

SECONDA PARTE

12 PREMESSA

Il D.Lgs. 31/2001, modificato e integrato con successivo D.Lgs. 27/2002, disciplina la qualità delle acque potabili destinate al consumo umano garantendone la salubrità e la pulizia. Il decreto recepisce la Direttiva Europea 98/83/CE, del Dicembre 2003, con la quale il limite previsto per l'arsenico viene abbassato nelle acque potabili da 50 a 10 microgrammi/litro ($\mu\text{g l}^{-1}$), in considerazione della sua cancerogenicità e dell'evidente rischio per la salute umana. Infatti ciò risulta dall'Agenzia Internazionale di Ricerca sul Cancro (I.A.R.C.) che classifica l'arsenico come elemento cancerogeno ponendolo in diretta correlazione con molte patologie oncologiche e in particolare con il tumore del polmone, della vescica, del rene e della cute.

L'Italia ha continuamente fatto ricorso all'istituto della deroga, che ha innalzato il limite previsto dal D. Lgs. 31/2001 da 10 a 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ per l'arsenico rendendo potabili per deroga acque che in realtà non lo sono. A febbraio dell'anno 2010 l'Italia ha richiesto ancora una volta di innalzare i limiti consentiti a 50 $\mu\text{g l}^{-1}$, ma la Commissione Europea il 28 Ottobre 2010 con il documento n. C(2010)7605 ha risposto negativamente alla richiesta di questa ulteriore deroga giudicando estremamente grave e dannoso per salute pubblica qualsiasi ulteriore rinvio a quanto prescritto dal D.Lgs. 31/2001. In particolare la Commissione Ue così si esprime "...per quanto riguarda il boro e il fluoruro, le prove scientifiche permettono deroghe temporanee fino ai valori richiesti rispettivamente di 2-3 mg l^{-1} per il boro e di 2,5 mg l^{-1} per il fluoruro". Per quanto riguarda l'arsenico, le prove scientifiche nei documenti indicati in riferimento negli orientamenti dell'Organizzazione Mondiale della Sanità e nel parere del comitato scientifico dei rischi sanitari e ambientali consentono deroghe temporanee fino a 20 $\mu\text{g l}^{-1}$, mentre valori di 30, 40 e 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ determinerebbero rischi sanitari superiori, in particolare talune forme di cancro. Pertanto, Bruxelles ha deciso di autorizzare unicamente deroghe per valori di arsenico fino a 20 $\mu\text{g l}^{-1}$ ". Detto questo l'Unione Europea chiede pertanto alle competenti istituzioni che:

- a) si faccia divieto di uso per consumo umano di acqua contenente arsenico e si provveda laddove occorra a forme alternative di approvvigionamento di acqua potabile per la popolazione;
- b) si informi correttamente la popolazione in merito;
- c) si adottino immediatamente tutti i provvedimenti necessari a dearsenicare l'acqua destinata a consumo umano.

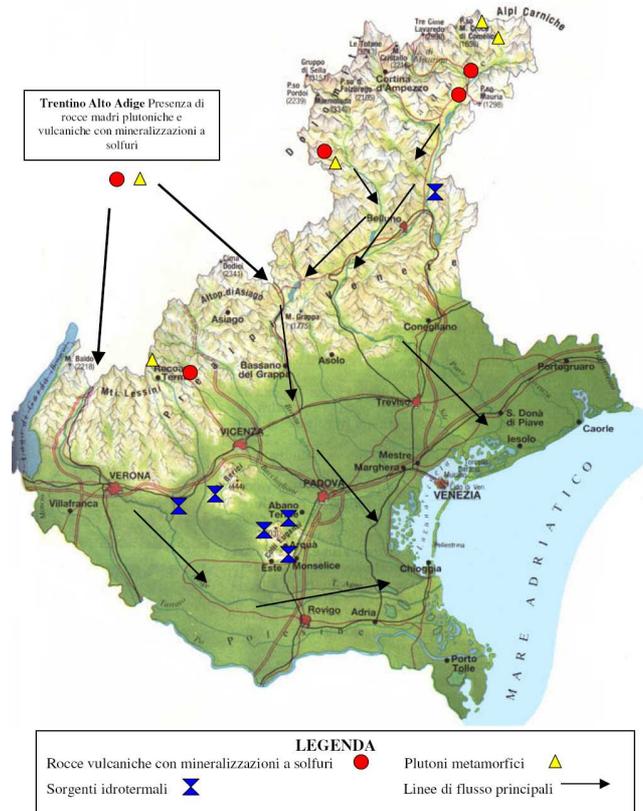
In Italia 128 Comuni distribuiscono acqua contenente arsenico oltre la soglia di 10 $\mu\text{g l}^{-1}$: in alcune zone la concentrazione arriva a 76 $\mu\text{g l}^{-1}$. Tra i comuni 91 sono nel del Lazio, 16 in Toscana, 10 in Trentino-Alto Adige, 8 in Lombardia e 3 in Umbria, per un totale di circa un milione di persone.

L'identificazione, la caratterizzazione ed il recupero di aree contaminate costituiscono oggi un problema ambientale di prioritaria importanza non solo a livello nazionale, ma anche globale. Il problema dei terreni contaminati si è evidenziato in tutta la sua gravità alla fine degli anni Settanta quando, a fronte di un diffuso risveglio della coscienza ambientale, si sono manifestati numerosi casi di grave inquinamento. Tuttavia per quanto riguarda l'arsenico occorre distinguere tra inquinamento antropico e quello naturale. Quello antropico è più facilmente controllabile in quanto si tratta di eliminare le fonti di inquinamento diffuse e puntiformi di questo elemento: si tratterebbe di limitarne l'uso nella fabbricazione del vetro, nell'industria del pellame e soprattutto come pesticida. Per quanto riguarda l'inquinamento naturale il controllo risulta più difficile. L'arsenico possiede circa 250 specie mineralogiche e in quelle più importanti e diffuse si presenta combinato allo zolfo in diversi minerali dando origine ad associazioni mineralogiche tipiche in cui cristallizzano molti solfuri tra cui l'arsenopirite (AsFeS), sfalerite (ZnS), pirite (FeS_2), galena (PbS) che sottoposti al processo di "Weathering" rilasciano l'arsenico in forma solubile, quindi mobile che può disperdersi nell'ambiente, nelle acque sotterranee con conseguenti inquinamenti delle falde e dei pozzi.

Nella Regione Veneto l'arsenico naturale è diffuso in gran parte del territorio ed è dovuto principalmente ai processi di alterazione naturale delle rocce madri delle aree collinari e montane, poste nel settore più settentrionale della regione. Nel Bellunese è stata riscontrata la presenza di arsenico nei giacimenti di piombo, ferro e zinco; nel Trentino vi sono numerose aree caratterizzate da solfuri le quali sono attraversate da alcuni corsi d'acqua rappresentano fonti di apporto naturale dell'arsenico. Attraverso l'erosione e la degradazione dei suoli e dei minerali contenenti arsenico, avviene una prima diffusione dell'elemento nelle fasce pedemontane venete caratterizzate dalla presenza di acquiferi che alimentano le falde. A questo evento si aggiunge quello dei corsi d'acqua: nei fiumi Piave, Brenta e Adige, che assicurano il trasporto dei sedimenti da monte verso valle e lungo le loro piane alluvionali sono stati riscontrati elevati tenori di arsenico. Le particelle sospese e i fanghi contenenti arsenico raggiungono la laguna di Venezia (figura 12.1). Per ultimo, ulteriori fonti di inquinamento e di dispersione vengono dalle aree caratterizzate da fenomeni idrotermali, in cui il sovrasfruttamento degli acquiferi profondi induce la risalita di acque salate

confinata in profondità all'interno di sedimenti marini e la rimobilizzazione di alcuni elementi, tra i quali l'arsenico.

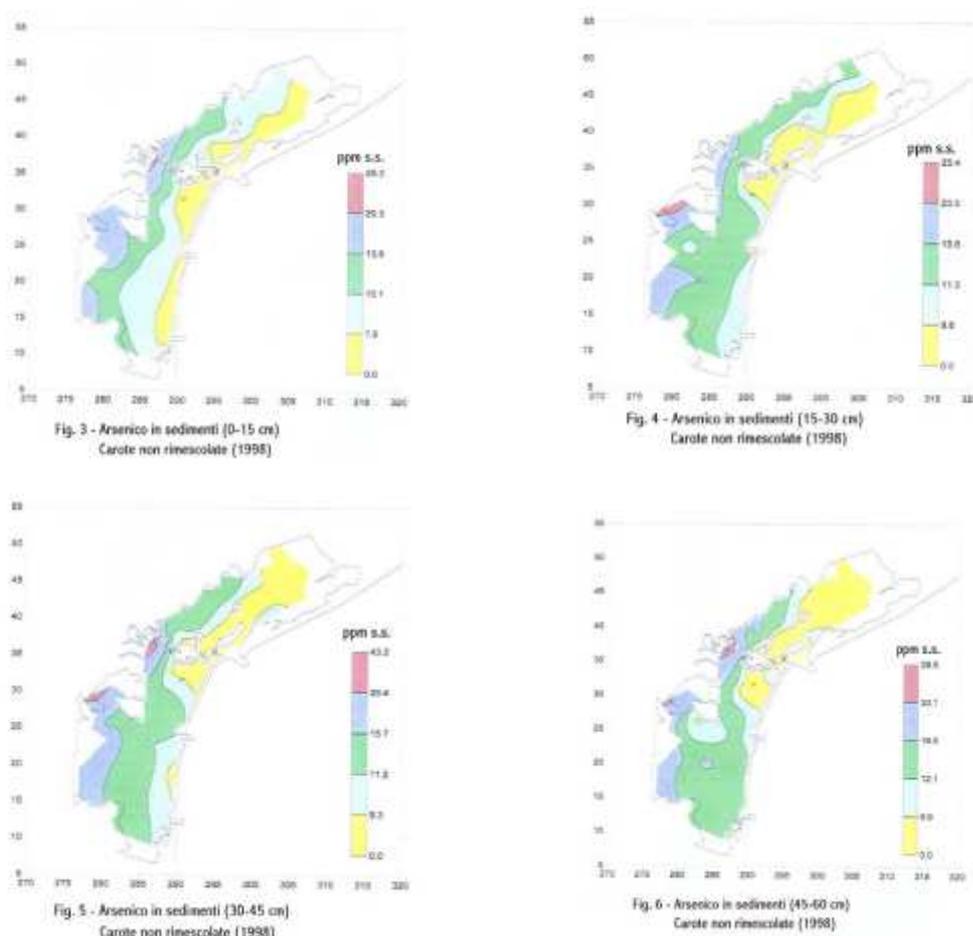
Figura 12.1 – Fonti naturali di arsenico e le sue principali linee di distribuzione



(da D'Aprile et al., 2006)

Nel lavoro di Degetto et al., 2001, si rivela una continuità tra la concentrazione di arsenico riscontrata nei sedimenti e quella riscontrata nei terreni circumlagunari (figura 12.2); inoltre le analisi di correlazione tra l'arsenico e altri elementi quali lo Zn e il Pb inquinanti di origine antropica dimostrano che l'arsenico è correlato unicamente con gli elementi della matrice minerale chimici. In questo caso l'attività inquinante di Porto Marghera pare abbia scarso riscontro con l'inquinamento da arsenico. A questo proposito in figura si riportano le mappe, ottenute con carote non rimescolate, dei livelli di inquinamento di arsenico della laguna di Venezia e della gronda lagunare. Questi livelli rappresentano anche una sequenza temporale per cui lo strato 45-60 cm può essere considerato "vecchio" di almeno 90-100 anni quando non esisteva ancora l'insediamento industriale di Porto Marghera, pertanto la presenza di arsenico a quella profondità esclude la sua origine antropica.

Figura 12.2 – Stratigrafia della presenza di arsenico



(da Degetto et al., 2001)

Al di là dell'origine dell'inquinamento da arsenico della laguna di Venezia, del suo interland e di altre zone del Veneto, la sua contaminazione è oggetto di dibattito e di studio da diverso tempo per possibili rischi di carattere sanitario ed ambientale. Per quanto riguarda specificamente il suolo, in diverse aree del veneziano sono state riscontrate concentrazioni che superano il valore di concentrazione limite accettabile stabiliti dalla legge per suoli ad uso verde pubblico e residenziale. In tali casi è previsto, come previsto dalle correnti norme di legge, l'obbligo di bonifica e il ripristino del sito qualora il limite accettabile sia superato. Essendo nella maggior parte dei casi la contaminazione da arsenico prevalentemente di livello medio-basso, ma distribuita su superfici ampie, vi è la necessità di sviluppare ed applicare nuove tecnologie, alternative alla rimozione del suolo ed al conferimento in discarica che risulta assai costoso. Il ricorso alla fitodepurazione sembra essere la più adatta a questi casi ed è stata recentemente adottata e sostenuta finanziariamente dalla Regione Veneto. In questa ottica muove la presente ricerca che si propone di indentificare quelle caratteristiche morfologiche e fisiometaboliche necessarie per una specie vegetale candidata alla fitodepurazione. Il *Pennisetum clandestinum* è una pianta perenne con elevatissima velocità di crescita che rallenta solo nei mesi invernali, con un apparato radicale molto esteso, adattabile ai nostri climi: attualmente viene utilizzata in programmi di fitodepurazione (Panuccio M.R., Dip. BIOMAA, Università Mediterranea Reggio Calabria, comunicazione personale), ma le sue caratteristiche di resistenza alla tossicità dell'arsenico, di assorbimento e traslocazione delle frazioni epigee dell'arsenico e le sue eventuali proprietà di detossificazione non sono ancora note. Il presente lavoro si propone di acquisire queste conoscenze al fine di un uso estensivo di questa specie vegetale in programmi di fitodepurazione.

13 INTRODUZIONE

I meccanismi di tolleranza o di resistenza ai metalli pesanti messi in atto dalle piante si possono ricondurre sostanzialmente a due comportamenti. Nel primo la pianta riduce l'assorbimento del metallo, meccanismo di esclusione; nel secondo attua una detossificazione all'interno delle cellule attraverso il sequestro delle sostanze tossiche. Berry (1986) ha classificato tre diverse strategie di tolleranza ai metalli: 1) *esclusione*: assorbimento limitato a livello radicale, oppure limitato traslocazione dalle radici alle foglie; 2) *detossificazione*: compartimentalizzazione dei metalli a livello subcellulare, oppure blocco dei metalli stessi nelle pareti cellulari attraverso legami chimici; 3) *tolleranza di tipo biochimico*: vie metaboliche altamente specializzate e adattamenti di tipo enzimatico.

Le piante in grado di colonizzare suoli contaminati da metalli pesanti, danno origine a popolazioni cosiddette "metallofite", adattate dal punto di vista ecologico e fisiologico (Ernest, 1974; 2003) verso le quali si nutre grande interesse per il loro possibile utilizzo nelle tecnologie di risanamento dei siti inquinati.

13.1 L'ARSENICO

Figura 13.1 – Simbolo dell'arsenico in alchimia



13.1.1 NOTIZIE

L'arsenico era noto agli antichi persiani con il nome di *Zarnik*, ma il nome attuale deriva dal greco *Arsenikon*. L'arsenico è un elemento chimico classificato come "metalloide", in quanto presenta caratteristiche comuni sia ai metalli che ai non-metalli. Per molti secoli è stato utilizzato come veleno per l'uomo, ma trova applicazione in molti campi che vanno dall'utilizzazione come pesticidi in agricoltura all'impiego sottoforma di arseniuro di gallio nei circuiti integrati come semiconduttore, alla produzione di leghe metalliche. L'arsenico e molti dei suoi composti sono potentissimi veleni che colpiscono il sistema digestivo e il sistema nervoso, sono anche cancerogeni essendo implicati nell'insorgenza del carcinoma renale, della vescica, del carcinoma mammario e di altre neoplasie. L'esposizione cronica all'arsenico riduce le difese antiossidanti dell'organismo, provoca stress ossidativo; interferisce con i meccanismi endocrinologici alterando i profili ormonali. Ha avuto anche un'ampia applicazione in campo medico, per combattere malattie quali le malattie veneree e oggi sono in corso studi per l'uso dell'arsenico, sottoforma di triossido di arsenico, contro la leucemia (Au et al., 2003; Zhen e Zhu, 2008). Non è mai stato provato direttamente che l'arsenico sia un elemento essenziale (Nielsen, 1998), sebbene si sia visto che piccole dosi di arsenico possono apportare benefici sulla crescita degli animali, mentre invece, nelle piante, non è mai stata evidenziata alcuna azione positiva (Lasky et al., 2004).

Il limite massimo di assunzione dell'arsenico stabilito dall'O.M.S., è di $50 \mu\text{g l}^{-1}$, ma le quantità di arsenico che vengono rilasciate da sedimenti e matrici litiche possono superare questo limite nelle acque che vengono utilizzate per uso potabile e possono quindi recare gravi danni agli ecosistemi e alla salute umana.

13.1.2 ARSENICO NEL SUOLO

L'arsenico è un elemento ubiquitario, presente nella crosta terrestre a concentrazioni dell'ordine dei $5 - 6 \text{ mg kg}^{-1}$ (Yan-Chu, 1994). Nella litosfera, oltre 200 minerali contengono arsenico, in genere combinato con solfiti, e le forme più comuni sono: arsenopirite (FeAsS), cobaltite (CoAsS), realgar (AsS) e nicolite (NiAs) (Reimann e Caritat, 1998).

Nel suolo l'arsenico è presente principalmente come arsenico inorganico e, in misura minore, si trova legato a sostanza organica. In generale, in suoli ben areati, la forma prevalente è l'arseniato As(V) , sottoforma di H_2AsO_4^- , mentre in condizioni riducenti prevale l'arsenito, As(III) , molto spesso in forma

indissociata, H_3AsO_3 (Porter e Peterson, 1977; Haswell et al., 1985; Onken e Hossner, 1995). La forte affinità dell'arseniato con le matrici inorganiche e in particolare con gli ossidi e idrossidi di ferro, comporta la presenza arseniato libero nella fase acquosa del suolo a concentrazioni assai esigue.

Come riportato da Wenzel et al. (2002), suoli non contaminati, o con una lieve contaminazione da arsenico, hanno una concentrazione di arseniato pari a 53 nM, mentre in suoli altamente contaminati è presente a concentrazioni maggiori di 2,3 μM (Zhao et al., 2008). L'arseniato, comunque, viene efficientemente assimilato dalla pianta in quanto, essendo chimicamente analogo all'anione fosfato, utilizza gli stessi carriers per entrare nelle cellule radicali e questo ha per effetto una diminuzione della quota di arseniato libero nella fase acquosa del suolo.

La contaminazione da arsenico nell'ambiente è dovuta a processi di mineralizzazione naturale, ma soprattutto a processi di natura antropica quali, l'uso di erbicidi, insetticidi e prodotti di conservazione del legno, e dall'accumulo di sottoprodotti dell'industria mineraria e fonderie.

Negli ultimi decenni nel Sud-Est Asiatico (West Bengal, Bangladesh e Vietnam), gli effetti tossici dell'arsenico si sono rivelati in modo preoccupante, colpendo milioni di persone. La lisciviazione di rocce e matrici litiche ricche di arsenico libera il metallo che si accumula nei fiumi, nelle sorgenti e nelle acque sotterranee che alimentano i pozzi. Queste acque vengono utilizzate per uso potabile con gravi conseguenze per la salute umana (Nordstrom, 2002). La stessa acqua viene anche utilizzata per irrigare vaste aree agricole destinate prevalentemente alla coltura del riso che è particolarmente efficiente nell'assorbimento dell'arsenico in suoli sommersi, ed è in grado di accumularne notevoli quantità nei grani (Williams et al., 2007; Zhu et al., 2008). Quindi, per le popolazioni asiatiche, il rischio di esposizione al metallo è elevato, in quanto può avvenire sia attraverso l'acqua potabile sia per l'ingestione di colture erbacee inquinate e sia anche per la carne e derivati, quando il bestiame viene alimentato con foraggi inquinati (Meharg e Hartley-Whitaker, 2002).

13.1.3 EFFETTO DELLA RIZOSFERA SULLA SPECIAZIONE DELL'ARSENICO

I processi biologici e chimici che hanno luogo nella rizosfera sono in grado di influenzare la speciazione dell'arsenico, modificandone la biodisponibilità. Sebbene l'arseniato sia la specie dominante nei suoli aerobici, si possono creare dei micrositii anaerobici dove è presente in prevalenza arsenito, in particolare laddove le comunità batteriche sono molto attive e il consumo di ossigeno è elevato (Zhao et al., 2008). E' dunque possibile che piante, cresciute in suoli aerobici, possano allo stesso tempo assorbire arsenito e arseniato.

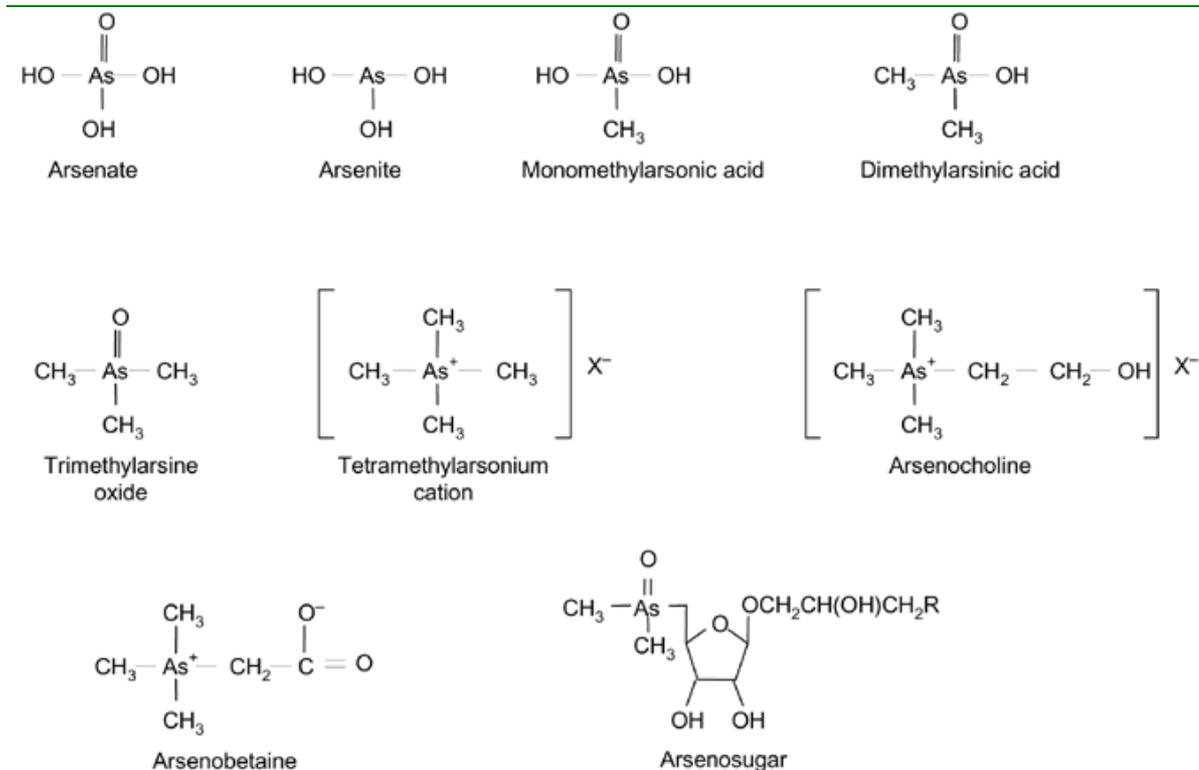
Le piante acquatiche, trovandosi in condizioni di anossia, hanno la capacità di rilasciare ossigeno accumulato nell'aerenchima radicale ossidando, in tal modo, il ferro ridotto. Sulla superficie radicale si formano, pertanto, dei depositi costituiti da ossidi di ferro, soprattutto come ferridrite. Gli ossidi di ferro hanno un'elevatissima affinità per l'arseniato e in specie acquatiche come *Phalaris arundinacea*, *Typha latifolia* e *Oryza sativa*, è stato dimostrato che il 70-80% di arsenico è sottoforma di arseniato precipitato con ferridrite sulla superficie delle radici (Hansel et al., 2002; Blute et al., 2004; Liu et al., 2006). Come conseguenza di tale adsorbimento, la concentrazione di arsenico nella rizosfera risultava essere dalle 5 alle 9 volte maggiore rispetto alla quantità di metallo presente nel suolo circostante. Tale processo, se da un lato comporta l'arricchimento di arsenico in prossimità della zona di assorbimento della pianta, dall'altro costituisce un possibile meccanismo di sequestro dell'arsenico, che diventa meno mobile e, di conseguenza, meno disponibile per l'assorbimento radicale (Liu et al., 2004a). Un'ulteriore conferma sperimentale è data dai risultati di uno studio condotto su radici di riso da Chen et al. (2005), in cui viene chiaramente dimostrato che la presenza degli ossidi di ferro diminuisce l'assorbimento di arseniato da parte delle piante poiché viene da questi catturato per adsorbimento.

13.1.4 ARSENICO NELLA PIANTA

La tossicità dell'arsenico dipende dalla specie chimica che esso può assumere. Pertanto le diverse forme di arsenico presenti nel suolo e nella pianta, assumono un aspetto importante per valutarne la tossicità. In figura 13.2 sono riportate le diverse specie di arsenico rinvenute nelle piante terrestri. L'arsenico viene generalmente assimilato dalle piante superiori nella forma inorganica di arseniato, As(V), o di arsenito, As(III). L'arseniato, come precedentemente riportato, entra nella pianta utilizzando gli stessi carriers del fosfato (Asher e Reay, 1979; Meharg et al., 1994), attraverso un meccanismo di cotrasporto con i protoni, in cui 2H^+ sono coinvolti per ogni anione H_2PO_4^- o H_2AsO_4^- che entra (Ullrich-Eberius et al., 1989).

L'arsenito invece, è la forma di arsenico predominante in ambienti riducenti, quali ad esempio le risaie, dove risulta facilmente mobile e disponibile per le piante (Xu et al., 2008). In questi ambienti, l'ammontare di arsenito nella soluzione di suolo varia da 0,01 a 3 μM , risultando quindi maggiore rispetto alle concentrazioni di arseniato tipiche di un suolo non contaminato (Zhao et al., 2008).

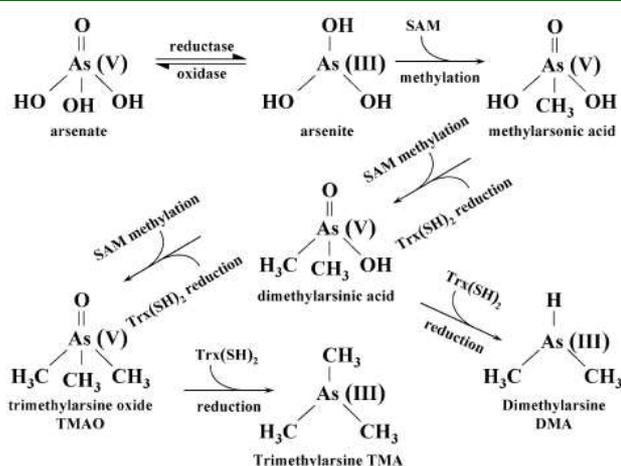
Figura 13.2 – Specie di arsenico presenti in piante superiori



(da Meharg e Hartley-Whitaker, 2002)

L'assorbimento di arsenito da parte delle piante superiori avviene attraverso le acquagliceroporine, una subfamiglia delle acquaporine, i cui canali però sono caratterizzati da pori di dimensione maggiore che permettono il passaggio di molecole neutre come il glicerolo. A conferma di tale meccanismo e, diversamente dall'arseniato, l'assorbimento di arsenito è inibito dalla presenza di glicerolo e antimonite, ma non dalla presenza di fosfato (Meharg e Jardine 2003; Ma et al., 2008). Un meccanismo alternativo è stato evidenziato in alcuni lieviti nei quali l'aggiunta di glucosio inibiva dell'80% l'assorbimento di arsenito, suggerendo il coinvolgimento di una esoso-permeasi che riconosceva e trasportava l'arsenito in assenza di glucosio (Liu et al., 2004b; Bhattacharjee e Rosen, 2007). L'arsenito viene assorbito rapidamente dalle radici. La V_{\max} è comparabile a quella dell'arseniato in assenza di fosfato, ma con una K_m maggiore e quindi una minore affinità rispetto alla corrispondente forma ossidata.

Figura 13.3 – Organizzazione dell'arsenico*



* Composti organici dell'arsenico prodotti in batteri, alghe e piante superiori.
(da Meharg e Hartley-Whitaker, 2002)

Per quanto riguarda le specie organiche dell'arsenico, le forme più comuni nei suoli sono l'acido monometilarsonico (MMA) e l'acido dimetilarsinico (DMA). La loro presenza è dovuta all'uso, protratto nel tempo, di pesticidi ed erbicidi a base di arsenico, oppure vengono sintetizzati dai microrganismi del suolo ed alghe (figura 13.3). Entrambi gli acidi organici, MMA e DMA vengono assorbiti dalle piante, ma in modo meno efficiente rispetto alle specie inorganiche dell'arsenito e dell'arseniato.

In particolare, uno studio condotto da Raab et al. (2007) su 46 diverse specie di piante, esposte per 24 ore a 13.3 μM di arseniato, MMA e DMA, ha dimostrato che le quantità di MMA e DMA assorbite non superavano rispettivamente il 50% e il 20% dell'ammontare totale di arseniato assorbito.

I meccanismi alla base dell'assorbimento delle specie organiche dell'arsenico non sono ancora stati chiariti e richiedono ulteriori studi, al fine di ottenere delle informazioni più precise sul metabolismo e l'assimilazione di tali specie.

13.1.5 DESTINO METABOLICO DELL'ARSENICO NELLE PIANTE: RIDUZIONE DI ARSENIATO AD ARSENIATO E COMPARTIMENTAZIONE VACUOLARE

La forma prevalente di arsenico nei tessuti vegetali è quella trivalente dell'arsenito anche quando le piante vengono esposte al solo arseniato. Questo significa che l'arseniato viene ridotto ad arsenito all'interno della pianta. La percentuale di arsenito sul totale di arsenico presente nella pianta è specie-specifica e compresa in un intervallo che varia dal 92 al 100%.

La prima tappa del metabolismo dell'arsenico nelle piante comporta il passaggio da una forma tossica, quale l'As(V), ad una forma ancora più tossica che è l'As(III). L'arseniato esplica la sua azione negativa nel citoplasma, sostituendo il gruppo fosfato dell'ATP, e dando luogo a forme instabili ADP-As che alterano il flusso energetico cellulare (Meharg, 1994). Tuttavia, a seguito della rapida riduzione ad As(III) nel citosol, l'As(V) diminuisce la sua concentrazione così da non risultare più tossico (Bertolero et al., 1987). L'arsenito, invece, reagisce con i gruppi sulfidrilici (-SH) di enzimi e con le proteine provocando un'inibizione di tutte le funzioni cellulari (Ullrich-Eberius et al., 1989). Specie non-tolleranti all'arsenico, quando esposte al metallo, mostrano sintomi che vanno dall'inibizione della crescita radicale, fino alla morte (Macnair e Cumbes, 1987; Meharg e Macnair, 1991; Paliouris e Hutchinson, 1991; Carbonell-Barrachina et al., 1995).

Molto probabilmente, come sostenuto da numerose ricerche, la reazione di riduzione da arseniato ad arsenito è di natura enzimatica. Bleeker et al. (2006), hanno evidenziato, nell'estratto radicale di *Holcus lanatus*, che la capacità riducente di questa pianta è prevalentemente di natura enzimatica. Tuttavia, in un esperimento condotto *in vitro*, si è visto che la riduzione dell'arseniato può avvenire utilizzando la via di ossido riduzione del glutatione (Delnomdedieu et al., 1994), è improbabile però che questo rappresenti il meccanismo principale di riduzione dell'arseniato in quanto si tratta di una reazione molto lenta che non giustifica la velocità di formazione dell'arsenito nei tessuti vegetali. Sono necessari ulteriori studi per chiarire in quale modo avvenga la riduzione dell'arseniato ad arsenito nel citosol e quale sia l'effettivo ruolo dell'enzima arseniato-reduttasi.

Nella reazione di riduzione intracellulare dell'arseniato si ha anche la formazione di composti reattivi dell'ossigeno (ROS) (Hartley-Whitaker et al., 2001). È stato osservato in numerose specie vegetali che tali composti, prodotti in genere dal metabolismo secondario, risultano tossici e inducono nelle piante dei meccanismi di risposta che comprendono, da un lato la sintesi di enzimi antiossidanti quali la superossido-dismutasi, la catalasi e la glutatione-S-transferasi, e dall'altro, la formazione di composti antiossidanti di natura non enzimatica, come il glutatione e l'ascorbato (Alscher, 1989; Mylona et al., 1998; Dat et al., 2000; Hartley-Whitaker et al., 2001; Halušková et al., 2010).

L'arsenito presente nel citoplasma cellulare, può complessarsi con i composti tiolici del citosol, in particolare con glutatione (GSH) e soprattutto con le fitochelatine che formano con il metallo un legame più stabile rispetto a quello con il GSH. I metodi analitici per determinare i complessi che l'arsenico forma con i gruppi tiolici sono tuttora allo studio in quanto, essendo delle molecole instabili è difficile estrarle senza impedire l'alterazione o la sintesi di nuove specie dell'arsenico. Raab et al. (2005) con la tecnica HPLC-ICP-MS/ES-MS, hanno trovato che meno del 60% dell'arsenico estratto da radici e foglie di girasole era complessato con gruppi tiolici, mentre, Pickering et al. (2000) e Dhankher et al. (2002) hanno visto che, in *Brassica juncea* e *A. thaliana*, un'altissima percentuale (96-100%) di arsenico sottoforma di arsenito era legato alle fitochelatine con una coordinazione molto stabile formata da tre residui solforici.

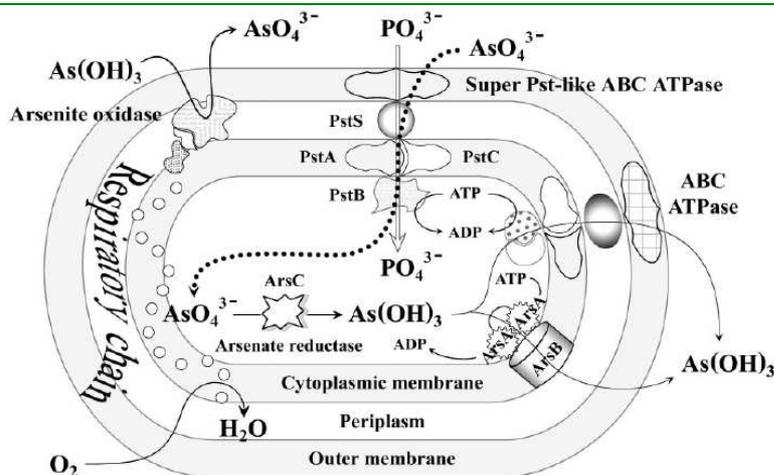
Le fitochelatine sono derivati del glutatione e si formano in seguito a una transpeptidasi del γ -glutamylcystein-dipeptide operata dall'enzima costitutivo fitochelatina sintasi (PCS) (Schmöger et al., 2000; Vatamaniuk et al., 2000). Rappresentano una piccola famiglia di peptidi, con una struttura generale $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, dove n è generalmente compreso tra 2 e 5, tuttavia sono state trovate fitochelatine con un n pari a 12 e delle varianti rappresentate da $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$ e $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$ (Cobbett, 2000).

L'azione della fitochelatina sintasi è indotta dalla presenza di metalli, soprattutto dai cationi Ag^+ , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} e dagli ossianioni di arseniato e selenato. Anche l'arsenito, presente nel citosol a concentrazioni elevate in seguito alla riduzione dell'arseniato, induce la biosintesi di PCS. La produzione di fitochelatine rappresenta uno dei meccanismi principali di detossificazione per gli organismi vegetali, alghe e alcuni funghi, in quanto il metallo immobilizzato risulta meno tossico rispetto allo ione libero.

I complessi As-PC e As-(GS)_3 , sono instabili a pH alcalino o neutro, ma sono stabili in ambiente acido, tipico dei vacuoli (~ 5.5) (Schmöger et al., 2000; Sneller et al., 2000). Inoltre il basso pH del vacuolo previene l'eventuale ri-ossidazione dell'arsenito, e consente l'accumulo di alte concentrazioni di complessi As-PC , nelle piante tolleranti. Le piante sensibili all'arsenico invece, pur avendo la possibilità di compartimentare l'arsenico nei vacuoli, risentono immediatamente degli effetti tossici dell'arseniato assorbito in quanto non riescono ad attuare una detossificazione efficiente.

Le proteine che effettuano il trasporto del complesso fitochelatina-metallo pesante, all'interno dei vacuoli, appartengono alla famiglia dei trasportatori ABC (I trasportatori di transmembrana ABC utilizzano l'energia dell'idrolisi dell'ATP per trasportare varie sostanze attraverso le membrane cellulari). Nei lieviti è stato identificato un trasportatore di membrana chiamato Ycf1p (yeast cadmium factor), che conferisce resistenza a una varietà di metalli pesanti, inclusi cadmio e arsenico, ed è membro della famiglia di proteine MRP (multidrug resistance-associated protein), una sub-famiglia dei trasportatori ABC (Li et al., 1997; Ghosh et al., 1999). Nel microrganismo *Saccharomyces pombe*, i complessi Cd-PC si avvalgono del trasportatore di vacuolo HMT1, sempre appartenente alla famiglia ABC. Presumibilmente, il trasportatore HMT1 è presente anche nelle piante superiori, ma fino ad oggi non esiste alcuna prova sperimentale. Solo Bleeker et al. (2006), hanno dimostrato, in un esperimento su cellule radicali di *Holcus lanatus*, che il complesso As(III)-(GS)_3 era trasportato prontamente nei vacuoli radicali tramite una Mg-ATPasi con il coinvolgimento di un trasportatore ABC. Nella Figura 13.4 sono riportati le trasformazioni dell'arsenico e i suoi movimenti di entrata ed uscita da una cellula modello.

Figura 13.4 – Metabolismo dell'arsenico proposto per *Alcaligenes faecalis*



(da Silver e Phung, 2005)

13.1.6 MECCANISMI DI TRASLOCAZIONE DELL'ARSENICO ALL'INTERNO DELLA PIANTA

13.1.6.1 Trasporto xilematico

A differenza del fosfato, l'arsenico non viene traslocato efficientemente alla parte aerea. Infatti, in *Arabidopsis thaliana* si è osservato che circa il 73% di fosforo assorbito arriva alle foglie contro il 2.6% dell'arsenico (Quaghebeur e Rengel, 2004). La ridotta traslocazione dell'arsenico è probabilmente conseguenza della rapida riduzione nelle cellule radicali, dell'arseniato ad arsenito, e successiva complessazione dell'arsenito nei vacuoli. Il trasporto dell'arseniato nello xilema non segue la stessa via del fosfato diversamente da quanto avviene nelle cellule radicali. Infatti, piante con ridotta funzionalità del gene *pho1* che codifica per il caricamento xilematico del fosfato, confrontate con piante nelle quali il gene *pho2* veniva invece sovraespresso, hanno evidenziato che solo il trasporto di fosfato era influenzato, mentre non si registrava nessuna differenza a carico dell'arseniato (Quaghebeur e Rengel, 2004). Rimangono ancora da individuare i meccanismi molecolari che governano il passaggio dell'arseniato nello xilema.

Dalle analisi di speciazione dell'arsenico, condotte su campioni di xilema raccolti da piante di diversa specie, in vari esperimenti, è risultato che le forme inorganiche sono di gran lunga le più rappresentate e l'arsenito supera percentualmente l'arseniato. La presenza dell'acido dimetilarsinico (DMA) è stata rinvenuta nello xilema di cocomero (*Cucumis sativus* L.) e pomodoro (*Lycopersicon esculentum* L.), in una percentuale dell'ordine del 4% dell'arsenico totale (Mihucz et al., 2005; Xu et al., 2007).

Le diverse specie vegetali variano notevolmente riguardo la mobilità, e quindi la presenza dell'arsenico all'interno dello xilema. Il rapporto tra arsenico nello xilema e arsenico nelle radici è, in genere, minore dell'unità nelle piante non-accumulatrici mentre in specie iperaccumulatrici come la *Pteris vittata*, si riscontra un'elevata concentrazione di arsenico nello xilema e, di conseguenza, nelle foglie rispetto alle radici

13.1.6.2 Trasporto floematico

Il trasporto dell'arsenico dalle foglie alle radici per via floematica è un processo ancora poco noto. Per analogia con altri metalli pesanti, ad esempio il cadmio, si potrebbe ipotizzare un trasporto sottoforma di complesso tiolico; infatti in *Arabidopsis thaliana* (Chen et al., 2006; Li et al., 2006) e in *Brassica napus* (Mendoza-Cózatl et al., 2008) si è osservato un trasporto floematico del cadmio sottoforma di Cd-GS e Cd-PC. Per quanto riguarda l'arsenico però, va considerato che i complessi As(III)-PC o As(III)-GS, non sono stabili a pH subalcalino e quindi non sarebbero favoriti alle condizioni del succo floematico che in generale ha un pH intorno a 7,5.

13.1.7 EFFETTO DELLE MICORRIZE SULLA DISPONIBILITÀ DELL'ARSENICO

La micorrizzazione coinvolge in condizioni naturali più del 90% delle specie vegetali. Le piante riescono ad instaurare simbiosi con le micorrize anche in suoli inquinati da arsenico e numerosi studi hanno dimostrato che l'infezione da micorrize ne riducono gli effetti negativi. L'infezione comporta, in particolare,

la soppressione del sistema ad alta affinità del fosfato diminuendo, di conseguenza, l'assorbimento dell'arseniato che si avvale di questo sistema per entrare nelle radici (Gonzalez-Chavez et al., 2002). Inoltre, le micorrizze possono aumentare la resistenza all'arsenico delle piante ospiti mediante efflusso di arsenito, caso riscontrato con il fungo micorrizico *Hymenoscyphus ericae*. L'aumento dell'acquisizione del fosforo operato dalle micorrizze poi, rappresenta di per sé un miglioramento dello stato nutrizionale della pianta che comporta un aumento della crescita (Liu et al., 2005; Ahmed et al., 2006; Chen et al., 2007). E' stato riportato in diversi esperimenti che la presenza di micorrizze diminuisce la traslocazione dell'arsenico all'interno della pianta, dalle radici alle foglie, tuttavia il meccanismo è ancora poco chiaro (Gonzalez-Chavez et al., 2002; Chen et al., 2007; Ultra et al., 2007).

13.1.8 ESEMPI DI PIANTE TOLLERANTI ALL'ARSENICO

Sebbene l'arsenico sia un elemento altamente fitotossico, alcune piante sono capaci di colonizzare siti inquinati, come ad esempio le miniere per l'estrazione di oro, rame, piombo, stagno o zinco (O'Neill, 1995). In particolare, molte delle piante rinvenute in siti contaminati da arsenico (popolazioni metallifere) sembrano possedere livelli di tolleranza molto alti nei confronti dell'arseniato As(V), rispetto alle piante della stessa specie che vivono in siti non contaminati (popolazioni non metallifere) (De Koe e Jacques, 1993; Macnair e Cumbes, 1987; Rocovich e West, 1975). La tolleranza all'arseniato si basa principalmente sulla riduzione dell'assorbimento di arseniato, in seguito alla soppressione del sistema di trasporto del fosfato ad alta affinità (Bleeker et al., 2003; Meharg, 1994; Meharg e Macnair, 1992).

Generalmente la disponibilità del fosfato nel suolo è bassa, dell'ordine di 10 μM nella fase acquosa del suolo, di conseguenza nelle piante è attivo il sistema di trasporto del fosfato ad alta affinità che, nei suoli inquinati con arsenico, per la stretta somiglianza chimica fra i due ioni, può trasportare anche arseniato.

Le piante tolleranti, pur rallentando l'ingresso dell'arseniato, tramite la soppressione del sistema ad alta affinità, riescono tuttavia ad accumulare notevoli quantità di arsenico all'interno, senza mostrare evidenti sintomi di tossicità, a dimostrazione di un meccanismo di detossificazione interna, che consente il sequestro dell'arsenico. Tra le specie arsenico-tolleranti ricordiamo *Agrostis capillaris* L., *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv. e *Holcus lanatus*.

Nella popolazione della specie vegetale *Holcus lanatus*, pianta graminacea nativa del continente Europeo, esiste un polimorfismo genetico per cui gli ecotipi cosiddetti "tolleranti", selezionati naturalmente nei suoli inquinati da arsenico, riducono l'assorbimento dell'arseniato sopprimendo il sistema ad alta affinità del fosfato (HAUS), attivo a basse concentrazioni di fosfato esterno (Clarkson et al., 1978) per cui l'arseniato potrà essere assorbito solo attraverso il sistema a bassa affinità. Negli ecotipi non-tolleranti, l'arseniato non è in grado di sopprimere il sistema ad alta affinità per cui sarà assorbito indistintamente da entrambi i sistemi del trasporto sia a bassa e sia ad alta affinità. Per questo motivo la soppressione del sistema ad alta affinità, a livello genetico, rappresenta il meccanismo che maggiormente determina la tolleranza all'arsenico delle specie tolleranti anche se a questo si affianca un sistema di detossificazione interna.

13.1.9 LA PTERIS VITTATA: UNA FELCE IPERACCUMULATRICE DI ARSENICO

Nonostante molte piante si siano rivelate in grado di tollerare l'arsenico, poche sono in grado di iperaccumularlo e, soprattutto, di effettuarne una traslocazione dalle radici alle foglie.

Pteris vittata è una specie appartenente alla famiglia delle Pteridaceae, comunemente chiamata Chinese Brake Fern. E' in grado di accumulare arsenico fino a 10000 mg kg^{-1} di peso secco delle fronde, prima di mostrare sintomi di tossicità e di raggiungere, addirittura, concentrazioni di circa 22000 mg kg^{-1} di peso secco (Wang et al., 2002). Questo eccezionale bioaccumulatore naturale è stato scoperto recentemente (Ma et al., 2001), ed ha aperto grandi prospettive sul fitorisanamento di siti contaminati da arsenico, anche per le caratteristiche positive della pianta. Infatti è capace di crescere velocemente, è dotata di una notevole biomassa aerea ed è in grado di sviluppare un sistema radicale molto esteso, con un elevato sviluppo di peli, la cui densità e lunghezza viene indotta nei suoli dall'arsenico quando è presente ad elevata concentrazione (Gupta e Devi, 1994; Bondada e Ma, 2003).

Pteris vittata è tipica dei luoghi caldi e soleggiati, essendo originaria dell'Asia, Africa e Australia, non può venire quindi impiegata nei climi freddi. In Italia si trova nel Sud: Salernitano, Calabria, Sicilia e Ischia, anche a Roma, lungo il Tevere, mentre il punto più a nord dove è stata rinvenuta è Genova.

Studi recenti hanno permesso di identificare nuove felci iperaccumulatrici di arsenico, tra cui la felce tropicale *Pityrogramma calomelanos* (Visoottivseth et al., 2002), e altre appartenenti al genere *Pteris*: *Pteris cretica*, *Pteris longifolia* e *Pteris umbrosa* (Zhao et al., 2002). Ulteriori ricerche sono in atto al fine di individuare altre iperaccumulatrici adattabili ai diversi climi.

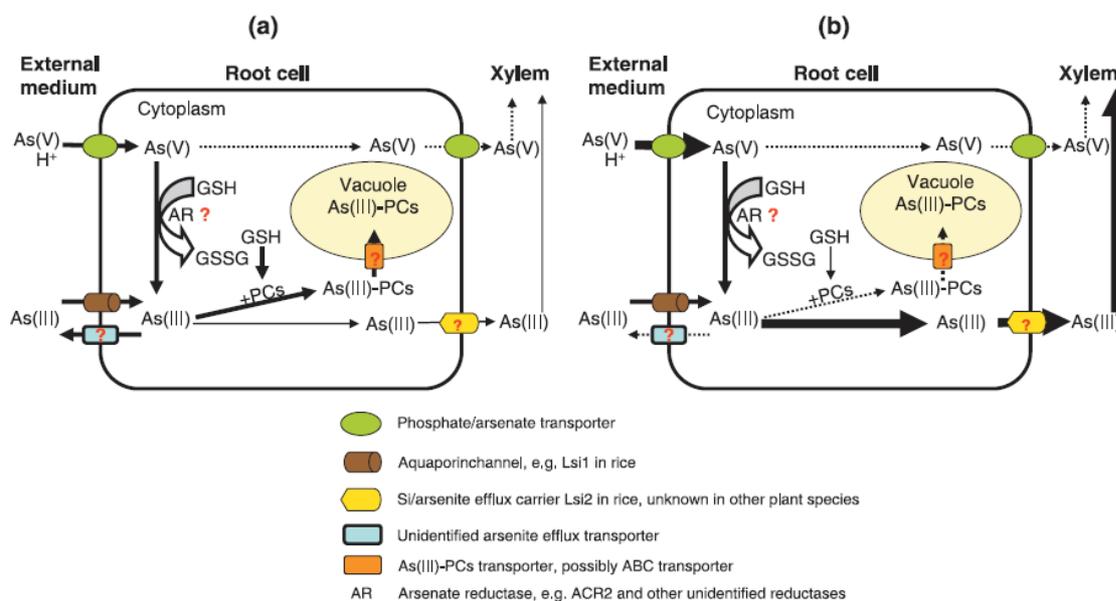
Il metabolismo di detossificazione dell'arsenico in *P. vittata* risulta diverso dalle piante non iperaccumulatrici, che si servono principalmente della complessazione dell'arsenico con le fitochelatine per neutralizzare gli effetti tossici del metallo. In *Pteris vittata*, invece, solo una piccola percentuale di arsenico si

trova legato a composti tiolici (~ 1-3% dell'arsenico totale) (Zhao et al., 2003; Raab et al., 2004a; Zhang et al., 2004), mentre la maggior parte (60-90%), si rinviene sottoforma di arsenito inorganico, probabilmente accumulato nei vacuoli (Lombi et al., 2002; Pickering et al., 2006).

In realtà, complessare l'arsenico con le fitochelatine, alle concentrazioni in cui l'arsenico è assimilato da questa felce, diventerebbe per la pianta un meccanismo troppo dispendioso dal punto di vista energetico. Infatti, il rapporto stechiometrico As:S è di 1:3, quindi la quantità di zolfo richiesta per complessare i 2500 mg kg⁻¹ di arsenico presente nelle fronde, sarebbe troppo elevata rispetto alla quantità di zolfo normalmente accumulata dalla pianta (Zhao et al., 2002). La maggior parte dell'arsenico assorbito viene traslocato all'apparato fogliare entro le prime 20 settimane di crescita e la sua concentrazione aumenta con l'età (Tu et al., 2002).

Inizialmente, l'arseniato viene ridotto ad arsenito a livello radicale e, successivamente al caricamento dell'arsenito nello xilema, avviene la traslocazione del metallo dalle radici alle foglie. Su et al. (2008) hanno dimostrato che circa il 93-98% di arsenico era presente nello xilema come arsenito, indipendentemente se la fonte fosse As(V) o As(III). Sembra che il confinamento dell'arsenico nei vacuoli delle cellule radicali e la traslocazione la sua traslocazione nelle parti aeree della pianta, rappresentino i punti chiave della capacità di accumulo di *P. vittata* (figura 13.5).

Figura 13.5 – Il destino dell'arsenico in piante non iperaccumulatrici (a) e iperaccumulatrici (b)



L'arsenico è presente nel suolo sotto due distinte forme, l'As(V) e l'As(III), reciprocamente scambiabili in funzione principalmente del potenziale di ossidoriduzione e della reazione (pH) del suolo. Le due forme possono essere acquisite indipendentemente dalle cellule radicali delle piante dai sistemi di trasporto dei fosfati e dell'acido silicico in virtù della loro affinità con i rispettivi trasportatori. L'eccezionalità dell'arsenico rispetto ad altri metalli risiede in queste sue proprietà che sono anche la causa principale della sua pericolosità. Nello spazio metabolico l'As(V), che difficilmente in questa forma può essere traslocato nella parte epigea della pianta, in entrambe le specie viene rapidamente convertito in As(III) tramite dall'arseniato riduttasi od altre vie ancora sconosciute. L'As(III) nelle specie non iperaccumulatrici sarà stoccato principalmente nel vacuolo dopo essere stato complessato con le fitochelatine; successivamente, quando il vacuolo avrà raggiunta la saturazione, sarà estruso all'esterno; nelle specie iperaccumulatrici l'As(III) verrà rapidamente traslocato nella parte aerea della pianta in grande quantità; mentre relativamente debole sarà il flusso verso il vacuolo e verso l'esterno. Attualmente non sono ancora stati caratterizzati alcuni importanti trasportatori che governano il flusso in uscita verso l'esterno e verso le strutture xilematiche dell'As(III).

(da Zhao, 2008)

13.1.10 INFLUENZA METABOLICA DELL'ARSENICO SUI CAMMINI METABOLICI

Le variazioni morfofunzionali indotte dall'arsenico sulle piante non hanno avuto la stessa attenzione di quelle studiate in campo medico e le notizie in letteratura sono assai scarse. Era comunque noto da molti anni che i metalli pesanti provocavano un complessivo rallentamento della crescita sia della parte aerea sia di quella radicale tanto da coniare il termine “*little shoot and little root*” che si può applicare anche all'arsenico. È stato riscontrata infatti una riduzione della lunghezza delle radici, l'altezza della pianta ed una diminuzione del peso secco in piante di riso (Yamane, 1989; Abedin et al. 2002) e di fagiolo (Carbonell-Barrachina et al., 1998) trattate con arsenico e che in linea generale l'arsenito era più tossico dell'arseniato (Marin et al. 1992; D'Ilio et al. 2002).

Recentemente è stato riscontrato che l'arseniato e l'arsenito agiscono in modo differenziato sul metabolismo (Wang et al., 2010). In piante di riso è stato osservato che l'arsenito agisce principalmente sui meccanismi riguardanti l'assorbimento del potassio e del fosfato, mentre l'arseniato colpiva quello dell'azoto. L'effetto era proporzionale alla concentrazione dell'arsenico nei tessuti e nel caso del riso i tessuti radicali erano più colpiti di quelli fogliari per effetto di una maggiore concentrazione di arsenico nelle radici rispetto alle foglie. Sempre nel riso era riscontrata una sotto regolazione dei geni correlati col metabolismo del potassio e del fosforo provocata dall'arsenito in misura 2-3 volte superiore a quella indotta dall'arseniato. Erano sensibilmente sottoespressi i geni codificanti per i due trasportatori del fosfato ad alta affinità, la fosfatasi acida e i trasportatori del potassio tutti localizzati nei tessuti radicali. Come conseguenza una generale caduta dei contenuti in fosforo e potassio era riscontrabile sia nelle radici e sia nelle foglie. Un comportamento opposto era osservato per i geni afferenti al metabolismo dell'azoto che subivano una sottoregolazione da parte dell'arseniato tre volte superiore rispetto all'arsenito. Erano sottoespressi i geni codificanti per la nitrato riduttasi, la nitrito riduttasi, la glutamatosintasi, la glutamiasintetasi, e i trasportatori del nitrato e dell'ammonio ad alta affinità.

Sintomi di clorosi per effetto dell'arsenico sono stati riscontrati in sorgo e riso (Shaibur et al. 2006, Shaibur et al., 2008).

13.2 PENNISETUM CLANDESTINUM

Il *Pennisetum clandestinum* è una specie erbacea tropicale che è conosciuta con diversi nomi comuni tra i quali il più frequente “erba kikuyu” di derivazione africana in quanto nativo della regione che ospita la Tribù Kikuyu. E' utilizzato sia come pascoli soprattutto in Sud America (Ataroff e Narajo, 2009) sia come tappeto erboso in Australia e Sud Africa (Barton et al., 2008). E' una specie aggressiva e con rapida crescita, tanto che è stata classificata come potenziale causa di danni economici o ecologici nelle isole Hawaii e altre isole del Pacifico (Daehler et al., 2004). La descrizione di questa specie (Chiovenda, 1903) si riferisce al lavoro di Hochstetter da qui il nome completo *Pennisetum clandestinum* Hochst ex Chiov. Appartiene al genere *Pennisetum* Rich, Famiglia *Poaceae*, Ordine *Cyperales*. Pianta rizomatosa, stolonifera, perenne, altezza da 30 a 40 cm con massimo a 70 cm, gli stoloni molto ramificati formano fitti tappeti erbosi a livello del terreno. I germogli sterili hanno fusti brevi e foglie lunghe, i germogli fertili sono in posizione più bassa rispetto ai sterili e presentano foglie più piccole. La guaina fogliare si presenta di colore giallo-verde intenso con ligula densa di peli. La foglia è una lamina lineare che arriva fino a 30 cm di lunghezza e 7 mm di spessore, chiusa in età giovane e completamente aperta a maturazione, glabra o con pochi peli e profili seghettati. L'infiorescenza è ridotta a 2-4 spighe raccolte nel fodero superiore della foglia. Le spighe, lunghe 1-2 cm, comprendono due fiori: uno sterile in basso e uno bisessuale in alto. La cariosside si presenta marrone scuro ed ha dimensioni di 2,5 mm di lunghezza e 1,5 mm di larghezza.

La kikuyu è stata variamente utilizzata; ad esempio è stato scoperto che l'associazione kikuyu/riso è un ottimo alimento per i bovini al pascolo. E' stato riscontrato un aumento della produzione di latte in quanto la dieta è maggiormente bilanciata per effetto dell'apporto di azoto proveniente dalla kikuyu che ne possiede quantità rilevanti (Trevaskis et al., 2004). Viene utilizzata per tappeti erbosi grazie alla sua resistenza meccanica: il sistema stolonifero e rizomatoso della kikuyu offre un'ottima resistenza al calpestio. Ricerche in tal senso indicano che basse e dosi di fertilizzante azotato somministrate frequentemente sono le pratiche agronomiche più indicate per il mantenimento ottimale del tappeto erboso (Barton et al., 2008). E' stato utilizzato anche come essenza da pascolo grazie ancora alle sue proprietà di resistenza meccanica, alle capacità di intercettazione delle acque meteoriche e di consolidamento dei suoli negli alti pascoli delle Ande (Ataroff e Narajo, 2009). E' anche utilizzato come dieta per l'allevamento degli agnelli per la sua digeribilità e per l'attivazione dei processi di fermentazione ruminale e il conseguente apporto di proteine microbiche alla dieta (Kozlosky et al., 2009). La resistenza alla salinità è stata studiata in relazione ad alcuni parametri fisiometabolici come l'accrescimento dell'apparato radicale in condizioni di stress salino ed alcuni enzimi riguardanti il metabolismo del carbonio; i risultati indicano che la kikuyu è particolarmente resistente alla

salinità ed anche all'acidità che tollera senza gravi perdite per la produzione di biomassa: lo studio è stato finalizzato al recupero delle numerose aree del Bacino del Mediterraneo afflitte dalla salinità (Muscolo et al., 2003; Sidari et al., 2004). Vi è un crescente interesse per la kikuyu in quanto, grazie alle sue caratteristiche di resistenza agli stress e di elevata produttività, è candidato a risolvere le esigenze di pascolo nei paesi tropicali (Herrero et al., 2000a e 2000b)

14 SCOPO DEL LAVORO

Il successo della fitodepurazione risiede nelle proprietà delle piante di assorbire e traslocare nella parte aerea le sostanze inquinanti presenti nel suolo o nell'acqua e, nel contempo, devono essere resistenti all'azione tossica degli inquinati. Oltre queste proprietà le piante debbono possedere alcune importanti caratteristiche: veloce accrescimento al fine di realizzare grandi quantità di biomassa con un elevato rapporto tra inquinante assorbito e unità di peso, apparato radicale molto esteso per esplorare la massima quantità possibile di suolo, potenzialità vegetativa estesa per molti mesi all'anno. Il *Pennisetum clandestinum* sembra possedere queste caratteristiche: si distingue per la velocità di crescita e il suo potenziale invasivo poiché sviluppa una fitta rete di radici rizomatose ed emette una grande quantità di stoloni che formano un tappeto erboso molto fitto, raggiunge un'altezza media compresa tra 15 e 40 centimetri. Queste notizie non sono però accompagnate da conoscenze in merito alle sue specifiche proprietà in merito agli inquinanti. Lo scopo del lavoro è quello di verificare il livello di resistenza all'arsenico e di valutare con quale efficienza l'arsenico sia assorbito dall'apparato radicale e traslocato poi nella parte epigea. Si effettueranno misure di trasporto dell'arseniato, la forma dell'arsenico più rappresentata nel suolo, al fine di stimare i parametri cinetici del trasporto dell'arseniato. I parametri cinetici del trasporto forniscono molte informazioni sui sistemi di regolazione dell'assorbimento ionico da parte delle radici. Verranno anche effettuati esperimenti in presenza dell'ione fosfato che, in altre specie vegetali, è stato visto essere un inibitore del trasporto dell'arseniato. In fine si verificherà se il *Pennisetum clandestinum* sia in grado di metabolizzare l'arseniato come è stato riscontrato in altre specie vegetali tramite la sua conversione in arsenico (III). L'arsenico (III) è molto più tossico dell'arseniato e può essere rilasciato dalle radici: è una forma di detossificazione attuata da alcune specie vegetali che presuppone la presenza negli spazi metabolici cellulari di meccanismi di ossidoriduzione predisposti per la riduzione dell'arseniato. Questi studi permetteranno di comprendere il comportamento del *Pennisetum clandestinum* (da qui denominato kikuyu) in presenza di arseniato valutandone i limiti e le capacità: premesse per realizzazione di efficienti sistemi di fitodepurazione grazie all'utilizzazione di specie vegetali con specifiche caratteristiche.

