



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-Forestali

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN ECOLOGIA FORESTALE

CICLO XIX

**STUDIO DEGLI EFFETTI DEL Cr(III) SU PIANTE DI SALICE:
CONFRONTO FRA DIFFERENTI SPECIE E
CONDIZIONI SPERIMENTALI**

Direttore del Corso: Ch.mo Prof. Franco Viola

Supervisore: Prof. Mario Malagoli

Correlatore: Prof.ssa Rossella Ghisi

Dottoranda: Virginia Rossignolo

data consegna tesi
30 dicembre 2008

“ Questo noi sappiamo:
la terra non appartiene all’uomo,
è l’uomo che appartiene alla terra.
Questo noi sappiamo.
Tutte le cose sono collegate,
come il sangue che unisce una famiglia.
Qualunque cosa capita alla terra,
capita anche ai figli della terra.
Non è stato l’uomo a tessere la tela della vita,
egli ne è soltanto un filo.
Qualunque cosa egli faccia alla tela,
lo fa a se stesso. ”

Da una lettera scritta nel 1854 dal Capo dei Pellerossa Capriolo Zoppo
al Presidente degli Stati Uniti Franklin Pierce.

SOMMARIO

RIASSUNTO.....	9
SUMMARY	11
1. INTRODUZIONE.....	13
1.1 I METALLI PESANTI: SORGENTI NATURALI E ANTROPICHE	14
1.1.1 Le piante e i metalli pesanti: tossicità e tolleranza.....	16
1.1.2 Strategie di risposta delle piante ai metalli pesanti	19
1.2 IL CROMO	24
1.2.1 Fonti ed usi del cromo	27
1.2.2 Il Cr nei sistemi acquatici.....	28
1.2.3 Il Cr nel suolo	29
1.2.4 Il Cr nell'atmosfera	31
1.2.5 Effetto del cromo sugli animali e sull'uomo.....	32
1.3 LA FITODEPURAZIONE	34
1.3.1 La potenzialità fitodepurative dei salici (<i>Salix</i> spp.).....	37
1.3.2 Assorbimento e traslocazione del Cr nelle piante	41
1.3.3 Effetti fitotossici del cromo sulle piante	43
1.3.4 Interazioni del cromo con ferro e zolfo.....	46
1.3.4.1 Il ferro.....	46
1.3.4.2 Lo zolfo	47
2. SCOPO	49
3. MATERIALI E METODI.....	51
3.1 DESCRIZIONE DELLE SPECIE IMPIEGATE.....	51
3.1.1 <i>Salix alba</i> L. sub. <i>Typica</i>	51
3.1.2 <i>Salix daphnoides</i> Vill.	52
3.1.3 <i>Salix elaeagnos</i> Scop.....	52
3.1.4 <i>Salix fragilis</i> L.....	53
3.1.5 <i>Salix purpurea</i> L.	54
3.1.6 <i>Salix nigra</i> Marsh.	55
3.1.7 <i>Salix matsudana</i> Koidz. var. <i>tortuosa</i>	56
3.2 ALLEVAMENTO DELLE PIANTE.....	57
3.2.1 Allevamento di 7 specie di salice cresciute in agriperlite	57
3.2.2 Allevamento di 4 specie di salice cresciute in agriperlite	60
3.2.3 Allevamento di 4 specie di salice cresciute in terreno	60
3.2.4 Allevamento di 2 specie di salice cresciute in soluzione idroponica e trattate per 15 giorni	62
3.2.5 Allevamento di 2 specie di salice cresciute in soluzione idroponica e trattate per 4 e 24 ore.....	62
3.3 CAMPIONAMENTO E ANALISI DEL TERRENO.....	63
3.3.1 Determinazione del carbonio organico e della sostanza organica.....	63
3.3.2 Determinazione del pH in acqua	64
3.3.3 Tessitura	64
3.3.4 Determinazione del calcare totale	65
3.3.5 Determinazione della capacità di scambio cationico	66

3.3.6 Mineralizzazione e quantificazione dei metalli.....	66
3.4 ANALISI DEL PH DELLA SOLUZIONE NUTRITIVA.....	66
3.5 DETERMINAZIONE DEL PESO FRESCO E DEL PESO SECCO.....	67
3.6 MINERALIZZAZIONE IN FORNO A MICROONDE.....	67
3.7 LETTURA DEGLI ELEMENTI IN ICP-OES.....	68
3.8 DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI PIGMENTI FOTOSINTETICI.....	69
3.9 DETERMINAZIONE DI ATTIVITÀ FOTOSINTETICA, TRASPIRAZIONE E CONDUTTANZA STOMATICA.....	69
3.10 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER LA MICROSCOPIA OTTICA.....	72
3.11 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER LA MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE (TEM)	73
3.12 ESTRAZIONE.....	73
3.12.1 Lettura delle proteine.....	74
3.13.2 Guaiacolo perossidasi - EC 1.11.1.7.....	74
3.13.3 Ascorbato perossidasi - EC 1.11.1.11.....	75
3.13.4 Catalasi - EC 1.11.1.6.....	75
3.13.5 Superossido dismutasi - EC 1.15.1.1.....	75
3.13 ELABORAZIONE STATISTICA.....	76
4. RISULTATI.....	79
4.1 ALLEVAMENTO DI 7 SPECIE DI SALICE CRESCIUTE IN AGRIPERLITE.....	79
4.1.1 Crescita delle piante.....	79
4.1.2 Contenuto di cromo.....	81
4.2 ALLEVAMENTO DI 4 SPECIE DI SALICE CRESCIUTE IN AGRIPERLITE.....	83
4.2.1 Crescita delle piante.....	83
4.2.2 Contenuto di cromo.....	85
4.2.3 Contenuto di ferro.....	87
4.2.4 Contenuto di zolfo.....	88
4.2.5 Contenuto di pigmenti fotosintetici.....	89
4.2.6 Scambi gassosi.....	90
4.2.7 Attività fotosintetica.....	93
4.3 ALLEVAMENTO DI 4 SPECIE DI SALICE CRESCIUTE IN TERRENO.....	94
4.3.1 Analisi del terreno.....	94
4.3.2 Crescita delle piante.....	94
4.3.3 Contenuto di cromo in piante e terreno.....	99
4.3.4 Contenuto di ferro.....	104
4.3.5 Contenuto in pigmenti fotosintetici.....	106
4.4 ALLEVAMENTO DI 2 SPECIE DI SALICE CRESCIUTE IN SOLUZIONE IDROPONICA E TRATTATE PER 15 GIORNI.....	108
4.4.1 Crescita delle piante.....	108
4.4.2 Contenuto di cromo.....	110
4.4.3 Contenuto di ferro.....	112
4.4.4 Contenuto in pigmenti fotosintetici.....	113
4.4.5 Scambi gassosi.....	114
4.4.6 Andamento dell'attività fotosintetica.....	115

4.4.7 Aspetto delle 2 specie di salice cresciute in soluzione idroponica e trattate per 15 giorni	116
4.4.8 Microscopia ottica	118
4.4.9 Microscopia elettronica	121
4.5 ALLEVAMENTO DI 2 SPECIE DI SALICE CRESCIUTE IN SOLUZIONE IDROPONICA E TRATTATE PER 4 E 24 ORE.....	124
4.5.1 Crescita delle piante	124
4.5.2 Contenuto di cromo	125
4.5.3 Contenuto di ferro	128
4.5.4 Contenuto in pigmenti fotosintetici	129
4.5.5 Scambi gassosi	130
4.5.6 Andamento dell'attività fotosintetica	132
4.5.7 Contenuto in proteine	132
4.5.8 Attività enzimatica	133
4.5.8.1 Guaiacolo perossidasi - EC 1.11.1.7	133
4.5.8.2 Ascorbato perossidasi - EC 1.11.1.11	135
4.5.8.3 Catalasi - EC 1.11.1.6.....	136
4.5.8.4 Superossido dismutasi - EC 1.15.1.1.....	137
5. DISCUSSIONE.....	139
6. CONCLUSIONI.....	153
INDICE DELLE FIGURE.....	155
INDICE DELLE TABELLE	160
BIBLIOGRAFIA.....	163

Riassunto

La presenza sul territorio italiano di numerosi casi di inquinamento da cromo porta alla necessità di individuare delle strategie di risanamento che possano essere impiegate su ampie superfici e con costi contenuti. A tale esigenza può positivamente rispondere la “fitodepurazione”, tecnica che utilizza piante erbacee e arboree, in sinergia con i microrganismi della rizosfera, per rimuovere e/o detossificare sostanze inquinanti dall’ambiente.

Lo studio illustrato in questa tesi nasce dall’esigenza di individuare una o più specie vegetali maggiormente promettenti per il fitorimedio di siti inquinati da cromo trivalente (CrIII).

Si è scelto di utilizzare piante di salice per la loro velocità di crescita, l’elevata produzione di biomassa e la notevole capacità di esplorazione del suolo da parte delle radici. Sono state inizialmente prese in esame sette specie di salice (*S. alba* L. sub. *typica*, *S. daphnoides* Vill., *S. elaeagnos* Scop., *S. fragilis* L., *S. purpurea* L., *S. matsudana* Marsh. var. *tortuosa* e *S. nigra* Koidz.).

Le risposte delle diverse specie sono state studiate allevando le piante con parametri differenti per durata di trattamento (da 4 ore a 1 anno di trattamento), modalità di allevamento (in cella climatica o in pieno campo), substrati di crescita (soluzione idroponica, agriperlite, terreno), concentrazioni delle soluzioni di trattamento (50, 100 e 300 μM di CrCl_3 per la soluzione nutritiva e 50 $\mu\text{moli Cr Kg}^{-1}$ terreno).

Sulla base delle risposte ai trattamenti, contenenti concentrazioni di Cr(III) 50 e 100 μM dalle sette specie di salice allevate in agriperlite, sono state scelte le quattro specie che hanno presentato la migliore combinazione di produzione di biomassa e accumulo di Cr: *Salix alba* sub. *typica*; *S. elaeagnos*; *S. fragilis* e *S. matsudana* var. *tortuosa*. Le rimanenti tre specie non sono state più utilizzate in quanto presentavano bassa produzione di biomassa o basso accumulo di Cr, o entrambi questi fattori.

Le 4 specie individuate sono state impiegate in due esperimenti distinti: uno allevando le piante in agriperlite e sottoponendole a trattamenti con Cr(III) a concentrazione 100 e 300 μM e l’altro facendo crescere le piante in vasetti contenenti terreno non contaminato o terreno contaminato da Cr(III) in concentrazione di 50 $\mu\text{moli Cr Kg}^{-1}$ terreno. Per le piante cresciute in agriperlite gli effetti della presenza di Cr 100 e 300 μM , si sono manifestati in un leggero calo di biomassa e di contenuto di Fe e S, rispetto alle piante di controllo. L’accumulo radicale di Cr ha raggiunto il valore di 1426 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s. dopo 28 giorni di trattamento. Nell’esperimento condotto in terreno le piante sottoposte a trattamento con Cr hanno manifestato una maggiore

produzione di biomassa e di clorofille rispetto a quelle di controllo pur accumulando nelle radici fino a $700 \mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s. dopo 45 giorni di trattamento.

Tra le quattro specie in esame, *S. fragilis* e *S. matsudana* avevano accumulato una discreta quantità di Cr sia nell'esperimento in terreno, sia negli esperimenti in agriperlite. Pertanto, queste due specie sono state ulteriormente sottoposte ad altre indagini e allevate in soluzione idroponica per 15 giorni, con soluzioni di trattamento di Cr 100 e 300 μM . Le piante delle due specie hanno evidenziato effetti della tossicità del Cr, tra i quali il calo degli scambi gassosi e dell'attività fotosintetica, la diminuzione della crescita, rilevanti alterazioni strutturali e ultrastrutturali a carico di foglie e apici radicali. Inoltre, è emerso un aumento dell'attività di alcuni enzimi, come la catalasi e la guaiacolo perossidasi, coinvolti nella detossificazione delle specie reattive dell'ossigeno. L'accumulo di Cr nelle radici si è rivelato notevole sia nel breve termine (fino a $4426 \mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s. dopo 4 ore di trattamento) sia per esposizioni più lunghe (fino a $6833 \mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s. dopo 15 giorni di trattamento).

Nel complesso le varie specie utilizzate hanno mostrato un'ampia variabilità nella capacità di accumulo soprattutto radicale mentre il tasso di traslocazione del Cr alla parte epigea risulta molto ridotto in tutte le specie.

L'effetto del cromo sulle piante non appare univoco ma sembra dipendente dalla concentrazione e dal substrato di crescita utilizzato: ad esempio per il parametro di crescita delle piante cresciute in soluzione idroponica, dove il cromo in soluzione risulta totalmente disponibile all'assorbimento radicale l'effetto sulla diminuzione di crescita è massimo, mentre in agriperlite e in terreno l'influenza del cromo sulla crescita è molto ridotto.

S. fragilis è la specie che ha ottenuto i migliori risultati in termini di accumulo, nelle diverse modalità sperimentali e concentrazioni di Cr utilizzate. L'attitudine all'accumulo sembra perciò essere una qualità intrinseca alla specie, mentre il *medium* di crescita pare influenzare la biodisponibilità del Cr. Gli accumuli maggiori si sono infatti ottenuti negli esperimenti condotti in soluzione idroponica.

Su terreno contaminato da Cr(III) la presenza dei salici ha permesso di rimuovere quantità superiori del metallo (fino al 26%) rispetto a quella misurata nel terreno sottoposto alla sola perdita di cromo per lisciviazione dell'acqua di adacquamento. L'utilizzo di salici quindi, in particolare *S. fragilis*, può fornire un importante contributo nella rimozione di cromo trivalente da siti contaminati, con la conseguente riduzione del pericolo di contaminazione delle acque superficiali e profonde.

Summary

The increasing numbers of chromium contaminated sites in Italy requires the adoption of low-cost and large scale clean-up technologies. As an alternative to the traditional methods, phytoremediation could be exploited, which uses herbaceous and woody plants in association with the rizosphere microorganisms to remove and/or detoxify soils, waters and sediments from environmental pollutants.

Trees have been suggested as suitable plants for the phytoremediation technologies, being high yielding biomass and genetically variable organisms. Particularly, species of the genus *Salix* are fast growing plants, excellent biomass producers, and their roots can explore large zones in deep.

Therefore, due to the need to identify plant species characterized by high phytoremediation potential, in the present study *Salix* spp. have been screened for tolerance to and accumulation of trivalent chromium (CrIII).

At first, seven *Salix* species were considered: *S. alba* L. sub. *typica*, *S. daphnoides* Vill., *S. elaeagnos* Scop., *S. fragilis* L., *S. purpurea* L., *S. matsudana* Marsh. var. *tortuosa* e *S. nigra* Koidz. The responses of plants to CrIII were evaluated in terms of duration of treatment (since 4 hours to 1 year), growing environment (climatic chamber or green-house), growing substrate (hydroponics, soil, perlite), and metal concentration (50, 100 e 300 μM di CrCl_3 for hydroponic and agriperlite experiments; 50 μmol Cr Kg^{-1} for soil trial).

Four *Salix* species were selected in perlite experiments (50 and 100 μM di CrCl_3) on the basis of cross-results relative to high CrIII tolerance and accumulation: *Salix alba* sub. *typica*; *S. elaeagnos*, *S. fragilis* e *S. matsudana* var. *tortuosa*. The remaining three species displayed low Cr accumulation and/or tolerance, and were not used for further experiments.

Selected plant species were in part grown in perlite with 100 and 300 μM di CrCl_3 , and in part inside pots containing soil with no Cr (control) or CrIII 50 μmol Cr Kg^{-1} .

Plants grown in perlite showed a slight decrease of biomass production and reduced Fe and S contents in response to Cr treatment. Also, Cr accumulation in roots accounted for 1426 μg Cr g^{-1} on a dry weight basis (d. wt.) after 28 days of treatment. Conversely, plants grown in CrIII contaminated soil produced more biomass and chlorophyll than the controls, while containing up to 700 μg Cr g^{-1} d.wt. in roots after 45 days in plus Cr.

Among the four species, *S. fragilis* e *S. matsudana* were those accumulating high Cr amounts in both experiments. Therefore, the two species were further used in hydroponic experiments in the presence of 100 or 300 μM CrIII for 15 days. Both plant species showed toxic effects due to

CrIII exposure, such as decrease of leaf gas exchange and photosynthetic activity, reduction of growth, structural and ultrastructural alterations of root tips and leaves. Moreover, the increased activity of such enzymes as catalase and guaiacol peroxidase, involved in scavenging reactive oxygen species (ROS), was observed. Chromium accumulation in roots was significant at both short- (up to 4426 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ d.wt. after 4 hours of treatment) and long- (up to 6833 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ d.wt. after 15 days of treatment) exposure of plants to CrIII.

In conclusion, the *Salix* species used in this study have shown high variability in root Cr accumulation, while the translocation rate of the metal to the shoot was generally limited. The effects of chromium on plants relied on the Cr concentration applied and on the plant growing substrate. Indeed, Cr was more available in hydroponic solution than in soil and perlite and, as a consequence, it was more promptly absorbed and caused more visible phytotoxic symptoms.

Our results indicate that the employment of *Salix* spp., particularly of *S. fragilis*, may be useful in the phytoremediation of CrIII contaminated sites. In fact, *S. fragilis* was the species that accumulated high levels of Cr in all the experimental conditions tested. Therefore, the capacity of Cr accumulation seems to be an intrinsic species-related feature, whereas the growth medium would affect the bioavailability of Cr to plants, and therefore Cr accumulation in plant tissues.

In soil contaminated with CrIII the presence of *Salix* plants allowed the removal of 26% more than that measured in soil subjected to the loss of Cr for water leaching.

1. INTRODUZIONE

Il genere umano si trova sempre più spesso a dover affrontare gravi problemi di inquinamento ambientale, causato dalla manipolazione delle sostanze naturali e dall'immissione di molecole xenobiotiche provenienti soprattutto dai processi produttivi agricoli ed industriali. La consapevolezza della gravità degli effetti che tale inquinamento può provocare alla salute pubblica e all'intero ecosistema ha fatto sì che anche i più recenti modelli di sviluppo economico facciano riferimento, in linea teorica, esclusivamente ad ipotesi compatibili con l'ambiente. Inoltre le continue emergenze ambientali ed il costante progresso delle conoscenze scientifiche hanno portato molte organizzazioni nazionali ed internazionali, alla necessità di redigere liste di composti potenzialmente pericolosi. Da una prima serie di liste ne sono state dedotte ulteriori, più limitate ma i cui composti vengono giudicati di pericolosità prioritaria, fra queste sono comprese la “U.S. EPA Priority pollutant list” e le “Priority Pollutants (PP)” e “Priority Hazardous Pollutants (PHP)” dell'Unione Europea”. (Mackay, 1991; Vighi e Bacci, 1998; <http://nsdi.epa.gov/waterscience/methods/pollutants.htm>; http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/priority_substances.htm).

In generale gli inquinanti possono essere suddivisi in (Borin, 2003):

- **Elementi tossici:** comprendono vari metalli pesanti (Cd, Cr, Cu, Zn, Hg, Pb, Ni...), metalloidi (As e Se) e radionuclidi, quali U e Tc;
- **Inquinanti organici:** comprendono sia composti altamente tossici e cancerogeni, quali i bifenili policlorinati (tra cui la diossina) e gli idrocarburi policiclici aromatici, sia sostanze di per sé non necessariamente ad alta tossicità (ma difficili da gestire per la loro elevata concentrazione in zone relativamente non vaste), quali reflui zootecnici e urbani. Tali sostanze sono caratterizzate da un elevato BOD¹ e sono perciò possibile causa di ipotossia o anossia dei corsi d'acqua;
- **Fitonutrienti:** nei corsi d'acqua un eccesso di nutrienti (soprattutto azoto e fosforo) provoca una rapida espansione della crescita di alghe, cui segue prima una risposta positiva della comunità biotica per l'accresciuta disponibilità di cibo, poi un collasso del sistema dovuto all'eccesso di ossigeno consumato.

Nella valutazione del rischio per l'ambiente e la salute si dovrebbe prendere in considerazione che gli elementi, oltre alla loro proprietà tossica intrinseca, possono esplicare effetti indesiderati a distanza di tempo e di spazio. Pur disponendo di informazioni dettagliate sugli effetti acuti di molti elementi tossici, non si hanno invece conoscenze approfondite riguardanti gli effetti dovuti

¹ Domanda Biochimica di Ossigeno: rappresenta una misura del contenuto di materia organica biodegradabile presente in un campione d'acqua. Può essere usato per stimare le qualità generali dell'acqua e il suo grado di inquinamento.

all'esposizione a bassissime concentrazioni per lunghi periodi e ciò costituisce uno dei grossi limiti nel campo della tossicologia ambientale (Newman e McIntosh, 1991).

1.1 I metalli pesanti: sorgenti naturali e antropiche

Il termine “metalli pesanti” è stato suggerito nel 1980 da Nieboer e Richardson per descrivere la presenza di alcune sostanze potenzialmente tossiche per gli esseri viventi che comprendono elementi con numero atomico maggiore di 20, densità superiore ai 5 g cm^{-3} , spiccata attitudine a formare complessi, bassa solubilità dei loro idrati, stati di ossidazione diversi a seconda delle condizioni di pH ed Eh (Corradini, 1998). I metalli pesanti fanno parte dei metalli di transizione, nei gruppi VI B, VII B, VIII B, I B, II B, ma anche nei gruppi III A e IV A.

I metalli pesanti, con l'eccezione del ferro e dell'alluminio, appartengono ai cosiddetti “elementi in traccia”, presenti nei più comuni suoli e rocce della crosta terrestre in concentrazioni inferiori allo 0,1 % (in peso) e solitamente in parti per milione o per miliardo.

Sono considerati metalli pesanti: argento, bario, cadmio, cobalto, cromo, manganese, mercurio, molibdeno, nichel, piombo, rame, stagno, titanio, vanadio, zinco, tallio, alcuni metalloidi con proprietà simili a quelle dei metalli pesanti quali arsenico, antimonio, selenio e bismuto. Tra questi gli elementi che provocano più spesso fenomeni di inquinamento sono: il cadmio, il cobalto, il cromo, il rame, il manganese, il molibdeno, il nichel, il mercurio, il piombo, lo stagno, lo zinco e il selenio.

I metalli pesanti sono naturalmente presenti nelle rocce, nel suolo e negli organismi viventi. Da un punto di vista ecotossicologico, i metalli si possono classificare in tre gruppi (Marchetti, 1998):

1. metalli che hanno un importante ruolo fisiologico;
2. metalli chimicamente simili ad un elemento indispensabile;
3. metalli che non hanno alcuna azione fisiologica conosciuta.

Il primo gruppo è formato da metalli che sono definiti essenziali per animali e piante, poiché rientrano nella struttura di alcune molecole fondamentali come per esempio gli enzimi. Zinco e rame fanno parte di questa categoria ma pur essendo necessari al corretto sviluppo e sopravvivenza degli organismi, ad elevate concentrazioni possono dar luogo a fenomeni di tossicità.

Nel corso del processo di alterazione delle rocce il reticolo cristallino dei minerali primari è distrutto dai processi pedogenetici, ed i metalli pesanti presenti nei reticoli cristallini primari sono trasferiti nella soluzione circolante del suolo. Una volta raggiunta la soluzione circolante

essi possono essere lisciviati verso la falda idrica od essere occlusi nei reticoli cristallini dei minerali pedogenetici.

Come regola generale (gli elementi aventi un elevato rapporto tra carica e raggio ionico, aventi in altri termini un elevato “potenziale ionico”, come Fe^{+3} , Al^{+3} , Mn^{+4} , Cr^{+3} precipitano in forma di idrossidi ed ossidi insolubili (Violante, 1989a; Violante, 1989b)). I metalli in traccia ad elevato potenziale ionico come Co, Ni, Cu, Zn, As e Se possono vicariare Fe, Al e Mn nei relativi minerali. I metalli in traccia aventi basso potenziale ionico come Pb e Cd, similmente a quanto accade a Ca e K, hanno un raggio ionico troppo elevato per poter essere ospitati nel reticolo cristallino degli ossidi ed idrossidi di ferro, alluminio e manganese, ma possono essere adsorbiti in forma scambiabile negli interstrati di smectiti, vermiculiti e illiti.

Gli elementi in traccia sono trattenuti negli orizzonti superficiali del suolo grazie all’accumulo nella biomassa vegetale. Tra i processi che favoriscono la lisciviazione dei metalli pesanti vi è la complessazione con leganti anionici e la formazione di specie complesse cariche negativamente e poco trattenute dal complesso di scambio del suolo. Tra i leganti che formano i complessi più stabili con i metalli pesanti vi sono il cloro ed i gruppi carbossilici, fosforici e tiolici della sostanza organica (Violante, 1989a; Violante, 1989b).

L’applicazione ai suoli di fanghi di depurazione e/o *compost* con un eccessivo contenuto in metalli pesanti, riduce la resa delle colture o, comunque peggiora la qualità dei prodotti. Inoltre per quanto riguarda le pratiche agricole, la maggior parte degli apporti di metalli pesanti deriva dall’utilizzo di fertilizzanti sia per il fatto che la concimazione viene ripetuta stagionalmente sia perché questi ultimi possono contenere quantità variabili di As, Cd, Pb, Bi e Zn. Il Co, il Cu e lo Zn sono utilizzati come integratori nelle diete degli animali da reddito e presenti, anche in notevoli quantità, nelle deiezioni degli animali.

Stagionali apporti di Cu, Hg, Mn, Pb, As, Sn e Zn sono causati inoltre dall’uso di antiparassitari di varia natura.

Questi apporti favoriscono l’accumulo di metalli pesanti nella biosfera favorendone l’ingresso nella catena alimentare con gravi danni alla salute dell’uomo e degli animali. I metalli pesanti risultano infatti tossici anche a basse concentrazioni. La loro tossicità dipende dai numerosi stadi di ossidazione che possono assumere e che conferiscono loro un’alta instabilità. Generalmente, i composti che hanno una tendenza a formare complessi stabili con molecole organiche hanno anche una più elevata capacità di danneggiare le membrane biologiche. I principali effetti negativi che i metalli pesanti hanno sulle cellule viventi sono l’inibizione dell’attività enzimatica, la formazione di radicali liberi, l’azione mutagena e cancerogena (Foà *et al.*, 1988; Costa, 1991; Lees, 1991).

1.1.1 Le piante e i metalli pesanti: tossicità e tolleranza

Le strategie che le piante adottano per difendersi dall'azione dei metalli pesanti sono di vario tipo. Alcune piante escludono i metalli dalle radici evitando di sviluppare l'apparato radicale nelle zone più contaminate, oppure vi possono essere delle modificazioni indotte nei trasportatori di membrana per ridurre l'influsso o aumentare l'efflusso di metalli (Clemens, 2001).

Le piante erbacee, della famiglia delle *Poaceae*, possono produrre degli essudati detti fitosiderofori che chelano il Fe, ma possibilmente anche altri metalli, e ne facilitano l'assorbimento. Tali molecole sono biosintetizzate a partire da nicotinammide a sua volta sintetizzata a partire dalla S-adenosil L-metionina attraverso l'azione della nicotinammida sintetasi (NAS) (Higuchi *et al.*, 1999). La nicotinammide a sua volta può chelare i metalli e facilitarne il loro trasporto (Stephan *et al.*, 1996; Von Wiren *et al.*, 1999).

Molte piante reagiscono ad alte concentrazioni di metalli pesanti accumulandoli nelle radici ed evitando la loro traslocazione nei tessuti epigei; all'interno delle cellule radicali i metalli si legano ad alcuni composti, tipicamente fitochelatine e metallotionine, e vengono immobilizzati nei vacuoli (Cobbett e Goldsbrough, 2000) (Figura 1). Le fitochelatine (PC) sono polimeri peptidici, di vario peso con una struttura generale $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ con $n=2\div 11$, che non derivano dall'attivazione di geni coinvolti nella risposta allo stress, ma vengono prodotti in seguito all'attivazione di una via biosintetica. Queste molecole sequestrano i metalli pesanti nel vacuolo tramite complessazione. Infatti utilizzando tecniche di spettroscopia a raggi X, Salt *et al.* (1995) hanno osservato che i complessi fitochelatina-metallo che si formano non vengono traslocati agli organi epigei.

Le metallotionine (MTs) invece sono proteine a basso peso molecolare (6-7 kDa) ricche in cisterna sintetizzate in seguito all'attivazione di geni specifici.

Tuttavia l'induzione di fitochelatine e/o metallotionine è specie-specifica e dipende anche dal tipo di stress considerato. Ad esempio in piante di sorgo è stato dimostrato che in condizioni di stress da Cr e di H_2O_2 (generata a seguito dalle ossido-riduzioni del metallo) la trascrizione di Mt-mRNA era specificatamente alta (Shaker *et al.*, 2004). Lo stress generato dal Cr, specialmente Cr(VI), sembra quindi non indurre la produzione di PC ma viene piuttosto suggerito un ruolo delle Mts nella detossificazione e tolleranza al Cr nelle piante (Shaker *et al.*, 2004).

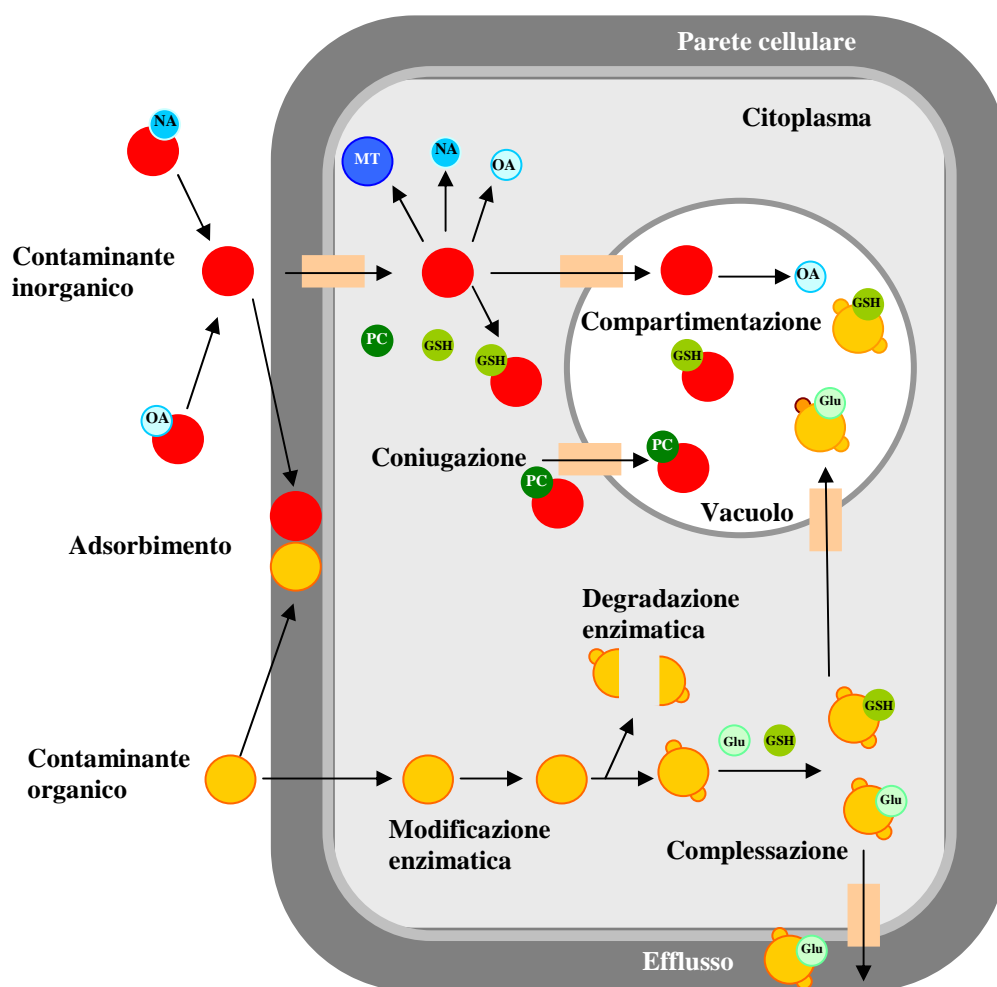


Figura 1 Possibili meccanismi adottati dalle cellule vegetali per tollerare elevate concentrazioni di inquinanti organici e/o inorganici (Pilon-Smits, 2005). (GSH= glutatione; Glu=glucosio; MT=metallotionine; NA=nicotinammina; OA= acidi organici; PC=fitochelatine; il trasporto attivo è rappresentato dai rettangoli rosa con la freccia nera).

Alcune piante rispondono alla presenza di elevate concentrazioni di metalli traslocandone una discreta quantità nella parte aerea e immagazzinandoli nei tessuti fogliari. Qui la tossicità dei metalli viene ridotta tramite complessazione con ligandi specifici (ancora fitochelatine) o precipitazione in composti insolubili, in modo da ridurre la concentrazione del metallo libero. Nel trasporto dei metalli nello xilema sembra siano coinvolti acidi organici e aminoacidi: in *Thlaspi caerulescens* lo zinco forma legami con acidi carbossilici, lo stesso avviene per il cadmio in *Brassica juncea*; entrambe queste specie, ed in particolare la prima, sono in grado di accumulare elevate quantità di metalli nella parte aerea. In *Sebertia acuminata* il nichel si lega al citrato (Sagner *et al.*, 1998). Nelle piante sembra Cr(III) venga complessato da composti organici come l'acido ossalico (Zenk, 1996; Lasat *et al.*, 1998; Lasat, 2002; Hall, 2002; Mangabeira *et al.*, 2006).

Si conoscono specie iperaccumulatrici² di metalli, che hanno però una produzione di biomassa molto limitata. La maggior parte delle piante invece non è in grado di traslocare elevate percentuali di metalli alla parte aerea, ma è possibile sfruttare quelle che producono molta biomassa, magari associandole a trattamenti del suolo che favoriscano la biodisponibilità e quindi l'assorbimento da parte delle piante (Pulford e Watson, 2003).

Nell'ultimo ventennio si è incrementata la sperimentazione su piante arboree, che producono molta più biomassa rispetto a quelle erbacee tuttavia la lunghezza nelle generazioni di tali piante non permette una rapida selezione di genotipi tolleranti verso i metalli (Dickinson *et al.*, 1991). Perciò le specie arboree potrebbero non essere in grado di adattarsi in tempi rapidi ad alte concentrazioni di metalli nel suolo (Kahle, 1993). Un tratto caratteristico dei suoli metalliferi europei, infatti, è l'assenza di alberi o specie legnose (Turner, 1994).

Tuttavia, la scarsità di sintomi di tossicità riportata dalle piante arboree rispetto a quelle riscontrate in molte specie erbacee potrebbe indicare che i loro meccanismi di tolleranza permettono la convivenza con concentrazioni di metalli pesanti maggiori rispetto alle colture erbacee (Riddell-Black, 1993). Tali piante non specificatamente selezionate per la tolleranza verso i metalli riescono a sopravvivere in suoli contaminati, sebbene di solito con tassi di crescita ridotti (Dickinson *et al.*, 1992).

Ci sono prove sia di tolleranza generica a un certo numero di metalli, sia di tolleranza specifica ad un solo metallo pesante. Il più comune carattere di resistenza ai metalli pesanti è la limitazione dell'accumulo alle radici e la scarsa traslocazione nelle foglie (Dickinson, 2000), ma la vera tolleranza richiede lo sviluppo di uno o più meccanismi fisiologici precisi con base genetica (Dickinson *et al.*, 1991). La stabilità genetica della tolleranza è tuttavia discutibile, poiché negli alberi può essere sia indotta sia persa, così la loro abilità nell'acclimatarsi alle fluttuazioni degli stress da inquinanti diventa fondamentale per la sopravvivenza. Dickinson *et al.* (1992) descrivono la tolleranza e la sopravvivenza delle piante nei suoli contaminati da metalli come derivanti da "un'orchestrata molteplicità di risposte fisiologiche e biochimiche, includendo sia meccanismi di evitazione che di vera resistenza".

Vari studi hanno mostrato che l'acclimatazione degli alberi al loro ambiente edafico è di considerevole importanza per la sopravvivenza nei suoli contaminati da metalli, benché sia importante anche la fertilità e la simbiosi micorrizica, che permette alle ife fungine di sequestrare ioni metallici e perciò favorisce la resistenza dei vegetali (Gadd, 1993; Galli *et al.*, 1994).

² Per specie iperaccumulatrici si intendono quelle piante in grado sia di assorbire elevate quantità di metalli, sia di traslocarle in quantità notevole alla parte epigea. Una nota specie iperaccumulatrice è *Thlaspi caerulescens*, in grado di accumulare elevatissime quantità di Cd (Brooks, 1998).

Per chiarire i meccanismi di adattamento agli inquinanti sono state utilizzate colture di cellule in sospensione o di callo cicatriziale e allevamento di semenzali e talee. Le piante adulte tuttavia differiscono dai semenzali per molti aspetti, compresi l'allocazione del carbonio, la struttura della chioma e la percentuale di tessuto fotosinteticamente non più attivo, che cresce con l'età (Turner, 1994). I semenzali sono più sensibili agli stress quindi potrebbero portare ad alcune indicazioni fuorvianti riguardo la capacità di accumulo delle piante mature (Riddell-Black, 1993). Tuttavia sarebbe impossibile compiere molti esperimenti pensando di utilizzare piante arboree adulte per cui in ambito sperimentale vengono diffusamente impiegati semenzali e talee.

Punshon e Dickinson (1997) hanno mostrato che la resistenza ai metalli pesanti nei salici può essere aumentata da un graduale adattamento degli alberi allo stress. Landberg e Greger (1994) hanno testato 94 cloni di *Salix viminalis* e *Salix dasyclados* riguardo alla tolleranza ai metalli pesanti usando un sistema idroponico; i risultati mostrano considerevoli variazioni nella tolleranza e nell'assorbimento tra i cloni delle due specie. Per esempio, la concentrazione di Cd nei getti dei cloni esposti ad una soluzione di Cd 1 μ M per 20 giorni differiscono di un fattore 80 tra la concentrazione più bassa e quella più alta.

1.1.2 Strategie di risposta delle piante ai metalli pesanti

Molti ioni metallici sono essenziali alle piante all'interno di parecchie vie metaboliche e per il corretto funzionamento di alcuni enzimi (Tabella 1).

Tabella 1 Richiesta di ioni metallici da parte di alcuni enzimi. I metalli possono essere presenti sotto forma di attivatori o facenti parte integrante della struttura dell'enzima (quest'ultimo indicato dall'asterisco). (Modificato da: Hall *et al.*, 1984).

<i>Ione</i>	Enzima
Zn ²⁺	Alcool deidrogenasi* Lattato deidrogenasi* Gliceraldeide fosfato deidrogenasi
Cu ²⁺	Catecolo ossidasi* Citocromo ossidasi* Ascorbato ossidasi*
Mg ²⁺	Parecchie fosfotransferasi (es. esochinasi) Parecchie fosfoidrolasi (es. fitasi) Parecchie ligasi (es. succinil-CoA sintetasi) Acido δ-aminolevulinico deidratasi*
Mn ²⁺	Isocitrato deidrogenasi Alcune fosfotransferasi
Ca ²⁺	Aspirasi Fosfolipasi Lipasi
Fe ²⁺ o Fe ³⁺	Citocromi* Perossidasi Ferredossina* Catalase*
K ⁺	Piruvato chinasi Acetil-CoA sintetasi Aldolasi γ-Glutamil-cisteina sintetasi

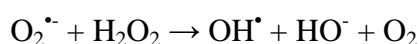
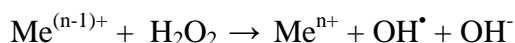
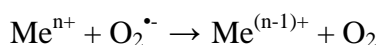
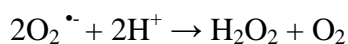
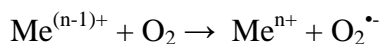
Tuttavia la presenza di concentrazioni elevate di uno o più metalli può invece portare al manifestarsi di effetti fitotossici all'interno delle piante con conseguenze anche letali, infatti i principali effetti negativi che i metalli pesanti hanno sulle cellule viventi sono la formazione di radicali liberi, l'inibizione dell'attività fotosintetica e dell'attività enzimatica e l'azione mutagena e cancerogena (Stohs e Bagchi, 1995).

L'inibizione dell'attività fotosintetica nelle piante superiori dovuta ai metalli pesanti è ben documentata in letteratura, così come la riduzione di pigmenti fotosintetici (Clijsters e Van Assche, 1985; Prasard e Strzalka, 1999; Pandey e Sharma, 2003; Scoccianti *et al.*, 2006). I meccanismi direttamente collegati con la riduzione dei pigmenti fotosintetici includono l'inibizione degli enzimi coinvolti nella biosintesi delle clorofille quali l'acido δ-aminolevulinico deidratasi (ALAD) (Vajpayee *et al.*, 2000) e la protoclorofillide reductasi (De Filippis e Pallaghy, 1994) oltre alla sostituzione, da parte dei metalli, degli ioni centrali di Mg nelle clorofille (Prasard e Strzalka, 1999).

Per difendersi dalla tossicità dei metalli pesanti le cellule vegetali possono utilizzare vari sistemi difensivi come l'immobilizzazione, l'esclusione, la induzione di metallotionine, la sintesi

di fitochelatine e/o altri agenti chelanti, la compartimentazione (Cobbett, 2000; Satofuka *et al.*, 2001; Kömives *et al.*, 2003; Srivastave *et al.*, 2004; Zerbi e Marchiol, 2004).

Quando i metalli nei tessuti assumono livelli tali da non poter essere detossificati, possono dare origine a reazioni tipo “Fenton³” o “Haber-Weiss” (Asada e Takahashi, 1987; Koppenol, 2001) che portano ad un aumento di specie reattive dell’ossigeno (*Reactive Oxygen Species* o ROS), (dove Me= metallo):



I ROS dall’eccitazione dell’ossigeno (O_2) a formare ossigeno singoletto (O_2^1) o dal trasferimento di uno, due o tre elettroni all’ O_2 per formare rispettivamente radicale superossido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), perossido di idrogeno (H_2O_2) e radicale ossidrile (OH^{\bullet}) (Mittler, 2002; Scandalios, 2005; Gratão *et al.*, 2005). I ROS sono normalmente presenti nelle cellule quali prodotti intermedi di varie vie metaboliche ma rappresentano un serio problema quando la loro concentrazione aumenta a seguito di uno stress sia di origine biotica che abiotica.

La presenza di ROS provoca seri danni quali ossidazione delle proteine (es. frammentazione della catena peptidica, alterazione della carica elettrica, aumento della suscettibilità alla proteolisi, distruzione della funzionalità enzimatica attraverso l’ossidazione dei centri Fe-S), e danni a DNA e RNA (es. presenza di mutazioni, delezioni, traslocazione e degradazione delle basi). La presenza di ROS può inibire l’attività respiratoria dei mitocondri e la perdita della fissazione del carbonio nei cloroplasti. Inoltre essi possono reagire con gli acidi grassi insaturi e causare perossidazione lipidica nel plasmalemma e in organelli intracellulari, quali ad esempio nelle membrane tilacoidali dei cloroplasti in cui si assiste quindi all’inibizione dell’attività dei fotosistemi I e II. Tali perossidazioni a loro volta inducono la perdita del contenuto cellulare, rapido disseccamento e morte cellulare (Fridowich, 1976; Scandalios, 1993; Gratão *et al.*, 2005; Landberg e Greger, 2002; Panda e Choudhury, 2005; Sinha *et al.* 2005; Yu *et al.*, 2007;).

Per minimizzare tali effetti negativi gli organismi aerobi hanno evoluto sistemi di difesa che comprendono antiossidanti enzimatici e non enzimatici (Figura 2). Le difese non enzimatiche includono composti quali ascorbato (o vitamina C), tocoferolo (o vitamina E), glutatione (GSH/GSSH), cisteina, flavonoidi e β carotene. Fra gli enzimi antiossidanti sono inclusi

³ dal nome dell’ideatore Fenton H.J.H.: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^{\bullet}$

superossido dismutasi (SOD), ascorbato perossidasi (APX), guaicol perossidasi (GPX), catalasi (CAT) e glutazione riduttasi (GR).

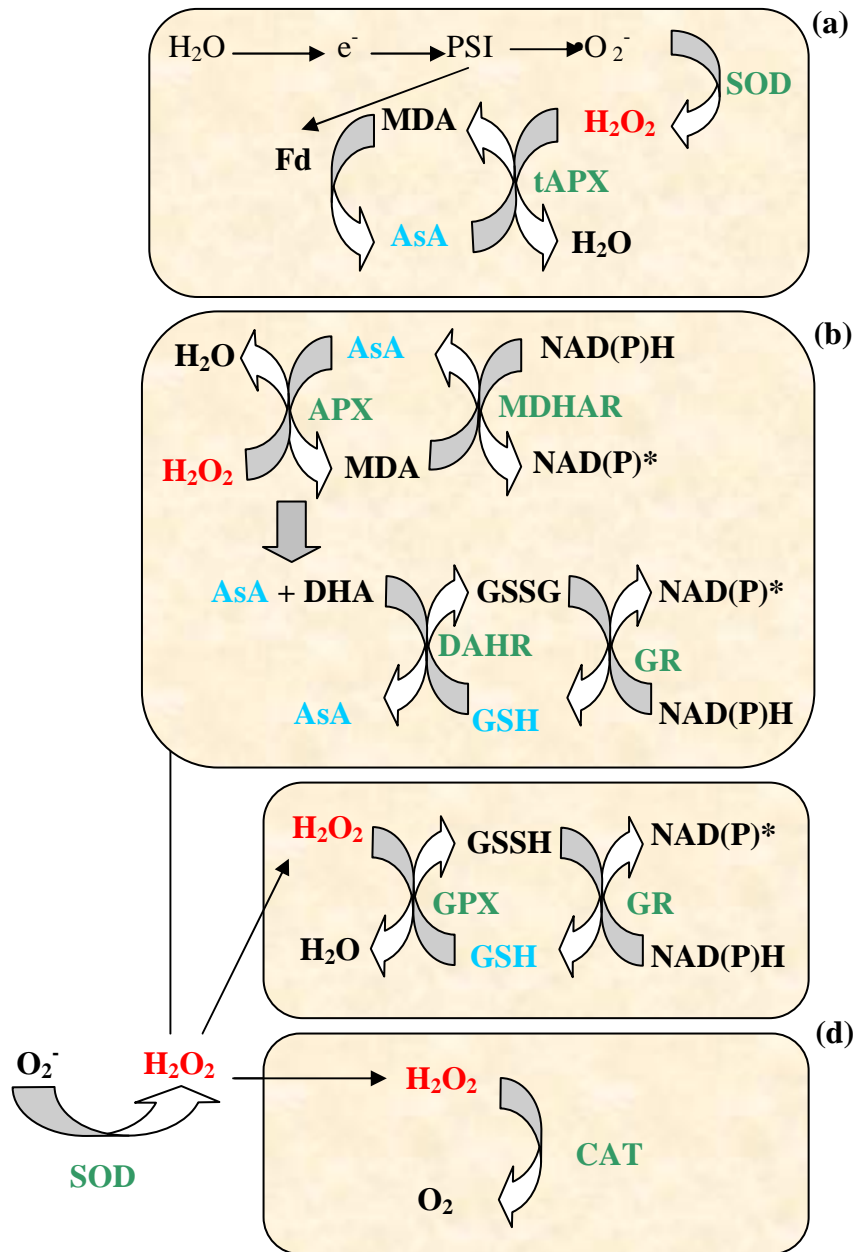


Figura 2 Vie di detossificazione dei radicali liberi nelle piante. **(a)** Il ciclo acqua-acqua nei cloroplasti, **(b)** il ciclo ascorbato-glutazione in cloroplasti, citosol, mitocondri, apoplasto e perossisomi, **(c)** il ciclo glutazione perossidasi (GPX) nei perossisomi, **(d)** catalasi (CAT) nei perossisomi. Abbreviazioni: DHA=deidroascorbato, DHAR=deidroascorbato reductasi, Fd=ferredoxina, GR=glutazione reductasi, GSSH=glutazione ossidato, GSH=glutazione ridotto, MDA=monodeidroascorbato, MDHAR= monodeidroascorbato reductasi, PSI=fotosistema I, tAPX=ascorbato perossidasi tilacoidale (Da: Mittler, 2002).

La prima linea di difesa è rappresentata dalla superossido dismutasi (SOD) (EC 1.15.1.1) la quale converte il radicale superossido ($\bullet O_2^-$) ad acqua ossigenata (H_2O_2) attraverso la reazione seguente (Figura 2/A):



Esistono tre differenti forme isoenzimatiche di SOD classificate in base al metallo che funge da cofattore (Scandalios, 1993; Alscher *et al.* 2002). Le Mn-SODs sono localizzate in mitocondri e perossisomi (del Rio *et al.*, 2003), ma la loro presenza è stata riportata anche nei cloroplasti di alcune piante (Hayakawa *et al.*, 1984); le Fe-SODs non sono state trovate in tutte le piante (Ferreira *et al.*, 2002) ma sembrano essere associate ai cloroplasti (Alscher *et al.*, 2002), mentre le Cu/Zn-SODs sono localizzate in citosol, cloroplasti e perossisomi (del Rio *et al.*, 2002).

A sua volta l'H₂O₂ è detossificata da due classi di enzimi, le catalasi e le perossidasi. Questi enzimi catalizzano la riduzione dell'H₂O₂ a 2H₂O, usando H₂O₂ come donatore di elettroni nel caso delle catalasi, o altri agenti riducenti nel caso delle perossidasi (Fridovich, 1976).

La catalasi (CAT) (EC 1.11.1.6) è una emoproteina che metabolizza l'acqua ossigenata (H₂O₂) ad acqua (H₂O) e ossigeno (O₂) all'interno dei perossisomi (Figura 2/D). L'H₂O₂ viene liberata seguendo la conversione del glicolato a glicoxilato durante la fotorespirazione (Igamberdiev e Lea, 2002).

Questo enzima è l'unico, fra quelli che degradano l'H₂O₂, che la decompone senza consumare equivalenti riducenti cellulari per cui risulta insensibile allo stato redox delle cellule e la sua funzionalità sembra non essere alterata durante lo stato di stress (Mittler, 2002; Scandalios, 2005). La CAT decompone l'H₂O₂ con estrema rapidità e in base alla concentrazione di H₂O₂ presente si possono attivare due differenti vie di detossificazione (Scandalios, 2005):

- a basse concentrazioni (<1 µM) di H₂O₂ la CAT può ossidare una certa varietà di donatori di idrogeno (es. etanolo e acido ascorbico) nella maniera seguente: $\text{RH}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{R} + 2\text{H}_2\text{O}$
- ad alte concentrazioni la CAT decompone l'H₂O₂ ad una velocità estremamente rapida usando la reazione "catalitica" nella quale l'H₂O₂ agisce sia come un accettore sia come un donatore di molecole di idrogeno: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

Anche per la CAT sono state individuate più forme isoenzimatiche anche se il loro numero varia in base alla specie analizzate, infatti in piante di mais e spinacio ne sono state trovate tre (Bagnoli *et al.*, 1994; Scandalios *et al.*, 2000), ma solo due in orzo e pesco (Bagnoli *et al.*, 1994; Skadsen *et al.*, 1995), mentre ne sono state individuate sei in *Arabidopsis thaliana* (Michael e McClung, 2002).

Le perossidasi hanno vari ruoli fisiologici nelle cellule vegetali e partecipano in molte reazioni incluse quelle di lignificazione, *cross linking* dei polisaccaridi della parete cellulare, ossidazione dell'acido indol 3-acetico (IAA), regolazione dell'allungamento cellulare e ossidazione dei fenoli (Mocquot *et al.*, 1996). L'attività delle perossidasi è strettamente correlata con i cambiamenti nei processi fisiologici all'interno delle piante, come respirazione, attività

fotosintetica, fissazione della CO₂, traspirazione e conduttanza stomatica con ovvie conseguenze sulla crescita e il benessere delle piante. Risultano essere perciò indicatori sensibili in caso di compromessa attività metabolica (Verkleij e Schat, 1990). Fra le perossidasi si possono citare l'APX e la GPX.

La famiglia dell'ascorbato perossidasi (APX) è composta da cinque isoforme (Asada, 1992) localizzate in tilacoidi, stroma, citosol, perossisomi e apoplasto (Miyake e Asada, 1992; Jiménez *et al.* 1997).

L'APX (EC 1.11.1.11) è anch'esso un enzima che catalizza la demolizione dell'H₂O₂ all'interno del ciclo "ascorbato-glutatione" (Figura 2/B). In tale ciclo l'enzima APX promuove la riduzione dell'H₂O₂ attraverso una serie di ossidoriduzioni a carico degli antiossidanti ascorbato (AsA) e glutatione (GSH). In un primo passaggio infatti l'AsA viene ossidato a monodeidroascorbato (MDA), a sua volta ridotto per azione dell'enzima monodeidroascorbato riduttasi (MDAR). Gli equivalenti riducenti sono in tal caso resi disponibili dall'ossidazione del GSH a glutatione ossidato (GSSG). L'enzima glutatione riduttasi (GR) opera infine la riduzione del GSSG a GSH utilizzando il potere riducente derivante dal trasporto di elettroni fotosintetico ed immagazzinato come NADPH (Mittler, 2002).

Rispetto all'enzima CAT, sembra che l'APX mostri un'affinità per l'H₂O₂ su scala micromolare mentre la CAT la dimostri su scala mM. Ciò suggerisce che ci possano essere due differenti classi di enzimi antiossidanti: l'APX può essere responsabile per la modulazione fine dei ROS come segnale, mentre la CAT può essere responsabile della rimozione dell'eccesso di H₂O₂ durante la fase di stress (Mittler, 2002; Scandalios, 2005).

Altro enzima antiossidante è la guaiacolo perossidasi (GPX) (EC 1.11.1.7) che si distingue dall'APX sia nelle sequenze amminoacidiche sia nelle funzioni fisiologiche (Chen *et al.*, 1992). La GPX partecipa in varie vie metaboliche quali la decomposizione dell'acido indol 3-acetico (IAA), biosintesi di lignina e difesa contro i patogeni consumando l'H₂O₂. Nelle reazioni di ossidoriduzione il GPX utilizza composti aromatici come donatori di elettroni, quali il guaiacolo e il pirogallolo (Asada, 1999).

1.2 Il cromo

Il cromo è un metallo di transizione localizzato nel gruppo VI B della tavola periodica degli elementi. Ha numero atomico 24, peso atomico 51,9961, raggio atomico di 140 (160) pm, densità 7,19 g cm⁻³, punto di fusione 1850-1900 °C, punto di ebollizione 2672 ± 20 °C, pressione di vapore 1 Torr a 1616 °C. È solubile in HNO₃, insolubile in acqua, diluibile in HCl e H₂SO₄ e

si lega facilmente ad altri metalli. Scoperto nel 1798 dal chimico francese N. L. Vauquelin in un minerale di piombo (crocoite, PbCrO_4), è il settimo elemento più abbondante sulla terra (Katz e Salem, 1994; Zayed e Terry, 2003; Shanker *et al.*, 2005) e il ventunesimo nella crosta terrestre ($0,1-0,3 \text{ mg kg}^{-1}$). In natura si presenta come un metallo duro, lucido, color grigio acciaio; può essere facilmente lucidato, fonde con difficoltà ed è molto resistente alla corrosione; il minerale più importante è la cromite (FeCr_2O_4) di origine magmatica, ma molto diffusa è anche la crocoite (PbCrO_4) (Figura 3).

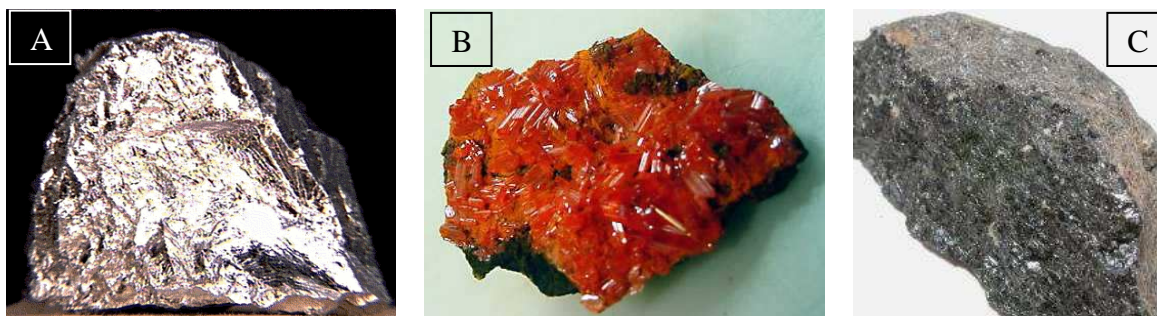


Figura 3 Alcuni minerali contenenti cromo: cromo metallico (A), crocoite (B) e cromite (C)

Il cromo è famoso per le varie colorazioni che i suoi composti chimici possono assumere: il dicromato di potassio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) è rosso rubino, il cromato di potassio (K_2CrO_4) è giallo mentre il cloruro di cromo (CrCl_3) è verde smeraldo (Figura 4).

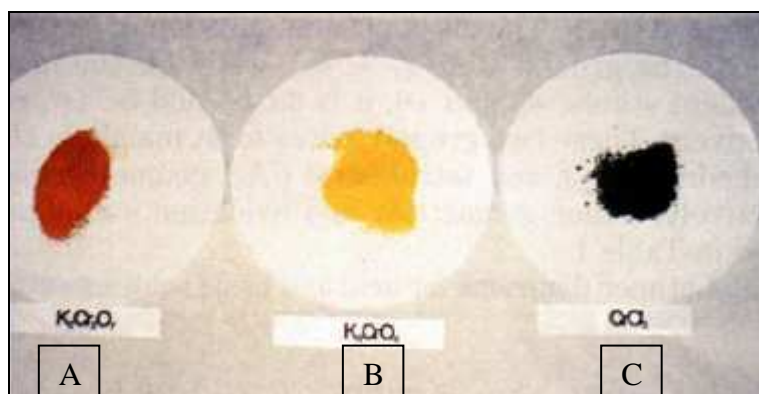


Figura 4 Colorazione assunta da alcuni composti di cromo: $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (A), K_2CrO_4 (B) e CrCl_3 (C) (Da: Shupack, 1991).

La tossicità di questo metallo deriva in gran parte dalla sua elevata reattività che lo porta ad assumere vari stati di ossidazione compresi fra -2 e +6 (Tabella 2) e dal conseguente elevato potenziale ossidativo che danneggia le cellule biologiche.

Tabella 2 Stati di ossidazione assunti dal cromo e geometria del composto (Da: Shupack, 1991)

Composto	Geometria	Stato di ossidazione
$[\text{Cr}(\text{CO})_5]^{-2}$	Bipiramide trigonale	-2
$[\text{Cr}_2(\text{CO})_{10}]^{-2}$	Ottaedro	-1
$[\text{Cr}(\text{bipy})_3]$	Ottaedro	0
$[\text{Cr}(\text{CNR})_6]^+$	Ottaedro	+1
$[\text{Cr}(\text{CO})_2(\text{diars})_2\text{X}]^+$	Prisma trigonale	+2
$[\text{CrCl}_4]^{-1}$	Tetraedro	+3
$[\text{CrF}_6]^{-2}$	Ottaedro	+4
$[\text{CrOCl}_4]^{-1}$	Piramide quadrata	+5
$[\text{CrO}_4]^{-2}$	Tetraedro	+6

Gli stati di ossidazione Cr(III) e Cr(VI) sono i più stabili in natura, infatti le forme Cr(II), Cr(IV) e Cr(V) sono instabili e vengono rapidamente convertite in Cr(III) che a sua volta può essere ossidato a Cr(VI) (Shupack, 1991; Zayed e Terry, 2003). Il Cr nella sua forma trivalente è considerato 10÷100 volte meno tossico del CrO_4^{2-} (Katz e Salem, 1994; Zayed *et al.*, 1998).

Il Cromo è inserito nella “U.S. EPA⁴ Priority pollutant list” come uno dei 129 maggiori inquinanti presenti al mondo ed è segnalato come uno dei 14 più nocivi metalli pesanti (<http://nsdi.epa.gov/waterscience/methods/pollutants.htm>). Inoltre è inserito nella lista delle 25 sostanze che possiedono il più elevato potenziale di rischio per la salute umana (Chaney *et al.*, 1997). La presa di coscienza di tale pericolosità ha portato, ad esempio, a rendere obbligatoria la Direttiva della Comunità Europea 2002/95/CE (RoHS⁵), a partire dal 1° luglio 2006, che vieta l'utilizzo di cromo esavalente come componente nei rivestimenti anticorrosione in vari tipi di apparecchiature elettriche ed elettroniche.

La maggiore attenzione riservata nell'ultimo decennio alla pericolosità di questo elemento da parte della comunità scientifica mondiale deriva dal fatto che i siti contaminati da cromo sono in notevole aumento a causa del rilascio, spesso non regolato, degli effluenti provenienti dalle numerose attività industriali che impiegano tale metallo (Chandra *et al.*, 1997).

I casi di inquinamento sono numerosi anche in Italia e ciò mette a serio pericolo le generazioni future a causa degli effetti cancerogeni e mutageni che il cromo possiede. Si possono riportare alcuni esempi, come il recente caso di inquinamento da cromo esavalente riscontrato del fiume Dora sito nel comune di Torino: dai campionamenti effettuati da Arpa Piemonte su campioni di acque, anche di falda, si sono rilevate concentrazioni di cromo esavalente fino a 30 $\mu\text{g l}^{-1}$ (mentre il limite di legge per il cromo esavalente nell'acqua di falda è di 5 $\mu\text{g l}^{-1}$) (Comune

⁴ EPA=Environmental Protection Agency of USA.

⁵ Restriction of Hazardous Substances Directive

di Torino, Prot n. 14532 Tit. 06 Cl. 9 - 7 Fasc. 3 Data: 18/09/2008). Altro esemplare caso di inquinamento da cromo esavalente è quello riscontrato nell'estate del 2001 nella falda acquifera di Tezze sul Brenta (PD) e dell'alta padovana (Fontaniva e Cittadella), per una concentrazione fino a mille volte superiore alla soglia ammessa dalla normativa vigente (http://www.report.rai.it/R2_popup_articolofoglia/0,7246,243%255E8723,00.html). Quest ultimo caso di inquinamento non risultava ancora risolto a giugno 2006 data in cui il capo segreteria tecnica del Ministero dell'Ambiente, dott. Fabrizio Fabbri scrive “*Il livello di inquinamento da cromo esavalente rilevato a Tezze sul Brenta rappresenta un'inaccettabile condizione di rischio diretto ed indiretto della popolazione che vive nelle vicinanze dell'area.*”

1.2.1 Fonti ed usi del cromo

Il cromo metallico viene principalmente ottenuto tramite un processo di estrazione a partire dalla cromite. Nell'anno 2005 la produzione mondiale dei vari composti di cromo è stata di quasi 15 milioni di tonnellate, inoltre l'andamento dell'estrazione del cromo sta progressivamente aumentando. I principali paesi produttori sono Sud Africa, Kazakistan e India (*United States Geological Survey Mineral Resources Program*, <http://minerals.usgs.gov/>).

Il Cr(VI) risulta dominante in reflui derivanti da industrie metallurgiche, di lavorazione dei metalli, refrattarie e di produzione e applicazione di pigmenti, mentre il Cr(III) si trova principalmente in reflui provenienti da concerie, industrie tessili e galvaniche (Kotaš e Stasicka, 2000). I settori produttivi nei quali è impiegato il cromo sono quindi:

- industria galvanica nella quale si utilizza solfato cromico per effettuare la “cromatura” (Vajpayee *et al.*, 1999);
- industria tessile e conciaria. La concia delle pelli è la principale causa antropica di influsso di Cr nella biosfera, con il 40% del totale. Chandra *et al.* (1997) hanno stimato che nella sola India circa 2000-3200 tonnellate di cromo elementare vengono immesse annualmente nell'ambiente dalle industrie conciarie, producendo negli affluenti concentrazioni di Cr comprese tra 2 e 5 g l⁻¹. Per la concia delle pelli si usa il dicromato di potassio che ossida i materiali organici della pelle, si riduce e precipita all'interno dei tessuti come Cr₂O₃ o Cr(OH)₃ che conferiscono morbidezza alla pelle e servono come mordenti per il successivo processo di colorazione;
- i cromati sono utilizzati come additivi nei circuiti industriali delle acque di raffreddamento per limitare la corrosione delle superfici di scambio termico;

- pigmenti quali il colore “giallo di cromo” ottenuto con cromato di piombo, il “giallo di zinco” ottenuto con cromato di zinco, il “verde di cromo o di Guignet” ottenuto con ossido di cromo e il “violetto di stagno” ottenuto con cromato di stagno (ANPA, 1999);
- mordenti (sali di cromo).;
- produzione di leghe metalliche. Infatti la lega Fe/Cr ha un contenuto di cromo pari al 66-72%, gli acciai inossidabili Ni/Cr contengono cromo per il 18% mentre gli acciai legati “rapidi” hanno cromo per lo 0,3% (ANPA, 1999).

1.2.2 Il Cr nei sistemi acquatici

Il cromo normalmente presente nelle acque proviene da fonti naturali quali precipitazioni, costituenti di rocce, ceneri vulcaniche dell’atmosfera ed effluenti di sistemi terrestri.

La concentrazione del cromo nelle acque non contaminate è di $0,1\div 117 \mu\text{g l}^{-1}$ nelle acque dolci e di $0,2\div 0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ nelle acque marine (Pawlisz, 1997). Alcune linee guida indicano come limiti massimi per la vita d’acqua dolce $1 \mu\text{g l}^{-1}$ per Cr (VI) e $8 \mu\text{g l}^{-1}$ per Cr (III), per la vita marina $1 \mu\text{g l}^{-1}$ per Cr (VI) e $50 \mu\text{g l}^{-1}$ per Cr (III), per l’acqua ad uso irriguo $8 \mu\text{g l}^{-1}$ per Cr (VI) e $5 \mu\text{g l}^{-1}$ per Cr (III), per l’acqua potabile $50 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr (VI) (Krishnamurthy e Wilkens, 1994; Pawlisz, 1997; Zayed e Terry, 2003).

Il graduale aumento della concentrazione di cromo nelle acque (soprattutto nei fiumi) è dovuto allo spargimento di reflui provenienti da industrie metallurgiche, conciarie, di placcaggio eseguito elettroliticamente, e da altre industrie chimiche. Questi composti solubili, la cui forma chimica dipende dalle caratteristiche dei processi industriali, vengono poi lisciviati nelle acque naturali, rappresentando un problema rilevante per l’ambiente, soprattutto nel caso del cromo esavalente (Kotaś e Stasicka, 2000).

Il cromo nelle acque naturali si trova prevalentemente come Cr(III) o Cr(VI). La presenza e il rapporto tra queste due forme dipende da vari processi che includono trasformazioni redox chimiche e fotochimiche, reazioni di precipitazione e dissoluzione e di adsorbimento e desorbimento.

Cineticamente il Cr^{3+} è sostanzialmente inerte nei sistemi acquatici a causa della sua scarsa solubilità in acqua, e sebbene sia considerato meno tossico della forma esavalente il suo stato di ossidazione può velocemente mutare. Infatti le reazioni di protonazione/deprotonazione possono essere molto rapide (Che-Jen Lin. 2002).

Le trasformazioni fra Cr(III) e Cr(VI) in acqua sono influenzate da molteplici fattori quali pH, potenziale redox, ossigeno disciolto nel medium, cinetica di reazione, concentrazione e speciazione chimica di alcuni reagenti. In condizioni anaerobiche, il Cr(III) dovrebbe essere l’unica

forma presente, mentre in condizioni aerobiche è il pH che interviene a regolare la presenza/assenza di uno stato di ossidazione del metallo in questione. Infatti, mentre il cromo trivalente è la specie più stabile a $\text{pH} \leq 6$, quello esavalente prevale in condizioni basiche con $\text{pH} \geq 7$ (Kotaš e Stasicka, 2000).

La natura e la concentrazione degli agenti ossidanti e riducenti nello strato superficiale della colonna d'acqua giocano un ruolo importante nella speciazione del cromo. Inoltre, studi effettuati su acque naturali (Kotaš e Stasicka, 2000; Zayed e Terry, 2003) hanno dimostrato come il Cr(III) viene facilmente ossidato a Cr(VI) in presenza di ossido di manganese. Fra i reagenti che possono provocare reazioni di ossido/riduzione del cromo sono inclusi: ferro [Fe(II)] (Buege e Hug, 1997; Buege e Hug, 1998; Zhang e Balett, 1999), zolfo [S(VI)] (Beattie e Haight, 1972), manganese [Mn(III) e Mn(VI)] (Seigneur e Costantinou, 1995), radicale ossidrile ($\bullet\text{OH}$) (Zhang, 2000), vanadio [V(II) e V(IV)] (Davis e Espenson, 1970) e arsenico [As(III)] (Beattie e Haight, 1972).

Nelle acque le forme principali di Cr(III) sono gli idrossidi, tuttavia il Cr(III) mostra una certa tendenza a formare complessi anche con materiali organici come aminoacidi, acidi fulvici e umici ed altri acidi. Nella maggior parte dei complessi che si formano, il Cr(III) è immobilizzato da composti macromolecolari e perciò rimosso dalla soluzione. Inoltre, i complessi del Cr(III) acqua/idrossido hanno una forte tendenza ad essere adsorbiti sui solidi normalmente presenti nelle acque i quali contribuiscono, così, a diminuire la mobilità del Cr(III) e la sua biodisponibilità nei corpi idrici.

1.2.3 Il Cr nel suolo

Nella crosta terrestre la presenza di cromo varia da 100 a 300 mg kg^{-1} mentre il suolo può contenere da 5 a 3000 mg kg^{-1} (Shewry e Peterson 1976; Skeffington *et al.*, 1976; Zayed e Terry, 2003) a seconda della roccia madre. Nei *serpentine soils* si possono raggiungere concentrazioni di 125 g kg^{-1} (Adriano, 1986; Zayed e Terry, 2003) (Tabella 3).

I livelli di cromo presenti in piante cresciute in suoli non contaminati sono solitamente minori di 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s., raramente superano i 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s., e tipicamente sono nell'ordine di 0,02 e 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s. (Kabata e Pendias, 1992).

Tabella 3 Concentrazioni di cromo nell'ambiente (modificato da Zayed e Terry, 2003).

Elemento	Concentrazione	Referenze
Terreno naturale	5-1000 mg kg ⁻¹	Adriano (1986)
	5-3000 mg kg ⁻¹	Skeffington <i>et al.</i> (1976)
	5-1500 mg kg ⁻¹	Verry e Vermette (1991)
	30-300 mg kg ⁻¹	Katz e Salem (1994)
	da tracce a 5.23%	NAS (1974)
<i>Serpentine soils</i>	634-125 000 mg kg ⁻¹	Adriano (1986)
Terreno a livello mondiale	200 mg kg ⁻¹ (media)	Vinogradov (1959)
	100-300 mg kg ⁻¹	Aubert e Pinta (1977)
	10-150 mg kg ⁻¹ (media 40 mg kg ⁻¹)	NAS (1974)
Terreno negli USA	25-85 mg kg ⁻¹ (media 37 mg kg ⁻¹)	Shacklette <i>et al.</i> (1971)
Terreno del Canada	10-5000 mg kg ⁻¹ (media 43 mg kg ⁻¹)	Pawlisz (1997)
Terreno del Giappone	87 mg kg ⁻¹ (media)	Smith <i>et al.</i> (1989)
Terreno della Svezia	74 mg kg ⁻¹ (media)	Smith <i>et al.</i> (1989)
Sedimenti	0-31 000 mg kg ⁻¹	Pawlisz (1997)
Acqua dolce	0-117 µg l ⁻¹ (in media 9.7 µg l ⁻¹)	Pawlisz (1997)
Acqua di mare	0-0.5 µg l ⁻¹	Pawlisz (1997)
Aria	1-545 000 ng m ³	Pawlisz (1997)
	100 ng m ³	USEPA (1983)
Piante	0.006-18 mg kg ⁻¹	Pawlisz (1997)
Animali	0.03-1.6 mg kg ⁻¹	Pawlisz (1997)

Il cromo trivalente è un acido forte che tende a formare complessi esacoordinati ottaedrici con molti ligandi come l'acqua, l'ammonio, l'urea e altri ligandi organici che contengono ossigeno, nitrogeno o solfato come donatori di elettroni.

Le diverse forme di Cr coesistono in equilibrio dinamico, controllato da tre importanti reazioni: ossidoriduzione, precipitazione/dissoluzione e adsorbimento/desorbimento.

Nella maggior parte dei suoli la forma predominante di cromo è il Cr(III), meno solubile e quindi meno mobile di Cr(VI), poiché in condizioni riducenti la forma esavalente viene ridotta a quella trivalente, con velocità crescente al decrescere del pH. Tuttavia la riduzione di Cr(VI) a Cr(III) è possibile, anche a pH subalcalini e in condizioni aerobiche, purché il suolo contenga sufficiente energia da sostanza organica per permettere la reazione redox. Gli orizzonti inferiori sono più poveri in sostanza organica, e quindi meno propensi ad inibire la mobilità del cromato (Adriano, 1986; Zayed e Terry, 2003).

Il Cr(VI) esiste in soluzione come idrocromato, cromato e dicromato; l'equilibrio tra queste forme dipende dal pH. Alcuni composti del cromo esavalente, come gli ossidi o i sali dell'acido cromico con ammonio, Na e K, sono facilmente solubili in acqua, mentre i sali di Zn e Pb sono

praticamente insolubili (Zayed e Terry, 2003). Al contrario, la solubilità di Cr(III) è limitata dalla formazione di molti ossidi e idrossidi insolubili. Spesso il Cr(III) si trova in composti misti con Fe(III), come ad esempio il $(\text{Cr,Fe})(\text{OH})_3$, che hanno solubilità ancora minore di $\text{Cr}(\text{OH})_3$ (Adriano, 1986; Rai *et al.*, 1987; Zayed e Terry, 2003). (Figura 5).

Le forme mobili del Cr(VI) possono essere ridotte da diversi riducenti organici come Fe(II) e S^{2-} . Questo processo è anche chiamato “decromificazione”.

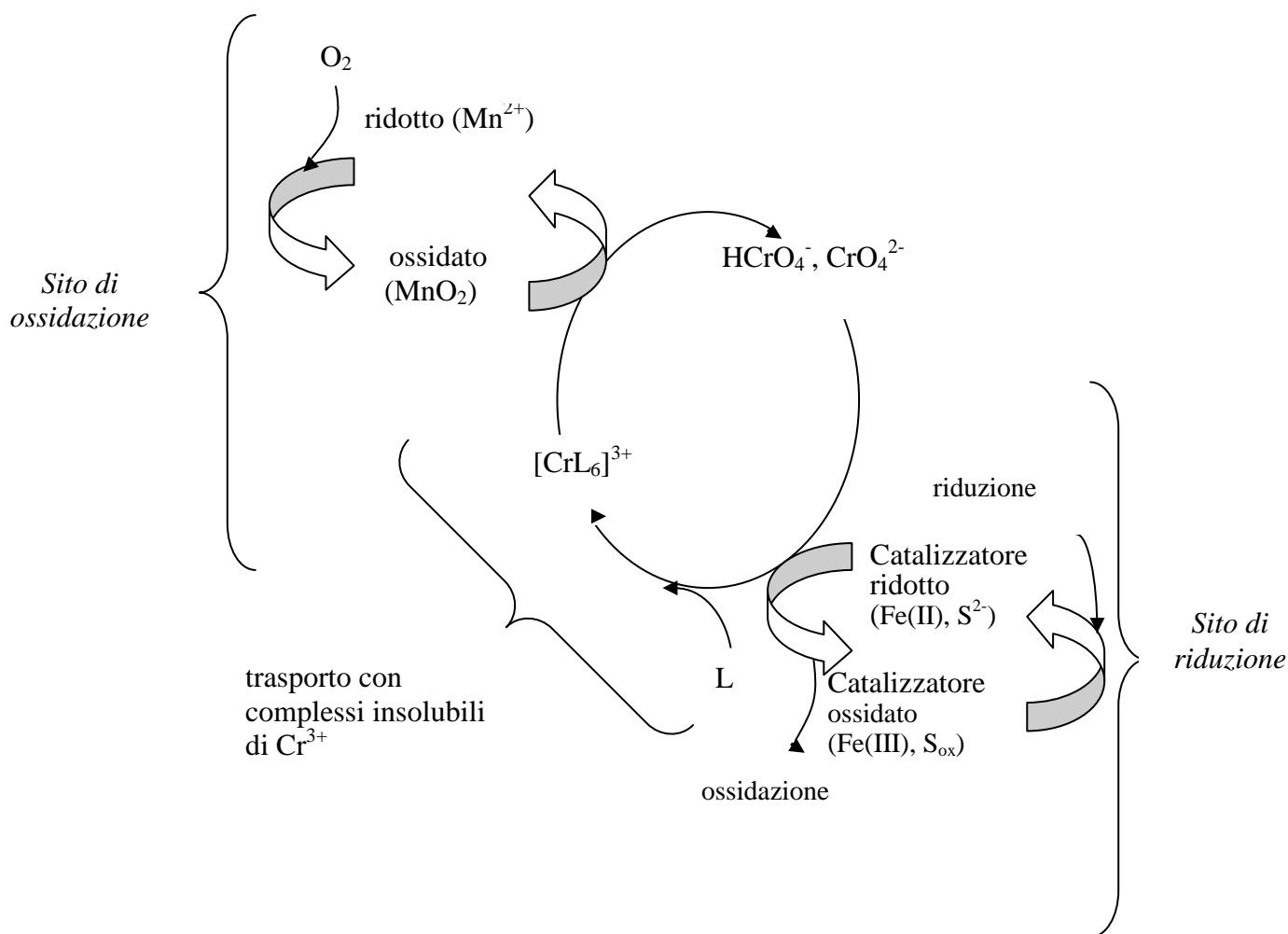


Figura 5 Il ciclo di ossidazione-riduzione del cromo nel suolo (James e Bartlett 1988).

1.2.4 Il Cr nell'atmosfera

Nell'atmosfera il contenuto di cromo varia notevolmente da $5 \cdot 10^{-6}$ a $1,2 \cdot 10^{-3} \mu\text{g m}^{-3}$, come in Antartide e Groellandia, fino a $0,0015-0,03 \mu\text{g m}^{-3}$ in campioni raccolti in aree urbane (Nriagu, 1998; Shanker *et al.*, 2005). Circa il 60-70% del Cr presente nell'atmosfera proviene da fonti antropogeniche, mentre il rimanente 30-40% origina da fonti naturali (Sieigneur e Constantinou, 1995). Le dimensioni delle particelle contenenti Cr hanno importanza ai fini della valutazione del rischio per la salute degli esseri umani e degli organismi animali in generale. Particelle di

diametro compreso fra 0,2 e 10 μm possono infatti essere inalate e causare rischi di tipo cancerogeno (Nriagu *et al.*, 1988).

Una delle sorgenti principali di emissioni gassose di metalli pesanti è rappresentata dai fumi prodotti dal consumo di combustibili. Circa l'84% delle ceneri prodotte dalla combustione dei carboni sono volatili ed il loro contenuto in elementi in tracce è piuttosto variabile, dipendendo sia dal tipo di carbone che dalle condizioni di combustione.

1.2.5 Effetto del cromo sugli animali e sull'uomo

L'EPA (*Environmental Protection Agency*) sostiene che tutti i composti del cromo siano nocivi, sebbene il maggior tasso di tossicità sia associato allo stato di ossidazione esavalente (<http://nsdi.epa.gov/waterscience/methods/pollutants.htm>). Gli effetti biologici del cromo, perciò, dipendono dalla forma chimica, dalla solubilità e dalla valenza del metallo.

Il Cr(III) è un elemento essenziale in traccia per il mantenimento di un buono stato di salute per gli esseri umani e animali in quanto è responsabile del controllo del metabolismo del glucosio, dei lipidi e delle proteine nei mammiferi (Anderson, 1989). È stato identificato come un attivo componente del CrGTF⁶, il quale è coinvolto nel modulare la velocità di rimozione del glucosio dal sangue (Nieboer e Jusys, 1988) agendo come cofattore per legare l'insulina ai siti recettoriali di membrana aumentando così l'effetto dell'ormone. La dose giornaliera necessaria di Cr(III) è 10-40 μg per bambini fino a sei mesi, e di 50-200 μg per le altre età, l'EPA ha comunque stabilito che la dose limite di assunzione di Cr nella dieta umana non dovrebbe superare 1mg Kg^{-1} al giorno (Katz e Salem 1994; Zayed *et al.*, 1998).

Sebbene a basse concentrazioni il Cr(III) sia necessario, in quantitativi superiori risulta tossico a causa della sua capacità di coordinare vari composti organici, inibendo così alcuni sistemi metallo-enzima (Cohen *et al.*, 1993). Shi *et al.* (1993) hanno evidenziato che anche il Cr(III) è capace di produrre radicali liberi che provocano danni alle membrane biologiche come la perossidazione dei lipidi e ciò potrebbe avere una implicazione significativa nei riguardi del meccanismo di induzione del cancro da parte del cromo. Inoltre Snow (1991) ha notato che il Cr(III) alterava l'interazione fra il DNA templato e la polimerasi.

Tuttavia la capacità del Cr(III) di indurre il cancro è un questione ancora controversa in quanto alcuni ricercatori ritengono che i composti di cromo trivalente, benché maggiormente reattivi con gli acidi nucleici purificati, non inducano effetti genotossici su cellule intatte mentre

⁶ GTF=fattore di tolleranza del glucosio

produrrebbero una varietà di effetti su bersagli subcellulari ed in sistemi acellulari (De Flora, 2000).

Le alterazioni cutanee causate dal contatto con composti di cromo comprendono dermatiti irritative da contatto, infiammazioni della cute e delle mucose, ulcere croniche, necrosi o corrosione dermica dovute all'azione ossidante e sensibilizzante soprattutto del cromo esavalente (Bock *et al.*, 2003)

Le maggiori modalità di assorbimento del Cr avvengono per ingestione e inalazione. In quest'ultimo caso è stato calcolato che fino al 97% delle particelle contenenti Cr(III) di dimensioni inferiori a 5 µm vengono trattenute nei polmoni, mentre i composti molto solubili del Cr(VI) possono essere assorbiti anche in corrispondenza delle prime vie aeree (Foà *et al.*, 1988). Infatti in alcune categorie di lavoratori a rischio (es. saldatori) il più importante sito di accumulo del Cr è stato individuato nei polmoni (Aitio e Jarvisalo, 1986). L'inalazione di materiale contenente cromo esavalente può causare perforazione del setto nasale, asma, bronchiti, broncospasma, pneumonite, infiammazione della laringe e delle labbra e può provocare un aumento dell'incidenza del carcinoma ai bronchi (Olaguibel e Basomba, 1989; Snow, 1991; Bagdon e Hazen, 1991; Kotaś e Stasicka, 2000).

Una volta entrato nella cellula sembra che il cromo esavalente venga in parte ridotto a cromo trivalente e in piccola percentuale rimanga allo stato esavalente. Tale riduzione è possibile grazie all'intervento di composti riducenti (es. ascorbato, glutazione, cistina, acqua ossigenata) e dall'attività enzimatica (es. citocromo P-450, aldeide ossidasi e NADP(H), chinoneossidoreduttasi o DT-diaforasi) (Aiyar *et al.*, 1992).

Il Cr(VI) è annoverato dall'EPA nella classe A dei composti carcinogenici, cioè esistono prove decisive sulla sua capacità di indurre il cancro. La maggior tossicità della forma esavalente dipende sia dal suo elevato potenziale ossidativo sia dalla maggior solubilità dei suoi composti rispetto a quelli con il Cr(III) (Snow, 1991; Bagdon e Hazen, 1991; Kotaś e Stasicka, 2000). L'esposizione a cromo esavalente è in grado di indurre una serie di alterazioni a carico del DNA, quali mutazioni puntiformi ed aberrazioni cromosomiche e modificazioni alle macromolecole a causa della produzione di specie reattive dell'ossigeno, nonché fenomeni di perossidazione lipidica con conseguente danno strutturale e funzionale alle membrane (Dayan e Paine, 2001). Inoltre nel corso della riduzione da Cr(VI) a Cr(III) si formerebbero dei legami molto stabili con il DNA e le proteine, quali l'actina, e gli aminoacidi cisteina, istidina, serina, treonina e tirosina. (Costa, 1993).

1.3 La fitodepurazione

Le tradizionali tecniche di “bonifica” dei suoli contaminati da metalli pesanti prevedono l’asportazione (e il suo conferimento in discariche speciali), il lavaggio o la solidificazione del suolo. I costi di tali tecniche sono notevoli, e poco convenienti su larga scala.

L’idea di utilizzare le piante per rimuovere gli inquinanti dal suolo e dalle acque si sviluppò negli anni ’50, ma solo successivamente Chaney (1983) la applicò anche alla rimozione dell’eccesso di metalli nel suolo; da allora si è imposta come una valida alternativa alle strategie comunemente utilizzate.

Il termine anglosassone *phytoremediation* deriva dall’associazione dal greco *phytos* (pianta) e dalla radice latina *remedium* (curare, risanare). La fitodepurazione utilizza piante erbacee e arboree, in sinergia con i microorganismi presenti nelle acque e nei terreni, al fine di rimuovere e/o detossificare sostanze inquinanti dall’ambiente.

Perché questa procedura risulti efficace è necessario che vengano rispettati alcuni requisiti:

1. l’inquinante deve essere biodisponibile e concentrato nel suolo ad una profondità compatibile con la presenza dell’apparato radicale;
2. devono sussistere le condizioni per l’instaurarsi di mutue relazioni tra l’apparato radicale delle piante e i microrganismi del suolo determinando così un aumento dell’efficienza del processo;
3. le caratteristiche chimico-fisiche del suolo devono essere adatte alla crescita vegetale.

La *phytoremediation*, a seconda dei meccanismi d’azione, può essere distinta come segue:

- Fitoestrazione: è il processo che avviene quando le radici delle piante assorbono gli inquinanti dal terreno e lo traslocano alla parte aerea (Kumar et al., 1995). A tale scopo sono spesso state utilizzate piante dette “iperaccumulatrici” che sono capaci di accumulare metalli pesanti a livelli superiori di 100 volte rispetto a quelli misurati nell’apparato aereo delle piante comuni non accumulatrici. Perciò un iperaccumulatore può raggiungere concentrazioni di oltre 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ per il Hg; 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ per il Cd; 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ per Co, Cr, Cu e Pb; 10000 $\mu\text{g g}^{-1}$ per Zn e Ni. Attualmente sono state individuate circa 440 specie appartenenti a 45 famiglie di piante iperaccumulatrici di metalli (Baker et al., 2000) (Figura 6/A);
- Rizofiltrazione: è un concetto simile alla fitoestrazione anche se si riferisce soprattutto alla bonifica delle acque sotterranee attraverso l’adsorbimento, l’assorbimento e precipitare gli inquinanti da parte di piante che posseggano un apparato radicale ben sviluppato e capace di esplorare volumi consistenti di substrato (Dushenkov et al., 1995) (Figura 6/B);
- Fitostabilizzazione: le piante stabilizzano gli inquinanti del suolo, rendendoli meno pericolosi attraverso la riduzione della mobilità e della biodisponibilità degli inquinanti

nell'ambiente sia per azione fisico-meccanica dell'apparato radicale sia per essudazione di sostanze chelanti (Vangronsveld *et al.*, 1995). In questo caso le piante hanno il compito di ricoprire la superficie del suolo per prevenire l'erosione e ridurre la percolazione. Il contaminante non viene rimosso, ma vengono ridotte le possibilità che esso migri verso altri comparti ambientali (Figura 6/C)

- Fitovolatilizzazione: prevede la volatilizzazione nell'atmosfera dell'inquinante che, grazie al flusso della traspirazione, viene traslocato dalle radici alle foglie (Burken e Schnoor, 1999) (Figura 6/D).

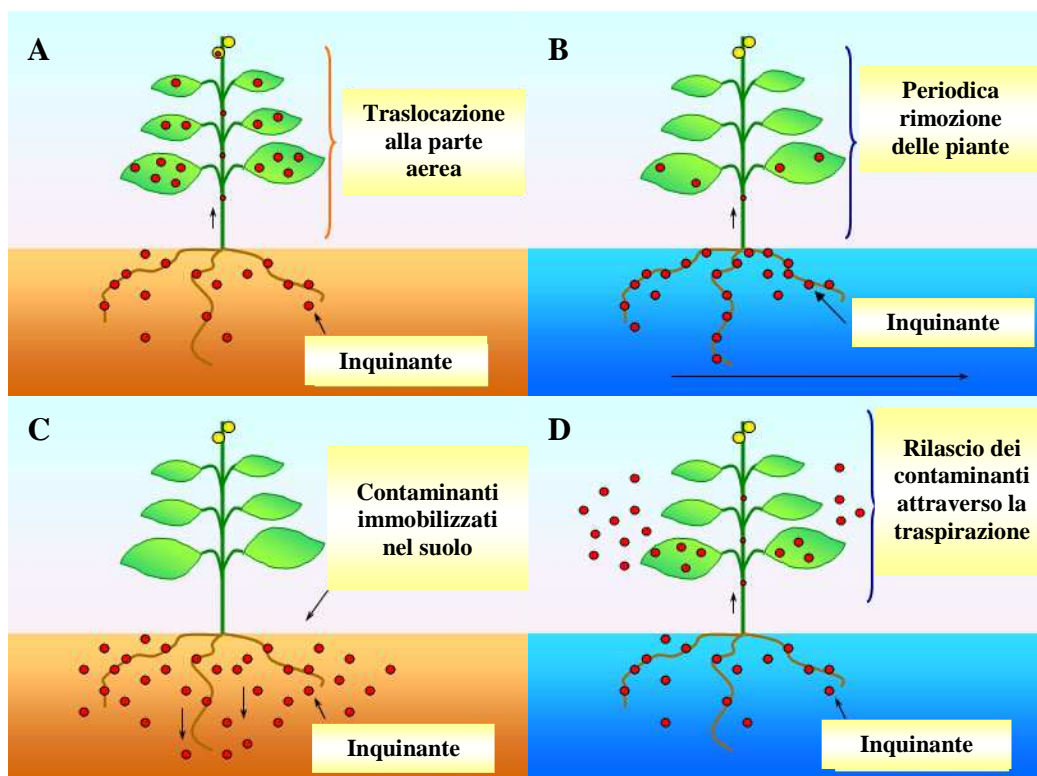


Figura 6 Processi inerenti la fitodepurazione: Fitoestrazione (A), Rizofiltrazione (B), Fitostabilizzazione (C) e fitovolatilizzazione (D) (modificato da: <http://rydberg.biology.colostate.edu/epsmlab/>).

In relazione alla crescente necessità di salvaguardare il territorio dalla pressione inquinante, anche in Italia si è iniziato ad utilizzare impianti di fitodepurazione. Questi si prestano bene al trattamento secondario, terziario o per il finissaggio dei reflui di origine civile, industriale, zootecnica o miste e presentano notevoli vantaggi quali (Knight, 1997):

- semplicità ed economia di costruzione e di gestione;
- limitata manutenzione effettuabile anche da parte di personale non specializzato;
- maggiore resistenza agli shock di carico organico ed idraulico (grazie ai lunghi tempi di ritenzione idraulica);
- possibilità di ottenere sottoprodotti vegetali da riutilizzare o comunque non dannosi per l'ambiente (a seconda del tipo di inquinante da bonificare);

- alta efficienza nella rimozione degli inquinanti (es. N e P) e dei batteri patogeni;
- bassi consumi energetici e limitati costi di gestione;
- ottima integrazione con l'ambiente naturale grazie alla sua piacevolezza estetica rispetto agli impianti tradizionali;
- aumento della biodiversità grazie al miglioramento delle condizioni ambientali;
- possibilità di fungere da zone di ricerca, di didattica ed educazione;
- incremento delle attività legate al così detto ecoturismo quali pesca, caccia, bird-watching e fotografia.

Esistono tuttavia anche alcuni svantaggi:

- la superficie necessaria per la realizzazione degli impianti di fitodepurazione varia a seconda degli obiettivi di qualità richiesti ed è generalmente superiore alla superficie necessaria per un impianto tradizionale;
- si può assistere ad un calo di rendimento nei mesi invernali (ciò dipende anche dalle specie vegetali prescelte e dall'andamento del clima);
- prestazioni non sempre stabili ed elevate su alcuni inquinanti;
- scarsa regolazione e gestione del processo naturale di depurazione;
- produzione di odori sgradevoli (per alcune tipologie di impianto) e proliferazione di insetti nei bacini a superficie libera;
- lunghi tempi di disinquinamento: infatti, la relativamente lenta crescita delle piante, unita al basso coefficiente d'accumulo dei metalli nella parte aerea, ha come conseguenza che i tempi d'esecuzione della bonifica siano molto maggiori di quelli delle convenzionali tecniche di bonifica. L'escavazione e la posa in discarica richiedono dei mesi, laddove la fitoestrazione richiede alcuni anni. Pertanto, nel caso di siti che costituiscano un serio pericolo per la salute umana, da esposizione diretta, è necessario ricorrere a tecniche di più rapida esecuzione.

Dal punto di vista economico la fitoestrazione è considerata un trattamento dai costi più contenuti rispetto ad altri, anche se i calcoli rinvenibili in letteratura fanno riferimento alla realtà statunitense (Berti e Cunningham, 2000).

In ogni caso la prima valutazione dei costi e della possibile realizzazione di un progetto di fitoestrazione deve essere fatta sul sito da bonificare. I parametri più significativi sono la superficie del sito, la profondità della contaminazione, la quota totale di metallo da estrarre, la capacità estrattiva della pianta prescelta. Questi fattori determineranno il numero totale di raccolti necessari al conseguimento di un determinato obiettivo.

Per rendere la fitoestrazione efficace per abbattere il livello di metallo tossico in un tempo massimo di 1-3 anni bisognerebbe usare piante in grado di accumulare più dell'1% di metallo

nella parte aerea, e produrre più di 20 t/ha di biomassa asportabile all'anno (Berti e Cunningham, 2000). Nel valutare la produzione di biomassa di una specie bisogna tener conto anche che alte concentrazioni di contaminante possono inibire la crescita delle piante stesse e quindi limitare l'applicabilità al sito o ad alcune zone o comunque agire prolungando il periodo di trattamento.

Si può affermare pertanto che la fitoestrazione è una tecnica applicabile, con risultati presumibilmente positivi, a siti caratterizzati da una contaminazione mediamente estesa, di concentrazione non elevata e comunque limitata alla porzione di terreno raggiungibile dalle radici.

Le specie erbacee maggiormente utilizzate sono *Brassica juncea* (L.), *Carex* spp., *Glyceria aquatica* (L.), *Iris* spp., *Juncus* spp., *Lemna* spp., *Nymphaea* spp., *Phragmites australis* (Cav.), *Scirpus* spp., *Spartina* spp., *Typha latifolia* (L.) (Kadlec and Knight, 1996; Knight, 1997; Vymazal, 2000).

Nell'ultimo decennio si è iniziato ad impiegare anche piante arboree no-food che, per l'elevato ritmo di crescita, produzione di biomassa, capacità di evapotraspirazione e formazione di un robusto e profondo apparato radicale, sarebbero più adatte all'impiego in programmi di fitodepurazione piuttosto che piante erbacee aventi biomassa ridotta. Tra le piante arboree più utilizzate si ricordano: *Acer* spp., *Ailanthus altissima* (Mill.), *Alnus* spp., *Betula* spp., *Liriodendron tulipifera* (L.), *Quercus* spp., *Pinus* spp., *Populus* spp., *Salix* spp., etc.

Queste specie rappresentano una soluzione economica sostenibile ed ecologicamente valida per il rimedio di terreni contaminati, soprattutto quando non è conveniente l'uso di altri trattamenti o non vi sono limiti di tempo per il riutilizzo dei terreni (Dickinson, 2000).

Tra le specie arboree precedentemente citate, quelle appartenenti al gen. *Salix* sembrano avere delle buone potenzialità fitodepurative.

1.3.1 La potenzialità fitodepurative dei salici (*Salix* spp.)

Il genere *Salix* deve il suo nome dal latino “*salio*” che significa salto, per sottolinearne il rapido accrescimento, o secondo altre tesi dal celtico “*sul*” (vicino) e “*lis*” (acqua). Entrambe queste etimologie sottolineano le caratteristiche peculiari che accomunano tutte le specie di questo genere, ovvero il relativo breve ciclo di vita e la continua ricerca d'acqua (Martini e Papero, 1988).

Secondo Gupta *et al.* (2000) l'azione depurativa effettuata dalle piante nei confronti di vari inquinanti è tanto più elevata quanto più si riescono ad associare in una stessa specie una notevole produzione di biomassa e un'alta concentrazione di metalli nei suoi tessuti. Le specie appartenenti al genere *Salix* hanno dimostrato, in diversi esperimenti, di possedere entrambe

queste peculiarità e ciò le rende fortemente adatte a essere impiegate in azioni di fitodepurazione. Infatti l'uso di salici come filtro vegetale, ovvero per la purificazione di acque reflue e fanghi, permette di stabilizzare il substrato inquinante, riciclare nutrienti e accumulare inquinanti nei loro tessuti (Perttu e Kowalik, 1997). Ad esempio Gregersen e Brix (2001) hanno realizzato in Danimarca una zona umida ricostruita a *Salix viminalis* L. allo scopo di trattare acque di scarico e riciclare i nutrienti provenienti da singole abitazioni in siti dove gli standard di qualità degli scarichi erano molto restrittivi e dove non era possibile l'infiltrazione del suolo. In tale sistema sperimentale non era previsto uno scarico dell'acqua in uscita dall'impianto, infatti tutti i nutrienti contenuti nel refluo venivano utilizzati per produrre biomassa vegetale e tutta l'acqua veniva traspirata nell'atmosfera attraverso i salici. Ciò è stato possibile grazie ad un preciso dimensionamento dell'impianto in base alla quantità e qualità del refluo da trattare, alla stima della capacità di evapotraspirazione delle piante e alla conoscenza delle condizioni climatiche locali.

Le caratteristiche fisiologiche principali, essenziali nel definire l'efficacia del genere *Salix* per progetti di risanamento ambientale sono:

- notevole velocità di crescita e alta capacità di convertire la radiazione solare in energia chimica per la pianta (Christersson *et al.*, 1993; Wilkinson, 1999);
- possedere un sistema radicale eccellente, fibroso ed esteso;
- elevata traspirazione che permette di richiamare un grande volume di acqua all'interno dell'apparato radicale, traslocare alla parte aerea i composti assorbiti dal terreno e volatilizzare alcuni di essi nell'atmosfera (Persson e Lindroth, 1994; Lindroth *et al.*, 1995; Ledin, 1998; Gregersen e Brix, 2001; Ebbs *et al.*, 2003);
- efficiente capacità di assimilare nutrienti (Ericsson, 1981; Elowson, 1999) e capacità di facilitare la filtrazione dell'azoto e la successiva denitrificazione ad opera dei batteri (Aronsson e Perttu, 2001);
- elevata tolleranza agli stress derivati da scarsa disponibilità di ossigeno nel suolo a causa di ristagno idrico (Krasny *et al.*, 1988; Jackson e Attwood, 1996; Aronsson e Perttu, 2001);
- possibilità di impiego in opere di ripristino ambientale grazie alla facile propagazione vegetativa per talea, infatti i fusti caduti o i rami che toccano terra possono radicare, inoltre gli individui ceduti emettono vigorosi polloni dalla ceppaia mentre il seme germina rapidamente in ambienti favorevoli;
- pronunciata capacità di diverse specie e cloni di accumulare metalli pesanti (Punshon e Dickinson, 1997; Klang-Westin e Eriksson, 2003) e buona tolleranza ad elevate concentrazioni di diossido di carbonio e idrocarburi (Maurice *et al.*, 1999);

- possono essere ceduti;
- raccolti molto frequentemente con una resa pari a 10-15 t ha⁻¹ anno⁻¹ di peso secco (Riddell-Black, 1993);
- applicazioni economicamente realizzabili se impiegate per impianti di piccole e medie dimensioni, in confronto a impianti che impiegano tecniche convenzionali di depurazione (Perttu e Kowalik, 1997).

Il materiale legnoso derivante da impianti di fitodepurazione può essere reimpiegato come combustibile in impianti di teleriscaldamento (anche se non presenta un potere calorifico molto elevato) e i metalli, eventualmente assorbiti dal suolo e liberati durante la combustione, possono essere filtrati dai fumi e propriamente smaltiti con le ceneri. In questo modo il volume di materiale contaminato da gestire è notevolmente ridotto: dai molti m³ del terreno contaminato iniziale a piccole quantità di cenere ottenute dalla combustione.

Watson *et al.* (1999) hanno sviluppato una tecnica (NFT – *Nutrient thin Film hydroponic Technique*) che può essere usata per una rapida valutazione della tolleranza di talee ai metalli, basata sulla produzione di biomassa in condizioni di esposizione agli elementi tossici. Un test su 15 cloni di *Salix* spp. ha mostrato che c'è accordo tra i risultati della tecnica NFT, la produzione di biomassa e l'assorbimento di metalli da parte degli stessi cloni cresciuti in campo (Pulford *et al.*, 2002; Watson, 2002). Tale tecnica può essere utile per perseguire gli obiettivi della fitodepurazione, infatti bisogna considerare non solo la capacità di accumulo, ma anche la produzione di biomassa (ovvero la quantità di metalli pesanti sequestrati dal suolo per ettaro).

Anche Pulford *et al.* (2002) hanno valutato la concentrazione di metalli pesanti di 20 varietà di salici, soprattutto nella corteccia e nel legno. Complessivamente, le concentrazioni negli individui di tre anni hanno suggerito che certi cloni avevano la capacità di assorbire significative quantità di inquinanti; il Cd, in particolare, si concentrava nei fusti ben dieci volte rispetto alle concentrazioni del suolo. Inoltre Punshon *et al.* (1995) hanno confrontato alcuni cloni di *Salix* spp. trovando che alcuni di essi compartimentalizzavano il cadmio nei tessuti legnosi molto più marcatamente di altri, rappresentando una caratteristica vantaggiosa per la rimozione a lungo termine dei contaminanti del suolo. Due anni più tardi Punshon e Dickinson (1997) hanno pubblicato un articolo che riportava l'utilizzo di *Salix bujatica* Nazarov., *S. x calodendron* Wimm., *S. caprea* L., *S. cinerea* L., *S. cordata* Muhlenb., *S. fragilis* L. e *S. viminalis* L. in colture contenenti Cu, Zn e Cd. Lo studio aveva lo scopo di investigare le potenzialità di accumulo delle varie specie e la possibilità di aumentare la resistenza delle piante stesse ai metalli attraverso un graduale aumento di metalli nei trattamenti. I dati hanno mostrato che l'acclimatazione alla tossicità dei metalli può essere raggiunta attraverso un graduale aumento

nella concentrazione di metalli piuttosto che attraverso un breve periodo di pre-trattamento. L'esperimento ha mostrato che le talee cresciute in soluzione idroponica non ammendata erano più abili nel continuare a crescere in presenza di elevate concentrazioni di metalli piuttosto che le piante pre-trattate. Inoltre si è notato che la concentrazione di Cu nella componente legnosa delle talee aumentava con la durata dell'esposizione al metallo.

Lanberg e Greger (1996) hanno stimato la tolleranza e l'accumulo di Cd, Cu e Zn nei fusti di diversi cloni di *Salix* spp. cresciuti in aree contaminate da metalli pesanti e in altre aree di controllo. Non è stata trovata alcuna differenza tra i due tipi di aree per quanto riguarda la tolleranza dei salici verso i metalli, né per quanto riguarda la concentrazione di metalli pesanti nei fusti raccolti. Comunque, la crescita dei cloni dell'area contaminata era generalmente stimolata a basse concentrazioni di metallo. La variazione intraspecifica nell'accumulo e nella tolleranza dei metalli pesanti risultava più ampia rispetto a quella interspecifica. I cloni dell'area contaminata presentavano un maggiore accumulo di metalli nell'apparato radicale e una minore traslocazione nei getti, probabilmente a causa di un meccanismo di protezione che prevede lo stoccaggio dei metalli all'interno delle radici.

S. fragilis L. e *S. viminalis* L. sono stati usati in un esperimento condotto da Vandecasteele *et al.* (2005) su suoli contaminati da Cd. I risultati acquisiti hanno confermato quelli ottenuti anche da Punhon e Dickinson (1997), Stoltz e Greger (2002) e Rosselli *et al.* (2003) in cui si mostra che tali salici sono maggiormente accumulatori di Zn e Cd nei germogli, mentre di Cu, Cr, Ni e Pb si accumulano maggiormente nelle radici. Le piante di *S. fragilis* risultarono avere elevate concentrazioni di Cd e Zn in legno, corteccia e foglie, mentre Cr, Cu, Ni e Pb erano meno accumulati nella parte aerea.

Perttu e Kowalik (1997) hanno mostrato come circa 20 g ha⁻¹ anno⁻¹ di Cd possono essere rimossi da 10-12 t di sostanza secca epigea. Questo studio è stato eseguito in Svezia dove i contenuti del metallo possono raggiungere i 600 g Cd ha⁻¹ lavorabile, provenienti per la maggior parte da terreni contaminati dall'utilizzo di fertilizzanti fosfatici contenenti il metallo e da deposizioni atmosferiche. Un altro caso di studio ha riportato l'utilizzo di piante di *S. viminalis* allevate per 1,5 anni su un suolo contaminato. I risultati hanno evidenziato un significativo decremento (57%) nella concentrazione di oli minerali nei sedimenti. Al contrario, nel terreno lasciato a riposo, tale decremento era solo del 15%. Nello stesso esperimento si è rilevato che *S. viminalis* L. non è metallo selettivo nei confronti di Cd, Cu, Pb e Zn (Vervaeke, 2003).

1.3.2 Assorbimento e traslocazione del Cr nelle piante

Studi condotti su diversi tipi di piante hanno dimostrato che il cromo non è un elemento essenziale per la loro crescita e il loro sviluppo (Huffman e Allaway, 1973; Bonet *et al.*, 1991; Terry, 1981). La traslocazione e l'accumulo del cromo nelle piante dipendono (Shanker *et al.*, 2005) dallo stato di ossidazione del metallo, dalla sua concentrazione nel mezzo di crescita e dalla specie vegetale considerata.

L'assorbimento del Cr nelle piante avviene secondo due differenti meccanismi: esperimenti condotti su piantine d'orzo mediante l'utilizzo di inibitori metabolici (dinitrofenolo, sodio azide), hanno mostrato una decisa diminuzione dell'assorbimento del Cr(VI) ma non del Cr(III). Da ciò si è dedotto che l'assorbimento del Cr(VI) richieda energia metabolica a differenza del Cr(III) che verrebbe, invece, assorbito passivamente (Skeffington *et al.*, 1976). Infatti la via di trasporto del Cr(VI) risulta essere un meccanismo attivo che coinvolge trasportatori a bassa affinità del solfato in quanto si è notato che la presenza di ioni SO_4^{2-} e altri anioni del gruppo VI inibivano l'assorbimento del Cr(VI) ma non del Cr(III) (Shewry e Peterson, 1974; Cervantes *et al.*, 2001) (Figura 7).

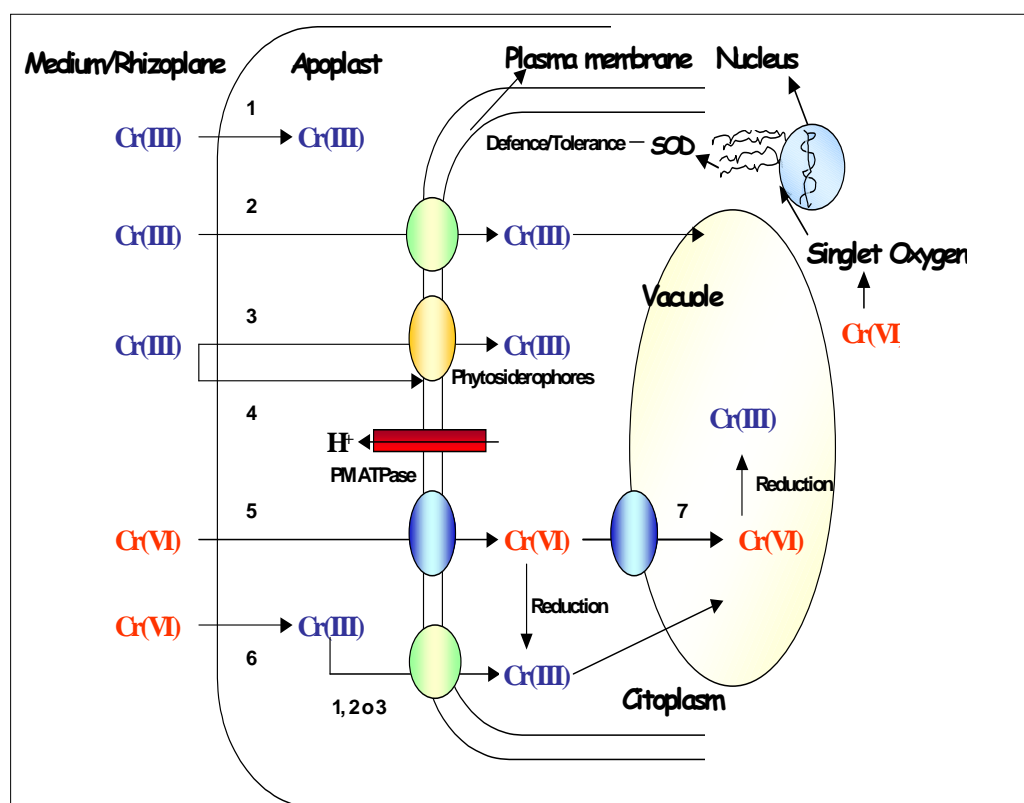


Figura 7 Possibili meccanismi di assorbimento del Cr : (1) ritenzione del Cr(III) nell'apoplasto; (2) diffusione del Cr(III) attraverso il plasmalemma e il tonoplasto; (3) legame del Cr(III) ai fitosiderofori e trasporto dei complessi attraverso la membrana plasmatica; (4) legame del complesso Cr(III)-fitosiderofori alla membrana plasmatica; (5) trasporto del Cr(VI) mediante trasportatori anionici e sua riduzione nel citosol; (6) riduzione apoplastica Cr(VI) → Cr(III) e conseguente trasporto attraverso il plasmalemma o il tonoplasto; (7) trasporto del Cr(VI) al tonoplasto e riduzione nel vacuolo. (Modificato da Shaker *et al.* 2005)

Per migliorare l'assorbimento e la traslocazione del Cr alcuni ricercatori hanno pensato di indurre la complessazione del Cr con composti organici i quali ne faciliterebbero la disponibilità alle piante (Srivastava *et al.*, 1999). È stato dimostrato, infatti, che piante di grano cresciute in colture idroponiche con CrCl_3 e ossalato, malato o glicina accumulavano nelle radici più Cr di quelle esposte solo al CrCl_3 (Srivastava *et al.*, 1999).

Un maggior grado di assorbimento e traslocazione del Cr, soprattutto nella forma trivalente, è stata notata in piante che presentavano una notevole capacità di assorbimento e traslocazione del Fe in quanto tali ioni presentano alcune caratteristiche simili (Schmidt, 1996; Pandey e Sharma, 2003). Questo ha fatto supporre che le piante impieghino gli stessi meccanismi per l'assorbimento del Fe(III) e del Cr(III).

È stato ormai dimostrato che le piante possiedono la grande capacità di convertire il più tossico Cr(VI) nel Cr(III) già a livello degli apici radicali contribuendo in tal modo a ridurre di 20÷100 volte la tossicità del metallo. Zayed *et al.* (1998) individuarono le differenti forme chimiche del cromo all'interno di piante di varie specie attraverso un'indagine a raggi-X. All'interno di piante sottoposte a trattamento con K_2CrO_4 i tessuti analizzati verificarono la mancanza delle forme Cr^{6+} , Cr^{5+} e Cr^{4+} già all'interno delle radici. Nel medesimo anno anche Lytle *et al.* arrivarono alla stessa conclusione sottoponendo piante di giacinto d'acqua a trattamenti con Cr^{6+} . I ricercatori ipotizzarono quindi che la conversione da Cr(VI) a Cr(III) avvenisse già nei tessuti radicali e non nella soluzione nutritiva prima dell'assorbimento. Infatti già McGrath nel 1982 avevano misurato la valenza del cromo rimasto in soluzioni originariamente contenenti Cr^{3+} o CrO_4^{2-} usate per la crescita di avena per 4 settimane. Egli aveva notato che entrambi gli ioni di cromo rimanevano inalterati nella soluzione nutritiva per tutta la durata dell'esperimento.

Una volta assorbito il cromo viene trasportato all'interno della pianta soprattutto attraverso lo xilema (Skeffington *et al.*, 1976). Se il cromato è presente in quantità molto alte sembra che una parte di esso rimanga presente sotto forma di Cr(VI) all'interno delle piante. In tale forma, si muoverebbe nello xilema più velocemente dello ione Cr^{3+} presumibilmente perché quest'ultimo viene trattenuto dalle interazioni elettrostatiche con le pareti dei vasi, come accade per il Ca^{2+} (Skeffington *et al.*, 1976). Una volta che il Cr è stato trasferito alla parte epigea si rintraccia un sito di accumulo preferenziale a livello dei margini fogliari suggerendo che il trasporto xilematico del Cr sia collegato alla traspirazione (Lytle *et al.*, 1998).

Una volta all'interno della pianta il Cr viene scarsamente traslocato alla parte aerea con valori di traslocazione generalmente compresi fra 1÷2% (Huffman e Allaway, 1973; Cary *et al.*, 1977;

Punshon e Dickinson, 1997; Zayed *et al.*, 1998; Stoltz e Greger, 2002; Rosselli *et al.*, 2003; Pandey e Sharma, 2003; Zayed e Terry, 2003, Vandecasteele *et al.*, 2005). La ridottissima traslocazione del Cr alla parte epigea sembra dovuto alla formazione di complessi stabili con molecole organiche come proteine e carboidrati (Mangabeira *et al.*, 2006) e alla loro compartimentazione all'interno dei vacuoli radicali (Turner e Rust, 1971; Tiffin, 1972). Se invece la quantità di cromo nelle radici risulta elevata è possibile osservare una traslocazione maggiore del metallo verso la parte aerea; questo si verifica per inabilità delle cellule radicali a ridurre tutto il Cr(VI) presente a Cr(III), e per il mancato trasferimento dello stesso nei vacuoli (Barcelò *et al.*, 1987; Vàsquez *et al.*, 1987). Il sito di accumulo del Cr nella parte epigea risulta a livello dei margini fogliari, suggerendo che il trasporto xilematico del Cr sia collegato alla traspirazione (Lytle *et al.*, 1998).

1.3.3 Effetti fitotossici del cromo sulle piante

Come già osservato nel paragrafo precedente, è stato dimostrato che il cromo non è un elemento essenziale per le piante, tuttavia alcuni esperimenti hanno ottenuto un aumento della produzione di biomassa e di pigmenti fotosintetici in piante trattate con concentrazioni di Cr molto basse, di circa 1 μM (Bonet *et al.*, 1991; Schmidt, 1996; Schützendübel *et al.*, 2002; Vandecasteele *et al.* 2005; Yu *et al.*, 2006). Bonet *et al.* (1991) notarono che bassi livelli di Cr(III) aumentavano significativamente la crescita sia delle piante cresciute in condizioni di Fe-controllo sia di quelle in Fe-carezza, inoltre in queste ultime si aveva una riduzione della clorosi fogliare. Questo effetto non fu correlato né alla sostituzione di Mn, P e Fe nei tessuti né alla possibile alterazione indotta dal cromo nel rapporto Fe/Mn e P/Fe. A tale effetto non si è data ancora una motivazione esauriente, tuttavia Poschenrieder *et al.* (1991) hanno suggerito che il positivo effetto del Cr(III) nella crescita delle piante possa essere collegato all'influenza sul livello di citochinine o altri ormoni della crescita, interazione con acidi nucleici, competitiva inibizione del cromo sui legami della spermina al DNA, o induzione all'aumento del livello del poliammide spermina.

Se il Cr si trova in concentrazioni superiori esplica invece una sequenza notevole di effetti tossici sulle piante. Innanzi tutto il Cr è un metallo molto reattivo che cambia facilmente il suo stato di ossidazione provocando la formazione di ROS o radicali liberi. I radicali liberi si formano in seguito alla riduzione del Cr(VI) in Cr(III) già a livello degli apici radicali (Zayed *et al.*, 1998; Lytle *et al.*, 1998), inoltre è stato dimostrato che il Cr(III) può essere a sua volta ridotto a Cr(II) da riducenti biologici come la L-cisteina e NADH così che la nuova forma Cr(II) reagisce con perossido di idrogeno e idroperossidi lipidici producendo il radicale idrossido

(Ozawa *et al.*, 1990; Shi *et al.*, 1993). Anche studi successivi hanno confermato che il Cr(III), pur essendo meno tossico del Cr(VI), può causare seri problemi nei tessuti vegetali sebbene in concentrazioni maggiori (Sharma *et al.*, 2003; Shanker *et al.*, 2004), al contrario per lungo tempo il Cr(III) era stato considerato non tossico.

I radicali liberi prodotti dalle ossido-riduzioni del Cr esplicano molteplici effetti tossici quali: perossidazione lipidica, danneggiamento dell'ultrastruttura dei cloroplasti, riduzione dell'attività fotosintetica e della biosintesi di clorofille, inibizione della respirazione mitocondriale, riduzione della crescita, alterazione del bilancio idrico (Bonet *et al.*, 1991; Poschenrieder *et al.*, 1991; Barcelo e Poschenrieder, 1997; Panda e Patra, 2000).

La riduzione della quantità prodotta di clorofille sembra dovuta alla capacità del Cr di degradare l'acido δ -aminolevulinico deidratasi, un importante enzima coinvolto nella biosintesi delle clorofille come pure di interferire con l'utilizzazione dell'acido δ -aminolevulinico (ALA) (Vajpayee *et al.*, 2000). Gli stessi autori hanno ipotizzato che il Cr, soprattutto nella forma esavalente, può sostituire gli ioni di Mg dai siti attivi dell'enzima. La riduzione delle clorofille interferisce negativamente sull'attività fotosintetica che risulta pure inibita dalla degradazione dell'ultrastruttura dei cloroplasti e dalla deviazione del trasporto di elettroni dai siti donatori di elettroni del PS I al Cr (Choudhury e Panda, 2004; Shaker *et al.*, 2005).

L'inibizione della respirazione mitocondriale è dovuta alla capacità del Cr di penetrare nel mitocondrio ed avere così accesso agli elementi funzionali della catena di trasporto degli elettroni inibendo tutti e quattro i maggiori complessi nei mitocondri radicali (Dixit *et al.*, 2002). L'inibizione della catena di trasporto degli elettroni sembra dovuta all'interazione del Cr con Cu e Fe e altri *carries* di elettroni (noneme-Fe-S-proteine e citocromo) che subiscono i cambiamenti *redox* durante il flusso di elettroni (Dixit *et al.*, 2002). I citocromi mitocondriali possono direttamente trasferire elettroni al Cr riducendolo, o in alternativa il ridotto gruppo eme del citocromo può servire come legante del Cr al blocco di trasferimento degli elettroni. Il notevole grado di inibizione dell'attività della citocromo ossidasi può essere dovuta al legame del Cr al citocromo a_3 , nel complesso IV (Dixit *et al.*, 2002) (Figura 8).

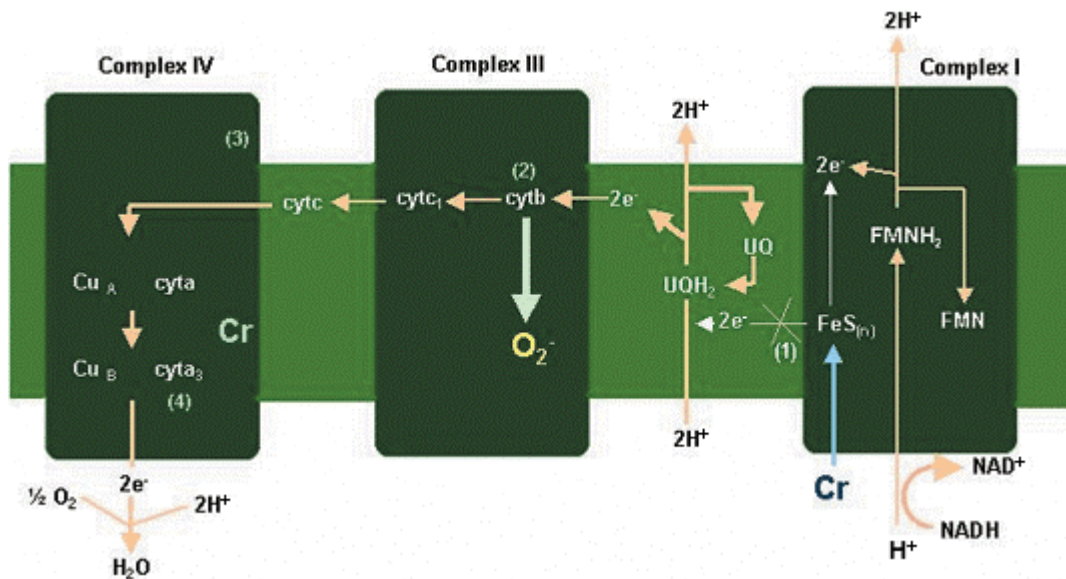


Figura 8 Coinvolgimento del cromo sull'inibizione nel sistema di trasporto degli elettroni nelle piante; 1, 2 e 3 rappresentano i siti di inibizione del Cr (da: Panda e Choudhury, 2005).

Il Cr(III) ha alta affinità per le proteine e può legarsi ad enzimi essenziali e inattivarli (Riedel, 1985). Ad esempio la ridotta germinazione dei semi sottoposti a stress da Cr sembra dovuta all'interazione del Cr con l'attività dell'enzima amilasi e del successivo trasporto dello zucchero nell'asse embrionale (Zeid, 2001). Inoltre si è notato un aumento dell'attività della proteasi e ciò contribuirebbe alla riduzione della germinazione nei semi trattati (Zeid, 2001). Il Cr sembra interferire anche con la nitrato riduttasi e di conseguenza con la biosintesi di proteine (Solomon e Barber, 1990; Vajpayee *et al.*, 1999; Vajpayee *et al.*, 2000). La nitrato riduttasi diminuisce l'attività in quanto il calo di contenuto di clorofilla, conseguente allo stress da Cr, determina un abbassamento del tasso fotosintetico e quindi una minore produzione di NADH. È noto, infatti, che l'induzione della nitrato reduttasi dipende dall'energia e dalla formazione di agenti riducenti generati fotosinteticamente (Sharma *et al.* 1995; Vajpayee *et al.*, 1999)

La diminuzione della crescita nelle piante sembra essere dovuta anche all'inibizione della divisione cellulare causata da aberrazioni cromosomiche (Liu *et al.*, 1993), da danneggiamenti alla struttura della pianta comprensivi della riduzione del numero di cellule parenchimatice e spongiformi nelle cellule delle foglie, aumento del numero di vacuoli (Han *et al.*, 2004), Nelle radici il Cr causa inibizione dell'allungamento e della divisione cellulare fino all'appassimento e alla plasmolisi delle cellule (Bassi *et al.*, 1990; McGrath, 2004). Inoltre il Cr interferisce negativamente con l'assorbimento di alcuni macro e micro nutrienti quali Fe, P, Mn, Cu, Mg, Ca, N, K, B e Zn (Sharma e Pant, 1994; Schmidt, 1996; Pandey e Sharma, 2003, Scoccianti *et al.* 2006) e riduce il potenziale idrico della pianta e il tasso di traspirazione (Chatterjee e Chatterjee, 2000).

1.3.4 Interazioni del cromo con ferro e zolfo

1.3.4.1 Il ferro

Il ferro è un micronutriente essenziale presente nei tessuti vegetali in quantità medie di 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ di peso secco. Il Fe viene incorporato in sistemi enzimatici principalmente di due tipi: emoproteine (es. citocromi, catalasi, perossidasi) e ferro-zolfo proteine (es. ferridossina, riboflavina, aconitasi); è presente inoltre, assieme ad altri ioni, in numerosi enzimi e partecipa alla sintesi delle clorofille. Sebbene il Fe sia abbondantemente presente nel suolo (circa il 5% della crosta terrestre), la sua biodisponibilità in terreni aerati è molto bassa, in quanto dipende dal pH e dal potenziale redox del terreno. La solubilità della specie ridotta Fe^{2+} è decisamente maggiore di quella del Fe^{3+} ed è massima a pH di circa 3,5, ma per valori tipici di pH tra 6,0 e 8,0 il Fe^{2+} viene facilmente ossidato e predomina la forma trivalente meno solubile.

La solubilizzazione e l'assorbimento del ferro da parte delle piante avviene secondo due strategie principali. Alcune (dicotiledoni e monocotiledoni non *Poaceae*) riducono il Fe-chelato a Fe^{2+} sulla superficie esterna della membrana plasmatica, tramite induzione di una Fe(III)-riduttasi ed estrusione di protoni per acidificare la rizosfera. Successivamente il Fe(II) entra nel citoplasma cellulare grazie a un trasportatore. Altre piante (tipicamente le *Poaceae*) essudano dei "fitosiderofori", composti organici a basso peso molecolare ed elevata specificità per il Fe^{3+} , che solubilizzano lo ione ferrico. Il complesso Fe(III)-fitosideroforo viene poi trasportato all'interno della cellula, dove il Fe trivalente viene rilasciato intatto (Buchanan *et al.*, 2003).

Diversi studiosi (Barcelo *et al.*, 1985a; Adriano, 1986) hanno dimostrato che il cromo interferisce con l'assorbimento di alcuni micronutrienti, tra cui anche il ferro. In particolare, la similarità tra Cr(III) e Fe(III) suggerisce che questa forma di cromo potrebbe entrare nelle cellule delle *Poaceae* grazie ai fitosiderofori. Nelle dicotiledoni il Cr sembrerebbe interferire con il Fe mediante inibizione della Fe(III)-riduttasi o competendo col Fe(II) per i siti di assorbimento (Shanker, 2004). Gli effetti del cromo sull'assorbimento di ferro sono però controversi: la maggior parte degli autori riporta una inibizione dell'assorbimento e della traslocazione del Fe in piante trattate con cromo inoltre ad alte concentrazioni il Cr potrebbe indurre sintomi di ferro-carenza grazie alla sua capacità di sostituire il Fe in siti fisiologici importanti (Barcelo *et al.*, 1985b; Adriano, 1986; Chatterjee e Chatterjee, 2000).; Cary *et al.* (1977a,b), al contrario, hanno riscontrato un aumento della disponibilità e dell'assorbimento di Fe in seguito alla somministrazione di Cr(VI), Cr(III) e fanghi di concerie. Risultati analoghi sono stati ottenuti anche da Bonet *et al.* (1991). In radici di piante allevate in carenza di ferro, l'aggiunta di Cr(III) a concentrazione 2 μM inibisce lievemente la Fe(III)-riduttasi, mentre a concentrazioni di 10 μM

il Cr(III) stimola la riduttasi sia in radici allevate in ferro-carezza sia in quelle allevate con Fe sufficiente (Barton *et al.*, 2000).

1.3.4.2 Lo zolfo

Lo zolfo è un macronutriente essenziale per le piante, in quanto rientra nella sintesi di numerosi composti quali aminoacidi essenziali (cisteina, metionina), vitamine (biotina e tiamina), coenzima A, S-adenosilmetionina e ferrodossina. Considerando la media di un ampio numero di specie vegetali, il fabbisogno di S si aggira attorno a 1 mg g^{-1} in peso secco, 10 volte più del ferro.

Una carenza di zolfo nelle piante può portare a clorosi generalizzata che colpisce sia le giovani foglie che le mature, arresto della sintesi proteica (a causa della mancata formazione degli aminoacidi solforati) e alterazione dell'utilizzazione degli aminoacidi che tendono ad accumularsi nella cellula (Alpi *et al.*, 1992).

Lo zolfo è presente nel suolo in forma legata organicamente, nella struttura di alcuni minerali, nei solfati di Ca, Mg e Na. La forma principale con cui lo zolfo entra nelle piante è quella ionica solubile del solfato (SO_4^{2-}), assorbito attraverso le radici mediante trasporto attivo. L'anidride solforica gassosa entra facilmente attraverso le foglie, dove è assimilata, ma questa sorgente di zolfo è significativa solo in quelle aree dove l'aria è contaminata.

Il solfato è attivamente cotrasportato con i protoni nelle cellule delle radici con una stechiometria $\text{SO}_4^{2-} : \text{H}^+ = 1:3$. L'attività di trasporto è energizzata da un gradiente di protoni transmembrana determinato da una H^+ -ATPasi della membrana (pompa protonica). Se il pH del mezzo esterno aumenta, o se l'attività della pompa protonica diminuisce, l'assorbimento del solfato è inibito.

Una volta all'interno della pianta, il solfato viene ridotto a solfuro e viene assimilato nei composti solforati, a partire dalla cisteina. Il maggiore prodotto della via di assimilazione del solfato è il glutatione, un tiolo non proteico. Il glutatione e i suoi derivati sono implicati, tra le altre cose, nell'eliminazione delle specie reattive dell'ossigeno, nella detossificazione degli xenobiotici (ad esempio gli erbicidi) e nella sintesi delle fitochelatine (Buchanan *et al.*, 2003).

Il cromo interferisce con l'assorbimento del solfato presumibilmente nella forma di CrO_4^{2-} . Il cromo esavalente, infatti, attraversa il plasmalemma utilizzando il trasportatore a bassa affinità per il solfato, come già dimostrato anche per alcuni microrganismi. Ciò risulta confermato dal fatto che il solfato e altri anioni del gruppo VI inibiscono l'ingresso di CrO_4^{2-} nelle cellule; questa inibizione sarebbe da attribuirsi alla similarità chimica tra tali ioni (Zayed e Terry, 2003).

2. SCOPO

Il crescente aumento dell'inquinamento diffuso di origine antropica pone la necessità di individuare tecniche di biorisanamento che possano essere impiegate su ampia scala e con costi contenuti. A tale necessità risponde efficacemente la fitodepurazione che si pone come metodo per il risanamento dei suoli inquinati attraverso l'impiego di specie vegetali.

Fra gli inquinanti particolare attenzione è stata riservata ai metalli pesanti e fra questi il Cr, elemento tossico ormai comune in diversi corsi d'acqua del nostro territorio, è considerato uno dei più pericolosi per la salute degli esseri viventi. Per la sua rimozione, diversi lavori hanno focalizzato l'attenzione sul bioaccumulo, con particolare enfasi sulla selezione di specie di piante iperaccumulatrici per questo metallo. Molte delle piante selezionate appartengono a specie erbacee che servono direttamente come fonte di cibo per l'uomo e numerosi animali superiori, e che producono solitamente poca biomassa. Perciò nell'ultimo decennio l'attenzione si è focalizzata su specie che, oltre ad una buona capacità di accumulo, presentino congiuntamente rapida crescita ed elevata produzione di biomassa.

Per rispettare tali esigenze si è deciso di utilizzare, in questo studio, delle specie appartenenti al genere *Salix* le quali presentano il vantaggio di avere grande diffusione negli ambienti ripariali delle nostre campagne e facilità di propagazione per talea, caratteristica fondamentale in previsione di un impiego su larga scala. In letteratura, inoltre, gli studi riguardanti piante del gen. *Salix* hanno evidenziato una tendenza all'accumulo di metalli pesanti.

L'obiettivo di questo studio è ricercare una o più specie di salici che, per capacità di accumulo e tolleranza allo stress da Cr, sia promettente per il fitorimediale di siti inquinati da cromo trivalente, con l'auspicio di poter impiegare su larga scala tali specie in casi reali di contaminazione.

La valutazione delle risposte delle specie si è articolata attraverso cinque esperimenti in cui si sono valutati parametri morfologici e fisiologici in risposta a differenti trattamenti con Cr(III) e variate modalità sperimentali.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Descrizione delle specie impiegate

3.1.1 *Salix alba* L. sub. *Typica*

Albero alto fino a 25-30 m (è il salice che in assoluto può raggiungere le maggiori dimensioni), spesso pollonifero (Figura 9/A); la corteccia adulta è grigio-olivastra e fessurata longitudinalmente, mentre il ramo dell'anno è sottile, flessibile e sericeo, di colore bianco argenteo (Figura 9/B). Le foglie sono lanceolato-lineari, lunghe 5-10 cm e larghe 5-25 mm, con margine denticolato; da giovani sono pubescenti e sericee su entrambi i lati (Figura 9/B), poi la pagina superiore diviene verde-grigiastra e scarsamente pelosa, mentre quella inferiore rimane pubescente e bianco-sericea. Il salice bianco è tipicamente ripariale e vive dal livello del mare fino a 800-1000 m s.l.m.; predilige suoli umidi, anche temporaneamente sommersi, e sciolti, purché ricchi di nutrienti. Il suo areale si estende dal Mediterraneo fino al Mar Baltico e dalla penisola iberica fino alla Cina occidentale; in Italia è presente in tutte le regioni esclusa la parte meridionale della Puglia. Si distinguono 4 sottospecie di *S. alba*, di cui la più diffusa in Italia è quella *typica* (Martini e Paiero, 1988).

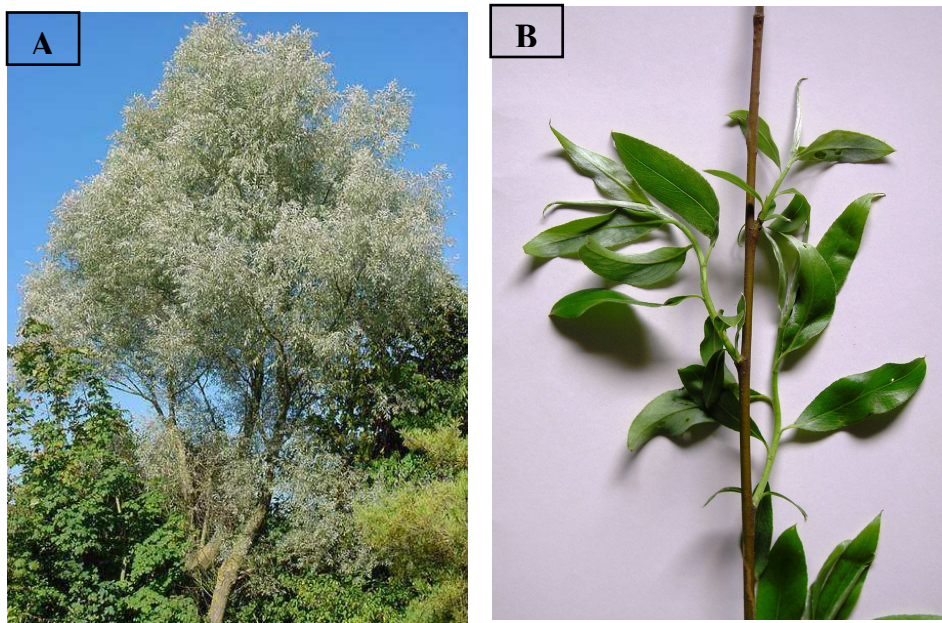


Figura 9 Portamento (A) e particolare delle foglie (B) di *S. alba* subsp. *typica*.

3.1.2 *Salix daphnoides* Vill.

Si presenta come un piccolo albero o arbusto di altezza compresa fra i 3 e i 15 m. I rami sono fragili all'inserzione con il tronco, nel primo anno sono di solito sparsamente tormentosi, crescendo diventano glabri, lucidi e di colore bruno rossastro o bruno scuro.

Le foglie sono di forma da ovali-oblunghe a lanceolate ad ellittico-lanceolate con lunghezza di 5-10 cm e larghezza di 1-5 cm, con margine finemente e regolarmente dentato. Le foglie sono glabre, tranne che per la parte prossimale del margine e lungo le nervature, di colore verde scuro e lucide sulla pagina superiore mentre sono glauche in quella inferiore (Figura 10).

Presenta amenti cilindrici, di lunghezza di 3-4 cm e la fioritura avviene generalmente tra febbraio e aprile, precedentemente alla fogliazione.

È un salice prevalentemente montano con altitudine fra i 1000 e i 1800 m s.l.m. Predilige suoli alluvionali umidi di fondovalle, ghiaiosi o sabbioso-limosi e soggetti a periodiche sommersioni.

L'areale di diffusione è esteso dalla Francia orientale alla Russia occidentale e a nord fino alla Scandinavia. Il limite dell'areale corre dai Pirenei alla Penisola Balcanica settentrionale e in Italia è diffuso lungo l'intero versante meridionale dell'arco alpino, dalle Alpi Marittime alle Alpi e Prealpi Carniche e Guglie. Popola inoltre l'Appennino settentrionale e centrale fino ai monti Sibillini (Martini e Paiero, 1988).



Figura 10 Portamento (A) e particolare delle foglie (B) di *S. daphnoides*

3.1.3 *Salix elaeagnos* Scop.

Grosso arbusto o alberello (1-6 m, talora fino a 15 m) a rami sottili, giallastri o bruno rossastri, da giovani coperti da una leggera peluria biancastra. Le foglie sono lineari, lunghe 6-12 cm e attenuate alle estremità (Figura 11); la pagina inferiore è densamente ricoperta da una peluria bianca e ragnatelosa, mentre quella superiore è verde scura e opaca. Il margine fogliare è più o meno revoluta, tanto che l'aspetto globale della foglia è simile a quello del rosmarino. Il salice ripaiolo è tipico di stazioni rivierasche lungo fiumi e torrenti da 100 a 1800 m s.l.m., con

preferenza per suoli alluvionali di varia natura, da sabbioso-argillosi a ghiaiosi, umidi per falda freatica superficiale e spesso soggetti a periodiche sommersioni. Pur prediligendo esposizioni soleggiate, questo salice vegeta bene anche a quote elevate purché la temperatura media annua non scenda sotto i 2°C. L'areale del *S. elaeagnos* copre i monti dell'Europa centro-meridionale dai Pirenei ai Balcani, scendendo anche lungo gli Appennini. In Italia si rinviene in tutte le regioni tranne che in Puglia, Sicilia e Sardegna (Martini e Paiero, 1988).

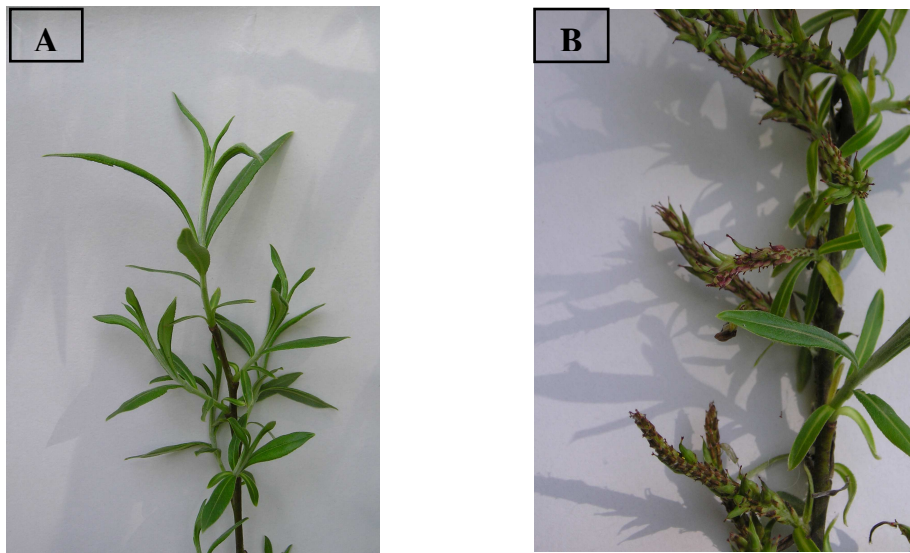


Figura 11 Particolare del germoglio (A) e delle infiorescenze (B) di *S. elaeagnos*

3.1.4 *Salix fragilis* L.

Albero pollonifero di dimensioni più o meno cospicue, talvolta arbusto di altezza compresa fra 3-15 fino a 20 m (Figura 12/A), con corteccia fessurata. I rami giovani sono grigiastri e glabri, molto fragili nel punto d'inserzione. Le foglie sono lanceolate, lunghe 8-15 cm, dal margine dentellato (Figura 12/B); da giovani sono vischiose e vellutato-sericee, poi glabre e lucenti sulla pagina superiore mentre opache e glauche su quella inferiore. Le esigenze stazionali del *S. fragilis* sono analoghe a quelle del *S. alba*: normalmente si trova in stazioni ripariali con elevata e persistente umidità, ma su suoli poveri in contenuto di basi. Nel bacino mediterraneo (dalla Penisola iberica fino all'Asia minore) l'areale del salice fragile è discontinuo, mentre è più omogeneo nell'Europa centrale, settentrionale e orientale (esclusi i rilievi più elevati, le terre artiche oltre il 60° parallelo e le regioni continentali più interne); alcuni autori ritengono tuttavia che l'area di indigenato di questa specie sia più ristretta, dal momento che la coltivazione ne ha alterato sensibilmente la distribuzione naturale. In Italia si ritiene autoctono solamente in

provincia di Bolzano, mentre le segnalazioni in altre regioni riguarderebbero l'ibrido coltivato *S. rubens* (Gellini e Grossoni, 1997; Martini e Paiero, 1988).

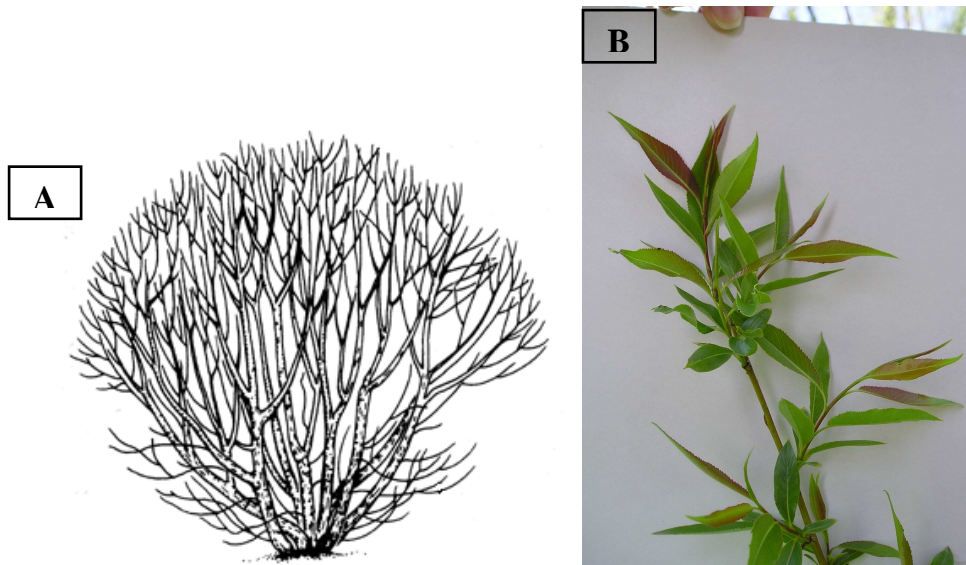


Figura 12 Portamento (A) e particolare del germoglio (B) di *S. fragilis*.

3.1.5 *Salix purpurea* L.

Arbusto di circa 5-6 m di altezza con rami sottili, nel primo anno di colore rossastro, lucidi, glabri o debolmente pelosi, negli anni successivi diventano di colore giallo-grigiastri o grigio-brunastri, glabri e opachi (Figura 13). La corteccia si presenta inizialmente liscia e successivamente si fessura irregolarmente, internamente di colore giallo limone.

Le foglie sono di forma da obovato-oblunghe a lineari-spatolate di lunghezza compresa fra 4 e 12 cm, 4-10 volte più lunghe che larghe. La pagina superiore è di colore bluastrò e lucida, inferiormente è glauca. Il margine fogliare è finemente e irregolarmente seghettato.

Gli amenti sono cilindrici, sub-eretti e lunghi fino a 5 cm i maschili e 4 cm i femminili.

Predilige le sponde e i greti dei corsi d'acqua dalla pianura fino al piano montano (1800 m s.l.m.) su suoli poco evoluti e a volte condizionati da una certa aridità atmosferica.

L'areale si diffonde dalla Danimarca e le coste tedesche del Baltico, localmente nelle Isole Britanniche, a est fino al fiume Ob a all'Asia minore, Iraq e Iran settentrionale. In Italia è una specie diffusa in tutte le regioni (Martini e Paiero, 1988).

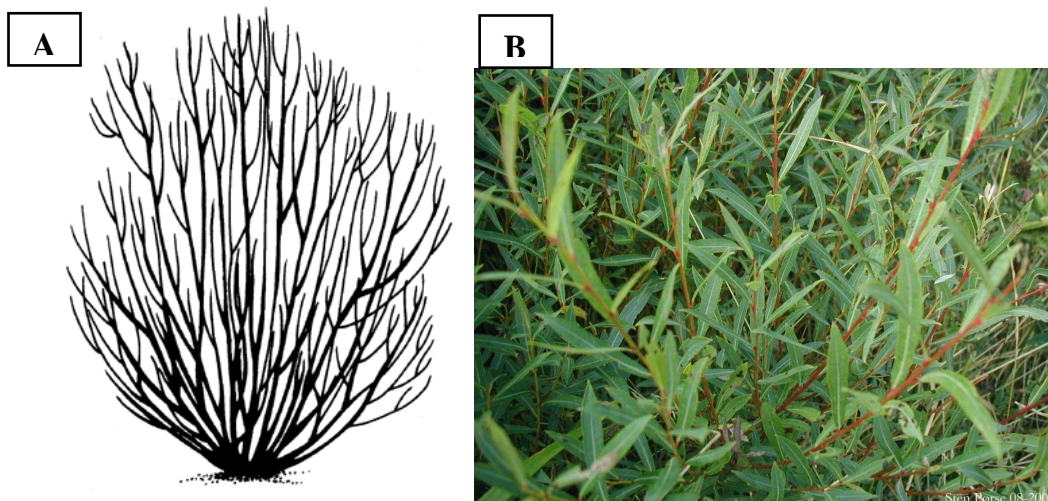


Figura 13 Portamento (A) e particolare del germoglio (B) di *S. purpurea*

3.1.6 *Salix nigra* Marsh.

Il salice nero è un albero poco longevo che raggiunge generalmente i 20 m di altezza ma può arrivare fino ai 42 m, a volte tuttavia lo si trova anche in forma cespugliosa (Burns e Honkala, 1990). Ha rapida crescita e raggiunge la maturità a circa 30 anni. La corteccia, di colore marrone scuro, appare spesso profondamente solcata con formazione di creste squamose. La chioma è ampia e aperta con robuste branche. I germogli sono sottili, di colore variabile dal verde al marrone, giallo o violaceo, sono sottili e facilmente staccabili. Ha foglie lanceolate con dimensioni variabili dai 5 ai 12 cm di lunghezza, di colore verde brillante sul margine superiore e verde chiaro in quello inferiore. Le radici sono profonde e permettono un'ampia esplorazione laterale del suolo (Figura 14).

Il salice nero può riprodursi sia per via agamica, tramite talee, sia per via gamica. Esso incomincia a riprodursi a circa 10 anni e genera una notevole quantità di semi (circa 5 milioni Kg^{-1}) che maturano dopo 45-60 giorni dall'impollinazione che può essere anemofila o entomofila. I semi non sono dormienti e la capacità germinativa è generalmente elevata anche se può essere ridotta a pochi giorni se le condizioni stagionali sono troppo secche (Burns e Honkala, 1990).

È pianta pioniera ed eliofila che predilige suoli umidi, infatti è molto comune lungo i margini dei fiumi dove occupa le zone più infossate e meno ricche in sabbia. È comune anche in zone paludose e lungo fossati di drenaggio (Burns e Honkala, 1990). Sopporta bene lunghi periodi di sommersione ma non tollera la siccità. Cresce in molteplici suoli, ma si sviluppa meglio in quelli limosi o ricchi in argilla anche con acqua stagnante (Dionigi *et al.*, 1985).

Il *S. nigra* si trova in tutta la parte orientale degli Stati Uniti, le zone adiacenti del Canada e Messico. Il suo areale si estende da ovest a sud del New Brunswick e del Maine centrale fino al Quebec, Ontario meridionale, parte centrale del Michigan, sud-est del Minnesota, north-est Dakota, fino alla Florida meridionale e alla Georgia (Burns e Honkala, 1990).

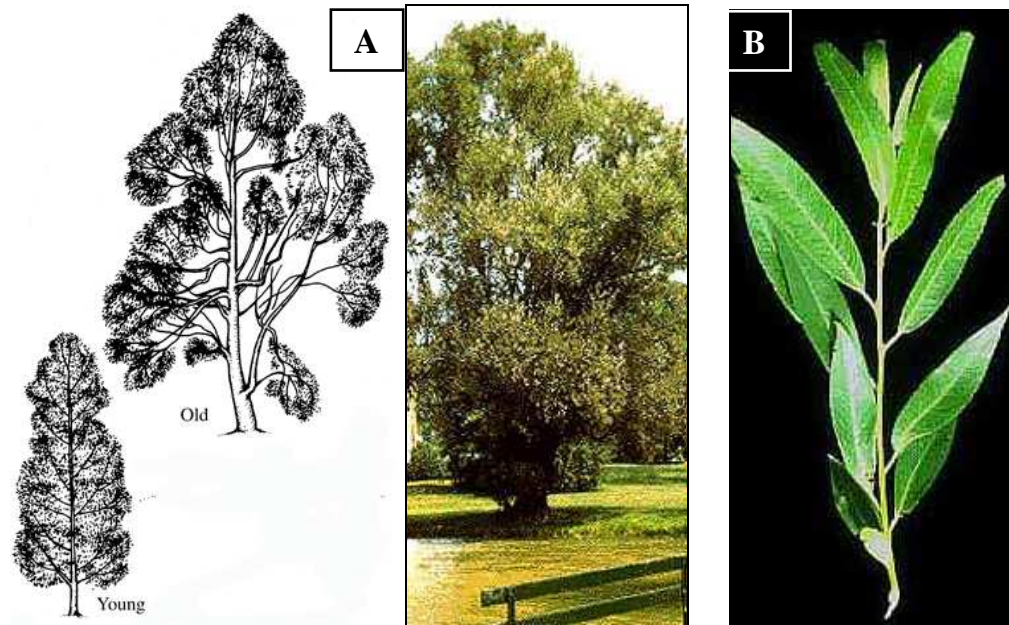


Figura 14 Portamento (A) e particolare del germoglio (B) di *S. nigra*.

3.1.7 *Salix matsudana* Koidz. var. *tortuosa*

Albero di medie dimensioni (8-15 m), con chioma regolare e corteccia ruvida e fessurata. I rami sono tipicamente tortuosi; da giovani sono verde brillante e sottili, da adulti grigi (Figura 15). Le foglie sono strette e lanceolate, lunghe 5-10 cm e dal margine liscio; sono grigiastre o biancastre sulla pagina inferiore, verde brillante su quella superiore. Le foglie richiamano la tortuosità dei rami, accennando una forma arricciata (Figura 15/B). Il *S. matsudana* 'Tortuosa' è una specie originaria della Cina, ma ormai si trova comunemente coltivata anche in Europa e USA come pianta ornamentale; non risulta "invasiva", in quanto esplica una limitata concorrenza nei confronti delle specie autoctone. Preferisce esposizioni assolate e, come altre specie di *Salix*, si adatta a suoli sabbiosi e argillosi, anche occasionalmente sommersi; sopporta moderatamente la siccità. Possiede una discreta tolleranza verso la salinità del suolo e degli aerosol (University of Connecticut Plant Database, 2005; Gellini e Grossoni, 1997; Martini e Paiero, 1988).



Figura 15 Portamento (A) e particolare del germoglio (B) di *S. matsudana*.

3.2 Allevamento delle piante

3.2.1 Allevamento di 7 specie di salice cresciute in agriperlite

Talee di sette specie di salice sono state prelevate da individui di provenienza dell'azienda agricola sperimentale Toniolo di Legnaro (PD) afferente alla Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Padova. In tabella 4 si riportano le provenienze delle specie utilizzate:

Tabella 4 Quadro riassuntivo delle specie di salici utilizzate nel primo esperimento (Martini e Papero, 1988; Gellini e Grossoni, 1997.)

Nome	Areale	Habitat
<i>S. alba</i> sub. <i>typica</i>	Paleotemperato	Luoghi umidi da fondovalle ai 1000 m s.l.m.
<i>S. daphnoides</i>	Eurasiatico temperato	Prevalentemente montano dai 1000 ai 1800 m s.l.m.
<i>S. elaeagnos</i>	Orofico sud Europeo	Stazioni rivierasche lungo fiumi e torrenti da 100 a 1800 m s.l.m.
<i>S. fragilis</i>	Eurosiberiana	Stazioni ad elevata e persistente umidità da fondovalle ai 1000 m s.l.m.
<i>S. purpurea</i>	Eurasiatico temperato	Greti dei corsi d'acqua da fondovalle ai 1800 m s.l.m.
<i>S. nigra</i>	Nord America	Luoghi molto umidi
<i>S. matsudana</i> var. <i>tortuosa</i>	Cina/Siberia	Luoghi umidi

Le talee per ciascuna specie sono state prelevate da un unico individuo al fine di minimizzare le differenze entro i campioni. Le dimensioni delle talee erano di circa 15 cm, avendo cura di tagliare segmenti con almeno 3-4 gemme ciascuno; per ogni specie sono state raccolte 21 talee.

Le talee sono state messe a radicare, in gruppi di tre, in vasi di plastica contenenti una miscela di torba e sabbia in parti uguali, e tenute in serra per 8 giorni. Successivamente i vasi sono stati trasportati in cella climatizzata (di cui si riportano i parametri in Tabella 5) per facilitare la germinazione e la crescita delle piantine fino ad una dimensione tale da permettere il trapianto. Fino al momento del trapianto le talee sono state irrigate con acqua.

Tabella 5 Parametri termoigrometrici e fotoperiodo della cella climatizzata.

	Giorno	Notte
Durata	12,5	11,5
Irradianza	280 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	-
Temperatura	23,5°C	19°C
Umidità relativa	60%	60%

A 37 giorni dal prelievo le piantine sono state trasferite in contenitori mono-pianta in PET trasparente, contenenti ciascuno una miscela di 300g di sabbia quarzifera e 80g di perlite. I contenitori sono stati avvolti in carta d'alluminio per proteggere l'apparato radicale dalla luce, e sistemati a gruppi di sette in sottovasi rettangolari; a loro volta i 12 sottovasi sono stati ricoperti di un film plastico scuro per evitare la proliferazione di alghe. All'interno della cella climatizzata i sottovasi, contenenti ciascuno almeno una pianta per ciascuna specie, sono stati posizionati secondo uno schema randomizzato (Figura 16).

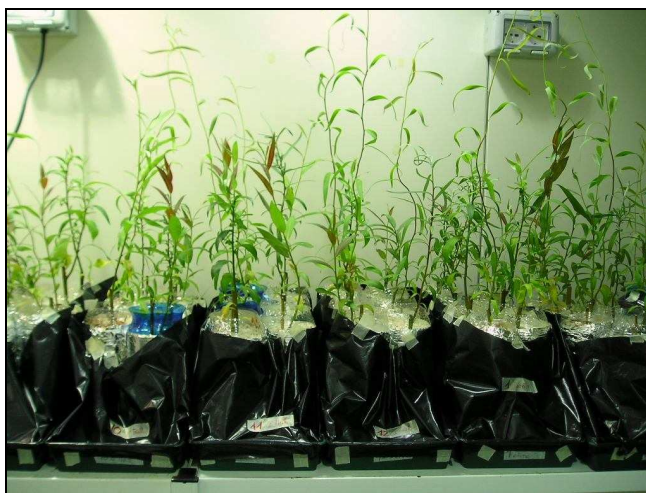


Figura 16 Posizionamento delle piante all'interno della cella climatica per il secondo esperimento.

La perlite utilizzata nell'esperimento è un materiale che deriva da rocce riolitiche vulcaniche che si espandono anche di 20 volte rispetto alle dimensioni originali quando sono rapidamente riscaldate oltre gli 870 °C. Contiene circa il 70% di silicio e risulta essere un materiale chimicamente inerte. È un eccellente isolante, sia termico che acustico, resistente al fuoco e

classificato come materiale ultraleggero (Chesterman C.W. 1975). La tabella 6 riporta la composizione chimica della perlite.

Tabella 6 Analisi chimica della perlite (da Chakir *et. al.*, 2002)

Costituente	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	P ₂ O ₅	TiO ₂	CaO	MgO	MnO	K ₂ O	Na ₂ O
Perlite (%)	75,22	13,08	1,83	0,02	0,13	1,43	0,10	0,06	4,95	3,00

Alle piantine è stata somministrata una soluzione nutritiva completa (Tabella 7) ogni 2-3 giorni, in eguale quantità, in ragione di 90-120 ml di soluzione per ciascuna pianta.

Tabella 7 Nutrienti contenuti nella soluzione nutritiva completa.

Nutrienti	Concentrazione (µM)
KH ₂ PO ₄	60,87
KNO ₃	304,35
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	304,35
MgSO ₄ ·7H ₂ O	304,35
FeNaEDTA·3H ₂ O	15,22
H ₃ BO ₃	7
MnCl·4H ₂ O	1,37
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,058
ZnCl ₂	0,131
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,0167

Trascorsi 32 giorni dal trapianto le piante di ciascuna specie sono state suddivise in tre gruppi misti di 7 individui ciascuno, a due dei quali è stato aggiunto Cr(III) alla soluzione nutritiva, sotto forma di CrCl₃ x 6H₂O in due diverse concentrazioni (Tabella 8). Il terzo gruppo è stato tenuto come controllo, senza l'aggiunta di Cr; tuttavia, al fine di bilanciare la cariche ioniche rispetto ai due gruppi trattati con cromo, la soluzione nutritiva completa è stata addizionata di 100µM CaCl₂.

Fino al momento del prelievo delle piantine, a distanza di 28 giorni dall'inizio dei trattamenti, la frequenza di somministrazione della soluzione nutritiva è rimasta invariata.

Tabella 8 Trattamenti utilizzati nell'esperimento 1.

Tesi		pH
controllo	soluzione nutritiva + 100 µM CaCl ₂	5,3
1	soluzione nutritiva + 50 µM CrCl ₃	4,8
2	soluzione nutritiva + 100 µM CrCl ₃	4,3

3.2.2 Allevamento di 4 specie di salice cresciute in agriperlite

Le condizioni sperimentali della seconda prova ricalcano quelle attuate per il primo esperimento, sia per le modalità di allevamento che per la durata di ciascuna fase di crescita delle piante. Le uniche differenze sono le seguenti: sono state scelte quattro delle sette specie precedentemente utilizzate e la scelta è ricaduta su *S. alba* subsp. *typica*, *S. elaeagnos*, *S. fragilis* e *S. matsudana* var. *tortuosa*. Inoltre per i trattamenti si è scelto di aumentare la quantità di $\text{CrCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ fino alle concentrazioni di 100 e 300 μM così come riportato in tabella 9.

Tabella 9 Trattamenti utilizzati nell'esperimento 2

Tesi		pH
controllo	soluzione nutritiva + 100 μM CaCl_2	5,3
1	soluzione nutritiva + 100 μM CrCl_3	4,3
2	soluzione nutritiva + 300 μM CrCl_3	3,9

3.2.3 Allevamento di 4 specie di salice cresciute in terreno

Talee di circa 15 cm delle quattro specie di specie di *Salix* utilizzate nel secondo esperimento sono state prelevate in data 27/06/2005 dagli stessi individui impiegati negli esperimenti precedenti

Il giorno successivo le talee, in numero di 200, sono state messe a radicare in vasi contenenti un terreno proveniente dall'azienda agricola sperimentale Toniolo di Legnaro (PD) e collocati secondo uno schema randomizzato (Figura 17).



Figura 17 Sistema randomizzato di controllo (A) e di trattamento (B).

Sono stati utilizzati vasetti di PELD (*Polyethylene Low Density*) di colore nero, a base rotonda e quadrata di diversi volumi in funzione della durata del trattamento. Le dimensioni sono state scelte considerando la probabile crescita dell'apparato radicale per il periodo considerato (Tabella 10).

Tabella 10 Numero progressivo e data di ciascun prelievo, età delle piante e volume dei vasi utilizzati.

Prelievo N°	Età delle piante	Volumi dei vasi
1° Pr. Ottobre 2005	3 mesi e mezzo	1,5 L
2° Pr. Giugno 2006	11 mesi e mezzo	3,5 L
3° Pr. Ottobre 2006	15 mesi e mezzo	4,5 L

Nel primo periodo di radicazione, al fine di evitare fenomeni di disidratazione delle porzioni vegetative, ancora mancanti di apparato radicale, sono state effettuate somministrazioni d'acqua quotidiane manuali. Inoltre, per ridurre l'evapotraspirazione è stata posizionata sull'intelaiatura metallica della serra una rete ombreggiante che diminuiva la temperatura di 1-2° C. Poco tempo dopo il periodo di radicazione è stato realizzato un impianto di microirrigazione (o irrigazione a goccia) automatico.

L'impianto di irrigazione è stato realizzato utilizzando una tubazione principale in PELD da 32 mm di diametro collegata a 2 elettrovalvole RAIN-BIRD a bassa portata $\frac{3}{4}$ M/M in PEHD, ciascuna provvista di diramazione secondaria munita di gocciolatori on-line a bottone con q max 4 l h^{-1} , in numero di una per pianta.

L'irrigazione è stata utilizzata durante la stagione estiva con una frequenza giornaliera ed un orario di 2-4 minuti, tale da permettere il raggiungimento di volumi d'adacquata compresi tra 130 e 260 ml di acqua al giorno.

La somministrazione di acqua è stata interrotta, oltre che durante i periodi piovosi, anche nei cinque giorni precedenti il trattamento (in data 31/08/2005), questo per rendere maggiormente assimilabile la soluzione da parte del terreno ed evitare perdite per percolazione al momento della distribuzione.

Le piante di ciascuna specie sono state suddivise in due gruppi di eguale numero, uno destinato al trattamento, l'altro tenuto per il controllo.

Una soluzione di cloruro di cromo esaidrato ($\text{CrCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) in concentrazione di $600 \mu\text{M}$ è stata distribuita uniformemente in proporzione alla dimensione del vaso, in modo da avere una concentrazione di circa $200 \mu\text{mol Kg}^{-1}$ terreno.

La soluzione è stata distribuita in 2 interventi eseguiti il 5 e 6 settembre 2005 utilizzando un cilindro graduato.

3.2.4 Allevamento di 2 specie di salice cresciute in soluzione idroponica e trattate per 15 giorni

Da piante di *S. fragilis* e *S. matsudana* var. *tortuosa* sono state prelevate talee della lunghezza di circa 15 cm che sono state subito poste a radicare in vasche contenenti acqua e posizionate al buio. Dopo una settimana le talee presentavano già piccole radici perciò si è iniziato a somministrare loro una soluzione nutritiva così come riportato in tabella 3.4. La soluzione è stata continuamente arieggiata utilizzando inalatori d'aria. Le piante sono state quindi poste in cella climatica con parametri settati secondo le indicazioni riportate in tabella 3.2. La soluzione nutritiva è stata cambiata due volte a settimana (Figura 18/A).

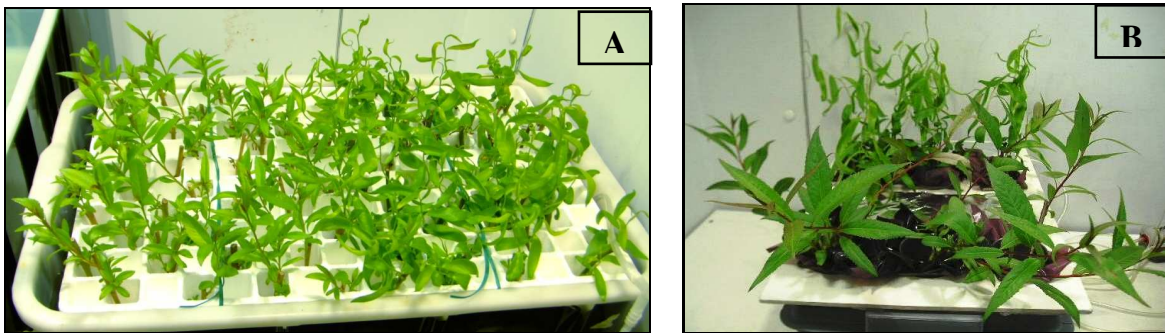


Figura 18 Allevamento di talee in cella climatica per il quarto esperimento. Allevamento in un'unica vasca fino a 37 giorni (A) e allevamento in tre vasche distinte per ciascuna tesi per i successivi 15 giorni di trattamento (B).

All'età di 37 giorni sono stati avviati i trattamenti con $\text{CrCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ in concentrazioni 100 e 300 μM (Tabella 9) e le piante suddivise in tre vasche, una di controllo, una di trattamento 100 μM e una di trattamento 300 μM (Figura 18/B). I trattamenti si sono protratti per 15 giorni.

L'esperimento è stato ripetuto in tre repliche distinte utilizzando 4 piante per ogni replica, per ogni specie e per ogni tesi.

3.2.5 Allevamento di 2 specie di salice cresciute in soluzione idroponica e trattate per 4 e 24 ore

Anche per quest'ultimo esperimento si è scelto di utilizzare talee (di circa 15 cm di lunghezza) provenienti da piante di *S. fragilis* e *S. matsudana* var. *tortuosa* della stessa provenienza delle talee utilizzate negli esperimenti precedenti. Le talee sono state poste a radicare al buio in vasche contenenti acqua per una settimana e successivamente trasferite in cella climatica (Tabella 5) e nutrite con soluzione nutritiva (Tabella 7). La soluzione nutritiva è stata cambiata due volte a settimana (Figura 19/A).

A 37 giorni dal prelievo delle talee si sono cominciati i trattamenti sempre con concentrazioni di $\text{CrCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ pari a 100 e 300 μM (Tabella 9) e le piante sono state trasferite in contenitori

cilindrici del volume di 3 l (Figura 19/B). Sono stati effettuati 2 prelievi a distanza di 4 e 24 ore dall'inizio del trattamento.

L'esperimento è stato ripetuto in tre repliche distinte utilizzando 4 piante per ogni replica, per ogni specie e per ogni tesi.

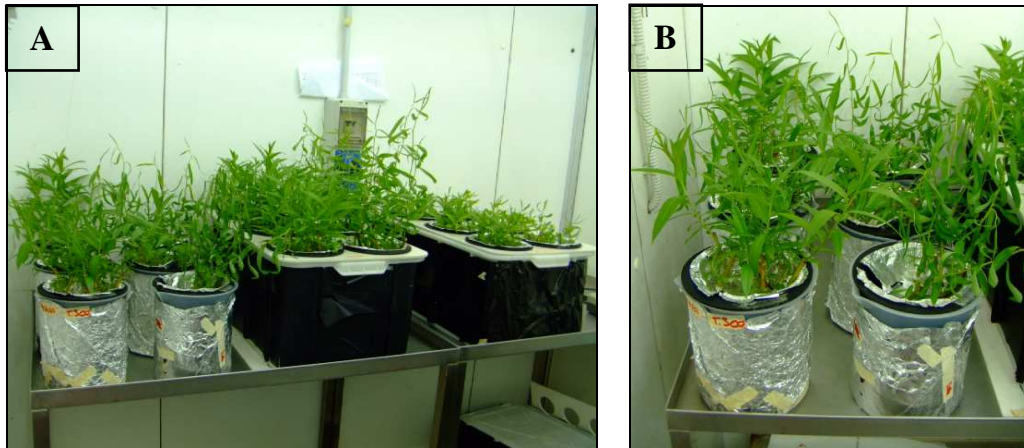


Figura 19 Allevamento di talee in cella climatica per il quinto esperimento. Foto di insieme (A) e piante sottoposte a trattamento per 4 e 24 ore (B)

3.3 Campionamento e analisi del terreno

Il terreno utilizzato nella prova era proveniente dalla zona di campagna del comune di Legnaro (PD).

3.3.1 Determinazione del carbonio organico e della sostanza organica

La quantità di carbonio organico è stata valutata per via ossidimetrica usando come reattivo ossidante il bicromato potassico 1 N (MIPAF, 2000). Per eseguire la titolazione, in beute da 250 ml sono state poste quantità di terreno variabili in rapporto al contenuto di sostanza organica, 10 ml di $K_2Cr_2O_7$ 1 N e 20 ml di H_2SO_4 concentrato (96-98%). Il contenuto delle beute è stato portato ad ebollizione su becco Bunsen.

Previo raffreddamento, nelle beute sono stati aggiunti 200 ml di H_2O , 5 ml di H_3PO_4 concentrato (85% v/v) e, come indicatore, 1 ml di fenilalanina. Al fine di valutare la quantità di $K_2Cr_2O_7$ 1 N utilizzato nella reazione, il $K_2Cr_2O_7$ non ridotto è stato determinato utilizzando una soluzione di $FeSO_4$ 1N. Per stabilire il contenuto di C organico nel campione sottoposto ad analisi, la differenza tra i 10 ml di $K_2Cr_2O_7$ 1 N e gli ml di $FeSO_4$ 1 N impiegati è stata moltiplicata per il peso equivalente del C stesso, ossia per 3, e per la normalità dei reattivi impiegati, ossia per 1.

Il contenuto di sostanza organica è stato infine calcolato moltiplicando la quantità di carbonio per un fattore empirico posto uguale a 1,72.

3.3.2 Determinazione del pH in acqua

Il pH è stato determinato per via potenziometrica, dopo taratura del sistema di misura, su una sospensione suolo-acqua con un rapporto 1:2,5. È stato utilizzato un pH-metro con compensazione di temperatura, munito di elettrodo monotubolare vetro-calomero. La taratura del sistema è stata effettuata facendo uso di una soluzione tampone di riferimento avente pH vicino a quello del campione. È stata controllata la linearità del sistema utilizzando almeno un'altra soluzione di riferimento a pH diverso. La misura della reazione è stata effettuata introducendo il sistema elettrico nell'estratto mantenuto in agitazione. Il risultato è stato espresso in unità di pH con 2 cifre decimali (MIPAF, 2000).

3.3.3 Tessitura

La tessitura del suolo è la sua distribuzione per classi dimensionali delle particelle elementari ed è uno dei caratteri edafici più importanti in quanto non varia considerevolmente con il tempo. È responsabile di molte proprietà fisiche, idrologiche e chimiche ed è uno dei caratteri su cui si fonda la divisione tra famiglie e serie nella classificazione dei suoli.

La tessitura è stata determinata utilizzando il metodo densimetrico (MIPAF, 2000) che prevede una prima fase differente a seconda che il contenuto di sostanza organica nel terreno sia superiore o inferiore al 3%.

Nel caso in esame il terreno da analizzare conteneva più del 3% di sostanza organica per cui si è provveduto a pesarne 50 g che sono stati introdotti in un becher a cui sono stati aggiunti 110 ml di acqua ossigenata (40% v/v). Questa operazione ha permesso di distruggere la sostanza organica, che fa da aggregante, e non permette alle particelle del suolo di disperdersi nelle soluzioni acquose. Dopo 24 ore il campione è stato posto su una piastra riscaldante per fare evaporare tutta l'acqua ossigenata in eccesso.

Una volta raffreddata, si è proceduto alla dispersione della soluzione con 100 ml di esametrafosfato di sodio (Calgon). Il tutto è stato poi portato ad un volume di 500 ml con acqua distillata e fatto decomporre per 4 minuti con un disaggregatore a 14.000-16.000 giri min^{-1} .

Il composto così preparato è stato versato in un cilindro di vetro graduato e portato a volume. Si sono quindi effettuati 20 doppi capovolgimenti completi per omogeneizzare la sospensione, operando lentamente per evitare di emulsionare il liquido. Infine il cilindro è stato posto a riposo.

La tessitura è stata determinata sulla base delle variazioni nel tempo della massa volumica in sospensione nel suolo. I valori di massa volumica sono messi in relazione, in modo empirico, alla dimensione delle particelle in maniera che, scegliendo opportuni tempi, la lettura di massa volumica possa essere una misura di una data dimensione di particelle. I sedimenti infatti precipitano nella soluzione con velocità determinata dalla Legge di Stoke.

La densità delle sospensioni di argilla più limo è stata misurata, con un idrometro di Bouyoucos, dopo 4 minuti mentre la densità dell'argilla è stata letta dopo 2 ore. Infine si è ricavata per differenza la presenza di sabbia.

Utilizzando il triangolo delle tessiture dei sistemi di classificazione USDA⁷ e ISSS⁸, e avendo a disposizione le percentuali di sabbia, limo e argilla, si è determinata la tipologia di terreno analizzato (Figura 20).

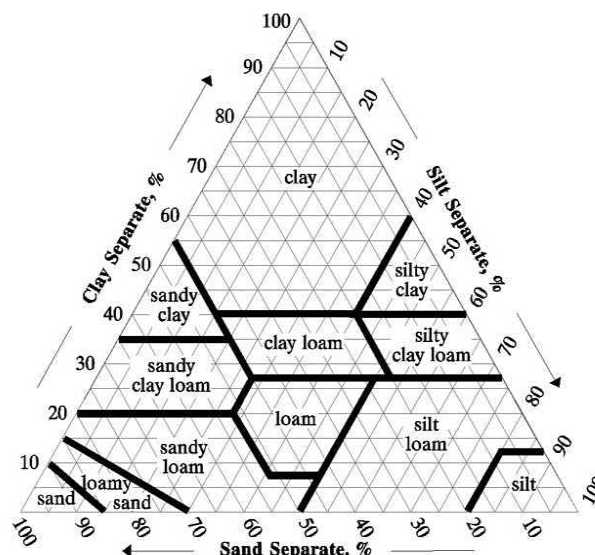


Figura 20 Triangolo della tessitura (modello USDA).

3.3.4 Determinazione del calcare totale

La conoscenza del contenuto in carbonati totali (CaCO_3 , MgCO_3 , NaCO_3 , ecc.) impropriamente definito “calcare totale” è utile per molteplici fattori: per la corretta interpretazione del pH, per valutare l’incidenza del calcare nel volume del suolo e quindi la proporzione della frazione più direttamente interessata alla nutrizione vegetale, per calcolare correttamente i fabbisogni idrici.

Il contenuto in calcare totale viene determinato valutando l’anidride carbonica che si sviluppa trattando il suolo con acido cloridrico (MIPAF, 2000).

⁷ US Department of Agriculture

⁸ International Soil Science Society



La determinazione del calcare totale viene fatta per calcimetria volumetrica cioè misurando il volume di CO_2 che si sviluppa, a temperatura e pressioni note, a seguito dell'azione di un eccesso di HCl su un peso noto di suolo.

Si sono pesati 1,7 grammi di terreno e collocati nel calcimetro di Scheibler con 10 ml di HCl 1 N. Rilevata la temperatura ed i gradi Scheibler si determina la quantità di calcare totale (CaCO_3 in %) utilizzando la tabella di Scheibler.

3.3.5 Determinazione della capacità di scambio cationico

Il metodo prevede l'impiego, come soluzione scambiante, di una soluzione di cloruro di bario (BaCl_2) e trietanolamina tamponata a pH 8,1.

Vengono pesati 2,5 g di campione di terreno ai quali si aggiungono 50 ml della soluzione appena descritta.

Il complesso suolo-bario così ottenuto viene agitato per 1 ora e successivamente filtrato con filtri Whatman n° 42. Il filtrato viene in seguito diluito 1:10 e l'analisi delle basi scambiabili è effettuata tramite ICP. La lettura di questo strumento è espressa in mg l^{-1} pertanto è necessaria la trasformazione in $\text{meq}/100$ g di terreno per uniformare il dato alle unità di misura ufficiali per le basi scambiabili.

3.3.6 Mineralizzazione e quantificazione dei metalli

Il campione di terreno viene posto in beuta e addizionato con 28 ml di acquaregia (7 ml di HNO_3 e 21 ml di HCl) e riscaldato con bunsen fino al raggiungimento di una leggera ebollizione da tenere sotto controllo per 30 minuti, avendo cura di agitare in continuazione. Una volta terminato il riscaldamento, il campione viene trasferito in un matraccio da 100 ml e portato a volume con acqua distillata. Si procede quindi al filtraggio del contenuto del matraccio utilizzando filtri monouso Watman n° 4. La determinazione del contenuto di metalli viene eseguita mediante ICP così come riportato nel paragrafo 3.7.

3.4 Analisi del pH della soluzione nutritiva

Il pH delle soluzioni nutritive (sia la soluzione di base, sia quella di ciascun trattamento) è stato misurato prima delle somministrazioni mediante lo strumento HI 9321 *Microprocessor pH-meter* (Hanna Instruments, USA). Prima delle misurazioni si è proceduto alla taratura

dell'apparecchio a pH 4,01 e 7,01 utilizzando due apposite soluzioni tampone. Successivamente gli elettrodi, ripuliti con acqua deionizzata dopo ogni misurazione, sono stati immersi nei recipienti contenenti ciascuno una delle soluzioni nutritive, rilevando pH e temperatura. Le soluzioni erano mantenute in continuo movimento da un agitatore magnetico. I valori rilevati sono riportati in Tabella 11.

Tabella 11 Trattamenti utilizzati nell'esperimento.

Soluzione	pH	T (°C)
Soluzione nutritiva di base	5,10	22,3
Controllo	5,15	21,5
1	4,27	22,2
2	3,93	21,2

3.5 Determinazione del peso fresco e del peso secco

Alla fine di ciascun allevamento, tutte le piantine sono state immerse per circa 2 minuti in una soluzione di EDTA 10 mM al fine di rimuovere eventuali residui di Cr adsorbiti sulla superficie esterna delle radici stesse. Le piante sono state poi accuratamente lavate con acqua deionizzata, asciugate e pesate al millesimo di grammo, suddividendole in foglie, fusto (esclusa la talea di origine) e radici. Una parte delle foglie (circa 500 mg) di tre-quattro repliche per ogni specie è stata prelevata e conservata a -80°C per successive analisi. Tutto il materiale rimanente è stato invece collocato in stufa per 3 giorni a 80°C e in seguito trasferito a temperatura ambiente per circa due ore in campana essiccatrice, prima di procedere alla misurazione del peso secco.

Per ogni campione sono stati anche calcolati il rapporto peso fresco/peso secco di foglie, fusto e radici.

3.6 Mineralizzazione in forno a microonde

La determinazione del contenuto di cromo, ferro e zolfo è stata ottenuta tramite mineralizzazione dei tessuti e successiva lettura all'ICP.

Per la mineralizzazione dei campioni è stato adottato il metodo EPA 3050B, utilizzando come digestore a microonde lo strumento della Cem Starsystem 6 plus. I campioni sono stati finemente macinati con mortaio e azoto liquido e pesati al millesimo di grammo con una bilancia analitica. Metà di ogni campione (circa 300 mg) è stata quindi trasferita in un provettone e addizionata con 10 ml di HNO₃ 69%, riscaldando il tutto nel digestore a microonde per 30 minuti a 105°C. Sono

stati quindi aggiunti, in varie aliquote, un totale di 10 ml di H₂O₂ al 40% durante due fasi successive di riscaldamento a 105°C per 30 minuti ciascuna. Ogni prodotto è stato quindi filtrato con filtri monouso Whatman n° 41 e diluito con acqua deionizzata fino a un volume finale di 100 ml, in preparazione alla lettura all'ICP.

3.7 Lettura degli elementi in ICP-OES

Per determinare il contenuto minerale presente nella sostanza secca è stato utilizzato uno spettrometro ICP-OES, ovvero *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy* CIROS^{CCD} (Spectro Analytical Instruments, Kleve D). Questo strumento permette di rilevare, con precisione e con sensibilità variabili, quasi tutti gli elementi ad eccezione di gas nobili, idrogeno, ossigeno e fluoro.

Tale apparecchio presenta molti vantaggi rispetto alla tradizionale spettrometria ad assorbimento atomico (spettrometria AAS) in quanto è più sensibile, permette di impostare una o più lunghezze d'onda specifiche e prive di interferenze relative all'elemento voluto, è in grado di analizzare una maggiore gamma di elementi e, non da ultimo, restituisce velocemente una risposta analitica.

Lo spettrometro ad emissione atomica di plasma è caratterizzato dal plasma stesso, costituito da gas Argon ad elevato grado di ionizzazione e ad elevatissima temperatura (fra 7.000 e 11.000 °C a seconda dell'analisi), prodotto dalla ionizzazione del gas che viene costantemente immesso all'interno del sistema.

Le lunghezze d'onda scelte per rilevare i picchi di emissione di Cr, Fe e S sono riportati in tabella 12; successivamente è stata determinata una retta di taratura per ciascun elemento rilevato, con campi di applicabilità indicati in tabella 3.9.

Tabella 12 Lunghezze d'onda e campi di rilevabilità per cromo, ferro e zolfo

Elemento	λ nm	campo di applicabilità	
		limite inferiore	limite superiore
		mg/litro	
Cromo	267,716	0,0003	12,0
Ferro	259,941	0,0011	12,0
Zolfo	182,034	0,012	60,0

Il valore finale, espresso in $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s., è una media tra le 3 letture consecutive di ogni campione; contestualmente vengono visualizzati anche la deviazione standard e l'errore standard relativo, per fornire una stima immediata dell'attendibilità dell'analisi.

3.8 Determinazione del contenuto di pigmenti fotosintetici

Circa 100 mg di tessuto fogliare fresco (conservato a -80°C) delle piante allevate nelle diverse condizioni sono stati macinati in un mortaio con azoto liquido. I campioni così polverizzati sono stati trasferiti in provette di polipropilene, addizionati di 10 ml di etanolo al 96% e miscelati ripetutamente. I campioni sono stati quindi collocati al buio a 4°C per 24 ore; dopodiché gli estratti sono stati filtrati attraverso filtri monouso Whatman n° 1 e analizzati tramite spettrofotometro Perkin-Elmer UV/VIS Lambda 1.

Le letture sono state eseguite a 665, 649 e 470 nm. Le concentrazioni di clorofille e carotenoidi sono state calcolate mediante le seguenti formule (Welburn e Lichtenthaler, 1984):

$$Chla = 13.95 \cdot A665 - 6.88 \cdot A649 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$Chlb = 24.96 \cdot A649 - 7.32 \cdot A665 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$Xan+Car = \frac{1000 \cdot A470 - 2.05 \cdot Chla - 114.8 \cdot Chlb}{245} \text{ } \mu\text{g/ml}$$

dove:

$A665$, $A649$ e $A470$ = assorbanze alle relative lunghezze d'onda.

Per ogni campione sono state eseguite 3 repliche con doppia lettura per ogni replica.

3.9 Determinazione di attività fotosintetica, traspirazione e conduttanza stomatica

Per misurare la capacità fotosintetica è stato usato lo strumento *LCi Portable Photosynthesis System* di ADC BioScientific Ltd (Figura 3.13/A). Questo strumento è costituito da una *console* principale, alla quale è collegata una cuvetta (*leaf chamber*) e da una sonda esterna che fornisce l'aria di riferimento per le analisi. La sonda deve essere posizionata lontana dallo strumento, in un'area dove il livello di CO₂ sia stabile, quindi lontano dal suolo e dalle piante; nel nostro caso l'estremità della sonda è stata portata all'esterno della cella climatizzata, in comunicazione con l'aria aperta. Lo strumento è dotato di batteria interna che assicura il funzionamento per una decina di ore e può supportare tre tipi di camere fogliari: per latifoglie, per conifere o per graminacee (differiscono per le dimensioni). Per il nostro esperimento è stata scelta la cuvetta per latifoglie (Figura 21/B).

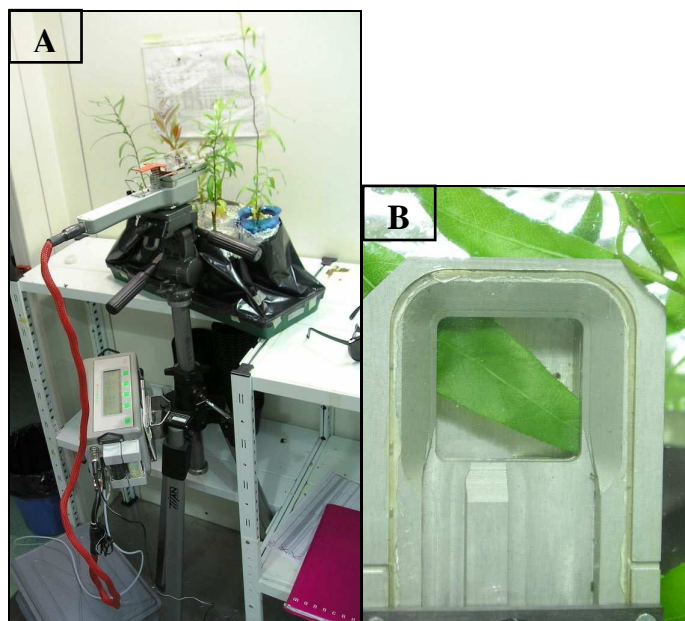


Figura 21 Lo strumento *LCi Portable Photosynthesis System* montato su cavalletto (A) e particolare della cuvetta per latifoglie (B).

Le misurazioni sono state effettuate con scadenze diverse a seconda dell'esperimento e per ciascuna misura sono state scelte quattro piante di *Salix* per ogni tesi ed è stata scelta una foglia per ogni pianta, tra quelle completamente sviluppate, e su questa sono state eseguite tre letture ciascuna. Successivamente, ogni foglia è stata fotografata nella posizione che occupava nella cella fogliare, per poter in seguito ricavare il rapporto tra l'area della foglia effettivamente esposta alla misurazione e l'area nota della cella (Figura 21/B).

La radiazione fotosinteticamente attiva viene misurata grazie ad un sensore posto sulla cuvetta. Questo strumento restituisce sia parametri misurati direttamente, sia valori calcolati (Tabella 13).

Tabella 13 Alcuni dei parametri fondamentali rilevati da *LCi Portable Photosynthesis System*.

Simbolo	Descrizione	Unità di misura
P	pressione atmosferica	mBar
R_b	resistenza allo strato limite	$\text{m}^2 \text{s mol}^{-1}$
c_i	CO_2 sottostomatica	vpm
T_{ch}	temperatura della camera	$^{\circ}\text{C}$
T_{leaf}	temperatura della foglia	$^{\circ}\text{C}$
Q_{leaf}	PAR incidente sulla foglia	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
A	Fotosintesi	$\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$
g_s	conduttanza stomatica di CO_2	$\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
E	Traspirazione	$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Alcuni parametri, come Rb e area fogliare, devono essere preimpostati nello strumento; per quanto riguarda Rb è stato fissato un valore di $0,17 \text{ m}^2 \text{ s mol}^{-1}$, mentre l'area fogliare è stata considerata unitaria.

Al termine dei rilievi tutti i valori rilevati sono stati corretti per l'effettiva superficie fogliare, calcolata tramite elaborazione fotografica. Per tale elaborazione è stato utilizzato il software *ImageJ* versione 1.33, sviluppato dal National Institute of Health (USA).

Successivamente si è proceduto alla correzione dei valori di traspirazione, assimilazione, conduttanza stomatica e CO_2 sottostomatica, secondo le formule seguenti:

$$E_{\text{aggiornato}} = \frac{E_{\text{rilevato}} \cdot \text{area}_{\text{impostata}}}{\text{area}_{\text{corretta}}} \qquad A_{\text{aggiornato}} = \frac{A_{\text{rilevato}} \cdot \text{area}_{\text{impostata}}}{\text{area}_{\text{corretta}}}$$

dove:

$E_{\text{aggiornato}}$ e $A_{\text{aggiornato}}$ = valori definitivi di E e A

E_{rilevato} e A_{rilevato} = valori di E e A misurati dallo strumento

$\text{area}_{\text{impostata}}$ = valore unitario fisso (impostato nello strumento) di area della camera fogliare

$\text{area}_{\text{corretta}}$ = valore di area fogliare corretto mediante elaborazione fotografica.

Per quanto riguarda la conduttanza stomatica bisogna tener conto che essa è il reciproco della resistenza stomatica:

$$gs = \frac{1}{rs}$$

Correggendo la resistenza totale, definita come somma di rs e Rb, per l'effettiva superficie fogliare, è quindi possibile calcolare la conduttanza stomatica corretta. Questo si può riassumere con la formula seguente:

$$gs_{\text{aggiornata}} = \frac{1}{\left(\frac{1}{gs_{\text{rilevata}}} + rb \right) \cdot \text{area}_{\text{impostata}} - rb} \cdot \text{area}_{\text{corretta}}$$

dove:

$gs_{\text{aggiornata}}$ = valore definitivo di gs

gs_{rilevata} = valore di gs misurato dallo strumento

$\text{area}_{\text{impostata}}$ = valore unitario fisso (impostato nello strumento) di area della camera fogliare

$\text{area}_{\text{corretta}}$ = valore di area fogliare corretto mediante elaborazione fotografica.

Per il calcolo della CO_2 sottostomatica viene applicata la formula proposta da Pearcy (1989):

$$ci = c_a - \frac{A}{gc}$$

dove:

c_a = flusso di CO₂ che fuoriesce dalla cella di misurazione dello strumento

gc = conduttanza totale

3.10 Preparazione dei campioni per la microscopia ottica

Porzioni subapicali della sesta foglia di piante allevate nelle condizioni di crescita riportate al paragrafo 3.2.4 sono state tagliate a pezzetti della grandezza di alcuni mm ciascuno e quindi fissate in soluzione di gluteraldeide al 3% in tampone cacodilato 0,1 M (pH 6,9) per 2 ore al buio a 4 °C. È stata eseguita una post-fissazione con tetrossido di osmio (OsO₄) all'1% in tampone cacodilato 0,1 M (pH 6,9) per 2 ore al buio e a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi in tampone cacodilato 0,1 M (pH6,9) si è provveduto alla disidratazione dei tessuti utilizzando una serie di soluzioni acquose di alcool a concentrazione crescente secondo il seguente protocollo:

- Alcool etilico 25% 3 cambi in 15 minuti
- Alcool etilico 50% 3 cambi in 15 minuti
- Soluzione satura di acetato di uranile in alcool etilico 75% 30 minuti al buio
- Alcool etilico 100% 3 cambi in 10 minuti

L'alcool etilico assoluto è stato poi sostituito con ossido di propilene, eseguendo 3 cambi in 20 minuti.

Successivamente è stata eseguita una inclusione in resina epossidica (araldite) così preparata:

- Araldite (A/M) 27 ml
- Anidride dodecilsuccinica (DDSA) 23 ml
- Acceleratore (C) 0,75 ml

Il processo è stato effettuato trasferendo i campioni in miscele di ossido di propilene/resina sempre più concentrate per quest'ultimo componente, permettendo così una più completa ed omogenea diffusione della resina all'interno dei tessuti.

Il protocollo seguito è stato il seguente:

- Resina/ossido di propilene 1:3 per 60' in stufa a 35 °C in provette con tappi ben chiusi
- Resina/ossido di propilene 1:1 per 60' in stufa a 35 °C in provette con tappi ben chiusi
- Resina/ossido di propilene 3:1 per per tutta la notte in stufa a 35 °C in provette con tappi ben chiusi.

Il giorno successivo, dopo aver sostituito la miscela resina/ossido di propilene con resina pura, le provette sono state messe in stufa per 2 ore a 35 °C prive di tappo al fine di consentire l'evaporazione di tutto l'ossido di propilene residuo. È stata poi eseguita l'inclusione dei

campioni in box appositi con resina pura e la polimerizzazione della resina è stata ottenuta ponendo i campioni per 24 ore in stufa a 40 °C e per 3 giorni a 60 °C.

Per ottenere le sezioni da utilizzare con il microscopio ottico si è proceduto a tagliare delle sezioni di 1 µm di spessore dai campioni inclusi in resina precedentemente ottenuti. Per il taglio si è utilizzato un ultramicrotomo (Ultracut – Reichert – Jung) e lame di vetro.

3.11 Preparazione dei campioni per la microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

Dai campioni inclusi in resina, così come riportato nel paragrafo precedente, sono state ottenute delle sezioni ultrasottili di circa 800 Å, mediante un ultramicrotomo (Ultracut – Reichert – Jung) e con l'utilizzo di lame di diamante. Le sezioni, raccolte su retini di rame coperti da film di collodio e da uno strato di carbonio, venivano contrastate con citrato di piombo per 45 minuti e accuratamente lavate con acqua distillata e asciugate. L'osservazione dei campioni è stata infine effettuata con un microscopio elettronico a trasmissione (Hitachi H300) operante a 75 kV.

3.12 Estrazione

Campioni di tessuto fogliare e radicale conservati a -80 °C sono stati macinati finemente in mortaio con azoto liquido avendo cura di non scongelare mai la polvere così ottenuta. Si sono quindi pesati circa 100 mg di materiale per ciascun campione utilizzando una bilancia analitica di precisione. A tale campione è stato aggiunto 1 ml del tampone di estrazione composto da una soluzione 50 mM KH_2PO_4 , 10 g/l PVP (Polivinilpirrolidone) e 0,1% Triton X-100, tamponata a pH 7,8 con KOH. Le provette sono state dapprima agitate e poi poste al buio e a 4 °C per 10 minuti. È stata seguita la centrifugazione per 10 minuti a 13000 giri con microcentrifuga, sempre alla temperatura di 4 °C. Il surnatante è stato quindi prelevato e posto in provette pulite posizionate in ghiaccio e al buio.

Tutte le letture di assorbanza di seguito descritte sono state effettuate utilizzando lo spettrofotometro Perkin-Elmer UV/VIS Lambda 1. Per ogni tipo di lettura di seguito descritta sono state in totale effettuate circa 220 letture.

3.12.1 Lettura delle proteine

Il contenuto di proteine è stato determinato secondo il metodo di Bradford (Bradford, 1976) che prevede l'utilizzazione di 50 mg del reattivo omonimo sciolto in 25 ml di etanolo 96% e 50 ml di acido ortofosforico 85% tutto portato al volume di 0,5 l con H₂O milliQ. La soluzione è stata ben miscelata e successivamente conservata al buio a 4 °C.

Nella cuvetta di lettura è stato unito 1 ml di reattivo di Bradford a 50 µl tampone di reazione e 50 µl di estratto dalle radici precedentemente ottenuto (Paragrafo 3.12) mentre per le foglie sono stati usati 90 µl di tampone di reazione e 10 µl di estratto. Il tutto è stato posto a temperatura ambiente per 15 minuti per poi procedere alla lettura dell'assorbanza a 595 nm.

Prima di effettuare la lettura dell'assorbanza dei campioni si è provveduto a costruire una retta di taratura. Tale retta è stata ottenuta in base alle letture effettuate misurando l'assorbanza a 595 nm di soluzioni aventi quantitativi noti di BSA (sieroalbumina bovina). La retta di taratura è stata costruita usando aliquote crescenti di BSA (1 µg/µl) che sono state poi diluite a 100 µl con lo stesso tampone usato per l'estrazione (Tabelle 14).

Tabella 14 Volume dei reagenti utilizzati per costruire la retta di taratura utile alla quantificazione delle proteine.

<i>BSA (µl)</i>	0	10	20	30	50	75
Tampone di estrazione (µl)	100	90	80	70	50	25
Reattivo di Bradford (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000

3.13.2 Guaiacolo perossidasi - EC 1.11.1.7

Per la determinazione dell'attività della guaiacolo perossidasi è stato modificato il protocollo di analisi proposto da Hemed e Klein (1990).

All'interno di cuvette al quarzo del volume di 1,5 ml sono stati miscelati i seguenti reagenti: 800 µl di tampone di reazione (soluzione madre di concentrazione 62,5 mM di KH₂PO₄ tamponata a pH 7,8 con KHO), 50 µl di H₂O milliQ, 50 µl di guaiacolo (soluzione madre di concentrazione 180 mM), 50 µl di surnatante del campione da analizzare e 50 µl di H₂O₂ (soluzione madre di concentrazione 179,6 mM). La lettura è stata effettuata a 470 nm per 2 minuti seguendo l'aumento dell'assorbanza dovuta alla trasformazione del guaiacolo a tetraguaiacolo mediata dalla presenza dell'enzima guaiacolo perossidasi. Per il calcolo dell'attività enzimatica è stato usato un coefficiente di estinzione pari a 26,5 mM⁻¹ cm⁻¹ e l'attività è stata espressa in µmol di tetraguaiacolo min⁻¹ mg⁻¹ proteina.

3.13.3 Ascorbato perossidasi - EC 1.11.1.11

Per la determinazione dell'attività dell'ascorbato perossidasi è stato modificato il protocollo di analisi proposto da Nakano e Asada (1981).

All'interno di cuvette al quarzo del volume di 1,5 ml sono stati miscelati i seguenti reagenti: 800 μ l di tampone di reazione (soluzione madre di concentrazione 62,5 mM di KH_2PO_4 tamponata a pH 7,8 con KHO), 50 μ l di Na_2EDTA (soluzione madre di concentrazione 2 mM), 50 μ l di ascorbato (soluzione madre di concentrazione 10 mM), 50 μ l di surnatante del campione da analizzare e 50 μ l di H_2O_2 (soluzione madre di concentrazione 4 mM). La lettura è stata effettuata a 290 nm per 2 minuti seguendo la diminuzione dell'assorbanza dovuta all'ossidazione dell'ascorbato a deidroascorbato mediata dall'enzima ascorbato perossidasi. Per il calcolo dell'attività enzimatica è stato usato un coefficiente di estinzione pari a $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e l'attività è stata espressa in μmol di ascorbato ridotto $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteina.

3.13.4 Catalasi - EC 1.11.1.6

Per la determinazione dell'attività della catalasi è stato seguito il protocollo di analisi proposto da Aebi (1984). A tale scopo All'interno di cuvette al quarzo del volume di 1,5 ml sono stati miscelati i seguenti reagenti: 780 μ l di tampone di reazione (soluzione madre di concentrazione 64 mM di KH_2PO_4 tamponata a pH 7,8 con KOH), 150 μ l di tampone di estrazione (soluzione 50 mM KH_2PO_4 , 10 g/l PVP e Triton X-100 allo 0,1% tamponata a pH 7,8 con KOH), 50 μ l di surnatante del campione da analizzare e 20 μ l di H_2O_2 (soluzione madre di concentrazione 750 mM). La lettura è stata effettuata a 240 nm per 2 minuti seguendo la diminuzione dell'assorbanza dovuta alla riduzione dell' H_2O_2 ad acqua mediata dall'enzima catalasi. L'attività è stata espressa in μmol di H_2O_2 ridotta $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteina

3.13.5 Superossido dismutasi - EC 1.15.1.1

Per la determinazione dell'attività della superossido dismutasi è stato seguito un protocollo ottenuto modificando quelli proposti da Elstner e Heupel (1976) e Öyanagui Y. (1984).

Prima di procedere alla lettura allo spettrofotometro è stata condotta una reazione che ha portato alla formazione del nitrito da idrossilammina cloruro. Per ottenere la soluzione di incubazione si sono miscelate, in provetta da 1,5 ml: 100 μ l di estratto, 300 μ l di ipoxantina e idrossilammoniocloruro (soluzione madre 1 mM), 300 μ l di acqua milliQ e 300 μ l di xantina ossidasi (soluzione madre 104 mM). La reazione è cominciata quando si è aggiunto la xantina ossidasi ed è stata condotta per 30 minuti a 37 C° in un bagnetto termostatico.

In precedenza è stato preparato un agente colorimetrico ottenuto mescolando insieme una soluzione di α -naftilammina e di acido solfanilico in modo che si potessero usare 2 ml di questo agente colorimetrico per ogni campione.

A sua volta la soluzione di α -naftilammina è stata ottenuta sciogliendo 0,25 g di α -naftilammina in 50 ml di acqua distillata bollente, sono stati poi uniti 62,5 ml di acido acetico glaciale e il tutto è stato portato a volume con 137,5 ml di acqua milliQ fredda. Tale soluzione è stata stoccata al buio a 4 °C.

La soluzione di acido solfanilico è stata ottenuta sciogliendo 0,825 g di acido sulfaminico in 187,5 ml di acqua milliQ calda e aggiungendo infine 62,5 ml di acido acetico glaciale. La soluzione è stata anch'essa stoccata al buio a 4 °C.

Trascorsi i 30 minuti di incubazione della soluzione in bagnetto termostatico si è provveduto a unire (in provette usa e getta da 3 ml) 1ml di tale soluzione con 2 ml dell'agente colorimetrico preparato in precedenza. La soluzione così ottenuta è stata quindi lasciata a riposo a temperatura ambiente per 20 minuti e poi si è provveduto alla lettura allo spettrofotometro. La lettura è stata fatta leggendo l'assorbanza a 550 nm.

L'attività è stata espressa in U SOD mg^{-1} proteina. Una unità di SOD esprime la quantità di enzima necessaria a ridurre del 50% la formazione del nitrito rispetto alla reazione avvenuta senza enzima.

3.13 Elaborazione statistica

Al fine di verificare le differenze tra specie, ed tra i trattamenti entro le specie, tutti i dati raccolti sono stati analizzati mediante alcuni test statistici.

Innanzitutto sono state verificate l'omogeneità della varianza (omoschedasticità) e la normalità della distribuzione dei dati. Per verificare l'omoschedasticità è stato usato il test di Levene, che analizza la varianza sulle deviazioni assolute dei valori dalle rispettive medie di gruppo (se il test risulta statisticamente significativo, allora la varianza non è omogenea). Per quanto riguarda la normalità dei dati, la condizione è stata verificata tramite il test W di Shapiro-Wilk (come per il precedente, se il test risulta significativo la normalità dei dati non è verificata).

Successivamente, i dati normali e omogenei sono stati elaborati con il test ANOVA. I dati per i quali non erano verificati gli assunti di normalità e/o omogeneità sono stati invece analizzati con il test non parametrico U di Mann-Whitney, che compara le mediane di due campioni indipendenti ed ha il vantaggio di poter essere utilizzato facilmente sia su piccoli campioni che su campioni numerosi.

Tali test hanno permesso di riscontrare alcune differenze significative (livello di significatività del 95%, $\alpha = 0,05$) intra e interspecifiche per i vari parametri analizzati.

4. RISULTATI

4.1 Allevamento di 7 specie di salice cresciute in agriperlite

In questo primo esperimento sono state utilizzate sette specie appartenenti al genere *Salix* (Tabella 15). Sono state individuate specie con caratteristiche differenti fra loro per ecologia e areale al fine di avere un ampio spettro di risposte ai trattamenti con Cr(III). Delle sette specie 5 sono autoctone nel territorio italiano: *S. alba*, *S. daphnoides*, *S. elaeagnos*, *S. fragilis* e *S. purpurea*, mentre le altre due sono alloctone: *S. matsudana* var. *tortuosa* e *S. nigra*.

Tabella 15 Quadro riassuntivo delle specie di salici utilizzate (modificato da: Martini e Papero, 1988. Gellini e Grossoni, 1997).

Nome	Areale	Habitat
<i>S. alba</i> sub. <i>typica</i>	Paleotemperato	Luoghi umidi da fondovalle ai 1000 m s.l.m.
<i>S. daphnoides</i>	Eurasiatico temperato	Prevalentemente montano dai 1000 ai 1800 m s.l.m.
<i>S. elaeagnos</i>	Orofico sud Europeo	Stazioni rivierasche lungo fiumi e torrenti da 100 a 1800 m s.l.m.
<i>S. fragilis</i>	Eurosiberiana	Stazioni ad elevata e persistente umidità da fondovalle ai 1000 m s.l.m.
<i>S. purpurea</i>	Eurasiatico temperato	Greti dei corsi d'acqua da fondovalle ai 1800 m s.l.m.
<i>S. nigra</i>	Nord America	Luoghi molto umidi
<i>S. matsudana</i> var. <i>tortuosa</i>	Cina/Siberia	Luoghi umidi

4.1.1 Crescita delle piante

Le piante sono state cresciute in vasetti contenenti sabbia e torba per 37 giorni e successivamente trapiantate in recipienti contenenti sabbia e agriperlite e irrorate con soluzione nutritiva. A 32 giorni di distanza dal trapianto si è incominciato a somministrare il Cr e le piante di ciascuna specie sono state suddivise in tre gruppi misti di 7 individui ciascuno, a due dei quali è stato aggiunto Cr(III) alla soluzione nutritiva, sotto forma di $\text{CrCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ in due diverse concentrazioni, 100 e 300 μM . Il terzo gruppo è stato tenuto come controllo.

La crescita delle piante è rappresentata in figura 22: in ascissa sono riportate le sette specie ciascuna delle quali è suddivisa in piante di controllo, piante trattate con Cr 100 μM e piante trattate con Cr 300 μM . Ogni istogramma è dato dalla somma del peso fresco delle radici (in grigio) e delle foglie (in bianco).

Tale parametro sembra non essere influenzata dai trattamenti con cromo, infatti il peso fresco non presenta differenze significative tra i trattamenti e il controllo (Figura 22). Tuttavia fra le specie utilizzate il *S. fragilis* si evidenzia per la più alta produzione di biomassa radicale, che arriva al valore medio di 8 g e un peso complessivo per pianta di 11,9 g. Al contrario le specie che presentano una produzione di biomassa più contenuta sono il *S. daphnoides* e il *S. purpurea* che raggiungono rispettivamente 0,83 g e 0,72 g di peso radicale e 3,5 g e 2,7 g di peso totale.

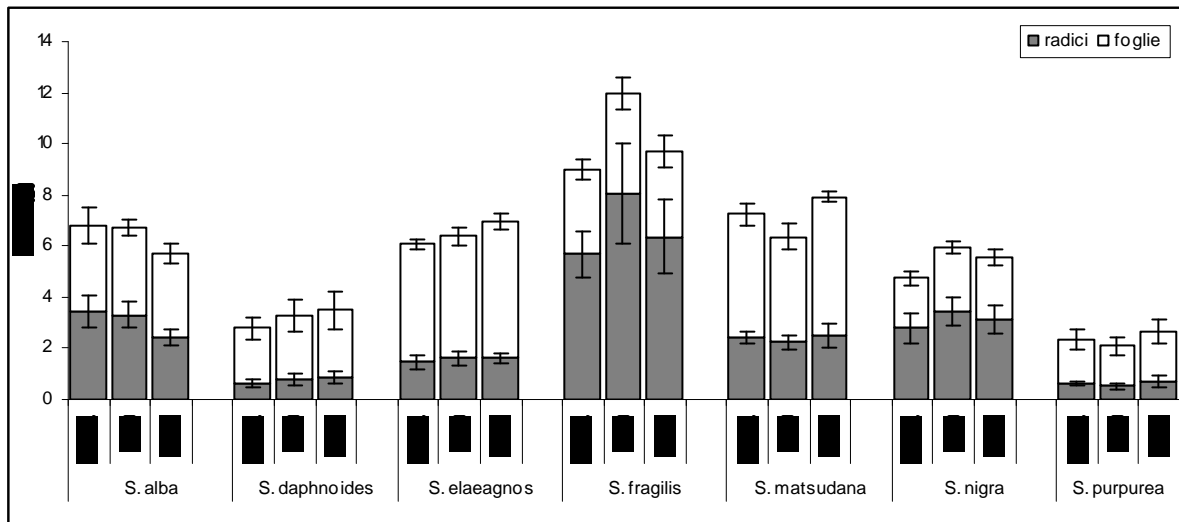


Figura 22 Peso fresco medio delle sette specie di *Salix* cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=7) dei singoli organi.

L'andamento del peso secco (Figura 23) rispecchia quello del peso fresco, infatti non ci sono differenze significative all'interno delle singole specie.

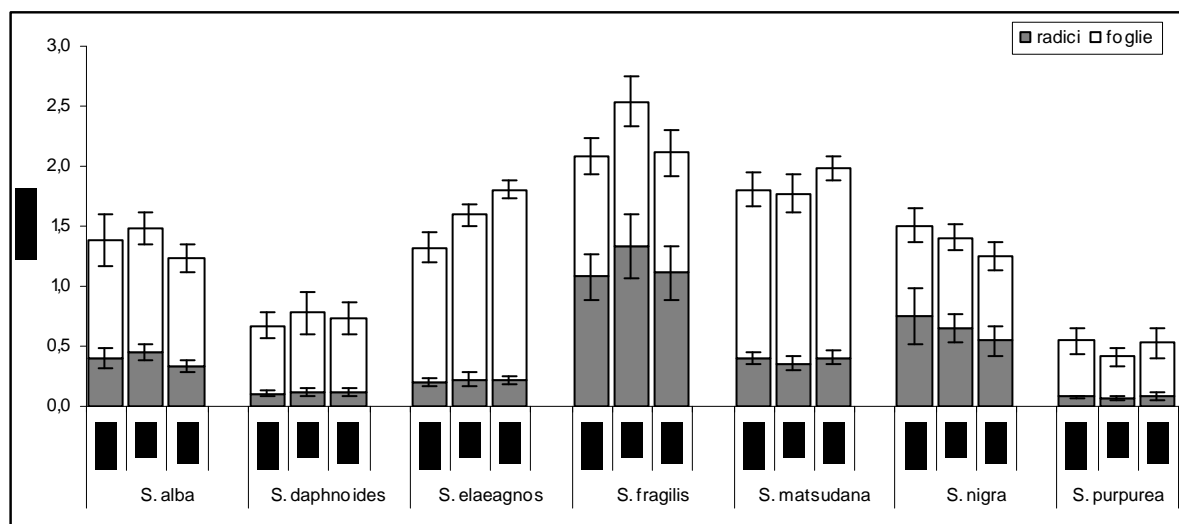


Figura 23 Peso secco medio delle sette specie di *Salix* cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=7) dei singoli organi.

Il rapporto fra il peso secco e il peso fresco (Figura 24) sia in radici che in foglie non evidenzia differenze significative in risposta ai trattamenti né all'interno di ciascuna specie né

nel confronto fra le specie. Il rapporto risulta differente nelle foglie rispetto alle radici con un valore medio di 0,3 nelle prime e di 0,2 nelle seconde.

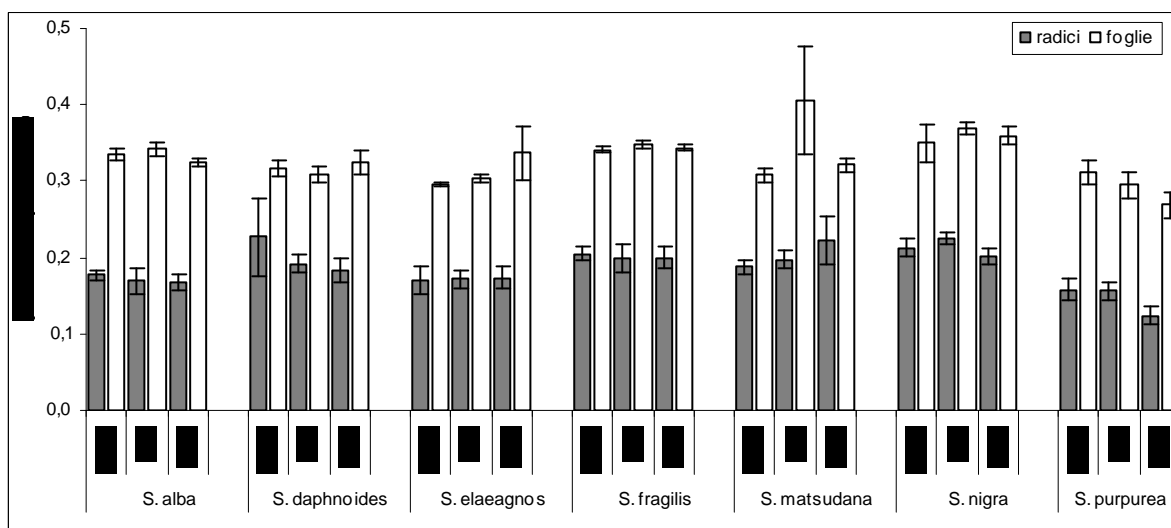


Figura 24 Rapporto fra il peso secco e il peso fresco delle sette specie di *Salix* cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=7) dei singoli organi.

4.1.2 Contenuto di cromo

Il contenuto in cromo nelle radici (Figura 25) risulta significativamente differente all'interno di ciascuna specie in risposta ai trattamenti. La quantità di cromo presente nelle radici di controllo è compreso fra 1 e 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s.. Nelle radici di piante trattate con la soluzione 50 μM il valore è compreso fra il massimo medio di 67,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s. del *S. fragilis* e il minimo di 23,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s. del *S. nigra*, mentre per le radici di piante trattate con la soluzione 100 μM il valore è compreso fra 229 $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s. del *S. purpurea* e 62,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s. del *S. nigra*.

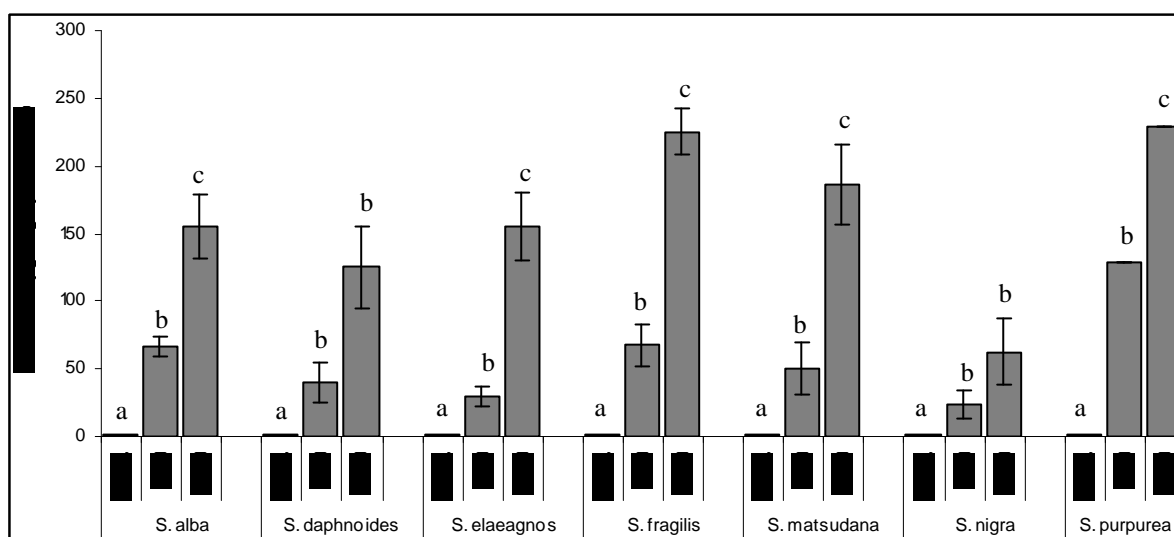


Figura 25 Contenuto di cromo in radici di ciascuna specie di *Salix* cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=7); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,5$.

Moltiplicando il valore unitario del contenuto in cromo per la corrispondente produzione di biomassa secca delle radici si ottiene la quantità di cromo accumulata per ciascuna specie (Figura 26). La specie che presenta il maggior accumulo è il *S. fragilis* che raggiunge il valore medio di 89,6 $\mu\text{g Cr}$ nel trattamento 50 μM e di 286,5 $\mu\text{g Cr}$ nel trattamento 100 μM . Al contrario la specie che ottiene il valore più basso è il *S. daphnoides* con 3,8 $\mu\text{g Cr}$ nel trattamento 50 μM e 14,7 $\mu\text{g Cr}$ nel trattamento 100 μM .

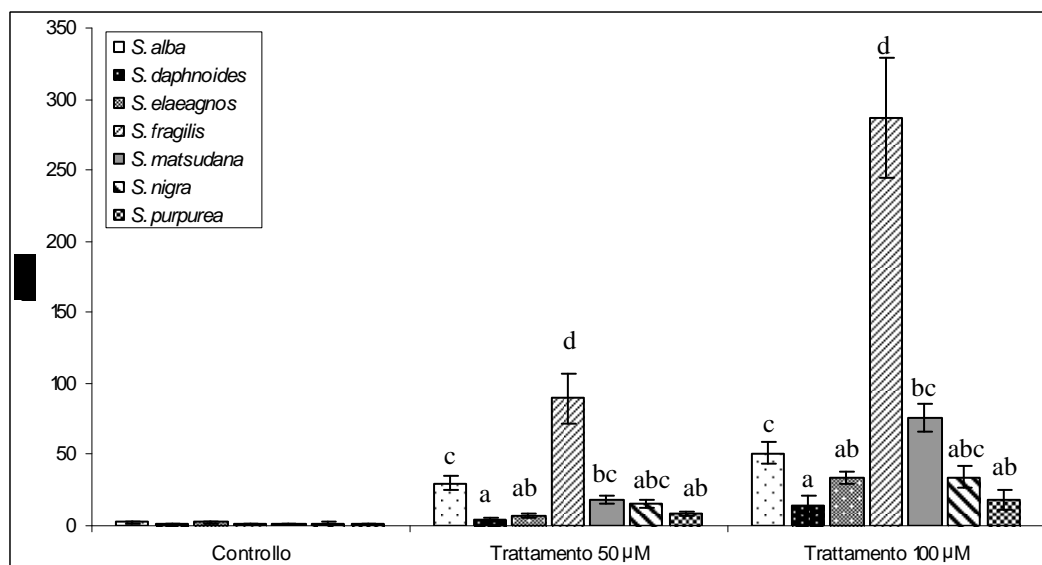


Figura 26 Contenuto totale di Cr per specie e per ciascun trattamento. Le barre indicano l'errore standard (n=7); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni trattamento, per $\alpha < 0,5$.

Sulla base dei risultati ottenuti in questo primo esperimento sono state individuate quattro specie da riutilizzare negli esperimenti successivi. Le specie scelte sono state *S. alba*, *S. elaeagnos*, *S. fragilis* e *S. matsudana*, invece si è deciso di non riutilizzare *S. daphnoides*, *S. nigra* e *S. purpurea*.

Le motivazioni alla base di tale scelta sono state le seguenti: *Salix alba* sub. *typica* ha presentato la migliore capacità di accumulo di cromo per unità di massa per il trattamento con cromo 50 μM , inoltre ha avuto una buona produzione di biomassa soprattutto radicale; *S. elaeagnos*: ha presentato una buona capacità di accumulo di cromo per unità di massa per il trattamento con cromo 100 μM e ha prodotto una buona quantità di biomassa soprattutto fogliare; *S. fragilis*: ha presentato la migliore capacità di accumulo di cromo per unità di massa per il trattamento con cromo 100 μM , inoltre è la specie che ha prodotto la maggior quantità di biomassa sia epigea che ipogea tanto da rendere questa specie la migliore in termini di accumulo totale; *S. matsudana* var. *tortuosa*: ha presentato una buona capacità di accumulo per entrambi i trattamenti e ha avuto una buona produzione di biomassa.

Per le specie da non reimpiantare le valutazioni sono state le seguenti: *S. daphnoides* ha prodotto una biomassa ridotta rispetto alle altre specie, soprattutto a livello radicale inoltre l'accumulo è stato minore rispetto alle quattro specie descritte in precedenza; *S. nigra* ha prodotto una buona biomassa radicale tuttavia ha ottenuto i minori accumuli di Cr per entrambi i trattamenti; *S. purpurea* ha presentato una buona capacità di accumulo accompagnata però dalla più bassa produzione di biomassa fra le sette specie.

4.2 Allevamento di 4 specie di salice cresciute in agriperlite

4.2.1 Crescita delle piante

Le 4 specie di salice selezionate sono state allevate in vasetti contenenti sabbia e torba per 37 giorni e successivamente trapiantate in recipienti contenenti sabbia e agriperlite e irrorate con soluzione nutritiva. A 32 giorni di distanza dal trapianto si è incominciato a somministrare il Cr e le piante di ciascuna specie sono state suddivise in tre gruppi misti di 7 individui ciascuno, a due dei quali è stato aggiunto Cr(III) alla soluzione nutritiva, sotto forma di $\text{CrCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ in due diverse concentrazioni, 100 e 300 μM . Il terzo gruppo è stato tenuto come controllo.

Al termine del periodo di trattamento la biomassa fresca totale appare significativamente inferiore rispetto alle piante di controllo solo in *S. alba* nel trattamento con 300 μM di CrCl_3 . Tuttavia sembra esserci una generale tendenza alla diminuzione di biomassa nelle piante sottoposte a trattamento rispetto alle piante di controllo, in tutte e quattro le specie a parte il *S. matsudana* trattato con 100 μM di CrCl_3 (Figura 27).

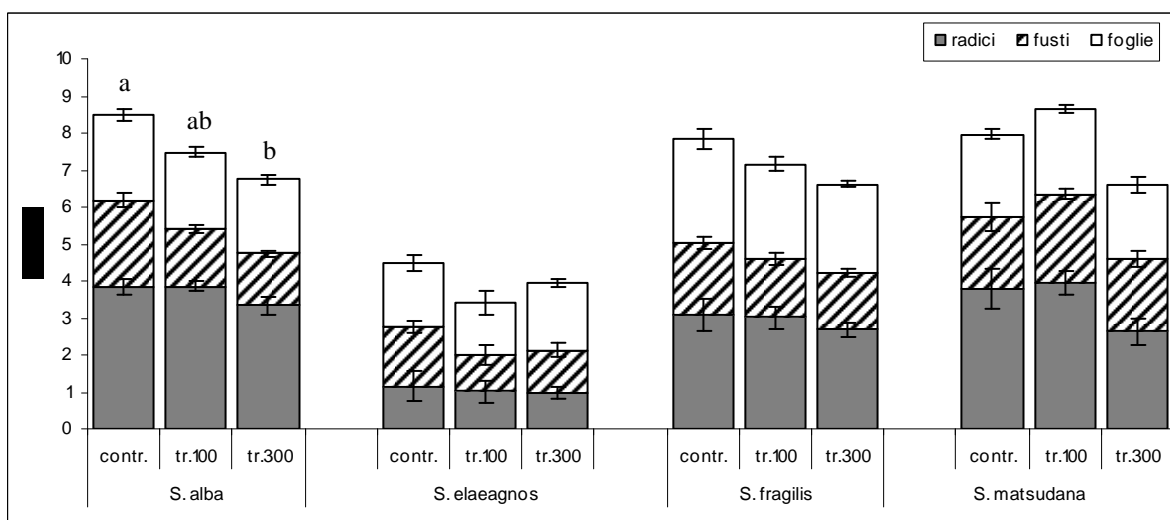


Figura 27 Peso fresco medio delle quattro specie di *Salix* cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=6) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative nella biomassa totale all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,05$.

Il peso secco totale mostra lo stesso andamento decrescente riscontrato per il peso fresco. Anche in questo caso però risulta significativamente inferiore al controllo solo il peso di *S. alba* del trattamento con 300 μM di CrCl_3 (Figura 28).

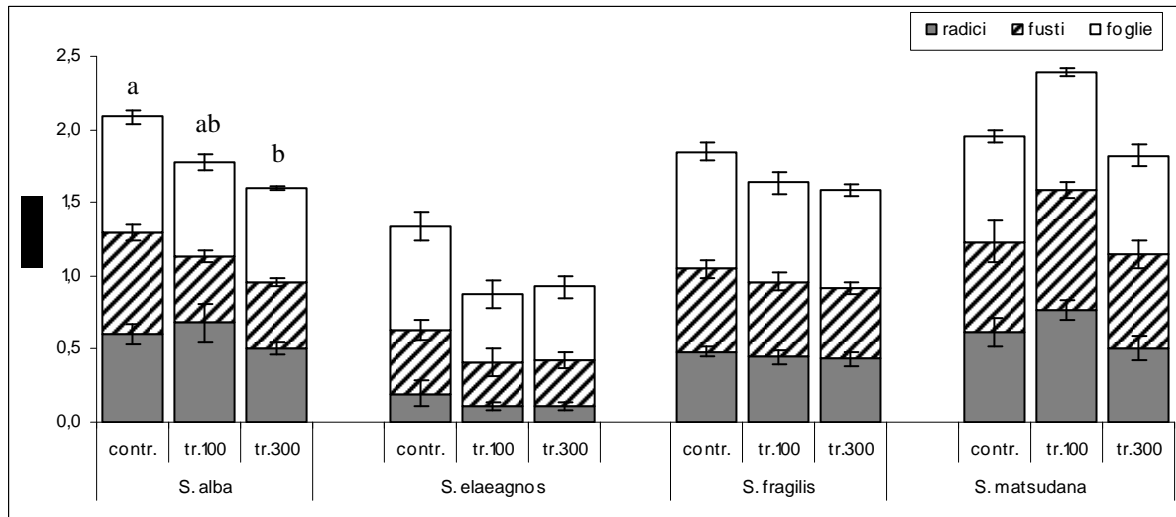


Figura 28 Peso secco medio delle quattro specie di *Salix* cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=6) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative nella biomassa totale, all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,05$.

Per quanto riguarda il rapporto tra il peso secco e il peso fresco, tutte le specie presentano un valore totale compreso tra 0,25 e 0,30, sia per il controllo che per i trattamenti senza manifestare differenze significative all'interno di ciascun organo (Figura 29).

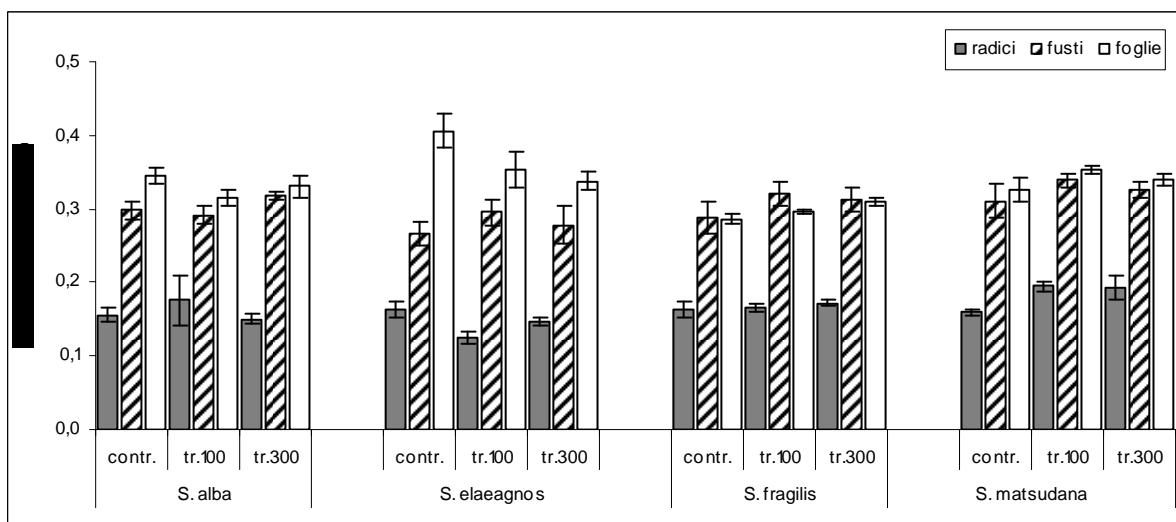


Figura 29 Rapporto tra peso secco e peso fresco delle quattro specie di *Salix* cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=6) dei singoli organi

4.2.2 Contenuto di cromo

Nelle piante trattate con Cr 100 μM il contenuto di cromo nelle radici varia tra 159 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s. del *S. alba* e 220 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s. del *S. fragilis*, mentre nelle piante allevate con Cr 300 μM l'accumulo è superiore a 700 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s. in tutte le specie (Figura 30/A): 780 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s. nelle radici di *S. alba*, 1456 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s. in *S. elaeagnos*, 1430 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s. in *S. fragilis* e 708 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s. in *S. matsudana*.

I valori del contenuto di cromo nelle foglie di piante trattate sono di 2 ordini di grandezza inferiori rispetto ai valori delle radici (Figura 30/B): per il trattamento con Cr 100 μM sono compresi tra 1,65 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s. in *S. matsudana* e 2,79 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s. di *S. elaeagnos*, mentre per il trattamento con Cr 300 μM si passa dai 2,86 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s. del *S. alba* ai 5,72 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s. del *S. fragilis*.

Nelle piante trattate con 100 μM di CrCl_3 non si riscontrano differenze significative rispetto al controllo, mentre per il trattamento con Cr 300 μM le differenze sono significative per tutte le specie tranne che per il *S. elaeagnos*. In particolare, in *S. fragilis* e *S. matsudana* le differenze rispetto al controllo risultano più marcate (Figura 30/B).

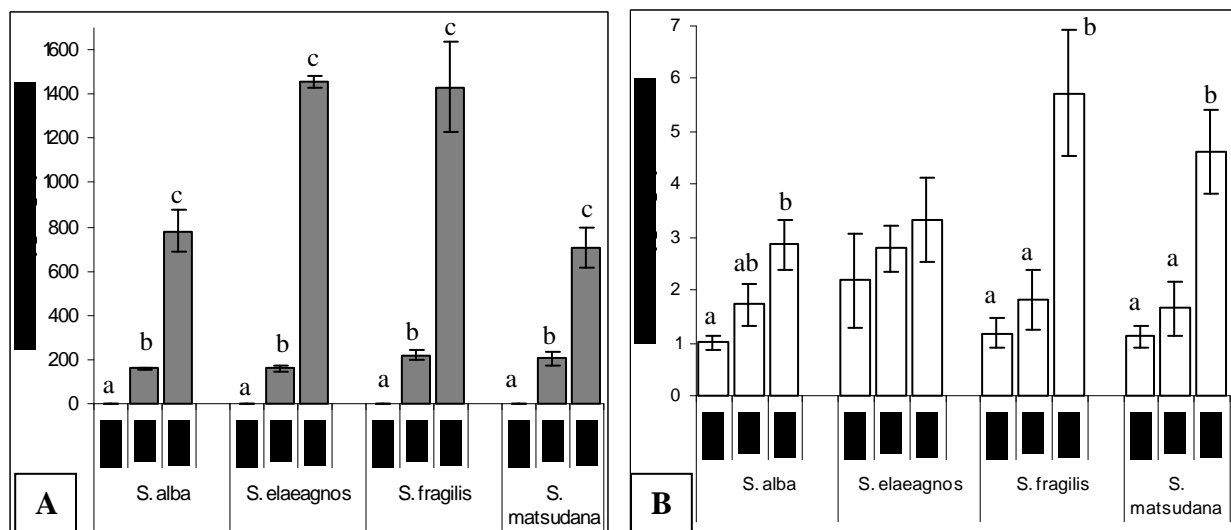


Figura 30 Contenuto di cromo in radici (A) e foglie (B) di ciascuna specie di *Salix* cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=7) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,5$.

Moltiplicando il valore unitario del contenuto in cromo per la corrispondente produzione di biomassa secca di foglie e radici si ottiene la quantità di cromo accumulata per ciascuna specie, si ha quindi una misura della rimozione totale di cromo effettuata da ciascuna specie (Figura 31).

In *S. elaeagnos* i livelli di accumulo di cromo risultano significativamente inferiori alle altre specie per il trattamento con Cr 100 μM che raggiunge solo i 22 μg per pianta, mentre nel trattamento con Cr 300 μM questa specie ne rimuove 189 μg per pianta.

Sembra inoltre che il *S. fragilis*, nel trattamento con Cr 300 μ M, rimuova una quantità di cromo maggiore alle altre specie, sebbene questa differenza sia significativa solo rispetto al *S. elaeagnos* (Figura 31), infatti i valori ottenuti per *S. alba* e *S. matsudana* non differiscono significativamente da quelli delle altre specie.

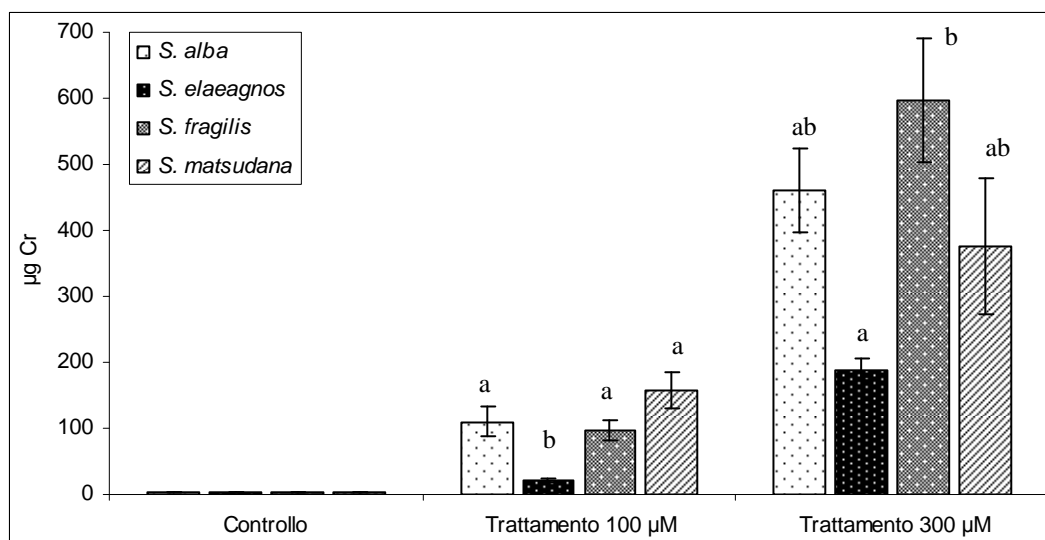


Figura 31 Contenuto totale di Cr per specie e per ciascuna trattamento. Le barre indicano l'errore standard (n=7); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni trattamento, per $\alpha < 0,5$.

La traslocazione percentuale di cromo dalle radici alle foglie, calcolata secondo la formula seguente:

$$\text{Traslocazione \%} = \frac{Cr_{\text{foglie}}}{Cr_{\text{pianta.totale}}} \cdot 100$$

si attesta mediamente attorno all'1% del cromo totale assorbito, tranne che nel caso del *S. elaeagnos* trattato con 100 μ M di CrCl_3 , che mostra un tasso di traslocazione pari a 6,4 % (Tabella 16). Questo divario nel *S. elaeagnos* sembra dovuto alla sua ridotta biomassa, soprattutto radicale, che lo indurrebbe a trasferire alle foglie quantità di cromo maggiori rispetto alle altre specie.

Tabella 16 Percentuale media di traslocazione dall'apparato radicale alle foglie delle quattro specie di *Salix* nei diversi trattamenti con cromo. Le barre indicano l'errore standard (n=6); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni trattamento, per $\alpha < 0,5$

	Traslocazione media (%)	
	100 μ M di CrCl_3	300 μ M di CrCl_3
<i>S. alba</i>	1,06 \pm 0,28 ^a	0,50 \pm 0,11
<i>S. elaeagnos</i>	6,44 \pm 1,97 ^b	0,94 \pm 0,43
<i>S. fragilis</i>	1,19 \pm 0,33 ^a	0,72 \pm 0,18
<i>S. matsudana</i>	1,06 \pm 0,51 ^a	1,22 \pm 0,26

Rapportando il peso secco medio di ciascun trattamento con quello del proprio controllo secondo la formula riportata di seguito:

$$\text{Tolleranza \%} = \frac{p.s._t}{p.s._c} \cdot 100$$

dove:

p.s._t = peso secco (g) delle piante trattate a 100 o 300 µM di CrCl₃

p.s._c = peso secco (g) delle piante di controllo

il risultato dà una misura della tolleranza di ciascuna specie ai trattamenti con cromo (Tabella 17).

I valori più vicini a 100% indicano una maggiore tolleranza. Per il trattamento con 100 µM di CrCl₃ i valori sono compresi tra 82% del *S. elaeagnos* e 128% del *S. matsudana*. Nel caso delle piante trattate con 300 µM di CrCl₃ i valori si attestano attorno all'80% in tutte e quattro le specie. Nel complesso si può affermare che tutte le specie studiate sono piuttosto tolleranti a queste concentrazioni di cromo anche se si osservano risposte differenti all'interno di ciascuna specie: *S. matsudana* è la specie che mostra la più pronunciata riduzione in tolleranza con un 44,7% in meno fra il trattamento con Cr 300 µM rispetto al 100 µM, seguito dal *S. alba* con una diminuzione del 26,62% e dal *S. fragilis* con una diminuzione del 14,27%. Si discosta da questo andamento il *S. elaeagnos* che registra un aumento del 3,32%.

Tabella 17 Percentuale media di tolleranza delle quattro specie di *Salix* ai diversi trattamenti con cromo (n=6); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni trattamento, per $\alpha < 0,5$

	Tolleranza media (%)	
	100 µM di CrCl ₃	300 µM di CrCl ₃
<i>S. alba</i>	110,77 ± 10,07 ^a	84,15 ± 2,40
<i>S. elaeagnos</i>	82,14 ± 19,97 ^{ab}	85,46 ± 21,76
<i>S. fragilis</i>	92,87 ± 6,89 ^b	78,60 ± 8,80
<i>S. matsudana</i>	128,13 ± 6,35 ^c	83,44 ± 7,46

4.2.3 Contenuto di ferro

La quantità di ferro presente nelle radici appare generalmente inferiore per le piante trattate rispetto a quelle di controllo, tranne che per *S. elaeagnos* trattato con 300 µM di CrCl₃ in cui il contenuto di Fe è pari a quello del controllo, con 277 µg g⁻¹ s.s. (Figura 4.19/A). Nel controllo di *S. matsudana* si osservano i valori più alti di contenuto di Fe con 305 µg g⁻¹ s.s., mentre nelle piante di questa specie trattate con Cr si riscontrano valori attorno a 170 µg g⁻¹ s.s. Per quanto riguarda il *S. alba*, i valori sono i più bassi rispetto alle altre specie, con 163 µg g⁻¹ s.s. nelle radici delle piante di controllo e circa 115 µg g⁻¹ s.s. nelle piante trattate. In *S. fragilis* le

differenze non sono significative, sebbene si noti comunque una tendenza alla diminuzione del contenuto in Fe nelle piante trattate rispetto al controllo. (Figura 32/A).

Nelle foglie, le differenze nel contenuto di Fe in *S. alba* e *S. matsudana* ricalcano le significatività riscontrate per le radici. In *S. elaeagnos* e *S. fragilis*, invece, non si riscontrano differenze significative. Anche nei tessuti fogliari i valori di Fe sembrano essere tendenzialmente inferiori nelle piante trattate rispetto a quelle di controllo (Figura 32/B).

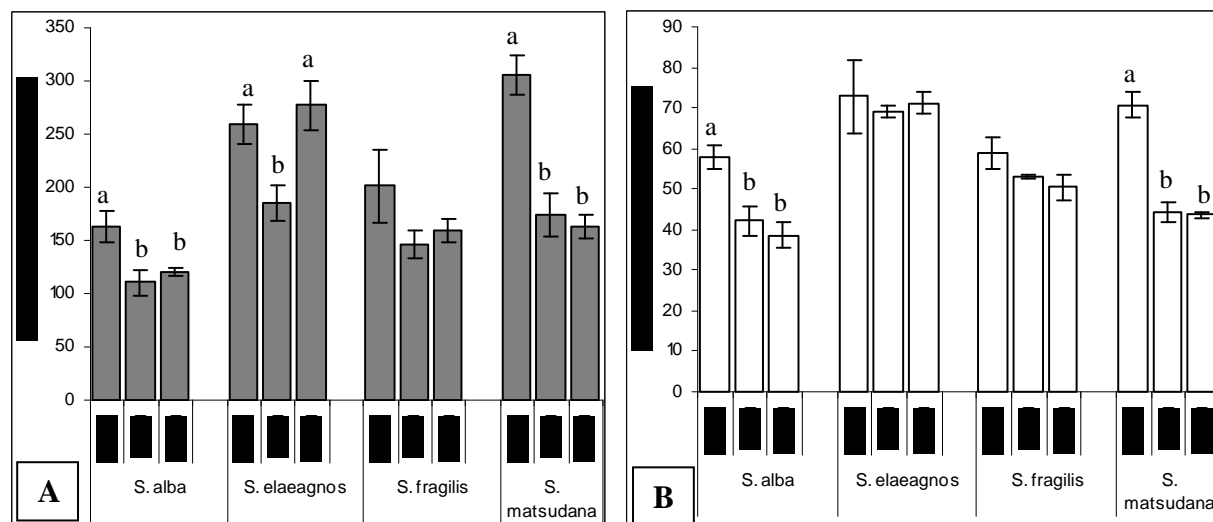


Figura 32 Contenuto di ferro in radici (A) e foglie (B) di ciascuna specie di *Salix* cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=7) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,5$.

4.2.4 Contenuto di zolfo

La quantità di zolfo presente nelle radici non presenta differenze significative tra i vari trattamenti, sebbene nelle piante trattate si noti una generale tendenza alla diminuzione rispetto al controllo (Figura 33/A).

Il contenuto di zolfo nei tessuti fogliari è significativamente inferiore nelle piante di *S. elaeagnos* e *S. matsudana* trattate con 300 μM di CrCl_3 . Si nota comunque un andamento decrescente anche per le altre due specie (Figura 33/B). *S. alba* e *S. matsudana* sono le specie che, rispettivamente, accumulano zolfo in minore quantità la prima e in maggiore quantità la seconda, in tutte le tesi.

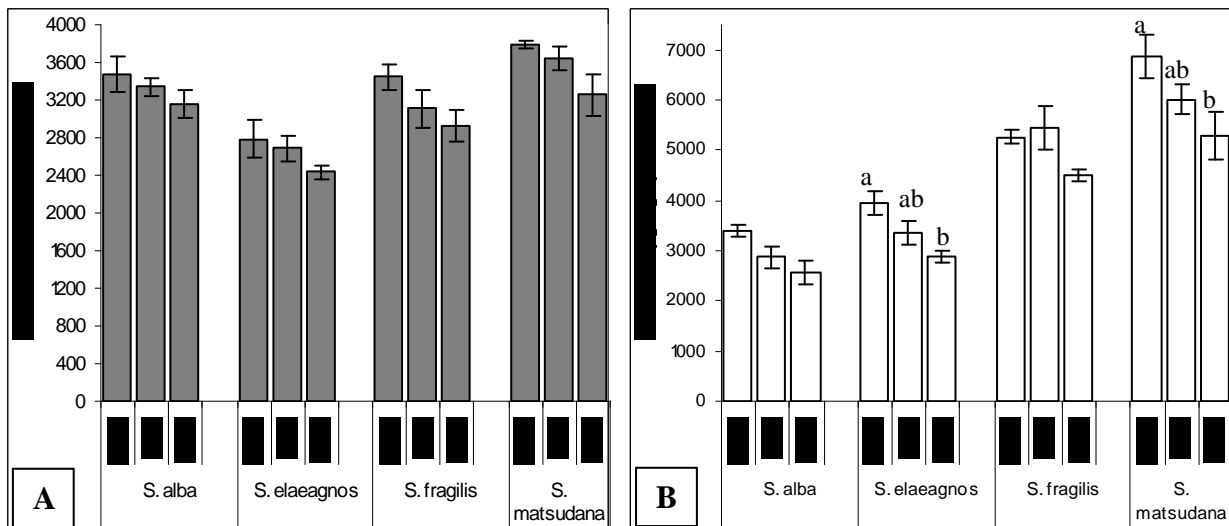


Figura 33 Contenuto di zolfo in radici (A) e foglie (B) di ciascuna specie di *Salix* cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=7) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per < 0,5.

4.2.5 Contenuto di pigmenti fotosintetici

Nell'ambito di ciascuna specie non si osservano differenze significative relativamente al contenuto di *Chla*, di *Chlb* e di clorofilla totale (Figura 34). Si nota però che in *S. elaeagnos* la quantità di clorofilla totale è sempre superiore alle altre specie.

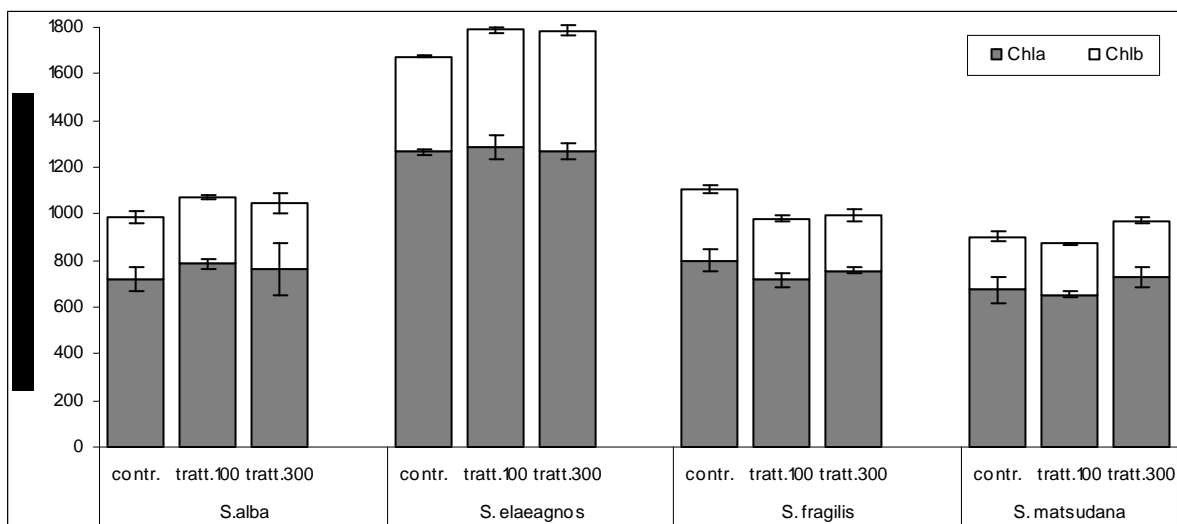


Figura 34 Contenuto di pigmenti fotosintetici delle quattro specie di *Salix* cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=7) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per < 0,5.

Per quanto riguarda tuttavia il rapporto tra *Chla* e *Chlb*, in *S. elaeagnos* le piante trattate con cromo mostrano un rapporto significativamente inferiore al controllo in quanto aumenta la quantità di *Chlb* rispetto al controllo. Viceversa, nelle piante di *S. fragilis* esposte a Cr tale rapporto risulta superiore al controllo, con valori che differiscono significativamente anche tra i

trattamenti (Figura 35). In particolare, per il trattamento 100 μM di CrCl_3 di *S. fragilis* ciò sembra dovuto principalmente alla diminuzione di *Chla* rispetto al controllo, mentre per il trattamento 300 μM di CrCl_3 sembra più decisiva la diminuzione di *Chlb*.

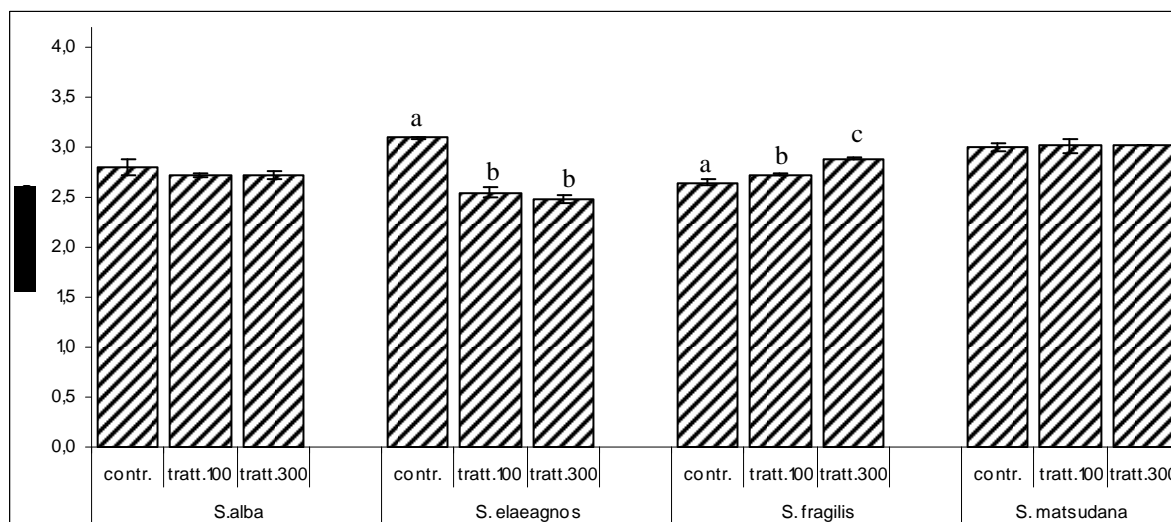


Figura 35 Rapporto clorofilla a/b delle quattro specie di *Salix* cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=7) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $< 0,5$.

4.2.6 Scambi gassosi

Prima dell'inizio dei trattamenti (giorno 0 - Figura 36) il livello medio di traspirazione varia tra 4,4 e 5,8 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ per tutte le specie, ad eccezione del *S. elaeagnos* il cui livello è di 10,1 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$. I valori di traspirazione mostrano un lieve decremento per le prime due date di misurazione per poi stabilizzarsi e raggiungere valori generalmente compresi fra 2 e 3,6 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (giorno 23°). Fa eccezione il *S. elaeagnos* che mostra una più decisa diminuzione passando da 10,1 (giorno 0) a 4,5 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (giorno 23° - Figura 36/B).

Tra tutti, *S. matsudana* è la specie che ha subito il decremento più moderato (Figura 36/D).

Al 9° giorno le piante di *S. alba* trattate con Cr mostrano un livello di traspirazione significativamente inferiore, con valori di 2,88 e 2,67 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ rispettivamente per il trattamento 100 e il trattamento 300 μM di Cr, rispetto a quello delle piante di controllo, mentre al 23° giorno solo il gruppo trattato con Cr 300 μM risulta inferiore al controllo in misura significativa, con 2,73 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 36/A).

In piante di *S. elaeagnos* trattate si hanno valori inferiori al controllo solo in corrispondenza del 2° giorno di trattamento, tuttavia risulta significativa solo la differenza rispetto al trattamento con Cr 300 μM (Figura 36/B).

In *S. fragilis* non vi sono differenze significative a parte al 16° giorno di trattamento in cui le piante trattate con Cr 100 μM mostrano un livello di traspirazione pari a 2,00 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ contro un valore di controllo di 2,7 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 36/C).

In *S. matsudana* differenze significative si osservano al 2° e 9° giorno. Al 2° giorno sono le piante del trattamento con Cr 100 μM ad avere un valore inferiore al controllo rispettivamente con 3,7 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 5,6 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Per il 9° giorno le piante trattate con Cr 300 μM assumono una traspirazione superiore rispetto al controllo con valori corrispondenti di 3,5 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e di 2,5 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 36/D).

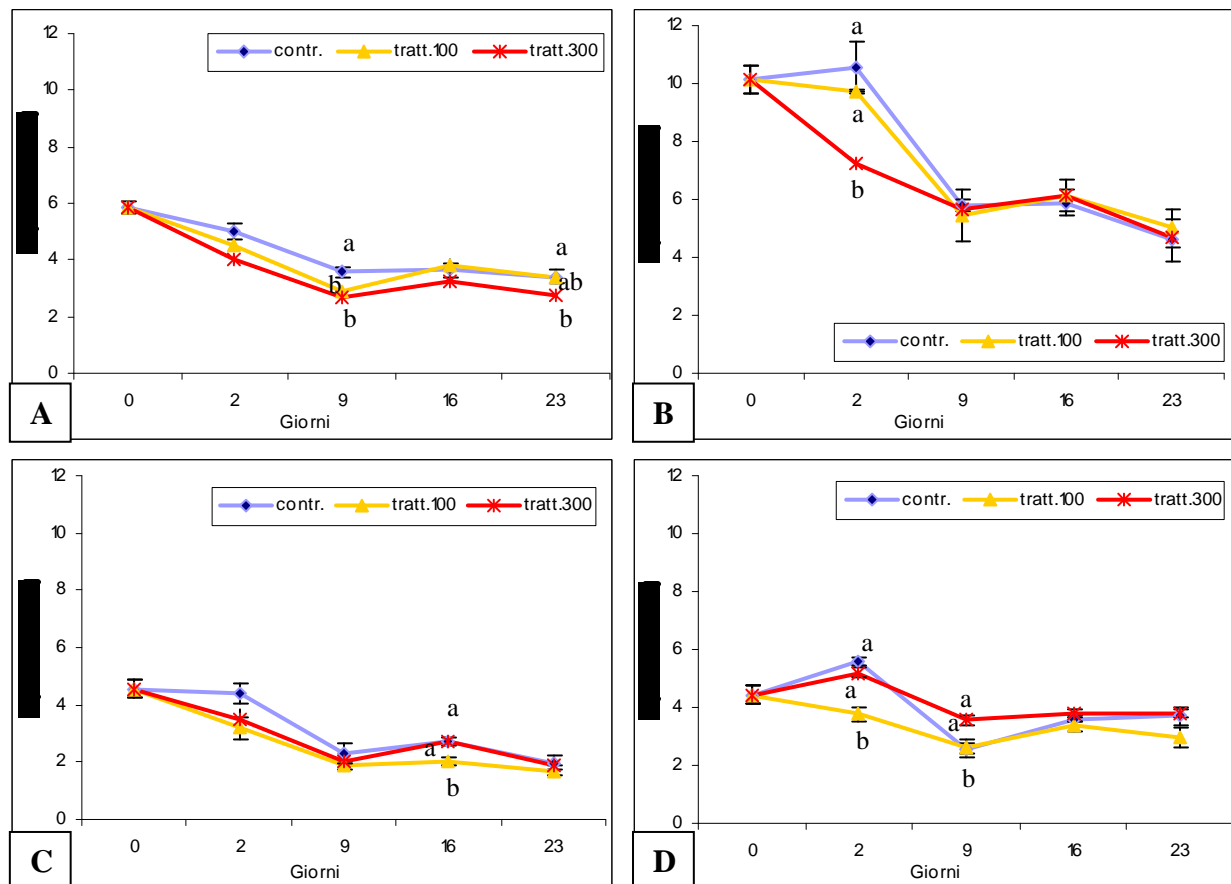


Figura 36 Andamento della traspirazione in *S. alba* (A), *S. elaeagnos* (B), *S. fragilis* (C) e *S. matsudana* (D). Piante cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n = 12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.

La conduttanza stomatica (g_s) in piante di controllo di *S. alba* (Figura 37/A) è compresa entro i valori di 0,65 e 0,37 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e si mantiene a livelli superiori a quelli delle piante trattate dal 2° al 23° giorno anche se risulta esserci una differenza significativa solo al 9° giorno. Sempre in *S. alba* i livelli di conduttanza stomatica per le piante dei due trattamenti assumono valori molto simili in tutte le date di campionamento e compresi fra 0,51 e 0,30 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

In *S. elaeagnos* (Figura 37/B) l'andamento della conduttanza stomatica appare meno costante che nella specie precedente, il valore delle piante di controllo è superiore a quello delle piante trattate con Cr 300 μM in corrispondenza del secondo giorno ma è molto simile a quello delle piante trattate con Cr 100 μM . Nel campionamento del 9° giorno invece la gs delle piante di controllo risulta significativamente inferiore rispetto a quello di entrambi i trattamenti assumendo il valore più basso registrato per questa specie e pari a 0,30 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

S. fragilis, (Figura 37/C) presenta un andamento di gs piuttosto regolare e privo di differenze significative per tutte e tre le tesi con valori compresi fra 0,17 e 0,37 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Le piante di *S. matsudana* trattate con 300 μM di CrCl_3 mostrano valori di conduttanza stomatica costantemente superiori al trattamento con 100 μM di CrCl_3 , mentre sono significativamente superiori al controllo solo al 9° giorno. Invece, le piante trattate con 100 μM di CrCl_3 assumono valori inferiori al controllo al 2° giorno (Figura 37/D). In complesso la gs per *S. matsudana* risulta compresa entro valori di 0,29 e 0,08 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ che la rendono la specie con la minore conduttanza stomatica rispetto alle quattro specie considerate.

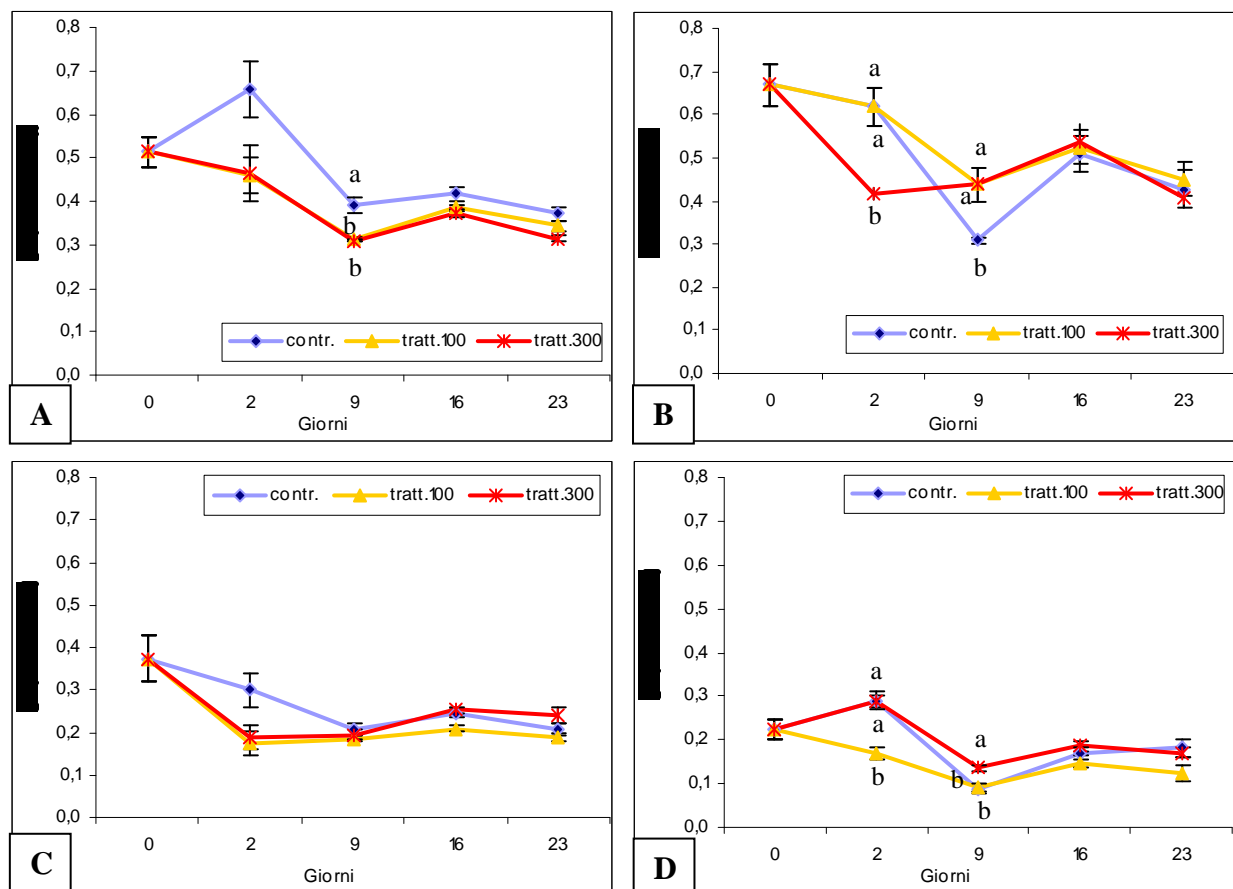


Figura 37 Andamento della conduttanza stomatica in *S. alba* (A), *S. elaeagnos* (B), *S. fragilis* (C) e *S. matsudana* (D). Piante cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard ($n = 12$); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.

4.2.7 Attività fotosintetica

In *S. alba* i valori di fotosintesi delle piante trattate si discostano dal controllo solo al 9° giorno di trattamento nel quale assumono valori inferiori al controllo; per tutte e tre le tesi i valori di attività fotosintetica sono compresi fra 10,56 e 7,39 mmol CO₂ m⁻² s⁻¹ (Figura 38/A).

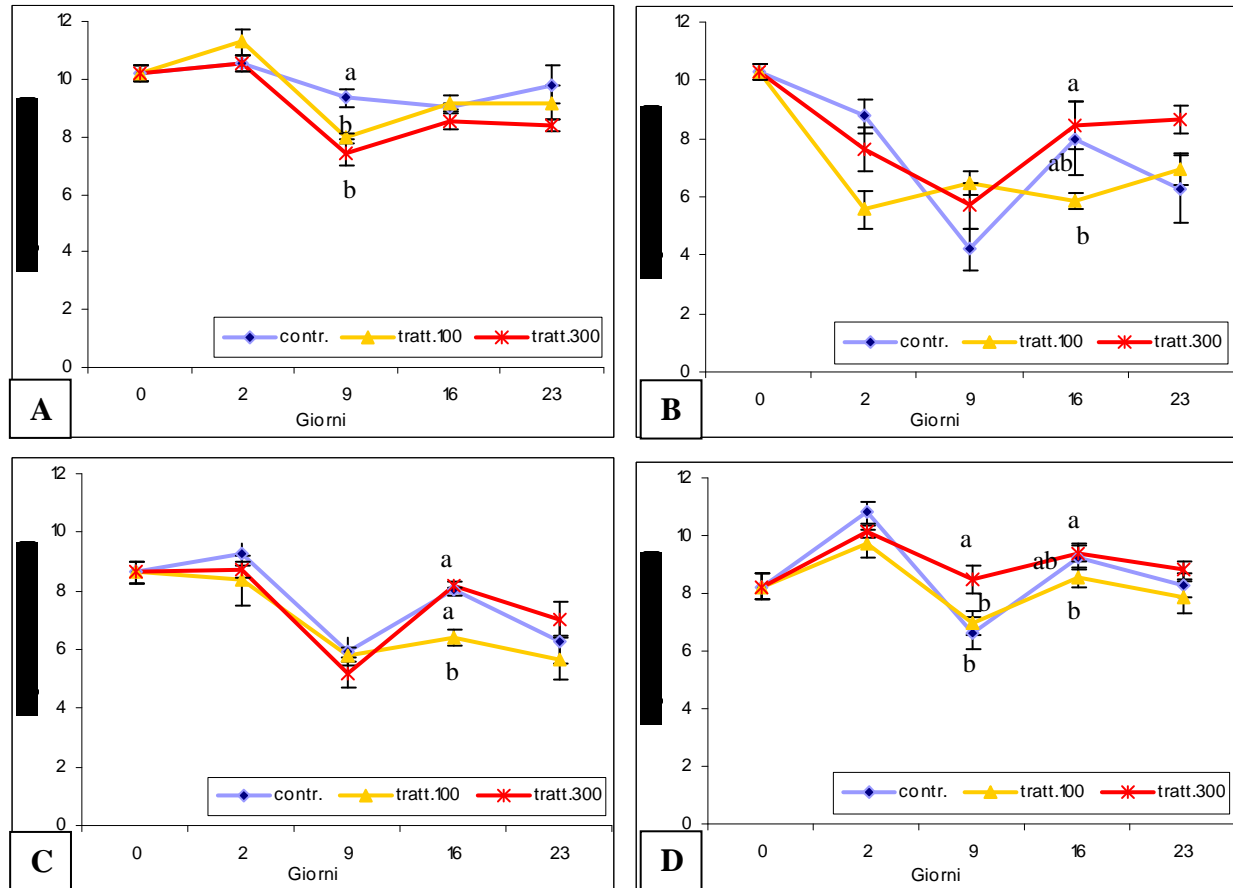


Figura 38 Andamento dell'attività fotosintetica in *S. alba* (A), *S. elaeagnos* (B), *S. fragilis* (C) e *S. matsudana* (D). Piante cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.

Nelle piante di *S. elaeagnos* al 16° giorno, i due gruppi di piante trattate non mostrano differenze significative rispetto al controllo bensì differiscono significativamente tra di loro, in quanto le piante trattate con Cr 100 μM hanno valori di 5,84 mmol CO₂ m⁻² s⁻¹ mentre quelle trattate con Cr 300 μM raggiungono 8,48 mmol CO₂ m⁻² s⁻¹ (Figura 38/B). Nella stessa specie, in piante sottoposte a trattamento, si osservano al 9° e al 23° giorno valori di fotosintesi superiori rispetto al controllo anche se tale differenza non è significativa.

I valori del livello di fotosintesi in *S. fragilis* sono significativamente inferiori al controllo solo al 16° giorno per le piante trattate con Cr 100 μM. Nel complesso questa specie assume valori compresi fra 9,23 e 5,19 mmol CO₂ m⁻² s⁻¹ (Figura 38/C).

In *S. matsudana* (Figura 38/D), invece, si notano differenze significative rispetto al controllo al 9° giorno per il trattamento Cr 300 μM, mentre al 16° giorno i due trattamenti non differiscono

significativamente dal controllo bensì l'uno rispetto all'altro. Gli andamenti dei grafici in Figura 4.25/C e 4.25/D sono molto simili agli andamenti della traspirazione.

4.3 Allevamento di 4 specie di salice cresciute in terreno

4.3.1 Analisi del terreno

Le analisi di laboratorio eseguite sul terreno ne hanno permesso la identificazione come “suolo franco” (Tabella 18). L'analisi del pH, pari a 8,3 ha evidenziato l'alcalinità del terreno, nel quale l'assorbimento di Ca e Mg aumenta, quella di S e K è ottimale, mentre diminuisce per macroelementi come N e P e per microelementi come Zn, Fe, Mn, Cu e B (Benton, 2005; Marschner, 1995).

Il terreno è risultato mediamente dotato in sostanza organica e scarsamente dotato in calcare. Per quanto riguarda macro e microelementi il terreno è normalmente dotato per sodio e magnesio mentre risulta quantitativamente basso il contenuto in calcio. Il contenuto in ferro, anche se di poco, rientra nell'intervallo dei valori medi percentuali (0,5 – 4%) dei micronutrienti nei suoli, come descritto da Violante (2005).

Il terreno risulta avere un contenuto in Cr normale per un terreno non contaminato (Zayed e Terry, 2003).

Tabella 18 Analisi chimico-fisiche del terreno

Parametro	Valore
Tessitura	Sabbia 54% - limo 24% - argilla 22%. Franco (classificazione USDA)
pH	8,3 – alcalino
Carbonio organico	0,93 g/kg
Sostanza organica	15 g/kg - mediamente dotato
Calcare totale	16,96 g/kg - poco calcareo
Na ⁺ , K ⁺ , Mg ⁺ e Ca ⁺	K ⁺ => nr mg/Kg s.s. Na ⁺ => 30 mg/Kg s.s. Mg ⁺ => 2314 mg/Kg s.s. Ca ⁺ => 188 mg/Kg s.s.
C.S.C.	16,81 cmol/Kg - media
Cr e Fe	Cr => 4,62 mg/Kg s.s. Fe => 5808,9 mg/Kg s.s.

4.3.2 Crescita delle piante

Le piante delle quattro specie di salice sono state allevate in vasi con il terreno sopra descritto e addizionato di Cr in quantità pari a 2,6 mg Kg⁻¹ terreno.

Nel primo prelievo, ad Ottobre 2005 la biomassa fresca totale non presenta differenze significative fra controllo e trattamento all'interno di ciascuna delle quattro specie (Figura 39). Tuttavia il peso fresco appare leggermente inferiore nelle piante trattate rispetto a quelle di controllo per *S. matsudana* e *S. alba* mentre per *S. elaeagnos* e *S. fragilis* sono le piante di controllo ad avere biomassa inferiore rispetto al trattato. Confrontando i pesi relativi ad ogni organo vi sono differenze significative solo nelle radici di *S. alba*, dove le piante trattate presentano un peso fresco significativamente inferiore a quelle di controllo.

Nel secondo prelievo, a Giugno 2006 (Figura 39/B), la biomassa fresca totale in *S. alba* e *S. fragilis* non presenta alcuna differenza fra trattato e controllo, né per la biomassa totale né confrontando ciascun organo. Al contrario evidenziano differenze significative in *S. elaeagnos* e *S. matsudana* dove le piante trattate dimostrano un maggior accrescimento rispetto a quelle di controllo soprattutto grazie ad un aumento della biomassa radicale e dei fusti. In *S. elaeagnos* le differenze sono significative anche in radici, fusto e foglie. Confrontando fra loro le specie risulta come *S. fragilis* e *S. matsudana* abbiano raggiunto una biomassa significativamente superiore a quella di *S. alba* per entrambe le tesi.

Nel terzo prelievo, ad Ottobre 2006 (Figura 39/C), si osserva lo stesso andamento del secondo prelievo, con differenze significative nella biomassa sempre in *S. elaeagnos* e *S. matsudana* dove le piante trattate dimostrano un maggior accrescimento rispetto a quelle di controllo. Si differenziano invece *S. alba* e *S. fragilis* dove vi è, anche se di poco, un minor accrescimento delle piante trattate rispetto a quelle di controllo.

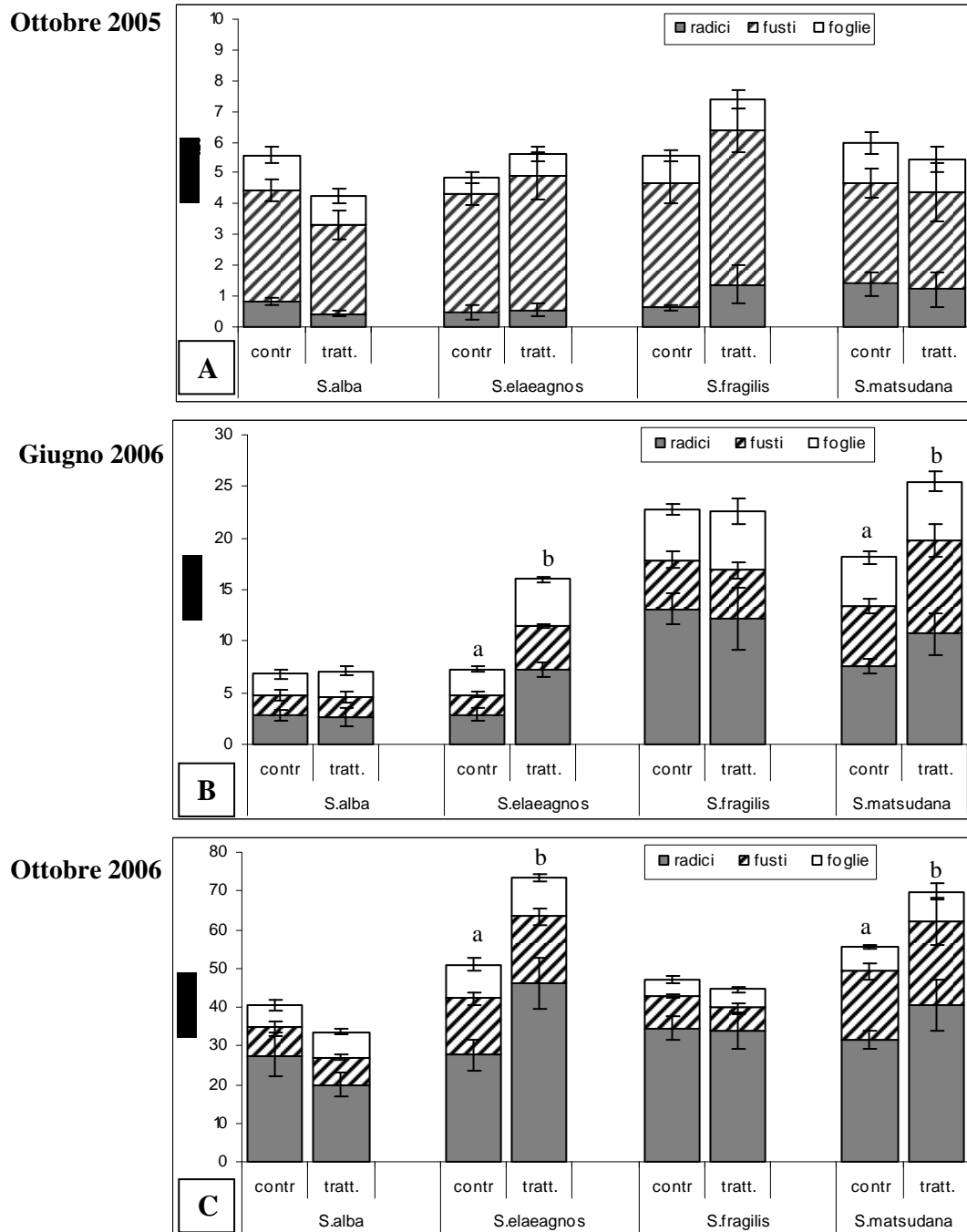


Figura 39 Peso fresco medio delle piante prelevate in ottobre 2005 (A), in giugno 2006 (B) e ottobre 2006 (C) delle quattro specie di *Salix* cresciute in terreno. Le barre indicano l'errore standard (n=6) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative nella biomassa totale, all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,05$.

Per quanto riguarda il peso secco, a Ottobre 2005 (Figura 40/A), non si rilevano differenze significative all'interno di ciascuna specie. Tuttavia in *S. elaeagnos* e *S. fragilis* il peso secco delle piante trattate supera di poco quello delle piante di controllo, il contrario avviene in *S. matsudana* e *S. alba*. In quest'ultima specie si ha un peso secco significativamente inferiore a quelle di controllo per la biomassa radicale.

A Giugno 2006 (Figura 40/B) le differenze sono significativamente maggiori nel peso secco delle piante trattate rispetto a quello delle piante di controllo in radici, fusti, foglie e biomassa totale di *S. elaeagnos*. Anche *S. matsudana* presenta un aumento nella biomassa delle piante trattate rispetto al controllo anche se non significativa. L'unica specie che presenta una leggera diminuzione nel peso secco delle piante trattate è il *S. alba*.

Ad Ottobre 2006 (Figura 40/C) *S. alba* e *S. fragilis* presentano una biomassa secca molto simile fra trattato e controllo mentre anche in questo prelievo le piante trattate di *S. elaeagnos* e *S. matsudana* dimostrano un maggior accrescimento di quelle di controllo sebbene significativo solo in *S. elaeagnos*.

Valutando nel complesso l'esperimento si nota che le differenze fra trattato e controllo diventano più marcate, e quindi significative, a partire da Giugno 2006 e perciò a undici mesi e mezzo di distanza dal trattamento con cromo mentre la prima epoca di prelievo, avvenuta a tre mesi e mezzo di distanza dal trattamento, non manifesta differenze significative.

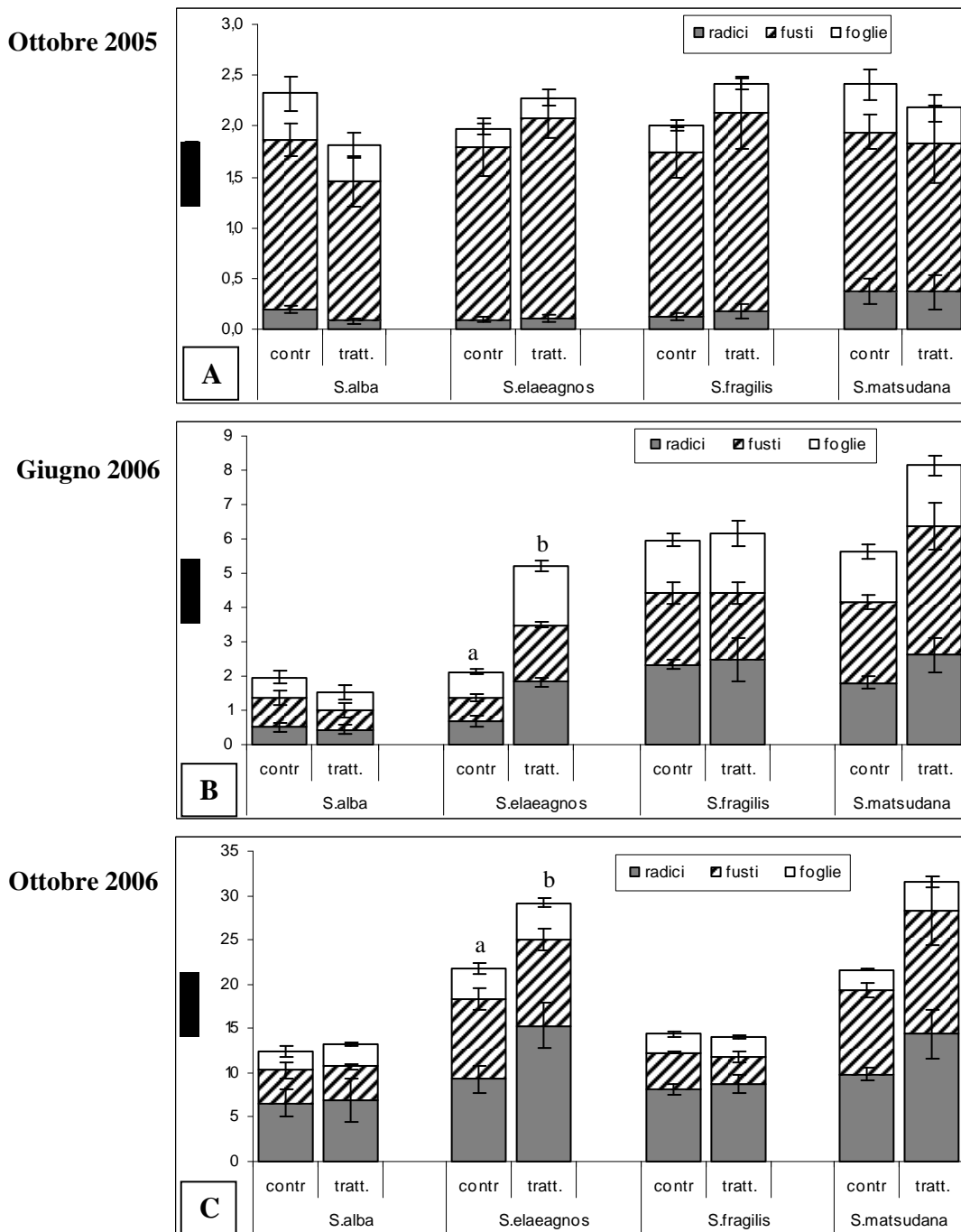


Figura 40 Peso secco medio delle piante prelevate in ottobre 2005 (A), in giugno 2006 (B) e ottobre 2006 (C) delle quattro specie di *Salix* cresciute in terreno. Le barre indicano l'errore standard (n=6) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative nella biomassa totale, all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,05$.

Per quanto riguarda il rapporto tra peso secco e peso fresco totale non si sono evidenziate differenze significative tra le piante trattate e il controllo all'interno di ciascuna specie e per le varie epoche di prelievo (Figura 41). Tuttavia il rapporto in *S. elaeagnos* è significativamente superiore a quello delle altre specie in Ottobre 2005, mentre in Ottobre 2006 sia *S. elaeagnos* che *S. matsudana* hanno un rapporto superiore rispetto a quello delle piante di *S. fragilis*.

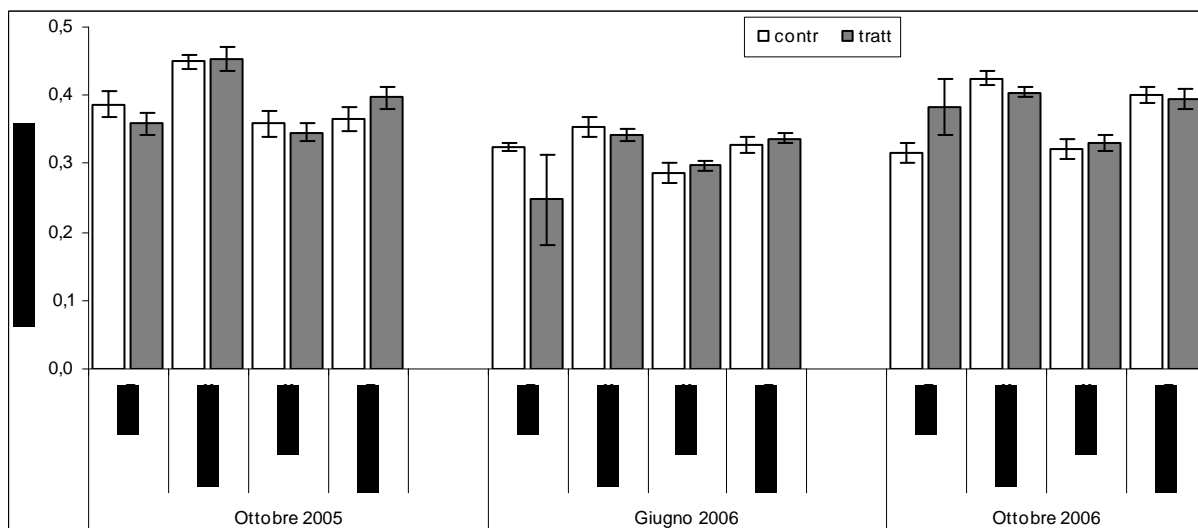


Figura 41 Rapporto tra peso secco e peso fresco delle quattro di *Salix* cresciute in terreno. Le barre indicano l'errore standard (n=6) della biomassa totale.

4.3.3 Contenuto di cromo in piante e terreno

Le piante trattate presentano maggiori contenuti di cromo rispetto a quelle di controllo, sia nelle foglie che nelle radici, in tutti e tre i prelievi effettuati. Tuttavia gli ordini di grandezza per l'accumulo sono molto differenti per i due organi, in effetti il contenuto di cromo in radici arriva ad essere da 50 a 100 volte superiore rispetto a quello stoccato nelle foglie (Figura 42).

A Ottobre 2005 i valori di cromo nell'apparato radicale delle piante sottoposte a trattamento sono compresi tra 352,3 e 699 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s rispettivamente del *S. alba* e del *S. fragilis* mentre i valori delle radici di controllo sono compresi fra 12 e i 15 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s rispettivamente per *S. matsudana* e *S. elaeagnos* (Figura 42/A). L'accumulo nelle foglie del trattato è compreso fra 6,4 e 16,1 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s. rispettivamente del *S. alba* e *S. elaeagnos* mentre i valori per le foglie di controllo sono comprese fra 2,7 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s per *S. alba* e 3,4 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s per *S. fragilis* (Figura 4.42/B).

A Giugno 2006 i valori di cromo, sia in radici che foglie, sono decisamente inferiori rispetto a quelli osservati nel primo prelievo. Infatti il contenuto in cromo nelle radici trattate è compreso tra i 229,5 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s del *S. elaeagnos* ed i 422 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s del *S. fragilis*, mentre nelle radici di controllo il valore è compreso fra 4 e 9,8 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s rispettivamente per *S. elaeagnos* e *S. matsudana* (Figura 42/C). In foglie il valore del trattato è compreso fra 2,5 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s per il *S. fragilis* e 3,9 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s per il *S. alba* mentre i valori di controllo sono inclusi fra 0,9 e 2,3 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s rispettivamente per *S. fragilis* e *S. alba* (Figura 42/D).

A Ottobre 2006 i valori di cromo sono compresi tra 144 e 335 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s nelle radici del trattato rispettivamente per *S. elaeagnos* e *S. fragilis* mentre nelle radici di controllo il valore è

compreso fra 5 e 7 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s (Figura 42/E). Nelle foglie del trattato il contenuto in cromo è di circa 5 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s per tutte le specie mentre per il controllo è incluso fra 2,3 e 4,6 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s rispettivamente del *S. fragilis* e del *S. elaeagnos* (Figura 42/F).

Prendendo in esame tutti e tre i prelievi risulta evidente la diminuzione di concentrazione nei tessuti analizzati dei prelievi di Giugno e Ottobre 2006 rispetto a quello di Ottobre 2005.

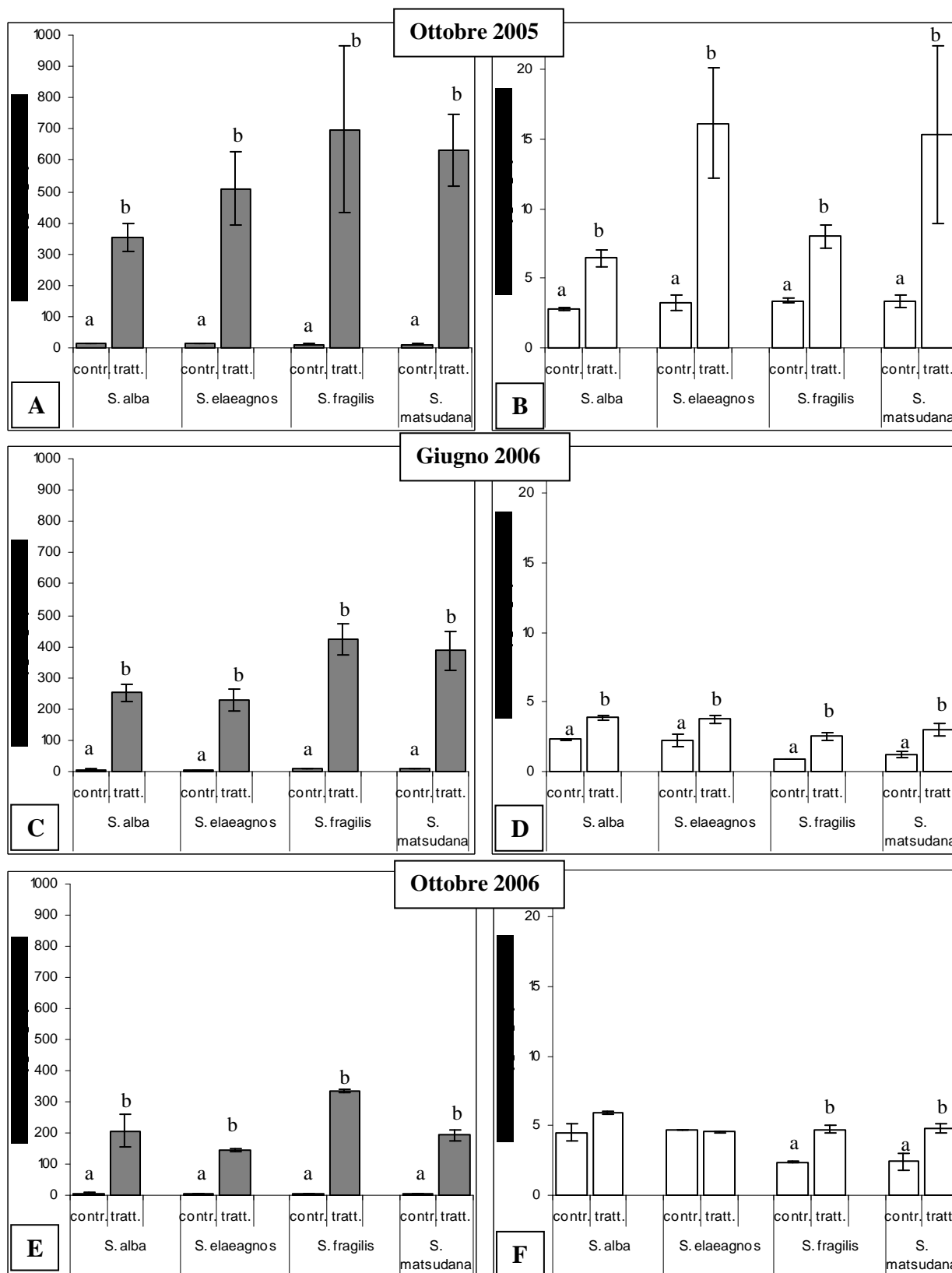


Figura 42 Contenuto medio di cromo in radici (A) e foglie (B) delle piante prelevate in ottobre 2005, in radici (C) e foglie (D) di giugno 2006, e in radici (E) e foglie (F) di ottobre 2006 delle quattro specie di *Salix* cresciute in terreno. Le barre indicano l'errore standard (n=6); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,05$.

La figura 43 mostra l'immobilizzazione di cromo totale effettuata da ciascuna specie. Nelle tre le epoche di campionamento le specie che raggiungono i migliori risultati in termini di

capacità di stoccaggio di cromo e produzione di biomassa risultano *S. fragilis* e *S. matsudana*; tuttavia le differenze con le altre due specie non risultano significative ne terzo prelievo.

A Giugno 2006 la quantità media di cromo immobilizzata nei tessuti delle quattro specie è pari a 1026 μg in *S. fragilis*, 851,4 μg in *S. matsudana*, 158 μg in *S. elaeagnos* e 77 μg in *S. alba* (Figura 43).

Ad Ottobre 2006 l'andamento è simile a quello riscontrato per Giugno anche se i valori di cromo stoccato risultano superiori soprattutto grazie all'aumento di biomassa raggiunto durante la stagione vegetativa. In questo prelievo la quantità media di cromo immobilizzata nei suoi tessuti delle quattro specie è pari a 2950 μg in *S. fragilis*, 2803 μg in *S. matsudana*, 2237 μg in *S. elaeagnos* e 1790 μg in *S. alba* (Figura 43).

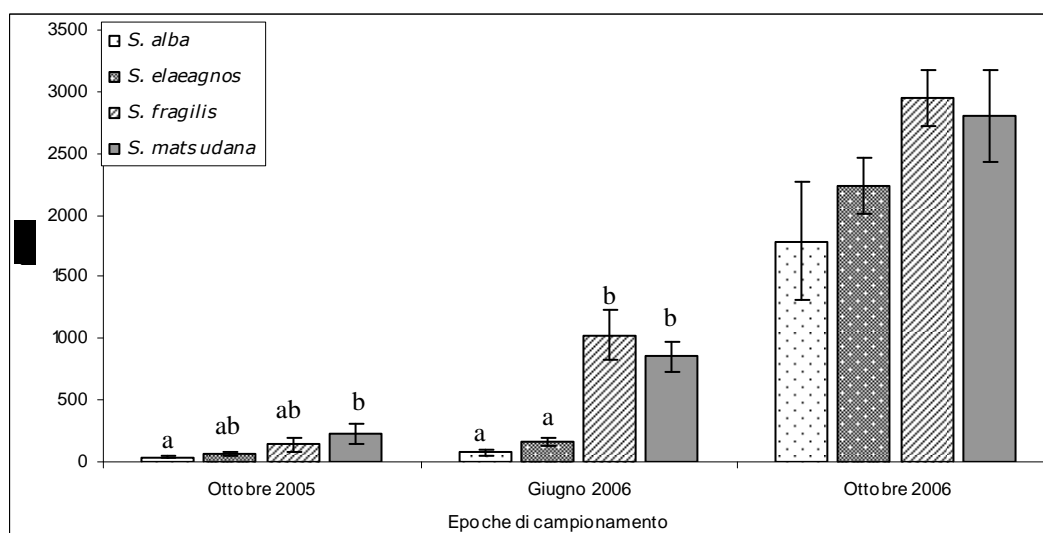


Figura 43 Contenuto totale di Cr delle piante cresciute in terreno, suddivise per specie e per ciascuna epoca di prelievo. Le barre indicano l'errore standard (n=7); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni epoca di prelievo, per $\alpha < 0,5$.

In tabella 19 è riportata la percentuale di traslocazione di cromo dalle radici alle foglie. Risulta subito evidente un calo nella traslocazione tra il primo prelievo e quelli successivi. A ottobre 2005 infatti il tasso di traslocazione è compreso fra il 3,9 e il 6,2% mentre scende a valori compresi fra 0,4 e 1,1% nell'ultima epoca di campionamento.

All'interno del primo prelievo non si riscontrano differenze significative fra le specie mentre a giugno e ottobre 2006 *S. alba* e *S. elaeagnos* traslocano significativamente di più rispetto al *S. fragilis* che risulta, nel lungo periodo, la specie con la minore capacità di traslocazione fra le quattro analizzate.

Tabella 19 Percentuale media di traslocazione dall'apparato radicale alle foglie delle quattro specie di *Salix*, cresciute in terreno per ciascuna epoca di prelievo.; lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni epoca di prelievo, per $\alpha < 0,5$

	Traslocazione media percentuale (%)		
	Ottobre 2005	Giugno 2006	Ottobre 2006
<i>S. alba</i>	6,2 ± 0,85	1,8 ± 0,257 ^a	1,1 ± 0,21 ^a
<i>S. elaeagnos</i>	4,3 ± 1,29	2,1 ± 0,42 ^a	0,9 ± 0,11 ^a
<i>S. fragilis</i>	6,1 ± 1,39	0,5 ± 0,10 ^b	0,4 ± 0,05 ^b
<i>S. matsudana</i>	3,9 ± 0,86	0,8 ± 0,14 ^{ab}	0,6 ± 0,08 ^{ab}

La tabella 20 mostra la variazione del contenuto medio di cromo nel terreno nel periodo ottobre 2005÷ottobre 2006. Il contenuto nel terreno dei vasi dove sono state allevate le 4 specie di salice viene confrontato con quello riscontrato nel terreno di controllo, ossia terreno sottoposto al medesimo trattamento con cromo e pari regime di adacquamento ma non inerbito e quindi sottoposto alla sola perdita di cromo dovuta all'effetto della lisciviazione dell'acqua nel terreno.

In tutte e tre le epoche di campionamento si nota come la presenza dei salici abbia contribuito all'abbassamento del contenuto totale di cromo nel terreno stesso. Tale effetto risulta più marcato nel secondo e terzo prelievo dove si ha una variazione media del contenuto in cromo rispettivamente pari a -23,7% e -26,2% mentre nel primo prelievo la diminuzione risulta di -8,9%.

Tabella 20 Variazione percentuale media di Cr nel terreno trattato e suddiviso per le specie di salici su di esso cresciute rispetto al terreno trattato ma non inerbito detto "Controllo + Cr".

Prelievo	Specie	Cr TOT nel terreno (mg/Kg)	Variazione % di Cr nel terreno	Variazione media %
Ottobre 2005	<i>S. alba</i>	12,23	-18,56	-8,9 ± 3,6
	<i>S. elaeagnos</i>	14,31	-1,30	
	<i>S. fragilis</i>	13,45	-7,78	
	<i>S. matsudana</i>	13,42	-8,07	
	controllo + Cr	14,50		
Giugno 2006	<i>S. alba</i>	11,00	-24,55	-23,7 ± 4,6
	<i>S. elaeagnos</i>	11,42	-19,97	
	<i>S. fragilis</i>	12,00	-14,17	
	<i>S. matsudana</i>	10,07	-36,04	
	controllo + Cr	13,70		
Ottobre 2006	<i>S. alba</i>	9,99	-25,43	-26,2 ± 1,4
	<i>S. elaeagnos</i>	9,90	-26,53	
	<i>S. fragilis</i>	9,65	-29,79	
	<i>S. matsudana</i>	10,17	-23,14	
	controllo + Cr	12,53		

4.3.4 Contenuto di ferro

La quantità di ferro contenuta nelle foglie non presenta un andamento omogeneo fra le tre epoche di campionamento. Infatti mentre nel campionamento di ottobre 2005 sono le foglie di controllo ad avere un contenuto in Fe più elevato rispetto al trattato, nei successivi campionamenti, di giugno e ottobre 2006, sono generalmente le piante trattate a contenere più ferro. Infatti a ottobre 2005 le piante di controllo riportano valori maggiori rispetto a quelle di trattamento in tutte e quattro le specie anche se la differenza risulta significativa solo per *S. alba* e *S. matsudana* (Figura 44/B). A giugno 2006 invece, sono le piante trattate a contenere più ferro, con differenze significative in *S. alba* e *S. fragilis* (Figura 44/D). Anche a ottobre 2006, le piante trattate presentano un maggior contenuto in Fe rispetto alle piante di controllo in *S. alba*, *S. fragilis* e *S. matsudana*, anche se per quest'ultima la differenza non è significativa. Viceversa in *S. elaeagnos* sono le piante di controllo ad accumulare più Fe di quelle di trattate in modo significativo (Figura 44/F).

Confrontando il contenuto in Fe ottenuto nelle foglie all'interno di ciascuna specie fra le tre epoche di prelievo (Figura 44/B/D/F) si nota un minor contenuto di Fe nel campionamento di giugno 2006 in tutte le specie rispetto ai due prelievi di ottobre. In effetti a giugno 2006 i valori sono compresi fra 160 e 417 $\mu\text{g Fe g}^{-1}$ s.s., a ottobre 2005 sono compresi fra 332 e 955 $\mu\text{g Fe g}^{-1}$ s.s. e a ottobre 2006 sono compresi fra 472 e 1154 $\mu\text{g Fe g}^{-1}$ s.s.

La quantità di ferro presente nelle radici (Figura 44/A/C/E) appare generalmente inferiore nelle piante trattate rispetto a quelle di controllo in tutti e tre i prelievi. In particolare, a Ottobre 2005 nelle piante trattate vi è un accumulo di ferro minore rispetto a quelle di controllo, ma la loro differenza è significativa solo per *S. alba* e *S. matsudana* con valori del trattato rispettivamente di 2801 e 2571 $\mu\text{g Fe g}^{-1}$ s.s. contro i valori dei rispettivi controlli di 4410 e 5708 $\mu\text{g Fe g}^{-1}$ s.s. (Figura 44/A).

Nel secondo prelievo, non si hanno differenze significative tra le foglie delle piante trattate e quelle di controllo all'interno di ciascuna specie (Figura 44/C). Il contenuto in Fe più alto si ha nelle radici di controllo del *S. fragilis* con 4552 $\mu\text{g Fe g}^{-1}$ s.s. mentre quello più basso si ha nella radici del trattato del *S. alba* con 2069 $\mu\text{g Fe g}^{-1}$ s.s.

Anche a ottobre 2006 si osserva che le piante di controllo presentano nelle foglie contenuti di ferro maggiori di quelle trattate sebbene le differenze non siano significative (Figura 44/E). Il contenuto in Fe più alto si ha nelle radici di controllo del *S. alba* con 3569 $\mu\text{g Fe g}^{-1}$ s.s. quello più basso si ha nella radici del trattato del *S. matsudana* con 2096 $\mu\text{g Fe g}^{-1}$ s.s.

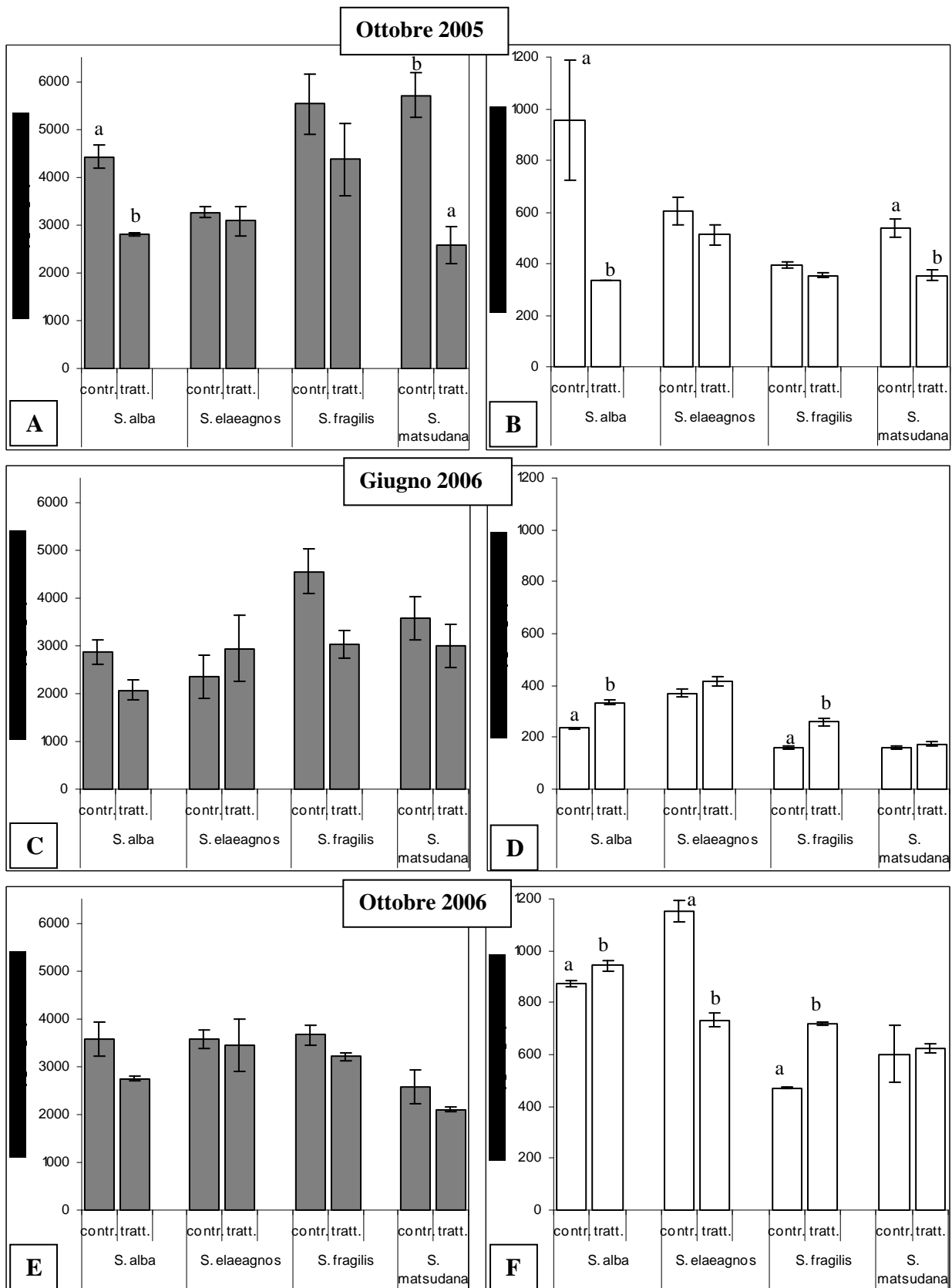


Figura 44 Contenuto medio di ferro in radici (A) e foglie (B) delle piante prelevate in ottobre 2005, in radici (C) e foglie (D) di giugno 2006, e in radici (E) e foglie (F) di ottobre 2006 delle quattro specie di *Salix* cresciute in terreno. Le barre indicano l'errore standard (n=6); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,05$.

4.3.5 Contenuto in pigmenti fotosintetici

Ad Ottobre 2005 si può osservare un maggior contenuto in clorofilla totale (*Chla* + *Chlb*) nelle piante trattate rispetto a quelle di controllo anche se tale differenza è significativa solo per *S. alba*. Anche prendendo in considerazione singolarmente *Chla* e *Chlb* le differenze sono significativamente superiori nelle piante trattate rispetto a quelle di controllo solo in *S. alba* (Figura 45/A).

A Giugno 2006 il contenuto totale in clorofilla nelle piante trattate è significativamente superiore a quelle di controllo in tutte e quattro le specie. Anche il contenuto in *Chla* è risultato significativamente maggiore nelle piante trattate rispetto a quelle di controllo in tutte e quattro le specie, mentre la *Chlb* del trattato risulta superiore al controllo solo in *S. alba* (Figura 45/B).

Nel terzo prelievo, ad Ottobre 2006, i contenuti di clorofilla totale non presentano differenze significative tra le piante trattate e quelle di controllo anche se per *S. elaeagnos*, *S. fragilis* e *S. matsudana* si nota un valore medio del trattato superiore a quello di controllo (Figura 45/C).

Il rapporto *Chla* su *Chlb* non evidenzia differenze significative ad Ottobre 2005 e 2006 con valori compresi fra 1,9 e 2,4 nel primo prelievo e fra 2,2 e 2,7 nell'ultimo prelievo (Figura 45/B/D/F).

A Giugno 2006 le piante di *S. elaeagnos*, *S. fragilis* e *S. matsudana* trattate con Cr presentano un rapporto *Chla* su *Chlb* maggiore rispetto a quelle di controllo mentre in *S. alba* avviene il contrario. Si osservano differenze significative in *S. alba* e in *S. matsudana*.

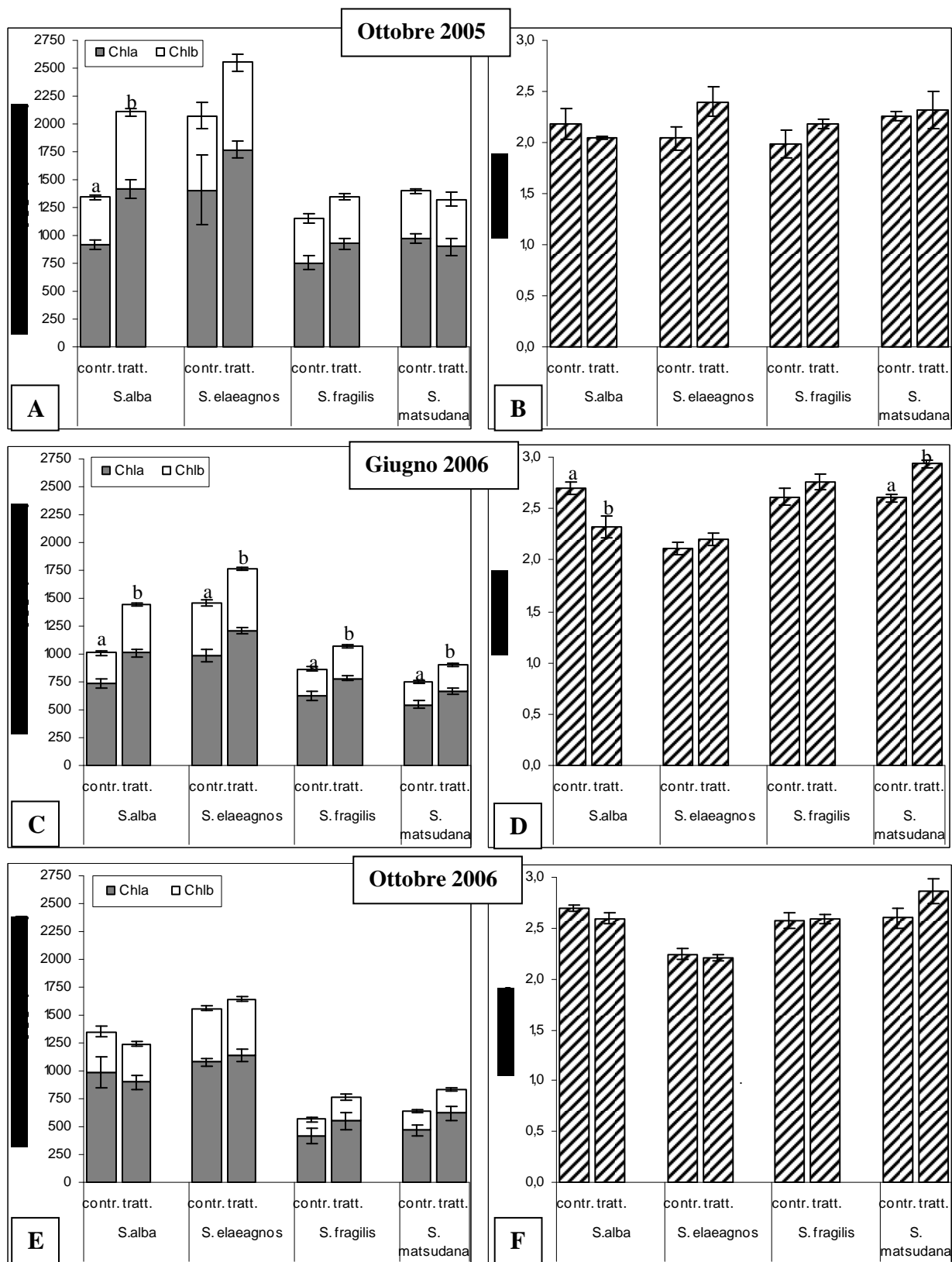


Figura 45 Contenuto medio di pigmenti fotosintetici delle piante prelevate in ottobre 2005 (A), in giugno 2006 (C) e ottobre 2006 (E). Rapporto clorofilla a/b delle piante prelevate in ottobre 2005 (B), in giugno 2006 (D) e ottobre 2006 (F) di delle quattro specie di *Salix* cresciute in terreno. Le barre indicano l'errore standard (n=6); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,05$.

4.4 Allevamento di 2 specie di salice cresciute in soluzione idroponica e trattate per 15 giorni

4.4.1 Crescita delle piante

Al fine di chiarire le potenzialità fitodepurative di alcune specie di salice e approfondire degli aspetti legati alla tossicità del Cr sulle piante si è scelto di riutilizzare due specie: *S. fragilis* e *S. matsudana*. Queste specie sono state scelte in quanto avevano permesso di accumulare una discreta quantità di Cr sia nell'esperimento in terreno (Figura 43), sia negli esperimenti in agriperlite (Figura 26 e 31), inoltre per il fatto che *S. fragilis* sia una specie autoctona mentre il *S. matsudana* sia alloctona. Non sono stati riutilizzati il *S. alba* e il *S. elaeagnos* in quanto nell'esperimento in terreno avevano accumulato meno cromo rispetto alle specie precedenti (Figura 43).

Le piante cresciute per sette settimane in soluzione idroponica completa e sottoposte nelle ultime due settimane a trattamento con soluzione 100 e 300 μM di CrCl_3 mostrano valori di biomassa fresca nettamente inferiori rispetto alla biomassa di controllo (Figura 46/A/B).

In *S. fragilis* la biomassa totale fresca raggiunge i 15,5 g mentre per quella dei trattamenti si ferma a 3,6 e 2,9 g rispettivamente per il trattamento 100 e 300 μM di cromo. Considerando separatamente ciascun organo di questa specie si ha una differenza significativa anche nelle radici fra il peso di controllo e quello del trattamento 300 μM (Figura 46/A).

Anche per il *S. matsudana* la biomassa totale fresca è nettamente superiore a quella dei trattati con un peso di 4,6 g per il controllo, 1,4 g per il trattamento 100 μM e 0,9 per quello 300 μM di cromo. Anche considerando separatamente il peso di fusti e foglie le differenze di ciascuno dei due trattati risultano significativamente inferiori rispetto al controllo (Figura 46/A).

Nel complesso la figura 4.33/A mostra come il *S. fragilis* abbia una capacità di accrescimento, nelle condizioni imposte dall'esperimento, decisamente maggiore rispetto al *S. matsudana* che gli permette di raggiungere un peso triplo rispetto alla seconda specie.

Anche per il peso totale secco (Figura 46/B) in *S. fragilis* e *S. matsudana* si presentano differenze significative fra i controlli e i corrispondenti trattati. In *S. matsudana* la differenza è significativa, fra controllo e trattati, anche considerando separatamente i pesi secchi di ciascun organo.

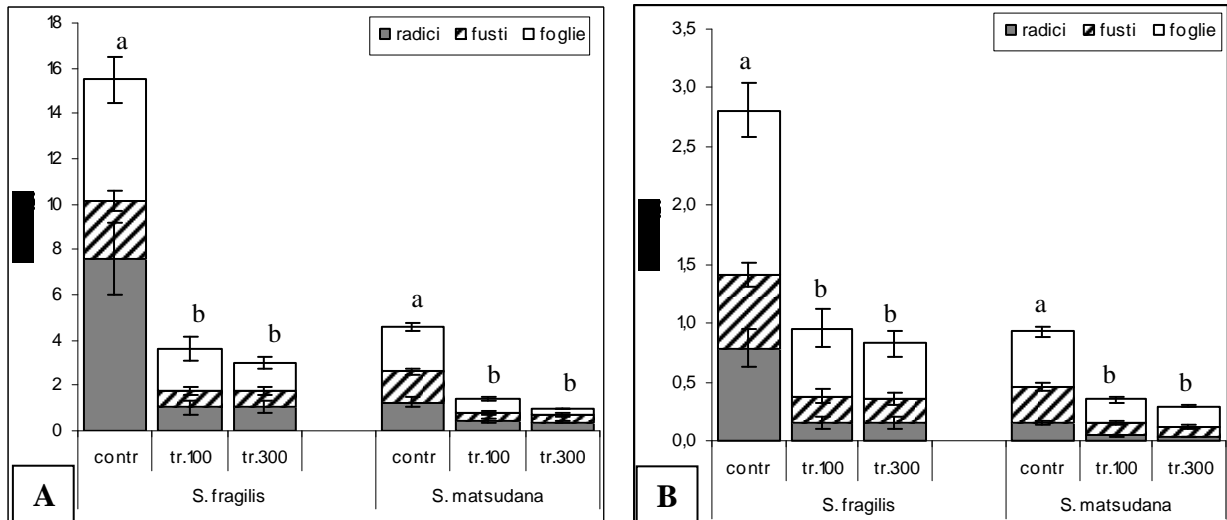


Figura 46 Peso fresco medio (A) e peso secco medio (B) delle due specie di *Salix*. Le barre indicano l'errore standard (n=12) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative nella biomassa totale, all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,05$.

Il rapporto fra peso secco e peso fresco in entrambe le specie analizzate conferma una netta differenza fra controllo e trattato per radici, fusti e foglie (Figura 47). Il rapporto degli organi di controllo è compreso entro valori medi di 0,07 e 0,25 per *S. fragilis*, e di 0,35 e 0,53 per *S. matsudana*. L'aumento del rapporto fino al valore medio di circa 1,5 per i trattati di entrambe le specie (ad eccezione delle foglie di *S. matsudana* con un valore di 4) risulta principalmente imputabile alla diminuzione di peso fresco dei vari organi dovuto principalmente ad una minore idratazione dei tessuti trattati rispetto a quelli di controllo.

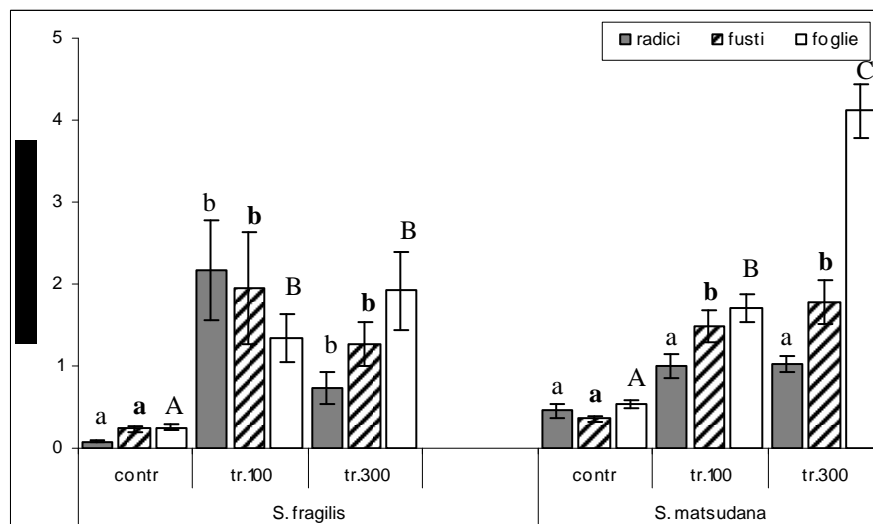


Figura 47 Rapporto tra peso secco e peso fresco delle due specie di *Salix*. Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative dei singoli organi per ciascuna specie, all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,05$.

4.4.2 Contenuto di cromo

Il contenuto in cromo totale per le radici di entrambe le specie si attesta a un livello di $13,8 \mu\text{g Cr g}^{-1}\text{s.s.}$ nel controllo (Figura 48/A). Le differenze rispetto a questo dato sono significative e notevoli per entrambe le specie e soprattutto in corrispondenza delle radici di piante trattate con cromo $100 \mu\text{M}$ il cui valore supera addirittura quello ottenuto con il trattamento $300 \mu\text{M}$. In effetti in *S. fragilis* si ottengono valori medi pari a 6833 e $787 \mu\text{g Cr g}^{-1}\text{s.s.}$ rispettivamente per il trattamento con cromo 100 e $300 \mu\text{M}$. In *S. matsudana* i valori ottenuti nei trattati sono inferiori rispetto a quelli raggiunti dalla prima specie ma comunque sono significativamente superiori rispetto al controllo con valori di 2752 e $680 \mu\text{g Cr g}^{-1}\text{s.s.}$ rispettivamente per il trattamento con cromo 100 e $300 \mu\text{M}$. (Figura 48/A).

Anche per l'apparato fogliare si ottengono aumenti significativi di cromo nei trattati rispetto ai controlli per entrambe le specie ma in questo caso l'accumulo di cromo è proporzionale alla concentrazione del metallo nel *medium* di crescita (Figura 48/B). Il valore di controllo in *S. fragilis* si attesta a $1,27 \mu\text{g Cr g}^{-1}\text{s.s.}$ mentre per i trattamenti con cromo 100 e $300 \mu\text{M}$ si arriva rispettivamente a livelli di $13,8$ e $47,4 \mu\text{g Cr g}^{-1}\text{s.s.}$ In foglie di *S. matsudana* il controllo assume il valore di $0,9 \mu\text{g Cr g}^{-1}\text{s.s.}$ mentre per i trattamenti con cromo 100 e $300 \mu\text{M}$ si arriva rispettivamente a livelli di $8,9$ e $41,1 \mu\text{g Cr g}^{-1}\text{s.s.}$ (Figura 48/B).

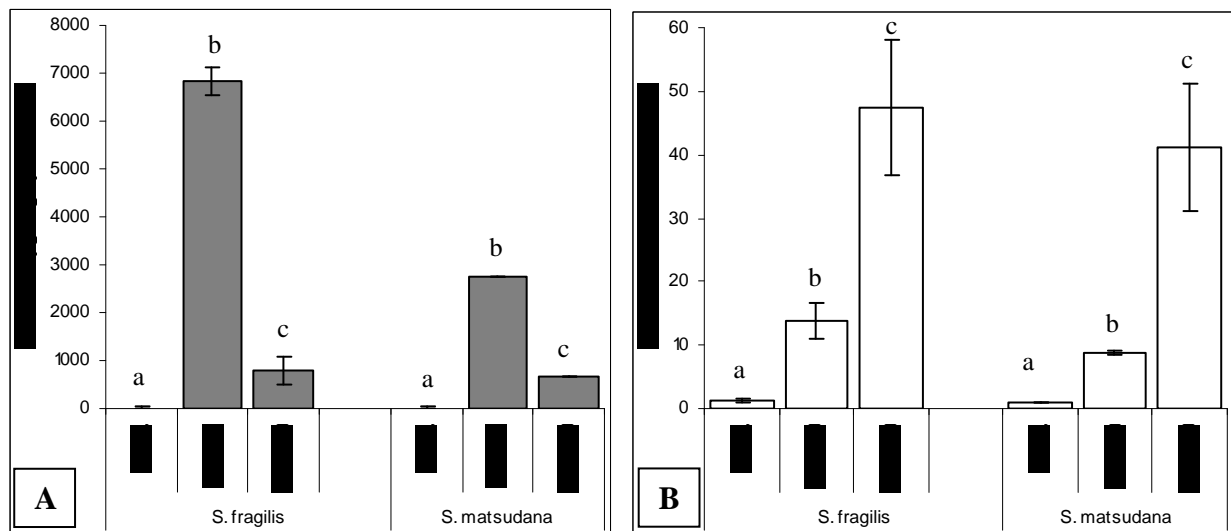


Figura 48 Contenuto di cromo in radici (A) e foglie (B) di ciascuna specie di *Salix*. Le barre indicano l'errore standard (n=12) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,5$.

La figura 49 mette a confronto le due specie analizzate rispetto alla quantità di cromo effettivamente stoccata nei tessuti. In ogni tesi il *S. fragilis* mostra un accumulo di cromo significativamente superiore rispetto al *S. matsudana* in virtù sia di una maggiore capacità di accumulo per unità di massa (come evidenziato in figura 48) sia grazie ad una maggiore

produzione di biomassa (come riportato in figura 46). Il livello massimo è ottenuto in corrispondenza del trattamento con cromo 100 μM in cui il *S. fragilis* arriva al valore medio di 1077 $\mu\text{g Cr}$.

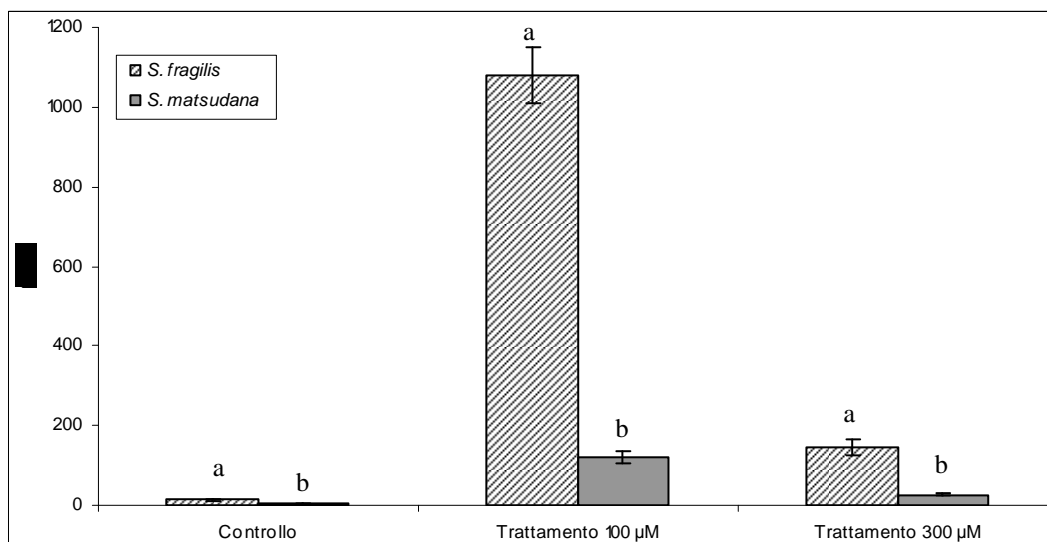


Figura 49 Contenuto totale di Cr delle piante di *Salix*. Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni tesi, per $\alpha < 0,5$.

La capacità di traslocazione del Cr dalle radici alle foglie (Tabella 21) non rivela differenze significative dal confronto delle due specie all'interno di ciascun trattamento. Si evidenzia, tuttavia, un netto aumento della traslocazione con valori che passano da circa 2% per il trattamento 100 μM a più di 20% per il trattamento 300 μM .

Tabella 21 Percentuale media di traslocazione dall'apparato radicale alle foglie delle due specie di *Salix*. Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,5$.

	Traslocazione media percentuale (%)	
	100 μM di CrCl_3	300 μM di CrCl_3
<i>S. fragilis</i>	2,33 \pm 0,90 ^a	20,57 \pm 3,07 ^b
<i>S. matsudana</i>	1,68 \pm 0,22 ^a	23,02 \pm 1,26 ^b

L'indice di tolleranza, riportato in tabella 22, si attesta entro valori compresi fra 21 e 29% non evidenziando differenze significative né dal confronto dei due trattamenti all'interno di ciascuna specie, né da quello fra le specie.

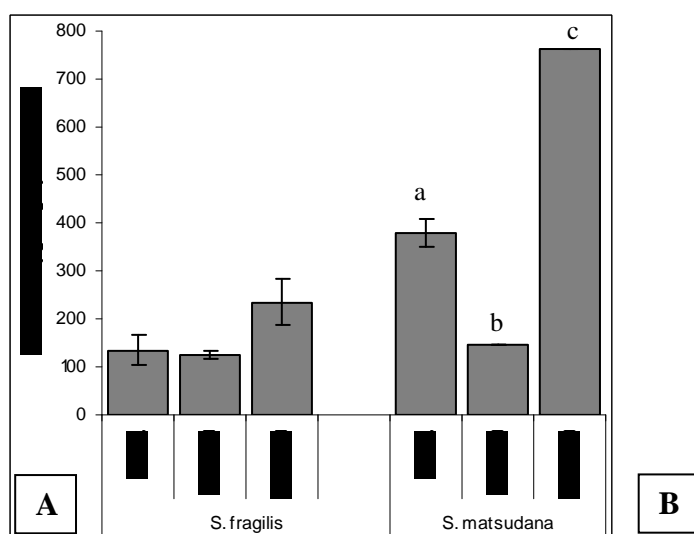
Tabella 22 Percentuale media di tolleranza delle due specie di *Salix* ai diversi trattamenti con cromo. Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni trattamento, per $\alpha < 0,5$

	Tolleranza media (%)	
	100 μM di CrCl_3	300 μM di CrCl_3
<i>S. fragilis</i>	23,01 \pm 1,81	21,36 \pm 3,07
<i>S. matsudana</i>	29,66 \pm 4,27	22,51 \pm 2,48

4.4.3 Contenuto di ferro

Il contenuto di ferro nelle radici di *S. fragilis* (Figura 50/A) non mostra differenze significative fra il controllo e le piante trattate, tuttavia si nota un piccolo aumento di Fe in corrispondenza del trattamento con Cr 300 μM . In radici di *S. matsudana* tale differenza risulta molto più accentuata e significativa, in effetti il valore di controllo è di 380 $\mu\text{g Fe g}^{-1}\text{s.s.}$ mentre il valore del trattamento 300 μM è di 764 $\mu\text{g Fe g}^{-1}\text{s.s.}$ Il ferro del trattamento con Cr 100 μM risulta significativamente inferiore ad entrambe le altre tesi e pari a 145,6 $\mu\text{g Fe g}^{-1}\text{s.s.}$ (Figura 50/A).

L'apparato fogliare mostra un contenuto in ferro decisamente inferiore rispetto a quello rilevato per le radici in entrambe le specie e non si sono rilevate differenze significative. Tuttavia si nota per entrambe le specie una diminuzione nel contenuto in Fe in corrispondenza del trattamento con Cr 100 μM sia rispetto al controllo sia rispetto al trattamento 300 μM (Figura 50/B).



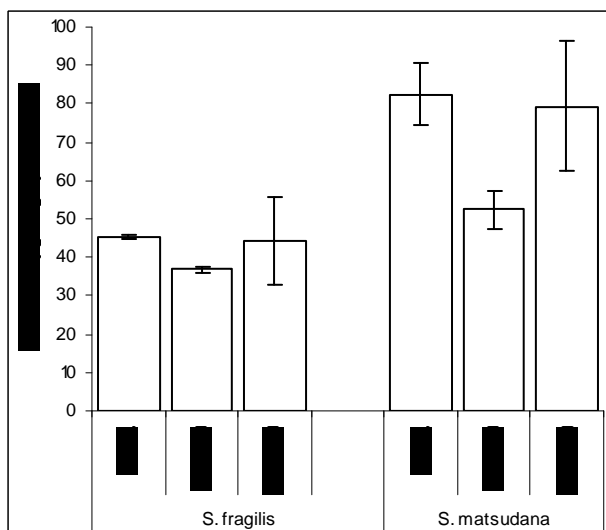


Figura 50 Contenuto di ferro in radici (A) e foglie (B) di ciascuna specie di *Salix*. Le barre indicano l'errore standard (n=12) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,5$.

4.4.4 Contenuto in pigmenti fotosintetici

L'analisi del contenuto in clorofilla a e b evidenzia un netto decremento di tali pigmenti nelle foglie delle piante esposte a Cr rispetto al controllo in entrambe le specie. In effetti sia il valore di clorofilla totale che di Chl a e Chl b le risultano significativamente differenti tra controllo e trattamenti con Cr (Figura 51/A).

In *S. matsudana* il valore di Chl totale medio di controllo si attesta a 1202 $\mu\text{g Chl g}^{-1}\text{p.f.}$ mentre quello dei trattati è di 469,4 e 491,4 $\mu\text{g Chl g}^{-1}\text{p.f.}$. In *S. fragilis* il valore di Chl totale per il controllo è di 1110 $\mu\text{g Chl g}^{-1}\text{p.f.}$ mentre per le piante trattate è di 452,2 e 210,2 $\mu\text{g Chl g}^{-1}\text{p.f.}$ rispettivamente per il trattamento con cromo 100 e 300 μM ; quest'ultima specie inoltre sembra risentire maggiormente del trattamento con Cr 300 μM rispetto al *S. matsudana* in quanto assume un valore dimezzato rispetto a quello riscontrato nell'altra specie per lo stesso trattamento (Figura 51/A).

Il rapporto Chl a/b mostra anche in questo caso differenze significative fra controlli e piante trattate per entrambe le specie (Figura 51/B). I controlli arrivano al valore medio di circa 2,8 mentre i valori dei trattati sono compresi fra 2,32 e 2,42.

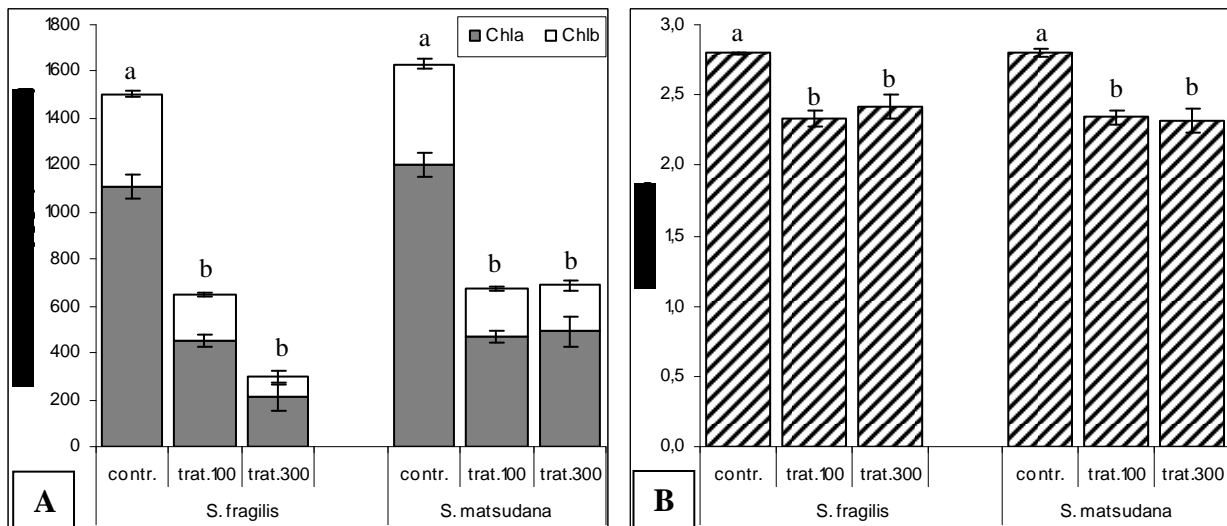


Figura 51 Contenuto di pigmenti fotosintetici (A) e rapporto clorofilla a/b (B) delle due specie di *Salix*. Le barre indicano l'errore standard (n=4) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per < 0,5.

4.4.5 Scambi gassosi

In *S. fragilis* l'andamento della traspirazione mostra differenze significative fra il controllo e i trattati in tutte le epoche di campionamento mentre non si evidenziano differenze confrontando i due trattamenti (Figura 52/A). Il valore controllo è pari a 2,26 mmol H₂O m⁻²s⁻¹ e sale in corrispondenza del 9° e 14° giorno a 2,9 mmol H₂O m⁻²s⁻¹, al contrario i valori dei trattati scendono fin dal 6° giorno a circa 0,8 mmol H₂O m⁻²s⁻¹ e rimangono a questo livello in corrispondenza di tutti i successivi prelievi.

Anche in *S. matsudana* i valori di traspirazione nelle piante sottoposte alle due concentrazioni di cromo mostrano un decremento significativo rispetto al controllo. Si notano anche differenze significative confrontando i due trattati fra loro in corrispondenza del 6° e 14° giorno di rilievo nei quali il valore corrispondente al trattamento con cromo 300 µM è significativamente inferiore anche al quello del trattamento 100 µM (Figura 52/B).

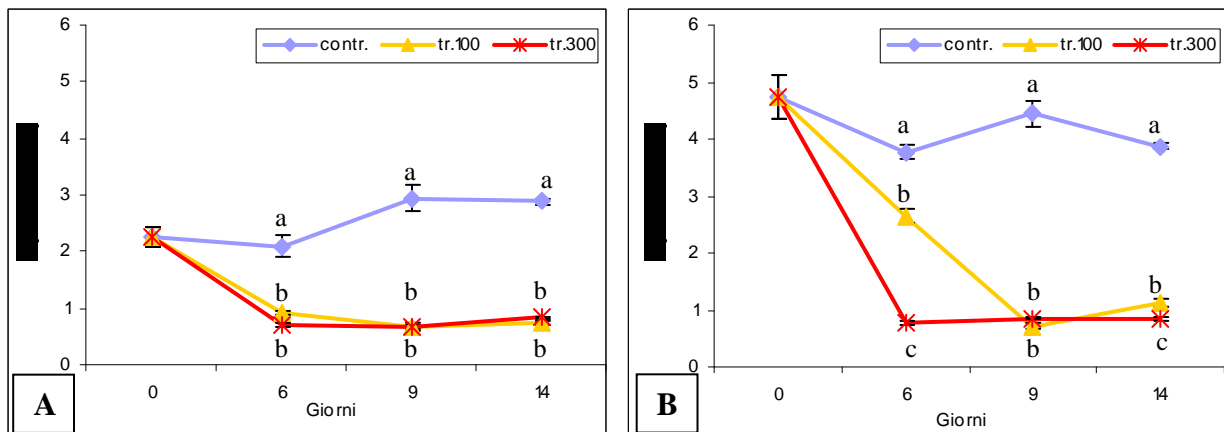


Figura 52 Andamento della traspirazione in *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n = 12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.

I valori misurati per la conduttanza stomatica mostrano diminuzioni significative in corrispondenza di entrambi i trattati rispetto al controllo per entrambe le specie e in tutte le epoche di campionamento (Figura 53). I valori di controllo rilevati in *S. fragilis* appaiono mediamente inferiori rispetto ai corrispondenti di *S. matsudana* così come rilevato anche per la traspirazione (Figura 53 e 52). Inoltre per la prima specie i valori dei trattati scendono sin dal 6° giorno a circa $0,07 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mentre per *S. matsudana* al 6° giorno il valore corrispondente al trattamento con cromo 100 μM è di $0,31 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mentre quello del trattamento 300 μM è di $0,06 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Nelle date successive anche per *S. matsudana* la conduttanza stomatica dei trattati si attesta a circa $0,07 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Figura 53/B).

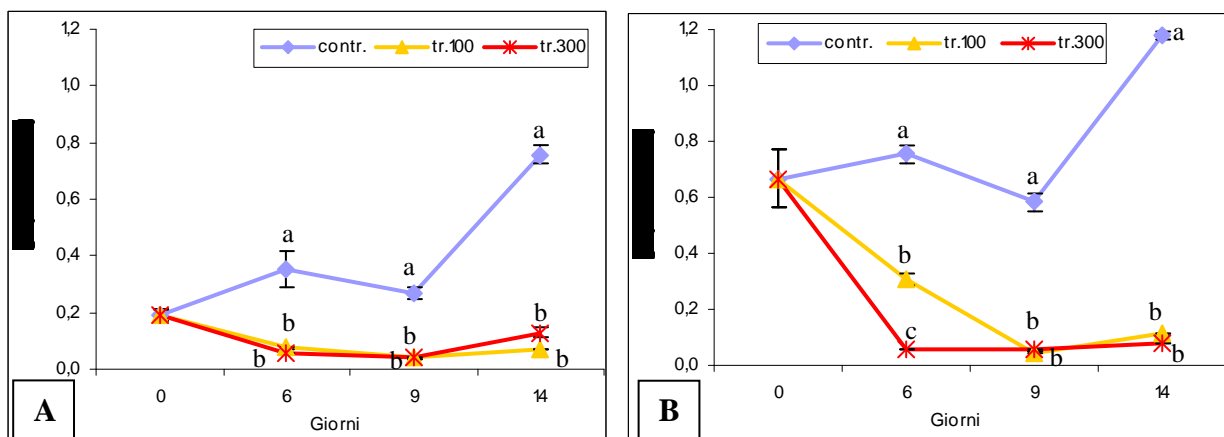


Figura 53 Andamento della conduttanza stomatica in *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n = 12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.

4.4.6 Andamento dell'attività fotosintetica

La figura 54/A riporta l'andamento dell'attività fotosintetica per *S. fragilis* che assume valori compresi fra $5 \text{ e } 8 \text{ mmol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ per il controllo. Tali valori risultano significativamente superiori ad entrambi i trattati in tutte le epoche di campionamento successive al giorno 0.

Sempre in questa specie si rivela anche una significativa diminuzione dell'attività fotosintetica per le piante trattate con cromo 300 μM rispetto a quelle trattate con 100 μM dal 6° al 14 giorno.

In *S. matsudana* non si riscontrano invece differenze significative fra i due trattamenti ma questi sono significativamente inferiori al controllo con valori compresi fra 1 e -0,5 $\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ contro il valore di circa 4 $\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ del controllo (Figura 54/B).

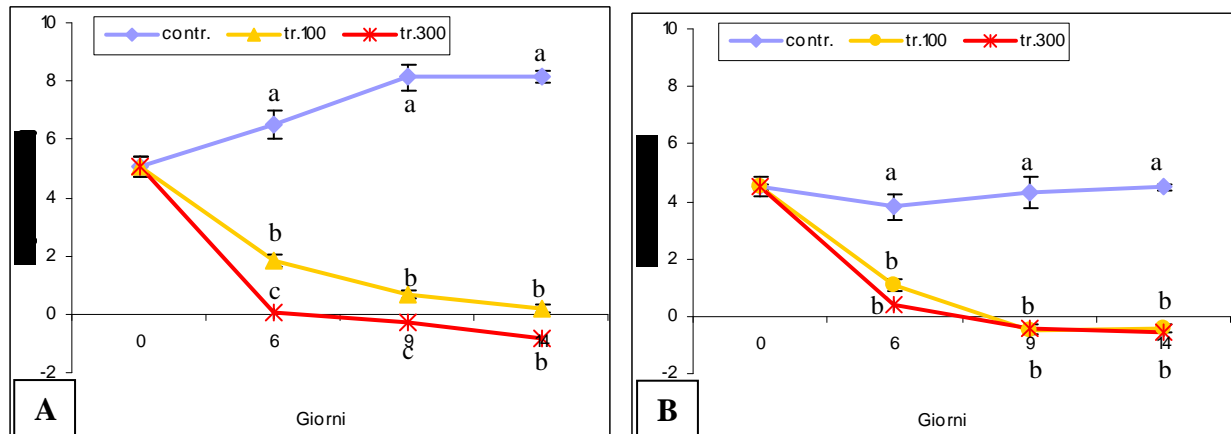


Figura 54 Andamento della fotosintesi in *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.

4.4.7 Aspetto delle 2 specie di salice cresciute in soluzione idroponica e trattate per 15 giorni

Le piante di controllo a 47 giorni di prelievo delle talee (Figura 55/A) mostrano una crescita vigorosa, al contrario le piante della stessa età sottoposte a 15 giorni di trattamento mostrano vistosi segni di sofferenza quali crescita ridotta, clorosi fogliare, comparsa di vaste zone necrotiche, perdita di turgore fogliare (Figura 55/B/C e 56/A/B) che arriva, in corrispondenza del trattamento 300 μM alla abscissione delle foglie stesse a partire dalla base del fusto (Figura 55/C).



Figura 55 Piante di salice dopo 15 giorni di trattamento. Piante di controllo (A), piante trattate con cromo 100 μM (B) e piante trattate con cromo 300 μM (C).



Figura 56 Foglie di piante sottoposte a 15 giorni di trattamento con soluzione di Cr 300 µM. *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B).

A 15 giorni dall'inizio del trattamento le piante campionate mostrano ancor di più gli evidenti segni della tossicità del cromo, inoltre la morfologia delle radici delle piante trattate con cromo appare molto alterata se confrontata con le radici di controllo. La figura 57 riporta le radici di controllo e di trattato 300 µM del *S. fragilis*. Le radici trattate appaiono imbrunite e i peli radicali risultano più radi e corti rispetto a quelli del controllo.



Figura 57 Radici di *S. fragilis* cresciute in soluzione idroponica per sette settimane di cui due di trattamento. (A) Pianta di controllo e (A) pianta trattata con 300 µM di CrCl₃.

4.4.8 Microscopia ottica

L'analisi al microscopio ottico è stata effettuata su campioni di foglie e apici radicali di *S. fragilis* e *S. matsudana* rispettivamente di controllo e trattate con soluzione di CrCl_3 100 e 300 μM .

Le sezioni di foglie di *S. fragilis* mostrano vari indicatori di stress, quali:

- riduzione dello spessore della foglia delle piante sottoposte a trattamento, sia con cromo 100 che 300 μM rispetto al controllo (Figura 58);
- nel mesofillo delle piante di controllo è possibile riconoscere le cellule del parenchima a palizzata e quelle del lacunoso (Figura 58/A) mentre nelle foglie del trattato emerge una disorganizzazione dell'istologia fogliare apparentemente più marcata nel trattamento con Cr 100 μM (Figura 58/B/C);
- in corrispondenza delle foglie delle piante trattate si nota una variazione nella morfologia delle cellule del parenchima a palizzata che anziché avere la tipica forma allungata (Figura 58/A) assumono una forma più tondeggianta ed irregolare (Figura 58/B/C);

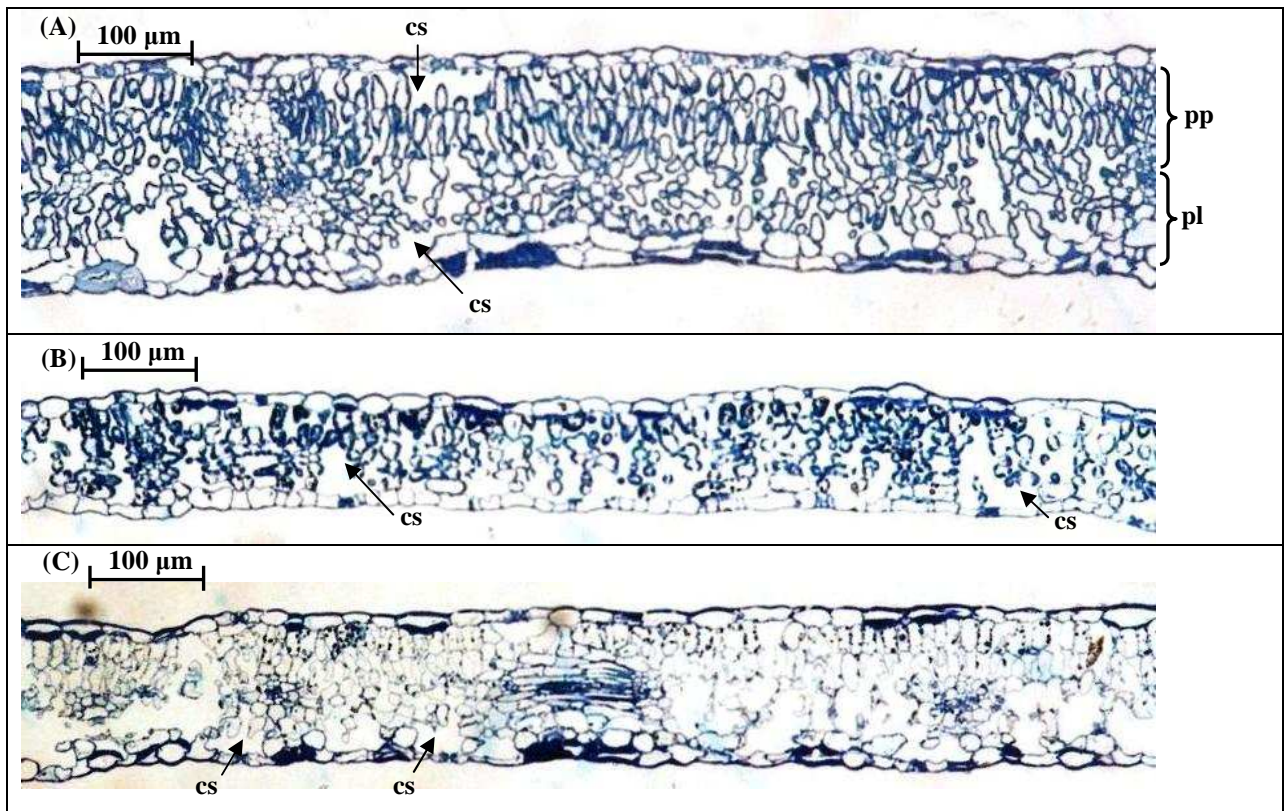


Figura 58 Sezioni trasversali di foglie di *S. fragilis* osservate al microscopio ottico. (A) Foglia di controllo, (B) foglia trattata con 100 μM di CrCl_3 e (C) foglia trattata con 300 μM di CrCl_3 . Ingrandimento 10 X. cs= camera sottostomatica; pp= parenchima a palizzata; pl= parenchima lacunoso.

Nelle foglie delle piante trattate di *S. matsudana* è presente una certa disorganizzazione del parenchima clorofilliano che non è più organizzato in lacunoso e palizzata come strati evidenti e

distinti (Figura 59). Tuttavia lo spessore della foglia non sembra manifestare diminuzioni per le foglie di piante sottoposte a trattamento rispetto a quelle di controllo (Figura 59).

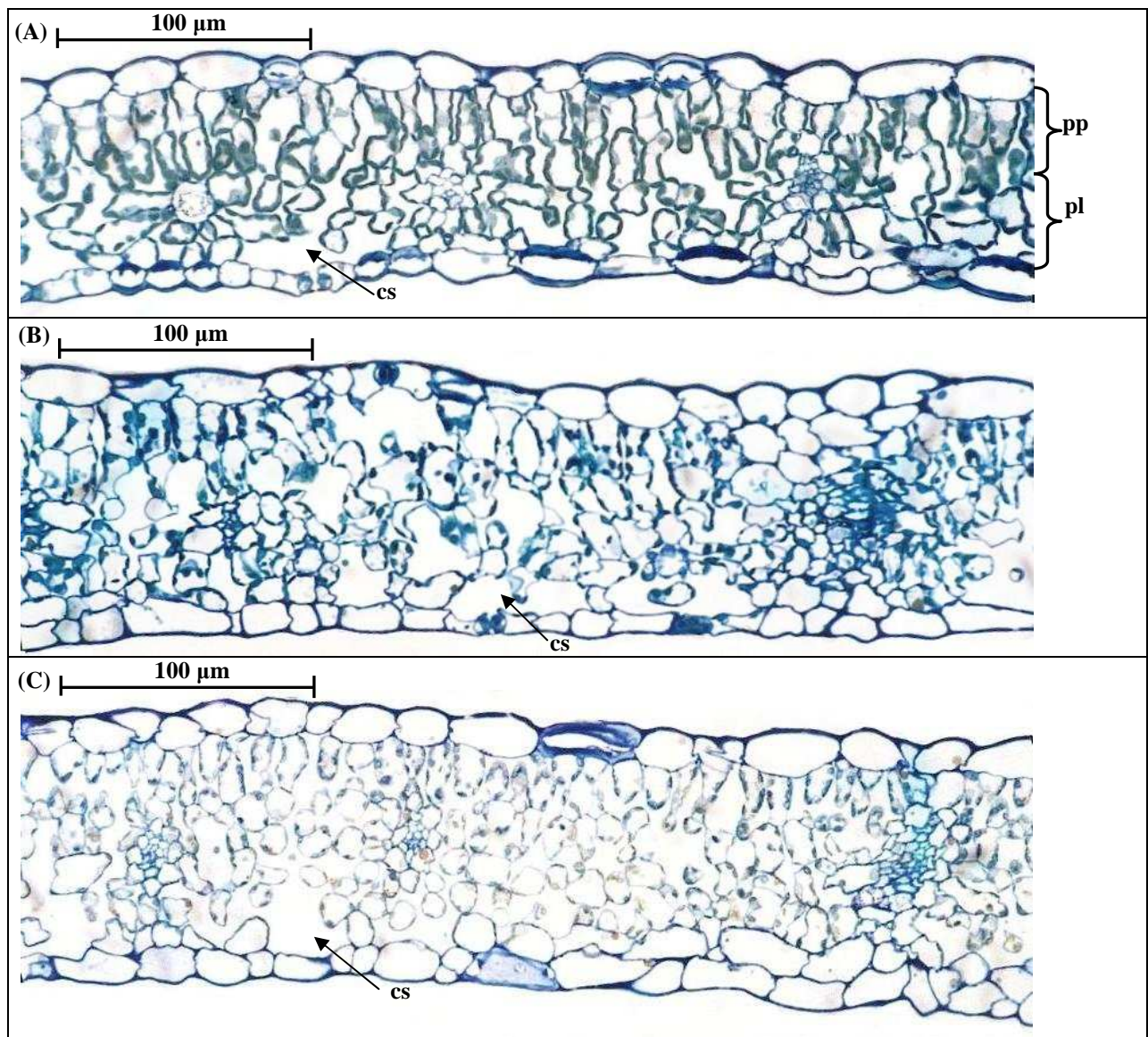


Figura 59 Sezioni trasversali di foglie di *S. matsudana* osservate al microscopio ottico. (A) Foglia di controllo, (B) foglia trattata con 100 μM di CrCl₃ e (C) foglia trattata con 300 μM di CrCl₃. Ingrandimento 25 X. cs= camera sottostomatica; pp= parenchima a palizzata; pl= parenchima lacunoso.

Per quanto riguarda l'apparato radicale di *S. fragilis* si notano vari effetti della tossicità del cromo (Figura 60):

- diminuzione dello spessore degli apici radicali delle radici trattate con Cr. Ciò è evidente soprattutto nelle radici trattate con Cr 300 μM nelle quali l'apice appare ridotto della metà in spessore rispetto a quelle di controllo;
- la cuffia radicale risulta ridotta nei trattati rispetto al controllo.
- nelle radici trattate con Cr sembra che il Cr stesso abbia fortemente alterato il *pattern* di differenziamento cellulare.

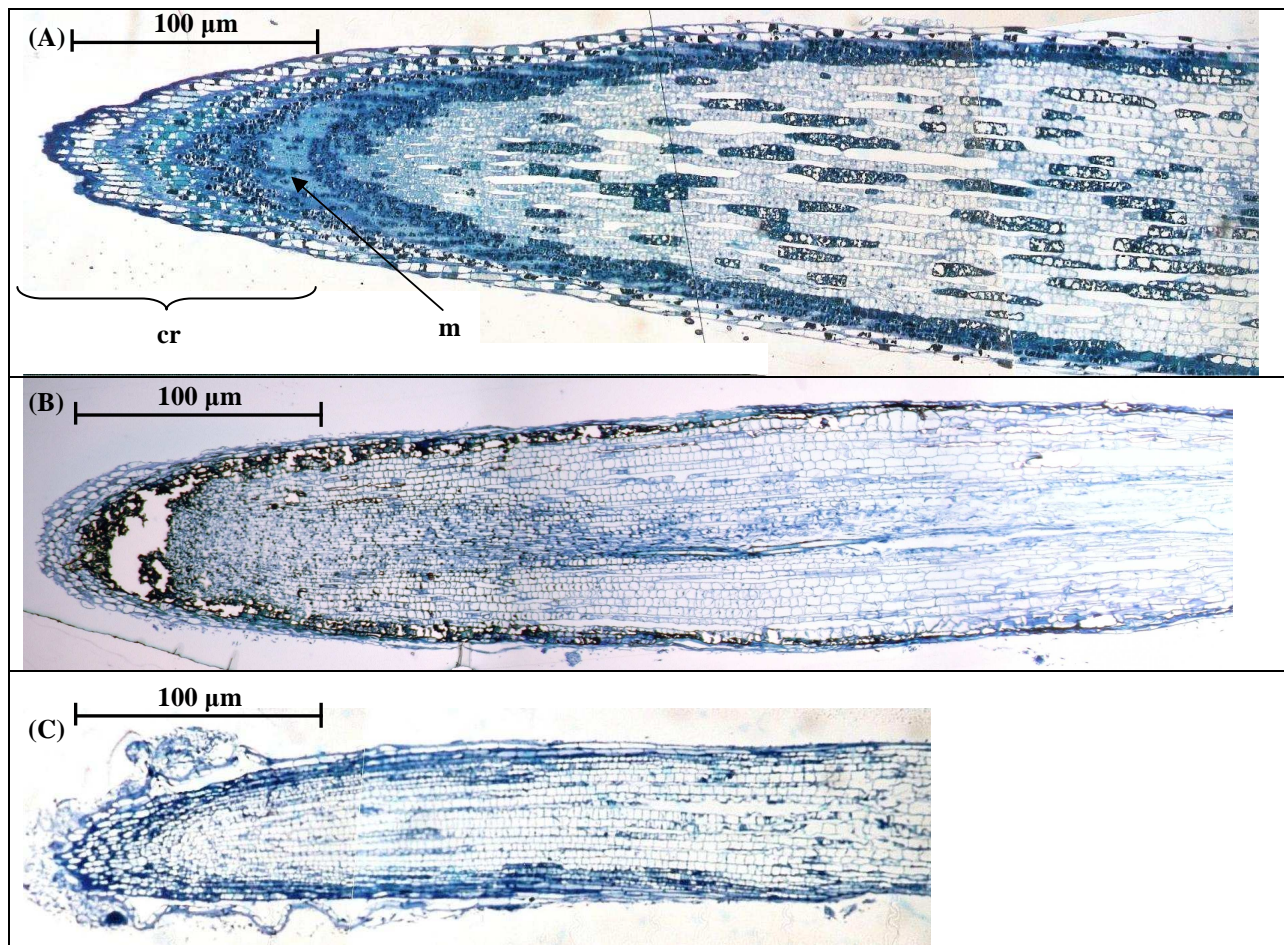


Figura 60 Sezioni longitudinali di apici radicali di *S. fragilis* osservati al microscopio ottico. (A) Apice di controllo, (B) apice trattato con 100 μM di CrCl_3 e (C) apice trattato con 300 μM di CrCl_3 . Ingrandimento 10 X. cr=cuffia radicale; m=meristema.

Anche in *S. matsudana* si manifestano gli stessi effetti del cromo evidenziati in *S. fragilis*. Infatti anche per questa specie è evidente la riduzione dello spessore degli apici radicali delle piante sottoposte a trattamento rispetto a quelle di controllo come pure l'alterazione del *pattern* di differenziazione cellulare (Figura 61).

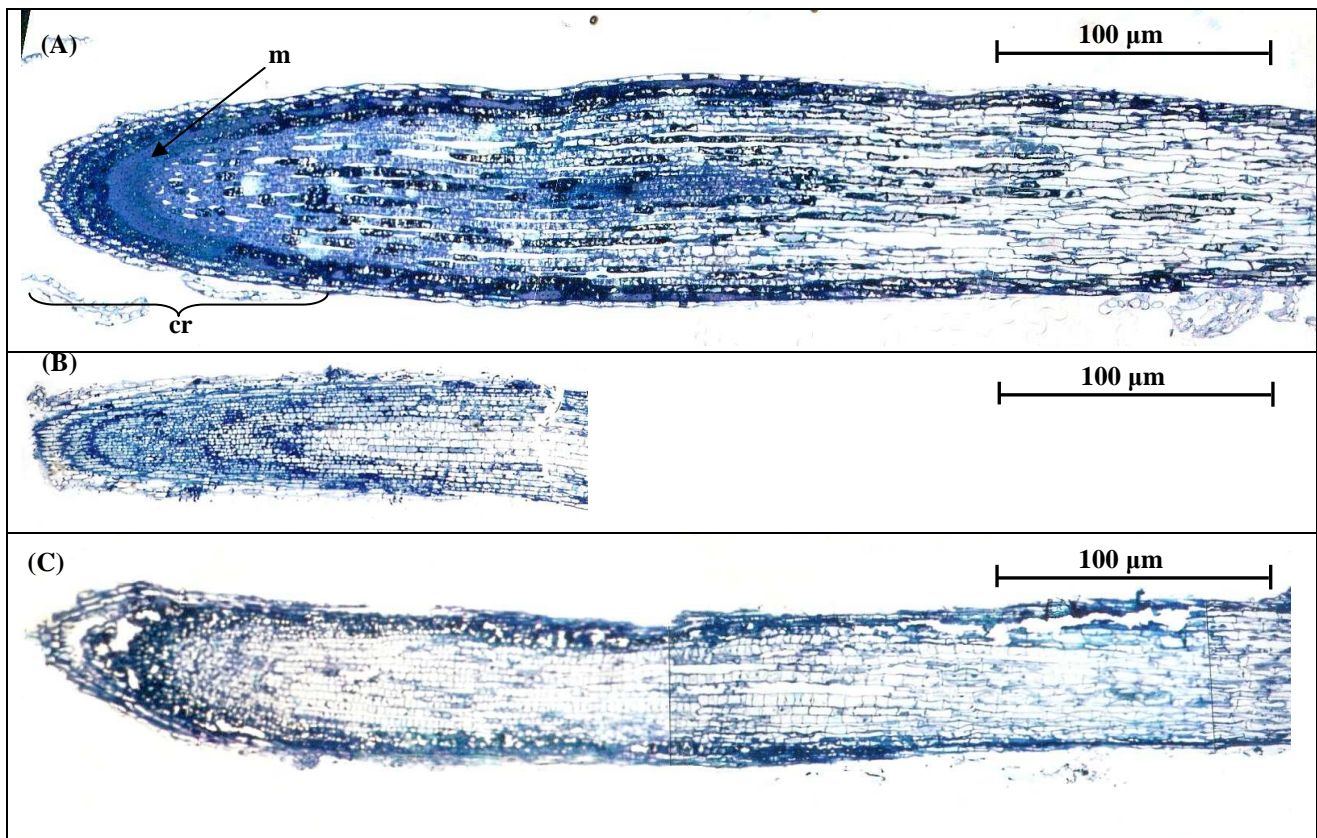


Figura 61 Sezione di apici radicali di *S. matsudana* osservati al microscopio ottico. Piante cresciute in soluzione idroponica per sette settimane di cui due di trattamento. (A) Apice di controllo, (B) apice trattato con 100 μM di CrCl_3 e (C) apice trattato con 300 μM di CrCl_3 . Ingrandimento 10 X. cr=cuffia radicale; m=meristema.

4.4.9 Microscopia elettronica

Nelle fotografie al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) è evidente l'ultrastruttura di cloroplasti fogliari di controllo e trattati con Cr delle due specie in esame (Figura 62).

Per entrambe le specie considerate nel cloroplasto di controllo (Figura 62/A e 63/A) di forma lenticolare si nota nitido il sistema di membrane interne formato da tilacoidi impilati a formare i grana (tg) o da tilacoidi intergranali (ti) immersi nello stroma (s), contenente numerosissimi ribosomi ed enzimi, dove sono visibili dei globuli osmiofilici (go).

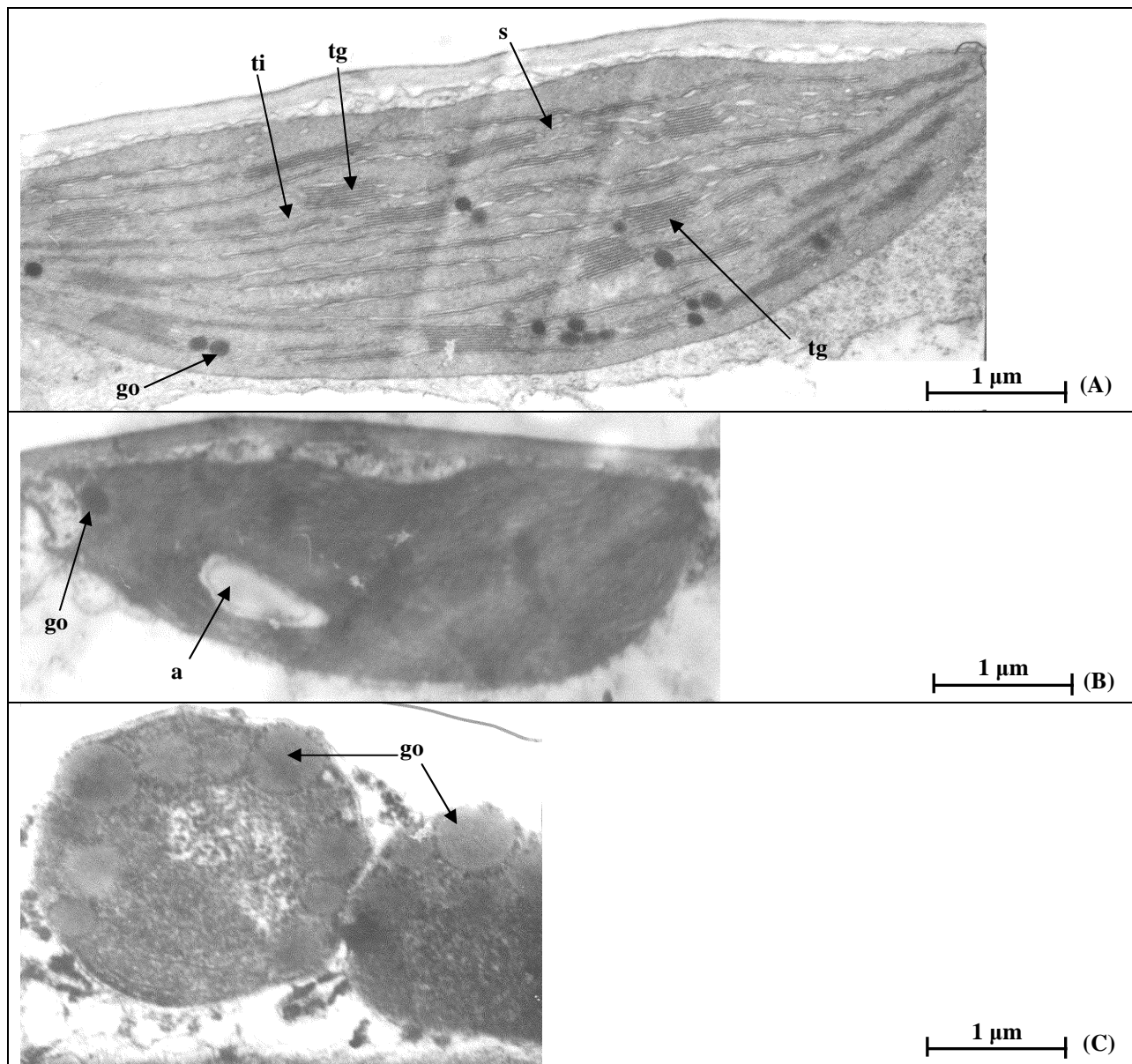


Figura 62 Cloroplasti del mesofillo fogliare di *S. fragilis* fotografati al microscopio elettronico a trasmissione. (A) Piante di controllo, (B) piante trattate con 100 μM di CrCl_3 e (C) piante trattate con 300 μM di CrCl_3 . Ingrandimento 21000 X. a=accumuli di amido; tg=tilacoidi granali; ts=tilacoidi intergrana; s=stroma; go=globuli osmiofili.

I cloroplasti di piante trattate con cromo appaiono alterati rispetto ai propri controlli. Infatti nei cloroplasti trattati con Cr si notano (Figura 62 e 63):

- per i cloroplasti di piante trattate con Cr 300 μM si nota la perdita della forma lenticolare per assumerne una più tondeggiate (Figura 62/C e 63/C);
- disorganizzazione dei tessuti tilacoidali con perdita della distinzione fra grana e tilacoidi intergrana nel cloroplasto di *S. fragilis* (Figura 62/B/C), mentre per il *S. matsudana* il sistema tilacoidale appare abbastanza integro, anche se ridotto (Figura 63/B/C);
- maggior numerosità dei globuli osmiofili (go) che raggiungono dimensioni maggiori rispetto a quelli rilevati nei controlli (Figura 62/B/C e Figura 63/B/C);

- nei cloroplasti di foglie trattate con Cr 100 e 300 μM di *S. matsudana* si notano dei voluminosi granuli di amido (a) (Figura 63/B/C).

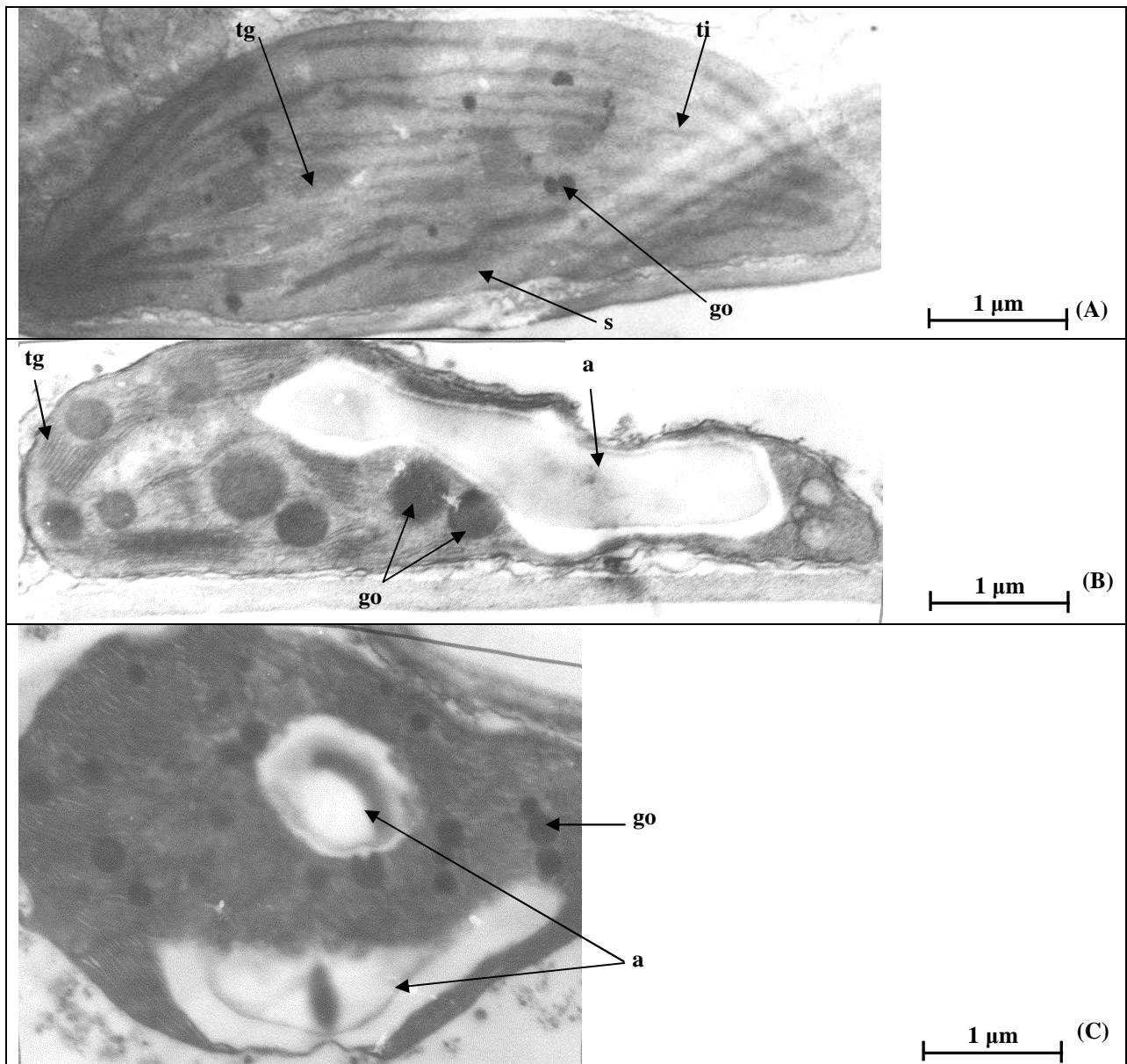


Figura 63 Cloroplasti del mesofillo fogliare di *S. matsudana* fotografati al microscopio elettronico a trasmissione. (A) Piante di controllo, (B) piante trattate con 100 μM di CrCl_3 e (C) piante trattate con 300 μM di CrCl_3 . Ingrandimento 21000X. a=accumuli di amido; tg=tilacoidi granali; ts=tilacoidi intergrana; s=stroma; go=globuli osmiofili.

4.5 Allevamento di 2 specie di salice cresciute in soluzione idroponica e trattate per 4 e 24 ore

4.5.1 Crescita delle piante

Le piante di *S. fragilis* e *matsudana* cresciute per cinque settimane sono state sottoposte a trattamento con Cr 100 e 300 μM per 24 ore. Sono stati eseguiti campionamenti dopo 4 h e 24 h di trattamento e le piante di trattato e controllo non hanno mostrato differenze significative nella produzione di biomassa fresca né considerando separatamente ciascun organo, né considerando il peso totale. Tuttavia si è notato per entrambe le specie una diminuzione della biomassa fresca in corrispondenza delle piante trattate con cromo 100 μM (Figura 64/A).

L'andamento del peso secco (Figura 64/B) ha rispecchiato quello evidenziato per il peso fresco, anche in questo caso non sono state presenti differenze significative.

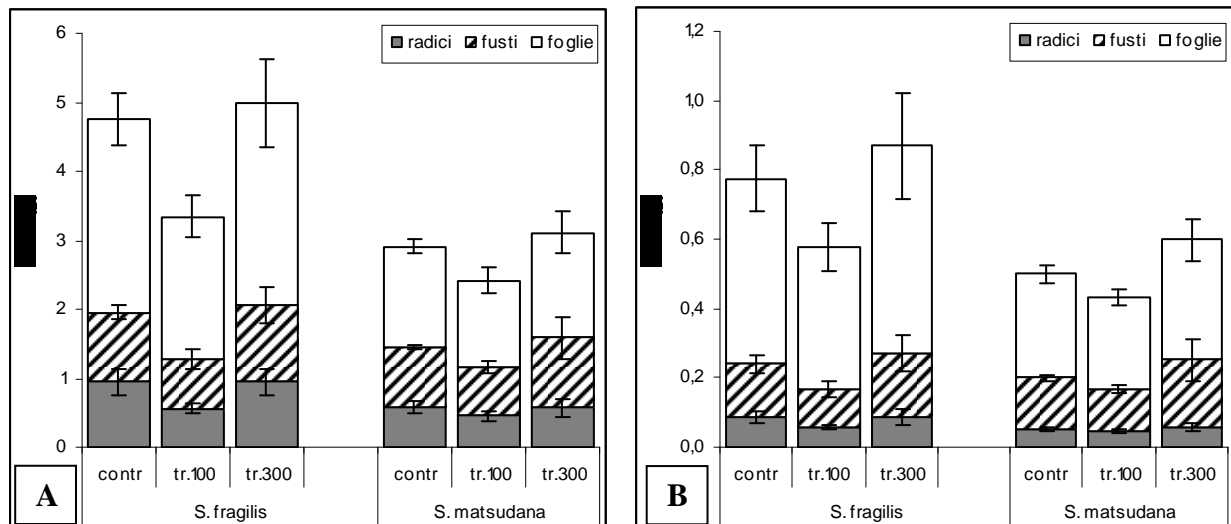


Figura.64 Peso fresco medio (A) e peso secco medio (B) delle due specie di *Salix* cresciute in soluzione idroponica per cinque settimane e trattate per 24 ore. Le barre indicano l'errore standard (n=12) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative nella biomassa totale, all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,05$.

Il rapporto peso secco su peso fresco mostra una situazione di equilibrio all'interno di ciascuna specie in riferimento alle varie tesi, non si manifestano infatti variazioni per questo parametro (Figura 65).

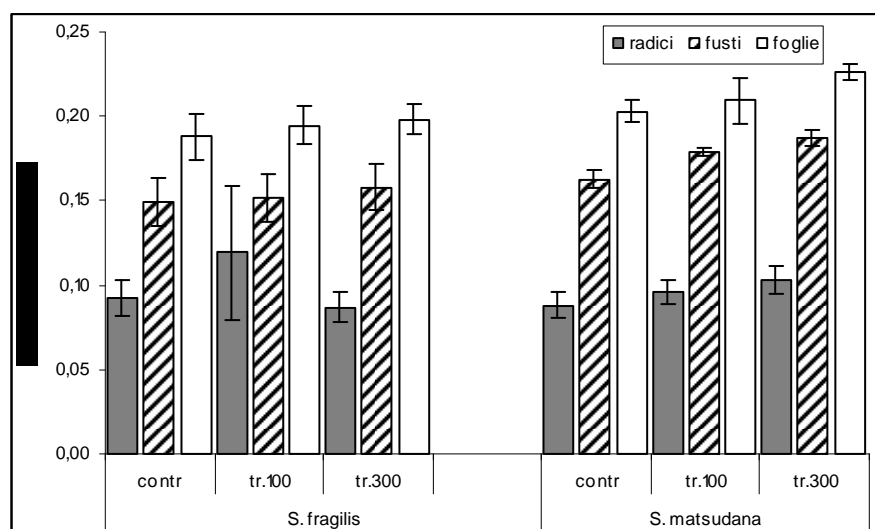


Figura 65 Rapporto tra peso secco e peso fresco delle due specie di *Salix* cresciute in soluzione idroponica per cinque settimane e trattate per 24 ore. Le barre indicano l'errore standard (n= 12); lettere diverse indicano differenze significative per ciascun organo, all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,05$.

4.5.2 Contenuto di cromo

La figura 46 riporta il contenuto di cromo nell'apparato radicale per le due specie di salici e in riferimento ai campionamenti effettuati a distanza di 4 e 24 ore dall'inizio del trattamento con CrCl_3 . Il valore del controllo in *S. fragilis* si attesta a $0,004 \mu\text{g Cr g}^{-1}\text{s.s.}$ mentre già dopo sole 4 ore di trattamento si raggiungono valori di $2042 \mu\text{g Cr g}^{-1}\text{s.s.}$ per le radici trattate con cromo $100 \mu\text{M}$ e $2413 \mu\text{g Cr g}^{-1}\text{s.s.}$ per quelle trattate con cromo $300 \mu\text{M}$; in corrispondenza delle 24 ore di trattamento i valori raggiungono i 4426 e $3983 \mu\text{g Cr g}^{-1}\text{s.s.}$ rispettivamente per il trattamento 100 e $300 \mu\text{M}$ (Figura 66/A).

In *S. matsudana* il valore di controllo è pari a $2,8 \mu\text{g Cr g}^{-1}\text{s.s.}$ mentre a 4 ore dall'inizio del trattamento il contenuto è di circa $1850 \mu\text{g Cr g}^{-1}\text{s.s.}$ per entrambi i trattati; a 24 ore di trattamento si hanno valori di 3422 e $3177 \mu\text{g Cr g}^{-1}\text{s.s.}$ rispettivamente per il trattamento 100 e $300 \mu\text{M}$ (Figura 66/B).

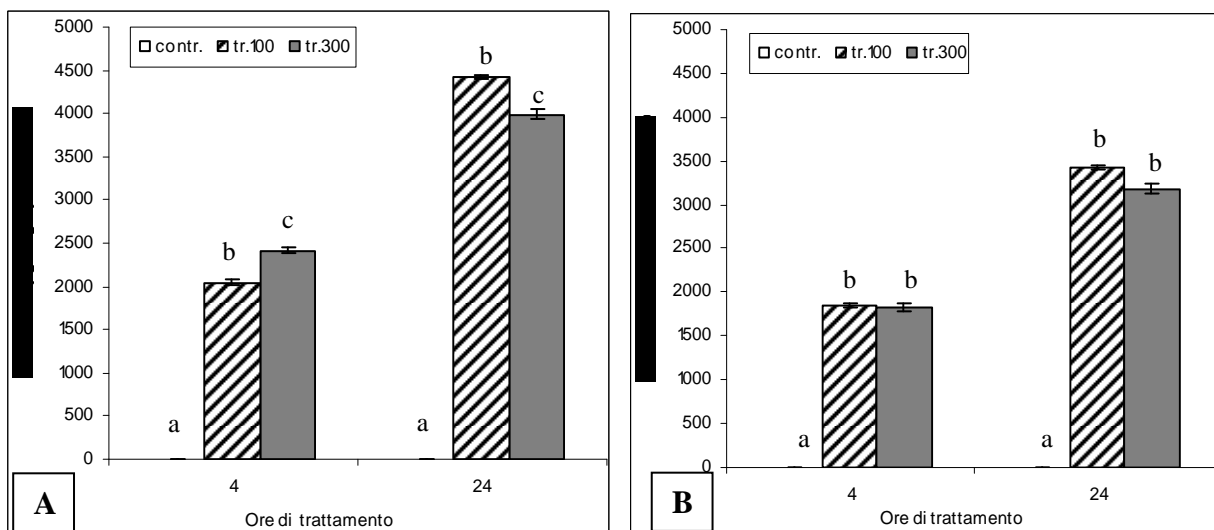


Figura 66 Contenuto di cromo in radici di *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B) cresciute in soluzione idroponica per cinque settimane. Le barre indicano l'errore standard (n=4); lettere diverse indicano differenze significative all'interno della stessa ora di prelievo, per $\alpha < 0,5$.

Il contenuto di cromo in foglie di *S. fragilis* (Figura 67/A) è pari a $0,004 \mu\text{g Cr g}^{-1}\text{s.s.}$ mentre i trattati assumono il valore medio di 16 e $61 \mu\text{g Cr g}^{-1}\text{s.s.}$ rispettivamente per il trattamento 100 e 300 μM dopo 4 ore di trattamento e 6,7 e $61 \mu\text{g Cr g}^{-1}\text{s.s.}$ rispettivamente per il trattamento 100 e 300 μM dopo 24 ore di trattamento. Per il *S. matsudana* il contenuto di cromo in foglie è pari a $0,8 \mu\text{g Cr g}^{-1}\text{s.s.}$ per il controllo ed è compreso fra 8 e $22,5 \mu\text{g Cr g}^{-1}\text{s.s.}$ per i trattati sia a 4 che a 24 ore di trattamento (Figura 67/B).

Appare evidente che il contenuto in cromo per entrambe le specie è circa 100 volte inferiore nelle foglie rispetto alle radici, così come evidenziato anche dai risultati degli esperimenti precedenti.

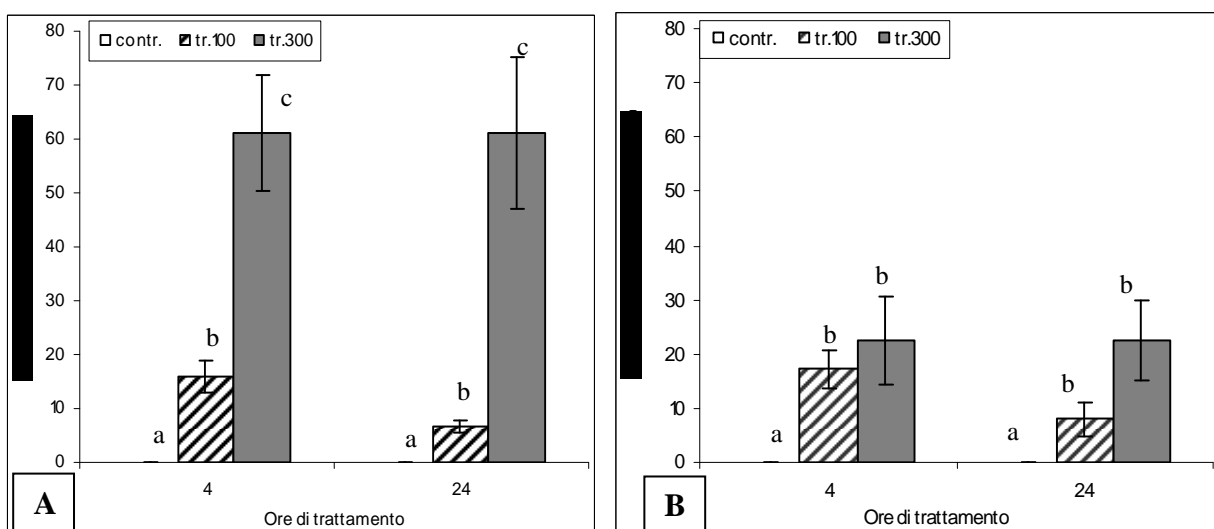


Figura 67 Contenuto di cromo in foglie di *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B) cresciute in soluzione idroponica per cinque settimane. Le barre indicano l'errore standard (n=4); lettere diverse indicano differenze significative all'interno della stessa ora di prelievo, per $\alpha < 0,5$.

Considerando congiuntamente il contenuto di cromo per grammo di s.s. e la biomassa prodotta dalle piante, si ha una misura della rimozione totale di cromo effettuata da ciascuna specie (Figura 68).

Dopo 4 ore di trattamento il *S. fragilis* riesce ad immagazzinare circa 200 μg Cr mentre dopo 24 l'accumulo medio risulta di 255 e 381 μg Cr rispettivamente per il trattamento con cromo 100 e 300 μM (Figura 68/A). Il *S. matsudana* accumula fra i 150 e i 195 μg Cr per entrambe le epoche di campionamento (Figura 68/B). All'interno delle singole specie non si riscontrano differenze significative né all'interno dei trattati né per epoca di campionamento.

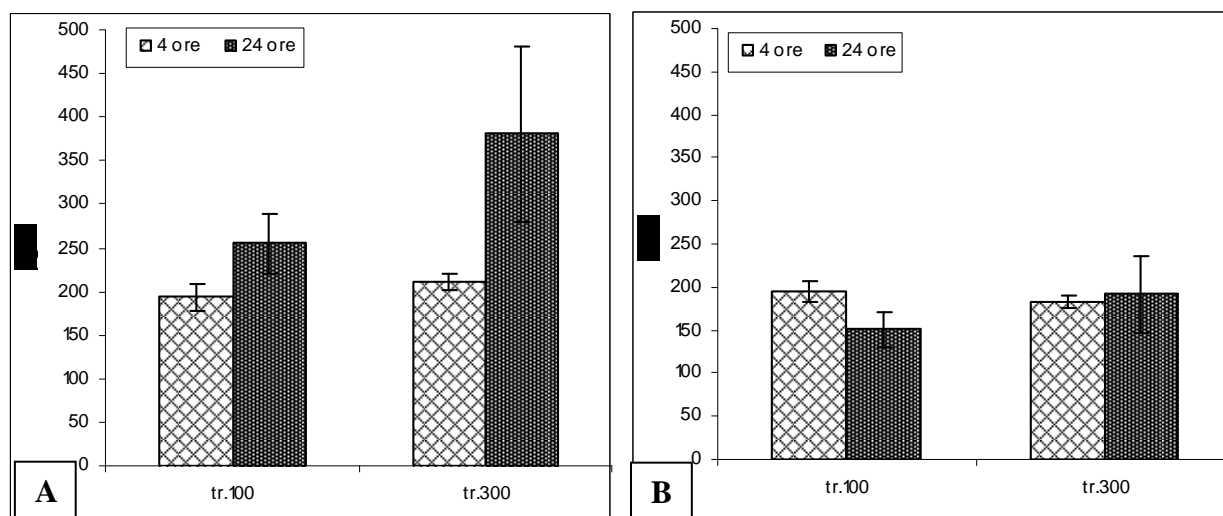


Figura 68 Contenuto totale di Cr per *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B) cresciute in soluzione idroponica per cinque settimane. Le barre indicano l'errore standard (n=4); lettere diverse indicano differenze significative all'interno della stessa ora di prelievo, per $\alpha < 0,5$.

Il tasso di traslocazione del cromo dalle radici all'apparato fogliare (Tabella 23) si conferma essere molto basso così come evidenziato anche dai risultati ottenuti negli esperimenti precedenti. In corrispondenza del trattamento con cromo 100 μM infatti la traslocazione è di poco superiore all'1% per entrambe le specie. Il tasso si alza significativamente per il trattamento corrispondente a 300 μM in particolar modo per il *S. fragilis* che raggiunge il 10,8%

Tabella 23 Percentuale media di traslocazione dall'apparato radicale alle foglie delle due specie di *Salix*, cresciute in soluzione idroponica per cinque settimane e trattate per 24 ore. Lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie (n= 4), per $\alpha < 0,5$.

	Traslocazione media percentuale (%)	
	100 μM di CrCl_3	300 μM di CrCl_3
<i>S. fragilis</i>	1,1 \pm 0,06 ^a	10,8 \pm 0,16 ^b
<i>S. matsudana</i>	1,4 \pm 0,02 ^a	4,4 \pm 0,11 ^b

Il grado di tolleranza dopo 24 ore di trattamento mostra già un calo in corrispondenza del trattamento 100 μM , infatti entrambe le specie assumono il valore di circa 82% (Tabella 24). Al

contrario le piante trattate con cromo 300 μM non sembrano risentire degli effetti negativi di tale metallo per il parametro analizzato, infatti il valore ottenuto è vicino al 100%.

Tabella 24 Percentuale media di tolleranza delle due specie di *Salix* cresciute in soluzione idroponica per cinque settimane e trattate per 24 ore. Lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie ($n=12$), per $\alpha < 0,5$

	Tolleranza media (%)	
	100 μM di CrCl_3	300 μM di CrCl_3
<i>S. fragilis</i>	81,04 \pm 10,73	99,98 \pm 19,21
<i>S. matsudana</i>	82,96 \pm 2,82	108,15 \pm 15,15

4.5.3 Contenuto di ferro

Il contenuto in ferro nelle radici mostra per *S. fragilis* un aumento in corrispondenza delle piante trattate rispetto al controllo (Figura 69/A). Infatti mentre il controllo si attesta a circa 380 $\mu\text{g Fe g}^{-1}\text{s.s.}$ sia a 4 che a 24 ore, il valore dei trattati arriva fino al dato massimo di 1187 $\mu\text{g Fe g}^{-1}\text{s.s.}$

Per il *S. matsudana* invece l'unico aumento significativo riscontrato rispetto al controllo si ha a 4 ore per il trattamento con cromo 100 μM che assume il valore di 561 $\mu\text{g Fe g}^{-1}\text{s.s.}$, per tutti gli altri dati il contenuto in ferro è di circa 400 $\mu\text{g Fe g}^{-1}\text{s.s.}$ (Figura 69/B).

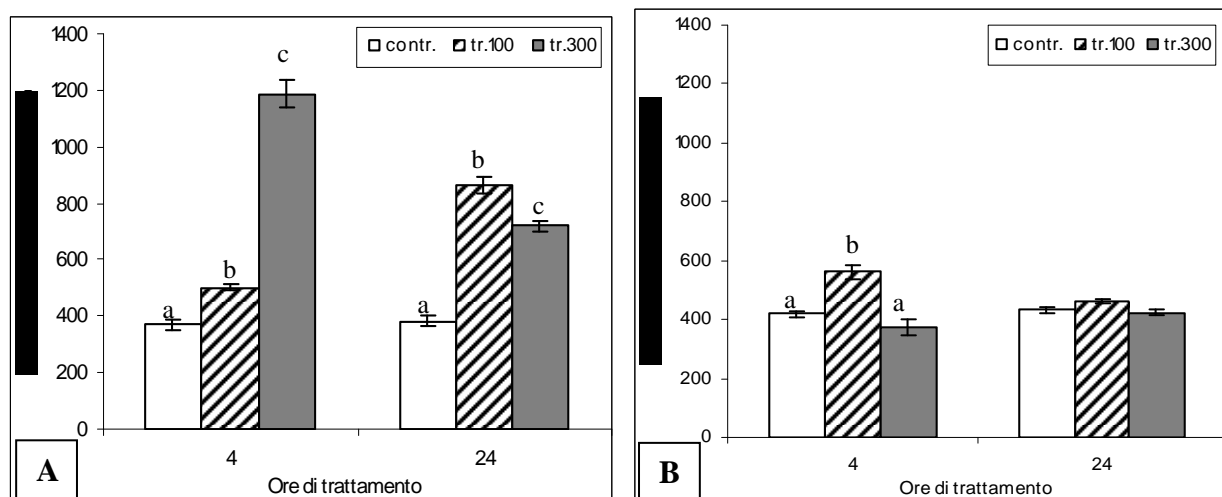


Figura 69 Contenuto di ferro in radici di *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard ($n=4$); lettere diverse indicano differenze significative all'interno della stessa ora di prelievo, per $\alpha < 0,5$.

In foglie di *S. fragilis* il contenuto in ferro assume un andamento opposto a quello riscontrato nelle radici, infatti si assiste ad una significativa diminuzione dal controllo fino al trattamento 300 μM sia a 4 che a 24 ore con un valore che passa da 66 a 55 $\mu\text{g Fe g}^{-1}\text{s.s.}$ (Figura 70/A).

Per il *S. matsudana* anche il contenuto di Fe in foglie non manifesta differenze significative fra piante di controllo e trattamento con un contenuto medio di ferro pari a circa $53 \mu\text{g Fe g}^{-1}\text{s.s.}$ sia a 4 che a 24 ore (Figura 70/B).

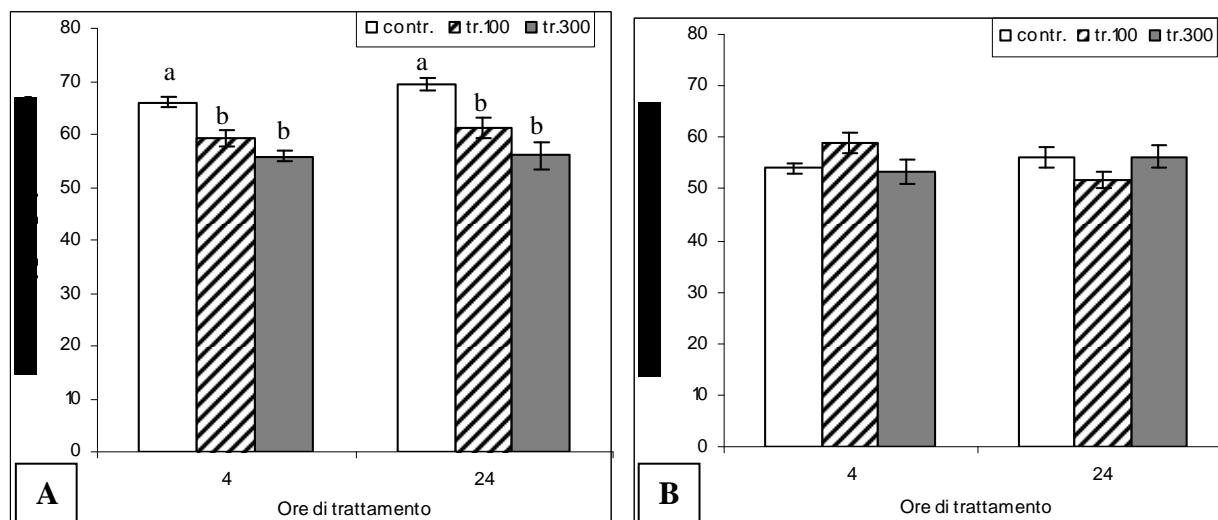


Figura 70 Contenuto di ferro in foglie di *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n=4); lettere diverse indicano differenze significative all'interno della stessa ora di prelievo, per $\alpha < 0,5$.

4.5.4 Contenuto in pigmenti fotosintetici

Il contenuto in clorofille mostra differenze significative per entrambe le specie nel prelievo effettuato dopo 4 ore di trattamento (Figura 71). In *S. fragilis* sia la clorofilla a che la b risultano significativamente superiori nei trattati rispetto al controllo dopo 4 ore di trattamento, invece a 24 ore di trattamento non si riscontrano differenze (Figura 71/A). Anche in *S. matsudana* dopo 4 ore di trattamento il valore di clorofilla totale corrispondente al trattamento $100 \mu\text{M}$ risulta significativamente superiore al controllo, al contrario il valore del trattamento $300 \mu\text{M}$ è significativamente inferiore al controllo sia per la clorofilla a che per la b. A 24 ore di distanza dall'inizio del trattamento non si verificano differenze significative (Figura 71/B).

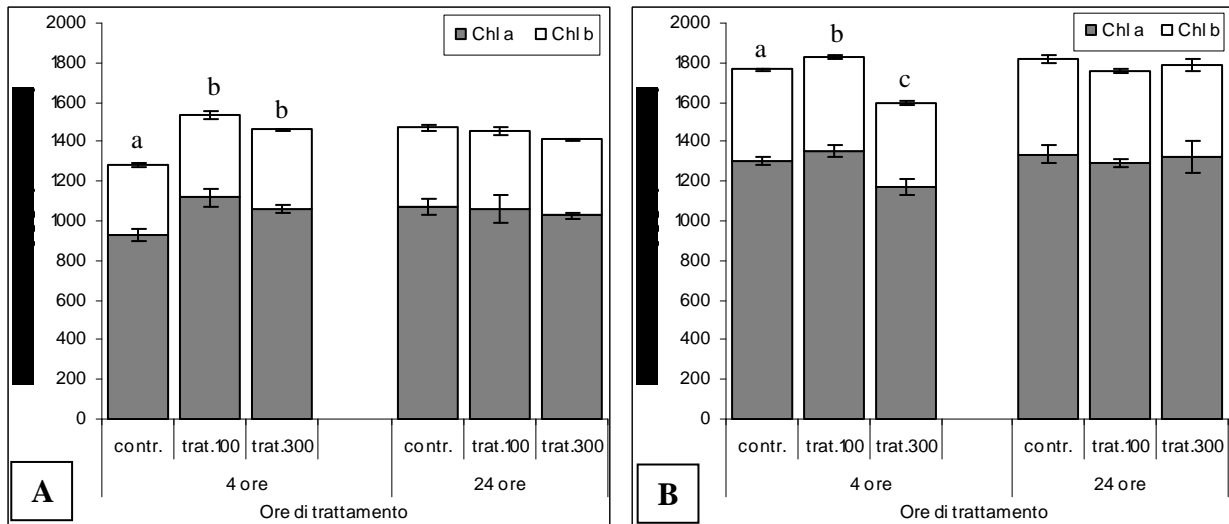


Figura 71 Contenuto di pigmenti fotosintetici in piante di *S. fragilis* (A) e in *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative all'interno della stessa ora di prelievo per la clorofilla totale, per < 0,5.

Il rapporto clorofilla a su b non rileva differenze significative né dopo 4 né dopo 24 ore di trattamento e per entrambe le specie (Figura 72).

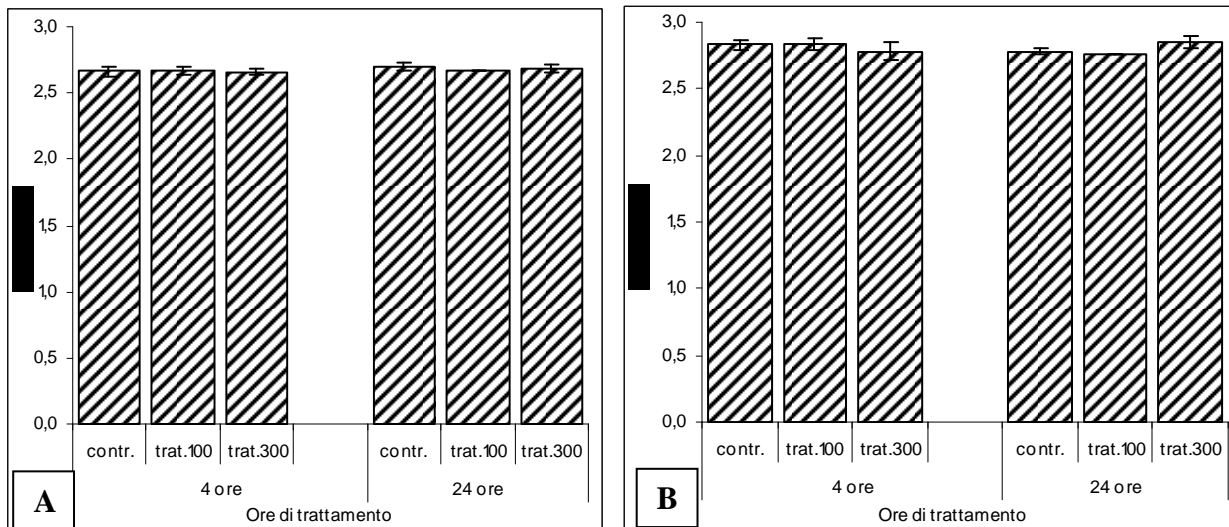


Figura 72 Rapporto clorofilla a/b in *S. fragilis* (A) e in *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative all'interno della stessa ora di prelievo, per < 0,5.

4.5.5 Scambi gassosi

La traspirazione in piante di *S. fragilis* (Figura 73/A) non mostra differenze fra controllo e trattati dopo 4 ore di trattamento, invece dopo 24 ore si osserva un significativo decremento della traspirazione dei trattati che risulta più accentuata per il trattamento con cromo 300 µM. Per questa specie il valore di controllo si attesta a circa 5 mmol H₂O m⁻²s⁻¹, a 24 ore di trattamento si

rilevano i valori di 3,6 e 2,2 mmol H₂O m⁻²s⁻¹ rispettivamente per il trattamento con cromo 100 e 300 µM.

Per il *S. matsudana* si notano differenze significative dei trattati rispetto al controllo già dopo solo 4 ore di trattamento (Figura 73/B), in questo caso però il valore della traspirazione dei trattati è di 8,7 mmol H₂O m⁻²s⁻¹, valore superiore al controllo che è pari a 6,7 mmol H₂O m⁻²s⁻¹. A 24 ore di trattamento il valore corrispondente al trattamento 100 µM rimane significativamente superiore a quello di controllo mentre per il trattamento con 300 µM si ha un decremento significativo fino a 5,7 mmol H₂O m⁻²s⁻¹.

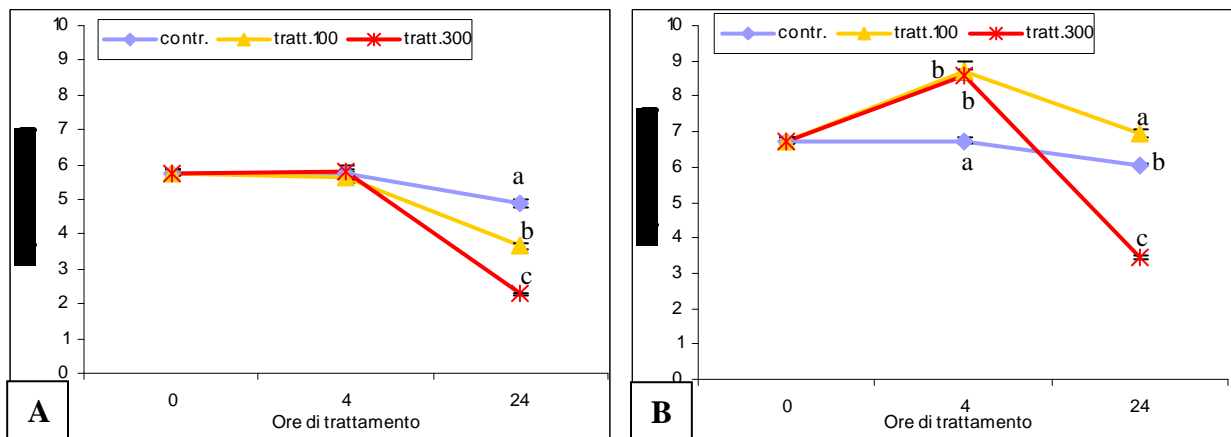


Figura 73 Andamento della traspirazione in *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.

La conduttanza stomatica rilevata in *S. fragilis* mostra differenze significative solo dopo 24 ore di trattamento con un valore di controllo pari a 0,8 mmol H₂O m⁻²s⁻¹ mentre per il trattamento con Cr 300 µM il dato scende a 0,2 mmol H₂O m⁻²s⁻¹ (Figura 74/A).

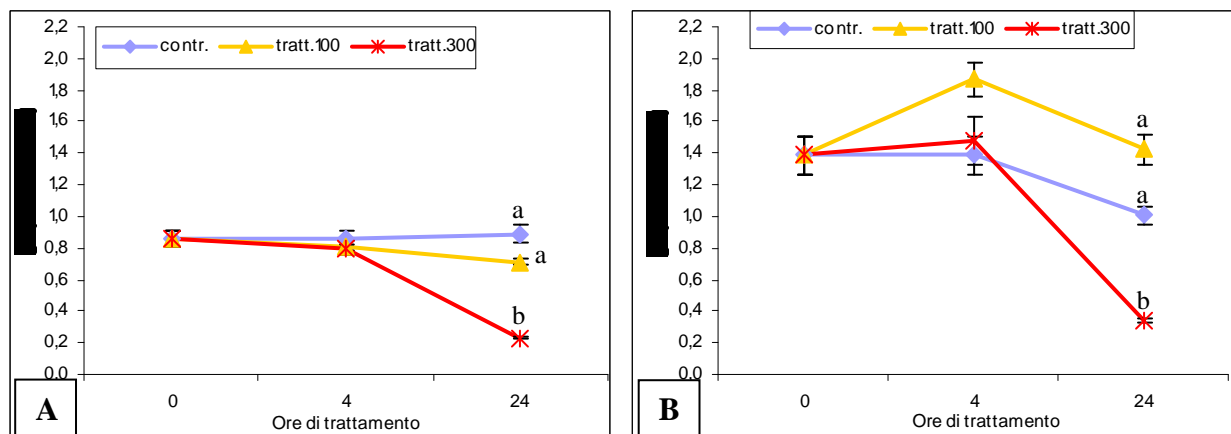


Figura 74 Andamento della conduttanza stomatica in *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.

In *S. matsudana* l'andamento della conduttanza stomatica rispecchia quello evidenziato per la traspirazione, i dati corrispondenti al trattamento con Cr 100 μM si mantengono sempre superiori a quelli delle altre due tesi anche se la differenza non risulta significativa rispetto al controllo. A 24 ore di trattamento il valore corrispondente al trattamento 300 μM scende significativamente rispetto al controllo a 0,3 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Figura 74/B).

4.5.6 Andamento dell'attività fotosintetica

Come per i due parametri precedenti in *S. fragilis* si rilevano differenze significative di attività fotosintetica solo a 24 ore di trattamento con valori dei trattati inferiori rispetto al controllo (Figura 75/A).

Anche per *S. matsudana* si osserva un andamento simile ai precedenti e anche in questo caso si ha un decremento significativo di attività fotosintetica solo per il trattamento con Cr 300 μM che scende a 7,8 $\text{mmol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ contro i 10,3 $\text{mmol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ del controllo (Figura 75/B).

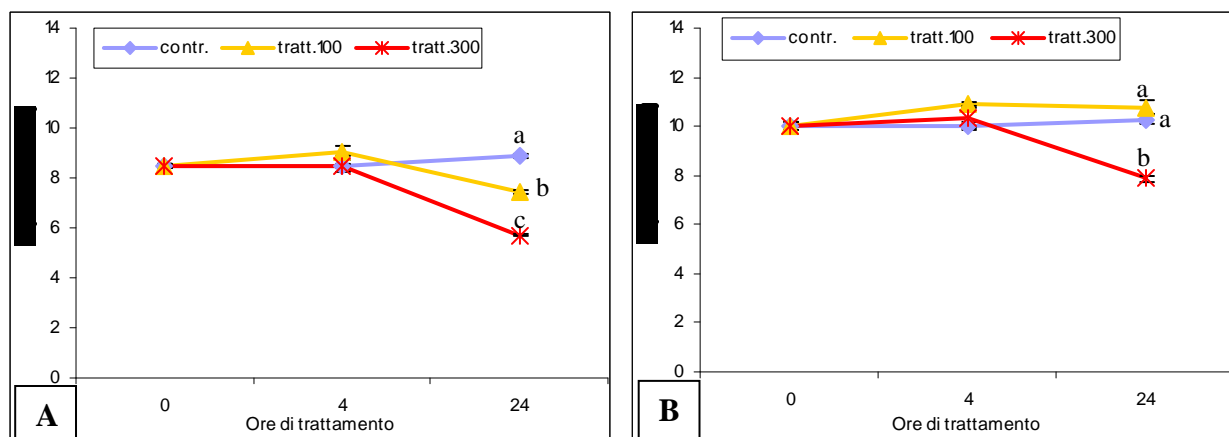


Figura 75 Andamento dell'attività fotosintetica in *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.

4.5.7 Contenuto in proteine

Confrontando fra loro le due specie di salici si riscontra un andamento simile rispetto al contenuto di proteine in radici sia a 4 che a 24 ore di trattamento. Infatti mentre a 4 ore di trattamento le tre tesi assumono valori pressoché identici all'interno di ciascuna specie, per il prelievo a 24 ore si rileva un decremento di proteine nei trattati rispetto al controllo, diminuzione che risulta significativa in *S. fragilis* (Figura 76). In quest'ultima specie il valore di controllo è costante a 12,5 $\text{mg proteina g}^{-1}$ p.f. mentre dopo 24 ore il valore corrispondente al trattamento con Cr 300 μM scende significativamente a 8,4 $\text{mg proteina g}^{-1}$ p.f. (Figura 76/A).

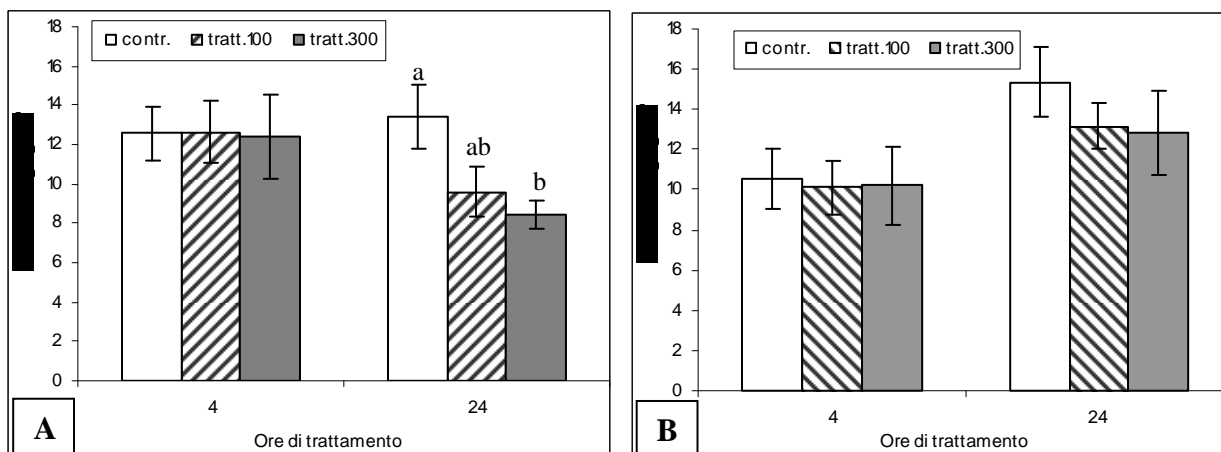


Figura 76 Contenuto di proteine in radici di *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.

Il contenuto di proteine in foglie di *S. fragilis* non mostra differenze significative fra le tre tesi né a 4 né a 24 ore di trattamento con un valore medio compreso fra 46 e 50 mg proteina g^{-1} p.f. (Figura 77/A). Anche per *S. matsudana* non si rilevano differenze significative anche se a 24 ore il contenuto in proteine sembra aumentare per i trattati rispetto al controllo (Figura 77/B).

Il contenuto di proteine rilevato nelle foglie risulta circa cinque volte superiore a quello riscontrato nelle radici per entrambe le specie (Figura 76 e 77).

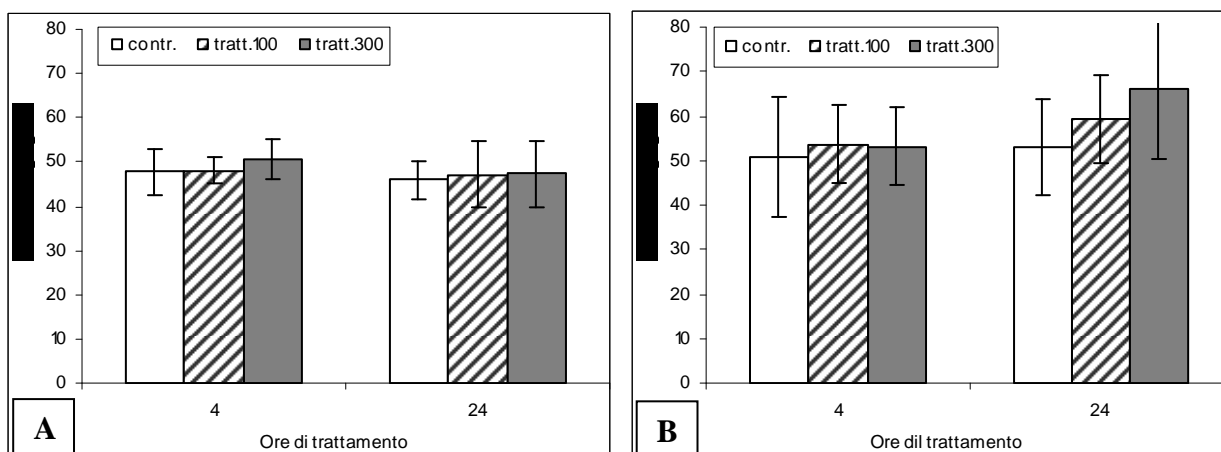


Figura 77 Contenuto di proteine in foglie di *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.

4.5.8 Attività enzimatica

4.5.8.1 Guaiacolo perossidasi - EC 1.11.1.7

L'attività della guaiacolo perossidasi (GPX) rilevata in radici di *S. fragilis* mostra un aumento significativo dell'attività dopo 24 ore di trattamento in corrispondenza della tesi 300 μ M rispetto sia al controllo che alla tesi 100 μ M. Infatti il valore di controllo è di 0,6 μ mol GPX $min^{-1}ml^{-1}$

proteina mentre quello del trattamento 300 μM è di 0,9 $\mu\text{mol GPX min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ proteina (Figura 78/A). A 4 ore di trattamento non si rilevano differenze fra le tre tesi in *S. fragilis*.

L'attività della guaiacolo perossidasi in *S. matsudana* mostra una risposta sia a 4 che a 24 ore di trattamento con un aumento significativo dell'attività di entrambi i trattamenti rispetto al controllo. Infatti il valore di controllo si attesta a 0,25 $\mu\text{mol GPX min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ proteina mentre per i trattamenti si raggiunge un valore più che doppio (Figura 78/B).

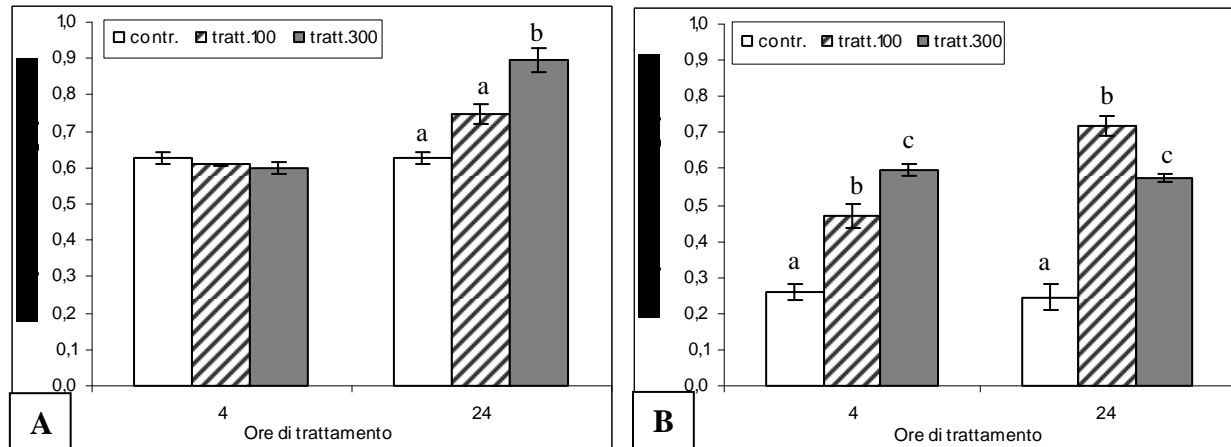


Figura 78 Andamento dell'attività della GPX in radici di *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.

In foglie di *S. fragilis* l'attività della guaiacolo perossidasi mostra un aumento significativo di entrambi i trattamenti rispetto al controllo dopo 4 ore di trattamento con un valore medio di controllo pari a 0,003 $\mu\text{mol GPX min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ proteina e valori medi di 0,010 e 0,008 $\mu\text{mol GPX min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ proteina rispettivamente per il trattamento con cromo 100 e 300 μM (Figura 79/A). A 24 ore di trattamento non si rilevano differenze significative, tuttavia si nota un certo aumento nel valore medio dei trattai rispetto al controllo.

Anche in foglie di *S. matsudana* l'attività della guaiacolo perossidasi sembra aumentare nei trattamenti rispetto al controllo tuttavia le differenze non sono significative (Figura 79/B).

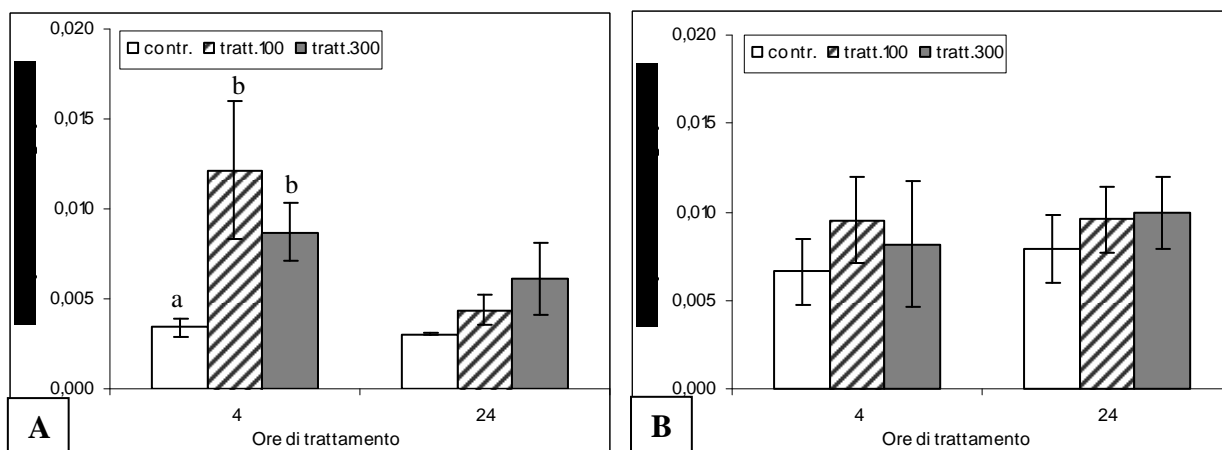


Figura 79 Andamento dell'attività della GPX in foglie di *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.

4.5.8.2 Ascorbato perossidasi - EC 1.11.1.11

L'andamento dell'attività dell'enzima ascorbato perossidasi (APX) non mostra per radici di *S. fragilis* differenze significative per le tre tesi, con valori medi compresi fra 0,12 e 0,17 $\mu\text{mol APX min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ proteina (Figura 80/A).

Per *S. matsudana* invece si nota una tendenza alla diminuzione dell'attività in corrispondenza dei trattamenti rispetto al controllo soprattutto dopo 24 ore di trattamento dove il valore medio corrispondente alla tesi 300 μM scende a 0,085 $\mu\text{mol APX min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ proteina contro gli 0,2 $\mu\text{mol APX min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ proteina del controllo (figura 80/B).

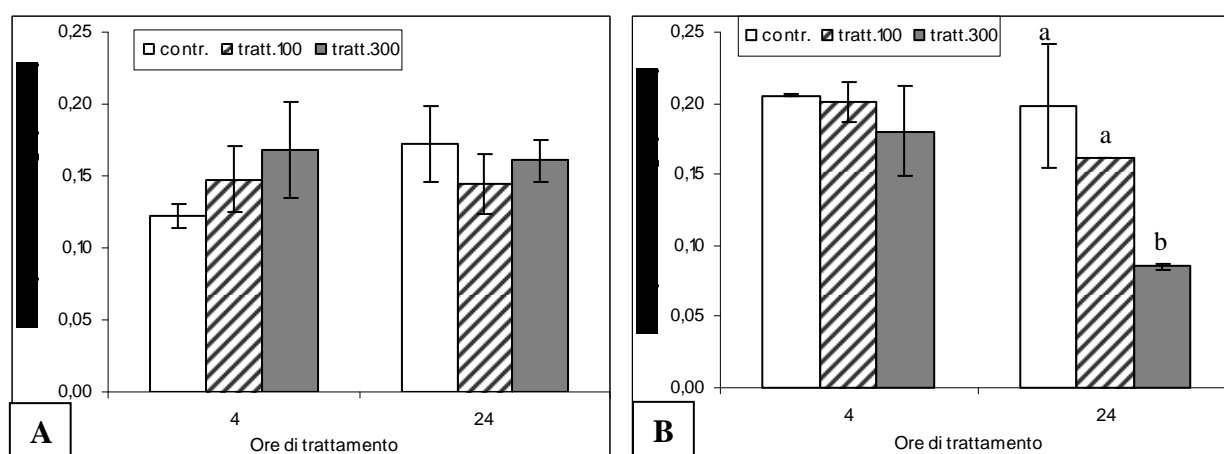


Figura 80 Andamento dell'attività della APX in radici di *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.

In foglie di *S. fragilis* l'andamento dell'attività dell'ascorbato perossidasi è decisamente più definito rispetto al corrispondente nelle radici. Infatti sia a 4 che a 24 ore di trattamento si ha un significativo decremento dell'attività dei trattamenti rispetto al controllo (Figura 81/A).

In foglie di *S. matsudana* invece non si riscontrano differenze significative fra le tre tesi, né a 4 né a 24 ore di trattamento (Figura 81/B).

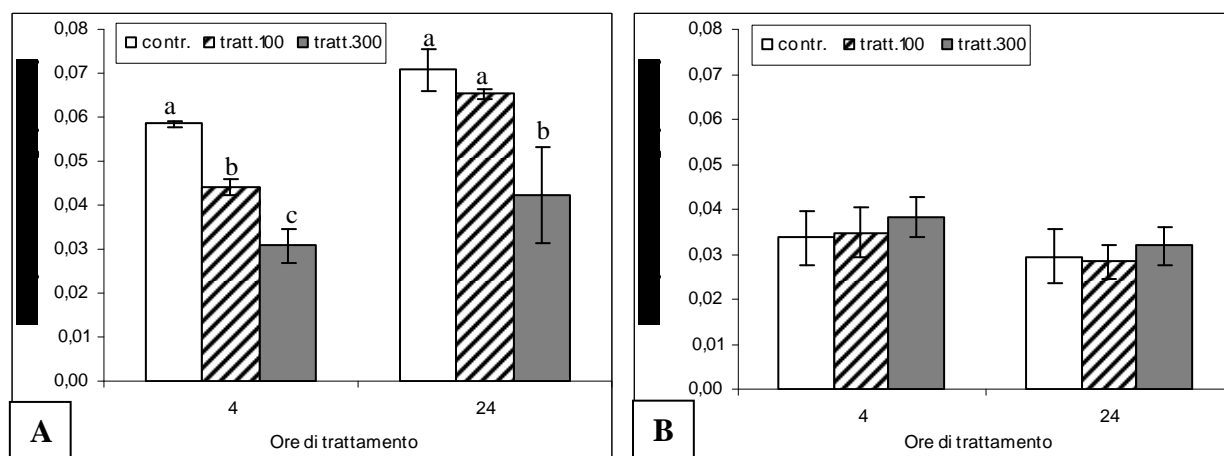


Figura 81 Andamento dell'attività della APX in foglie di *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.

4.5.8.3 Catalasi - EC 1.11.1.6

La risposta ai trattamenti dell'enzima catalasi (CAT) presente nell'apparato radicale mostra un significativo aumento dell'attività di questo enzima nei trattamenti rispetto al controllo che si ripete per entrambe le specie analizzate e le epoche di campionamento (Figura 82).

In *S. fragilis* dopo 4 ore di trattamento l'attività media del controllo è di 11 $\mu\text{mol CAT min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ proteina e di 16,1 e 18,6 $\mu\text{mol CAT min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ proteina rispettivamente per il trattamento con cromo 100 e 300 μM . A 24 ore di trattamento i valori medi di trattato sono un po' superiori ai precedenti con 16,5 e 22,5 $\mu\text{mol CAT min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ proteina rispettivamente per il trattamento con cromo 100 e 300 μM (Figura 82/A).

In *S. matsudana* il valore di controllo si attesta a 13 $\mu\text{mol CAT min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ proteina mentre dopo solo 4 ore di trattamento arriva a circa 30 $\mu\text{mol CAT min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ proteina. Al prelievo delle 24 ore il valore è comunque significativamente superiore al controllo anche se di misura inferiore rispetto al prelievo delle 4 ore con un dato di circa 17 $\mu\text{mol CAT min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ proteina (Figura 82/B).

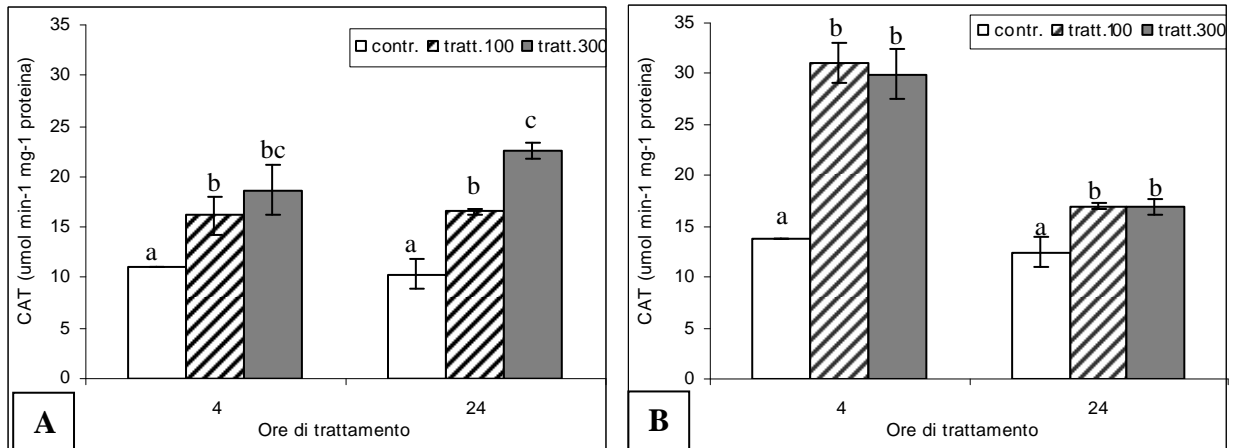


Figura 82 Andamento dell'attività della CAT in radici di *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B).. Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.

In foglie di *S. fragilis* si riscontrano differenze significative solo per il prelievo a 4 ore con un aumento dell'attività della CAT che passa da un valore medio del controllo di $2,5 \mu\text{mol CAT min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ proteina a $5,7$ e $8,3 \mu\text{mol CAT min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ proteina rispettivamente per il trattamento con cromo 100 e $300 \mu\text{M}$ (Figura 83/A).

L'attività della CAT in foglie di *S. matsudana* non riporta differenze significative fra le tre tesi, né a 4 né a 24 ore di trattamento con valori medi compresi fra $7,7$ e $10,6 \mu\text{mol CAT min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ proteina (Figura 83/B).

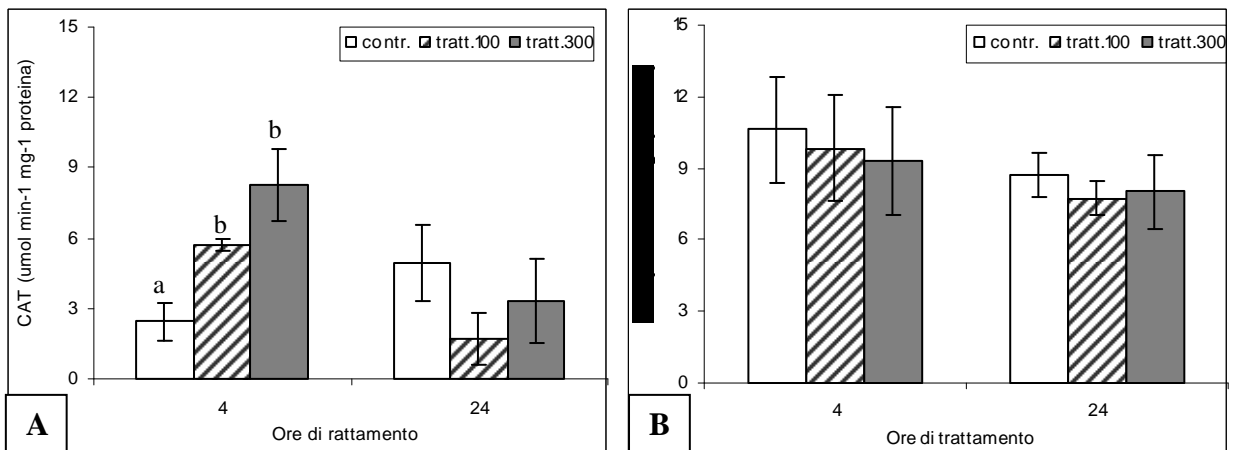


Figura 83 Andamento dell'attività della CAT in foglie di *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B).. Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.

4.5.8.4 Superossido dismutasi - EC 1.15.1.1

L'attività dell'enzima superossido dismutasi (SOD) in radici riporta differenze significative fra trattamento e controllo solo per il campionamento a 24 ore del *S. fragilis*, in cui il valore

medio di controllo è di 9,1 U SOD ml⁻¹ proteina mentre si alza a 13 e 14 U SOD ml⁻¹ proteina rispettivamente per il trattamento con cromo 100 e 300 µM (Figura 84/A).

Per il *S. matsudana* l'attività della SOD non riporta differenze significative fra le tre tesi, né a 4 né a 24 ore di trattamento (Figura 84/B).

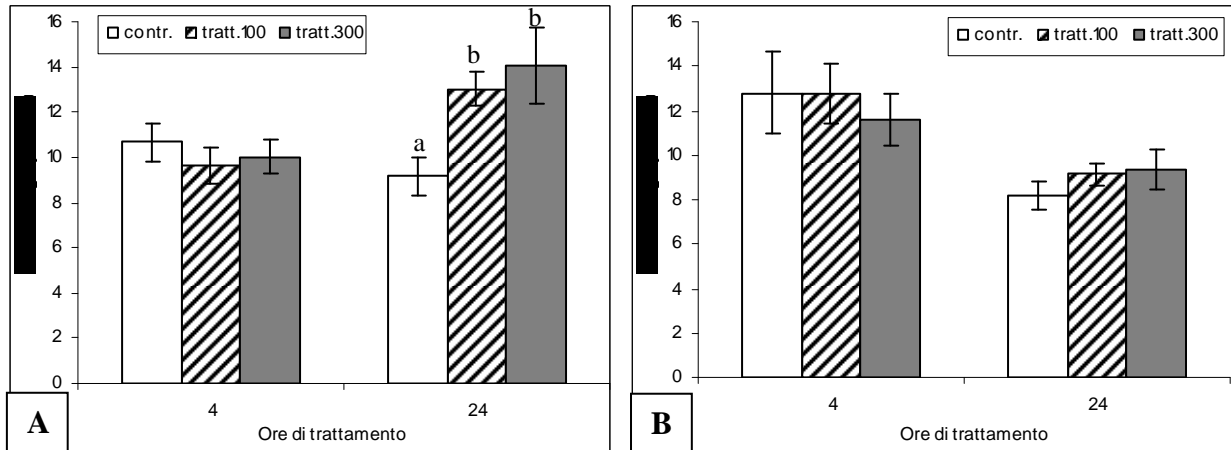


Figura 84 Andamento dell'attività della SOD in radici di *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.

In foglie di *S. fragilis* l'attività della SOD è compresa entro 3,2 e 3,4 U SOD ml⁻¹ proteina e non presenta differenze significative fra le tre tesi, né a 4 né a 24 ore di trattamento (Figura 85/A).

In foglie di *S. matsudana* dopo 4 ore di trattamento non compaiono differenze significative mentre a 24 ore l'attività della SOD nei è significativamente inferiore rispetto al controllo con un valore di quest'ultimo pari a 3 U SOD ml⁻¹ proteina e di 2,7 e 2,3 U SOD ml⁻¹ proteina rispettivamente per il trattamento con cromo 100 e 300 µM (Figura 85/B).

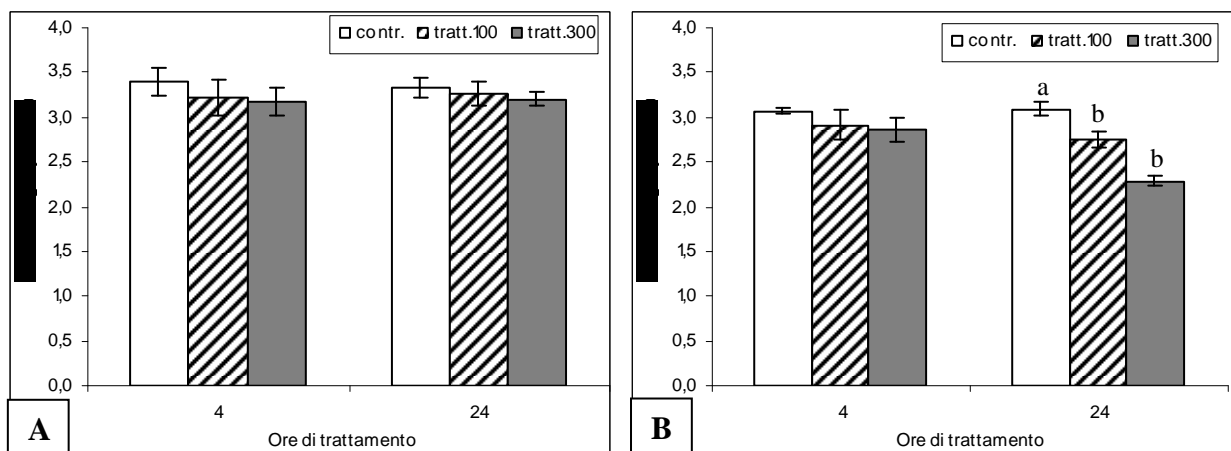


Figura 85 Andamento dell'attività della SOD in foglie di *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.

5. DISCUSSIONE

La presenza sul territorio italiano di numerosi casi di inquinamento da cromo porta alla necessità di individuare delle strategie di risanamento che possano essere impiegate su ampie superfici e con costi contenuti. Lo studio illustrato in questa tesi nasce dalla esigenza di individuare una o più specie vegetali maggiormente promettenti per il fitorimedia di siti inquinati da cromo trivalente e dalla volontà di individuare alcuni fattori che possano alterare le risposte delle piante al cromo.

Gli esperimenti effettuati hanno permesso di studiare le risposte a determinate concentrazioni di cromo trivalente di alcune specie di salice allevate con parametri differenti per:

- durata di trattamento (da 4 ore a 1 anno di trattamento);
- modalità di allevamento (in cella climatica o in pieno campo);
- substrati di crescita (soluzione idroponica, agriperlite, terreno);
- concentrazioni delle soluzioni di trattamento (50, 100 e 300 μM per la soluzione idroponica e 50 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$ terreno).

Questo tipo di indagine permette di avere un quadro piuttosto completo di quelle che possono essere le potenzialità fitodepurative di ogni singola specie. In effetti se da un lato si possono condurre confronti orizzontali all'interno di ogni esperimento confrontando fra loro le risposte delle varie specie al cromo, si può altresì condurre un'indagine che attraversi verticalmente tutti gli esperimenti e considerare le risposte al cromo di ciascuna specie alle diverse modalità sperimentali.

La combinazione di questi due approcci appare innovativa all'interno della letteratura scientifica che spesso ne considera solo uno, il più delle volte il confronto orizzontale. L'approccio verticale permette di passare "dal laboratorio al campo", consolidando alcuni risultati o scoprendo nuovi aspetti legati a ciascuna specie.

La risposta al cromo delle varie specie di salici è stata valutata considerando differenti aspetti morfologici e fisiologici quali: parametri di crescita, contenuto in cromo, ferro e zolfo, microscopia ottica ed elettronica di apici radicali e sezioni di foglie, contenuto in clorofille, andamento di traspirazione, conduttanza stomatica e attività fotosintetica, contenuto in proteine, andamento dell'attività di enzimi coinvolti nello stress ossidativo.

Lo scopo principale della prima attività sperimentale è stato quello di selezionare fra le sette specie di salice analizzate (*S. alba* sub. *typica*, *S. daphnoides*, *S. elaeagnos*, *S. fragilis*, *S. purpurea*, *S. matsudana* var. *tortuosa* e *S. nigra*) quelle più idonee per approfondire le risposte al cromo e cercare di comprendere i processi alla base di tali risposte. La scelta è stata fatta

seguendo il principio secondo cui l'azione di depurazione effettuata dalle piante nei confronti degli inquinanti è tanto più elevata quanto più si riescono ad associare in una stessa specie una notevole produzione di biomassa e un'alta concentrazione di metalli nei suoi tessuti (Gupta *et al.*, 2000). Si è quindi valutata la biomassa prodotta e il contenuto in cromo totale nella parte ipogea. Sono state così scelte le quattro specie che hanno presentato la migliore combinazione di tali parametri: *Salix alba* sub. *typica*; *S. elaeagnos*; *S. fragilis* e *S. matsudana* var. *tortuosa*. Le altre tre specie non sono state riutilizzate in quanto presentavano bassa produzione di biomassa o basso accumulo o entrambi questi fattori.

Le 4 specie individuate sono state sottoposte a trattamenti con Cr(III) a concentrazione 100 e 300 μM in agriperlite al fine di verificare la risposta delle specie scelte al trattamento 100 μM (che era stato usato anche per l'esperimento su sette specie) e valutare le risposte delle specie ad un trattamento a concentrazione più elevata, 300 μM .

A seguito dei risultati ottenuti si è deciso di provare le stesse quattro specie in condizioni più vicine ad un possibile caso di inquinamento ambientale da Cr(III). A tal scopo piante di *Salix alba*, *S. elaeagnos*, *S. fragilis* e *S. matsudana* sono state allevate in vasetti posti in pieno campo e suddivise in due gruppi, uno contenente terreno non contaminato e l'altro contenente terreno contaminato da Cr(III).

Sulla base dei risultati ottenuti dagli esperimenti precedenti sono state infine individuate in *S. fragilis* e *S. matsudana* le specie più promettenti per il fitorimedia da Cr(III). Queste specie sono state scelte in quanto avevano permesso di accumulare una discreta quantità di Cr sia nell'esperimento in terreno (Figura 43), sia negli esperimenti in agriperlite (Figura 26 e 31), inoltre per il fatto che *S. fragilis* è una specie autoctona mentre il *S. matsudana* è alloctona. Tali specie sono state quindi riutilizzate in due esperimenti condotti in cella climatica e cresciute in soluzione idroponica, al fine di approfondire alcuni aspetti legati alla tossicità del Cr su tali specie.

Gli effetti del Cr sulla crescita sono stati evidenziati confrontando fra loro piante di controllo e trattate per i parametri di peso fresco e secco. Negli esperimenti condotti in agriperlite e in soluzione idroponica si è rilevata una generale diminuzione del peso delle piante trattate rispetto a quelle di controllo (Figura 27, 46, e 64). Tale diminuzione è evidenziata anche dall'indice di tolleranza che risulta, in tali esperimenti, generalmente inferiore al 100% e più basso in corrispondenza delle piante trattate con Cr 300 μM rispetto a quelle con 100 μM (Tabella 17, 22, 24). Al contrario nell'esperimento condotto in terreno si ha un tendenziale aumento della biomassa nelle piante sottoposte a trattamento rispetto a quelle di controllo (Figura 39).

L'effetto del cromo sulla diminuzione di biomassa è ben documentato in letteratura e si manifesta sia per trattamenti effettuati utilizzando Cr(VI) che Cr(III). In effetti una riduzione di biomassa in piante trattate con CrCl₃ si è ottenuta su pomodoro (Mangabeira *et al.*, 2006), girasole (Chen e Cutright, 2001), soia - girasole - *Brassica napus* e *juncea* - avena - tabacco - loglio - trifoglio - lenticchia d'acqua e *Pinus taeda* (Mei *et al.*, 2002), sedano (Scoccianti *et al.* 2006) così come in piante trattate con solfato di cromo come cavolfiore (Chatterjee e Chatterjee, 2000), soia - girasole - *Brassica napus* e *juncea* - avena - tabacco - loglio - trifoglio - lenticchia d'acqua e *Pinus taeda* (Mei *et al.*, 2002), frumento (Sharma *et al.* 1995). In *Sinapis alba* Hanus e Thomas (1993) hanno evidenziato che la produzione di sostanza secca viene ridotta dalla somministrazione di Cr(VI) in misura di 200-400 mg kg⁻¹ nel suolo. Prasad *et al.* (2001) riportano, per gli apici radicali di *S. viminialis*, una maggiore tossicità del Cr rispetto ad altri metalli come Cd e Pb.

La diminuzione di crescita radicale può essere causata all'inibizione della divisione e dell'allungamento cellulare dovuta ad una aberrazione cromosomica (Liu *et al.*, 1993) oppure dal prolungamento del ciclo di estensione cellulare nelle radici determinato dalla presenza di cromo (Shanker *et al.*, 2005). In effetti Terry già nel 1981 dimostrò chiaramente che i maggiori effetti della tossicità del cromo in piante di barbabietola da zucchero erano localizzati nei tessuti fibrosi delle radici. Tali osservazioni lo portarono ad ipotizzare una serie di eventi collegati fra loro di risposta alla tossicità del Cr: severi danni ai tessuti fibrosi delle radici e quindi alla funzionalità e alla crescita delle radici stesse, diminuzione dell'assorbimento di acqua e nutrienti, abbassamento del contenuto idrico nelle foglie e quindi ridotta espansione delle stesse, minore attività fotosintetica, dovuta anche ad un possibile minor assorbimento di ferro. Tali risultati sembrano essere confermati sia dall'aspetto morfologico dell'apparato epigeo e ipogeo delle piante sottoposte a trattamento (Figura 55, 56 e 57) sia dall'indagine microscopica condotta nell'esperimento in soluzione nutritiva e trattamento protratto per 15 giorni (Figura 58, 59, 60 e 61).

Infatti dal confronto fra radici di controllo e trattate (Figura 57) appare evidente come queste ultime siano più corte e imbrunite rispetto a quelle di controllo. Tale effetto è stato osservato in diversi casi di esposizione delle radici a metalli e sembra dovuto allo stimolo indotto dal metallo alla lignificazione. Inoltre la presenza di metalli aumenterebbe la quantità di radici con apice morto e nero (Barcelo e Poschenrieder, 1990).

Le figure 60 e 61 riportano delle sezioni di apice radicale fotografate al microscopio ottico. Esse mostrano chiaramente i danni arrecati dal cromo alla struttura di tali organi in *S. fragilis* e *S. matsudana* dopo 15 giorni di trattamento con Cr(III) in soluzione nutritiva. Questo effetto

sull'apparato radicale si traduce in uno stress idrico più o meno pronunciato, ripercuotendosi poi sull'accrescimento generale del resto della pianta. In effetti anche le foto di sezioni di foglie visualizzate al microscopio ottico mostrano diversi danni (Figura 58 e 59) anche se è da notare che le foglie di *S. matsudana* sembrano manifestare minori sintomi di tossicità rispetto a quelle del *S. fragilis*.

Le analisi condotte nell'esperimento in soluzione idroponica e trattamento per 15 giorni sono state effettuate in quanto si voleva portare un confronto con i risultati ottenuti nell'esperimento in agriperlite nel quale erano state utilizzate quattro specie di salice. In effetti, pur avendo utilizzato le medesime concentrazioni di Cr nei due esperimenti, si sono ottenuti risultati differenti con un effetto acuto di tossicità del Cr in corrispondenza dell'esperimento in idroponica (Figura 46, 51, 52, 53, 54) mentre nell'esperimento in agriperlite e in un tempo di trattamento di 28 giorni gli effetti di tossicità si erano manifestati solo con una diminuzione della biomassa delle piante trattate rispetto a quelle di controllo (Figura 27). Per l'esperimento in idroponica si è quindi deciso di procedere con analisi che permettessero di approfondire i danni arrecati alla struttura e all'ultrastruttura delle piante.

Al contrario di quanto evidenziato negli esperimenti condotti in idroponica, le piante di salice allevate in terreno mostrano un tendenziale aumento della biomassa quando sottoposte a trattamento con cromo rispetto a quelle del controllo per tutte le epoche di prelievo tra ottobre 2005 e ottobre 2006 ad eccezione del *S. alba* (Figura 39). Tale stimolo all'accrescimento trova riscontro in letteratura specialmente in caso di trattamenti a basse concentrazioni di metalli pesanti e in risposta sia al Cr che ad altri metalli (Schmidt, 1996; Schützendübel *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2006). In un esperimento condotto su *S. fragilis* e *S. viminalis* da Vandecasteele *et al.* (2005) in differenti terreni contaminati da metalli pesanti (fra i quali anche il Cr) non si riscontrarono effetti negativi sui parametri di crescita. Bonet *et al.* (1991) studiarono l'interazione fra Cr(III), Fe, P e Mn in piante di fagiolo Fe-sufficienti e Fe-carenti e notarono che in corrispondenza dei trattamenti con bassi livelli di Cr(III) si assisteva ad un significativo aumento della crescita sia in piante Fe-sufficienti che Fe-carenti e a una riduzione della clorosi in queste ultime. Tuttavia Poschenrieder *et al.* (1991) non notarono consistenti correlazioni fra cambiamenti nell'ultrastruttura di cloroplasti e stimolo alla crescita causata dal cromo. Questi stessi autori suggerirono che il positivo effetto del Cr(III) nella crescita delle piante potesse essere collegato all'influenza sul livello di citochinine o altri ormoni della crescita, interazione con acidi nucleici, competitiva inibizione del cromo sui legami della spermina al DNA, o induzione all'aumento del livello del poliammide spermina..

L'effetto del cromo sulla crescita delle piante non risulta quindi univoco ma appare dipendente dalla concentrazione e dal substrato di crescita utilizzato: in soluzione idroponica, dove il cromo in soluzione risulta totalmente disponibile all'assorbimento radicale l'effetto sulla diminuzione di crescita esercitata dal cromo sulle piante è massimo, mentre in agriperlite e in terreno l'influenza del cromo sulla crescita è molto ridotto nel primo caso o addirittura di stimolo nel secondo.

Per le piante cresciute in soluzione idroponica e trattate per 24 ore sono state effettuate ulteriori analisi atte a chiarire quali effetti l'assorbimento del Cr potesse provocare all'interno delle piante. È noto che le piante riescono a detossificare il Cr(VI) già a livello degli apici radicali riducendolo a Cr(III) (Zayed *et al.*, 1998; Lytle *et al.*, 1998) e quest'ultimo viene ulteriormente ridotto a Cr(II) della L-cisteina e NADPH (Ozawa *et al.*, 1990; Stohs e Bagchi, 1995). Tali reazioni provocano però all'interno dei tessuti la produzione di composti instabili che, reagendo con l'ossigeno, producono radicali ossidrilici, facenti parte delle specie reattive dell'ossigeno (dette ROS) altamente tossiche per la cellula. La presenza di ROS provoca seri danni quali perossidazione lipidica, ossidazione delle proteine, inibizione degli enzimi e danni a DNA e RNA che possono arrivare fino alla morte delle cellule (Fridowich, 1976; Landberg e Greger, 2002; Gratão *et al.*, 2005; Panda e Choudhury, 2005; Sinha *et al.* 2005; Yu *et al.*, 2007). Per difendersi dallo stress ossidativo le piante possiedono complessi sistemi antiossidanti enzimatici e non enzimatici. Al fine di investigare le immediate risposte al cromo in termini di attività degli enzimi antiossidanti, le piante di *Salix fragilis* e *matsudana* cresciute in soluzione idroponica con concentrazioni di Cr 100 e 300 μ M sono state prelevate dopo 4 e 24 ore di trattamento.

Si può premettere che l'attività degli enzimi coinvolti nella protezione delle cellule dallo stress ossidativo indotto dalla presenza di metalli pesanti è molto variabile in dipendenza da: specie di pianta utilizzata, stadio di sviluppo, tessuto analizzato, tipo di metallo e tempo di esposizione. Quindi le risposte ottenute sono specie-specifiche e riconducibili solo alle modalità di allevamento effettuate in tale esperimento. In letteratura infatti sono riportati molteplici risultati che riportano l'aumento, la diminuzione o la non variazione di ciascuno degli enzimi analizzati in risposta a vari metalli..

In radici di *S. fragilis* e *S. matsudana* si è riscontrato un aumento dell'attività in GPX (Figura 78) e CAT (Figura 82) in corrispondenza di entrambi i trattamenti. Un aumento dell'attività in piante trattate con Cr(VI) è stato riportato anche per la GPX su radici di *Pistia Stratiotes* L. (Sinha *et al.*, 2005) e per la CAT in piante di mais (Sharma *et al.* 2003). Alcuni lavori invece riportano un effetto negativo sull'attività della CAT in presenza di elevati quantitativi di Cr

giustificando tale diminuzione con una possibile negativa interazione del Cr sul Fe che farebbe diminuire la quantità della forma attiva di Fe necessaria al corretto funzionamento della CAT (Yu *et al.*, 2007). La diminuzione del contenuto di Fe però non si è verificata durante le 24 ore del trattamento infatti il contenuto in Fe nelle radici (Figura 69) risulta significativamente superiore nei trattati rispetto al controllo sia in *S. fragilis* che *matsudana* e ciò potrebbe aver contribuito al corretto funzionamento degli enzimi sopra citati..

L'unico enzima che manifesta un calo di attività nelle radici è l'ascorbato perossidasi in *S. matsudana* (Figura 80/B). La differente risposta riscontrata per CAT e APX conferma l'ipotesi avanzata da alcuni autori che sostengono che esista una differente affinità fra APX (scala μM) e CAT (scala mM) per l' H_2O_2 e ciò suggerisce che ci possano essere due differenti classi di enzimi antiossidanti: l'APX può essere responsabile per la modulazione fine dei ROS come segnale, mentre la CAT può essere responsabile della rimozione dell'eccesso di H_2O_2 durante la fase di stress (Mittler, 2002; Scandalios, 2005). Anche Hegedus *et al.* (2001) misurarono un decremento dell'attività dell'APX in radici di piante di orzo sottoposte ad elevate concentrazioni di Cd, così come Schützendübel *et al.* (2002) in piante di pioppo. Tale risultato però non concorda con quanto riportato per il Cr stesso (Shaker *et al.* 2004), per il Cd e per altri metalli quali Zn, Al e Ni in cui si è riscontrato un forte aumento dell'attività dell'APX (Aravidin e Prasard, 2003).

Un significativo aumento di attività si è registrato anche per la SOD in radici di *S. fragilis* (Figura 84/A). Fra gli enzimi saggiati nell'esperimento la SOD è considerata la prima linea di difesa dai radicali liberi in quanto catalizza la conversione del radicale superossido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) in acqua ossigenata (H_2O_2) mentre la CAT e le perossidasi riducono l' H_2O_2 ad acqua.

L'attività registrata per la SOD mostra un aumento dell'attività in radici di *S. fragilis* (Figura 85/A) e al contrario una diminuzione in foglie di *S. matsudana* (Figura 85/B). Anche in altri lavori riportati in letteratura questo enzima ha mostrato risposte contrastanti. È stato determinato un aumento di attività della SOD a seguito di trattamenti con Cd su piante di pino (Vitória *et al.* 2001; Schützendübel *et al.* 2001), nessuna variazione è stata riscontrata in soia trattata con Cd (Ferreira *et al.* 2002) mentre un declino è stato evidenziato in piante di pioppo trattate con Cd (Schützendübel *et al.* 2002) e lattuga trattate con Se (Xue *et al.* 2001). Dixit *et al.* (2002) trovarono che in radici di *Pisum sativum* L. cv. Azad trattato con Cr(VI) si assisteva ad un aumento dell'attività della SOD rispetto al controllo in corrispondenza del trattamento con Cr 20 μM , al contrario nel trattamento con Cr 200 μM l'attività subiva un decremento. Gli autori ipotizzarono che il calo di attività ad alte concentrazioni di Cr fosse dovuto ad un effetto inibitore diretto del Cr sulla SOD stessa; trovarono inoltre che il Cr(VI), proporzionalmente alle concentrazioni utilizzate, inibiva il trasporto di elettroni nei mitocondri probabilmente a causa

dell'interazione fra Cr, Cu e Fe dei trasportatori di elettroni (proteine Fe-S nonheme e proteine heme). Anche Yu *et al.* (2007) riscontrarono una diminuzione dell'attività della SOD in piante trattate con Cr(VI) con concentrazioni da 1,05 a 12,6 mg l⁻¹ in piante di salice ibrido (*Salix matsudana* Koidz X *Salix alba* L.).

Per quanto riguarda l'attività misurata nelle foglie si nota che gli enzimi di *S. fragilis* sembrano essere attivati maggiormente rispetto a quelli del *S. matsudana* soprattutto dopo 4 ore di trattamento suggerendo una maggiore reattività del *S. fragilis* rispetto al *S. matsudana* in risposta ai trattamenti con cromo (Figura 79, 81 e 83). In foglie di *S. fragilis* si ha infatti un aumento dell'attività in GPX e CAT (Figura 79 e 83), mentre una diminuzione per APX (Figura 81). Un calo di attività dell'APX è stato ottenuto anche da Rai *et al.* (2004) su piante di *Ocinum Tenuiflorum* L. trattate con Cr(VI); questi autori misurarono in foglie un aumento dell'attività in GPX e CAT mentre una diminuzione in APX che giocherebbe quindi un ruolo minore nella detossificazione dell'acqua ossigenata a causa della sensibilità di quest'enzima al Cr stesso.

Nei dati ottenuti si è potuto riscontrare che entrambe le specie di salice utilizzate rispondono ai trattamenti con Cr aumentando l'attività di GPX, CAT e SOD soprattutto a livello radicale. Si può dedurre, quindi, che in tali specie esista una immediata risposta in termini di attivazione delle difese dallo stress ossidativo contro il Cr(III). Il Cr nella sua forma trivalente è stato a lungo considerato non tossico ma l'attivazione delle difese antiossidanti riscontrate in questo lavoro conferma quanto emerso, durante gli ultimi anni, sulla pericolosità del cromo anche in questo stato di ossidazione (Pandey e Sharma, 2003; Scoccianti *et al.* 2006). Si suppone che l'attivazione di tali enzimi sia stata permessa anche dal fatto che nell'arco delle 24 ore di trattamento non si è riscontrato un calo nel contenuto in Fe in radici (Figura 69), elemento essenziale al corretto funzionamento di alcune isoforme di tali enzimi. È da riportare inoltre che Quaggiotti *et al.* (2007) hanno identificato potenziali geni candidati nella regolazione delle risposte al Cr(III) delle stesse specie di salice. Sulla base di tale analisi è stato evidenziato come alcuni geni, direttamente o indirettamente, coinvolti nella regolazione delle risposte allo stress ossidativo risultavano sovra espressi.

È chiaro comunque che, sebbene la piante analizzate abbiano attivato tempestivamente alcune difese, lo stress indotto dal Cr soprattutto in certe condizioni, ha portato a lungo termine al deperimento delle piante, come si è evidenziato nel parametro di crescita precedentemente analizzato.

Lo stato di deperimento delle piante sottoposte a trattamento in soluzione idroponica viene confermato anche dal rilievo di traspirazione, conduttanza stomatica e attività fotosintetica. Infatti per piante di *S. fragilis* e *matsudana* cresciute in soluzione idroponica e trattate per 24 ore

i valori di tali parametri per il trattamento con Cr 300 μ M risultano significativamente inferiori rispetto al controllo (Figura 73, 74 e 75). Gli andamenti rilevati in corrispondenza del trattamento con Cr 100 μ M risultano invece di meno semplice interpretazione: da un lato *S. fragilis* mostra valori nelle piante trattate inferiori al controllo, dall'altro *S. matsudana* mostra valori superiori al controllo, sebbene con differenze non sempre significative (Figura 73, 74 e 75). Sembra che, per quanto riguarda il trattamento con cromo 100 μ M il *S. fragilis* risenta sin da subito maggiormente dell'effetto dannoso del cromo rispetto all'altra specie.

Nei confronti della traspirazione e del bilancio idrico alcuni studi riportano effetti negativi causati dal cromo (Vazques *et al.*, 1987; Pandey e Sharma, 2003; Panda e Choudhury, 2005). Gli effetti del cromo sulla conduttanza stomatica potrebbero essere dovuti al suo elevato potenziale ossidativo, che danneggerebbe la membrana delle cellule stomatiche di guardia (Barcelo *et al.*, 1986; Vazques *et al.*, 1987). Altri autori ipotizzano che il mal funzionamento delle cellule di guardia sia dovuto ad uno squilibrio nel contenuto in K, infatti è noto che il Cr può alterare l'assorbimento di numerosi nutrienti essenziali alle piante e quindi creare danni a varie vie metaboliche e processi fisiologici. Moral *et al.* (1995) hanno riportato che il contenuto di nutrienti quali N, P, K, Na, Ca e Mg nei fusti di piante di pomodoro erano negativamente influenzati dai trattamenti con Cr. L'interazione del cromo con Fe, S e altri nutrienti è stata rilevata da molti ricercatori (Skeffington *et al.*, 1976; Barcelo *et al.*, 1985; Adriano, 1986). Una delle cause del minore assorbimento di molti nutrienti in piante trattate con Cr potrebbe essere dovuta all'inibizione dell'attività dell' H^+ ATPasi nella membrana plasmatica radicale derivante dal danneggiamento della membrana plasmatica causato dalla formazione di radicali liberi. La diminuzione dell'attività dell'ATPasi provoca una minore estrusione di protoni che può determinare una diminuzione nell'attività di trasporto attraverso la membrana plasmatica con conseguente riduzione nell'assorbimento di molti nutrienti. Inoltre è possibile che il Cr interferisca con i meccanismi di controllo del pH intracellulare, tale possibilità sembrerebbe supportata dal fatto che il Cr può essere ridotto nella cellula utilizzando protoni (Zaccheo *et al.*, 1985).

L'interferenza del Cr con lo S è stata riscontrata per le quattro specie di salice allevate in agriperlite per le quali il contenuto di zolfo è risultato tendenzialmente inferiore nelle piante trattate rispetto a quelle di controllo in tutte le specie (Figura 33) anche se tali differenze risultano significative solo nelle foglie di *S. elaeagnos* e *S. matsudana* trattate con Cr 300 μ M (Figura 33/B). Il cromo interferisce con l'assorbimento del solfato principalmente sotto forma di Cr(VI) per la loro similarità chimica, in quanto entrerebbe nella cellula tramite gli stessi trasportatori del solfato (Shewry e Peterson, 1974, Schiavon *et al.*, 2008). La forma di cromo

utilizzata nell'esperimento in agriperlite, il Cr(III), sembra però interferire piuttosto con l'assorbimento del ferro, mentre la diminuzione del contenuto di zolfo può essere dovuta ad una generale ridotta capacità di assorbimento dei nutrienti conseguente allo stress generato dal cromo nelle piante.

In effetti, anche in alcuni esperimenti riportati in questa tesi, si è notata una diminuzione del contenuto di ferro sia in foglie che in radici di alcune specie (Figura 70/A, 50/A, 44/A/B e 32/A/B). Ad esempio nell'esperimento condotto in terreno si è notato un minore contenuto di Fe nelle radici del trattato rispetto al controllo in tutti i campionamenti (Figura 44/A/C/E), mentre per le foglie il trattato è risultato minore del controllo solo nel primo prelievo (Figura 44/B) dove il tasso di traslocazione del cromo era doppio rispetto a quello del secondo e terzo prelievo (Tabella 19). Probabilmente la maggior quantità di Cr assorbito dalla pianta e traslocato nelle foglie nel primo prelievo ha influito negativamente sul trasporto del Fe alla parte aerea della pianta. Infatti, per la sua somiglianza con il Fe^{3+} sia nelle proprietà chimiche che nelle dimensioni ioniche, sembra che il Cr(III) si comporti in modo affine a tale ione interferendo con il suo assorbimento e inducendo un'alterazione nel metabolismo del Fe (Schmidt, 1996; Pandey e Sharma, 2003). Un negativo effetto sull'assorbimento del Fe fu riscontrato anche su piante di pomodoro in conseguenza a trattamenti con cromo (Moral *et al.* 1996).

Tuttavia il contenuto in ferro non ha sempre dato risposte univoche, in quanto in alcuni casi si sono ottenuti degli aumenti del contenuto in ferro per le piante sottoposte a trattamento rispetto a quelle di controllo, come in foglie di *S. alba* e *fragilis* nei prelievi di giugno 2005 e ottobre 2006 per l'esperimento condotto su terreno (Figura 44/D/F), in radici trattate con Cr 300 μ M di *S. matsudana* (Figura 50/A), in radici di *S. fragilis* e *matsudana* trattate con Cr 100 e 300 μ M (Figura 69/A/B). Anche l'aumento nel contenuto in Fe è documentato in letteratura in piante allevate in presenza sia di cromo trivalente che esavalente (Cary *et al.*, 1977a,b; Misra e Jaiswal; 1982; Schmidt, 1996), eppure non sono ancora chiare le basi fisiologiche di tale fenomeno. Bonet *et al.* (1991) proposero che i benefici effetti di una bassa concentrazione di Cr (0,25 – 1 μ M) fossero dovuti ad un aumento nel trasporto di Fe. Nelle dicotiledoni il Fe viene preferibilmente assorbito come Fe(II) il quale viene prodotto grazie all'attività dell'enzima Fe(III)-reduttasi che riduce il Fe(III) a Fe(II). Nel 1996 Schmidt misurò un aumento dell'attività dell'enzima Fe(III) reduttasi associato alle radici in piante Fe-carenti e sottoposte a trattamenti con Cr a basse concentrazioni. Cary *et al.* (1977b) hanno riscontrato che somministrando Cr(III) e Cr(VI) in concentrazioni variabili tra 200 e 800 μ g l^{-1} a diverse dicotiledoni orticole, queste assorbivano Fe in maggiore quantità rispetto alle piante di controllo. Al contrario Shaker (2004) trovò che il cromo inibiva la riduzione del Fe(III) a Fe(II) e competeva con i siti di assorbimento

del Fe(II) inoltre, ad alte concentrazioni, il Cr potrebbe indurre sintomi di ferro-carenza grazie alla sua capacità di sostituire il Fe in siti fisiologici importanti (Chatterjee e Chatterjee, 2000).

In base alle risposte ottenute nei vari esperimenti la relazione Cr-Fe non sembra univocamente definita ma a volte sembra influenzata dalla biodisponibilità del cromo nel medium di crescita e perciò dalla sua concentrazione. Infatti sembra che dove il Cr è presente in basse concentrazioni, come nel caso della prova in terreno, dove la biodisponibilità del cromo è ridotta rispetto agli allevamenti in soluzione idroponica, si verifichi un aumento nel contenuto in ferro nelle piante trattate rispetto al controllo (Figura 44). La quantità di Fe misurata nel terreno è pari a 5,8 g Fe Kg⁻¹ suolo secco, valore che corrisponde al minimo nell'intervallo di contenuto in ferro per i terreni coltivati (Violante, 2005). Inoltre, si può supporre che il Fe sia poco biodisponibile a causa del pH alcalino del terreno stesso (Tabella 18). Come è stato riportato in precedenza si può ipotizzare che il Cr abbia agito stimolando l'attività della Fe(III)-reduttasi e favorendo quindi la produzione della forma di Fe assorbibile, la Fe²⁺ (Schmidt, 1996). Non è quindi possibile affermare in modo univoco che la presenza di cromo influisca in modo negativo all'accumulo di ferro.

Per quanto riguarda la diminuzione dell'attività fotosintetica è probabile che essa sia legata ad alcuni fattori quali ad esempio la diminuzione di pigmenti fotosintetici, come clorofilla a e b. Il massimo calo delle clorofille si è ottenuto nell'esperimento condotto in soluzione idroponica con piante trattate per 15 giorni (Figura 51/A). Tale effetto in risposta allo stress indotto dal cromo nelle piante è ben documentato in letteratura (Chatterjee e Chatterjee, 2000; Panda, 2003; Sharma *et al.*, 2003; Pandey e Sharma, 2003; Scoccianti *et al.*, 2006). Il cromo infatti possiede la capacità di degradare l'acido δ -aminolevulonico deidratasi (ALAD), un importante enzima coinvolto nella biosintesi della clorofilla, così come interferisce con l'utilizzazione dell'acido δ -aminolevulonico (ALA) (Vajpayee *et al.*, 2000). Si suppone anche che il Cr possa ridurre l'attività dell'ALAD in quanto si sostituirebbe agli ioni Mg dai siti attivi dell'enzima (Vajpayee *et al.*, 2000).

Il calo dell'attività fotosintetica può essere spiegato anche dallo stato di degradazione dell'ultrastruttura dei cloroplasti evidenziato dalle indagini effettuate al TEM (Figura 62 e 63). In alcuni studi la condensazione dello stroma è stata messa in relazione ai sintomi derivanti dallo stress ossidativo così come la deformazione e il minor volume dei cloroplasti (Figura 62/B/C e 63/B/C) (Kukkola *et al.* 2000).

In altre condizioni di crescita delle stesse piante non si è registrato un calo nel contenuto di clorofille, anzi nelle piante allevate in terreno si è registrato un significativo aumento nel contenuto di clorofille nelle piante esposte al cromo per tutti i prelievi e per tutte le specie di

salice utilizzate (Figura 45/A/C/E), tale risposta potrebbe essere collegata al generale aumento di Fe riscontrato nelle foglie (Figura 44/B). Anche l'aumento del contenuto in clorofille ha trovato riscontro in letteratura in alcuni esperimenti condotti con Cr sia a basse (Bonet *et al.*, 1991) che ad alte concentrazioni (Sharma *et al.* 2003). In quest'ultimo lavoro piante di mais sono state sottoposte a trattamenti con Cr(IV) per 40 giorni a concentrazioni crescenti di cromo (0,05-0,1-0,25-0,5 e 1 mM) e in corrispondenza dei trattamenti con Cr superiori a 0,1 mM il contenuto di clorofilla era uguale o leggermente superiore rispetto al controllo.

Per quanto riguarda il contenuto di cromo nei tessuti fogliari e radicali (Figura 25, 30, 42, 48 e 66) si riscontrano differenti capacità di accumulo sia confrontando fra loro le varie specie sia all'interno di ogni singola specie. Infatti si sono rilevate notevoli differenze nella quantità di cromo immobilizzato nei tessuti in relazione al substrato di crescita utilizzato.

I livelli di cromo presenti in piante cresciute in suoli non contaminati sono solitamente minori di $1 \mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s., raramente superano i $5 \mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s., e tipicamente rientrano nell'ordine di 0,02 e $0,2 \mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s. (Kabata e Pendias, 1992). Nelle prove effettuate in questo studio i dati rilevati nei tessuti di controllo non eccedono mai il valore medio di $14 \mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s. in radici e $4 \mu\text{g Cr g}^{-1}$ s.s. in foglie per tutti gli esperimenti, mentre il valore dei tessuti delle piante sottoposte a trattamento arrivano a livelli notevoli.

I valori massimi di accumulo si sono ottenuti nell'esperimento condotto in soluzione idroponica e trattamento per 15 giorni (Figura 66). Tuttavia si è rilevato un maggior accumulo in corrispondenza delle radici di piante trattate con Cr 100 μM rispetto a quelle sottoposte al trattamento con Cr 300 μM . Tale risultato è in contrasto con i dati disponibili in letteratura che riportano generalmente un maggior accumulo Cr nei tessuti di piante trattate con concentrazioni superiori (Dixit *et al.*, 2002; Scoccianti *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007). La quantità di Cr accumulata potrebbe essere stata alterata dallo stato di deperimento generale delle piante, testimoniato anche dalle indagini di microscopia, sia ottica che elettronica (Figura 60, 61, 62 e 63). Infatti è molto probabile che a causa di tale stato di deperimento i sistemi di assorbimento e traslocazione del Cr siano stati compromessi così come è probabile che vi sia anche stata una perdita di Cr da parte delle cellule a causa della loro degradazione in corrispondenza delle piante trattate con Cr 300 μM . Infatti è noto che quando la cellula si danneggia o muore le sostanze che aveva accumulato si disperdono nuovamente all'esterno abbandonandosi al processo spontaneo della diffusione (Longo, 1997). Anche MacFarlane e Burchett (2000) trovarono una maggiore concentrazione di Cu in foglie di mangrovia sottoposte a trattamento con Cu 400 $\mu\text{g g}^{-1}$ di sedimento rispetto a quelle cresciute alla concentrazione di Cu 800 $\mu\text{g g}^{-1}$ di sedimento

Per quanto riguarda gli esperimenti condotti utilizzando soluzione nutritiva è interessante notare che in soluzione idroponica le piante hanno raggiunto valori di accumulo di cromo molto elevati, soprattutto nell'apparato radicale (Figura 48, 66), mentre nei tessuti delle piante cresciute in agriperlite e irrorate della stessa soluzione nutritiva si sono ottenuti valori di accumulo più che dimezzati rispetto ai precedenti (Figura 30). Una spiegazione di tale differenza ci è fornita da uno studio condotto da Chakir *et al.* (2002) nel quale è emerso che la perlite è in grado di adsorbire, dopo 24 ore, fino al 40% del Cr(III) addizionato tramite una soluzione di Cr(III) 0,38 mM. Inoltre l'adsorbimento aumenterebbe esponenzialmente passando da pH 1,5 a 5. Il pH misurato nelle soluzioni di trattamento (Tabella 9) risulta quindi essere compreso nell'intervallo in cui il fenomeno di adsorbimento del Cr(III) sulle pareti della perlite sarebbero superiori al 22% (Chakir *et al.*, 2002). È ipotizzabile quindi che il minor accumulo di cromo nei tessuti di piante allevate in perlite sia dovuto ad una minore biodisponibilità del metallo nella soluzione nutritiva circolante e quindi a un minor assorbimento da parte della pianta. Ciò sembrerebbe inoltre spiegare il motivo dei minori effetti negativi esercitati dal Cr sulle piante allevate in agriperlite rispetto a quelle allevate in soluzione idroponica in relazione ai parametri visti in precedenza.

Anche per l'esperimento condotto in terreno è possibile che il minor accumulo di Cr nei tessuti vegetali sia dovuto ad una minore disponibilità del Cr nel terreno. Infatti il cromo trivalente è adsorbito 30÷300 volte più fortemente alla componente argillosa del suolo rispetto al cromo esavalente (Griffin *et al.*, 1977). All'aumentare del pH l'adsorbimento del Cr(III) a questa componente aumenta mentre diminuisce per il Cr(VI), fino ad azzerarsi nei confronti del Cr(VI) a pH intorno a 8,5. L'aumento di adsorbimento del Cr(III) ad alti valori di pH è attribuita alla capacità di scambio cationico-adsorbimento delle specie idrolizzate di Cr(III) (Griffin *et al.*, 1977). Il pH misurato nel terreno utilizzato per l'esperimento è pari a 8,3, valore che lo rende un terreno alcalino (Tabella 18).

Il contenuto di cromo misurato in radici e foglie delle specie di *Salix* in tutti gli esperimenti effettuati in questo studio conferma quanto osservato da altri ricercatori: il Cr presente nelle foglie è decine di volte inferiore alle concentrazioni riscontrate nelle radici, in quanto i tassi di traslocazione si aggirano generalmente attorno dall'1÷2% (Tabella 16, 19, 21 e 23). Percentuali simili sono state riscontrate anche da Zayed *et al.* (1998) in alcune piante del genere *Brassica*, ma si osservano comunemente in molte specie sia erbacee che arboree trattate con cromo (Huffman e Allaway, 1973; Cary *et al.*, 1977; Punshon e Dickinson, 1997; Zayed *et al.*, 1998; Stoltz e Greger, 2002; Pandey e Sharma, 2003; Zayed e Terry, 2003; Rosselli *et al.*, 2003; Vandecasteele *et al.*, 2005).

Mandabeira *et al.* (2006) hanno studiato le modalità di assorbimento, traslocazione e stoccaggio del Cr(III) all'interno di piante di pomodoro. Il Cr(III) fu localizzato nel parenchima corticale delle radici di alcune cellule che stoccavano calcio ossalato inoltre mediante l'indagine al TEM la ricerca dimostrò che il Cr(III) si concentra in radici e fusti molto più che in foglie e viene traslocato limitatamente in quanto forma complessi stabili con molecole organiche come proteine e carboidrati già all'interno delle radici. Come è stato osservato in molti studi una ridotta quantità di Cr giunge tuttavia fino alle foglie, dove si ritiene che venga complessato da composti organici (come l'acido ossalico), individuati come potenziali chelatori del Cr(III) (Zenk, 1996; Lasat *et al.*, 1998; Lasat, 2002; Hall, 2002; Mangabeira *et al.*, 2006). Il cromo legato all'ossalato nelle foglie sembra che possa essere secreto sotto forma di struttura cristallina sulla superficie fogliare (Lytle *et al.*, 1998).

Tuttavia, in piante di *S. fragilis* e *matsudana* cresciute in soluzione idroponica e sottoposte per 15 giorni a trattamento con cromo 300 µM si è riscontrato un tasso di traslocazione superiore al 20% (Tabella 21). Ciò potrebbe essere imputabile allo stato di generale sofferenza misurato nelle piante e alla conseguente alterazione dei processi di assorbimento e traslocazione del metallo. È da notare tuttavia che la capacità di traslocazione del Cr dalle radici alle foglie non rivela differenze significative dal confronto fra le due specie all'interno di ciascun trattamento nonostante l'accumulo di cromo nelle radici fosse molto più elevato in *S. fragilis* rispetto al *S. matsudana* (Figura 48).

Considerando congiuntamente il contenuto di cromo per grammo di sostanza secca e la biomassa prodotta dalle piante, si ha una misura della rimozione totale di cromo effettuata da ciascuna specie. È interessante notare che *S. fragilis* è la specie che in tutte le modalità sperimentali applicate è risultata la migliore in termini di rimozione di cromo, quindi la capacità di accumulo sembra essere una qualità intrinseca alla specie, mentre il *medium* di crescita sembra influenzare la biodisponibilità del Cr. Infatti gli accumuli maggiori si ottengono in corrispondenza degli esperimenti condotti in soluzione idroponica, mentre i minori per quelli condotti in agriperlite e in terreno.

Per quanto riguarda l'esperimento in terreno è interessante notare la diminuzione di accumulo per unità di biomassa nei tessuti analizzati dei prelievi di giugno e ottobre 2006 rispetto a quello di ottobre 2005. Ciò potrebbe essere imputabile al limitato volume di terreno contaminato. Inoltre il terreno utilizzato è stato contaminato con Cr una sola volta e il cromo presente in esso, peraltro in quantità molto modeste (Tabella 20), può essere andato incontro nel tempo a maggiori fenomeni di complessazione e adsorbimento da parte del terreno.

La tabella 20 mostra la variazione percentuale media di cromo nel terreno suddiviso per ciascuna specie su di esso cresciuta. Tale valore viene confrontato con quello riscontrato nel terreno di “controllo + Cr”, ossia terreno sottoposto al medesimo trattamento con cromo e pari regime di adacquamento ma non inerbito e quindi sottoposto alla sola perdita di cromo dovuta all'effetto della lisciviazione dell'acqua nel terreno. In tutte e tre le epoche di campionamento si nota come la presenza dei salici abbia contribuito all'abbassamento del contenuto totale di cromo nel terreno. Questo risultato conferma l'effetto positivo che le piante di salice utilizzate hanno nella rimozione del Cr(III) dal terreno e mostrano l'importante ruolo che potrebbero assumere se impiegate in aree contaminate da cromo trivalente. Inoltre anche la quantità di Cr sequestrata all'interno delle radici risulta non è più soggetta a fenomeni di lisciviazione con conseguente contaminazione delle acque superficiali e profonde.

6. CONCLUSIONI

Nella fase di progettazione di un impianto di fitodepurazione è fondamentale la scelta accurata delle specie vegetali da utilizzare, in relazione al tipo di contaminante, alle condizioni di crescita e ai tempi di decontaminazione. Tale scelta può infatti pregiudicare l'efficacia dell'azione fitodepurante. Negli anni, molteplici sperimentazioni hanno cercato di chiarire le potenzialità fitodepurative dei salici. Nel complesso si è notata una buona capacità di accumulo di inquinanti naturali e xenobiotici con ampia variabilità a seconda della specie considerata per produzione di biomassa, capacità di accumulo, traslocazione dall'apparato ipogeo a quello epigeo, con possibile specificità di rimozione per uno o più metalli. L'individuazione delle specie più adatte alla rimozione/stabilizzazione dell'inquinante non può quindi prescindere da un'adeguata sperimentazione.

L'esito degli esperimenti effettuati su salici sottoposti a trattamenti con cromo trivalente, ha evidenziato alcune caratteristiche intra-specifiche che possono essere influenzate dalle modalità sperimentali. La scelta del *medium* di crescita, ad esempio, pare influire sulla velocità di accrescimento di alcune specie: *S. elaeagnos* si è rilevata particolarmente vigorosa in terreno mentre ha manifestato crescita stentata in agriperlite.

Confrontando i tre substrati di crescita, se da un lato non si può prescindere dall'utilizzo del terreno in quanto costituisce il naturale substrato di sviluppo delle piante, dall'altro, l'agriperlite e la soluzione idroponica sono stati utilizzati a scopi sperimentali per ridurre la complessità delle interazioni che avvengono fra suolo e pianta. Dal confronto fra soluzione idroponica e agriperlite sembra che quest'ultimo sia il substrato meno adatto alla sperimentazione infatti è emerso che le piante allevate in agriperlite accumulano una quantità di cromo inferiore rispetto a quelle allevate in soluzione idroponica. Ciò potrebbe essere imputabile ad una ridotta biodisponibilità di Cr che verrebbe adsorbito dalla perlite, così come evidenziato in alcune pubblicazioni scientifiche. Questo aspetto altera quindi la valutazione della potenzialità massima fitodepurativa delle piante.

Per effetto della mediazione del substrato di crescita anche gli esiti del cromo sulle piante non si sono manifestati in maniera univoca: se ad elevate concentrazioni e biodisponibilità il cromo esplica una notevole tossicità sulle piante, a basse concentrazioni esso sembra stimolare la crescita e la produzione di clorofille. Le piante cresciute in terreno contaminato con Cr(III) sono apparse più rigogliose delle corrispondenti cresciute nel terreno non trattato.

S. fragilis è la specie che ha ottenuto i migliori risultati in termini di accumulo, indipendentemente dal variare delle modalità sperimentali e delle concentrazioni di Cr utilizzate. La capacità di accumulo sembra perciò essere una qualità intrinseca alla specie, mentre il

medium di crescita pare influenzare la biodisponibilità del Cr. Gli accumuli maggiori si sono infatti ottenuti negli esperimenti condotti in soluzione idroponica, mentre i minori sono stati registrati in agriperlite e in terreno.

In *S. fragilis* è stata inoltre osservata una elevata produzione di biomassa radicale e ciò rende questa specie certamente utilizzabile su terreni contaminati da cromo per la sua attitudine a raggiungere in breve tempo una buona penetrazione del terreno.

Va segnalato tuttavia che *S. fragilis* ha mostrato i più bassi indici di tolleranza calcolati per gli esperimenti in soluzione idroponica. Ciò potrebbe indicare che le piante migliori accumulatrici possono in realtà essere le meno tolleranti per la loro bassa efficienza nell'attuare delle strategie di difesa contro l'ingresso del cromo rispetto alle specie più tolleranti.

Un altro parametro che sembra non variare con le modalità sperimentali è il tasso di traslocazione del Cr alla parte epigea. Tale indice risulta generalmente molto ridotto e aumenta nemmeno a fine stagione vegetativa per l'esperimento in terreno.

Per quanto sopra esposto, ed in particolare per la capacità di accumulo e la produzione di biomassa, *S. fragilis* ha fornito i migliori risultati per il fitorimedio di substrati contaminati da Cr(III) risulta essere il *S. fragilis*.

In termini generali la ridotta traslocazione alla parte epigea rende le specie analizzate in questo lavoro più adatte alla fitostabilizzazione all'interno dei tessuti radicali che alla fitoestrazione. Ciò è comunque considerato come un aspetto positivo in quanto il cromo viene immobilizzato e non è più soggetto a fenomeni di lisciviazione con conseguente contaminazione delle acque superficiali e profonde.

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1 Possibili meccanismi adottati dalle cellule vegetali per tollerare elevate concentrazioni di inquinanti organici e/o inorganici (Pilon-Smits, 2005). (GSH= glutatione; Glu=glucosio; MT=metallotionine; NA=nicotinammina; OA= acidi organici; PC=fitochelatine; il trasporto attivo è rappresentato dai rettangoli rosa con la freccia nera).....	17
Figura 2 Vie di detossificazione dei radicali liberi nelle piante. (a) Il ciclo acqua-acqua nei cloroplasti, (b) il ciclo ascorbato-glutatione in cloroplasti, citosol, mitocondri, apoplasto e perossisomi, (c) il ciclo glutatione perossidasi (GPX) nei perossisomi, (d) catalasi (CAT) nei perossisomi. Abbreviazioni: DHA=deidroascorbato, DHAR=deidroascorbato reductasi, Fd=ferredoxina, GR=glutatione reductasi, GSSH=glutatione ossidato, GSH=glutatione ridotto, MDA=monodeidroascorbato, MDHAR= monodeidroascorbato reductasi, PSI=fotosistema I, tAPX=ascorbato perossidasi tilacoidale (Da: Mittler, 2002).	22
Figura 3 Alcuni minerali contenenti cromo: cromo metallico (A), crocoite (B) e cromite (C)	25
Figura 4 Colorazione assunta da alcuni composti di cromo: $K_2Cr_2O_7$ (A), K_2CrO_4 (B) e $CrCl_3$ (C) (Da: Shupack, 1991).....	25
Figura 5 Il ciclo di ossidazione-riduzione del cromo nel suolo (James e Bartlett 1988).	31
Figura 6 Processi inerenti la fitodepurazione: Fitoestrazione (A), Rizofiltrazione (B), Fitostabilizzazione (C) e fitovolatilizzazione (D) (modificato da: http://rydberg.biology.colostate.edu/epsmitlab/).	35
Figura 7 Possibili meccanismi di assorbimento del Cr : (1) ritenzione del Cr(III) nell'apoplasto; (2) diffusione del Cr(III) attraverso il plasmalemma e il tonoplasto; (3) legame del Cr(III) ai fitosiderofori e trasporto dei complessi attraverso la membrana plasmatica; (4) legame del complesso Cr(III)-fitosiderofori alla membrana plasmatica; (5) trasporto del Cr(VI) mediante trasportatori anionici e sua riduzione nel citosol; (6) riduzione apoplastica Cr(VI) → Cr(III) e conseguente trasporto attraverso il plasmalemma o il tonoplasto; (7) trasporto del Cr(VI) al tonoplasto e riduzione nel vacuolo. (Modificato da Shaker <i>et al.</i> 2005).....	41
Figura 8 Coinvolgimento del cromo sull'inibizione nel sistema di trasporto degli elettroni nelle piante; 1, 2 e 3 rappresentano i siti di inibizione del Cr (da: Panda e Choudhury, 2005).....	45
Figura 9 Portamento (A) e particolare delle foglie (B) di <i>S. alba</i> subsp. <i>typica</i>	51
Figura 10 Portamento (A) e particolare delle foglie (B) di <i>S. daphnoides</i>	52
Figura 11 Particolare del germoglio (A) e delle infiorescenze (B) di <i>S. elaeagnos</i>	53
Figura 12 Portamento (A) e particolare del germoglio (B) di <i>S. fragilis</i>	54
Figura 13 Portamento (A) e particolare del germoglio (B) di <i>S. purpurea</i>	55
Figura 14 Portamento (A) e particolare del germoglio (B) di <i>S. nigra</i>	56
Figura 15 Portamento (A) e particolare del germoglio (B) di <i>S. matsudana</i>	57
Figura 16 Posizionamento delle piante all'interno della cella climatica per il secondo esperimento.	58
Figura 17 Sistema randomizzato di controllo (A) e di trattamento (B).	60
Figura 18 Allevamento di talee in cella climatica per il quarto esperimento. Allevamento in un'unica vasca fino a 37 giorni (A) e allevamento in tre vasche distinte per ciascuna tesi per i successivi 15 giorni di trattamento (B).	62

Figura 19 Allevamento di talee in cella climatica per il quinto esperimento. Foto di insieme (A) e piante sottoposte a trattamento per 4 e 24 ore (B).....	63
Figura 20 Triangolo della tessitura (modello USDA).....	65
Figura 21 Lo strumento <i>LCi Portable Photosynthesis System</i> montato su cavalletto (A) e particolare della cuvetta per latifoglie (B).....	70
Figura 22 Peso fresco medio delle sette specie di <i>Salix</i> cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=7) dei singoli organi.....	80
Figura 23 Peso secco medio delle sette specie di <i>Salix</i> cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=7) dei singoli organi.....	80
Figura 24 Rapporto fra il peso secco e il peso fresco delle sette specie di <i>Salix</i> cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=7) dei singoli organi.....	81
Figura 25 Contenuto di cromo in radici di ciascuna specie di <i>Salix</i> cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=7); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,5$	81
Figura 26 Contenuto totale di Cr per specie e per ciascun trattamento. Le barre indicano l'errore standard (n=7); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni trattamento, per $\alpha < 0,5$	82
Figura 27 Peso fresco medio delle quattro specie di <i>Salix</i> cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=6) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative nella biomassa totale all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,05$	83
Figura 28 Peso secco medio delle quattro specie di <i>Salix</i> cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=6) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative nella biomassa totale, all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,05$	84
Figura 29 Rapporto tra peso secco e peso fresco delle quattro specie di <i>Salix</i> cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=6) dei singoli organi.....	84
Figura 30 Contenuto di cromo in radici (A) e foglie (B) di ciascuna specie di <i>Salix</i> cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=7) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,5$	85
Figura 31 Contenuto totale di Cr per specie e per ciascuna trattamento. Le barre indicano l'errore standard (n=7); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni trattamento, per $\alpha < 0,5$	86
Figura 32 Contenuto di ferro in radici (A) e foglie (B) di ciascuna specie di <i>Salix</i> cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=7) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,5$	88
Figura 33 Contenuto di zolfo in radici (A) e foglie (B) di ciascuna specie di <i>Salix</i> cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=7) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $< 0,5$	89
Figura 34 Contenuto di pigmenti fotosintetici delle quattro specie di <i>Salix</i> cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=7) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $< 0,5$	89
Figura 35 Rapporto clorofilla a/b delle quattro specie di <i>Salix</i> cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=7) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $< 0,5$	90

- Figura 36 Andamento della traspirazione in *S. alba* (A), *S. elaeagnos* (B), *S. fragilis* (C) e *S. matsudana* (D). Piante cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n = 12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo. 91
- Figura 37 Andamento della conduttanza stomatica in *S. alba* (A), *S. elaeagnos* (B), *S. fragilis* (C) e *S. matsudana* (D). Piante cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n = 12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo. 92
- Figura 38 Andamento dell'attività fotosintetica in *S. alba* (A), *S. elaeagnos* (B), *S. fragilis* (C) e *S. matsudana* (D). Piante cresciute in agriperlite e sabbia. Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo. 93
- Figura 39 Peso fresco medio delle piante prelevate in ottobre 2005 (A), in giugno 2006 (B) e ottobre 2006 (C) delle quattro specie di *Salix* cresciute in terreno. Le barre indicano l'errore standard (n=6) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative nella biomassa totale, all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,05$ 96
- Figura 40 Peso secco medio delle piante prelevate in ottobre 2005 (A), in giugno 2006 (B) e ottobre 2006 (C) delle quattro specie di *Salix* cresciute in terreno. Le barre indicano l'errore standard (n=6) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative nella biomassa totale, all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,05$ 98
- Figura 41 Rapporto tra peso secco e peso fresco delle quattro di *Salix* cresciute in terreno. Le barre indicano l'errore standard (n=6) della biomassa totale. 99
- Figura 42 Contenuto medio di cromo in radici (A) e foglie (B) delle piante prelevate in ottobre 2005, in radici (C) e foglie (D) di giugno 2006, e in radici (E) e foglie (F) di ottobre 2006 delle quattro specie di *Salix* cresciute in terreno. Le barre indicano l'errore standard (n=6); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,05$. .. 101
- Figura 43 Contenuto totale di Cr delle piante cresciute in terreno, suddivise per specie e per ciascuna epoca di prelievo. Le barre indicano l'errore standard (n=7); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni epoca di prelievo, per $\alpha < 0,5$ 102
- Figura 44 Contenuto medio di ferro in radici (A) e foglie (B) delle piante prelevate in ottobre 2005, in radici (C) e foglie (D) di giugno 2006, e in radici (E) e foglie (F) di ottobre 2006 delle quattro specie di *Salix* cresciute in terreno. Le barre indicano l'errore standard (n=6); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,05$. .. 105
- Figura 45 Contenuto medio di pigmenti fotosintetici delle piante prelevate in ottobre 2005 (A), in giugno 2006 (C) e ottobre 2006 (E). Rapporto clorofilla a/b delle piante prelevate in ottobre 2005 (B), in giugno 2006 (D) e ottobre 2006 (F) di delle quattro specie di *Salix* cresciute in terreno. Le barre indicano l'errore standard (n=6); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,05$ 107
- Figura 46 Peso fresco medio (A) e peso secco medio (B) delle due specie di *Salix*. Le barre indicano l'errore standard (n=12) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative nella biomassa totale, all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,05$ 109
- Figura 47 Rapporto tra peso secco e peso fresco delle due specie di *Salix*. Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative dei singoli organi per ciascun organo, all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,05$ 109

Figura 48	Contenuto di cromo in radici (A) e foglie (B) di ciascuna specie di <i>Salix</i> . Le barre indicano l'errore standard (n=12) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,5$	110
Figura 49	Contenuto totale di Cr delle piante di <i>Salix</i> . Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni tesi, per $\alpha < 0,5$	111
Figura 50	Contenuto di ferro in radici (A) e foglie (B) di ciascuna specie di <i>Salix</i> . Le barre indicano l'errore standard (n=12) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,5$	113
Figura 51	Contenuto di pigmenti fotosintetici (A) e rapporto clorofilla a/b (B) delle due specie di <i>Salix</i> . Le barre indicano l'errore standard (n=4) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,5$	114
Figura 52	Andamento della traspirazione in <i>S. fragilis</i> (A) e <i>S. matsudana</i> (B). Le barre indicano l'errore standard (n = 12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.	115
Figura 53	Andamento della conduttanza stomatica in <i>S. fragilis</i> (A) e <i>S. matsudana</i> (B). Le barre indicano l'errore standard (n = 12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.	115
Figura 54	Andamento della fotosintesi in <i>S. fragilis</i> (A) e <i>S. matsudana</i> (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.	116
Figura 55	Piante di salice dopo 15 giorni di trattamento. Piante di controllo (A), piante trattate con cromo 100 μ M (B) e piante trattate con cromo 300 μ M (C).	116
Figura 56	Foglie di piante sottoposte a 15 giorni di trattamento con soluzione di Cr 300 μ M. <i>S. fragilis</i> (A) e <i>S. matsudana</i> (B).	117
Figura 57	Radici di <i>S. fragilis</i> cresciute in soluzione idroponica per sette settimane di cui due di trattamento. (A) Pianta di controllo e (A) pianta trattata con 300 μ M di CrCl_3	117
Figura 58	Sezioni trasversali di foglie di <i>S. fragilis</i> osservate al microscopio ottico. (A) Foglia di controllo, (B) foglia trattata con 100 μ M di CrCl_3 e (C) foglia trattata con 300 μ M di CrCl_3 . Ingrandimento 10 X. cs= camera sottostomatica; pp= parenchima a palizzata; pl= parenchima lacunoso.	118
Figura 59	Sezioni trasversali di foglie di <i>S. matsudana</i> osservate al microscopio ottico. (A) Foglia di controllo, (B) foglia trattata con 100 μ M di CrCl_3 e (C) foglia trattata con 300 μ M di CrCl_3 . Ingrandimento 25 X. cs= camera sottostomatica; pp= parenchima a palizzata; pl= parenchima lacunoso.	119
Figura 60	Sezioni longitudinali di apici radicali di <i>S. fragilis</i> osservati al microscopio ottico. (A) Apice di controllo, (B) apice trattato con 100 μ M di CrCl_3 e (C) apice trattato con 300 μ M di CrCl_3 . Ingrandimento 10 X. cr=cuffia radicale; m= meristema.....	120
Figura 61	Sezione di apici radicali di <i>S. matsudana</i> osservati al microscopio ottico. Piante cresciute in soluzione idroponica per sette settimane di cui due di trattamento. (A) Apice di controllo, (B) apice trattato con 100 μ M di CrCl_3 e (C) apice trattato con 300 μ M di CrCl_3 . Ingrandimento 10 X. cr=cuffia radicale; m=meristema.	121
Figura 62	Cloroplasti del mesofillo fogliare di <i>S. fragilis</i> fotografati al microscopio elettronico a trasmissione. (A) Piante di controllo, (B) piante trattate con 100 μ M di CrCl_3 e (C) piante trattate con 300 μ M di CrCl_3 . Ingrandimento 21000 X. a=accumuli di amido; tg=tilacoidi granali; ts=tilacoidi intergrana; s=stroma; go=globuli osmiofilati.	122

- Figura 63 Cloroplasti del mesofillo fogliare di *S. matsudana* fotografati al microscopio elettronico a trasmissione. (A) Piante di controllo, (B) piante trattate con 100 μM di CrCl_3 e (C) piante trattate con 300 μM di CrCl_3 . Ingrandimento 21000X. a=accumuli di amido; tg=tilacoidi granali; ts=tilacoidi intergrana; s=stroma; go=globuli osmiofili..... 123
- Figura.64 Peso fresco medio (A) e peso secco medio (B) delle due specie di *Salix* cresciute in soluzione idroponica per cinque settimane e trattate per 24 ore. Le barre indicano l'errore standard (n=12) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative nella biomassa totale, all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,05$ 124
- Figura 65 Rapporto tra peso secco e peso fresco delle due specie di *Salix* cresciute in soluzione idroponica per cinque settimane e trattate per 24 ore. Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per ciascun organo, all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,05$ 125
- Figura 66 Contenuto di cromo in radici di *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B) cresciute in soluzione idroponica per cinque settimane. Le barre indicano l'errore standard (n=4); lettere diverse indicano differenze significative all'interno della stessa ora di prelievo, per $\alpha < 0,5$ 126
- Figura 67 Contenuto di cromo in foglie di *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B) cresciute in soluzione idroponica per cinque settimane. Le barre indicano l'errore standard (n=4); lettere diverse indicano differenze significative all'interno della stessa ora di prelievo, per $\alpha < 0,5$ 126
- Figura 68 Contenuto totale di Cr per *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B) cresciute in soluzione idroponica per cinque settimane. Le barre indicano l'errore standard (n=4); lettere diverse indicano differenze significative all'interno della stessa ora di prelievo, per $\alpha < 0,5$ 127
- Figura 69 Contenuto di ferro in radici di *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n=4); lettere diverse indicano differenze significative all'interno della stessa ora di prelievo, per $\alpha < 0,5$ 128
- Figura 70 Contenuto di ferro in foglie di *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n=4); lettere diverse indicano differenze significative all'interno della stessa ora di prelievo, per $\alpha < 0,5$ 129
- Figura 71 Contenuto di pigmenti fotosintetici in piante di *S. fragilis* (A) e in *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative all'interno della stessa ora di prelievo per la clorofilla totale, per $< 0,5$ 130
- Figura 72 Rapporto clorofilla a/b in *S. fragilis* (A) e in *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12) dei singoli organi; lettere diverse indicano differenze significative all'interno della stessa ora di prelievo, per $< 0,5$ 130
- Figura 73 Andamento della traspirazione in *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo. 131
- Figura 74 Andamento della conduttanza stomatica in *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo. 131
- Figura 75 Andamento dell'attività fotosintetica in *S. fragilis* (A) e *S. matsudana* (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo. 132

Figura 76 Contenuto di proteine in radici di <i>S. fragilis</i> (A) e <i>S. matsudana</i> (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.	133
Figura 77 Contenuto di proteine in foglie di <i>S. fragilis</i> (A) e <i>S. matsudana</i> (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.	133
Figura 78 Andamento dell'attività della GPX in radici di <i>S. fragilis</i> (A) e <i>S. matsudana</i> (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.....	134
Figura 79 Andamento dell'attività della GPX in foglie di <i>S. fragilis</i> (A) e <i>S. matsudana</i> (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.....	135
Figura 80 Andamento dell'attività della APX in radici di <i>S. fragilis</i> (A) e <i>S. matsudana</i> (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.....	135
Figura 81 Andamento dell'attività della APX in foglie di <i>S. fragilis</i> (A) e <i>S. matsudana</i> (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.....	136
Figura 82 Andamento dell'attività della CAT in radici di <i>S. fragilis</i> (A) e <i>S. matsudana</i> (B).. Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.....	137
Figura 83 Andamento dell'attività della CAT in foglie di <i>S. fragilis</i> (A) e <i>S. matsudana</i> (B).. Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.....	137
Figura 84 Andamento dell'attività della SOD in radici di <i>S. fragilis</i> (A) e <i>S. matsudana</i> (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.....	138
Figura 85 Andamento dell'attività della SOD in foglie di <i>S. fragilis</i> (A) e <i>S. matsudana</i> (B). Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$ all'interno di ogni epoca di rilievo.....	138

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1 Richiesta di ioni metallici da parte di alcuni enzimi. I metalli possono essere presenti sotto forma di attivatori o facenti parte integrante della struttura dell'enzima (quest'ultimo indicato dall'asterisco). (Modificato da: Hall <i>et al.</i> , 1984).	20
Tabella 2 Stati di ossidazione assunti dal cromo e geometria del composto (Da: Shupack, 1991)	26
Tabella 3 Concentrazioni di cromo nell'ambiente (modificato da Zayed e Terry, 2003).....	30
Tabella 4 Quadro riassuntivo delle specie di salici utilizzate nel primo esperimento (Martini e Papero, 1988; Gellini e Grossoni, 1997.)	57
Tabella 5 Parametri termoigrometrici e fotoperiodo della cella climatizzata.	58
Tabella 6 Analisi chimica della perlite (da Chakir <i>et. al.</i> , 2002)	59

Tabella 7 Nutrienti contenuti nella soluzione nutritiva completa.	59
Tabella 8 Trattamenti utilizzati nell'esperimento 1.	59
Tabella 9 Trattamenti utilizzati nell'esperimento 2	60
Tabella 10 Numero progressivo e data di ciascun prelievo, età delle piante e volume dei vasi utilizzati.....	61
Tabella 11 Trattamenti utilizzati nell'esperimento.	67
Tabella 12 Lunghezze d'onda e campi di rilevabilità per cromo, ferro e zolfo	68
Tabella 13 Alcuni dei parametri fondamentali rilevati da <i>LCi Portable Photosynthesis System</i>	70
Tabella 14 Volume dei reagenti utilizzati per costruire la retta di taratura utile alla quantificazione delle proteine.	74
Tabella 15 Quadro riassuntivo delle specie di salici utilizzate (modificato da: Martini e Papero, 1988. Gellini e Grossoni, 1997).	79
Tabella 16 Percentuale media di traslocazione dall'apparato radicale alle foglie delle quattro specie di <i>Salix</i> nei diversi trattamenti con cromo. Le barre indicano l'errore standard (n=6); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni trattamento, per $\alpha < 0,586$	
Tabella 17 Percentuale media di tolleranza delle quattro specie di <i>Salix</i> ai diversi trattamenti con cromo (n=6); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni trattamento, per $\alpha < 0,5$	87
Tabella 18 Analisi chimico-fisiche del terreno	94
Tabella 19 Percentuale media di traslocazione dall'apparato radicale alle foglie delle quattro specie di <i>Salix</i> , cresciute in terreno per ciascuna epoca di prelievo.; lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni epoca di prelievo, per $\alpha < 0,5$	103
Tabella 20 Variazione percentuale media di Cr nel terreno trattato e suddiviso per le specie di salici su di esso cresciute rispetto al terreno trattato ma non inerbato detto "Controllo + Cr".	103
Tabella 21 Percentuale media di traslocazione dall'apparato radicale alle foglie delle due specie di <i>Salix</i> .. Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie, per $\alpha < 0,5$	111
Tabella 22 Percentuale media di tolleranza delle due specie di <i>Salix</i> ai diversi trattamenti con cromo. Le barre indicano l'errore standard (n=12); lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni trattamento, per $\alpha < 0,5$	112
Tabella 23 Percentuale media di traslocazione dall'apparato radicale alle foglie delle due specie di <i>Salix</i> , cresciute in soluzione idroponica per cinque settimane e trattate per 24 ore. Lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie (n= 4), per $\alpha < 0,5$	127
Tabella 24 Percentuale media di tolleranza delle due specie di <i>Salix</i> cresciute in soluzione idroponica per cinque settimane e trattate per 24 ore. Lettere diverse indicano differenze significative all'interno di ogni specie(n= 12), per $\alpha < 0,5$	128

BIBLIOGRAFIA

- Adriano D.C. 1986.** Trace elements in the Terrestrial Environment, 105-123. New York: Springer Verlag. Pp. 105-123.
- Aebi H. 1984.** Catalase *in vitro*. Methods in enzymology. Vol. 105, pp. 121-126.
- Aitio A. e Jarvisalo J. 1986.** Levels of welding fume components in tissue and body fluids. In: R.M Stern, A. Berlin, A.C. Flethcher, J. Jarvisalo (eds.) Health hazards and biological effects of welding fumes and gases. Excerpta Medica, International Congress Series 676, Amsterdam. Pp. 169-179.
- Aiyar J., De Flora S. e Wetterhahn K.E. 1992.** Reduction of chromium(VI) to chromium(V) by rat liver cytosolic and microsomal fractions: is DT-diaphorase involved? Carcinogenesis. Vol. 13. No. 7, pp. 1159-1166.
- Alpi A., Pupillo P. e Rigano C. 1992.** Fisiologia delle piante. EdiSES.
- Alscher R.G., Erturk N. e Heath L.S. 2002.** Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany. Vol. 53, pp. 1331-1341. doi: 10.1093/jexbot/53.372.1331.
- Anderson R.A. 1989.** Essentiality of Cr in humans. Science of The Total Environment. Vol. 86, pp. 75-81.
- ANPA, Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente. 1999.** Il rischio in Italia da sostanze inorganiche – Fondo naturale incontaminato e contaminato. A cura di Bressa G. e Cima F. pp. 123.
- Aravidin P. e Prasard M.N.V. 2003.** Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte. Plant Physiology and Biochemistry. Vol. 41, pp. 391-397. doi: 10.1016/S0981-9428(03)00035-4.
- Asada K. e Takahashi M. 1987.** Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle D.J. et al. Photoinhibition. Pp. 227-287. Elsevier.
- Asada K. 1992.** Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. Physiologia Plantarum. Vol. 85, pp. 601-639. doi: 10.1034/j.1399-3054.1992.850216.x.
- Asada K. 1999.** The water cycle in chloroplast: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. Vol. 50, pp. 601-639. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.601.
- Bagdon R.E. e Hazen R.E. 1991.** Skin permeation and cutaneous hypersensitivity as a basis for making risk assessments of chromium as a soil contaminant. Environmental Health Perspectives. Vol. 92, pp. 111-119.
- Bagnoli F., Danti S., Magherini V., Cozza R., Innocenti A.M. e Racchi M.L. 2004.** Molecular cloning, characterization and expression of two catalase genes from peach. Functional Plant Biology. Vol. 31, pp. 349-357. doi: 10.1071/FP03203.
- Baker A.J.M., McGrath S.P., Reeves R.D. e Smith A.C. 2000.** Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry N and Bañuelos G. Phytoremediation of contaminated soil and water. Lewis Publishers. Printed in the United States of America. Pp. 85-107.
- Barcelo J., Poschenrieder C. e Gunse B. 1985.** Effect of chromium VI on mineral element content of bush beans. Journal of Plant Nutrition. Vol. 8, N° 3, pp. 211-217.

- Barcelo J., Poschenrieder C. e Gunse B. 1986.** Water relations of chromium VI treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv Contender) under both normal and water stress conditions. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 37, pp. 178-187.
- Barcelo J. e Poschenrieder C. 1990.** Plant water relations as affected by heavy metal stress. A review. *Journal of Plant Nutrition*. Vol. 13, pp.1-37.
- Barcelo J. e Poschenrieder C. 1997.** Chromium in plants. In: Carati S., Tottarelli F. e Seqmi P. (eds), Chromium environmental issue, pp. 101-129. Francotangati Press, Milan.
- Bassi M., Corradi M.G. e Realini M. 1990.** Effects of chromium (VI) on two freshwater plants, *Lemna minor* and *Pista stratiotes*. 1. Morphological observations. *Cytobios*. Vol. 62, pp. 27-38.
- Barlett R.G. e James B.R. 1988.** Mobility and bioavailability of chromium in soil. In : Chromium in the natural and human environments. Eds. Jerone O. Nriagu and E. Nieboer. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. Pp. 267-304.
- Benton Jones J. Jr. 2005.** Hydroponics, a practical guide for the soilless grower. CRC Press. Printed in the United States of America. Pp.102.
- Beattie J.K. e Haight Jr. G.P. 1972.** Chromium(VI) oxidations of inorganic substrates. *Prog. Inorg. Chem.* Vol. 17, pp. 93-145.
- Buege I.J. e Hug S.J. 1997.** Kinetics and pH dependence of chromium(VI) reduction by iron(II). *Environmental Science and Technology*. Vol. 31, pp. 160-170.
- Buege I.J. e Hug S.J. 1998.** Influence of organic ligands on chromium(VI) reduction by iron(II). *Environmental Science and Technology*. Vol. 32, pp. 2092-2099.
- Bini C., Maleci Bini L., Gabbrielli R. e Paolillo A. 2000.** Biological perspectives in soil remediation with reference to chromium. *Bioremediation of Contaminated Soils*. Vol. 38, pp. 663-675.
- Bonet A., Poschenrieder C. e Barcelo J. 1991.** Chromium III-iron interaction in Fe-deficient and Fe-sufficient bean plants. I. Growth and nutrient content. *Journal of Plant Nutrition*. Vol. 14, N° 4, pp. 403-414.
- Borin M. 2003.** Fitodepurazione. Soluzioni per il trattamento dei reflui con le piante. Edagricole.
- Brooks R.R. (Ed) 1998.** Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals – Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining. New York: International Center for Agriculture and Biosciences.
- Bock M., Schmidt A., Bruckne, T. e Diepgen, T.L. 2003.** Occupational skin diseases in the construction industry. *Br. J. Dermatol.* Vol. 149, pp. 1165-1171.
- Bradford M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. Vol. 72, pp. 248-254.
- Burns R.M. e Honkala B.H. 1990.** Silvics of North America. Vol 2. Hardwoods. Agric. Handb. 654. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service. Pp.877.
- Cary E.E., Allaway W.H. e Olsen O.E. 1977a.** Control of Chromium Concentration in Food Plants: 1. Absorption and Translocation of Chromium by Plants. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 25, N° 2, pp. 300-304.
- Cary E.E., Allaway W.H. e Olsen O.E. 1977b.** Control of Chromium Concentration in Food Plants: 2. Chemistry of Chromium in Soils and Its Availability to plants. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 25, N° 2, pp. 305-309.

- Chakir A., Bessiere J., Kacemi K.AL. e Marouf B. 2002.** A comparative study of the removal of trivalent chromium from aqueous solutions by bentonite and expanded perlite. *Journal of Hazardous Materials*. Vol. B 95, pp.29-46.
- Chandra P., Sinha S. e Rai U.N. 1997.** Bioremediation of Cr from water and soil by vascular aquatic plants. In: *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*, ed. E.L. Kruger, T.A. Anderson e J.R. Coats, 274-282. Washington, DC: American Chemical Society.
- Chaney R.L., Malik K.M., Li Y.M. Brewer E.P., Angle J.S. e Baker A. 1997.** Phytoremediation of soil metals. *Current opinion in Biotechnology*. Vol. 8, pp. 279-284.
- Chatterjee J. e Chatterjee C. 2000.** Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. *Environmental Pollution*. Vol. 109, pp. 69-74.
- Che-Jen Lin. 2002.** The chemical transformations of chromium in natural waters – a model study. *Water, Air, and Soil Pollution*. Vol. 139, pp. 137-158.
- Chen G.X., Sano S. e Asada K. 1992.** The amino acid sequence of ascorbate peroxidase from tea has high degree of homology to that of cytochrome *c* peroxidase from yeast. *Plant & Cell Physiology*. Vol. 33, pp. 109-116.
- Chen H. e Cutright T. 2001.** EDTA and HEDTA effects on Cd, Cr and Ni uptake by *Helianthus annuus*. *Chemosphere*. Vol. 45, pp. 21-28.
- Chesterman C.W. 1975.** *Industrial minerals and rocks*. 4th edition. AIME, New York, pp. 927.
- Choudhury S. e Panda S.K. 2005.** Toxic effects, oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium Nepalese* (Schwaegr.) Broth. Under chromium and lead phytotoxicity. *Water Air and Soil Pollution*. Vol. 167, No. 1-4, pp. 73–90.
- Clemens S. 2001.** Phytochelatin and metallothioneins: role in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* Vol. 53, pp. 159-182.
- Clijsters H. e Van Assche F. 1985.** Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynthesis Research*. Vol. 7, pp 31-40.
- Cobbett C.S. 2000.** Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Current Opinion in Plant Biology*. Vol. 3, pp. 211-216.
- Cobbett C.S. e Goldsbrough P.B. 2000.** Mechanisms of metal resistance: phytochelatin and metallothioneins. In *Phytoremediation of Toxic Metals. Using Plants to Clean up the Environment*, ed. I Raskin, BD Ensley, pp. 247–71. New York:Wiley
- Comune di Torino. 2008.** Comunicazione sul procedimento di bonifica e informazioni riguardanti il caso del fiume Dora presunto inquinato da Cromo esavalente. Prot n. 14532 Tit. 06 Cl. 9 - 7 Fasc. 3 Data: 18/09/2008.
- Corradini F. 1988.** Rame oltre i limiti di guardia. *Terra trentina*. Vol. 34, No. 2, pp.: 27-29.
- Costa M. 1991.** DNA-protein complexes induced by chromate and other carcinogens. *Environmental Health Perspective*. Vol. 92, pp. 45-52.
- Costa M. 1993.** Molecular targets of nickel and chromium in human and experimental systems. *Scand. J. Work Environ. Health*. Vol. 19, No. 1, pp. 71-74.
- Davis K.M. e Espenson J.H., 1970.** Kinetics and mechanism of the oxidation of vanadium(III) by chromium (VI) in aqueous perchloric acid solutions. *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 92, pp. 1884-1888.
- Dayan A.D. e Paine A.J. 2001.** Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: review of literature from 1985 to 2000. *Hum. Exp. Toxicol.* Vol. 20, No. 9, pp. 439-451.

- De Filippis L.F e Pallaghy C.K. 1994.** Heavy metals: sources and biological effects. In: Algae and water pollution: advances in Lymnology series. Eds. Rai L.C., Caur J.P. e Soeder C.J. Vol. 42, pp. 32-77. Schweizerbart, Stuttgart.
- De Flora S. 2000.** Threshold mechanisms and site specificity in chromium (VI) carcinogenesis. Carcinogenesis. Vol. 21, No. 4, pp.533-541.
- del Rio L.A., Corpus F.J., Sandalio L.M., Palma J.M., Gomez M. e Barroso J.B. 2002.** Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. Journal of Experimental Botany. Vol. 53, pp. 1255-1272. doi: 10.1093/jexbot/53.372.1255.
- del Rio L.A., Sandalio L.M., Altomare D.A. e Zilinskas B.A. 2003.** Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. Journal of Experimental Botany. Vol. 54, pp. 923-933. doi: 10.1093/jxb/erg091.
- Dickinson N.M., Turner A.P. and Lepp N.W. 1991.** How do trees and other long-lived plants survive in polluted environments?. Functional Ecology. Vol. 5, No. 1, pp. 5-11.
- Dickinson N.M., A.P. Turner, S.A. Watmough e N.W. Lepp. 1992.** Acclimatation of trees to pollution stress: cellular metal tolerance traits. Annals of Botany. Vol. 70, pp. 569-572.
- Dickinson N.M. 2000.** Strategies for sustainable woodland on contaminated soils. Chemosphere. Vol. 41, pp. 259-263.
- Dionigi C.P., Mendelssohn I.A. e Sullivan V.I. 1985.** Effects of soil waterlogging on the energy status and distribution of *Salix nigra* and *S. exigua* in the Atchafalaya River Basin of Louisiana. American Journal of Botany. Vol. 72, N. 1, pp. 109-119.
- Direttiva 2002/95/CE.** Restriction of Hazardous Substances Directive. Restrizione dell'uso di determinate sostanze pericolose nelle apparecchiature elettriche ed elettroniche.
- Dixit V., Pandey V. and Shyam R. 2002.** Chromium ions inactivate electron transport and enhance superoxide generation in vivo in pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) root mitochondria. Plant, Cell and Environment. Vol. 25, pp. 687-693.
- Eltner E.F. e Heupel A. 1976.** Inhibition of nitrite formation from hydroxylamminiumchloride: a simple assay for superoxide dismutase. Analytical biochemistry. Vol. 70, N° 2, pp. 616-620.
- Ferreira R.R.; Fornazier R.F., Vitória A.P., Lea P.J. e Azevedo R.A. 2002.** Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. Journal of Plant nutrition. Vol. 25, pp. 327-342. doi: 10.1081/PLN-100108839.
- Foà, V., Riboldi L., Patroni M., Zocchetti C., Sbrana C. e Mutti A. 1988.** Effects derived from long-term low-level chromium exposure in ferro-alloy metallurgy. Study of absorption and renal function in workers. Sci. Tot. Environ. Vol. 71, pp. 389-396.
- Fridovich Irwin. 1976.** Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. Pp. 239-277. In: Free radicals in biology. Vol. 1. Ed. by William A. Pryor. Academic Press, Inc. New York.
- Gadd G.M. 1993.** Tansley Review No. 47. Interactions of fungi with toxic metals. New Phytologist. Vol. 124, pp. 25-60.
- Galli U., Scuëpp H. e Brunold C. 1994.** Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. Physiologia Plantarum. Vol. 92, pp. 364-368.
- Gellini R. e P. Grossoni. 1997.** Botanica forestale – Vol II. Angiosperme, 215-225. Padova: CEDAM
- Gratão P., polle A., Lea P.J. e Azevedo R.A. 2005.** Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. Functional Plant Biology. Vol. 32, pp. 481-494.

- Griffin R.A., Au A.K. e Frost R.R. 1977.** Effect of pH [hydrogen-ion concentration] on adsorption of chromium from landfill-leachate by clay minerals. *Journal of Environmental Science. Eng.* Vol. 12, N° 8, pp. 431-449.
- Gupta S.K., Herren T., Krebs R. e Hari T.. 2000.** In *situ* gentle remediation measures for heavy metal-polluted soils. In: Terry N and Bañuelos G. *Phytoremediation of contaminated soil and water.* Lewis Publishers. Printed in the United States of America. Pp. 303-322.
- Hall J.L., Flowers T.J. e Roberts R.M. 1984.** La cellula vegetale: struttura e metabolismo. Nicola Zanichelli Editore s.p.a. Pp. 100.
- Hall J.L. 2002.** Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany.* Vol. 53, n. 366, pp. 1-11.
- Hanus J. e Tomas J. 1993.** An investigation of chromium content and its uptake from soil in the white mustard. *Acta Fytotech.* Vol. 48, pp 39-47.
- Hayakawa T., Kanematsu S. e Asada K. 1984.** Occurrence of Cu-Zn-superoxide dismutase in the intrathylakoid space of spinach-chloroplasts. *Plant & Cell Physiology.* Vol. 25, pp. 883-889.
- Hegedus A., Erdei S. e Horvath G. 2001.** Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Science.* Vol. 160, pp. 1085-1093. doi:10.1016/S0168-9453(01)00330-2.
- Hemeda H.M. e Klein B.P. 1990.** Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. *Journal of Food Science.* Vol. 55, pp. 184-185.
- Higuchi K, Suzuki K, Nakanishi H, Yamaguchi H, Nishizawa NK, Mori S. 1999.** Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores. *Plant Physiology.* Vol. 119, pp.471-79.
- Huffman Jr E.W. e Allaway W.H. 1973.** Chromium in plants: distribution in tissues, organelles and extracts, and availability of bean leaf Cr to animals. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 21, pp. 982-986.
- James B.R. e Bartlett R.J. 1988.** Mobility and bioavailability of chromium in soil. In: Nriagu J.O., Nieboer E., eds. *Chromium in Natural and Human Environments.* Wiley Interscience, New York, pp 265-305.
- Jiménez A., Hernández J.A.,io L.A. e Sevilla F. 1997.** Evidence for the presence of the ascorbato-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology.* Vol. 114, pp. 275-284.
- Kabata-Pendias A. e Pendias H. 1992.** Trace elements in soil and plants. 2nd edn. CRC Press, London, pp.227-233.
- Kahle H. 1993.** Response of roots of trees to heavy metals. *Environmental Experimental Botany.* Vol. 33. pp. 99-119.
- Katz S.A. e Salem H. 1994.** The biological and environmental chemistry of chromium. New York: VCH Publisher.
- Kömives T., Gullner G. e Rennenberg H. 2003.** Roles of glutathione and glutathione-related enzymes in remediation of polluted soils by transgenic poplars. In: Davidian J.-C., Grill D., De Kok L.J., Stulen I., Hawkesford M.J., Chung E. and Rennenberg H. editors. *Sulfur transport and assimilation in plants - Regulation, interaction and signalling.* Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. Pp. 101-109.
- Koppenol W.H. 2001.** "The Haber-Weiss cycle – 70 years later". *Redox Report.* Vol. 6, No. 4, pp, 229-234. doi:10.1179/135100001101536373.

- Kotaś J. e Stasicka Z. 2000.** Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environ. Pollution*, Vol. 107, pp. 263-283.
- Krishnamurthy S. e Wilkens M.M. 1994.** Environmental chemistry of Cr. *Northeastern Geology*. Vol. 16, No. 1, pp. 14-17.
- Kukkola E., Rautio P. e Huttunen S. 2000.** Stress indications in copper- and nickel-exposed Scots pine seedlings. *Environmental and Experimental Botany*. Vol. 43, pp. 197-210.
- Kumar P.B.A.N., Dushenkov V., Motto H. e Rasjin I. 1995.** Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soil. *Environmental Science & Technology*. Vol. 29, pp. 1232-1238.
- Igamberdiev A.U. e Lea P.J. 2002.** The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organism. *Phytochemistry*. Vol. 60, pp. 651-674. doi: 10.1016/S0031-9422(02)00179-6.
- Landberg T. e M. Greger. 1994.** Can heavy metal tolerant clones of *Salix* be used as vegetation filters on heavy metal contaminated land?. In *Proceedings: Willow vegetation filters for municipal wastewater and sludges. A biological purification system*, ed. P. Aronsson e K. Perttu, pp. 133-144. Uppsala, Svezia, 5-10 Giugno.
- Landberg T. e Greger M. 2002.** Differences in oxidative stress in heavy metal resistant and sensitive clones of *Salix viminalis*. *Journal of Plant Physiology*. Vol. 159, pp. 69-75.
- Lasart M.M., Baker A.J.M. e Kochian L.V. 1998.** Altered Zn compartmentation in the root symplasm and stimulated Zn adsorption into the leaf as mechanisms involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 118, pp. 875-883.
- Lasart M.M. 2002.** Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality*. Vol. 31, pp. 109-120.
- Lees P.S.J. 1991.** Chromium and disease: review of epidemiologic studies with particular reference to etiologic information provided by measures of exposure. *Environmental Health Perspective*. Vol. 92, pp. 93-104.
- Liu D.H., Jaing W.S. e Li M.X. 1993.** Effect of chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. *Israel Journal of Plant Science*. Vol. 42, pp. 235-243.
- Longo C. 1997.** *Biologia vegetale, forme e funzioni*. UTET, Torino. Pp. 170
- Lytle C.M., Lytle F.W., Yang N., Qian J.-H., Hansen D., Zayed A., e Terry N.. 1998.** Reduction of Cr(VI) to Cr(III) by Wetland Plants: Potential for In Situ Heavy Metal Detoxification. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 32, N° 20, pp. 3087-3093.
- MacFarlane G.R. e Burchett M.D. 2000.** Cellular distribution of copper, lead and zinc in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Aquatic Botany*, Vol. 68, pp. 45-59.
- Mackay D. 1991.** *Multimedia environmental models: the fugacity approach*. Lewis Publishers.
- Mangabeira P.A., Gavrillov K.L., de Almeida A.-A.F., Oliveira A.H., Severo M.I., Rosa T.S., Silva D. da C., Labejof L., Escaig F., Levi-Setti R., Mielke M.S., Loustalot F.G. e Galle P. 2006.** Chromium localization in plant tissues of *Lycopersicon esculentum* Mill. using ICP-MS and ion microscopy (SIMS). *Applied surface science*. Vol. 252, pp. 3488-3501.
- Marchetti R. 1998.** Inquinamento delle acque superficiali. In "Ecologia applicata (Nuova Edizione). Città Studi Edizioni, Torino.
- Marschner Horst. 1995.** *Mineral nutrition of higher plants*. Academic press. Printed in Great Britain by The University Printing House, Cambridge.

- Martini F. e Paiero P. 1988.** I salici d'Italia., guida al riconoscimento e all'utilizzazione pratica. Edizioni LINT Trieste.
- McGrath S.P. 1982.** The uptake and traslocation of tri- and hexa-valent chromium and effects on the growth of oat in flowing nutrient solution and soil. *New Phytologist*. Vol. 92, pp. 381-390.
- McGrath S.P. 1995.** Chromium and Nickel. In: Alloway B.J. (eds). *Heavy metals in soil*, pp. 139-155. Chapman and Hall. London, UK.
- Mei B., Puryear J.D. e Newton R.J. 2002.** Assessment of Cr tolerance and accumulation in selected plant species. *Plant and Soil*. Vol. 247, pp. 223-231.
- Michael T.P. e McClung C.R. 2002.** Phase-specific circadian clock regulatory elements in Arabidopsis. *Plant Physiology*. Vol. 133, pp. 443-447. doi: 10.1104/pp.103.028399.
- MIPAF – Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. 2000.** Metodi di analisi chimica del suolo. Coordinatore P. Violante. Milano: Franco Angeli editore.
- Misra S.G. e Jaiswal P.C. 1982.** Absorption of Fe by spinach on chromium(VI) treated soil. *Journal of Plant Nutrition*. Vol. 5, pp.755-760.
- Mittler Ron. 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TRIENDS in Plant Science*. Vol. 7 No. 9. pp. 405-410. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02312-9.
- Miyake C. e Asada K. 1992.** Thylakoid-bound ascorbato peroxidase in spinach chloroplast and photoreduction of its primary oxidation product the monodehydroascorbate radicals in thylacoids. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. Vol. 33, pp. 541-553.
- Mocquot B., Vangronsveld J., Clijsters H. e Mench M. 1996.** Copper toxicity in young maize (*Zea mais* L.) plants: effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and enzyme activities. *Plant and soil*. Vol. 182, pp. 287-300.
- Moral R., Pedreno N.J., Gomez I. e Mataix J. 1995.** Effects of chromium on the nutrient element content and morphology of tomato. *Journal of Plant Nutrition*. Vol. 18, pp. 815-822.
- Moral R., Gomez I., Pedreno N.J. e Mataix J. 1996.** Absorption of Cr and effects on micronutrient content in tomato plant (*Lycopersicum esculentum* M.) *Agrochimica*. Vol. 40, pp. 132-138.
- Nakano Y. e Asada K. 1981.** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbato-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell Physiology*. Vol. 22, Nç 5, pp 867-880.
- Newman M.C. e McIntosh A.W. 1991.** *Metal Ecotoxicology – Concepts & Applications*. Lewis Publ., Chelsea, Michigan, USA.
- Nieboer E. e Richardson D.H.S. 1980.** The replacement of the non-descript term “heavy metals” by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution*. Vol. 1, pp. 3-26.
- Nieboer E. e Jusys A.A. 1988.** Biologic chemistry of chromium. In: Nriagu, J.O. and Nieboer, E. Editors, 1988. *Chromium in Natural and Human Environments* Wiley Interscience, New York, pp. 21–81.
- Nriagu J.O. 1988.** Production and uses of chromium. In: *Chromium in natural and human environment*, ed. J.O. Nriagu. New York: John Wiley and Son. Pp. 81-105.
- Olaguibel J.M. e Basomba A. 1989.** Occupational asthma induced by chromium salts. *Allergol. Immunopatol*. Vol. 17, pp. 133-136.

- Ōyanagui Y. 1984.** Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Analytical biochemistry*. Vol. 142, pp. 290-296.
- Ozawa T. e Hanaki A. 1990.** Spin-trapping on the reactions of Cr(III) with hydrogen peroxide in the presence of biological reductants; is Cr(III) nontoxic? *Biochemistry International*. Vol. 22, pp. 343-352.
- Panda S.K. e Patra H.K. 2000.** Does Cr(III) produces oxidative damage in excised wheat leaves. *Journal of Plant Biology*. Vol. 27, No. 2, pp. 105-110.
- Panda S.K. 2003.** Heavy-metal phytotoxicity induces oxidative stress in a moss, *Taxithellium* sp. *Current Science*. Vol. 84, No. 5, pp. 631-633.
- Panda S.K. e Choudhury S. 2005.** Chromium stress in plants. *Brazilian Journal of Plant physiology*. Vol. 17, No. 1, pp. 95-102.
- Pandey N. e Sharma C.P. 2003.** Chromium interference in iron nutrition and water relations of cabbage. *Environmental and Experimental Botany*. Vol. 49, pp. 195-200.
- Pawlisz A.V. 1997.** Canadian water quality guidelines for Cr. *Environ. Toxicol. Water Qual.* Vol. 12, No. 2, pp. 123-161.
- Pearcy R.W., Ehleringer J., Mooney H.A. e Rundel B.W. 1989.** *Plant Physiological Ecology: Field methods and instrumentations*. London: Chapman and Hall.
- Pilon-Smits E.A.H. 2005.** Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* Vol. 56, pp. 15-39.
- Poschenrieder C., M.D. Vasquez, A. Bonet e Barcelo J. 1991.** Chromium-III-iron interaction in iron sufficient and iron deficient bean plants. 2. Ultra structural aspects. *Journal of Plant Nutrition*. Vol. 14, N° 4, pp. 415-428.
- Prasard M.N.V. e Strzalka K. 1999.** Impact of heavy metals on photosynthesis. In: *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems*. Eds. M.N.V. Prasard and J. Hagemeyer, pp. 117-138. Springer, Berlin
- Prasad M.N.V., M. Greger e Landberg T. 2001.** *Acacia nilotica* L. bark removes toxic elements from solution: corroboration from toxicity bioassay using *Salix viminalis* L. in hydroponic system. *Int. J. Phytoremed.* Vol. 3, pp. 289-300.
- Pulford I.D. and Watson C. 2003.** Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees-a review. *Environmental International*. Vol. 29, pp. 529-540.
- Punshon T. e Dickinson N.M. 1997.** Acclimatation of *Salix* to metal stress. *New Phytologist*. Vol. 137, pp. 303-314.
- Quaggiotti S., Barcaccia G., Schiavon M., Nicolé S., Gallo G., Rossignolo V., Soattin M e Malagoli M. 2007.** Phytoremediation of chromium using *Salix* species: Cloning ESTs and candidate genes involved in the Cr response. *Gene*. Vol. 402, pp.68-80.
- Rai D., B.M. Sass e Moore D.A. 1987.** Cr(III) hydrolysis constants and solubility of Cr(III) hydroxide. *Inorg. Chem.* Vol. 26, pp. 345-349.
- Riddell-Black D. 1993.** A review of the potential for the use of trees in the rehabilitation of contaminated land. WRC Report CO 3467. Medemenham: Water Research Centre.
- Riedel G.H. 1985.** The relationship between chromium(VI) uptake, sulfate uptake, and chromium(VI) toxicity in the estuarine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Aquatic Toxicology*. Vol. 7, N°3, pp. 191-204.
- Rosselli W., Keller C e Boschi K. 2003.** Phytoextraction capacity of trees growing on a metal contaminated soil. *Plant and Soil*. Vol. 256, pp. 265-272.

- Sagner S., Kneer R., Wanner G., Cosson J-P., Deus-Neumann B. e Zenk M.H.. 1998.** Hyperaccumulation complexation and distribution of nichel in *Sebertia acuminata*. *Phytochem.* Vol. 47, pp. 339-347.
- Salt D.E., Blaylock M., Kumar P.B.A., Dushenkov V., Ensley B.D., Chet I.e Raskin I.. 1995.** Phytoremediation: a novel strategy for removal of toxic metals from the environment using plants. *Bio/Technology.* Vol. 13, pp. 468-474
- Satofuka H., Fukui T., Takagi M., Atomi H. e Imanaka T. 2001.** Metal-binding properties of phytochelatin-related peptides. *Journal of Inorganic Biochemistry.* Vol. 86, pp. 595-602.
- Scandalios J.G. 1993.** Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology.* Vol 101, pp.7-12.
- Scandalios J.G., Acevedo A e Ruzsa S. 2000.** Catalase gene expression in response to chronic high temperature stress in maize. *Plant Science.* Vol. 156, pp. 103-110. doi: 10.1016/S0168-9452(00)00235-1.
- Scandalios J.G. 2005.** Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* Vol. 38, pp 995-1014.
- Schiavon M., Pilon-Smits E.A., Wirtz M., Hell R. e Malagoli M. 2008** Interactions between chromium and sulfur metabolism in *Brassica juncea*. *Journal of Environmental Quality.* Vol. 37, No. 4, pp.1536-1545.
- Schmidt W. 1996.** Influence of chromium(III) on root-associated Fe(III) reductase in *Plantago lanceolata* L.. *Journal of Experimental Botany,* Vol. 47, N° 299, pp. 805-810.
- Schützendübel A., Schwanz P., Teichmann T., Gross K., Langenfeld H.R. Godbold D.L. e Polle A. 2001.** Cadmium-induced changes in antioxidant systems, hydrogen peroxide content and differentiation of Scots pine roots. *Plant Physiology.* Vol. 127, pp. 887-989. doi: 10.1104/pp.127.3.887.
- Schützendübel A., Nikolova P., Rudolf C. e Polle A. 2002.** Cadmium and H₂O₂-induced oxidative stress in *Populus x canescens* roots. *Plant Physiology and Biochemistry.* Vol. 40, pp. 577–584. doi: 10.1016/S0981-9428(02)01411-0.
- Shewry P.R. e Peterson P.J. 1974.** The uptake and transport of chromium by barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany.* Vol. 25, pp. 785-797.
- Scoccianti V., Crinelli R., Tirillini B., Mancinelli V. e Speranza A. 2006.** Uptake and toxicity of Cr(III) in celery seedlings. *Chemosphere.* 64, 1695-1703.
- Seigneur C. e Costantinou E., 1995.** Chemical kinetic mechanism for atmospheric chromium. *Environmental Science and Technology.* Vol. 29, pp. 2039-2044.
- Shahandheh H. e Hossner L.R. 2000.** Plant screening for chromium phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation.* Vol. 2, pp. 31-51.
- Shanker A.K., Djanaguiraman M., Sudhagar R., Chandrashekar C.N. e Pathmanabhan G. 2004.** Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek. Cv CO 4) roots. *Plant Science.* Vol. 166, pp. 1035-1043.
- Shanker A.K. 2004.** Plasm membrane H⁺ ATPase and Fe(III) reductase: key enzymes when engineering tolerance to chromium speciation stress in plants. Paper in BIOHORIZON 2004, 6th National Symposium on Biochemical engineering and biotechnology Held at Indian Institute of Technology. New Delhi 12th-13th march 2004.

- Shanker A.K., Cervantes C., Loza-Tavera H. e Avudainayagam S. 2005.** Chromium toxicity in plants. *Environmental International*. Vol. 31, pp. 739-753.
- Sharma D.C., Chatterjee C. e Sharma C.P. 1995.** Chromium accumulation and its effects on wheat (*Triticum aestivum* L. cv. HD2204) metabolism. *Plant Science*. Vol. 111. 145-151.
- Sharma D.C., Sharma C.P. e Tripathi R.D. 2003.** Phytotoxic lesions of chromium in maize. *Chemosphere*. Vol. 51, pp. 63-68.
- Skeffington R.A., Shewry P.R. e Petersen P.J. 1976.** Chromium uptake and transport in barley seedlings *Hordeum vulgare*. *Planta*. Vol. 132, pp. 209-214.
- Shi X. L., Dalal N. S. e Kasprzak K. S. 1993.** Generation of free radicals from hydrogen peroxide and lipid hydroperoxides in the presence of Cr(III). *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 302, No. 1, pp. 294-299.
- Shupack S.L. 1991.** The chemistry of chromium and some resulting analytical problems. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 92, pp. 7-11.
- Sinha S., Saxena R. e Singh S. 2005.** Chromium induced lipid peroxidation in the plants *Pistia stratiotes* L: role of antioxidants and antioxidant enzymes. *Chemosphere*. Vol. 58, pp. 595-604.
- Solomon L.P. e Barber M.J. 1990.** Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol. And Plant Mol. Biol.* Vol. 41, pp. 225-253.
- Snow E.T. 1991.** A possible role for Chromium(III) in genotoxicity. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 92, pp. 75-81.
- Srivastava S., Tripathi R.D. e Dwivedi U.N. 2004.** Synthesis of phytochelatins and modulation of antioxidants in response to cadmium stress in *Cuscuta reflexa* – an angiospermic parasite. *Journal of Plant Physiology*. Vol. 161, pp. 665-674.
- Stephan U.W., Schmidke I., Stephan V.W. e Scholz G. 1996.** The nicotianamine molecule is made-to-measure for complexation of metal micronutrients in plants. *Biometals*. Vol. 9, pp. 84-90.
- Stohs S. J. e Bagchi D. 1995.** Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 18, N° 2, pp. 321-336.
- Stoltz E. e Greger M. 2002.** Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submergent mine tailings. *Environmental and Experimental Botany*. Vol. 47, pp. 271-280.
- Terry N. 1981.** An analysis of the growth responses of *Beta vulgaris* L. to phototoxic trace elements. II. Chromium. Final report to the Kearney Foundation of Soil Science. July, 1975 – June, 1980.
- Turner A.P. 1994.** The responses of plants to heavy metals. In: *Toxic metals in soil-plant systems*, ed. E.M. Ross, 153-187. Chichester: Wiley.
- Vajpayee P., Sharma S.C., Tripathi R.D., Rai U.N. e Yunus M. 1999.** Bioaccumulation of chromium and toxicity to photosynthetic pigments, nitrate reductase activity and protein content of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Chemosphere*. Vol 39, No 12: 2159-2169.
- Vajpayee P., Tripathi R.D., Rai U.N., Ali M.B. e Singh S.N. 2000.** Chromium accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content of *Nymphaea alba*. *Chemosphere*. Vol. 41, pp. 1075-1082.

- Vandecasteele B., Meers E., Vervaeke P., De Vos B., Quataert P. e Tack F.M.G. 2005.** Growth and trace metal accumulation of two *Salix* clones on sediment-derived soils with increasing contamination levels. *Chemosphere*. Vol. 58, pp. 995-1002.
- Vasquez M.D., C.H. Poschenrieder e J. Barcelo. 1987.** Chromium (VI) induced structural and ultrastructural changes in bushbean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Annals Bot.* Vol. 59, pp. 427-438.
- Verkleij J.A. e Schat H. 1990.** Mechanisms of metal tolerance in plants. In: Heavy metals tolerance in plants – Evolutionary Aspects. Ed. A.J. Shaw. CRC Press, Boca Rator, FL. Pp. 179-193.
- Vighi M. e Bacci E. 1998.** *Ecotossicologia*. Ed. UTET.
- Violante P. 1989a.** I fattori di formazione del suolo. In “Chimica del suolo”. Patron Editore, Bologna.
- Violante P. 1989b.** I processi di alterazione. In “Chimica del suolo”. Patron Editore, Bologna.
- Violante. 2005.** Chimica del suolo e della nutrizione delle piante. Bologna: ed agricole. Pp. 309-318.
- Vitória A.P., Lea P.J. e Azevedo R.A. 2001.** Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry*. Vol. 57, pp. 701-710. doi 10.1016/S0031-9422(01)00130-3.
- Von Wiren N., Klair S., Bansal S., Briat J.F., Khodr H., Shiori T. et al. 1999.** Nicotianamine chelates both FeIII and FeII. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiology*. Vol. 119, pp. 1107–1114.
- Xue T.L., Hartikainen H. e Piironen V. 2001.** Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant and Soil*. Vol. 237. pp. 55-61. doi: 10.1023/A:1013369804867.
- Yu X.Z., Trapp S., Zhou P.H., Peng X.Y. e Cao X. 2006.** Response of weeping willows to linear alkylbenzenesulfonate, *Chemosphere*. Vol. 64, pp. 43–48.
- Yu X.Z., Gu J.D. and Huang S.Z. 2007.** Hexavalent chromium induced stress and metabolic responses in hybrid willows. *Ecotoxicology*. DOI 10.1007/s10646-006-0129-6.
- Zaccheo P., Genevini P.L. e Cocucci S. 1982.** Chromium ions toxicity on the membrane transport mechanism in segments of maize seedling roots. *Journal of Plants Nutrition*. Vol. 5., pp. 1217-1227.
- Zaccheo P., Cocucci M. e Cocucci S. 1985.** Effects of Cr on proton extrusion, potassium uptake and transmembrane electric potential in maize root segments. *Plant. Cell. Environ.* Vol. 8, pp. 721-726.
- Zhang H. e Balett R.J. 1999.** Light-induced oxidation of aqueous chromium(III) in the presence of iron(III). *Environmental Science and Technology*. Vol.33, pp. 588-594.
- Zhang H. 2000.** Light and iron(III)-induced oxidation of chromium(III) in the presence of organic acids and manganese(II) in simulated atmospheric water. *Atmos. Environ.* Vol. 34, pp. 1633-1640.
- Zayed A.M., Lytle C.M., Qian J.H. e Terry N. 1998.** Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops. *Planta*. Vol. 206, pp. 293-299.
- Zayed A.M. e Terry N. 2003.** Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant and soil*. Vol. 249: 139-156.

Zeid I.M. 2001. Responses of *Phaseolus vulgaris* to chromium and cobalt treatments. *Biologia Plantarum*. Vol. 44, pp. 111-115.

Zenk M.H. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene*. Vol. 179, pp. 21-30.

Zerbi G. e Marchiol L. 2004. Fitoestrazione di metalli pesanti – contenimento del rischio ambientale e relazioni suolo-microrganismi-pianta. *Forum*.

FONTI TELEMATICHE

http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/priority_substances.htm

<http://minerals.usgs.gov/>

<http://nsdi.epa.gov/waterscience/methods/pollutants.htm>

http://www.report.rai.it/R2_popup_articolofoglia/0,7246,243%255E8723,00.html

<http://rydberg.biology.colostate.edu/epsmitlab/>