

Studio dei meccanismi di risposta su base microscopica e biochimica allo stress da metalli pesanti su macrofite acquatiche campionate *in vivo* nel Fiume Irno (SA)

Marilena Insolubile^{1*}, Marco Lentini¹, Adriana Basile¹, Cristiano Gramegna⁴, Marco Guida¹, Giulia Maisto¹, Sergio Sorbo², Marco Trifuoggi³, Sergio Esposito¹

¹ Dip. Biologia – Univ. Napoli “Federico II” - Complesso Universitario di Monte Sant’Angelo - Via Cinthia - 80126 Napoli.

² CESMA, Centro dei Servizi Metrologici Avanzata, Sezione di microscopia - Università di Napoli “Federico II” - Complesso Universitario di Monte Sant’Angelo - Via Cinthia - 80126 Napoli.

³ Dip. Chimica - Univ. Napoli “Federico II” - Complesso Universitario di Monte Sant’Angelo - Via Cinthia - 80126 Napoli.

⁴ Direzione Tecnica – ARPAC - Via Vicinale Santa Maria del Pianto, Centro Polif., TORRE 1 - 80143 Napoli.

* Referente per la corrispondenza: marilena.insolubile@libero.it

Pervenuto il 10.3.2017; accettato il 10.5.2017

Riassunto

L'inquinamento da metalli pesanti rappresenta una delle più importanti alterazioni degli ambienti naturali. Lungo l'asta fluviale dell'Irno, corpo idrico che si sviluppa in provincia di Salerno, sono sversati scarichi idrici di processo di industrie che operano sul territorio e, in funzione di tale impatto antropico, sono stati individuati siti di campionamento al fine di verificare il livello di contaminazione ambientale e i possibili danni a macrofite acquatiche quali la *Veronica beccabunga* e l'*Apium nodiflorum*.

Sono state condotte analisi sulle acque superficiali e sui sedimenti fluviali a monte e a valle di fonderie che operano sul territorio; un ulteriore sito di controllo è stato selezionato in un punto di risorgiva fluviale. In particolare, i risultati denotano un accumulo di Pb nei sedimenti a valle delle fonderie. Sono state misurate quindi le concentrazioni di Pb, Cu, Cd nelle radici e nelle foglie delle piante campionate. Un aumento dei livelli di Heat Shock Proteins 70 (HSP70) testimonia un evidente stress delle macrofite acquatiche presenti a valle delle fonderie, confermato dai danni ultrastrutturali osservati in campioni di foglie mediante la microscopia elettronica a trasmissione (TEM). I livelli di inquinamento sono tali da indurre una serie di modificazioni ultrastrutturali e funzionali principalmente nei cloroplasti, ma anche nei mitocondri e nei sistemi di endomembrane. Gli effetti dell'impatto antropico dovuto all'immissione di metalli pesanti nell'ecosistema fluviale sono discussi alla luce dei risultati ottenuti.

PAROLE CHIAVE: *Veronica beccabunga* / *Apium nodiflorum* / Fonderie / Piombo

Study of microscopic and biochemical response mechanisms to heavy metal stress on aquatic macrophytes sampled *in vivo* in Irno River

Heavy metals pollution represents one of the most important alterations of natural environments. Along the River Irno, in the Salerno Area, Southern Italy, wastes for industries there present are responsible of an anthropic impact. Different sites had been individuated in order to determine the level of polluting contamination, and the possible damage to aquatic plants living on the river shores, such as *Veronica beccabunga* and *Apium nodiflorum*.

Analyses on flushing waters and river sediments were made, before and after the industrial waste systems; a further site was located at the river springs. Interestingly, the data indicate an accumulation of lead (Pb) in the sediments downstream the foundries. Levels of Lead (Pb), Copper (Cu) and Cadmium (Cd) have been determined in roots and leaves of water plants. An increase in the levels of Heat Shock Proteins 70 (HSP70s) testimonies a clear stress conditions of the plants downstream the foundries, and this is confirmed by ultrastructural damages observed in leaf samples observed by transmission electron microscopy (TEM). Pollution levels are enough to induce severe ultrastructural and functional modifications, mainly in chloroplasts; further damages were observed in mitochondria and endomembrane systems. The effects of anthropic impact – due to heavy metals pollution – in this river ecosystem are discussed under the light of the results shown.

KEY WORDS: *Veronica beccabunga* / *Apium nodiflorum* / Foundries / Lead

INTRODUZIONE

Il Fiume Irno nasce alle pendici del Monte Stella e percorre 11 km prima di sfociare nel Golfo di Salerno, dopo aver attraversato i territori di Baronissi, Pellezzano e Salerno, con andamento nord-sud. Esso si sviluppa in zone a media densità abitativa, nelle quali ancora oggi è in corso un'urbanizzazione del territorio; diverse realtà imprenditoriali, già dal 1800 come gli stabilimenti delle storiche Manifatture Cotoniere Meridionali, insistono sul bacino dell'Irno.

Lungo l'asta fluviale, in un ambiente ripariale fortemente antropizzato, sono immessi scarichi civili, costituiti da acque di prima pioggia e scarichi fognari, ai quali si aggiungono scarichi industriali.

Operano in tale territorio le "Fonderie Pisano", collocate a Nord del Comune di Salerno, in località Fratte, che producono ghisa di seconda fusione, in uno stabilimento di 180.000 m² (30.000 m² coperti). Dai controlli ambientali eseguiti dagli Enti competenti è emerso un inquinamento da metalli pesanti dei sedimenti fluviali e contaminazione fecale delle acque superficiali a valle dello scarico delle fonderie (ARPAC, 2014).

Lo scopo della presente ricerca è stato quello di misurare i livelli di inquinamento di piombo (Pb), rame (Cu) e cadmio (Cd) nelle acque superficiali e nei sedimenti fluviali lungo il Fiume Irno e gli effetti di tale inquinamento sulle stesse specie di macrofite acquatiche, prelevate lungo l'asta fluviale a monte e a valle delle Fonderie Pisano. Sono state pertanto campionate la *Veronica beccabunga* e l'*Apium nodiflorum*, disponibili nelle stazioni individuate. In particolare, sono stati osservati i danni ultrastrutturali nelle macrofite acquatiche, messi in relazione alla presenza ed eventuale variazione delle Heat Shock Proteins 70 (HSP70s).

MATERIALI E METODI

Siti di campionamento

È stata individuata una stazione di campionamento a monte delle Fonderie, condizione ambientale "indisturbata" e una a valle dell'immissione delle acque di scarico dell'impianto industriale. Un'ulteriore stazione di controllo è stata selezionata in un punto di risorgiva fluviale. Sono state condotte analisi sulle acque superficiali, sui sedimenti fluviali, su campioni di *Veronica beccabunga* e *Apium nodiflorum*.

Le coordinate, rappresentate con proiezione Fuso 33 - WGS 84 - Emisfero Nord, sono di seguito riportate.

- *Stazione di campionamento risorgiva* (Comune di Pellezzano), denominata di seguito "R"
Coordinate: 480990 long; 4507976 lat.

- *Stazione di campionamento monte dell'impatto antropico* (Comune di Pellezzano), denominata di seguito "M"
Coordinate: 481061 long; 4507631 lat.

- *Stazione di campionamento valle dell'impatto antropico* (Comune di Pellezzano), denominata di seguito "V"
Coordinate: 481062 long; 4506121 lat.

L'esatta localizzazione geografica della stazione è stata effettuata attraverso l'uso del GPS.

Determinazione dei livelli di metalli pesanti nei campioni di macrofite acquatiche e nei sedimenti fluviali

250 mg di campione (radici e foglie) sono stati essiccati in stufa a 105 °C, trattati tramite polverizzatore a biglie di agata, infine sottoposti ad attacco acido aggiungendo 4 mL di HNO₃ (65%) e 2 mL di HF (50%). Per il bianco sono state utilizzate le stesse

quantità dei due acidi senza l'aggiunta di campione. È stato utilizzato un fornello a microonde Milestone (Digestor/Dryng Module mls 1200) con diversi programmi per la digestione, in funzione della matrice.

I campioni sono stati analizzati attraverso spettrometria ad assorbimento atomico (Spectra AA220 FS, Varian). Le analisi sono state condotte in triplicato per ciascun campione.

Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

Campioni di foglie di macrofite acquatiche sono stati fissati in glutaraldeide al 3% in tampone fosfato (pH 7,2-7,4) per 1,5 ore a temperatura ambiente e post-fissati in soluzione di osmio all'1% in tampone fosfato (pH 7,2-7,4) per 1,5 ore a temperatura ambiente, disidratati con concentrazioni crescenti di alcol etilico (serie crescente degli alcoli) fino all'alcol etilico assoluto, ed inclusi in resina epossidica Spurr. Sezioni ultrasottili del mesofillo (70-80 nm di spessore) delle fronde, sottoposte a ultramicrotomia, sono state montate su griglie di rame, poi colorate con acetato di uranile e citrato di piombo e osservate con un Philips EM208STEM, con una tensione di accelerazione di 80 KV (Dykstra, 1992).

Estrazione di proteine, elettroforesi e analisi Western blotting

Heat Shock Proteins 70 (HSP70s) sono state estratte con tampone di estrazione (32 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 1 mM β-mercaptoetanolo; 0,5% di Triton X-100; 2 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) in un rapporto di 1:2 tra peso fresco del campione e volume di tampone d'estrazione, mediante l'utilizzo di un omogeneizzatore

re automatico Tissue Lyser con due sfere di acciaio per ciascun campione (Stainless Steel Beads; \varnothing 5 mm). L'omogenato è stato centrifugato a 4°C per 20 min a 13000 rpm in una centrifuga Thermo Scientific SL16R; il surnatante contenente le proteine solubili è stato nuovamente centrifugato per 10 min. Il surnatante è stato utilizzato per la determinazione delle proteine solubili, analisi SDS-PAGE e Western Blot. SDS-PAGE è stata eseguita utilizzando una soluzione di poliacrilammide al 10% e con un gel di impilamento al 4%. Prima di procedere al caricamento degli estratti di ciascun campione gli stessi sono stati denaturati al calore in presenza di SDS e β -mercaptoetanolo (100°C per 10 min). Gli estratti sono stati poi sottoposti a elettroforesi, caricati nel gel di poliacrilammide al 10% alla medesima concentrazione di proteine (21 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), in condizioni denaturanti, e sottoposti a un campo elettrico di 180 V e 40 mA 10 W per circa 40 minuti in una cella per elettroforesi BIO-RAD Mini-Protean Tetra System, in un opportuno tampone di corsa (TRIS, GLICINA, SDS, H₂O).

Subito dopo la corsa SDS-PAGE le proteine sul gel di poliacrilammide sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa. Il filtro è incubato con un anticorpo specifico primario anti HSP70 diluito in TBS-Tween contenente BSA all'1%. Dopo 3 lavaggi per 10' con TBS-Tween, si continua a incubare il filtro con l'anticorpo secondario anti-rabbit IgG (perossidasi conjugate-Sigma) diluito 1:16000 in TBS-Tween. Le proteine sono rivelate mediante chemiluminescenza (ECL), visibili attraverso un rivelatore fornito di telecamera e software ChemiDoc (BIO-RAD XRS).

RISULTATI

Metalli pesanti nella matrice sedimenti fluviali e biota

La concentrazione del Pb e del Cu nei sedimenti fluviali risulta maggiore nella stazione di campionamento valle rispetto alla stazio-

ne monte, mentre le concentrazioni del Cd sono irrilevanti (Fig. 1).

Pb, Cu, Cd sono stati rilevati anche nei campioni di foglie e radici di *Veronica beccabunga* e *Apium nodiflorum*, prelevati nelle stazioni di campionamento monte e valle (Fig. 2).

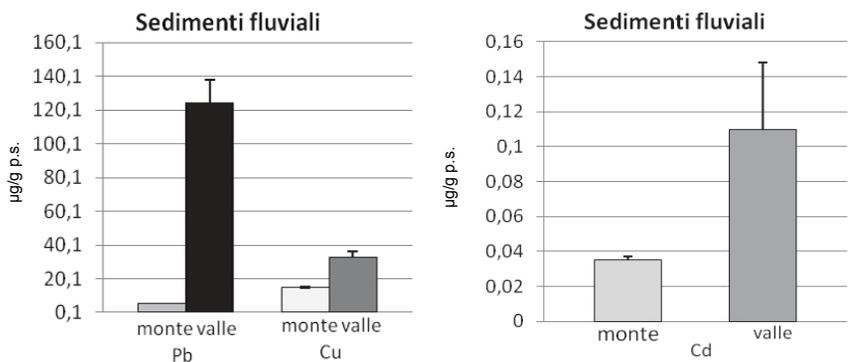


Fig. 1. Concentrazione di Pb, Cu, Cd nei sedimenti ($\mu\text{g}/\text{g}$ p.s.) di campioni prelevati a monte e valle dell'impatto antropico lungo l'asta fluviale dell'Irno, anno 2015.

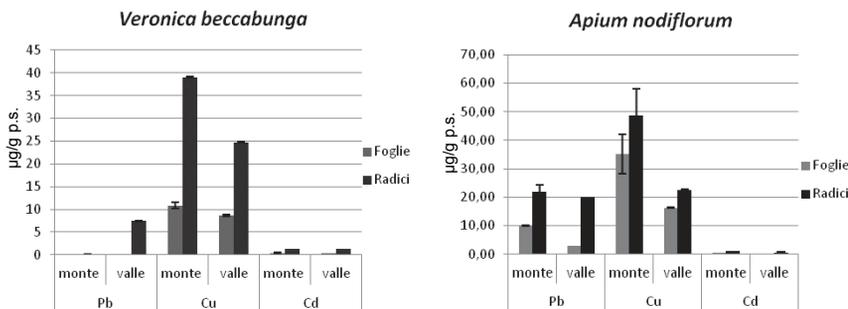


Fig. 2. Concentrazione del Pb, Cu, Cd nelle radici e nelle foglie di campioni di *Veronica beccabunga* e *Apium nodiflorum* a monte e valle dell'impatto antropico lungo l'asta fluviale dell'Irno, anno 2015.

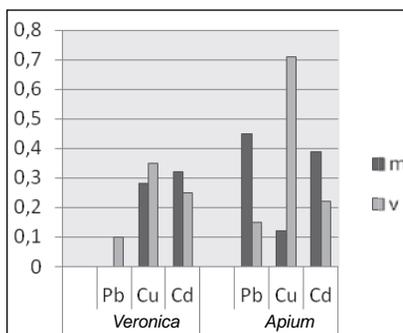


Fig. 3. Fattore di traslocazione (TF) di Pb, Cu, Cd, relativo alle macrofite acquatiche campionate nelle stazioni monte e valle.

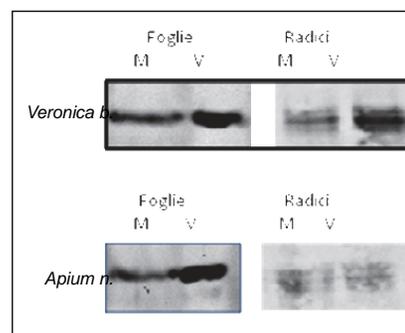


Fig. 4. Identificazione delle bande riferibili alle HSP70 relative alle macrofite acquatiche campionate a monte (m) e a valle (v) dell'impatto antropico.

Il fattore di traslocazione (TF), cioè la capacità di una specie vegetale di trasferire il contenuto dei metalli pesanti dalle radici alla parte aerea, è stato derivato dalla concentrazione dei metalli pesanti riscontrata nelle radici e nelle foglie nelle specie campionate nelle stazioni monte e valle (Fig. 3). È emerso un basso TF, con valori < 1.

Determinazione dei livelli delle HSP70

La determinazione dei livelli delle HSP70 è stata eseguita nei campioni di foglie e radici di macrofite acquatiche prelevati a monte e a valle dell'impatto antropico (Fig. 4).

In *Veronica beccabunga* è evidente una banda riferibile alle HSP70 nei campioni di foglie e radici prelevati a valle. In *Apium nodiflorum* le HSP70 sembrano ugualmente espresse nelle foglie nel tratto monte e valle, mentre nelle radici i livelli di tali proteine sembrano diminuire, sia a monte sia a valle.

Osservazioni ultrastrutturali con il microscopio elettronico a trasmissione (TEM)

Le cellule del mesofillo delle foglie a pelo d'acqua del campione di *Veronica beccabunga*, prelevato a valle presentano cloroplasti con abbondanti plastoglobuli; si osservano anche casi di apparente fusione di cloroplasti. Alcuni mitocondri mostrano una struttura alterata (Fig. 5).

Le cellule del mesofillo delle foglie del campione di *Apium nodiflorum*, prelevato nel tratto di risorgiva mostrano, come atteso, una perfetta organizzazione cellulare.

Le cellule del mesofillo delle foglie del campione di *Apium nodiflorum*, prelevato a monte e a valle, appaiono alterate rispetto ai campioni prelevati nel

tratto di risorgiva, nei cloroplasti che appaiono rigonfi o comunque alterati nella forma, pieni di grossi plastoglobuli e con stroma elettrone-chiaro e nella presenza nel citoplasma dei corpi multivesicolari (Fig. 6).

DISCUSSIONE

Le piante acquatiche presentano un'alta tolleranza ai metalli pesanti e sono in grado di accumulare tali elementi nell'ambiente, derivanti, in particolare, da attività industriali e agricole (Oustridge e Noller, 1991; Ali e Soltan, 1999) tanto da confermarne un ruolo centrale nel monitoraggio ambientale del bioaccumulo (Vardanyan, *et al.*, 2007). In questo progetto è stato studiato il Fiume Irno, in provincia di Salerno, al fine di verificare l'eventuale

congruenza tra le risposte microscopiche e biochimiche delle macrofite acquatiche a un impatto ambientale moderato.

Una contaminazione di Pb è stata osservata nei sedimenti fluviali, evidente nella stazione di campionamento a valle dell'impatto antropico rispetto alla stazione posizionata a monte.

È stata inoltre determinata la concentrazione di Pb, Cu e Cd nei campioni di foglie e radici di *Veronica beccabunga* e *Apium nodiflorum*. Bassi valori del fattore di traslocazione (TF < 1) suggeriscono che i metalli pesanti considerati vengano chelati nelle radici e solo una piccola quantità veicolata verso le foglie (Basile *et al.*, 2001). A tali concentrazioni sono stati riscontrati nelle macrofite acquatiche dan-

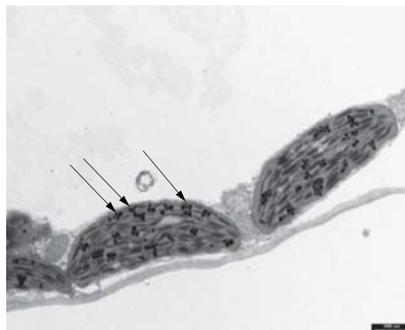


Fig. 5a. Cellula del mesofillo della foglia a pelo d'acqua di *Veronica beccabunga* prelevata a monte: cloroplasti con molti plastoglobuli.

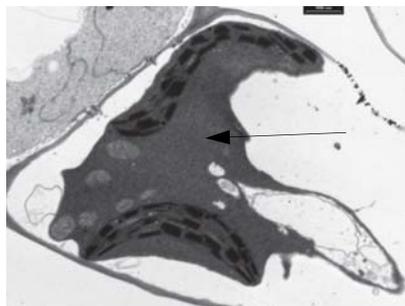


Fig. 5c. Apparente fusione di cloroplasti di cellula del mesofillo della foglia a pelo d'acqua di *Veronica beccabunga* prelevata a valle.

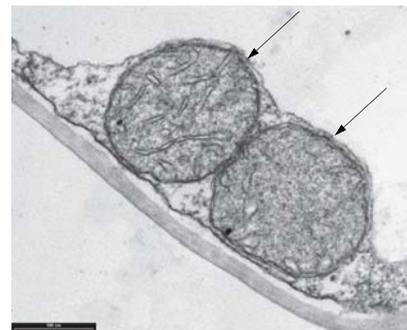


Fig. 5b. Mitocondri di una cellula del mesofillo della foglia a pelo d'acqua di *Veronica beccabunga* prelevata a monte.



Fig. 5d. Struttura alterata di un mitocondrio di una cellula del mesofillo della foglia a pelo d'acqua di *Veronica beccabunga* prelevata a valle.

ni ultrastrutturali, nelle cellule del mesofillo delle foglie, e un aumento delle proteine HSP70. Nei campioni di foglie e radici di *Veronica beccabunga* e di *Apium nodiflorum* è stata misurata un'alta concentrazione di Cu rispetto alla concentrazione riscontrata nei sedimenti fluvia-

li; di fatto, il rame è un elemento fisiologicamente adsorbito, dato il suo ruolo essenziale come co-fattore di enzimi e proteine come la plastocianina (Ghosh *et al.*, 2001); questo provoca un accumulo di tale elemento a livelli elevati all'interno delle cellule, inducendo risposte specifiche,

ad esempio la sintesi di HSP70s per contrastare i possibili effetti tossici di accumulo di Cu. Le HSP70 sono abbondanti, sia a monte sia a valle, dimostrando uno stress ambientale, probabilmente dovuto anche alla presenza di altri inquinanti non misurati in questo studio (Basile *et al.*, 2015).

La risposta allo stress nelle foglie dei campioni di *Veronica beccabunga* e *Apium nodiflorum* è stata confermata dalla osservazione di danni ultrastrutturali. Oltre a modifiche nella forma dei cloroplasti e alterazioni nei mitocondri con zone elettroniche nella matrice e slargamento delle creste, sono stati evidenziati corpi multivescicolari nel citoplasma, probabilmente derivanti da attività di plasmolisi, perdita di permeabilità selettiva della membrana (Schwartzman e Cidlowski, 1993) e accumulo di membrane non digerite per endocitosi. In campioni di foglie di *Veronica beccabunga* e di *Apium nodiflorum* prelevati nella stazione valle, si osserva una maggiore presenza di plastoglobuli e granuli di amido rispetto ai campioni monte.

CONCLUSIONI

La normativa attualmente in vigore relativa alle acque superficiali (D. Lgs 172/2015), definisce i limiti da non superare per il biota, gli Standard di Qualità Ambientale (SQA), in riferimento ad alcune sostanze prioritarie e pericolose prioritarie, da ricercare nei pesci, crostacei e molluschi.

Interessanti informazioni, nell'ambito del monitoraggio ambientale, potrebbero emergere nel monitorare tali sostanze anche nelle macrofite acquatiche, estendendo il concetto di biota, delle quali, come evidenziato, è ormai chiaro il ruolo di biaccumulatore e bioindicatore.

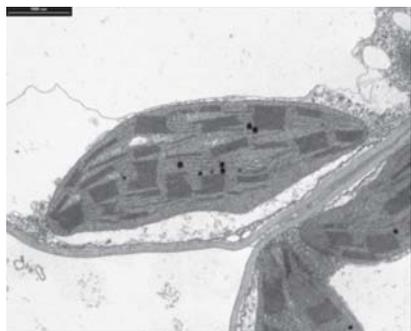


Fig. 6a. Cellule del mesofillo della foglia di *Apium nodiflorum* prelevata in un tratto di risorgiva.

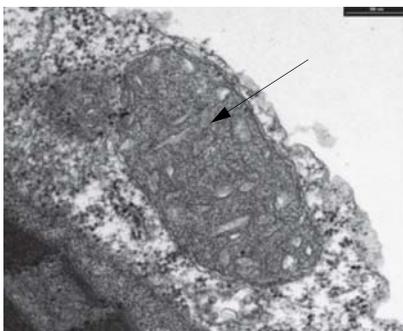


Fig. 6b. Mitocondri di cellule del mesofillo della foglia di *Apium nodiflorum* prelevata in un tratto di risorgiva.

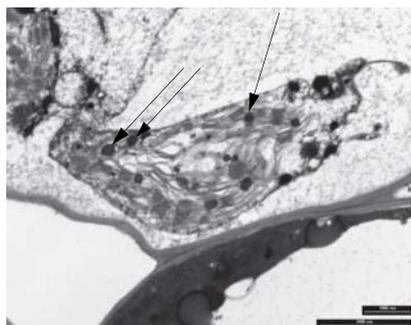


Fig. 6c. Cloroplasti di cellule del mesofillo della foglia di *Apium nodiflorum* prelevata a monte con stroma elettronicamente denso e grossi plastoglobuli.

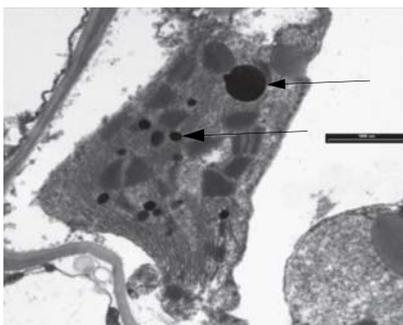


Fig. 6d. Cloroplasto con grossi plastoglobuli di cellula del mesofillo della foglia di *Apium nodiflorum* prelevata a valle.

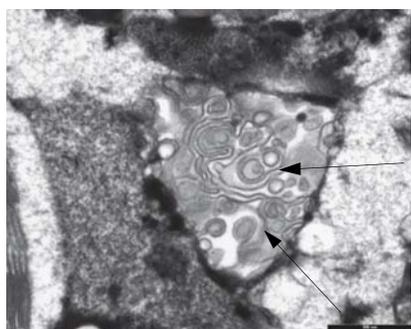


Fig. 6e. Corpi multivescicolari nel citoplasma della cellula del mesofillo della foglia di *Apium nodiflorum* prelevata a monte.



Fig. 6f. Corpi multi vescicolari nel citoplasma della cellula del mesofillo della foglia di *Apium nodiflorum* prelevata a valle.

BIBLIOGRAFIA

- Ali M., Soltan M.E., 1991. Heavy metals in aquatic macrophytes, water and hydro soils from the river Nile. *Egypt. J. Uni. Arabi Biol. Cairo*, **9**: 99-115, 1999
- ARPAC, 2014. Relazione tecnica sulle attività integrative al monitoraggio ambientale sul Fiume Irno, anno 2014, <http://www.arpacampania.it/web/guest/782>).
- Basile A., Cogoni A.E., Bassi P., Fabrizi E., Sorbo S., Giordano S., Castaldocobianchi R., 2001. Accumulation of Pb and Zn in gametophytes and sporophytes of the moss *Funaria hygrometrica* (Funariales). *Ann. Bot.*, **87**: 537-543.
- Basile A., Sorbo S., Cardi M., Lentini M., Castiglia D., Cianciullo P., Conte B., Loppi S., Esposito S., 2015. Effects of heavy metals on ultrastructure and HSP70 induction in *Lemna minor* L. exposed to water along the Sarno River, Italy. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 114: 93-101 DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.01.009.
- Dykstra M.J., 1992. *Biological Electron Microscopy*. Plenum Press, New York, N.Y.
- Ghosh S., Mahoney S.R., Penterman J.N., Peirson D., Dumbroff E.B., 2001. Ultrastructural and biochemical changes in chloroplasts during *Brassicanapus* senescence. *Plant Physiol. Biochem.*, **39**: 777-784. [http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01296-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01296-7)
- Outridge P.M., Noller B.N., 1991. Accumulation of toxic trace elements by freshwater vascular plants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **121**: 2-63.
- Schwartzman R.A., Cidlowsky J.A., 1993. Apoptosis - the biochemistry and molecular biology of programmed celldeath. *Endocr. Rev.*, **14**: 133-151. <http://dx.doi.org/10.1210/edrv-14-2-133>.
- Vardanyan L., Schmieder K., Sayadyan H., Heege T, Heblinski J., Agyemang T., De J., Breuet J., 2007. Heavy metal accumulation by certain aquatic macrophytes from Lake Sevan (Armenia). In: Sengupta M. and Dalwani R. (Eds.), *Proceedings of Taal2007, The 12th World Lake Conference*: 1028-1038.