



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

*DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE, FORESTALI E
ALIMENTARI*

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

RELAZIONE FINALE

IL RISO E L'ARSENICO

Relatore: Prof.ssa Elisabetta Barberis

Candidato: Federico Concaro

Anno Accademico 2015-2016

Indice

1. Premessa.....	3
2. Tossicità dell'arsenico.....	4
3. Il riso e l'arsenico: aspetti agronomici.....	4
3.1.1 Diffusione nel mondo.....	4
3.1.2 Principali forme di arsenico e relazione con il riso.....	5
3.1.3 Interazione tra arsenico ed elementi del terreno.....	7
3.1.4 Attività esplicata dai microrganismi in risicoltura.....	8
3.1.5 Gestione dell'acqua in ambiente risicolo.....	9
3.1.6 Pratiche agronomiche per contrastare l'assorbimento dell'arsenico...	11
3.1.7 Tossicità da As nel riso.....	12
3.1.8 Miglioramento genetico.....	13
3.1.9 La situazione in Italia.....	14
4. Lavorazione e trasformazione del riso: influenza sul quantitativo di arsenico.....	16
5. Limiti di legge per l'arsenico nel riso.....	18
6. Implicazioni e rischi per la salute umana.....	19
7. Analisi e strumenti per individuare l'arsenico nella granella.....	19
8. Conclusioni.....	21
9. Bibliografia.....	22

1. Premessa

L'arsenico (As) è un elemento presente nella crosta terrestre, tossico per piante, animali e per la salute umana. La pericolosità dell'As nei suoli è strettamente connessa alla sua speciazione, che ne influenza la frazione biodisponibile ed il reale rischio per le catene agro-alimentari. In questi ultimi anni ha assunto sempre più importanza ed attenzione la contaminazione di prodotti alimentari, tra cui il riso, elemento base per la dieta di milioni di persone. Per limitarne la presenza è opportuno agire trasversalmente lungo tutta la filiera, implementando nuove pratiche agronomiche, selezionando le varietà più resistenti, introducendo nuove tecniche per riconoscere facilmente la contaminazione di As in prodotti freschi o trasformati e stabilendo opportuni limiti di legge.

2. Tossicità dell'arsenico

L'arsenico è un elemento presente nella crosta terrestre, dannoso per piante e per animali. La concentrazione di As nei suoli è influenzata da numerosi fattori, riconducibili a due attività: naturale, attività vulcanica e processi pedogenetici, ed antropica, attività mineraria, processi industriali ed impiego di prodotti fitosanitari.

E' possibile suddividere le specie di As presenti nel terreno in due categorie:

- arsenico inorganico, con le specie più comuni rappresentate da arsenico pentavalente, ione arseniato, (As (V)) e arsenico trivalente, ione arsenito (As (III));
- arsenico organico: i cui composti principali, derivanti sia dall'As(III) sia dall'As(V), sono l'acido monometilarsonico (MMA) e l'acido dimetilarsinico (DMA).

L'agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha inserito l'arsenico inorganico nella lista 1 delle sostanze cancerogene e numerosi studi hanno evidenziato che l'As(III) è dieci volte più tossico dell'As(V), in entrambe le sue forme: organica ed inorganica.

La maggior parte della popolazione mondiale entra in contatto con l'arsenico per via orale, attraverso il consumo di alimenti e acqua potabile. E' stato stimato che più di 150 milioni di persone abbiano risentito della presenza di As nei prodotti alimentari e nelle falde acquifere. Ad oggi numerosi stati, tra cui India, Cina, Bangladesh, Cile, Turchia e Argentina, sono interessati in modo significativo dalla contaminazione di As.

3. Il riso e l'arsenico: aspetti agronomici

3.1.1 Diffusione nel mondo

Il riso (*Oryza sativa* L.), uno dei cereali più consumati e commercializzati al mondo, rappresenta una delle principali vie di esposizione per l'ingestione di arsenico. Si stima che la granella di riso contenga una quantità di As dieci volte superiore rispetto agli altri cereali. L'elemento, che può essere assorbito dalla pianta in entrambe le forme chimiche, è in grado di traslocare dall'apparato radicale alla sezione aerea, concentrandosi in limitata parte anche nelle cariossidi. Generalmente il riso prodotto in Asia contiene un livello maggiore di As inorganico, a differenza delle altre aree risicole del mondo dove prevale la frazione organica.

Numerosi studi (Zhao F.J., et al., 2013) hanno dimostrato che il riso coltivato in Asia presenta una netta linearità tra la frazione di As inorganico e l'As totale. Viceversa il riso proveniente dagli Stati Uniti è caratterizzato da un modello iperbolico, con il maggior quantitativo di As inorganico raggiunto in prossimità degli 0,15 mg g⁻¹ di As totale. In Europa la correlazione tra quantitativo di As inorganico e As totale presenta valore intermedio rispetto alla situazione riscontrata in Asia e Stati Uniti. La correlazione tra As organico ed As totale è invece lineare in tutte e tre le regioni; in ordine decrescente Stati Uniti > Europa > Asia. In generale, con l'eccezione del continente asiatico, all'aumentare dell'As totale, la porzione di As inorganico diminuisce a favore della frazione organica.

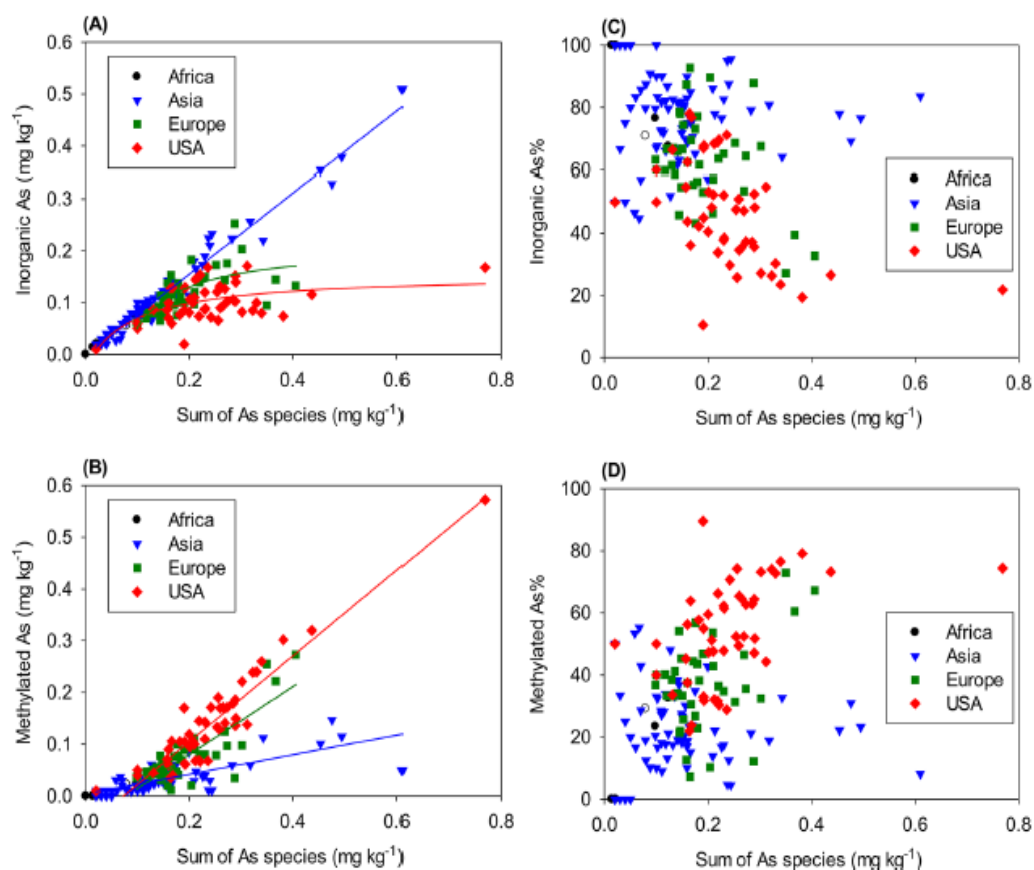


Figura 1 Differenze tra As organico e As inorganico nel riso proveniente da diversi continenti (Zhao F.J., et al., 2013)

3.1.2 Principali forme di arsenico e relazione con il riso

La concentrazione delle differenti specie di As nella pianta di riso dipende essenzialmente dalla cultivar, dalla natura del terreno e dalle condizioni aerobiche/anaerobiche del suolo. Nel corso degli anni è stata dimostrata (Bastias J.M., Beldarrain T., 2015) una relazione negativa tra l'accumulo di As nel riso e l'elevato volume d'aria nell'apparato radicale (root porosity), riconducibile alla presenza dell'aerenchima. Il conseguente efflusso di ossigeno provoca l'ossidazione dei minerali limitrofi alla rizosfera, favorendo l'adsorbimento del metalloide. Pertanto, le cultivar caratterizzate da un maggior volume di ossigeno nelle radici, assorbono un minor quantitativo di As e ne riducono la concentrazione finale nella granella.

La metilazione dell'As, mediata principalmente da attività microbica, è favorita da condizioni di anaerobiosi, indotta dalla sommersione della coltura e/o dall'aggiunta di sostanza organica (S.O.). L'ambiente anaerobico consente infatti lo sviluppo di batteri ferro-riduttori e la solubilizzazione di As(III), incrementando così il substrato di metilazione. A seconda della tecnica di coltivazione l'influenza della frazione organica sulla biodisponibilità dell'As varia significativamente: nella sommersione continua, tipica delle

nostre risaie, l'aggiunta di S.O non determina un marcato cambiamento delle condizioni di aerobiosi/anaerobiosi, effetto viceversa apprezzabile nel riso coltivato in asciutta.

L'As^V, vista l'analogia con lo ione fosfato (PO₄³⁻), viene assorbito dai vegetali attraverso i sistemi di trasporto del fosfato, Pht1 e Pht2. L'As^{III} sfrutta invece le acqua glicoproteine NIPs e il trasportatore di silicio LS1I e LSi2. Entrambe le forme organiche, DMA e MMA, sono assorbite attraverso le acquaporine. In generale la pianta di riso, soprattutto a livello radicale, tende a ridurre facilmente lo ione pentavalente in ione trivalente (Zhao F.J., et al., 2010). Tale reazione porta l'As(III) a prevalere quasi sempre sull'As(V), anche in condizioni aerobiche del terreno, dove, in ogni caso, la biodisponibilità di As è limitata per l'adsorbimento sui minerali circostanti.

L'acido dimetilarsinico, presente nel terreno, può essere trasformato dai microrganismi attraverso due vie differenti:

- conversione (riduttiva) a specie volatili di As, come dimetil e trimetilarsina (TMA), poi rilasciati nell'atmosfera circostante, rapidamente degradati dai raggi UV ed infine depositati nuovamente sul terreno;
- demetilazione, con conseguente produzione di CO₂ e As(V).

La prima trasformazione è più frequente in condizioni anaerobiche, mentre la seconda prevale in terreni aerobici. Entrambi i processi sono intrinsecamente legati alla comunità microbica, proprietà del terreno e condizioni ambientali.

Il pH determina la carica di MMA e DMA, caratterizzati da una bassa pK_a , rispettivamente 4.2 e 6.1. Poiché le acquaporine sono permeabili solo da molecole neutre, l'equilibrio tra dissociazione e protonazione, determinato dal cambiamento di pH, influenza l'assorbimento da parte della pianta. A pH sub-acido 6,5, condizioni tipica della risicoltura italiana, viene ridotto l'ingresso nella pianta di entrambe le specie organiche.

L'As^{III} può legarsi a proteine o peptidi che contengono gruppi tiolici, come proteine enzimatiche ed il glutathione (GSH). La coniugazione con quest'ultimo provoca nei tessuti stress ossidativo, ma induce anche la sintesi di fitochelatine (PCs), peptidi non proteici costituiti da unità ripetute di γ -glutamincisteina, che chelano l'As(III) e lo detossificano, accumulandolo nel vacuolo attraverso trasportatori appartenenti alle proteine ABC.

In generale, l'assorbimento radicale è più efficiente per l'As inorganico rispetto all'As organico, la cui assimilazione cala ulteriormente all'aumentare dei gruppi metilici (MMA prevale pertanto sul DMA). La scarsa affinità tra As organico ed apparato radicale viene

però compensata dalla più efficiente traslocazione dalle radici alla granella. La frazione metilata è mobilizzata efficacemente da xilema e floema, mentre l'As(III) viene preferibilmente trasportato attraverso lo xilema. L'As inorganico pertanto tende a concentrarsi nei tessuti vegetativi, mentre le forme metilate si accumulano di più negli organi riproduttivi. E' stato dimostrato che l'assorbimento dell'As inorganico è venti volte superiore alla frazione organica, ma il trasporto entro la pianta di riso è 100 volte più efficace per l'As organico (Zhao F.J., et al., 2013).

Le cause di questa differente mobilità restano tuttora da chiarire. Una possibile spiegazione è che l'As(III), assorbito dal terreno o ridotto a partire dall'As(V), venga prontamente complessato dai composti tiolici, come le fitochelatine, e sequestrato all'interno dei vacuoli, limitandone così la traslocazione nella pianta. L'inibizione della sintesi delle fitochelatine, mediante inibitori chimici o biologici, porta ad un incremento nel trasporto di As inorganico. La maggior mobilità dell'As organico si riscontra anche nella granella: la frazione inorganica si concentra prioritariamente nella parte superficiale della cariosside, l'As metilato invece permea direttamente entro l'endosperma, e viene difficilmente allontanato durante i processi di lavorazione.

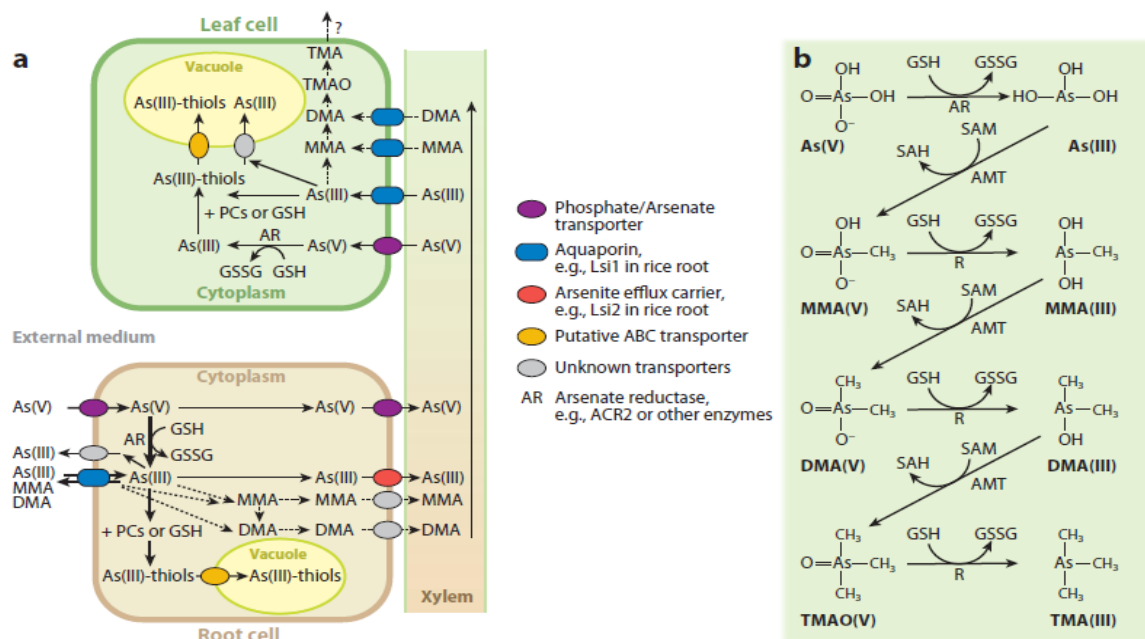


Figura 2 Assorbimento e metabolismo dell'arsenico nel riso (Zhao F., et al., 2010)

3.1.3 Interazione con gli elementi del suolo

Nel suolo, la mobilità degli elementi dipende da un alto numero di variabili, tra le quali: Capacità di Scambio Cationico (CSC), pH, potenziale ossido riduttivo (Eh) e granulometria del terreno.

Per limitare l'assorbimento ed il conseguente accumulo dell'arsenico nel riso, occorre conoscere l'interazione del metalloide con quattro importanti elementi della crosta terrestre: ferro (Fe), fosforo (P), zolfo (S) e silicio (Si) (Zhao F.J., et al., 2010):

- il ferro ricopre un ruolo fondamentale nel ciclo biochimico dell'arsenico. Gli idrossidi di ferro adsorbono con efficacia l'arsenico; in ambiente ridotto tuttavia, si ha la dissoluzione di tali minerali con conseguente rilascio del metalloide in soluzione. Attraverso il rilascio di ossigeno dall'aerenchima radicale alla rizosfera (ROL: *radial oxygen loss*) si ha l'ossidazione dallo ione ferroso (Fe^{2+}) allo ione ferrico (Fe^{3+}), inducendo così la nuova precipitazione di ossidi e idrossidi di ferro. Il rivestimento di Fe sequestra metalli alle radici, soprattutto con riso in sommersione, e modifica la

traslocazione dell'arsenico dalle radici ai germogli (Bastias J.M., Beldarrain T., 2015). Diminuisce significativamente l'assorbimento di As(V), ma interagisce poco con l'As(III), forme organiche ed inorganiche;

- il secondo elemento di interesse è il fosforo. Lo ione fosfato (PO_4^{3-}), avendo lo stesso numero di ossidazione dell'arsenico pentavalente e dimensioni simili, compete con quest'ultimo per l'assorbimento radicale. I canali trasportatori del fosforo sono infatti gli stessi responsabili dell'assorbimento dell'arsenico. Pertanto, quando la disponibilità di fosforo nel terreno è elevata, l'introduzione di arsenico nella pianta cala. In alcuni casi l'arsenico può essere incorporato all'interno dell'ATP (adenosintrifosfato), sostituendo lo ione fosfato. Questo scambio inibisce la fosforilazione ossidativa e la sintesi di ATP;
- lo zolfo riduce la tossicità del metalloide attraverso i legami tra As(III) ed i tioli alcoli. La formazione di questi composti evita la traslocazione dell'As ai germogli, favorendone l'accumulo nell'apparato radicale, evitando l'arresto della sintesi proteica e l'inibizione della piruvato deidrogenasi. Dunque l'apporto di zolfo, attraverso l'impiego di concimi organici e/o di sintesi, è molto importante in terreni contaminati da arsenico;
- l'ultimo elemento di grande interesse per mitigare l'assorbimento di As è il silicio. Il ruolo ricoperto dai trasportatori di silicio nell'assimilazione dell'As è di notevole importanza viste le somiglianze tra gli acidi silicici e l'arsenito. La presenza di silicio diminuisce la fitotossicità dell'As ed aumenta la sintesi di enzimi antiossidanti e dei loro isozimi. I terreni con un'elevata disponibilità di Si, per esempio quelli ricchi di cenere vulcanica, non presentano problemi di tossicità da As.

Anche la sostanza organica esplica un ruolo fondamentale nel ciclo biochimico dell'As. E' stato dimostrato come l'adsorbimento di As (III) ed As (V) su acidi umici venga influenzato dal pH e dalla concentrazione totale del metalloide nel terreno. Ad un pH di 5.5 si ha il massimo adsorbimento dell'As (V).

3.1.4 Attività esplicata dai microrganismi in risicoltura

Recentemente ha assunto sempre più interesse lo studio e l'applicazione di microrganismi in ambiente risicolo. Sia i funghi che i batteri esplicano azione positive per ridurre l'assorbimento di As:

- i funghi micorrizici arbuscolari (MAF) rappresentano una valida alternativa, alle pratiche agronomiche convenzionali, per ridurre l'assorbimento di As inorganico da parte del riso. Incrementano la biodisponibilità del fosforo per la pianta, che determina un maggiore sviluppo della coltura ed un'elevata competizione con il metalloide. Inoltre, alcune specie di MAF implementano l'essudazione di As (III) e riducono l'assorbimento di As (V) (Zhang X., et al., 2015). Alcuni ricercatori hanno riportato che riso in sommersione, inoculato con *Rhizophagus irregularis*, e riso non

sommerso, inoculato con *Glomus geosporum*, presentano rese più elevate e maggiore contenuto di fosforo in granella;

- tra i batteri, di notevole efficacia è l'attività svolta da ceppi microbici arsenito-ossidanti, su tutti *Aliihoeflea spp.* In aggiunta, condizioni anaerobiche ed un'elevata dotazione di sostanza organica promuovono l'attività di batteri ferro-riduttori, alghe (*Cynadium spp.*) e microrganismi in grado di metilare l'As (*Hydrogenobacter acidophilus*), processo catalizzato dall'enzima arsenito metiltransferasi (arsM).

Una delle soluzioni più pratiche ed economiche per il risicoltore, ad oggi, appare pertanto la creazione di un habitat ottimale per lo sviluppo di microrganismi utili in grado di limitare l'assorbimento di As.

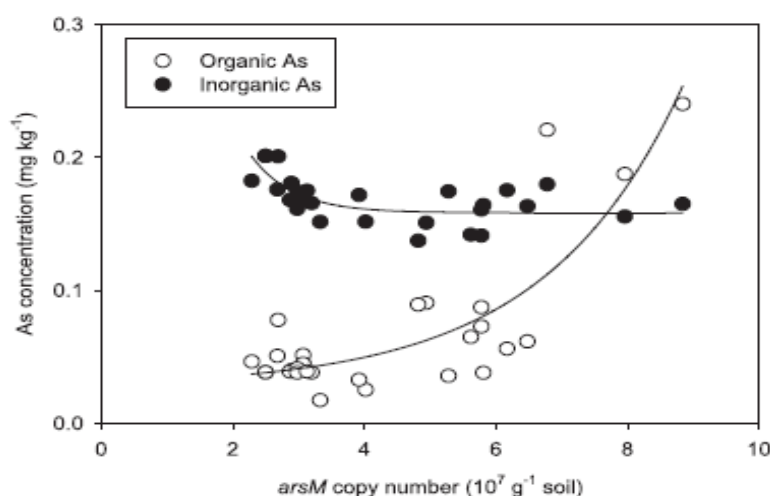


Figura 3 Relazione tra la concentrazione di arsM e As organico ed inorganico (Ma R., et al., 2014)

3.1.5 Gestione dell'acqua in ambiente risicolo

La gestione dell'acqua in risicoltura influenza le specie di As nel terreno ed il loro conseguente accumulo nel riso; per questo motivo risulta fondamentale ottimizzare la gestione dell'acqua d'irrigazione. La presenza di acqua per la maggior parte del ciclo colturale, riso coltivato in sommersione (flooded rice), porta ad una riduzione dell'As (V) ad As (III) ed una mobilitazione del metalloide nella soluzione del suolo. In sommersione aumenta progressivamente anche la disponibilità di Ferro (Fe), Manganese (Mn) e sostanza organica disciolta (DOM: *dissolved organic matter*).

In Italia, uno studio effettuato dall'Ente Risi tra il 2008 ed il 2013 ha preso in considerazione tre differenti tecniche di coltivazione del riso, rilevando la tipologia e la quantità di As accumulato nella granella. Le differenti pratiche agronomiche impiegate possono essere così schematizzate:

- semina in acqua e sommersione contigua per la maggior parte della stagione colturale, flooded rice o riso sommerso (FLD);

- semina interrata e sommersione della camera risicola con comparsa della 3°-4°foglia (DRY);
- semina interrata ed irrigazione turnate, aerobica di riso o riso in asciutta (IRR).

I dati dell'esperimento hanno dimostrato che il quantitativo di As totale ed inorganico nella granella, a parità di terreno, è maggiore con la metodologia DRY rispetto alla FLD e all'IRR. Con la sommersione della camera risicola a partire dalla 3°- 4°foglia infatti, aumenta la biodisponibilità di As in prossimità della fioritura, tra fine Luglio e metà Agosto. In questo periodo la pianta è più suscettibile all'assorbimento ed alla successiva traslocazione di As nella granella. La gestione attraverso irrigazione turnata, o riso in asciutta, in accordo con le proprietà chimico-fisiche del terreno, minimizza il quantitativo di As totale ed inorganico nella granella. Questa pratica agronomica presenta però significative limitazioni e problematiche:

- rese areiche inferiori in media del 15-20%;
- minore efficacia da parte degli erbicidi con conseguente diffusione di erbe infestanti, soprattutto *Echinochloa crus-galli*;
- attacchi più frequenti da parte di *Pyricularia oryzae*;
- elevata concentrazione di Cadmio (Cd);
- allungamento del ciclo colturale.

È quindi necessario individuare una gestione dell'acqua che permetta di ridurre il contenuto di As nel riso, garantendo al contempo elevate rese produttive. Una possibilità è quella di valutare l'effetto di asciutte programmate, in fasi diverse del ciclo colturale, sulla composizione della soluzione tellurica e di capire come questa si rifletta sulla quantità di As accumulato nella pianta. Sono state sperimentate singole asciutte in corrispondenza degli stadi fenologici di: accestimento, metà levata, fine fioritura; oppure combinazioni di due asciutte: accestimento e metà levata, o metà levata e fine fioritura. La concentrazione di As scende fino al limite di rivelabilità analitico in corrispondenza di ciascuna asciutta, per poi tornare a crescere. L'asciutta a metà levata, sia con semina interrata sia con semina in acqua, consente di ridurre maggiormente l'arsenico rispetto all'asciutta ad inizio levata. La concentrazione di As in soluzione si riflette sull'accumulo nei tessuti vegetali e la scelta dei periodi in cui effettuare le asciutte, consente di ridurre l'esposizione della pianta all'As negli stadi fenologici in cui il rischio di assorbimento è maggiore.

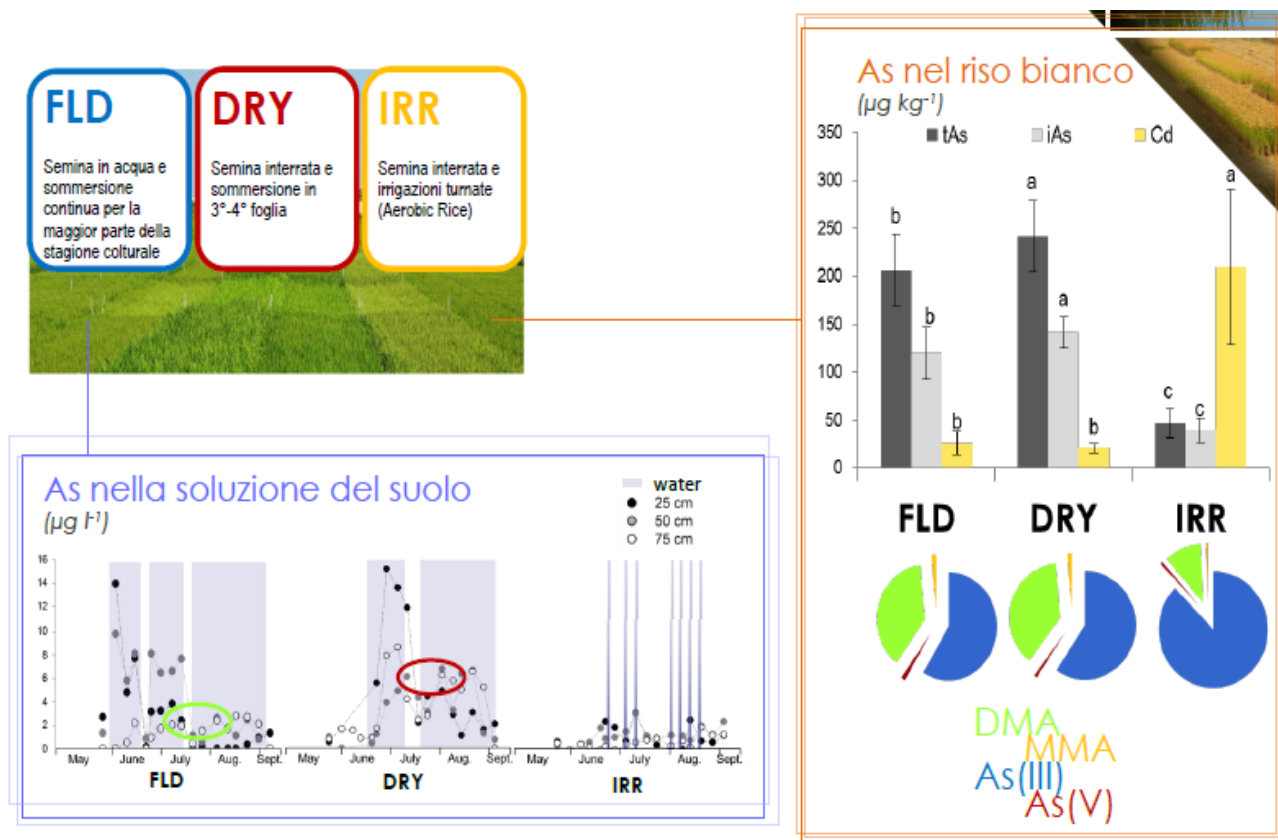


Figura 4 Correlazione tra tecniche di gestione dell'acqua, As circolante in soluzione, As stoccato nella granella e Cd (Romani M., et al.)

3.1.6 Pratiche agronomiche per contrastare l'assorbimento dell'Arsenico

Oltre alla gestione idrica della risaia e l'aggiunta di sostanza organica al terreno, è ancora poco conosciuto il potenziale effetto di altre pratiche agronomiche per ridurre l'assorbimento dell'As nel riso.

In quest'ottica sono stati intrapresi numerosi studi per minimizzare e mitigare la concentrazione di As, mediante attività esplicitate da altre colture:

- fito-estrazione: impiego di piante accumulatrici in terreni contaminati, di notevole interesse la felce *Pteris vittata*. In seguito al suo asporto si è registrata una maggior riduzione della frazione organica nella granella di riso rispetto all'inorganica, suggerendo che una riduzione dell'As totale nel terreno porta ad una minor metilazione da parte dei microrganismi;
- fito-stabilizzazione: colture capaci di stabilizzare l'arsenico ed evitarne la dispersione
- fito-immobilizzazione: piante in grado di ridurre la biodisponibilità dell'arsenico nel suolo, mediante la costituzione di precipitati con piombo e ferro;
- fito-volatilizzazione: uso di piante geneticamente modificate che producono forme volatili di arsenico.

Tuttavia, molte di queste attività presentano restrizioni e limitazioni dovute ad un importante costo economico, approfondite competenze scientifiche e problemi legati alla gestione aziendale di tempo e macchinari.

Anche la fertilizzazione sta acquisendo sempre più rilevanza in tale direzione. La forma chimica ed il quantitativo di azoto aggiunto al terreno influenza il potenziale ossido-riduttivo, determinando così l'eventuale solubilizzazione di ossidi e idrossidi di ferro nel terreno ed in prossimità dell'apparato radicale. Molti degli studi sul tema della fertilizzazione azotata sono stati condotti in vaso, in serra o a condizioni atmosferiche controllate. Pertanto la loro efficacia in pieno campo deve ancora essere dimostrata e non è possibile, ad oggi, esprimere un giudizio sulla loro valenza.

Infine, l'impiego di biochar (carbone di legna), ottenuto dalla pirolisi della biomassa, ha attirato molta attenzione per ridurre la mobilità e la disponibilità dei metalli pesanti. Presenta tuttavia, oltre ad un costo elevato, un effetto "collaterale": da un lato, grazie alla sua elevata superficie di scambio, trattiene l'As, dall'altro, innalzando il pH, aumenta la solubilizzazione dell'As nella soluzione circolante.

3.1.7 Tossicità da As nel riso

La tossicità dell'As nella pianta di riso varia a seconda della specie. L'As(V) interferisce con l'assorbimento dello ione fosfato e con le successive attività metaboliche di fosforilazione e sintesi di ATP. L'As(III) invece interagisce con i gruppi sulfidrilici di alcune proteine, alterandone la struttura o la funzione catalitica.

L'accumulo di As a livello radicale inibisce la crescita e la proliferazione dell'apparato ipogeo, inoltre nella traslocazione verso la granella può indurre stress ossidativi. Queste due alterazioni portano, in analisi ultima, ad una minore attività fotosintetica, determinando una ridotta crescita in biomassa ed un limitato accumulo di sostanza organica nelle cariossidi.

Le specie organiche di As, MMA e DMA, inducono meno squilibri ed alterazioni rispetto all'As inorganico sia nella salute umana sia nel metabolismo del riso. Ad oggi la principale fitopatia ricondotta alle specie metilate di As è la "Straight Head Disease". Questo disturbo fisiologico, causato da un elevato quantitativo di As organico nel terreno, comporta la più o meno completa sterilità della pannocchia con la sua mancata reclinazione durante la maturazione. Tale fitopatia è molto diffusa negli stati centro-meridionali degli Stati Uniti, dove storicamente sono stati utilizzati defolianti, erbicidi e fungicidi in coltivazioni di cotone a base di MMA e DMA. Questi residui hanno contribuito ad un'elevata concentrazione di As organico nella pannocchia, inducendo tale squilibrio. In Europa ed in Italia questa alterazione è poco diffusa.

3.1.8 Miglioramento genetico

La selezione di nuove varietà e l'impiego di tecniche della moderna ingegneria genetica rappresentano due valide opportunità per mitigare l'assorbimento dell'As nel riso. Sono stati studiati due "quantitative trait loci" (QTLs) associati alla presenza di As nella granella di riso; tali segmenti di genoma spiegano rispettivamente il 35% ed il 26% della variabilità fenotipica totale. Questi tratti genomici sono fondamentali per gli ambienti più contaminati dal metalloide e consentono di selezionare future varietà predisposte ad un minor accumulo di As nella granella. Ad oggi, le varietà più sensibili all'assorbimento e all'accumulo di As nelle cariossidi sono le varietà a chicco rosso, ma la correlazione tra colore della granella e l'accumulo di As resta tuttora da approfondire.

L'ingegneria genetica mette a disposizione numerosi strumenti, capaci di aumentare la tolleranza nei confronti di ambienti contaminati da As, implementare la metilazione del metalloide a livello del terreno e ridurre l'assorbimento da parte dell'apparato radicale.

E' stato dimostrato che la tossicità dell'As è ridotta in piante transgeniche contenenti un numero maggiore di geni coinvolti nella sintesi di fitochelatine e precursori del glutathione. La sovra-espressione di entrambi questi pool genici garantisce una minor tossicità ed un minor accumulo del metalloide. Numerosi studi sono stati condotti anche per investigare la fito-estrazione per allontanare l'As dal terreno. In tale settore, oggetto di studio sono alcuni geni della specie *P. vittata*, soprattutto quelli responsabili del trasporto xilematico e della detossificazione a livello fogliare.

Vista la condivisione con trasportatori e canali di elementi essenziali quali P e Fe, non sarà possibile bloccare completamente l'assorbimento di As(III) ed As(V) all'interno della pianta. Vi sono però alcune strategie applicabili per ridurre la tossicità e l'assorbimento dell'As:

- identificare alternative e varianti nei trasportatori dello ione fosfato, NIP acquaporine e LSi2 carriers, più selettivi verso il metalloide;
- implementare la produzione di fitochelatine a livello radicale, per limitare la traslocazione dell'As alla granella e facilitarne l'accumulo nei vacuoli dell'apparato ipogeo;
- diffondere sementi geneticamente modificate, capaci di organizzare l'As, sintetizzare composti volatili ed aumentare la fuoriuscita di As(V) dall'apparato radicale.

Source	Target	Gene	Consequence	Reference
<i>Oryza sativa</i>	<i>O. sativa</i>	As ^{III} S-adenosyl transferase (<i>arsM</i>)	Decreases As in rice grain	Kumar et al., 2015
<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Phosphate transporter (<i>PHT1</i> ;8)	Increases phosphate and As ^V absorption and translocation	Wu et al., 2011
<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Response to phosphate 2 requirement (<i>PHR2</i>)	Increases tolerance to As and greater As ^V efflux capacity	Wu et al., 2011
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>O. sativa</i>	Arsenate reductase (<i>ACR3</i>)	Increases As ^{III} efflux Decreases As accumulation in rice grain	Kumar et al., 2015

Figura 5 Principali modificazioni genetiche in *Oryza sativa* (Bastias J., Beldarrain T., 2015)

3.1.9 La situazione in Italia

L'Italia è il primo produttore di riso in Europa, rappresentante circa il 50% della produzione europea totale. La superficie totale a riso è circa 240.000 ha, di cui il 52% in Piemonte (Vercelli, Novara e Alessandria) ed il 41% in Lombardia (Pavia e Milano). Le sottospecie sono tutte *Japonica*, viste le condizioni climatiche inadeguate per la sottospecie *Indica*; le varietà più famose sono Carnaroli, Arborio e Vialone Nano. La dimensione di una tipica azienda risicola italiana è di 48 ha, con rese medie areiche che variano da 5.0 tons/ha fino a 6.9 tons/ha, a seconda della varietà.

Visto l'impiego di acqua glaciale nelle principali aree risicole, il quantitativo di As nel terreno e nell'acqua di irrigazione non è particolarmente elevato, soprattutto nell'areale piemontese. Nella provincia di Pavia e Milano si ha invece una maggiore contaminazione. Ad ogni modo, sia la concentrazione di As totale sia quella di As inorganico non supera le soglie limite stipulate dall'EFSA.

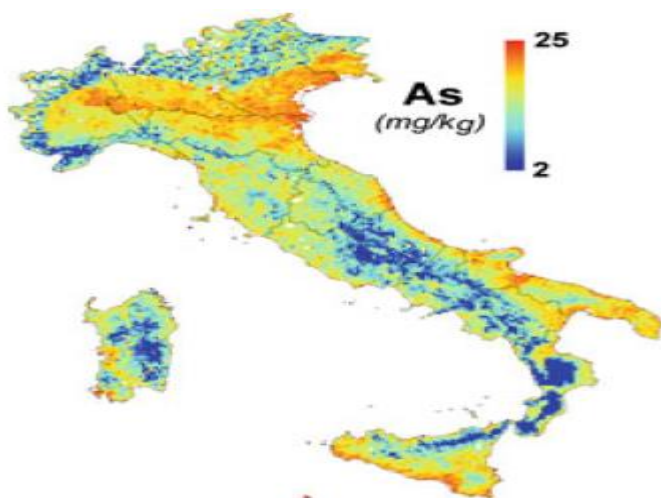


Figura 6 Concentrazione di As nella penisola italiana (Costantini E., Dazzi C., *The soils of Italy*)

Corso d'acqua	Comune	Cd	As
Agogna (2008-2010)	Mezzana Bigli	<0,5 µg/l	<5 µg/l
Erbognone (2009-2010)	Ottobiano	"	"
Olona Meridionale (2008-2010)*	San Zenone	"	Solo 2008*
Po (2009-2010)	Frascarolo	"	"
Po (2009-2010)	Pieve del Cairo	"	"
Po (2009-2010)	Bastida Pancarana	"	"
Po (2008-2010)	Spessa Po	"	"
Terdoppio (2008-2010)	Vigevano	"	"
Terdoppio (2008-2010)	Zinasco	"	"
Ticino (2008-2010)	Bereguardo	"	"
Ticino (2008-2010)	Pavia	"	"
Ticino (2008-2010)	Travacò Siccomario	"	"
Canale deviatore acque alte (2009-2010)	Miradolo Terme	"	"
Olona Meridionale (2008-2010)	Pontelungo (Bornasco)	"	"
Colatore Reale (2009-2010)	Chignolo	"	"
Naviglio Pavese (solo 2008)	Pavia	"	"
Lambro Meridionale (2010)	Zibido al Lambro	"	"

* nel 2008:
• 11 Giugno 7 µg/l
• 6 Ottobre 5 µg/l
• 11 Dicembre 5 µg/l

[ARPA PV, 2008-2010]

Figura 7 Concentrazione di As e Cd nei corsi principali corsi d'acqua pavesi, monitoraggio dal 2008 al 2010 (Romani M., et al., 2013)

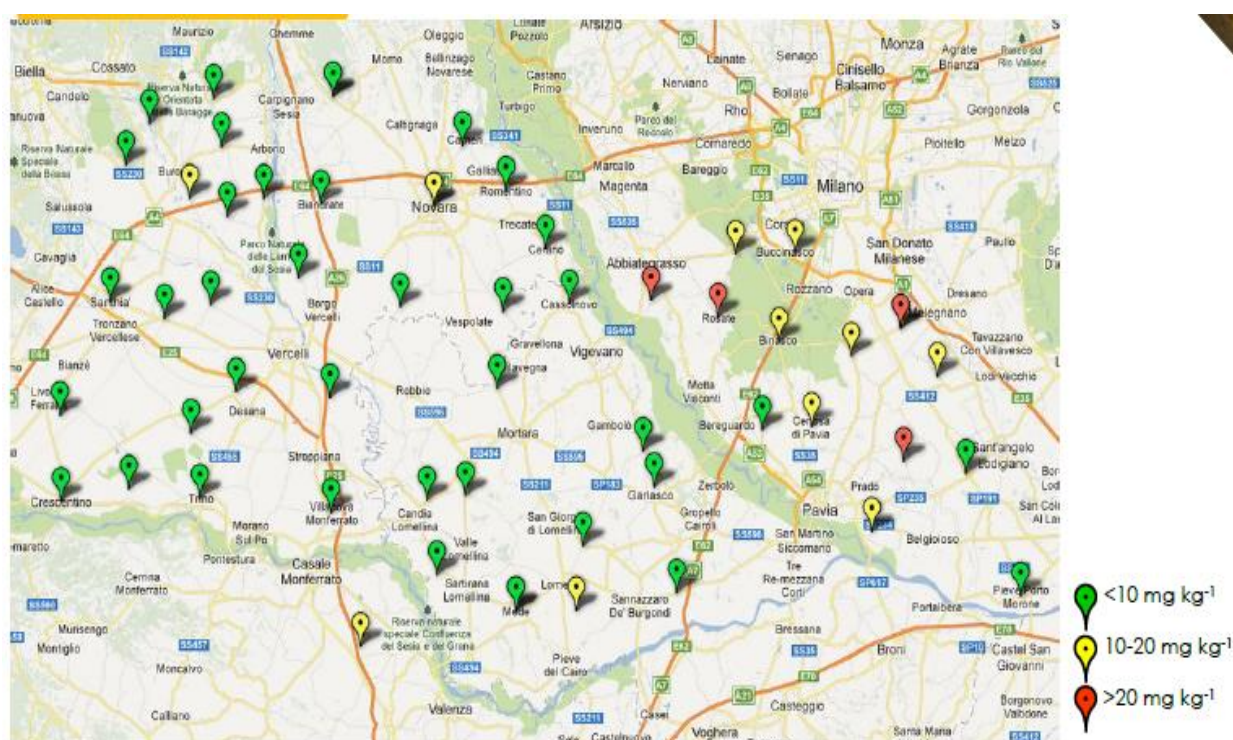


Figura 8 Concentrazione di As nei suoli di Pavia, Vercelli e Novara nel 2008 (Romani M., et al., 2013)



Varietà		As inorganico ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		As totale ICP-MS ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
		2012	2013	2012	2013
Lungo A da parboiled	Augusto	105.2 <i>kl</i>	74.4 <i>hi</i>	237.6 <i>efg</i>	229.3 <i>bcd</i>
	Dardo	130.5 <i>ghij</i>	80.9 <i>fgh</i>	266.5 <i>cde</i>	208.3 <i>def</i>
	Loto	188.3 <i>a</i>	121.5 <i>a</i>	352.0 <i>a</i>	277.2 <i>a</i>
	Luna	166.0 <i>abcd</i>	98.6 <i>bcd</i>	266.8 <i>cde</i>	208.7 <i>def</i>
Lungo A da interno	Baldo	140.5 <i>efgh</i>	78.8 <i>ghi</i>	240.0 <i>efg</i>	212.7 <i>de</i>
	Camaroli	99.0 <i>l</i>	41.8 <i>j</i>	234.0 <i>fg</i>	175.6 <i>hi</i>
	Karnak	104.8 <i>kl</i>	38.1 <i>j</i>	209.5 <i>gh</i>	172.2 <i>i</i>
	Roma	122.0 <i>hijk</i>	68.2 <i>i</i>	255.0 <i>def</i>	200.2 <i>efg</i>
	Vialone Nano	175.8 <i>abc</i>	70.4 <i>hi</i>	305.0 <i>b</i>	197.7 <i>efg</i>
	Volano	158.3 <i>cde</i>	73.8 <i>hi</i>	297.3 <i>bc</i>	214.9 <i>cde</i>
Lungo B	CL 26	147.1 <i>defg</i>	104.0 <i>bc</i>	265.8 <i>cdef</i>	196.1 <i>efgh</i>
	CL 71	106.2 <i>kl</i>	73.1 <i>hi</i>	200.9 <i>h</i>	138.3 <i>j</i>
	CLXL	135.0 <i>fghi</i>	93.2 <i>cde</i>	242.0 <i>ef</i>	244.9 <i>b</i>
	Gladia	139.3 <i>efgh</i>	86.9 <i>efg</i>	247.5 <i>def</i>	194.7 <i>efgh</i>
	Sirio	143.8 <i>defgh</i>	86.2 <i>efg</i>	236.3 <i>efg</i>	186.0 <i>ghi</i>
Tondo	Balilla	130.7 <i>ghij</i>	105.5 <i>b</i>	276.9 <i>bcd</i>	195.1 <i>efgh</i>
	Centauro	154.5 <i>cdef</i>	79.1 <i>ghi</i>	248.3 <i>def</i>	197.4 <i>efgh</i>
	CL 12	113.6 <i>ijkl</i>	88.3 <i>defg</i>	251.0 <i>def</i>	187.5 <i>fghi</i>
	Selenio	179.5 <i>ab</i>	97.3 <i>bcde</i>	297.0 <i>bc</i>	236.5 <i>bc</i>
	Sole	151.8 <i>defg</i>	91.0 <i>def</i>	255.8 <i>def</i>	208.4 <i>def</i>

Figura 9 As nelle principali varietà di riso italiano (Romani M., et al., 2013)

4. Lavorazione e trasformazione del riso: influenza sul quantitativo di arsenico

Un fattore di notevole importanza è la posizione dell'As nella granella. Mediante analisi a raggi X è stato possibile evidenziare un significativo accumulo di As nella parte periferica della cariosside di riso, in prossimità della traccia vascolare-ovulare, tessuto materno contenente xilema e floema e responsabile del trasporto di nutrienti ai tessuti filiali, aleurone ed endosperma. (Zhao F.J., et al., 2010) Tale distribuzione giustifica il maggior contenuto di As nel riso integrale (brown rice) rispetto al riso bianco (white rice). Nel primo caso infatti è sufficiente applicare la procedura di sbramatura, eliminando lo strato fibroso più esterno, detto lolla (insieme di glume e glumette). Il riso bianco invece va incontro anche all'operazione di sbiancatura, che porta all'allontanamento della pula di riso, residuo farinoso costituito da embrione, pericarpo e tegumento della cariosside. La restante parte, endosperma amidaceo, può essere sottoposto ad una fase di lucidatura/brillatura. L'As inorganico contenuto nell'endosperma si lega a proteine dell'aleurone e può essere complessato con gruppi sulfidrilici. Rispetto al riso bianco quello integrale o sbramato presenta pertanto un maggior contenuto di As, ma al tempo stesso è comprensivo di una maggior porzione fibrosa e lipidica che, oltre a determinare la pigmentazione scura del seme, ne caratterizza un maggior contenuto nutrizionale.

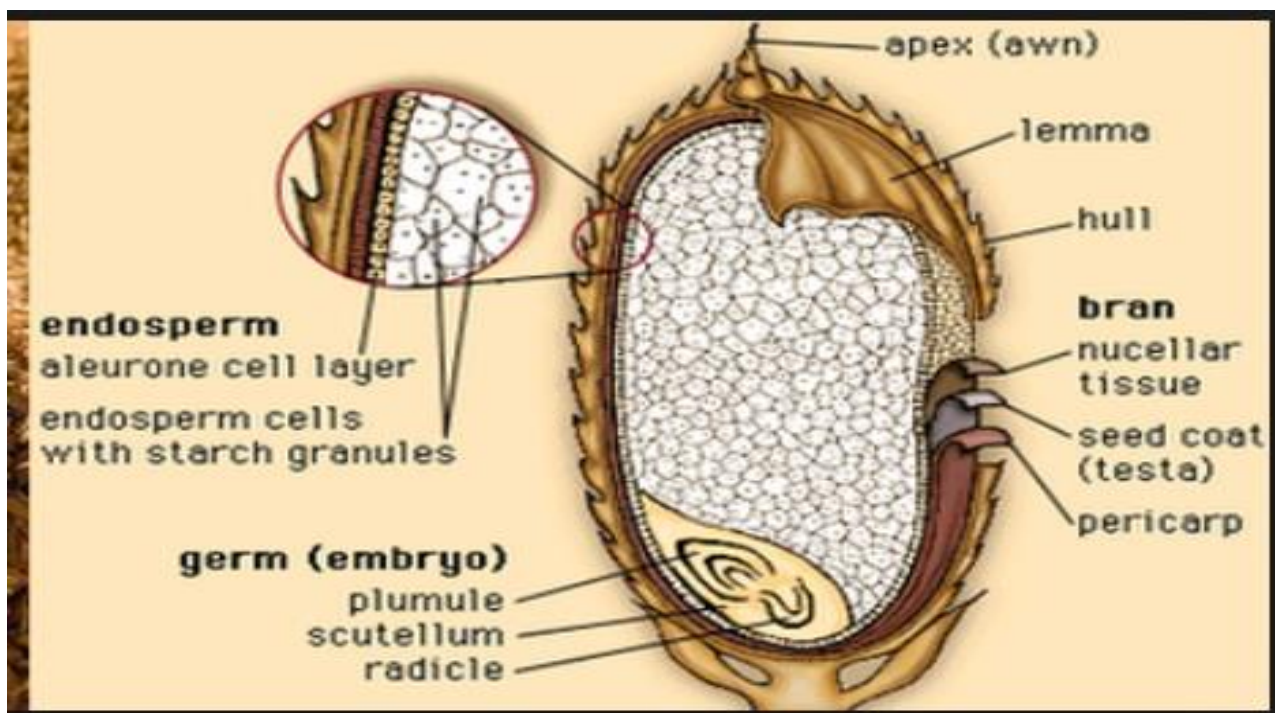


Figura 10 Strati che compongono la cariosside di riso

Un'altra tipologia di riso è il riso parboiled. Il trattamento di parboilizzazione, effettuato su risone (riso non ancora sbramato) può essere schematizzato in tre punti:

- trattamento con acqua calda (60-75° C): vitamine e minerali contenuti negli strati più esterni del granello sono solubilizzati attraverso l'acqua calda e pressate nel chicco di riso sotto forte pressione idraulica;
- trattamento con pressione ad elevate temperature (105-125° C ~ 0,75-1,2 bar): il vapore pressurizzato trasporta le sostanze solubili all'interno dell'endosperma e gelatinizza i granuli di amido;
- trattamento di essiccazione (35-90° C): l'aria secca rimuove l'acqua accumulata durante il processo fino ad arrivare ad un contenuto di umidità pari al 12-14 %.

In seguito al trattamento, il riso si presenta traslucido con un contenuto in vitamine e sali minerali più elevato rispetto al riso bianco. Accanto al maggiore potere nutraceutico occorre però evidenziare l'aumento di As nella granella, che viene solubilizzato ed inglobato nell'endosperma. Effettuando la parboilizzazione su riso integrale invece non è stato registrato un aumento di As.

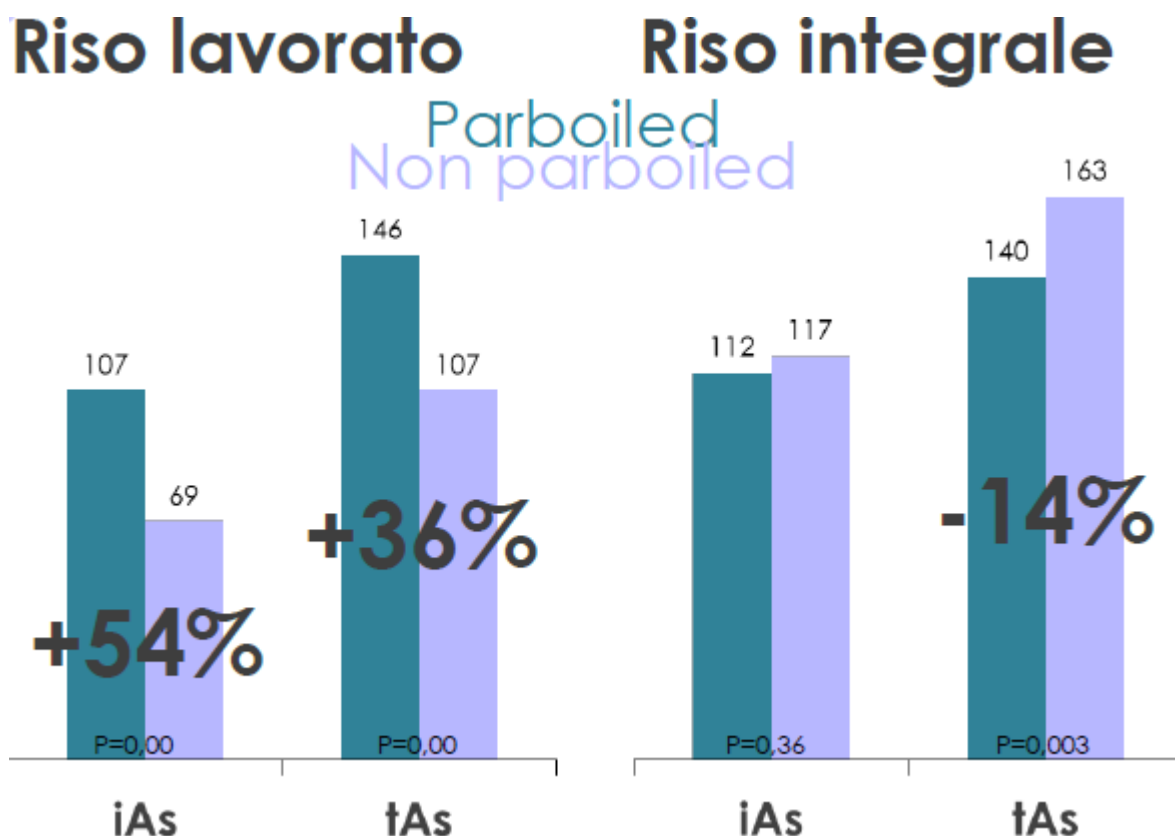


Figura 11 Studio dell'Ente Risi su risi prodotti in Italia (Romani M., et al., 2013)

5. Limiti di legge per l'arsenico inorganico nel riso

L'EFSA (European Food Safety Authority), a partire dal 1 Gennaio 2016, ha deliberato il regolamento che fissa i limiti massimi di arsenico inorganico nel riso. I valori sono stati fissati in seguito a studi ed analisi a livello europeo, secondo cui il consumo medio di As giornaliero di una persona è compreso tra 0,13 e 0,56 µg per kg di peso corporeo (dati EFSA 4/25). L'esposizione per i bambini sotto i 3 anni d'età è due-tre volte superiore quella degli adulti, per il basso potenziale allergenico della granella di riso. Di seguito i limiti di legge:

- riso destinato alla produzione di alimenti per lattanti e prima infanzia etichettati e venduti come tali (baby food) : 0,10 mg/Kg;
- riso lavorato e non parboiled: 0,20 mg/Kg;
- riso parboiled e riso semigreggio: 0,25/kg;
- gallette di riso, wafers di riso e crackers di riso: 0,30 mg/Kg.

Il contenuto massimo in crackers e gallette è maggiore per l'elevata quantità di sostanza secca presente nei prodotti. Per il parboiled verrà presa in esame una eventuale revisione del livello nel 2018.

6. Implicazioni e rischi per la salute umana

Ad oggi, i rischi più gravosi per la salute umana sono collegati principalmente all'ingestione di arsenico inorganico. I limiti di legge introdotti lo scorso Gennaio testimoniano la pericolosità di questa forma.

Dopo essere stato ingerito, una frazione dell'As contenuto nel riso viene metabolizzato dalla flora intestinale, rendendolo disponibile per il nostro organismo. La parte di As che non viene liberata nell'intestino tenue raggiunge il colon, dove i microrganismi, decomponendo le macromolecole arrivate, rilasciano ulteriore As. Nel tratto gastrointestinale il metalloide va incontro a numerose biotrasformazioni, come ossidazione, riduzione, metilazione e tiolazione.

E' stato dimostrato che il contenuto di As rilasciato dipende dalla composizione e dalla variabilità della nostra dieta. Una dieta ricca di verdure riduce la comparsa di lesioni cutanee correlate alla presenza di As e la biodisponibilità a livello gastro-intestinale. In ogni caso la porzione di As inorganico rilasciata durante la digestione è maggiore rispetto alla frazione organica. Resta comunque necessario un approfondimento finalizzato all'analisi del rischio e alla prevenzione.

L'esposizione all'As dipende anche dal mezzo e dal tempo di cottura. Cucinare il riso in molta acqua, da 6 a 10 parti di acqua per una di riso, è un buon metodo per ridurre la biodisponibilità di As, ma aumenta drasticamente il consumo di acqua ed energia e la perdita di alcuni nutrienti.

L'As inorganico colpisce gran parte dei sistemi del nostro organismo: nervoso, gastrointestinale, cardiovascolare ed in maniera minore anche respiratorio ed epatico, ed è responsabile della comparsa del tumore alla vescica e alla pelle. La doppia capacità dell'arsenico di indurre sia mutazioni che epimutazioni è considerata la maggiore causa dei suoi effetti cancerogeni.

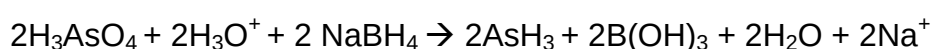
E' opportuno prestare riguardo soprattutto per i bambini, evitando il consumo esclusivo di alimenti a base di riso e variando il più possibile la dieta, introducendo farine a base di avena, orzo e multicereali. Un'attenzione speciale va ai bambini che soffrono di celiachia, maggiormente esposti rispetto ai loro coetanei.

7. Analisi e strumenti per individuare l'arsenico nella granello

L'analisi chimica per discriminare e quantificare selettivamente le specie chimiche dell' As, rilevanti per la salute umana, è un caposaldo essenziale nelle attività di sorveglianza, prevenzione e controllo. La tecnica più comune per rilevare le diverse specie di As è l'HPLC/ICP-MS. L'*high performance liquid chromatography* (HPLC) separa le specie inorganiche e metilate di As; la *coupled plasma mass spectrometry* (ICP-MS) invece ne determina il contenuto. Tale metodologia rappresenta la tecnica universalmente adottata dai laboratori con maggiore esperienza.

Accanto ad analisi analitiche di estrema precisione, occorre sviluppare tecniche più rapide ed economiche. Nel biomonitoraggio umano, l'arsenico urinario rappresenta il biomarcatore di esposizione più frequentemente utilizzato. Tuttavia la sua validità è limitata se non si discrimina la frazione rappresentata dall'As inorganico e dai suoi metaboliti e non si tiene conto delle possibili interferenze della dieta sul DMA urinario.

In ambito agronomico è stato introdotto un kit da campo in grado di analizzare e determinare rapidamente la presenza di As nel riso. Questa soluzione è stata pensata ed introdotta in aree rurali dove l'analisi HPLC/ICP-MS risulta troppo costosa e di difficile applicazione. In campo si ha la preparazione dei campioni da analizzare, l'impiego di strumenti analitici che non richiedano elettricità, una piccola stufa a gas ed un kit commerciale impiegato per la determinazione dell'As nell'acqua potabile. Tutto il procedimento sfrutta la reazione di Gutzeit:



L'individuazione e la determinazione di As dipende principalmente dal cambiamento di colore del filtro di carta impregnato con bromuro di mercurio, in seguito alla sostituzione con il gruppo $-\text{AsH}_2$, come evidenziato nella formula di cui sopra. Il colore varia da giallo a marrone scuro, a seconda della concentrazione di As inorganico nei campioni analizzati. La durata del test è di circa un'ora e permette ai tecnici di osservare, macroscopicamente, la presenza di As nella granella di riso. Per valori più dettagliati e precisi è comunque necessaria l'analisi analitica di laboratorio.

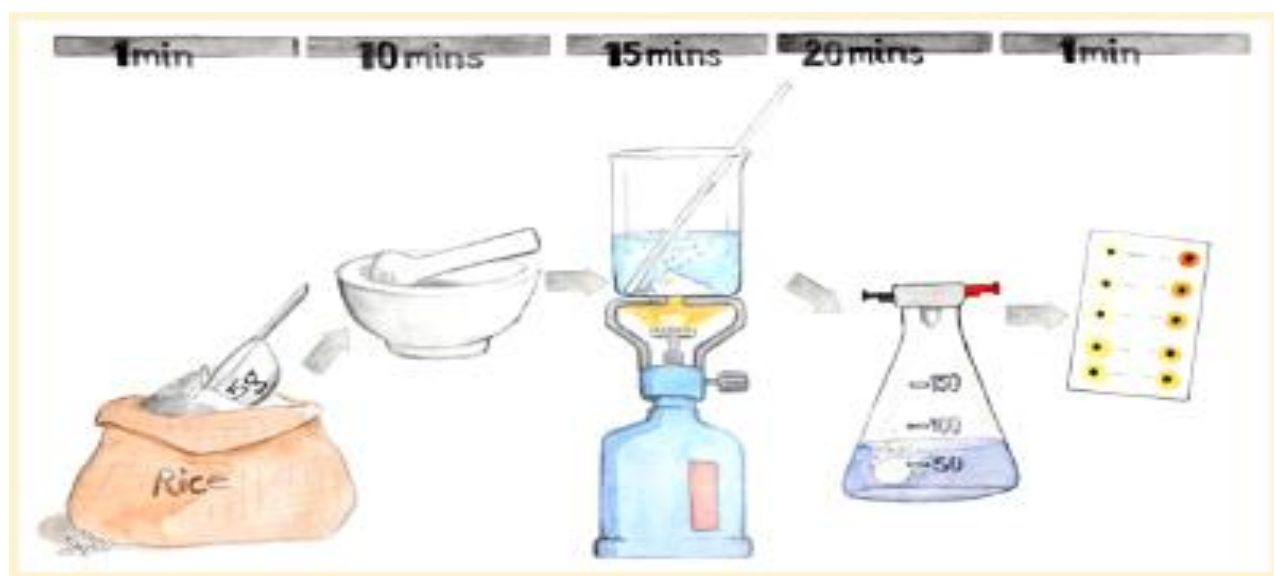


Figura 12 Campionamento ed analisi di campo per determinare l'As inorganico nella granella di riso (Bralatei E., et al., 2015)

8. Conclusioni

Il problema dell'As nel riso è di primaria importanza per la nostra salute. L'introduzione di limiti di legge e la maggiore sensibilità da parte del consumatore si sono tradotti in una più scrupolosa ed attenta gestione dell'ambiente risicolo. Nuove pratiche agronomiche, miglioramento genetico, microrganismi simbiotici e innovative analisi chimiche sono strumenti che consentono di ridurre e monitorare costantemente il metalloide nella granella di riso.

Vi sono tuttavia numerose opportunità commerciali che potrebbero portare, nel medio termine, ad un ulteriore abbattimento del problema As lungo la catena agro-alimentare:

- Consolidare filiere per garantire la tracciabilità del prodotto, tutelando al contempo risicoltori e consumatori;
- regolamentare l'import/export europeo ed italiano;
- assicurare l'origine del prodotto;
- creare prodotti a marchio.

Pur consapevoli dell'impossibilità di annullare il rischio per la salute umana (l'As sarà sempre presente nel terreno), l'adempimento delle innumerevoli idee ed applicazioni disponibili porterà ad una riduzione significativa del problema.

9. Bibliografia

- Aureli F., D'Amato M., Raggi A., Cubadda F., 2015 L'importanza della speciazione e le sue criticità nell'applicazione alle attività di sorveglianza e di controllo. Convegno nazionale Arsenico nelle catene alimentari
- Bastias J.M., Beldarrain T., 2015 Arsenic traslocation in rice cultivation and its implication for human health. *Chilean Journal of Agricultural Research* 76(1) January-March 2016
- Bralatei E., Lacan S., Krupp E.M., Feldmann J., 2015 Detection of inorganic arsenic in rice using a field test kit: a screening method. *Analytical Chemistry* 87 (22), pp 11271–11276
- EFSA, 2010 Scientific Opinion on Arsenic in Food
- Ma R., Shen J., Wu J., Tang Z., Shen Q., Zhao F.J., 2014 Impact of agronomic practices on arsenic accumulation and speciation in rice grain. *Science Direct* 194, 217-223
- Romani M., Miniotti E., Tenni D., Martin M., Beone G.M., Cubadda F., Sacchi G., 2013 Arsenico e riso in ambienti temperati. Italia: stato dell'arte e prospettive di mitigazione. Ente Risi
- Tyson J., 2013 The determination of arsenic compounds: a critical review. *ISRN Analytical Chemistry*, Article ID 835371, 24 pages
- Zhang X., Wu S., Ren B., Chen B., 2015 Water management, rice varieties and mycorrhizal inoculation influence arsenic concentration and speciation in rice grains. *Mycorrhiza*, Volume 26, Issue 4, pp 299-309
- Zhao F.J., McGrath S.P., Meharg A.A., 2010. Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annual Reviews Plant Biology* 61, 535–59
- Zhao F.J., Zhu Y.G., Meharg A.A., 2013. Methylated arsenic species in rice: geographical variation, origin, and uptake mechanisms. *Environmental Science & Technology* 47, 3957-3966.