

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II

CIRAM

Tesi sperimentale del dottorato in
"Analisi dei Sistemi Ambientali"
(XX ciclo)

Risposta del muschio acquatico
Leptodictyum riparium (Hedw.) Warnst.
a metalli pesanti.

Dottorando
dott. Sergio Sorbo

Coordinatore
prof. Lucio Lirer

Tutor
prof. Adriana Basile

Anno Accademico 2006-2007

ABSTRACT

L'inquinamento da metalli pesanti rappresenta una delle più importanti alterazioni degli ambienti naturali. L'effetto di questi inquinanti sugli organismi vegetali può essere tanto una risposta di danno che di tossitolleranza.

Quattro metalli pesanti, 2 estranei al metabolismo cellulare (cadmio e piombo) e 2 microelementi (rame e zinco), sono stati testati *in vitro* sul muschio acquatico *Leptodictyum riparium*. I campioni di muschio esposti sono stati studiati in microscopia elettronica a trasmissione (TEM) ed in microscopia elettronica a scansione ambientale (ESEM) per valutare le alterazioni ultrastrutturali e la localizzazione dei metalli a livello tissutale e cellulare; mediante spettrometria ad assorbimento atomico è stato studiato il bioaccumulo dei metalli nella pianta intera; elettroforesi denaturante (SDS-PAGE) e Western blotting sono stati impiegati per valutare la quantità di Heat Shock Protein; è stato anche determinato il contenuto di proteine solubili con il metodo di Bradford (1976).

Con riferimento ai danni ultrastrutturali, tra i metalli testati il Cd si è dimostrato il più tossico, mentre Pb, Cu e Zn hanno mostrato simile tossicità: i principali danni ultrastrutturali sono a carico dei cloroplasti.

La valutazione del contenuto di metallo nell'intera pianta mostra che il muschio è in grado di concentrare i metalli pesanti testati, soprattutto Cu e Zn.

Per ciò che riguarda la localizzazione a livello tissutale, la microanalisi a raggi X applicata all'ESEM non ha evidenziato localizzazione preferenziale dei metalli pesanti. La localizzazione cellulare dei metalli ne ha mostrato i picchi a livello di vescicole citoplasmatiche e parete cellulare.

Tutti e 4 i metalli pesanti inducevano incremento del contenuto cellulare di HSP 70.

Il contenuto di proteine solubili in *Leptodictyum riparium* diminuiva in risposta allo stress da metalli pesanti, soprattutto con Cd e Pb a 10^{-4} M; Cu e Zn mostravano cambiamenti minori.

Complessivamente *Leptodictyum riparium* ha mostrato notevole tolleranza ai metalli pesanti testati, la cui tossicità induce i danni ultrastrutturali osservati e la diminuzione del contenuto di proteine solubili misurata. La tolleranza del muschio in parte si può spiegare con la localizzazione dei metalli a livello di parete cellulare e vescicole citoplasmatiche, che intrappolano questi elementi tossici sottraendoli al citoplasma. L'induzione metallo-indotta di HSP 70 può contribuire a diminuire gli effetti proteotossici. Inoltre l'elevata capacità di bioaccumulo di *Leptodictyum riparium* lo

rende potenzialmente idoneo a progetti di ricerca sul biomonitoraggio e sul fitorisanamento.

INTRODUZIONE

Metalli pesanti

I metalli pesanti sono elementi con massa atomica maggiore di $4,5 \text{ g/cm}^3$ (per alcuni Autori il limite di riferimento é $5,0$ o anche $6,0 \text{ g/cm}^3$) (Bargagli, 1998a). Ciò nonostante elementi "leggeri" come l'alluminio o i metalloidi (particolarmente arsenico e selenio) sono spesso inclusi nel gruppo dei metalli pesanti (Bargagli, 1998a). In realtà il termine "metalli pesanti" evoca i concetti di permanenza e tossicità nei sistemi biologici e lunghi tempi di residenza o persistenza nell'ambiente (Bargagli, 1998a).

Nelle scienze biologiche il termine "metalli in traccia" o anche "elementi in traccia" viene spesso adoperato come sinonimo di "metalli pesanti": sono detti "in traccia" quegli elementi presenti a concentrazioni molto basse negli organismi viventi. Un altro termine riferito a questi elementi chimici che fa riferimento agli effetti sugli organismi viventi è "metalli potenzialmente tossici".

I 4 elementi chimici presi in esame in questo studio (cadmio, piombo, rame e zinco) per i valori di densità rientrano nella definizione classica di metalli pesanti: pertanto nel testo verrà mantenuto questo termine.

Effetto dei metalli pesanti sugli organismi vegetali

L'effetto dei metalli pesanti sugli organismi vegetali può essere tanto una risposta di danno che di tossi-tolleranza.

In presenza di metalli pesanti gli organismi vegetali possono andare incontro a danni microscopici e biochimici (Basile *et al.*, 1994, 1995, 2001; Sanità di Toppi and Gabbrielli, 1999) (fig. 1).

La risposta di tossi-tolleranza allo stress da metalli pesanti, mediata su base microscopico-biochimica, si articola in tre momenti fondamentali: 1) prevenzione del danno, 2) disintossicazione degli agenti tossici e 3) riparazione dei danni subiti. In presenza di metalli pesanti gli organismi vegetali possono manifestare risposte di tossi-tolleranza, diversificate tra loro (risposta a ventaglio) (Sanità di Toppi and Gabbrielli, 1999) (fig. 2).

Tra i metalli noti per essere agenti inquinanti ce ne sono alcuni del tutto estranei al metabolismo cellulare (es. cadmio e piombo) ed altri, detti microelementi, che sono utili in quantità molto limitate (es. rame e zinco).

Il piombo (Pb) è molto tossico sia per le piante che per gli animali. Si diffonde tramite il particolato e le sue fonti principali sono il traffico veicolare, le fonderie ed i combustibili fossili. E' un elemento estraneo al metabolismo degli organismi viventi.

Il cadmio (Cd) è un elemento nocivo per qualsiasi essere vivente ed è provvisto di potere cancerogeno. La sua origine nell'ambiente è da attri-

buire ad industrie chimiche e petrolchimiche, all'impiego di fertilizzanti fosfatici e di pesticidi, ai rifiuti urbani, ai combustibili fossili, ai settori della galvanoplastica, delle vernici e dei coloranti. E' un elemento estraneo al metabolismo degli organismi viventi.

Il rame (Cu) è scarsamente tossico per l'uomo e gli animali, mentre può risultare tossico anche a concentrazioni basse per le piante. Le sue fonti principali sono fertilizzanti e pesticidi usati in agricoltura (in particolare quelli contro insetti e funghi), l'industria del ferro e dell'acciaio, i combustibili fossili ed i rifiuti urbani. Essendo un cofattore delle plastocianine, il Cu non è un elemento estraneo al metabolismo vegetale.

Lo zinco (Zn) è nocivo per gli organismi viventi solo ad alta concentrazione. Le fonti di emissione sono il traffico veicolare, le fonderie, gli inceneritori, i combustibili fossili, le industrie di vernici e gomma, i fertilizzanti ed i pesticidi usati in agricoltura contro i parassiti. Anche lo Zn non è un elemento estraneo al metabolismo vegetale: essendo un elemento chiave per molti enzimi (es. alcool deidrogenasi), è anch'esso un microelemento degli organismi vegetali

Heat Shock Protein

Le Heat Shock Protein (HSP) sono proteine presenti in tutti i gruppi di organismi viventi, dai procarioti agli eucarioti, e molte di esse sono costi-

tutivamente espresse (Kiang and Tsokos, 1998). Hanno funzioni fisiologiche molto importanti, in quanto assicurano il corretto folding delle proteine cellulari, ne regolano l'assemblaggio, la traslocazione attraverso la membrana, l'attività e la degradazione (Kiang and Tsokos, 1998). Le HSP sono classificate in base al peso molecolare e differiscono tra loro per la struttura, gli organismi che le ospitano e la localizzazione cellulare. In condizioni di stress, le HSP sono overespresse o ne vengono indotte nuove isoforme (Lewis *et al.*, 1999) (fig. 3). Oggetto del nostro studio è la HSP 70, di cui è nota l'induzione in presenza di metalli pesanti; questa proteina è probabilmente è un effettore di metallo-tolleranza (Bierkens *et al.*, 1998).

Briofite

Le Briofite sono le più semplici piante terrestri; sono organismi eucarioti ed autotrofi, per lo più a vita terrestre, caratterizzate da un'organizzazione anatomica molto semplice. Le Briofite, essenzialmente sulla base di caratteri morfologici, vengono attualmente suddivise in tre classi: Muschi, Epatiche ed Antocerote. Hanno un ciclo vitale caratterizzato da alternanza di generazioni antitetiche eteromorfe, cioè con alternanza di due generazioni successive: una fase predominante apolide (gametofito) ed una fase successiva diploide (sporofito), con aspetti comple-

tamente diversi l'una dall'altra; il gametofito è fotosintetico ed autonomo dal punto di vista trofico, mentre lo sporofito dipende troficamente dal primo.

Nel ciclo vitale di una muschio (fig. 4) la spora aploide germinando dà origine ad uno stadio giovanile, pluricellulare, di colore verde (protonema), che può essere filamentoso o laminare a seconda della specie. Successivamente dal protonema si sviluppano delle gemme, che danno origine alla stadio aploide maturo (gametofito), che nei muschi ha sempre un aspetto cormoide: consta di una porzione assile, il fusticino, che si attacca al substrato mediante rizoidi unicellulari o pluricellulari, e di numerosi foglioline (o filloidi) sessili, attaccate al fusticino. Il gametofito produce gametangi maschili (anteridi) che generano a loro volta gameti maschili flagellati (anterozoidi), i quali, in presenza di acqua, possono raggiungere e fecondare il gamete femminile, l'oosfera, nel gametangio femminile (archegonio). Dalla fecondazione, passando attraverso una fase embrionale, origina lo sporofito, che consta di una parte assile (seta), infissa nel gametofito tramite una struttura austoriale (piede), e di una capsula, all'estremità apicale della seta. All'interno della capsula il tessuto sporigeno va incontro a meiosi ed origina spore aploidi: una volta liberate all'esterno allorché la capsula è matura, le spore vengono disperse nell'ambiente dalle correnti d'aria e germinando ripetono il ciclo.

Le briofite, per l'elevato rapporto superficie/volume, la semplice organizzazione anatomica e l'assenza di radici, sono particolarmente sensibili all'inquinamento ambientale (Tyler, 1990; Bargagli, 1998b).

Bioindicazione, bioaccumulo e fitorisanamento

L'inquinamento può essere definito come la variazione qualitativa e quantitativa delle caratteristiche chimico-fisiche di un certo substrato. Operativamente l'inquinamento può essere definito in termini di concentrazioni di differenti inquinanti, il cui monitoraggio è difficile perché le concentrazioni degli inquinanti sono molto variabili nello spazio e nel tempo. I dati relativi a misurazioni periodiche, effettuate con apparecchi automatici o direttamente da operatori, sono puntiformi, ossia limitati a pochi inquinanti, misurati in un certo istante: in questo modo non si ottiene una definizione precisa del trend spazio-temporale degli inquinanti nel substrato esaminato.

Gli effetti degli inquinanti sugli organismi possono essere efficacemente valutati con tecniche di biomonitoraggio, che consistono in analisi di organismi o comunità reattivi all'inquinamento per stimarne le deviazioni da condizioni "normali" di controllo (Nimis, 1999). Gli organismi adoperati in queste tecniche sono chiamati bioindicatori o biomonitors e possono funzionare come integratori di dati, nel senso che registrano l'effetto

dell'inquinamento ambientale nel tempo. I bioindicatori pertanto non danno più dati puntiformi sull'inquinamento, ma registrano l'effetto dei numerosi inquinanti cui sono esposti nel corso del tempo, eventualmente evidenziandone anche effetti di tipo additivo o sinergico.

Possono essere distinti 2 effetti principali, corrispondenti a 2 categorie di tecniche:

- ✓ accumulo di elementi chimici (specialmente metalli pesanti e radio-nuclidi), corrispondenti a tecniche di bioaccumulo, che misurano concentrazioni di elementi in organismi tolleranti, in grado di assorbire ed accumulare elementi, raggiungendo concentrazioni interne elevate (Bargagli, 1998c; Nimis, 1999);

- ✓ cambiamenti morfologici, fisiologici o genetici a livello di organismi, popolazione o comunità, corrispondenti a tecniche di bioindicazione (Shaw *et al.*, 1989; Giordano *et al.*, 2004).

Fitorisanamento o phytoremediation o biorisanamento mediante vegetali è l'uso di piante per estrarre, sequestrare e/o detossificare inquinanti (Meagher, 2000). Il fitorisanamento è largamente adoperato come la risposta ecologicamente alternativa ai distruttivi metodi di risanamento fisico-chimici correntemente praticati. Le piante hanno molte proprietà endogene genetiche, biochimiche e fisiologiche che le rendono agenti ideali per la depurazione di acqua e suolo; progressi significativi sono stati compiuti

per utilizzare piante native o geneticamente modificate per il risanamento di ambienti inquinati (Meagher, 2000). L'obiettivo finale della maggior parte delle strategie di fitorisanamento è l'iperaccumulo di elementi chimici all'interno di organismi o parti di essi, intendendosi per iperaccumulo la concentrazione di un metallo maggiore di 0,1 - 1% del peso secco della pianta (Baker, 1999).

SCOPO DEL LAVORO

Scopo del lavoro è lo studio della risposta, su base microscopica e biochimica, del muschio acquatico *Leptodictyum riparium* a 4 metalli pesanti, di cui 2 estranei al metabolismo cellulare (Cd, Pb) e 2 microelementi (Cu e Zn), testati in condizioni strettamente controllate.

MATERIALI E METODI

Materiale vegetale

Il nome del muschio *Leptodictyum riparium* (Hedw.) Warnst. (Amblistegiaceae, Musci, Bryophyta) (fig. 5) ha etimologia greca, da λεπτος (gracile) e δικτιον (rete); il nome specifico *riparium* si riferisce alla vita acquatica su fondali bassi. Si tratta di una pianta con il gametofito dall'aspetto generalmente gracile, ramificato, di colore verde, che vive immerso in acqua dolce su fondali bassi, abbarbicato al fondo, o su superfici bagnate; è diffuso in tutti i continenti.

Campioni di *Leptodictyum riparium* cresciuti in campo, lunghi da 5 a 7 cm, sono stati prelevati da uno stagno artificiale nell'Orto Botanico dell'Università di Napoli Federico II. Alcuni dei campioni raccolti sono stati depositati nell'erbario della sezione di Biologia Vegetale del Dipartimento delle Scienze Biologiche (Università di Napoli Federico II).

Colture in vitro

Le piante sono state messe in coltura il giorno stesso della raccolta; i campioni prelevati in campo, dopo la completa e delicata rimozione di particelle ed organismi epifiti adesi, sono stati lavati accuratamente con acqua bidistillata e poi disinfettati in superficie con etanolo al 70% (per 2 minuti) e con soluzione acquosa di NaClO al 2% con aggiunta di poche goc-

ce di Triton X-100 (per 5 minuti). Successivamente i campioni sono stati lavati con acqua bidistillata sterile (per 10 minuti) e messi in coltura in becker (7,5 cm di diametro, 5 campioni per beaker) con 400 ml di terreno di coltura Mohr modificato liquido sterile (Krupa, 1964), a pH 7,5, con la seguente composizione: KNO_3 100 mg/l, $\text{CaCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/l, MgSO_4 10 mg/l, KH_2PO_4 136 mg/l, FeSO_4 0,4 mg/l e soluzione BBM (Bold Basal Medium secondo Nichols, 1973) 1 ml/l. Il Mohr delle colture di controllo non conteneva altri elementi chimici, mentre i test con i metalli pesanti sono stati condotti in presenza di 1 dei seguenti sali: CuSO_4 , ZnCl_2 , CdCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ a 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} M. Ad altre colture di controllo sono stati aggiunti Na_2SO_4 , NaCl o NaNO_3 alle stesse concentrazione dei metalli pesanti. Le soluzioni di coltura sono state sostituite ogni 3 giorni. Le colture sono state condotte in cella climatica con temperature di 13/20°C (rispettivamente temperatura notturna e diurna all'interno della cella), umidità relativa costante al 70% ed un fotoperiodo di 16 ore di luce ($40 \text{ Em}^{-2} \text{ s}^{-1}$) / 8 ore di buio. I campioni sono stati osservati in microscopia ottica ogni 2 giorni per valutarne lo stato generale e sono stati tenuti in coltura per 3 settimane.

Gli esperimenti di coltura *in vitro* sono stati condotti in triplicato e sono stati ripetuti 3 volte.

Microscopia elettronica a trasmissione (TEM) convenzionale

La preparazione dei campioni per la microscopia elettronica a trasmissione (TEM) si articola nelle seguenti fasi successive: fissazione, disidratazione, inclusione in resina, ultramicrotomia e colorazione (Dykstra, 1992).

Segmenti subapicali maturi del gametofito di *Leptodictyum riparium*, neoformati nelle soluzioni di coltura, sono stati fissati in soluzione di gluteraldeide al 3% (Agar Scientific, U.K.) in tampone fosfato (0,065M; pH 7,2-7,4) per 1,5 ore a temperatura ambiente e post-fissati in soluzione di osmio all'1% (Agar Scientific, U.K.) in tampone fosfato (0,065 M; pH 7,2-7,4) per 1,5 ore a temperatura ambiente. La disidratazione è stata eseguita con concentrazioni crescenti di alcol etilico (serie crescente degli alcoli) fino all'alcol etilico assoluto. Il campione, dopo passaggio per 20 minuti in ossido di propilene assoluto (Merck, Germany), è stato poi sottoposto ad inclusione tramite passaggi in soluzioni di ossido di propilene a concentrazioni crescenti di resina epossidica Spurr (Agar Scientific, U.K.) fino alla resina assoluta. Dopo polimerizzazione in stufa a 70°C per 24 ore, i blocchetti di resina contenenti il campione sono stati poi sottoposti ad ultramicrotomia, ottenendo sezioni ultrasottili di 70-80 nm. Queste ultime, raccolte su retini di rame, sono state colorate con soluzioni di acetato di uranile e citrato di piombo. Le osservazioni ultrastrutturali sono state

eseguite al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) FEI EM 208S, con una tensione di accelerazione di 80 KV .

Per ogni trattamento le osservazioni sono state eseguite 1 volta a settimana, su 3 campioni diversi di ciascuno dei quali sono stati osservati 3 filloidi.

Microanalisi a raggi X all'ESEM

La spettroscopia a dispersione di energia (EDS), meglio nota come microanalisi a raggi X, applicata al microscopio elettronico a scansione ambientale (environmental scanning electron microscopy ESEM) è stata impiegata per localizzare i metalli pesanti a livello tessutale. Campioni di *Leptodictyum riparium* freschi, appena prelevati dal terreno di coltura, sono stati frammentati, montati su stub per ESEM ed osservati mediante un microscopio elettronico a scansione ambientale FEI Quanta 200 ESEM provvisto di spettrometro per microanalisi a raggi X. I parametri impiegati sono stati i seguenti: voltaggio 30 KV, spotsize 6, tempo di acquisizione 50 s, angolo di take off di 35°.

Per ogni trattamento le osservazioni sono state eseguite 1 volta a settimana, su 3 campioni diversi di ciascuno dei quali sono stati osservati 3 filloidi.

Microanalisi a raggi X al TEM

La spettroscopia a dispersione di energia (EDS), meglio nota come microanalisi a raggi X, applicata al TEM è stata impiegata per localizzare i metalli pesanti a livello subcellulare.

Il protocollo di preparazione dei campioni per la microanalisi a raggi X al TEM è analogo a quello per il TEM convenzionale, eccetto per la post-fissazione in osmio e la colorazione delle fettine che non sono state eseguite. Per la raccolta delle fettine sono stati impiegati retini di nylon e le osservazioni sono state seguite con il TEM Philips CM12, provvisto di spettrometro per microanalisi a raggi X. I parametri impiegati sono stati i seguenti: voltaggio di accelerazione 40 KV, diametro del fascio 50 nm, numero medio di conte 800-1000 conte s^{-1} , angolo di take off 35° , tempo di acquisizione 100s.

Per ogni trattamento le osservazioni sono state eseguite 1 volta a settimana, su 3 campioni diversi di ciascuno dei quali sono stati osservati 3 filloidi.

Spettrometria ad assorbimento atomico

Il campione da esaminare, asciugato con carta bibula ed essiccato sotto vuoto per 24 ore, è stato mineralizzato mediante trattamento con soluzione di HNO_3 al 70% a $70^\circ C$ per 20 minuti (rapporto peso campio-

ne/volume HNO₃ 50:1). Al termine del trattamento, il digerito è stato centrifugato per 5 minuti a 12.000 g; il soprannatante è stato quindi diluito opportunamente con HNO₃ 0,2% e usato per la determinazione della concentrazione dei metalli mediante spettrofotometro ad assorbimento atomico Perkin Elmer, modello 5100 ZEEMAN, fornito di fornello di grafite HGA 600. Le determinazioni sono effettuate con il metodo della curva di taratura, ovvero costruendo una retta di taratura con almeno tre soluzioni standard di riferimento dell'elemento (Perkin Elmer) da determinare.

Le misurazioni, eseguite 1 volta a settimana e su 3 campioni per ogni trattamento, sono state ripetute 3 volte sullo stesso campione e sono riportate come media su peso secco.

Preparazione degli estratti (per elettroforesi, Western blotting e determinazione delle proteine)

Gametofiti di *Leptodictyum riparium* (1 g) sono stati velocemente congelati in azoto liquido in mortaio e polverizzati con un pestello. Le HSP 70 sono state estratte con tampone di estrazione avente la seguente composizione chimica: Tris-HCl 32 mM a pH 7,8, glicerolo al 10%, ditiotreitolo (DTT) 5 mM, Triton X-100 allo 0,05% e protease inhibitor cocktail (Sigma

P9599) 1ml/30gr di tessuto. L'estrazione è stata eseguita a 4-6°C e con rapporto peso/volume 1:2; l'omogenato è stato filtrato attraverso 4 strati di garza e centrifugato a 20.000 g per 20 minuti a 4°C in centrifuga Sorvall RC5C plus con rotore Sorvall SS34. Il soprannatante (estratto grezzo) è stato adoperato per la determinazione delle proteine solubili, per l'SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis) ed il Western blot.

L'estratto è stato preparato in triplicato a partire da campioni di *Leptodictyum riparium* trattati con i metalli pesanti alle concentrazioni 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M, dopo 3 e 6 giorni di coltura.

Elettroforesi e Western blotting

Gli estratti, prima di essere sottoposti ad elettroforesi SDS-PAGE, sono stati denaturati in miscela di trattamento (Tris-HCl 0,125 M a pH 6,8, SDS al 4%, glicerolo al 20 % (v/v), DTT 0,2 mM, blu di bromofenolo allo 0,02%, in proporzione 1:1) in bagno a 100°C per 5 minuti ed infine raffreddati in ghiaccio prima del caricamento nel gel.

Le HSP 70 di *Leptodictyum riparium* sono state risolte tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide al 10% (dimensioni del gel di 10 x 10,5 cm e stacking gel al 4%); 10-40 µg di proteine, caricate sul gel in vasca per elettroforesi (Hoefler miniVE system), sono stati sottoposti a corsa per 90

minuti a 40 mA e 180 V (corrente erogata da alimentatore Pharmacia E301 power supply) (Laemmli, 1970). Il tampone di corsa era così composto:

Tris-HCl (pH 8.3.)	25	mM
Glicina	0.192	mM
SDS [*]	0.1	%

(^{*}): Sodiodecilsolfato

Per l'analisi in Western blot i polipeptidi, separati con la corsa in SDS-PAGE, sono stati trasferiti dai gel su membrana di nitrocellulosa (Schleicher and Schuell, Protran; porosità di 0,2 μ m) applicando una corrente di 25 V e 300 mA per 2 ore in vaschetta di trasferimento (Hoefer miniVE blot module). Il tampone di trasferimento, oltre ad i componenti di quello di corsa, conteneva metanolo al 20 % per migliorare il trasferimento delle proteine (Towbin Transfer Buffer). In seguito i polipeptidi sono stati incubati per 2 ore a temperatura ambiente con anticorpi contro HSP 70 di cuore bovino (Sigma). I peptidi che avevano cross-reagito sono stati identificati mediante incubazione con anticorpo secondario (antimouse IgG) coniugato con fosfatasi alcalina e visualizzati mediante reazione con i sali di tetrazolio (soluzione di nitro blu di tetrazolio 0,48 mM, 5-bromo-4 clo-

ro-3 indolil fosfato 0,56 mM in Tris-HCl 10 mM a pH 9,2 e MgCl₂ 60 mM; Sigma B6404) (Esposito *et al.*, 2005).

Determinazione delle proteine solubili

Le proteine solubili dei campioni sono state stimate con il metodo di Bradford (1976), basato su saggio colorimetrico con blu Coomassie R-250, usando il metodo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) con spettrofotometro Beckman DU 65. Una curva standard con albumina serica bovina è stata usata per calcolare le concentrazioni di proteina negli estratti.

Analisi statistica

La significatività delle differenze tra le medie dei parametri misurabili esaminati (valori di bioaccumulo, contenuto di proteine solubili e numero di plastoglobuli), confrontando il controllo con il trattato ed i diversi trattamenti tra loro, è stata controllata mediante il test t di Student ($p < 0,05$).

RISULTATI

La concentrazione $10^{-3}M$ induceva necrosi progressiva e poi morte dell'intero gametofito con tutti i metalli testati già a 7 giorni di coltura; le altre concentrazioni consentivano la sopravvivenza dei gametofiti, salvo la comparsa di zone necrotiche. L'estensione delle zone necrotiche diminuiva al diminuire delle concentrazioni (effetto dose-dipendente) ed era maggiore con l'allungarsi dei tempi di coltura (effetto tempo-dipendente).

Osservazioni ultrastrutturali

Controllo (fig. 6)

Le cellule dei filloidi di *Leptodictyum riparium* cresciuto in condizioni di controllo mostravano una organizzazione ultrastrutturale con cellule circondate da una tipica parete cellulare fibrosa e cloroplasti discoidali o affusolati, generalmente distribuiti in file sotto le pareti cellulari. I cloroplasti contenevano un sistema lamellare ben sviluppato, con diversi grana e tilacoidi stromali disposti secondo l'asse principale, pochi plastoglobuli e granuli di amido. Il sistema vacuolare era formato da uno o più grandi vacuoli. Il citoplasma mostrava mitocondri con creste tubulari, reticolo endoplasmatico liscio e rugoso, dittiosomi e nucleo.

In presenza dei metalli pesanti le cellule dei filloidi di *Leptodictyum riparium* presentavano alterazioni ultrastrutturali che, osservabili già dopo 7 giorni di coltura, erano mantenute fino alla fine dell'esperimento.

Effetti del Pb (fig. 7a-c)

Il muschio stressato con Pb, pur non mostrando generalmente danni severi, subiva effetti dose-dipendenti. Generalmente i cloroplasti avevano un sistema tilacoidale ben preservato ed alcuni presentavano rigonfiamenti irregolari (forma ameboide). Sotto la parete cellulare erano presenti numerose microvescicole, alcune delle quali mostravano un contenuto chiaro, altre un contenuto elettrondenso. Le altre strutture subcellulari erano organizzate come nel controllo.

Effetti del Cd (fig. 7d-f)

Il Cd causava importanti alterazioni ultrastrutturali: i cloroplasti apparivano generalmente slargati o con rigonfiamenti irregolari (cloroplasti ameboidi) ed avevano una organizzazione alterata delle membrane interne, numerosi plastoglobuli e granuli di amido. Il sistema tilacoidale era ben esteso, ma prevalentemente fatto di grandi ed irregolari impilamenti di grana distribuiti irregolarmente all'interno dello stroma. Nel citoplasma erano presenti corpi multivescicolari con precipitati elettrondensi e mitocondri con creste slargate. Queste alterazioni, dipendenti dalla dose, erano più intense e frequenti nei campioni trattati con Cd a 10^{-4} M.

Effetti dello Zn (fig. 8a-c)

Lo Zn causava lievi alterazioni dei cloroplasti: questi organelli erano talvolta di forma irregolare, variabile e con evidenti protuberanze, e mostravano un elevato numero di goccioline lipidiche e pochi, piccoli granuli di amido. Complessivamente il sistema tilacoidale appariva ben conservato. All'interno del citoplasma e sotto la parete cellulare erano presenti vescicole, alcune delle quali apparivano chiare, altre elettrondense. Il tipico grande vacuolo unico non era comune nei campioni trattati con Zn: il sistema vacuolare appariva suddiviso in vacuoli più piccoli separati da briglie citoplasmatiche; all'interno di questi vacuoli erano visibili depositi elettrondensi.

Effetti del Cu (fig. 8d-f)

I campioni trattati con rame mostravano cloroplasti con rigonfiamenti, ma con sistema tilacoidale ben preservato, plastoglobuli e granuli di amido. Il citoplasma mostrava numerose vescicole e corpi multivescicolari; le altre strutture subcellulari erano organizzate come nel controllo.

Bioaccumulo

Leptodictyum riparium, esaminato in spettrometria ad assorbimento atomico, è risultato particolarmente efficace nel bioaccumulare i metalli testati: dopo 7 giorni di coltura Cu e Zn raggiungevano concentrazioni molte

alte, mentre Pb e Cd erano meno concentrati (fig. 9). I metalli erano accumulati nel seguente ordine decrescente: Zn, Cu, Pb e Cd.

La capacità di bioaccumulo può essere efficacemente espressa come coefficiente di bioaccumulo, calcolato come il rapporto tra la concentrazione media dell'elemento nella pianta e la concentrazione iniziale nel terreno di coltura.

Coefficiente di bioaccumulo = $[C_f] / [C_i]$

C_f = concentrazione media finale nella pianta

C_i = concentrazione iniziale del terreno di coltura

Come si evince dalla tab. 1 e dalla fig. 10, i valori del coefficiente di bioaccumulo erano particolarmente elevati per Zn e Cu; lo Zn, a parità di concentrazione nel terreno di coltura, aveva sempre i valori più elevati.

I valori di bioaccumulo misurati dopo 2 e 3 settimane di coltura erano comparabili con quelli dopo 1 settimana.

Localizzazione dei metalli

La localizzazione dei metalli, esaminata mediante microanalisi a raggi X applicata all'ESEM, ha mostrato picchi di Cd, Pb, Cu e Zn in tutti gli "organismi" (filloidi, fusticino e rizoidi) del gametofito di *Leptodictyum riparium*

esposto ai metalli pesanti: pertanto a livello di "organo" e di tessuto non si è evidenziata localizzazione preferenziale dei metalli.

La localizzazione dei metalli nelle cellule dei filloidi, esaminata mediante microanalisi a raggi X applicata al TEM, ha mostrato picchi di Cd, Pb, Cu e Zn a livello di vescicole citoplasmatiche e parete cellulare; gli spettri registrati sono mostrati in fig. 11.

Contenuto di proteine solubili

Leptodictyum riparium cresciuto in condizioni di controllo presentava un contenuto di proteine solubili di $1,46 \pm 0,11$ mg prot. \cdot mg⁻¹ FW (fig. 12). Il Cd non ha causato cambiamenti apprezzabili nel contenuto di proteine solubili a 10^{-5} M, ma le piante stressate a 10^{-4} M presentavano una diminuzione del 35%. Il Pb ha causato una diminuzione di circa il 40% del contenuto di proteine solubili a tutte le concentrazioni: la concentrazione 10^{-5} M ha causato una riduzione del 42% già dopo 3 giorni di esposizione. Cu (10^{-6} M) e Zn (10^{-4} M) hanno causato solo una leggera diminuzione (15-20%) del contenuto di proteine totali.

Heat Shock Protein

Il controllo di *Leptodictyum riparium* mostrava 2 polipeptidi che reagivano con gli anticorpi contro la HSP 70 bovina, con 2 differenti pesi molecolari: 70 e 72 Kda (fig. 13).

Il Cd induceva incremento dose-dipendente delle HSP 70: entrambe le bande aumentavano già dopo 3 giorni di coltura a 10^{-4} M e dopo 6 giorni a 10^{-5} M. Dopo 6 giorni di coltura a 10^{-4} M l'effetto tossico del Cd era chiaramente evidente perché le bande colorate dell'HSP70 erano sfumate.

Il Pb induceva aumento della banda dell'HSP 72 dopo 6 giorni coltura a 10^{-5} M ed aumento della HSP 70 dopo 6 giorni a 10^{-4} M.

Nelle piante trattate con Cu e Zn entrambe le proteine aumentavano dopo 6 giorni di esposizione ai metalli (fig. 13).

DISCUSSIONI

L'inquinamento da metalli pesanti rappresenta una delle più importanti alterazioni degli ambienti naturali: pertanto negli ultimi anni la ricerca di idonei indicatori di inquinamento è stata estesa alle piante semplici, come le briofite, per la loro ampia distribuzione e l'alta sensibilità ai cambiamenti di composizione chimica dell'ambiente. Nel gruppo delle briofite sono note sia piante sensibili che tolleranti all'inquinamento ambientale. Le specie tolleranti sono in grado di crescere estesamente anche in aree soggette ad elevato inquinamento ambientale; ciò nonostante non molti autori hanno indagato sulle ragioni di questa tolleranza (Shaw 1987, 1990; Basile *et al.*, 1994, 1995, 2001, 2005; Carginale *et al.*, 2004).

Nelle piante superiori gli stress abiotici possono causare cambiamenti strutturali e funzionali con effetti spesso deleteri per la vita della pianta; inoltre è noto che la presenza di metalli pesanti induce alterazioni strutturali ed ultrastrutturali in organismi vegetali semplici (Basile *et al.*, 2001; Carginale *et al.*, 2004); questo studio ha mostrato che sorprendentemente lo stress da metalli pesanti non causa danni importanti nel muschio acquatico *Leptodictyum riparium*.

Con riferimento ai danni ultrastrutturali, tra i metalli pesanti testati il Cd si è dimostrato il più tossico, mentre Zn, Pb e Cu hanno mostrato simile tossicità. Bisogna comunque sottolineare che le concentrazioni di metalli

pesanti testate in questo studio sono alte in riferimento alle quantità generalmente reperibili nelle acque inquinate (Sanità di Toppi and Gabbrielli, 1999; Jain and Sharma, 2001; Mansour and Sidky, 2002): pertanto la tolleranza di *Leptodictyum riparium* ai metalli testati è molto alta, anche in relazione alla scala di tossicità riportata in letteratura (Brown, 1984). La tolleranza di *Leptodictyum riparium* a Cu e Zn può essere ascritta al loro ruolo di microelementi: Cu è un cofattore delle plastocianine e Zn è un elemento chiave per molti enzimi (es. alcool deidrogenasi).

I metalli pesanti hanno numerosi e differenti bersagli negli organismi vegetali: il Cd danneggia l'intera fisiologia della cellula (Sanità di Toppi and Gabbrielli, 1999); inoltre i metalli pesanti inducono stress ossidativo (Gallego *et al.*, 1996; Bargagli, 1998a; Dixit *et al.*, 2001; Shah *et al.*, 2001). Pertanto questi elementi chimici danneggiano la cellula in numerosi e differenti modi e, tramite lo stress ossidativo, possono indurre senescenza. Così, soprattutto in organismi semplici come le briofite, che hanno un'anatomia ed una fisiologia poco complessa (Tyler, 1990; Bargagli, 1998b; Sanità di Toppi and Gabbrielli, 1999) e pochi fenomeni di detossificazione, i metalli pesanti possono indurre comparsa di danni e fenomeni di senescenza.

Gli effetti ultrastrutturali in *Leptodictyum riparium* esposto ai metalli pesanti interessano soprattutto cloroplasti e vacuoli, con variazioni della

struttura degli organelli e del numero. Nei campioni stressati i cloroplasti apparivano deformati ed il trattamento con Cd interferiva con la corretta organizzazione del sistema tilacoidale, che appariva organizzato in maniera alterata rispetto al controllo; inoltre in presenza di Cd i cloroplasti presentavano numerosi plastoglobuli nello stroma.

Danni ai cloroplasti sono stati pure riscontrati in seguito a stress da metalli pesanti in piante appartenenti a diversi taxa: in *Triticum aestivum* (Angiosperma), in *Elodea canadensis* (Angiosperma), nell'epatica *Lunularia cruciata* (Briofita) e nelle cellule algali (Clorofita) del lichene *Bryoria fuscescens* (Ouzounidou *et al.*, 1997; Dalla Vecchia *et al.*, 2005; Carginale *et al.*, 2004; Tarhanen, 1998). Pertanto i cloroplasti sembrano essere un bersaglio comune dell'effetto tossico da metalli pesanti. Il danno ai cloroplasti in *Elodea canadensis* e *Triticum aestivum* trattate con metalli pesanti è probabilmente anche in relazione alla perdita di attività fotosintetica (Dalla Vecchia *et al.*, 2005; Ouzounidou *et al.*, 1997).

L'aumento di plastoglobuli riscontrato in *Leptodictyum riparium* trattato con metalli pesanti concorda con l'analoga alterazione trovata in *Elodea canadensis* trattata con Cd: questi plastoglobuli sono stati considerati come accumuli di lipidi derivanti dalla degenerazione delle membrane tilacoidali (Dalla Vecchia *et al.*, 2005). La comparsa di questo tipo di inclusione è generalmente considerata come un sintomo di senescenza (Ghosh *et*

al., 2001): l'incremento delle goccioline lipidiche può essere spiegata con alterazioni metaboliche, che portavano all'accumulo di metaboliti intermedi e materiali di riserva.

Il ritrovamento di slargamenti nei cloroplasti e nei mitocondri di *Leptodictyum riparium* trattato con metalli pesanti può essere messo in relazione alla perdita di permeabilità selettiva delle membrane, conseguente ad un danno primario alle membrane o secondaria a perdita di energia cellulare (Schwartzman and Cidlowski, 1993). I compartimenti delimitati da membrane possono rigonfiarsi o coartarsi quando gli ioni si muovono liberamente attraverso una membrana, eventualmente trascinati dall'acqua (Schwartzman and Cidlowski, 1993). Un'altra possibile causa di questa alterazione può derivare dalla stress ossidativo indotto dai metalli pesanti, che suggerisce la possibile perossidazione delle membrane biologiche tramite il sistema della lipossigenasi (Gallego *et al.*, 1996).

Il ritrovamento di vescicole in *Leptodictyum riparium* trattato con metalli pesanti è in accordo con altri studi che dimostrano la comparsa di vescicole elettrondense in piante trattate con metalli pesanti, come nell'alga *Tetraselmis seucica* sottoposta a trattamento con Cd e Cu (Nassiri *et al.*, 1996), nell'epatica *Lunularia cruciata* esposta a Cd (Carginale *et al.*, 2004), nell'angiosperma *Allium sativum* esposta a Cd (Liu & Kottke, 2004), in cellule di tabacco esposte a Cd (Kuthanová *et al.*, 2004) ed in due specie di

licheni trattati con Mn (Hauck *et al.*, 2002); in alcuni degli studi riportati le vescicole citoplasmatiche accumulavano metalli pesanti (Nassiri *et al.*, 1996; Liu & Kottke, 2004). La tolleranza delle piante ai metalli pesanti è spesso dipendente da processi di trasporto che determinano la compartimentazione dei metalli, prevenendo così il loro accumulo all'interno del citoplasma (Brune *et al.*, 1995). Il ritrovamento di metalli pesanti a livello della parete cellulare concorda con l'analogia localizzazione trovata in altre specie di briofite: in *Funaria hygrometrica* trattata con Pb e Zn (Basile *et al.*, 2001), nei 3 muschi acquatici *Fontinalis antipyretica*, *Scapania ondulata* e *Fissidens polyphyllus* trattati con diversi metalli pesanti (Vázquez *et al.*, 1999) e nell'epatica *Lunularia cruciata* trattata con Cd (Carginale *et al.*, 2004). E' noto in letteratura che i metalli pesanti si legano alle cariche negative degli acidi poliuronici nelle pareti cellulari vegetali (Satake *et al.*, 1989; Satake and Miyasaka, 1984; Basile *et al.*, 2001; Carginale *et al.*, 2004). E' da sottolineare che questo legame alla parete cellulare rappresenta un importante meccanismo di tolleranza ai metalli pesanti in quanto ne previene l'ingresso nel protoplasma: il muschio *Funaria hygrometrica* è in grado di vivere e persino di sporificare su siti minerari con forte contaminazione di Pb e Zn proprio per l'elevata capacità delle pareti cellulari di legare i metalli pesanti (Basile *et al.*, 2001). Pertanto il reperimento di metalli pesanti, mediante microanalisi a raggi X, a livello di vescicole cito-

plasmatiche e di parete cellulare di *Leptodictyum riparium* può spiegare in parte la tolleranza di questo muschio ai metalli pesanti testati, che possono essere in questo modo compartimentati ed esclusi da siti cellulari più suscettibili di danno.

Per ciò che riguarda la localizzazione a livello tissutale, la microanalisi a raggi X applicata all'ESEM non ha evidenziato localizzazione preferenziale dei metalli pesanti, i quali erano presenti in tutti e 3 gli "organi" del gametofito: filloidi, fusticino e rizoidi. Questo dato probabilmente è in relazione al fatto che *Leptodictyum riparium*, vivendo completamente sommerso in acqua, assorbe gli elementi chimici da tutta la superficie del gametofito; diverso è il caso dei vegetali che sono a contatto con un substrato inquinato solo con una parte del corpo. Il muschio *Funaria hygrometrica* che cresceva in un sito minerario fortemente contaminato assorbiva i metalli pesanti solo tramite la base del gametofito infissa nel terreno: in questo caso era evidentissima una localizzazione preferenziale dei metalli a livello del gametofito e della zona di transizione tra gametofito e sporofito (placenta), mentre i metalli erano addirittura assenti all'apice dello sporofito (capsula) (Basile *et al.*, 2001).

Il contenuto di proteine solubili di *Leptodictyum riparium* diminuiva in risposta allo stress da metalli pesanti, soprattutto con Cd e Pb a 10^{-4} M; Cu e Zn mostravano cambiamenti minori. La diminuzione del contenuto di pro-

teine solubili è indice di effetto tossico generalizzato: questo spiega perché questo parametro diminuisce molto in presenza dei metalli estranei al metabolismo cellulare (Cd e Pb) ed alla concentrazione più alta, mentre i due microelementi hanno effetti minori.

L'incremento da noi riscontrato delle HSP in *Leptodictyum riparium* trattato con metalli pesanti è in accordo con numerosi dati bibliografici: è stato dimostrato che una delle più importanti alterazioni metaboliche in piante che crescevano su suoli contaminati da metalli pesanti è l'induzione di mRNA per le HSP e la sintesi di queste proteine (Czarnecka *et al.*, 1984; Neumann *et al.*, 1989). Inoltre sono state descritte sia tolleranza ai metalli indotta da stress da calore in colture cellulari di *Lycopersicon peruvianum* (Neumann *et al.*, 1994) che induzione dose-dipendente della sintesi di HSP 70 in *Raphidocelis subcapitata* in seguito ad esposizione a differenti classi di inquinanti ambientali (Bierkens *et al.*, 1998). Un ruolo cruciale di questi fenomeni è giocato dall'HSP 70, coinvolta nel recupero ed il ripiegamento, spesso insieme alle HSP 100 ed ad altri chaperoni molecolari, di proteine mal ripiegate o denaturate (Boston *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2002). Alcune delle HSP, specialmente i membri delle famiglie dell'HSP 60 e dell'HSP 70, giocano un ruolo prioritario nel ripiegamento e l'assemblaggio delle proteine; inoltre si è recentemente discusso

sull'interazione dell'HSP 70 sia con i regolatori dell'apoptosi che con i recettori degli ormoni (Nollen and Morimoto, 2002).

I Western blot dei polipeptidi che danno reazione crociata con le HSP 70 in *Leptodictyum riparium* mostravano differenti proteine con pesi molecolari leggermente differenti, di 70 e 72 kDa rispettivamente. La comparsa ed il comportamento di queste due diverse forme di HSP 70 erano differenti in relazione al metallo, alla sua concentrazione ed alla lunghezza dell'esposizione. Il Cd esibiva un effetto dose-dipendente, che appariva efficace fino a 10^{-4} M e 6 giorni di esposizione, quando probabilmente il danno generalizzato induceva notevole diminuzione delle HSP in accordo con la diminuzione delle proteine solubili ed il severo danno alle strutture cellulari. Il Pb mostrava un modello di comportamento più complesso: le 2 differenti forme di HSP 70 cambiavano le loro quantità relative e gli effetti non erano dose-dipendenti; da notare che il Pb causava una forte diminuzione del contenuto di proteine solubili, nonostante i piccoli cambiamenti dell'ultrastruttura cellulare. Cu e Zn causavano incremento del contenuto di HSP, senza indurre cambiamenti apprezzabili dell'ultrastruttura cellulare: ciò suggerisce che in presenza di un eccesso di questi metalli fisiologicamente importanti il ruolo delle HSP è di preservare le proteine e la corrette strutture cellulari, piuttosto che fungere da chaperoni per polipeptidi neosintetizzati. A dare supporto a questa

ipotesi sta il fatto che in presenza di Cu e Zn i livelli di proteine solubili diminuivano meno che con Pb e Cd, ma comunque in modo manifesto, suggerendo una diminuzione di sintesi proteica. A questo punto è essenziale, in condizioni di stress, mantenere le proteine nella loro conformazione funzionale e possibilmente recuperare le proteine con danni conformazionali per recuperare le loro funzioni: tutto ciò porta a ridurre gli effetti dello stress e possibilmente ad indurre tolleranza. In questo senso la tolleranza ai metalli può essere messa in relazione all'incremento di HSP 70. La presenza limitata di importanti alterazioni ultrastrutturali in *Leptodictyum riparium* trattato con i metalli testati anche ad elevate concentrazioni e per tempi lunghi è notevole. Questo risultato è in accordo con la diminuzione non drammatica del contenuto di proteine solubili e di HSP, a parte il caso del Cd ad elevate concentrazioni.

Ulteriori studi sono necessari per chiarire meglio la base fisiologica e possibilmente molecolare di questa bassa sensibilità ai metalli pesanti, che coinvolge, almeno in parte, l'induzione di HSP.

Gli studi di spettrometria ad assorbimento atomico sul contenuto di metalli in *Leptodictyum riparium* dimostrano che questo muschio è in grado di concentrare i metalli pesanti testati. I coefficienti di bioaccumulo sono particolarmente elevati per il Cu e lo Zn, mentre hanno valori inferiori per Pb e Cd. Per quanto riguarda il bioaccumulo ricordiamo che specie bioac-

cumulatrici sono organismi in grado di tollerare, assorbire ed accumulare gli inquinanti nei loro tessuti, raggiungendo concentrazioni molte volte maggiori di quelle misurabili nell'ambiente (Bargagli, 1998c). Pertanto si può concludere che *Leptodictyum riparium* cresciuto *in vitro* in presenza di metalli pesanti è un ottimo bioaccumulatore, soprattutto nei confronti di Cu e Zn. I coefficienti di bioaccumulo più elevati per Cu e Zn si possono spiegare con il loro ruolo di microelementi, per cui essi sono assorbiti fisiologicamente e non sono trattati come estranei dal metabolismo cellulare. Finora la maggior parte degli studi di bioaccumulo sono stati svolti in campo, mediante esposizioni più o meno controllate di organismi, autoctoni o alloctoni, ad ambienti inquinati (Bargagli, 1998b; Nimis, 1999; Nimis *et al.*, 2000; Carreras *et al.*, 2002; Adamo *et al.*, 2003; Giordano *et al.*, 2005). Sono pochi gli studi di bioaccumulo eseguiti mediante coltura in condizioni strettamente controllate (Vàzquez *et al.*, 1999; Bennicelli *et al.*, 2004; Carginale *et al.*, 2004); eppure gli studi sul bioaccumulo *in vitro* sono necessari per conoscere la relazione tra le concentrazioni interne degli inquinanti nella pianta e le concentrazioni esterne ambientali e quindi per risalire dalla concentrazione interna alla pianta ad un valore stimato di concentrazione ambientale.

L'elevata capacità di bioaccumulo di *Leptodictyum riparium* lo rende potenzialmente adatto a studi di biomonitoraggio ambientale e di fitorisana-

mento di siti inquinati. Poiché gli elementi chimici sono "immutabili" e non possono essere resi completamente atossici, l'obiettivo finale della maggior parte delle strategie di fitorisanamento è l'iperaccumulo degli elementi all'interno di organismi o parti di essi. Iperaccumulo è generalmente definito come la concentrazione di un metallo maggiore di 0,1 - 1% del peso secco della pianta (Baker, 1999); a queste concentrazioni il recupero dei metalli dai tessuti vegetali è potenzialmente economico (Baker, 1999). I valori di bioaccumulo mostrati da *Leptodictyum riparium*, già dopo 7 giorni di coltura, rientrano (o sono vicinissimi) nella definizione di iperaccumulo, anche nel caso delle concentrazioni più basse testate; pertanto questa specie di muschio acquatico è potenzialmente idonea per progetti di ricerca sul fitorisanamento di acque contaminate da metalli pesanti.

REFERENCES

Adamo P., Giordano S., Vingiani S., Castaldo Cobianchi R., Violante P. (2003) Trace element accumulation by moss and lichen exposed in bags in the city of Naples (Italy). *Environmental Pollution* 122: 91-103.

Baker A.J. (1999) Metal hyperaccumulator plants: a review of the biological resource for possible exploitation in the phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry N., Bañuelos G.S. (editors) *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, pp. 85-107.

Bargagli R. (1998a) Chemical elements and plant life. In: *Trace Element in Terrestrial Plants: an Ecophysiological approach to Biomonitoring and Biorecovery*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-21.

Bargagli R. (1998b) Mosses as passive and active biomonitors of trace elements. In: *Trace Element in Terrestrial Plants: an Ecophysiological approach to Biomonitoring and Biorecovery*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 207-236.

Bargagli R. (1998c) Plants as biomonitors of atmospheric pollutants. In: Trace Element in Terrestrial Plants: an Ecophysiological approach to Bio-monitoring and Biorecovery. Springer-Verlag, Berlin, pp. 79-103.

Basile A., Cafiero G., Spagnuolo V., Castaldo Cobiañchi R. (1994) Tissue and cell localization of experimentally supplied lead in *Funaria hygrometrica* (Hedw), using X-ray SEM and TEM microanalysis. Journal of Bryology 18: 69-81.

Basile A., Cogoni A.E., Bassi P., Fabrizi E., Sorbo S., Giordano S., Castaldo Cobiañchi R. (2001) Accumulation of Pb and Zn in gametophytes and sporophytes of the moss *Funaria hygrometrica* (Funariales). Annals of Botany 87: 537-543.

Basile A., di Nuzzo R.A., Capasso C., Sorbo S., Capasso A., Carginale V. (2005) Effect of cadmium on gene expression in the liverwort *Lunularia cruciata*. Gene 356: 153-159.

Basile A., Spagnuolo V., Alfano F., Castaldo Cobiañchi R. (1995) Effect of lead and colchicine on morphogenesis in protonemata of the moss *Funaria hygrometrica*. Annals of Botany (London) 76: 597-606.

- Bennicelli R., Stezpniewska Z., Banach A., Szajnocha K., Ostrowski J. (2004) The ability of *Azolla caroliniana* to remove heavy metals (Hg(II), Cr(III), Cr(VI)) from municipal waste water. *Chemosphere* 55: 141-146.
- Bierkens J., Maes J., Vander Plaetse F. (1998) Dose-dependent induction of heat shock protein 70 synthesis in *Raphidocelis subcapitata* following exposure to different classes of environmental pollutants. *Environmental Pollution* 101: 91-97.
- Boston R.S., Viitanen P.V., Vierling E. (1996) Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology* 32: 191-222.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brown DH. (1984) Uptake of mineral elements and their use in pollution monitoring. In: Dyer A.F., Duckett J.G. (editors) *The experimental biology of bryophytes*. Academic Press, New York, pp. 229-255.

Brune A., Urbach W., Dietz K.J. (1995) Differential toxicity of heavy metals is partly related to a loss of preferential extraplasmic compartmentation: a comparison of Cd, Mo, Ni, and Zn-stress. *New Phytologist* 129: 403-409.

Carginale V., Sorbo S., Capasso C., Trinchella F., Cafiero G., Basile A. (2004) Accumulation, localisation, and toxic effects of cadmium in the liverwort *Lunularia cruciata*. *Protoplasma* 223: 53-61.

Carreras H.A., Pignata M.L. (2002) Biomonitoring of heavy metals and air quality in Cordoba City, Argentina, using transplanted lichens. *Environmental Pollution* 117: 77-87.

Czarnecka E., Edelman L., Schoffl F., Key J.L. (1984) Comparative analysis of physical stress responses in soybean seedlings using cloned heat shock cDNAs. *Plant Molecular Biology* 3: 45-58.

Dalla Vecchia F., La Rocca N., Moro I., De Faveri S., Andreoli C., Rascio N. (2005) Morphogenetic, ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea canadensis* exposed to cadmium. *Plant Science* 168: 329-338.

Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R. (2001) Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany* 52, 1101-1109.

Dykstra M.J. (1992) *Biological Electron Microscopy*. Plenum Press, New York, N.Y.

Esposito S., Guerriero G., Vona V., Di Martino Rigano V., Carfagna S., Rigano C. (2005) Glutamate synthase activities and protein changes in relation to nitrogen nutrition in barley: the dependence on different plastidic glucose-6P dehydrogenase isoforms. *Journal of Experimental Botany* 56: 55-64.

Gallego, S.M., Benavides, M.P., Tomaro, M.L. (1996) Effect of heavy metal ion on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science* 121, 151-159.

Ghosh S., Mahoney S.R., Penterman J.N., Peirson D., Dumbroff E.B. (2001) Ultrastructural and biochemical changes in chloroplasts during *Brassica napus* senescence. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 777-784.

Giordano S., Adamo P., Sorbo S., Vingiani S. (2005) Atmospheric trace metal pollution in the Naples urban area based on results from moss and lichen bags. *Environmental Pollution* 136: 431-442.

Giordano S. , Sorbo S., Adamo P., Basile A., Spagnolo V., Castaldo Cobianchi R. (2004) Biodiversity and trace element content of epiphytic bryophytes in urban and extraurban sites of southern Italy. *Plant Ecology* 170: 1-14.

Hauck, M., Mulack, C., Paul, A. (2002) Manganese uptake in the epiphytic lichens *Hypogymnia physodes* and *Lecanora conizaeoides*. *Environmental and Experimental Botany* 48, 107-117.

Jain C.K., Sharma M.K. (2001) Distribution of trace metals in the Hindon River system, India. *Journal of Hydrology* 253: 81-90.

Kiang J.G. and Tsokos G.C. (1998) Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. *Pharmacology and Therapeutics* 80: 183-201.

Krupa J. (1964) Studies on the physiology of germination of spores of *Fu-*
naria hygrometrica (Sibith.). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 33:
173-192.

Kuthanová A., Gemperlová L., Zelenková S., Eder J., Machácková I., Opa-
trný Z., Cvikrová M. (2004) Cytological changes and alterations in poly-
amine contents induced by cadmium in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiology*
and *Biochemistry* 42: 149-156.

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly
of the head of bacteriophag T4. *Nature* 227: 680-685.

Lewis S., Handy R.D., Cordi B., Billinchurst Z., Depledge M.H. (1999)
Stress proteins (HSPs): methods of detection and their use as an envi-
ronmental biomarker. *Ecotoxicology* 8: 361-368.

Liu D., Kottke I. (2004) Subcellular localization of copper in the root cells
of *Allium sativum* by electron energy loss spectroscopy (EELS). *Biore-*
source Technology 94, 153-158.

Mansour S.A., Sidky M.M. (2002) Ecotoxicological Studies. 3. Heavy metals contaminating water and fish from Fayoum Governorate, Egypt. *Food Chemistry* 78: 15-22.

Meagher R.B. (2000) Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 153-162.

Nassiri Y., Ginsburger-Vogel T., Mansot J.L., Wéry J. (1996) Effects of heavy metals on *Tetraselmis suecica*: ultrastructural and energy-dispersive X-ray spectroscopy studies. *Biology of the Cell* 86: 151-160.

Neumann D., Lichtenberger O., Gunter D., Tschiersch K., Nover L. (1994) Heat-shock proteins induce heavy metals tolerance in higher plants. *Planta* 194: 360-367.

Neumann D., Nover L., Parthier B., Rieger R., Scharf K.D., Niden U. (1989) Heat shock and other stress response systems in plants. *Biolog Zentralb*: 108: 1-146.

Nimis P.L. (1999) Il biomonitoraggio della qualità dell'aria in Italia. *Workshop Proceedings: Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale*. Roma, 26-27 Novembre 1998. ANPA Serie Atti. 2: 173-189.

Nimis P.L., Lazzarin G., Lazzarin A., Skert N. (2000) Biomonitoring of trace elements with lichens in Veneto (NE Italy). *The Science of the Total Environment* 255: 97-111.

Nollen E.A.A., Morimoto R.I. (2002) Chaperoning signalling pathways: molecular chaperones as stress-sensing "heat shock" proteins. *Cell Science* 115: 2809-2816.

Ouzounidou, G., Moustakas, M., Eleftheriou, P. (1997) Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 32: 154-160.

Sanità di Toppi L. and Gabbrielli R. (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41: 105-130.

Satake K, Miyasaka K. (1984) Evidence of high mercury accumulation in the cell wall of the liverwort *Jungermannia vulcanicola* Steph. to form particles of a mercury-sulphur compound. *Journal of Bryology* 13: 101-105.

Satake K., Takamatsu T., Soma M., Shibata K., Nishikawa M., Say P.J., Whitton B.A. (1989) Pb accumulation and location in the shoots of the aquatic liverwort *Scapania undulata* (L.) Dum. in stream water at Green-side Mine, England. *Aquatic Botany* 33: 111-122.

Schwartzman R.A., Cidlowski J.A. (1993) Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews* 14: 133-151.

Shah, K., Kumar, R.G., Verma, S., Dubey, R.S. (2001) Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science* 161, 1135-1144.

Shaw A.J. (1987) Effect of environmental pretreatment on tolerance to copper and Zn in the moss *Funaria hygrometrica*. *American Journal of Botany* 74: 1466-1475.

Shaw A.J. (1990) Metal tolerance and cotolerance in the moss *Funaria hygrometrica*. *Canadian Journal of Botany* 68: 2275-2282.

Shaw J., Beer S.C. and Lutz J. (1989) Potential for the evolution of heavy metal tolerance in *Bryum argenteum*, a moss. I. Variation within and among populations. *The Bryologist* 92: 73-80.

Sun W., Van Montagu M., Verbruggen N. (2002) Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1577: 1-9.

Tarhanen S. (1998) Ultrastructural responses of the lichen *Bryonia fuscescens* to simulated acid rain and heavy metal deposition. *Annals of Botany* 82: 735-746.

Tyler G. (1990) Bryophytes and heavy metals: a literature review. *Botanical Journal of Linnean Society* 104: 231-253.

Vázquez, M.D., Lòpez, J., Carballeira, A. (1999) Uptake of heavy metals to the extracellular and intracellular compartments in three species of aquatic bryophytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44: 12-24.

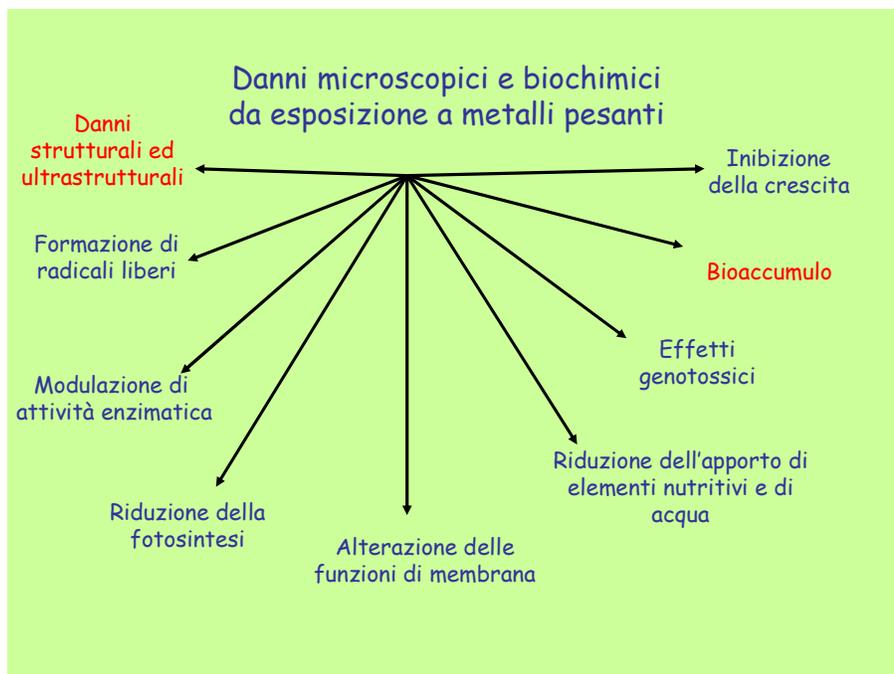


Figura 1. La figura presenta le risposte di danno, su base microscopica e biochimica, che gli organismi vegetali possono manifestare in presenza di metalli pesanti. In rosso sono evidenziate le risposte di danno prese in esame in questo studio.

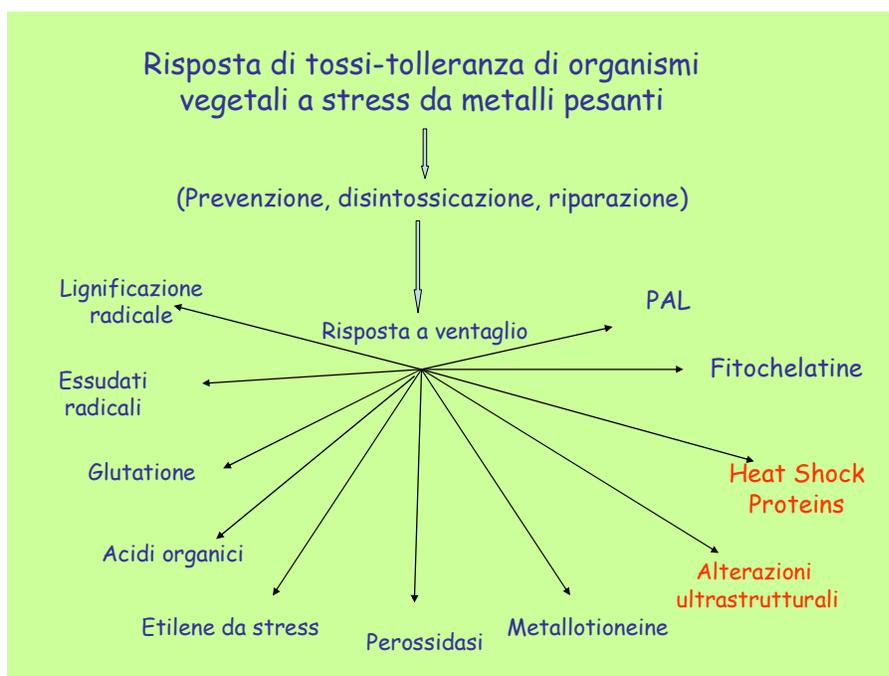


Figura 2. La figura presenta molecole e risposte cellulari coinvolte nelle risposte di tossi-tolleranza che gli organismi vegetali possono manifestare in presenza di metalli pesanti.

In rosso sono evidenziate le molecole e le risposte cellulari prese in esame in questo studio.

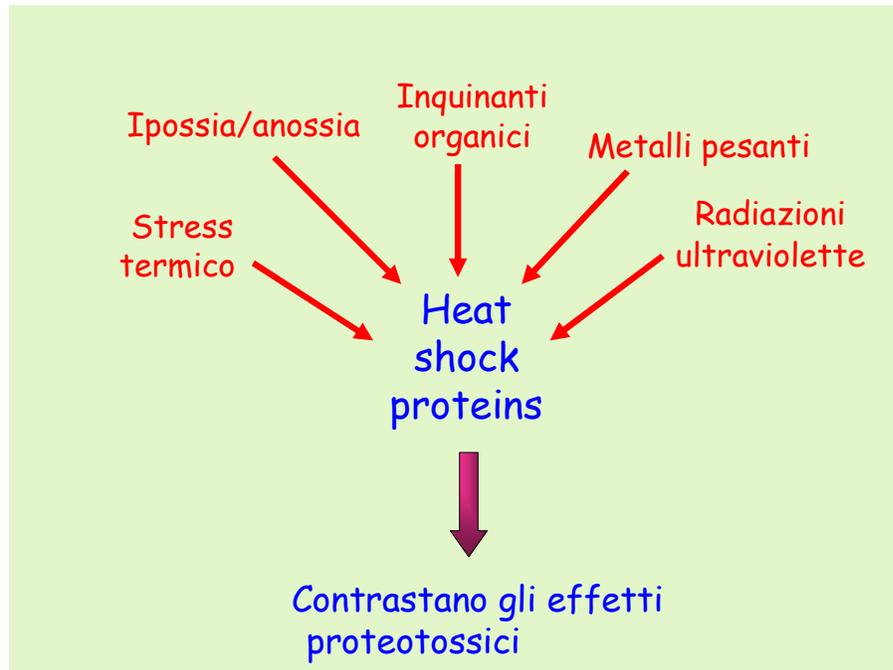


Figura 3. La figura mostra come diversi agenti di stress possono indurre, negli organismi vegetali, overespressione o sintesi *de novo* di Heat Shock Protein, che, contrastando gli effetti proteotossici degli agenti di stress, conferiscono tossi-tolleranza.

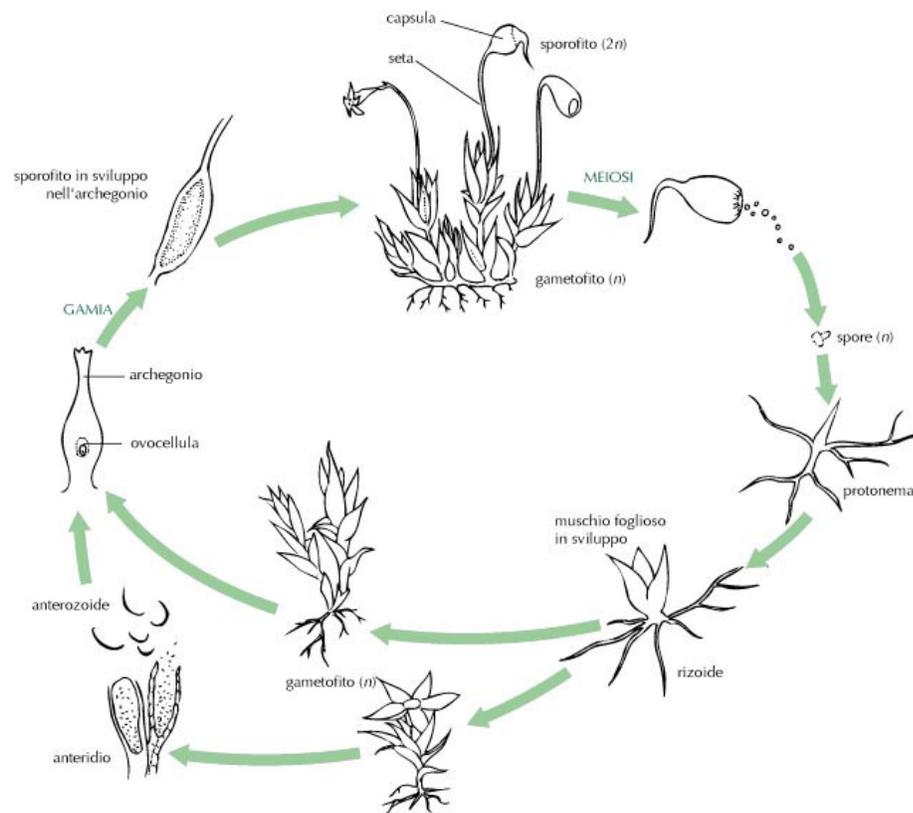


Figura 4. Nel ciclo vitale di una muschio la spora aploide, germinando, dà origine ad uno stadio giovanile, pluricellulare, di colore verde (protonema), che può essere filamentoso o laminare a seconda della specie. Successivamente dal protonema si sviluppano delle gemme, che danno origine alla stadio aploide maturo (gametofito), che nei muschi ha sempre un aspetto cormoide: il gametofito consta di una porzione assile, il fusticino, che si attacca al substrato mediante rizoidi unicellulari o pluricellulari, e di numerosi foglioline (o filloidi) sessili, attaccate al fusticino. Il gametofito produce gametangi maschili (anteridii) che generano a loro volta gameti maschili flagellati (anterozoidi), i quali, in presenza di acqua, possono raggiungere e fecondare il gamete femminile, l'oosfera, nel gametangio femminile (archegonio). Dalla fecondazione, passando attraverso una fase embrionale, origina lo sporofito, che consta di una parte assile (seta), infissa nel gametofito tramite

una struttura austoriale (piede), e di una capsula, all'estremità apicale della seta. All'interno della capsula il tessuto sporigeno va incontro a meiosi ed origina spore aploidi: una volta liberate all'esterno allorché la capsula è matura, le spore vengono disperse nell'ambiente dalle correnti d'aria e germinando ripetono il ciclo.

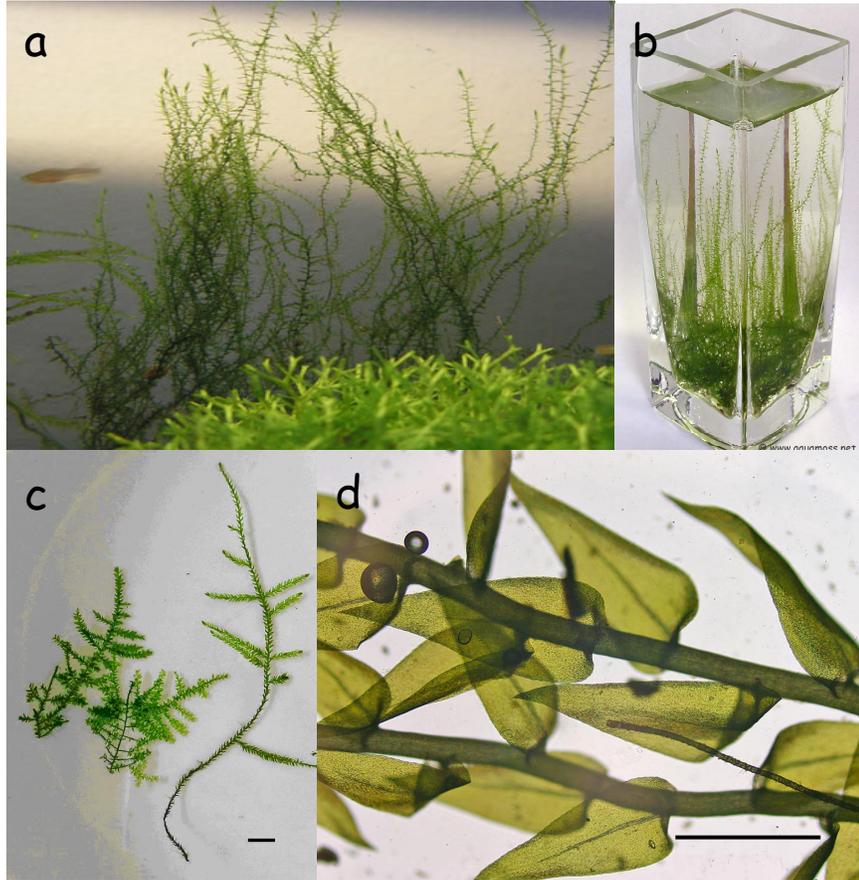


Figura 5. *Leptodictyum riparium* (Hedw) Warnst., Amblistegiaceae (Musci, Bryophyta).
Le foto a e b mostrano la pianta coltivata in acquario (a) ed in vaso (b); la foto c mostra
l'aspetto complessivo del gametofito del muschio; la foto d illustra l'aspetto dei filloidi e
del fusticino.
scale bar: 3 mm (c); 1 mm (d).

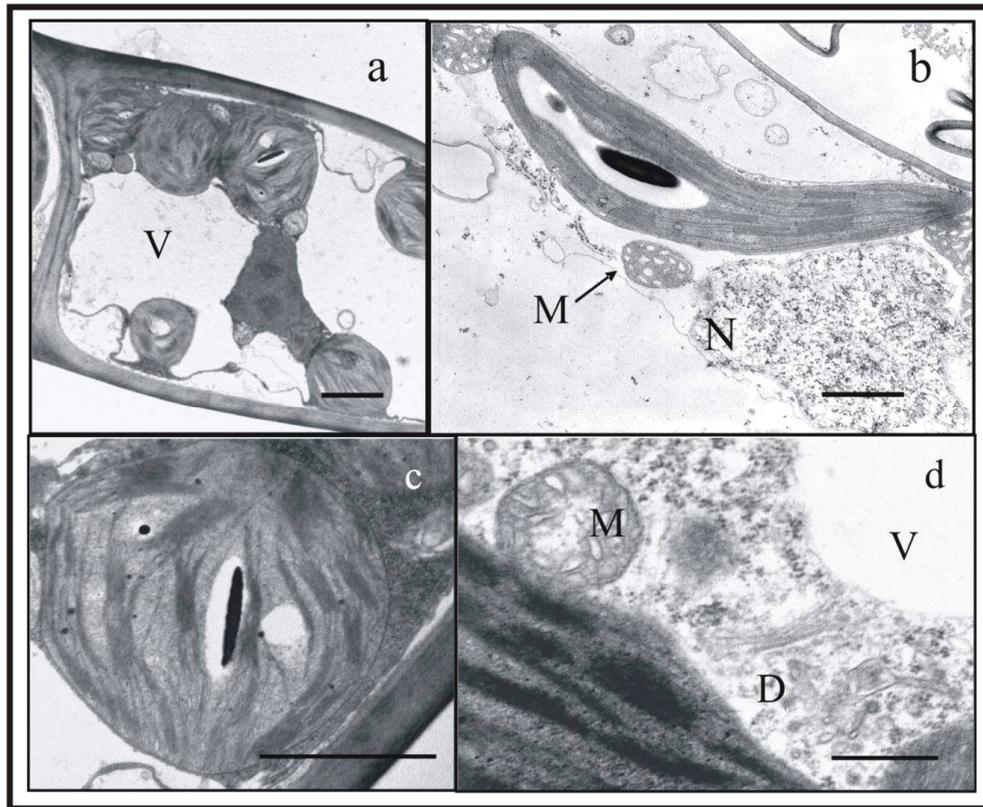


Figura 6. Micrografie in TEM di campioni di controllo di *L. riparium* dopo 2 settimane di coltura. **a**, Sezione che mostra l'ultrastruttura cellulare e la sezione trasversa di cloroplasti; **b**, sezione mostrante nucleo (N), mitocondrio (M) ed un una sezione longitudinale di cloroplasto; **c**, ingrandimento di una sezione trasversa di cloroplasto; **d**, sezione mostrante un mitocondrio (M) ed un dittiosoma. (D).

CW, parete cellulare; D, dittiosoma; M, mitocondrio; N, nucleo; V, vacuolo.

Scale bar: 1 μ M.

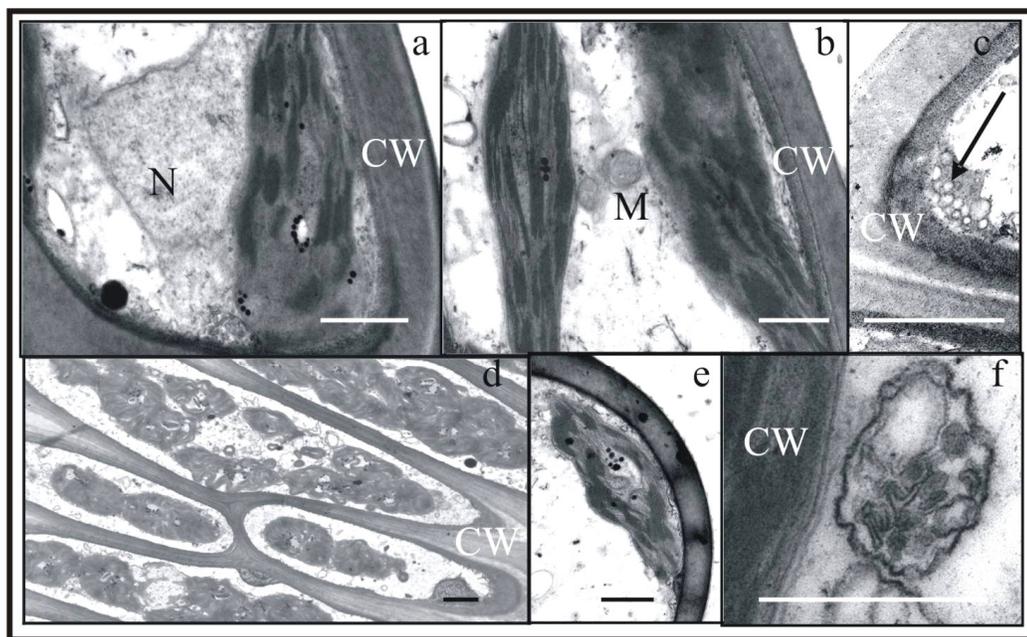


Figura 7. Micrografie al TEM di campioni di *L. riparium* trattati con Pb (a-c) e Cd (d-f) a 10^{-4} M per 2 settimane. a, nucleo e cloroplasto; b, sezione longitudinale di 2 cloroplasti; c, microvesicole presenti vicino alla parete cellulare; d, cloroplasti slargati o con rigonfiamenti irregolari; e, sezione di cloroplasto mostrante l'organizzazione anomala del sistema di membrane interne; f, corpo multivesicolare con depositi elettrondensi.

CW, parete cellulare; D, ditiiosomi; M, mitocondri; N, nucleo; V, vacuolo.

Scale bars: 1 μ M

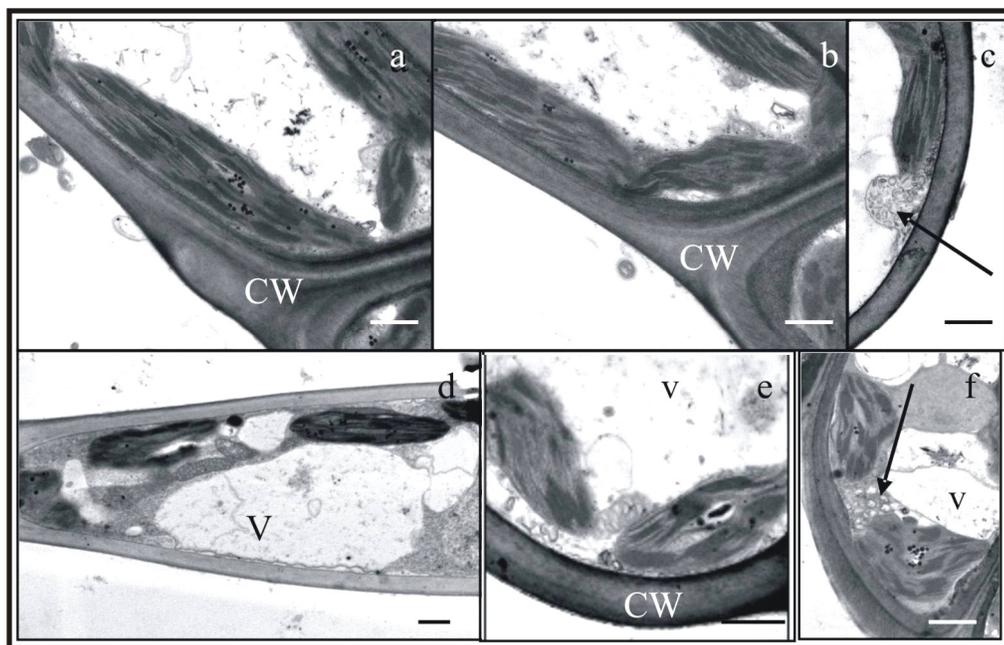


Fig. 8. Micrografie al TEM di campioni di *L. riparium* trattati con Zn (a-c) e Cu (d-f) a 10^{-4} M per 2 settimane. a, cloroplasto con numerose goccioline lipidiche; b, cloroplasto di forma irregolare, con numerose goccioline lipidiche; c, vescicole sotto la parete cellulare (vedi freccia); d-e, cellule trattate con Cu, mostranti cloroplasti, mitocondrio e vacuolo; f, vescicole citoplasmatiche (vedi freccia).

CW, parete cellulare; D, dittiosomi; M, mitocondri; N, nucleo; V, vacuolo.

Scale bar: 1 μ M

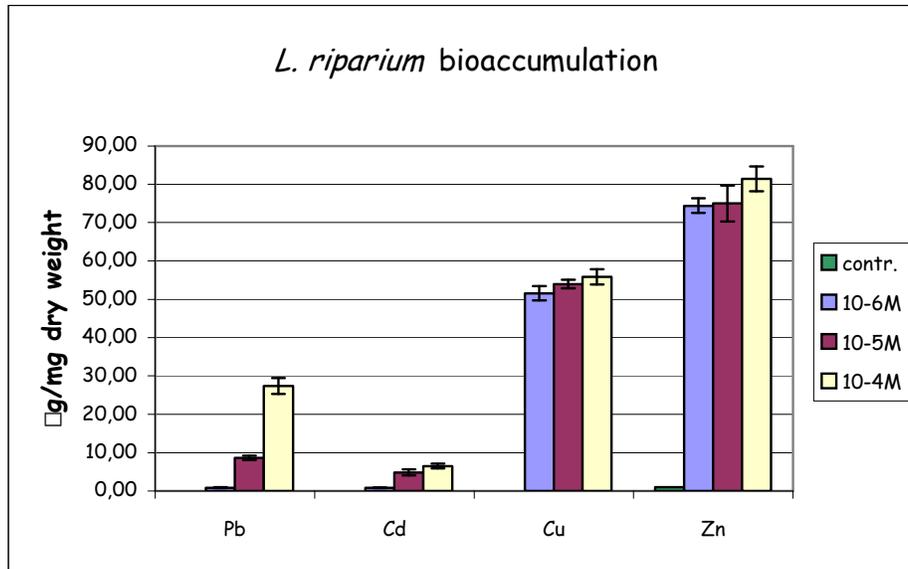


Fig. 9. Concentrazioni di Pb, Cd, Cu e Zn (esprese come µg/mg peso secco) in *L. riparium* a 10⁻⁶M, 10⁻⁵M e 10⁻⁴M dopo 7 giorni di coltura. I valori sono riportati come medie ± DS.

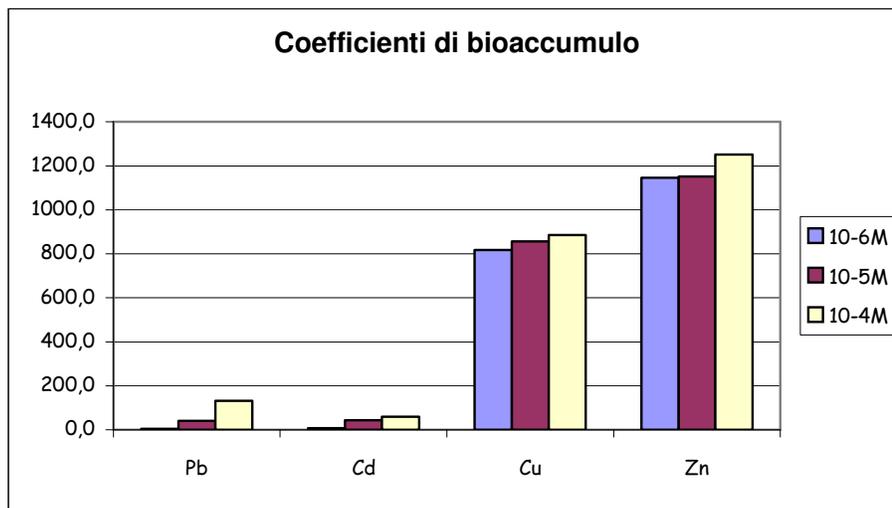


Fig. 10. Coefficienti di bioaccumulo di *L. riparium* dopo 7 giorni di coltura.

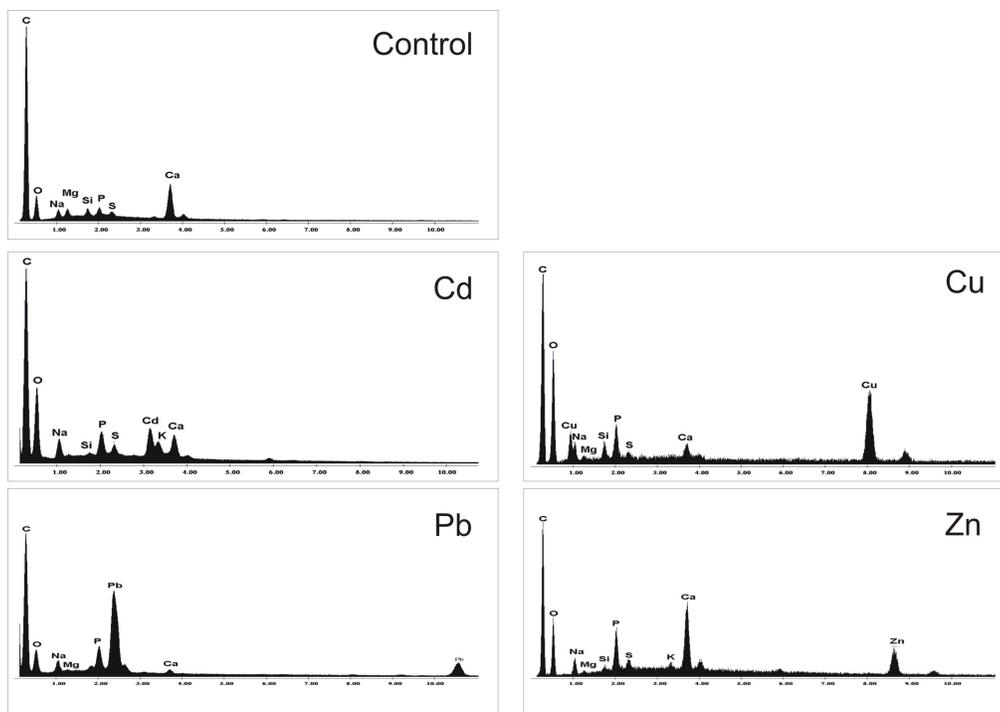


Fig. 11. Spettri di microanalisi a raggi X applicata al TEM, acquisiti su pareti cellulari in *L. riparium* dopo trattamento con metalli pesanti per 15 giorni.

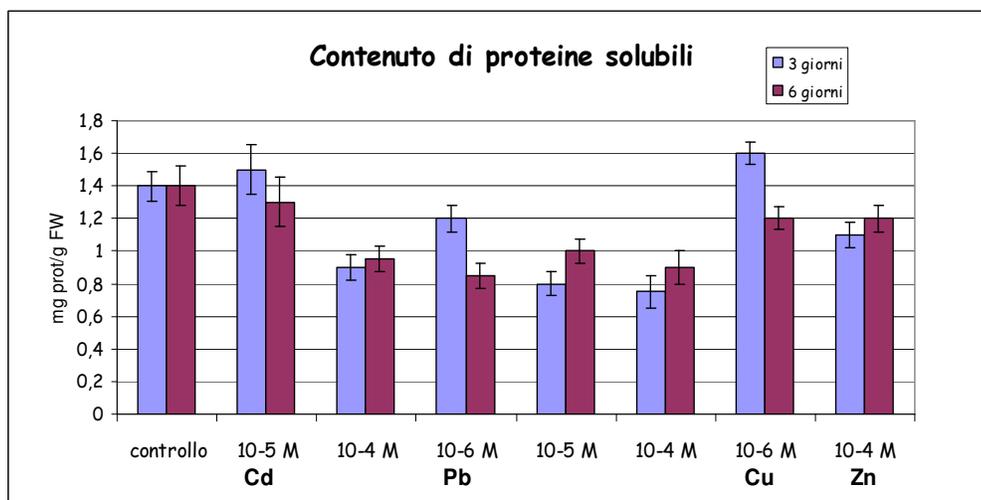


Figura 12. Contenuto di proteine solubili in *L. riparium* stressato con Cd, Pb, Cu e Zn a 3 e 6 giorni di coltura. I valori sono riportati come medie \pm DS.

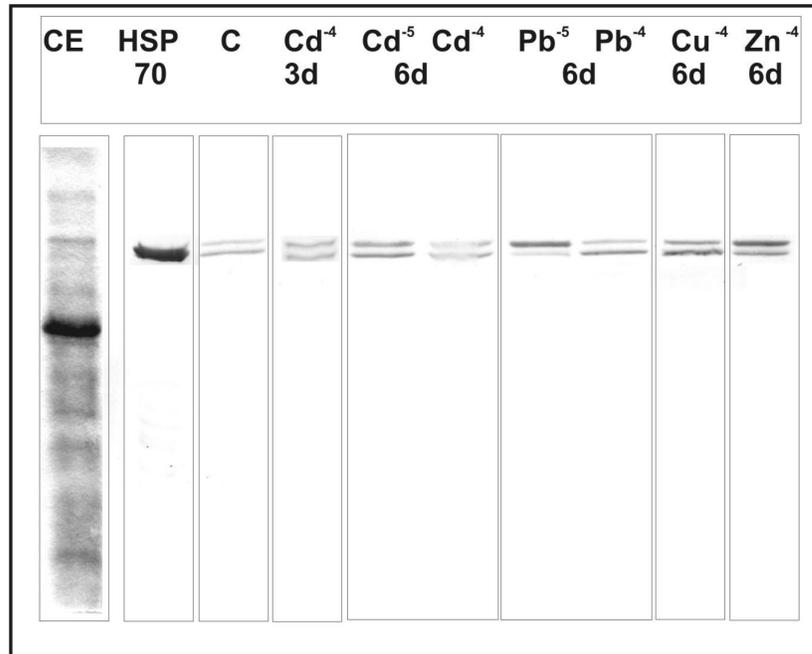


Figura 13. SDS-PAGE and Western blots di estratti grezzi di campioni di *L. riparium* esposti per 3 e 6 giorni a differenti concentrazioni di Cd, Pb, Cu e Zn.

Lane CE, estratto grezzo colorato con coomasie; lane HSP 70, controllo con HSP 70 bovina (Sigma); lane C, estratto grezzo di *L. riparium* controllo (non stressato); lane Cd⁴ 3d, estratto da *L. riparium* stressato con Cd 10⁻⁴M per 3 giorni; lane Cd⁵ 6d, estratto da *L. riparium* stressato con Cd 10⁻⁵M per 6 giorni; lane Cd⁴ 6d, estratto da *L. riparium* stressato con Cd 10⁻⁴M per 6 giorni; lane Pb⁵ 6d, estratto da *L. riparium* stressato con Pb 10⁻⁵M per 6 giorni; lane Pb⁴ 6 d, estratto da *L. riparium* stressato con Pb 10⁻⁵M per 6 giorni; lane Cu⁴ 6d, estratto da *L. riparium* stressato con Cu 10⁻⁴M per 6 giorni; lane Zn⁴ 6d, estratto da *L. riparium* stressato con Zn 10⁻⁴M per 6 giorni.

	$10^{-6}M$	$10^{-5}M$	$10^{-4}M$
Pb	4,0	41	132
Cd	7,0	43	58
Cu	818,0	857	886
Zn	1145,0	1153	1252

Tabella 1. Coefficienti di bioaccumulo di *L. riparium* dopo 7 giorni di coltura in presenza di metalli pesanti.

INDICE

ABSTRACT	p. 2
INTRODUZIONE	
<i>Metalli pesanti</i>	p. 5
<i>Effetti dei metalli pesanti sugli organismi vegetali</i>	p. 6
<i>Heat Shock Protein</i>	p. 7
<i>Briofite</i>	p. 8
<i>Bioindicazione, bioaccumulo e fitorisanamento</i>	p. 10
SCOPO DEL LAVORO	p. 13
MATERIALI E METODI	
<i>Materiale vegetale</i>	p. 14
<i>Colture in vitro</i>	p. 14
<i>Microscopia elettronica a trasmissione (TEM) convenzionale</i>	p. 16
<i>Microanalisi a raggi X all'ESEM</i>	p. 17
<i>Microanalisi a raggi X al TEM</i>	p. 18
<i>Spettrometria ad assorbimento atomico</i>	p. 18
<i>Preparazione degli estratti (per elettroforesi, Western blotting e determinazione delle proteine)</i>	p. 19
<i>Elettroforesi e Western blotting</i>	p. 20
<i>Determinazione delle proteine solubili</i>	p. 22
<i>Analisi statistica</i>	p. 22

RISULTATI	p. 23
<i>Osservazioni ultrastrutturali</i>	p. 23
<i>Bioaccumulo</i>	p. 25
<i>Localizzazione dei metalli</i>	p. 26
<i>Contenuto di proteine solubili</i>	p. 27
<i>Heat Shock Protein</i>	p. 28
DISCUSSIONI	p. 29
REFERENCES.....	p. 40
Figure	p. 51
Tabella	p. 62