

Università di Pisa

Facoltà di Agraria

Corso di laurea specialistica in Biotecnologie Vegetali e
Microbiche

Studio dell'efficienza di
fitoestrazione da parte della
felce *Pteris vittata* L. in un
terreno contaminato da
arsenico

Relatore

Chiar.mo Prof. Giovanni Vallini

Correlatore

Dott.ssa Adriana Ciurli

Candidato

Francesco Mignolli

A.A. 2005/2006

Indice

Riassunto 6

Parte prima

Introduzione 8

1.1	Il problema dell'inquinamento ambientale	9
1.1.1	La situazione in Europa	10
1.1.2	Inquinamento dei suoli	12
1.1.2.1	Esposizione diretta	14
1.1.2.2	Accumulo negli alimenti	15
1.1.3	Tecnologie di bonifica	15
1.1.3.1	Biologiche	16
1.1.3.2	Chimiche	16
1.1.3.3	Fisiche	16
1.1.3.4	Termiche	17
1.1.4	Metodo ex-situ	18
1.1.5	Metodo in-situ	18
1.2	Phytoremediation	21
1.2.1	Applicazioni e meccanismi	22
1.2.1.1	Estrazione	23
1.2.1.2	Degradazione	23
1.2.1.3	Volatilizzazione	24
1.2.1.4	Immobilizzazione	24
1.2.1.5	Controllo idraulico	24
1.2.2	Rizofiltrazione	25
1.2.3	Fitostabilizzazione	27
1.2.4	Fitovolatilizzazione	29
1.2.5	Fitodegradazione	32
1.2.6	Fitoestrazione	34
1.3	Resistenza ai metalli e piante iperaccumulatrici	40

1.3.1	Esclusione	41
1.3.2	Accumulo	42
1.3.3	Iperaccumulo	42
1.3.3.1	Significato ecologico dell'iperaccumulo dei metalli	45
1.3.3.2	Basi fisiologiche della metallo-tolleranza	48
1.4	L'arsenico	59
1.4.1	L'arsenico nell'ambiente	60
1.4.2	Tossicità dell'arsenico	65
1.4.2.1	Meccanismo di tossicità dell'arsenico pentavalente	66
1.4.2.2	Meccanismo di tossicità dell'arsenico trivalente	68
1.4.2.3	Fitotossicità dell'arsenico	69
1.4.3	Tecnologie per il trattamento di bonifica dell'arsenico	71
1.4.3.1	Solidification/Stabilization (S/S)	72
1.4.3.2	Vitrification	72
1.4.3.3	Soil washing/Acid extraction	72
1.4.3.4	In-situ soil flushing	72
1.4.3.5	Precipitation/Coprecipitation	73
1.4.3.6	Membrane filtration (MF)	73
1.4.3.7	Adsorption	73
1.4.3.8	Ion exchange	74
1.4.3.9	Electrokinetic treatment	74
1.4.4	Potenzialità delle tecniche di fitorisanamento	74
1.4.4.1	Fitostabilizzazione	75
1.4.4.2	Fitovolatilizzazione	76
1.4.4.3	Fitoestrazione/Rizofiltraazione	76
1.5	<i>Pteris vittata</i> L.: una felce iperaccumulatrice di arsenico	78
1.5.1	Cenni botanici	78
1.5.1.1	Struttura delle felci	78
1.5.1.2	<i>Pteris vittata</i> L.	84
1.5.2	Fisiologia della tolleranza e dell'iperaccumulo di arsenico in <i>Pteris vittata</i>	87
1.5.2.1	Evoluzione del fenomeno dell'iperaccumulo di arsenico nelle felci	87
1.5.2.2	Assorbimento, trasporto e accumulo dell'arsenico	88
1.5.2.3	Localizzazione dell'arsenico in <i>P. vittata</i>	92
1.5.2.4	Ruolo dei composti tiolici nella tolleranza e iperaccumulo di As in <i>P. vittata</i>	94
1.6	Scopo della Tesi	97

Parte seconda

Materiali e Metodi 100

- 2.1 Materiale vegetale 101
 - 2.1.1 Raccolta e semina delle spore 101
 - 2.1.1.1 Semina su mezzo agarizzato 102
 - 2.1.1.2 Semina su terreno 103
 - 2.1.2 Trapianto degli sporofiti 106

- 2.2 Prove in idroponica 110
 - 2.2.1 Acclimatazione all'idroponica 110
 - 2.2.2 Soglie di sopravvivenza 112
 - 2.2.2.1 Soglia di sopravvivenza all'As(V) 112
 - 2.2.2.2 Soglia di sopravvivenza all'As(III) 114
 - 2.2.3 Prove di *uptake* dell'arsenico 115

- 2.3 Prove su terreni contaminati 117
 - 2.3.1 Breve descrizione dell'ex sito industriale 117
 - 2.3.1.1 I terreni 118
 - 2.3.2 Allestimento della prova 119

- 2.4 Metodologia analitica 123
 - 2.4.1 Caratteristiche generali dello strumento 123
 - 2.4.2 Analisi dei campioni tramite ICP-OES 126
 - 2.4.2.1 Preparazione dei campioni vegetali 127
 - 2.4.2.2 Preparazione dei campioni di suolo 128

- 2.5 Indici dell'efficienza di fitoestrazione 129

Parte terza

Risultati 132

- 3.1 Prove in idroponica 133
 - 3.1.1 Soglie di sopravvivenza 133
 - 3.1.1.1 Soglia di sopravvivenza all'As(V) 133
 - 3.1.1.2 Soglia di sopravvivenza all'As(III) 143
 - 3.1.2 Prova di *uptake* in idroponica 151
- 3.2 Prove su terreni contaminati 159

Parte quarta

Discussioni 170

Parte quinta

Conclusioni 185

Appendice 189

Bibliografia 209

Ringraziamenti 220

Riassunto

L'arsenico è un metalloide tossico, causa di avvelenamenti e responsabile di alterazioni cancerose della pelle, dei polmoni e della vescica. Sebbene normalmente diffuso nell'ambiente, le numerose attività antropiche, come la lavorazione dei metalli, la combustione di carbone, le attività minerarie, la produzione di sostanze coloranti di prodotti chimici e antiparassitari, hanno contribuito ad aumentarne i livelli specialmente nel suolo. È stato stimato che nell'ultimo decennio le immissioni di arsenico da parte dell'uomo si sono collocate tra 52000 a 112000 tonnellate/anno. La *Phytoremediation* è una tecnologia emergente basata sulla capacità di alcune piante di rimuovere particolari sostanze contaminanti da suoli e acque, che negli ultimi anni è oggetto di particolare attenzione da parte della comunità scientifica in virtù soprattutto dei bassi costi e del ridotto impatto ambientale. Uno dei meccanismi fisiologici, noto come iperaccumulo, riguarda la capacità di certe piante di assorbire grandi quantità di una sostanza inquinante (solitamente un metallo tossico) accumulandola all'interno delle cellule. In questo modo i contaminanti vengono progressivamente rimossi dal terreno eliminando le piante. Sebbene siano note numerose specie vegetali adatte alla rimozione di un'ampia varietà di elementi tossici nessuna pianta aveva dimostrato un comportamento come iperaccumulatrice di arsenico fino alla recente scoperta della felce *Pteris vittata* L. che ha aperto potenzialmente la porta alla *Phytoremediation* di siti contaminati da arsenico.

Nel presente lavoro, una volta ottimizzate le tecniche di coltivazione della felce, sono state allestite prove in idroponica e su terreni provenienti da un ex sito industriale contaminato da As. In idroponica le piante sono state esposte a soluzioni nutritive a concentrazioni crescenti

di arsenato e arsenito di sodio e della combinazione di entrambi i sali. Per quanto riguarda le prove su terreno, è stata, in primo luogo, valutata la capacità di adattamento di *P. vittata* a suoli marginali di tipo industriale e successivamente, l'efficienza di fitoestrazione dell'arsenico. Per ciascuna prova, sono stati prelevati campioni di radici e fronde e sottoposti ad analisi mediante ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry*) per misurarne le quantità di arsenico accumulate. I risultati di questo studio dimostrano, oltre a sorprendenti potenzialità di adattamento a diverse situazioni ambientali, soprattutto la straordinaria abilità di *P. vittata* ad iperaccumulare elevate concentrazioni di As soprattutto nelle fronde rivelando una efficiente capacità di traslocazione dalle radici alla parte epigea.

Parte prima

Introduzione

1.1 Il problema dell'inquinamento ambientale

In un periodo di 45 anni, compreso tra il 1930 e il 1975, la popolazione mondiale è aumentata di circa 2 miliardi portandosi a 4 miliardi di individui. Con lo stesso incremento è giunta a quota 6 miliardi nei 25 anni successivi, dal 1975 al 2000. Secondo le ultime proiezioni entro il 2020 dovrebbe raggiungere gli 8 miliardi. La crescita della popolazione e il conseguente sviluppo di aree urbane densamente popolate, insieme a una generale industrializzazione, ha come una delle sue più pericolose conseguenze, la minaccia dell'ambiente (Ward & Singh, 2004).

Sono sempre più numerosi i casi di contaminazione accidentale con sostanze nocive per l'ambiente e per l'uomo, e tra questi, per esempio i casi ormai storici legati al rilascio di diossina in Belgio, a Seveso in Italia e a Bophal in India.

I principali problemi legati alla dispersione di rifiuti urbani e industriali riguardano la contaminazione dei suoli e delle acque. Lo smaltimento controllato e incontrollato dei rifiuti, le perdite accidentali di inquinanti durante processi industriali, le attività di estrazione mineraria, e le applicazioni di fanghi e liquami in agricoltura, sono responsabili della diffusione nel nostro ecosistema di sostanze contaminanti (fig. 1.1).

Il numero e il tipo di sostanze organiche e inorganiche coinvolte è molto numeroso e comprende: metalli pesanti, sostanze putrescibili e combustibili, rifiuti pericolosi, esplosivi, e derivati del petrolio. La componente inorganica, rappresentata quasi esclusivamente dai metalli pesanti e dai metalloidi, presenta problematiche ben diverse rispetto a quella organica, non potendo, infatti essere degradati dai microrganismi del suolo, necessitano di essere immobilizzati o di essere rimossi fisicamente (Ghosh & Singh, 2005).

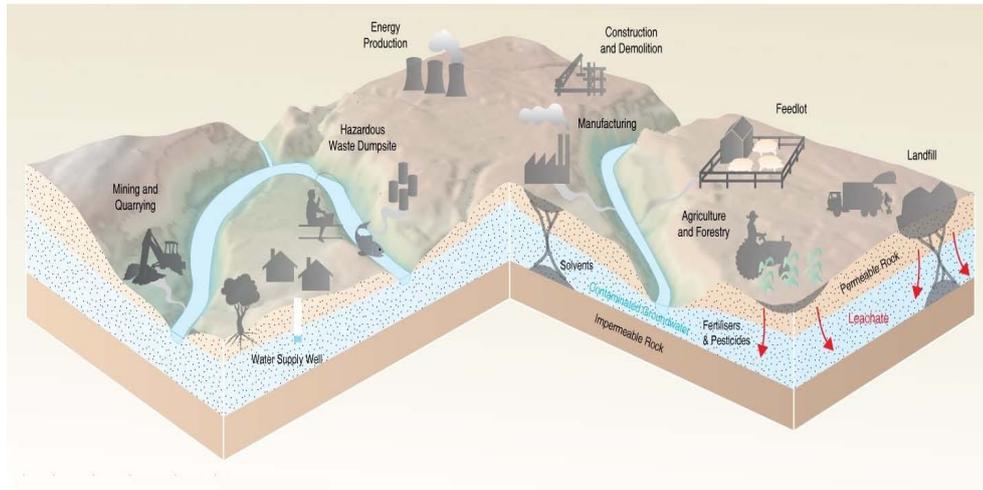


Figura 1.1 Fonti di inquinamento e il loro impatto sull'ambiente

1.1.1 La situazione in Europa

La contaminazione dei suoli in Europa è ampiamente diffusa ed esiste sia come realtà localizzata, soprattutto in corrispondenza di siti industriali, sia come fenomeno esteso per effetto delle precipitazioni atmosferiche, es. piogge acide, della progressiva lisciviazione di sostanze chimiche usate in agricoltura o a causa dell'erosione del suolo attraverso cui può avvenire la dispersione di sostanze inquinanti.

Secondo le ultime stime, in Europa ci potrebbero essere più di due milioni di siti potenzialmente contaminati (siti di cui sia sospettata una contaminazione del suolo senza che sia avvenuta ancora una verifica per accertarne le reali dimensioni e impatto sull'ambiente) e un numero pari a circa 100 000 siti per i quali è sicura la necessità di interventi di risanamento (EEA, 2005).

La maggiore concentrazione di siti si trova prevalentemente nelle zone industriali del nord-ovest dell'Europa, dal Regno Unito attraverso il nord-est della Francia, il Belgio e l'Olanda fino alla regione della Ruhr in Germania. Altre zone riguardano la valle del Po nel milanese e la regione, nota come “il triangolo nero”, caratterizzata dalla presenza dell'industria pesante e che comprende Repubblica Ceca, Slovacchia, Germania orientale e parte della Polonia (fig. 1.2) (EEA, 2005).

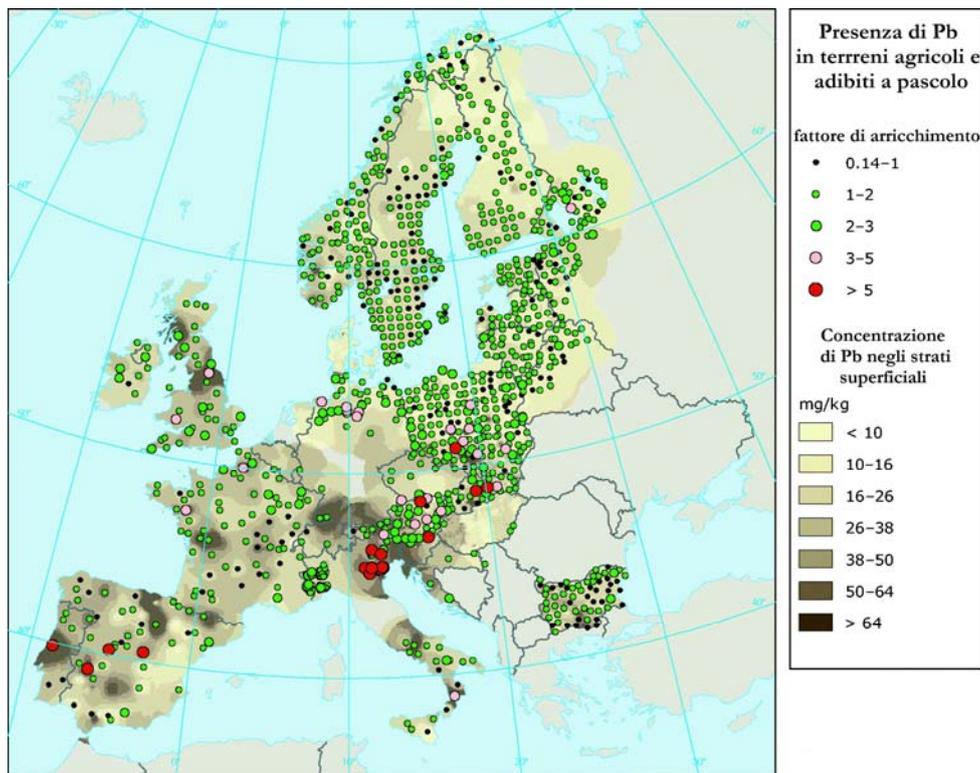


Figura 1.2 Distribuzione in Europa dei principali siti contaminati dalla presenza di Pb

Comunemente, la causa dell'inquinamento è da attribuire alla presenza di metalli pesanti, idrocarburi, idrocarburi clorurati e residui dell'attività estrattiva. A questi, negli ultimi 30 anni, si è unito un'ampia serie di rifiuti considerati pericolosi e smaltiti incautamente in discarica senza alcuna precauzione, provocando l'inquinamento delle acque di falda e di superficie.

Le problematiche legate alle aree ex-industriali e militari sono spesso poco note, poiché è difficile prevedere la natura e la varietà degli inquinanti accumulati in quei suoli. Molti insediamenti militari abbandonati hanno a che fare con materiali pericolosi e sostanze radioattive di cui in certi casi non ne esiste alcuna documentazione. E' il caso di molti paesi dell'Est Europa come l'Estonia, dove quasi il 2% del territorio è occupato da basi militari utilizzate in passato dall'esercito sovietico.

In alcune parti dell'Europa come in Belgio, Danimarca, Olanda e nel nord della Francia, l'attività agricola è motivo anch'essa di inquinamento ambientale a causa della continua distribuzione di antiparassitari in grado di percolare nel terreno e di raggiungere le falde sotterranee. L'applicazione al terreno dei fanghi provenienti dagli impianti industriali, pratica utilizzata per aumentare la dotazione di sostanze minerali utili, porta all'accumulo progressivo di metalli pesanti con un danno a lungo termine alla fertilità. Per questa ragione l'Unione Europea è intervenuta con una direttiva che impone il divieto di utilizzare a scopi agricoli fanghi di origine industriale non sottoposti ad alcun trattamento e ponendo severi limiti anche per la distribuzione di quelli trattati. Attualmente meno del 5% dei terreni destinati all'agricoltura dell'UE risulta essere correntemente trattata con questi fanghi (EEA, 2005).

1.1.2 Inquinamento dei suoli

In Europa, come in molte parti del mondo, attività umane quali l'agricoltura, l'urbanizzazione e lo stesso turismo stanno determinando un progressivo degrado del suolo.

In linea di principio, il terreno rappresenta una risorsa rinnovabile, ma i processi naturali di formazione del suolo sono molto lenti. Per questo motivo il totale risanamento dei danni causati dall'eccessivo sfruttamento o da altre forme di pressione antropiche potrebbe richiedere tempi molto lunghi.

Sebbene in generale i problemi di degrado del suolo in Europa siano meno gravi che in altre zone del mondo, fenomeni quali la contaminazione localizzata del terreno, la salinizzazione, la compattazione, l'erosione idrica ed eolica interessano vaste zone del continente.

Alcuni dati: solo nell'Europa occidentale esistono migliaia di siti contaminati, mentre l'aumento delle concentrazioni saline e dell'alcalinità interessa quasi 4 milioni di ettari di terreno concentrati soprattutto nei paesi del Mediterraneo e dell'Europa dell'Est. Sempre in Europa, una superficie di circa 115 milioni di ettari è esposta all'erosione eolica e allo stesso tempo avanza il fenomeno della desertificazione che sempre più va ad interessare alcune zone dell'area mediterranea (EEA, 2003).

Il degrado del suolo legato all'aumento della produzione di rifiuti e dell'uso diffuso di sostanze chimiche, registrato specialmente negli ultimi 40 anni, sta ponendo notevoli problemi di tipo ambientale e per la salute dell'uomo.

Le principali fonti di contaminazione del suolo sono le seguenti:

- utilizzo di discariche abusive o inadeguate;
- gestione impropria di sostanze pericolose (es. dispersioni accidentali, stoccaggio inadatto)
- abbandono di siti industriali, militari e minerari;
- incidenti.

La contaminazione del suolo può provocare molteplici effetti sulla salute umana, sugli ecosistemi e sull'economia, nei seguenti modi:

- scarichi di contaminanti nel terreno, nelle acque sotterranee o superficiali;
- assorbimento di contaminanti da parte delle piante;
- inalazione di polveri o sostanze volatili;
- incendi o esplosioni di gas di discarica;
- produzione di rifiuti secondari pericolosi;

I contaminanti solubili in acqua e volatili che penetrano nel suolo possono infiltrarsi nelle acque sotterranee mediante meccanismi di scambio tra l'acqua presente nei pori del terreno e l'acqua sotterranea. La mobilità e i livelli di esposizione variano in misura considerevole, a seconda del tipo di contaminante, delle condizioni locali del suolo, dell'ecosistema interessato e del clima. Molte specie sono più sensibili ai contaminanti rispetto agli esseri umani e possono essere danneggiate da concentrazioni inferiori ai limiti stabiliti per la sicurezza delle acque potabili destinate al consumo umano. Gli inquinanti più mobili sono i composti organo-alogenati e i prodotti petroliferi.

I metalli pesanti presentano una mobilità inferiore, che tuttavia può aumentare in determinate condizioni (es. pH, sostanza organica ecc.) (EEA, 2003).

1.1.2.1 Esposizione diretta

I cambiamenti di destinazione d'uso dei terreni possono essere la causa di un aumento dell'esposizione ai suoli contaminati. In passato, molti ex siti industriali e le discariche abbandonate venivano riutilizzati per altri scopi, ad esempio per l'edilizia abitativa e la costruzione di scuole e centri di ricreazione. Il rischio di ingestione o di contatto con la pelle aumenta

con la frequenza dell'esposizione e dipende dal tipo di contaminazione e dal relativo grado di tossicità. I bambini nei parchi-giochi sono considerati i soggetti più vulnerabili ed esposti.

E' possibile inalare sostanze volatili e particelle di suolo (attraverso la polvere) da siti contaminati. Fonti tipiche sono gli ex siti di trasformazione o stoccaggio del petrolio, a causa della presenza di sostanze volatili, le discariche contenenti scorie di metalli pesanti.

La quantificazione degli effetti dell'esposizione diretta è raramente disponibile, poiché gli effetti dell'ingestione delle particelle di suolo e del contatto cutaneo nella maggior parte dei casi non sono immediatamente visibili, né misurabili, e si sa poco sul rapporto dose-effetto.

1.1.2.2 Accumulo negli alimenti

I metalli pesanti, in particolare cadmio e rame, possono accumularsi in misura elevata nei vegetali. Questo fenomeno si verifica frequentemente nel caso di ex discariche recuperate e utilizzate a scopo agricolo. La contaminazione delle acque di superficie può provocare, inoltre, l'accumulo di sostanze contaminanti nei pesci tra cui molti composti organici clorurati assorbiti in modo particolarmente rapido dal tessuto adiposo e anche certi metalli, tipo il mercurio (EEA, 2003).

1.1.3 Tecnologie di bonifica

Le tecnologie di bonifica permettono di eliminare o di rendere innocue le sostanze che inquinano suoli o acque. Secondo il meccanismo prevalente su cui si basano, si possono distinguere tecnologie biologiche, chimiche, fisiche e termiche.

1.1.3.1 Tecnologie biologiche

I metodi di risanamento biologici sfruttano soprattutto le capacità dei microrganismi per ottenere la mineralizzazione o la trasformazione dei contaminanti in forme meno tossiche, meno mobili oppure più tossiche ma meno biodisponibili. I principali vantaggi di questi metodi riguardano la possibilità di intervenire su un vasto numero di molecole inquinanti di tipo organico, il loro potenziale effetto benefico sulla struttura e sulla fertilità del terreno e il fatto di essere assolutamente non invasivi. Per contro, in un intervento di risanamento biologico, di se stesso lento e influenzato dalle condizioni ambientali, i tempi di realizzazione risultano difficili da stimare, oltre al fatto che non tutti i contaminanti possono essere trattati con mezzi biologici (Evans & Furlong, 2003).

1.1.3.2 Tecnologie chimiche

In questo genere di trattamenti, i composti tossici sono distrutti, immobilizzati o neutralizzati attraverso una serie di reazioni chimiche. Il principale pregio di un approccio di tipo chimico è che consente la degradazione di sostanze, la cui natura recalcitrante o estremamente tossica, le rende incompatibili con i sistemi biologici. E' probabile, tuttavia, che durante il processo chimico si accumulino composti derivati da una parziale degradazione, rivelandosi talora più tossici di quelli di partenza, oppure che siano gli stessi reagenti introdotti nel terreno a causare danni e inquinamento (Evans & Furlong, 2003).

1.1.3.3 Tecnologie fisiche

I trattamenti fisici non possono essere considerati dei sistemi di risanamento in senso stretto, perché si basano su procedimenti in grado di separare il contaminante dalla matrice solida o liquida e di ottenerli in

forma concentrata, destinandoli successivamente al trattamento o allo smaltimento finale. Il fatto che si tratti di interventi puramente fisici, senza cioè l'aggiunta di reagenti chimici, potrebbe essere visto come un vantaggio riducendo molto i rischi di contaminazioni secondarie. Tuttavia, i contaminanti non sono distrutti e la loro concentrazione richiede necessariamente accorte misure di contenimento e se a ciò si aggiungono i costi sempre crescenti per lo smaltimento in discarica, soprattutto per lo smaltimento di rifiuti speciali, questa opzione appare sempre meno conveniente.

1.1.3.4 Tecnologie termiche

I trattamenti termici possono indurre la separazione dell'inquinante mediante desorbimento/volatilizzazione, causarne la distruzione per pirolisi o incenerimento o provocarne l'immobilizzazione mediante fusione della matrice solida nella quale si trovano (nota come vitrificazione). Sebbene più di ogni altro procedimento permetta di ottenere la totale degradazione dei contaminanti, i costi energetici, il rischio di generare nuovi residui inquinanti e gli effetti negativi sulla struttura e sulla sostanza organica del terreno, ne limitano l'applicabilità (Evans & Furlong, 2003).

Le diverse metodiche di ripristino di un sito contaminato vengono comunemente raggruppate in due categorie, tecniche *ex-situ* e tecniche *in-situ*, semplicemente prendendo in considerazione il luogo dell'intervento di bonifica, direttamente sul sito interessato dalla contaminazione o altrove.

1.1.4 Metodo *ex-situ*

Il sistema richiede la rimozione in seguito all'escavazione del terreno contaminato e il successivo trattamento di bonifica che può essere "on site" se fatto avvenire sul luogo dell'escavazione, oppure "off site" se è necessario ricorrere a impianti localizzati altrove.

Le tecnologie di bonifica più comuni applicate agli interventi *ex-situ* sono raggruppate in tre classi omogenee, ottenute tenendo conto del tipo di azione esercitata sui contaminanti:

- separazione e concentrazione: l'inquinante è separato dal suolo/acqua, concentrato e inviato al trattamento finale;
- trasformazione: l'inquinante è convertito mediante reazioni chimiche o biologiche in un prodotto meno pericoloso o innocuo;
- immobilizzazione/inertizzazione: la mobilità dell'inquinante è ridotta mediante la formazione di prodotti poco solubili o per inglobamento in una matrice che ne impedisce fisicamente il movimento (Nardella, 2003)

1.1.5 Metodo *in-situ*

Le tecnologie *in-situ* a differenza di quelle *ex-situ*, non prevedono l'escavazione del terreno da bonificare. Si definiscono *in-situ* quelle tecniche di biorimediazione che non comportano alcuna movimentazione di terreno e portano alla diminuzione della biodisponibilità del contaminante nel suolo attraverso processi di degradazione, trasformazione e immobilizzazione. Le tecniche *in-situ*, in virtù di costi di esercizio più bassi e un minore impatto sull'ecosistema, sono certamente da favorire rispetto a quelle *ex-situ*. Comunemente un intervento di bonifica *ex-situ* in suoli contaminati da metalli pesanti, prevede l'escavazione di un notevole volume di terreno, la rimozione dello strato

contaminato, stabilizzazione fisica oppure lavaggio del terreno con acidi forti o sostanze chelanti (Greman, 2005). In alternativa si può avere trasporto e seppellimento del suolo inquinato in siti destinati a discarica, ma tale intervento non fa altro che trasferire altrove il problema della contaminazione e sottoporre gli operatori a rischi durante la movimentazione del materiale contaminato (Ghosh & Singh, 2005).

Alcune tra le alternative di biorisanamento *in-situ*, comprendono la diluizione del terreno contaminato fino a livelli di sicurezza per mezzo dell'apporto di terreno non contaminato e la copertura del suolo con materiale inerte. Nel caso di inquinamento da sostanze inorganiche (es. metalli pesanti) può risultare efficace portarle all'immobilizzazione aggiungendo al suolo agenti complessanti o correttivi che aumentino il pH del terreno diminuendo la solubilità di metalli come Cd, Cu, Ni e Zn. Anche in questi casi, però, gli interventi comportano sempre dei costi piuttosto alti e alterano comunque un ambiente spesso già compromesso in partenza (Mench et al.,1994; Alloway & Jackson,1991).

La scelta di una tecnologia di bonifica è determinata da molteplici fattori, sia di tipo tecnico sia di tipo economico e legale, di seguito elencati.

Fattori legati alla natura dell'inquinante:

- o la resistenza all'attacco da parte dei microrganismi;
- o le caratteristiche chimico-fisiche che determinano la mobilità e la persistenza dei composti nei suoli e nelle acque;
- o la tossicità degli inquinanti, che determina le misure cautelative di sicurezza da adottare.

Fattori legati alla tecnologia:

- o i limiti di efficacia del trattamento, il livello di sviluppo delle tecnologie applicabili;

-
- o la presenza di effetti indesiderati collaterali al trattamento quali rumore, cattivi odori, produzione di polveri, rilascio di sostanze a loro volta inquinanti;
 - o rischi di incidenti associati al metodo di trattamento in relazione al sito.

Fattori di tipo economico:

- o il valore del sito prima e dopo l'intervento, il costo del trattamento, il tempo utile per la bonifica, i costi di trasporto e dei macchinari, il costo del monitoraggio e delle analisi ecc.;
- o il costo associato a una eventuale mancata produzione (Nardella, 2003a).

1.2 Phytoremediation

L'urgente necessità di decontaminare vaste porzioni di territorio è rallentata e contrastata dal costo elevatissimo delle tecniche attualmente disponibili, normalmente di tipo chimico-ingegneristico, che, oltre ad essere poco convenienti dal punto di vista economico, risultano essere invasive e origine di profonde alterazioni chimiche, fisiche e biologiche per i substrati oggetto della bonifica. In ogni caso, i costi da sostenere per la realizzazione di questi interventi sono molto elevati, così che un'operazione di disinquinamento può diventare spesso insostenibile economicamente. Le bonifiche che si avvalgono di tecniche chimico-fisiche, infatti, restituiscono spesso una terra non più adatta alla coltivazione poiché durante il processo di decontaminazione ogni attività biologica compresa quella dei microrganismi utili (funghi, batteri azoto fissatori, micorrize) e della fauna terricola viene drasticamente compromessa (Mancuso et al. 2004).

Per ovviare a queste problematiche, la ricerca si è orientata verso lo sviluppo di alternative più economiche e rispettose dell'ambiente. Una tecnologia innovativa, affidabile, ecosostenibile ed applicabile su larga scala è rappresentata dalla *phytoremediation*, che prevede l'utilizzo di specie vegetali per la bonifica da sostanze organiche e/o inorganiche inquinanti. Il termine *phytoremediation* (dal prefisso Greco *phyto*=pianta unito alla radice latina *remedium*=rimedio per porre riparo a un male) è relativamente recente: coniato nel 1991, raggruppa al suo interno una serie di tecniche che sfruttano la capacità delle piante e dei microrganismi associati alla rizosfera di degradare, rimuovere, o contenere alcuni inquinanti presenti nel suolo, nei sedimenti e nelle acque (USEPA, 2000).

1.2.1 Applicazioni e Meccanismi

La *phytoremediation* può essere applicata per il trattamento di substrati solidi (es. terreni, sedimenti inquinati), liquidi (es. acque di scarico industriali e urbane, acque di drenaggio di terreni agricoli e acque di falda) e gassosi (inquinanti di natura volatile) (Salt et al., 1998). La tecnologia può essere adottata con una certa efficacia contro un ampio numero di inquinanti organici e inorganici. Molte delle sostanze di natura organica che derivano dalle attività umane si comportano come xenobiotici per gli organismi viventi, risultando la maggior parte delle volte tossici e carcinogenici. Queste molecole sono rilasciate nell'ambiente in seguito a perdite accidentali da serbatoi (es. carburanti e solventi), alle attività militari (es. esplosivi, armi di tipo chimico), agricole (prodotti fitosanitari, erbicidi), industriali (industrie chimiche, petrolchimiche), trattamento del legname ecc...

In base alle caratteristiche chimiche, i composti organici, possono essere degradati a livello della rizosfera oppure prelevati dalla pianta e successivamente degradati, sequestrati o volatilizzati. E' il caso per esempio, di alcuni solventi come il TCE (tricloroetilene) comune inquinante delle acque di falda (Newman et al., 1997), di erbicidi come l'atrazina (Burken & Schnoor, 1997), di esplosivi come il TNT (trinitrotoluene) (Van Aken et al., 2004), di idrocarburi quali gasolio, benzene, toluene e PAHs (idrocarburi policiclici aromatici), e dei PCBs (bifenili policlorinati) (Pilon-Smits, 2005).

A differenza dei composti organici che in molti casi possono essere mineralizzati, gli inquinanti di natura inorganica devono per forza di cose essere rimossi fisicamente dal substrato, oppure convertiti in forme inerti o comunque resi non più biodisponibili (Cunningham & Ow, 1996).

Tra i composti di natura inorganica per i quali è possibile intervenire con tecniche di fitorisanamento si possono includere i macroelementi e microelementi essenziali per le piante, come i nitrati e fosfati, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn che, se rilasciati in quantità superiori a certi limiti per effetto delle attività umane, possono esibire un'estrema tossicità (Lasat, 2002). Oppure elementi non essenziali quali Cd, Hg, Pb, Al e As (Cobbett, 2003) e in certi casi anche isotopi radioattivi come ^{238}U , ^{137}Cs e ^{90}Sr (Dushenkov, 2003).

La *phytoremediation* può essere descritta in base ai processi naturali che presiedono alla rimozione delle sostanze inquinanti. Tali meccanismi comprendono: l'estrazione e l'accumulo nei tessuti delle piante dei contaminanti, la degradazione attraverso processi biochimici, la volatilizzazione, l'immobilizzazione dei contaminanti nella zona di interfaccia suolo-radice, il controllo idraulico mediante copertura vegetale del movimento del *plume* nelle acque di falda e dei fenomeni erosivi e di infiltrazione (USEPA, 2000).

1.2.1.1 Estrazione

Il principio di estrazione o di fitoestrazione si basa sulla possibilità di coltivare specie vegetali note per asportare e accumulare determinate sostanze contaminanti nella loro parte epigea (fusto e foglie) ottenendo a seguito di ripetuti interventi di sfalcio la rimozione progressiva dell'inquinante dal terreno interessato (USEPA, 2000).

1.2.1.3 Degradazione

Le piante sono in grado di promuovere la degradazione delle sostanze inquinanti a livello della rizosfera, sia rilasciando enzimi attraverso le

radici, sia stimolando la microflora del terreno. La maggior parte dei microrganismi del suolo, siano essi simbiotici (es. rizobatteri e micorrize) o capaci di vita autonoma, infatti, vive in stretta associazione con le radici, traendo nutrimento dalle sostanze rilasciate negli essudati radicali della pianta. Questo porta ad un incremento complessivo dell'attività microbica della rizosfera con conseguenze positive anche sulla crescita della pianta stessa (Khan, 2005).

1.2.1.4 Volatilizzazione

Molti composti tossici possono essere trasformati dalle piante e rilasciati nell'atmosfera come molecole volatili. La volatilizzazione permette di rimuovere completamente gli inquinanti da un sito senza la necessità di una continua raccolta del materiale vegetale e del suo successivo smaltimento (Pilon-Smits, 2005).

1.2.1.5 Immobilizzazione

L'immobilizzazione consiste nel limitare la mobilità nel suolo degli inquinanti rendendoli non più biodisponibili e quindi meno tossici per l'uomo e per l'ambiente (USEPA, 2000). In presenza di piante è infatti possibile che si verifichino fenomeni di assorbimento, adsorbimento e precipitazione dei composti nell'intorno della zona esplorata dalle radici (Saleh et al., 2004).

1.2.1.6 Controllo idraulico

Il controllo idraulico o *phytohydraulics plumes control*, si riferisce all'uso di piante per limitare il movimento delle acque e della migrazione degli inquinanti, ottenuto per effetto dell'assorbimento e del consumo idrico dell'evaporazione e della traspirazione. Questa tecnologia trova

applicabilità sia alle acque di falda che alle acque superficiali contaminate da inquinanti organici che inorganici (Saleh et al., 2004).

Sulla base dei processi descritti si riconoscono cinque principali modalità d'azione della *phytoremediation*:

- Rizofiltrazione
- Fitostabilizzazione
- Fitovolatilizzazione
- Fitodegradazione
- Fitoestrazione (Salt et al., 1998; USEPA, 2000)

1.2.2 Rizofiltrazione

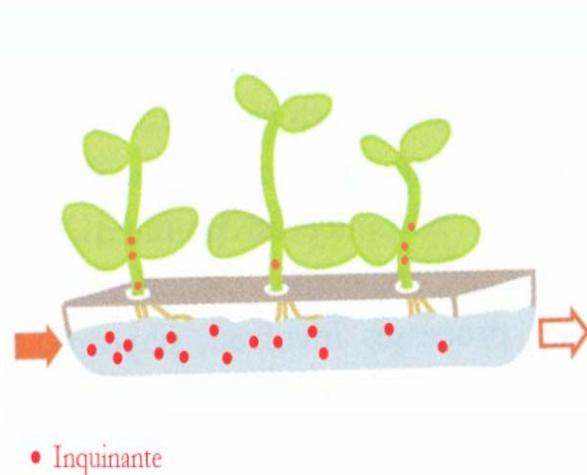


Figura 1.3 Rappresentazione schematica del meccanismo di rizofiltrazione

La rizofiltrazione prevede che i contaminanti presenti in soluzione siano assorbiti e traslocati dalle piante oppure fatti precipitare e immobilizzati a livello delle radici (fig. 1.3). La tecnologia si presta soprattutto al trattamento delle acque di superficie o di falda che risultino moderatamente inquinate. Non trova applicabilità per il risanamento di terreni o fanghi dal momento che è necessario che i contaminanti si trovino in soluzione e liberi di entrare in contatto con l'apparato radicale

delle piante. I contaminanti così accumulati o immobilizzati sono asportati attraverso la rimozione fisica delle piante (USEPA, 2000).

Il trattamento delle acque può avvenire *in-situ* oppure *ex-situ*.

Nel caso delle applicazioni *in-situ*, le acque sottoposte al trattamento devono essere quanto più superficiali possibile, dal momento che la profondità delle radici delle piante potrebbe non essere la stessa del corpo idrico. Se così fosse, si renderebbe necessario produrre una circolazione forzata dell'acqua per assicurare un trattamento completo, ma con costi maggiori quanto più profondo è il corpo idrico interessato.

Un impianto *ex-situ* può essere situato anche lontano dalla zona da bonificare e oltre ad essere più facilmente monitorabile, può essere disegnato in modo che la profondità raggiunta dall'acqua da trattare sia il più possibile in proporzione a quella raggiunta dalle radici. Il sistema si presta efficacemente anche per la decontaminazione delle acque di falda mediante il pompaggio dell'acqua verso l'impianto (USEPA, 2000).

Le piante utilizzate a questo scopo, oltre ad essere in grado di accumulare e tollerare significative concentrazioni delle sostanze contaminanti, devono sviluppare anche una considerevole biomassa radicale per avere una più estesa superficie di contatto con il mezzo liquido. Sono molteplici le specie acquatiche per le quali è stata dimostrata una certa attitudine a rimuovere sostanze tossiche come molti metalli pesanti, tra queste il giacinto d'acqua (*Eichhornia crassipes*) e la lenticchia d'acqua (*Lemna minor*) (Prasad & Freitas, 2003). Nella maggior parte dei casi questo tipo di piante, tuttavia, ha un limitato potenziale di rizofiltrazione, a causa della limitata efficienza fitoestraente e soprattutto per il lento accrescimento dell'apparato radicale (Dushenkov et al., 1995).

Le piante terrestri, opportunamente allevate in idroponica, viceversa riescono a produrre apparati radicali di lunghezza ben maggiore,

estremamente fascicolati e con un'ampia superficie di contatto con il mezzo. Fra le piante che si sono dimostrate promettenti candidate per la rimozione di metalli pesanti nelle acque, possiamo ricordare il girasole (*Helianthus annuus*) per la rimozione del piombo (Dushenkov et al., 1995), e *Brassica juncea* adatta anche come plantula, quindi con bassissime esigenze di luce e nutrienti, all'assorbimento di Cd, Pb, Ni, Cr nonché di radionuclidi quali ^{90}Sr e ^{137}Cs (Salt et al., 1997).

1.2.3 Fitostabilizzazione

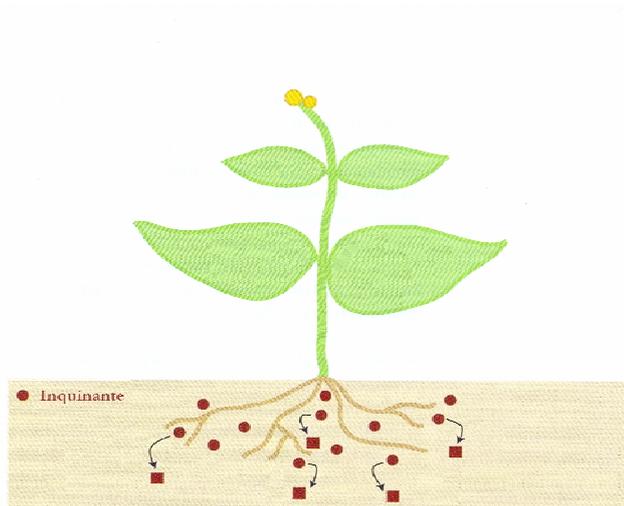


Figura 1.4 Rappresentazione schematica del meccanismo di fitostabilizzazione

La fitostabilizzazione è definita come l'immobilizzazione nel suolo di un contaminante attraverso assorbimento e accumulo da parte delle radici, oppure adsorbimento e/o precipitazione sulla superficie radicale o a livello della rizosfera (fig. 1.4). L'uso delle piante può inoltre impedire o limitare fortemente la migrazione delle sostanze inquinanti via lisciviati o la loro dispersione per effetto dell'erosione del terreno (USEPA, 2000).

Alla base della fitostabilizzazione si trovano meccanismi chimici e biochimici che portano alla diminuzione della biodisponibilità delle sostanze inquinanti: tra questi, l'incorporazione di molecole organiche

all'interno dei polimeri che compongono le lignine o le particelle di humus, la precipitazione e il sequestro di certi ioni metallici da parte degli ossidi/idrossidi di ferro legati alle particelle di terreno (Cunningham et al., 1995).

La fitostabilizzazione è una tecnologia di fitorimedio ovviamente *in-situ*, dai costi ridotti, dal momento che non è richiesto lo smaltimento né di materiali pericolosi né della biomassa vegetale prodotta e con un basso impatto ambientale contribuendo in molti casi alla ricostituzione di ecosistemi naturali compromessi. Sicuramente il più grosso limite è dato dal fatto che i contaminanti continuano a rimanere nel suolo e sono necessari monitoraggi costanti e protratti per tempi molto lunghi per garantire che non avvenga nessun rilascio e mobilitazione di sostanze nocive dal terreno alla falda o a terreni confinanti (USEPA, 2000).

La copertura vegetale, nella maggior parte dei casi, prevede la presenza sia di piante legnose ad alto fusto che di piante erbacee. Le specie arboree, come il pioppo, grazie ai tassi di traspirazione elevati riescono a mantenere un flusso idrico che tende verso la superficie prevenendo così il percolamento delle acque contaminate negli strati più profondi. Le piante erbacee, invece, creano un ostacolo all'erosione del suolo e allo scorrimento laterale dell'acqua in virtù del denso apparato radicale. Tra le piante erbacee, le specie appartenenti alla famiglia delle graminacee hanno una minore tendenza rispetto alle dicotiledoni ad accumulare inquinanti nella parte aerea e questo rende minima l'esposizione degli altri organismi (es. fauna erbivora) a sostanze tossiche (Pilon-Smits, 2005; Bennett et al. 2003).

Vetiveria zizanioides e *Sesbania rostrata*, sono due piante che grazie alla capacità di tollerare la presenza di metalli pesanti ed estreme condizioni ambientali hanno permesso, negli ultimi anni, di ricolonizzare aree

minerarie della Cina fortemente caratterizzate da elevate concentrazioni di piombo e zinco. In entrambi i casi si tratta di piante considerate pioniere dotate di crescita rapida, di un apparato radicale profondo e massiccio e capaci di tollerare condizioni pedo-climatiche proibitive nonché un ampio spettro di metalli tossici. Per quanto riguarda *S.rostrata*, una leguminosa, la simbiosi con il batterio azotofissatore *Azorhizobium caulinodans*, anch'esso probabilmente tollerante allo stress da metalli pesanti, determina un arricchimento del terreno di azoto, contribuendo ulteriormente al processo di ricolonizzazione e successione ecologica dei terreni contaminati (Wong, 2003).

1.2.4 Fitovolatilizzazione

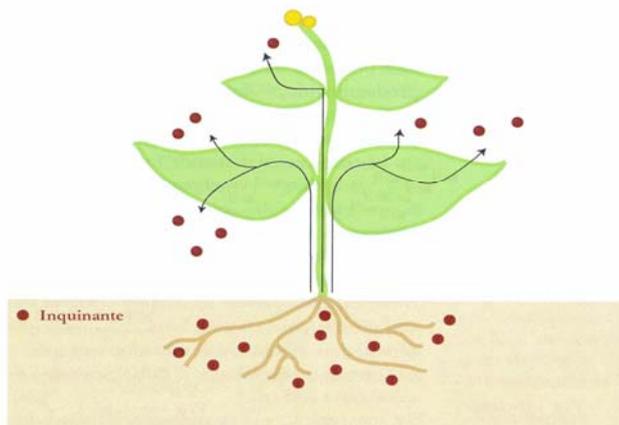


Figura 1.5 Rappresentazione schematica del meccanismo di fitovolatilizzazione

La fitovolatilizzazione consiste nell'assimilazione di una sostanza contaminante da parte di una pianta e nel suo rilascio nell'atmosfera in forma gassosa attraverso il flusso traspirativo (fig. 1.5). Prima di essere allontanate per volatilizzazione, le molecole subiscono nella maggior parte dei casi dei processi metabolici di trasformazione che ne riducono la tossicità (USEPA, 2000).

Sebbene molte di queste sostanze volatili risultino molto meno tossiche rispetto a quelle da cui derivano, la fitovolatilizzazione è comunque al centro di un dibattito sui possibili rischi ambientali legati al trasferimento dei problemi di inquinamento dal suolo all'atmosfera. Molti sono concordi nel sostenere che la fitovolatilizzazione dovrebbe essere circoscritta ad aree poste a una certa distanza dalle zone abitate e non interessate da condizioni climatiche tali da favorire una rapida deposizione al suolo dei composti volatili (Prasad & Freitas, 2003).

Nonostante la controversa questione sui reali benefici apportati, la fitovolatilizzazione si è dimostrata efficace per la decontaminazione dei siti inquinati sia da metalli pesanti che da sostanze organiche. Trova, infatti, applicabilità per il trattamento delle acque di falda contaminate da composti organici clorurati volatili come illustrato in alcune prove condotte in zone inquinate da TCE (tricloroetilene) effettuate impiegando ibridi di pioppo in grado di assorbire e volatilizzare il contaminante assorbito mantenendone minime quantità nei tessuti fogliari (Newman, 1997).

La fitovolatilizzazione di specie inorganiche è limitata a As, Se e Hg poiché possono formare composti gassosi (Nardella, 2003b). Anche se è chiaro il coinvolgimento dei microrganismi nella trasformazione dell'arsenico penta [As(V)] e trivalente [As(III)] in composti volatili come l'arsina [AsH₃], la monometilarsina [AsH₂(CH₃)], la dimetilarsina [AsH(CH₃)₂] e la trimetilarsina [As(CH₃)₃] (Turpeinen et al., 2002), non è ancora del tutto noto se esistono piante in grado di volatilizzare l'arsenico in quantità significative (Salt et al., 1998).

Nel corso del processo di fitovolatilizzazione del selenio, si ha la produzione di composti volatili a partire sia da forme organiche che inorganiche (selenato, selenito e Se-Met). Le molecole rilasciate in forma

organica, di cui la più rappresentativa è il dimetilseleniuro (DMSe), presentano dei livelli di tossicità oltre 600 volte più bassi dei loro precursori inorganici (Minorsky, 2003).

Lavori condotti su *Brassica juncea* e sulla macroalga *Chara canescens* hanno permesso di rivelarne interessanti potenzialità ai fini della rimozione del selenio soprattutto presente come selenocianato [SeCN⁻].

I meccanismi biochimici che sono responsabili dell'accumulo e della volatilizzazione del SeCN⁻ come DMSe, non sono stati ancora del tutto chiariti, si suppone, però che in *Brassica*, siano implicati i *pathways* per la trasformazione di tiocianato (sottoprodotto dell'idrolisi dei glucosinolati e analogo del selenocianato), in dimetilsolfuro (De Souza et al., 2002).

Il mercurio è considerato uno dei metalli più tossici per le piante con effetti deleteri sulla sintesi della clorofilla anche per quelle come *Salvia natans* e *Bacopa monnieri* considerate tolleranti (Ruiz et al. 2003).

Alcune fra le prospettive più incoraggianti per quanto riguarda l'uso delle piante per la detossificazione di quelli che sono tra i composti più tossici del mercurio, gli organomercuriali, provengono dall'uso della tecnologia del DNA ricombinante e dall'espressione nelle piante di geni microbici del metabolismo del mercurio (Kramer, 2005; Ruiz et al. 2003). Piante modificate in grado di esprimere il gene batterico *merB* della organomercurio liasi riescono a rompere la molecola di metilmercurio [CH₃Hg⁺] nello ione Hg²⁺, molto meno tossico, e metano. Le piante trasformate con il gene *merA*, invece, codificano una mercurio reductasi in grado di ridurre lo ione Hg²⁺ in mercurio elementare [Hg⁰] che è volatile e può allontanarsi così dalla cellula. Dalla combinazione dei due geni *merA* e *merB* si ottengono piante transgeniche dotate dell'intero set enzimatico per la degradazione del mercurio organico a mercurio elementare e capaci di sopportare livelli di fenilmercurioacetato nel

terreno circa 100 volte più alti di quelli che ucciderebbero piante non resistenti (Meagher & Heaton, 2005).

1.2.5 Fitodegradazione

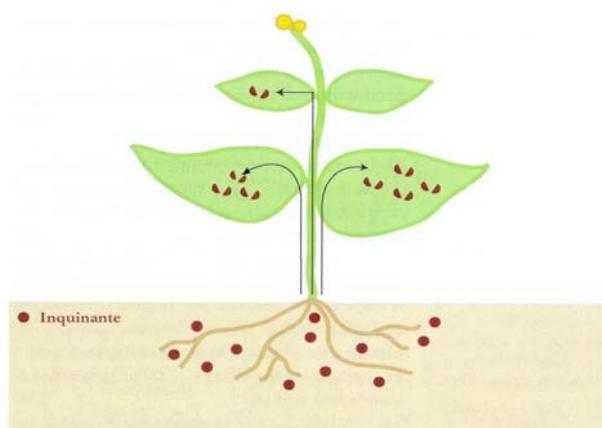


Figura 1.6 Rappresentazione schematica del meccanismo di fitodegradazione

Con il termine fitodegradazione si intendono tutti quei processi di degradazione dei contaminanti, messi in atto all'interno della pianta oppure all'esterno di essa, mediante enzimi essudati dalla pianta (fig. 1.6) (Nardella, 2003b).

Nella fitodegradazione, i composti organici possono essere mineralizzati completamente a CO_2 , acqua e Cl_2 , oppure solo parzialmente degradati in intermedi stabili e meno tossici immagazzinati nella cellula (Pilon-Smits, 2005).

Sebbene gli enzimi rilasciati dalla pianta (vedi tab. 1.1), come la nitroreductasi siano in grado di agire anche isolati, è solo nell'ambiente della rizosfera che la loro azione viene promossa. I prodotti essudati dalle radici, infatti, sono in grado di mantenere il pH entro valori compatibili con l'attività catalitica, come pure chelare ioni metallici che potrebbero

esercitare un'azione inibente nei confronti degli enzimi (Nardella, 2003b).

La degradazione delle molecole tossiche che avviene all'interno della pianta è il requisito essenziale perché si possa parlare di fitodegradazione in senso stretto. Recentemente, però, è stato fatto notare che certi microrganismi endofiti, in associazione ai tessuti vegetali, possono partecipare al metabolismo delle sostanze tossiche assimilate dalle piante. Un esempio è fornito da *Methylobacterium populum* ceppo Bj001, un endofita di pioppo (*Populus deltoides* x *nigra* DN34) per il quale è dimostrato un ruolo importante nella decomposizione di alcuni esplosivi come il 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT), l'esaidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX) e l'ottaidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,-tetrazocina (HMX) (Van Aken et al., 2004).

In colture axeniche di cellule di pioppo ibrido (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*), dove si può escludere ogni partecipazione metabolica di eventuali microrganismi, è stata invece osservata la naturale capacità della pianta a trasformare, e in parte anche mineralizzare, la molecola di tricloroetilene (TCE) in tricloroetano e in acido di-tricloroacetico, aprendo la strada a nuove prospettive di fitorisanamento (Newman, 1997).

Tabella 1.1 **Principali enzimi coinvolti nella fitodegradazione**

Enzima	Azione
Dealogenasi	dealogenazione dei composti organici
Lattasi	rottura dell'anello aromatico
Nitrilasi	rottura del legame CN-anello aromatico
Nitroreduktasi	riduzione dei gruppi nitro es. esplosivi
Perossidasi	degradazione dei fenoli
Fosfatasi	rottura del legame fosfato-catena organica

1.2.6 Fitoestrazione

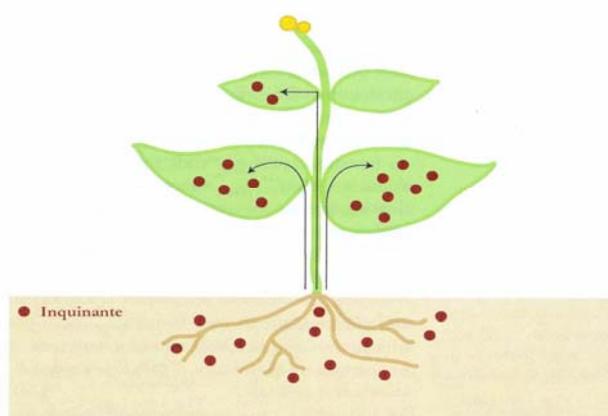


Figura 1.7 Rappresentazione schematica del meccanismo di Fitoestrazione

La fitoestrazione consiste nell'assorbimento dei contaminanti, prevalentemente metalli pesanti, attraverso l'apparato radicale e dalla successiva traslocazione all'interno della pianta. I contaminanti concentrati nei tessuti vegetali sono quindi rimossi asportando le piante, o parti di esse, dal sito (fig. 1.7) (Nardella, 2003b; Lasat, 2002).

Esistono due diverse strategie di fitoestrazione: la fitoestrazione indotta e la fitoestrazione continua (Salt et al. 1998).

Nel caso della fitoestrazione indotta, detta anche chelato-assistita, le piante deputate alla rimozione di un particolare metallo pesante vengono coltivate fino al raggiungimento di una biomassa ideale, dopodiché per mezzo dell'aggiunta al terreno di un appropriato agente chelante viene aumentata la biodisponibilità del metallo incrementando l'assorbimento e il bioaccumulo nelle piante. Al termine della fase di accumulo, spesso dopo un periodo di tempo piuttosto breve (alcuni giorni o settimane), le piante vengono raccolte incenerite o smaltite mediante compostaggio (fig. 1.8) (Huang, 1997; Salt et al, 1998). La biodisponibilità del metallo è, infatti, uno dei fattori che limitano il successo di un intervento di fitorisanamento. Il piombo, uno tra i più importanti inquinanti ambientali, risulta assai poco disponibile nel terreno a causa della formazione di complessi stabili con la sostanza organica, con Fe e ossidi di Mn e con le argille, e per la precipitazione sotto forma di carbonato, idrossido e fosfato. Per questo motivo, la mobilizzazione del metallo per mezzo di un agente chelante, può rappresentare una strategia per portare il metallo a contatto con le radici della pianta e avere così un'efficiente fitoestrazione (Blaylock et al., 1997; Shen et al., 2002).

Il caso di *Brassica juncea*, che in presenza di EDTA, è indotta ad incrementare l'accumulo di piombo nei germogli, ne è un esempio (Vassil et al., 1998). E' necessario far notare, tuttavia, che l'apporto *in-situ* di questi agenti chelanti senza un accurato controllo sul metodo di applicazione, sulla regolazione delle quantità introdotte e dei tempi di azione, può agevolare il movimento dei metalli tossici attraverso i lisciviati del terreno fino a raggiungere le falde sotterranee creando degli ulteriori rischi di inquinamento (Shen et al., 2002).

Un approccio alternativo alla tecnica di fitoestrazione precedentemente descritta, è la fitoestrazione continua. Questa strategia si avvale di

determinati processi fisiologici che permettono ad alcune piante di accumulare metalli in modo continuo lungo tutto il ciclo vitale. Una pianta adatta a questo scopo deve essere in grado di crescere su terreni contaminati mantenendo la produzione di elevata biomassa e allo stesso tempo sopportare elevate concentrazioni del metallo nelle cellule (fig. 1.8) (Salt et al. 1998).

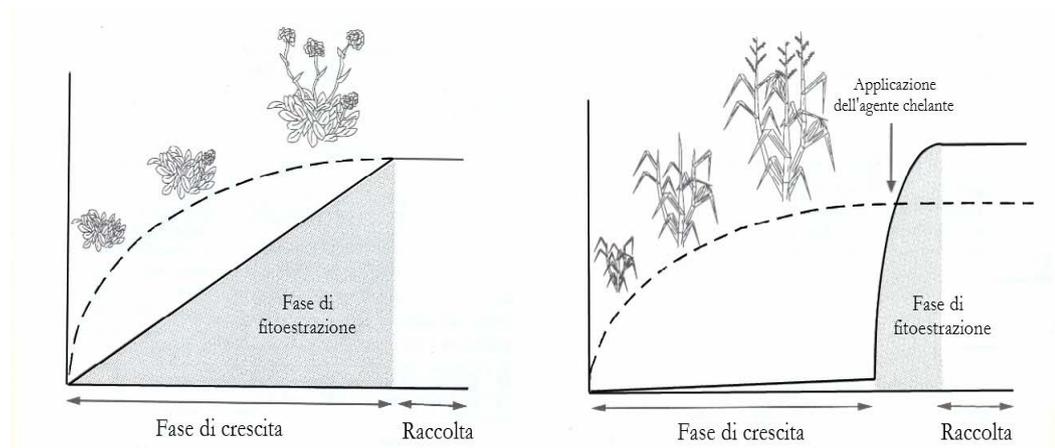


Figura 1.8 Diagramma della fitoestrazione continua (a destra) e assistita (a sinistra). La linea *continua* rappresenta la concentrazione del metallo nella parte epigea; la linea *tratteggiata* traccia l'andamento della biomassa della pianta (da Salt et al., 1998).

Tuttavia, come osservato per la fitoestrazione di elementi radioattivi quali ^{137}Cs , i risultati ottenuti da un processo di fitoestrazione risentono dell'estrema variabilità delle diverse piante anche nell'ambito della stessa specie, senza considerare poi quella collegata alle diverse condizioni di crescita e caratteristiche del terreno (Dushenkov, 2003).

L'efficienza di fitoestrazione di una pianta è determinata da tre fattori chiave: dalla produzione di biomassa, dal fattore di bioconcentrazione del metallo e dal fattore di traslocazione. Il fattore di bioconcentrazione, definito come il rapporto fra la concentrazione del metallo nella parte epigea di una pianta e la concentrazione riscontrata nel suolo. Il fattore di traslocazione, che è dato dal rapporto fra la concentrazione del metallo

nella parte epigea e quella misurata nelle radici misura, dà una stima dell'abilità della pianta a traslocare i metalli dalla radice agli organi in superficie, che più facilmente possono essere raccolti e smaltiti. Sebbene esistano rare eccezioni, la maggior parte delle piante ha un fattore di bioconcentrazione per i metalli pesanti e per i metalloidi minore di 1. L'impiego di piante con un basso fattore di traslocazione ai fini della fitoestrazione potrebbe non essere conveniente perché, indipendentemente da quanto grande sia la biomassa, è calcolato che per ridurre della metà la concentrazione di un metallo nei primi venti centimetri di terreno, sarebbero necessari oltre 100 raccolti. (McGrath & Zhao, 2003).

L'uso di piante in grado di fitoestrarre metalli pesanti in terreni contaminati, costituisce una delle strategie di fitorisanamento più promettenti e accolte favorevolmente dall'opinione pubblica in virtù dei bassi costi, della possibilità di intervenire su un ampio spettro di metalli tossici inclusi i radionuclidi, per la minima interferenza sull'ecosistema e per la mancata produzione di nessun tipo di rifiuto secondario. Tuttavia, molte delle piante accumulatrici di metalli pesanti finora identificate, o hanno una crescita molto lenta o producono una biomassa esigua.

Brassica juncea ha ricevuto negli anni un'attenzione particolare grazie ad una discreta efficienza nella fitoestrazione del piombo e ad un'elevata produzione di biomassa (18 t/ha) unita ad una grande adattabilità alle diverse condizioni climatiche e pedologiche. Nel caso, per esempio, della cultivar 426308 di *B. juncea*, è stato calcolato che, con il 3,5% di piombo accumulato nei germogli, possa estrarre fino a 630 Kg/ha in un solo raccolto (Kumar et al. 1995).

Nel corso del tempo l'interesse scientifico su questa pianta è andato crescendo tanto che lavori più recenti hanno aperto la strada anche ad

interventi di tipo biotecnologico con risultati piuttosto incoraggianti. Nel lavoro di Wangeline et al. (2004), gli alti livelli di glutatione (GSH) misurati nella linea transgenica APS di *B. juncea*, sovraesprime il gene per l'ATP-solforilasi, conferivano la capacità di tollerare e accumulare ben 12 diversi metalli tossici tra cui As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, V, W, e Zn.

La *phytoremediation* negli ultimi dieci anni ha progressivamente conquistato il favore delle industrie e delle agenzie governative per la protezione dell'ambiente, in virtù soprattutto dei bassi costi richiesti dagli interventi (Kramer, 2005; Pilon-Smits, 2005). Attualmente, se si considera che solo negli Stati Uniti si spendono circa 6-8 miliardi di dollari l'anno per il risanamento ambientale, ed in Europa circa 25-50 miliardi, un processo totalmente biologico come la *phytoremediation*, che può risultare fino a dieci volte più economico dei metodi di tipo ingegneristico come il *soil washing*, *soil burning* e *pump-and-treat*, può rivelarsi davvero auspicabile. Se a questo si aggiunge il fatto che si tratta di una tecnologia più rispettosa dell'ambiente delle tecniche di risanamento convenzionali, che fa uso di piante, a tutti gli effetti considerate delle 'pompe' e dei 'filtri' a energia solare, si comprende il crescente consenso che sta avendo da parte anche dell'opinione pubblica (Cunningham et al., 1995; Raskin et al., 1997; Salt et al., 1998).

Proprio per questo motivo negli Stati Uniti negli ultimi cinque anni il mercato della *phytoremediation* è cresciuto di quasi il triplo a partire dai 30-49 milioni di dollari del 1999.

In Europa, sebbene non ci sia ancora un impiego commerciale significativo della *phytoremediation*, il crescente interesse nell'ambito scientifico e della ricerca in questo settore e la notevole quantità di siti

inquinati specialmente situati nelle regioni dell'Est, indicano che lo sviluppo di questa tecnologia su larga scala potrebbe riguardare un futuro molto vicino (Pilon-Smits, 2005).

Sebbene l'uso delle piante per la bonifica di siti inquinati risulti vantaggioso per molti aspetti, esistono alcuni limiti che ne potrebbero ostacolare l'applicabilità su ampia scala.

In molti casi le concentrazioni nel suolo degli inquinanti possono essere elevate a tal punto da risultare fitotossiche o comunque tali da non consentire alle piante di crescere sufficientemente per fornire un'adeguata biomassa. In altri casi, come spesso accade nei terreni ex-industriali, può essere la scarsa fertilità del suolo a costituire un fattore di limite rallentando la crescita delle piante.

A questo si deve aggiungere il fatto che la popolazione microbica nei suoli contaminati risulta generalmente depressa sia in termini di diversità genetica che di abbondanza numerica, portando ad avere una limitata dotazione di microrganismi utili per attuare un'efficiente azione degradativa sui contaminanti (Pilon-Smits, 2005).

1.3 Resistenza ai metalli e piante iperaccumulatrici

Il progressivo incremento dell'inquinamento ambientale da metalli pesanti e metalloidi, ha esercitato una pressione selettiva causando un rapido adattamento negli organismi vegetali che hanno cominciato a manifestare fenomeni di tolleranza in un arco di tempo relativamente breve nell'ordine delle centinaia o addirittura delle decine di anni. Per esempio, le miniere di piombo e rame producono cumuli di materiale di scarto particolarmente tossico per la presenza di elevate concentrazioni di metalli pesanti. Tuttavia, alcune piante come *Agrostis tenuis*, che possono sopravvivere in corrispondenza delle aree di miniera, hanno evoluto questa forma di tolleranza nel corso di 400 anni di attività estrattiva (fig. 1.9).



Figura 1.9 Vegetazione di *Agrostis tenuis* su una miniera di rame in UK

La tolleranza ai metalli non trova una definizione ancora precisa e ben delineata poiché il meccanismo varia considerevolmente secondo il tipo di metallo e della specie vegetale considerata.

In alcuni casi, la resistenza ai metalli tossici si è evoluta solo in alcuni membri appartenenti a specie molto diffuse, rinvenuti in ambienti marginali ricchi in metalli (es. suoli ultramafici). Le piante, in questo caso, hanno sviluppato sistemi per limitare l'assorbimento di determinati ioni metallici e/o per detossificare la cellula una volta assorbiti. In altri casi, in seguito a lunghi periodi di isolamento geografico, si sono avuti eventi di selezione che hanno portato a vere e proprie specie dette *metallofite*, estremamente divergenti dal punto di vista genetico e morfologico dal progenitore di origine. Si sono trovate così ad occupare precise nicchie ecologiche ed essere spesso descritte come endemismi di aree metallifere (Whiting, 2002).

E' stato osservato, inoltre che piante metallo-tolleranti esibiscono una minore competitività rispetto a quelle non-tolleranti se fatte crescere in ambienti non metalliferi, indicando che l'acquisizione della resistenza ai metalli pesanti si è evoluta con un costo a livello fisiologico (Bondada & Ma, 2003).

Nei paragrafi che seguono saranno prese in esame le diverse strategie messe in atto dalle piante per la resistenza ai metalli concedendo però, maggior enfasi al fenomeno dell'iperaccumulo visto le maggiori implicazioni pratiche e tecnologiche.

1.3.1 Esclusione

Particolari meccanismi fisiologici impediscono che i metalli presenti nel suolo raggiungano la parte aerea della pianta rimanendo limitandone l'assorbimento o mantenendoli confinati all'interno delle radici (fig. 1.10).

Il sistema prevede l'alterazione della permeabilità della membrana citoplasmatica, adattamenti del complesso dei trasportatori degli ioni metallici della cellula e rilascio di agenti chelanti.

1.3.2 Accumulo

Le piante in grado di accumulare metalli ne tollerano elevate quantità immagazzinandoli nei tessuti, grazie alla sintesi di molecole chelanti, o stoccandoli in parti della pianta meno sensibili alla presenza dei metalli. L'accumulo in queste piante riflette le concentrazioni presenti nel suolo tanto che in molti casi sono usate come piante indicatrici nella prospezione dei siti di interesse minerario (fig. 1.10) (Raskin et al., 1994).

1.3.3 Iperaccumulo

Una forma estrema di tolleranza ai metalli, detta anche ipertolleranza, è quella esibita da alcune piante capaci di prelevare e concentrare nei loro tessuti, quantità eccezionalmente alte di metalli pesanti di gran lunga superiori a quelle di cui è dotato il terreno su cui vivono (Gosh & Singh, 2005) (fig. 1.10)

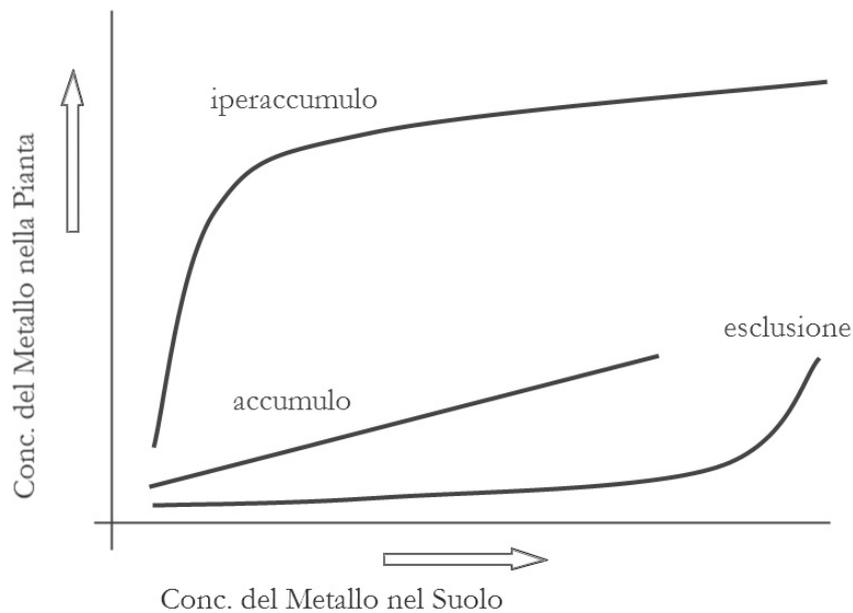


Figura 1.10 Relazione fra crescenti concentrazioni di metalli nel suolo e assorbimento da parte delle piante secondo le principali strategie di tolleranza.

Il fenomeno dell'iperaccumulo dei metalli è una caratteristica piuttosto rara nel regno vegetale e che riguarda specie adattate a vivere in ambienti particolari. Le prime osservazioni in merito a questa particolarità naturale, infatti, sono avvenute studiando i suoli ultramafici o serpentini, terreni caratterizzati dalla presenza di alti livelli di Ni, Co e Cr ma bassi livelli in azoto, fosforo, potassio e calcio. Sebbene praticamente inospitali per la maggior parte delle piante, hanno avuto la funzione di vere e proprie “isole ecologiche” entro cui si sono col tempo selezionate delle specie endemiche in grado di sopravviverci. Tra le piante adattate a vivere in questi suoli, soprattutto nelle regioni temperate, alcune specie appartenenti al genere *Alyssum*, in particolare *Alyssum bertolonii*, hanno rappresentato i primi esempi documentati di piante iperaccumulatrici di Ni in grado di accumularne oltre l'1% nelle foglie (Salt et al. 1998; Mengoni et al. 2003). *Thalyspi caeruleascens* (*Brassicaceae*) costituisce un altro esempio ampiamente studiato, noto per la capacità di assorbire e stoccare

nei germogli elevate quantità di Zn e Cd senza manifestare alcun sintomo di tossicità (Pence et al., 2000)

Ad oggi sono state identificate intorno alle 400 specie di piante appartenenti a 45 famiglie in grado di comportarsi come iperaccumulatrici di metalli pesanti in rappresentanza di circa lo 0,2% di tutte le angiosperme. La maggior parte di queste accumula Ni, circa 30 accumulano sia Co che Cu che Zn e soltanto alcune accumulano Cd e Mn (tab. 1.2). La lista delle piante è in continua crescita, tanto che recentemente Ma et al. (2001), hanno identificato la prima pianta terrestre, la felce *Pteris vittata*, che accumula arsenico fino a 22000 mg di As per kg di peso secco nelle fronde.

Per definire il concetto di iperaccumulo, sono stati stabiliti valori di soglia delle concentrazioni per i diversi metalli. Per esempio, sono state proposte soglie di 10.000 mg per kg di peso secco per lo zinco e il manganese, 1.000 mg per kg per cobalto, rame, arsenico, nickel e selenio e 100 mg per kg per il cadmio, concentrazioni maggiori di 2 o 3 ordini di grandezza dei livelli rintracciati nelle piante “normali”. Spesso, per definire il fenomeno dell’iperaccumulo, si preferisce usare il fattore di bioconcentrazione (il rapporto fra le concentrazioni all’interno della pianta e nel terreno circostante), che nel caso delle piante iperaccumulatrici è necessariamente superiore a 1 e talvolta raggiunge valori di 50-100 (Arru et al., 2004).

Tabella 1.3 Accumulo di metalli pesanti in alcune piante iperaccumulatrici (adattato da Macek et al., 2004).

Elemento	Specie	Livello (mg/kg su peso secco)
Mn	<i>Macadamia neutrophylla</i>	51.800
Zn	<i>Thlaspi caerulescens</i>	51.600
Ni	<i>Psycotria douarrei</i>	47.500
Cu	<i>Ipomea alpina</i>	12.300
Co	<i>Haumaniastrum robertii</i>	10.200
Pb	<i>Thlaspi rotundifolium</i>	8.200
Cd	<i>Thlaspi caerulescens</i>	1.800

1.3.3.1 Significato ecologico dell'iperaccumulo dei metalli

La spiegazione al perché alcune piante assimilino elevate quantità di metalli, talvolta nemmeno essenziali al funzionamento della cellula e teoricamente fatali già a dosi molto basse, è ritenuto ancora per certi aspetti un enigma biologico. Boyd & Martens (1998), riportano in letteratura cinque diverse ipotesi volte a postularne dei possibili significati in termini di adattamento all'ambiente.

Sebbene da molti considerata una teoria che non implica l'intervento della selezione naturale, in certe piante, i metalli tossici farebbero il loro ingresso inavvertitamente all'interno della pianta sfruttando le normali vie di accesso per altri elementi minerali, una caratteristica secondaria derivata da altri meccanismi fisiologici delle piante iperaccumulatrici (Boyd & Martens, 1998).

L'ipotesi di interferenza allelopatica, suggerisce che piante iperaccumulatrici perenni, spogliandosi ad ogni stagione del fogliame, arricchirebbero progressivamente il terreno circostante di metalli. Questo impedirebbe l'affermarsi di specie meno tolleranti che potrebbero competere o, al contrario, creare condizioni favorevoli alla germinazione di plantule di altre specie iperaccumulatrici. Sebbene molte di queste

connessioni ecologiche rimangono ancora da esplorare in modo definitivo, è stato realmente osservato che lo strato appena superficiale del terreno situato sotto la chioma di piante iperaccumulatrici di nickel come *Sebertia acuminata* in Nuova Caledonia, risulti significativamente arricchito di nickel, elemento di cui la specie è nota come iperaccumulatrice (Boyd & Jaffré, 2001).

L'ipotesi secondo la quale le piante trarrebbero vantaggio dall'iperaccumulo dei metalli per resistere alla carenza d'acqua, non ha trovato ancora un riscontro empirico. È stato postulato che i metalli verrebbero accumulati nelle foglie per aumentare la resistenza allo stress idrico attraverso due meccanismi. Il primo, grazie all'accumulo preferenziale nelle cellule dell'epidermide fogliare, ci sarebbe la riduzione della traspirazione cuticolare; il secondo, afferma che i metalli stoccati nelle cellule, allo stesso modo dei soluti compatibili (prolina, Na⁺, K⁺, Cl⁻), servirebbero ad aumentare l'osmolarità e regolare il potenziale idrico della cellula. Tuttavia, dai risultati ottenuti da Whiting et al. (2003), in uno studio condotto su *Alyssum murale* e *Thlaspi caerulescens*, non è stato provata l'esistenza di alcun effetto significativo di resistenza allo stress idrico in seguito all'iperaccumulo di Zn e Ni, in termini di riduzione dell'inibizione dello stress osmotico sulla crescita. Gli stessi autori sono concordi nel considerare improbabile che il fenomeno dell'iperaccumulo si sia evoluto per avere un ruolo nell'osmoregolazione della cellula. In primo luogo perché Zn e Ni sono molto più tossici degli ioni K⁺ e richiedono "costosi" ligandi organici a cui legarli. Secondo, perché il tasso di iperaccumulo non appare influenzato da condizioni transitorie di stress idrico, ma al contrario si esprime costitutivamente; terzo, se questi metalli svolgessero una parte come osmoliti, dovrebbero essere accumulati nelle cellule fisiologicamente più attive del mesofillo piuttosto

che nelle cellule dell'epidermide, dove riscontri sempre più numerosi ne attestano la presenza più alta (Whiting et al., 2003).

Allo stesso modo di certi composti organici prodotti dalle piante (es. alcaloidi, terpeni, glucosinolati ecc.), i metalli tossici assorbiti dal terreno e accumulati nelle cellule, secondo l'idea più diffusa circa il significato dell'iperaccumulo, servirebbero per la difesa da agenti patogeni o da insetti fitofagi. A differenza dei composti organici, gli elementi minerali utilizzati a scopo difensivo, sono assorbiti direttamente dal terreno e in teoria non possono essere né trasformati né degradati dai meccanismi biochimici di controdifesa dei fitofagi (Boyd & Martens, 1998; Boyd, 2004).

La difesa si esplica fondamentalmente in due modi: provocando la morte del fitofago in seguito all'ingestione di materiale vegetale altamente tossico, oppure attraverso un effetto deterrente per cui tessuti con una più alta presenza di metalli risulterebbero meno attaccati rispetto a quelli in cui la concentrazione è minore.

L'effetto deterrente, che alcune piante iperaccumulatrici avrebbero nei confronti degli insetti, è stato documentato da una serie di lavori in cui all'insetto veniva presentata la scelta fra piante in grado o meno di accumulare metalli tossici.

In un recente lavoro di Jhee et al. (2005), è stato osservato che se certi insetti, come la locusta *Melanoplus femurrubrum*, si trovavano di fronte all'alternativa di nutrirsi delle foglie di piante della specie *Streptanthus polygaloides* (Brassicaceae), la scelta privilegiava quelle piante che erano state allevate su substrati più poveri di nickel e che quindi ne avevano traslocato minori quantità nei tessuti. Simili risultati sono stati ottenuti studiando l'interazione del tripide *Frankliniella occidentalis* con *Thlaspi caerulescens*; anche in questo caso all'aumentare della quantità di Cd

accumulata dalla pianta si registrava una diminuzione lineare dei danni sulle foglie causati dalle punture degli insetti (Jiang et al., 2005).

Ad ogni meccanismo di difesa delle piante, generalmente corrispondono delle misure adattative di controdifesa da parte degli erbivori/patogeni in un processo noto come coevoluzione. E' quindi probabile che erbivori e patogeni abbiano evoluto dei sistemi che consentano loro di aggirare le difese basate sull'accumulo di metalli tossici da parte delle piante. Come riscontrato per alcuni insetti fitofagi, una strategia potrebbe consistere nell'orientamento selettivo verso un pabulum caratterizzato da una minore concentrazione di metalli, oppure di nutrirsi abbinando a un cibo con un'alta tossicità uno a più bassa, in modo da diluirne l'effetto nocivo, o ancora, semplicemente riuscendo a tollerare nell'organismo ingenti quantità di metalli tossici assimilati (Boyd & Martens, 1998).

La piena comprensione di tutte le implicazioni ecologiche del fenomeno dell'iperaccumulo dei metalli, oltre ad essere affascinante da un punto di vista naturalistico, può esserlo anche da un punto di vista pratico, in quanto, l'applicazione su ampia scala di piante iperaccumulatrici nell'ambito di interventi di *phytoremediation* o di *phytomining* potrà essere più prontamente raggiunta se saranno note le conseguenze ecologiche dell'iperaccumulo sugli altri organismi, uomo compreso.

1.3.3.2 Basi fisiologiche della metallo-tolleranza e iperaccumulo

Si definiscono metalli pesanti tutti quei metalli la cui densità è superiore a 5g/cm^3 . In virtù della solubilità in condizioni fisiologiche, 17 metalli dei 90 presenti in natura, risultano disponibili per le cellule e di una certa importanza per gli organismi e per gli ecosistemi. Sebbene alcuni come

Fe, Mo e Mn siano importanti micronutrienti, la maggior parte risulta essere tossica anche in dosi molto basse (Hg, Sb, Ag, Cd, Pb, U, ecc.).

Per capire con quali modalità questi metalli si rivelano tossici per la cellula, è necessario illustrarne brevemente alcune caratteristiche chimiche.

La maggior parte dei metalli pesanti appartengono al gruppo dei metalli di transizione e sono normalmente presenti come cationi in condizioni fisiologiche. Alcuni di questi elementi possono partecipare a reazioni di ossido-riduzione (es. la reazione di Fenton $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightleftharpoons \text{OH}\cdot + \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^-$) portando alla formazione di specie reattive dell'ossigeno e conseguente stress ossidativo per la cellula.

Un altro importante motivo di tossicità dovuta ai metalli pesanti, è dato dalla loro capacità di interagire fortemente con gli atomi di ossigeno, zolfo, e azoto dei gruppi funzionali di molte macromolecole biologiche (es. residui di cisteina in molti enzimi) con il risultato di provocarne l'inattivazione.

In altri casi, l'enzima può perdere funzionalità in seguito alla sostituzione di uno ione metallico con funzione di cofattore, con uno estraneo. E' il caso dello ione Mg^{2+} legato all'enzima Rubisco che può essere sostituito dai cationi bivalenti Co^{2+} e Ni^{2+} (Schützendübel & Polle, 2002).

Perché una pianta riesca a tollerare dosi normalmente letali di metalli pesanti, come nelle piante iperaccumulatrici, è necessario che entrino in gioco speciali meccanismi fisiologici in grado di agire a diversi livelli: dalla mobilitazione del metallo dal terreno alla radice, al trasferimento al fluido xilematico o floematico, dal trasporto attraverso le membrane plasmatiche, allo stoccaggio in apposite strutture cellulari (Lasat et al., 1996).

Le radici sono in grado di mobilizzare certi metalli la cui disponibilità risulta normalmente limitata a causa di fenomeni che ne favoriscono l'ossidazione e la formazione di composti insolubili e stabili complessi metallo-organici. Il ferro, trovandosi prevalentemente in natura sotto forma di composti ossidati e insolubili, costituisce l'esempio più studiato dei meccanismi adottati dalle piante per aumentarne la mobilità nel suolo rizosferico.

Come è noto, il modello per l'assorbimento del Fe nelle dicotiledoni e nelle monocotiledoni non graminacee si realizza in due fasi, nella prima si ha l'induzione di una riduttasi capace di ridurre i Fe(III)-chelati presenti nel terreno, rilasciando lo ione Fe^{2+} libero. La seconda fase è il trasporto del Fe^{2+} nel citoplasma attraverso uno specifico trasportatore o uno meno specifico per gli ioni bivalenti. Inoltre, l'induzione di pompe come l' H^+ ATPasi di membrana, acidificando l'ambiente esterno, aumentano la disponibilità di Fe (fig. 1.11).

A differenza di tutte le altre piante, le graminacee, prelevano direttamente il ferro trivalente grazie al rilascio da parte delle radici di molecole organiche dette fitosiderofori (es. acido avenico e mugineico). Il ferro, una volta trasportato nel citoplasma sotto forma di complesso *fitosideroforo-Fe³⁺* da appositi trasportatori, si scinde, ed è a questo punto che viene ridotto a Fe^{2+} da riduttasi interne come alcune flavoproteine NADH-dipendenti (fig. 1.11) (Alpi et al., 2000; Buchanan et al., 2003).

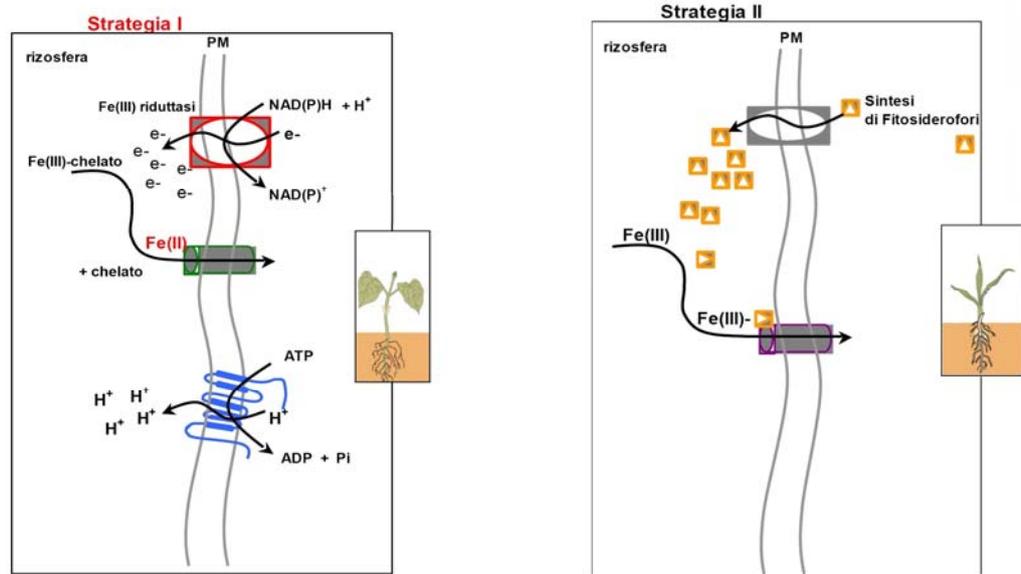


Figura 1.11 Modelli a confronto dei meccanismi di assimilazione del Fe, adottati dalle dicotiledoni e monocotiledoni non graminacee (Strategia I) e dalle graminacee (Strategia II).

Il trasporto dei metalli pesanti o metalli di transizione attraverso le membrane cellulari, è mediato da diversi sistemi, e affidato a tipologie diverse di trasportatori. Queste comprendono le *heavy metals ATPasi* (o *CP-type ATPasi*), le proteine *Nramps* (*natural resistance-associated macrophage proteins*) le proteine del gruppo delle CDF (*cation diffusion facilitator*), la superfamiglia dei trasportatori ABC (*ATP-binding cassette*) e la famiglia di proteine nota come *ZIP family*.

Questa grande diversità e variabilità molecolare all'interno di ogni singola categoria di trasportatori, potrebbe fornire alla pianta tutto un insieme di carriers a diversi gradi di affinità in funzione della disponibilità dei metalli nel substrato, nonché garantire un trasporto specifico dei metalli attraverso i diversi comparti cellulari (Hall & Williams, 2003).

Le *heavy metals ATPasi* prendono il nome anche di CPx-ATPasi poiché contengono un dominio transmembrana caratterizzato dalla sequenza aminoacidica Cisteina-Prolina-Cisteina/Istidina/Serina e pare abbiano un

ruolo negli scambi intracellulari di un ampio numero di metalli. Indagini molecolari hanno dimostrato l'esistenza di due gruppi principali all'interno di questa famiglia ciascuno con una diversa specificità di trasporto, uno per i cationi monovalenti Cu^+/Ag^+ e l'altro per quelli bivalenti $\text{Zn}^{2+}/\text{Co}^{2+}/\text{Cd}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$.

La superfamiglia di trasportatori ABC (*ATP-binding cassette*), presente in tutti i tre regni dei viventi, si distingue per il gran numero di famiglie di trasportatori di membrana al suo interno. Tutti i trasportatori ABC possiedono una o due ripetizioni dei due domini principali: un dominio transmembrana altamente idrofobico e uno che si estende nel citosol con un sito di attacco per le molecole di ATP. La maggior parte delle proteine ABC funzionano come pompe azionate dall'idrolisi dell'ATP per il movimento all'interno della cellula non solamente di ioni ma anche di zuccheri, lipidi, peptidi, pigmenti ecc. (Hall & Williams, 2003). In particolare, il membro AtPDR12, appartenente alle 130 proteine ABC attualmente individuate in *Arabidopsis*, sembra avere un ruolo nel conferire resistenza allo ione Pb^{2+} contribuendo, insieme con altri meccanismi di detossificazione, all'esclusione mediante pompaggio all'esterno della cellula il Pb(II) come tale e/o in forma coniugata con molecole organiche (es. glutatione) (Lee et al. 2005).

Alla classe di proteine di membrana denominata Nramp (*natural resistance-associated macrophage proteins*), riscontrata anche in batteri, funghi, ed animali, è stato attribuito nelle piante un ruolo di trasportatori di ioni metallici. Esistono prove che dimostrano che in *Arabidopsis* i geni della famiglia, *AtNramp*, codificano per un insieme di trasportatori che permettono il movimento intracellulare di Fe, Mn e Cd^{2+} (Thomine et al., 2000).

La famiglia delle proteine CDF (*cation diffusion facilitator*) sono state per la prima volta identificate nei batteri, ma esistono prove della loro presenza in veste di trasportatori di Zn anche in lievito e animali. Per quanto riguarda le CDF vegetali, la prima ad essere caratterizzata è stata la proteina ZAT in *Arabidopsis* costituita da 398 residui aminoacidici. Sebbene il gene per la proteina ZAT risultasse espresso costitutivamente e i suoi livelli di trascrizione non aumentassero in risposta all'aumento di concentrazione di Zn, piante transgeniche in grado di sovraesprimere il gene, mostravano una maggiore resistenza ad alte concentrazioni di Zn, unito a un aumento significativo delle quantità accumulate nelle cellule. E' stato pertanto proposto che il trasportatore ZAT sia coinvolto nel trasferimento e nel processo di sequestro all'interno del vacuolo degli ioni Zn^{2+} (Van der Zaal et al., 1999). Più recentemente, un gene ZAT (*ZTP1*) è stato caratterizzato anche per *Thlaspi caerulescens*, iperaccumulatrice di Zn: in questo caso il gene risulta principalmente espresso in foglie e radici ed esibisce un più alto livello di trascrizione in piante adattate ai suoli definiti calamini (ricchi in Zn, Cd e Pb) piuttosto che in quelle provenienti da suoli serpentini (ricchi in Ni) o non-metalliferi (Assunção et al., 2001).

Sono circa 85 i membri appartenenti alla famiglia denominata ZIP (ZRT, IRT-like Proteins) scoperti oltre che nei procarioti anche negli eucarioti, piante comprese. Essi includono trasportatori di Fe, Zn, Mn e Cd tra loro differenti per specificità e affinità ai vari substrati. Il nome ZIP ha origine dai primi elementi individuati di cui è stata rivelata la correlazione molecolare con IRT1 (trasportatore regolato dal Fe in *Arabidopsis*) e ZRT1 e ZRT2 (trasportatori rispettivamente ad alta e bassa affinità dello Zn^{2+} in *Saccharomyces cerevisiae*). In seguito a prove di complementazione sul mutante di lievito *zrt1zrt2* (difettoso nell'assorbimento dello Zn) con

librerie di cDNA di *Arabidopsis*, è stato possibile giungere al clonaggio dei geni per i trasportatori ZIP nelle piante, designati da ZIP1 a ZIP3 e più recentemente ZIP4. Tutte le proteine correlate con ZRT/IRT e codificate dalla famiglia di geni ZIP, possiedono una regione citoplasmatica tra il III e il IV dominio che contiene un motivo ricco di istidina che può agire come sito di legame per metalli. Questi carriers sono espressi nelle radici in risposta alla carenza di Zn suggerendo il loro coinvolgimento proprio nell'assorbimento dello zinco dal terreno. Studi di competizione con altri ioni bivalenti, inoltre, suggeriscono indirettamente che questi trasportatori potrebbero mediare l'assorbimento anche di Cu e Cd (Mäser et al., 2001; Buchanan et al., 2003). La scoperta del trasportatore di Zn^{2+}/Cd^{2+} ZNT1 in *Thlaspi caerulescens*, con un alto grado di similarità con il gene ZIP4 di *Arabidopsis*, ha consentito di chiarire, almeno in parte, un aspetto delle ragioni fisiologiche e molecolari che distinguono una specie iperaccumulatrice da una non iperaccumulatrice. In primo luogo, il gene ZNT1 in *Thlaspi caerulescens*, viene espresso costitutivamente e a livelli più alti, sia nelle radici che nei germogli, rispetto a *T. arvense* (specie non iperaccumulatrice). Inoltre, sembra che in *T. caerulescens*, diversamente da *T. arvense*, la quantità di trascritto risulti modulata negativamente in misura decisamente minore al crescere della concentrazione di Zn, riuscendo a mantenere un *uptake* circa 2 volte superiore anche in presenza di concentrazioni di 50 μ M di Zn, valore comparabile a quello che si ritrova nella soluzione circolante di terreni contaminati (Pence et al., 2000).

L'accumulo di grandi quantità di metalli, particolarmente evidente nelle piante iperaccumulatrici, richiede anche un'elevata capacità di attivare meccanismi di detossificazione all'interno delle cellule.

Il legame del metallo con sostanze chelanti specifiche e ad alta affinità riduce la concentrazione cellulare degli ioni liberi potenzialmente in grado di interferire nel metabolismo. All'interazione fra il ligando e lo ione metallico, fa seguito la traslocazione e la compartimentalizzazione del complesso all'interno del vacuolo (fig. 1.12).

Le piante producono un'ampia varietà di ligandi, fra questi, gli acidi carbossilici come l'acido citrico e l'acido malico svolgono un ruolo attivo nella detossificazione dello zinco e del cadmio soprattutto nella foglia (Yang et al., 2005). Gli stessi aminoacidi in forma libera sembra che possano avere una certa importanza nel meccanismo di tolleranza e iperaccumulo. Un aminoacido in particolare, l'istidina (His), favorirebbe il flusso e la traslocazione nel liquido xilematico dello ione Ni^{2+} una volta assorbito dalle radici in *Alyssum lesbiacum* (iperaccumulatrice di Ni). Verosimilmente, una volta che Ni^{2+} è entrato nella radice come ione idratato, il complesso Ni-His potrebbe essere coinvolto nella fase di caricamento dello xilema e utilizzato da sistemi di trasporto di membrana, oppure, in alternativa, favorendo la mobilità del nickel per via simplastica (Kerkeb & Krämer, 2003).

Il ruolo delle antocianine come agenti chelanti di metalli pesanti, è stato osservato per la prima volta in *Brassica juncea* nei confronti del molibdeno. Piante mutanti con una ridotta capacità di sintesi per le antocianine, esibivano, infatti, una minore capacità di accumulare Mo rispetto al *wild-type* e a varietà con livelli di antocianine superiori, dimostrando così l'esistenza di una correlazione positiva fra il contenuto di antocianine e l'accumulo di molibdeno (Hale et al., 2001).

In virtù dell'elevata reattività degli ioni metallici con i gruppi tiolici (gruppi -SH), non sorprende che fra i più importanti agenti chelanti implicati nei sistemi di detossificazione oltre che per l'omeostasi cellulare,

siano coinvolte delle molecole di natura peptidica in larga parte costituite da sequenze di aminoacidi solforati. I ligandi in questione, sono noti col nome di metallotioneine (MT) e fitochelatine (PC).

Metallotioneine

Come accennato in precedenza, le metallotioneine sono proteine ubiquitarie a basso peso molecolare (6-7 kDa) con un elevato contenuto di zolfo. Si pensa che, almeno nel regno animale, abbiano un ruolo nella fissazione di metalli essenziali presenti in tracce (es. Cu e Zn), nel controllo della loro concentrazione come ioni liberi nella cellula, nella regolazione del flusso nei vari compartimenti cellulari e nel limitare gli effetti dannosi causati dall'esposizione ad altri elementi potenzialmente tossici quali cadmio e mercurio.

Suddivise in quattro classi distinte in funzione del contenuto in cisteina e della struttura, le metallotioneine, presentano motivi strutturali caratterizzati dalla ripetizione delle sequenze Cys-Cys, Cys-X-Cys e Cys-X-X-Cys, dove X sta per un qualsiasi altro aminoacido ad eccezione di His e degli aminoacidi aromatici (Yang et al., 2005). Sebbene siano molto comuni e ampiamente descritte nel regno animale, esistono prove della loro distribuzione anche fra le piante, anche se la loro funzione rimane in gran parte ancora inesplorata. Esistono tuttavia forti evidenze che nei vegetali, tali proteine siano coinvolte nella tolleranza e nei meccanismi di omeostasi del rame, come sembrano dimostrare gli alti livelli di trascrizione di MT2 (metallotioneine di classe 2) in *Arabidopsis* in presenza di Cu, oppure l'acquisizione di resistenza al Cu in seguito all'espressione dei geni per MT1 e MT2 di *Arabidopsis* introdotti in ceppi mutanti di lievito MT-*deficient* (Hall, 2002).

Fitochelatine

Le fitochelatine (PCs) sono una famiglia di peptidi in grado di complessare metalli la cui struttura di base è costituita dalla ripetizione del dipeptide γ -GluCys seguite da una glicina (Gly) terminale. La sintesi di queste molecole avviene a partire dal glutatione (GSH) attraverso l'azione di una PC sintasi, una dipeptidil transpeptidasi in grado di trasferire unità di γ -GluCys da una molecola di glutatione all'altra, formando progressivamente oligomeri da 2 a 11 elementi ripetuti. È stato inoltre osservato che la sintesi e l'attività dell'enzima è promossa dalla presenza di ioni metallici in particolare dal Cd seguito da Ag, Bi, Pb, Zn, Cu, Hg e Au (Cobbett, 2000).

Il coinvolgimento delle fitochelatine nei meccanismi di tolleranza ai metalli è però controverso ed è ancora una questione oggetto di dibattito scientifico.

Non esistono ancora prove certe in favore del ruolo svolto dalle fitochelatine nella detossificazione delle cellule da un eccesso di micronutrienti quali per esempio Zn, Ni, Cu, Fe, Mo e Mn.

Dall'altro lato, tuttavia, le PCs sono richieste per la detossificazione di altri metalli e metalloidi non essenziali con un'alta affinità per i gruppi sulfidrilici, come Cd, Hg e in particolare As. Tali metalli, sebbene siano ubiquitari in natura, sono principalmente presenti in quantità trascurabili nell'ambiente, il che rende difficile credere che la conservazione del gene della fitochelatina sintasi in tutto il regno vegetale possa essere spiegato come risultato della pressione selettiva esercitata dall'esposizione a questi metalli tossici (Schat et al., 2002).

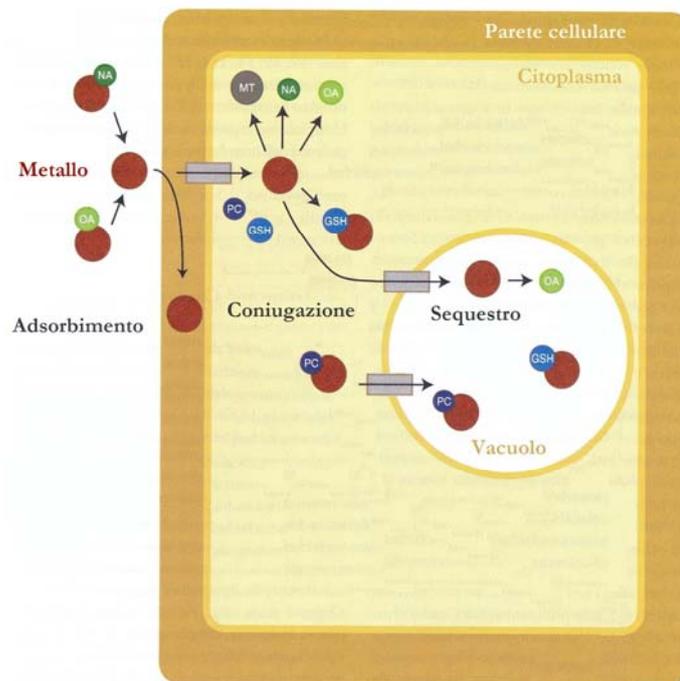


Figura 1.12 Rappresentazione schematica dei meccanismi cellulari coinvolti nella tolleranza ai metalli. La detossificazione generalmente coinvolge la coniugazione del metallo con chelanti di natura organica seguita dal sequestro nel vacuolo o nell'apoplasto. I chelanti mostrati in figura sono: GSH: glutatione ; MT: metallotioneine; NA: nicotinamminaOA: acidi organici; PC: fitochelatine

1.4 L'ARSENICO

Se per molti anni è stato il mercurio ad essere oggetto di una speciale attenzione da parte della comunità scientifica a causa della sua rilevanza a livello tossicologico, oggi, l'interesse del pubblico e della scienza si è spostato sull'arsenico. Il motivo è principalmente dovuto alla crescente diffusione quasi epidemica di fenomeni di intossicazione che affliggono attualmente centinaia di migliaia di persone soprattutto nelle zone del Bangladesh, del Bengala occidentale e dell'India. Sebbene sia possibile che fonti di natura antropogenica possano essere talora all'origine di casi localizzati di contaminazione da arsenico, nel caso soprattutto del Bangladesh, tale entità e ampiezza non può che avere una spiegazione di tipo geologico (Hossain, 2006).

L'arsenico era conosciuto già dalle prime civiltà della Cina, dell'India, della Grecia e dell'Egitto che avevano imparato ad estrarlo dai minerali che lo contenevano. Durante l'Età del Bronzo, l'arsenico veniva utilizzato nella fusione del bronzo come sostanza da aggiungere per esaltarne la lucentezza. Tanto è vero che la parola "orpimento" dal Latino *aurum* = oro e *pigmentum* = colore, è il nome dato al minerale di solfuro di arsenico (As_2S_3) impiegato in passato nella pittura proprio per il suo colore lucido e brillante ad imitazione dell'oro. Senza dubbio, insieme alle qualità tecnologiche, è verosimile che fossero note fin dai primi tempi, anche le proprietà farmacologiche e tossiche dell'arsenico. Esistono, infatti documenti scritti, a partire dal 222 a.C. in Cina, riguardanti le tecniche di produzione di composti farmaceutici dal realgar (minerale di arsenico AsS). In tempi successivi, intorno al 1250 d.C., Alberto Magno attraverso il trattamento con calore di un solfuro di

arsenico riuscì per la prima volta a isolare l'elemento As (Matschullat, 2000).

1.4.1 L'arsenico nell'ambiente

L'arsenico è un elemento che è ampiamente diffuso sulla crosta terrestre in quantità stimate attorno ai $4,01 \times 10^{16}$ kg. Con circa $1,715 \times 10^7$ kg all'anno, il naturale rilascio di As dalla litosfera è in gran parte determinato dalle esalazioni ed eruzioni vulcaniche alle quali vanno aggiunti altri $4,87 \times 10^6$ kg annui legati al vulcanismo sottomarino.

Allo stato elementare, stato di ossidazione 0, si presenta come un materiale all'apparenza simile a un metallo (è considerato infatti un metalloide) dalla colorazione grigio-metallica, in forma combinata può assumere gli stati di ossidazione di -3, +3 e +5. In natura, più frequentemente si trova in associazione con minerali di solfuri metallici del tipo $M(II)AsS$, dove per M si intendono metalli bivalenti come Fe, Ni e Co, la tabella 1.4 ne da una lista più o meno completa (Matschullat, 2000).

Tabella 1.4 Principali minerali dell'arsenico presenti in natura (adattata da Mandal & Suzuki, 2002).

Minerale	Composizione
Arsenico nativo	As
Proustite	Ag_3AsS_3
Rammelsbergite	$NiAs_2$
Safflorite	$(Co,Fe)As_2$
Seligmannite	$PbCuAsS_3$
Smaltite	$CoAs_2$
Niccolite	$NiAs$
Realgar	AsS
Orpimento	As_2S_3
Cobaltite	$CoAsS$
Arsenopirite	$FeAsS$
Tennantite	$(Cu,Fe)_{12}As_4S_{13}$

Enargite	Cu_3AsS_4
Arsenolite	As_2O_3
Claudetite	As_2O_3
Scorodite	$\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Annabergite	$(\text{Ni},\text{Co})_3(\text{AsO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$
Hoernesite	$\text{Mg}_3(\text{AsO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$
Haematolite	$(\text{Mn},\text{Mg})_4\text{Al}(\text{AsO}_4)(\text{OH})_8$
Conicalcite	$\text{CaCu}(\text{AsO}_4)(\text{OH})$
Loellingite	FeAs_2
Farmacosiderite	$\text{Fe}_3(\text{AsO}_4)_2(\text{OH})_5 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Il suolo presenta livelli di arsenico molto variabili in funzione soprattutto della roccia madre da cui si è originato, dalle attività umane, nonché dagli andamenti climatici, dalle componenti organiche e inorganiche e dal potenziale ossidoriduttivo del terreno. In generale si stimano valori tra 0,1 a 40 mg kg⁻¹ con una media in generale collocata attorno ai 5-6 mg kg⁻¹, in cui i valori più bassi riguardano prevalentemente i terreni sabbiosi e i più alti quelli di origine alluvionale e ricchi di sostanza organica.

Nel terreno l'arsenico si trova principalmente in forma inorganica e, mentre in condizioni riducenti o anaerobiche, prevalgono le forme ridotte degli arseniti As(III), in condizioni ossidanti o aerobiche, gli arsenati As(V) rappresentano le specie prevalenti, più stabili e in grado di interagire fortemente con le argille, la sostanza organica e gli ossidi/idrossidi di ferro e manganese.

Le specie inorganiche possono essere trasformate in composti organici attraverso reazioni di biometilazione operate dai microrganismi con produzione di composti organici quali, l'acido monometilarsonico (MMAA), l'acido dimetilarsinico (DMAA), l'ossido di trimetilarsina (TMAO) oppure composti volatili come l'arsina (fig. 1.13) (Matschullat, 2000; Mandal & Suzuki, 2002).

Nell'atmosfera si accumula una quantità media di $1,74 \times 10^6$ kg di As distribuiti in modo disomogeneo tra i due emisferi. Si stima, infatti, che $1,48 \times 10^6$ kg riguardino l'emisfero settentrionale a causa della maggior concentrazione di aree altamente industrializzate, mentre $0,26 \times 10^6$ kg quello meridionale. Le polveri costituiscono la forma e il veicolo principale attraverso cui l'arsenico, sottoforma di As metallico o di ossidi e solfuri, si disperde nell'atmosfera in seguito alle attività umane. Circa il 60% delle emissioni umane di As possono essere attribuite essenzialmente ai processi di estrazione e lavorazione del rame e dalla combustione del carbone. Altre fonti comunque importanti vanno dall'applicazione di erbicidi, all'attività metallurgica di piombo e zinco, dall'industria del vetro a quella per la produzione di agenti preservanti per il legname da costruzione, dall'incenerimento dei rifiuti alla produzione di acciaio (Matschullat, 2000).

La concentrazione di arsenico nelle acque è generalmente bassa e per quanto riguarda l'acqua del mare la quantità oscilla fra 0,001 a 0,008 mg l⁻¹. Sebbene il rapporto fra arsenico pentavalente e trivalente in acque ossigenate e a pH 8,1 sulla base di calcoli termodinamici risulti pari a 10²⁶:1, nella realtà il contenuto di As trivalente risulta inaspettatamente più alto, con un rapporto fino a 10:1 per effetto dei processi riducenti di natura biologica. Tra i composti organici dell'arsenico comuni nell'ambiente marino, si ritrovano sali di tetrametilarsonio, arsenocolina, arsenobetaina e ossidi di dimetilribosilarsina. Tuttavia, solo una frazione minima dell'arsenico totale negli oceani rimane in soluzione, poiché la maggior parte risulta adsorbito al materiale corpuscolato in sospensione. La concentrazione di arsenico nelle acque interne varia da 1-10 µg l⁻¹ fino a raggiungere livelli di 100-5000 µg l⁻¹ soprattutto in quelle aree interessate da attività minerarie. Anche in questo caso in condizioni di

alto o moderatamente alto potenziale redox predominano tendenzialmente gli ossianioni pentavalenti H_3AsO_4 , H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} e AsO_4^{3-} , mentre in condizioni riducenti le specie trivalenti come gli arseniti (H_3AsO_3) prevalgono (Mandal & Suzuki, 2002).

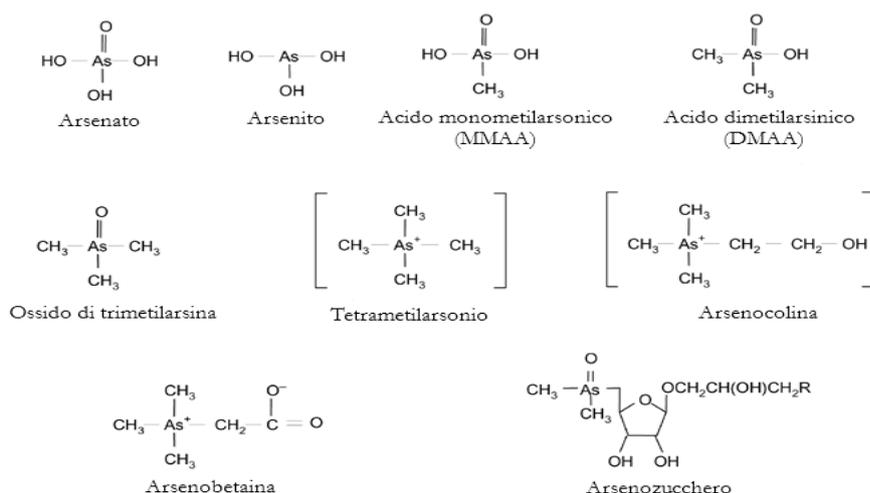


Figura 1.14 Strutture di alcuni fra i composti più importanti dell'arsenico.

A causa delle attività umane si è avuto un costante rilascio di arsenico a livello dell'atmosfera, delle acque e del suolo con evidenti ripercussioni sugli organismi viventi. L'arsenico si può infatti accumulare nel suolo in seguito all'uso di antiparassitari, all'applicazione di fertilizzanti, dalla deposizione delle ceneri prodotte dalla combustione di combustibili di origine fossile, dallo smaltimento dei rifiuti industriali ecc...

Paesi come la Cina, l'ex Unione Sovietica, la Francia, la Germania, il Messico, il Perù, la Namibia, la Svezia e gli Stati Uniti, sono stati negli anni i responsabili di quasi il 90% della produzione di arsenico a livello mondiale (Mandal & Suzuki, 2002).

Sebbene allo stato attuale l'uso dell'arsenico in agricoltura sia fortemente regolamentato, nel 1955, solamente negli Stati Uniti, si producevano 18000 tonnellate di arsenico per uso agricolo come arsenato di piombo,

arsenato di calcio, acetoarsenito di rame, MSMA (metanarsonato monosodico), DSMA (metanarsonato disodico) e acido cacodilico usato come insetticida nelle piantagioni di cotone. L'arsenico è stato usato per molti anni in modo estensivo come disseccante sempre per il cotone, tanto che si calcola che solamente nel 1964 negli USA, sia stato fatto uso di circa duemila e cinquecento tonnellate di acido arsenico (H_3AsO_4) impiegato come disseccante su 495000 ha di piantagioni di cotone. L'impiego dell'arsenito di sodio nella preparazione di erbicidi non selettivi e geosterilizzanti era addirittura in uso già a partire dal 1890. Ad oggi l'arsenico per uso agricolo è sottoposto ad una rigida legislazione, ed ad occupa circa il 50% dell'arsenico prodotto di cui il 90% in forma organica.

Attualmente, il 30% del mercato mondiale dell'arsenico lo detengono tutti quei prodotti usati come preservanti per il legno come il FCAP (Fluor-Chrome-Arsenic-Phenol) in uso da prima del 1918, il CCA (Chromated Copper Arsenate) e l'ACA (Ammonical Copper Arsenate) (Mandal & Suzuki, 2002).

In medicina l'arsenico e i suoi derivati hanno avuto in passato grande importanza per la loro applicazione nella terapia della sifilide e della tripanosmiasi ma è progressivamente diminuita in seguito all'avvento dei farmaci chemio-antibiotici. Usati a piccole dosi, gli arsenicali inorganici esercitano diverse azioni farmacologiche, agendo come antianemici, anabolizzanti, ricostituenti (soluzione di Fowler e liquore di Pearson) e antiparassitari locali. Maggiore rilievo hanno tuttavia i derivati organici come gli arsenossidi (es. fenilarsenossido), gli arsenobenzoli (Salvarsan[®], Neo-salvarsan[®]) e i derivati pentavalenti (Atoxil[®], triparsamide, stovarsolo e melarsene) che acquistano efficacia subito dopo aver subito nell'organismo la riduzione a trivalenti (De Agostini, 1972).

1.4.2 Tossicità dell'arsenico

Gli effetti tossici dell'arsenico possono colpire un'ampia varietà di organismi tra cui anche l'uomo. La maggior parte dei casi di intossicazione nell'uomo sono dovuti all'esposizione a forme di arsenico inorganico soprattutto arseniti che risultano più tossici delle forme ossidate. L'arsenico, se ingerito, viene assorbito a livello del tratto gastrointestinale e, attraverso il flusso sanguigno, può raggiungere altri organi. L'avvelenamento acuto da arsenico (dose letale per l'uomo stimata attorno a 1-3 mg kg⁻¹) si manifesta con dolori addominali, nausea, vomito e diarrea, difficoltà nella deglutizione, soppressione della diuresi, sete, affaticamento muscolare, aritmie e può concludersi con la morte in due o tre giorni (Chou & De Rosa, 2003).

Gli effetti legati a forme di intossicazione cronica nell'uomo sono ben noti e riguardano soprattutto gli organi coinvolti nell'assorbimento, nell'accumulo e/o nell'escrezione dell'arsenico: come il tratto gastrointestinale, il sistema circolatorio, il fegato, i reni e il derma. Gli effetti più caratteristici di un'esposizione prolungata all'arsenico sono alterazioni a livello cutaneo che includono iper e ipo pigmentazione, formazione di neoplasie palmari e plantari che talora possono evolvere in cancro, neuropatie periferiche (es. BFP *Blackfoot disease patient*), danni a livello vascolare nonché il rischio di sviluppare forme tumorali a livello della vescica, dei polmoni, del fegato e dei reni (Chou & De Rosa, 2003; Duker et al., 2005). Tra questi sintomi, i danni a carico del derma sono i più frequenti dal momento che la pelle, insieme ai capelli e alle unghie, rappresentano luoghi di accumulo dell'arsenico privilegiati a causa dell'alto contenuto in cheratina e dei molti aminoacidi solforati ai cui gruppi sulfidrilici si lega facilmente l'As trivalente. Altri effetti sono mal funzionamenti delle attività ematopoietiche, anidremia (dovuto alla

perdita di acqua dal plasma sanguigno verso il tratto gastrointestinale), danni al fegato caratterizzati da itterizia, cirrosi portale e ascite, neuriti periferiche, anoressia e perdita di peso (Duker et al., 2005).

La tossicità dell'arsenico dipende da fattori che comprendono il diverso stato fisico (a seconda cioè che si presenti in forma gassosa, disciolta in soluzione oppure come polvere) dalla natura chimica e dallo stato di ossidazione in cui si può trovare. Come regola generale, è riconosciuto che tra gli arsenicali, quelli inorganici (l'arsina AsH_3 su tutti) risultano essere più tossici di quelli organici (arsenobetaina e arsenocolina si trovano normalmente negli organismi marini) e che le specie trivalenti As(III) esibiscono una maggiore tossicità rispetto a quelle pentavalenti As(V) .

1.4.2.1 Meccanismo di tossicità dell'arsenico pentavalente

A causa della similarità nella struttura e nelle proprietà chimiche, lo ione arsenato AsO_4^{3-} , può facilmente andare a sostituire in molte reazioni biochimiche il gruppo fosfato PO_4^{3-} . Un esempio è dato dalla formazione di glucosio-6-arsenato e del 6-arsenogluconato per reazione con glucosio e gluconato. Dei due composti, il glucosio-6-arsenato in particolare, somigliando alla molecola analoga del glucosio-6-fosfato, può diventare il substrato per l'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi, enzima chiave nella via dei pentosi fosfati, nonché inibire l'attività dell'esochinasi nel primo step della glicolisi.

Il fenomeno noto come arsenolisi impedisce la formazione di ATP sia a livello del substrato sia durante la fosforilazione ossidativa (Hughes, 2002; Juhasz et al., 2003; Duker et al., 2005). A livello del substrato l'arsenolisi può avvenire nel corso del processo glicolitico. In uno step, il

fosfato viene legato, in seguito all'azione della gliceraldeide-3P-deidrogenasi, alla D-gliceraldeide-3-fosfato per formare l'1,3-bifosfoglicerato. L'arsenato può sostituire il fosfato in questa reazione e portare alla formazione di 1-arsenato-3-fosfoglicerato. A causa probabilmente della maggior lunghezza rispetto al legame P–O, il legame As–O, risulta meno stabile e tende con molta più facilità ad idrolizzarsi in ione arsenato e 3-fosfoglicerato senza generare alcun composto fosforilato ad alto livello energetico (fig. 1.15).

L'arsenolisi interviene anche durante le reazioni all'interno dei mitocondri durante la fosforilazione ossidativa. In questo caso la competizione fra As e P si realizza nella formazione di adenosina-5'-difosfato-arsenato (ADP-As) che tende con facilità, anche in questo caso, ad idrolizzarsi al posto di adenosina-5'-difosfato-fosfato (ATP) portando a una sostanziale diminuzione dei livelli di ATP nella cellula (Hughes, 2002).

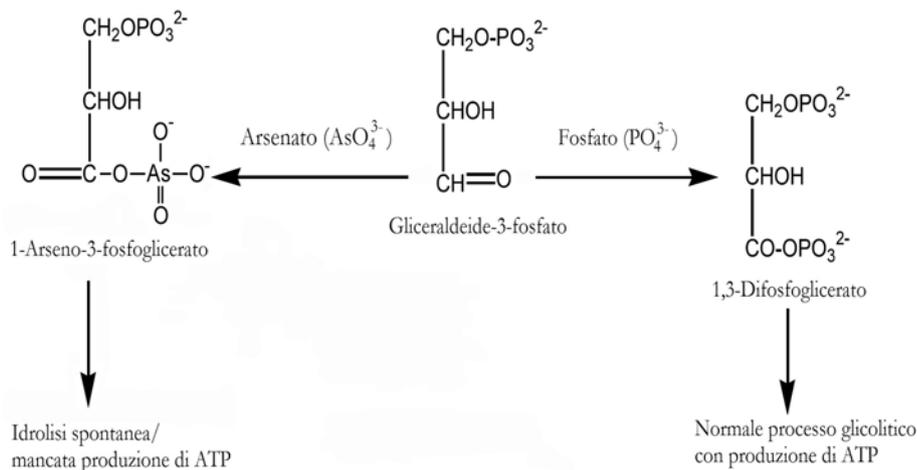


Figura 1.15 Inibizione da parte dello ione arsenato sulla fosforilazione a livello del substrato durante la glicolisi

1.4.2.2 Meccanismo di tossicità dell'arsenico trivalente

L'attività di molti enzimi, recettori e coenzimi dipende da specifici gruppi funzionali caratterizzati dalla presenza di gruppi tiolici e sulfidrilici. L'affinità degli arsenicali trivalenti nei confronti di composti tiolici (es. GSH, cisteina ecc.) può determinare l'inattivazione di importanti eventi biochimici qualora vadano ad interagire in siti di importanza critica per l'attività catalitica di determinati enzimi. Ciò nonostante, è stato anche proposto che il legame degli arseniti a siti proteici o enzimatici non essenziali potrebbe svolgere un ruolo come meccanismo di detossificazione (Hughes, 2002; Mandal & Suzuki, 2002).

Gli enzimi che partecipano al ciclo degli acidi tricarbossilici sono più di altri influenzati negativamente. L'azione inibitrice, a seguito della formazione del complesso tra As(III) e i gruppi -SH della molecola dell'acido lipoico (gruppo prostetico della diidrolipoil transacetilasi), ha come effetto l'inattivazione del complesso multienzimatico della piruvato deidrogenasi, passaggio obbligato per l'ingresso di tutti i carboidrati (attraverso l'acido piruvico) nel ciclo di Krebs o degli acidi tricarbossilici. Dalla sostituzione dei due atomi di idrogeno dei gruppi tiolici in presenza di As(III), infatti, si ha la sostituzione e la formazione del complesso diidrolipoilarsenato e l'arresto del processo di riossidazione del gruppo diidrolipoico necessario affinché il meccanismo di ossidazione dell'acido piruvico ad acetyl CoA non si interrompa (fig. 1.16) (Mandal & Suzuki, 2002).

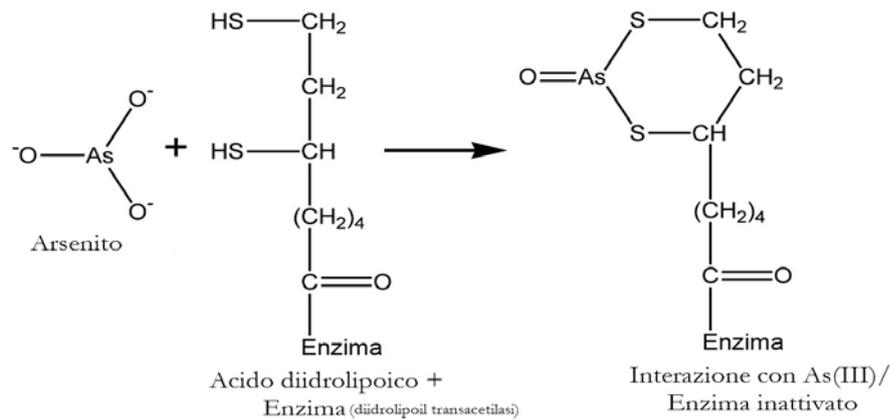


Figura 1.16 Azione tossica dell'arsenico trivalente nei confronti dell'attività dell'enzima diidrolipoil transacetilasi del complesso della Piruvato deidrogenasi.

1.4.2.3 Fitotossicità dell'arsenico

Non è ancora noto quale ruolo rivesta l'arsenico nella nutrizione delle piante, e sebbene in modestissime quantità possa esplicare effetti benefici, all'aumentare delle concentrazioni diviene estremamente fitotossico e causa di clorosi/necrosi delle foglie, di inibizione della crescita e morte dell'intera pianta. A causa delle notevoli differenze in termini di solubilità, mobilità e biodisponibilità dei vari composti dell'arsenico, la relazione fra l'elemento e la pianta non è ancora ben chiara. A questo si deve aggiungere che la composizione e lo stato fisico del suolo sono in grado di condizionare fortemente la disponibilità dell'arsenico per le piante, dal momento che l'assorbimento dell'elemento così come la sua potenziale fitotossicità, risulta maggiore laddove si ha un minor contenuto di ossidi di ferro e alluminio, di argille, e di sostanza organica capaci di agire come sostanze adsorbenti. Un altro fattore di primaria importanza che influenza la disponibilità di As nel suolo è il fosfato. L'anione fosfato e l'anione arsenato, analoghi da un punto di vista chimico, competono nelle reazioni di scambio anionico e per i siti di interazione con gli ossidi/idrossidi di Fe e Al; di conseguenza quanto più aumenta la concentrazione di fosfato, tanto maggiore sarà il

rilascio di arsenico nella soluzione circolante e viceversa. La competizione fra P e As, oltre a influenzare gli equilibri tra forme complessate e libere dei due elementi nel suolo, può incidere direttamente sulla fisiologia dell'assorbimento da parte delle radici delle piante, in quanto, arsenato e fosfato entrano all'interno delle radici sfruttando gli stessi meccanismi di trasporto (Gulz et al., 2005). Se da una parte ad ogni aumento della concentrazione del P nel suolo aumenta la disponibilità di As, in ragione di quanto detto in precedenza, dall'altra però, si può avere una maggiore competizione per i siti di accesso nella cellula a vantaggio del fosfato sfavorendo l'ingresso dell'As nella pianta. La complessità di tali equilibri può essere la ragione che spiega l'apparente contraddittorietà di molti risultati sull'accumulo e la fitotossicità dell'arsenico nelle piante riportati in letteratura (Caille et al., 2004).

La misurazione di alcuni parametri fisiologici e biochimici condotti su piante di fagiolo e di mais allevate in condizioni di idroponica e sottoposte al trattamento con soluzioni (2 e 5 ppm) di sodio arsenato, hanno indicato che, tra gli effetti tossici riscontrati, alcuni interessavano l'inibizione della crescita, l'attività stomatica, la riduzione del numero di radici secondarie e la riduzione del contenuto di proteine solubili e di pigmenti fotosintetici (clorofille e carotenoidi). E' inoltre emerso che la presenza di As favorisce la perossidazione lipidica e il danno alle membrane come conseguenza di un aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS *Reactive Oxygen Species*) (Stoeva et al., 2003/04; Stoeva et al. 2005). Recentemente è stato anche osservato che livelli da 4 a 16 mg L⁻¹ di arsenico, sia come As(V) che come As(III), hanno effetti sui processi di germinazione e in particolar modo riducono l'attività amilolitica della β e α -amilasi nelle cariossidi di frumento. Inoltre,

all'aumentare delle concentrazioni di arsenico, e in modo particolare As(III), è stata osservata una lineare diminuzione dell'allungamento della radice e del germoglio in plantule di frumento nei primi stadi di accrescimento (Liu et al., 2005) nonché una riduzione in termini di peso secco in piante di *Cichorium endivia* irrigate con acque contaminate (Calvo et al., 2006).

Sebbene, come è stato già detto, l'arsenico non costituisca un elemento essenziale per il metabolismo cellulare nelle piante, esistono riscontri come quella riportata da Carbonell-Barrachina et al. (1999) in cui quantità comunque limitate di arsenico (sottoforma di ione arsenato) da 1 a 5 mg L⁻¹ esercitavano una certa stimolazione della crescita (maggiore sostanza secca prodotta) in *Brassica napus* rispetto alle tesi di controllo. Secondo questi ed altri autori, la spiegazione di questo fenomeno è da mettere in collegamento con l'assimilazione del fosfato. Fosfato e arsenato come è noto condividono molte analogie chimiche, tanto che sono trasportati all'interno delle radici dagli stessi carriers di membrana, e sebbene l'As sia in grado sostituire il P nella molecola di ATP, come è stato visto, la molecola non può partecipare alle reazioni di trasferimento di energia. In queste condizioni la pianta potrebbe reagire come in condizioni di fosforo-carezza ed indurre una maggior produzione di trasportatori di membrana del P incrementandone l'*uptake* e così la crescita della pianta.

1.4.3 Tecnologie per il trattamento di bonifica dell'arsenico

In questo paragrafo, e in quello successivo, saranno prese rapidamente in considerazione le tecnologie applicabili su larga scala per il trattamento di suoli, rifiuti industriali e acque contaminate da arsenico, concedendo maggior enfasi alle tecniche di fitorisanamento.

1.4.3.1 Solidification/Stabilization (S/S)

Questo tipo di intervento permette di ridurre la mobilità di sostanze tossiche e di contaminanti mediante procedimenti chimici e fisici. Gli inquinanti possono essere infatti immobilizzati e resi potenzialmente meno pericolosi in seguito alla conversione in forme meno solubili, mobili o tossiche. Nel caso dell'arsenico, sono spesso usate sostanze come cemento, calce, solfato ferrico, persolfati, sostanze che permettono di alterare il pH del suolo, ed altri agenti talvolta coperti da brevetto.

1.4.3.2 Vitrification

Il sistema consiste nel ridurre la mobilità dei metalli incorporandoli in una matrice vetrosa chimicamente stabile ed inerte, per effetto delle alte temperature. Il processo permette di convertire in silicoarsenati i composti solubili dell'As(V) (USEPA, 2002).

1.4.3.3 Soil washing/ Acid extraction

Il processo si basa sul principio che molti contaminanti tendono a rimanere adsorbiti alle particelle di suolo più fini (argilla, limo) piuttosto che a quelle di grana maggiore (sabbia, scheletro). Per questo motivo è possibile allontanare per semplice separazione fisica la frazione di terreno a grana più fine che risulta maggiormente contaminata.

1.4.3.4 In-situ soil flushing

Questa tecnologia consente di estrarre i contaminanti dal suolo per mezzo dell'iniezione direttamente nel terreno di soluzioni composte da acidi, basi, agenti chelanti o surfattanti. Il contaminante portato così in soluzione o in emulsione, viene recuperato insieme alle soluzioni, prelevandolo da appositi pozzi.

1.4.3.5 Precipitation/Coprecipitation

Nella *Precipitation* sono utilizzate sostanze chimiche per rendere insolubili i contaminanti, ad esempio modificando il pH, aggiungendo agenti ossidanti, solfuri, idrossido di ferro solfato di ammonio ecc. Nella *Coprecipitation* la precipitazione dei contaminanti avviene solo se in presenza di altre sostanze adsorbenti es. calce, idrossido di calcio idrossido di alluminio ecc. Il materiale di deposito è poi rimosso dalla fase liquida per filtrazione o chiarificazione.

1.4.3.6 Membrane filtration (MF)

La tecnica porta alla separazione dei contaminanti dal mezzo liquido attraverso il passaggio in barriere o membrane. In base alla porosità si parla di microfiltrazione, ultrafiltrazione, nanofiltrazione e osmosi inversa. A causa del basso peso molecolare di molte specie dell'arsenico disciolte in soluzione, solamente la nanofiltrazione e l'osmosi inversa si rivelano di una certa efficacia. MF può essere abbinata a tecniche di *Precipitation/Coprecipitation* (USEPA, 2002).

1.4.3.7 Adsorption

In questo caso i soluti (inquinanti) si concentrano all'interno di una matrice adsorbente entro cui l'acqua contaminata viene fatta passare. Quando il potere adsorbente di questi materiali si esaurisce o vengono rigenerati o altrimenti smaltiti. Alcuni dei materiali adsorbenti utilizzati sono: alluminio e carbone attivo, granuli di rame/zinco o di idrossido ferrico ecc...

1.4.3.8 Ion exchange

Ion exchange consiste in un processo fisico/chimico in cui gli ioni, trattenuti elettrostaticamente sulla superficie di particolari resine spesso di natura sintetica, sono scambiati con altri ioni di uguale carica. In questo modo si ottiene la rimozione dalla fase acquosa dei composti ionici dei contaminanti per mezzo della sostituzione di cationi o anioni tra il contaminante e il mezzo di scambio (tipicamente acidi e basi forti e deboli).

1.4.3.9 Electrokinetic treatment

Questo tipo di trattamento si basa sul principio che l'applicazione di un campo elettrico determina la migrazione di molecole cariche. I contaminanti, es. gli ioni dei sali di As(V) e As(III) che raggiungono gli elettrodi possono essere rimossi per elettrodeposizione, precipitazione (in seguito al cambiamento di stato di ossidazione), o attraverso il pompaggio di acqua in corrispondenza degli elettrodi (USEPA, 2002).

1.4.4 Potenzialità delle tecniche di fitorisanamento

Attualmente sembra che non esista una tecnologia che possa trovare un'applicazione *in-situ* economicamente conveniente e con un impatto ridotto sull'ambiente per la rimozione dell'arsenico da suoli e acque inquinate. Oltre a questo, i metodi fisico-chimici come la precipitazione chimica e l'osmosi inversa, sebbene efficaci e applicati correntemente soprattutto per il trattamento *ex-situ* delle acque (acque di falda, acqua potabile, acque industriali ecc.), hanno notevoli svantaggi fra i quali su tutti gli alti costi e la produzione di grandi volumi di fanghi e salamoie altamente tossiche. L'uso delle piante si inserisce in questo contesto come uno strumento di un certo interesse per la bonifica di siti inquinati

in virtù dei bassi costi di attuazione, con un'influenza minima sull'ambiente e sull'opinione pubblica. In riferimento all'arsenico, le strategie di *phytoremediation* per le quali si intravedono interessanti potenzialità sono fitostabilizzazione, fitovolatilizzazione e soprattutto fitoestrazione/rizofiltrazione (Alkorta et al., 2004).

1.4.4.1 Fitostabilizzazione

La fitostabilizzazione, come spiegato nel capitolo precedente, fa riferimento all'uso di piante tolleranti in grado di stabilizzare la presenza di un contaminante nel terreno al fine di evitarne la dispersione per effetto dell'erosione del suolo, del percolamento nelle acque in profondità o del trasporto sottoforma di polveri. Piante As-tolleranti potenzialmente utili a questo scopo sono note da diverso tempo. Uno dei problemi maggiori riguarda il fatto che, in rapporto al tipo di contaminazione, ad elevate concentrazioni di arsenico, si possono associare forme di inquinamento da altri metalli soprattutto Cu e Zn. Questo implica che le piante da impiegare debbano esibire una capacità di tolleranza multipla per diversi metalli e metalloidi: esempi di questo tipo includono *Agrostis capillaris*, *Deschampsia cespitosa* e *Silene vulgaris* (Fitz & Wenzel, 2002).

Un'altra forma di fitostabilizzazione consiste nel diminuire la mobilità e la biodisponibilità degli inquinanti attraverso la formazione di precipitati e composti insolubili a livello della rizosfera oppure mediante adsorbimento sulle radici. In virtù delle analogie tra P e As, piante come *A. capillaris* potrebbero favorire la precipitazione di sali di As e Pb come dimostrato per i composti P-Pb. Altri processi di immobilizzazione dell'arsenico mediati dalla partecipazione delle piante all'interfaccia suolo-radice, sono la diminuzione del pH per rilascio di acidi organici e

l'ossidazione per trasporto di O₂ nel zona esplorata dalle radici (Fitz & Wenzel, 2002).

1.4.4.2 Fitovolatilizzazione

La fitovolatilizzazione è l'uso di piante per volatilizzare molecole inquinanti come dimostrato per il mercurio e il selenio. La volatilizzazione dell'arsenico avviene normalmente nell'ambiente naturale. Specie chimiche inorganiche subiscono, da parte della popolazione microbica del terreno, una prima riduzione e in seguito la metilazione che li rende volatili. Sebbene attualmente manchino delle prove sperimentali che dimostrino l'effetto della rizosfera sulla volatilizzazione dell'arsenico, alcuni studi suggeriscono che, in assenza di piante, la produzione di molecole volatili raggiunge proporzioni piuttosto limitate. E' noto, infatti, che in condizioni di laboratorio, la trasformazione dell'As(V), sia in anaerobiosi che in aerobiosi, procede prima con la riduzione ad As(III) e poi verso le forme volatili come monometilarsina (MMA), dimetilarsina (DMA) e trimetilarsina (TMA). Tuttavia la stabilità di questi composti (soprattutto di TMA) non è molto alta, poiché a contatto con l'acqua presente nel terreno tendono ad ossidarsi nuovamente in molecole solubili entro poche ore (Turpeinen et al., 2002). Inoltre, proprio per la manifesta tossicità di questi composti rispetto a quelli del selenio, lo sviluppo e l'applicazione di tecniche di fitovolatilizzazione dell'arsenico meriterebbero un'attenzione e una cautela particolare.

1.4.4.3 Fitoestrazione/Rizofiltrazione

La recente scoperta della felce *Pteris vittata* L. come la prima pianta che iperaccumula arsenico fino a concentrazioni che in certi casi hanno

superato i 22000 mg Kg⁻¹ (Ma et al., 2001) nella parte epigea, ha permesso di considerare pienamente la possibilità di applicare le tecniche di fitoestrazione e di rizofiltrazione come strategie per il risanamento di suoli e acque contaminate. Il capitolo successivo, in particolare, fornirà un'ampia trattazione delle conoscenze attuali su questa pianta e sulla potenzialità di essere impiegata nel fitorisanamento, nonché della particolare fisiologia dell'accumulo e della tolleranza a quantità di arsenico normalmente letali per la maggior parte degli organismi viventi.

1.5 *Pteris vittata* L.: una felce iperaccumulatrice di arsenico

1.5.1 Cenni botanici

1.5.1.1 Struttura delle felci

Le piante note comunemente come felci, appartengono alla grande Divisione di piante vascolari delle *Pteridophyta* Classe *Pterophyta* e costituiscono un gruppo piuttosto cospicuo comprendendo ben 240 generi e circa 10400 specie diverse.

Ciò che accomuna le varie Pteridofite è l'alternanza di due generazioni aploide e diploide tra loro ben diverse (antitetiche e eteromorfe), di cui però una prevale sull'altra. Lo sporofito (fase diploide) rappresenta, infatti, la generazione più evidente, mentre il gametofito (fase aploide) è un piccolo tallo con un diametro che supera raramente i 2,5 cm. Le due generazioni, giunte a maturità, sono fisiologicamente indipendenti. Lo sporofito è sempre fotosintetico, mentre il gametofito può non esserlo; i gametofiti di alcune felci sono principalmente o interamente dipendenti dal nutrimento che originariamente si trovava nelle spore. Lo sporofito di tutte le Pteridofite può raggiungere dimensioni notevoli ed è di norma costituito dai tre organi fondamentali delle piante vascolari o Tracheofite: radici, fusto e foglie (Cronquist, 1979; Gerola, 1997).

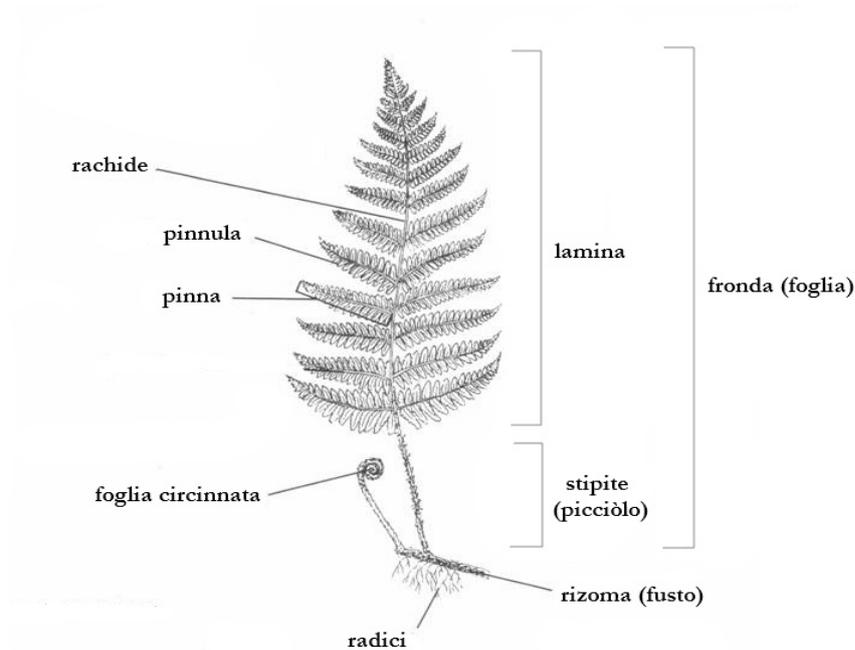


Figura 1.17 Le parti anatomiche di una felce

La radice primaria di una felce ha origine direttamente dall'embrione non appena è avvenuta la fecondazione. Il suo ruolo è fondamentalmente quello di garantire ancoraggio al substrato e naturalmente l'assorbimento di acqua e nutrienti per il giovane sporofito. Tuttavia, dal momento che l'allungamento e l'ispessimento della radice primaria ad un certo punto si interrompe, il ruolo principale è assunto da radici avventizie prodotte in successione con lo sviluppo del rizoma.

E' importante ricordare che, sebbene queste radici secondarie siano in grado di generare estese ramificazioni, sono prive del tessuto cambiale e pertanto non può avere luogo l'ingrossamento tipico della struttura secondaria.

Il fusto nelle diverse specie di felci differisce nella forma, nelle dimensioni e nel modo di accrescersi, è solitamente sotterraneo (fatta eccezione per il *caudex* delle felci arboree) tanto che è comunemente chiamato rizoma. L'habitus del rizoma assume una certa importanza

sistematica perché in base alla diversa lunghezza degli internodi, può assumere un aspetto più o meno strisciante fino ad essere estremamente raccorciato talora quasi assurgente, sempre orizzontale ma leggermente rivolto verso l'alto (fig.1.18) (Jones, 1987).

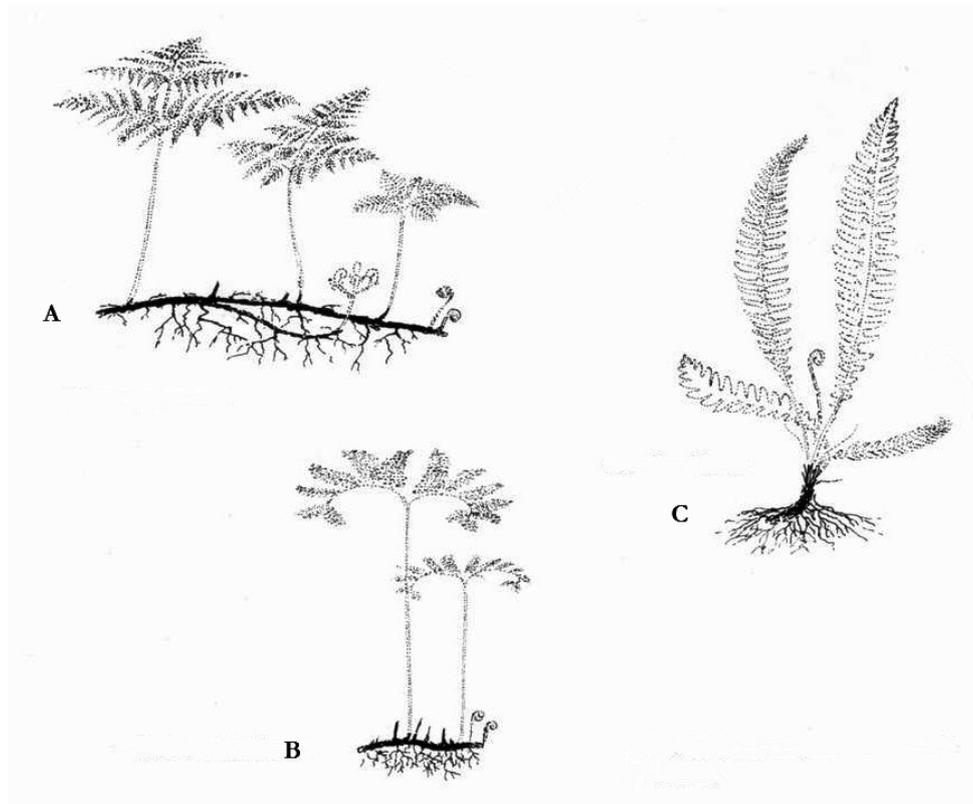


Figura 1.18 Differenti tipologie di rizoma: a) strisciante *long-creeping* b) raccorciato *short-creeping* c) assurgente.

Le foglie delle felci, chiamate spesso fronde, sono generalmente divise in uno stipite basale o picciolo e una lamina espansa. Quasi sempre la giovane foglia cresce srotolandosi dall'apice ed in questo caso la foglia è detta circinnata con la tipica forma detta "a pastorale".

Le fronde di quasi tutte le felci sono composte (la lamina è costituita da alcune o da molte parti distinte come fossero piccole foglie) ma esistono anche molte felci con foglie semplici. In molte foglie composte, il picciolo basale continua come asse principale o rachide della lamina

ramificandosi in diversi segmenti laterali. Foglie di questo tipo sono dette pennato-composte. Foglie pennato-composte in cui le ramificazioni primarie del rachide risultano ulteriormente ramificate si dicono invece pennato-decomposte. I rami laterali principali di una fronda pennato-composta prendono il nome di pinne o pinne primarie e gli ultimi segmenti quando le pinne stesse sono composte si dicono pinnule (Cronquist, 1979).

Le felci si riproducono attraverso spore prodotte all'interno di sporangi che nella maggior parte dei casi si trovano riuniti in gruppi distinti che prendono il nome di sori. Nella maggior parte delle felci moderne i sori sono distribuiti sulla pagina inferiore e lungo le nervature degli sporofilli che molto spesso non sono altro che normali foglie vegetative, anche se non di rado lo sporofillo può costituire un organo più o meno modificato e non fotosintetico.

A differenza delle specie exindusiate, un soro giovane è normalmente coperto da una sottile membrana protettiva chiamata indusio. La forma e la struttura dell'indusio variano a seconda della felce e le differenze forniscono utili informazioni di carattere tassonomico. Nelle piante del genere *Pteris* e *Adiantum* i sori si trovano riuniti vicino al margine della foglia, il quale si è spesso arrotolato all'indietro a formare un singolo indusio (in questo caso trattasi di un falso indusio) comune a tutta la fila dei sori (Cronquist, 1979).

Gli sporangi, pur essendo in specie differenti molto diversi per la forma, per il luogo dove vengono differenziati e per il tipo di deiscenza, sono invece abbastanza simili per quanto riguarda la struttura. In generale, gli sporangi sono costituiti esternamente da uno strato di cellule sterili, all'interno del quale se ne forma uno transitorio (tappeto), che serve per la nutrizione delle spore originate in seguito alla divisione meiotica delle

cellule di un tessuto ancora più interno detto archesporio (Gerola, 1997). La parete esterna di protezione, a maturità ha uno spessore unicellulare e ad essa è affidata la deiscenza dello sporangio. Le spore sono rilasciate in seguito alle contrazioni causate da cambiamenti igroscopici di un gruppo di cellule con pareti spesse che solitamente formano un anello (anulus). Tensioni che si sviluppano dentro l'anulus causano la rottura dello sporangio in un punto ben definito (stromium) o su una linea marcata da cellule con pareti più sottili (Cronquist, 1979; Jones, 1987).

Dalla geminazione delle spore aploidi si forma una struttura nota come protallo o gametofito anch'esso aploide. Il protallo, nei diversi tipi di felci, varia in forma e struttura ma è sempre piccolo e insignificante. Il tipo più comune è il tallo verde, sottile, piatto, più o meno a forma di cuore che raramente raggiunge la grandezza di un centimetro quadrato. Il gametofito è spesso fotosintetico ed è ancorato al substrato grazie a sottili cellule ialine allungate dette rizoidi. Lo sviluppo del protallo continua fino alla differenziazione degli organi riproduttivi, archegoni e anteridi portati su una fascia centrale di cellule leggermente più spessa che si estende dall'insenatura. L'archegonio, l'organo femminile, ha una forma vagamente a fiasca nella cui parte basale si differenzia la cellula uovo, il collo è leggermente sporgente e nei tipi cuoriformi è spesso curvato verso il retro del protallo. Gli anteridi, gli organi maschili, sono più o meno globosi e al loro interno maturano un numero imprecisato, che spesso supera il centinaio, di spermatozoi. Quando gli spermatozoi sono maturi, una cellula opercolare dell'anteridio degenera, lasciando un'apertura attraverso la quale fuoriescono. I gameti maschili sono nudi, spiralizzati ed hanno un numero variabile di flagelli ad un'estremità. Gli spermatozoi una volta liberati vengono attratti dall'uovo che si trova nell'archegonio da

stimoli chimici ed hanno bisogno di un velo di acqua in cui nuotare (Cronquist, 1979; Jones, 1987).

La fusione di una cellula uovo e di uno sperma nel centro dell'archegonio costituisce la fecondazione. Dalla formazione di uno zigote diploide, si forma un embrione dotato di una radice, di un fusto e di una foglia primaria che nelle prime fasi di vita trae nutrimento dal corpo del gametofito. Dopo che il nuovo sporofito si è trasformato in pianta indipendente, il gametofito prima o poi degenera e muore (fig. 1.19) (Cronquist, 1979).

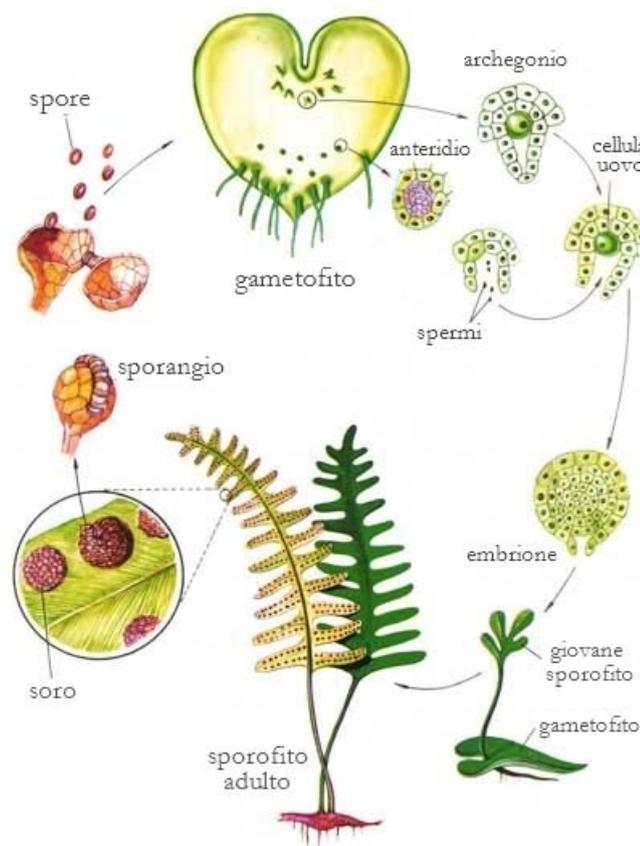


Figura 1.19 Rappresentazione del ciclo vitale di una felce

1.5.1.2 *Pteris vittata* L.

La specie *Pteris vittata*, appartiene alla Classe *Pterophyta*, Ordine *Filicales*, Famiglia *Pteridaceae*, Genere *Pteris*.



Figura 1.20 Esempio di *Pteris vittata* (Orto Botanico di Padova).

Il Genere *Pteris* comprende un vasto numero di specie prevalentemente di origine tropicale, anche se in alcuni casi si è avuto un adattamento anche a zone a clima temperato. Si tratta di felci terrestri in grado di colonizzare habitat tra loro diversi, dagli ambienti riparati del sottobosco

(*P. umbrosa*) agli spazi aperti (*P. vittata*); alcune specie riescono ad occupare da ambienti marginali antropizzati (*P. tremula*, *P. orientalis*, mentre altre si ritrovano in prossimità degli estuari dei grandi fiumi delle regioni tropicali (*P. ensiformis*). Mentre la maggior parte delle specie prediligono terreni sub-acidi estremamente umidi (*P. comans*), altre si sono adattate a terreni talvolta calcarei e soggetti ad un'alternanza di stagioni secche ed umide (*P. vittata*, *P. cretica*).

Pteris vittata in particolare si presenta come una pianta che può raggiungere dimensioni da 60 a 100 cm con un rizoma compatto ad internodi piuttosto raccorciati; le fronde sono pinnate, dotate da 15 a 30 segmenti di colore verde scuro e di consistenza coriacea con un'evidente pinna terminale. Le singole pinne che raggiungono dimensioni approssimativamente di 1,5-2 cm × 6-10 cm, hanno forma leggermente falciata, ondulata e sottilmente seghettata ai margini, generalmente di colore chiaro nella pagina inferiore con le nervature in evidenza.

I sori sono portati in file continue ai margini delle pinne prossime all'apice e sono protetti da un falso indusio creato dal ripiegamento del bordo più esterno della pinna (fig. 1.21) (Jones, 1987; Mickel, 2003; Pignatti, 1982).

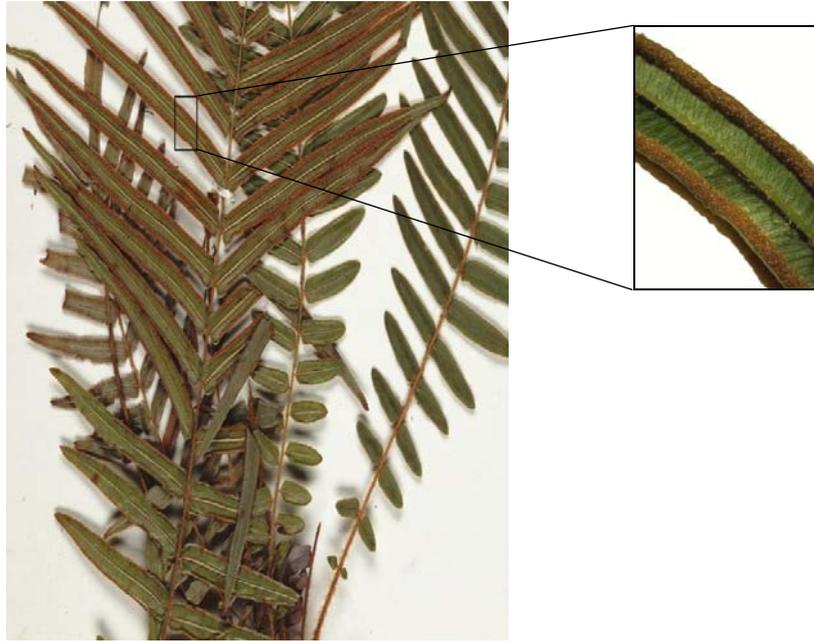


Figura 1.21 Fronde di *Pteris vittata*. Nel riquadro in alto a destra, un ingrandimento dei sori e della loro disposizione in due file lungo il margine inferiore della pinna.

1.5.2 Fisiologia della tolleranza e dell'iperaccumulo di arsenico in *Pteris vittata*

1.5.2.1 Evoluzione del fenomeno dell'iperaccumulo di arsenico nelle felci

La capacità di iperaccumulare l'arsenico sembra essere una prerogativa delle felci e in particolare di quelle specie dell'ordine delle *Pteridales* tra cui molte appartenenti al genere *Pteris* spp. e, come riportato da Francesconi et al. (2002), anche dalla specie *Pityrogramma calomelanos* originaria della Thailandia. Un altro dato interessante è il fatto che, a differenza di altre piante iperaccumulatrici di metalli, il carattere di iperaccumulatrice di As, almeno per quanto riguarda *Pteris vittata*, pare sia costitutivo esprimendosi indipendentemente dal fatto che la pianta si trovi a crescere su terreni contaminati o meno (Zhao et al., 2002).

I motivi per cui si sia affermato questo carattere rimangono ancora poco chiari, tuttavia esistono alcune ipotesi che propongono con una certa verosimiglianza, dei possibili percorsi evolutivi.

La vita sulla terra ferma, come del resto in precedenza quella nelle profondità degli oceani, si è affermata soprattutto in corrispondenza delle sorgenti di origine vulcanica e di substrati caratterizzati dalla presenza di grandi quantità di elementi minerali tra cui anche metalli e metalloidi. Per sopravvivere in queste condizioni, gli organismi viventi dovevano necessariamente essere in grado o di mantenere l'omeostasi citoplasmatica affinché i processi cellulari potessero funzionare, oppure adattare le proprie attività metaboliche in modo che potessero procedere anche in presenza di sostanze considerate tossiche. In riferimento all'arsenico, è noto che dai camini vulcanici terrestri e oceanici si ha un rilascio che raggiunge concentrazioni di gran lunga più elevate rispetto a quelle che mediamente si ritrovano sulla crosta terrestre. In

considerazione di quanto detto, è plausibile credere che le prime piante terrestri si siano trovate in condizione di dover far fronte alla presenza di arsenico adottando sistemi diversi tra cui probabilmente anche l'iperaccumulo (Meharg, 2002). Se l'iperaccumulo si fosse affermato come meccanismo di tolleranza, verosimilmente si sarebbe perso nel corso del tempo non appena le piante avessero colonizzato ecosistemi non più ricchi di arsenico. Per qualche motivo però, le specie del genere *Pteris* avrebbero mantenuto questo carattere semplicemente, o come “bagaglio” di geni ereditato da un loro progenitore oppure perché conferiva loro qualche particolare vantaggio selettivo. In alternativa, è plausibile pensare che il fenomeno dell'iperaccumulo si sia affermato in tempi successivi come risposta a una particolare pressione selettiva e abbia interessato principalmente felci del genere *Pteris* perchè forse rimasero confinate in ambienti ricchi di arsenico fino a tempi relativamente recenti della loro storia evolutiva (Meharg, 2003).

1.5.2.2 Assorbimento, trasporto e accumulo dell'arsenico

Diversamente dalla maggior parte delle piante che in presenza di arsenico tendono, attraverso una strategia di esclusione, a limitarne l'assorbimento e la traslocazione nei germogli, *Pteris vittata* è in grado di accumulare grandi quantità di arsenico principalmente nella porzione epigea. Tentativi volti a valutare le potenzialità fitoestrattive di questa pianta, hanno riportato che le capacità di iperaccumulo in un terreno contaminato possono superare i 6000 mg As Kg⁻¹ in sostanza secca nelle fronde dopo sole otto settimane dal trapianto e con livelli di accumulo nelle radici oltre 20 volte più bassi (Ma et al., 2001; Tu et al., 2002).

Più recentemente è stato osservato che anche i gametofiti aploidi resistono alla presenza di arsenico e, allo stesso modo dello sporofito

adulto, si comportano come strutture in grado di iperaccumulare (Gumaelius et al., 2004).

Un aspetto interessante della fisiologia dell'assorbimento e dell'accumulo di arsenico riguarda l'interazione con il fosforo. Il fatto che entrambi gli elementi appartengano al V Gruppo fa sì che abbiano una configurazione elettronica molto simile e condividano molte caratteristiche chimiche. Nel suolo per esempio, lo ione arsenato e fosfato competono per gli stessi siti di adsorbimento, con il risultato che ogni aumento della concentrazione di arsenato nella soluzione circolante ha come effetto la diminuzione della quantità di fosfato adsorbito e viceversa (vedi par. 14.2). Allo stesso modo anche a livello delle radici sarebbe stato riscontrato un rapporto di tipo competitivo tra i due ioni per gli stessi trasportatori. Tuttavia nella maggior parte delle piante gli effetti di questa competizione appaiono poco significativi: primo perché lo ione arsenato risulta fitotossico anche a dosi relativamente basse e secondo perché i trasportatori hanno una maggiore affinità per il fosfato. In certi casi addirittura, la presenza di quantità relativamente alte di arsenato nel suolo favorirebbe l'*uptake* del fosfato in seguito a una regolazione positiva della trascrizione dei geni per i trasportatori come risposta fisiologica alla percezione di una P-carezza (Tu & Ma, 2003).

Nel caso di *Pteris vittata*, per il fatto che è in grado di accumulare notevoli quantità di arsenico, gli effetti della competizione fra As e P si mostrano ben più evidenti. In prove condotte in idroponica, l'influsso di arsenato è risultato fortemente ridotto dalla presenza di fosfato. In esperimenti a lungo termine, infatti, la concentrazione di As diminuiva all'aumentare della concentrazione di fosfato. E' stato inoltre osservato che in condizioni di affamamento da fosfato per alcuni giorni, le piante accumulavano arsenico nelle radici con una velocità maggiore in ragione

probabilmente di un incremento della densità dei trasportatori di membrana P/As indotto dal trattamento (Wang et al., 2002).

La maggior parte degli studi sulla fisiologia dell'assorbimento dell'arsenico si sono concentrati quasi interamente sulle specie pentavalenti, in quanto più rappresentative degli ambienti aerobici ossidanti occupati dalle piante. In condizioni di anaerobiosi l'arsenato è prontamente ridotto ad arsenito e può essere assorbito dalle radici. Sebbene ancora non esistano riscontri definitivi su *Pteris vittata*, è stato osservato che l'assorbimento di arsenito in microrganismi come *Saccharomyces cerevisiae* è mediato dalla presenza di canali per il trasporto di acqua e glicerolo (acquagliceroporine) appartenenti alla famiglia delle MIP (*major intrinsic protein*). La presenza di questi canali rende possibile l'attraversamento della membrana cellulare da parte dell'acqua e di altre molecole a basso peso molecolare ed elettricamente neutre come il glicerolo, l'urea, l'acido borico e composti dell'arsenico trivalente come $\text{As}(\text{OH})_3$. Più recentemente, in seguito a studi sulla cinetica dell'assorbimento dell'arsenito è stata postulata l'esistenza di trasportatori transmembranalmente MIPs/acquagliceroporine in piante come il riso. In presenza di concentrazioni crescenti di glicerolo e di $\text{Sb}(\text{OH})_3$, un analogo di $\text{As}(\text{OH})_3$, si osservava una diminuzione lineare dell'assorbimento di arsenito nelle radici come in presenza di un fenomeno di competizione per gli stessi trasportatori (Meharg & Jardine, 2003).

Piante come *Pteris vittata* in grado di accumulare arsenico preferenzialmente nella porzione epigea piuttosto che nelle radici, hanno evoluto un sistema molto efficiente di traslocazione attraverso la via xilematica. Proprio in ragione di una maggiore corrente linfatica in risposta a un maggior flusso traspirativo, le fronde più adulte

accumulerebbero concentrazioni di arsenico superiori rispetto alle fronde più giovani (Zhang et al., 2002).

In *P. vittata*, è stato osservato che, mentre nelle fronde si ritrova principalmente l'arsenico trivalente con circa il 60-74% sul totale, nelle radici prevale la specie pentavalente. Risultati simili sono stati ottenuti anche per un'altra felce iperaccumulatrice di arsenico, *Pityrogramma calomelanos* in cui circa il 60-72% dell'arsenico estratto nelle fronde era nella forma ridotta, mentre il 95% dell'arsenico totale nelle radici era presente nella forma ossidata (Zhang et al., 2002; Francesconi et al. 2002). Le piante terrestri, a differenza di molte alghe, non hanno sistemi di detossificazione dell'arsenico per mezzo della metilazione. Nelle felci come *P. vittata* sembra probabile, invece, che la riduzione dell'As(V) ad As(III) per opera di una arsenato riduttasi, sia un passaggio fondamentale nel processo di detossificazione mediante la rimozione dal citosol. Il fenomeno può sembrare paradossale dal momento che As(III) è generalmente considerato più tossico di As(V) (Zhang et al., 2002). Una possibile spiegazione del motivo che non si sia evoluto un sistema di estrusione specifico per l'arsenato, può essere dovuto al fatto che in un ambiente primordiale non ossidante, la maggior parte dell'arsenico doveva presentarsi nella sua forma ridotta come As(III). In questa situazione i primi organismi avrebbero evoluto dei meccanismi di detossificazione specifici per l'arsenico trivalente e non per l'arsenico pentavalente. Una volta che l'atmosfera divenne un ambiente ossidante e l'arsenito ossidato ad arsenato, i meccanismi di resistenza all'As(V) si sarebbero evoluti sulla base di quelli esistenti per l'eliminazione di As(III) attraverso la selezione di una riduttasi specifica per l'arsenato (Rosen, 2002).

Quando, come nel caso di *Pteris vittata*, si osservano elevate concentrazioni di arsenico nei germogli piuttosto che nelle radici, siamo di fronte a un sistema di trasporto particolarmente efficiente. Una delle principali differenze fra una specie accumulatrice di arsenico e una non-accumulatrice pare sia proprio la velocità con cui le radici riescono a mobilizzare e a trasferire l'As verso la parte epigea della pianta. Analisi condotte su radici di felci iperaccumulatrici (*P. vittata* e *P. cretica*) hanno mostrato che la quantità di arsenico estraibile era maggiore rispetto a quella presente in radici di altre felci non iperaccumulatrici (es. *Nephrolepis exaltata*). Questa osservazione suggerirebbe il fatto che ci potrebbe essere un pool di As mobile maggiormente disponibile alla traslocazione nelle specie iperaccumulatrici, mentre nelle altre, la maggior parte dell'arsenico assorbito risulterebbe sequestrato stabilmente all'interno dei vacuoli delle cellule della radice. E' quindi plausibile pensare che piante come *P. vittata* o *P. cretica* possano, allo stesso modo delle specie non-accumulatrici, accumulare una certa quantità di As nei vacuoli all'interno della radice (sebbene in quantità minori) ma, a differenza di quest'ultime, possedere un meccanismo di efflusso che garantirebbe la rimobilizzazione dell'As dal vacuolo (Poynton et al., 2004).

1.5.2.3 Localizzazione dell'arsenico in *P. vittata*

In un recente lavoro di Pickering et al. (2006) è stato possibile acquisire, in modo non invasivo, immagini dettagliate circa la localizzazione delle diverse specie di arsenico all'interno dei vari organi di *P. vittata*, attraverso l'uso della spettroscopia a raggi X (XAS) (fig. 1.21).

A livello delle pinne (le foglie che compongono la fronda) l'arsenito era la specie predominante con livelli che hanno raggiunto valori fino a 25 mM in prossimità delle nervature. Per contro, la presenza di arsenato è

risultata generalmente esigua nella lamina anche se sono state riscontrate concentrazioni fino a 1 mM all'interno delle nervature.

Un attento esame del rachide della fronda, ha rivelato l'assenza di arsenito rispetto all'arsenato confinato prevalentemente nella porzione centrale dei vasi linfatici. L'osservazione in parte confermerebbe l'ipotesi, sebbene non da tutti condivisa, proposta da Kertulis et al. (2005), per cui sarebbe l'arsenato ad essere traslocato seguendo il flusso xilematico ed essere poi ridotto ad arsenito una volta giunto alle fronde.

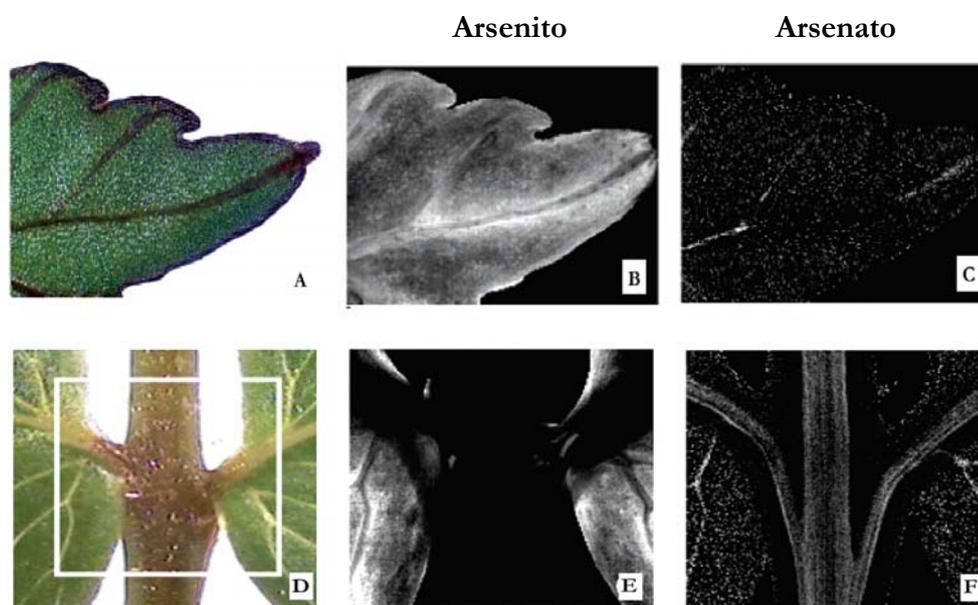


Figura 1.22 Le immagini mostrano rispettivamente la porzione apicale di una pinna (fig. A-C) e di un tratto di rachide di una fronda (fig. D-F) di *P. vittata*. Le immagini B-C ed E-F, acquisite con la tecnologia XAS (X-ray Absorption Spectroscopy) rivelano in particolare la localizzazione di arsenito e arsenato nelle due porzioni di pianta (da Pickering et al. 2006).

A livello cellulare la distribuzione di As nelle pinne di *P. vittata* rispetta le osservazioni fatte nelle foglie di altre piante iperaccumulatrici. Similmente allo Zn in *Thlaspi caerulescens* e al Ni in *Alyssum lesbiacum* e *A. bertolonii*, As è prevalentemente accumulato nello strato di cellule dell'epidermide sia della pagina inferiore che superiore della pinna. In seguito ad un'indagine più approfondita per mezzo della microanalisi a raggi X, è stato possibile evidenziare che la presenza dell'As a livello sub-

cellulare, sia significativamente rappresentata nella porzione centrale della cellula. Dal momento che la maggior parte del volume interno della cellula è occupato dal vacuolo, è plausibile affermare che sia quello il luogo in cui l'arsenico venga accumulato (Lombi et al., 2002). La figura 1.23, mette a confronto la localizzazione dell'arsenico e del silicio all'interno delle cellule di una sezione di pinna di *P. vittata*. E' evidente come l'As a differenza del Si, che per motivi meccanici tende a concentrarsi lungo le pareti esterne delle cellule, risulti distribuito più uniformemente occupandone gli spazi interni.

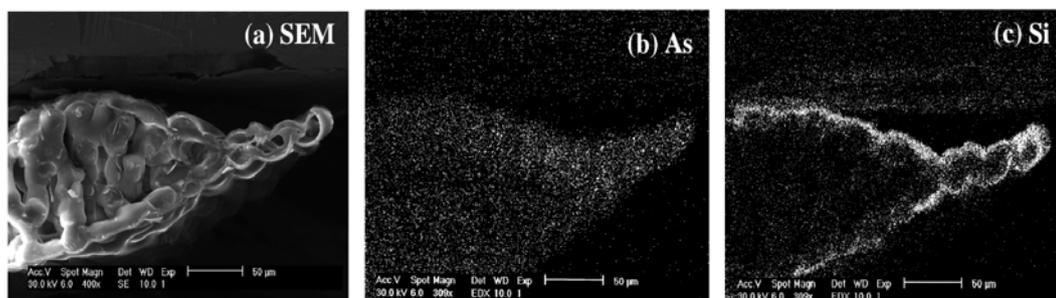


Figura 1.23 Scanning electron micrograph (SEM) di una sezione di pinna di *P. vittata* (a) e la corrispondente distribuzione di As (b) e Si (c) per mezzo della tecnologia EDXA Energy Dispersive X-ray Microanalyses (da Lombi et al., 2002)

1.5.2.4 Ruolo dei composti tiolici nella tolleranza e iperaccumulo di As in *P. vittata*

Le piante in grado di accumulare metalli tossici condividono tutte la caratteristica di tollerarne elevate concentrazioni senza subire conseguenze legate alla loro tossicità. Come è stato illustrato in precedenza, mentre alcune piante hanno evoluto la capacità di evitare o escludere i metalli al fine di ridurne o impedirne l'ingresso nelle cellule, altre hanno sviluppato veri e propri meccanismi di detossificazione che gli permettono di sopportare elevate concentrazioni del metallo altrimenti tossiche.

Alcune fra le possibili risposte alla presenza di elementi tossici includono l'attivazione di vie metaboliche alternative meno sensibili alla presenza di ioni metallici, modificazioni a carico della struttura degli enzimi, o l'alterazione della permeabilità della membrana attraverso arrangiamenti strutturali o modifiche nella composizione (Cai et al., 2004).

Sulla base di una serie di osservazioni, sembra piuttosto che in *P. vittata* il meccanismo più probabile, coinvolto nella detossificazione e nell'iperaccumulo di arsenico, sia la chelazione dello ione per mezzo di ligandi e il suo sequestro in distretti lontani dai siti del metabolismo della cellula come il vacuolo (Cai et al., 2004; Zhao et al., 2002).

Come è stato descritto in precedenza, As(III) è la specie predominante nella parte epigea di *P. vittata* a differenza delle radici in cui si ritrova principalmente As(V). In ragione della grande affinità dell'arsenito con i gruppi tiolici, sarebbe ragionevole attendersi la formazione di complessi stabili con la categoria di composti come le fitochelatine (PC) coinvolte in molte specie vegetali nella resistenza ai metalli. Effettivamente in seguito alla presenza di As, molte piante reagiscono aumentando la sintesi di fitochelatine come dimostrano i lavori di Maitani et al. (1996) su culture cellule radicali di *Rubia tinctorum*, di Schmöger et al. (2000) su sospensioni cellulari di *Rauwolfia serpentina*, di Schat et al. (2002) in radici di *Silene vulgaris* e di Hartley-Whitaker et al. (2001) in cui viene dimostrato che la tolleranza all'arsenico esibita da *Holcus lunatus* dipende, oltre che dalla soppressione del sistema di trasporto ad alta affinità P/As, anche dalla presenza delle fitochelatine.

P. vittata, differisce dalle piante non iperaccumulatrici fondamentalmente per due aspetti. In primo luogo, è stata rilevata la presenza di sole PC₂, cioè fitochelatine con due ripetizioni dell'unità strutturale (γ-Glu-Cys)_n-Gly, mentre nelle altre specie studiate fin ora si trovano PCs a catena più

lunga. In secondo luogo, sebbene anche in *P. vittata* sia stata osservata un'induzione della sintesi di PC₂ soprattutto nei germogli dove la concentrazione di As(III) è maggiore, le quantità prodotte risultano di gran lunga inferiori a quelle riportate per *Holcus lunatus*, *Silene vulgaris*, e *Rauwolfia serpentina*, e con un rapporto molare fra As(III) e gruppi tiolici dei residui di cisteina di PCs molto basso (0.09 nelle fronde e 0.03 nelle radici). Questo basso rapporto implica che solo una piccola porzione dell'arsenico accumulato (circa 1-3%) risulterebbe effettivamente legato alle fitochelatine, a differenza di *R. serpentina*, *S. vulgaris* e *H. lunatus* in cui il rapporto mediamente di 3:1 è in accordo con il modello strutturale che prevede che ogni atomo di As trivalente si coordini con tre gruppi tiolici dei residui di cisteina (Zhao et al., 2003; Raab et al., 2004).

Sulla base di questi risultati è stato escluso da molti autori l'idea che le fitochelatine possano svolgere un ruolo importante nell'immagazzinamento di As nella cellula di *P. vittata*. Tuttavia come è stato suggerito da Zhao et al. (2003), le fitochelatine possono agire come shuttle nel trasporto dell'arsenico dal citoplasma al vacuolo in cui l'As si troverebbe in forma libera non complessata. In tempi più recenti è emerso che un ruolo attivo nel processo di iperaccumulo e di tolleranza all'arsenico in *P. vittata* lo svolga piuttosto un composto tiolico a basso peso molecolare non ancora identificato, per il quale esisterebbe una forte correlazione positiva fra l'assorbimento di As e la sua biosintesi nella fronda (Cai et al., 2004).

1.6 Scopo della Tesi

Come si evince dagli argomenti trattati nell'introduzione, lo smaltimento dei rifiuti generati dalle attività umane costituisce uno dei maggiori problemi con cui devono confrontarsi le Amministrazioni di tutti i Paesi della terra, e in particolar modo quelli più industrializzati.

Uno dei maggiori problemi in questo ambito, è rappresentato dalla presenza di metalli e metalloidi tossici che tendono ad un anomalo e nocivo accumulo in quelle zone caratterizzate da una forte pressione antropica. In questo contesto appare rilevante l'inquinamento da arsenico, caratteristico di quelle zone interessate da un'intensa attività mineraria, di tipo industriale, specialmente per la produzione di sostanze chimiche per l'agricoltura o per il trattamento del legname da costruzione, o semplicemente in corrispondenza zone adibite a discarica. La ricerca di soluzioni a basso costo ed ecocompatibili, negli ultimi anni, si è orientata verso l'adozione di piante con caratteristiche tali da poterne prevedere un loro impiego nelle tecnologie di biorisanamento o più precisamente di fitorisanamento.

In questa prospettiva la felce *Pteris vittata* si colloca come una pianta con caratteristiche promettenti al fine di essere impiegata in progetti di bonifica che prevedano la fitoestrazione dell'arsenico.

Dal momento che solo recentemente è nota la sua particolare attitudine all'iperaccumulo del metalloide, sono relativamente limitati i dati disponibili circa la sua applicazione specie su larga scala. Per questo motivo le indagini rivolte ad un possibile utilizzo a scopi fitodepurativi devono essere condotte secondo quelli che sono solitamente i passaggi compiuti in ricerche di questo tipo.

Da tenere inoltre in considerazione è il fatto che *P. vittata*, oltre ad essere una specie vegetale filogeneticamente molto distante dalle comuni piante a seme che non riveste importanza agronomica né ornamentale, la sua diffusione in natura riguarda prevalentemente aree a clima tropicale. E' quindi importante, prima ancora della sua applicazione biotecnologica, valutarne la capacità di adattamento alle nostre latitudini, a condizioni pedologiche difficili e spesso marginali, nonché ottimizzarne le tecniche di coltivazione ed allevamento onde ottenere esemplari capaci oltre che di sopravvivere anche di produrre grande biomassa.

Le indagini che ci siamo proposti di compiere sono state quelle in condizioni di mesocosmo ossia condotte in spazi limitati tali da limitare le variabili. Sono state predisposte in primo luogo delle colture idroponiche, in modo da svincolarci da ogni fattore di variabilità esterno al sistema pianta-metallo, e poi in coltura su terreno contaminato proveniente da un sito ex-industriale per avvicinarci a quelle che sono le condizioni reali di inquinamento.

Lavorando in un contesto di artificiosità, ci allontaniamo da quelle che sono le concrete risposte della pianta all'impatto con i fattori ambientali esterni ma otteniamo, nel breve periodo, delle risposte circa le sue capacità generali ad attuare efficaci meccanismi di resistenza e di accumulo dell'elemento tossico.

Il presente lavoro dovrebbe inoltre incoraggiare successivi e più realistici studi su scala più ampia che, supportati da prove in laboratorio, sollecitino ulteriori ricerche nella valutazione delle potenzialità della pianta.

Lavorare in condizione di mesocosmo ci ha obbligato ad intervenire con piante giovani e ad analizzare le risposte alla contaminazione nel tempo breve.

Anche se individui di età più avanzata potrebbero dare delle risposte diverse in virtù di un maggior ritmo evapotraspirativo e di una maggiore biomassa in cui incamerare la sostanza, le prove svolte non tolgono significatività alla nostra ricerca. In primo luogo perché lavorare in mesocosmo porta sempre a dei risultati che divergono più o meno dai riscontri in pieno campo e sarebbe illusorio sforzarsi per ottenere il contrario. Per questo motivo se lo scopo principale ha come oggetto lo studio di quelle che sono gli aspetti generali della resistenza e dell'iperaccumulo della sostanza tossica ci sembra che tali caratteristiche di fondo possano essere valutate in maniera significativa lavorando anche con piante giovani e con tempistiche di intervento che rientrino nell'ordine di pochi mesi.

Parte seconda

Materiali e Metodi

2.1 Materiale vegetale

Le prove sperimentali, sia in coltura idroponica che su terreno, sono state svolte impiegando due diversi ecotipi di *Pteris vittata* coltivati a partire da spore nel periodo novembre 2005 – maggio 2006. Nel caso dell'ecotipo identificato arbitrariamente con la sigla PvIt, le spore sono state raccolte da esemplari conservati presso l'Orto Botanico di Padova, mentre l'ecotipo denominato PvCh proviene da un centro di ricerca a Neuchâtel nella Svizzera occidentale.

2.1.1 Raccolta e semina delle spore

La raccolta delle spore è avvenuta selezionando fronde fertili dotate di sori maturi e già in fase di sporulazione.

Le fronde sono state conservate per circa due settimane in contenitori nel cui fondo erano sistemati fogli di carta per agevolare la raccolta delle spore, e mantenute a temperatura ambiente in un luogo asciutto e al riparo da correnti d'aria. Questo sistema si accelera il processo di maturazione e di apertura degli sporangi facilitando allo stesso tempo il recupero delle spore (fig. 1.1.).

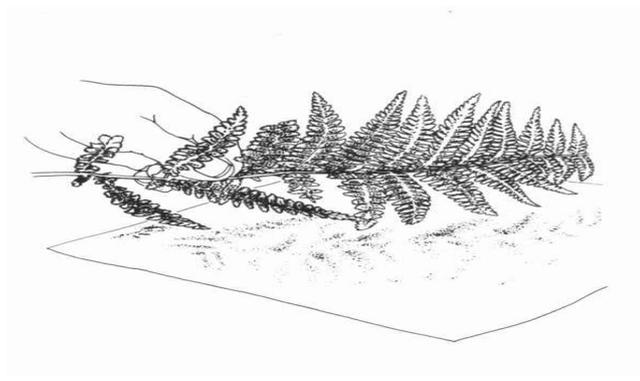


Figura 2.1 Le spore liberate dai sori di una fronda fertile si raccolgono su un semplice foglio di carta.

La semina ha richiesto l'adozione di particolari accorgimenti per far fronte alla difficoltà di avere un'adeguata germinazione delle spore e un pieno sviluppo dei gametofiti ma soprattutto per evitare il più possibile fenomeni di contaminazione del substrato da parte di funghi, alghe e muschi.

2.1.1.1 *Semina su mezzo agarizzato*

Tra i tentativi volti all'individuazione della tecnica più efficace per ottenere piante da utilizzare a scopo sperimentale è stata predisposta una prova di semina delle spore e di allevamento delle plantule su mezzi di crescita artificiale.

Il mezzo di coltura utilizzato segue il protocollo sperimentale di Dong et al., (2005).

Il mezzo di coltura conteneva una soluzione di sali minerali e vitamine MS (*Murashige & Skoog – basal*) (0,5×), agar allo 0,8% e saccarosio al 3% pH 6.5. La soluzione completa, collocata all'interno di barattoli in vetro (h=10 cm Ø= 5 cm) venivano sterilizzati in autoclave (120°C per 20 minuti).

Un passaggio fondamentale per la riuscita di una coltura su agar è garantire la sterilità oltre che dei contenitori e del mezzo di crescita anche del materiale vegetale scelto per la propagazione.

Per la sterilizzazione delle spore, è stato necessario ottimizzare un protocollo che consentisse di sterilizzare le spore di *P. vittata* senza però comprometterne la vitalità.

Dopo diversi tentavi, il metodo di sterilizzazione più efficace e allo stesso tempo meno aggressivo, è stato individuato utilizzando una soluzione al 50% di varechina commerciale unita a Tween 20 allo 0,5%.

10 mg di spore, previamente aliquotate in eppendorf, sono state sottoposte a un lavaggio con 2 ml della soluzione sterilizzante e

mantenute per 1 minuto in agitazione. Segue una prima centrifugazione di 2 minuti per rimuovere la soluzione sterilizzante e in seguito altre 5 centrifugazioni per rimuovere acqua sterile impiegata per i lavaggi.

Una volta che il terreno di crescita all'interno dei vasetti si è solidificato, si è proceduti al piastramento delle Le spore disinfettate vengono portate in sospensione in acqua sterile e seminate all'interno dei vasetti. I vasetti sono stati poi chiusi, accuratamente sigillati e sistemati in cella climatica.

Le operazioni, di sterilizzazione e piastramento delle spore, sono state condotte lavorando sotto cappa a flusso laminare in condizioni di sterilità.

2.1.1.2 Semina su terreno

Il substrato ottimale è risultato quello costituito da una miscela di terriccio Hawita-Flor[®] e sabbia quarzifera nel rapporto in volume di 3:1 (pH 7.5 ca.). Il terreno è stato autoclavato alla temperatura di 120°C per 20 minuti e, ancora caldo, è stato versato all'interno di vasetti per la semina per circa $\frac{3}{4}$ del loro volume. È importante introdurre terriccio ancora tiepido perché il calore sprigionato crea correnti d'aria in uscita dal vaso, limitando l'ingresso alghe, spore di funghi o di muschio.

Il vasellame utilizzato per la semina è stato il seguente:

- vasetti in plastica tondi 10/105 cm
- sottovaso rettangolare di 42 cm

Sia i vasetti che il sottovaso sono stati previamente lavati e disinfettati con una soluzione diluita di ipoclorito di sodio.

Una volta che il terriccio è stato distribuito nei vasetti si è proceduto con la semina. A causa delle ridotte dimensioni delle spore di felce (20-60µm), per garantire una densità di semina adeguata ed evitare di spargerne una quantità eccessiva e disomogenea, è stato utilizzato un

metodo che consiste nel far aderire le spore su carta, che viene successivamente capovolta sopra il vasetto e colpita delicatamente far cadere le spore sul terreno (fig. 2.2)

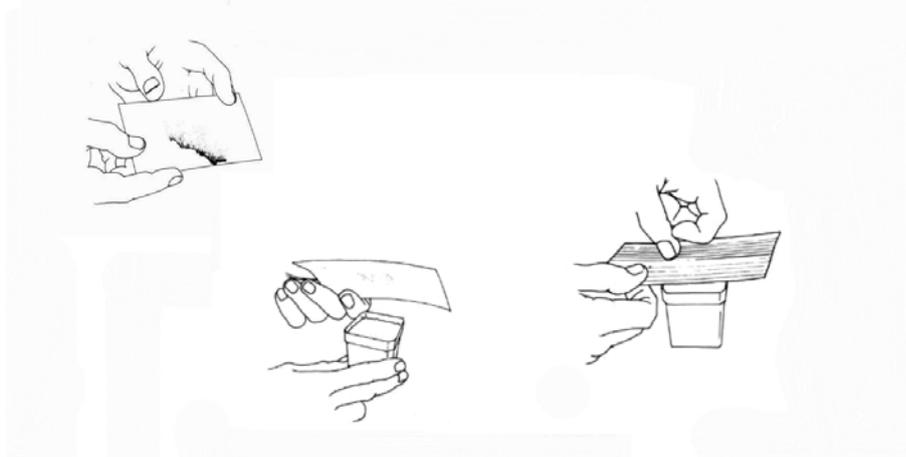


Figura 2.2 Sequenza delle operazioni di semina in vasetti delle spore di felce

A semina avvenuta, ciascun vasetto è stato umettato con acqua autoclavata mediante un nebulizzatore e successivamente sigillato, insieme al sottovaso, con della pellicola trasparente al fine di mantenere il più possibile l'umidità all'interno e allo stesso tempo impedire l'ingresso di patogeni e/o altri agenti inquinanti (fig. 2.3).

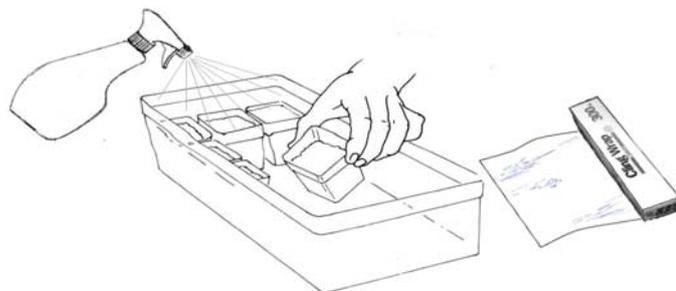


Figura 2.3 Operazioni conclusive: nebulizzazione del terreno appena seminato e copertura dei singoli vasi con pellicola trasparente.

Una volta effettuata la semina, i vasi e i sottovasi (fig. 2.4) sono stati posti in cella climatica alle seguenti condizioni:

fotoperiodo 12 ore

intensità luminosa 70 (P.A.R.) $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$

temperatura 23°C

umidità relativa 50-60%

Ogni due settimane, veniva somministrata al sottovaso una soluzione Hoagland diluita al 50% per garantire una migliore qualità della germinazione e un più rapido sviluppo dei gametofiti.

L'emergenza dei gametofiti ha richiesto mediamente dai 10 ai 15 giorni.

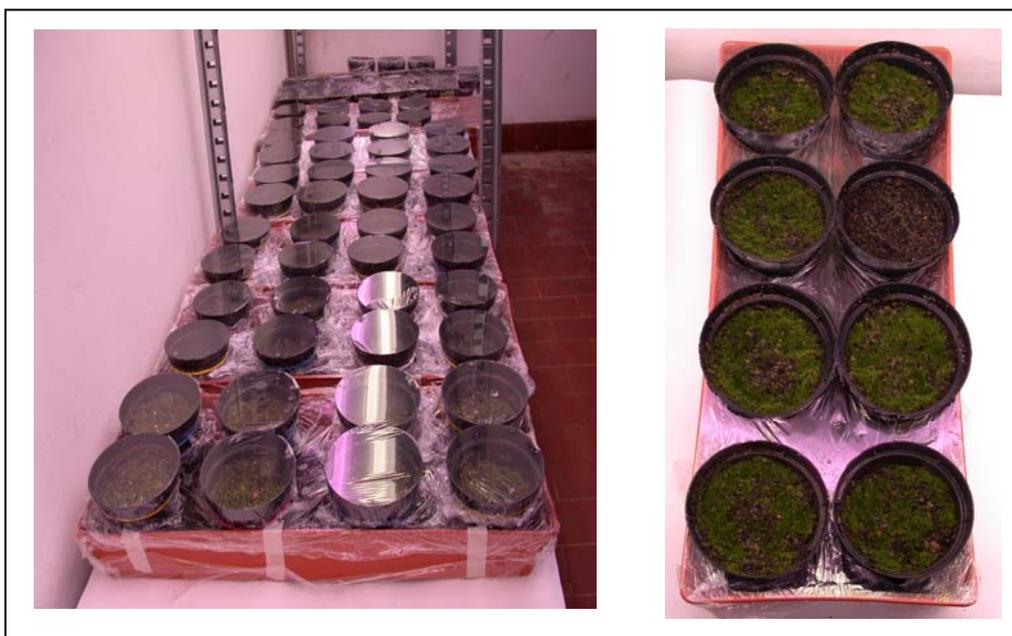


Figura 2.4 La foto di destra mostra l'allestimento in camera di crescita dei vasetti e sottovasi che sono stati destinati alla semina. Nella foto di sinistra alcuni vasetti a cui è stata rimossa la pellicola trasparente e in evidenza una rigogliosa copertura di gametofiti appena germinati.

2.1.2 Trapianto degli sporofiti

Dopo un periodo di circa 60-70 giorni dalla semina, i gametofiti provenienti dalle colture in vaso, avevano raggiunto il pieno sviluppo maturando anche archegoni e anteridi.

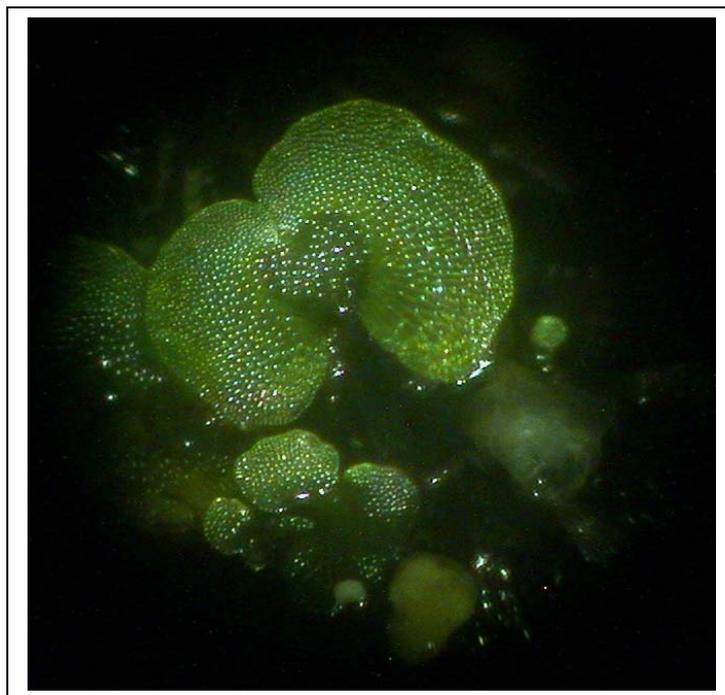


Figura 2.5 Ingrandimento allo stereomicroscopio di un gametofito di *P. vittata*.

Successivamente, in seguito alla fecondazione degli archegoni sono apparsi i giovani sporofiti (vedi par. 1.5.1) con una certa uniformità nel numero e nelle dimensioni.

Al fine di garantire lo spazio sufficiente alla crescita delle plantule è stato necessario intervenire con un primo trapianto.

Per il trapianto sono stati utilizzati nuovi contenitori più spaziosi e in particolare dei vasi rettangolari delle dimensioni 40×20×16 cm (fig. 2.7) riempiti per metà con la stessa miscela 3:1 di terriccio e sabbia anche in questo caso autoclavata.

Con l'ausilio di un cilindro di metallo del diametro di circa 2 cm con il margine leggermente affilato, sono state estratte piccole zollette o *patches* di sporofiti dai vasi di semina e trasferite nel nuovo contenitore alla distanza di circa 4-5 cm l'una dall'altra (fig. 2.6).



Figura 2.6 Il trapianto per mezzo di un 'foratappi' di metallo, garantisce una maggiore uniformità delle *patches* di sporofiti da trasferire.

Una volta disposte le *patches* alla giusta distanza, sono state irrorate con abbondante acqua sterile finemente nebulizzata al fine di appressare il terreno alle radichette e di limitare lo stress idrico provocato alle giovani plantule durante tutte le operazioni di trapianto. Tutto il vaso a cassetta è stato in ultimo coperto con pellicola trasparente allo scopo di mantenere all'interno un ambiente umido. Nei mesi che sono seguiti al trapianto, la pellicola è stata prima forata in più punti poi a poco a poco rimossa per acclimatare le piante all'ambiente esterno.

Le irrigazioni, anche in questo caso con cadenze di due settimane sono state praticate bagnando il sottovaso con acqua di rubinetto alternata a soluzione Hoagland diluita.



Figura 2.7 La foto di sinistra mostra il vaso a cassetta in cui è avvenuto il trapianto in zollette degli sporofiti (foto di destra).

Trascorsi circa cinque mesi dal primo trapianto, gli sporofiti avevano raggiunto vigore e dimensioni sufficienti da poter essere trasferiti in una piccola serra non climatizzata e successivamente venire utilizzati per le prove sperimentali in idroponica e su terreni contaminati.

Di seguito riportati i valori della temperatura e umidità relativa medi registrati nel periodo Maggio/Ottobre 2006 forniti dal servizio Agrometeorologico dell'ARSIA di Pisa.

	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre
Temp.	19°C	22°C	27°C	23°C	22°C	18°C
U.R.	59%	50%	54%	58%	63%	66%



Figura 2.8 In alto, la serretta dove sono state condotte tutte le prove, mantenuta sotto un costante ombreggiamento per limitare gli effetti negativi sulle felci di un'eccessiva illuminazione. In basso, le piante di *P. vittata* ormai pronte per essere utilizzate negli esperimenti.

2.2 Prove in idroponica

Per coltura idroponica si intende un sistema di coltivazione in cui la pianta è svincolata dal legame con il suolo, e le radici si trovano a contatto diretto con un mezzo liquido da cui traggono le sostanze nutritive di cui hanno bisogno, fornite in dosi controllate. In questo modo, la prova sperimentale risulta sottratta dalla variabilità delle condizioni del suolo ossia dalle complesse interazioni del sistema pianta-terreno-microorganismi. È altresì vero che, per gli stessi motivi, i risultati ottenuti con questa forma di coltivazione possono fornire solo dei dati indicativi riguardo a una futura applicazione in suolo.

Le prove realizzate in condizioni di coltura idroponica nell'ambito di questo lavoro di Tesi, hanno avuto inizio a partire dalla metà del mese di maggio 2006 e si sono concluse intorno ai primi giorni di ottobre dello stesso anno. Sono state messe a punto prove volte all'individuazione di soglie sopravvivenza di *Pteris vittata* a due specie chimiche dell'arsenico, arsenato di sodio e (meta)arsenito di sodio e della diversa abilità di iperaccumulo dei due ecotipi di *P. vittata* (PvIt e PvCh) nei confronti di soluzioni contenenti arsenato, arsenito e di una combinazione dei due sali.

2.2.1 Acclimatazione all'idroponica

Ogni test effettuato in idroponica è stato preceduto da una fase iniziale di acclimatazione, un periodo di circa 30 giorni per consentire alle piante di adattarsi al passaggio dal terreno al mezzo liquido.

Partendo da spore, non è stato possibile allevare individui singoli, cioè formati da un singolo gametofito, pertanto saranno considerate piante un

insieme, il più possibile omogeneo, di individui cresciuti assieme da ogni singola “*patch*” trapiantata.

Le piante di una dimensione media di 20-25 cm e provviste di 10-15 fronde sono state prelevate, tagliando una zolla di terriccio e radici, dai contenitori dove era avvenuto il primo trapianto.

Con estrema attenzione e cura si sono lavate le radici sciacquandole sotto acqua corrente fino a che tutto o quasi il substrato non fosse stato rimosso. Segue il trasferimento delle felci all'interno di cestelli in plastica di 5 cm di diametro e 6 cm di profondità, riempiti con perlite lavata (un materiale inerte tale da garantire il solo sostegno meccanico alle piante).

I cestelli sono stati sistemati all'interno di alveoli praticati appositamente su una piattaforma in polistirolo delle dimensioni di 25×25×4 cm in grado di alloggiare fino a 8 piante. Richiamandosi ad un sistema di coltivazione in idroponica chiamato *floating*, i supporti in polistirolo sono fatti galleggiare all'interno di vasche del volume di circa 10 litri riempite con 8 litri di soluzione Hoagland 0,5×. Infine, per garantire una sufficiente ossigenazione degli apparati radicali immersi nella soluzione nutritiva, ogni vasca è stata dotata di un diffusore di aria collegato ad aeratori esterni (fig. 2.9).

Il periodo minimo affinché le piante potessero considerarsi acclimatate è stato di circa un mese.

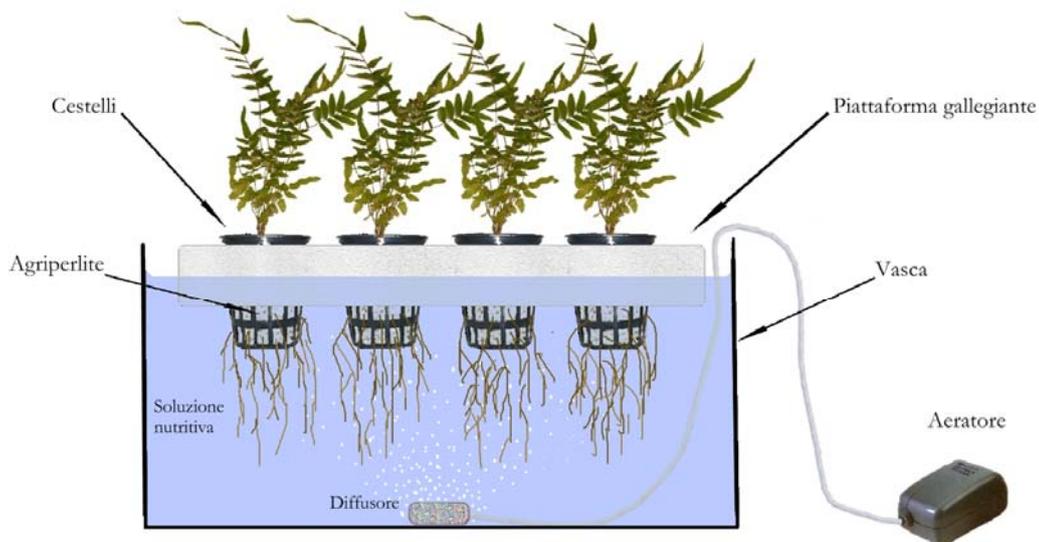


Figura 2.9 Schema dell'impianto di idrocoltura: le piante sono poste all'interno di cestelli forati riempiti con agriperlite per consentire la circolazione della soluzione nutritiva. Una pietra porosa sul fondo della vasca collegata ad un aeratore assicura una buona ossigenazione degli apparati radicali.

2.2.2 Soglie di sopravvivenza

Nel presente lavoro è stata ricercata la concentrazione soglia dell'arsenico, sottoforma di As(V) e As(III), nella soluzione nutritiva. La concentrazione soglia è quel dosaggio che, pur ponendo la pianta in condizioni di stress, ne consente la sopravvivenza unita a una significativa capacità di assorbimento dell'elemento tossico.

2.2.2.1 Soglia di sopravvivenza all'As(V)

Dal momento che non era noto quale fosse la concentrazione massima di arsenico nella forma pentavalente tollerata da *Pteris vittata*, sono state preparate sei diverse soluzioni a concentrazioni crescenti di arsenato di

sodio eptaidratato ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Fluka[®] p. 98,5%), scelte in modo da abbracciare uno spettro più ampio possibile (vedi tab. 2.1).

Tabella 2.1 Per ogni concentrazione di sale impiegata nell'esperimento (colonna di sinistra) è fatto corrispondere l'effettiva concentrazione di As (colonna di destra)

Concentrazione di arsenato di sodio $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	[As]
Controllo 0 ppm (mg/l)	0,513 ppm (mg/l)
100 ppm (mg/l)	17,300 ppm (mg/l)
250 ppm (mg/l)	45,401 ppm (mg/l)
500 ppm (mg/l)	93,826 ppm (mg/l)
800 ppm (mg/l)	160,285 ppm (mg/l)
1600 ppm (mg/l)	320,569 ppm (mg/l)

Le soluzioni sono state realizzate facendo solubilizzare le diverse quantità di sale all'interno del mezzo nutritivo rappresentato da soluzione Hoagland 0,5×. Ciascuna soluzione, del volume di 3 litri, è stata versata all'interno di sei vaschette di plastica 30×20×10 cm correggendo il pH a 6.5-6.8 con HCl 1 M.

Con un sistema di coltura idroponica simile a quello descritto precedentemente, sono state trasferite, per ciascuna delle sei tesi, tre piante¹ dell'ecotipo PvIt provenienti dalle vasche di acclimatazione.

Trascorso un periodo di 30 giorni, sono stati raccolti campioni delle soluzioni e del materiale vegetale, distinto in radici e fronde, pesato in eppendorf (circa 0,5 g ciascuno), posto in azoto liquido e conservato a -70°C fino al momento delle analisi.

¹ Si ricorda che per semplicità, sono considerate come piante quelle che in realtà sono gruppi più o meno omogenei di individui diversi, ottenuti in seguito al trapianto di *patches* di più sporofiti.



Figura 2.10 La foto mostra il supporto il polistirolo in cui sono inseriti i cestelli da idroponica pronti per essere trasferiti nelle soluzioni contaminate. Il film plastico nero consente di limitare l'evaporazione della soluzione nutritiva e controllare la proliferazione di eventuali alghe all'interno delle vasche.

2.2.2.2 Soglia di sopravvivenza all'As(III)

Anche nel caso della prova con l'arsenico trivalente è stata allestita una prova del tutto simile alla precedente. In questo caso sono state preparate cinque diverse soluzioni Hoagland 0,5× a cui sono state aggiunte quantità crescenti di (meta)arsenito di sodio (NaAsO_2 Sigma-Aldrich® p. 90%) rispettando le concentrazioni riportate in tabella 2.2.

Tabella 2.2 Per ogni concentrazione di sale impiegata nell'esperimento (colonna di sinistra) è fatto corrispondere l'effettiva concentrazione di As (colonna di destra)

Concentrazione di (meta)arsenito di sodio NaAsO ₂	[As]
Controllo 0 ppm (mg/l)	0,458 ppm (mg/l)
100 ppm (mg/l)	41,537 ppm (mg/l)
250 ppm (mg/l)	109,000 ppm (mg/l)
500 ppm (mg/l)	225,250 ppm (mg/l)
800 ppm (mg/l)	384,790 ppm (mg/l)

Come descritto, per ogni vaschetta sono state sistemate tre piante dell'ecotipo PvIt già acclimatate all'idroponica e mantenute a contatto con le soluzioni contaminate anche in questo caso per 30 giorni. Al termine della prova, soluzioni e piante sono state campionate con lo stesso criterio visto in precedenza.

2.2.3 Prove di *uptake* dell'arsenico

Al fine di valutare le capacità fitoestrattive dei due ecotipi di *P. vittata* (PvIt e PvCh), sono state allestite due prove in idrocoltura in condizioni in cui l'arsenico era presente come arsenato, arsenito e miscela arsenato/arsenito.

In base a quanto ricavato dagli esperimenti precedenti sulle soglie di tolleranza alle diverse specie di As, è stato ritenuto appropriato adottare soluzioni con una concentrazione di arsenico intermedia, individuata in 250 e 500 ppm di arsenato e (meta)arsenito di sodio. Nel caso delle soluzioni in cui i due sali si trovavano in combinazione fra loro, sono state utilizzate sempre concentrazioni di 250 e 500 ppm in cui però il

contributo in moli di As da parte di un sale corrispondesse a quello dell'altro (tab. 2.3)

Tabella 2.3 Nella colonna di destra, le concentrazioni dei sali di arsenato e arsenito di sodio impiegate nelle prove di uptake in idroponica con i due ecotipi di *P. vittata* (PvIt & PvCh), mentre a sinistra le concentrazioni di As corrispondenti.

Concentrazione dei sali di arsenico	[As]	
	PvIt	PvCh
Controllo 0 ppm (mg/l)	0,698 ppm (mg/l)	0,382 ppm (mg/l)
Na ₂ HAsO ₄ ·7H ₂ O 250 ppm (mg/l)	56,624 ppm (mg/l)	54,649 ppm (mg/l)
Na ₂ HAsO ₄ ·7H ₂ O 500 ppm (mg/l)	111,165 ppm (mg/l)	108,863 ppm (mg/l)
NaAsO ₂ 250 ppm (mg/l)	98,825 ppm (mg/l)	109,850 ppm (mg/l)
NaAsO ₂ 500 ppm (mg/l)	217,140 ppm (mg/l)	221,191 ppm (mg/l)
Na ₂ HAsO ₄ ·7H ₂ O & NaAsO ₂ 250 ppm (mg/l)	74,234 ppm (mg/l)	73,773 ppm (mg/l)
Na ₂ HAsO ₄ ·7H ₂ O & NaAsO ₂ 500 ppm (mg/l)	147,756 ppm (mg/l)	143,580 ppm (mg/l)

L'esperimento è stato condotto utilizzando lo stesso impianto di *floating* descritto nel par. 2.2.2. Le prove sono state allestite con quattro piante per vaschetta e condotte anche in questo caso per un periodo di 30 giorni. Al termine sono stati fatti campionamenti sul materiale vegetale e sulle soluzioni di idroponica (vedi par. 2.2.2).

2.3 Prove su terreni contaminati

Al fine di valutare l'efficacia di un intervento di fitorisanamento mediante l'uso di *Pteris vittata* in condizioni di reale contaminazione da arsenico, è stata predisposta una prova in cui sono stati utilizzati dei terreni provenienti da un sito industriale non più attivo e in via di bonifica.

2.3.1 Breve descrizione dell'ex sito industriale

Il sito in questione è compreso fra i comuni di Massa e di Carrara, e rientra nell'area industriale estesa complessivamente per 3537 ha e considerata ai sensi Legge 426/98; D.M. 21/12/99 e Decreto del Ministero dell'Ambiente n°468 del 18 settembre 2001 Sito di Interesse Nazionale.

Il sito (fig. 2.11), che per motivi di riservatezza non verrà nominato, ha una superficie complessiva 167.000 m². Il terreno, e la falda sotterranea risultano contaminati da metalli e da pesticidi. Attualmente è in fase di esecuzione l'abbattimento dei fabbricati. Ulteriori indagini sono state svolte per la caratterizzazione dei suoli al di sotto dei fabbricati ed i risultati sono stati portati in conferenza dei servizi presso il Ministero dell'Ambiente insieme al progetto definitivo di bonifica con misure di sicurezza. Accertata la presenza di arsenico, DDT e diossine nel sottosuolo. La bonifica dei suoli e degli edifici è in corso; i rifiuti sono smaltiti in discarica 2C in Germania e in impianti di termodistruzione a Ferrara e Ravenna. Attualmente è attivo l'impianto pilota per il trattamento delle acque.



Figura 2.11 Visione panoramica dell'ex sito industriale. Da notare che la maggior parte dell'area è stata provvisoriamente asfaltata come provvedimento di messa in sicurezza del sito in attesa di essere bonificato con misure definitive.

2.3.1.1 I terreni

Una delle principali sorgenti di inquinamento da arsenico del sito è data dalla presenza di un esteso deposito stratificato di ceneri di pirite (fig. 2.12).

Le ceneri di pirite costituiscono il necessario ed inevitabile residuo del procedimento industriale di fabbricazione dell'acido solforico.



Figura 2.12 Nella foto uno scavo aperto all'interno del sito industriale. In evidenza lo strato rossastro delle ceneri di pirite e, immediatamente sotto, un orizzonte di terreno sabbioso di colore grigio chiaro. Campioni di entrambe le tipologie di suolo sono state utilizzate per le prove di fitorisanamento con *P. vittata*.

Tale sostanza, fin dai primi anni del secolo scorso, è stata utilizzata su larga scala per la preparazione dei concimi chimici (perfosfati) destinati all'agricoltura; essa, più in generale, rappresenta inoltre uno dei più importanti prodotti intermedi di tutta l'industria chimica di base. L'acido solforico veniva ottenuto attraverso il c.d. arrostitimento del minerale pirite in forni speciali a seguito del quale il residuo solido che ne derivava era costituito, appunto, dalla cenere di pirite. Negli anni che hanno preceduto il secondo conflitto mondiale furono realizzati in Italia circa cento stabilimenti di varia potenzialità per la produzione di acido solforico a partire dalle pirite. Solamente verso i primi anni '70 la materia prima pirite è stata sostituita dallo zolfo - proveniente dalla desolforazione dei gas naturali e dei prodotti petroliferi - che è divenuto l'ingrediente di base per la produzione dell'acido solforico attraverso

l'impiego di una diversa tecnologia. Si possono così trovare ancora oggi depositi (più o meno controllati) di queste ceneri in varie zone del Paese. Al fine, come è stato detto, di testare l'effettiva capacità di *P. vittata*, in primo luogo ad adattarsi a terreni provenienti da aree industriali e in seguito valutarne le capacità fitoestrattive, sono stati prelevati dei campioni delle strato di ceneri di pirite e dello strato immediatamente sottostante caratterizzato da un'elevata frazione di sabbia fine e grossolana e stoccati separatamente in due fusti da 60 litri dotati di chiusura ermetica.

2.3.2 Allestimento della prova

L'impostazione sperimentale della prova ha previsto la realizzazione di nove diverse tesi ciascuna replicata quattro volte secondo lo schema riportato in tabella 2.3.

Tabella 2.3

Terreni			Terreni+piante		
Terreno non contaminato ²	Ceneri di pirite	Sabbia	PvIt	PvCh	
			Terreno non contaminato	Ceneri di pirite	Sabbia

L'impianto è stato realizzato con piante appartenenti ai due ecotipi di età compresa fra 9 e 10 mesi, trapiantate mantenendo un minimo di pane di terra, all'interno di vasi tondi 18×16 cm riempiti con volume di 2 litri dei vari terreni. Sul fondo dei vasi è stato disposto uno strato di circa 2 cm di argilla espansa Leca[®] per evitare la fuoriuscita di terreno dai fori alla base del vaso (fig. 2.13).

² Il terreno non contaminato consiste nella miscela terriccio/sabbia 3:1 impiegata nelle semine, nei trapianti e nei rinvasi.



Figura 2.13 Il disegno in alto mostra uno spaccato longitudinale dei vasi e del modo con cui sono state messe a dimora le piante nei vasi. In basso, una foto scattata una volta che l'operazione di trapianto è stata ultimata, i vasi sono stati sottoposti a un regime di irrigazione mediante un impianto a goccia temporizzato.

Dopo un periodo di 60 e 190 giorni dalla messa a dimora delle piante, sono stati effettuati i campionamenti del materiale vegetale nella

fattispecie delle sole fronde visto la difficoltà di garantire una completa rimozione di residui di substrato dalle radici mediante il lavaggio.

I campioni raccolti, sono stati essiccati in stufa a 70°C per una settimana dopodiché polverizzati in mortaio con azoto liquido ed infine conservati in provette chiuse ermeticamente in attesa delle analisi.

Per quanto riguarda i terreni, sono stati fatti dei prelievi mediante carotaggi all'inizio e alla fine dell'esperimento (dopo 190 gg). Anche in questo caso sono stati essiccati in stufa e conservati in tubi ermetici pronti per essere analizzati.

2.4 Metodologia analitica

La valutazione del livello di accumulo di As nei tessuti vegetali, nelle soluzioni di idroponica e nei terreni è stata possibile con l'ausilio di un'apparecchiatura ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry*) modello *Optima 2000 DV*- Perkin-Elmer (fig. 2.14).

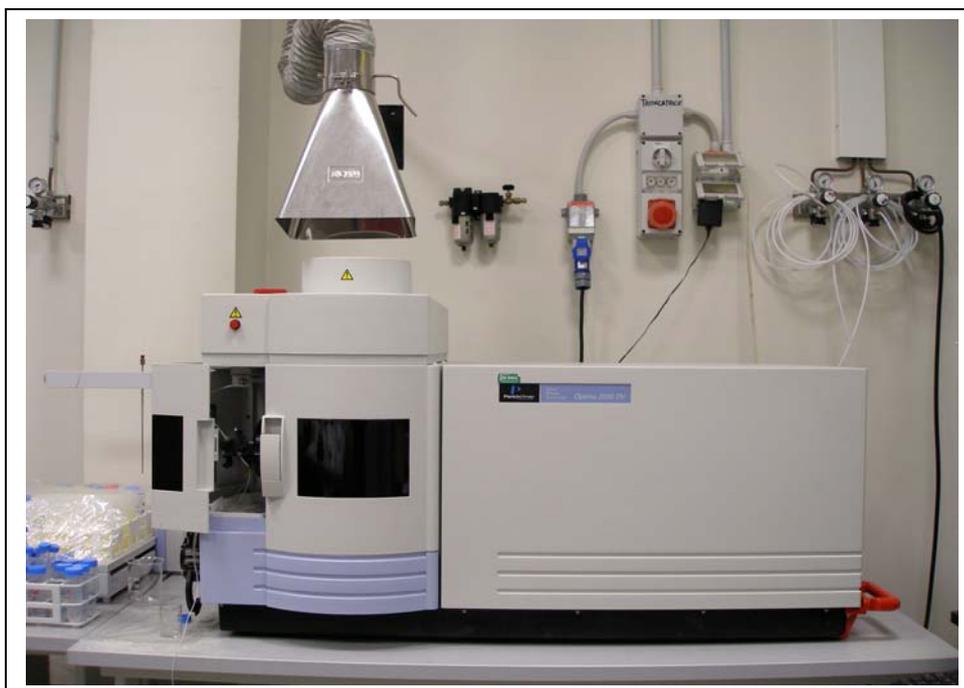


Figura 2.14 ICP-OES utilizzato per l'analisi dei campioni.

2.4.1 Caratteristiche generali dello strumento

La caratteristica generale ogni strumentazione ICP è la generazione di una sorgente di plasma ad altissima temperatura. In termini molto schematici, il principio di funzionamento è così descritto: del gas di argon viene iniettato e fatto turbinare all'interno di una torcia costituita

da tre tubi in quarzo tra loro concentrici. Un avvolgimento di rame, detto *load coil*, circonda dall'esterno l'estremità della torcia ed è collegato a un generatore di radio frequenze (RF) (fig. 2.15).

Quando viene applicata una potenza di 700-1500 W all'RF, si genera una corrente alternata che oscilla all'interno dell'avvolgimento in rame a una frequenza corrispondente a quella impostata dal generatore. Nella maggior parte degli strumenti ICP questa frequenza può andare da 27 a 40 MHz.

Il passaggio di corrente nel *load coil* genera a sua volta un campo elettromagnetico all'interno della torcia. A seguito della produzione di una scintilla prodotta da un elettrodo in grafite, alcuni atomi di argon subiscono ionizzazione. Gli elettroni allontanati, vengono immediatamente catturati dal potente campo magnetico ed accelerati secondo il principio definito come *inductive coupling*. Questi elettroni ad alta energia collidono con altri atomi di argon portandone via altri elettroni. Tale ionizzazione collisionale dell'argon, continua e si autoalimenta, generando il plasma, uno stato della materia in cui coesistono contemporaneamente atomi neutri, elettroni, e ioni in grado di raggiungere temperature fino a 6800 K (6526,85 °C) a differenza degli spettrometri a fiamma o a fornace in cui le temperature al massimo raggiungono i 3300 K (3026,85 °C).

Per poter essere introdotto all'interno della torcia, un campione da analizzare mediante ICP, deve essere necessariamente in forma liquida iniettato come aerosol grazie ad un apposito nebulizzatore (fig. 2.15). La prima funzione delle alte temperature è quella di rimuovere il solvente (*desolvation*), lasciando il campione sottoforma di microscopiche particelle di sali. La fase successiva consiste nella scomposizione di queste particelle in molecole separate (*vaporization*), che sono poi dissociate in

singoli atomi (*atomization*). Una volta che il campione è passato attraverso questi tre stadi, il plasma ne provoca l'eccitazione e la ionizzazione degli atomi. Perché un atomo o uno ione possa emettere nel suo spettro caratteristico, uno o più elettroni devono essere promossi ad un livello energetico più alto mediante un processo di eccitazione. L'eccitazione e la ionizzazione avvengono principalmente nella regione centrale del plasma detta *initial radiation zone* (IRZ) mentre nella porzione immediatamente successiva, detta *normal analytical zone* (NAZ), l'emissione degli atomi viene definitivamente rilevata e misurata.

Nell'ICP-OES, la radiazione emessa dall'eccitazione degli atomi e degli ioni nel plasma, viene misurata per ottenere informazioni sulla natura e composizione elementare del campione. Dal momento che le specie eccitate dal plasma emettono luce a diverse lunghezze d'onda, l'emissione è pertanto di tipo policromatico. Questo tipo di radiazione deve essere separata in singole lunghezze d'onda affinché l'emissione propria delle specie possa essere identificata e la sua intensità, misurata senza interferenze. La separazione della radiazione secondo le diverse lunghezze d'onda, avviene all'interno di uno spettrometro collegato alla torcia (fig. 2.15), grazie all'uso di un monocromatore, impiegato per misurare la luce a una lunghezza d'onda alla volta, oppure un policromatore, in grado di rilevare più lunghezze d'onda differenti contemporaneamente. In ogni caso la vera determinazione della luce, una volta scomposta alle diverse frequenze, avviene mediante appositi detector fotosensibili come il *photo-multiplier tube* (PMT), *charge-injection device* (CID) o come il *charge-coupled device* (CCD).

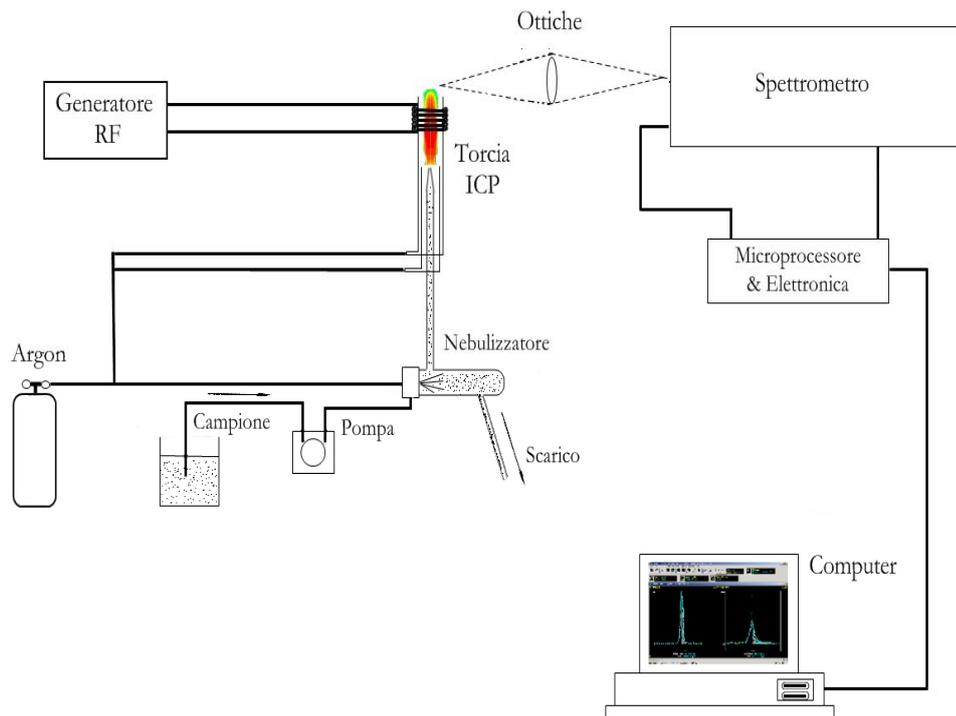


Figura 2.15 Il disegno illustra in forma schematica i principali componenti di un ICP-OES.

2.4.2 Analisi dei campioni tramite ICP-OES

La procedura seguita per la preparazione dei campioni per la lettura allo strumento ha seguito metodologie differenti a seconda che i campioni fossero tessuti vegetali, soluzioni di idroponica o terreni. In ogni caso sono state effettuate letture dell'As a lunghezza d'onda pari a 193,696 nm e del P a 178,221 nm.

2.4.2.1 Preparazione dei campioni vegetali

Relativamente alle prove condotte in idrocoltura, i campioni vegetali raccolti e conservati freschi secondo quanto specificato nel par. 2.3.2, sono stati mantenuti in stufa a 70°C per circa una settimana e per ottenere un materiale essiccato. Successivamente sono stati pesati con bilancia analitica (il peso medio generalmente si collocava attorno a 0,08 g) e avviati al processo di mineralizzazione.

La mineralizzazione del materiale è avvenuta all'interno di becker da 25 ml in cui sono stati aggiunti 5 ml di HNO₃ al 65% ultrapuro, il tutto scaldato su piastra riscaldante avendo cura di aumentare gradatamente la temperatura durante il corso della digestione fino a un massimo di 120°C (fig. 2.16). La digestione ha avuto una durata di c.a 24 ore.



Figura 2.16 *Batch* di campioni di piante in digestione in acido nitrico. Il bulbo in vetro a chiudere ciascun becker permette di far condensare in parte i vapori sprigionati durante la mineralizzazione su piastra riscaldante limitando le perdite di arsenico per volatilizzazione.

2.4.2.2 Preparazione dei campioni di suolo

Le analisi sui terreni impiegati nella prova di fitodecontaminazione descritta nel par. 2.3, sono state effettuate prendendo in considerazione la frazione di arsenico e fosforo solubile immediatamente disponibile ad essere assorbita dalle piante.

L'estrazione è avvenuta pesando circa 5 g di ciascun terreno (terreno non contaminato, ceneri di pirite e sabbia) in tubi da centrifuga da 38 ml a cui sono stati aggiunti 20 ml di una soluzione di CaCl_2 0,05M. Rispetto all'acqua pura, una soluzione di calcio cloruro simula di più la soluzione circolante di un terreno. La miscela così preparata è stata mantenuta in agitazione per 2 ore su agitatore e in seguito centrifugato per 20 minuti a 13000 rpm. Il surnatante, prima di essere analizzato all'ICP, è stato previamente filtrato sottovuoto con filtri in microfibra di vetro con una capacità di ritenzione delle particelle in sospensione fino ad un minimo di $1,5\mu\text{m}$ di diametro.

2.5 Indici dell'efficienza di fitoestrazione

La valutazione dell'arsenico asportato dalle piante di *Pteris vittata* è stata effettuata tramite la seguente espressione:

$$Q = C_f \cdot P_f$$

Q: quantità (μg) di As asportato

C_f : concentrazione ($\mu\text{g/g}$ di s.s.) di As nelle fronde

P_f : peso secco delle fronde (g)

Questa formula ci permette di quantificare l'As asportato e accumulato nella parte aerea della pianta trascurando il contributo delle radici poiché è la biomassa della porzione epigea ad essere rimossa in un contesto di fitorisanamento.

La concentrazione di arsenico nei tessuti da solo potrebbe non essere un buon indicatore dell'assorbimento dal terreno da parte delle piante perché non prende in considerazione la concentrazione dell'elemento nel suolo. Il Fattore di Bioconcentrazione (BF), che definito come il rapporto fra la concentrazione di As nei tessuti della pianta e la concentrazione nel suolo, può essere usato come indice per confrontare l'efficacia della pianta nel concentrare l'arsenico del terreno nella sua biomassa (Tu & Ma, 2002).

$$\mathbf{BF = C_f / C_s}$$

BF: *Bioconcentration Factor*

Cf: conc. ($\mu\text{g/g}$ di s.s.) di As nelle fronde

Cs: conc. ($\mu\text{g/g}$) di As nel substrato

Il Fattore di Traslocazione TF rappresenta un ulteriore indice che permette di valutare la capacità e l'efficacia della pianta nel traslocare la sostanza dalle radici ai tessuti epigei, ed è definito come il rapporto tra la concentrazione di arsenico nelle fronde e quella misurata nelle radici.

$$\mathbf{TF = C_f / C_r}$$

TF = *Translocation Factor*

Cf = conc. ($\mu\text{g/g}$ di s.s.) di As nelle fronde

C_r = conc. ($\mu\text{g/g}$ di s.s.) di As nelle radici

A causa dell'analogia chimica con il fosforo, l'arsenico può dar luogo a tossicità interferendo con molti processi fisiologici a cui prende parte il fosforo (vedi par. 1.4.2). Per queste ragioni, P dovrebbe avere un ruolo importante nelle piante per la difesa nei confronti della fitotossicità da As. Se così fosse, il rapporto (P/As) all'interno dei tessuti di una pianta, definito come la concentrazione molare di P diviso la concentrazione espressa in moli di As, potrebbe essere un buon indicatore per valutare oltre che la loro abbondanza relativa nei tessuti di una pianta, anche il loro effetto sulla crescita e lo stato fisiologico di una pianta (Tu & Ma, 2005).

$$\mathbf{P/As\ ratio = [P]/[As]}$$

P/As ratio = rapporto fra la concentrazione di P e As

[P] = conc. (moli/g di s.s.) di fosforo nei tessuti

[As] = conc. (moli/g di s.s.) di arsenico nei tessuti

Sempre in relazione con il fosforo, l'indice BP (*Bioaccumulation Preference*), offre un'indicazione sulla selettività di una pianta ad assorbire arsenico dal substrato in cui si trova a crescere (che può essere una soluzione nutritiva o il terreno) rispetto al fosforo. Un valore più alto indicano una maggior preferenza ad assorbire As piuttosto che P.

$$\mathbf{BP = ([As]_p/[As]_s)/([P]_p/[P]_s)}$$

BP = *Bioaccumulation preference*

[As]_p = conc. (μg/g di s.s.) di arsenico nella pianta

[As]_s = conc. (μg/g o mg/l) di arsenico nel substrato

[P]_p = conc. (μg/g di s.s.) di fosforo nella pianta

[P]_s = conc. (μg/g o mg/l) di fosforo nel substrato

Parte terza

Risultati

3.1 Prove in idroponica

I paragrafi che seguono illustrano i risultati ottenuti nelle prove condotte in idroponica descritte nel capitolo precedente. Unitamente alla descrizione dell'esito delle prove, verranno presi in considerazione i dati provenienti dalle analisi spettrometriche e le elaborazioni matematiche degli indici di fitoestrazione.

3.1.1 Soglie di sopravvivenza

Come illustrato nel par. 2.2.2, sono stati effettuati saggi in condizioni di coltura idroponica, utilizzando soluzioni a concentrazione crescente di arsenato di sodio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e di arsenito di sodio (NaAsO_2) al fine di valutare il grado di resistenza di *Pteris vittata* alle due specie di arsenico nei tempi considerati. Nei paragrafi che seguiranno, la descrizione del quadro sintomatologico dovuto all'effetto fitotossico dell'arsenico su *P. vittata*, sarà affiancata anche dai risultati delle analisi all'ICP-OES sui tessuti, come descritto nel par. 2.4.2 del capitolo 2.

3.1.1.1 Soglia di sopravvivenza all' As(V)

Come visto nel capitolo precedente, la prova è stata condotta sottoponendo per un periodo di 30 giorni sei gruppi di quattro piante (*P. vittata* ecotipo PvIt) a sei diverse concentrazioni di arsenato di sodio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), nello specifico: 0 ppm (controllo), 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 800 ppm e 1600 ppm. A ciascuna concentrazione di sale corrisponde un titolo di arsenico misurato attraverso ICP-OES rispettivamente pari a: 0,513 ppm, 17,300 ppm, 45,401 ppm, 93,826 ppm, 160,285 ppm e 320,569 ppm.

Una delle osservazioni più evidenti è che, nonostante le elevate concentrazioni di arsenico in forma solubile e quindi prontamente assimilabile, in nessuna prova si è assistito a un deperimento totale e irreversibile delle piante alla fine della periodo di trattamento. Sebbene nelle prove a più alta concentrazione (800 ppm e 1600 ppm) siano apparsi dei segni di fitotossicità uniti a una sensibile inibizione della crescita, in tutte le altre tesi le piante hanno mantenuto presumibilmente un buono stato metabolico come dimostra il fatto che hanno continuato ad emettere nuove fronde producendo una biomassa paragonabile agli individui allevati in assenza di arsenico (CTRL) (figura 3.1).

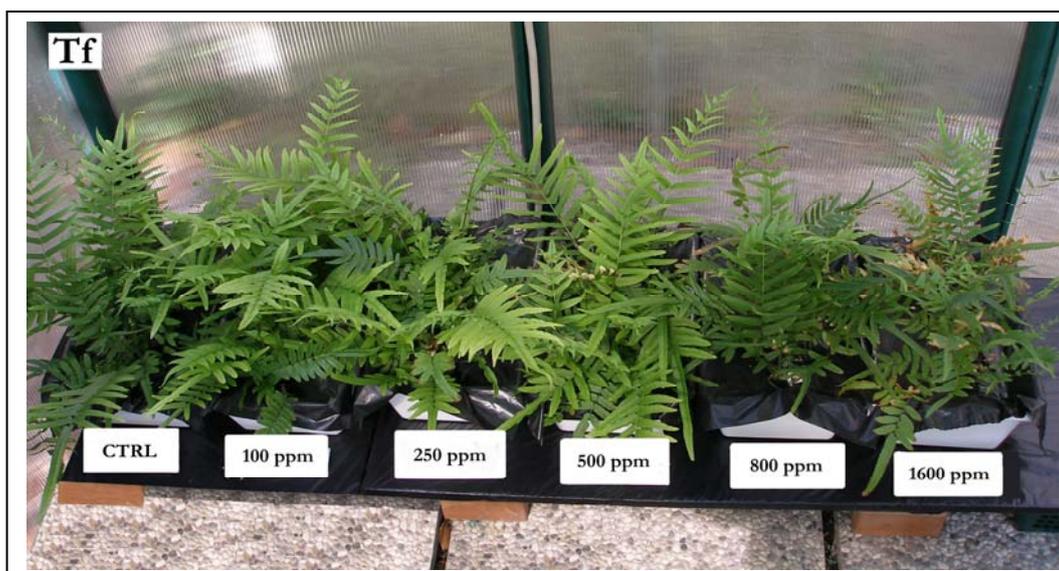


Figura 3.1 Prova in coltura idroponica con soluzioni a concentrazioni crescenti di arsenato di sodio (da 0 ppm a 1600 ppm). T0 indica l'inizio della prova e Tf la fine del trattamento dopo 30 giorni

Nonostante ciò, già a partire dalla prima settimana, le piante sottoposte alle concentrazioni più alte (800 ppm e 1600 ppm) hanno cominciato a mostrare alcuni sintomi di fitotossicità. I primi segni si sono manifestati inizialmente a livello delle fronde più adulte come clorosi distribuite

lungo il margine apicale delle pinne. Con l'estendersi del fenomeno a tutto il lembo, le clorosi sono state accompagnate prima da imbrunimenti ed in seguito da necrosi fino, in certi casi, al disseccamento dell'intera fronda (fig. 3.2).

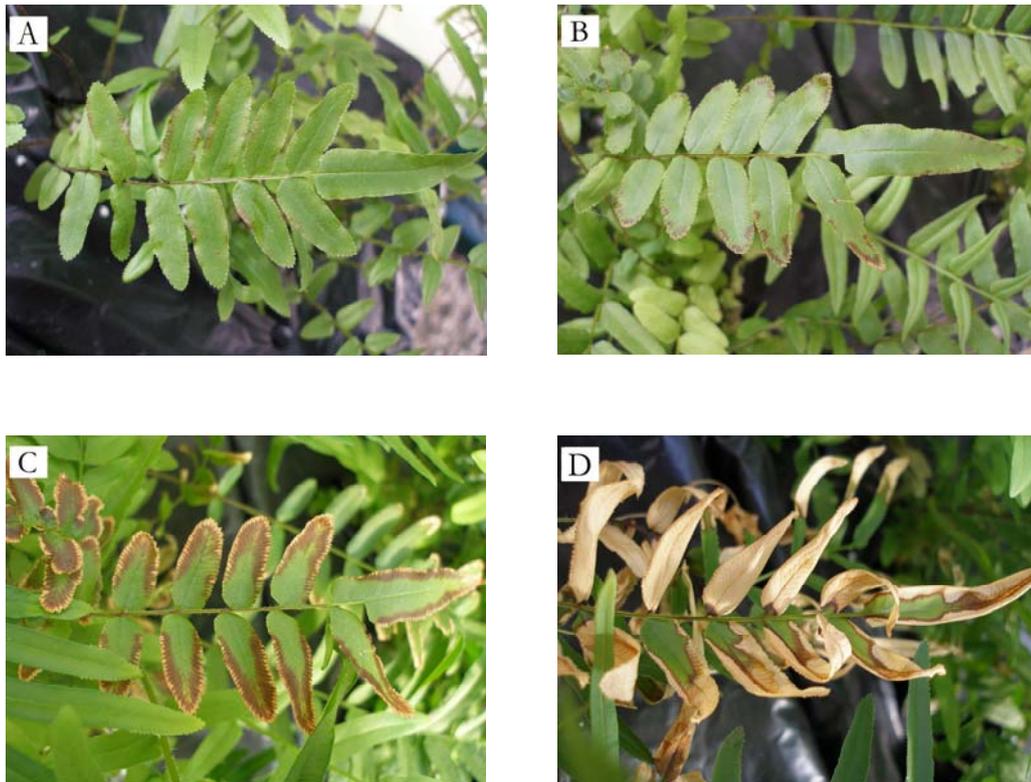


Figura 3.2 Le fotografie da A a D, scattate in tempi diversi, mostrano il decorso dei sintomi di fitotossicità su *P. vittata* in seguito all'esposizione all'arsenico (arsenato di sodio). Da clorosi iniziali distribuite lungo i margini delle pinne (A), si passa ai primi imbrunimenti inizialmente localizzati lungo i bordi (B) ma che progressivamente tendono ad estendersi verso il centro delle pinne (C) degenerando infine in vere necrosi portando l'intera fronda al quasi completo disseccamento (D).

Nel presente studio è stato anche ricercato quale fosse l'assorbimento di As e P nei diversi organi di *P. vittata* per ciascuna delle concentrazioni a cui sono state sottoposte le piante nelle diverse tesi. Nello specifico, è stata ricavata, attraverso misura con ICP-OES, la concentrazione dei due elementi all'interno delle radici e delle fronde. In questa e nelle prove che

seguiranno, i dati relativi alla determinazione del P totale non saranno riportati in grafico ma verranno utilizzati per le elaborazioni matematiche di alcuni indici di fitoestrazione.

Il grafico presentato in fig. 3.3 illustra chiaramente che per ogni concentrazione di arsenato di sodio, presente nella soluzione di idroponica, l'accumulo del metalloide appare enormemente maggiore rispetto al controllo (0 ppm).

Risulta inoltre evidente la linearità dell'iperaccumulo nelle fronde al crescere delle dosi di arsenico somministrate, fino al raggiungimento di livelli prossimi ai 9000 μ g per grammo di sostanza secca nella tesi con 1600 ppm di sale di arsenato di sodio.

Un'altra osservazione di grande significatività è quella relativa alla diversa capacità di accumulo esibita dalle radici rispetto alle fronde. Come evidenziato dal grafico in fig. 3.3, infatti, i livelli di arsenico rilevati nelle radici risultano decisamente inferiori rispetto a quelli ritrovati nella parte epigea delle piante. Rispetto alle fronde, le radici mantengono un andamento più costante al variare della concentrazione del sale somministrato, sebbene nelle tesi con 500 ppm, 800ppm e 1600 ppm si sia registrato un accumulo sensibilmente superiore rispetto alle tesi con 100 e 250 ppm.

Le osservazioni trovano conferma grazie ad analisi statistica eseguita con il test di significatività *Two-way ANOVA* (tab. 3.1).

Il grafico in figura 3.4 riporta la quantità media totale di arsenico, espressa come μ g di As, asportato e accumulato nelle fronde e la media della biomassa della parte aerea prodotta, espressa come grammi di sostanza secca. Dal calcolo delle quantità totali assorbite sono stati intenzionalmente esclusi i valori relativi alle radici, in primo luogo perché scarsamente significativi se confrontati con quelli delle fronde e in

secondo luogo perché nell'ottica di un intervento di fitorisanamento su base poliennale le radici non verrebbero asportate e il loro contributo alla fitoestrazione sarebbe praticamente nullo. Anche in questo caso l'andamento delle quantità totali di As assorbito riflette quello mostrato nel grafico in fig. 3.3. Si osserva, infatti, una lineare proporzionalità fra le dosi di arsenico presenti inizialmente nelle soluzioni di idroponica e quelle accumulate nelle fronde, si passa da un media di quasi 4500 μg di As per la prova con 100 ppm arsenato di sodio fino ad oltre 10000 μg in presenza di 1600 ppm. Per quanto concerne la biomassa prodotta, sempre dal grafico in figura 3.4 è possibile apprezzarne una certa riduzione soprattutto nelle tesi a più alto contenuto di arsenico in soluzione.

La tabella 3.2, infine, riassume per ogni tesi le quantità totali di arsenico presenti inizialmente nel substrato (in questo caso in 3 litri di soluzione nutritiva), le quantità totali asportate dalle piante durante il periodo di trattamento e la quantità residua calcolata come differenza fra l'As nel substrato e quello ritrovato nelle fronde.

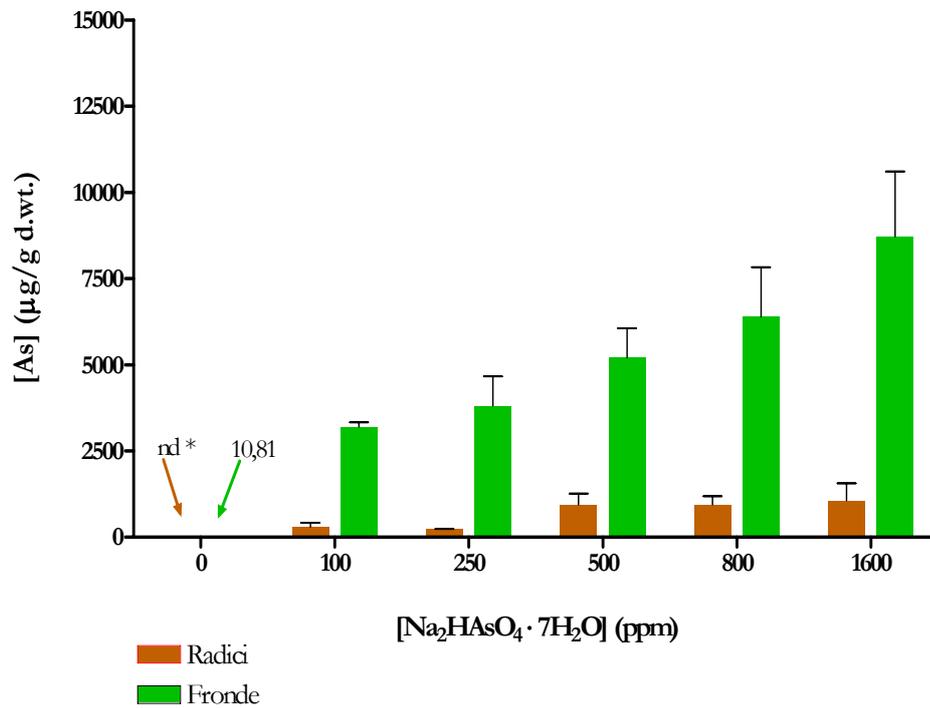


Figura 3.3 Gli istogrammi rappresentano la media e l'errore standard dei valori della concentrazione di As rilevati nelle radici e nelle fronde di *P. vittata* in coltura idroponica. Per ciascuna prova a concentrazione crescente di arsenato di sodio eptaidratato $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, sono poste a confronto le quantità relative di arsenico, espresse in μg di As per g di peso secco. Per la tesi di controllo (0 ppm) sono stati riportati i valori numerici per radici e fronde che per motivi di proporzioni non sono visibili i rispettivi istogrammi.

* nd: *not detectable* (conc. inferiore ai limiti strumentali $<20\mu\text{g/l}$)

Tabella 3.1 Per ogni tesi della prova “Soglia As(V)” sono riportate le concentrazioni medie di As misurate nei tessuti di radici e fronde. Viene riportata, inoltre la significatività statistica ottenuta sottoponendo i dati dei due organi di ciascuna tesi al test *Two-way ANOVA Bonferroni’s post test*.

Tesi	[As] _{radici} (µg/g)	[As] _{fronde} (µg/g)	Significatività
CTRL (0 ppm)	nd [†]	10,8 ± 2,8 [‡]	ns [¶]
100 ppm	302 ± 120,4	3203,5 ± 124,1	**
250 ppm	235,6 ± 2,9	3814,2 ± 849,3	**
500 ppm	942,8 ± 325,6	5209 ± 855,5	***
800 ppm	942,9 ± 244,8	6387,6 ± 1443,3	***
1600 ppm	1062,3 ± 498	8714,5 ± 1887,9	***

† nd: not detectable

‡ Media ± Dev. St.

¶ ns: not significant P value > 0,05 * significant P value < 0,05 ** very significant P value < 0,01

*** extremely significant P value < 0,001

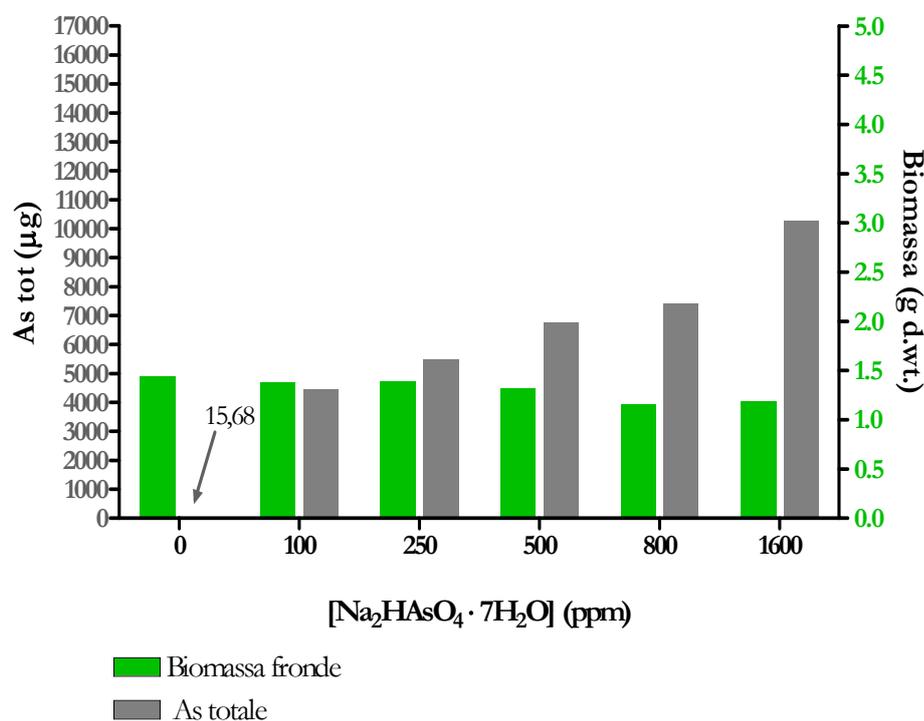


Figura 3.4 Gli istogrammi in grigio (■) rappresentano le quantità medie totali espresse in µg di As accumulate nelle fronde di *P. vittata* in ciascuna tesi a differenti concentrazioni di arsenato di sodio eptaidratato Na₂HAsO₄ · 7H₂O. Gli istogrammi in verde (■) affiancati, mostrano la quantità di biomassa prodotta espressa in grammi di peso secco.

Tabella 3.2 La tabella riporta per ogni tesi la quantità totale in mg di arsenico presente inizialmente nei tre litri di ciascuna soluzione, la quantità totale di arsenico asportata dalle piante ottenuta come somma dei mg di arsenico accumulati nelle fronde di tutte le repliche, e le quantità residue nella soluzione ottenute come differenza dei primi due.

Tesi	As totale substrato (mg)	As totale fronde (mg)	Δ As residuo (mg)
<i>CTRL (0 ppm)</i>	1,5	0,05	1,45
<i>100 ppm</i>	51,9	13,3	38,6
<i>250 ppm</i>	136,2	16,5	119,7
<i>500 ppm</i>	281,5	20,2	261,3
<i>800 ppm</i>	480,8	22,2	458,6
<i>1600 ppm</i>	961,7	30,9	930,8

Di seguito saranno riportati in tabella 3.3 e tab. 3.4 alcuni parametri di fitoestrazione descritti al cap. 2 par. 2.5. Per l'analisi statistica dei valori si rimanda all'Appendice a pag. 184.

- BF – *Bioconcentration Factor* - $([As]_{fronde}/[As]_{substrato})$
- TF – *Translocation Factor* – $([As]_{fronde}/[As]_{radici})$
- P/As *molar ratio* $([P]/[As])$
- BP - *Bioaccumulation Preference* - $([As]_{pianta}/[As]_{sub.})/([P]_{pianta}/[P]_{sub.})$

Tabella 3.3 Fattore di Bioconcentrazione - *Bioconcentration Factor* (BF) - e Fattore di Traslocazione - *Translocation Factor* (TF) - calcolati in *P. vittata* per la prova in idroponica “Soglia As(V)”.

Tesi	<i>Bioconcentration Factor</i>		<i>Translocation Factor</i>
	Fronde	Radici	
<i>CTRL (0 ppm)</i>	21,06	0,000	NA [†]
<i>100 ppm</i>	185,17	17,46	12,21
<i>250 ppm</i>	84,01	5,19	16,22
<i>500 ppm</i>	55,52	10,05	6,41
<i>800 ppm</i>	39,85	5,88	6,90
<i>1600 ppm</i>	27,18	3,31	10,89

†NA: *not applicable*

Tabella 3.4 Rapporto molare fosforo/arsenico - *P/As molar ratio* - e *Bioaccumulation Preference* (BP) calcolati in *P. vittata* per la prova in idroponica “Soglia As(V)”.

Tesi	<i>P/As molar ratio</i>		<i>Bioaccumulation Preference</i>	
	Fronde	Radici	Fronde	Radici
<i>CTRL (0 ppm)</i>	505,51	NA [†]	0,15	0,00
<i>100 ppm</i>	1,57	38,64	1,42	0,07
<i>250 ppm</i>	1,31	27,93	0,65	0,03
<i>500 ppm</i>	0,90	10,42	0,46	0,04
<i>800 ppm</i>	0,75	9,28	0,33	0,03
<i>1600 ppm</i>	0,81	10,10	0,15	0,01

†NA: *not applicable*

3.1.1.2 Soglia di sopravvivenza all'As(III)

Nella presente ricerca è stata portata avanti un'indagine volta a valutare le capacità di tolleranza di piante di *P. vittata* dell'ecotipo PvIt sottoposte a concentrazioni crescenti di arsenito di sodio (NaAsO_2). Come illustrato al Cap. 2 par. 2.2.2 sono state provate cinque diverse concentrazioni come di seguito riportate: 0 ppm (controllo), 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm e 800 ppm a cui corrispondono i seguenti valori di concentrazione di As misurati all'ICP-OES: 0,458 ppm, 41,537 ppm, 109,000 ppm, 225,250 ppm, 384,790 ppm.

Come si può osservare dalla foto in figura 3.5, l'effetto tossico dell'arsenico si è manifestato con una sostanziale riduzione della crescita e la comparsa di disseccamenti e necrosi lungo i margini delle fronde, come descritto per la soglia di sopravvivenza all'As(V).

In ragione di un maggior titolo in As, a parità di concentrazione di sale aggiunto alle soluzioni, l'entità dei danni nel presente esperimento appare maggiormente evidente rispetto al precedente, evidenziando con particolare chiarezza come al crescere della concentrazione di arsenico nelle soluzioni cresca anche la serietà dei sintomi di fitotossicità apparsi sulle piante.

Se nella prova di tolleranza all'arsenico pentavalente i primi sintomi si sono manifestati dopo circa sette giorni, in questo caso le fronde hanno cominciato a disseccare solo dopo due giorni (fig. 3.6). Nonostante l'elevata concentrazione di As presente nella tesi 800ppm di arsenito di sodio (a cui corrispondono c.a. 400 ppm di As) le piante hanno mantenuto una certa vitalità continuando ad emettere nuovi germogli (fig. 3.7).

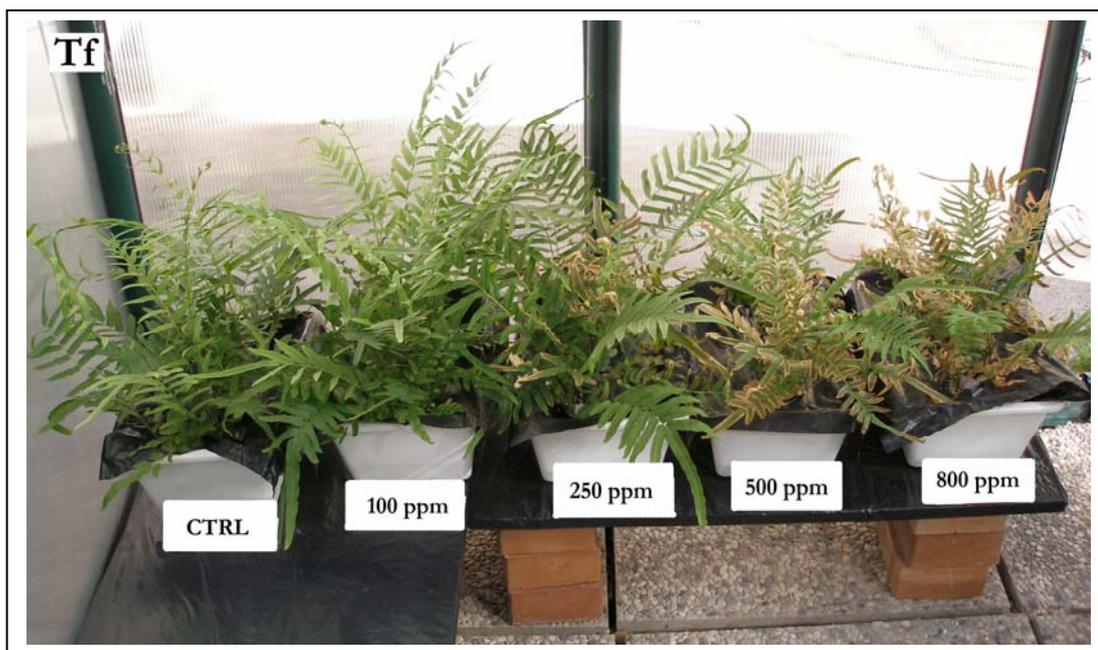
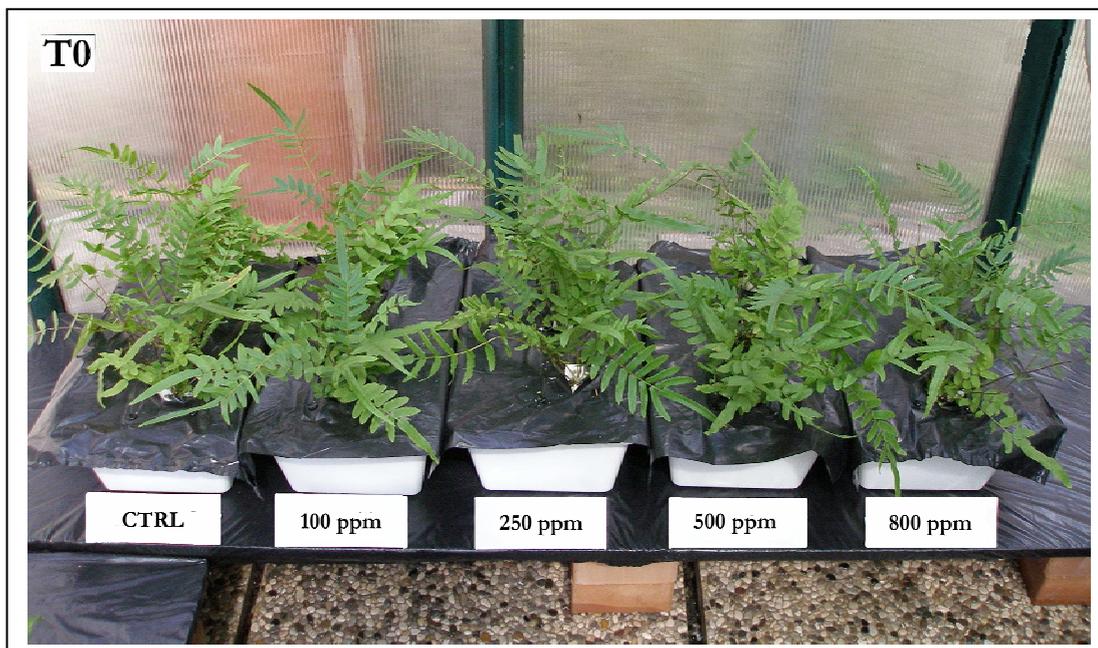


Figura 3.5 Prova in coltura idroponica con soluzioni a concentrazioni crescenti di arsenito di sodio (da 0 ppm a 800 ppm). T0 indica l'inizio della prova e Tf la fine del trattamento dopo 30 giorni.



Figura 3.6 Primi sintomi di tossicità in presenza di 500 ppm di arsenito di sodio dopo due giorni di esposizione. La fronda inizia così un graduale processo che culminerà con il totale disseccamento.



Figura 3.7 Foto dall'alto della tesi 800 ppm di arsenito di sodio al termine dei trenta giorni di esposizione. Sebbene nel complesso le piante risultino gravemente compromesse, è da notare comunque una residua vitalità come dimostrato dall'emissione di alcuni nuovi germogli.

Anche nel caso della prova di tolleranza all'arsenico trivalente sono state analizzate mediante ICP-OES le concentrazioni di arsenico assorbite e accumulate nelle fronde e nelle radici per ciascuna tesi. Il grafico in figura 3.8 mostra chiaramente come anche in questo caso ci sia stato un notevole iperaccumulo nelle piante trattate rispetto a quelle del controllo. È altresì evidente la proporzionalità dell'accumulo di As soprattutto nelle fronde all'aumentare delle concentrazioni di arsenito di sodio aggiunte alla soluzione di idroponica. Di particolare interesse è il fatto che ad ogni concentrazione di sale di arsenico, si è registrato una significativa differenza tra le quantità di As ritrovate nelle fronde rispetto a quelle nelle radici. Nel caso della prova a 800 ppm di NaAsO_2 nella parte epigea sono stati misurati livelli di arsenico superiori di oltre 20 volte rispetto a quelli delle radici. Anche in questo caso in tabella 3.5 sono riportati i risultati del test di significatività secondo il metodo *Two-way ANOVA* dei valori di concentrazione di As delle radici e delle fronde per ciascuna tesi. Il grafico in figura 3.9 mostra le quantità medie totali di As accumulate nelle fronde affiancando ad esse la media della biomassa prodotta della parte epigea. Rispetto alla prova precedente in presenza di arsenato di sodio, l'accumulo di arsenico è stato mediamente più alto a parità di concentrazione dei due diversi sali, dovuto molto probabilmente al maggior titolo in As nell'arsenito di sodio. I valori si collocano infatti tra i 19,445 μg di As del controllo e i 16467,440 μg di As in presenza di 800 ppm di arsenito di sodio. Sempre dallo stesso grafico si rende inoltre evidente un effetto di inibizione della crescita che si traduce in una progressiva riduzione della biomassa all'aumentare delle concentrazioni di As nelle soluzioni si passa infatti dai circa 2 grammi (1,95 g) di peso secco del controllo a poco più di un grammo (1,19 g) nella tesi a 800 ppm di sale.

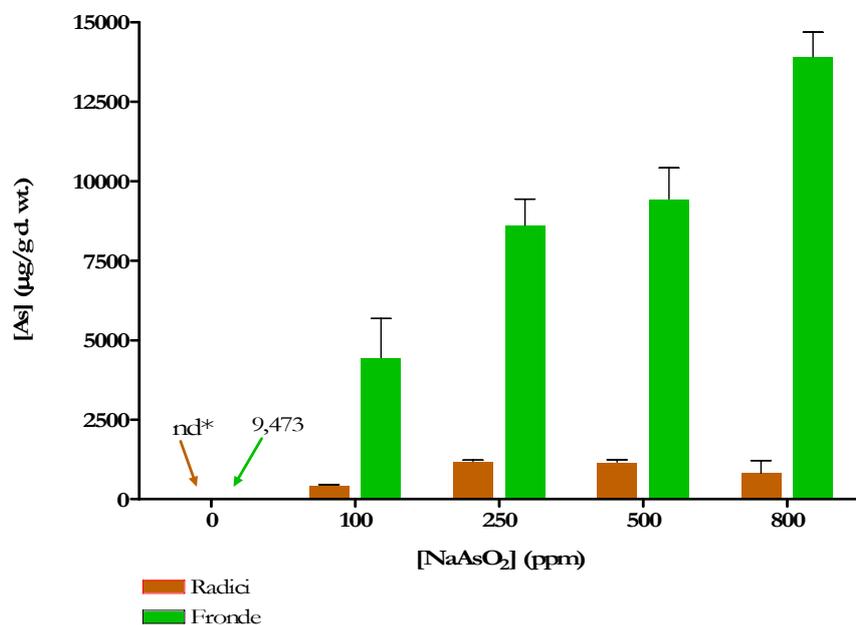


Figura 3.8 Gli istogrammi rappresentano la media e l'errore standard dei valori della concentrazione di As rilevati nelle radici e nelle fronde di *P. vittata* in coltura idroponica. Per ciascuna prova a concentrazione crescente di arsenito di sodio NaAsO₂, sono poste a confronto le quantità relative di arsenico, espresse in µg di As per g di peso secco. Per la tesi di controllo (0 ppm) sono stati riportati i valori numerici per radici e fronde che per motivi di proporzioni non sono visibili i rispettivi istogrammi.

* nd: *not detectable* (conc. inferiore ai limiti strumentali <20µg/l)

Tabella 3.5 Per ogni tesi della prova “Soglia As(III)” sono riportate le concentrazioni medie di As misurate nei tessuti di radici e fronde. Viene riportata, inoltre la significatività statistica ottenuta sottoponendo i dati dei due organi di ciascuna tesi al test *Two-way ANOVA & Bonferroni’s post test*.

Tesi	[As] _{radici} (µg/g)	[As] _{fronde} (µg/g)	Significatività
CTRL (0 ppm)	nd [†]	9,5 ± 5,2 [‡]	ns [¶]
100 ppm	438,9 ± 161	4450 ± 123,9	***
250 ppm	1188,1 ± 46,1	8609,2 ± 824,8	***
500 ppm	1159,4 ± 77	9441,1 ± 982,8	***
800 ppm	818,1 ± 402,5	13910,1 ± 778,2	***

[†] nd: not detectable

[‡] Media ± Dev. St.

[¶] ns: not significant P value > 0,05 * significant P value < 0,05 ** very significant P value < 0,01

*** extremely significant P value < 0,001

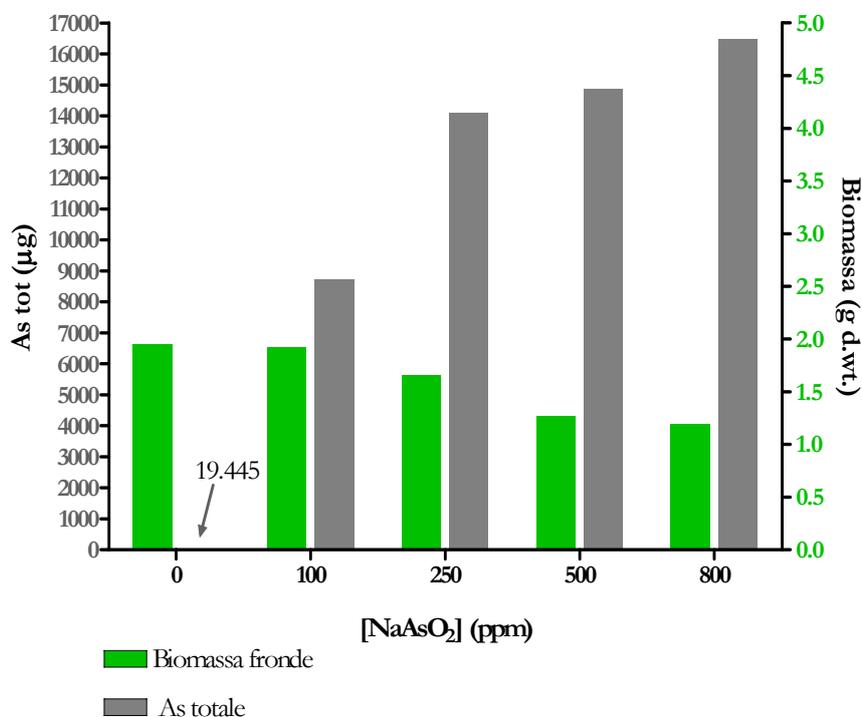


Figura 3.9 Gli istogrammi in grigio (■) rappresentano le quantità medie totali espresse in µg di As accumulate nelle fronde di *P. vittata* in ciascuna tesi a differenti concentrazioni di arsenito di sodio NaAsO₂. Gli istogrammi in verde (■) affiancati, mostrano la quantità di biomassa prodotta espressa in grammi di peso secco.

Tabella 3.6 La tabella riporta per ogni tesi la quantità totale in mg di arsenico presente inizialmente nei tre litri di ciascuna soluzione, la quantità totale di arsenico asportata dalle piante ottenuta come somma dei mg di arsenico accumulati nelle fronde di tutte le repliche, e le quantità residue nella soluzione ottenute come differenza dei primi due.

Tesi	As totale substrato (mg)	As totale fronde (mg)	Δ As residuo (mg)
<i>CTRL (0 ppm)</i>	1,37	0,06	1,32
<i>100 ppm</i>	124,61	26,19	98,42
<i>250 ppm</i>	327,00	42,33	284,67
<i>500 ppm</i>	675,75	44,63	631,12
<i>800 ppm</i>	1154,37	49,40	1104,97

Di seguito saranno riportati in tabella 3.7 e 3.8 alcuni parametri di fitoestrazione descritti al cap. 2 par. 2.5. Per l'analisi statistica dei valori si rimanda all'Appendice a pag. 184.

- BF – *Bioconcentration Factor* - $([As]_{\text{fronde}}/[As]_{\text{substrato}})$
- TF – *Translocation Factor* – $([As]_{\text{fronde}}/[As]_{\text{radici}})$
- P/As *molar ratio* $([P]/[As])$
- BP - *Bioaccumulation Preference* - $([As]_{\text{pianta}}/[As]_{\text{sub.}})/([P]_{\text{pianta}}/[P]_{\text{sub.}})$

Tabella 3.7 Fattore di Bioconcentrazione - *Bioconcentration Factor* (BF) - e Fattore di Traslocazione - *Translocation Factor* (TF) - calcolati in *P. vittata* per la prova in idroponica “Soglia As(III)”.

Tesi	<i>Bioconcentration Factor</i>		<i>Translocation Factor</i>
	Fronde	Radici	
<i>CTRL (0 ppm)</i>	20,68	0,00	NA [†]
<i>100 ppm</i>	107,13	10,57	10,20
<i>250 ppm</i>	78,98	10,900	7,24
<i>500 ppm</i>	41,91	5,15	8,20
<i>800 ppm</i>	36,15	2,13	20,28

†NA: *not applicable*

Tabella 3.8 Rapporto molare fosforo/arsenico - *P/As molar ratio* - e *Bioaccumulation Preference* (BP) calcolati in *P.vittata* per la prova in idroponica “Soglia As(III)”.

Tesi	<i>P/As molar ratio</i>		<i>Bioaccumulation Preference</i>	
	Fronde	Radici	Fronde	Radici
<i>CTRL (0 ppm)</i>	768,81	NA [†]	0,13	0,00
<i>100 ppm</i>	1,26	27,45	0,79	0,03
<i>250 ppm</i>	0,76	10,47	0,47	0,03
<i>500 ppm</i>	0,61	4,95	0,28	0,03
<i>800 ppm</i>	0,54	4,19	0,19	0,02

†NA: *not applicable*

3.1.2 Prova di *uptake* in idroponica

Nella prova in idroponica descritta nel capitolo 2 par. 2.2.3 è stato preso in considerazione il diverso comportamento dei due ecotipi di *Pteris vittata* (PvIt e PvCh) in relazione alla capacità di iperaccumulare l'arsenico aggiunto alla soluzione nutritiva come arsenato di sodio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e arsenito di sodio (NaAsO_2) e come combinazione di entrambe le specie in quantità equimolari.

Riassumendo, l'esperimento è stato condotto utilizzando i due ecotipi ed è stato allestito con sette tesi, ciascuna a diverse concentrazioni di sali di arsenato e arsenito, e rispettivamente: "controllo" 0 ppm di As, arsenato di sodio As(V) 250 ppm, arsenato di sodio As(V) 500 ppm, arsenito di sodio As(III) 250 ppm, arsenito di sodio As(III) 500 ppm, arsenato/arsenito As(V/III) 250 ppm, arsenato/arsenito As(V/III) 500 ppm. Alle concentrazioni citate, in base alle analisi mediante ICP-OES corrispondono valori di As pari a: 0,698 e 0,382 ppm - tesi "controllo" ecotipo PvIt e PvCh - 56,624 e 54,649 ppm - tesi As(V) 250 ppm ecotipo PvIt e PvCh - 111,165 e 109,850 ppm - tesi As(V) 500 ppm - 98,825 e 109,850 ppm - tesi As(III) 250 ppm - 217,140 e 221,191 - tesi As(III) 500 ppm - 74,234 e 73,773 - tesi As(V/III) 250 ppm - 147,756 e 143,756 - tesi As(V/III) 500.

La foto in figura 3.10 fa vedere l'esperimento al termine del periodo di 30 giorni. Le piante si presentano complessivamente in buono stato anche se si notano dei sintomi di fitotossicità soprattutto nelle piante dell'ecotipo PvIt tenute a contatto con 500 ppm di arsenito di sodio e 500 ppm di arsenato/arsenito di sodio. Tutto questo fa supporre che, rispetto alla prova con l'ecotipo PvCh, da parte delle piante dell'ecotipo italiano ci sia stato un maggior assorbimento di arsenico tale da comprometterne in parte la vitalità.

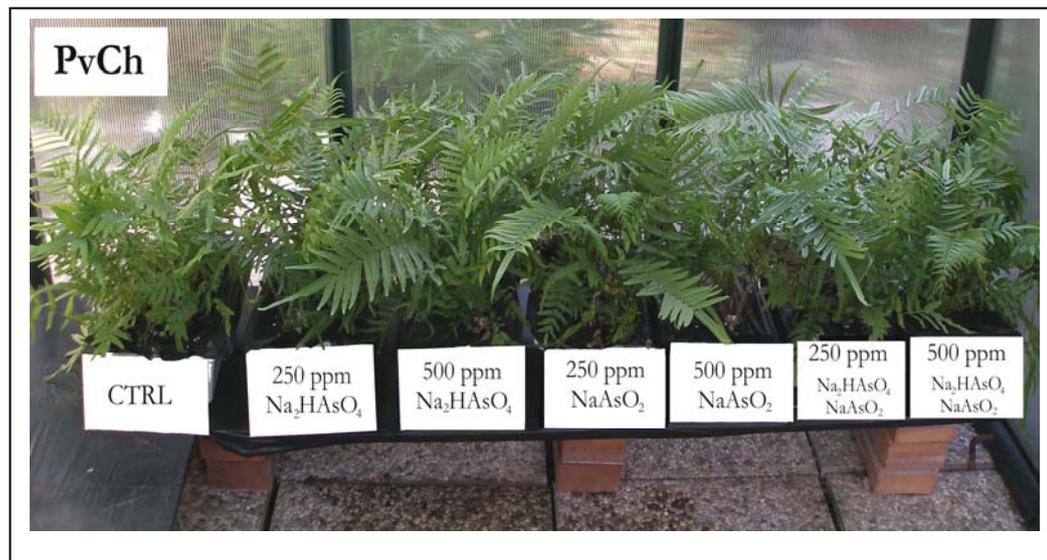
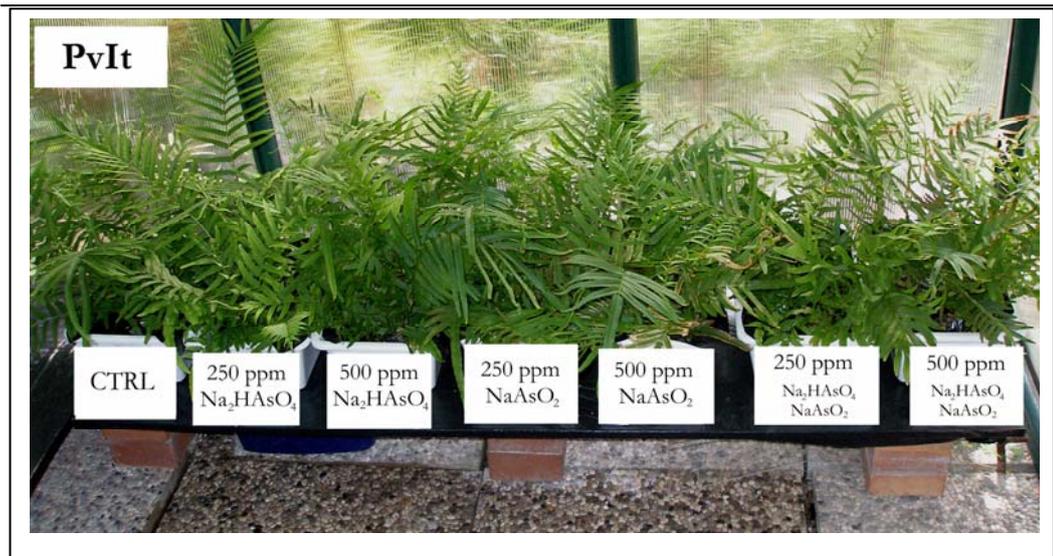
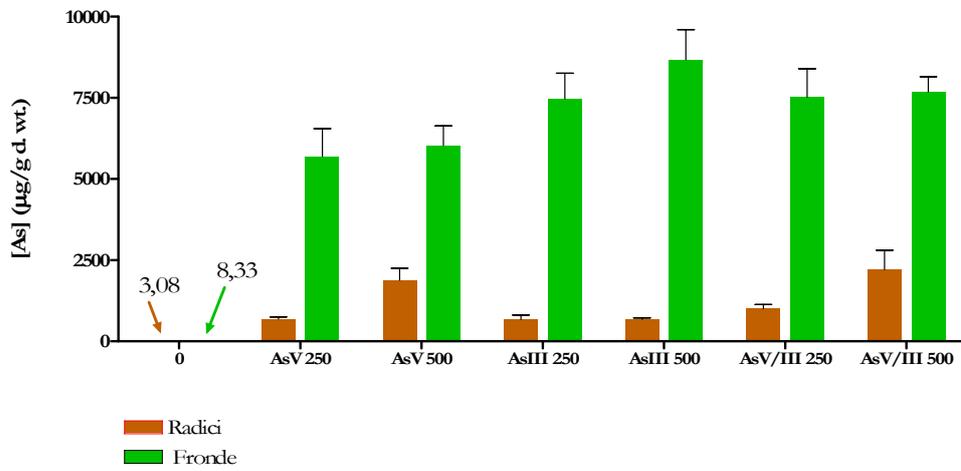


Figura 3.10 In alto, la prova di uptake di arsenico in idroponica con *P. vittata* dell'ecotipo italiano (PvIt); in basso la stessa prova allestita però con piante dell'ecotipo svizzero (PvCh). Entrambe le foto sono state scattate al termine di 30 giorni di esposizione alle soluzioni contaminate con i sali di arsenico.

I grafici in figura 3.11 mostrano le quantità relative di arsenico presenti nelle fronde e nelle radici mettendo a confronto i due ecotipi. In entrambi i casi è dimostrato ancora una volta la significativa differenza di accumulo tra la parte ipogea e quella epigea delle piante a tutte le concentrazioni. In entrambi gli ecotipi il massimo di assorbimento si registra per il trattamento con 500 ppm di arsenito di sodio dove si sono misurati nelle fronde delle piante PvIt e PvCh rispettivamente: oltre 8600 µg di As per grammo di peso secco oltre 5100 µg di As per grammo di peso secco. In accordo con le considerazioni fatte a proposito della maggiore manifestazione di fitotossicità delle piante dell'ecotipo PvIt, emerge chiaramente dal grafico in figura 3.11 una evidente differenza nell'accumulo di As da parte delle piante dell'ecotipo PvIt rispetto a quelle dell'ecotipo PvCh, si passa infatti da una riduzione media delle concentrazioni del 25% c.a. per As(V) 250 e 500 ppm, del quasi 42% per As(III) 250 e 500 ppm e di oltre il 35% per As(V/III) 250 e 500 ppm. tutte queste differenze sono state sottoposte ad analisi statistica utilizzando il metodo *Two-way* ANOVA (tab. 3.9) ed è interessante notare come per la tesi di controllo (CTRL) e per quelle trattate con 250 e 500 ppm di arsenato di sodio - As(V) 250 ppm e As(V) 500 ppm - non sussista una differenza significativa. In tutti gli altri casi, la differenza fra PvIt e PvCh in termini di concentrazione di As accumulato nelle fronde è ritenuta da estremamente significativa, per le tesi As(III) 250 e 500 ppm, a molto significativa, tesi As (V/III) 250 e 500 ppm.

PvIt



PvCh

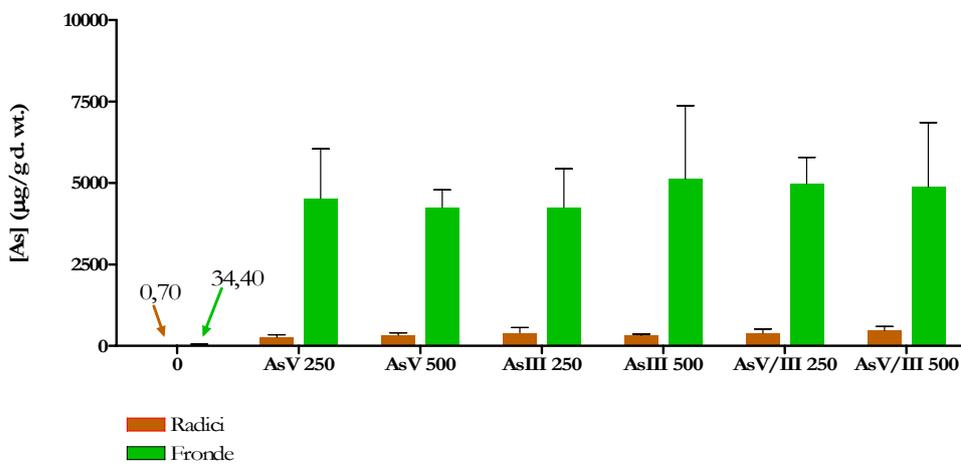


Figura 3.11 Gli istogrammi rappresentano la media e l'errore standard dei valori della concentrazione di As rilevati nelle radici e nelle fronde di *P. vittata* in coltura idroponica per la prova di uptake dell'arsenico. Il grafico in alto si riferisce ai risultati ottenuti per l'ecotipo denominato PvIt mentre quello in basso per l'ecotipo PvCh. Per la tesi di controllo (0 ppm) sono stati riportati i valori numerici per radici e fronde che per motivi di proporzioni non sono visibili i rispettivi istogrammi.

Tabella 3.9 Per ogni tesi della prova di uptake per PvIt e PvCh, sono riportate le concentrazioni medie di As misurate nelle fronde. Viene riportata, inoltre la significatività statistica ottenuta sottoponendo i dati dei due ecotipi al test *Two-way ANOVA Bonferroni's post test*.

Tesi	PvIt [As] _{fronde} (µg/g)	PvCh [As] _{fronde} (µg/g)	Significatività
CTRL (0 ppm)	8,3 ± 4,2 [†]	34,4 ± 22,8	ns [‡]
As(V) 250 ppm	5691,6 ± 860,2	4521,6 ± 1526,2	ns
As(V) 500 ppm	6029 ± 598,9	4257,1 ± 533,2	ns
As(III) 250 ppm	7465,9 ± 794,2	4257,3 ± 1179,1	***
As(III) 500 ppm	8678,6 ± 923,7	5133,7 ± 2239,3	***
As(V/III) 250 ppm	7519,3 ± 875	4981,6 ± 800,9	**
As(V/III) 500 ppm	7689,3 ± 459,4	4884,1 ± 1961,1	**

† Media di 4 repliche ± Dev. Std.

‡ ns: *not significant* P value > 0,05 * *significant* P value < 0,05 ** *very significant* P value < 0,01

*** *extremely significant* P value < 0,001

Il grafico in figura 3.12 assegna per ciascun ecotipo e per ciascuna tesi, le quantità totali di arsenico assorbito nelle fronde insieme alle relative biomasse. Anche in questo caso si nota una maggior iperaccumulo nella prova condotta con *P. vittata* dell'ecotipo PvIt, fino a valori prossimi ai 17000 µg in presenza di 500 ppm di arsenito di sodio. Sempre per l'ecotipo italiano si osserva una maggiore proporzionalità tra le concentrazioni di arsenico presenti nel mezzo nutritivo e quelle riscontrate nei tessuti. Per quanto riguarda la biomassa delle fronde, in tutti e due gli ecotipi, si mantiene pressoché costante e non si rilevano significative differenze legate alla fitotossicità dell'arsenico in soluzione tra le tesi trattate e quelle di controllo. Anche in questo caso, la tabella 3.10 riporta le quantità di arsenico presente inizialmente in soluzione, le quantità accumulate nelle fronde e quelle residue ottenute per differenza.

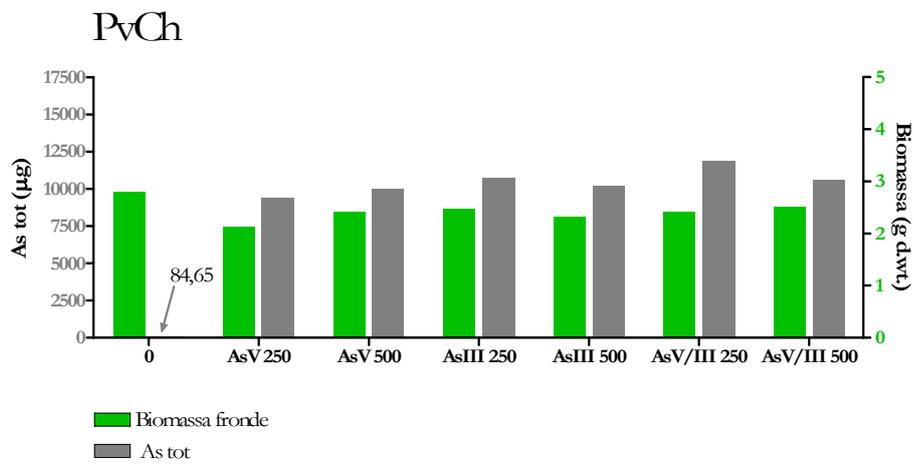
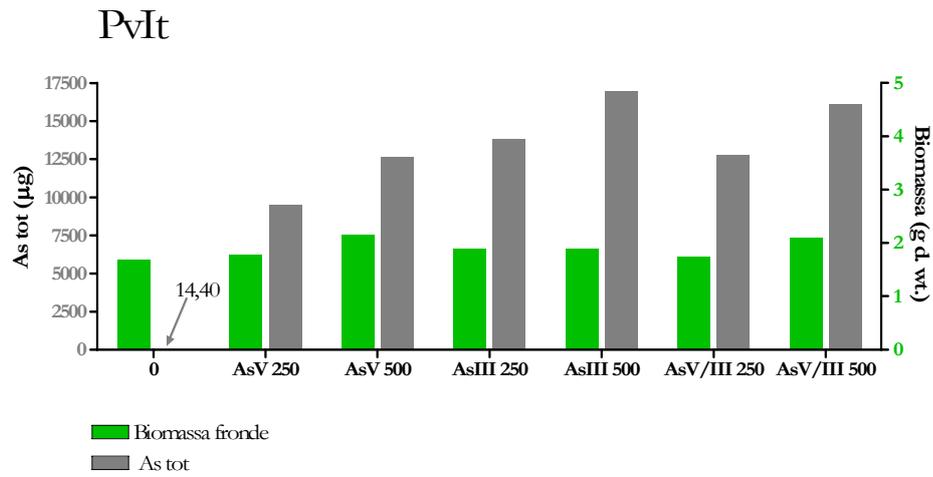


Figura 3.12 Gli istogrammi in grigio (■) rappresentano le quantità medie totali espresse in µg di As accumulate nelle fronde di *P. vittata* in ciascuna tesi della prova in idroponica “uptake” per i due ecotipi di *P. vittata* PvIt e PvCh. Gli istogrammi in verde (■) affiancati, mostrano la quantità di biomassa prodotta espressa in grammi di peso secco.

Tabella 3.10 La tabella riporta, per ogni tesi della prova di uptake per PvIt e PvCh, la quantità totale in mg di arsenico presente inizialmente nei tre litri di ciascuna soluzione, la quantità totale di arsenico asportata dalle piante ottenuta come somma dei mg di arsenico accumulati nelle fronde di tutte le repliche, e le quantità residue nella soluzione ottenute come differenza dei primi due.

Tesi	As totale substrato (mg)		As totale fronde (mg)		Δ As residuo (mg)	
	PvIt	PvCh	PvIt	PvCh	PvIt	PvCh
<i>CTRL (0 ppm)</i>	2,10	1,15	0,06	0,33	2,04	0,82
<i>As(V) 250 ppm</i>	169,87	163,95	38,17	37,60	131,17	126,35
<i>As(V) 500 ppm</i>	333,50	326,59	50,65	40,11	282,85	286,48
<i>As(III) 250 ppm</i>	296,47	329,55	55,23	42,83	241,24	286,72
<i>As(III) 500 ppm</i>	651,42	663,57	67,86	40,91	583,56	622,66
<i>As(V/III) 250 ppm</i>	222,70	221,32	51,17	47,52	171,53	173,8
<i>As(V/III) 500 ppm</i>	443,27	430,74	64,44	42,48	378,83	388,26

Di seguito saranno riportati in tabella 3.11 e 3.12 alcuni parametri di fitoestrazione descritti al cap. 2 par. 2.5. Per l'analisi statistica dei valori si rimanda all'Appendice a pag. 184.

- BF – *Bioconcentration Factor* - $([As]_{fronde}/[As]_{substrato})$
- TF – *Translocation Factor* – $([As]_{fronde}/[As]_{radici})$
- P/As *molar ratio* $([P]/[As])$
- BP - *Bioaccumulation Preference* - $([As]_{pianta}/[As]_{sub.})/([P]_{pianta}/[P]_{sub.})$

Tabella 3.11 Fattore di Bioconcentrazione - *Bioconcentration Factor* (BF) - e Fattore di Traslocazione - *Translocation Factor* (TF) - calcolati in *P. vittata* per la prova in idroponica di uptake per gli ecotipi PvIt e PvCh”.

Tesi	<i>Bioconcentration Factor</i>				<i>Translocation Factor</i>	
	Fronde		Radici		PvIt	PvCh
	PvIt	PvCh	PvIt	PvCh		
<i>CTRL (0 ppm)</i>	11,94	90,04	4,41	1,82	3,39	8,86
<i>As(V) 250 ppm</i>	100,52	82,74	12,04	4,80	8,33	17,15
<i>As(V) 500 ppm</i>	54,23	39,11	16,96	3,03	3,32	13,22
<i>As(III) 250 ppm</i>	75,55	38,76	6,80	3,66	11,37	13,59
<i>As(III) 500 ppm</i>	39,97	23,21	3,12	1,44	12,80	16,88
<i>As(V/III) 250 ppm</i>	101,29	67,53	13,47	5,30	7,57	14,00
<i>As(V/III) 500 ppm</i>	52,04	34,02	14,94	3,34	3,76	9,86

Tabella 3.12 Rapporto molare fosforo/arsenico - *P/As molar ratio* - e *Bioaccumulation Preference* (BP) calcolati in *P. vittata* per la prova in idroponica di uptake per gli ecotipi PvIt e PvCh”.

Tesi	<i>P/As molar ratio</i>				<i>Bioaccumulation Preference</i>			
	Fronde		Radici		Fronde		Radici	
	PvIt	PvCh	PvIt	PvCh	PvIt	PvCh	PvIt	PvCh
<i>CTRL (0 ppm)</i>	995,60	242,39	4367,70	3478,9	0,06	0,41	0,01	0,01
<i>As(V) 250 ppm</i>	1,08	1,79	24,91	30,94	0,59	0,36	0,03	0,02
<i>As(V) 500 ppm</i>	0,82	1,68	12,84	30,83	0,40	0,19	0,03	0,01
<i>As(III) 250 ppm</i>	0,71	1,71	11,16	12,87	0,52	0,20	0,04	0,03
<i>As(III) 500 ppm</i>	0,70	1,59	6,25	9,57	0,24	0,11	0,03	0,02
<i>As(V/III) 250 ppm</i>	0,75	1,63	14,91	21,04	0,65	0,29	0,03	0,03
<i>As(V/III) 500 ppm</i>	0,64	1,78	7,47	16,65	0,38	0,14	0,03	0,02

3.2 Prove su terreni contaminati

Per quanto concerne le prove sui terreni contaminati, descritta al capitolo “Materiali e Metodi”, è stata valutata in primo luogo le possibilità di adattamento di *Pteris vittata* (PvIt e PvCh) a suoli marginali provenienti da un ex sito industriale in via di bonifica, e successivamente le capacità di asportazione dell'arsenico di cui i terreni risultano contaminati.

I terreni, ceneri di pirite e sabbia, su cui sono avvenuti i trapianti, quasi del tutto privi di sostanza organica, e probabilmente contaminati con altri metalli pesanti, apparivano del tutto inadatti ad ospitare qualsiasi tipo di pianta. Come controllo, insieme ai terreni contaminati, è stata aggiunta una tesi su suolo non contaminato, lo stesso impiegato nelle operazioni di semina e trapianti descritto al cap. 2 par. 2.1.1.

Il confronto fra le biomasse prodotte può rappresentare un buon indice per valutare il grado di acclimatazione a e di adattamento ai vari terreni. Come appare dalle fotografie in figura 3.13, scattate al momento del trapianto, dopo 60 giorni e al termine dell'esperimento dopo 190 giorni, tutte le piante hanno aumentato nel tempo la propria biomassa senza mostrare particolari sintomi di sofferenza. Il grafico delle biomasse (fig. 3.14) a 190 giorni, e la tabella 3.13 ad esso collegata, in parte confermano quanto commentato. Da quanto emerso dalle elaborazioni statistiche, non esistono, infatti, differenze significative in termini di biomassa prodotta tra le piante appartenenti ad entrambi gli ecotipi cresciute su terreno non contaminato rispetto a quelle cresciute su ceneri di pirite e sabbia; così come non si notano variazioni della biomassa delle piante coltivate sui due tipi di suolo contaminato.



Figura 3.13 fotografie della prova su terreni contaminati scattate all'inizio (T0), dopo 60 giorni (T60) e alla fine dell'esperimento dopo 190 giorni (T190).

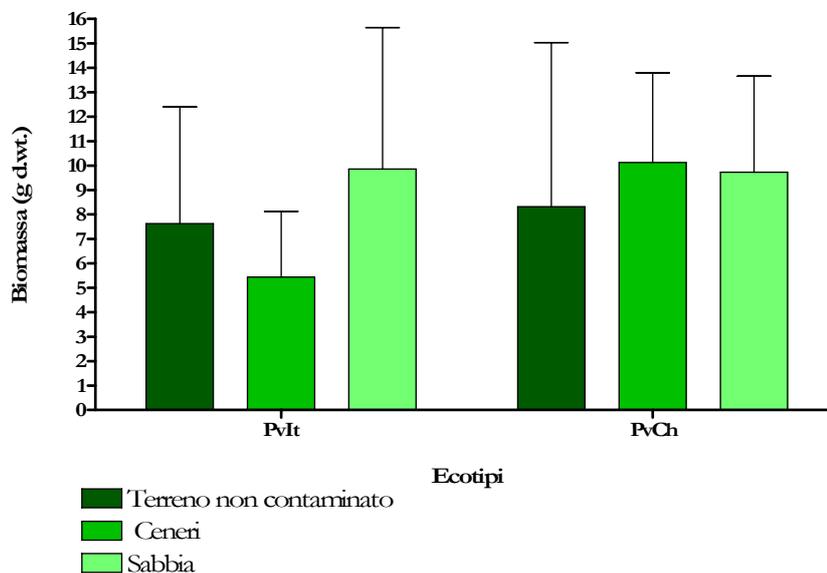


Figura 3.14 Il grafico mostra per i due ecotipi di *P. vittata* la quantità media espressa in grammi di peso secco della biomassa prodotta alla fine dell'esperimento, dopo 190 giorni, per ciascuna tipologia di suolo.

Tabella 3.13 Prova su terreni contaminati. Significatività statistica del confronto fra la biomassa delle fronde di ciascun ecotipo in relazione con i diversi tipi di terreni. Le analisi delle varianze sono state effettuate con il test *Two-way ANOVA Bonferroni's post test*.

<i>Terreno non contaminato vs. Ceneri</i>			Significatività
Ecotipo	T.n.C.*	Ceneri	
<i>PvIt</i>	7,62 ±4,77†	5,44 ±2,69	ns‡
<i>PvCh</i>	8,31 ±6,72	10,13 ±3,67	ns
<i>Terreno non contaminato vs. Sabbia</i>			
Ecotipo	T.n.C.	Sabbia	
<i>PvIt</i>	7,62 ±4,77	9,86 ±5,78	ns
<i>PvCh</i>	8,31 ±6,72	9,73 ±3,92	ns
<i>Ceneri vs. Sabbia</i>			
Ecotipo	Ceneri	Sabbia	
<i>PvIt</i>	5,44 ±2,69	9,86 ±5,78	ns
<i>PvCh</i>	10,13 ±3,67	9,73 ±3,92	ns

* T.n.C: Terreno non contaminato

† Media di 4 repliche ± Dev. Std.

‡ ns: *not significant* P value>0,05 * *significant* P value<0,05 ** *very significant* P value<0,01

*** *extremely significant* P value<0,001

Il lavoro ha previsto analisi spettrometriche all'ICP-OES dei tessuti delle fronde campionati a 60 e a 190 giorni per rilevarne le concentrazioni di arsenico e fosforo assorbite.

Il grafico in figura 3.15, riporta per i due ecotipi, le concentrazioni espresse come μg di As per grammo di peso secco dell'arsenico accumulato nelle fronde dopo 60 e 190 giorni.

Dal grafico e dalle tabelle statistiche 3.14 si evince che la variabilità dei risultati sull'assorbimento dell'arsenico a 60 e 190 giorni è esclusivamente determinata – per oltre il 75% a 60 gg e per circa l'88% a 190gg – dalla tipologia dei terreni e non dall'ecotipo di *P. vittata*. Si notano inoltre (tab. 3.15 e 3.16) sia a 60 che a 190 giorni, differenze estremamente significative nelle concentrazioni di arsenico riscontrate tra le piante cresciute su terreno non contaminato e quelle su ceneri di pirite e sabbia. Tuttavia, mentre a 60 giorni non si osservano differenze nell'accumulo per le tesi “ceneri” e “sabbia”, a fine prova emergono per entrambi gli ecotipi differenze statisticamente rilevanti. In ultima analisi, alla luce sempre di un test statistico, è risultato che, per le prove su ceneri di pirite e sabbia, l'incremento della concentrazione di As, per entrambi gli ecotipi, nel passare da 60 a 190 giorni è risultato molto significativo (tab. 3.17).

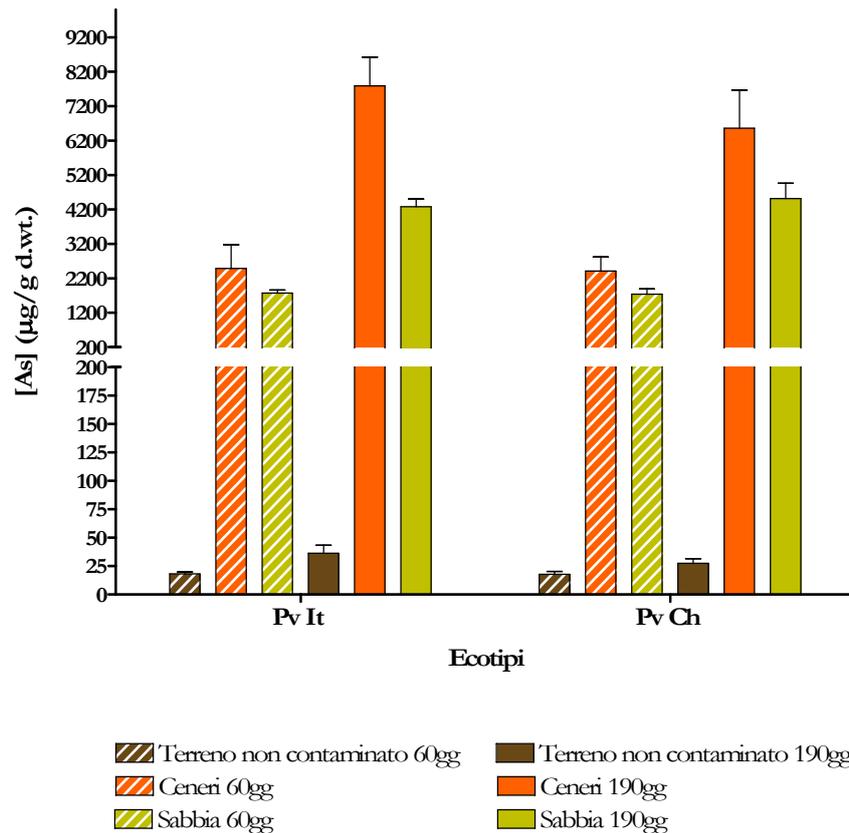


Figura 3.15 Gli istogrammi rappresentano la media e l'errore standard dei valori della concentrazione di As espressa come µg di As per grammo di sostanza secca, rilevati nelle fronde dei due ecotipi (PvIt e PvCh) di *P. vittata* allevate su terreno non contaminato, ceneri di pirite e sabbia a 60 e a 190 giorni.

Tabella 3.14 L'ecotipo e il tipo di terreno rappresentano le due principali variabili in grado di determinare i diversi assorbimenti di As rilevati a 60 e 190 gg. La tabella ne riassume il peso percentuale sul totale e ne stabilisce la significatività statistica secondo il test *Two-way* ANOVA.

60 giorni

Sorgente della Variabilità	% della variabilità totale	<i>P value</i>	Significatività
Ecotipo	0,03	0,8892	ns [†]
Terreni	75,70	P<0.0001	***

190 giorni

Sorgente della Variabilità	% della variabilità totale	<i>P value</i>	Significatività
Ecotipo	0,28	0,5165	ns
Terreni	87,68	P<0.0001	***

† ns: *not significant* P value>0,05 * *significant* P value<0,05 ** *very significant* P value<0,01 *** *extremely significant* P value<0,001

Tabella 3.15 Prova su terreni contaminati. Significatività statistica delle differenze di As accumulato tra le diverse tesi a 60gg secondo il test Two –way ANOVA Bonferroni's post test.

<i>Terreno non contaminato vs. Ceneri</i>			Significatività
Ecotipo	T.n.C.*	Ceneri	
<i>PvIt</i>	18,09 ±3,30†	2490 ±1371,85	***‡
<i>PvCb</i>	17,81 ±4,78	2411 ±819,83	***
<i>Terreno non contaminato vs. Sabbia</i>			
Ecotipo	T.n.C.	Sabbia	
<i>PvIt</i>	18,09 ±3,30	1772 ±179,42	***
<i>PvCb</i>	17,81 ±4,78	1737±308,79	***
<i>Ceneri vs. Sabbia</i>			
Ecotipo	Ceneri	Sabbia	
<i>PvIt</i>	2490 ±1371,85	1772 ±179,42	ns
<i>PvCb</i>	2411 ±819,83	1737 ±308,79	ns

* T.n.C: Terreno non contaminato

† Media di 4 repliche ± Dev. Std.

‡ ns: *not significant* P value>0,05 * *significant* P value<0,05 ** *very significant* P value<0,01

*** *extremely significant* P value<0,001

Tabella 3.16 Prova su terreni contaminati. Significatività statistica delle differenze di As accumulato tra le diverse tesi a 190gg secondo il test Two –way ANOVA Bonferroni's post test.

<i>Terreno non contaminato vs. Ceneri</i>			Significatività
Ecotipo	T.n.C.*	Ceneri	
<i>PvIt</i>	36,33 ±13,79†	7788 ±1662,82	***‡
<i>PvCb</i>	27,37 ±8,24	6559 ±2211,05	***
<i>Terreno non contaminato vs. Sabbia</i>			
Ecotipo	T.n.C.	Sabbia	
<i>PvIt</i>	36,33 ±13,79	4275 ±452,81	***
<i>PvCb</i>	27,37 ±8,24	4516 ±896,96	***
<i>Ceneri vs. Sabbia</i>			
Ecotipo	Ceneri	Sabbia	
<i>PvIt</i>	7788 ±1662,82	4275 ±452,81	***
<i>PvCb</i>	6559 ±2211,05	4516 ±896,96	*

* T.n.C: Terreno non contaminato

† Media di 4 repliche ± Dev. Std.

‡ ns: *not significant* P value>0,05 * *significant* P value<0,05 ** *very significant* P value<0,01

*** *extremely significant* P value<0,001

Tabella 3.17 Prova su terreni contaminati. Significatività statistica dell'incremento delle concentrazioni di As nelle fronde osservato nel passare da 60 a 190 giorni secondo il test Two-way ANOVA Bonferroni's post test.

<i>Terreno non contaminato 60gg vs. Terreno non contaminato 190gg</i>			Significatività
Ecotipo	T.n.C.* 60gg	T.n.C. 190gg	
<i>PvIt</i>	36,33 ±13,79†	36,33 ±13,79	ns‡
<i>PvCh</i>	27,37 ±8,24	27,37 ±8,24	ns
<i>Ceneri 60gg vs. Ceneri 190gg</i>			
Ecotipo	Ceneri 60gg	Ceneri 190gg	
<i>PvIt</i>	2490 ±1371,85	7788 ±1662,82	***
<i>PvCh</i>	2411 ±819,83	6559 ±2211,05	***
<i>Sabbia 60gg vs. Sabbia 190gg</i>			
Ecotipo	Sabbia 60gg	Sabbia 190gg	
<i>PvIt</i>	1772 ±179,42	4275 ±452,81	**
<i>PvCh</i>	1737±308,79	4516 ±896,96	**

* T.n.C: Terreno non contaminato

† Media di 4 repliche ± Dev. Std.

‡ ns: *not significant* P value>0,05 * *significant* P value<0,05 ** *very significant* P value<0,01

*** *extremely significant* P value<0,001

Anche in questo caso, sono state riportate graficamente (fig. 3.16) la misura dell'arsenico totale asportato (μg), ottenuta moltiplicando i valori relativi a un grammo di sostanza secca per i grammi totali di biomassa prodotta. Al totale dell'arsenico assorbito, sono stati affiancati gli istogrammi riguardanti il peso secco (g) delle fronde come espressione della biomassa prodotta alla fine della prova. Osservando il grafico, emerge palesemente come la quantità di arsenico presente nelle piante cresciute su terreno non contaminato sia decisamente più bassa in confronto a quella delle piante dei suoli industriali. Nel caso dei terreni contaminati ("ceneri" e "sabbia"), il valore più alto riguarda la prova su ceneri di pirite per *PvCh* con un totale di arsenico asportato quasi prossimo a 70000 μg . C'è da dire comunque, che le differenze riscontrate nelle quantità di As accumulate dai due ecotipi non risultano significative alla luce di test statistici (tab. 3.18) e che l'unico fattore capace di

influenzare la variabilità risulta essere solo natura del suolo (“T.n.C.”, “ceneri” e “sabbia”).

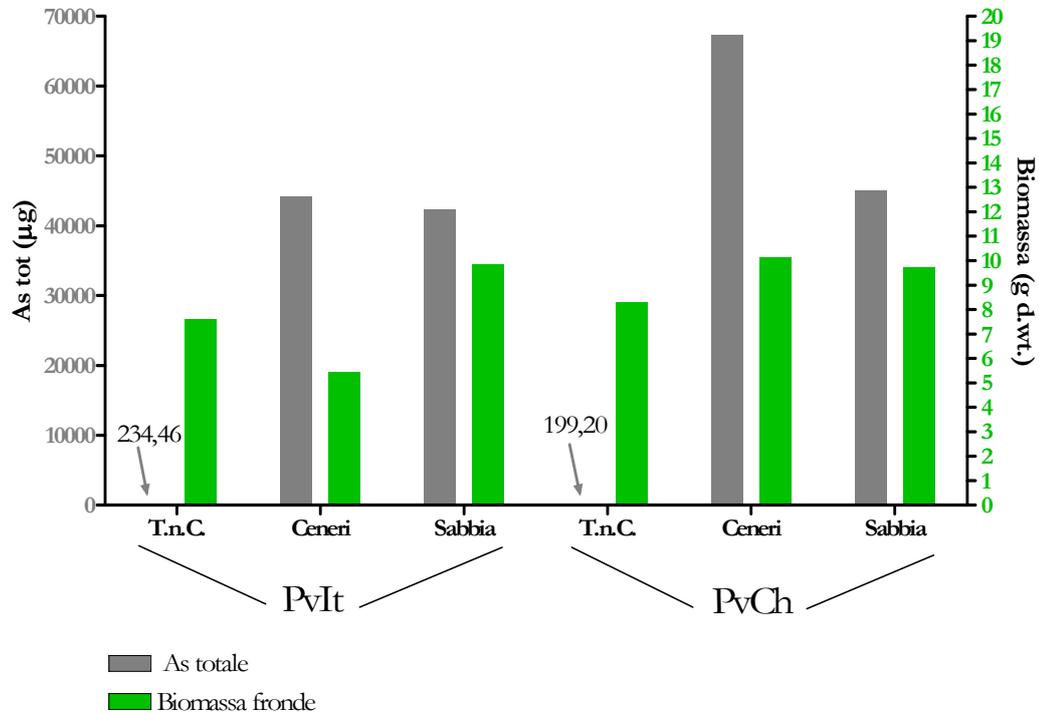


Figura 3.16 Gli istogrammi in grigio (■) rappresentano le quantità medie totali espresse in µg di As accumulate nelle fronde di *P. vittata* (PvIt e PvCh) allevate su terreno non contaminato (T.n.C.), ceneri di pirite (ceneri) e sabbia. per i due ecotipi di *P. vittata*. Gli istogrammi in verde (■) affiancati, mostrano la quantità di biomassa prodotta espressa in grammi di peso secco.

Tabella 3.18 Per ogni tipo di terreno, sono riportati i valori delle quantità medie totali di As misurate nelle fronde di due ecotipi (PvIt e PvCh). Viene riportata, inoltre la significatività statistica del confronto dei dati per i due ecotipi ottenuta sottoponendoli al test *Two-way ANOVA Bonferroni's post test*.

Tesi	PvIt	PvCh	Significatività
	As tot. (µg)	As tot. (µg)	
<i>T. non contaminato</i>	234,47 ± 129,29†	199,20 ± 113,96	ns‡
<i>Ceneri</i>	44231,13 ± 27714,01	67405,48 ± 35248,32	ns
<i>Sabbia</i>	42317,93 ± 25687,34	45140,95 ± 22567,22	ns

† Media di 4 repliche ± Dev. Std.

‡ ns: not significant P value > 0,05 * significant P value < 0,05 ** very significant P value < 0,01

*** extremely significant P value < 0,001

I grafici in figura 3.17 illustrano la diminuzione della concentrazione di As solubile nei terreni misurate all'inizio e dopo 190 giorni dal trapianto delle felci (vedi par. 2.4.2.2 cap. 2). La tabella 3.19 ne riporta l'interpretazione statistica alla luce del test *Two-way* ANOVA.

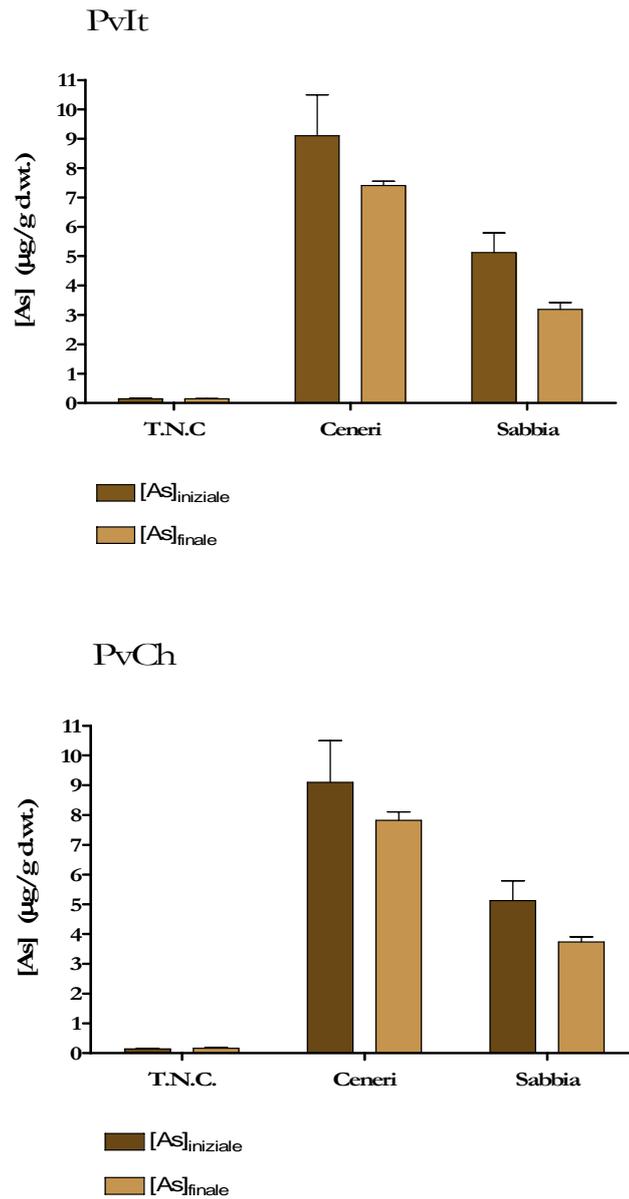


Figura 3.17 I grafici mostrano le concentrazioni di As solubile, espresse in µg/g di peso secco di terreno, misurate all'inizio (■ [As]_{iniziale}) e alla fine (■ [As]_{finale}) dell'esperimento dopo 190 giorni. In alto il grafico relativo alle prove condotte con *P. vittata* dell'ecotipo italiano (PvIt), in basso quello per l'ecotipo svizzero (PvCh).

Tabella 3.19 In tab. A e B le concentrazioni medie di As solubile rilevate nei terreni all'inizio([As]_{iniziale}) e al termine della prova ([As]_{finale}) in presenza di *P. vittata* – PvIt – (A) e – PvCh – (B). Viene riportata, inoltre la significatività statistica del confronto dei dati mediante il test *Two-way ANOVA Bonferroni's post test*.

A

Tesi	PvIt		Significatività
	[As] _{iniziale}	[As] _{finale}	
<i>T. non contaminato</i>	0,141±0,052†	0,136±0,003	ns‡
<i>Ceneri</i>	9,100±2,790	7,405±0,289	ns
<i>Sabbia</i>	5,124±1,336	3,187±0,467	ns

B

Tesi	PvCh		Significatività
	[As] _{iniziale}	[As] _{iniziale}	
<i>T. non contaminato</i>	0,141±0,052	0,141±0,052	ns
<i>Ceneri</i>	9,100±2,790	9,100±2,790	ns
<i>Sabbia</i>	5,124±1,336	5,124±1,336	ns

† Media di 4 repliche ± Dev. Std.

‡ ns: *not significant* P value>0,05 * *significant* P value<0,05 ** *very significant* P value<0,01

*** *extremely significant* P value<0,001

Di seguito saranno riportati in tabella, 3.20 e 3.21, alcuni parametri di fitoestrazione descritti al cap. 2. Come esposto al par. 2.3.2 dello stesso capitolo, non sono state prese in considerazione le analisi delle radici a causa della scarsa attendibilità dei risultati, dovuta all'oggettiva difficoltà nel garantirne una sufficiente pulizia dai residui di substrato. Per questo motivo, non potrà essere preso in considerazione il Fattore di Traslocazione né le elaborazioni relative alle radici per tutti gli altri indici.

- BF – *Bioconcentration Factor* - $([As]_{fronde}/[As]_{substrato})$
- P/As *molar ratio* $([P]/[As])$
- BP - *Bioaccumulation Preference* - $([As]_{pianta}/[As]_{sub.})/([P]_{pianta}/[P]_{sub.})$

Tabella 3.20 Fattore di Bioconcentrazione - *Bioconcentration Factor (BF)* - calcolati in *P. vittata* per la prova su terreni contaminati a 60 e 190 giorni e per gli ecotipi PvIt e PvCh.

Tesi	<i>Bioconcentration Factor</i>			
	60 giorni		190 giorni	
	PvIt	PvCh	PvIt	PvCh
<i>T. non contaminato</i>	128,33	126,30	257,69	194,10
<i>Ceneri</i>	273,63	264,92	855,80	720,73
<i>Sabbia</i>	345,83	339,06	834,34	881,39

Tabella 3.21 Rapporto molare fosforo/arsenico - *P/As molar ratio* - e *Bioaccumulation Preference (BP)* calcolati in *P. vittata* per la prova su terreni contaminati a 60 e 190 giorni e per gli ecotipi PvIt e PvCh.

Tesi	<i>P/As molar ratio</i>				<i>Bioaccumulation Preference</i>			
	60 giorni		190 giorni		60 giorni		190 giorni	
	PvIt	PvCh	PvIt	PvCh	PvIt	PvCh	PvIt	PvCh
<i>T. non contaminato</i>	317,35	366,77	264,76	343,09	0,54	0,47	0,65	0,50
<i>Ceneri</i>	1,35	1,26	0,56	0,52	0,15	0,16	0,37	0,40
<i>Sabbia</i>	1,95	1,77	1,10	1,02	0,22	0,25	0,40	0,43

Parte quarta

Discussioni

Alla luce dei risultati ottenuti, per la cui rassegna si rimanda al cap. 3, il presente capitolo si propone di fornire un'analisi e un approfondimento su tutti quegli aspetti che nel corso della ricerca si sono rivelati più interessanti e probabilmente più significativi.

Una delle prime considerazioni da fare riguarda la non comune capacità di adattamento e tolleranza all'arsenico esibita da *Pteris vittata*, soprattutto in quelle prove condotte in condizioni di idroponica dove l'esposizione all'elemento tossico è diretta e non attenuata dall'azione tampone del terreno. Da quanto si può osservare in figg. 3.1 e 3.5 al capitolo 3 le piante hanno sopportato per trenta giorni concentrazioni di oltre 320 ppm di As per le prove di soglia con arsenato di sodio e di circa 384 ppm con arsenito di sodio. Felci che non presentano caratteristiche di iperaccumulatrici di arsenico come *Nephrolepis exaltata* già a concentrazioni di 1068 μM di As presenti in soluzione di idroponica (corrispondenti a circa 80 ppm) non sono in grado di sopravvivere (Tu et al. 2004). Anche per quanto riguarda le sperimentazioni su terreno, un dato significativo che testimonia lo stato di salute generale delle piante, è quello relativo alla biomassa prodotta (Fayiga et al., 2004). Nel nostro caso, la biomassa della parte epigea delle felci coltivate su suolo contaminato ("Ceneri" e "Sabbia") non ha subito diminuzioni statisticamente rilevanti rispetto a quella prodotta dalle piante mantenute su terreno normale non inquinato ("T.n.C"), dimostrando uno stato di buona condizione vegetativa e di generale rigoglio.

Secondo quanto è emerso dagli esperimenti, le piante hanno cominciato ad esibire dei sintomi di fitotossicità a livello delle fronde (imbrunimenti e disseccamenti dell'apice delle pinne) quando la concentrazione di arsenico nei tessuti ha raggiunto livelli prossimi a 8700 $\mu\text{g/g}$ di sostanza secca per la prova "Soglia As(V)" e "Soglia As (III)". Questi risultati

concorderebbero in parte con quanto riportato da Wang et al. (2002) secondo cui, i sintomi sulle fronde di *Pteris* in coltura idroponica, sono apparsi una volta che la concentrazione di arsenico nei germogli aveva raggiunto circa i 10000 µg/g di s.s.

Come atteso, in tutte le prove in cui sono state aggiunte alla soluzione Hoagland quantità crescenti di arsenico di entrambe le specie (Na_2HAsO_4 e NaAsO_2), le concentrazioni accumulate nelle piante hanno seguito un andamento pressoché lineare, andando da un minimo di circa 3100 µg/g di s.s. ad un massimo di 8690 µg/g per la prova “Soglia As (V)” e da 4300 µg/g a 13900 per la prova “Soglia As (III)” (figg. 3.3 e 3.8 cap. 3). In molti casi è stato fatto riferimento alla proporzionalità dell’iperaccumulo in *P. vittata* e della relazione di linearità tra il contenuto di arsenico nella vegetazione e quella presente nel substrato (Wang et al., 2002; Zhao et al., 2002; Tu & Ma, 2003; Caille et al., 2005) tanto che per alcuni autori l’assorbimento di arsenico avverrebbe seguendo il flusso dell’acqua attraverso le radici, in modo del tutto passivo (Tu & Ma, 2002).

Una delle prerogative che distinguono la felce *P. vittata* e per la quale se ne intravedono interessanti applicazioni nell’ambito della fitoestrazione, è la singolare capacità di concentrare notevoli quantità di arsenico nei tessuti insieme alla crescita relativamente rapida e alla grande biomassa (Ma et al., 2001). Dall’osservazione dei grafici relativi alle quantità totali di arsenico in tutte le prove sia in idroponica (3.4, 3.9 e 3.12) che su terreni contaminati (fig. 3.16), l’accumulo è stato rilevante, con il raggiungimento di un massimo intorno di 10000 µg/pianta per la tesi con 1600 ppm di arsenato di sodio, di oltre 16400 µg/pianta in presenza di 800 ppm di arsenito di sodio fino a quasi 70000 µg/pianta ottenuti per la prova in terreno su ceneri di pirite dopo 190 giorni. A titolo di

paragone, le quantità di arsenico assorbite da *Pteris vittata* rispetto a quelle ritrovate in *Nephrolepis exaltata*, cresciute entrambe in condizioni di idroponica, sono state nelle fronde di *P. vittata* fino a 18 volte superiori (Tu et al., 2004).

E' stato analizzato anche il comportamento di *P. vittata* nei termini della capacità di traslocazione dell'arsenico andando a misurare per ogni tesi in condizioni di idrocoltura le quantità relative allocate nelle radici e nelle fronde. Un altro aspetto di notevole importanza al fine di valutare l'efficienza di fitoestrazione, riguarda proprio la capacità da parte di una pianta di trasferire la sostanza inquinante dalle radici alla porzione epigea. Questa caratteristica assume particolare rilievo con piante che, come *P. vittata*, sono in grado di occupare un terreno per più anni, consentendo interventi periodici di rimozione della sola parte aerea, sede principale dell'accumulo.

Come risulta dalle tabelle 3.1 e 3.5, relative ai confronti tra l'assorbimento di arsenico misurato nelle radici e nelle fronde per gli esperimenti "Soglia As(V)" e "Soglia As(III)", in accordo con quanto descritto in molte pubblicazioni (Tu & Ma, 2002; Zhang et al., 2002; Tu et al., 2002), la maggior parte dell'arsenico assorbito risulta accumulato nelle fronde e in quantità estremamente maggiori rispetto alle radici.

L'indice di traslocazione *Traslocation Factor* (TF), definito come il rapporto tra concentrazione di As nelle fronde e quella nelle radici, descrive l'efficienza di una pianta nel processo di trasferimento della sostanza verso la parte epigea. In tutte le prove si sono ottenuti valori di TF superiori a 1 (vedi tabelle 3.3, 3.7 e 3.11) confermando quanto appena commentato che cioè *P. vittata* riesce ad attivare dei meccanismi particolarmente efficienti nella traslocazione dell'arsenico anche se

attualmente il fenomeno nella sua complessità rimane non del tutto compreso (McGrath & Zhao, 2003; Caille et al., 2004, Tu & Ma, 2002).

Un altro aspetto di un certo interesse è rappresentato dal raffronto fra le concentrazioni di As nelle fronde delle piante allevate in presenza di arsenato e le concentrazioni di quelle fatte crescere a contatto con arsenito. Il grafico sottostante (fig. 4.1), ricavato dai dati ottenuti dalle prove “Soglia As(V)” e “Soglia As(III)”, illustra con due rette di regressione, il diverso accumulo di arsenico nelle fronde in presenza di concentrazioni crescenti di arsenico trivalente, As(III), e arsenico pentavalente, As(V) nella soluzione di idroponica. Come si può osservare sembra che in presenza di arsenito le piante accumulino mediamente più arsenico. Abedin et al. (2002) riportano un comportamento analogo nella pianta di riso, osservando che in presenza di alte concentrazioni di arsenico l'*uptake* di arsenito risultava più grande rispetto all'arsenato. Gli stessi autori fanno inoltre notare come l'assorbimento di arsenato a differenza dell'arsenito fosse inibito dalla presenza di fosfato. Il fenomeno è stato ricondotto al fatto che potrebbero intervenire due diversi meccanismi di *uptake* dell'arsenico a livello delle radici, a seconda che si tratti di As(V) o di As(III). In particolare, mentre l'arsenito si suppone che abbia accesso tramite delle acquagliceroporine (Meharg & Jardine, 2003), l'arsenato entrerebbe nella pianta sfruttando i sistemi per l'assorbimento del fosfato (Meharg & Macnair, 1992; Wang et al., 2002) sottostando alla competizione per gli stessi siti di ingresso (Wang et al., 2002; Poynton et al. 2004; Tu & Ma, 2003). Sulla base di queste considerazioni si può supporre che il minore accumulo di arsenico nelle fronde delle piante in presenza di As(V) sia in parte legato a un minor *uptake* di arsenato a livello radicale dovuto al rapporto di competizione fra gli anioni AsO_4^{2-} e PO_4^{2-} .

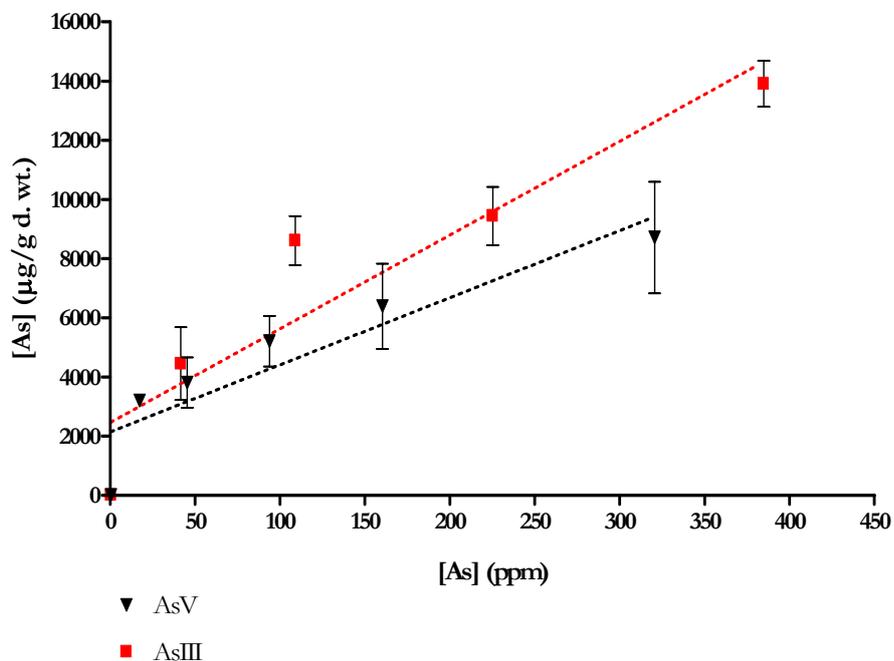


Figura 4.1 Diverso assorbimento di As nelle fronde di *P. vittata* in presenza di concentrazioni crescenti nella soluzione nutritiva di arsenico pentavalente As(V) (▼) e trivalente As(III) (■). Le barre verticali rappresentano \pm Dev. St. (deviazione standard).

Uno degli scopi di questo lavoro, è stato quello di valutare eventuali differenze nell'assorbimento di arsenico da parte di due diversi ecotipi di *P. vittata*, per comodità identificati con le sigle PvIt e PvCh. In uno degli esperimenti, sono state allestite due prove in condizioni di idroponica in cui entrambi gli ecotipi venivano sottoposti a due concentrazioni di arsenato e di arsenito di sodio e di arsenato/arsenito insieme in quantità equimolari (vedi cap. 2 par. 2.2.3).

Dai risultati riportati nel capitolo 3 par. 3.1.1.3 è emerso che in presenza di arsenito e arsenato/arsenito alle concentrazioni di 250 e 500 ppm, l'ecotipo italiano (PvIt) ha accumulato significativamente di più rispetto all'ecotipo svizzero (PvCh) (vedi figura 3.11 e tabella 3.9). Tuttavia è difficile stabilire quanto abbiano potuto incidere su questi risultati le eventuali diversità genetiche, è ragionevole credere piuttosto a una diversa risposta ad un andamento climatico diverso. Le due prove, infatti, sono state condotte, in due tempi diversi nell'arco dell'estate 2006. In base ai rilevamenti di temperatura e umidità gentilmente forniti dal servizio agro-meteorologico dell'ARSIA della sezione di Pisa, è apparso che nel periodo in cui era in atto la prova di *uptake* con *Pteris* dell'ecotipo PvIt, la temperatura media è stata rispettivamente pari a 27°C con una percentuale umidità relativa mediamente intorno al 54%. Diversamente, durante il periodo in cui era in corso lo studio con *Pteris* PvCh si sono registrati valori di temperatura più bassi, circa 22°C, e livelli di umidità relativa più elevati, intorno al 63%. Tutto questo fa pensare che in ragione di temperature più elevate e percentuali di umidità più basse i tassi di traspirazione delle piante della prova di “*uptake* PvIt”, fossero maggiori. Dal momento che è noto che l'arsenico si muove attraverso le vie xilematiche seguendo il flusso della linfa ascendente (Kertulis et al., 2005; Mihucz et al., 2005) e il suo assorbimento è condizionato dal variare dei flussi di traspirazione (Zhang et al., 2002) si può credere che più alte sono le temperature e minore il tasso di umidità si avrà un maggior richiamo di linfa xilematica e quindi un maggior trasporto di arsenico dalle radici alle fronde.

Di particolare rilevanza è stata l'adattabilità di *Pteris* dimostrata in terreni marginali provenienti da un ex sito industriale fortemente inquinato. Le piante hanno dato risposte positive in termini di capacità di

attecchimento ed aumentando in tempi relativamente brevi la loro biomassa aerea, raggiungendo dimensioni paragonabili a quelle mantenute in condizioni terreno ottimale (vedi cap. 3 par. 3.2).

Per quanto riguarda gli assorbimenti di arsenico nelle prove su terreno è stato rilevato un importante incremento in tutte le tesi dell'accumulo nel tempo nel passare da 60 a 190 giorni, ad eccezione di quelle su terreno non contaminato. Si è notato, inoltre, che le piante cresciute su ceneri di pirite, l'iperaccumulo al termine del test è stato significativamente superiore rispetto a quelle mantenute su sabbia. Con tutta probabilità, la differenza riscontrata è dovuta ad una più forte contaminazione da arsenico in "ceneri" rispetto a "sabbia", come in parte dimostrano le analisi su terreno dell'arsenico solubile.

La prova su terreni contaminati ha previsto lo studio comparato della diversa abilità di iperaccumulo in due ecotipi di *Pteris vittata* (PvIt e PvCh). Dalle analisi sul materiale vegetale e dalle successive elaborazioni statistiche (v. fig. 3.15 e tab. 3.14) è emerso che l'unico fattore in grado di influenzare in modo significativo la variabilità riscontrata negli assorbimenti di arsenico, è il tipo di terreno (T.n.C., ceneri e sabbia) su cui le piante sono state allevate, indipendentemente dal fatto che appartenessero all'uno o all'altro ecotipo.

Sebbene dai grafici in figura 3.17 e dalla tabella 3.19 nel cap. 3 si osservi una generale diminuzione della concentrazione di As nei terreni in presenza delle piante, le differenze non risultano statisticamente significative. Il dato lascia tuttavia pensare ad una progressiva tendenza verso una diminuzione della quantità di arsenico, apprezzabile in modo importante solo dopo tempi più lunghi.

L'efficienza di fitoestrazione può essere valutata da una serie di indici che riflettono: la capacità della pianta di concentrare l'arsenico nei tessuti (*Bioconcentration Factor* BF), l'abilità di traslocazione dell'arsenico dalle radici alle fronde (*Translocation Factor* TF), di valutare gli effetti di interazione reciproca di P e As sull'assorbimento dei due elementi (*Bioaccumulation Preference* BP) e sullo stato fisiologico delle piante (*P/As molar ratio*).

Il Fattore di Bioconcentrazione (BF) è definito come il rapporto della concentrazione di arsenico nei tessuti di una pianta e la concentrazione rilevata nel substrato (terreno o soluzione di idroponica). Per alcuni autori l'indice BF definisce meglio le potenzialità di iperaccumulo rispetto ai semplici valori di concentrazione rilevate nei tessuti, in quanto quest'ultimi non prendono in considerazione le quantità relative di arsenico nel suolo o nel mezzo nutritivo (Tu & Ma, 2002; Tu et al., 2002). A titolo di esempio Porter & Peterson (1977) riportano che alcune specie di *Agrostis* spp. cresciute su suoli contaminati da arsenico contenevano fino a 3470 mg di As per Kg di s.s. . Tuttavia, poiché le concentrazioni di arsenico in quei terreni risultavano di gran lunga superiori (26000 mg/Kg) non è stato possibile affermare che tali piante fossero in grado di iperaccumulare arsenico.

I nostri risultati mostrano che in tutte le prove in idroponica (v. tabb. 3.3, 3.7 e 3.11) e su terreni contaminati (v. tab. 3.20) i valori di BF nelle fronde sono ampiamente superiori a 1 confermando ulteriormente in *P. vittata* una spiccata capacità di bioconcentrare arsenico.

Oltre all'interesse per le capacità di assorbire grandi quantità di contaminanti da un terreno, una pianta per la quale se ne intravedano prospettive nella phytoremediation, dovrebbe possedere la caratteristica di trasferire quanto più possibile la sostanza dalle radici alle parte epigea

per facilitare così la rimozione del contaminante. Il Fattore di Traslocazione, definito come il rapporto fra la concentrazione di arsenico nella parte epigea (fronde) e quella nelle radici, è un buon indicatore riguardo a questa abilità nella traslocazione (Tu & al., 2004).

Nelle tabelle 3.3, 3.7 e 3.11 sono elencati per ogni tesi, i valori relativi agli indici di traslocazione. Per tutti i casi si sono ottenuti indici superiori a 1; ciò significa che siamo in presenza di un efficace trasferimento di arsenico dal sistema radicale alle fronde. Sebbene i nostri risultati siano in accordo con altri studi riguardo al fatto che *P. vittata* traslochi arsenico nelle fronde - espresso da un $TF > 1$ - (Tu & Ma, 2002; Tu et al., 2004), se ne discostano per valori numerici più alti, dovuti probabilmente a tempi di esposizione all'arsenico più lunghi che hanno consentito alle piante una maggiore traslocazione.

Il fattore di *Bioaccumulation Preference* (BP) dell'arsenico sul fosforo, misura la selettività di una pianta nel privilegiare l'assorbimento di arsenico sul fosforo e si ottiene dal rapporto fra la concentrazione di As nella pianta diviso quella del substrato e la concentrazione di P nella pianta e quella del substrato - $([As]_{\text{pianta}}/[As]_{\text{substrato}})/([P]_{\text{pianta}}/[P]_{\text{substrato}})$. Valori di BP più alti indicano una maggiore preferenza nell'*uptake* di As. Tu & Ma (2003) hanno trovato che dopo 20 settimane di coltivazione di *P. vittata* su terreni contaminati, l'indice BP risultava in tutti i casi maggiore di 1 nelle fronde, e minore di 0,5 nelle radici con la conclusione che, nella parte epigea, l'arsenico rispetto al fosforo, veniva accumulato in modo preferenziale.

Nel nostro studio la tendenza rispecchia quella riportata in letteratura, cioè che i valori di BP relativi alle fronde nelle prove in idroponica, "Soglia As(V)" "Soglia As(III)" e "*uptake*" in PvIt e PvCh, appaiono superiori a quelli nelle radici di almeno un ordine di grandezza (v. tabb.

3.4, 3.8 e 3.12) e cioè che l'arsenico nei confronti del fosforo, risultava preferenzialmente accumulato nella parte epigea. Tuttavia, a differenza del lavoro sopraccitato, in nessuna tesi, ad eccezione di "Soglia As(V)" 100 ppm (tab. 3.4), i valori superavano l'unità. Come prevedibile, per le tesi di controllo, dove la concentrazione di As era molto bassa, si sono ottenuti i più bassi valori di BP. È interessante notare come, in presenza di 800 e 1600 ppm di arsenato di sodio - prova "Soglia As(V)" - e con 500 e 800 ppm di arsenito di sodio - prova "Soglia As(III)" - l'indice BP per le fronde non si discosti in maniera significativa dalle rispettive tesi di controllo (vedi appendice) suggerendo che da una certa soglia in poi sembra che diminuisca, nelle fronde, la capacità di concentrare arsenico nei confronti del fosforo.

Come è stato in più occasioni menzionato, il meccanismo dell'iperaccumulo di As in *Pteris vittata* ha dimostrato essere visibilmente influenzato dalla presenza e dalla disponibilità di P (Tu et al., 2003; Tu & Ma, 2003; Wang et al., 2002; Tu et al., 2004). In questo lavoro di Tesi, affianco all'indice di *Bioaccumulation Preference* (BP) è stato preso in considerazione anche il rapporto molare tra il fosforo e l'arsenico (*P/As molar ratio*) in fronde e radici delle piante sottoposte ai diversi esperimenti. In virtù dell'analogia tra arsenato e fosfato, As può determinare tossicità interferendo con molte funzioni fisiologiche esercitate da P (Meharg and Hartley-Whitaker, 2002). Per questa ragione, è ragionevole credere che il fosforo svolga un ruolo critico nell'assicurare una certa difesa contro fenomeni di fitotossicità provocati dall'arsenico (Tu & Ma, 2005, Tu et al., 2004). Un'ipotesi sostiene che tra i sistemi adottati da *Pteris* per resistere alla tossicità dell'arsenico ci sia quello di riuscire a mantenere sufficienti concentrazioni di P nelle radici affinché ne sia garantita una normale attività metabolica (Luongo & Ma, 2005).

Il comportamento di *P. vittata* riportato dagli autori è stato riscontrato anche nel nostro lavoro. La figura 4.2 restituisce in grafico le concentrazioni di fosforo misurate in radici e fronde nelle prove “Soglia As(V)” e “Soglia As(III)”.

Dai grafici e dalle analisi statistiche, riportate in appendice, si osserva una maggiore presenza di P nelle radici in confronto alle fronde fatta eccezione per le tesi “Soglia As(III)” 250 e 500 ppm di arsenito di sodio per le quali si assiste ad un decremento delle quantità di fosforo accumulate sia in radici che fronde dovuto verosimilmente alla fitotossicità di un eccesso di As.

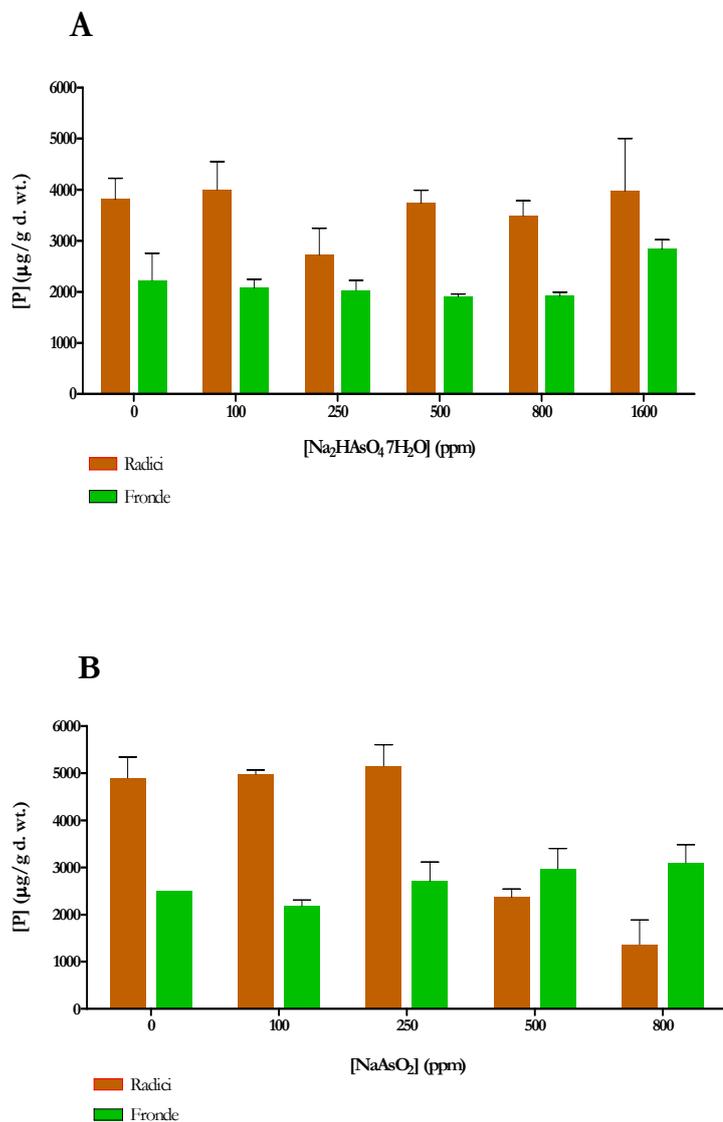


Figura 4.2 Gli istogrammi rappresentano la media e l'errore standard dei valori di concentrazione di P rilevati nelle radici e nelle fronde di *P. vittata* per la prova “Soglia As(V)” (A) e per “Soglia As(III)” (B).

Per le ragioni fin qui presentate riguardo all'influenza reciproca che P e As hanno reciprocamente sullo stato fisiologico di una pianta, sono in molti a ritenere che il rapporto molare P/As potrebbe rappresentare un

buon indice per valutare gli effetti dei due elementi sulla crescita di una pianta.

Come si può osservare dalle tabelle 3.4, 3.8, attinenti alle prove “Soglia As(V)” e “Soglia As(III)”, la tendenza generale è quella di una progressiva diminuzione dei valori al crescere delle concentrazioni di As nella soluzione. È da notare tuttavia che nelle radici si mantengono valori di P/As sempre più alti rispetto alle fronde, conseguenza sia del maggior accumulo di P rispetto alle fronde che dell’efficiente sistema di traslocazione dell’arsenico nella parte aerea (Tu et al., 2004)

In linea con quanto riportato da Tu & Ma (2003) e Tu & Ma (2005), secondo cui a rapporti P/As inferiori a 1 facevano riscontro segni di evidente difficoltà nella crescita delle piante, è interessante notare come nel nostro caso, la comparsa dei segni di fitotossicità sulle fronde sia associata a valori di *P/As molar ratio* <1 ottenuti nelle fronde (cfr. figure 3.1 e 3.5 con tabelle 3.4 e 3.8). Questo permette di pensare che valori di P/As superiori a 1 nelle fronde siano necessari per consentire una normale crescita delle piante e che la presenza del fosforo aiuti ad attenuare la tossicità dell’As (Tu & Ma, 2003; Fayiga & Ma, 2005; Tu et al., 2004).

Dalla tabella 3.12 relativa alla prova di *uptake* dell’As in idroponica, si riscontrano indici di P/As per l’ecotipo PvCh maggiori di 1 e in tutti i casi superiori a quelli calcolati per PvIt (vedi appendice). Il dato è quasi sicuramente imputabile al minor assorbimento di arsenico da parte delle piante dell’ecotipo svizzero per le ragioni già precedentemente commentate.

P/As molar ratio insieme al fattore di *Bioaccumulation preference* (BP), forniscono un’importante dimostrazione circa l’intima interrelazione fra P e As. Questo potrebbe avere importanti implicazioni nell’ottica di un

ipotetico intervento di phytoremediation di un sito contaminato, in quanto dalla gestione, per esempio di una concimazione, può dipendere non solo lo stato di salute delle piante ma anche le loro efficienza di fitoestrazione dell'arsenico.

Parte quinta

Conclusioni

Lo scopo del nostro lavoro era quello, innanzi tutto, di ottimizzare le tecniche che consentissero di ottenere piante di *Pteris vittata* partendo da spore e di osservare in che modo la felce avrebbe risposto alla contaminazione da arsenico valutandone le potenzialità di sopravvivenza e adattamento e le capacità fitoestrattive.

Per questo motivo sono state allestite prove in condizioni di mesocosmo sia in idroponica, sottoponendo le piante a concentrazioni crescenti di due diversi sali di arsenico (arsenato e arsenito di sodio), e prove su terreni contaminati provenienti da un ex sito industriale.

Lavorando in condizioni di idroponica è stato possibile fare delle osservazioni libere dalla variabilità delle complesse interazioni chimiche e biologiche di un suolo.

In terreno, invece sono state apprezzate le qualità delle piante poste in situazioni molto più vicine ad un contesto di un reale intervento di fitorisanamento di un terreno inquinato, sebbene in scala ovviamente molto ridotta.

Alla luce dei risultati emersi dal nostro lavoro è possibile concludere che:

- *Pteris vittata* è una pianta che riesce a sopportare concentrazioni di arsenico oltre le 300 ppm in soluzione idroponica ben superiori ai limiti nei terreni stabiliti per legge e fissati tra 20 e 50 ppm (D.M. 471/99)
- L'assorbimento di As rilevato nelle fronde è risultato proporzionale alla concentrazione presente nel substrato, sia esso costituito da una soluzione nutritiva arricchita con sali di As o un terreno industriale contaminato.
- Le asportazioni totali di arsenico hanno avuto dei massimi compresi tra 10000 e 16000 µg di As a pianta dopo 30 giorni

-
- condizioni di idroponica e fino a quasi 70000 μg a pianta dopo 190 giorni su terreno di ceneri di pirite.
- Le piante in tutti i casi hanno dimostrato una grande capacità di traslocazione dell'arsenico dall'apparato radicale alla parte epigea, confermato anche da indici di traslocazione ben oltre l'unità.
 - Le fronde hanno rappresentato l'organo di maggior accumulo di arsenico, confermando in *P. vittata* gli elementi distintivi propri delle piante iperaccumulatrici.
 - Non sono state riscontrate differenze significative nelle capacità di iperaccumulo fra due ecotipi di *P. vittata* (PvIt e PvCh) di diversa provenienza geografica. La variabilità riscontrata in coltura idroponica è con tutta probabilità imputabile ad un cambiamento delle condizioni ambientali in particolare della temperatura e dell'umidità relativa.
 - Le piante si sono adattate a crescere su terreni contaminati senza mostrare particolari segni di sofferenza né di riduzione della crescita e quindi della biomassa prodotta.
 - Le quantità di arsenico accumulate nelle fronde di *P. vittata* mantenute su terreni contaminati sono aumentate dopo 130 giorni di oltre il 190% su ceneri di pirite e di quasi il 150% su sabbia.

Nonostante il grande impulso delle ricerche avuto negli ultimi anni, resta ancora molto da approfondire, specialmente a livello fisiologico e molecolare, ed è auspicabile che in futuro, i meccanismi alla base del particolarissimo fenomeno della tolleranza e dell'iperaccumulo di arsenico in *Pteris vittata* vengano compresi, sia per penetrarne il fascino da un punto di vista biologico ed evolutivistico sia per poter affidare a

protocolli di intervento più certi l'utilizzo della pianta a fini di fitorisanamento.

Appendice - Tabelle statistiche

Di seguito saranno riportate le tavole relative alle analisi statistiche di ciascun indice di fitoestrazione elencati nelle tabelle 3.3-3.4; 3.7-3.8; 3.11-3.12 e 3.20-3.21.

Per ciascun indice è stato effettuato un confronto fra valori di ciascuna tesi. I dati sono stati sottoposti all'analisi statistica secondo il metodo *one-way* ANOVA Tukey's post test, riportando nell'ultima colonna la significatività statistica della differenza, convenzionalmente indicata con: ns-*not significant*; *-*significant*; **-*very significant* e ***-*extremely significant*.

Prova “Soglia As(V)”

“Soglia As(V)”
 BF - *Bioconcentration factor* -
 fronde

Tabella 2

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs 100ppm	-164,1	27,73	P < 0.001	***
CTRL vs 250ppm	-62,95	10,64	P < 0.001	***
CTRL vs 500ppm	-34,45	5,821	P < 0.05	*
CTRL vs 800ppm	-18,79	3,174	P > 0.05	ns
CTRL vs 1600ppm	-6,121	1,034	P > 0.05	ns
100ppm vs 250ppm	101,2	17,09	P < 0.001	***
100ppm vs 500ppm	129,7	21,91	P < 0.001	***
100ppm vs 800ppm	145,3	24,55	P < 0.001	***
100ppm vs 1600ppm	158,0	26,69	P < 0.001	***
250ppm vs 500ppm	28,49	4,814	P < 0.05	*
250ppm vs 800ppm	44,16	7,461	P < 0.01	**
250ppm vs 1600ppm	56,83	9,601	P < 0.001	***
500ppm vs 800ppm	15,67	2,647	P > 0.05	ns
500ppm vs 1600ppm	28,33	4,787	P < 0.05	*
800ppm vs 1600ppm	12,67	2,140	P > 0.05	ns

“Soglia As(V)”
 BF - *Bioconcentration factor* -
 radici

Tabella 3

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs 100ppm	-17,46	9,168	P < 0.001	***
CTRL vs 250ppm	-5,190	2,726	P > 0.05	ns
CTRL vs 500ppm	-10,05	5,277	P < 0.05	*
CTRL vs 800ppm	-5,883	3,089	P > 0.05	ns
CTRL vs 1600ppm	-3,314	1,740	P > 0.05	ns
100ppm vs 250ppm	12,27	6,442	P < 0.01	**
100ppm vs 500ppm	7,409	3,891	P > 0.05	ns
100ppm vs 800ppm	11,58	6,079	P < 0.05	*
100ppm vs 1600ppm	14,14	7,428	P < 0.01	**
250ppm vs 500ppm	-4,859	2,552	P > 0.05	ns
250ppm vs 800ppm	-0,6927	0,3638	P > 0.05	ns
250ppm vs 1600ppm	1,876	0,9852	P > 0.05	ns
500ppm vs 800ppm	4,166	2,188	P > 0.05	ns
500ppm vs 1600ppm	6,735	3,537	P > 0.05	ns
800ppm vs 1600ppm	2,569	1,349	P > 0.05	ns

“Soglia As(V)”
P/As molar ratio
fronde

Tabella 4

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs 100ppm	503,9	24,80	P < 0.001	***
CTRL vs 250ppm	504,2	24,81	P < 0.001	***
CTRL vs 500ppm	504,6	24,83	P < 0.001	***
CTRL vs 800ppm	504,8	24,84	P < 0.001	***
CTRL vs 1600ppm	504,7	24,84	P < 0.001	***
100ppm vs 250ppm	0,2543	0,01252	P > 0.05	ns
100ppm vs 500ppm	0,6680	0,03288	P > 0.05	ns
100ppm vs 800ppm	0,8167	0,04019	P > 0.05	ns
100ppm vs 1600ppm	0,7573	0,03727	P > 0.05	ns
250ppm vs 500ppm	0,4137	0,02036	P > 0.05	ns
250ppm vs 800ppm	0,5623	0,02768	P > 0.05	ns
250ppm vs 1600ppm	0,5030	0,02475	P > 0.05	ns
500ppm vs 800ppm	0,1487	0,007317	P > 0.05	ns
500ppm vs 1600ppm	0,08933	0,004397	P > 0.05	ns
800ppm vs 1600ppm	-0,05933	0,002920	P > 0.05	ns

“Soglia As(V)”
P/As molar ratio
radici

Tabella 5

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs 100ppm	-38,64	6,289	P < 0.01	**
CTRL vs 250ppm	-27,93	4,546	P > 0.05	ns
CTRL vs 500ppm	-10,42	1,696	P > 0.05	ns
CTRL vs 800ppm	-9,276	1,510	P > 0.05	ns
CTRL vs 1600ppm	-10,10	1,644	P > 0.05	ns
100ppm vs 250ppm	10,71	1,743	P > 0.05	ns
100ppm vs 500ppm	28,22	4,593	P > 0.05	ns
100ppm vs 800ppm	29,36	4,779	P < 0.05	*
100ppm vs 1600ppm	28,54	4,645	P > 0.05	ns
250ppm vs 500ppm	17,51	2,850	P > 0.05	ns
250ppm vs 800ppm	18,66	3,037	P > 0.05	ns
250ppm vs 1600ppm	17,83	2,902	P > 0.05	ns
500ppm vs 800ppm	1,144	0,1862	P > 0.05	ns
500ppm vs 1600ppm	0,3177	0,05170	P > 0.05	ns
800ppm vs 1600ppm	-0,8263	0,1345	P > 0.05	ns

“Soglia As(V)”

BP - *Bioaccumulation preference* -
fronde

Tabella 6

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs 100ppm	-1,270	32,64	P < 0.001	***
CTRL vs 250ppm	-0,5007	12,87	P < 0.001	***
CTRL vs 500ppm	-0,3117	8,011	P < 0.01	**
CTRL vs 800ppm	-0,1770	4,550	P > 0.05	ns
CTRL vs 1600ppm	-0,0006667	0,01714	P > 0.05	ns
100ppm vs 250ppm	0,7690	19,77	P < 0.001	***
100ppm vs 500ppm	0,9580	24,63	P < 0.001	***
100ppm vs 800ppm	1,093	28,09	P < 0.001	***
100ppm vs 1600ppm	1,269	32,62	P < 0.001	***
250ppm vs 500ppm	0,1890	4,858	P < 0.05	*
250ppm vs 800ppm	0,3237	8,320	P < 0.001	***
250ppm vs 1600ppm	0,5000	12,85	P < 0.001	***
500ppm vs 800ppm	0,1347	3,462	P > 0.05	ns
500ppm vs 1600ppm	0,3110	7,994	P < 0.01	**
800ppm vs 1600ppm	0,1763	4,533	P > 0.05	ns

“Soglia As(V)”

BP - *Bioaccumulation preference* -
radici

Tabella 7

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs 100ppm	-0,07233	7,943	P < 0.01	**
CTRL vs 250ppm	-0,0310	3,404	P > 0.05	ns
CTRL vs 500ppm	-0,0420	4,612	P > 0.05	ns
CTRL vs 800ppm	-0,02667	2,928	P > 0.05	ns
CTRL vs 1600ppm	-0,0130	1,428	P > 0.05	ns
100ppm vs 250ppm	0,04133	4,539	P > 0.05	ns
100ppm vs 500ppm	0,03033	3,331	P > 0.05	ns
100ppm vs 800ppm	0,04567	5,015	P < 0.05	*
100ppm vs 1600ppm	0,05933	6,516	P < 0.01	**
250ppm vs 500ppm	-0,0110	1,208	P > 0.05	ns
250ppm vs 800ppm	0,004333	0,4759	P > 0.05	ns
250ppm vs 1600ppm	0,0180	1,977	P > 0.05	ns
500ppm vs 800ppm	0,01533	1,684	P > 0.05	ns
500ppm vs 1600ppm	0,0290	3,185	P > 0.05	ns
800ppm vs 1600ppm	0,01367	1,501	P > 0.05	ns

Prova “Soglia As(III)”

“Soglia As(III)”
 BF - *Bioconcentration factor* -
 fronde

Tabella 8

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs 100 ppm	-86,45	10,13	P < 0.001	***
CTRL vs 250 ppm	-58,30	6,833	P < 0.01	**
CTRL vs 500 ppm	-21,23	2,488	P > 0.05	ns
CTRL vs 800 ppm	-15,47	1,813	P > 0.05	ns
100ppm vs 250 ppm	28,15	3,299	P > 0.05	ns
100ppm vs 500 ppm	65,22	7,644	P < 0.01	**
100ppm vs 800 ppm	70,98	8,320	P < 0.01	**
250ppm vs 500 ppm	37,07	4,345	P > 0.05	ns
250ppm vs 800 ppm	42,83	5,020	P < 0.05	*
500ppm vs 800 ppm	5,764	0,6756	P > 0.05	ns

“Soglia As(III)”
 BF - *Bioconcentration factor* -
 radici

Tabella 9

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs 100ppm	-10,57	32,97	P < 0.001	***
CTRL vs 250ppm	-10,90	34,01	P < 0.001	***
CTRL vs 500ppm	-5,147	16,06	P < 0.001	***
CTRL vs 800ppm	-2,126	6,635	P < 0.01	**
100ppm vs 250ppm	-0,3347	1,044	P > 0.05	ns
100ppm vs 500ppm	5,419	16,91	P < 0.001	***
100ppm vs 800ppm	8,440	26,33	P < 0.001	***
250ppm vs 500ppm	5,753	17,95	P < 0.001	***
250ppm vs 800ppm	8,774	27,38	P < 0.001	***
500ppm vs 800ppm	3,021	9,426	P < 0.001	***

“Soglia As(III)”
P/As molar ratio
 fronde

Tabella 10

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs 100ppm	767,6	7,985	P < 0.01	**
CTRL vs 250ppm	768,1	7,990	P < 0.01	**
CTRL vs 500ppm	768,2	7,992	P < 0.01	**
CTRL vs 800ppm	768,3	7,993	P < 0.01	**
100ppm vs 250ppm	0,5007	0,005209	P > 0.05	ns
100ppm vs 500ppm	0,6517	0,006779	P > 0.05	ns
100ppm vs 800ppm	0,7237	0,007529	P > 0.05	ns
250ppm vs 500ppm	0,1510	0,001571	P > 0.05	ns
250ppm vs 800ppm	0,2230	0,002320	P > 0.05	ns
500ppm vs 800ppm	0,07200	0,0007490	P > 0.05	ns

“Soglia As(III)”
P/As molar ratio
 radici

Tabella 11

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs 100ppm	-27,45	64,35	P < 0.001	***
CTRL vs 250ppm	-10,47	24,54	P < 0.001	***
CTRL vs 500ppm	-4,951	11,61	P < 0.001	***
CTRL vs 800ppm	-4,187	9,816	P < 0.001	***
100ppm vs 250ppm	16,98	39,81	P < 0.001	***
100ppm vs 500ppm	22,50	52,75	P < 0.001	***
100ppm vs 800ppm	23,26	54,54	P < 0.001	***
250ppm vs 500ppm	5,517	12,93	P < 0.001	***
250ppm vs 800ppm	6,281	14,72	P < 0.001	***
500ppm vs 800ppm	0,7637	1,790	P > 0.05	ns

“Soglia As(III)”
BP - *Bioaccumulation preference* -
fronde

Tabella 12

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs 100ppm	-0,6540	10,05	P < 0.001	***
CTRL vs 250ppm	-0,3350	5,148	P < 0.05	*
CTRL vs 500ppm	-0,1530	2,351	P > 0.05	ns
CTRL vs 800ppm	-0,05467	0,8401	P > 0.05	ns
100ppm vs 250ppm	0,3190	4,902	P < 0.05	*
100ppm vs 500ppm	0,5010	7,699	P < 0.01	**
100ppm vs 800ppm	0,5993	9,210	P < 0.001	**
250ppm vs 500ppm	0,1820	2,797	P > 0.05	ns
250ppm vs 800ppm	0,2803	4,308	P > 0.05	ns
500ppm vs 800ppm	0,09833	1,511	P > 0.05	ns

“Soglia As(III)”
BP - *Bioaccumulation preference* -
radici

Tabella 13

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs 100ppm	-0,03367	28,68	P < 0.001	***
CTRL vs 250ppm	-0,0340	28,97	P < 0.001	***
CTRL vs 500ppm	-0,0350	29,82	P < 0.001	***
CTRL vs 800ppm	-0,02367	20,16	P < 0.001	***
100ppm vs 250ppm	-0,0003333	0,2840	P > 0.05	ns
100ppm vs 500ppm	-0,001333	1,136	P > 0.05	ns
100ppm vs 800ppm	0,0100	8,519	P < 0.001	***
250ppm vs 500ppm	-0,001000	0,8519	P > 0.05	ns
250ppm vs 800ppm	0,01033	8,803	P < 0.001	***
500ppm vs 800ppm	0,01133	9,655	P < 0.001	***

Prova “*uptake PvIt*”

“*uptake PvIt*”
BF - *Bioconcentration factor* -
fronde

Tabella 14

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs AsV 250ppm	-88,58	20,40	P < 0.001	***
CTRL vs AsV 500ppm	-42,30	9,740	P < 0.001	***
CTRL vs AsIII 250ppm	-63,61	14,65	P < 0.001	***
CTRL vs AsIII 500ppm	-28,03	6,454	P < 0.01	**
CTRL vs AsV/III 250ppm	-89,35	20,58	P < 0.001	***
CTRL vs AsV/III500ppm	-40,10	9,235	P < 0.001	***
AsV 250ppm vs AsV 500ppm	46,28	10,66	P < 0.001	***
AsV 250ppm vs AsIII 250ppm	24,97	5,750	P < 0.01	**
AsV 250ppm vs AsIII 500ppm	60,55	13,94	P < 0.001	**
AsV 250ppm vs AsV/III 250ppm	-0,7770	0,1789	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV/III500ppm	48,48	11,16	P < 0.001	***
AsV 500ppm vs AsIII 250ppm	-21,31	4,908	P < 0.05	*
AsV 500ppm vs AsIII 500ppm	14,27	3,285	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsV/III 250ppm	-47,06	10,84	P < 0.001	***
AsV 500ppm vs AsV/III500ppm	2,195	0,5054	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsIII 500ppm	35,58	8,193	P < 0.001	***
AsIII 250ppm vs AsV/III 250ppm	-25,75	5,929	P < 0.01	**
AsIII 250ppm vs AsV/III500ppm	23,51	5,413	P < 0.05	*
AsIII 500ppm vs AsV/III 250ppm	-61,33	14,12	P < 0.001	***
AsIII 500ppm vs AsV/III500ppm	-12,07	2,780	P > 0.05	ns
AsV/III 250ppm vs AsV/III500ppm	49,25	11,34	P < 0.001	***

“uptake PvIt”
**BF - Bioconcentration factor -
radici**

Tabella 15

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs AsV 250ppm	-7,638	6,489	P < 0.01	**
CTRL vs AsV 500ppm	-12,55	10,66	P < 0.001	***
CTRL vs AsIII 250ppm	-2,394	2,034	P > 0.05	ns
CTRL vs AsIII 500ppm	1,282	1,089	P > 0.05	ns
CTRL vs AsV/III 250ppm	-9,066	7,702	P < 0.001	***
CTRL vs AsV/III500ppm	-10,53	8,947	P < 0.001	***
AsV 250ppm vs AsV 500ppm	-4,916	4,176	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsIII 250ppm	5,245	4,455	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsIII 500ppm	8,921	7,578	P < 0.001	***
AsV 250ppm vs AsV/III 250ppm	-1,428	1,213	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV/III500ppm	-2,894	2,458	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsIII 250ppm	10,16	8,631	P < 0.001	***
AsV 500ppm vs AsIII 500ppm	13,84	11,75	P < 0.001	***
AsV 500ppm vs AsV/III 250ppm	3,488	2,963	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsV/III500ppm	2,022	1,718	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsIII 500ppm	3,676	3,123	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsV/III 250ppm	-6,672	5,668	P < 0.01	**
AsIII 250ppm vs AsV/III500ppm	-8,138	6,914	P < 0.01	**
AsIII 500ppm vs AsV/III 250ppm	-10,35	8,791	P < 0.001	***
AsIII 500ppm vs AsV/III500ppm	-11,81	10,04	P < 0.001	***
AsV/III 250ppm vs AsV/III500ppm	-1,466	1,246	P > 0.05	ns

“uptake PvIt”
**P/As molar ratio
fronde**

Tabella 16

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs AsV 250ppm	994,5	13,15	P < 0.001	***
CTRL vs AsV 500ppm	994,8	13,15	P < 0.001	***
CTRL vs AsIII 250ppm	994,9	13,15	P < 0.001	***
CTRL vs AsIII 500ppm	994,9	13,15	P < 0.001	***
CTRL vs AsV/III 250ppm	994,8	13,15	P < 0.001	***
CTRL vs AsV/III 500ppm	995,0	13,15	P < 0.001	***
AsV 250ppm vs AsV 500ppm	0,2557	0,003381	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsIII 250ppm	0,3708	0,004902	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsIII 500ppm	0,3818	0,005047	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV/III 250ppm	0,3278	0,004333	P > 0.05	ns

AsV 250ppm vs AsV/III 500ppm	0,4417	0,005840	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsIII 250ppm	0,1150	0,001520	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsIII 500ppm	0,1260	0,001666	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsV/III 250ppm	0,07200	0,0009519	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsV/III 500ppm	0,1860	0,002459	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsIII 500ppm	0,01100	0,0001454	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsV/III 250ppm	-0,04300	0,0005685	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsV/III 500ppm	0,07100	0,0009387	P > 0.05	ns
AsIII 500ppm vs AsV/III 250ppm	-0,05400	0,0007139	P > 0.05	ns
AsIII 500ppm vs AsV/III 500ppm	0,06000	0,0007933	P > 0.05	ns
AsV/III 250ppm vs AsV/III 500ppm	0,1140	0,001507	P > 0.05	ns

“uptake PvIt”
P/As molar ratio
radici

Tabella 17

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs AsV 250ppm	4343	104,5	P < 0.001	***
CTRL vs AsV 500ppm	4355	104,8	P < 0.001	***
CTRL vs AsIII 250ppm	4357	104,8	P < 0.001	***
CTRL vs AsIII 500ppm	4361	104,9	P < 0.001	***
CTRL vs AsV/III 250ppm	4353	104,7	P < 0.001	***
CTRL vs AsV/III 500ppm	4360	104,9	P < 0.001	***
AsV 250ppm vs AsV 500ppm	12,08	0,2905	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsIII 250ppm	13,75	0,3308	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsIII 500ppm	18,66	0,4488	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV/III 250ppm	10,00	0,2406	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV/III 500ppm	17,44	0,4196	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsIII 250ppm	1,674	0,04028	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsIII 500ppm	6,582	0,1583	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsV/III 250ppm	-2,074	0,04989	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsV/III 500ppm	5,365	0,1291	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsIII 500ppm	4,908	0,1181	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsV/III 250ppm	-3,748	0,09016	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsV/III 500ppm	3,691	0,08878	P > 0.05	ns
AsIII 500ppm vs AsV/III 250ppm	-8,655	0,2082	P > 0.05	ns
AsIII 500ppm vs AsV/III 500ppm	-1,217	0,02927	P > 0.05	ns
AsV/III 250ppm vs AsV/III 500ppm	7,439	0,1789	P > 0.05	ns

“uptake PvIt”

BP - *Bioaccumulation preference* -
fronde

Tabella 18

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs AsV 250ppm	-0,5360	20,02	P < 0.001	***
CTRL vs AsV 500ppm	-0,3438	12,84	P < 0.001	***
CTRL vs AsIII 250ppm	-0,4575	17,09	P < 0.001	***
CTRL vs AsIII 500ppm	-0,1823	6,807	P < 0.01	**
CTRL vs AsV/III 250ppm	-0,5903	22,05	P < 0.001	***
CTRL vs AsV/III 500ppm	-0,3260	12,18	P < 0.001	***
AsV 250ppm vs AsV 500ppm	0,1923	7,180	P < 0.001	***
AsV 250ppm vs AsIII 250ppm	0,07850	2,932	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsIII 500ppm	0,3538	13,21	P < 0.001	***
AsV 250ppm vs AsV/III 250ppm	-0,05425	2,026	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV/III 500ppm	0,2100	7,843	P < 0.001	***
AsV 500ppm vs AsIII 250ppm	-0,1138	4,248	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsIII 500ppm	0,1615	6,032	P < 0.01	**
AsV 500ppm vs AsV/III 250ppm	-0,2465	9,207	P < 0.001	***
AsV 500ppm vs AsV/III 500ppm	0,01775	0,6629	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsIII 500ppm	0,2753	10,28	P < 0.001	***
AsIII 250ppm vs AsV/III 250ppm	-0,1328	4,958	P < 0.05	*
AsIII 250ppm vs AsV/III 500ppm	0,1315	4,911	P < 0.05	*
AsIII 500ppm vs AsV/III 250ppm	-0,4080	15,24	P < 0.001	***
AsIII 500ppm vs AsV/III 500ppm	-0,1438	5,369	P < 0.05	*
AsV/III 250ppm vs AsV/III 500ppm	0,2643	9,869	P < 0.001	***

“uptake PvIt”

BP - *Bioaccumulation preference* -
radici

Tabella 19

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs AsV 250ppm	-0,0180	2,799	P > 0.05	ns
CTRL vs AsV 500ppm	-0,0220	3,421	P > 0.05	ns
CTRL vs AsIII 250ppm	-0,0320	4,975	P < 0.05	*
CTRL vs AsIII 500ppm	-0,01825	2,838	P > 0.05	ns
CTRL vs AsV/III 250ppm	-0,0245	3,809	P > 0.05	ns
CTRL vs AsV/III 500ppm	-0,02375	3,693	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV 500ppm	-0,004000	0,6219	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsIII 250ppm	-0,0140	2,177	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsIII 500ppm	-0,0002500	0,03887	P > 0.05	ns

AsV 250ppm vs AsV/III 250ppm	-0,006500	1,011	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV/III 500ppm	-0,00575	0,8940	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsIII 250ppm	-0,0100	1,555	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsIII 500ppm	0,00375	0,5831	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsV/III 250ppm	-0,002500	0,3887	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsV/III 500ppm	-0,00175	0,2721	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsIII 500ppm	0,01375	2,138	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsV/III 250ppm	0,0075	1,166	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsV/III 500ppm	0,008250	1,283	P > 0.05	ns
AsIII 500ppm vs AsV/III 250ppm	-0,006250	0,9718	P > 0.05	ns
AsIII 500ppm vs AsV/III 500ppm	-0,0055	0,8551	P > 0.05	ns
AsV/III 250ppm vs AsV/III 500ppm	0,0007500	0,1166	P > 0.05	ns

Prova “*uptake* PvCh”

“*uptake* PvCh”

BF - *Bioconcentration factor* - fronde

Tabella 20

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs AsV 250ppm	7,303	0,5529	P > 0.05	ns
CTRL vs AsV 500ppm	50,94	3,856	P > 0.05	ns
CTRL vs AsIII 250ppm	51,29	3,882	P > 0.05	ns
CTRL vs AsIII 500ppm	66,83	5,059	P < 0.05	*
CTRL vs AsV/III 250ppm	22,52	1,704	P > 0.05	ns
CTRL vs AsV/III500ppm	56,03	4,241	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV 500ppm	43,63	3,303	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsIII 250ppm	43,98	3,330	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsIII 500ppm	59,53	4,506	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV/III 250ppm	15,21	1,152	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV/III500ppm	48,72	3,688	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsIII 250ppm	0,3493	0,02644	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsIII 500ppm	15,90	1,203	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsV/III 250ppm	-28,42	2,152	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsV/III500ppm	5,089	0,3852	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsIII 500ppm	15,55	1,177	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsV/III 250ppm	-28,77	2,178	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsV/III500ppm	4,739	0,3588	P > 0.05	ns
AsIII 500ppm vs AsV/III 250ppm	-44,32	3,355	P > 0.05	ns
AsIII 500ppm vs AsV/III500ppm	-10,81	0,8181	P > 0.05	ns
AsV/III 250ppm vs AsV/III500ppm	33,51	2,537	P > 0.05	ns

“uptake PvIt”
**BF - Bioconcentration factor -
radici**

Tabella 21

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs AsV 250ppm	-2,980	3,398	P > 0.05	ns
CTRL vs AsV 500ppm	-1,202	1,370	P > 0.05	ns
CTRL vs AsIII 250ppm	-1,836	2,093	P > 0.05	ns
CTRL vs AsIII 500ppm	0,3843	0,4381	P > 0.05	ns
CTRL vs AsV/III 250ppm	-3,473	3,960	P > 0.05	ns
CTRL vs AsV/III 500ppm	-1,519	1,732	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV 500ppm	1,779	2,028	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsIII 250ppm	1,145	1,305	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsIII 500ppm	3,365	3,836	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV/III 250ppm	-0,4928	0,5618	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV/III 500ppm	1,462	1,666	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsIII 250ppm	-0,6337	0,7226	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsIII 500ppm	1,586	1,808	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsV/III 250ppm	-2,271	2,590	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsV/III 500ppm	-0,3170	0,3614	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsIII 500ppm	2,220	2,531	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsV/III 250ppm	-1,638	1,867	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsV/III 500ppm	0,3167	0,3612	P > 0.05	ns
AsIII 500ppm vs AsV/III 250ppm	-3,857	4,398	P > 0.05	ns
AsIII 500ppm vs AsV/III 500ppm	-1,903	2,170	P > 0.05	ns
AsV/III 250ppm vs AsV/III 500ppm	1,954	2,228	P > 0.05	ns

“uptake PvIt”
**P/As molar ratio
fronde**

Tabella 22

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs AsV 250ppm	240,6	16,14	P < 0.001	***
CTRL vs AsV 500ppm	240,7	16,15	P < 0.001	***
CTRL vs AsIII 250ppm	240,7	16,15	P < 0.001	***
CTRL vs AsIII 500ppm	240,8	16,16	P < 0.001	***
CTRL vs AsV/III 250ppm	240,8	16,15	P < 0.001	***
CTRL vs AsV/III 500ppm	240,6	16,14	P < 0.001	***
AsV 250ppm vs AsV 500ppm	0,1113	0,007464	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsIII 250ppm	0,08050	0,005401	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsIII 500ppm	0,1973	0,01323	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV/III 250ppm	0,1543	0,01035	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV/III 500ppm	0,007250	0,0004864	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsIII 250ppm	-0,03075	0,002063	P > 0.05	ns

AsV 500ppm vs AsIII 500ppm	0,08600	0,005770	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsV/III 250ppm	0,04300	0,002885	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsV/III 500ppm	-0,1040	0,006978	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsIII 500ppm	0,1168	0,007833	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsV/III 250ppm	0,07375	0,004948	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsV/III 500ppm	-0,07325	0,004915	P > 0.05	ns
AsIII 500ppm vs AsV/III 250ppm	-0,04300	0,002885	P > 0.05	ns
AsIII 500ppm vs AsV/III 500ppm	-0,1900	0,01275	P > 0.05	ns
AsV/III 250ppm vs AsV/III 500ppm	-0,1470	0,009863	P > 0.05	ns

“uptake PvIt”
P/As molar ratio
radici

Tabella 23

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs AsV 250ppm	838,8	2,551	P > 0.05	ns
CTRL vs AsV 500ppm	838,9	2,552	P > 0.05	ns
CTRL vs AsIII 250ppm	856,9	2,606	P > 0.05	ns
CTRL vs AsIII 500ppm	860,2	2,616	P > 0.05	ns
CTRL vs AsV/III 250ppm	848,7	2,582	P > 0.05	ns
CTRL vs AsV/III 500ppm	853,1	2,595	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV 500ppm	0,1023	0,0003110	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsIII 250ppm	18,07	0,05495	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsIII 500ppm	21,37	0,06499	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV/III 250ppm	9,896	0,03010	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV/III 500ppm	14,29	0,04347	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsIII 250ppm	17,96	0,05464	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsIII 500ppm	21,27	0,06468	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsV/III 250ppm	9,793	0,02979	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsV/III 500ppm	14,19	0,04316	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsIII 500ppm	3,301	0,01004	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsV/III 250ppm	-8,171	0,02485	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsV/III 500ppm	-3,777	0,01149	P > 0.05	ns
AsIII 500ppm vs AsV/III 250ppm	-11,47	0,03489	P > 0.05	ns
AsIII 500ppm vs AsV/III 500ppm	-7,077	0,02153	P > 0.05	ns
AsV/III 250ppm vs AsV/III 500ppm	4,395	0,01337	P > 0.05	ns

“uptake PvIt”

BP - *Bioaccumulation preference* -
fronde

Tabella 24

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs AsV 250ppm	0,04875	1,105	P > 0.05	ns
CTRL vs AsV 500ppm	0,2173	4,925	P < 0.05	*
CTRL vs AsIII 250ppm	0,2053	4,653	P < 0.05	*
CTRL vs AsIII 500ppm	0,3040	6,892	P < 0.01	**
CTRL vs AsV/III 250ppm	0,1230	2,789	P > 0.05	ns
CTRL vs AsV/III 500ppm	0,2648	6,002	P < 0.01	**
AsV 250ppm vs AsV 500ppm	0,1685	3,820	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsIII 250ppm	0,1565	3,548	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsIII 500ppm	0,2553	5,787	P < 0.01	**
AsV 250ppm vs AsV/III 250ppm	0,07425	1,683	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV/III 500ppm	0,2160	4,897	P < 0.05	*
AsV 500ppm vs AsIII 250ppm	-0,01200	0,2721	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsIII 500ppm	0,08675	1,967	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsV/III 250ppm	-0,09425	2,137	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsV/III 500ppm	0,0475	1,077	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsIII 500ppm	0,09875	2,239	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsV/III 250ppm	-0,08225	1,865	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsV/III 500ppm	0,05950	1,349	P > 0.05	ns
AsIII 500ppm vs AsV/III 250ppm	-0,1810	4,104	P > 0.05	ns
AsIII 500ppm vs AsV/III 500ppm	-0,03925	0,8899	P > 0.05	ns
AsV/III 250ppm vs AsV/III 500ppm	0,1418	3,214	P > 0.05	ns

“uptake PvIt”

BP - *Bioaccumulation preference* -
radici

Tabella 25

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
CTRL vs AsV 250ppm	-0,01725	3,612	P > 0.05	ns
CTRL vs AsV 500ppm	-0,0050	1,047	P > 0.05	ns
CTRL vs AsIII 250ppm	-0,02125	4,449	P > 0.05	ns
CTRL vs AsIII 500ppm	-0,009750	2,041	P > 0.05	ns
CTRL vs AsV/III 250ppm	-0,02075	4,344	P > 0.05	ns
CTRL vs AsV/III 500ppm	-0,009500	1,989	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV 500ppm	0,01225	2,565	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsIII 250ppm	-0,004000	0,8375	P > 0.05	ns

AsV 250ppm vs AsIII 500ppm	0,007500	1,570	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV/III 250ppm	-0,003500	0,7328	P > 0.05	ns
AsV 250ppm vs AsV/III 500ppm	0,007750	1,623	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsIII 250ppm	-0,01625	3,402	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsIII 500ppm	-0,00475	0,9945	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsV/III 250ppm	-0,01575	3,298	P > 0.05	ns
AsV 500ppm vs AsV/III 500ppm	-0,004500	0,9422	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsIII 500ppm	0,0115	2,408	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsV/III 250ppm	0,0005000	0,1047	P > 0.05	ns
AsIII 250ppm vs AsV/III 500ppm	0,01175	2,460	P > 0.05	ns
AsIII 500ppm vs AsV/III 250ppm	-0,0110	2,303	P > 0.05	ns
AsIII 500ppm vs AsV/III 500ppm	0,0002500	0,05234	P > 0.05	ns
AsV/III 250ppm vs AsV/III 500ppm	0,01125	2,355	P > 0.05	ns

Prova “Terreni contaminati”

“terreni”
BF 60gg

PvIt

Tabella 26

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
T.n.C. vs Ceneri	-145,3	3,216	P > 0.05	ns
T.n.C. vs Sabbia	-217,5	4,813	P < 0.05	*
Ceneri vs Sabbia	-72,20	1,598	P > 0.05	ns

PvCh

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
T.n.C. vs Ceneri	-138,6	4,228	P < 0.05	*
T.n.C. vs Sabbia	-212,8	6,490	P < 0.01	**
Ceneri vs Sabbia	-74,14	2,261	P > 0.05	ns

“terreni”
BF 190gg

PvIt

Tabella 27

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
T.n.C. vs Ceneri	-598,1	9,19	P < 0.001	***
T.n.C. vs Sabbia	-576,6	8,86	P < 0.001	***
Ceneri vs Sabbia	21,46	0,33	P > 0.05	ns

PvCh

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
T.n.C. vs Ceneri	-526,6	5,97	P < 0.01	**
T.n.C. vs Sabbia	-687,3	7,80	P < 0.001	***
Ceneri vs Sabbia	-160,7	1,82	P > 0.05	ns

“terreni”
P/As 60gg

PvIt

Tabella 28

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
T.n.C. vs Ceneri	324,0	18,14	P < 0.001	***
T.n.C. vs Sabbia	323,6	18,12	P < 0.001	***
Ceneri vs Sabbia	-0,3450	0,01932	P > 0.05	ns

PvCh

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
T.n.C. vs Ceneri	386,2	12,09	P < 0.001	***
T.n.C. vs Sabbia	385,8	12,08	P < 0.001	***
Ceneri vs Sabbia	-0,4072	0,01275	P > 0.05	ns

“terreni”
P/As 190gg

PvIt

Tabella 29

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
T.n.C. vs Ceneri	285,1	13,18	P < 0.001	***
T.n.C. vs Sabbia	284,6	13,16	P < 0.001	***
Ceneri vs Sabbia	-0,5270	0,02437	P > 0.05	ns

PvCh

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
T.n.C. vs Ceneri	362,2	10,79	P < 0.001	***
T.n.C. vs Sabbia	361,7	10,77	P < 0.001	***
Ceneri vs Sabbia	-0,4850	0,01445	P > 0.05	ns

“terreni”
BP 60gg

PvIt

Tabella 30

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
T.n.C. vs Ceneri	1,695	16,51	P < 0.001	***
T.n.C. vs Sabbia	1,621	15,78	P < 0.001	***
Ceneri vs Sabbia	-0,07475	0,7279	P > 0.05	ns

PvCh

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
T.n.C. vs Ceneri	1,455	9,718	P < 0.001	***
T.n.C. vs Sabbia	1,372	9,167	P < 0.001	***
Ceneri vs Sabbia	-0,0825	0,5511	P > 0.05	ns

“terreni”
BP 190gg

PvIt

Tabella 31

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
T.n.C. vs Ceneri	1,816	8,807	P < 0.001	***
T.n.C. vs Sabbia	1,773	8,602	P < 0.001	***
Ceneri vs Sabbia	-0,04225	0,2049	P > 0.05	ns

PvCh

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	
T.n.C. vs Ceneri	1,329	10,40	P < 0.001	***
T.n.C. vs Sabbia	1,288	10,07	P < 0.001	***
Ceneri vs Sabbia	-0,04175	0,3267	P > 0.05	ns

Bibliografia

- Abedin M.J., Feldmann J. and Meharg A.A. (2002) – Uptake kinetics of arsenic species in rice plants – *Plant Physiology* **128**: 1120-1128
- Alkorta I., Hernández-Allica J. and Garbisu C. (2004) – Plants against the global epidemic of arsenic poisoning – *Environmental International* **30**: 949-951
- Alloway B.J. and Jackson A.P. (1991) - The behaviour of heavy metals in sewagesludge amended soils – *The Science of the Total Environment* **100**: 151-176
- Alpi A., Pupillo P., Rigano C. (2000) – Le sostanze nutritive delle piante - In: “Fisiologia delle piante” – EdiSES S.r.l. p. 147-180
- Arru L., Rognoni S., Barboncini M. and Perata P. (2004) – Impiego di sistemi vegetali per il recupero di terreni inquinati da metalli pesanti – *Agroindustria* **3**: 215-222
- Assunção A.G.L., Costa Martins P.D.A., De Folter S., Vooijs R., Schat H., Aarts M.G.M. (2001) - Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell and Environment* **24**: 217-226
- Bennett L.E., Burkhead J.L., Hale K.L., Terry N., Pilon-Smits E.A.H. (2003) – Analysis of transgenic Indian mustard plants for phytoremediation of metal-contaminated mine tailings – *Journal of Environmental Quality* **32**: 432-440
- Blaylock M.J., Salt D.E., Dushenkov S., Zakharova O., Gussman C., Kapulnik Y., Ensley B.D. and Raskin I. (1997) - Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents - *Environmental Science & Technology* **31**: 860-865
- Bondada B.R. and Ma L.Q. (2003) – Tolerance of heavy metals in vascular plants: arsenic hyperaccumulation by chinese, brake fern (*Pteris vittata* L.) – In: S. Chandra & M. Srivastava (eds.) “Pteridology in The New Millennium” Kluwer Academic Publishers Chap.28 p. 397-420
- Boyd R.S. (2004) – Ecology of metal hyperaccumulation – *New Phytol.* **162**: 563- 567
- Boyd R.S. and Jaffré T. (2001) – Phytoenrichment of soil Ni content by *Sebertia acuminata* in New Caledonia and the concept of elemental allelopathy – *South African Journal of Science* **97**: 535-538
- Boyd R.S. and Martens S.N. (1998) – The significance of metal hyperaccumulation for biotic interaction – *Chemoecology* **8**: 1-7

-
- Buchanan B.B., Gruijssem W. and Jones R.J. (2003) – Fisiologia molecolare dell'acquisizione, trasporto e utilizzazione dei nutrienti minerali – In: “Biochimica e biologia molecolare delle piante” Zanichelli editore S.p.A. p. 1113-1153
- Burken J.G. and Schnoor J.L. (1997) – Uptake and metabolism of atrazine by poplar trees - *Environmental Science & Technology* **31**: 1399-1406
- Cai Y., Su J. and Ma L.Q. (2004) – Low molecular weight thiols in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* upon exposure to arsenic and other trace elements – *Environmental Pollution* **129**: 69-78
- Caille N., Swanwick S., Zhao F.J. and McGrath S.P. (2004) – Arsenic hyperaccumulation by *Pteris vittata* from arsenic contaminated soils and the effect of liming and phosphate fertilization – *Environmental Pollution* **132**: 113-120
- Caille N., Zhao F.J. and McGrath S.P. (2005) – Comparison of root absorption, translocation and tolerance of arsenic in the hyperaccumulator *Pteris vittata* and the nonhyperaccumulator *Pteris tremula* – *New Phytologist* **165**: 755-761
- Calvo C., Bolado S., Alvarez-Benedí J. and Andrade M. A. (2006) - Arsenic uptake and accumulation in curly endives (*Cichorium endivia* L.) irrigated with contaminated water - *Journal of Environmental Science and Health Part B*, **41**: 459–470
- Carbonell-Barrachina A.A., Burló F., Valero D., López E., Martínez-Romero D. and Martínez-Sánchez F. (1999) – Arsenic toxicity and accumulation in turnip as affected by arsenic chemical speciation – *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 2288-2294
- Chou C.-H.S.J. and De Rosa C.T. (2003) – Case studies: Arsenic – *Internal Journal of Hygiene and Environmental Health* **206**: 381-386
- Cobbett C. (2003) – Heavy metals and plants model systems and hyperaccumulators- *New Phytologist* **159**: 289-293
- Cobbett C.S. (2000) – Phytochelatins and their roles in heavy metals detoxification – *Plant Physiology* **123**: 825-832
- Cronquist A. (1979) – Divisione Polypodiophyta: felci – In: “Botanica” Zanichelli Editore S.p.A. p. 290-312
- Cunningham S.D. and Ow D.W. (1996) – Promises and prospects of phytoremediation – *Plant Physiology* **110**: 715-719
- Cunningham S.D., Berti W.R. and Huang J.W. (1995) – Phytoremediation of contaminated soils – *Trends in Biotechnology* **13**: 393-397
- De Agostini (1972) – La Grande Enciclopedia – Istituto Geografico De Agostini S.p.A. Novara

-
- De Souza M.P., Pickering I.J., Walla M., and Terry N. (2002) - Selenium Assimilation and Volatilization from Selenocyanate-Treated Indian Mustard and Muskgrass - *Plant Physiology* **128**: 625-633
- Dong R., Formentin E., Losseso C., Carimi F., Benedetti P., Terzi M. and Lo Schiavo F. (2005) - Molecular cloning and characterization of a phytochelatin synthase gene, *PvPCS1*, from *Pteris vittata* L. - *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **32**: 527-533
- Duker A.A, Carranza E.J.M. and Hale M. (2005) – Arsenic geochemistry and health – *Environmental international* **31**: 631-641
- Dushenkov S. (2003) – Trends in phytoremediation of radionuclides – *Plant and Soil* **249**:167-175
- Dushenkov V., Kumar P.B.A.N., Motto H. and Raskin I. (1995) – Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams – *Environmental Science & Technology* **29**: 1239-1245
- European Environment Agency (2003) - L'ambiente in Europa: seconda valutazione - Cap. 11 (Degradato del suolo)
- European Environment Agency (2005). The European environment - State and outlook 2005
- Evans G.M. and Furlong J.C. (2003) – Contaminated land and bioremediation – In: “Environmental Biotechnology: theory and application” John Wiley & Sons Ltd. p. 89-111
- Fayiga A.O. and Ma L.Q. (2005) – Arsenic uptake by two hyperaccumulator ferns from four arsenic contaminated soils – *Water, Air, and Soil Pollution* **168**: 71-89
- Fayiga A.O., Ma L.Q., Cao X. and Rathinasabapathi B. (2004) – Effects of heavy metals on growth and arsenic accumulation in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. – *Environmental Pollution* **132**: 289-296
- Fitz W.J. and Wenzel W.W. (2002) – Arsenic transformations in the soil-rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation – *Journal of Biotechnology* **99**: 259-278
- Francesconi K., Visoottiviset P., Sridokchan W. and Goessler W. – Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: a potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils – *The Science of the Total Environment* **284**: 27-35
- Gerola F.M. (1997) – Generalità sulle Pteridofite – In: “Biologia vegetale. Sistematica filogenetica – UTET Torino p. 419-434

-
- Ghosh M. and Singh S.P. (2005) – A review on Phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts – *Applied Ecology and Environmental Research* **3**: 1-18
- Greman H. (2005) – Phytoextraction of heavy metals from contaminated soils: expectations and limitations – *Geophysical Research Abstracts* **7**: 11-13
- Gulz P.A., Gupta S.K. and Schulin R. (2005) – Arsenic accumulation of common plants from contaminated soils – *Plant and Soil* **272**: 337-347
- Gumaelius L., Lahner B., Salt D.E. and Banks J.N. (2004) – Arsenic hyperaccumulation in gametophytes of *Pteris vittata*. A new model system for analysis of arsenic hyperaccumulation – *Plant Physiology* **136**: 3198-3280
- Hale K.L., McGrath S.P., Lombi E., Stack S.M., Terry N., Pickering I.J., George G.N. and Pilon-Smits E.A.H. (2001) - Molybdenum sequestration in *Brassica* species. A role for anthocyanins? – *Plant Physiology* **126**: 1391-1402
- Hall J.L. (2002) – Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance - *Journal of Experimental Botany* **53**: 1-11
- Hall J.L. and Williams L.E. (2003) - Transition metal transporters in plants - *Journal of Experimental Botany* **54**: 2601-2613
- Hartley-Whitaker J., Ainsworth G., Vooijs R., Bookum W.T., Schat H. and Meharg A.A. (2001) - Phytochelatins Are Involved in Differential Arsenate Tolerance in *Holcus lanatus* - *Plant Physiology* **126**: 299–306
- Hossain M.F. (2006)- Arsenic contamination in Bangladesh: an overview – *Agriculture, Ecosystems and Environment* **113**: 1-16
- Huang J.W., Chen J.J., Berti W.R. and Cunningham S.D. (1997) – Phytoremediation of lead-contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoextraction - *Environmental Science & Technology* **31**: 800-805
- Hughes M.F. (2002) – Arsenic toxicity and potential mechanisms of action – *Toxicology Letters* **133**: 1-16
- Jhee M.E., Boyd R.S. and Eubanks M.D. (2005) – Nickel hyperaccumulation as an elemental defence of *Streptanthus polygaloides* (Brassicaceae): influence of herbivore feeding mode – *New Phytologist* **168** :331-344
- Jiang R.F., Ma D.Y., Zhao F.J. and McGrath S.P. (2005) – Cadmium hyperaccumulation protects *Thlaspi caerulescens* from leaf feeding damage by thrips (*Frankliniella occidentalis*) – *New Phytologist* **167**: 805-814
- Jones D.L. (1987) – The structure of ferns – In: “Encyclopaedia of ferns: an introduction to ferns, their structure, biology, economic importance, cultivation and propagation” Timber Press, Inc. Portland, Oregon. Chap. 3 p. 21-38

-
- Juhasz A.L., Naidu R., Zhu Y.G., Wang L.S., Jiang J.Y., Cao Z.H. (2003) – Toxicity issues associated with geogenic arsenic in the groundwater-soil-plant-human continuum – *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **71**: 1100-1107
- Kerkeb L. and Krämer U. (2003) - The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Abyssum lesbiacum* and *Brassica juncea* - *Plant Physiology* **131**: 716-724
- Kertulis G.M., Ma L.Q., MacDonald G.E., Chen R., Winefordner J.D. and Cai Y. (2005) – Arsenic speciation and transport in *Pteris vittata* L. and the effects on phosphorus in the xylem sap – *Environmental and Experimental Botany* **54**: 239-247
- Khan G.A. (2005) - Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation – *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **18**: 335-364
- Kramer U. (2005) – Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils – *Current Opinion in Biotechnology* **16**: 133-141
- Kumar P.B.A.N., Dushenkov V., Motto H. and Raskin I. (1995) – Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils – *Environmental Science & Technology* **29**: 1232-1238
- Lasat M.M. (2002) - Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms – *Journal of Environmental Quality* **31**: 109-20
- Lasat M.M., Baker A.J.M., and Kochian L.V. (1996) – Physiological characterization of root Zn²⁺ absorption and translocation to shoots in Zn hyperaccumulator and non-accumulator species of *Thlaspi* - *Plant Physiology* **112**: 1715-722
- Lee M., Lee K., Lee J., Noh E.W., and Lee Y. (2005) - AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis* - *Plant Physiology* **138**: 827-836
- Liu X., Zhang S., Shan X. and Zhu Y.G. (2005) – Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amyolytic activity of wheat – *Chemosphere* **61**: 239-301
- Lombi E., Zhao F.J., Fuhrmann M., Ma L.Q. and McGrath S.P. (2002) – Arsenic distribution and speciation in the fronds of the hyperaccumulator *Pteris vittata* – *New Phytologist* **156**: 195-203
- Luongo T. and Ma L.Q. (2005) – Characteristics of arsenic accumulation by *Pteris* and non-*Pteris* ferns – *Plant and Soil* **277**: 117-126
- Ma L.Q., Komar K.M., Tu C., Zhang W.H., Cai Y. and Kennelley E.D. (2001) – A fern that hyperaccumulates arsenic. A hardy, versatile, fast -growing plant helps to remove arsenic from contaminated soils – *Nature* **409**: 579-579

-
- Macek T., Pavlikova D. and Mackova M. (2004) – Phytoremediation of metals and inorganic pollutants - In: Singh A. and Ward O.P. (Eds) “Applied Bioremediation and Phytoremediation”. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Vol. 1 p. 135-149
- Maitani T., Kubota H., Sato K. and Yamada T. (1996) - The composition of metals bound to class 111 metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum* - *Plant Physiology* **110**: 1145-1150
- Mancuso S., Pandolfi C., Azzarello E. and Mugnai S. (?2004?) – La fitorimediazione: aspetti generali – In: Mancuso S. “ Fitorimediazione, bonificare con le piante” quaderno informativo n.1 progetto FITOMED p. 3-12
- Mandal B.K. and Suzuki K.T. (2002) – Arsenic round the world: a review – *Talanta* **58**: 201-235
- Mäser P., Thomine S., Schroeder J.I., Ward J.M., Hirschi K., Sze H., Talke I.N., Amtmann A., Maathuis F.J.M., Sanders D., Harper J.F., Tchieu J., Gribskov M., Persans M.W., Salt D.E., Kim S. A, and Guerinot M.L. (2001) - Phylogenetic Relationships within Cation Transporter Families of *Arabidopsis* - *Plant Physiology* **126**: 1646-1667
- Matshullat J. (2000) – Arsenic in the geosphere: a review – *The Science of the Total Environment* **249**: 297-312
- McGrath S.P. and Zhao F.J. (2003) – Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils – *Current Opinion in Biotechnology* **14**: 277-282
- Meagher R.B., Heaton A.C.P. (2005) - Strategies for the engineered phytoremediation of toxic element pollution: mercury and arsenic – *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **32**: 502-513
- Meharg A.A and Jardine L. (2003) – Arsenite transport into paddy rice (*Oryza sativa*) roots - *New Phytologist* **157**: 39-44
- Meharg A.A. (2002) – Arsenic and old plants – *New Phytologist* **156**: 1-8
- Meharg A.A. (2003)- Variation in arsenic accumulation: hyperaccumulation in ferns and their allies. *New Phytologist* **157**: 25-31
- Meharg A.A. and Hartley-Whitaker J. (2002) – Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and non-resistant plant species – *New Phytologist* **154**: 29-43
- Meharg A.A. and Macnair M.R. (1992) – Suppression of the high-affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. – *Journal of Experimental Botany* **43**: 519-524

-
- Mench M.J., Didier V.L., Loffler M., Gomez A. and Masson P. (1994) - *Journal of Environmental Quality* - **23**: 785-792
- Mengoni A., Baker A.J.M., Bazzicalupo M., Reeves R.D., Adigüzel N., Chianni E., Galardi F., Gabbrielli R. and Gonnelli C. (2003) – Evolutionary dynamics of nickel hyperaccumulation in *Abyssum* revealed by ITS nrDNA analysis – *New Phytologist* **159**: 691-699
- Mickel J.T. (2003) – Hardy Ferns for American gardens – In: “Ferns for American gardens” Timber Press, Inc. Portland, Oregon. Chap. 4 p. 77-322
- Mihucz V.G., Tatár E., Virág I., Cseh E., Fodor F. and Záráy G. (2005) – Arsenic speciation in xylem sap of cucumber (*Cucumis sativus* L.) - *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **383**: 461-466
- Minorsky P.V. (2003) – The hot and the classic – *Plant Physiology* **133**: 14-15
- Nardella A. (2003)a – Le tecnologie di bonifica non biologiche – In: EniTecnologie & Eni Corporate University (Eds.) “ La bonifica biologica di siti inquinati da idrocarburi”. Ulrico Hoepli Milano p. 43-69
- Nardella A. (2003)b – La *phytoremediation* – In: EniTecnologie & Eni Corporate University (eds.) “ La bonifica biologica di siti inquinati da idrocarburi”. Ulrico Hoepli Milano p. 87-96
- Newman L.A., Strand S.E., Choe N., Duffy J., Ekuan G., Ruszaj M., Shurtleff B.B., Wilmoth J., Heilman P., and Gordon M.P. (1997) - Uptake and Biotransformation of Trichloroethylene by Hybrid Poplars - *Environmental Science & Technology* **31**: 1062-1067
- Pence N.S., Larsen P.B., Ebbs S.D., Letham D.L.D., Lasat M.M., Garvin D.F., Eide D., and Kochian L.V. (2000) - The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* – *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 4956-4960
- Pickering I.J., Gumaelius L., Harris H.H., Prince R.C., Hirsch G., Banks J.A., Salt D.E. and George G.N. (2006) - Localizing the biochemical transformations of arsenate in a hyperaccumulating fern- *Environmental Science & Technology* **40**: 5010-5014
- Pignatti S. (1982) – Flora d’Italia – Edagricole vol. 1 p. 51
- Pilon-Smits E. (2005) – Phytoremediation – *Annual Review of Plant Biology* **56**: 15-39
- Porter E.K. and Peterson P.J. (1977) – Arsenic tolerance in grasses growing on mine waste – *Environmental Pollution* **14**: 255-265

-
- Poynton C.Y., Huang J.W., Blaylock M.J., Kochian L.V. and Elless M.P. (2004) – Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris* species: root As influx and translocation – *Planta* **219**: 1080-1088
- Prasad M.N.V. and Freitas H.M.O (2003). - Metal hyperaccumulation in plants: Biodiversity prospecting for phytoremediation technology – *Electronical Journal of Biotechnology* **6**: 285-321
- Raab A., Feldmann J. and Meharg A.A. (2004) – The nature of arsenic-phytochelatin complexes in *Holcus lanatus* and *Pteris cretica* – *Plant Physiology* **134**: 1113-1122
- Raskin I., Kumar P.B.A.N., Dushenkov S., and Salt D.E. (1994) - Bioconcentration of heavy metals by plants – *Current Opinion in Biotechnology* **15**: 285-290
- Raskin I., Smith R.D. and Salt D.E. (1997) – Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment – *Current Opinion in Biotechnology* **8**: 221-226
- Rosen B.P. (2002) – Biochemistry of arsenic detoxification – *FEBS Letters* **529**: 86-92
- Ruiz O.N., Hussein H.S., Terry N., and Daniell H. (2003) - Phytoremediation of Organomercurial Compounds via Chloroplast Genetic Engineering - *Plant Physiology* **132**: 1344-1352
- Saleh S., Huang X.D., Greenberg B.M. and Glick B. (2004) – Phytoremediation of persistent organic contaminants in the environment – In: Singh A. and Ward O.P. (Eds.) “Applied Bioremediation and Phytoremediation”. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Vol. 1 p. 115-123
- Salt D.E., Pickering I.J., Prince R.C., Gleba D., Dushenkov S., Smith R.D. and Raskin I. (1997) – Metal Accumulation by Acquacultured Seedlings of Indian Mustard – *Environmental Science & Technology* **31**: 1636-1644
- Salt D.E., Smith R.D. and Raskin I. (1998) - Phytoremediation – *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 643-668
- Schat H., Llugany M., Vooijs R., Hartley-Whitaker J. and Bleeker P.M. (2002) – The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes - *Journal of Experimental Botany* **53**: 2381-2392
- Schat H., Llugany M., Vooijs R., Hartley-Whitaker J. and Bleeker P.M. (2002) - The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and nonhyperaccumulator metallophytes - *Journal of Experimental Botany* **53**: 2381-2392
- Schmöger M.E.V., Oven M. and Grill E. (2000) – Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants – *Plant Physiology* **122**: 793-801

-
- Schützendübel A. and Polle A. (2002) – Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization – *Journal of Experimental Botany* **53**: 1351-1365
- Shen Z.G., Li X.D., Wang C.c., Chen H.M. and Chua H. (2002) – Lead phytoextraction from contaminated soil with hig-biomass plant species – *Journal of Environmental Quality* **31**: 1893-1900
- Stoeva N., Berova M. and Zlatev Z. (2003/04) – Physiological response of maize to arsenic contamination – *Biologia Plantarum* **47**: 449-452
- Stoeva N., Berova M. and Zlatev Z. (2005) – Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plants – *Biologia Plantarum* **49**: 293-296
- Thomine S., Wang R., Ward J.M., Crawford N.M. and Schroeder J.I. (2000) - Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes - *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 4991-4996
- Tu C. and Ma L.Q. (2002) – Effects of arsenic concentrations and forms on arsenic uptake by the hyperaccumulator ladder brake - *Journal of Environmental Quality* **31**: 641-647
- Tu C. and Ma L.Q. (2003) – Effects of arsenate and phosphate on their accumulation by an arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. – *Plant and Soil* **249**: 373-382
- Tu C. and Ma L.Q. (2005) - Effects of As hyperaccumulation on nutrient content and distribution in fronds of the hyperaccumulator Chinese brake - *Environmental Pollution* **135**: 333–340
- Tu C., Ma L.Q. and Bondada B. (2002) – Arsenic accumulation in the hyperaccumulator Chinese Brake and its utilization potential for phytoremediation – *Journal of Environmental Quality* **31**: 1671-1675
- Tu S., Ma L. and Luongo T. (2004) – Root exudates and arsenic accumulation in arsenic hyperaccumulating *Pteris vittata* and non-hyperaccumulating *Nephrolepis exaltata* – *Plant and Soil* **258**: 9-19
- Turpeinen R., Panssar-Kallio M., Kairesalo T. (2002) - Role of microbes in controlling the speciation of arsenic and production of arsines in contaminated soils – *The Science of the Total Environment* **285**: 133-145
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) Report (2000) - Introduction to Phytoremediation – EPA 600/R-99/107
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) Report (2002) – Arsenic treatment technologies for soil, waste and water – EPA 542-R-02-004

-
- Van Aken B., Yoon J.M. and Schnoor J.L. (2004) - Biodegradation of Nitro-Substituted Explosives 2,4,6-Trinitrotoluene, Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine, and Octahydro-1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5-Tetrazocine by a Phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. Associated with Poplar Tissues (*Populus deltoides* x *nigra* DN34) - *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 508-517
- Van der Zaal B.J., Neuteboom LW, Pinas J.E., Chardonens A.N., Schat H., Verkleij J.A.C., Hooykaas P.J.J. (1999) - Over expression of a novel Arabidopsis gene related to putative zinc transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation - *Plant Physiology* **119**: 1047-1055
- Vassil A.D., Kapulnik Y., Raskin I, and Salt D.E (1998) - The Role of EDTA in Lead Transport and Accumulation by Indian Mustard - *Plant Physiology* **117**: 447-453
- Wang J., Zhao F.J., Meharg A.A, Raab A., Feldmann J. and McGrath S. (2002) – Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate and arsenic speciation – *Plant Physiology* **130**: 1552-1561
- Wangelin A.L., Burkhead J.L., Hale K.L., Lindblom S.D., Terry N., Pilon M. and Pilon-Smits E.A.H. (2004) – Overexpression of ATP sulfurylase in Indian mustard: effects on tolerance and accumulation of twelve metals – *Journal of Environmental Quality* **33**: 54-60
- Ward O.P. and Singh A. (2004) – Soil bioremediation and phytoremediation: an overview– In: Singh A. and Ward O.P. (Eds.) “Applied Bioremediation and Phytoremediation”. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Vol. 1 pag 1-5
- Whiting S.N., Neumann P.M. and Baker A.J.M. (2003) – Nickel and zinc hyperaccumulation by *Alyssum murale* and *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae) do not enhance survival and whole-plant growth under drought stress – *Plant, Cell and Environment* **26**: 351-360
- Whiting S.N., Reeves R.D. and Baker A.J.M. (2002) - Conserving biodiversity: mining metallophytes and land reclamation - *Mining Environmental Management* **10**: 11-16
- Wong M.H. (2003) - Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils - *Chemosphere* **50**: 775-780
- Yang X.E., Jin X.F., Feng Y. and Islam E. (2005) – Molecular mechanisms and genetic basis of heavy metal tolerance/hyperaccumulation in plants – *Journal of Integrative Plant Biology* **47**: 1025-1035
- Zhang W., Cai Y., Tu C. and Ma L.Q. (2002) – Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant – *The Science of the Total Environment* **300**: 167-177
- Zhao F.J., Dunham S.J. and McGrath S.P. (2002) – Arsenic hyperaccumulation by different fern species – *New Phytologist* **156**: 27-31

Zhao F.J., Wang J.R., Barker J.H.A., Schat H., Bleeker P.M. and McGrath S.P. (2003)
– The role of phytochelatins in arsenic tolerance in the hyperaccumulator *Pteris vittata* – *New Phytologist* **159**: 403-410

Ringraziamenti

Alla fine ce l'ho fatta! Ma forse dovrei dire che ce l'abbiamo fatta, perché il numero delle persone che mi hanno aiutato materialmente e moralmente in questi lunghi anni di studio e di Tesi è davvero lungo.

In particolare però, mi sento di ringraziare i miei genitori per il loro costante ed affettuoso appoggio.

Ringrazio il Chiar.mo Prof. Giovanni Vallini per le conoscenze e l'entusiasmo che mi ha trasmesso, la Dott.ssa Adriana Ciurli per il "quotidiano" sostegno e incoraggiamento durante il periodo di Tesi e la Dott.ssa Susanna Pucci per la cordiale ospitalità e soprattutto per i preziosi suggerimenti.

Un particolare ringraziamento lo vorrei rivolgere al Chiar.mo Prof. Amedeo Alpi che ha permesso con generosa disponibilità lo svolgimento di tutto il lavoro, mettendo a disposizione spazi ed attrezzature.