

Università degli Studi di Napoli Federico II



Facoltà di Agraria

Dipartimento di Scienze del Suolo della Pianta dell' Ambiente e delle Produzioni Animali

Dottorato di ricerca di Agrobiologia ed Agrochimica

XX ciclo

Sezione di Chimica Agraria

Tesi di Dottorato

***Mobilità e Fitodisponibilità di Arsenico
in Suoli Inquinati***

Tutore

Ch.mo Prof. Antonio Violante

Dottoranda

Dott.ssa Aegle Branco

Anni Accademici 2004-2007

Indice

Parte Generale

1-Introduzione

<i>1.1-Proprietà fisiche e chimiche dell'arsenico</i>	1
<i>1.2-Fonti di arsenico nell'ambiente</i>	1
<i>1.2.1-Fattori naturali</i>	1
<i>1.2.2-Fattori antropici</i>	3
<i>1.3-L'arsenico nell'atmosfera</i>	5
<i>1.4-L'arsenico nel suolo</i>	6
<i>1.4.1-Mobilità dell'arsenico nel suolo</i>	7
<i>1.4.1.1-Interazione dell'arsenico con i principali costituenti del suolo</i>	8
<i>1.4.1.2-Competizione arseniato-fosfato nei suoli</i>	11
<i>1.4.2-Frazionamento dell'arsenico nel suolo</i>	11
<i>1.5-L'arsenico nell'acqua</i>	13
<i>1.5.1-Abbondanza e distribuzione dell'arsenico nelle acque naturali</i>	14
<i>1.6-L'arsenico nella pianta</i>	15
<i>1.6.1-Piante iperaccumulatrici e piante tolleranti</i>	18
<i>1.6.2-Fenomeni di tossicità e resistenza indotti nelle piante dall'arsenico</i>	19
<i>1.6.3-Fattori responsabili dell'assorbimento di arsenico da parte delle piante</i>	20
<i>1.6.4-Ruolo delle micorrize nella tolleranza delle piante all'arsenico</i>	23
<i>1.7-L'arsenico nell'uomo</i>	25
<i>1.7.1-Metabolismo e tossicità dell'arsenico</i>	26
<i>1.8-L'arsenico nel mondo</i>	27
<i>1.9-Siti inquinati da arsenico in Italia</i>	28
<i>1.9.1-Scarlino</i>	29
<i>1.9.1.1-Attività paleo-industriale</i>	30

1.9.1.2-Attività industriale.....	31
1.9.1.3-Sedimenti alluvionali e fluviali.....	33
1.9.1.4-Suoli.....	35

2-Scopo del lavoro

2.1-Arsenico e piante alimentari.....	37
---------------------------------------	----

Parte Sperimentale

3-Materiali e Metodi

3.1-Campionamento suoli.....	40
3.1.1-Localizzazione geomorfologica dell'area di campionamento dei suoli inquinati.....	40
3.1.2-Campionamento dei suoli inquinati.....	40
3.1.3-Descrizione dell'area di campionamento del suolo non inquinato.....	42
3.1.4-Modalità di campionamento.....	42
3.2-Analisi chimico-fisiche.....	43
3.2.1-Analisi fisiche.....	43
3.2.1.1-Determinazione della granulometria.....	43
3.2.1.2-Determinazione della conduttività elettrica.....	43
3.2.2-Analisi chimiche.....	43
3.2.2.1-Determinazione del grado di reazione (pH).....	43
3.2.2.2-Determinazione del "calcare totale".....	43
3.2.2.3-Determinazione del calcare attivo.....	44
3.2.2.4-Determinazione del carbonio organico e della sostanza organica.....	44
3.2.2.5-Determinazione dell'azoto totale.....	44
3.2.2.6-Determinazione del fosforo assimilabile.....	44
3.2.2.7-Determinazione della capacità di scambio cationico (C.S.C.).....	45
3.2.2.8-Determinazione delle basi di scambio.....	45

3.2.2.9-Determinazione del ferro e dell'alluminio estraibili.....	45
3.2.2.10-Determinazione dell'arsenico totale.....	46
3.2.2.11-Estrazione sequenziale dell'arsenico.....	46
3.3-Prove di crescita di piante alimentari su suoli	
<i>naturalmente e artificialmente inquinati</i>	47
3.3.1-Prove di crescita di piante alimentari su suoli inquinati.....	47
3.3.1.1-Prove di crescita di <i>Triticum durum</i> L.....	47
3.3.1.2-Prove di crescita di <i>Lactuca sativa</i> L.....	48
3.3.1.3-Preparazione delle soluzioni concimanti.....	48
3.3.1.4-Micorrize.....	49
3.3.2-Prove di crescita di piante alimentari	
<i>irrigate con acque inquinate artificialmente</i>	49
3.3.2.1-Prove di crescita di <i>Triticum durum</i> L.....	50
3.3.2.2-Preparazione delle soluzioni di arsenico.....	50
3.3.2.3-Preparazione delle soluzioni concimanti.....	50
3.4-Raccolta ed essiccazione dei tessuti vegetali.....	50
3.5-Determinazione della concentrazione di As e P totale nei tessuti vegetali.....	51

4-Risultati e Discussione

4.1-Assorbimento di arsenico in piante di grano	
(<i>Triticum durum</i> cv. <i>Creso</i>) allevate su suoli inquinati.....	52
4.1.1- Caratteristiche chimico-fisiche dei suoli inquinati.....	52
4.1.2.-Arsenico totale ed estrazione sequenziale.....	54
4.1.3-Crescita delle piante e tossicità da arsenico.....	57
4.1.4-Concentrazione di As nei tessuti vegetali.....	60
4.1.5-Considerazioni conclusive.....	65
4.2-Assorbimento di arsenico in piante di lattuga	
(<i>Lactuca sativa</i> cv. <i>Trocadero</i>) allevate su suolo inquinato.....	67
4.2.1- Caratteristiche chimico-fisiche del suolo inquinato.....	67
4.2.2-Crescita delle piante e tossicità da arsenico.....	67
4.2.3-Concentrazione di As e P nei tessuti vegetali.....	71
4.2.4-Considerazioni conclusive.....	82

<i>4.3-Assorbimento di arsenico in piante di grano</i>	
<i>(Triticum durum cv. Creso) irrigate con acque inquinate artificialmente.....</i>	<i>83</i>
<i>4.3.1- Caratteristiche chimico-fisiche del suolo non inquinato</i>	<i>83</i>
<i>4.3.2- Crescita delle piante e tossicità da arsenico.....</i>	<i>83</i>
<i>4.3.3- Concentrazione di As e P nei tessuti vegetali.....</i>	<i>89</i>
<i>4.3.4- Considerazioni conclusive.....</i>	<i>100</i>

5-Conclusioni

<i>5.1-Arsenico e agricoltura</i>	<i>101</i>
---	------------

<i>Bibliografia.....</i>	<i>104</i>
---------------------------------	-------------------

Parte Generale

1-Introduzione

1.1-Proprietà fisiche e chimiche dell'arsenico

L'Arsenico (numero atomico 33; massa atomica 74,9216) è un metalloide appartenente al V gruppo della tavola periodica degli elementi. Il numero di massa atomica dei suoi isotopi varia tra 68 e 80 ma solo l'isotopo 75 è stabile.

Allo stato elementare è un solido che si presenta in tre forme allotropiche: gialla (alfa), nera (beta) e grigia (gamma). La forma grigia, romboedrica, è la più stabile temperatura ambiente. Sublima a 630°C e ha una tensione di vapore di 1 mm Hg a 372°C. Si combina rapidamente con cloro e fluoro a caldo e con molti metalli e non metalli. È un elemento molto reattivo. L'Arsenico può presentare vari stati di ossidazione (-3, 0, +3, +5) e rinvenirsi in natura in forme sia organiche che inorganiche.

1.2-Fonti di arsenico nell'ambiente

L'arsenico giunge negli ambienti terrestri ed acquatici a causa della concomitante azione di fattori naturali ed antropici. La maggior parte dei problemi ambientali legati alla presenza di questo inquinante derivano dalla sua naturale mobilizzazione. Tuttavia le attività antropiche hanno contribuito, in modo non trascurabile, ad incrementare l'inquinamento da arsenico di suoli ed acque (Smedley e Kinniburgh, 2002).

Le cause naturali sono da ricercarsi principalmente nei processi di pedogenesi, nell'attività biologica e vulcanica. Le attività antropiche responsabili dell'accumulo di arsenico nell'ambiente sono rappresentate, invece, dall'attività mineraria e di fusione di metalli, dalla combustione di rifiuti, dalla produzione di energia con combustibili fossili, quali carbone o petrolio, dall'applicazione di insetticidi, erbicidi e fungicidi a base di arsenico, di fertilizzanti e di prodotti per la protezione del legno (Adriano, 2001). Sebbene molti prodotti a base d'arsenico siano stati banditi nelle ultime decadi (pesticidi, erbicidi), alcuni di questi vengono ancora oggi impiegati, ad esempio per preservare il legno dall'attacco di parassiti. L'impatto sull'ambiente derivante dal largo uso fatto, soprattutto in passato, di tali composti perdurerà negli anni (Smedley e Kinniburgh, 2002).

1.2.1-Fattori naturali

L'arsenico è un elemento in traccia estremamente tossico ed ubiquitario, presente mediamente in ogni comparto ambientale e negli organismi viventi (Cullen e Reimer,

1989). Nella crosta terrestre è ventesimo per abbondanza con una quantità di circa 1,5-3 mg kg⁻¹ (Mandal e Suzuki, 2002; Frankeberg, W.T., 2002).

L'arsenico è presente come costituente principale in più di 200 minerali, dei quali approssimativamente il 60% sono arseniati, il 20% solfati e il restante 20% arseniti, ossidi, silicati ed arsenico elementare (As) (Smedley e Kinniburgh, 2002). La concentrazione più elevata dei minerali dell'arsenico si riscontra in aree minerarie, dove si rinvengono in stretta associazione con metalli di transizione come Cd, Pb, Ag, Au, Sb, P, W e Mo. Il più abbondante minerale puro dell'arsenico è l'arsenopirite (FeAsS), seguito da altri due minerali arsenosolfati quali il realgar e l'orpimento. I principali minerali dell'As sono riportati in Tabella 1.

Le concentrazioni di arsenico che si riscontrano nei vari tipi di rocce sono piuttosto variabili. Nelle rocce ignee sono generalmente basse, Ure e Berrow (1982) riportano un valore medio di 1.5 mg kg⁻¹ per tutti i tipi di rocce ignee. Quelle con un maggiore contenuto di silice presentano valori lievemente più alti ma generalmente inferiori a 5 mg kg⁻¹. I vetri vulcanici sono gli unici che presentano valori abbastanza elevati, intorno ai 5.9 mg kg⁻¹. Comunque, in genere, c'è una differenza relativamente piccola, in termini di contenuto in As, tra i differenti tipi di rocce ignee.

La concentrazione di arsenico nelle rocce metamorfiche tende a riflettere la concentrazione delle rocce ignee e sedimentarie dalle quali derivano. La maggior parte ne contiene circa 5 mg kg⁻¹ o meno.

Nelle rocce sedimentarie, invece, la concentrazione è più alta ed è generalmente compresa tra 5 e 10 mg kg⁻¹ (Webster, 1999). Le sabbie e le arenacce (rocce di sabbia cementate con argilla o quarzo) tendono ad averne quantità più basse, riflettendo la scarsa dotazione in arsenico dei loro minerali dominanti, quali il quarzo e i feldspati. In media le arenacce presentano circa 4 mg kg⁻¹ dell'elemento tossico. Depositi di argilla hanno una concentrazione più alta rispetto alle arenacce, tipicamente intorno ai 13 mg kg⁻¹. L'alto valore riflette la più elevata proporzione di solfati, ossidi, sostanza organica e argilla contenuti.

Alte concentrazioni di arsenico si riscontrano in rocce ricche di ferro, Boyle e Jonasson (1973) riportano in tali rocce valori superiori a 2900 mg kg⁻¹. Anche le fosforiti sono ricche di arsenico con un quantità di circa 400 mg kg⁻¹.

Per quanto riguarda i sedimenti non consolidati, fanghi e argille solitamente hanno un contenuto di arsenico variabile tra 3-10 mg kg⁻¹, in funzione della loro tessitura e

mineralogia. Elevate concentrazioni riflettono una forte presenza di pirite e ossidi di Fe. Un incremento di arsenico nei sedimenti si osserva in aree minerarie.

L'arsenico e le sue forme si ritrovano in vari tipi di depositi metalliferi (Mandal e Suzuki, 2002).

Tabella 1. Principali minerali dell'arsenico presenti in natura

Minerali	Composizione	Presente in
<i>Arsenico nativo</i>	As	Vene idrotermali
<i>Niccolite</i>	NiAs	Vene e depositi di noriti
<i>Realgar</i>	AsS	Depositati, spesso associato con orpimento e argilla e marmo. Depositati di sorgenti termali
<i>Orpimento</i>	As ₂ S ₃	Vene idrotermali, sorgenti termali, prodotto di sublimazione vulcanica
<i>Cobaltite</i>	CoAsS	Rocce metamorfiche
<i>Arsenopirite</i>	FeAsS	Vene minerali
<i>Tennantite</i>	(Cu, Fe) ₁₂ As ₄ S ₁₃	Vene idrotermali
<i>Elargite</i>	Cu ₃ AsS ₄	Vene idrotermali
<i>Arsenolite</i>	As ₂ O ₃	Minerale secondario formato dall'ossidazione dell'arsenopirite, arsenico nativo ed altri minerali dell'arsenico
<i>Claudetite</i>	As ₂ O ₃	Minerale secondario formato dall'ossidazione di realgar, arsenopirite ed altri minerali dell'arsenico
<i>Scorodite</i>	FeAsO ₄ ·2H ₂ O	Minerale secondario
<i>Annabergite</i>	(Ni, Co) ₃ (AsO ₄) ₂ ·8H ₂ O	Minerale secondario
<i>Hoernesite</i>	Mg ₃ (AsO ₄) ₂ ·8H ₂ O	Minerale secondario
<i>Conichalcite</i>	CaCu(AsO ₄)(OH)	Minerale secondario
<i>Pharmacosiderite</i>	Fe ₃ (AsO ₄) ₂ (OH) ₃ ·5H ₂ O	Prodotto dell'ossidazione dell'arsenopirite ed altri minerali dell'As

Smedley e Kinnisburgh (2002)

1.2.2-Fattori antropici

Attività industriali. Il triossido di arsenico (As₂O₃) è la forma più comune con cui numerose industrie liberano arsenico nell'ambiente. In particolare rilasciano notevoli quantità di arsenico le industrie di ceramiche, le industrie produttrici di componenti elettronici (semiconduttori, circuiti integrati), le industrie di cosmetici, le industrie tessili, i colorifici e le vetrerie. L'arsenico e i suoi derivati trovano diversi impieghi nelle lavorazioni odierne: unito al piombo viene utilizzato per la preparazione di pallini da caccia; allo stato di estrema purezza trova applicazione in elettronica per le sue proprietà semiconduttrici; viene utilizzato anche come componente di leghe metalliche nelle quali, introdotto in piccole quantità, ha la proprietà di conferire durezza e resistenza termica (produzione di acciaio, ottone e piombo).

Attività minerarie. L'arsenico è un componente naturale dei minerali che contengono Pb, Zn, Cu e Au e, conseguentemente, durante i processi minerari di estrazione e fusione sono frequenti fenomeni di contaminazione di suoli, sedimenti, corsi d'acqua (fiumi e laghi), acque di falda e atmosfera.

Li and Thornton (1993), studiando la contaminazione da arsenico nel suolo di alcune aree minerarie dell'Inghilterra (Derbyshire, Cornwall, Somerset), hanno riscontrato nei primi 15 cm di suolo concentrazioni di arsenico molto elevate (16-925 mg kg⁻¹ di suolo). Questi autori hanno inoltre dimostrato che durante i processi di fusione dei minerali contenenti Cu, Pb, Zn e Au avviene un ingente rilascio di arsenico nell'atmosfera.

Processi di combustione del carbone. Le concentrazioni di arsenico presenti nel carbone sono piuttosto variabili (2-82 mg kg⁻¹) in funzione dell'origine geologica (Adriano et al., 1980). Sebbene concentrazioni di 2.5-17 mg kg⁻¹ siano state riportate da Palmer e Klizas (1997), alcuni campioni di carbone hanno mostrato quantità del metalloide molto elevate, addirittura pari a 35.000 mg kg⁻¹ (Belkin et al., 2000). La combustione del carbone, oltre a determinare il rilascio di arsenico nell'atmosfera, determina la produzione di ingenti quantità di ceneri leggere (fly ash) e pesanti (bottom ash) contenenti arsenico, il che ne riduce drasticamente le possibilità di impiego (Beretka and Nelson, 1994). E' stato in particolare osservato che il contenuto di arsenico presente nelle ceneri è inversamente proporzionale alla dimensione delle particelle di cenere. Le particelle di cenere più piccole sono dunque quelle più pericolose, anche perché possono essere trasportate ad una certa distanza dal luogo di produzione e successivamente ricadere (fall-out) contaminando il suolo e le acque superficiali.

Attività agricola. In agricoltura l'uso indiscriminato di prodotti a base di arsenico (fino agli anni 50-60) ha determinato in vaste zone agricole, in particolare in quelle ad intensa vocazione florovivaistica, un elevato accumulo di questo elemento. Negli ultimi anni, nei paesi maggiormente sviluppati, gran parte dei pesticidi e dei diserbanti contenenti arsenico sono stati banditi dall'agricoltura. Tuttavia in molti paesi in via di sviluppo tali prodotti vengono tutt'oggi ampiamente utilizzati arrecando gravissimi danni al sistema suolo-acqua-pianta, e di conseguenza agli animali superiori.

In passato sono stati adoperati in agricoltura numerosi pesticidi (insetticidi e anticrittogamici) a base di arsenico: arseniato di piombo (PbAsO₄), arseniato di calcio (CaAsO₄), arseniato di magnesio (MgAsO₄), arseniato (ZnAsO₄) e arsenito (ZnAsO₃) di

zinco, etc, i quali sono stati per lunghi anni utilizzati in pieno campo e soprattutto sotto serra per la difesa di specie floricole ad alto reddito.

Studi condotti da alcuni ricercatori australiani hanno evidenziato che in numerosi suoli del sud dell'Australia e della Tasmania, adibiti alla coltivazione delle orchidee, le concentrazioni di arsenico superano i 2500 mg kg⁻¹. Ure e Berrow (1982) hanno rilevato, in suoli coltivati a frutteto, concentrazioni del metalloide variabili tra 366 e 732 mg kg⁻¹ a causa di continue applicazioni di pesticidi a base d'arsenico per il trattamento delle colture. Prove sperimentali sull'uso di pesticidi contenenti arsenico nella zootecnia australiana hanno inoltre evidenziato la capacità di quest'elemento di accumularsi nei tessuti animali e di mantenersi su livelli di concentrazione piuttosto elevati anche dopo la macellazione del bestiame, con conseguenze assai negative per la salute dell'uomo (Vaughan, 1993).

Un'altra causa di contaminazione è la presenza dell'arsenico come impurezza nei fertilizzanti commerciali. Ripetute fertilizzazioni comportano nel lungo periodo un accumulo di As nel suolo. In particolare, i concimi fosfatici possono contenere quantità talvolta elevate di arsenico sotto forma di impurezza. Charter et al. (1995) hanno osservato, studiando il contenuto di metalli pesanti presenti in concimi fosfatici di diversa natura, che l'arsenico è l'elemento maggiormente rappresentato, pur mostrando un contenuto estremamente variabile (fosfato monoammionico, 8.1 – 17.8 mg kg⁻¹; fosfato biammonico, 6.8 – 12.4 mg kg⁻¹).

1.3-L'arsenico nell'atmosfera

L'arsenico arriva nell'atmosfera attraverso l'erosione del suolo esercitata dal vento, le emissioni vulcaniche, la volatilizzazione dell'elemento dal suolo, gli aerosol di acqua di mare, l'inquinamento antropico, e ritorna sulla superficie della Terra attraverso deposizioni umide e secche. L'arsenico atmosferico consiste principalmente di As₂O₃ in polvere (Cullen and Reimer, 1989). Nriagu e Pacyna (1988) hanno stimato che le fonti antropiche dell'elemento tossico nell'atmosfera (circa 18.8 ton/anno) ammontano a circa il 70% del flusso globale di As atmosferico.

Nell'aria, l'arsenico è presente prevalentemente adsorbito come arsenito e arseniato su particelle di materia, mentre le specie organiche sono di scarsa importanza ad eccezione

di aree caratterizzate dall'uso di pesticidi a base dell'elemento tossico (Mandal e Suzuki, 2002).

L'esposizione dell'uomo all'arsenico attraverso l'aria è generalmente molto bassa, normalmente la sua concentrazione ha un range variabile tra 0.4 e 30 ng m⁻³ (*World Health Organization* - WHO, 1996). La quantità di As inalata ogni giorno è circa 50 ng o meno (considerando che ogni giorno vengono inalate circa 20 m³ di aria) in aree incontaminate (WHO, 1981).

I livelli tipici di As per le regioni europee si aggirano tra 0.2 e 1.5 ng m⁻³ in aree rurali, 0.5 e 3 ng m⁻³ in aree urbane e non più di 50 ng m⁻³ in aree industriali (Mandal e Suzuki, 2002). Le concentrazioni di As nelle acque di pioggia e nella neve in aree rurali sono invariabilmente basse e tipicamente minori di 0.03 µg l⁻¹; in aree interessate da attività di fonderia ed emissioni vulcaniche sono generalmente più alte. Infatti, Andreae (1980) ha riscontrato nella pioggia di tali aree una concentrazione di As di circa 0.5 µg l⁻¹. A meno che non siano significativamente contaminate da fonti industriali, le precipitazioni atmosferiche contribuiscono poco all'arricchimento in As dei corpi d'acqua superficiali e sotterranei (Smedley e Kinniburgh, 2002).

1.4-L'arsenico nel suolo

La concentrazione di arsenico in suoli non contaminati può variare da 1 a 40 mg kg⁻¹, con più basse concentrazioni in suoli sabbiosi, o derivanti da granito, e più elevate in suoli alluvionali ed organici (Mandal e Suzuki, 2002). In ogni caso, generalmente, è inferiore a 10 mg kg⁻¹ (Fitz e Wenzel, 2002).

Nel suolo l'arsenico è presente con una grande varietà di forme sia organiche che inorganiche. Le forme inorganiche sono le più abbondanti, presenti soprattutto in minerali ferrosi e solfuri di origine vulcanica come l'arsenopirite (FeAs), realgar (AsS) e orpimento (As₂S₃) (Huang, 1994). Le principali forme inorganiche sono rappresentate dall'arseniato (V) e dall'arsenito (III) (Manning e Goldberg, 1997; Frankenberg, 2002).

I composti organici dell'arsenico possono essere trasformati per biometilazione (aggiunta di CH₃ attraverso l'attività biologica) in suolo, acqua e all'interfaccia acqua-sedimenti, attraverso l'attività di batteri (*Escherichia coli*, *Flavobacterium sp.*, *Methanobacterium sp.*) e funghi (*Aspergillus glaucus*, *Candida humicola*). In condizioni ossidanti si ha la formazione di acido monometilarsinico (MMA), acido

dimetiliarsinico (DMA) e ossido di trimetilarsina (TMAO). Tuttavia, usualmente solo le prime due specie organiche si ritrovano in concentrazioni rilevabili nel suolo oltre ad abbondanti concentrazioni di specie inorganiche, As(V) e As(III) (Figura 1).

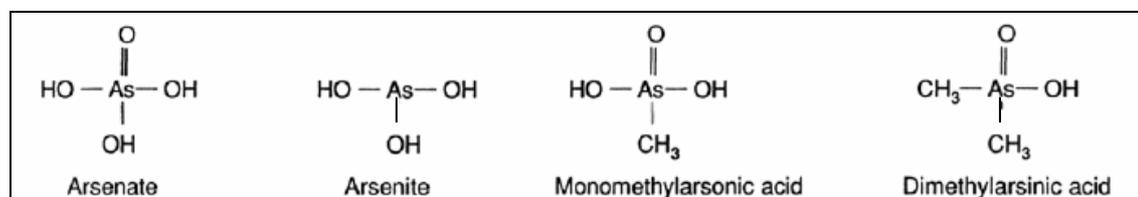


Figura 1. Struttura chimica delle principali specie dell'arsenico estratte dal suolo

La tossicità ed il comportamento chimico dei composti dell'arsenico sono largamente influenzati dalla specie presente. In generale, i composti inorganici sono più tossici dei composti organici e lo stato trivalente è più tossico dello stato pentavalente (Adriano, 2001).

1.4.1-Mobilità dell'arsenico nel suolo

Determinare la reattività e la mobilità di arsenico in suoli e sedimenti è complicato dalle reazioni di ossidoriduzione, precipitazione e dissoluzione, dall'attività biologica e dall'adsorbimento sulle superfici dei minerali e sulla sostanza organica (Manning e Goldberg, 1997). È noto che l'arsenico ha un'elevata affinità per le superfici degli ossidi, affinità influenzata da numerosi fattori biogeochimici quali, tessitura del suolo, sostanza organica, natura dei minerali, pH, potenziale redox e competizione tra ioni (Adriano, 2001). L'adsorbimento delle forme inorganiche dell'As sulle superfici dei minerali del suolo è un processo estremamente importante poiché influenza la mobilità dell'elemento stesso (Zhang e Sparks, 1989) e rappresenta quindi uno dei fenomeni fondamentali per la comprensione dei meccanismi di biodisponibilità del metalloide nel sistema suolo-acqua-pianta (Sun e Doner, 1996; Raven et al., 1998)

In ambienti mediamente ossidanti della superficie terrestre l'arsenico è dotato di bassa mobilità, tendendo a precipitare come arseniato con vari ioni polivalenti come Fe, Zn, Pb, Cu, etc., o ad essere adsorbito sulle superfici di ossidi di metalli (Fe, Al, Mn) e minerali argillosi. La mobilità chimica dell'elemento è quindi essenzialmente espletata dalla specie trivalente e si realizza in sistemi particolarmente riducenti, come ad esempio in zone palustri per il decadimento anaerobico della sostanza organica (Tanelli

et al., 2003). Inoltre, ci si può aspettare che la mobilità dell'As adsorbito sia sostanzialmente differente nei suoli in base alla durata del periodo in cui essi hanno ricevuto As in seguito ad attività antropiche (Wenzel et al., 2002). È stato dimostrato che l'As diventa rapidamente recalcitrante nel suolo con il passar del tempo (Lombi et al., 1999), risultandone una riduzione di tossicità. Infatti, il metalloide adsorbito sui minerali del suolo forma, nel tempo, complessi di superficie sempre più stabili, può lentamente penetrare nei micropori o formare dei precipitati con Fe ed Al diventando sempre meno desorbibile, biodisponibile e tossico (Frenkenberg, 2002; Sparks, 2003; Pigna et al., 2006).

1.4.1.1-Interazione dell'arsenico con i principali costituenti del suolo

I principali costituenti del suolo sono brevemente descritti nel sottostante riquadro.

Minerali argillosi. Principali componenti inorganici del suolo. Strutturalmente simili ai fillosilicati (classe di silicati alla quale appartengono), caratterizzati dalla sovrapposizione di foglietti tetraedrici ed ottaedrici (strati). Hanno forma e dimensioni differenti e sono scambiatori di cationi con un'ampia superficie esterna che presenta numerosi gruppi reattivi di spigolo e vertice.

Sostanza organica. Costituita principalmente da residui vegetali, animali, e da resti di microrganismi, che degradandosi liberano molecole e ioni. In seguito ad un processo di risintesi, queste unità strutturali si riorganizzano a formare macromolecole note come sostanze umiche, costituite da varie frazioni: umina, acidi umici, acidi fulvici. Presentano carattere colloidale, ampia superficie specifica e capacità di adsorbire reversibilmente molecole e ioni

Minerali a carica variabile (ossidi, ossidrossidi di Fe, Al, Mn, Ti, etc.). Hanno una carica di superficie, positiva o negativa, che si localizza in corrispondenza di legami di valenza non soddisfatti, ai margini della struttura, o derivati da interruzione dell'organizzazione cristallina. Sono capaci di fissare ioni H^+ e OH^- dall'acqua. La carica superficiale è pH dipendente e diviene più positiva al diminuire del pH della soluzione, mentre diminuisce e diviene negativa all'aumentare del pH. Presentano diversi gradi di cristallinità e adsorbono anioni (prevalentemente) e cationi polivalenti.

L'adsorbimento dell'arsenico nel suolo avviene prevalentemente su minerali a carica variabile ed in parte minore su gruppi $-OH_2$ di spigolo e di vertice di fillosilicati.

Si è osservato, utilizzando metodologie EXAFS (X-ray adsorption fine structure), che ioni arseniato vengono adsorbiti sulle superfici dei minerali a carica variabile formando "inner-sphere complexes", ovvero legami covalenti molto forti (Sparks, 1999). Tali legami possono essere monodentati, bidentati mononucleari e/o bidentati binucleari in

proporzioni differenti a seconda delle caratteristiche delle superfici degli adsorbenti (Figura 2).

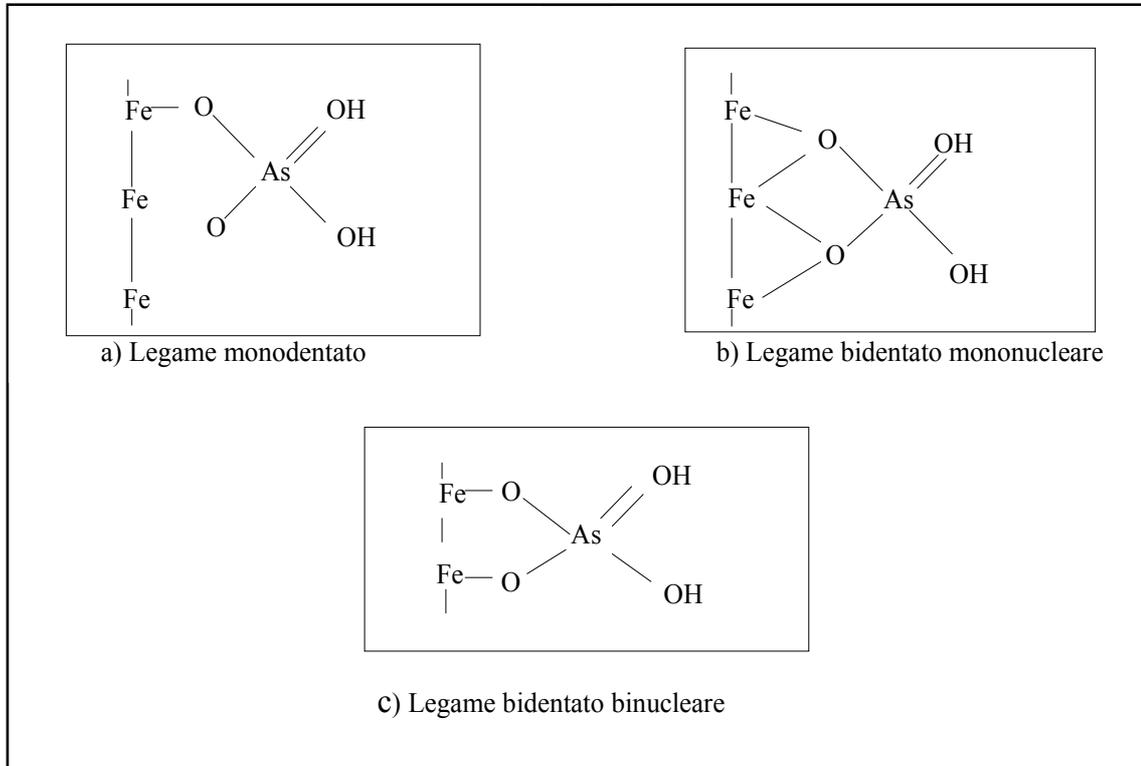


Figura 2. "Inner-Sphere complexes" di ioni arseniato su ossidi di ferro

La natura degli adsorbenti riveste un ruolo fondamentale nei fenomeni di adsorbimento dell'arsenico. Recenti studi condotti su ossidi di ferro, alluminio e manganese hanno evidenziato che ioni arseniato sono adsorbiti con maggiore affinità sugli ossidi di manganese e ferro piuttosto che su quelli di alluminio, mentre gli ioni arsenito sono fortemente fissati sulle superfici di ossidi di ferro ma molto debolmente su ossidi di alluminio (Violante e Pigna, 2002; Violante et al, 2006, 2007a).

Le forme di As presenti nel suolo e la loro solubilità dipendono oltre che dal tipo e dalla quantità dei componenti adsorbenti, anche dal pH e dal potenziale redox. Arseniato di Fe e di Al (AlAsO_4 , FeAsO_4) sono dominanti nei suoli acidi e sono meno solubili dell'arseniato di Ca (Ca_3AsO_4), la principale forma dell'As in suoli alcalini e calcarei. Studi condotti usando suoli o idrossidi puri di Fe hanno evidenziato che la mobilità dell'As(V) aumenta all'aumentare del pH in un intervallo di pH comunemente

riscontrato nei suoli (3-8), mentre l'As(III) tende ad assumere un comportamento opposto (Manning and Goldberg, 1997; Smith et al., 1999; Raven et al., 1998).

Anche il potenziale redox influenza significativamente la speciazione e la solubilità dell'elemento tossico nel suolo. In condizioni ossidanti (alto potenziale redox), in ambienti aerobi, l'arseniato è la specie stabile ed è fortemente adsorbita su argille, ossidi e idrossidi di Fe e Mn e sulla sostanza organica. In condizioni riducenti (basso potenziale redox) l'arsenito è la forma predominante (Sadiq et al., 1983). Sotto l'influenza di fattori ossidanti, l' H_3AsO_3 nel suolo può essere rapidamente convertito in H_3AsO_4 . Il potenziale di ossidoriduzione teorico del sistema è 0.557 V a 20° C.

Si è osservato che l'aumento della solubilità dell'As in condizioni riducenti è associato alla dissoluzione di ossidi e idrossidi di Fe e Mn. Vi è una significativa correlazione tra dissoluzione del Fe e mobilità dell'As a conferma che tali componenti del suolo rappresentano i maggiori agenti di adsorbimento dell'inquinante (Masschelyn et al., 1991). Difatti, l'attività dell'arsenico nella soluzione del suolo è controllata principalmente dalle reazioni di complessazione su ossidi e idrossidi di Al, Mn e specialmente Fe (Inskip et al., 2002). La frazione tessiturale più piccola (argillosa, < 2 micrometri) contiene maggiori quantità di As adsorbite (Lombi et al., 2000), poiché in essa sono tipicamente concentrati ossidi e idrossidi che di solito presentano dimensioni estremamente ridotte. Questo spiega la più alta tossicità dei suoli inquinati a tessitura fine rispetto a quelli a tessitura grossolana (Jacobs et al., 1970).

Anche la sostanza organica gioca un ruolo importante nel determinare la mobilità del metalloide. Thanabalasingam e Pickering (1986) studiando l'adsorbimento di As(III) e As(V) su acidi umici, hanno dimostrato come questo sia influenzato dal pH e dalla concentrazione dell'elemento. Per l'As (V) il massimo adsorbimento sugli acidi umici si ha intorno a pH 5.5, mentre per l'As(III) si ha ad un pH più elevato. L'acido umico può essere un fattore importante nell'adsorbimento dell'inquinante in ambienti relativamente acidi. Viceversa in ambienti alcalini il rilascio o la solubilizzazione dell'arsenico è favorita. Xu et al. (1991) hanno mostrato che una bassa concentrazione di acido fulvico porta ad un'apprezzabile riduzione dell'adsorbimento di As su ossidi di alluminio. Questi acidi organici competono con l'arsenico per i siti di adsorbimento. Ciononostante quest'effetto è minore in condizioni acide (pH < 5.0) così come in condizioni alcaline (pH > 8.0).

1.4.1.2-Competizione arseniato-fosfato nei suoli

Il comportamento chimico degli ioni arseniato è molto simile a quello del fosfato, difatti entrambe gli anioni sono adsorbiti in maniera specifica dai costituenti del suolo formando sulle superfici dei minerali a carica variabile (ossidi di alluminio, ferro, manganese, allofane, imogolite) legami molto stabili di tipo *inner-sphere* (Sun e Doner, 1996; O'Reilly et al., 2001; Liu et al., 2001).

La mobilità dell'arseniato nel suolo in presenza di ioni fosfato è influenzata da numerosi fattori, quali: il pH, il rapporto molare arseniato/fosfato, la natura e le proprietà degli adsorbenti e il tempo di contatto tra gli anioni e le superfici adsorbenti.

L'applicazione di ingenti quantità di fertilizzanti fosfatici (pratica estremamente diffusa in agricoltura intensiva) può avere un ruolo importante nel rilascio di ioni arseniato e arsenito nella soluzione circolante, influenzando, quindi, anche sulla biodisponibilità di questo elemento per le piante (Peryea, 1991).

È stato osservato che il fosfato sposta l'arsenico adsorbito dai costituenti del suolo (Woolson et al., 1973; Peryea, 1991; Violante e Pigna, 2002; Violante et al., 2005b). Forti aggiunte di fosfato a suoli inquinati determinano uno spostamento approssimativamente del 77 % dell'arsenico totalmente presente, e la frazione di arsenico liberata viene ridistribuita ad una profondità maggiore lungo il profilo del suolo (Woolson et al. 1973).

Peryea (1991) ha osservato che, sebbene il fosfato incrementi la solubilità dell'arsenico, il desorbimento di quest'ultimo dipende dal tipo di suolo. Per i suoli vulcanici la concentrazione di arsenico in soluzione non varia dopo l'aggiunta di fosfato poiché questi suoli sono ricchi di allofani, che hanno una elevata capacità di fissare anioni. Ciò implica che solo elevate aggiunte di fosfato ad un suolo con tali caratteristiche possono influire sulla solubilità dell'arsenico.

1.4.2-Frazionamento dell'arsenico nel suolo

I metalli nel suolo possono essere presenti come ioni metallici (liberi, solubili, complessati, scambiabili, legati alla sostanza organica); in precipitati di diversa solubilità (ossidi, carbonati ed idrossidi), o possono partecipare alla formazione della struttura dei silicati. La tossicità dei metalli nel suolo dipende dalla loro mobilità e biodisponibilità, vale a dire dalla capacità di essere trasferiti dal suolo agli organismi viventi (Juste, 1988), funzione, non solo della concentrazione totale dell'elemento, ma

anche di fattori chimico-fisici (pH, Eh, sostanza organica, contenuto di argilla) e biologici (bioassorbimento, bioaccumulo, solubilizzazione).

Quanto detto suggerisce che ciò che è importante conoscere di un inquinante non è la sua quantità totale nell'ambiente ma, in particolare, il suo potenziale di mobilizzazione.

Una metodica semplice e ampiamente adottata per valutare i differenti pool di arsenico presenti nel suolo, e la loro relativa lability, è l'estrazione sequenziale del metalloide realizzata con reagenti caratterizzati da una forza di dissoluzione crescente. Idealmente, ciascun reagente va ad intaccare una specifica fase solida associata con l'elemento in traccia.

Basandosi sulla somiglianza chimica tra fosforo ed arsenico, Wenzel et al. (2001) hanno sviluppato e testato una procedura di estrazione sequenziale (*sequential extraction procedure-SEP*) per l'inquinante, modificando la versione di Chang e Jackson (1971) (citata da Wenzel et al., 2001) adoperata per distinguere i vari pool del fosfato. Si è assunto che il metalloide sia associato con costituenti del suolo simili a quelli cui risulta associato il P, ovvero Al, Fe, Ca e sostanza organica. Per l'arsenico però si conosce una più elevata affinità per gli idrossidi del Fe e dell'Al e, soprattutto in presenza di questi, una minore associazione con la sostanza organica.

La sequenza ottenuta per l'estrazione si compone di cinque steps. I cinque reagenti, adoperati in successione, sono caratterizzati da una forza di dissoluzione crescente e sono nell'ordine: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, NH_4^+ -ossalato, NH_4^+ -ossalato + acido ascorbico, $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$.

L' $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (I step) riesce ad estrarre l'arsenico non specificamente adsorbito in un unico step. L' $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (II step), invece, estrae la frazione del metalloide specificamente adsorbita sulle superfici dei minerali. È stato osservato che la soluzione di fosfato è efficiente nell'estrarre l'arsenico da differenti tipi di suolo. Infatti l'As e il P hanno una configurazione elettronica simile e, alla stessa concentrazione, il fosfato compete nel suolo con l'arsenico per i siti di adsorbimento localizzati sui minerali. È ragionevole pensare che un eccesso di $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ possa estrarre l'arsenico specificamente adsorbito dopo la rimozione dell'arsenico facilmente scambiabile effettuata con il precedente step. I risultati ottenuti dalla sperimentazione di Wenzel et al. (2001) evidenziano come l'ammonio ossalato (NH_4^+ -ossalato) sia efficiente nel solubilizzare gli idrossidi di Fe e Al amorfi (III step), e come in presenza di acido ascorbico solubilizzi gli ossidi di Fe e Al cristallini (IV step). L'ultimo step (V step)

consente di estrarre l'arsenico legato alla fase residua mediante una soluzione di $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (Wenzel et al., 2001).

In seguito all'applicazione di tale metodica Wenzel et al. (2001) mostrano che l'arsenico è prevalente nelle due frazioni estratte con l'ossalato, indicando così che il metalloide è principalmente associato con ossidi di Fe amorfi e cristallini. La frazione estratta con $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ rappresenta circa il 10% dell'arsenico totalmente estratto. La frazione labilmente adsorbita, ed estratta con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, è generalmente piccola ma può rappresentare il dato più importante relativamente al rischio ambientale, difatti è correlata con la concentrazione di arsenico presente nella soluzione del suolo.

Risultati analoghi sono stati ottenuti da Martin et al. (2007) analizzando suoli del Bangladesh irrigati con acque di falda inquinate da As.

La procedura di estrazione realizzata da Wenzel et al. consente quindi di estrarre, nell'ordine, le seguenti cinque frazioni del metalloide: i) As non specificamente adsorbito; ii) As specificamente adsorbito; iii) As presente in idrossidi amorfi di Fe ed Al; iv) As presente (fortemente legato o coprecipitato) in idrossidi cristallini di Fe e Al; v) As residuale. Tali frazioni danno informazioni sulla potenziale labilità dell'inquinante, in particolare l'arsenico estratto con i primi tre steps rappresenta quello più labile e quindi maggiormente biodisponibile.

1.5-L'arsenico nell'acqua

Esistono varie vie di esposizione dell'uomo all'arsenico, la più importante è probabilmente l'ingestione dell'elemento tossico attraverso l'acqua e gli alimenti. La contaminazione del suolo è una delle maggiori fonti di arsenico nell'acqua potabile (National Research Council, 1999; Le et al., 2000). Per alcuni decenni il livello di contaminazione massimo consentito nelle acque potabili è stato pari a $50 \mu\text{g l}^{-1}$, ma recentemente la WHO lo ha abbassato a $10 \mu\text{g l}^{-1}$ (WHO, 2001). La concentrazione di arsenico in acque non inquinate è solitamente compresa in un range che va da 1 a $10 \mu\text{g l}^{-1}$, con un aumento fino a $100\text{-}5000 \mu\text{g l}^{-1}$ in aree minerarie. Alti livelli di As sono stati riscontrati in acque di aree caratterizzate da attività termale, come in Nuova Zelanda (8.5 mg l^{-1}) e in Giappone ($1.8\text{-}6.4 \text{ mg l}^{-1}$) (Mandal e Suzuki, 2002).

Come nel suolo, l'As è presente nelle acque naturali soprattutto in forma inorganica, come ossianione trivalente (arsenito) o pentavalente (arseniato). Le forme organiche

possono essere prodotte dall'attività biologica, specialmente nelle acque superficiali, ma di rado sono quantitativamente importanti. Tuttavia, possono ritrovarsi dove l'acqua è significativamente inquinata dall'attività industriale.

Anche in ambiente acquatico il potenziale redox e il pH sono fattori molto importanti nel controllare la speciazione dell'As. In condizioni ossidanti e a bassi valori di pH H_2AsO_4^- è dominante (pH < 6.9), mentre ad alti valori di pH diventa dominante HAsO_4^{2-} (H_3AsO_4 e AsO_4^{3-} possono essere presenti rispettivamente in condizioni estremamente acide ed alcaline). In condizioni riducenti, e a pH < 9.2, la specie trivalente l'arsenito predomina.(Yan et al., 2000).

Oltre l'arsenico molti altri elementi in traccia si rinvergono in soluzione, in forma cationica (Pb^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}), e tendono a diventare insolubili all'aumentare del pH per formazione di idrossidi. In condizioni di pH prossime alla neutralità, tipiche delle acque sotterranee, la solubilità di molti cationi metallici è drasticamente limitata dalla precipitazione o la coprecipitazione con ossidi, idrossidi, carbonati o fosfati, o per forte adsorbimento su idrossidi e ossidi di metalli, su fillosilicati o sostanza organica. Al contrario, molti ossianioni, incluso l'arseniato, tendono a diventare meno fortemente adsorbiti in tali condizioni e a persistere a concentrazioni relativamente alte (decine di $\mu\text{mol l}^{-1}$) (Dzombak e Morel, 1990). Inoltre, rispetto ad altri ossianioni tossici, l'As è tra i più pericolosi nell'ambiente a causa della sua mobilità in un ampio range di condizioni redox. Difatti, gli ossianioni appaiono essere poco mobili in condizioni riducenti, mentre l'As si distingue risultando più mobile e in concentrazioni di alcuni mg l^{-1} quando tutti gli altri ossianioni sono presenti in concentrazioni dell'ordine di $\mu\text{g l}^{-1}$ (Smedley e Kinniburgh, 2002)

1.5.1-Abbondanza e distribuzione dell'arsenico nelle acque naturali

La concentrazione di arsenico nelle acque dolci varia in funzione della fonte e dall'ambiente geochimico. In condizioni naturali la più alta concentrazione di As è presente nelle acque sotterranee, a causa della forte interazione acqua-roccia e della maggiore probabilità che negli acquiferi si creino le condizioni fisiche e geochimiche favorevoli per la mobilizzazione e l'accumulo dell'elemento. Nelle acque sotterranee di molti paesi la concentrazione di arsenico è minore di $10 \mu\text{g l}^{-1}$ e qualche volta sostanzialmente più bassa. Tuttavia la letteratura riporta range molto ampi, da 0.5 a $5000 \mu\text{g l}^{-1}$, riscontrati in condizioni naturali. Alte concentrazioni si ritrovano in acque

sotterranee in condizioni sia riducenti che ossidanti ed in aree ad elevata attività geotermale, mineraria e industriale. Le acque di mare ordinariamente contengono 0.001-0.008 mg l⁻¹ di arsenico. La concentrazione del metalloide nelle acque di fiume è più bassa (0.1-0.8 µg l⁻¹ ma può talvolta arrivare a 2 µg l⁻¹). Il contenuto è fortemente influenzato dalla litologia del substrato roccioso. Concentrazioni relativamente alte possono trovarsi naturalmente in alcune aree influenzate da fonti geotermali o da acque sotterranee ricche di As. La concentrazione nelle acque di fiume di aree geotermali tipicamente si aggira tra i 10 ed i 70 µg l⁻¹ (es. USA e Nuova Zelanda) (Smedley e Kinniburgh, 2002). Nimik et al. (1998) riportano concentrazioni di As di 370 µg l⁻¹ nelle acque del fiume Madison (Wyoming e Montana) come conseguenza dell'attività del sistema geotermale di Yellowstone. La concentrazione di As in acque di lago è tipicamente vicina o più bassa rispetto a quella delle acque di fiume. Anche l'evaporazione può accrescerne sostanzialmente la concentrazione (Smedley e Kinniburgh, 2002).

1.6-L'arsenico nella pianta

La presenza di arsenico in suoli e corsi d'acqua fa sì che l'elemento tossico si rinvenga nei tessuti di diverse specie vegetali. È ormai generalmente accettato che il trasferimento di As dal suolo alla pianta rappresenta una delle principali vie di esposizione dell'uomo al metalloide.

L'assorbimento del metalloide è basso per molte specie, questo probabilmente perché vi è: i) limitato assorbimento delle radici; ii) limitata traslocazione di arsenico dalle radici ai germogli; iii) fitotossicità nei tessuti già a basse concentrazioni; iv) bassa biodisponibilità di arsenico nel suolo (Wang et al., 2002).

La concentrazione di arsenico in piante cresciute in suoli non contaminati varia tra 0.009 e 1.5 ppm, con un più alto range nelle foglie, e più basso range nei frutti (Tabella 2). In generale i contenuti maggiori del metalloide si riscontrano nelle radici, seguite dai fusti e infine dalle foglie (Kabata-Pendias e Pendias, 2001).

Sono note numerose specie di piante che tollerano elevati livelli di arsenico nei loro tessuti. Le piante che sopravvivono nei suoli inquinati da metalli pesanti sono generalmente tolleranti alla presenza dei contaminanti. Tali organismi possono essere divisi in tre gruppi: i) escludenti, vale a dire piante che mantengono la concentrazione

dei metalli nei germogli ad un livello basso qualunque sia la concentrazione del metallo nel suolo (Baker, 1981); ii) accumulatrici, dove i metalli sono concentrati nella biomassa epigea della pianta sia a basse che ad elevate concentrazioni del metallo nel suolo (Baker, 1981); iii) indicatrici, in cui la concentrazione interna del metallo riflette quella esterna del suolo (McGrath et al., 2002).

Tabella 2. Contenuto di arsenico (ppb) in piante alimentari e da foraggio cresciute su suolo non inquinato da arsenico

Piante	Tessuto	Peso fresco	Peso secco
<i>Orzo</i>	Cariossidi	-	3 – 18
<i>Avena</i>	Cariossidi	-	10
<i>Frumento</i>	Cariossidi	-	50, 3 - 10
<i>Riso integrale</i>	Cariossidi	-	110 - 200
<i>Mais</i>	Cariossidi	25	30 – 400
<i>Fagiolo</i>	Baccelli	0.74 - <6.7	7 – 100
<i>Cavolo</i>	Foglie	1.2 - <16.0	20 – 50
<i>Spinacio</i>	Foglie	-	200 - 1500
<i>Lattuga</i>	Foglie	<5.3	20 – 250
<i>Carota</i>	Radici	4.8 - <13.0	40 – 80
<i>Cipolla</i>	Bulbi	4.5	50 – 200
<i>Patata</i>	Tuberi	-	30 – 200
<i>Pomodoro</i>	Frutti	0.46	9 – 120
<i>Melo</i>	Frutti	<0.21	50 – 200
<i>Arancio</i>	Frutti	1.4 - <5.2	11 – 50
<i>Funghi eduli</i>	Completo	-	280
<i>Trifoglio</i>	Cime	-	20 – 160
<i>Erba da foraggio</i>	Cime	-	280 - 330

Kabata-Pendias e Pendias, 2001

Tuttavia, fenomeni di tossicità sono stati comunemente riscontrati in piante cresciute su scarti di miniera, su suoli trattati con pesticidi a base di arsenico, e su suoli con aggiunta di arsenico attraverso lo spargimento di liquami o acqua irrigua contaminata. La presenza di arsenico nelle acque irrigue o nel suolo a livelli elevati potrebbe ostacolare la normale crescita delle piante determinando sintomi di fitotossicità, come: riduzione dello sviluppo radicale e dei germogli, appassimento e necrosi delle foglie, riduzione della superficie fogliare e della fotosintesi, riduzione della produzione di frutti o granella.

La sensibilità ai metalli e la tossicità per le piante è influenzata non solo dalla concentrazione e dal tipo di inquinante, ma anche dalla fase fenologica o dallo stadio fisiologico in cui la pianta si trova (germinazione, emergenza della plantula, crescita vegetativa). Ad esempio, i semi in germinazione sono più sensibili all'inquinamento da metalli perché alcuni meccanismi di difesa ancora non sono sviluppati. In un recente

studio Zhang e Zhu (2005) mostrano che la germinazione dei semi di grano è influenzata considerevolmente sia da arseniato che da arsenito. La germinazione di alcune varietà decresce significativamente quando la concentrazione di As raggiunge 1 mg kg^{-1} . Perciò, in normali condizioni di campo, l'applicazione d'acqua contaminata mediante irrigazione potrebbe avere effetti negativi sulla germinazione. Sicuramente, esistono variazioni significative tra le specie vegetali relativamente alla tolleranza ad As (III) e As(V). Inoltre, l'As aggiunto mediante irrigazione può in parte adsorbirsi sulle particelle del suolo e ritrovarsi in basse concentrazioni nella soluzione circolante (Martin et al., 2007).

È stato accertato che l'altezza dei germogli e la lunghezza delle radici, di piante di grano, si riduce significativamente all'aumentare della concentrazione di arsenico. La riduzione dello sviluppo delle radici può essere imputato al fatto che, essendo la radice il primo punto di contatto con l'inquinante nel mezzo di crescita, la pianta cerchi di ridurre la superficie a contatto con il metalloide. È stato anche osservato che l'arsenito è più tossico dell'arseniato in termini di sviluppo radicale ed epigeo (Coddington, 1986). Inoltre, all'aumentare della concentrazione di arsenico ($4\text{-}16 \text{ mg l}^{-1}$) l'attività amilolitica, cioè l'attività di degradazione dell'amido (principale fonte di nutrimento nei semi), per azione sia della β -amilasi che dell' α -amilasi, viene significativamente ridotta (Zhang e Zhu, 2005)

Wallace et al. (1980) hanno mostrato che piante di fagiolo cresciute in una soluzione di arseniato 10^{-4} M hanno accumulato approssimativamente 4, 19 e 42 ppm di As rispettivamente in foglie, fusti e radici, con danni considerevoli per la pianta. Inoltre hanno osservato una diminuzione della concentrazione di Mn, P e Ca in ogni parte della pianta e di K nelle radici.

Gough et al. (1979) hanno osservato che il contenuto di As in foglie di alberi da frutto, con danni evidenti, è compreso tra 2.1 a 8.2 ppm. In generale la tolleranza delle piante all'arsenico è fissata a 2 ppm. Macnicol e Beckett (1983) hanno stimato che il livello critico massimo di As, che determina una riduzione del 10% della resa in varie piante, va da 1 a 10 ppm. Apparentemente l'As è meno tossico quando le piante sono ben rifornite di fosforo. Questo sembra inibire la tossicità dell'arsenico nei mitocondri delle cellule di riso.

1.6.1-Piante iperaccumulatrici e piante tolleranti

L'arsenico assorbito dalle piante generalmente viene solo in parte traslocato agli organi epigei, di solito rimane localizzato nell'apparato radicale. Baroni et al. (2004) hanno determinato il contenuto di arsenico in foglie, fusti, germogli e radici di piante spontanee e piante alimentari coltivate su suoli Toscani inquinati da attività mineraria ($\cong 50 \text{ mg kg}^{-1}$ di As). Le concentrazioni di arsenico rilevate sono sempre basse in foglie e fusti, talvolta elevate nelle radici; in Tabella 3 sono riportate le concentrazioni di As riscontrate in alcune delle piante oggetto di studio.

Tabella 3. Contenuto di arsenico (media \pm E.S.; mg kg^{-1}) in vegetali coltivati su suoli inquinati ($\cong 50 \text{ mg kg}^{-1}$ As)

Specie vegetale	Foglie	Foglie e Germogli	Germogli	Radici	Fiori/Infiorescenze	Frutti e Semi
<i>Lactuca sativa</i>	0.13 \pm 0.11					
<i>Solanum melangena</i>	0.11 \pm 0.09					
<i>Cucurbita pepo</i>	0.23 \pm 0.12				0.23 \pm 0.11	
<i>Capsicum annum</i>	0.27 \pm 0.18					< 0.02
<i>Lycopersicon esculentum</i>	0.07 \pm 0.03					< 0.02
<i>Helichrysum italicum</i>		2.53 \pm 1.99		1.05 \pm 0.55	0.31 \pm 0.12	
<i>Phalaris coerulea</i>		0.54 \pm 0.09		5.14 \pm 1.42	< 0.02	
<i>Avena fatua</i>		0.44 \pm 0.15		6.21 \pm 2.37	0.04 \pm 0.01	
<i>Brassica napus</i>	0.19 \pm 0.13		0.02 \pm 0.01	0.34 \pm 0.26		
<i>Lupinus albus</i>	2.54 \pm 1.79		0.81 \pm 0.13	2.89 \pm 0.95		0.44 \pm 0.17
<i>Coleostephus myconis</i>	0.62 \pm 0.21		0.04 \pm 0.03	13.25 \pm 3.71	0.59 \pm 0.09	

Baroni et al., 2004

La traslocazione o meno negli organi epigei della pianta segna la differenza tra le piante cosiddette “iperaccumulatrici” e le piante tolleranti. Le piante iperaccumulatrici sono capaci di accumulare concentrazioni eccezionalmente elevate di metalli. Recentemente sono state scoperte le prime piante iperaccumulatrici di As, le felci *Pteris vittata* e *Pityrogramma Calomelanos*. Entrambe le felci producono una considerevole biomassa e sono pertanto ampiamente utilizzate nei progetti di fitoestrazione (Ma et al., 2001; Francesconi et al., 2002; Visoottiviset et al, 2002).

Tuttavia, un po' di confusione è stata fatta con l'uso del termine “iperaccumulatrice di As”. In passato piante As-tolleranti cresciute su suoli pesantemente inquinati e scarti di miniera sono state definite iperaccumulatrici di As (Francesconi et al., 2002; Francesconi e Kuehnelt, 2002; Visoottiviset et al, 2002). In realtà confrontando piante iperaccumulatrici e piante tolleranti risulta evidente il differente comportamento

nell'accumulo dell'inquinante. Mentre le piante tolleranti tendono a ridurre la traslocazione di arsenico tra suolo-radici e radici-foglie, le iperaccumulatrici assorbono attivamente l'elemento e lo traslocano nei tessuti epigei (Fitz e Wenzel, 2002).

1.6.2-Fenomeni di tossicità e resistenza indotti nelle piante dall'arsenico

L'arseniato, la specie dominante dell'arsenico in condizioni aerobiche, è assorbito dalle piante attraverso il sistema di trasporto del fosfato, poiché vi è una similarità chimica tra i due elementi (Dixon, 1997). L'As una volta entrato nel citoplasma compete con il fosfato andando, ad esempio, ad inibire la fosforilazione ossidativa e la produzione di ATP (Meharg e McNair, 1994; Oremeland e Stolz, 2003), distruggendo così il flusso energetico nella cellula (Meharg e Hartley-Whitaker, 2002). Tuttavia, l'arseniato normalmente non raggiunge mai una concentrazione citoplasmatica abbastanza elevata tale da indurre tossicità. Infatti, viene rapidamente ridotto ad arsenito nei tessuti vegetali. L'arsenito altera la funzione di proteine ed enzimi legandosi ai gruppi sulfidrilici (Oremeland e Stolz, 2003), distruggendo o inibendo numerose funzioni cellulari che spesso conducono la cellula alla morte. Per esempio, la tossicità da arsenico nella plantula del riso causa delle alterazioni nel metabolismo dei carboidrati, riducendo l'accumulo degli zuccheri solubili attraverso l'inibizione dell'attività enzimatica (Jha e Dubey, 2004).

Inoltre, i composti dell'arsenico provocano la formazione di specie reattive dell'ossigeno (reactive oxygen species – ROS) nelle cellule vegetali che, determinando l'ossidazione dei lipidi, causano seri danni ai tessuti (Meharg e Hartley-Whitaker, 2002).

Le piante hanno evoluto alcuni meccanismi di detossificazione dell'As. Antiossidanti, enzimatici e non, sono indotti per contrastare i ROS. È stato dimostrato che la catalasi (CAT), la glutatione-S-transferasi (GST) e la superossido dismutasi (SOD) sono prodotte nel mais (*Zea mays*) quando questo viene esposto ad arseniato e arsenito (Mylona et al., 1998). Spesso le piante che assorbono metalli pesanti dal suolo producono fitochelatine (PCs), peptidi che contengono gruppi tiolo (SH) in grado di chelare metalli pesanti. Leopold et al. (1999) affermano che non tutte le piante sono abili nel formare complessi stabili metalli pesanti-PCs. La produzione delle PCs in risposta all'As inorganico è stata dimostrata in un certo numero di piante. Nei lieviti è stato osservato che complessi As-SH possono essere trasportati nei vacuoli e conferire

così resistenza (Ghosh et al., 1999). È possibile supporre che anche nelle piante superiori esista un simile meccanismo di resistenza all'arsenico (Tong et al., 2004).

In aggiunta alle vie di detossificazione attraverso antiossidanti e PCs, è stata ipotizzata l'esistenza di due vie in cui il fosforo è coinvolto nella resistenza delle piante superiori all'arsenico. La prima si esplica attraverso la riduzione dell'assorbimento di As in seguito alla soppressione del sistema di assorbimento ad alta affinità per il P e l'As (Meharg e Macnair, 1992); la seconda è rappresentata dal super-accumulo di P nei germogli, così come accade nei mutanti di *Arabidopsis ars 1* (Lee et al., 2003).

Studi condotti su colture in soluzione di popolazioni tolleranti di *Agrostis capillaris* e *Holcus lanatus* rivelano un assorbimento minore di P ed As rispetto alle piante non tolleranti. Meharg e Macnair (1992) mostrano che l'assorbimento di arseniato in colture idroponiche di piante tolleranti di *H. lanatus* causa la soppressione del sistema di assorbimento ad alta affinità del P determinando così un afflusso di As minore e un minore accumulo. Un meccanismo di tolleranza simile è stato descritto in popolazioni tolleranti di *Deshampsia cespitosa* (Meharg e Macnair, 1991).

1.6.3-Fattori responsabili dell'assorbimento di arsenico da parte delle piante

pH - Il pH della rizosfera può differire considerevolmente dal pH del "bulk soil" anche di più di due unità. I fattori responsabili del differente pH rizosferico sono: i) la fonte di approvvigionamento di azoto (assorbimento di NO_3^- oppure di NH_4^+); ii) lo stato nutrizionale della pianta (ad esempio carenza di Fe o di P); iii) l'escrezione di acidi organici; iv) la produzione di CO_2 dalle radici e dai microrganismi rizosferici; v) il potere tampone del suolo (Marshner, 1995).

Un aumento del pH rizosferico potrebbe favorire la mobilitazione della frazione di As(V) labile e scambiabile in vicinanza delle radici e di conseguenza aumenterebbe l'assorbimento dell'elemento da parte delle piante.

La nutrizione azotata, responsabile del rapporto di assorbimento cationi/anioni, influenza fortemente il pH della rizosfera. Pertanto, la fertilizzazione di piante con NO_3^- quale fonte di azoto può potenzialmente determinare un aumento del pH rizosferico e così la possibilità di accumulo di As(V) nei tessuti vegetali (Marschner e Romheld, 1983). Così come un aumento del pH rizosferico può accrescere la solubilità di As(V), e quindi la possibilità di assorbimento da parte delle piante, anche valori molto bassi di

pH, provocando la dissoluzione di ossidi e idrossidi di Fe, determinano la liberazione dell'As adsorbito (Fitz e Wenzel, 2002) aumentandone la biodisponibilità.

Essudati radicali – Acidi organici a basso peso molecolare sono ampiamente diffusi nel suolo, vengono rilasciati attraverso l'essudazione radicale, la decomposizione di residui vegetali e il metabolismo dei microrganismi (Jones, 1998). Generalmente hanno vita breve ma, essendo continuamente prodotti, la loro concentrazione rimane costante tra 10^{-4} e 10^{-6} M (Huang e Violante, 1986). In funzione della dissociazione e dei gruppi carbossilici, gli acidi organici a basso peso molecolare presentano varie cariche negative con le quali possono complessare cationi metallici presenti in soluzione o facilitare il desorbimento di anioni dai costituenti del suolo. Per questo, hanno un ruolo importante in molti processi del suolo quali: mobilizzazione e assorbimento di nutrienti (ad esempio P e Fe) da parte di piante e microrganismi, detossificazione di metalli, proliferazione microbica nella rizosfera, e dissoluzione di minerali del suolo che conducono alla pedogenesi (Marshner, 1995; Jones, 1998). È quindi logico ipotizzare che gli acidi organici a basso peso molecolare abbiano un effetto sul rilascio di arsenico dal suolo, anche se le ricerche in materia sono ancora limitate per confermare definitivamente tale ipotesi (Tao et al., 2006; Violante et al., 2005a e b).

Studi condotti somministrando una soluzione di ossalato di sodio o fosfato di sodio a piante di grano (*Triticum aestivum* L.), allevate su tre suoli contaminati da arsenico, hanno mostrato che sia l'ossalato che il fosfato aumentano la mobilità di As e che le quantità di As(III) e As(V) rilasciate aumentano proporzionalmente alla concentrazione di ossalato e fosfato. La quantità di arseniato rilasciata risultava più elevata rispetto a quella dell'arsenito e la differenza tra loro risultava più evidente in presenza di ossalato che in presenza di fosfato (Tao et al., 2006).

Lo stato nutrizionale della pianta influenza la produzione di essudati radicali. È stato accertato che le piante carenti di fosforo rilasciano maggiori quantità di acidi carbossilici (soprattutto acido malico e citrico) che tendono a modificare il pH del suolo rizosferico, a spostare il fosforo dai siti di adsorbimento, a chelare cationi metallici (che potrebbero immobilizzare il fosforo) formando con questi complessi metallo-chelati stabili e determinando così una maggiore disponibilità del nutriente (Kirk et al., 1999).

L'arsenico e il fosforo appartengono allo stesso gruppo chimico ed hanno simili costanti di dissociazione dei loro acidi e simile solubilità dei loro sali, presentano pertanto simile comportamento geochimico nel suolo (Adriano, 2001). È quindi ragionevole pensare

che la produzione di essudati radicali possa giocare un ruolo chiave nella mobilitazione di arsenico nella rizosfera determinando un aumento del metalloide assorbito dalle piante (Fitz e Wenzel, 2002).

Anche i meccanismi messi in atto dalle piante per l'assorbimento di Fe possono determinare maggiore biodisponibilità di arsenico. Nelle piante superiori sono state identificate due strategie per l'acquisizione del Fe. La strategia I si verifica nelle specie monocotiledoni, ad eccezione delle graminaceae, e nelle dicotiledoni, e include tre processi: a) aumento dell'escrezione di protoni, b) attività reduttasica di composti di membrana, c) aumento del rilascio di agenti riducenti e chelanti. La strategia II riguarda le graminaceae ed è caratterizzata dal rilascio di fitosiderofori e di sistemi di trasporto ad alta affinità per l'assorbimento del Fe (Marschner and Romheld, 1994).

Ossidi e idrossidi di Fe dominano l'adsorbimento di As nel suolo. La liberazione di protoni e/o il rilascio di composti riducenti e chelanti delle piante a strategia I potrebbero determinare la co-dissoluzione di As da ossidi e idrossidi rendendolo molto più solubile e disponibile per le piante (Fitz e Wenzel, 2002).

Interazione As-P - Similmente agli acidi carbossilici rilasciati dalle radici delle piante, altri anioni organici ed inorganici possono competere con l'As per i siti di adsorbimento. Gli ioni P giocano un ruolo predominante nella interazione As-anioni a causa della sua similarità fisicochimica con l'inquinante (Adriano, 2001).

Numerosi studi sono stati pubblicati sull'interazione As-P. In generale possiamo distinguere esperimenti condotti in idroponica, in vaso e in campo. Gli esperimenti in idroponica inevitabilmente sovrastimano l'importanza delle cinetiche di assorbimento delle piante considerate (Meharg e Macnair, 1994). Inoltre, i processi tipici relativi all'interazione suolo-pianta come il flusso dell'acqua, il flusso di nutrienti/inquinanti alla superficie delle radici, diffusione, adsorbimento/desorbimento e scambio ionico non vengono considerati in quanto in questo tipo di esperimenti il suolo è assente. Di conseguenza, la somministrazione di P in soluzione diminuisce l'assorbimento di As e mitiga i sintomi di fitotossicità causati dallo stesso (Meharg e Macnair, 1990). Risultati analoghi sono stati riportati da Geng et al. (2006a) in uno studio condotto su due cultivar di grano (*Triticum aestivum*) allevate in idroponica. In condizioni idroponiche, i risultati di Geng et al. (2006a), confermano che incrementando la concentrazione di P nella soluzione si riduce significativamente l'assorbimento di As nel grano. Sebbene il P inibisca la concentrazione di As in radici e fusti, la riduzione osservata nelle radici è più

elevata rispetto a quella evidenziata nei germogli. Wang et al. (2002) anche hanno riscontrato che gli effetti inibenti del P sull'As risultano più evidenti nelle radici che nei germogli.

Al contrario, l'assorbimento di As da parte di piante cresciute in vaso ed in campo aumenta in seguito ad applicazioni di P (Creger e Peryea, 1994). La presenza di fosforo causa una competizione As-P per i siti di adsorbimento dei costituenti del suolo determinando un aumento della biodisponibilità e della concentrazione di As nelle piante. Quaghebeur e Rengel (2001) studiando le interazioni As-P nella rizosfera hanno osservato che la presenza di P accresce significativamente la concentrazione di As in foglie e radici di *Holcus lanatus*. Jacobs e Keeney (1970), studiando l'assorbimento di arsenico in piante di mais su suolo inquinato artificialmente, con concentrazioni di 20 e 80 mg kg⁻¹, osservano che differenze nella tessitura e nel contenuto minerale del suolo influenzano l'interazione As-P. Precisamente, l'accumulo di arsenico nella pianta è più elevato su suolo sabbioso che su suolo argillo-limoso, inoltre aumentando il livello di P nel suolo si determina un lieve effetto sull'assorbimento di As da parte delle piante su suolo argillo-limoso, ma un marcato incremento nell'assorbimento del metalloide su suolo sabbioso, quando l'As è presente alla concentrazione più elevata (80 mg kg⁻¹).

Arsenico e fosforo esercitano un effetto antagonistico l'uno sull'altro durante l'assorbimento e il trasporto nelle piante. L'inibizione dell'assorbimento del P esercitata dall'As è stata osservata nei lieviti e in diverse piante superiori (Carbonell-Barrachina et al., 1997). Tuttavia in letteratura sono riportati numerosi casi in cui il P inibisce l'assorbimento dell'As. Quest'ultimo è un fenomeno ricorrente nei funghi (Beever e Burns, 1980), batteri (Silver e Misra, 1988), fitoplancton (Planas e Healey, 1978) e angiosperme come l'orzo (Asher e Reay, 1979) e *Holcus lanatus* L. (Meharg e Macnair, 1992).

1.6.4-Ruolo delle micorrize nella tolleranza delle piante all'arsenico

La tolleranza delle piante ai metalli pesanti è fortemente influenzata da fattori biologici, chimici e fisiologici. Alcuni microrganismi tellurici possono contribuire ad aumentare la tolleranza della pianta ospite ai metalli pesanti.

Sebbene elevate concentrazioni di metalli nel suolo siano tossiche per batteri e funghi, i microrganismi, come tutti gli organismi viventi, possono acquisire resistenza ai metalli pesanti attraverso la riduzione dell'assorbimento dell'inquinante, o attraverso

meccanismi che permettono di tollerare e sopravvivere in presenza di elevate concentrazioni interne dell'elemento tossico (Turnau et al., 1996). Il primo meccanismo coinvolge la riduzione dell'assorbimento, la formazione di complessi all'esterno delle cellule e il rilascio di acidi organici. Il secondo meccanismo consiste nella chelazione intracellulare dei metalli attraverso la sintesi di leganti, come ad esempio polifosfati, e/o la compartimentazione all'interno dei vacuoli (Leyval et al., 1997).

È opinione comune che la maggior parte delle piante che cresce in condizioni naturali sia micorrizata (Smith e Reed, 1997), vale a dire che viva in associazione simbiotica con organismi fungini. La presenza delle micorrize è stata rilevata anche in piante cresciute su suoli contaminati (Shetty et al., 1995) indicando che questi funghi hanno sviluppato tolleranza ai metalli pesanti. Tra questi vi sono i funghi micorrizici arbuscolari (funghi AM) le cui ife si sviluppano all'interno della radice della pianta ospite formando una caratteristica struttura ad alberello, da cui il nome di funghi "arbuscolari".

I funghi micorrizici arbuscolari (AMF) influiscono sulla nutrizione delle piante ospiti determinando un incremento nell'acquisizione di fosforo (Smith e Read, 1997). La via di assorbimento include: i) acquisizione di P attraverso ife extraradicali estese e molto ramificate; ii) traslocazione attraverso le ife verso le radici delle piante; iii) rilascio del P alle cellule radicali.

Considerando la similarità tra fosforo ed arseniato, comprendere il ruolo degli AMF nell'assorbimento di arseniato da parte delle piante risulta essenziale per conoscere la biogeochimica dell'inquinante negli ambienti terrestri.

In studi recentemente condotti sul ruolo dei funghi micorrizici nell'adattamento della pianta ospite al suolo contaminato da arsenico, Sharples et al. (2000 a e b) riportano che il meccanismo chiave attraverso il quale i funghi micorrizici (*Hymenoscyphus ericae*) potrebbero determinare resistenza di *Calluna vulgaris* alla tossicità dell'arsenico è l'esclusione del contaminante. Allo stesso modo dei batteri e dei lieviti (Rosen, 1999), i funghi ottengono resistenza all'As attraverso la riduzione dell'arseniato in arsenito, e l'espulsione dell'arsenito dalle cellule fungine. In uno studio più recente sulla resistenza all'arseniato di *Holcus lanatus* conferita dagli AMF, Gonzales-Chavez et al. (2002) osservano che gli AMF riducono il flusso di As nelle radici della pianta.

Ci sono due possibili ragioni che spiegano la resistenza all'As mediata dagli AMF: i) la colonizzazione da parte dei funghi arbuscolari potrebbe regolare il sistema di trasporto

ad elevata affinità del P in radici di piante che assorbono anche arsenico; ii) i funghi arbuscolari potrebbero aumentare il flusso di arsenico (come arsenito) fuori dalle radici micorrizate. Tuttavia, le informazioni sull'interazione AMF-As sono veramente limitate e sarebbe necessario condurre più ricerche, in particolare per rivelare i meccanismi di protezione dei funghi arbuscolari sulla pianta ospite in ambienti contaminati dal metalloide (Chen et al., 2007)

Le piante micorrizate suscitano grande interesse poiché i metalli pesanti non possono essere chimicamente degradati, quindi il recupero di suoli inquinati si limita principalmente a tecniche di immobilizzazione, di estrazione e di *phytoremediation* (Leyval et al., 1997). In quest'ottica la capacità delle micorrize di legare i metalli, impedendone la traslocazione nei germogli delle piante, può essere sfruttata in programmi di recupero di suoli contaminati.

L'uso delle micorrize potrebbe risultare utile anche laddove, per necessità, ci si trovi a coltivare piante alimentari su suoli inquinati da metalli pesanti. Le micorrize potrebbero ridurre l'assorbimento radicale dei metalli o comunque, immobilizzandoli nelle loro ife, impedirne la traslocazione dalle radici alle parti epigee di piante utilizzate per l'alimentazione umana e del bestiame.

1.7-L'arsenico nell'uomo

L'arsenico è un elemento che può accumularsi nei tessuti di tutti gli organismi viventi, compresi gli animali. La concentrazione nei tessuti varia in funzione della quantità ingerita. In alcuni animali marini, ad esempio nei celenterati, come molluschi e crostacei (Bowen, 1966), l'arsenico si accumula a livelli variabili tra 0.005 e 0.3 mg kg⁻¹. In tali organismi si riscontrano prevalentemente composti organici del metalloide, come arsenobetaina ed arsenochinolina, che, tra l'altro, sono molto resistenti alla degradazione chimica

Il corpo umano, invece, contiene 3-4 mg di arsenico e la quantità tende ad aumentare con l'età. L'arsenico inorganico tende ad accumularsi specialmente nei capelli ed altri tessuti ricchi di cheratina. La normale quantità di As nei capelli è circa 0.08-0.25 µg g⁻¹ con valori di 1.0 µg g⁻¹ in presenza di eccesso dell'elemento (Arnold et al., 1990). Il contenuto di As nelle urine può variare normalmente tra 5-40 µg al giorno, mentre la

presenza di 100 µg al giorno è indizio di avvelenamento acuto e sub-acuto (Arnold et al., 1990). In generale i composti organici sono più rapidamente espulsi rispetto alle forme inorganiche e tra queste la forma pentavalente più velocemente della trivalente.

1.7.1-Metabolismo e tossicità dell'arsenico (Da Mandal e Suzuki, 2002)

A causa della presenza di arsenico in acque, suoli, animali e vegetali, l'uomo viene spesso a contatto con diverse specie del metalloide. Le varie specie dell'arsenico differiscono tra loro per proprietà fisico-chimiche e biodisponibilità, questo complica enormemente lo studio della cinetica e del metabolismo dell'inquinante nell'uomo e negli animali. La distribuzione dell'elemento tossico nei tessuti dipende dalla diffusione operata dal sangue, dal volume dei tessuti stessi, dalle caratteristiche di membrana e dall'affinità per il tessuto. Il destino dell'arsenico ingerito dipende da: i) reazioni di ossidoriduzione tra As(III) e As(V) nel plasma; ii) reazioni consecutive di metilazione nel fegato. L'arsenico è rapidamente ridotto ad arsenito e successivamente in parte metilato. Il principale sito di metilazione sembra essere il fegato, dove l'enzima arsenico metiltransferasi media il processo di metilazione con l'S-adenosilmetionina quale donatore di gruppi metile.

La velocità di assorbimento dell'arsenico è proporzionale alla solubilità che è maggiore per gli arseniti e gli arseniati alcalini o, in caso di inalazione, alle dimensioni delle particelle della sostanza.

La forma chimica e lo stato di ossidazione sono molto importanti nel determinare la tossicità che per Whitacre e Pearse (1972) decresce nell'ordine $\text{arsina} > \text{As(III)} > \text{ossidi di As} > \text{As(V)} > \text{As organico}$, mentre per Vega et al. (2001) segue l'ordine $\text{As(III)} > \text{MMAO} > \text{DMA(III)} > \text{DMA(V)} > \text{MMA(V)} > \text{As(V)}$. Sebbene sia generalmente accettato che la metilazione rappresenti la principale via di detossificazione, recenti studi hanno dimostrato che metaboliti metilati possono essere in parte responsabili di effetti dannosi associati all'esposizione all'arsenico (Vega et al., 2001).

Il meccanismo tossico più comune di un elemento è l'inattivazione di sistemi enzimatici essenziali per catalizzare reazioni biologiche. L'As(V) non si lega direttamente ai siti attivi degli enzimi ma prima si riduce ad As(III). L'As(III) interferisce con gli enzimi formando legami con i loro gruppi -SH ed -OH, specialmente quando ci sono due gruppi -SH adiacenti. Aphosian (1989) ha ipotizzato che il legame dell'As(III) nelle cellule con gruppi sulfidrilici non essenziali potrebbe rappresentare un importante via di

detossificazione. Il forte legame tra As(III) e solfuri può essere la causa per cui l'elemento si accumula nei tessuti di cheratina come capelli ed unghie.

Vengono inibiti dalla presenza del metalloide anche gli enzimi che attraverso il ciclo dell'acido citrico producono energia cellulare. L'azione inibitrice è basata sulla inattivazione della piruvato-deidrogenasi attraverso la complessazione con As(III), a causa della quale la formazione di ATP viene inibita. La quantità di piruvato nel sangue aumenta, la produzione di energia si riduce ed infine la cellula si danneggia lentamente (Belton et al., 1985).

Sebbene l'As(III) sia ritenuta la forma più tossica, l'As(V) può avere effetti molto dannosi essendo un forte competitore del fosfato. Per esempio l'arseniato disaccoppia la fosforilazione ossidativa, il processo attraverso cui l'ATP viene prodotta e contemporaneamente la nicotinamide adenina dinucleotide (NADPH) viene ossidata (Dixon, 1997). L'arseniato distrugge questo processo producendo un estere arseniato dell'ADP, il quale è instabile e subisce un'idrolisi non enzimatica. Questo processo è chiamato arsenolisi (Aphosian, 1989). Pertanto, l'energia metabolica si riduce e viene prodotto glucosio-6-arseniato anziché glucosio-6-fosfato. L'arseniato può anche rimpiazzare il fosforo nel DNA (Elder e Davies, 1993) e questo sembra inibirne i meccanismi di replicazione.

1.8-L'Arsenico nel mondo

Numerosi acquiferi, in diverse parti del mondo, mostrano presenza di arsenico in concentrazioni superiori ai 50 $\mu\text{g l}^{-1}$, spesso molto più elevate. Le maggiori concentrazioni si riscontrano in alcune aree dell'Argentina, Bangladesh, Cile, Cina, Ungheria, India (Bengala Ovest), Messico, Romania, Taiwan, Vietnam e in molte zone dell'America (Figura 3) (Smedley e Kinniburgh, 2002). Recentemente, ispezioni condotte sulla qualità delle acque di falda in altre aree, come alcune zone del Nepal e della Cambogia, hanno rilevato in alcune fonti concentrazioni di arsenico superiori a 50 $\mu\text{g l}^{-1}$. Arsenico, associato ad acque termali, è stato riscontrato in diverse aree dell'Argentina, in Giappone, Nuova Zelanda, Cile, Islanda, Francia, USA. Problemi legati alla presenza di arsenico esistono anche in aree dove è prevalente l'attività mineraria. In tali aree la concentrazione di arsenico nelle acque spesso è dell'ordine dei mg l^{-1} . Problemi legati a questo tipo di attività si riscontrano in Ghana, Grecia,

Thailandia e USA. La presenza di As nelle acque di falda si riscontra sia in condizioni ossidanti che riducenti e sia in climi umido/temperati che aridi.

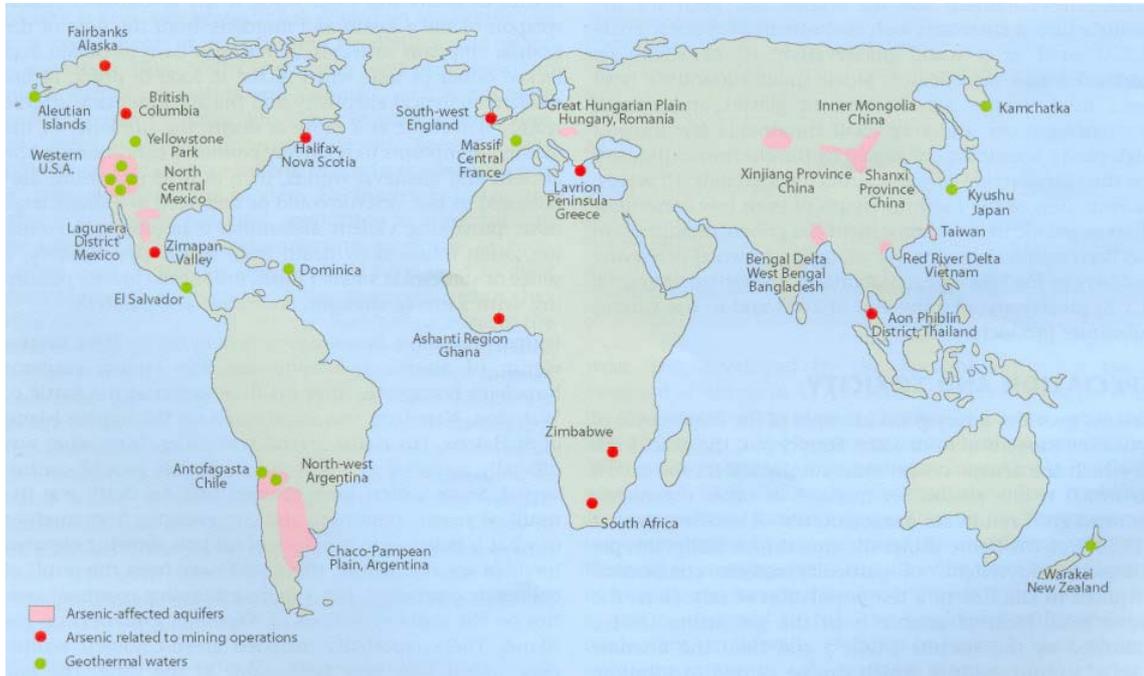


Figura 3. Aree affette da acque inquinate da arsenico (Smedley e Kinniburgh, 2002)

Particolarmente grave è la situazione ambientale in Bangladesh. Secondo studi recentemente pubblicati su riviste internazionali, l'arsenico presente in molti dei pozzi rurali starebbe contaminando attraverso l'irrigazione anche le coltivazioni di riso. Descritto dagli esperti come il "peggior avvelenamento di massa della storia", l'avvelenamento da arsenico potrebbe uccidere 270 mila persone. Altri 36 milioni sono stati esposti alla contaminazione, che è causa di cancro e di malattie della pelle (Ahmed e Rahman, 2001). In aree inquinate del Bengala si riscontra la presenza di molte specie tossiche dell'As(III) nelle acque di falda, che rappresentano circa il 50% dell'As totale. Anche in Bangladesh più della metà delle specie dell'As rilevate nelle acque sotterranee è rappresentata dalla forma trivalente (Mandal e Suzuki, 2002)

1.9-Siti inquinati da arsenico in Italia

La presenza di arsenico in suoli ed acque è rilevabile in diverse regioni Italiane. Tra le aree maggiormente inquinate vi è la Piana di Scarlino, nel Grossetano (Toscana), dove

una combinazione di fattori, naturali e antropici, ha determinato un accumulo di arsenico nei suoli, in alcune località, fino a concentrazioni di 1000 mg kg^{-1} . Anche in Sardegna, nell'area mineraria del Furtei, è stata accertata presenza dell'elemento tossico. In tale area è attiva una miniera d'oro che sfrutta una mineralizzazione a solfuri (principalmente pirite ed elargite) ricca in arsenico. Attualmente, il pericolo di contaminazione è limitato agli scavi a cielo aperto. Infatti, le acque della falda, affioranti all'interno degli scavi, presentano concentrazioni di arsenico non superiori a 5 mg kg^{-1} . Anche in Piemonte sono state accertate elevate concentrazioni dell'inquinante soprattutto nella Valle Anzasca, dove mineralizzazioni aurifere sono state sfruttate a partire dall'epoca romana. Nelle mineralizzazioni, l'oro è presente in associazione con solfuri ricchi in arsenico e concentrazioni elevate di questo elemento, fino a diverse centinaia di ppm, sono state riscontrate nei suoli e nei sedimenti della Valle, e addirittura alcuni mg l^{-1} si rinvenivano nelle acque superficiali e di falda. Relativamente all'inquinamento d'arsenico delle acque, i dati disponibili si riferiscono principalmente a quelle sotterranee. In genere la presenza del metalloide è dovuta a fenomeni naturali, ma sono stati evidenziati anche casi di contaminazione antropica. Allo stato odierno la situazione aggiornata sullo stato qualitativo delle acque sotterranee in Italia risulta difficoltosa a causa della copertura disomogenea delle reti di monitoraggio regionali. Solamente l'Emilia Romagna può fare riferimento ad una rete di monitoraggio territorialmente ben distribuita, attraverso la quale è possibile compiere sistematiche misure dei parametri necessari alle valutazioni sulla evoluzione qualitativa delle acque sotterranee. Presso la regione Lombardia e la Regione Piemonte sono in corso d'attuazione progetti finalizzati a completare sistemi di monitoraggio e ad integrare le conoscenze a carattere idrogeologico sulle acque sotterranee, con particolare riferimento a quelle per uso potabile.

1.9.1-Scarlino (Da Tanelli et al., 2003)

Il contenuto medio di As nei suoli della Piana di Scarlino (Grosseto) è significativamente superiore (fino a due ordini di grandezza) al contenuto medio della crosta terrestre ($1,5 \text{ mg kg}^{-1}$). In particolare, i suoli della zona mediana della Piana superano generalmente i limiti normativi fissati a 20 mg kg^{-1} (Tab. A: suoli destinati al verde pubblico, privato e residenziale) e a 50 mg kg^{-1} (Tab. B: suoli destinati ad uso commerciale ed industriale) del D.M. 471/99. Tale anomalia geochimica è documentata

da numerosi lavori effettuati da strutture pubbliche, preposte al controllo ambientale (ARPAT, ASL), e dalle società AQUATER, AMBIENTE, NUOVA SOLMINE, legate alla gestione del complesso industriale del Casone dove, dal 1962 al 1995, si è prodotto acido solforico ed ossidi di Fe dal trattamento delle pirite dei giacimenti maremmani.

Sulle cause che hanno determinato l'inquinamento sono state formulate due ipotesi. La prima individua la causa dell'anomalia in fenomeni naturali legati alle alluvioni del Fiume Pecora, particolarmente arricchito in sali di arsenico insolubili depositati ed inglobati nei sedimenti argillosi (NUOVA SOLMINE, 1999), la seconda introduce come concausa le attività industriali di lavorazione della pirite e le attività paleo-industriali (ARPAT, 2001; Tiezzi, 2002).

1.9.1.1-Attività paleo-industriale

Il territorio delle Colline Metallifere è stato interessato da attività minerarie e metallurgiche fin dai tempi antichi ed in particolare, durante i periodi etrusco-romano e medievale, sono state prodotte notevoli quantità di scorie di lavorazione metallurgica che oggi si possono rinvenire in varie località. Nella Val del Pecora i minerali oggetto di riduzione e lavorazione sono stati principalmente l'ematite dell'Isola d'Elba e le mineralizzazioni a solfuri misti del Massetano. Sulla base dei rilevamenti archeologici si possono distinguere due aree:

- zona della metallurgia del rame, del piombo e dell'argento, corrispondente all'alto e medio bacino del Pecora.
- zona della metallurgia del ferro, corrispondente alla bassa Valle del Pecora.

Nel bacino del Fiume Pecora sono segnalati numerosi accumuli di scorie e resti del trattamento di minerali di ferro, rame e piombo argentifero risalenti al periodo etrusco, etrusco-romano e medievale. Gli accumuli di scorie presenti nell'alta valle del Pecora sono prevalentemente i resti della metallurgia antica su minerali a rame, piombo ed argento provenienti dai limitrofi giacimenti a solfuri misti. Il contenuto in As nei resti della metallurgia del ferro è relativamente basso, compreso tra 7 e 22 mg kg⁻¹, così come nelle scorie a rame (17 e 35 mg kg⁻¹). Si presenta molto alto invece nella scorie a piombo (158 mg kg⁻¹).

1.9.1.2-Attività industriale

Dopo un lungo periodo d'inattività, lo sfruttamento delle risorse minerarie della Maremma riprese nella prime metà del XIX secolo. Con i primi anni del XX secolo iniziò lo sfruttamento dei giacimenti di pirite di Zavorrano, poi Niccioleta e Boccheggiano e quindi negli anni '80 di Campiano (Cipriani e Tanelli, 1983; Tanelli, 1983; Tanelli e Lattanzi, 1983).

Scarlino Scalo fra il 1905, anno di apertura della miniera di Gavorrano, e fino a circa la metà degli anni '60, divenne il centro di stoccaggio e spedizione della pirite estratta nei giacimenti maremmani dai quali veniva trasportata mediante teleferiche.

Nei primi anni '60 la Montecatini realizzò lo stabilimento del Casone, e dalla pirite s'iniziò a produrre acido solforico e pellets di ossidi di ferro, trattando il minerale proveniente da Gavorrano-Ravi, Boccheggiano e Niccioleta. Il ciclo produttivo prevedeva la frantumazione e l'arricchimento mediante flottazione del minerale grezzo a piè di miniera e quindi il trasporto dei concentrati di pirite con automezzi fino allo stabilimento del Casone. Ciò comportò la progressiva dismissione del centro di stoccaggio a Scarlino Scalo. Nel riquadro viene brevemente descritto il processo di produzione di H₂SO₄ realizzato nello stabilimento del Casone.

Processo di produzione dell'acido solforico nello stabilimento del Casone

La pirite subiva un processo di arrostitimento che consisteva essenzialmente nel sottoporre il minerale ad una temperatura di 900°C in ambiente ossidante con conseguente decomposizione della pirite in ossidi di ferro (ceneri di pirite) e SO₂ ($2\text{FeS}_2 + 11/2\text{O}_2 = \text{Fe}_2\text{O}_3 + 4\text{SO}_2$).

Dalla SO₂ si otteneva per ossidazione SO₃ e quindi acido solforico attraverso un processo catalitico di conversione a quattro stadi (Processo Monsanto - De Nora).

Le ceneri di pirite, costituite essenzialmente da ematite, subivano quindi un processo di riduzione, arricchimento magnetico e pellettizzazione che portava alla formazione di pellets di magnetite (tenore fino al 67% in ferro) usati per la produzione del metallo nell'impianto siderurgico di Piombino, e di materiali di scarto denominati impropriamente "sterili di pirite".

Nel 1970 vi fu la fusione Montecatini ed Edison (Montedison). Nel 1973 le attività chimico-minerarie della Montedison passarono all'ente statale EGAM che costituì la società Solmine per la gestione del comprensorio delle Colline Metallifere.

Nella prima metà degli anni '80 si ebbe la chiusura delle miniere di Gavorrano, Boccheggiano e Niccioleta e l'entrata in produzione della nuova miniera di Campiano. Sempre nello stesso periodo (1982) venne edificato nell'area dello stabilimento l'impianto per la frantumazione e l'arricchimento del minerale grezzo realizzando

quindi in loco il ciclo produttivo completo della pirite. Negli anni 1984-85 si ebbe l'interruzione del processo di pellettizzazione e la demolizione dell'impianto.

Le ceneri di pirite iniziarono ad essere stoccate a piè di fabbrica e dopo commercializzate in particolare nel mercato dei cementifici. Nel 1987 la Solmine passò sotto il controllo ENI che ne modificò la denominazione in Nuova Solmine.

Negli anni 1994-95 si ebbe la chiusura delle miniere di Campiano e la risistemazione dell'impianto per la produzione di acido solforico utilizzando quale materia prima lo zolfo di raffineria. Nel 1997 la Nuova Solmine è stata privatizzata ed assorbita dal gruppo SOLMAR SpA, mentre all'ENI rimangono in gestione alcuni impianti ed i laboratori di analisi attraverso la società Ambiente SpA (oggi ENIChem).

Nel complesso il ciclo produttivo della pirite espletato dal 1962 al 1995 prevedeva la formazione di varie tipologie di materiali reflui (acque torbide; fanghi; gas; fini, sterili e ceneri di pirite) che in varia forma e misura necessitavano di idonei processi di controllo, purificazione e smaltimento ai fini della salvaguardia ambientale. Alla fine degli anni '80 si provvide alla bonifica della zona dove erano localizzate le casse per gli sterili ed il bacino dei fanghi. Vi sono tuttora luoghi in cui sono presenti scorie del trattamento industriale oggetto di prossima bonifica. Di particolare rilievo la situazione del cosiddetto "panettone" formato da circa 1,5 milioni di tonnellate di ceneri di pirite ed alcune decine di migliaia di fini i quali, nel corso degli anni, hanno subito fenomeni di subsidenza locale che, in corrispondenza del "panettone", hanno raggiunto 6 metri ponendo così a contatto diretto i materiali di scarto con le acque della falda superficiale. In Tabella 4 sono riportati i contenuti in As e in metalli di base dei materiali di scarto derivanti dalla lavorazione della pirite, mentre in Tabella 5 sono riassunte le caratteristiche di tali materiali.

Tabella 4. Contenuto medio in As, Cu, Pb e Zn della pirite e dei materiali prodotti dallo stabilimento di Scarlino

Materiale	As mg kg⁻¹	Cu mg kg⁻¹	Pb mg kg⁻¹	Zn mg kg⁻¹
<i>Pirite^a</i>	320	170	1940	1560
<i>Fini di pirite^a</i>	310	249	1791	1349
<i>Ceneri di pirite^a</i>	420	275	1080	1385
<i>Sterili di pirite^b</i>	320	148	39	376
<i>Pellets^c</i>	260	Nd	1300	1400
<i>Fanghi di decantazione^c</i>	1000-2000	nd	1000	1000

Dati ^aNUOVA SOLMINE, 2002; ^bAQUATER, 1985; ^cNUOVA SOLMINE (comunicazione personale), 2002

Tabella 5. Tipologie di materiali di scarto derivanti dal ciclo produttivo della pirite

SCORIE INDUSTRIALI	
<i>Sterili di pirite</i>	Scorie di riduzione delle ceneri ematitiche a pellets di magnetite. Prodotti dal 1962 al 1984, sono stati variamente utilizzati per pavimentazioni stradali dentro e fuori lo stabilimento, rilevati stradali, basamenti di pozzi e di piazzali.
<i>Fini di pirite</i>	Materiali derivanti dalla frantumazione ed arricchimento del minerale grezzo non idonei al ciclo produttivo per la loro bassa granulometria.
<i>Ceneri di pirite</i>	Materiali ematitici derivanti dall'arrostimento della pirite. Sono stati utilizzati fino agli anni 1984-1985 per la produzione di ferro. Successivamente e fino al 1995 sono stati accumulati nel cosiddetto "panettone" nel quale sono presenti anche minori quantità di fini di pirite.

Tanelli et al., 2003

1.9.1.3-Sedimenti alluvionali e fluviali

Nella media Valle del Pecora sono presenti depositi terrigeni alluvionali e coalluvionali più o meno pedogenizzati chiusi al tetto da bancate di travertini, il tutto fortemente inciso dal Pecora e dai suoi affluenti. I travertini presentano contenuti in arsenico compresi tra 32 e 239 mg kg⁻¹ con una media di 141±81 mg kg⁻¹. Nei travertini si osserva altresì una buona correlazione tra i contenuti in As-Fe, As-Cu e As-Zn.

Sui sedimenti di alveo (stremis sediments) dei corsi fluviali presenti nel bacino idrografico del Pecora sono state eseguite in passato varie campagne d'indagine, essenzialmente mirate a studi di prospezione mineraria, riguardanti le zone della media ed alta valle del Pecora, con esclusione della Piana di Scarlino (SAMIN, 1982; RIMIN, 1985). Gli unici dati disponibili su sedimenti relativi alla Piana sono rappresentati da campioni prelevati ed analizzati dall'ARPAT lungo il corso del Fiume Pecora e del Canale Allacciante.

I sedimenti fluviali con i maggiori contenuti in As (> 500 mg kg⁻¹) si ritrovano lungo la media valle del Pecora. Quest'area si caratterizza altresì per la più alta densità di campioni con tenori in As maggiori di 100 mg kg⁻¹; viene quindi confermata l'estesa anomalia del metalloide rilevata nei suoli, paleosuoli, travertini ed alluvioni della zona. La Figura 4 mostra la distribuzione dell'arsenico nei sedimenti fluviali del bacino del Fiume Pecora.

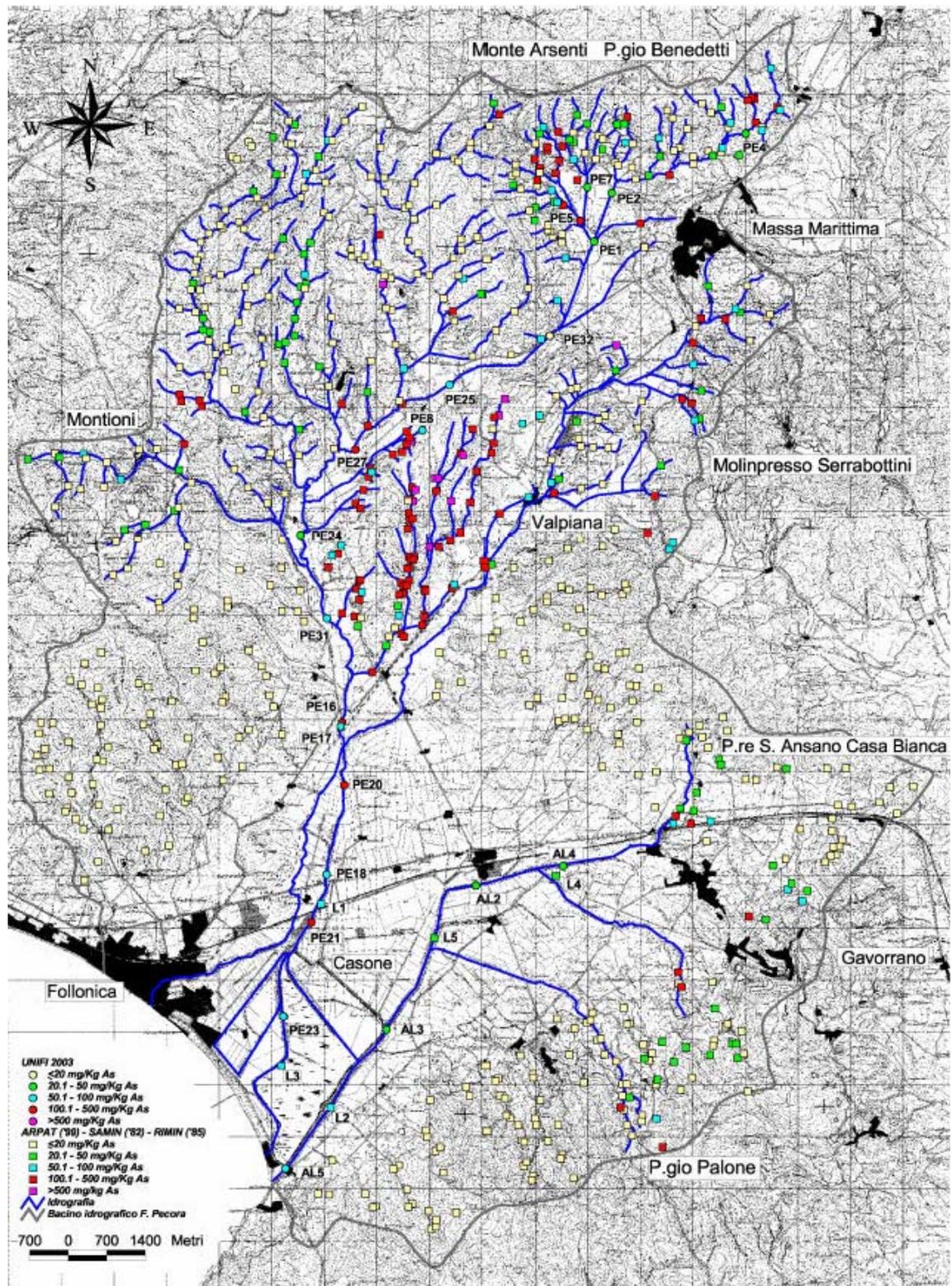


Figura 4. Carta della distribuzione dell'arsenico nei sedimenti fluviali del Fiume Pecora

1.9.1.4-Suoli

Le caratteristiche litologiche e chimiche dei terreni della Piana di Scarlino sono state determinate nel corso di varie campagne d'indagine ambientale tra le quali: AMBIENTE (1998,2001), NUOVA SOLMINE (1999) e ARPAT (2001).

Nei suoli appartenenti all'alta e media Valle del Pecora si rileva presenza di quarzo e minerali argillosi, ai quali sono variamente associati idrossidi di ferro, calcite, gesso e tracce di K-feldspato, albite, ematite, magnetite e pirite.

Nell'indagine condotta da Tanelli et al. (2003) si osserva che il contenuto medio di arsenico in campioni prelevati esternamente all'area compresa tra il Fiume Pecora ed il Canale Allacciante si aggira attorno ai $20 \pm 8 \text{ mg kg}^{-1}$, con un aumento fino a centinaia di mg kg^{-1} nella zona interna dell'area citata. Al di là di questa macro-zonizzazione le concentrazioni in arsenico hanno, in particolare nelle zone interne non industriali, una distribuzione marcatamente irregolare. La media generale è di $140 \pm 121 \text{ mg kg}^{-1}$, che sale al valore di $191 \pm 123 \text{ mg kg}^{-1}$ nei terreni di pertinenza industriale e scende al valore di $110 \pm 110 \text{ mg kg}^{-1}$ nei suoli esterni alle aree industriali. Nello studio condotto da Tanelli et al. (2003), viene, inoltre, evidenziata la situazione di una particolare zona, Casa Vetricella, dove si riscontra un elevato contenuto in arsenico in suoli superficiali e profondi (rispettivamente 191 mg kg^{-1} e 692 mg kg^{-1}). Nell'area campionata era presente uno stabilimento zootecnico per l'allevamento di suini dove, allo scopo di ripristinare l'area al cessare dell'attività, furono eseguiti interventi di aratura e scasso utilizzando scarti e resti del ciclo della pirite per ammendare e consolidare il terreno.

Lo spargimento sul territorio di scorie industriali che attraverso i lavori di aratura sono arrivate a livelli sub-superficiali, ragionevolmente caratterizzati da condizioni riducenti per la presenza di materia organica associabile alla destinazione d'uso pregressa, ha determinato rilascio di arsenico dalle scorie e la sua mobilità fino a livelli profondi nei suoli. Le concentrazioni più alte, dell'ordine delle centinaia di mg kg^{-1} , sono localizzate nella zona interna della Piana (corso del Pecora; corso dell'Allacciante) e in particolare nei suoli della zona industriale del Casone si rinvencono i contenuti massimi di As.

In uno studio condotto dall'ARPAT nei suoli localizzati in zona La Botte, adiacente all'area del Casone, si riscontrano contenuti di arsenico variabili da 500 a 1000 mg kg^{-1} . In tale area è molto elevato anche l'inquinamento delle acque superficiali, dove si evidenzia un contenuto in As pari a $1700 \mu\text{g l}^{-1}$. L'inquinamento interessa acque di uso

industriale, ma è evidente che esiste un grado di rischio per le persone, sia per possibili usi impropri delle acque (es. semplice lavaggio delle mani), sia per potenziali ibridazioni con acquiferi più profondi.

Come già detto, l'anomalia geochimica della Piana è imputabile sia a cause naturali che antropiche. In particolare, per quanto riguarda l'aliquota, non associabile alle attività industriali del Casone, il suo limite superiore è circa 100 mg kg^{-1} , che corrisponde al tenore in arsenico dei sedimenti fluviali del Pecora alla sbocco nella Piana. L'As è presente nei suoli essenzialmente legato ai solfuri e/o associato, come arseniato, ad idrossidi di ferro tipo goethite, pertanto nelle condizioni chimico-fisiche medie dei suoli della Piana l'elemento tossico è caratterizzato da bassa geodisponibilità e mobilità geochimica. Purtroppo esisitono situazioni particolari in cui la presenza di solfuri in superficie e di materia organica in sottosuolo porta alla formazione di ambienti particolarmente acidi e riducenti che favoriscono la mobilità dell'arsenico come arsenito. In Tabella 6 sono schematicamente riassunte le cause che hanno determinato l'anomalia di arsenico nella Piana di Scarlino.

Tabella 6. Fattori responsabili dell'anomalia di arsenico nella Piana di Scarlino

Sorgente	Materiali	Trasporto
Ciclo produttivo della pirite nello stabilimento del Casone (1962-1995)	Fiumi, acque reflue, fanghi, ceneri, fini e sterili di pirite	Antropico e naturale
Alluvioni del Fiume Pecora	Detriti di mineralizzazioni e discariche minerarie; materiali geologici (travertini, suoli) e scorie archeo-metallurgiche della media Val del Pecora	Naturale
Alluvioni del Canale Allacciante	Detriti di mineralizzazioni e discariche minerarie; scorie archeo-metallurgiche di Gavorrano e Scarlino	Naturale
Scorie	Scorie ferrifere archeo-metallurgiche usate durante le bonifiche, in particolare nelle aree costiere del padule	Antropico
Subordinate ed incerte		
Attività preparatorie dello stabilimento del Casone	Detriti vari usati come basi per gli stabilimenti	Antropico
Attività industriali per la pirite antecedenti allo stabilimento nel Casone (1905-1962)	Trasporto e spedizione di pirite commerciale a e da Scarlino Scalo	Antropico
Agricoltura	Uso di pesticidi e fertilizzanti fino a circa gli anni '70	Antropico

Tanelli et al., 2003

2-Scopo del lavoro

2.1-Arsenico e piante alimentari

La più importante via d'esposizione dell'uomo all'arsenico è indubbiamente rappresentata dall'ingestione dell'elemento tossico attraverso acqua ed alimenti. (National Research Council, 1999; Le et al., 2000).

L'uso in agricoltura di suoli ed acque irrigue inquinate dal metalloide può determinare presenza di arsenico nei tessuti vegetali. Sebbene la concentrazione dell'inquinante sia piuttosto bassa nelle più comuni specie erbacee (piante coltivate e selvatiche), e generalmente più elevata nelle radici che nelle foglie, la presenza del metalloide nei suoli agricoli, al di sopra del limite legale, richiede un'indagine più approfondita sul contenuto dell'elemento tossico nelle piante coltivate per l'alimentazione umana e del bestiame (Baroni et al., 2004).

Il presente lavoro ha avuto, pertanto, l'obiettivo principale di valutare l'assorbimento di arsenico da parte di piante d'interesse alimentare (*Triticum durum* L. e *Lactuca sativa* L.) coltivate su suoli naturalmente inquinati dal metalloide.

Allo scopo, è stata individuata un'area fortemente inquinata, la Piana di Scarlino, situata in provincia di Grosseto (Toscana), i cui suoli presentano una concentrazione di arsenico variabile da pochi mg fino a 1000 mg per kg.

Poiché la concentrazione totale di un inquinante nel suolo non dà una precisa misura della sua biodisponibilità e dei rischi ad essa associati, particolare cura è stata posta nell'effettuare, sui suoli campionati, la speciazione dell'arsenico. Tale tecnica ha consentito di distinguere i vari pool dell'elemento presenti nel suolo, differenti per labilità e biodisponibilità, e quindi di determinare la quantità del metalloide in forma effettivamente disponibile per la pianta.

L'assorbimento del metalloide è stato valutato in assenza ed in presenza di concimazione fosfatica, considerando che per la maggior parte delle piante l'assorbimento dell'inquinante dipende da fattori ambientali, quali tipo di suolo, dotazione di nutrienti, pH del mezzo e soprattutto dalla presenza di P (Marschner, 1995). Infatti, l'arseniato, la specie dominante dell'arsenico in condizioni aerobiche, è assorbito dalle piante attraverso il sistema di trasporto del fosfato, data la loro somiglianza chimica (Dixon, 1997). La presenza di fosforo può, come conseguenza della competizione As-P per i siti di adsorbimento sui costituenti del suolo, determinare un aumento della biodisponibilità e della concentrazione di As nelle piante, oppure un

assorbimento preferenziale del nutriente anziché dell'inquinante da parte della pianta potrebbe ridurre l'accumulo di As nei tessuti vegetali.

Tra i fattori che potrebbero influenzare l'acquisizione di arsenico da parte delle piante vi sono anche le micorrize. È stato infatti dimostrato che alcuni funghi micorrizici (arbuscular mycorrhizal) aumentano la tolleranza della pianta ospite alle condizioni di tossicità, inclusa la presenza di metalli pesanti, legandoli e limitandone la traslocazione nei germogli (Leyval et al., 1997). Tuttavia, le informazioni sull'interazione AMF-As sono veramente limitate e sarebbe necessario condurre più ricerche, in particolare per rivelare i meccanismi di protezione dei funghi arbuscolari sulla pianta ospite in ambienti contaminati dal metalloide (Chen et al., 2007)

Pertanto, l'accumulo dell'inquinante nei tessuti vegetali è stato osservato in presenza ed in assenza di funghi micorrizici arbuscolari.

Un'altro aspetto del lavoro ha riguardato la valutazione dell'assorbimento di arsenico da parte di piante di grano (*Triticum durum* L.) allevate su suolo non inquinato e irrigate con soluzioni del metalloide a concentrazione crescente. Tali prove hanno avuto lo scopo di simulare ciò che accade in alcuni paesi, come il Bangladesh o la Cina, dove la presenza di arsenico nelle acque di falda raggiunge livelli molto elevati. L'acqua attinta dai pozzi, proveniente da fonti sotterranee, presenta concentrazione di arsenico spesso molto più elevata dei limiti di legge. Tale acqua viene adoperata, oltre che per uso potabile, anche per l'irrigazione dei campi coltivati, per esempio delle risaie o dei campi di grano. Il grano in Cina rappresenta la principale coltura, coprendo questa circa il 22% delle terre arabili (Zhang e Zhu, 2005). L'uso protratto di acque contaminate da arsenico per l'irrigazione ha determinato un elevato livello del metalloide nei suoli agricoli (Alam e Sattar, 2000).

Anche in questo caso è stato valutato l'accumulo dell'elemento tossico nei tessuti vegetali in presenza ed in assenza di concimazione fosfatica.

Le varie prove sono state condotte con l'esclusivo obiettivo di ottenere il maggior numero di dati relativamente all'accumulo di arsenico in tessuti vegetali, in rapporto ai fattori che maggiormente potrebbero influenzarlo.

L'indagine condotta può contribuire a fornire informazioni circa il possibile rischio di accumulo dell'arsenico lungo la catena alimentare, a partire da suoli ed acque inquinate, attraverso specie vegetali adoperate per l'alimentazione umana e del bestiame.

I risultati ottenuti durante la sperimentazione verranno presentati secondo lo schema seguente:

- I. Determinazione dell'assorbimento di As in piante di grano (*Triticum durum* cv Cresco) coltivate su suoli inquinati
 - a. Valutazione dell'assorbimento all'aumentare della concentrazione del metalloide nel suolo
 - b. Osservazione della relazione che intercorre tra assorbimento dell'inquinante da parte della pianta e incidenza, nel suolo, delle forme di arsenico maggiormente biodisponibili (determinate mediante estrazione sequenziale)
 - c. Valutazione dell'influenza della concimazione fosfatica sull'assorbimento dell'inquinante

- II. Determinazione dell'assorbimento del metalloide in piante di lattuga (*Lactuca sativa* cv Trocadero) coltivate su suolo inquinato
 - a. Valutazione dell'influenza della concimazione fosfatica, delle micorrize e della contemporanea presenza di entrambe i fattori sull'assorbimento di As.

- III. Determinazione dell'assorbimento di As da parte di piante di grano (*Triticum durum* cv Cresco) irrigate con acque inquinate
 - a. Valutazione dell'assorbimento all'aumentare della concentrazione del metalloide nell'acqua irrigua
 - b. Valutazione dell'influenza della concimazione fosfatica sull'assorbimento dell'inquinante

Parte Sperimentale

3-Materiali e Metodi

3.1-Campionamento suoli

Per osservare l'eventuale accumulo di arsenico in piante alimentari, si è scelto di eseguire prove di crescita sia su suoli naturalmente inquinati dal metalloide che su suoli non inquinati e contaminati mediante irrigazione con soluzioni di arsenico.

Pertanto, sono state individuate diverse aree in cui poter campionare suoli con una naturale presenza dell'inquinante e suoli non inquinati.

3.1.1-Localizzazione geomorfologica dell'area di campionamento dei suoli inquinati

Il campionamento di suoli inquinati è stato realizzato a Scarlino, in provincia di Grosseto (Toscana), dove si riscontra una marcata presenza di arsenico, in suoli ed acque, a causa della concomitante azione di fattori naturali ed antropici.

Scarlino si colloca nella parte pianeggiante (Piana di Scarlino) del bacino idrografico del Fiume Pecora, un'ampia area che si estende tra Follonica a sud, Gavorrano e Massa Marittima ad est, Monte Arsenti a nord, e Montioni ad ovest (Figura 5). La fascia collinare che limita il bacino del Pecora si raccorda con gradualità all'area di fondovalle. Questa si presenta ampia e pianeggiante nella parte bassa, più stretta nella parte medio-alta del bacino. I corsi d'acqua più importanti del bacino idrografico della Val di Pecora sono: il Fiume Pecora ed il Canale Allacciante, che hanno un alveo pensile sulla Piana di Scarlino. Il Fiume Pecora nasce dal Monte Arsenti ad una quota di circa 400 metri s.l.m. e dopo un percorso di circa 25 km in direzione sud-ovest sfocia nel Padule di Scarlino. Il Canale Allacciante scavato durante le opere di bonifica raccoglie le acque provenienti dal versante Gavorrano-Scarlino e sfocia in mare presso la località Puntone (Tanelli et al., 2003).

3.1.2-Campionamento dei suoli inquinati

I campioni di suolo adoperati per la sperimentazione sono stati raccolti in differenti località caratterizzate da concentrazioni di arsenico variabili da un minimo di 10 ppm ad un massimo di 1000 ppm (ARPAT, 2001).

Le località prescelte sono state: Padule delle case, Casa Vetricella, La Botte.

I suoli campionati sono agricoli e collocati, nelle prime due località, in un contesto esclusivamente agricolo, nell'ultima, invece, nella zona industriale. Le specie vegetali maggiormente coltivate sono erbacee.

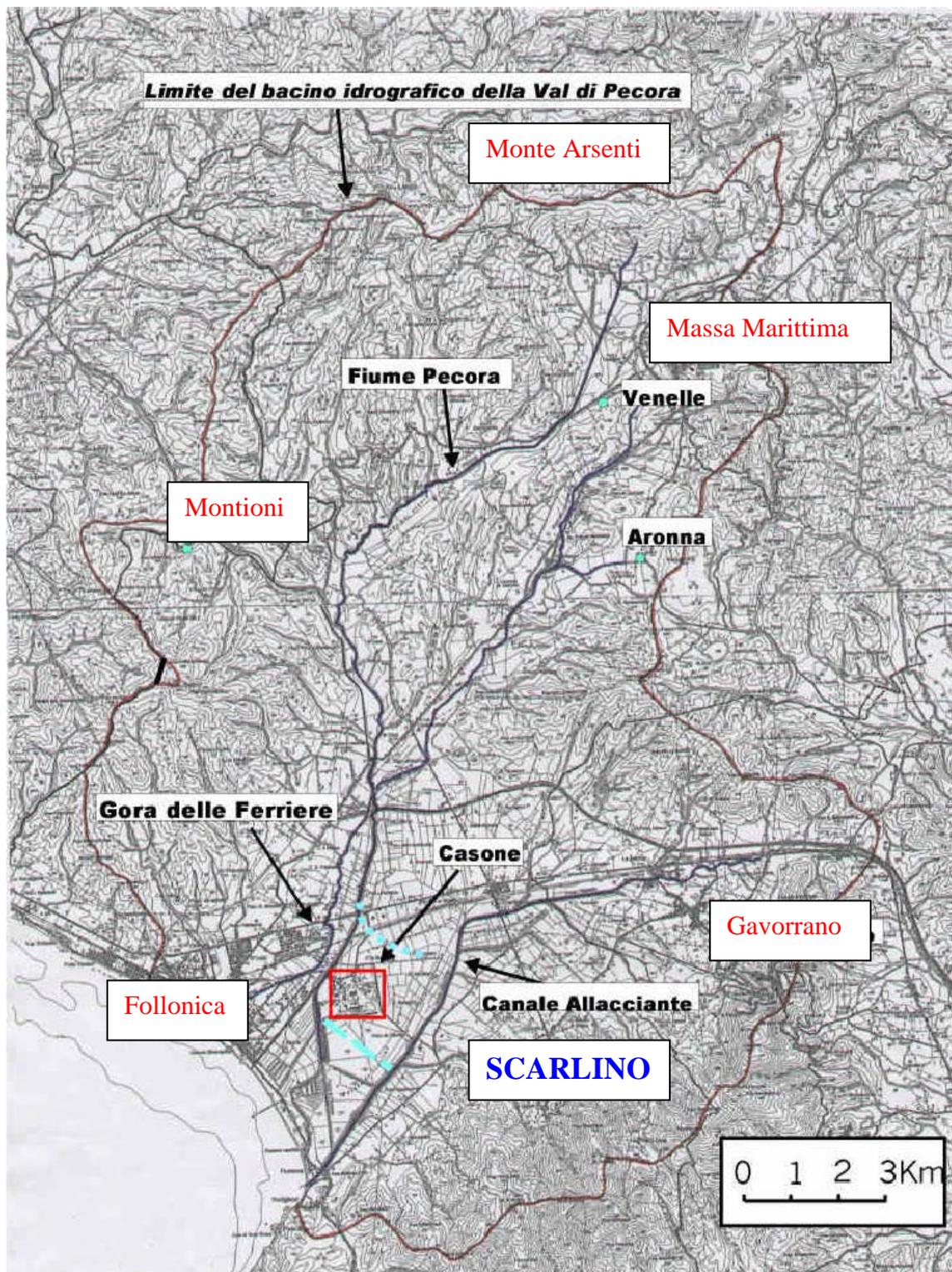


Figura 5. Bacino idrografico del Fiume Pecora

○○○○ Vecchio corso del Pecora prima delle opere di bonifica del 1830-1850

----- Tratto canalizzato costruito nel 1830-1850 ed abbandonato con le opere successive (Tanelli et al., 2003)

All'epoca del campionamento sui suoli non vi erano colture in atto. I suoli in località Casa Vetricella e La Botte presentavano, rispettivamente, un leggero inerbimento e una ricca vegetazione spontanea.

3.1.2-Descrizione dell'area di campionamento del suolo non inquinato

I campioni di suolo non inquinato sono stati prelevati in località Presenzano (per le prove condotte su piante di grano irrigate con acque inquinate) e in località Castelvoturno (per allestire i vasi controllo nella sperimentazione condotta sulla lattuga). Entrambe le località sono situate in provincia di Caserta (Campania).

I campioni di suolo prelevati a Presenzano sono stati campionati su di un altopiano, a circa 500 metri s.l.m.. L'area di campionamento è caratterizzata da vegetazione spontanea e lontana da qualsiasi forma d'inquinamento antropico o naturale.

I campioni di suolo raccolti a Castelvoturno sono stati prelevati presso l'azienda agricola sperimentale del DISSPAPA (*Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali*) della Facoltà di Agraria.

3.1.3-Modalità di campionamento

Il prelievo dei campioni inquinati è stato realizzato con attrezzi manuali nei primi 30 cm di suolo. In ogni località è stato individuata un'unica area in cui effettuare il prelievo, ad eccezione di Casa Vetricella dove il prelievo è stato realizzato in due zone molto distanti fra loro e caratterizzate da concentrazioni di arsenico molto differenti.

In ciascuna area sono stati prelevati circa 50 kg di suolo, posti in sacchetti di plastica ed etichettati. In Località La Botte è stato effettuato un secondo prelievo (circa 150 kg), a distanza di circa un anno e mezzo, per realizzare ulteriori prove sperimentali

Anche in località Presenzano e Castelvoturno il campionamento è stato eseguito secondo le modalità appena descritte; sono stati prelevati rispettivamente circa 170 e 100 kg di suolo.

3.2-Analisi chimico-fisiche

Le analisi chimico-fisiche sono state eseguite secondo i Metodi Ufficiali riportati sul Supplemento Ordinario della Gazzetta Ufficiale n°248 del 21.10.1999.

3.2.1-Analisi fisiche

3.2.1.1-Determinazione della granulometria

La determinazione si basa sul prelievo della sospensione di particelle con diametro inferiore a 200 μm a diverse altezze ed a tempi prestabiliti. Per separare le diverse frazioni di particelle è stato necessario fissare il tempo di prelevamento influenzato da: temperatura, profondità, massa volumica reale delle particelle.

Il contenuto delle varie frazioni granulometriche è stato espresso in g kg^{-1}

3.2.1.2-Determinazione della conduttività elettrica

La conduttività elettrica è stata determinata strumentalmente su estratto acquoso del suolo a rapporto acqua/soilo 5:1. Sul filtrato è stato rilevato il valore di conduttività, utilizzando l'apparecchiatura che fornisce direttamente i valori riportati a 25°C, espresso in $\mu\text{S cm}^{-1}$.

3.2.2-Analisi chimiche

3.2.2.1-Determinazione del grado di reazione (pH)

Il grado di reazione dei terreni è stato determinato per via potenziometrica su sospensioni di: suolo-acqua (rapporto acqua/soilo 2,5:1); suolo-KCl (rapporto KCl/soilo 2,5:1). I valori ottenuti in acqua non rispecchiano fedelmente il valore del pH in campo, ma sono indicativi del grado di reazione del sistema. Invece, i valori ottenuti in KCl sono maggiormente correlati al grado di saturazione ed alla natura del complesso di scambio.

3.2.2.2-Determinazione del "calcare totale"

Il contenuto di calcare totale dei suoli è stato determinato indirettamente misurando, per via gas-volumetrica, la CO_2 che si svolge trattando un campione di terra fine con acido cloridrico. La misurazione è stata effettuata adoperando il calcimetro di Dietrich-Fruehling. Il contenuto di "calcare totale" è stato espresso in g kg^{-1} .

3.2.2.3-Determinazione del calcare attivo

Il contenuto di calcare attivo è stato determinato facendo reagire un campione di terra fine con un eccesso di soluzione di ammonio ossalato. La quantità di ammonio ossalato che non ha reagito è stata valutata per titolazione con una soluzione di potassio permanganato. Dalla quantità di potassio permanganato adoperata, attraverso una formula, si è ottenuto il contenuto di calcare attivo espresso in g kg^{-1} .

3.2.2.4-Determinazione del carbonio organico e della sostanza organica

Il carbonio organico è stato determinato con il metodo Walkley-Black.

Il metodo prevede l'ossidazione del carbonio organico ad anidride carbonica con una soluzione di bicromato di potassio in presenza di acido solforico. Dopo 30 minuti, la reazione viene interrotta mediante aggiunta di 200 ml di H_2O demonizzata e la quantità di potassio bicromato che non ha reagito viene determinata per titolazione con una soluzione di ferro (II) solfato eptaidrato. Il punto finale della titolazione viene accertato con l'aggiunta di un indicatore di ossidoriduzione (Ferroina).

Il contenuto di carbonio organico è stato calcolato mediante una formula che tiene conto della quantità di campione pesata e della quantità di titolante utilizzata.

I risultati sono stati espressi in g kg^{-1} di suolo.

Considerando pari al 58% il contenuto medio di carbonio nella sostanza organica, è possibile utilizzare il fattore 1,724 per trasformare i g kg^{-1} di carbonio organico determinati nel corrispondente contenuto di sostanza organica.

3.2.2.5-Determinazione dell'azoto totale

La determinazione dell'azoto totale è stata effettuata per distillazione secondo Kjeldahl.

La metodologia Kjeldahl prevede la trasformazione dell'azoto organico, presente nel campione, in azoto ammoniacale mediante attacco con acido solforico concentrato e acido salicilico. L'ammonio viene poi distillato in ambiente alcalino.

Il contenuto in azoto totale è stato espresso in g kg^{-1} .

3.2.2.6-Determinazione del fosforo assimilabile

Tale determinazione è stata eseguita secondo il metodo Olsen.

La metodologia Olsen si basa sull'estrazione del fosforo dal campione di suolo con una soluzione di sodio bicarbonato. La concentrazione in fosforo della soluzione ottenuta

viene determinata per via colorimetrica, utilizzando la formazione del complesso fosfomolibdico di colore blu in presenza di acido ascorbico. Le letture sono state fatte per via spettrofotometrica.

Il contenuto di fosforo è stato espresso in mg kg^{-1} .

3.2.2.7-Determinazione della capacità di scambio cationico (C.S.C.)

Il campione di suolo viene monosaturato con bario per ripetuti trattamenti con soluzione di bario cloruro a pH 8,2. Successivamente, al campione Ba-saturato viene aggiunta più volte una quantità definita di una soluzione a titolo noto di magnesio solfato. La reazione porta alla formazione di bario solfato insolubile e, quindi, allo scambio completo Ba/Mg. L'eccesso di magnesio in soluzione viene determinata per titolazione con EDTA (acido etilendiamminotetracetico). Calcolata la quantità di magnesio adsorbito, che corrisponde alla quantità di bario scambiato, si accerta il valore della capacità di scambio cationico.

La C.S.C. è stata espressa in milliequivalenti per 100 g di suolo ($\text{meq } 100 \text{ g}^{-1}$).

3.2.2.8-Determinazione delle basi di scambio

Il contenuto degli ioni calcio, magnesio, potassio e sodio, rimossi dai siti di scambio con bario cloruro a pH 8,2, viene determinato per spettrofotometria in assorbimento atomico con atomizzatore a fiamma (FAAS).

Il contenuto di ciascun catione di scambio è stato espresso in milliequivalenti per 100 g di suolo ($\text{meq } 100 \text{ g}^{-1}$).

3.2.2.9-Determinazione del ferro e dell'alluminio estraibili

Estrazione in ditionito-citrato

Gli ossidi di ferro e di alluminio "liberi", come goethite e gibbsite, sono stati estratti con una soluzione sodio ditionito e sodio citrato.

La concentrazione degli elementi è stata determinata mediante spettrometria in assorbimento atomico con atomizzazione a fiamma (FAAS).

Il contenuto di ciascun elemento è stato espresso in mg kg^{-1} .

Estrazione in ammonio-ossalato

I composti a scarso ordine cristallino del ferro e dell'alluminio sono stati estratti con una soluzione di ammonio ossalato acido.

La concentrazione degli elementi è stata determinata mediante spettrometria in assorbimento atomico con atomizzazione a fiamma (FAAS).

Il contenuto di ciascun elemento è stato espresso in mg kg^{-1} .

3.2.2.10-Determinazione dell'arsenico totale (Metodo non Ufficiale)

La determinazione dell'arsenico totale è stata effettuata mediante mineralizzazione, con una miscela di acido nitrico al 65% e acido fluoridrico al 40%. Le letture sono state eseguite mediante spettrometria di emissione al plasma ad accoppiamento induttivo (*Inductively coupled plasma-ICP*).

I risultati sono stati espressi in mg kg^{-1} .

3.2.2.11-Estrazione sequenziale dell'arsenico (Metodo non ufficiale)

Nei suoli inquinati da arsenico, per determinare il contenuto delle varie frazioni del metalloide, è stata eseguita l'estrazione sequenziale realizzata da Wenzel et al. (2001). La metodica prevede l'uso sequenziale di reagenti caratterizzati da una forza di dissoluzione crescente, capaci di liberare l'arsenico ritenuto sui vari costituenti del suolo, e si compone di cinque step. Nel I step i campioni sono stati trattati con una soluzione di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05 M a 20°C per 4 ore. Nel II step è stato effettuato un trattamento con $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.05 M a 20°C per 16 ore. Nel III e nel IV step sono stati realizzati rispettivamente un trattamento con NH_4^+ -ossalato 0.2 M al buio, a pH 3.25 e 20°C per 4 ore e un trattamento con NH_4^+ -ossalato 0.2 M + acido ascorbico a pH 3.25 e a 96°C per 0.5 ore. Nell'ultimo step i residui sono stati sottoposti ad un trattamento con $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (Wenzel et al., 2001).

Mediante tale procedura, sono state estratte le seguenti cinque frazioni del metalloide: I) As non specificamente adsorbito; II) As specificamente adsorbito; III) As legato a idrossidi amorfi di Fe ed Al; IV) As presente in idrossidi cristallini di Fe e Mn; V) As residuale.

L'estrazione sequenziale dell'arsenico e le letture dei campioni mediante ICP sono state eseguite, rispettivamente, presso la Facoltà di Agraria e la Facoltà di Geologia dell'Università degli Studi di Torino.

3.3-Prove di crescita di piante alimentari su suoli naturalmente e artificialmente inquinati

3.3.1-Prove di crescita di piante alimentari su suoli inquinati

Nella valutazione delle possibili specie vegetali da allevare sui suoli inquinati, la scelta è ricaduta sul grano e sulla lattuga in quanto: la prima, è la specie principalmente coltivata sul suolo più inquinato campionato a Scarlino, ma è anche una coltura ampiamente diffusa in paesi come la Cina dove ci sono grossi problemi di inquinamento da arsenico; la seconda, è una delle specie vegetali raccomandate dalla OECD (1984) per testare la tossicità dei suoli, ma è una specie in cui la maggior parte della biomassa prodotta è rappresentata da organi eduli (le foglie).

Inizialmente, sono state condotte prove di crescita di piante di grano (*Triticum durum* cv Creso) su tutti e quattro i suoli Toscani, facendo quindi un esperimento a concentrazioni del metalloide variabili da qualche microgrammo a circa 250 mg kg⁻¹ di suolo. In seguito, sono state allevate piante di lattuga (*Lactuca sativa* cv Trocadero) esclusivamente sul suolo Toscano, campionato in località La Botte, caratterizzato dalla maggiore concentrazione dell'inquinante.

3.3.1.1-Prove di crescita di *Triticum durum* L.

Le prove di crescita sono state condotte sui quattro suoli toscani, caratterizzati da concentrazione di arsenico pari a: i) 4 mg kg⁻¹ (Padule delle Case); ii) 104 mg kg⁻¹ (Casa Vetricella A); iii) 192 mg kg⁻¹ (Casa Vetricella B); iv) 234 mg kg⁻¹ (La Botte).

I campioni di suolo sono stati omogeneizzati rompendo gli aggregati più grossi, soprattutto per quei suoli che si presentavano piuttosto argillosi.

Le piante sono state allevate in serra, inizialmente in vasi piccoli, contenenti circa 800 g di suolo, in seguito trapiantate in vasi più grandi con circa 7 kg di suolo.

Per ogni suolo raccolto sono stati preparati 6 vasi, in ciascuno dei quali sono stati collocati 10 semi.

Tutte le piante sono state concimate con azoto e potassio. Solo nella metà dei vasi di ciascuna tesi è stata effettuata anche la concimazione fosfatica. In totale sono stati allestiti 24 vasi, di cui 12 concimati anche con fosforo.

3.3.1.2-Prove di crescita di *Lactuca sativa* L.

Le prove di crescita sono state condotte sul suolo toscano maggiormente inquinato, campionato in località La Botte, caratterizzato da un contenuto di arsenico di circa 250 mg kg⁻¹. Il suolo è stato omogeneizzato rompendo gli aggregati più grossi.

La lattuga è stata allevata in serra e seminata inizialmente in contenitore alveolare, ponendo circa tre semi di lattuga per foro. Una metà del contenitore è stata preparata con una miscela di suolo e micorrize, l'altra metà esclusivamente con suolo. Dopo circa 30 giorni dall'emergenza, le piante sono state trapiantate in vasi contenenti circa 7 kg di suolo, trapiantando una sola pianta per vaso, e ponendo, nei vasi preparati per le piantine già micorrizzate in contenitore, alcuni grammi d'inoculo micorrizico.

Tutte le piante hanno ricevuto la concimazione azotata e potassica, solo la metà anche la concimazione fosfatica.

In conclusione, sono state allestite quattro differenti tesi, per un totale di 20 vasi così distribuiti: i) 5 piante allevate in presenza di micorrize e di concimazione fosfatica (M+P+); ii) 5 allevate in assenza di micorrize e di concimazione fosfatica (M-P-); iii) 5 in presenza di micorrize ed assenza di concimazione fosfatica (M+P-); iv) ed altre 5 in assenza di micorrize e presenza di concimazione fosfatica (M-P+).

È stata preparata una prova controllo su suolo non inquinato, campionato a Castelvoturno, allevando 5 piante con inoculo micorrizico commerciale e concimazione fosfatica (C1), e 5 piante senza né micorrize né concimazione fosfatica (C2).

3.3.1.3-Preparazione delle soluzioni concimanti

La preparazione delle soluzioni concimanti è stata fatta redigendo un piano di concimazione per ciascuna coltura.

Per ogni suolo adoperato nella sperimentazione è stata determinata la naturale dotazione in azoto, fosforo e potassio. Considerando poi il fabbisogno nutrizionale delle due colture oggetto di studio, è stata calcolata la differenza tra ciò che naturalmente i suoli presentavano e ciò di cui le colture avevano bisogno. Infine, è stata determinata la quantità di ciascun elemento da somministrare necessariamente alle piante attraverso la concimazione per soddisfare le loro esigenze nutrizionali. Le soluzioni preparate sono state adoperate sia per grano che per lattuga, ovviamente, differenti sono state le

quantità somministrate presentando le due specie vegetali un differente fabbisogno nutrizionale.

La concimazione azotata è stata eseguita con una soluzione di NH_4NO_3 (2,3 g l^{-1} , ovvero 60 mM); quella fosfatica con una soluzione di KH_2PO_4 (7,0 g l^{-1} , ovvero 100 mM); mentre per la concimazione potassica è stata preparata una soluzione di K_2SO_4 (4,4 g l^{-1} , ovvero 50 mM).

3.3.1.4-Micorrize

Per la micorrizzazione delle piante di lattuga, è stato adoperato un inoculo commerciale di funghi endomicorrizici arbuscolari, in formulato microgranulare, con un numero di propaguli infettivi per grammo pari a 100. L'inoculo utilizzato è formato da ceppi di funghi, tra i quali, il più importante, per effetto e quantità, è il *Glomus intradices*. Tale fungo ha una capacità infettiva ed un'efficacia superiore a quella di molte altre specie fungine. Inoltre è una specie autoctona del Mediterraneo, quindi ben adattata al clima della nostra regione.

Il prodotto è stato applicato in fase di semina, mescolandolo al suolo preparato per riempire il contenitore alveolare, e in fase di trapianto, collocando il prodotto immediatamente sotto le piantine in modo tale da rendere il contatto tra l'inoculo e la pianta più diretto possibile.

3.3.2-Prove di crescita di piante alimentari irrigate con acque inquinate artificialmente

Per le prove di crescita di piante alimentari su suolo inquinato mediante irrigazione con soluzioni di arsenico è stato scelto il grano (*Triticum durum* cv. Cresco). Tale scelta è stata fatta principalmente per poter osservare il differente accumulo di arsenico, nella stessa specie vegetale, quando il metalloide è già presente nel suolo e quando, invece, viene somministrato in soluzione acquosa, quindi inizialmente libero e non già fissato su vari costituenti del suolo. In secondo luogo, è sembrato interessante simulare ciò che accade in alcuni paesi, come la Cina, il Bangladesh, ecc., dove le acque inquinate non solo vengono adoperate per uso potabile ma anche utilizzate in agricoltura per l'irrigazione dei campi.

3.3.2.1-Prove di crescita di *Triticum durum* L.

Le prove di crescita sono state condotte su suolo non inquinato campionato in località Presenzano.

Le piante sono state allevate sotto serra, inizialmente in vasi piccoli, contenenti circa 800 g di suolo, in seguito trapiantate in vasi più grandi con circa 7 kg di suolo. In ogni vaso sono stati collocati 10 semi.

Le piante sono state divise in tre gruppi, o tesi, e irrigate con soluzioni di arsenico caratterizzate da concentrazioni crescenti del metalloide, pari a 0,5 mg l⁻¹, 1 mg l⁻¹ e 2 mg l⁻¹. Per ogni tesi sono stati preparati 6 vasi, per un totale di 18 vasi.

Tutte le piante, durante il ciclo biologico, sono state concimate con azoto e potassio. Solo nella metà dei vasi di ciascuna tesi è stata eseguita anche la concimazione fosfatica.

È stata allestita anche una prova controllo allevando le piante secondo le modalità appena descritte ma irrigandole con acqua non inquinata.

3.3.2.2-Preparazione delle soluzioni di arsenico

Per la preparazione delle soluzioni inquinanti è stato adoperato NaAsO₂.

Le tre soluzioni adoperate sono state preparate a concentrazione di 0,5 mg l⁻¹, 1 mg l⁻¹, 2 mg l⁻¹.

3.3.2.3-Preparazione delle soluzioni concimanti

La preparazione delle soluzioni concimanti è stata eseguita secondo le modalità descritte nel paragrafo 3.3.1.3.

3.4-Raccolta ed essiccazione dei tessuti vegetali

Una metà delle piante di grano allevate su suolo inquinato sono state raccolte a 40 giorni dall'emergenza, al fine di ottenere dei dati preliminari circa l'accumulo di arsenico in radici, foglie e fusti. L'altra metà delle piante è stata raccolta a maturazione della granella (8 mesi circa).

Le piante di grano irrigate con acque inquinate, invece, sono state raccolte tutte a fine ciclo produttivo.

Anche le piante di lattuga sono state raccolte in un'unica epoca, poco prima dell'emissione dello scapo fiorale per consentire, in tal modo, il massimo accumulo dell'inquinante nelle foglie.

In seguito alla raccolta, le piante di grano sono state divise in radici, foglie e fusti, e granella; le lattughe in radici e foglie. Dopo aver determinato il peso fresco, i vari tessuti vegetali sono stati essiccati in stufa ventilata a 70°C fino al raggiungimento di peso costante.

Dopo aver determinato anche il peso secco, i tessuti vegetali sono stati macinati, fino a ridurli in polvere, rendendoli così omogenei e consentendo una migliore mineralizzazione.

3.5-Determinazione della concentrazione di As e P totale nei tessuti vegetali

I campioni vegetali, essiccati e macinati, sono stati mineralizzati con una miscela di acido fluoridrico al 40%, acido nitrico al 65%, acqua ossigenata e acqua ultrapura, per determinarne il contenuto in arsenico totale e fosforo. I campioni mineralizzati sono stati analizzati mediante ICP.

4-Risultati e Discussioni

4.1-Assorbimento di Arsenico in piante di grano (*Triticum durum* cv Creso) allevate su suoli inquinati

4.1.1-Caratteristiche chimico-fisiche dei suoli inquinati

Alle analisi chimiche e fisiche, i suoli toscani, hanno presentato proprietà chimiche piuttosto variabili ma caratteristiche fisiche abbastanza simili (Tabella 7).

Dal punto di vista granulometrico, infatti, non sono state riscontrate notevoli differenze: i suoli prelevati in località Padule delle Case e La Botte hanno mostrato una tessitura franco-argillosa, mentre i suoli raccolti in località Casa Vetricella A e Casa Vetricella B hanno presentato una tessitura franco-sabbiosa-argillosa. La tessitura del suolo è un fattore molto importante nel determinare la mobilità dell'arsenico (Adriano, 2001). I suoli a tessitura fine (limosi e argillosi), costituiti da particelle con un'area superficiale elevata, sono più reattivi rispetto ai suoli sabbiosi e capaci di trattenere quantità più elevate di elementi in traccia (Chen et al., 1999; Berti e Jacobs, 1996). Inoltre, tali suoli, sono caratterizzati anche da una più elevata capacità di scambio cationico (CSC) che determina una più elevata capacità di adsorbimento di specie ioniche (Chen et al., 1999).

I suoli raccolti in località Padule delle Case e La Botte, caratterizzati da una maggiore percentuale di argilla rispetto ai suoli di Casa Vetricella A e B (34% nei primi due, 28 e 25% negli ultimi), hanno mostrato i valori di CSC più elevati, rispettivamente pari a 21.34 e 18.70 meq/100g, contro i 9-10 meq/100g riscontrati nei suoli di Casa Vetricella (Tabella 7). Nei suoli che hanno mostrato valori di CSC più alti, è stata osservata anche una maggiore dotazione di sostanza organica (SO), circa 3-4% (Tabella 7). Elementi in forma anionica non sono facilmente adsorbiti sulla sostanza organica del suolo (Violante et al., 2007b). Tuttavia, Thanabalasingam e Pickering (1986) hanno osservato assorbimento di As sugli acidi umici. Anche altri autori hanno accertato che ioni arseniato ed arsenito sono capaci di legarsi agli acidi umici del suolo, probabilmente legati a specie idrolitiche del Fe e dell'Al già in essi presenti (Buschmann et al., 2006; Ritter et al., 2006). Non è chiaro, però, quanto incide il contributo della SO nell'assorbimento del metalloide nel suolo, specialmente in presenza di adsorbenti più affini all'inquinante come gli idrossidi di Fe (Livesey e Huang, 1981; Wenzel et al., 2001).

Tabella 7. Caratteristiche chimico-fisiche dei suoli toscani inquinati da arsenico

Parametri chimico-fisici		Padule delle Case	Casa Vetricella A	Casa Vetricella B	La Botte
<i>Sabbia</i>	g/kg	321	441	482	293
<i>Limo</i>	g/kg	341	280	270	365
<i>Argilla</i>	g/kg	339	278	247	342
<i>C.Elettrica</i>	μS/cm	121.30	44.80	48.30	141.50
<i>pH</i>		8.00	5.90	6.70	8.10
<i>Calcare totale</i>	%	1.60	0.00	0.00	5.13
<i>S.O.</i>	%	3.20	1.20	1.60	4.00
<i>Azoto totale</i>	g/kg	1.80	1.11	1.17	2.01
<i>P₂O₅</i>	mg/kg	44.80	80.10	20.30	16.90
<i>C.S.C</i>	meq/100g	21.34	9.12	10.28	18.70
<i>Al^a</i>	mg/kg	1007.70	674.90	728.00	1115.00
<i>Al^b</i>	mg/kg	1210.30	935.10	1020.20	1380.40
<i>Fe^a</i>	mg/kg	2834.00	2343.00	2860.20	5077.00
<i>Fe^b</i>	mg/kg	9140.45	6210.30	7100.00	9310.40

^a Al e Fe estratti in Ammonio ossalato; ^b Al e Fe estratti in Ditionitio citrato

Nella frazione tessiturale più fine (argilla) sono abbondanti ossidi e idrossidi di Al e Fe, per i quali l'As mostra una grande affinità formando con essi legami talvolta molto forti. I suoli toscani con un più elevato contenuto di argilla, hanno mostrato difatti un maggiore contenuto di Al e Fe, soprattutto il suolo campionato in località La Botte (Tabella 7). In particolare, gli ossidi di Fe a scarso ordine cristallino, estratti con ammonio ossalato, costituiscono il 30-40% degli ossidi di Fe totalmente presenti nei suoli di Padule delle Case e Casa Vetricella A e B, mentre rappresentano più del 54% nel suolo di La Botte. Gli ossidi a scarso ordine cristallino presentano un'elevata capacità di fissare l'arsenico grazie alla loro estesa area superficiale.

La natura degli adsorbenti ed il pH influenzano fortemente la mobilità dell'As nel suolo, poiché regolano i fenomeni di adsorbimento e desorbimento del metalloide. Recenti studi condotti su ossidi di ferro, alluminio e manganese hanno evidenziato che ioni arseniato sono adsorbiti con maggiore affinità sugli ossidi di manganese e ferro piuttosto che su quelli di alluminio mentre gli ioni arsenito sono fortemente fissati sulle superfici di ossidi di ferro ma molto debolmente su ossidi di alluminio (Violante e Pigna, 2002; Violante et al, 2006, 2007a).

I valori di pH determinati hanno rivelato un grado di reazione subalcalino, per i suoli prelevati in località Padule delle Case e La Botte (rispettivamente pH 8.00 e 8.10), e subacido, per i suoli raccolti in località Casa Vetricella A e Casa Vetricella B (pH 5.90 e 6.70) (Tabella 7). Studi condotti usando suoli o idrossidi puri di Fe hanno evidenziato che la mobilità dell'As(V), la forma del metalloide più comune negli ambienti ossidanti, aumenta all'aumentare del pH in un intervallo di pH comunemente riscontrato nei suoli (3-8) (Manning and Goldberg, 1997; Smith et al., 1999; Raven et al., 1998).

Il contenuto di calcare è risultato piuttosto variabile, addirittura assente nei suoli campionati in località Casa Vetricella. Anche i carbonati intervengono nei meccanismi di adsorbimento dell'As. Difatti, Violante et al (2007b) hanno dimostrato come i carbonati presenti in suoli calcarei adsorbono il metalloide a valori di pH particolarmente elevati (pH>8-9). Tuttavia, il loro contributo nell'immobilizzazione dell'As nel suolo è basso, anche in suoli calcarei (Wenzel et al., 2001).

4.1.2-Arsenico totale ed estrazione sequenziale

Le concentrazioni totali di arsenico riscontrate nei suoli toscani sono risultate inferiori rispetto ai valori attesi determinati dall'ARPAT (2001) in precedenti studi volti al

monitoraggio dell'anomalia geochimica della Piana di Scarlino (Gr). In particolare, i suoli campionati presso Casa Vetricella B e La Botte hanno presentato un contenuto di As nettamente inferiore, rispettivamente di due e di quattro volte, ai valori massimi attesi (500 e 1000 ppm) (Tabella 8). Ciò è accaduto in quanto la Piana, diffusamente contaminata dal metalloide, presenta una grande variabilità di concentrazione dell'inquinante nei suoli, anche nell'ambito di una medesima località. Difatti, in un'indagine condotta da Tanelli et al. (2003), è stato osservato che il contenuto medio di arsenico in campioni prelevati nell'area del bacino idrografico del Fiume Pecora si aggira attorno ai $20 \pm 8 \text{ mg kg}^{-1}$, con un aumento fino a centinaia di mg kg^{-1} nella zona interna dell'area citata. Al di là di questa macro-zonizzazione le concentrazioni in arsenico hanno, in particolare nelle zone interne non industriali, una distribuzione marcatamente irregolare. La media generale è di $140 \pm 121 \text{ mg kg}^{-1}$, che sale al valore di $191 \pm 123 \text{ mg kg}^{-1}$ nei terreni di pertinenza industriale e scende al valore di $110 \pm 110 \text{ mg kg}^{-1}$ nei suoli esterni alle aree industriali (Tanelli et al., 2003).

Il suolo con la più alta presenza dell'elemento è stato campionato in località La Botte, dove si è osservata una concentrazione pari a 234 mg kg^{-1} . I suoli campionati in località Casa Vetricella A e B hanno presentato rispettivamente 104 e 194 mg kg^{-1} di As, mentre il suolo proveniente da Padule delle Case si è rivelato non inquinato, in quanto la concentrazione di As è risultata piuttosto bassa (4.7 mg kg^{-1}) e molto vicina al limite inferiore dell'intervallo di concentrazione entro cui ricadono i suoli considerati non inquinati ($1-40 \text{ mg kg}^{-1}$) (Tabella 8).

Il suolo più fortemente inquinato (La Botte) ha rivelato, in seguito alla procedura di estrazione sequenziale (SEP), anche il più elevato contenuto di As presente in forma disponibile (I e II step), pari a 24.67 mg kg^{-1} , circa tre volte superiore al valore riscontrato nel suolo proveniente da Casa Vetricella A (7.52 mg kg^{-1}) e circa il doppio del valore che caratterizza il suolo prelevato in località Casa Vetricella B (11.47 mg kg^{-1}) (Tabella 8). La concentrazione di As estratta con la prima fase della procedura di estrazione sequenziale (SEP) è generalmente molto bassa, ma rappresenta la frazione del metalloide più pericolosa in quanto debolmente ritenuta dai costituenti del suolo (Wenzel et al., 2001). Anche il II step della SEP estrae As facilmente desorbibile. In genere tale frazione rappresenta solo il 10% dell'As totale ma può essere rapidamente

Tabella 8. Concentrazione di As totale nei suoli toscani (valori ARPAT e valori riscontrati) e frazioni di As estratte mediante estrazione sequenziale

As totale (mg kg⁻¹)				
	Padule delle Case	Casa Vetricella A	Casa Vetricella B	La Botte
<i>As tot (ARPAT)</i>	0-10	100-200	300-500	500-1000
<i>As tot</i>	4	104	192	234
*Frazioni As (mg kg⁻¹)				
<i>I Step</i>	-	0.07	0.06	0.24
<i>II Step</i>	-	7.45	11.41	24.43
<i>III Step</i>	-	21.27	30.08	73.41
<i>IV Step</i>	-	66.34	97.48	108.66
<i>V Step</i>	-	13.79	17.91	8.01

*Frazioni di As estratte con i seguenti reagenti: I Step) (NH₄)₂SO₄; II Step) NH₄H₂PO₄; III Step) NH₄⁺ossalato; IV Step) NH₄⁺-ossalato + acido ascorbico; V Step) HNO₃/H₂O₂

mobilizzata in seguito ad un cambiamento di pH o alla competizione esercitata dal fosfato (Wenzel et al., 2001). La percentuale maggiore dell'inquinante si rinviene, in tutti i suoli, legata agli ossidi di Fe e Al (III e IV step), a dimostrazione del fatto che l'As viene adsorbito principalmente su minerali a carica variabile, quali ossidi a scarso ordine cristallino o cristallini di Fe, Al e Mn (Goldberg e Johnston, 2001; Violante et al., 2005b). In particolare, il suolo più contaminato ha presentato una percentuale di As legato alla frazione amorfa di Fe e Al pari al 34%, mentre nei suoli di località Vetricella tale percentuale scende al 19-20%. Al contrario, le percentuali maggiori del metalloide legate agli ossidi e gli idrossidi cristallini si rinvencono nei suoli meno inquinati (60%) (Figura 6). Il metalloide adsorbito sui minerali del suolo forma, nel tempo, complessi di superficie sempre più stabili, può lentamente penetrare nei micropori o formare dei precipitati con Fe ed Al diventando sempre meno desorbibile, biodisponibile e tossico (Frenkenberg, 2002; Sparks, 2003; Pigna et al., 2006).

Considerando che le prime tre fasi della SEP estraggono le frazioni dell'inquinante più mobili, è stato possibile affermare che nel suolo più inquinato circa la metà della quantità totale del metalloide è presente in forma più disponibile (99 ppm) (Tabella 8).

4.1.3-Crescita delle piante e tossicità da arsenico

La germinazione delle piante di grano, cresciute sui suoli toscani, è stata drasticamente influenzata dalla presenza di As. È stata osservata, all'aumentare della concentrazione del metalloide nel suolo, una germinazione minore e ritardata, e la crescita di piantine deboli (Figura 7). Inoltre, come si può facilmente osservare in Figura 7, il numero di semi germinati nel vaso contenente il suolo più inquinato ("La Botte", 234 mg kg⁻¹ di As) è risultato di gran lunga inferiore rispetto a quello osservato nel vaso controllo ("Padule delle case", 4 mg kg⁻¹ di As).

L'arsenico è altamente tossico per le piante, ad elevate concentrazioni interferisce nei loro processi metabolici, ne inibisce la crescita e in condizioni di grave inquinamento può provocarne la morte (Geng et al., 2006b). Inoltre, può determinare la riduzione di biomassa prodotta e di raccolto in una gran varietà di colture (Carbonell-Barrachina et al., 1997). Jiang e Singh, (1994) hanno osservato, a concentrazioni del metalloide nel suolo pari a 50 mg kg⁻¹, una significativa riduzione della produzione di orzo. La sensibilità delle piante alla presenza di inquinanti nel substrato di crescita è influenzata

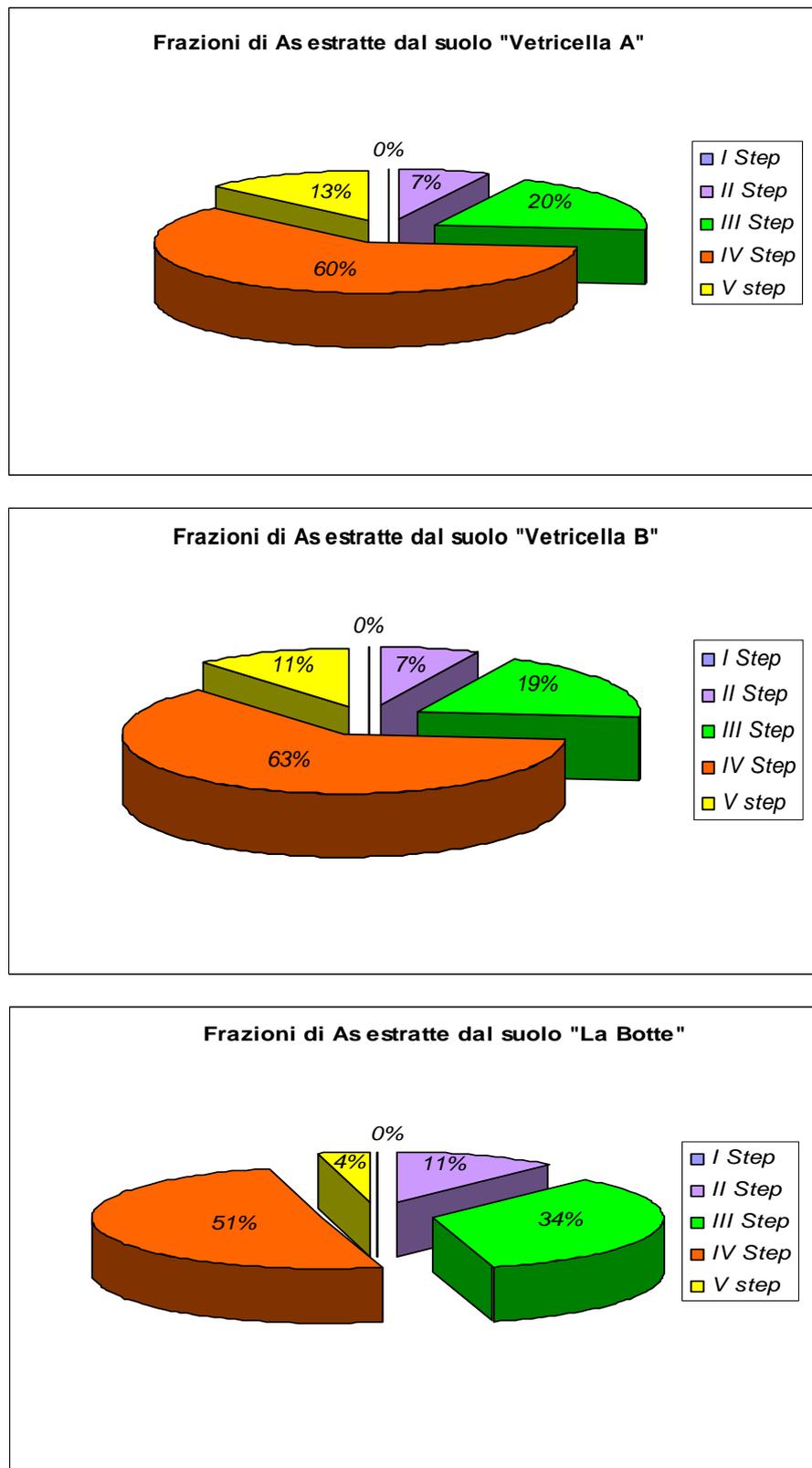


Figura 6. Frazioni di As estratte dai suoli toscani mediante estrazione sequenziale elaborata da Wenzel et al. (2001).

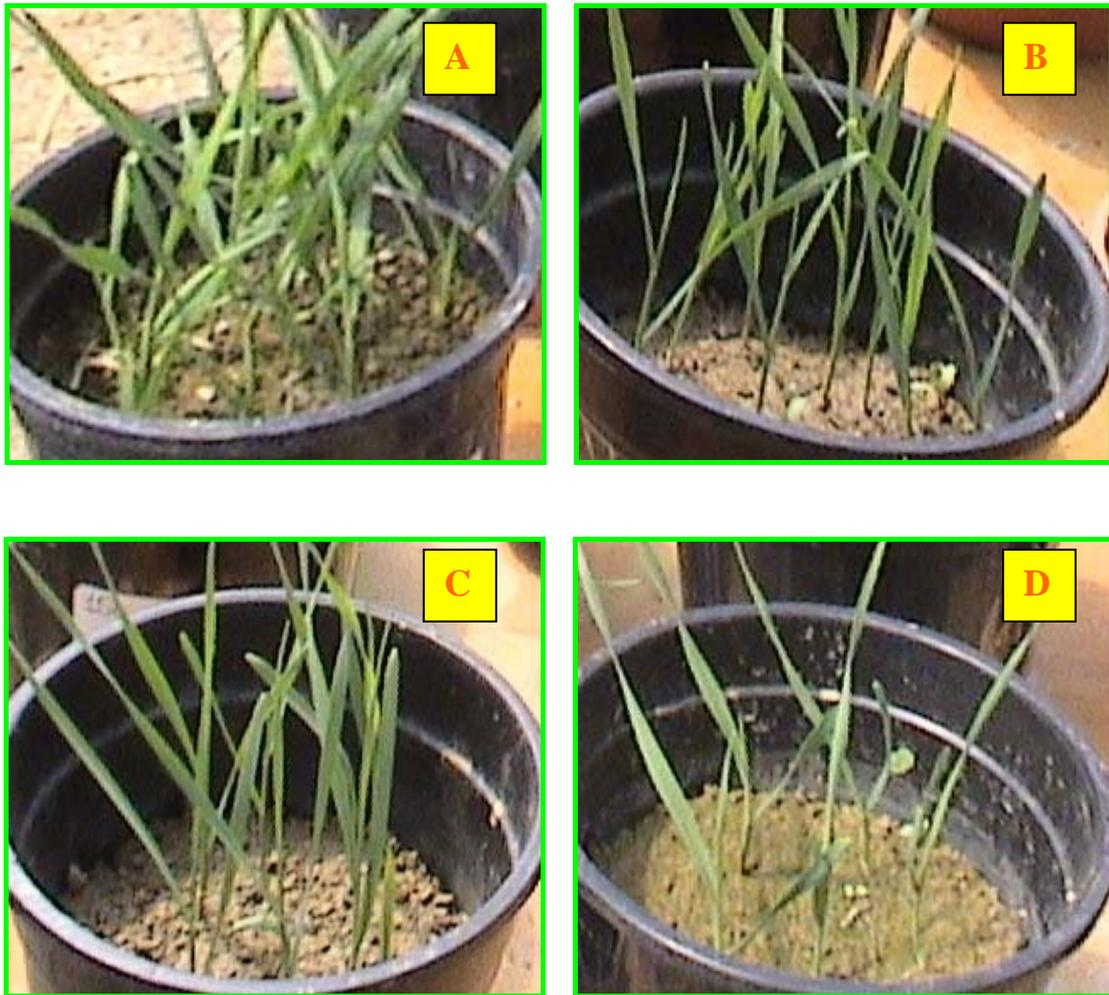


Figura 7. Germinazione di semi di grano nei suoli campionati in località: A) Padule delle Case (4 mg kg^{-1} di As); B) Casa Vetricella A (104 mg kg^{-1} di As); C) Casa Vetricella B (192 mg kg^{-1} di As); D) La Botte (234 mg kg^{-1} di As).

non solo dalla concentrazione e dalla natura dell'elemento tossico, ma anche dallo stadio biologico in cui si trova (germinazione, plantula, crescita, ecc.). Ad esempio, nella fase di germinazione la pianta risulta più sensibile all'inquinamento da metalli rispetto alle prime fasi di crescita, in quanto alcuni meccanismi di difesa non sono ancora stati sviluppati (Liu et al., 2005). Zhang e Zhu (2005), hanno osservato che all'aumentare della concentrazione di arsenico nei suoli (4-16 mg l⁻¹) l'attività amilolitica, cioè l'attività di degradazione dell'amido (principale fonte di nutrimento nei semi), per azione sia della β -amilasi che dell' α -amilasi, viene significativamente ridotta. Nonostante l'elevata concentrazione del metalloide nel suolo, e la grande influenza sulla germinazione e la crescita iniziale delle piantine, non sono stati riscontrati grossi segni di sofferenza nelle piante durante lo sviluppo. L'unico sintomo di tossicità riscontrato è stata la formazione di macchie rossastre sulle foglie più vecchie.

4.1.4-Concentrazione di As nei tessuti vegetali

Le piante cresciute sui suoli inquinati hanno accumulato As sia nelle radici che nella biomassa epigea. La presenza del metalloide in fusti e foglie, dopo sessanta giorni dall'emergenza (piante 60G), è risultata piuttosto bassa in tutte le piante. Nelle piante concimate con fosfato (piante P+), cresciute nei tre suoli contaminati, è stato rilevata una concentrazione media del metalloide pari a 0.65 mg kg⁻¹; nelle piante non concimate con fosfato (piante P-) il valore medio è salito a 0.89 mg kg⁻¹ (Tabella 9).

La concentrazione del metalloide nelle radici è risultata molto più elevata rispetto a quella osservata in foglie e fusti, soprattutto nelle piante P-, dove, sul suolo più inquinato ("La Botte"), la concentrazione dell'elemento ha raggiunto il valore di 2.55 mg kg⁻¹ contro gli 0.86 accumulati nelle foglie (Tabella 9). Inoltre, a differenza di quanto osservato per la biomassa epigea, nelle radici si sono manifestate differenze significative, nell'accumulo del metalloide, tra le piante cresciute su suoli a differente grado di contaminazione (Figura 8 A e B). Difatti, le piante P- allevate sul suolo con il minor contenuto dell'elemento tossico, campionato in località Casa Vetricella A (104 mg kg⁻¹ di As), hanno accumulato nelle radici una quantità di As pari a 1.72 mg kg⁻¹, ovvero 0.8 mg in meno rispetto alle piante cresciute sul suolo più inquinato (234 mg kg⁻¹ di As) (Tabella 9). Mentre l'assorbimento di As nelle radici è cresciuto all'aumentare del livello di contaminazione del suolo, soprattutto in assenza di concimazione fosfatica,

Tabella 9 Concentrazione di As presente in radici, foglie+fusti, e granella di piante di grano raccolte a 60 giorni dall'emergenza (piante 60G) e a fine ciclo produttivo (piante FC).

Piante 60G	Concentrazione As (mg kg⁻¹)			
<i>Località</i>	Piante P+		Piante P-	
	Radici	Foglie+Fusti	Radici	Foglie+Fusti
<i>Padule delle Case</i>	0.04±0.04	0.02±0.01	0.06±0.03	0.03±0.02
<i>Casa Vetricella A</i>	1.01±0.03	0.68±0.04	1.72±0.06	0.92±0.04
<i>Casa Vetricella B</i>	1.23±0.06	0.65±0.03	1.96±0.07	0.91±0.05
<i>La Botte</i>	1.45±0.06	0.63±0.03	2.55±0.10	0.86±0.02

Piante FC	Concentrazione As (mg kg⁻¹)					
<i>Località</i>	Piante P+			Piante P-		
	Radici	Foglie+Fusti	Granella	Radici	Foglie+Fusti	Granella
<i>Padule delle Case</i>	0.08±0.04	0.04±0.01	0.02±0.02	0.10±0.05	0.07±0.04	0.02±0.03
<i>Casa Vetricella A</i>	2.42±0.12	1.52±0.05	0.39±0.02	4.96±0.05	1.99±0.07	0.51±0.03
<i>Casa Vetricella B</i>	2.67±0.12	1.66±0.10	0.42±0.03	5.12±0.09	2.20±0.08	0.59±0.04
<i>La Botte</i>	3.10±0.09	1.83±0.08	0.44±0.01	5.62±0.13	2.45±0.04	0.62±0.03

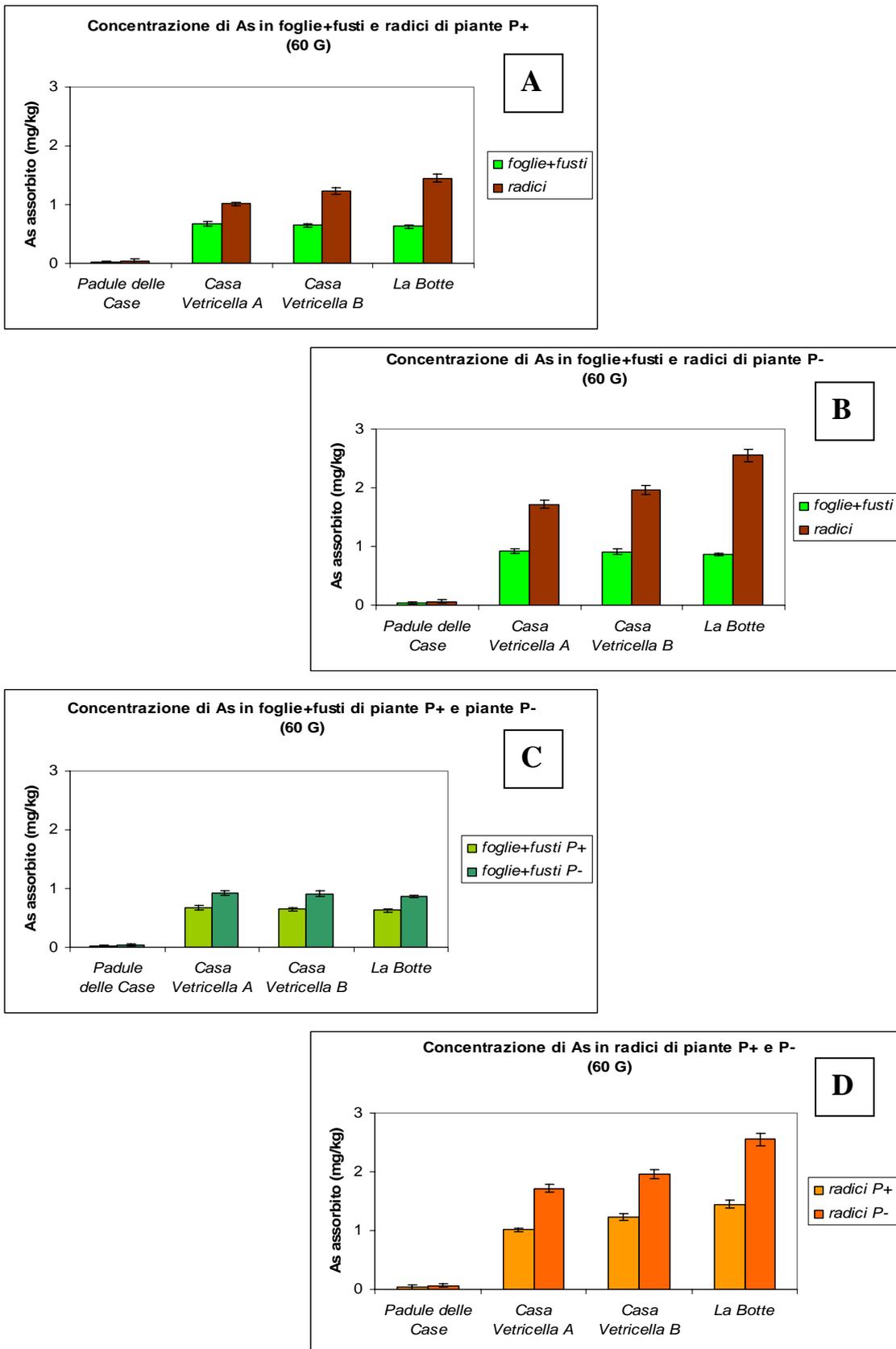


Figura 8. Concentrazione di As in piante di grano concimate (P+) e non concimate (P-) con fosfato e raccolte a 60 giorni dall'emergenza (60G).

la traslocazione negli organi epigei è rimasta pressoché costante in tutte le piante e lievemente superiore nelle piante P- rispetto alle piante P+ (Figura 8 C e D). Nelle foglie delle piante P- sono stati accumulati in media solo 0.24 mg kg^{-1} di As in più rispetto alle piante P+, mentre nelle radici di tali piante l'accumulo è stato superiore di circa 0.48 mg kg^{-1} (Tabella 9). Anche nella tesi meno inquinata ("Casa Vetricella A"), le piante P+ hanno assorbito una minore quantità dell'elemento tossico rispetto alle P-, in maniera più evidente negli organi ipogei, dove sono stati rilevati rispettivamente 1.01 e 1.72 mg kg^{-1} di As.

Geng et al. (2006b) hanno osservato, in piante di riso non concimate con P, una concentrazione di As drasticamente più elevata rispetto a piante concimate. Tuttavia, Tao et al. (2006) hanno stabilito che la somministrazione di P, mediante concimazione, a piante di grano allevate su suoli inquinati ($200\text{-}400 \text{ mg kg}^{-1}$) determina la mobilitazione dell'elemento tossico dai costituenti del suolo provocando un incremento nell'accumulo di As sia in radici che in germogli.

Il minore assorbimento di As esibito dalle piante concimate con fosfato è stato spiegato da Meharg et al. (1994), i quali hanno osservato che l'assorbimento di entrambe gli elementi (As e P) da parte della pianta avviene attraverso lo stesso sistema. I trasportatori di membrana, però, sono più efficienti nel trasportare P anziché As, consentendo così un assorbimento preferenziale del nutriente anche quando il livello di As disponibile risulta più elevato di quello del P.

Nelle piante raccolte a fine ciclo produttivo (piante FC) è stata riscontrata una condizione analoga a quella osservata nelle piante raccolte a sessanta giorni dall'emergenza. Difatti, nelle foglie e nella granella non sono evidenziabili significative differenze di assorbimento all'aumentare del contenuto di metalloide nel suolo, sia nelle piante P+ che nelle P- (Figura 9 A e B). Nella granella delle piante P+ la concentrazione di As ha avuto un valore medio di 0.51 mg kg^{-1} , mentre nelle P- tale valore è salito a 0.67 (Tabella 9). Sebbene nelle foglie la concentrazione dell'elemento sia rimasta piuttosto costante, rispetto all'aumento di contaminazione del suolo, i valori riscontrati sono stati abbastanza elevati, addirittura pari a 2.45 mg kg^{-1} osservati nella tesi più inquinata e non concimata con fosfato. La concentrazione minore, invece, è stata rilevata nella tesi più inquinata e concimata con fosfato (1.83 mg kg^{-1}). Questo, ancora una volta, dimostra il ruolo protettivo del P nei confronti delle piante che crescono in

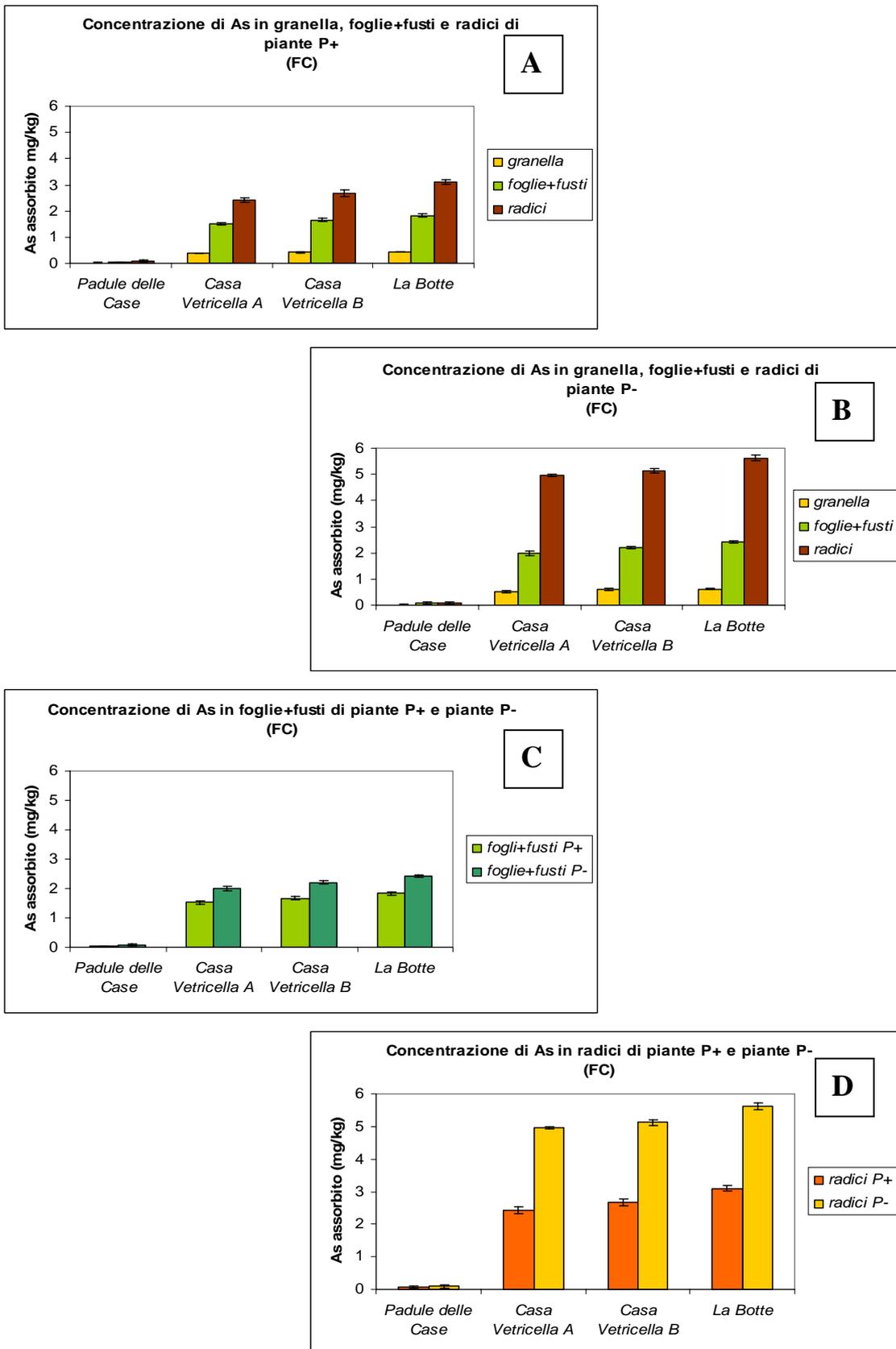


Figura 9. Concentrazione di As in piante di grano concimate (P+) e non concimate (P-) con fosfato e raccolte a fine ciclo produttivo (FC).

siti contaminati. La concentrazione dell'elemento tossico nelle radici è risultata molto elevata in tutte le piante, con un minimo di 2.42 mg kg⁻¹ nelle piante P+ cresciute sul suolo meno inquinato ("Vetricella A"), ed un massimo di 5.62 mg kg⁻¹, nelle piante P- allevate sul suolo più inquinato ("La Botte") (Tabella 9).

A differenza di quanto osservato nelle piante 60G, tra le radici delle piante FC cresciute nel suolo contenete 104 mg kg⁻¹ di As ("Vetricella A") e quelle cresciute nel suolo con 194 mg kg⁻¹ ("Vetricella B") dell'inquinante, non si sono osservate differenze significative in termini di assorbimento dei As, sia nelle piante P+ che in quelle P-. Al contrario, le piante cresciute nella tesi più inquinata hanno mostrato un accumulo dell'inquinante nelle radici significativamente differente dalle altre (Figura 9 A e B).

Ancora una volta, invece, è stato osservato un maggiore accumulo di As nelle piante non concimate con fosfato rispetto a quelle cui è stato somministrato il nutriente (Figura 9 C e D).

4.1.5-Considerazioni conclusive

Il suolo maggiormente inquinato da arsenico ("La Botte") ha mostrato il più elevato contenuto in argilla e la più alta concentrazione di ossidi di ferro e alluminio, confermando che la frazione tessiturale più piccola (argillosa, < 2 micrometri) contiene maggiori quantità di As adsorbite (Lombi et al., 2000), poiché in essa sono tipicamente concentrati gli ossidi. Questo spiega la più alta tossicità dei suoli inquinati a tessitura fine rispetto a quelli a tessitura grossolana (Jacobs et al., 1970).

In particolare, il suolo più inquinato, ha anche mostrato la più elevata percentuale di arsenico in forma debolmente adsorbita, quindi più fitodisponibile, e soprattutto la maggiore quantità di inquinante legata a ossidi e idrossidi di Fe e Al, a conferma che tali componenti del suolo rappresentano i maggiori agenti di adsorbimento del metalloide (Masschelyn et al., 1991; Fendorf et al., 2007). Difatti, l'attività dell'arsenico nella soluzione del suolo è controllata principalmente dalle reazioni di complessazione su ossidi e idrossidi di Al e specialmente di Fe (Inskeep et al., 2002). È nelle piante cresciute in questo suolo che è stato osservato il maggiore accumulo dell'elemento tossico.

La maggiore concentrazione dell'inquinante è stata rilevata negli organi ipogei della pianta, anche se la quantità di As contenuta nelle foglie è risultata, in alcune tesi,

piuttosto elevata. La concentrazione del metalloide nella granella si è presentata sempre molto bassa.

La somministrazione di fosfato ha influenzato notevolmente la disponibilità dell'elemento tossico. Infatti, le piante concimate sono state quelle in cui si è osservato il minor accumulo dell'inquinante negli organi vegetali, in particolare in quelli epigei. La concimazione fosfatica potrebbe, pertanto, aiutare a ridurre la presenza di As nelle piante coltivate per l'alimentazione umana e del bestiame allevate su suoli inquinati dal metalloide.

4.2-Assorbimento di Arsenico in piante di lattuga (*Lactuca sativa* cv. Trocadero) allevate su suolo inquinato

4.2.1-Caratteristiche chimico-fisiche del suolo inquinato

Per valutare l'assorbimento di As in piante di lattuga (*Lactuca sativa* cv Trocadero) è stato utilizzato il suolo toscano, campionato in località La Botte, precedentemente adoperato per le prove di crescita di piante di grano e caratterizzato da una concentrazione molto elevata del metalloide (234 mg kg^{-1} di As).

Le piante controllo, invece, sono state allevate su un suolo con caratteristiche simili al suolo inquinato ma campionato in provincia di Caserta (Castelvoturno-Campania).

Le caratteristiche chimico-fisiche dei suoli adoperati per la sperimentazione condotta sulle piante di lattuga sono state riportate in Tabella 10.

4.2.2-Crescita delle piante e tossicità da arsenico

La germinazione dei semi di lattuga non è stata ostacolata dalla presenza di As nel suolo. Tuttavia, inizialmente la crescita di alcune piantine è stata piuttosto difficile e particolarmente ridotta (Figura 10).

Tra le piante cresciute sul suolo contaminato, quelle inoculate con i funghi arbuscolari (funghi AM) e concimate con fosfato (M+P+) hanno mostrato la maggiore produzione di biomassa, sia epigea che ipogea, con un totale di 25 g di sostanza secca prodotta. Tale valore è risultato pari alla quantità di biomassa sviluppata dalle piante controllo (C1), allevate secondo le stesse modalità (trattate con inoculo commerciale e concimate con P), dove è stata determinata una quantità totale di sostanza secca pari a 25.38 g (Tabella 11). Questo ha consentito di rilevare l'importanza che i funghi micorrizici simbiotici, congiuntamente alla concimazione fosfatica, rivestono nel conferire alla pianta resistenza alla presenza dell'inquinante nel suolo. Infatti, uno dei ruoli principali delle micorrize è assorbire più fosfato per la pianta ospite (Smith e Read, 1997), ma anche maggiori quantità di potassio e azoto (Marschner e Dell, 1994). La sensibilità delle piante all'arseniato è intimamente associata alla nutrizione fosfatica. I trasportatori che mediano l'assorbimento di P e As hanno una maggiore affinità per il nutriente e, se la presenza di P nella soluzione circolante è elevata, il P può essere assorbito più efficientemente rispetto all'As (Meharg e Macnair, 1994).

Tabella 10. Proprietà chimico-fisiche del suolo inquinato (La Botte) e non inquinato (Castelvoturno)

Parametri chimico-fisici		La Botte	Castelvoturno
<i>Sabbia</i>	g/kg	293	234
<i>Limo</i>	g/kg	365	282
<i>Argilla</i>	g/kg	342	484
<i>C.Elettrica</i>	μS/cm	141.50	176.70
<i>pH</i>		8.10	7.95
<i>Calcare totale</i>	%	5.13	7.14
<i>S.O.</i>	%	4.00	2.50
<i>Azoto totale</i>	g/kg	2.01	1.35
<i>P₂O₅</i>	mg/kg	16.90	12.00
<i>C.S.C</i>	meq/100g	18.70	28.95
<i>As totale</i>	mg/kg	234.00	6.8

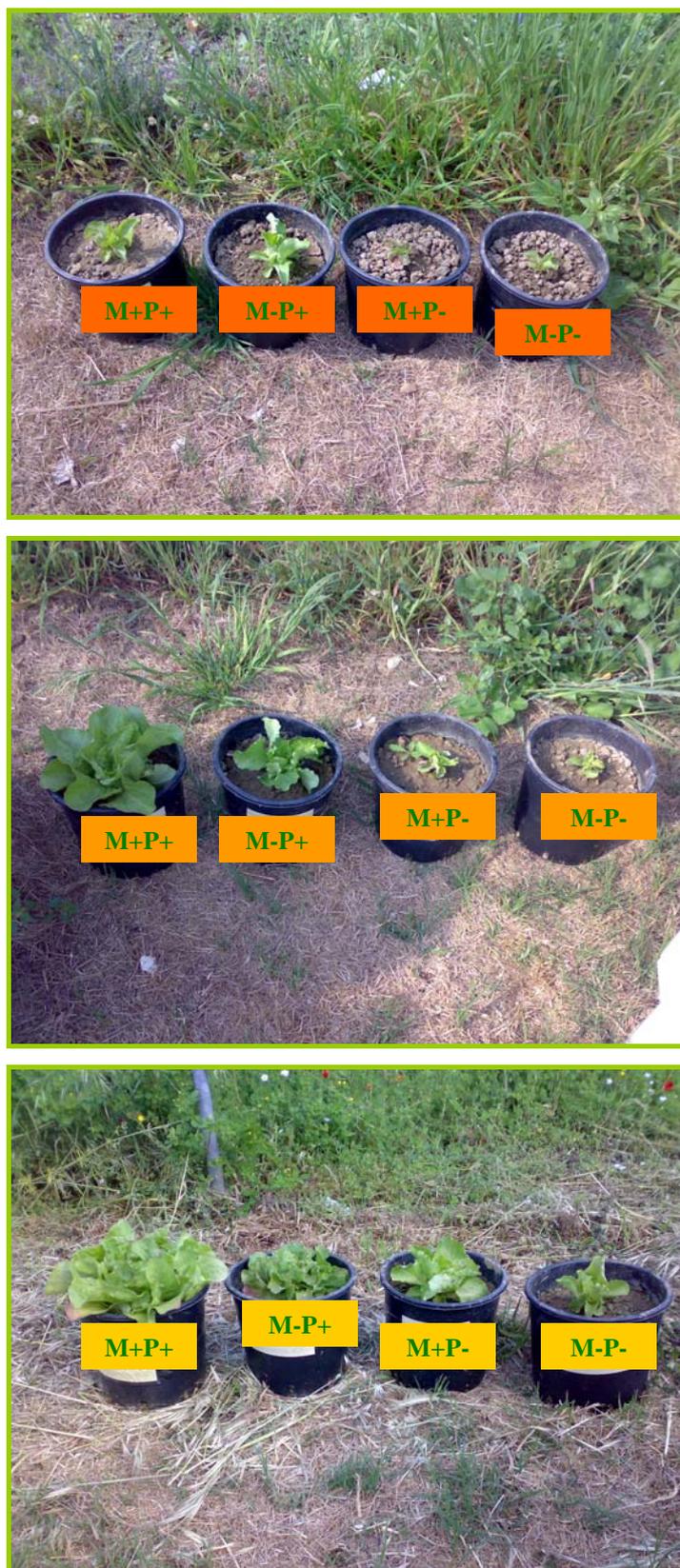


Figura 10. Crescita delle piante di lattuga a: A) 70 B) 90 e C) 100 giorni dall'emergenza

Alcuni studi hanno sottolineato, difatti, che gli effetti positivi delle micorrize sulla pianta ospite, in condizioni di stress ambientale, possono esser attribuite ad un incremento della nutrizione fosfatica, e che l'assorbimento di P da parte delle piante micorrizzate potrebbe giocare un ruolo chiave nell'alleviare gli effetti fitotossici dell'As (Liu et al. 2005).

Le piante trattate con sole micorrize, in assenza di fosfato (M+P-), hanno manifestato la minore produzione di biomassa, pari a 3.77 g, addirittura inferiore a quelle allevate in assenza di inoculo commerciale e di concimazione fosfatica (M-P-) (Tabella11). Questo, molto probabilmente, perché il fungo simbiote ha favorito l'assorbimento di As e provocato un stress maggiore nelle piante. L'influenza dei funghi AM sull'assorbimento di metalli pesanti da parte delle piante non è sempre chiaro (Leyval et al., 1997). Ad levate concentrazioni di metalli alcuni autori hanno evidenziato un più elevato assorbimento degli inquinanti da parte delle piante micorrizzate (Gildon e Tinker 1983; Killham e Firestone, 1983; Weissenhorn e Leyval, 1995), mentre altri hanno osservato una ridotta concentrazione di elementi tossici nei tessuti vegetali grazie alla presenza di funghi simbiotici (Leyval et al., 1991; Weissenhorn et al. 1995). Questi risultati dimostrano che l'effetto dei funghi AM, sull'assorbimento dei metalli pesanti da parte delle piante, non può essere generalizzato poichè dipendente da vari fattori tra i quali il tipo di metallo e la sua concentrazione nel suolo, ma anche dalla specie di fungo micorrizico (Leyval et al., 1997).

Anche la sola concimazione fosfatica ha determinato uno sviluppo limitato di biomassa (13.37 g) rispetto alle piante M+P+, probabilmente perché, come spiegato da Wenzel et al. (2002), la presenza di P, quale competitore dell'As, ha provocato la rimozione dell'elemento tossico dai siti di adsorbimento e determinato un aumento dell'inquinante nella soluzione circolante e nelle piante. Infatti, è stato dimostrato un maggiore assorbimento di As da parte delle piante in conseguenza di concimazioni fosfatice sia in vaso (Creger e Peryea, 1994; Jiang e Sing, 1994; Woolson, 1972) che in condizioni di campo (Small e McCants, 1983). Tuttavia, Woolson et al. (1973) hanno riportato, in seguito a concimazione fosfatica, una riduzione della crescita di mais allevato su suolo sabbioso-limoso, ma un sviluppo maggiore in mais cresciuto su suolo argilloso-limoso. Hurd-Karrer (1939), allevando piante di grano in vaso, ha riscontrato in seguito alla somministrazione di P, e in presenza di As, un maggiore sviluppo delle piante. Benson

(1953) ha osservato una migliore crescita di piante di orzo, in seguito all'aggiunta di P, solo su sette di diciassette suoli caratterizzati da una concentrazione elevata di As.

Tuttavia, la somministrazione di fosforo ha giovato alle piante considerando che le piante M-P- hanno prodotto una biomassa tre volte inferiore alle piante M-P+ (Tabella 11). Anche Knudson et al. (2003), conducendo prove di tolleranza all'As su *Leymus cinereus* (pianta erbacea perenne), hanno osservato, in piante trattate con una bassa dose di P, una produzione di biomassa inferiore a piante trattate con quantità più elevate del nutriente, dimostrando l'importanza del P nel prevenire la tossicità da As e l'inibizione di crescita. La maggiore crescita può essere stata determinata dal più elevato assorbimento di P al fine di contrastare elevati livelli di As disponibile (Knudson et al., 2003).

L'effetto tossico dell'As, sulle piante di lattuga, è stato facilmente evidenziato confrontando la quantità di biomassa prodotta dalle piante M-P- con quelle del controllo allevate secondo le stesse modalità (in assenza di inoculo commerciale e di concimazione fosfatica, piante C2). La produzione totale di sostanza secca in tali piante è stata pari rispettivamente a 4.83 e 20.81 g, ovvero, le piante C2 hanno sviluppato una biomassa circa cinque volte superiore alle piante M-P-. Studi condotti sulla tossicità dell'As hanno mostrato che le piante non resistenti al metalloide soffrono uno stress considerevole in seguito all'esposizione all'inquinante, con sintomi che vanno dall'inibizione della crescita radicale fino alla morte (Meharg e Macnair, 1991; Barrachina et al., 1995). Vi sono delle significative evidenze che l'esposizione alle specie inorganiche dell'As determina, nelle piante, la produzione di specie reattive dell'ossigeno (Hartley-Whitaker et al., 2001a e b) che provocano danni a vari costituenti cellulari, quali proteine, lipidi e acidi nucleici.

4.2.3-Concentrazione di As e P nei tessuti vegetali

La concentrazione di As nelle foglie e nelle radici delle piante di lattuga è risultata piuttosto limitata. In accordo, Peijnenburg et al. (2000) hanno osservato che l'assorbimento di metalli da parte della *L. sativa* dipende dal tipo di metallo ed è poco rilevante per l'As.

L'assorbimento del metalloide nelle piante M+P+ è risultato poco differente da quello osservato nelle piante M-P+. Difatti, in queste due tesi, sono state determinate

Tabella 11. Biomassa fogliare, radicale e totale di piante di lattuga cresciute su suolo inquinato e non inquinato (C1 e C2)

Campione	Foglie	Radici	Totale
		g	
<i>M+P+</i>	20.96 ± 1.08	4.36 ± 0.22	25.05
<i>M-P+</i>	10.19 ± 0.58	3.18 ± 0.19	13.37
<i>M+P-</i>	2.97 ± 0.16	0.80 ± 0.05	3.77
<i>M-P-</i>	3.76 ± 0.18	1.07 ± 0.06	4.83
<i>C1 (M+P+)</i>	20.71 ± 1.02	4.67 ± 0.32	25.38
<i>C2 (M-P-)</i>	15.79 ± 0.88	5.02 ± 0.26	20.81

concentrazioni di As rispettivamente di 0.86 e 0.91 $\mu\text{g g}^{-1}$ nelle foglie, e di 0.88 e 0.96 $\mu\text{g g}^{-1}$ nelle radici (Tabella 12). Una concentrazione di As più elevata è stata rilevata nelle piante M+P-, dove sono stati riscontrati nelle radici più di 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ del metalloide, circa il doppio di quanto osservato nelle radici delle piante M-P- dove sono stati determinati, invece, i valori di concentrazione del metalloide più bassi, sia nelle foglie che nelle radici (Tabella 12). Quindi, la presenza dell'inoculo commerciale, in assenza di concimazione fosfatica, ha determinato una maggiore concentrazione del metalloide sia negli organi epigei che in quelli ipogei delle piante di lattuga. Anche Liu et al. (2005), hanno osservato un incremento della concentrazione di As in radici di piante di pomodoro micorizzate. Weissenhorn e Leyval (1995) hanno riportato una più elevata concentrazione di metalli pesanti nelle piante, sempre a livelli tossici, a causa della colonizzazione da parte di funghi arbuscolari. Al contrario, Heggo et al. (1990) hanno osservato una riduzione nella concentrazione degli inquinanti nelle piante grazie alla presenza di micorrize. In accordo, Chen et al. (2007), studiando l'influenza dei funghi AM sull'assorbimento di P e As in piante di erba medica (*Medicago sativa*), hanno osservato che la colonizzazione da parte dei funghi simbiotici riduce sempre la concentrazione di As sia negli organi epigei della pianta che in quelli ipogei. D'altra parte, Galli et al. (1995) non hanno riscontrato alcun effetto in presenza di funghi simbiotici sulla concentrazione di metalli nei tessuti vegetali.

La sola concimazione fosfatica, in assenza di inoculo, ha determinato una concentrazione di As più elevata, sia nelle foglie (0.92 $\mu\text{g g}^{-1}$) che nelle radici (0.96 $\mu\text{g g}^{-1}$), rispetto alle piante che non hanno ricevuto alcun trattamento (M-P-) (Tabella 12). La somministrazione di P, mediante concimazione, determina la mobilizzazione dell'elemento tossico dai costituenti del suolo provocando un incremento nell'accumulo di As nelle piante (Tao et al. 2006). Fayiga e Ma (2005) hanno riportato che l'aggiunta di rocce fosfatiche, in un suolo inquinato da As e altri metalli, incrementa l'assorbimento di As da parte di felci iperaccumulatrici. Anche Boisson et al (1999), hanno osservato un incremento nell'assorbimento del metalloide in piante di mais (*Zea mays* cv Volga) e di fagiolo (*Phaseolus vulgaris* cv. Limburgse) in seguito all'applicazione di idrossiapatite ad un suolo contaminato da As, Zn, Pb, Cu e Cd. Tuttavia, Geng et al. (2006b) hanno rilevato, in piante di riso non concimate con P, una concentrazione di As drasticamente più elevata rispetto a piante concimate.

Tabella 12. Concentrazione totale di P e As in foglie e radici di piante di lattuga allevate su suolo inquinato e su suolo non inquinato (C1 e C2)

Campione	Concentrazione P		Concentrazione As	
	Foglie	Radici	Foglie	Radici
	mg g ⁻¹		μg g ⁻¹	
<i>M+P+</i>	3.19 ± 0.11	2.72 ± 0.09	0.87 ± 0.08	0.88 ± 0.04
<i>M-P+</i>	2.23 ± 0.13	2.05 ± 0.11	0.92 ± 0.06	0.96 ± 0.04
<i>M+P-</i>	1.53 ± 0.08	2.07 ± 0.17	1.22 ± 0.07	2.12 ± 0.02
<i>M-P-</i>	1.70 ± 0.07	1.66 ± 0.11	0.58 ± 0.06	0.78 ± 0.03
<i>C1 (M+P+)</i>	3.22 ± 0.11	2.96 ± 0.01	0.045 ± 0.06	0.10 ± 0.01
<i>C2 (M-P-)</i>	2.50 ± 0.01	2.28 ± 0.02	0.050 ± 0.03	0.09 ± 0.01

Le concentrazioni di As determinate nelle foglie e nelle radici delle piante di lattuga sono state graficamente rappresentate in Figura 11.

Anche se le piante M+P+ hanno manifestato una concentrazione del metalloide, in foglie e radici, non particolarmente elevata, sono quelle che hanno accumulato la maggiore quantità dell'elemento tossico nei loro tessuti. Difatti, tali piante, hanno mostrato un contenuto totale di As pari a $21.82 \mu\text{g vaso}^{-1}$, circa il doppio del contenuto riscontrato nelle piante M-P+, e superiore rispettivamente di quattro e sette volte alle piante M+P- e M-P- (Tabella 13). Sharples et al. (2000a), hanno riportato un accumulo di As in piante micorrizate di *Calluna vulgaris* (pianta arbustiva) maggiore del 100% rispetto alle piante non inoculate. Nonostante l'elevata presenza del metalloide nei loro organi, le piante M+P+ sono quelle che hanno risentito meno della presenza dell'inquinante nel suolo, come dimostrato dalla maggiore produzione di biomassa pari, addirittura, alle piante cresciute sul suolo non contaminato (piante C1). In tali piante, una biomassa più sviluppata ha determinato una diluizione del metalloide nei tessuti e ne ha evidentemente limitato l'effetto tossico. In accordo, Chen et al. (2007) hanno mostrato che migliorare la nutrizione fosfatica e favorire la crescita delle piante micorrizate determina una considerevole diluizione dell'As sia in foglie che in radici.

Questo indica che il rapporto As/P nelle piante micorrizate gioca un ruolo fondamentale nella detossificazione dell'inquinante (Benson et al., 1981). Diversi studi hanno indicato che l'effetto delle micorrize sulle piante ospiti in condizioni di stress ambientale potrebbe essere attribuito direttamente o indirettamente al miglioramento della nutrizione fosfatica (Liu et al. 2005).

Anche la sola concimazione fosfatica ha determinato un contenuto totale di As nelle piante ($12.42 \mu\text{g vaso}^{-1}$) più elevato rispetto alle piante che sono state esclusivamente inoculate con il fungo simbionte ($5.34 \mu\text{g vaso}^{-1}$) o che non ha subito alcun trattamento ($3.03 \mu\text{g vaso}^{-1}$) (Tabella 13). Ciononostante, le piante M-P+ hanno prodotto più biomassa delle piante M+P- e M-P- risentendo meno della tossicità dell'inquinante. Piante non resistenti all'As possono essere rese più resistenti al metalloide incrementando la loro nutrizione fosfatica, così la riduzione di sensibilità all'inquinante viene determinata da una più elevata presenza di P nel citoplasma che, competendo con l'As, ne riduce gli effetti tossici sulle cellule vegetali (Meharg, 2006).

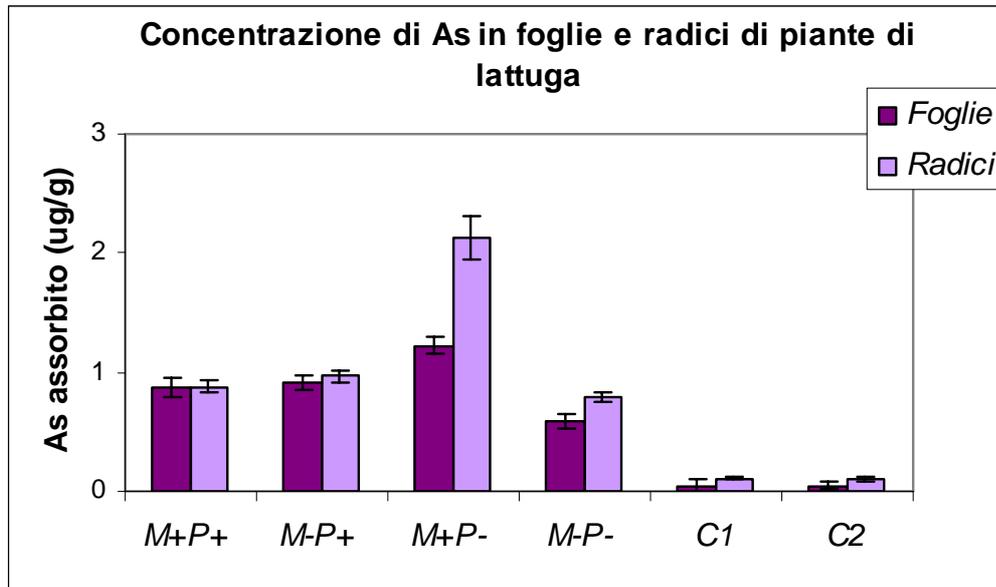


Figura 11. Concentrazione di As in foglie e radici di piante di lattuga allevate su suolo inquinato, in presenza (M+) o in assenza di micorrize (M-) e in presenza (P+) o in assenza (P-) di concimazione fosfatica, e su suolo non inquinato (C1 e C2).

Tabella 13. Contenuto di P e As per vaso.

Campione	Contenuto di P			Contenuto di As		
	Foglie	Radici	Totale	Foglie	Radici	Totale
	mg vaso ⁻¹			µg vaso ⁻¹		
<i>M+P+</i>	66.12	11.89	78.01	17.98	3.84	21.08
<i>M-P+</i>	22.73	6.50	29.27	9.35	3.06	12.42
<i>M+P-</i>	4.56	1.66	6.22	3.64	1.70	5.34
<i>M-P-</i>	6.42	1.77	8.20	2.18	0.84	3.02
<i>C1 (M+P+)</i>	66.86	13.84	80.70	0.92	0.48	1.40
<i>C2 (M-P-)</i>	39.75	11.49	51.24	0.78	0.50	1.28

Per quanto riguarda l'assorbimento del fosfato, le concentrazioni del nutriente riscontrate nei tessuti vegetali sono state riportate graficamente in Figura 12.

A differenza di quanto osservato per l'As, le piante M+P+ hanno manifestato una concentrazione del nutriente superiore a quella riscontrata nelle piante M-P+, in particolare nelle foglie. Difatti, nei loro organi epigei sono stati determinati rispettivamente 3.2 e 2.2 mg g⁻¹ di P (Tabella 12). Anche Chen et al. (2007), hanno osservato, nell'erba medica, una concentrazione di P significativamente più elevata in radici e foglie di piante micorrizzate, generalmente due volte maggiore alle piante controllo non inoculate.

Le piante M+P-, invece, hanno concentrato nelle loro foglie una quantità di P pari a quella osservata nelle piante M-P-, mentre nelle radici la concentrazione dell'inquinante è risultata maggiore nel primo gruppo di piante (Tabella 12). Questo, indica che le piante trattate esclusivamente con il fungo AM hanno traslocato meno fosforo dalle radici alle foglie. Tale fenomeno risulta ancor più evidente osservando il rapporto di concentrazione tra P radicale e P fogliare. Le piante M+P- presentano il più elevato rapporto P radici/P foglie, pari a 1.34, mentre in tutte le altre tesi tale rapporto risulta inferiore e mediamente pari al rapporto osservato nelle piante controllo (C1 e C2 rispettivamente 0.91 e 0.90) (Tabella 14). Questo dimostra la maggiore sofferenza, alla presenza di As, delle piante M+P- che non riescono a traslocare efficientemente P agli organi epigei. Difatti, il contenuto totale di P nelle piante M+P- (6.20 mg vaso⁻¹) è risultato inferiore a quello delle piante M-P- (8.20 mg vaso⁻¹). In particolare, il contenuto radicale risulta quasi lo stesso (1.66 e 1.77 mg vaso⁻¹) mentre il contenuto di P fogliare risulta inferiore nelle piante M+P- (4.56 e 6.42 mg vaso⁻¹) (Tabella 13). Inoltre, nelle piante M+P- anche la traslocazione dell'As dalle radici alle foglie è risultata inferiore rispetto alle altre tesi, come dimostrato dal più elevato rapporto As radici/As foglie (Tabella 14).

Un'elevata quantità totale di P è stata osservata nelle piante M+P+ (78 mg vaso⁻¹), pari al contenuto rilevato nelle piante controllo C1 (80 mg vaso⁻¹) (Tabella 13), ancora una volta a dimostrazione del fatto che le piante inoculate e concimate non hanno subito gli effetti fitotossici dell'inquinante. Anche Chen et al. (2007), hanno osservato un contenuto di P (P per vaso) marcatamente superiore nelle foglie e nelle radici di piante micorrizzate.

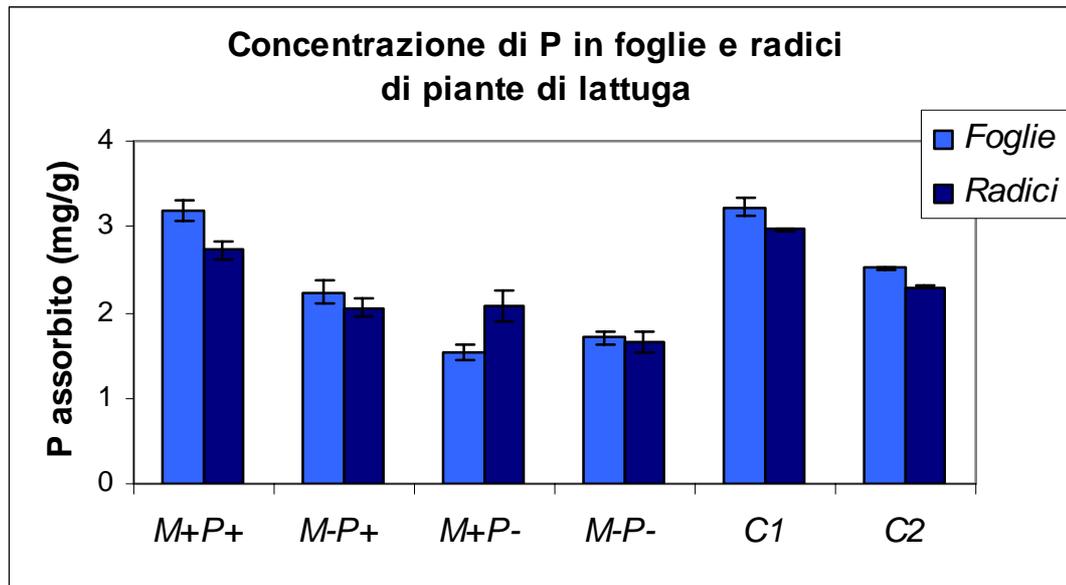


Figura 12. Concentrazione di P in foglie e radici di piante di lattuga allevate su suolo inquinato, in presenza (M+) o in assenza di micorrize (M-) e in presenza (P+) o in assenza (P-) di concimazione fosfatica, e su suolo non inquinato (C1 e C2).

Nelle piante che hanno ricevuto esclusivamente la concimazione fosfatica (M-P+), il contenuto di P è risultato inferiore al controllo C2, che non ha ricevuto né inoculo né concimazione, dimostrando che la presenza di As ha avuto effetti negativi sull'assorbimento del nutriente da parte delle piante M-P+. Meharg e Macnair (1992), hanno osservato che la tolleranza all'As in piante di *Holcus lanatus* è acquisita attraverso la riduzione dell'assorbimento dell'inquinante grazie alla soppressione del sistema di assorbimento ad alta affinità fosfato-arseniato.

La ridotta espressione dei trasportatori di membrana responsabili dell'assorbimento del P e dell'As, in genotipi di *H.lanatus* tolleranti, rappresenta un effettivo meccanismo di tolleranza all'inquinante (Meharg et al., 1994). Tuttavia, anche se l'assorbimento di P nelle piante M-P+ si è ridotto rispetto alle M+P+, anche l'assorbimento dell'As è risultato inferiore nel primo gruppo di piante, in virtù della soppressione del sistema di assorbimento ad alta affinità (Tabella 13). Inoltre, nelle piante M-P+ il contenuto di P, sia in foglie che in radici, è risultato sempre superiore al contenuto in As (Tabella 14). Questo grazie alla più elevata affinità dei trasportatori di membrana per il P che consentono di accumulare maggiori quantità del nutriente rispetto all'elemento tossico anche quando la quantità di As disponibile risulta molto più elevata di quella del P (Meharg et al., 1994).

Dalla determinazione dei rapporti P/As in foglie e radici, è stato evidenziato che le piante cui è stato aggiunto l'inoculo commerciale e il P hanno riportato il valore più alto del rapporto P/As, sia in foglie che in radici. Mentre l'assenza di inoculo in presenza di P ha determinato una riduzione del rapporto, evidenziando che tali piante hanno assorbito maggiori quantità dell'inquinante. L'aggiunta di P alle piante inoculate con funghi AM accresce il rapporto P/As sia in radici che foglie, mentre in quelle non inoculate tale rapporto si riduce (Chen et al., 2007). Anche Liu et al. (2005) hanno osservato, in piante micorrizzate, un più alto rapporto P/As nelle radici rispetto alle piante non inoculate. Il rapporto P/As risulta sempre più elevato nelle foglie che nelle radici, ma in misura molto lieve (Tabella 14), mentre Chen et al. (2007) osservano un rapporto P/As nelle foglie molto più alto rispetto a quello determinato nelle radici. A differenza di quanto detto, nelle piante M+P- il rapporto P/As fogliare è risultato molto più elevato di quello osservato nelle radici, in virtù della loro ridotta traslocazione dell'inquinante negli organi epigei (Tabella 14).

Tabella 14. Rapporto As radici/As foglie; P radici/P foglie; P/As in foglie, e radici di piante di lattuga

Campioni	As radici/foglie	P radici/foglie	P/As foglie	P/As radici
<i>M+P+</i>	1.01	0.85	3676	3096
<i>M-P+</i>	1.05	0.92	2430	2131
<i>M+P-</i>	1.73	1.34	1254	976
<i>M-P-</i>	1.34	0.97	2935	2114
<i>C1 (M+P+)</i>	2.31	0.91	72465	28788
<i>C2 (M-P-)</i>	2.01	0.90	50786	22983

4.2.4-Considerazioni conclusive

Le micorrize costituiscono un parte integrale e funzionale delle radici, provvedendo a creare un legame diretto tra suolo e apparato radicale . Possono per questo avere una grande importanza nel determinare la disponibilità e la tossicità dei metalli pesanti per le piante (Leyval et al., 1997). Le piante che crescono in suoli contaminati possono formare associazioni simbiotiche con le micorrize (Meharg e Hartlet-Whitaker, 2002; Sharples et al., 2002a, b). La colonizzazione dei funghi micorrizici determina una maggiore resistenza delle piante all'As (Meharg e Hartlet-Whitaker, 2002). Nel nostro studio, gli effetti benefici del fungo simbiote sono stati osservati solo in presenza di concimazione fosfatica. Le piante inoculate e concimate hanno prodotto quanto le piante controllo allevate su suolo non contaminato. Diversi studi hanno indicato che l'effetto delle micorrize sulle piante ospiti in condizioni di stress ambientale potrebbe essere attribuito direttamente o indirettamente al miglioramento della nutrizione fosfatica (Liu et al. 2005). Nonostante le piante inoculate e concimate abbiano accumulato maggiori quantità di As, non hanno risentito degli effetti fitotossici dell'inquinante. In queste piante, grazie alla produzione di una maggiore biomassa l'inquinante nei tessuti è stato fortemente diluito.

La concimazione fosfatica in assenza di inoculo ha determinato una riduzione della produzione di biomassa, ma anche un minore contenuto di As rispetto alle piante inoculate e concimate. Difatti, alcuni studi dimostrano che migliorare la nutrizione fosfatica nelle piante non tolleranti alla presenza dell'inquinante riduce la loro sensibilità grazie alla soppressione del sistema di assorbimento ad alta affinità fosfato-arseniato (Meharg e Macnair, 1992).

L'aggiunta di inoculo in assenza di P non ha avuto effetti benefici sulla pianta, poiché la presenza delle micorrize ha determinato una maggiore concentrazione di As nei tessuti vegetali e uno sviluppo ridotto delle piante. Questo rappresenta un dato importante considerando che la concimazione fosfatica è una pratica colturale ordinaria. Coltivare piante d'interesse alimentare su suoli contaminati, in assenza di inoculo micorrizico commerciale, può determinare la produzione di piante non commerciabili.

4.3-Assorbimento di Arsenico in piante di grano (*Triticum durum* cv. Creso) irrigate con acque inquinate artificialmente

4.3.1- Caratteristiche chimico-fisiche del suolo non inquinato

Le analisi di laboratorio eseguite sul suolo non inquinato, campionato in località Presenzano e adoperato per le prove di crescita di piante di grano (*Triticum durum* cv. Creso) irrigate con soluzioni di arsenico a concentrazione crescente (0.5, 1.0, 2.0 mg l⁻¹), hanno rivelato una concentrazione totale del metalloide molto bassa (6.8 mg kg⁻¹), tale da non influenzare i risultati dell'esperimento condotto (Tabella 15).

Le principali proprietà chimico-fisiche del suolo sono state riportate in Tabella 15.

4.3.2- Crescita delle piante e tossicità da arsenico

La germinazione dei semi di grano è stata lievemente influenzata dalla somministrazione di arsenico alle concentrazioni usate nel nostro esperimento. Tuttavia, in un recente studio Zhang e Zhu (2005) hanno mostrato che la germinazione del grano è influenzata considerevolmente sia da arseniato che da arsenito, riducendosi significativamente, in alcune varietà, quando la concentrazione del metalloide raggiunge valori di 1 mg kg⁻¹. La crescita delle piante, nelle prime fasi, non è stata ostacolata dalla presenza dell'inquinante, ad eccezione delle piante irrigate con la soluzione a più alta concentrazione dell'elemento tossico (2 mg l⁻¹) che hanno mostrato immediatamente uno sviluppo più stentato. Come si può osservare dalla Figura 13 A, le piante irrigate con la soluzione del metalloide a più bassa concentrazione (0.5 mg l⁻¹) non hanno mostrato differenze di crescita evidenti rispetto alle piante del vaso controllo, anzi sembrerebbe addirittura che una bassa somministrazione dell'inquinante abbia determinato una vigoria lievemente maggiore. Gli effetti benefici dell'arsenico sono noti per alcune piante, come la canola (*Brassica napus* L.) (Cox et Bell, 1996) e la *Spartina patens* (una pianta di palude) (Carbonell-Barrachina et al., 1998). In generale effetti benefici sono limitati a concentrazioni molto basse dell'inquinante (solitamente <10 µM) (Marschner, 1995). Difatti, secondo alcuni autori, sebbene non esistano evidenze che l'As sia elemento essenziale per le piante, la loro crescita può essere stimolata quando vengono fornite basse dosi del metalloide (Liebig et al., 1959; Carbonell et al., 1998).

Tabella 15. Proprietà chimico-fisiche del suolo non inquinato

<i>Parametri chimico-fisici</i>		Presenzano
<i>Sabbia</i>	g kg ⁻¹	519
<i>Limo</i>	g kg ⁻¹	275
<i>Argilla</i>	g kg ⁻¹	206
<i>pH (H₂O)</i>		5.70
<i>Calcare totale</i>	%	0.00
<i>Sostanza organica</i>	%	2.30
<i>Azoto totale</i>	g kg ⁻¹	1.21
<i>P₂O₅</i>	mg kg ⁻¹	13.50
<i>CSC</i>	meq/100g	18.50
<i>As totale</i>	mg kg ⁻¹	6.80
<i>Al^a</i>	mg kg ⁻¹	1163.70
<i>Al^b</i>	mg kg ⁻¹	2692.50
<i>Fe^a</i>	mg kg ⁻¹	3358.20
<i>Fe^b</i>	mg kg ⁻¹	6634.70

^a Al e Fe estratti in Ammonio ossalato; ^b Al e Fe estratti in Ditionitio citrato

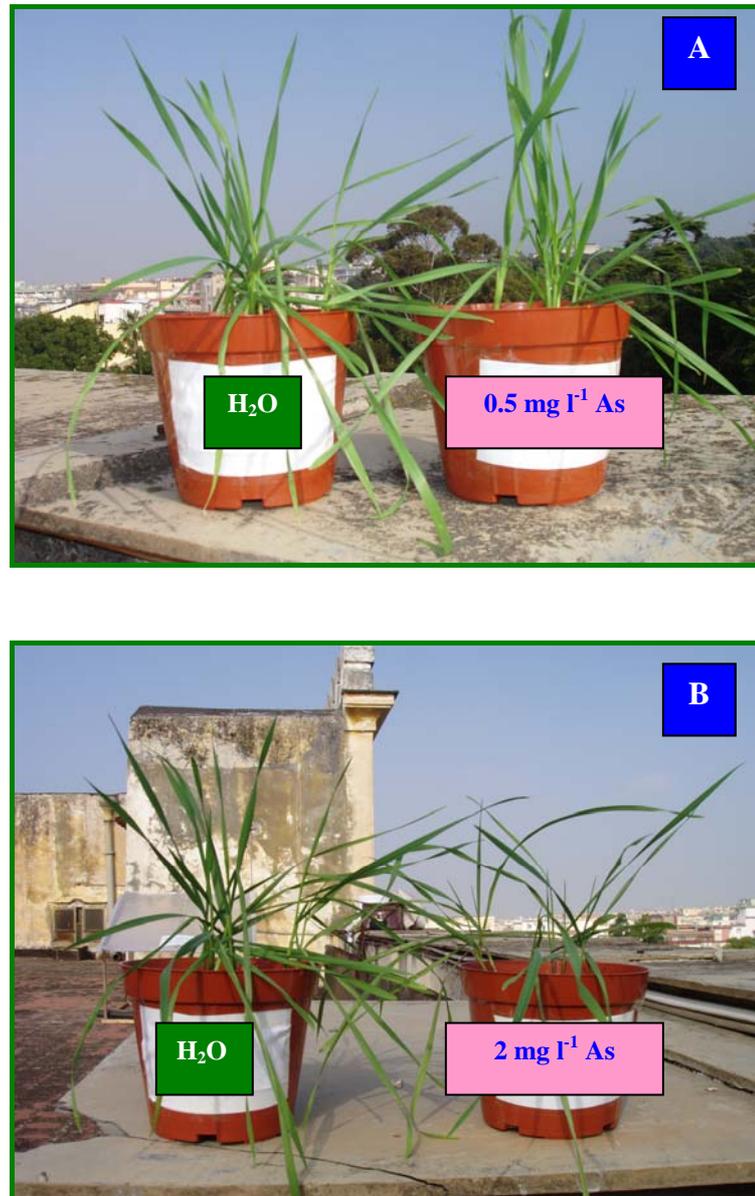


Figura 13. Confronto visivo tra la crescita di piante di grano irrigate con acqua e piante irrigate con soluzioni di arsenico a concentrazione di: A) 0.5 mg l⁻¹ e B) 2 mg l⁻¹.

Nella Figura 13 B, appare evidente come la maggiore concentrazione dell'inquinante provochi nelle piante di grano, sin dall'inizio, uno sviluppo più difficoltoso.

Altri sintomi di tossicità, ma di modesta entità, sono apparsi alcune settimane dopo la prima somministrazione dell'elemento tossico, ancora una volta in particolare sulle piante irrigate con la soluzione a più alta concentrazione (2 mg l^{-1}). Inizialmente si è osservata la formazione di punti necrotici bruno-rossastri sulle foglie vecchie ed in seguito la loro rapida senescenza.

I sintomi di tossicità da arsenico riportati in letteratura sono variabili e vanno dall'afflosciamento delle foglie alla comparsa di una colorazione violetta (per incremento degli antociani), dalla decolorazione delle radici fino alla plasmolisi cellulare. Tuttavia, il sintomo più comune, è la riduzione della crescita (Kabata-Pendias e Pendias, 2001)

Contrariamente a quanto riscontrato durante le prime fasi di crescita, l'applicazione protratta e continuata di arsenico ha avuto un effetto notevole sulla produzione di biomassa delle piante di grano. È stato osservato che la produzione di sostanza secca decresce marcatamente all'aumentare della concentrazione di arsenico nell'acqua d'irrigazione (Tabella 16).

Tale fenomeno è apparso molto più evidente nelle piante allevate in assenza di concimazione fosfatica (P-). Infatti, nei campioni concimati con fosfato (P+) è stata osservata una riduzione nella produzione di biomassa, rispetto al controllo, dell'11.9%, 16%, e 26% nelle piante irrigate rispettivamente con soluzioni di 0.5, 1.0, e 2.0 mg l^{-1} . Questa tendenza si è enormemente accentuata nei campioni di piante P- dove la riduzione è stata rispettivamente del 15%, 52%, e 67%. Questi risultati sono in accordo con alcuni dati riportati in letteratura (Abedin et al., 2002; Liu et al., 2005).

La produzione di granella è stata influenzata dall'applicazione del metalloide mediante irrigazione, in particolare nelle piante P-. Difatti, tra queste, si è osservata una notevole differenza tra la quantità di granella prodotta dal vaso controllo (8.40 g vaso^{-1}) e quella data dal vaso irrigato con la soluzione a più alta concentrazione dell'inquinante (2.20 g vaso^{-1}), che ha mostrato una produzione inferiore del 74%. Nel caso delle piante P+ l'esposizione alle concentrazioni di arsenico da 0.5 a 2.0 mg l^{-1} ha determinato una piccola o moderata riduzione nella produzione di granella (dal 17 al 33%) variando da 21.25 a 14.30 g vaso^{-1} (Tabella 16).

Anche il peso secco di fusti e foglie ha subito una considerevole variazione in seguito all'interazione As/P. La biomassa epigea si è ridotta all'aumentare della concentrazione di As nell'acqua d'irrigazione, specialmente quando le piante non sono state concimate con P (Tabella 16).

Per quanto riguarda la produzione di biomassa radicale, nelle piante P-, questa si è ridotta del 54%, 68% e 79% somministrando rispettivamente 0.5, 1, 2 mg l⁻¹ di arsenico, mentre nelle piante P+ la riduzione è risultata del 4.2%, 18.8% e 33%. La quantità minore di radici (0.38 g vaso⁻¹) è stata prodotta nella tesi trattata con la concentrazione più elevata del metalloide e non concimata con fosfato, seguita dalla tesi irrigata con la soluzione di 1 mg l⁻¹ (0.57 g vaso⁻¹). La più alta, invece, si è osservata nel testimone irrigato con sola acqua e concimato con fosfato (2.40 g vaso⁻¹). La concimazione fosfatica ha accresciuto significativamente la biomassa radicale in tutti i trattamenti. Infatti, la quantità di radici prodotta nei vasi irrigati con soluzioni di As pari a 0.5 e 1 mg l⁻¹ e concimate con P risulta superiore rispetto al testimone non concimato, tuttavia tali valori (rispettivamente 2.30 e 1.95 g vaso⁻¹) si sono rivelati più bassi rispetto al controllo P+ (Tabella 16).

L'applicazione della soluzione a concentrazione più bassa di arsenico non ha avuto effetto sul rapporto radici/fusti e foglie nella piante P+, mentre una chiara riduzione del rapporto si è osservata nelle piante P- (Tabella 16).

Questo dimostra che la biomassa radicale varia al variare della concentrazione di As nelle acque d'irrigazione più rapidamente della biomassa epigea, in particolare nelle piante non concimate con fosfato. Liu et al. (2005) studiando lo sviluppo di piante di grano, appartenenti a sei diverse varietà di *Triticum aestivum*, in presenza di arseniato o arsenito, hanno riportato una significativa riduzione della biomassa radicale nelle piantine di tutte e quattro le varietà all'aumentare della concentrazione del metalloide. Secondo Zhang e Zhu (2005) la riduzione dello sviluppo delle radici può essere imputata al fatto che, essendo la radice il primo punto di contatto con l'inquinante nel mezzo di crescita, la pianta cerchi di ridurre la superficie a diretto contatto con il metalloide. Quaghebeur e Rengel (2003) hanno osservato che all'aumentare dei livelli di As (V), nella soluzione nutritiva, si ha un decremento del peso secco di radici e fusti di *Holcus lanatus*, in maniera molto più marcata quando le piante non vengono concimate con fosfato.

Tabella 16. Biomassa prodotta da piante di grano irrigate con tre soluzioni di arsenico a concentrazione crescente (0.5, 1.0, 2.0 mg l⁻¹)

Campione	Radici	Fusti e foglie	Granella	Totale	Radici/Fusti e foglie
		g			
<i>Controllo P-</i>	1.80 ± 0.09	12.20 ± 0.80	8.40 ± 0.45	22.40	0.145
<i>0,5 mg l⁻¹</i>	0.83 ± 0.07	11.90 ± 0.60	5.75 ± 0.22	18.48	0.070
<i>1 mg l⁻¹</i>	0.57 ± 0.08	7.50 ± 0.42	3.00 ± 0.18	11.07	0.076
<i>2 mg l⁻¹</i>	0.38 ± 0.07	4.60 ± 0.22	2.20 ± 0.12	7.18	0.083
 <i>Controllo P+</i>	 2.40 ± 0.16	 13.00 ± 0.70	 21.25 ± 1.05	 36.35	 0.185
 <i>0,5 mg l⁻¹</i>	 2.30 ± 0.14	 12.40 ± 0.74	 17.60 ± 0.90	 32.30	 0.185
 <i>1 mg l⁻¹</i>	 1.95 ± 0.10	 11.80 ± 0.58	 16.90 ± 0.88	 30.65	 0.165
 <i>2 mg l⁻¹</i>	 1.60 ± 0.12	 11.20 ± 0.65	 14.30 ± 0.62	 27.10	 0.143

In conclusione possiamo affermare che, alle concentrazioni di As ($0.5 - 2 \text{ mg l}^{-1}$) adoperate per irrigare il grano allevato su suolo non inquinato, la crescita delle piante e la produzione di granella si sono mostrate moderatamente inibite dall'inquinante in presenza di fosfato (Figura 14).

La differenza nella produzione di biomassa tra piante P- e P+ alla concentrazione di 2 mg l^{-1} , dimostra l'importante ruolo del P nel prevenire la tossicità e l'inibizione della crescita provocata dalla presenza dell'inquinante sulle piante di grano. Infatti, studi condotti sulla tossicità da arsenico, hanno mostrato che le specie vegetali non resistenti all'inquinante subiscono uno stress considerevole in seguito all'esposizione al metalloide, con sintomi che vanno dall'inibizione dello sviluppo radicale fino alla morte della pianta (Meharg e Macnair, 1991; Barrachina et al., 1995). Tali piante possono divenire più resistenti all'arsenico attraverso la somministrazione di fosfato (Meharg e Macnair, 1992; Lee et al., 2003). In alcune piante resistenti, con un elevato tenore in P, è stata osservata una ridotta sensibilità al metalloide determinata non da un ridotto assorbimento di As, ma presumibilmente da una maggiore presenza di P nel citoplasma che competendo efficientemente con l'As riduce i danni provocati dall'inquinante alle cellule vegetali (Meharg et al., 1994).

4.3.3-Concentrazione di As e P nei tessuti vegetali

La concentrazione di arsenico in radici, fusti e foglie si è significativamente accresciuta incrementando la concentrazione del metalloide nelle acque d'irrigazione, mentre nella granella non si è rivelata significativamente differente nei tre trattamenti. Il valore più alto, cinque volte maggiore del controllo (rispettivamente 0.24 e 0.05 mg kg^{-1}), è stato riscontrato nelle piante P- irrigate con la soluzione di As più inquinata (Tabella 17).

Tali risultati potrebbero indicare che a livelli elevati di As nelle acque d'irrigazione, l'elemento causa una grave tossicità alle piante di grano determinando una riduzione della crescita e una minore traslocazione, di As stesso e di altri nutrienti, dalla soluzione del suolo alla granella. Risultati simili sono stati riportati da Rahaman et al. (2007) in piante di riso. Anche Abedin et al. (2002) hanno osservato che la concentrazione di As nel riso rimane statisticamente indifferente all'aumentare della concentrazione di arseniato nelle acque d'irrigazione.

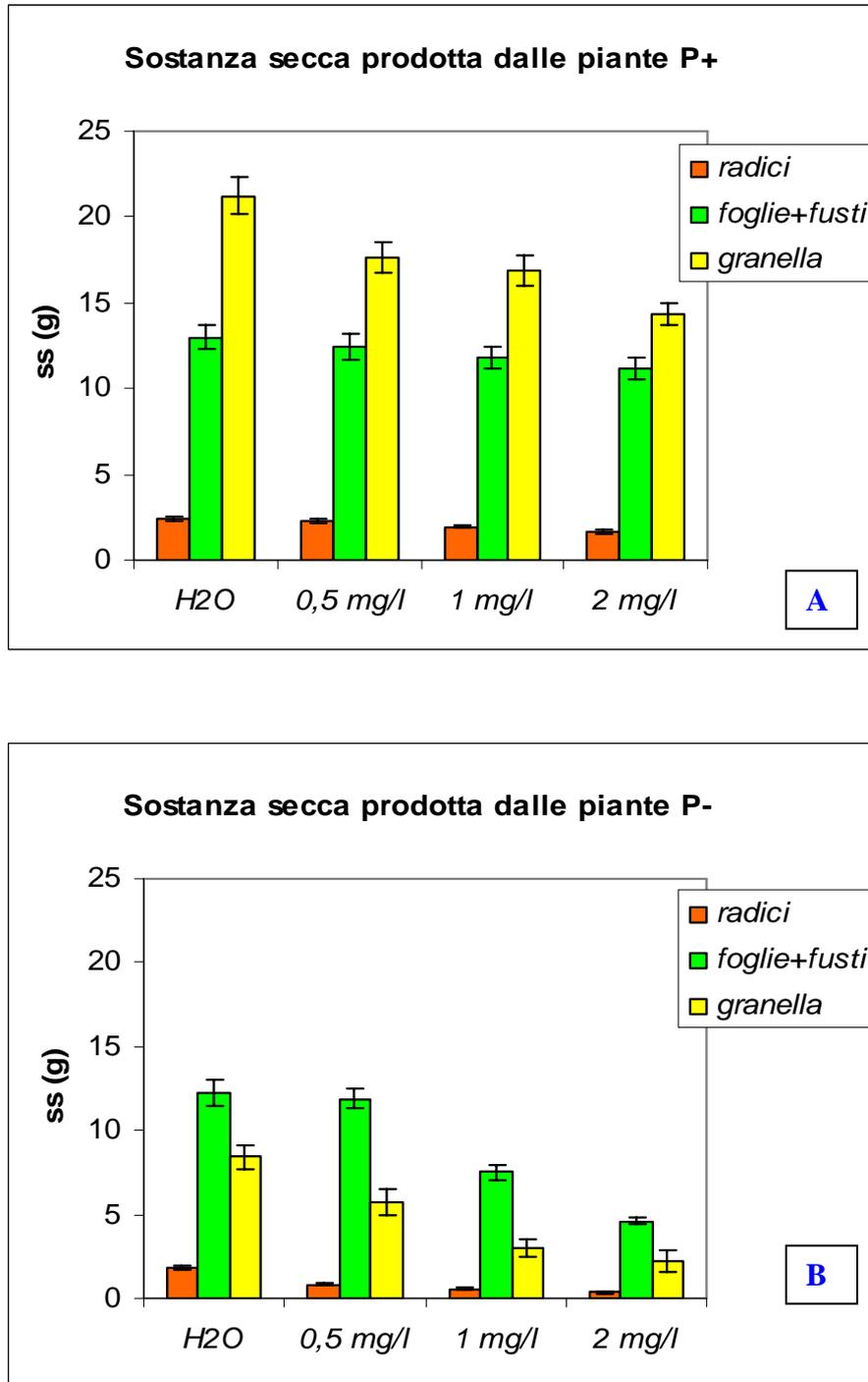


Figura 14. Sostanza secca (ss) prodotta in radici, fusti + foglie e granella di piante di grano irrigate con soluzioni di arsenico a concentrazione crescente da 0,5 a 2 mg l⁻¹: A) concimate con fosfato (P+); B) non concimate con fosfato (P-)

Tabella 17. Concentrazione totale di P e As in piante di grano esposte a tre differenti concentrazioni di As nelle acque d'irrigazione

Campione	Concentrazione P			Concentration As		
	Radici	Fusti e foglie	Granella	Radici	Fusti e foglie	Granella
	g kg ⁻¹			mg kg ⁻¹		
<i>Controllo P-</i>	1.32 ± 0.04	2.35 ± 0.02	6.16 ± 0.12	0.18 ± 0.05	0.07 ± 0.04	0.05 ± 0.03
<i>0,5 mg l⁻¹</i>	1.45 ± 0.08	2.27 ± 0.08	7.58 ± 0.16	0.63 ± 0.02	0.43 ± 0.01	0.24 ± 0.02
<i>1 mg l⁻¹</i>	1.77 ± 0.07	0.75 ± 0.05	6.59 ± 0.36	1.10 ± 0.03	0.44 ± 0.02	0.19 ± 0.02
<i>2 mg l⁻¹</i>	2.80 ± 0.10	0.65 ± 0.02	5.59 ± 0.28	2.06 ± 0.05	0.62 ± 0.02	0.20 ± 0.03
<i>Controllo P+</i>	1.47 ± 0.02	3.20 ± 0.01	5.55 ± 0.12	0.22 ± 0.04	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.04
<i>0,5 mg l⁻¹</i>	2.23 ± 0.03	2.46 ± 0.01	6.26 ± 0.18	1.40 ± 0.04	0.47 ± 0.03	0.11 ± 0.02
<i>1 mg l⁻¹</i>	2.55 ± 0.13	2.54 ± 0.04	6.41 ± 0.09	1.70 ± 0.05	0.56 ± 0.04	0.12 ± 0.03
<i>2 mg l⁻¹</i>	2.78 ± 0.12	2.74 ± 0.04	6.58 ± 0.32	3.20 ± 0.05	0.65 ± 0.04	0.14 ± 0.01

La concentrazione di As nella granella delle piante P+ ha subito una variazione moderata, tra 0.05 (controllo) e 0.14 mg kg⁻¹ (soluzione più concentrata). Nelle radici è aumentata all'aumentare della concentrazione del metalloide nell'acqua d'irrigazione e in presenza di concimazione fosfatica. Infatti, la quantità massima di As (3.2 mg kg⁻¹) è stata osservata nella radici delle piante P+ irrigate con la soluzione a più alta concentrazione dell'inquinante (Tabella 17).

Per un'immediata valutazione della distribuzione del metalloide negli organi delle piante di grano, le concentrazioni di As determinate nei tessuti radicali, in fusti e foglie, e nella granella vengono riportate in Figura 15.

Risultati analoghi sono stati ottenuti da altri autori (Tao et al., 2006) studiando l'influenza del P sull'assorbimento di As in piante di grano.

Incrementando la concentrazione del metalloide nell'acqua irrigua è aumentato il contenuto di arsenico nelle radici (µg vaso⁻¹) variando tra 0.52 e 0.78 e tra 3.22 e 5.12, in piante P- e P+ rispettivamente, mentre in fusti e foglie è aumentato nelle piante P+ e si è ridotto nelle piante P- (Tabella 18).

I risultati hanno mostrato che la più alta concentrazione di As nell'acqua d'irrigazione riduce la traslocazione dell'elemento fitotossico dalle radici ai germogli; difatti il rapporto tra la concentrazione del metalloide contenuto nelle radici e quella contenuta nei germogli aumenta, incrementando la quantità di As aggiunta ed effettuando la concimazione fosfatica (Tabella 19).

E' stato evidenziato che la concentrazione dell'inquinante nelle radici subisce un più rapido incremento rispetto alla concentrazione in fusti e foglie, e che le radici sono molto più sensibili alla presenza di As rispetto agli organi epigei.

I risultati hanno indicato, inoltre, che in presenza di concimazione fosfatica, la maggior parte dell'arsenico accumulato nei tessuti delle piante di grano, resta nell'apparato radicale mentre la quota più piccola si rinviene nella granella.

Sebbene la concimazione fosfatica aumenti l'assorbimento totale dell'elemento tossico, l'incremento rimane localizzato nelle radici. Infatti, nelle piante P- irrigate con la soluzione a più alta concentrazione del metalloide, il 72% di As si accumula nelle radici, il 21.5 % nei germogli e il 6.5% nella granella; mentre nelle piante P+ si riscontra l'81%, del metalloide totalmente assorbito dalla pianta, nelle radici, il 15.5% in fusti e foglie e solo il 3.5 % nella granella (Figura 16).

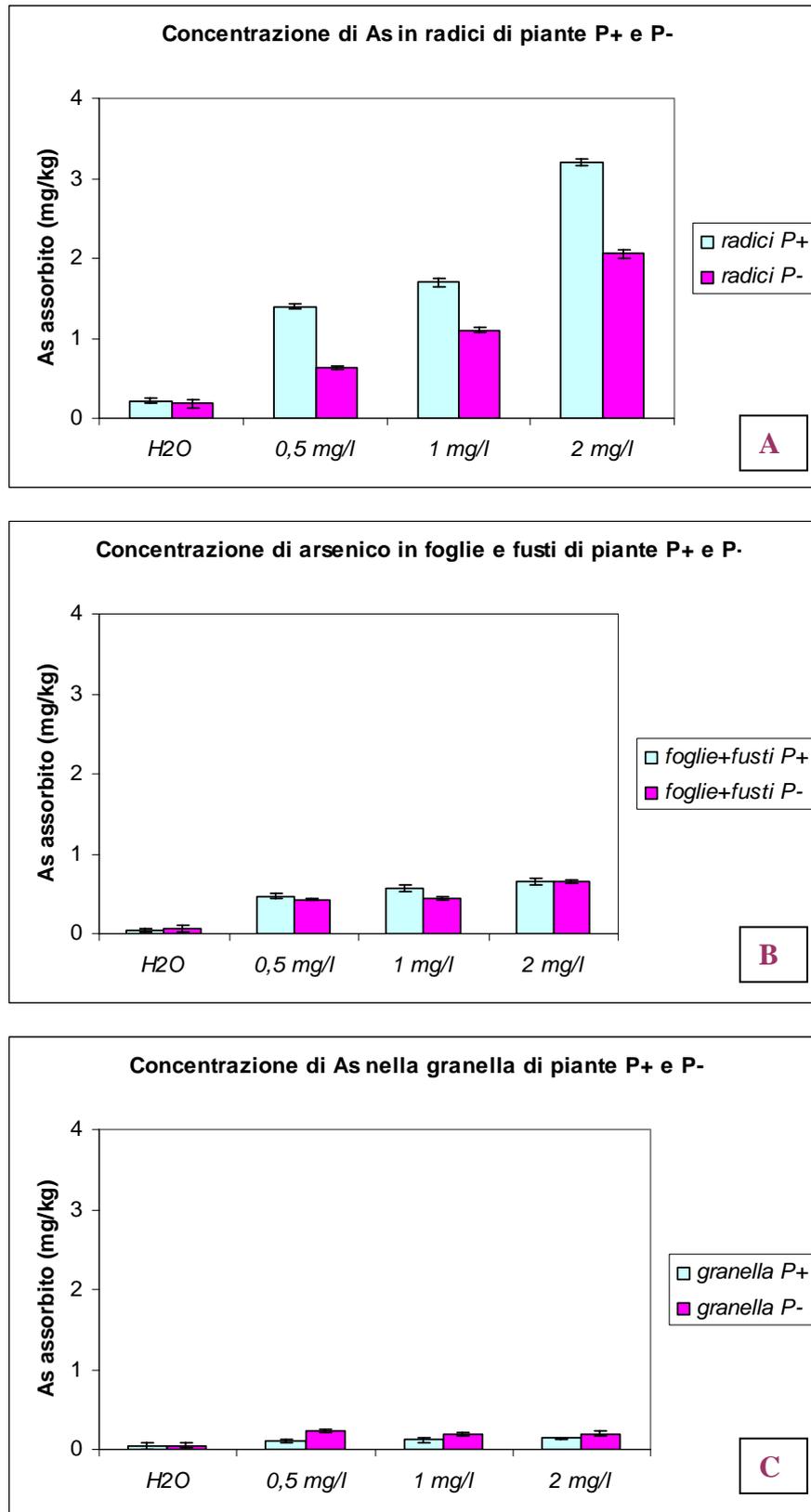


Figura 15. Concentrazione di As in A) radici; B) foglie e fusti; C) granella di piante di grano concimate (P+) e non concimate (P-) con fosfato.

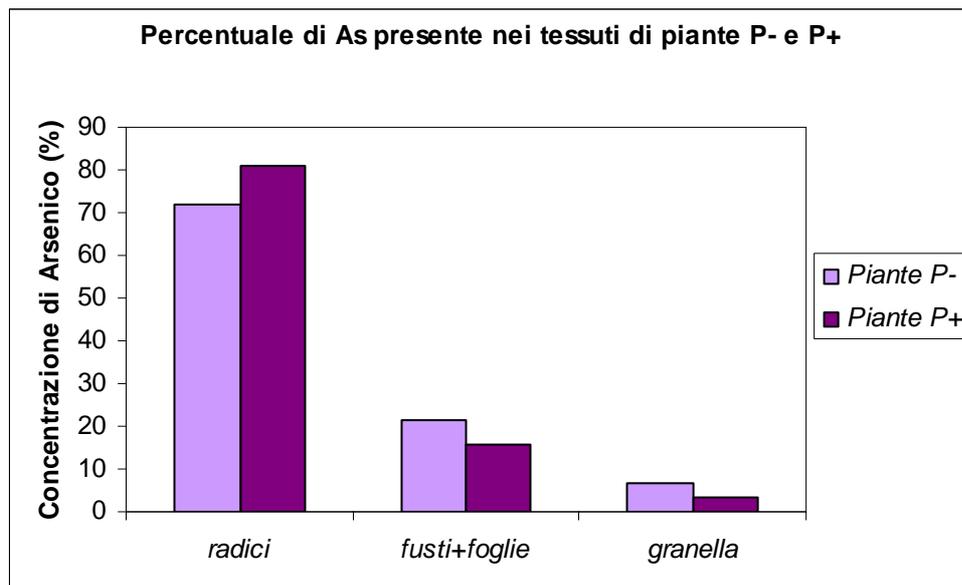


Figura 16. Percentuale di arsenico presente in radici, fusti+foglie e granella di piante di grano irrigate con la soluzione del metalloide a più alta concentrazione (2 mg l^{-1}), con (P+) e senza (P-) concimazione fosfatica.

Anche Abedin et al. (2002), conducendo uno studio su piante di riso, hanno osservato un'elevata quantità di As trattenuta dalle radici rispetto al fusto ed alla granella. Altri lavori mostrano stessi risultati (Meharg et al., 2001; Duxbury et al., 2002; Rahman et al., 2006, 2007).

La presenza del metalloide nella biomassa epigea dei cereali è chiaramente indesiderabile e riduce la qualità della granella. I nostri risultati indicano che la somministrazione di P determina un ridotto accumulo di inquinante nei fusti, nelle foglie e nella granella. Questo può avere un'applicazione pratica per colture allevate in pieno campo dove si ricorra per l'irrigazione ad acque contaminate.

La concentrazione di fosforo nelle radici è aumentata in seguito alla somministrazione di As. Nelle piante P- va da un minimo di 1.45 ad un massimo di 2.80 g kg⁻¹ nella tesi irrigata con la soluzione del metalloide a più alta concentrazione, e da 2.23 a 2.78 g kg⁻¹ nelle piante P+. Tuttavia, la concentrazione di P presente nelle radici aumenta più rapidamente nelle piante P- all'aumentare dei livelli di As (Tabella 17).

Lambkin e Alloway (2003) hanno osservato, in seguito alla somministrazione di basse concentrazioni di As, un incremento di As e P nella soluzione del suolo e nella pianta. I risultati della loro ricerca hanno mostrato che in seguito all'aggiunta di As aumenta l'assorbimento di P da parte della pianta poiché il nutriente viene più facilmente desorbito dai costituenti del suolo in conseguenza della competizione esercitata dal metalloide. Ciononostante il rapporto As/P nella pianta cresce mostrando un incremento nell'assorbimento di As all'aumentare della quantità somministrata dell'elemento tossico (Lambkin e Alloway, 2003).

È stato inoltre accertato che il contenuto di P radicale, nelle piante P-, si è ridotto da 2.4 (pianta controllo) a 1.0 mg vaso⁻¹ nelle piante irrigate con la soluzione più concentrata (2 mg l⁻¹). Al contrario, nelle radici delle piante P+ il contenuto di fosforo è aumentato da 3.4 (pianta controllo) a 5.1 mg vaso⁻¹ (0.5 mg l⁻¹) (Tabella 18).

Meharg et al. (1994) hanno osservato che l'accumulo di fosfato ed arseniato attraverso le radici avviene mediante lo stesso sistema d'assorbimento, e che tale sistema è molto più efficiente nell'assorbimento del fosfato. Questi risultati potrebbero spiegare come le piante tolleranti possano sopravvivere anche in presenza di elevati livelli di arseniato e, chiaramente, come in siti contaminati le piante riescano ad assorbire abbastanza fosfato per potere accrescersi (Meharg, 2006).

La *Pteris ensiformis*, non iperaccumulatrice, accumula più fosfato rispetto alla iperaccumulatrice *Pteris vittata* (Singh e Ma, 2006). Cox e Bell (1996) hanno ipotizzato che in presenza di arseniato la pianta reagisce come se ci fosse una carenza di fosfato, in quanto l'elemento tossico, pur sostituendo il nutriente nei tessuti vegetali, non riesce ad espletare il ruolo di trasportatore di energia di quest'ultimo. Così, all'aumentare della concentrazione di arsenico, la pianta incrementa l'assorbimento di fosforo.

La concentrazione di fosforo in fusti e foglie si è ridotta consistentemente nelle piante P- rispetto al controllo e alle piante P+; nelle piante P+, invece, si è ridotta rispetto al controllo, ma è rimasta costante all'aumentare del livello di As (Tabella 17).

Elevate concentrazioni di arsenico hanno ridotto drasticamente il contenuto di P in fusti e foglie, con l'inibizione più severa nelle piante P- dove i valori osservati sono stati pari al 10% (2 mg l^{-1}) e al 93% (0.5 mg l^{-1}) del valore controllo. Nelle piante P+ il valore osservato è stato pari circa al 74% del controllo e costante all'aumentare della concentrazione dell'inquinante nell'acqua d'irrigazione (Tabella 18).

Un elevato livello di As ha avuto un effetto lieve sul sistema di assorbimento del fosforo nelle piante P+, ma evidentemente ha causato seri danni nelle piante P- come dimostrato dalla loro incapacità di traslocare il nutriente in fusti e foglie.

Risultati analoghi sono stati osservati da Clark et al. (2000) in *Arabidopsis Thaliana*, dove in presenza di arseniato il valore del contenuto di P varia tra il 18 e il 33% del valore controllo, con un'inibizione maggiore nelle tesi con la più bassa somministrazione di fosforo. Gli autori suppongono che, attraverso l'inibizione del trasporto di fosfato agli organi epigei, l'arseniato crea uno stato che viene interpretato dalla pianta come una ridotta richiesta del nutriente da parte di fusti e foglie.

Risultati simili sono stati osservati per il contenuto di P nella granella (g vaso^{-1}) (Tabella 18).

La concentrazione di P nella granella aumenta in presenza di As nell'acqua irrigua, sia nelle piante P- che in quelle P+, ad eccezione delle piante P- irrigate con la soluzione più inquinata. Il valore più basso riscontrato nelle piante controllo, probabilmente è dovuto ad un effetto diluizione in quanto la granella prodotta dalle piante non esposte all'inquinante è risultata più elevata rispetto alle piante esposte all'elemento tossico (Tabella 17).

Tabella 18. Contenuto di fosforo e arsenico per vaso

Campione	Contenuto di P			Contenuto di As		
	Radici	Fusti e foglie g vaso ⁻¹	Granella	Radici	Fusti e foglie µg vaso ⁻¹	Granella
<i>Controllo P-</i>	0.0024	0.029	0.052	0.32	0.85	0.42
<i>0,5 mg l⁻¹</i>	0.0012	0.027	0.043	0.52	5.12	0.98
<i>1 mg l⁻¹</i>	0.0010	0.006	0.020	0.63	3.30	0.57
<i>2 mg l⁻¹</i>	0.0010	0.003	0.012	0.78	2.85	0.44
<i>Controllo P+</i>	0.0034	0.042	0.118	0.52	0.65	1.06
<i>0,5 mg l⁻¹</i>	0.0051	0.031	0.110	3.22	5.83	1.94
<i>1 mg l⁻¹</i>	0.0050	0.030	0.108	3.32	6.61	2.03
<i>2 mg l⁻¹</i>	0.0045	0.031	0.094	5.12	7.28	2.00

Il rapporto tra contenuto di fosforo in radici e contenuto di fosforo in fusti + foglie è aumentato all'aumentare del livello di As, in maniera consistente nelle piante non concimate. Infatti, ad elevate concentrazioni di arseniato, nelle piante P-, il rapporto è stato otto volte più alto rispetto al controllo, mentre nelle piante P+ solo due volte più elevato, a dimostrazione del fatto che le piante P- non riescono a traslocare efficientemente P agli organi epigei (Tabella 19).

Questi risultati sono in accordo con gli studi di Geng et al. (2006a), che hanno osservato in piante di alcune varietà invernali di grano, un più alto rapporto P radici/P fusti e foglie in condizioni di basso rifornimento di fosforo. È stato inoltre dimostrato che le piante resistenti all'arsenico hanno un più elevato contenuto di fosforo negli organi ipogei, nonostante mostrino una soppressione del sistema di assorbimento del P in risposta all'alta concentrazione del nutriente nelle radici (Meharg et al., 1994).

Il rapporto P/As in radici e fusti e foglie si è ridotto all'aumentare del livello di arsenico somministrato, in misura più evidente nelle piante P-. Tale rapporto si è mostrato più alto in fusti e foglie rispetto alle radici, ma nelle piante P- solo nella tesi irrigata con la soluzione a più bassa concentrazione dell'inquinante (0.5 mg l^{-1}). La somministrazione di P ha ridotto il rapporto P/As nelle radici. Al contrario, il rapporto P/As in fusti + foglie delle piante P+ si è rivelato molto più alto rispetto alle P- a parità di concentrazione di As nell'acqua irrigua (Tabella 19).

Nelle piante di grano all'aumentare del livello di arsenico e in presenza di concimazione fosfatica aumenta la traslocazione di P agli organi epigei e decresce la traslocazione di As. Non vi è dubbio che il miglioramento della nutrizione fosfatica delle piante, in presenza di alte concentrazioni di arsenico, diluisca la presenza dell'inquinante in fusti e foglie. Questa tesi avvalorata i risultati ottenuti da altri autori (Meharg et al., 1994), secondo i quali il fosforo riduce il trasferimento di As dal suolo alla biomassa epigea. La fertilizzazione fosfatica minimizza la traslocazione di As in fusti e foglie mentre esalta l'approvvigionamento di P.

Tu e Ma (2003) hanno esaminato l'effetto interattivo di pH, As e P sull'assorbimento di arsenico da parte della felce iperaccumulatrice *Pteris vittata* e hanno riscontrato che l'applicazione di P riduce la quantità di arsenico assorbita. D'altra parte, Tao et al. (2006) hanno osservato un aumento nell'accumulo di As negli organi ipogei ed epigei di piante di grano concimate con P. Al contrario, nelle piante di riso (Liu et al., 2005) è

Tabella 19. Rapporto P/As in radici, fusti + foglie e granella; rapporto P radici/P granella; rapporto As radici/As granella in piante di grano esposte a tre differenti concentrazioni di arsenico

Campione	P/As radici	P/As fusti+foglie	P/As granella	As radici/fusti+foglie	P radici/fusti+foglie
<i>Controllo P-</i>	7330	33570	123200	2.57	0.56
<i>0,5 mg l⁻¹ N</i>	2310	5280	3160	1.47	0.64
<i>1 mg l⁻¹ N</i>	1610	1700	3510	1.75	2.36
<i>2 mg l⁻¹ N</i>	1360	1050	2730	3.33	4.31
<i>Controllo P+</i>	6681	64000	111000	4.40	0.46
<i>0,5 mg l⁻¹ N+P</i>	1600	5230	5670	2.98	0.91
<i>1 mg l⁻¹ N+P</i>	1500	4540	5320	3.04	1.00
<i>2 mg l⁻¹ N+P</i>	870	4220	4700	4.92	1.01

stato riscontrato che la carenza di fosforo riduce la traslocazione di As nelle foglie e ne esalta l'accumulo nelle radici.

4.3.4-Considerazioni conclusive

Il nostro studio ha rivelato che il rifornimento di fosforo determina una maggiore concentrazione di arsenico nelle radici, probabilmente perché l'applicazione di fertilizzante contenente fosfato inibisce l'adsorbimento di As sulla superficie dei colloidi del suolo (Violante et al., 2005b) incrementando la quantità d'inquinante presente nella soluzione del suolo e quindi determinando una maggiore disponibilità del metalloide per le piante. È possibile che l'assorbimento di arsenico sia un processo passivo controllato dalla concentrazione stessa del metalloide nella soluzione circolante. Per alleviare la tossicità dell'arsenico le piante devono assorbire una sufficiente quantità di P tale da bilanciare l'eccesso di inquinante (Burlo et al., 1999; Carbonell-Barrchina et al., 1997). Lee et al. (2003), indicano *ars I* come un nuovo mutante di *Arabidopsis* che esibisce una maggiore tolleranza all'arseniato e un più elevato assorbimento di fosfato. Essi suggeriscono che la tolleranza all'arsenico potrebbe essere esaltata accrescendo l'assorbimento di fosforo. La nostra ipotesi è che la nutrizione fosfatica potrebbe essere coinvolta nella riduzione della produzione di specie reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species-ROS*) e delle proteine non tioliche, formate durante l'esposizione all'As e responsabili del danneggiamento dei tessuti e della perossidazione dei lipidi (Hartley-Whitaker et al., 2001a e b). Geng et al. (2006b) in piantine di due differenti genotipi di riso, riscontrano uno stress maggiore indotto dall'arsenico nel genotipo con una più alta produzione di enzimi antiossidanti e proteine non tioliche.

La concentrazione di arsenico usata nel nostro esperimento può ritrovarsi in aree caratterizzate da contaminazione da arsenico di acque sotterranee e da attività mineraria. In ogni caso, la concimazione fosfatica può ridurre gli effetti della tossicità da As senza incremento della concentrazione dell'inquinante negli organi epigei della pianta. Questo ha un'importanza pratica nei sistemi agricoli, poiché può ridurre le perdite di raccolto ed incrementarne la qualità.

5-Conclusioni

5.1-Arsenico e agricoltura

Gli esperimenti condotti hanno permesso, innanzitutto, di evidenziare lo stretto legame che intercorre tra contenuto in ossidi di ferro e alluminio e contenuto totale di As in suoli inquinati dal metalloide. In particolare, è stato possibile rilevare la grande influenza che tali ossidi esercitano sulla mobilità dell'As nel suolo. Già Violante et al. (2006, 2007a) hanno sottolineato l'importanza di ossidi e idrossidi di Fe, Al e Mn, nei meccanismi di adsorbimento dell'inquinante. È stata inoltre accertato che, più che il contenuto totale del metalloide nel suolo, è importante conoscere la quantità delle sue frazioni più mobili e maggiormente disponibili per le piante poiché sono queste che possono accumularsi nei tessuti vegetali e provocare fenomeni di fitotossicità.

Il nostro studio ha consentito, inoltre, di osservare che l'uso in agricoltura di suoli ed acque inquinate da As determina assorbimento dell'elemento tossico da parte di specie vegetali adoperate per l'alimentazione umana e del bestiame, determinando l'ingresso del metalloide nella catena alimentare e ponendo un serio rischio per la salute dell'uomo.

È stato osservato che la risposta delle piante alla presenza di As nel suolo varia in funzione della specie vegetale e delle condizioni di crescita.

Il grano (*Triticum durum* cv. Cresco) allevato su suoli inquinati ha assorbito As accumulandolo principalmente nelle radici. Difatti, a differenza di ciò che è accaduto negli organi ipogei della pianta, all'aumentare della concentrazione dell'inquinante nel suolo non si sono riscontrate grosse differenze tra le concentrazioni del metalloide nelle biomasse epigee. Le piante di grano concimate con fosfato hanno presentato, nelle radici di alcune tesi, una concentrazione del metalloide dimezzata rispetto alle piante non concimate. La presenza di P ha ridotto anche la traslocazione di As agli organi epigei della pianta. Questo dato ha un'importanza pratica laddove ci si trovi per necessità ad adoperare suoli inquinati per svolgere attività agricola.

Anche le piante di lattuga (*Lactuca sativa* cv Trocadero) cresciute su suolo inquinato hanno accumulato As, ma in quantità marcatamente inferiore a quella osservata nelle piante di grano. In realtà, la lattuga si è presentata anche più sensibile agli effetti fitotossici del metalloide, mostrando, in alcune tesi, una crescita molto stentata e ridotta. L'aggiunta di micorrize ha determinato un'elevata sensibilità delle piante di lattuga al metalloide. Difatti, le piante esclusivamente inoculate con funghi AM hanno mostrato uno sviluppo estremamente ridotto, tale da renderle non commerciabili. Al contrario, la

somministrazione combinata di inoculo micorrizico e concimazione fosfatica ha aiutato le piante a tollerare la presenza dell'inquinante nel suolo e nei propri organi, grazie ad uno sviluppo maggiore e ad una conseguente diluizione dell'As nei tessuti vegetali. Gli effetti benefici sono stati determinati anche da un maggiore assorbimento di P che, competendo efficacemente con il metalloide, ne ha inibito l'azione dannosa sul metabolismo e sui costituenti cellulari della pianta. Alcuni studi hanno sottolineato, difatti, che gli effetti positivi delle micorrize sulla pianta ospite, in condizioni di stress ambientale, possono esser attribuite ad un incremento della nutrizione fosfatica, e che l'assorbimento di P da parte delle piante micorrizzate potrebbe giocare un ruolo chiave nell'alleviare gli effetti fitotossici dell'As (Liu et al. 2005). Anche altri autori hanno mostrato che piante non resistenti all'As possono essere rese più resistenti al metalloide incrementando la loro nutrizione fosfatica, così la riduzione di sensibilità all'inquinante viene determinata dalla soppressione del sistema di assorbimento ad alta affinità fosfato-arseniato (Meharg e Macnair, 1992) ma anche da una più elevata presenza di P nel citoplasma che, competendo con l'As, ne riduce gli effetti tossici sulle cellule vegetali (Meharg, 2006).

Le piante di lattuga inoculate e concimate hanno presentato un contenuto di As basso, e una produzione di biomassa tale da renderle commerciabili.

Anche l'uso di acque inquinate da As ha determinato accumulo del metalloide in piante di grano (*Triticum durum* cv. Crespo), in particolare nelle radici. La concimazione fosfatica ha aumentato l'assorbimento dell'inquinante, probabilmente perché l'applicazione di fertilizzante contenente fosfato ha inibito l'adsorbimento di As sulla superficie dei colloidi del suolo (Violante et al., 2005b), incrementandone la quantità presente nella soluzione circolante e quindi determinando una maggiore disponibilità del metalloide per le piante. Ciononostante, le piante concimate hanno vegetato meglio e prodotto una maggiore biomassa.

I composti dell'arsenico provocano la formazione di specie reattive dell'ossigeno (reactive oxygen species – ROS) nelle cellule vegetali che, determinando l'ossidazione dei lipidi, causano seri danni ai tessuti (Meharg e Hartley-Whitaker, 2002). La nostra ipotesi è che la nutrizione fosfatica potrebbe essere coinvolta nella riduzione della produzione di specie reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species-ROS*) e delle proteine non tioliche, formate durante l'esposizione all'As e responsabili del danneggiamento dei tessuti e della perossidazione dei lipidi.

La somministrazione di fosfato, esclusiva o unita all'aggiunta di inoculo micorrizico commerciale, può ridurre gli effetti della tossicità da As senza incremento della concentrazione dell'inquinante negli organi epigei della pianta. Questo ha un'importanza pratica nei sistemi agricoli, poiché può ridurre le perdite di raccolto ed incrementarne la qualità.

Bibliografia

Abedin, M.J., Cresser, M.S., Meharg, A.A., Feldmann, J., and Cotter-Howells, J., (2002). *Arsenic accumulation and metabolism in rice (Oryza sativa L.)* Environ. Sci. Technol. 36, p. 962-968.

Adriano, D.C. (2001). *Trace Elements in the Terrestrial Environment.* Springer, New York

Adriano, D.C., Page, A. L., Elsewi, A.A., Chang, A.C., and Straughan, I. (1980). *Utilization and disposal of fly ash and other residues in terrestrial ecosystems: A review.* J.Environ. Qual. 9, p.333-334.

Ahmed, M., Rahman, M.M. (2001). *Water Supply and Sanitation-Rural and Low-Income Urban Communities,* ITB-Bangladesh Center for Water Supply and Waste Management, Dhaka Bangladesh.

Alam, M.B., Sattar, M.A. (2000). *Assessment of arsenic contamination in soils and waters in some areas of Bangladesh.* Water Sci. Technol. 42, p.185-193

Andreae, M.O. (1980). *Arsenic in rain and the atmospheric mass balance of arsenic.* J. Geophys. Res. 85, p.4512-4518.

Arnold, H.L., Odam, R.B., James, W.D. (1990). *Disease of the skin Clinical Dermatology,* 8th ed., Saunders W.B. Company, Philadelphia, p.121.

ARPAT (2001). *Contributo del dipartimento ARPAT di Grosseto allo studio delle anomalie da metalli, con particolare riferimento all'arsenico, nei terreni agricoli del Comune di Scarlino – Primi risultati del monitoraggio dei suoli agricoli del Comune di Scarlino, Maggio 2000 – Maggio 2001.*

Asher, C.J., Reay, P.F. (1979). *Arsenic uptake by barley hordeum-vulgare cultivar zephyr seedlings.* Aust. J. Plant Physiol. 6, p.459-466.

Baker, A.J.M. (1981). *Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals.* J. Plant Nutr. 3, p.643-654.

Baroni, F., Boscagli, A., Di Lella, L.A., Protano, G., Riccobono, F. (2004). *Arsenic in soil and vegetation of contaminated areas in southern Tuscany (Italy).* Journal of Geochemical Exploration 81, p.1-14.

Barrachina, A.C., Carbonell, F.B., and Beneyto, J.M., (1995). *Arsenic uptake, distribution, and accumulation in tomato plants – effect of arsenite on plant growth and yield.* Journal of plant nutr. 18, p. 1237-1250.

Beever, R.E., Burns, D.W.J. (1980). *Phosphorus, uptake, storage, and utilization by fungi.* Adv. Bot. Res. 8, p.127-219

Belkin, H. E., Zheng, B., Finkelman, R.B. (2000). *Human Health effects of domestic combustion of coal in rural China: a causal factor for arsenic and fluorine poisoning.* In: 2nd World Chinese Conf. Geological Sciences, Extended Abstr., August 2000, Stanford Univ., p.522-524.

Benson, N.R. (1953). *Effect of season, phosphate and acidity on plant growth in arsenic-toxic soils.* Soil Sci. 76, p. 215-224

Benson, L.M., Porter, E.K., Peterson, P.J. (1981). *Arsenic accumulation, tolerance, and genotypic variation in plants on arsenical mine wastes in S.W. England.* Journal of Plant Nutrition, v.3, p. 655-667

Beretka ,J., Nelson, P. (1994). *The current state of utilization of fly ash in Australia.* In Ash-A Valuable Resource 1, p.51-63. South African Coal Ash Association.

Berti, W.R., Jacobs, L.W. (1996). *Chemistry and phytotoxicity of soil trace elements from repeated sewage sludge applications.* J. Environ. Qual. 25, p. 1025-1032.

Boisson, J., Mench, M., Vangronsveld, J., Kopponen, P., de Koe, T. (1999). *Immobilization of trace metals and arsenic by different soil additives : evaluation by means of chemical extractions.* Communications in Soil Science and Plants Analysis, v. 30, p. 365-387

Bowen, H.J.M. (1966). *Trace Elements in Biochemistry.* Academic Press, London.

Boyle, R.W., Jonasson. I.R. (1973). *The geochemistry of As and its use as an indicator element in geochemical prospecting.* J. Geochem. Explor. 2, p.251-296

Burlo, F., Guijarro, L., Carbonell-Barrachina, A.A., Valero, D., Martinez-Sanchez, F., (1999). *Arsenic species: effects on and accumulation by tomato plants.* J. Agric. Food Chem.47, p. 1247-1253.

Buschmann, J., Kappeler, A., Lindoner, U., Kistler, D., Berg, M., Sigg, L. (2006). *Arsenite and arsenate binding to dissolved humic acids: Influence of pH, type of humic and aluminium.* Environ. Sci. Technol. 40, p.6015-6020

Carbonell, A.A., Aarabi, M.A., DeLaume, R.D., Gambrell, R.P., Patrick, W.H. (1998). *Arsenic in wetland vegetation: availability, phytotoxicity, uptake and effects on plant growth and nutrition.* Sci. Total Environ. 217, p.189-199.

Carbonell-Barrachina, A.A, Burlo, F., Burgos-Hernandez, A., Lopez, E., Mataix, J. (1997). *The influence of arsenic concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plants.* Sci. Hort. 71, p.167-176.

Carbonell-Barrachina, A.A., Aarabi, M.A., Delaune, R.D., Gambrell, R.P., Patrick Jr, W.H. (1998). *The influence of arsenic chemical form and concentration on *Spartina patens* and *Spartina alterniflora* growth and tissue arsenic concentration.* Plant Soil 198, p. 33-43

Charter, R.A., Tabatabai, M.A., Schafer, J.W. (1995). *Arsenic, molybdenum, selenium, and tungsten contents of fertilizers and phosphate rocks.* Commun. Soil Sci. Plant Anal 26, p.3051-3062.

Chen, M., Ma, L.Q., Shiralipour, A. (1999). *Baseline concentrations of 15 trace metals in Florida surface soils.* Journal of Environmental Quality, v.28, p. 1173-1181

Chen, B., Xiao, X., Zhu, Y.G., Smith, F.A., Xie, Z.M., Smith, S.E. (2007). *The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* gives contradictory effects on phosphorus and arsenic acquisition by *Medicago sativa* L.* Sci. of the Tot. Environ. 379, p.226-234

Clark, G.T., Dunlop, J., and Phung, H.T. (2000). *Phosphate absorption by *Arabidopsis thaliana*: interactions between phosphorus status and inhibition by arsenate.* Austr. J. Plant. Physiol. 27, 959-965.

Coddington, K. (1986). *A review of arsenicals in biology.* Toxicol. Environ. Chem. 11, p.281-290

Cox, M.S., Bell, P.E. (1996). *Differential tolerance of canola to arsenic when grown hydroponically or in soil.* J. Plant. Nutr. 19, p. 1599-1610

Creger, T.L., Peryea, F.J. (1994). *Phosphate fertilizer enhances arsenic uptake by apricot liners grown in lead-arsenate-enriched soil.* Hort. Sci. 29, p.88-92.

Cullen W.R., Reimer K.J. (1989). *Arsenic Speciation in Environment.* Chem Rev 89, p.713-764

Dixon, H.B.F. (1997). *The biochemical action of arsenic acids especially as phosphate analogues.* Advances in Inorganic Chemistry 44, p.191-227

Duxbury, J.M., Mayer, A.B., Lauren, J.B., Hassan, N., (2002). *Arsenic content of rice in Bangladesh and its impacts on rice productivity.* Presented in 4th Annual Conference on arsenic contamination in groundwater in Bangladesh: cause, effect and remedy, Dhaka, Bangladesh.

Dzombak, D.A., Morel, F.M.M. (1990). *Surface Complexation Modelling-Hydrous Ferric Oxide.* John Wiley, New York

Fayga, A.O., Ma, L.Q. (2005). *Using phosphate rock to immobilize metals in soil and increase arsenic uptake by hyperaccumulator *Pteris vittata*.* Science of Total Environment.

Francesconi, K., Kuehnelt, D. (2002). *Arsenic compounds in the environment.* In: Frenkenberger, W.T. Jr. (Ed), Environmental of Chemistry of Arsenic. Marcel Dekker, New York, p.51-94

Francesconi, K., Visootiviset, P., Sridokchan, W., Goessler, W. (2002). *Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: potential phytoremediator of arsenic-contaminated soil.* Sci. Total Environ. 284, p.27-35

Frenkeberg, W.T., (2002). *Environmental Chemistry of Arsenic.* Marcel Dekker, New York, p. 391

Fitz, W.J., Wenzel, W.W. (2002). *Arsenic transformations in the soil-rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation.* Biotechnology 99, p.259-278

Galli, U., Schuepp, H., Brunold, C. (1995). *Thiols of Cu-treated maize plants inoculated with the arbuscular-mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*.* Physiology Plantarum, v.94, p. 274-253

Geng, C.N., Zhu, Y.G., Tong, Y.P., Smith, S.E., Smith, F.A. (2006a). *Arsenate (As) uptake by and distribution in two cultivars of winter wheat (Triticum aestivum L.).* Chemosphere 62, p.608-615

Geng, C.N., Zhu, Y.G., Hu, Y., Williams, P., and Meharg, A.A., (2006b). *Arsenate causes differential acute toxicity to two P-deprived genotypes of rice seedlings (Oryza sativa L.).* Plant and Soil 279, 297-306.

Ghosh, M., Shen, J., Rosen, B.P. (1999). *Pathways of As (III) detoxification in Saccharomyces cerevisiae.* P. Natl. Acad. Sci. 96, p.5001-5006

Gildon, A., Tinker, P.B. (1983). *Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants.* New Phytol. 95, p. 247-261

Goldberg, S., Johnston, C.T. (2001). *Mechanisms of arsenic adsorption on amorphous oxides evaluated using macroscopic measurements, vibrational spectroscopy, and surface complexation modelling.* J. Colloid Interface. Sci. 234, p. 204-216

Gonzalez-Chavez, C., Harris, P.J., Dodd, J., Meharg, A.A. (2002). *Arbuscular mycorrhizal fungi confer enhanced arsenate resistance on Holcus lanatus.* New Phytol. 155, p.163-171

Gough, L.P., Shacklette, H.T., Case, A.A. (1979). *Element concentrations toxic to plants, animals and man.* U.S. Geol. Surv. Bull. 80

Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Vooijs, R., Ten Bookum, W., Schat, H., Meharg, A.A. (2001a). *Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in Holcus lanatus.* Plant Physiology, v.126, p. 299-306

Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Meharg, A.A., (2001b). *Copper and arsenate-induced oxidative stress in Holcus lanatus L. clones with differential sensitivity.* Plant Cell Environ. 24, 713-722.

Heggo, A., Angle, A., Chaney, R.L. (1990). *Effects of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans.* Soil Biology and Biochemistry, v.22, p. 865-869

Huang, Y.C. (1994). *Arsenic distribution in soil.* In: Arsenic in the environment, Part I: Cycling and characterization. Nriagu, J. O. (Ed). Wiley-Interscience, New York, p.17-49

Huang, P.M., Violante, A. (1986). *Influence of organic acids on crystallization and surface properties of precipitation products of aluminium.* In: Interactions of Soil Minerals, Organic Matter and Microorganism in Soil. Huang, P.M., Schnitzer, M. (Eds) Spec. Publ. 17, p. 159-221

Hurd-Karrer, A.M. (1939). *Antagonism of certain elements essential to plants toward chemically related toxic elements.* Plant Physiol. 14, p. 9-29

Inskip, W.P., McDermott, T.R., Fendorf, S. (2002). *Arsenic (V)/(III) cycling in soil and natural waters: chemical and microbiological processes.* In: Frankenberger, W.T. Jr (Ed), Environmental Chemistry of Arsenic. Marcel Dekker, New York, p.183-215

Jacobs, L.W., Keeney, D.R. (1970). *Arsenic-phosphorus interactions on corn.* Commun. Soil Sci. Plant Anal. 1, p.85-93

Jha, A.B., Dubey, R.S. (2004). *Carbohydrate metabolism in growing rice seedling under arsenic toxicity.* J. Plant Physiol. 161, p.867-872

Jiang, Q.Q., Singh, B.R. (1994). *Effect of different forms and sources of arsenic on crop yield and arsenic concentration.* Water Air Soil Pollut. 74, p. 321-343

Jones, D.L. (1998). *Organic acids in the rhizosphere-a critical review.* Plant Soil 205, p.25-44

Juste, C. (1988). *Appréciation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments en trace du sol.* Sci. Sol. 26, p.103-112.

Kabata-Pendias, A., Pendias, H. (2001). *Trace elements in soils and plants.* CRC Press, Boca Raton, FL.

Killham, K., Firestone, M.K. (1983). *Vesicular arbuscular mycorrhizal mediation of grass response to acidic and heavy metal depositions.* Plant Soil 72, p. 39-48

Kirk, G.J.D., Santos, E.E., Findenegg, G.R. (1999). *Phosphate solubilisation by organic anion excretion from rice (*Oryza sativa* L.) growing in aerobic soil.* Plant Soil 211, p.11-18

Knudson, J.A., Meikle, T., De Luca, T.H. (2003). *Role of Mycorrhizal Fungi and Phosphorus in the Arsenic Tolerance of Basine Wildrye.* J. Environ. Qual. 32, p. 2001-2006

Lambkin, D.C., Alloway, B.J. (2003). *Arsenate-induced phosphate release from soils and its effect on plant phosphorus.* Water, Air and Soil Pollution 144, p. 41-56

Le, X. C., Yalcin, S., Ma, M. (2000). *Speciation of submicrogram per liter levels of arsenic in water: on-site species separation integrated with sample collection.* Environ Sci Technol. 34, p.22-26

Lee, D.A., Chen, A., Schroeder, J.I. (2003). *Ars 1, an Arabidopsis mutant exhibiting increased tolerance to arsenate and increased phosphate uptake.* Plant J. 35, p.637-646

Leopold, I., D. Gunther, J. Schmidt, D. Neumann (1999). *Phytochelatins and heavy metal tolerance.* Phytochemistry 50, p.1323-1328

Leyval, C., Bertheline, J., Schontz, D., Weissenhorn, I., Morel, J.L. (1991). *Influence of endomycorrhizas on maize uptake of Pb, Cu and Cd applied as mineral salts or sewage sludge.* In: Farmer J.G. (Ed) Heavy metals in environment. CEP Consultants, Edinburg, p. 204-207

Leyval, C., Turnau, K., Haselwandter, K. (1997). *Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects.* Mycorrhiza 7, p.139-153

Li, X., Thornton, I. (1993). *Arsenic, antimony, and bismuth in soil and pasture herbage in some old metalliferous mining areas in England.* Environ . Geochem. Health. 15, p.135-144

Liebig, G.F., Bradford, G.R., Vanslow, A.P. (1959). *Effect of arsenic compounds on citrus plants in solution culture.* Soil Sci. 88, p. 342-348

Liu F., De Cristofaro A., and Violante A. (2001) *Effect of pH phosphate and oxalate on the adsorption/desorption of arsenate on/from goethite.* Soil Sci. 166, p.197-208

Liu, H., Probst, A., and Liao, B., (2005). *Metal contamination of soils and crops affected by the Chenzhou lead/zinc mine spill (Human, China).*Sci. Total Environ. 339, p. 153-166.

Livesey, N.T., Huang, P.M. (1981). *Adsorption of arsenate by soils and its relation to selected chemical properties and anions.* Soil Sci. 131, p.88-94

Lombi, E., Wenzel, W.W., Sletten, R. (1999). *Arsenic adsorption by soil and iron-coated sand: kinetics and reversibility.* J. Plant Nutr. Soil Sci. 162, p.451-456

Lombi, E., Sletten, R.S., Wenzel, W.W. (2000). *Sequentially extracted arsenic from different size fraction of contaminated soil.* Water Air Soil Pollut. 124, p.319-332

Ma, L.Q., Komar, K.M., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y., Kennelly, E.D. (2001). *A fern that hyperaccumulates arsenic.* Nature 409, p. 579

Macnicol, R.D., Beckett, P.H.T. (1983). *Critical Tissue Concentrations of Potentially Toxic Elements.* Plant Soil, p.85-107

Mandal, B.K., Suzuki, K.T. (2002). *Arsenic round the world: a review.* Talanta 58, p.201-235

Manning, B.A., Goldberg, S. (1997). *Arsenic (III) and Arsenic (V) Adsorption on Three California Soils.* Soil Science, vol. 162, n° 12

Marshner, H. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants*, second ed. Academic press, London.

Marshner, H., Dell, B. (1994). *Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis.* Plant Soil 159, p. 89-102

Marshner, H., Romheld, V. (1983). *In vivo measurement of root-induced pH changes at the soil-root interface: effect of plant species and nitrogen source.* Z. Pflanzenphysiol. 11, p.241-251

Marshner, H., Romheld, V. (1994). *Strategies of plants for acquisition of iron.* Plant Soil 165, p.261-274

Martin, M., Violante, A., Barberis, E. (2007). *Fate of arsenite and arsenate in flooded and not flooded soils of South West Bangladesh irrigated with arsenic contaminated water.* Journal of Environmental Science e Health Part A. 42, p. 1775-1783

Masschelyn, P.H., Delaune, R.D., Patrick, W.H. Jr. (1991). *Effect of redox potential and pH on arsenic speciation and solubility in a contaminated soil.* Environ. Sci. Technol. 25, p.1414-1418

McGrath, S.W., Zhao, F.J., Lombi, E. (2002). *Phytoremediation of metals, metalloids and radionuclides.* Adv. Agron. 75, p.1-56

Meharg, A.A., (2006). *Mechanism of plant resistance to metal and metalloid ions and potential biotechnological applications.* Plant and Soil 274, 163-174.

Meharg, A.A., Abedin, M.J., Rahman, M.M., Feldmann, J., Cotter-Howells, J., Cresser, M.S. (2001). *Arsenic uptake and metabolism in Bangladesh varieties. In: Book of abstracts, arsenic in the Asia-Pacific Region-managing arsenic for our future.* CSIRO, Adelaide, South Australia, p. 45-46.

Meharg, A.A., Hartley-Whitaker, J. (2002). *Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and non-resistant plant species.* New Phytologist, 154, p.29-43

Meharg, A.A.; McNair, M.R. (1990). *An altered phosphate uptake system in arsenate-tolerant *Holcus lanatus* L.* New Phytol. 116, p.29-35

Meharg, A.A.; McNair, M.R. (1991). *The mechanisms of arsenate tolerance in *Deshampsia cespitosa* (L.) Beauv. and *Agrostis capillaris*.* New Phytol. 119, p.291-297

Meharg, A.A.; McNair, M.R. (1992). *Suppression of the high affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L.* J. Exp. Bot. 43, p.519-534

Meharg, A.A.; McNair, M.R. (1994). *Relationship between plant phosphorus status and the kinetics of arsenate influx in clones of *Deshampsia cespitosa* L. Beauv. That differ in their tolerance to arsenate.* Plant Soil 162, p.99-106

Meharg, A.A., Naylor, J., Macnair, M.R. (1994). *Phosphorus nutrition of arsenate-tolerant and nontolerant phenotypes of velvet grass.* J. Environ. Qual. 23, p. 234-238.

Metodi Ufficiali di Analisi chimica del suolo. Supplemento Ordinario G.U. n° 248 del 21.10.1999.

Mylona, P.V., Polidoros, A.N., Scandalios, J.G. (1998). *Modulation of antioxidant responses by arsenic in maize.* Free Radical Bio. Med. 25, p.576-585

National Research Council (1999). *Arsenic in Drinking Water,* National Academy Press: Washington, DC.

Nimik, D.A., Moore, J.N., Dalby, C.E., Savka, M.W. (1998). *The fate of geothermal arsenic in the Madison and Missouri Rivers, Montana and Wyoming.* Water Resour Res. 34, p.3051-3067

Nriagu, J.O., Pacyna, J.M. (1988). *Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water, and soils by trace metals.* Nature 333, p.134-139

Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD (1984). *Guidelines for the testing of chemicals.* N° 208 Terrestrial plants, growth test. OECD, Paris

O'Reilly, S.E., Strawn, D.G., Sparks, D.L. (2001). *Residence time effects on arsenate adsorption/desorption mechanisms on goethite.* Soil Sci. Soc. Am. J. 65, p.67-77

Oremland, R.S., Stolz, J.F. (2003). *The ecology of arsenic.* Science 300, p.939-944

Palmer, C.A., Klizas, S.A. (1997). *The Chemical Analysis Of Argonne Premium Coal Samples.* US Geol. Surv. Bull. 2144, US Geological Survey, Reston, USA.

Peijnenburg, W., Baerselman, R., de Groot, A., Jager, T., Leenders, D., Posthuma, L., Van Veen, R. (2000). *Quantification of Metal Bioavailability for Lattuce (*Lactuca sativa* L.).* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 39, p. 420-430

Peryea F.J. (1991). *Vertical distribution of lead and arsenic in soils contaminated with lead arsenate pesticides residues.* Wat. Air Soil Poll.78, p.297-306

Pigna, M., Krishnamurti, G.S.R., Violante, A. (2006). *Effect of Residence Time, and Surface Coverage on the Desorption of Arsenate by Phosphate from Metal Oxides.* Soil Sci. Soc. Am. J. 70, p.2017-2027

Planas, D., Healey, F.P. (1978). *Effects of arsenate on growth and phosphorus metabolism of phytoplankton.* J. Physiol. 14, p.337-341

Quaghebeur, M., Rengel, Z. (2001). *The Presence of Phosphate in the Rhizosphere of *Holcus lanatus* L. Stimulates the Uptake of Arsenate from Kaolinite.* Arsenic in the Asia-Pacific Region Workshop (Book of Abstract), 20-23 November 2001, Adelaide, SA, p.143-145.

Quaghebeur, M., and Rengel, Z., (2003). *The distribution of arsenate and arsenite in shoots and roots of *Holcus lanatus* is influenced by arsenic tolerance and arsenate and phosphate supply.* Plant Physiology 132, p. 1600-1609.

Raven, K., Jain, A., Loppert, R.H. (1998). *Arsenite and arsenate adsorption on ferrihydrite: Kinetics, equilibrium, and adsorption envelopes.* Environ. Sci. Technol. 32, p.344-349

Rahman, M.A., Hasegawa, H., Rahman, M.A., Rahman, M.M., Miah, M.A.M., (2006). *Influence of cooking method on arsenic retention in cooked rice related to dietary exposure.* Sci. Total Environ. 370, 51-60.

Rahman, M.A., Hasegawa, H., Rahman, M.M., Rahman, M.A., Miah, M.A.M., (2007). *Accumulation of arsenic in tissues of rice plant (*Oryza sativa* L.).* Chemospher 10, p. 1016/j

Ritter, K., Aiken, G.R., Ranville, J.F., Bauer, M., Macaladi, D.L. (2006). *Evidence for the aquatic binding of arsenate by natural organic matter suspended Fe(III).* Environ. Sci e Technol. 40, p. 5380-5387

Rosen, B. (1999). *Families of arsenic transporters.* Trends Microbiol., 7, p.201-212

Sadiq, M., Zaida, T. H., Mian, A.A. (1983). *Environmental behavior of arsenic in soils: Theoretical.* Water Air Soil Pollution. 20, p.369-377

Sharples, J.M., Meharg, A.A., Chambers, S.M., Cairney, J.W.G. (2000a). *Mechanism of arsenate resistance in the ericoid mycorrhizal fungus *Hymenoscyphus ercae*.* Plant Physiol. 124, p.1327-1334

Sharples, J.M., Meharg, A.A., Chambers, S.M., Cairney, J.W.G. (2000b). *Symbiotic solution to arsenic contamination.* Nature 404, p.951-952

Shetty, K.G., Banks, M.K., Hetrik, B.A., Schwab, A.P. (1995). *Effects of mycorrhizae and fertilizer amendments on zinc tolerance of plants.* Environmental Pollution 88, p.307-314

Silver, S., Misra, T.K. (1988). *Plasmid-mediated heavy metal resistances.* Annu. Rev. Microbiol. 42, p.717-743

Singh, N., Ma, L.Q., (2006). *Arsenic speciation, and arsenic and phosphate distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and non-hyperaccumulator *Pteris ensiformis*. L.* Environ. Pollution 141, p. 238-246.

Smadley, P.L., Kinniburgh, D.G. (2002). *A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters.* Applied Geochemistry 17, p.517-568

Small, H.G., McCants, C.B. (1983). *Influence on arsenic applied to the growth media on the arsenic content of flue-cured tobacco.* Agron. J. 54, p. 129-133

Smith, K.G., Reed, D.J. (1997). *In: Mycorrhizal Symbiosis*, second ed. Academic Press, London, p.586

Smith, E., Naidu, R., Alston, A.M. (1999). *Chemistry of arsenic in soils: Sorption of arsenate and arsenite by four Australian soils.* J. Environ. Qual. 28, p.1719-1726

Sparks, D.L. (1999). *Kinetics and mechanisms of chemical reactions at the soil mineral/water interface.* Soil Physical Chemistry (D.L. Sparks, Ed), p.135-191

Sparks, D.L. (2003). *Environmental Soil Chemistry. 2° Ed.* Academic Press, San Diego.

Sun, X., and Doner, H. E. (1996). *An investigation of arsenate and arsenite bonding structures on goethite by FTIR.* Soil Sci. 161, p.865-872

Tanelli, G., Benvenuti, M., Costagliola, P., Mascaro, I., Lascialfari, S., Rossato, L., Bucciatti, A., Bertoli, M. (2003). *Studio della dispersione dell'arsenico nella Piana di Scarlino (Gr).* Università degli Studi di Firenze, Dipartimento di Scienze della Terra.

Tao, Y., Zhang, S., Jian, W., Yuan, C., Shan, X. (2006) *Effects of oxalate and phosphate on the release of arsenic from contaminated soils and arsenic accumulation in wheat.* Chemosphere 65, p.1281-1287

Thanabalasingam P. and Pickering W.F., (1986). *Arsenic sorption by humic acids,* Environ. Pollut. 12, p.233-246

Tong, Y.P., Kneer, R., Zhu, Y.G. (2004). *Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation.* Trends Plant Sci. 9, p.7-9

Tu, S., Ma, L.Q., (2003). Interactive effects of pH, arsenic and phosphorus on uptake of As and P and growth on the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. under hydroponic conditions. *Environ. Exp. Bot.* 50, 243-251.

Turnau, K., Kottke, I., Dexheimer, J. (1996). *Toxic element filtering in Rhizopogon roseolus/Pinus Sylvestris mycorrhizas collected from calamine dumps.* *Mycol Res* 100, p.16-22

Ure, A., Berrow, M. (1982). *The Elemental constituents of soil.* Chapter 3. In: Bowen, H.J.M. (Ed), *Environmental Chemistry.* Royal Society of Chemistry, London, p.94-203

Vaughan, G.T. (1993). Investigation Report CET/LHIR148: *The environmental chemistry and fate of arsenical pesticides in cattle tick dip sites and banana plantations.* CSIRO, Division of Coal and Energy Tecnology, Centre for Advances Analytical Chemistry, Sydney, Australia.

Violante, A., Del Gaudio, S., Pigna, M., Pucci, M., Amalfitano, C. (2007a). *Sorption and desorption of arsenic by soil minerals and soils in the presence of nutrients and root exudates.* In: *Interactions of Soil Minerals, Organic Matter and Microorganism in Soil.* Huang, P.M., Violante, A. (Eds). Springer-Verlag New York (In Press).

Violante, A., Krishnamurti, G.S.R., Pigna, M. (2007b). *Mobility of Trace Elements in Soil Environments.* In: *Biophysico-Chemical Processes of metals and Metalloids in Soil Environments.* Violante, A., Huang, P.M., Gadd, G. (Eds), p. 169-213

Violante, A., Pigna, M. (2002). *Competitive sorption of arseniate and phosphate on different clay minerals and soil.* *Soil Sci. Soc. Am.J.* 66, p.1788-1796

Violante, A., Pigna, M., Del Gaudio, S., (2005b). *Adsorption-Desorption Processes of Arsenate in Soil Environments.* In: *Soil Abiotic & Biotic Interactions and the Impact on the Ecosystem & Human Welfare.* Huang P.M., Bollag J.-M., Violante A. and Vityakon P (Eds.), Science Publishers (Enfield, NH USA), p. 269-299.

Violante, A., Ricciardella, M., Pigna, M., Capasso, R. (2005a). *Effects of organic ligands on the sorption of trace elements onto metal oxides and organo-mineral complexes.* In: Biogeochemistry of Trace Elements in the Rhizosphere. Huang, P.M., Gobran, G.R., Elsevier, B.V. (Eds), p. 157-182

Violante, A., Ricciardella, Del Gaudio, S., Pigna, M. (2006). *Coprecipitation of Arsenate with Metal oxides: Nature, Minerology and Reactivity of Aluminium Precipitates.* Environ. Sci. e Technol. 40, p. 4961-4967

Visootviseth, P., Francesconi, K., Sridokchan, W. (2002). *The potential of Thai indigenous plant species for the phytoremediation of arsenic contaminated land.* Environ. Pollut. 118, p.453-461

Wallace, A., Mueller, R.T., Wood, R.A. (1980). *Arsenic Phytotoxicity and Interactions in Bushbean Plants Grown in solution culture.* J. Plan. Nutr. 2, p.111

Wang, J.R., Zhao, W.; Meharg, A.A.; Raab, A.; Feldmann, J.; McGrath, S.P. (2002). *Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in Pteris vittata. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation.* Plant Physiology 130, p.1552-1561

Webster, J.G. (1999). *Arsenic.* In: Marshall, C.P., Fairbridge, R.W. (Eds), Encyclopaedia of Geochemistry. Chapman Hall, London, p.21-22

Weissenhorn, I., Leyval, C. (1995). *Root colonization of maize by a Cd-sensitive and Cd-tolerant Glomus mosseae and cadmium uptake in sand culture.* Plant and Soil, v.175, p. 233-238

Weissenhorn, I, Leyval, C., Belgy, G., Bertheline, J. (1995). *Arbuscular mycorrhizal contribution to heavy metal uptake by maize (Zea mais L.) in pot culture with contaminated soil.* Mycorrhiza 5, p. 245-251

Wenzel, W.W., Kirchbaumer, N., Prohaska, T., Stingeder, G., Lombi, E., Adriano, D.C. (2001). *Arsenic fractionation in soil using an improved sequential extraction procedure.* Analytica Chimica Acta 436, p.309-323

Wenzel, W.W., Brandstetter, A., Wutte, H., Lombi, E., Prohaska, T., Stingeder, G., Adriano, D.C. (2002). *Arsenic in field-collected soil solutions and extracts of contaminated soils and its implication to soils standards.* J. Plant Nutr. Soil. Sci. 165, p.221-228

World Health Organization - WHO (1996). *Guidelines for Drinking Water Quality, Recommendations, 2nd ed., vol. 2, Geneva.*

World Health Organization - WHO (1981). *Arsenic, Environmental Health Criteria 18, Geneva*

World Health Organization - WHO (2001). *Arsenic, Environmental Health Criteria 224, 2nd ed., Geneva*

Woolson, E.A. (1972). *Effects of fertilizer materials and combinations on the phytotoxicity, availability and content of arsenic in corn (maize).* J. Sci. Food Agric. 23, p. 1477-1481

Woolson E.A., Axely J.H., e Kearney, P.C. (1973). *The chemistry and phytotoxicity of arsenic in soils: Effect of time and phosphorus.* Soil Sci. Am. Proc. 37, p.254-259

Xu, H., Allard, B., e Grimvall A. (1991). *Effects of acidification and natural organic materials on the mobility of arsenic in the environment,* Water Air Soil Pollution. 58, p.269-278

Yan, X.P., Kerrich, R., Hendry, M.J. (2000). *Distribution of arsenic (III), arsenic (V) and total inorganic arsenic in porewaters from a thick till and clay-rich aquitard sequence.* Geochim. Cosmochim. Acta 64, p.2673-2648

Zhang, P.C., Sparks, D.L. (1989). *Kinetics and mechanisms of molybdate adsorption/desorption at the goethite/water interface using pressure-jump relaxation.* Soil Sci. Soc. Am. J. 53, p.1028-1034

Zhang, X.L.S, Zhu, X.S.Y-G. (2005). *Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amylolytic activity of wheat.* Chemosphere 61, p.293-301