

RELAZIONE DI PROGETTO

(A cura del coordinatore e del responsabile di gestione del progetto)

1. Tematica e Filiera	Miglioramento della efficienza nella gestione della risorsa idrica e qualità delle acque
------------------------------	--

2. Titolo	Recupero di metalli pesanti da reflui di allevamenti attraverso cicli di fitodepurazione a basso costo
------------------	--

3. Acronimo	LOW METAL
--------------------	-----------

4. Progetto	Bando	Affidamento diretto	Sportello
	¹ D.M. n. 5000 del 4 marzo 2015	² D.M. 16848/7303/2016 del 21/06/2016	³

5. Durata (mesi)		Report⁴ Intermedio ☐ Finale ☒	Nota⁵
-------------------------	--	--	-------------------------

6. Dati finanziari	Finanziamento concesso totale (€)	Finanziamento ricevuto (€)	Importo rendicontato (€)⁶
	145.257,85	72.628,93	166.925,66

7. Coordinatore di progetto	Nome e COGNOME	Alessandra MOSCATELLI
	Qualifica	Professore Associato
	Istituzione di appartenenza	Dipartimento di Bioscienze Università degli Studi di Milano
	Indirizzo	Via Celoria 26, 20133 Milano
	Tel/fax	02-50314846
	e-mail	Alessandra.moscatelli@unimi.it

8. Ente coordinatore	Denominazione: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO Indirizzo: VIA FESTA DEL PERDONO N. 7 Tel.: 02 50312069, Fax: 0250312750, e-mail: sportello.ricerca@unimi.it Si confermano gli estremi bancari o di tesoreria già forniti per la concessione del contributo ☐ sì ☐ no, indicare IBAN IT89E0100003245139300036879 ABI 01000CAB 03245BIC 0036879 CAB BIC Responsabile di gestione del progetto: Nome Tel/fax email
-----------------------------	---

9. Sintesi del progetto (max 20 righe) (può essere oggetto di pubblicazione)	La contaminazione delle acque da metalli pesanti rappresenta un problema ecologico che provoca effetti deleteri sull'equilibrio degli ecosistemi, sulla filiera alimentare e sulla salute dell'uomo. I metalli pesanti possono entrare nel ciclo dell'acqua sia per attività industriali o antropiche ma anche attraverso normali pratiche agro-zootecniche. Una possibile fonte di inquinamento è rappresentata dalla concimazione dei terreni agricoli con le deiezioni animali. E' da rilevare che alcuni metalli pesanti (Reg. CE 1831/2003), rappresentano nutrienti essenziali impiegati di routine nell'alimentazione animale. Diete eccessivamente ricche di tali elementi aumentano il rischio di inquinamento poiché la quota non assorbita dagli animali verrà eliminata con le feci. L'obiettivo generale di questo progetto è stato quello di identificare una strategia efficace di depurazione a basso costo per la gestione ecosostenibile delle acque all'interno di realtà agro-zootecniche rappresentative delle principali produzioni animali italiane. Questo scopo è stato raggiunto attraverso i seguenti punti: 1) Determinazione del bilancio di metalli pesanti nelle principali tipologie di aziende agro-zootecniche; 2) Costruzione di un impianto di fitodepurazione per testare la capacità della monocotiledone <i>Typha latifolia</i> e della felce <i>Thelypteris palustris</i> di sottrarre i metalli dalle acque contaminate con gli elementi maggiormente diffusi in ambito agro-zootecnico; 3) Studio della sostenibilità dell'impianto pilota attraverso la valutazione dell'effetto dei metalli sulle piante e l'efficienza delle piante nel rimuovere i contaminati dall'acqua.
--	--

Parole chiave	Metalli pesanti, <i>Thelypteris palustris</i>, <i>Typha latifolia</i>, fitodepurazione, allevamenti zootecnici
-----------------------------	---

10. Relazione del progetto (totale max. 10 pagine)

10.1 Descrizione dei risultati in relazione agli obiettivi generali e specifici previsti nel periodo di riferimento (max 2 pagine)

Obiettivo generale. *Ci si propone di mettere a punto un sistema di fitodepurazione a basso costo per la gestione ecosostenibile delle acque in una azienda agricola/zootecnica.*

LAVORO SVOLTO IN RELAZIONE AGLI OBIETTIVI SPECIFICI

1. Determinazione del bilancio di metalli pesanti e della loro natura chimica (solubile vs particelle) nelle principali tipologie di aziende agro-zootecniche italiane e nelle relative acque reflue tramite ICP-MS (UO.2 Dipartimento VESPA). Campionamento/Analisi ICP/ input output.

L'obiettivo generale di questa fase progettuale è stato quello di definire uno scenario realistico e puntuale della diffusione dei metalli pesanti all'interno delle principali produzioni zootecniche italiane. Nello specifico l'indagine condotta si prefissava non solo di determinare quali elementi rappresentassero un fattore di rischio, ma anche di individuare le principali criticità legate alla presenza dei metalli pesanti e proporre delle strategie di miglioramento nell'ottica della sostenibilità degli allevamenti intensivi. I campioni di alimento e acqua (Input), deiezioni e reflui (output) sono stati raccolti capillarmente in 25 allevamenti (differenti per specie, dimensioni e organizzazione aziendale), considerando le diverse fasi produttive. I campioni sono stati poi analizzati per la determinazione, attraverso analisi ICP- MS del contenuto dei seguenti elementi: Na, Mg, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd. In generale, le analisi da noi condotte hanno messo in evidenza che nessun metallo pesante classificato come tossico e contaminante indesiderato era presente a concentrazioni superiori a quelli ammessi dai limiti di legge. Tuttavia, il nostro studio ha evidenziato importanti criticità per alcuni metalli indispensabili per gli organismi viventi ma potenzialmente tossici in relazione alla dose: Zn, Cu, Mn e Se. I mangimi sono risultati la principale via di ingresso negli allevamenti di tali oligoelementi, frequentemente superiori alle dosi massime consentite come additivi nutrizionali (1831/2003). Il contenuto di oligoelementi nella dieta è risultato proporzionale a quello misurato nelle deiezioni. Tale riscontro conferma l'importanza del controllo dell'alimentazione animale nella gestione dell'agroecosistema. In maniera più approfondita, il suino, in particolare nelle fasi di svezzamento e ingrasso, è la specie animale in cui è stato osservato il più elevato output di metalli pesanti e l'elemento più critico è rappresentato dallo zinco. Ciò si riconduce alla possibilità di utilizzo, nella pratica di allevamento, dell'ossido di zinco a livelli farmacologiche (2000-3000 ppm) per il controllo di alcune diffuse forme enteriche, dopo prescrizione medico veterinaria. Il Comitato per i farmaci Veterinari ha recentemente stabilito che il bilancio beneficio-rischio dei prodotti contenenti ossido di zinco, da somministrare per via orale in animali produttori di alimenti, è negativo e per tale ragione è prevista la revoca delle autorizzazioni esistenti da parte della Europa nei prossimi cinque anni (EMA/394961/2017). Il nostro studio avvalorava l'ampia diffusione di utilizzo di tale elemento a dosi elevate e impone l'individuazione di strategie alternative finalizzate al controllo delle emissioni dello zinco nell'ambiente. Sulla base dei risultati ottenuti l'attenzione nelle fasi successive per lo sviluppo dell'impianto di fitodepurazione è stata posta sui seguenti elementi: Zn, Cu, Mn e Se.

2. Costruzione di un impianto di fitodepurazione per testare la capacità di *Typha latifolia* e *Thelypteris palustris* di sottrarre metalli dalle acque contaminate (UO.1 Dipartimento di Bioscienze).

Un impianto di fitodepurazione, comprendente 4 vasche scavate nel terreno e rivestite ciascuna da un telo impermeabile, è stato costruito presso l'Orto Botanico Città Studi. In ciascuna vasca sono stati stratificati diversi tipi di substrato ed una uguale quantità di acqua, come riportato in dettaglio nella relazione intermedia. Le piante di *T. latifolia* (30 per vasca) e *T. palustris* (60 per vasca), in coltura nelle serre dell'Orto Botanico Città Studi, sono state inserite all'interno delle vasche dell'impianto e la loro crescita è stata monitorata per 12 giorni prima dell'inizio dell'esperimento (T^0). Le piante utilizzate non hanno mostrato differenze nella performance di crescita nelle diverse vasche prima dell'inizio dell'esperimento.

3. La sostenibilità dell'impianto pilota sarà testato studiando l'effetto dei metalli sulle piante e l'efficienza delle piante nel rimuovere i contaminanti dall'acqua (UO.1 Dipartimento di Bioscienze, UO.2 Dipartimento VESPA). Dopo il periodo di acclimatazione delle piante nelle vasche 2 e 4 (vedi relazione intermedia) è stato aggiunto l'integratore normalmente utilizzato come additivo negli allevamenti, in modo da avere una concentrazione di metalli (Zn, Cu, Se, Mn) 10 volte superiore a quello consentito dai limiti di legge (per dettagli vedi relazione intermedia). Durante tutta la durata dell'esperimento ed in particolare in occasione dei campionamenti la crescita delle piante è stata monitorata e non si sono registrate alterazioni macroscopiche della crescita tra le piante cresciute nelle vasche di controllo rispetto a incubate in presenza dei metalli pesanti. Nessun segno di tossicità è stato osservato durante l'intero periodo sperimentale. I prelievi successivi di *T. latifolia* e *T. palustris*, in condizioni di controllo (Co) ed inquinate da metalli (Met) sono stati effettuati dopo 15 giorni dal T^0 ($T1$), dopo 45 giorni dal T^0 ($T2$) e dopo 5 mesi dal T^0 ($T3$), piante a riposo durante l'inverno

(solo per analisi ICP). Delle piante Co e Met si sono raccolti separatamente le parti aeree (foglie) e quelle sub aeree (rizomi/radici) nei diversi tempi riportati. Gli organi da utilizzare per le osservazioni di microscopia ottica/elettronica sono stati posti immediatamente in fissativo. La messa a punto delle procedure di inclusione ha richiesto due diversi esperimenti per ogni specie di piante. Per gli esperimenti di prova sono stati usati campioni di foglie e rizomi di piante prelevate al T⁰ e al T2 considerando che durante l'intervallo di tempo T⁰-T2 le piante sono cresciute e le pareti cellulari possono aver subito delle modificazioni (dettagli delle procedure riportate nel report intermedio). Per le estrazioni di proteine gli stessi organi sono stati prelevati ai diversi tempi, congelati in azoto liquido e conservati a -80°C. Parallelamente alle procedure di inclusione, sono stati testati due protocolli di estrazione delle proteine (vedi report intermedio) e tra questi è stata scelta la procedura che aveva permesso di ottenere un maggiore numero di proteine. Gli stessi estratti proteici sono stati sottoposti ad analisi tramite 2D-gel. Il gradiente IEF applicato e le condizioni per la successiva corsa in SDS-PAGE hanno permesso di ottenere una buona separazione delle proteine e di analizzare in dettaglio le differenze tra Co e Met nelle piante prelevate a tempi diversi.

4. Valutazione della capacità di fitoestrazione dei metalli da parte delle piante impiegate (UO.2

Dipartimento VESPA, UO.1 Dipartimento di Bioscienze). I campioni di tessuti vegetali, acqua e suolo nei diversi tempi, dopo essiccazione e mineralizzazione sono stati analizzati in triplo attraverso spettrometria di massa al plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) per la determinazione dei seguenti elementi Na, Mg, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd. I risultati ottenuti dimostrano che entrambe le specie vegetali sono state in grado di assorbire dall'ambiente acquoso Zn, Cu, Mn e Se, di traslocarli nei loro tessuti e di ridurre la quantità libera nel mesocosmo. Infatti, le piante provenienti da mesocosmi trattati (Met) hanno presentato livelli di Zn, Cu, Mn e Se significativamente superiori rispetto ai controlli ($P \leq 0.001$) sia a T1 che a T2. *T. palustris* è apparsa più efficace rispetto *T. latifolia*, specialmente nella traslocazione di Zn e Cu. Infatti nella parte ipogea la concentrazione di zinco era pari a 651 mg/kg di sostanza secca e 177 mg/kg di sostanza secca rispettivamente in *T. palustris* e *T. latifolia*. Tale dato è spiegabile con il fatto che *T. latifolia*, che comunque ha dimostrato avere una ottima tollerabilità ai metalli e una biomassa superiore rispetto a *T. palustris*, impiega più tempo per il processo di fitodepurazione. E' noto che la risposta delle piante all'esposizione ai metalli comprende sia modificazioni del metabolismo che alterazioni morfologiche. Per studiare le strategie delle due specie utilizzate foglie e rizomi di *T. palustris* e *T. latifolia* cresciute nell'impianto pilota in presenza o meno dei metalli pesanti (T2) sono state analizzate tramite microscopia ottica ed elettronica, per evidenziare eventuali alterazioni morfologiche. La morfologia di foglie e rizomi al T2 (Co e Met) sono poi state confrontate con i rispettivi controlli prelevati prima dell'inizio dell'esperimento (T0). Osservazioni istologiche non hanno rivelato alterazioni nella morfologia del mesofillo e nella forma delle cellule *T. latifolia*, mentre differenze sono state osservate nella morfologia del mesofillo e nella forma delle cellule nelle foglie di piante esposte ai metalli rispetto ai controlli in *T. palustris*. Per quanto riguarda la morfologia della porzione subaerea, i rizomi di entrambe le specie mostrano una diminuzione nella quantità di amiloplasti nel parenchima di riserva, suggerendo che i metalli possano alterare il metabolismo dei carboidrati. Differenze sono state osservate nello spessore della parete cellulare delle cellule dell'endoderma in rizomi di *T. latifolia*: in particolare le pareti dell'endoderma in campioni Met (T2) appare più sottile rispetto ai Co (T2). Osservazioni ultrastrutturali al TEM hanno confermato questa differenza. Analogamente a quanto osservato in *T. latifolia*, anche nei rizomi di *T. palustris* si sono osservate alterazioni nello spessore della parete delle cellule parenchimatiche nelle piante esposte ai metalli (Met-T2), rispetto ai controlli (Co-T2). Studi di immunofluorescenza condotti usando anticorpi specifici per le pectine metil esterificate e per le pectine parzialmente de-esterificate hanno permesso di confermare le alterazioni morfologiche descritte sopra, suggerendo un rimodellamento della parete cellulare dovuto all'esposizione ai metalli in entrambe le specie utilizzate. Per analizzare eventuali alterazioni indotte da metalli nella composizione proteica sono stati preparati estratti crudi delle porzioni aeree (foglie) e subaeree (rizomi/radici) di *T. latifolia* e *T. palustris*; i profili elettroforetici proteici dei campioni di Co e Met sono stati analizzati tramite elettroforesi in SDS poliacrilamide monodimensionale (1D) e bidimensionale (2D). Mentre in *T. palustris* non sono state evidenziate differenze nel profilo elettroforetico dei campioni di foglie e rizomi/radici Met rispetto al Co sia in analisi 1D che 2D, nel caso di *T. latifolia* alterazioni nel profilo proteico sono state osservate in rizomi trattati con metalli (Met-T2) rispetto al Controllo (Co-T2). Analisi tramite spettrometria di massa hanno permesso di identificare 4 polipeptidi la cui quantità cambia significativamente nei due campioni. Questa fase ci permette di concludere che entrambe le specie vegetali, sebbene necessitino degli adattamenti dei sistemi di coltivazione per l'impiego in campo, sono in grado di ridurre dalle acque reflue l'eccesso di metalli pesanti più diffusi negli allevamenti intensivi e possono essere un valido ed economico strumento di fitodepurazione.

10.2 Attività svolte (max 7 pag)

OR1. a-c Campionamento nelle aziende Zootecniche, Determinazione del bilancio di metalli pesanti nelle principali tipologie di aziende agrozootecniche italiane e nelle relative acque reflue tramite analisi ICP - Unità coinvolta: UO2 Dipartimento VESPA

L'obiettivo generale di questa fase progettuale, attraverso un'indagine capillare in tipici allevamenti intensivi, è stato quello di definire uno scenario realistico e puntuale della diffusione dei metalli pesanti all'interno delle principali produzioni zootecniche italiane al fine di definire sia quali elementi rappresentassero un fattore di rischio che di sviluppare strategie di miglioramento fit to purpose.

A tal fine campioni di alimento e acqua (Input), deiezioni e reflui (output) sono stati raccolti capillarmente in 25 allevamenti (differenti per specie, dimensioni e organizzazione aziendale), considerando le diverse fasi fisiologico-produttive, che ovviamente sono caratterizzate da alimentazione differente e possono influire in maniera diversa sull'output totale di elementi. La procedura di campionamento del materiale biologico prevedeva la raccolta di diversi campioni elementari in punti diversi della materia prima da analizzare, accurata miscelazione di diversi campioni per la costituzione di un campione globale che fosse veramente rappresentativo. Tale aspetto è fondamentale per l'inferenza, ossia il successivo trasferimento dei risultati ottenuti all'intera partita.

Ogni campione di mangime (1000g circa) è stato raccolto in più punti del luogo di stoccaggio (silos, sacchi) ed è stato trasportato in laboratorio refrigerato. I campioni di acqua sono stati raccolti in ogni allevamento da tutte le fonti normalmente impiegate per l'abbeverata. I campioni di feci (300g/ciascuno) sono stati acquisiti da ogni fase produttiva (considerando gli spazi interni che esterni) avendo cura che fossero rappresentativi del gruppo di animali. Dopo accurata miscelazione i campioni fecali sono stati trasportati in laboratorio a 4°C, congelati in azoto liquido e poi stoccati a -20°C fino al momento delle analisi.

In ciascuna azienda agricola sono stati registrati e valutati il benessere degli animali, le condizioni abitative e lo stato di salute. Per i sistemi di produzione intensivi dei suini, l'accesso all'acqua potabile, il numero di animali per area, la temperatura, la ventilazione, il pavimento sono stati considerati.

Sono state inoltre considerate le materie prime comunemente impiegate per la preparazione dei mangimi perché anch'esse, essendo dotate di contenuto naturale di metalli pesanti, potrebbero aumentare la quota che gli animali assumono con la razione. Tale procedura ha previsto l'acquisto di materie prime.

DETERMINAZIONE PRINCIPALI COMPONENTI- Dopo lo scongelamento, i campioni di mangime e di feci sono stati inseriti in sacchetti di alluminio pre-pesati ed essiccati a 105 ° C per 24 ore (DM, metodo AOAC 930,15) per la valutazione della sostanza secca (s.s.). Successivamente ogni campione è stato analizzato per la determinazione delle principali componenti chimiche: proteina grezza (CP, metodo AOAC 2001.11); fibra grezza (metodo CF, AOCS Ba 6a-05); estratto etereo (EE, DM 21/12/1998) e ceneri (metodo AOAC 942.05). I mangimi sono stati inoltre valutati per la loro salubrità e per la presenza di eventuali contaminanti di origine biologica (micotossine) tramite kit ELISA e microscopia ottica. I risultati ottenuti da questa fase ci hanno permesso di dimostrare che tutti gli animali erano alimentati con diete bilanciate per i principali parametri nutrizionali e rispettavano i fabbisogni in nutrienti specifici per specie e fase produttiva. Si osservava una riduzione delle principali componenti chimiche (% s.s) nelle feci rispetto al mangime, dovuto naturalmente all'assorbimento dei nutrienti durante il transito gastrointestinale (Grafico 1).

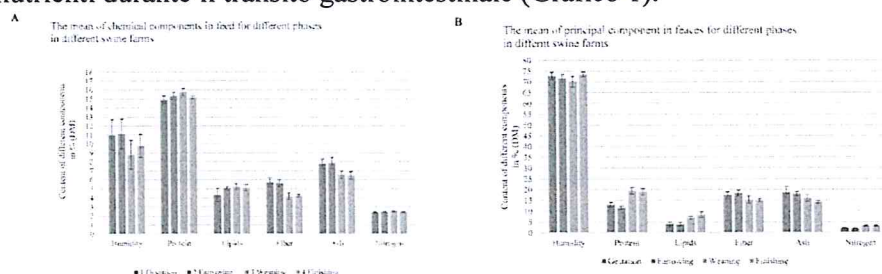


Grafico 1- A: media dei valori delle principali componenti chimiche dei mangimi, per fase produttiva, negli allevamenti suinicoli, B: media dei valori delle principali componenti chimiche nelle deiezioni, per fase produttiva, negli allevamenti suinicoli.

DETERMINAZIONE MEDIANTE ICP-MS DEI PRINCIPALI COMPONENTI MINERALI E METALLI PESANTI- Tutti i campioni in triplicato (0,3 g / DM di ciascuno) sono stati mineralizzati mediante ultraveloce camera di reazione Microonde Digestion System (Anton Paar MULTIVAVE 3000) in tubi di teflon riempiti con 10 ml di HNO₃ (65%) applicando una rampa di temperatura a gradiente (a 120 ° C in 10 'mantenuta per 10). Dopo 20 minuti di raffreddamento, le soluzioni mineralizzate, limpide, incolore e omogenee dei campioni sono state trasferite in provette di polipropilene e diluite con standard interno (72Ge, 89Y, 159Tb).

Tutti i campioni diluiti sono stati analizzati attraverso ICP-MS (ICP MS; Bruker Aurora M90 ICP-MS, Bremen, Germania) al fine di rilevare i seguenti elementi: Na, Mg, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Come, Se, Mo, Cd e Pb. I risultati ottenuti sono stati verificati utilizzando materiali di riferimento interni (fanghi di depurazione - LGC

61812, mangime per pollame - LGC7173, acque reflue - SPS-WW2 1). Le interferenze tipiche dell'analisi poliatomica sono state rimosse usando CRI (Collision-Reaction-Interface) con un flusso di H_2 di 75 mL / min-1 attraverso il cono dello skimmer.

Al fine di valutare statisticamente eventuali differenze significative tra i valori medi, tutti i dati di mangime e di feci sono stati analizzati utilizzando il software Proc Mixed di SAS (versione 9.4: SAS Inst. Inc., Cary, NC). L'analisi ha tenuto conto degli effetti fissi delle aziende agricole, delle fasi, delle interazioni a due e a tre vie associate al tipo di campione. I mezzi sono stati considerati diversi quando $P \leq 0,05$ e tendevano a differire se $0,05 < P \leq 0,10$. Le correzioni studentesche di Tukey-Kramer sono state utilizzate per separare i mezzi di trattamento all'interno delle interazioni a due e tre vie. All'interno di significative interazioni a tre vie, è stata utilizzata l'opzione slice per separare i mezzi all'interno di farm e fasi e campioni specifici. I risultati per i grafici sono riportati come medie minime e errori standard dei mezzi. I risultati per le tabelle sono riportati come medie e deviazione standard (collaborazione con Università telematica San Raffaele).

I risultati da noi ottenuti hanno evidenziato alcune criticità connesse agli alti livelli, all'interno dei mangimi, di alcuni metalli pesanti il cui uso è consentito, a dosi definite, in alimentazione animale in quanto sono nutrienti essenziali (Reg. UE 1031/2006): Zn, Cu, Mn, Se. Tali oligoelementi sono stati considerati nella fase successiva per la valutazione della capacità delle piante di rimuoverle da acque altamente contaminate.

In particolare, l'elemento più diffuso e rilevato nella quasi totalità dei mangimi per suini a livelli significativamente superiori a quelli ammessi come additivo (limite: 150 ppm) è lo zinco (Grafico 2).

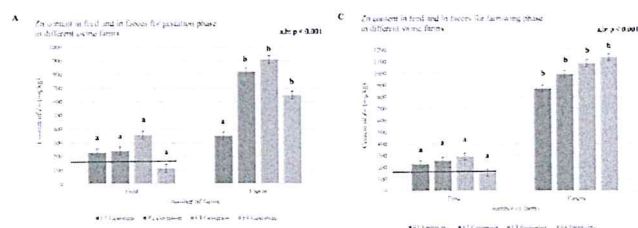


Grafico 2- contenuto medio di zinco nei mangimi (A) e nelle feci (C) delle diverse fasi produttive degli allevamenti suinicoli

Ciò si riconduce alla possibilità di utilizzo, nella pratica di allevamento, dell'ossido di zinco a livelli farmacologiche (2000-3000 ppm) per il controllo di alcune diffuse forme enteriche, dopo prescrizione medico veterinaria. Il nostro studio avvalorava l'ampia diffusione di utilizzo di tale elemento a dosi elevate e impone l'individuazione di strategie alternative finalizzate al controllo delle emissioni dello zinco nell'ambiente. Il mangime rimane comunque il principale input di tale elemento nell'allevamento. Inoltre come si può vedere dal grafico 2 il contenuto di tale elemento sul mangime tal quale è proporzionale al contenuto delle deiezioni, che possono rappresentare fonte di inquinamento delle acque e dei suoli.

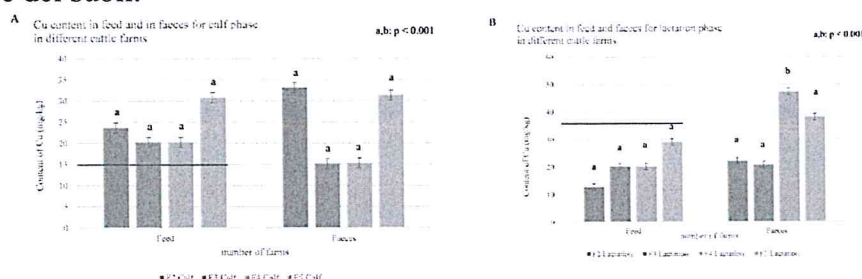


Grafico 3- A: media dei valori del contenuto in rame in mangimi di vitelli; B: media dei valori del contenuto in rame in mangimi di bovine in lattazione. Linea rossa: limite consentito.

Il livelli di zinco non sono risultati particolarmente critici nell'allevamento bovino, in cui limitate situazioni di superamento dei limiti consentiti e di entità moderate rientrano nel range degli errori casuali come ad esempio l'acquisto di materie prime con elevato contenuto primario di zinco.

L'aumento generale del tenore di rame è stato registrato nelle deiezioni di suino e bovino, riflettendo il loro contenuto di mangime soprattutto degli animali giovani la cui presenza (dati i livelli minimi

consentiti) è da ricondursi all'elevato contenuto delle materie prime (Grafico 3). Tale aspetto appare particolarmente importante alla luce della recente normativa che prevede la riduzione del limite massimo di Cu nelle razioni degli animali (Reg. UE 2018/1039). In nessun campione sono stati rilevati livelli significativi di metalli pesanti tossici. In conclusione la nostra indagine sottolinea l'importanza, per un miglioramento della sostenibilità degli allevamenti, sia della riduzione dell'input (attraverso un maggiore controllo dei mangimi) che della necessità di sviluppare delle strategie efficaci che riducano l'immissione nell'ambiente di Zn, Cu, Mn, e Se.

OR2. a Costruzione dell'impianto di fitodepurazione e coltura preliminare delle piante - Unità principalmente coinvolta: UO.1 Dipartimento di Bioscienze.

L'area sperimentale per la costruzione dell'impianto pilota di fitodepurazione è stata individuata presso l'Orto Botanico Città Studi dell'Università degli Studi di Milano, sito in via Golgi n. 18. L'impianto di fitodepurazione è costituito in 4 vasche a distanza di 1 m una dall'altra, ciascuna con una base pari a 4 m² e con una profondità di 1.2 m. Le vasche sono state impermeabilizzate con teli di EPDM (Ethylene-Propylene Diene Monomer, materiale elastico, resistente ed impermeabilizzante).

Nelle vasche sono stati stratificati diversi tipi di materiali (ciottoli arrotondati, brecciolino, sabbione). Le precipitazioni atmosferiche verificatesi successivamente hanno creato una lama di acqua sul fondo permettendo l'assestamento del fondo vasca e fondo di terreno e la giusta tensione del telo impermeabilizzante. Su questo substrato è stato stratificato terriccio professionale Vitaflor (210 Kg per ogni vasca).

Inserimento delle piante. Le vasche sono state numerate:

- 1- *Typha latifolia* controllo (Co)
- 2- *Thelypteris palustris* controllo (Co)
- 3- *Typha latifolia* inquinata (Met)
- 4- *Thelypteris palustris* inquinata (Met)

In ciascuna delle vasche 1 e 3 sono state inserite 30 piante di *T. latifolia*; in ciascuna delle vasche 2 e 4 sono state inserite 60 piante di *T. palustris*. In ogni vasca sono stati aggiunti 685 L di acqua. Dopo 12 giorni dalla messa in coltura (T⁰) le piante apparivano ben adattate in tutte le vasche dell'impianto. Per maggiori dettagli rivedere report di medio termine.

OR2. b Sostenibilità dell'impianto e messa a punto delle procedure di microscopia ed estrazione delle proteine - Unità coinvolte: UO.1 Dipartimento di Bioscienze. UO.1 Dipartimento VESPA.

Il prelievo delle piante ai diversi tempi per le osservazioni di microscopia, l'estrazione delle proteine e per l'analisi dei metalli è stato effettuato dalle assegniste Nadia Stroppa e Monika Heina (la cui attività è dedicata al 100% al progetto) in collaborazione a turno con gli altri colleghi coinvolti nel progetto.

Schema prelievi. Il 12° giorno dopo la messa in coltura è stato effettuato il primo prelievo (T⁰). Per ogni vasca è stata prelevata 1 pianta; campioni degli organi epigei (foglie) e degli organi ipogei (rizomi-radici) di *T. latifolia* e *T. palustris* sono stati congelati in azoto liquido e poi conservate a -80°C per le estrazioni di proteine o poste in fissativo per la maggiore di piante sono state prelevate per le analisi chimiche (vedi OR1). Lo stesso giorno del prelievo T⁰ l'acqua contenuta nelle vasche è stata completamente aspirata dai tubi corrugati di drenaggio. Si è quindi proceduto all'introduzione nelle vasche 3 e 4 dell'integratore ricco in metalli, che viene usato come additivo nei mangimi degli allevamenti suini (premiscela per suini all'ingrasso, MAXI CRC 0,5%). In tutte le vasche (Co-Met) sono stati poi aggiunti 695 L di acqua in modo da avere nelle vasche 3 e 4 (Met) le seguenti concentrazioni finali di inquinanti: Zn 44,02 mg/L, Cu 8,63 mg/L, Mn 10,83 mg/L, Se 0,09 mg/L. Abbiamo deciso di sottoporre le piante ad una concentrazione di Zinco almeno dieci volte superiore all'attuale limite massimo consentito nelle acque (3 mg/L).

In seguito sono stati effettuati i seguenti prelievi:

T1 – Dopo 15 giorni dal prelievo T⁰

T2 – Dopo 45 giorni dal T⁰

T3 – Dopo 5 mesi dal T⁰ (solo per analisi ICP in quanto le piante sono a riposo). Ai punti T1 e T2 il campionamento è stato effettuato come riportato al punto 1.

Protocolli per le osservazioni dei campioni Co e Met al microscopio ottico, microscopio confocale e TEM.

Basandoci sui dati di ICP-Massa che hanno mostrato un accumulo significativo di metalli al T2 soprattutto in foglie e rizomi, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sull'osservazione di questi organi in piante prelevate dopo 45 giorni dal T⁰ (T2). Analogamente, anche l'estrazione e l'analisi delle proteine è stata condotta principalmente in campioni prelevati al T2. La messa a punto dei protocolli di inclusione degli organi delle piante Co e Met per le osservazioni di microscopia ottica ed elettronica ha richiesto alcuni esperimenti preliminari che ci hanno permesso di arrivare ad un protocollo efficace per la preservazione di cellule e tessuti. I dettagli della procedura di fissazione/inclusione in resina LR white sono stati riportati nella relazione di medio termine. Per le osservazioni istologiche, sezioni 0.9 µm di foglie e rizomi di *T. latifolia* (Co-Met T⁰ e T2) e *T. palustris* (Co-Met

T⁰ e T2) sono state ottenute tramite l'ultramicrotomo Reichert-Jung UltracutE (per ottimizzare la performance dell'ultramicrotomo è stata effettuata una manutenzione nell'ambito del progetto-D'Amico Luciano ft n. 4/18). Le sezioni ottenute sono state poste su vetrini porta oggetto, colorate con blu di Toluidina e montate con opportuni sostanze per l'osservazione al microscopio ottico. I campioni sono stati osservati usando un microscopio Leica DM RB e le immagini sono state acquisite usando la video camera Leica MC 170 HD. Per ottimizzare la performance del microscopio ottico Leica e per migliorare la qualità delle immagini è stata effettuata una manutenzione del microscopio nell'ambito del progetto (D'Amico Luciano ft n. 4/18).

Un esperimento per localizzare i metalli nelle sezioni di rizomi di *T. latifolia* e *T. palustris* Co e Met (T2) è stato effettuato usando un colorante fluorescente, specifico per lo Zinco (inizialmente non previsto nel progetto-Fluozin-3, Life Technology ft n. 903). Tuttavia non abbiamo ottenuto alcuna colorazione. Sarebbe interessante, in un eventuale proseguo del lavoro, poter spendere del tempo nella messa a punto del protocollo.

Per l'osservazione al TEM sono state effettuate sezioni dello spessore di 90 nm, usando lame di diamante (Diatome ultra 45), usando l'ultramicrotomo Reichert-Jung UltracutE. Le sezioni sono state poste su grids in rame e contrastate usando acetato di uranile 3% per 30 minuti e citrato Pb 0.2 % per 12 minuti. La procedura di contrasto viene condotta a temperatura ambiente e al riparo dalla luce. I campioni sono stati osservati al microscopio elettronico a trasmissione EFTEM LEO 912AB (Zeiss, Jena, Germany) operante a 80 kV, presso il centro di microscopia Alembic (S. Raffaele) (il TEM presente che era presente nel Dip. di Bioscienze ed ora inserito nella piattaforma di Ateneo non è stato disponibile per circa 1 anno a causa del malfunzionamento del software della telecamera). Mentre le osservazioni preliminari di microscopia ottica erano già state inserite nel report intermedio, le osservazioni al TEM sono state fatte interamente nella seconda fase del progetto. L'analisi delle immagini osservate al microscopio ottico e al TEM hanno mostrato una buona preservazione sia dei tessuti che delle cellule.

Procedura di immunofluorescenza indiretta su sezioni di rizomi di *T. latifolia* e *T. palustris* Co-Met. Sezioni (0.9 µm) di rizomi di *T. latifolia* e *T. palustris* T2 Co-Met sono state fatti aderire su vetrini porta-oggetto precedentemente lavati in etanolo assoluto. Le sezioni sono state idratate/saturate in camera umida a temperatura ambiente, in 1%BSA/TBS per 45 min. Successivamente le sezioni sono state lavate in TBS e incubate con gli anticorpi primari JIM7 1:10 (contro le pectine metil esterificate) e LM19 1:10 (contro pectine parzialmente de esterificate) in BSA/TBS per 15 ore a 4°C. Dopo 2 lavaggi in TBS le sezioni sono state incubate con anticorpo secondario (rabbit anti-rat FITC) 1:200 per due ore a temperatura ambiente. Dopo 1 lavaggio in TBS le sezioni erano coperte da vetrini copri oggetto in opportuno montante. I campioni sono stati osservati usando il microscopio confocale Leica TCS SP2; le immagini sono state ottenute usando la linea laser 488 (intervallo di emissione 500-550). Questa parte della ricerca non era prevista nel progetto originale ed ha comportato l'acquisto dei due anticorpi primari e dell'anticorpo secondario menzionati sopra (PLANT PROBES- University of Leeds-GB, ft 290 per gli anticorpi primari e Prodotti Gianni ft P589 per l'anticorpo secondario), l'acquisto di un apposito montante (ft Sigma 2995) e l'uso del microscopio confocale Leica SP2 presso il Dip. di Bioscienze.

Estrazione di proteine da piante Co e Met. Come riportato in dettaglio nel report intermedio, per la messa a punto del protocollo di estrazione delle proteine da foglie e rizomi di *T. latifolia* e *T. palustris* sono stati testati due protocolli diversi, ripetendo almeno due volte la procedura di estrazione in modo da valutare la riproducibilità. L'efficienza dell'estrazione proteica nei due protocolli è stata valutata tramite analisi elettroforetica 1D e ci ha permesso di identificare il protocollo pubblicato da Valcu and Schlink (2006) come quello più efficace. In breve, 0.4 g di foglie o rizomi di *T. latifolia* e *T. palustris* prelevati al T⁰ e al T2 (Co e Met) congelati in azoto liquido al momento del campionamento e mantenuti a -80°C vengono omogenizzati in azoto liquido in mortai fino ad ottenere una polvere finissima. I campioni sono stati poi risospesi in una soluzione di precipitazione (10% TCA, 20 mM DTT in acetone) preraffreddata a -20°C. Le proteine sono state lasciate precipitare overnight a -20°C e successivamente i pellets lavati due volte per 1 ora a -20°C con una soluzione contenente 20 mM DTT in acetone e successivamente centrifugati per 30 min a 17 000 rpm (4°C) nel rotore Beckman JA 18.1. I pellets sono stati fatti asciugare per 10 min, risospesi in extraction buffer (8 M urea, 4% CHAPS, 65 mM DTE), sonicati per 30 min a 15-20°C e centrifugati per 30 min a 17 000 rpm (15°C) nel rotore Beckman JA 18.1. I supernatanti contenenti i polipeptidi estratti sono stati raccolti e conservati a -80°C prima dell'analisi tramite elettroforesi 1D e 2D. Il contenuto proteico dei campioni ottenuti sia è stato calcolato tramite il metodo di Bradford usando BSA come standard. Durante le procedure di estrazione si sono verificati degli inconvenienti tecnici per la centrifuga Beckman J2-21, che hanno richiesto interventi di riparazione e manutenzione (Beckman ft n. 374 e 392).

Analisi del profilo polipeptidico tramite elettroforesi 1D, 2D e Spettrometria di Massa (MS/MS). Per l'analisi 1D 15µg e 40 µg sono stati caricati su ogni lane, rispettivamente per l'analisi analitica e per i gel preparativi propedeutici all'identificazione tramite MS/MS. I polipeptidi sono stati separati su gel di poliacrilamide 10% (Laemmli, 1970) in un sistema di elettroforesi verticale (MiniVe Vertical Electrophoresis System - GE Healthcare, USA). Le proteine sono state colorate tramite Coomassie brilliant blue R250 o colorazione argentea

(Rabilloud, 2009). Per le elettroforesi 2D le proteine sono state prima separate usando l' Immobililine-Polyacrylamide System, un gradiente non lineare di pH 3-10 immobilizzato su strips di poliaccrilamide lunghe 7 cm (IPG strips; GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Il processo di IEF è stato effettuato tramite l' Ettan™ IPGphor system (GE Healthcare) come riportato in Moscatelli et al. (2015). La separazione dei polipeptidi nella seconda dimensione è stata effettuata secondo quanto descritto sopra per i gel 1D (Laemmli, 1970). Dopo separazione 2D i polipeptidi sono stati evidenziati tramite colorazione argintica (Rabilloud, 2009; acquistati reagenti per colorazione argintica parte di ft Sigma 1792). I polipeptidi presenti in diverse quantità tra il Co e Met (al T2) sono stati tagliati dai gels e sottoposti ad analisi tramite spettrometria di massa al fine di identificarli, seguendo un protocollo riportato in Moscatelli et al. (2015). Per questo approccio, che non era previsto nel progetto originale ci siamo avvalsi della collaborazione del Prof. Luca Bini (Laboratorio di Proteomica Funzionale, Dipartimento di Scienze della Vita-Università degli Studi di Siena). Questo intervento non ha comportato un aumento della spesa ma ha richiesto acquisto di reagenti non previsti (ft Sigma 1792).

Da notare che i tamponi e reagenti di base utilizzati per gli esperimenti erano in parte già presenti in Lab. Talvolta la quantità di cui disponevamo non è stata sufficiente per concludere gli esperimenti e abbiamo dovuto provvedere all'acquisto (parte del materiale in ft Sigma 7110/7111)

OR2. c Valutazione della capacità di fitoestrazione dei metalli pesanti da parte delle piante impiegate negli impianti di fitodepurazione e risposta delle piante ai metalli - Unità coinvolte: UO2 Dipartimento VESPA - UO.1 Dipartimento di Bioscienze

I campioni di piante (rizomi / radici e foglie / steli separatamente) e suolo e acqua, in tripla ripetizione, sono stati utilizzati per valutare le principali componenti chimiche e il contenuto di minerali e metalli pesanti tramite ICP-MS secondo la procedura descritta nell'OR-1. Le analisi sono state condotte in triplicato.

I risultati ottenuti dimostrano che entrambe le specie vegetali sono state in grado di assorbire dall'ambiente acquoso Zn, Cu, Mn e Se, di traslocarli nei loro tessuti e di ridurne la quantità libera nel mesocosmo. Infatti, le piante provenienti da mesocosmi trattati (Met) hanno presentato livelli di Zn, Cu, Mn e Se significativamente superiori rispetto ai controlli ($P \leq 0.001$) sia a T1 che a T2 (grafico 4).

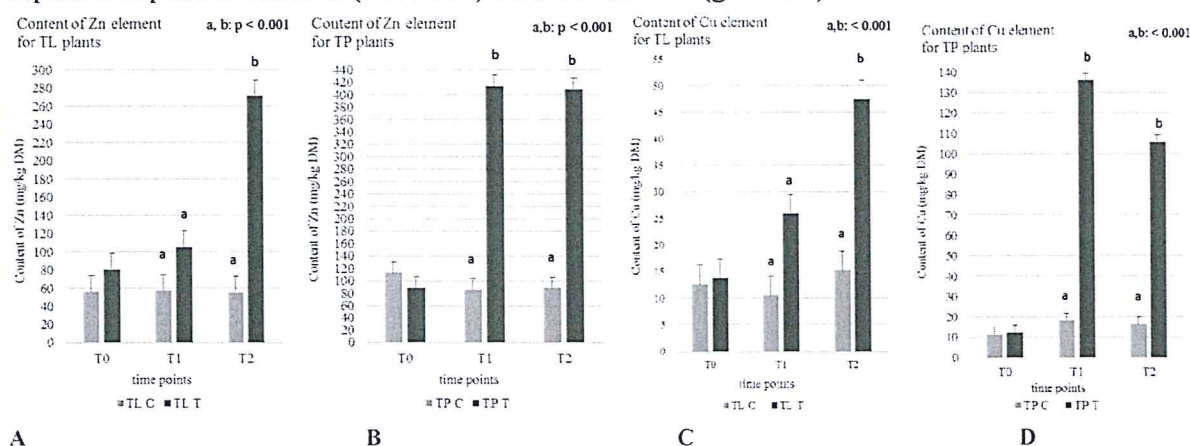


Grafico 4- A: livello di zinco in *T. latifolia* nei 3 tempi sperimentali; B: livello di zinco in *T. palustris* nei 3 tempi sperimentali; C: livello di rame in *T. latifolia* nei 3 tempi sperimentali; D: livello di rame in *T. palustris* nei 3 tempi sperimentali.

Tale approccio può essere facilmente applicato in campo per la riduzione dei principali metalli pesanti immessi nell'ambiente dalle produzioni animali. Sulla base dei dati ICP forniti dalla UO2 abbiamo focalizzato la nostra attenzione su piante di Co e Met prelevate al T2. Foglie e rizomi di *T. latifolia* e *T. palustris* cresciute nelle vasche Co e Met dell'impianto pilota sono state analizzate tramite microscopia ottica ed elettronica. Le sezioni analizzate derivano da tre piante diverse, i cui rizomi mostravano un diametro comparabile sia in piante trattate che in piante controllo. Le porzioni aeree delle due specie hanno mostrato risposte diverse al trattamento con i metalli. Al T⁰, la porzione centrale del mesofillo di foglie adulte di *T. latifolia* mostra ampi spazi aerei, delimitati da tessuto parenchimatico; al contrario, sia nella porzione adassiale che abassiale il parenchima a palizzata è bistratificato (Fig. 1A, C).

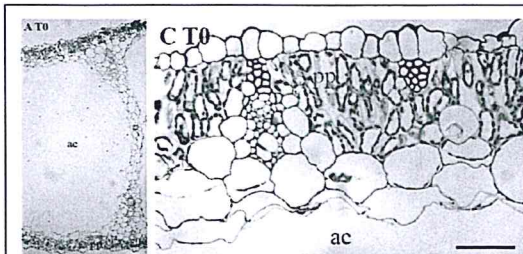


Fig. 1. Sezioni di foglie di *T. latifolia*

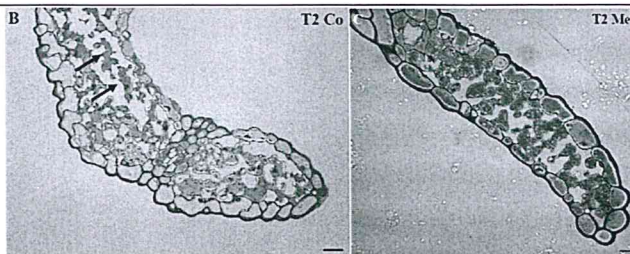


Fig. 2. Sezioni di foglie di *T. palustris*

Fasci conduttori sono distribuiti nel tessuto parenchimatico. La stessa morfologia della foglia è stata osservata sia nelle foglie Met che Co prelevate al T2, suggerendo che la presenza dei metalli non provoca alterazioni nell'istologia delle foglie il *T. Latifolia*. Le foglie di *T. palustris* mostrano una morfologia molto diversa. Al T⁰ le foglie appaiono sottili ed il mesofillo appare formato da parenchima lacunoso, con ampi spazi intercellulari delimitati da cellule leggermente lobate. In foglie prelevate al T2-Co, le cellule del mesofillo appaiono più differenziate con profili lobati/interdentati (Fig. 2B, frecce). Al contrario nel mesofillo di foglie T2-Met le cellule mostrano un profilo lineare, mantenendo la morfologia descritta per il T⁰ (Fig. 2C). Per definire in maggiore dettaglio la variazione nella morfologia, le dimensioni delle cellule sono state valutate misurando i due assi (ImageJ). Il trattamento con i metalli induce un incremento nella lunghezza delle cellule ed in significativo incremento del rapporto lunghezza/larghezza ($p < 0,01$), confermando una variazione nella forma delle cellule parenchimatiche del mesofillo in presenza dei metalli (Fig. 3D, E).

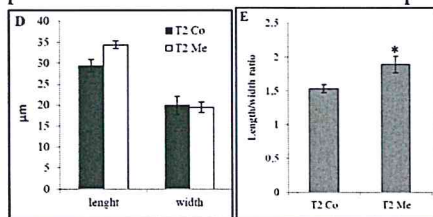


Fig. 3.

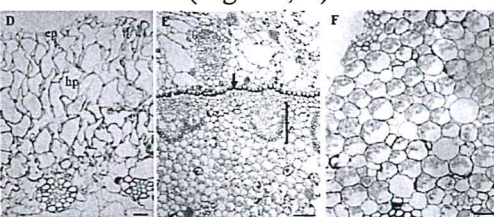


Fig. 4. Rizoma di *T. latifolia* T⁰ e T2-Co

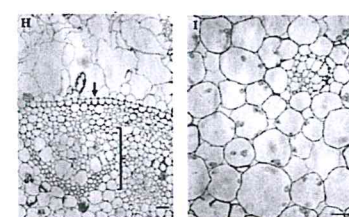


Fig. 5. Rizoma di *T. latifolia* T2-Met

Diversamente dalle foglie, I rizomi hanno mostrato alterazioni morfologiche simili in risposta ai metalli. I rizomi di *T. latifolia* T⁰ mostrano un'epidermide uniseriata (Fig. 4D, ep) che circonda un ipoderma multiseriato, con grandi cellule irregolari (Fig. 4D, hp). Al di sotto, la caratteristica più rilevante è la presenza di due regioni parenchimatiche distinte. La porzione più corticale (CP) è occupata da parenchima lacunoso con cellule molto grandi, altamente vacuolizzate, con geometrie variabili, pareti sottili e pochi plastidi che delimitano spazi aerei molto grandi (Fig. 4E). Il parenchima più interno (IP, Fig. 4E, F) è formato da cellule isodiametriche con numerosi amiloplasti e piccoli spazi intercellulari. In piante T2-Co e T2-Met la morfologia di CI ed IP non cambia, infatti le dimensioni delle cellule parenchimatiche misurate con il programma ImageJ non erano diverse in piante Met rispetto a piante Co ($p > 0.05$). Tuttavia, nell'IP di piante Met si osserva una significativa diminuzione nel numero di amiloplasti, rispetto al Co (confronta Fig. 4F e Fig. 5I). Una colorazione specifica per evidenziare i granuli di amido (Sudan Black) ha mostrato che mentre in rizomi di piante T⁰ e T2-Co non si osservano differenze nella presenza di amiloplasti e granuli di amido, nei rizomi di piante T2-Met una diminuzione significativa di granuli di amido è evidente, suggerendo l'influenza dei metalli nel metabolismo dei carboidrati. CP e IP sono separate da uno strato di cellule simile ad un endoderma, costituito da cellule con pareti ispessite nelle regioni radiali e tangenziali interne (Fig. 4E, freccia). In rizomi di piante T2-Met osservazioni tramite microscopia ottica hanno mostrato una riduzione degli ispessimenti di parete delle cellule dello strato "endoderm like", rispetto al controllo ($p < 0.05$; Fig 5H). Per confermare differenze nello spessore della parete nelle cellule dell'endoderma sezioni di rizomi di *T. latifolia* T2-Co e T2-Met sono state osservate al TEM (Fig.6). Nelle cellule del CP di Co e Met la parete cellulare è apparsa sottile e convoluta, il citoplasma è apparso occupato da un grande vacuole, con rari granuli di amido (Fig. 6A, D). Al contrario, le cellule dell' "endoderma" sono apparse molto diverse in T2-Met, rispetto a T2-Co (Fig 6b, E). Le pareti radiali e tangenziali interne nelle cellule dell'endoderma Co sono ispessite (Fig. 6B; cw), sia gli strati di parete primaria che secondaria appaiono uniformemente elettron densi, suggerendo una regolare deposizione/modificazione della parete.

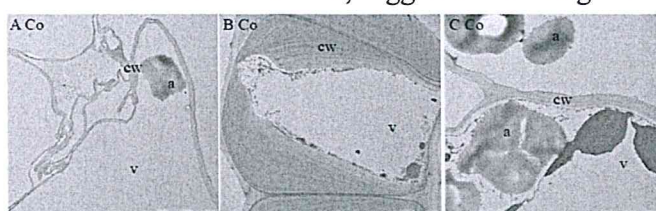


Fig. 6. (A-C) TEM di cellule parenchimatiche T2-Co *T. latifolia*. (D-F) TEM di cellule parenchimatiche T2-Met *T. latifolia*.

Al contrario, in rizomi di piante T2-Met le pareti delle cellule dell'endoderma appaiono più sottili e non

uniformemente elettrondense, con le pareti primaria e secondaria ben riconoscibili (Fig. 6E; pcw, scw), suggerendo alterazioni nella deposizione/rimodellamento della parete. Mentre la lamella mediana è spesso riassorbita tra le cellule parenchimatiche in T2-Co, permettendo così la formazione di ampi spazi intercellulari, in piante T2-Met la lamella mediana persiste tra le cellule parenchimatiche, inibendo la formazione di spazi intercellulari (Fig. 6C, D-F). Alterazioni nella struttura della parete cellulare sono state confermate anche da misure dello spessore; sia le pareti delle cellule IP che CP nei rizomi T2-Met appaiono significativamente più sottili rispetto al Co ($p < 0.05$), suggerendo un'influenza dei metalli sull'assemblaggio e modificazione della parete cellulare. Inoltre, a conferma delle osservazioni al microscopio ottico, nella CP si osserva un numero maggiore di amiloplasti in rizomi Co, rispetto ai trattati.

In rizomi di *T. palustris*, osservazioni di microscopia ottica ed elettronica hanno evidenziato la presenza di un aplomeristele, con grandi fasci conduttori perifloematici (Fig. 7).

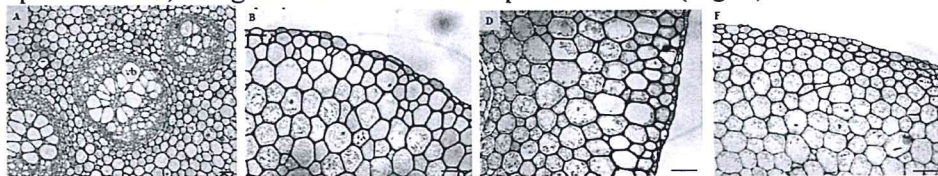


Fig. 7. Rizoma di *T. palustris* (A, B) T⁰; (D) T2-Co; (F) T2-Met.

Nei campioni di rizomi al T⁰ e al T2-Co le cellule parenchimatiche corticali e midollari appaiono isodiametriche, ricche di amiloplasti/granuli di amido e a delimitare piccoli spazi intercellulari (Fig. 7A, B, D). L'analisi delle dimensioni cellulari non ha mostrato differenze significative tra i T2-Co ed i T2-Met; tuttavia, come già riportato per *T. latifolia*, la colorazione con Sudan Black ha mostrato un aumento del numero di amiloplasti e dei granuli di amido nei campioni di rizomi T2-Co rispetto al T⁰ ed una significativa diminuzione nei T2-Met rispetto al T2-Co suggerendo che anche in *T. palustris* i metalli inducono una alterazione del metabolismo dei carboidrati. Le osservazioni al TEM hanno confermato differenze significative nello spessore della parete ($p < 0.05$) delle cellule parenchimatiche suggerendo alterazioni nella deposizione e nel rimodellamento della stessa parete (Fig. 8A, C, E) la diminuzione del numero di amiloplasti e dei granuli di amido in T2-Met rispetto al T2-C, in accordo con quanto descritto per *T. latifolia*.

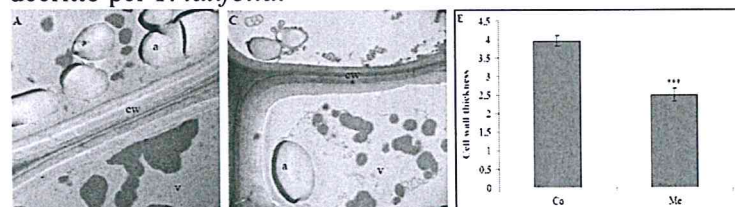


Fig. 8. Osservazioni al TEM. (A) T2-Co; (C) T2-Met; (E) spessore della parete in T2-Co e T2-Met.

In nessuna delle due specie nei T2-Met sono stati osservati inclusi elettrondensi, suggerendo che i metalli siano incorporati come ioni piuttosto che internalizzati come particelle insolubili. Questo non ha permesso di fare l'analisi elementare e gli studi di internalizzazione e "membrane trafficking" per determinare le vie di trasporto dei metalli nella cellula. A tale scopo, per avere una visione aggiornata delle tecniche per lo studio dei trasporti di membrana, la Dr.ssa Onelli aveva partecipato al Congresso "Unconventional Protein and Membrane Trafficking" (Lecce, 4-7 ottobre 2016). Le modificazioni nello spessore della parete cellulare nel parenchima dei rizomi suggerisce invece che i metalli possano essere incorporati nella matrice della parete stessa (pectine).

Per analizzare in maggiore dettaglio le alterazioni nella deposizione/rimodellamento delle pareti, sono stati condotti esperimenti di immunofluorescenza indiretta usando anticorpi (Ab) diretti contro le pectine metil esterificate (JIM7) e pectine parzialmente de-esterificate (LM19). Nei rizomi T2-Co delle piante di *T. latifolia*, gli Abs JIM7/LM19 hanno mostrato che in CP le pareti di tutte le cellule contenevano sia pectine metil esterificate che pectine de-esterificate.

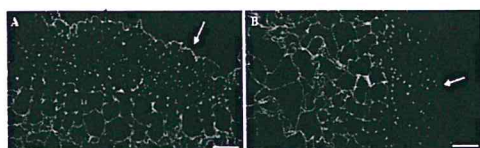


Fig. 9. Rizomi di *T. latifolia* (A) LM19 T2-Co; (B) LM19 T2-Met.

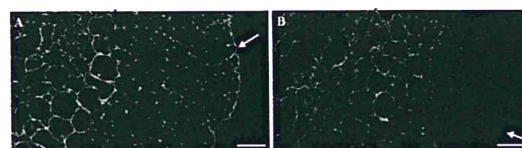


Fig. 10. Rizomi di *T. latifolia* (A) JIM7 T2-Co; (B) JIM7 T2-Met

Differenze nella distribuzione delle pectine tra il T2-Co ed il T2-Met sono state osservate porzione esterna della parete delle cellule epidermiche; mentre nel controllo questa porzione di parete è colorata da entrambi gli anticorpi, nei campioni trattati con i metalli, non si osserva alcuna colorazione (confronta Fig. 9A-B, freccia; Fig. 10A, B freccia). Inoltre la distribuzione delle pectine de-esterificate è apparsa più discontinua rispetto alle pectine metil esterificate e si concentra in piccoli tratti della parete. Al contrario, nella IP le pectine de-esterificate sono uniformemente distribuite nelle pareti cellulari, mentre le pectine esterificate sono maggiormente localizzate agli

angoli dei punti contatto tra le cellule. La stessa distribuzione negli angoli dei punti di contatto tra le cellule è stata osservata nell'IP sia per quanto riguarda le pectine esterificate che de esterificate.

I rizomi di *T. palustris* hanno mostrato modificazioni di parete più accentuate. Nell'epidermide e nel cortex le pectine de esterificate sono localizzate nello strato interno della parete primaria e nella lamella mediana. La parete primaria più vicina alla lamella mediana non mostra invece alcuna colorazione con L'Ab LM19 (Fig. 11 A, B frecce). Numerosi spazi intercellulari sono presenti tra le cellule parenchimatiche.

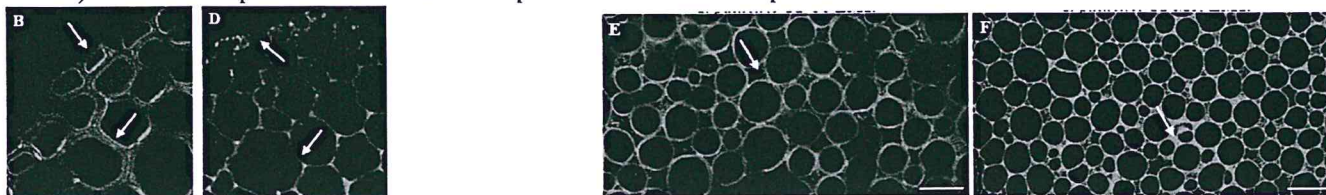


Fig. 11. (B, E) Rizomi di *T. palustris* LM19 (T2-Co); (D, F) LM19 (T2-Met).

In rizomi T2-Met nell'epidermide e cortex LM19 colora solo la lamella mediana, mentre nelle pith cells le pectine de esterificate sono localizzate in quantità abbondanti nelle regioni agli angoli dei punti di contatto tra le cellule, con corrispondente riduzione degli spazi intercellulari (Fig. 11F, H frecce).

Anche la localizzazione delle pectine esterificate cambia in T2-Met rispetto al Co. In T2-Co nelle cellule del cortex le pectine esterificate sono presenti nello strato interno della parete primaria e nella lamella mediana (Fig. 12B, frecce). Il trattamento con i metalli induce la scomparsa delle pectine esterificate dalla lamella mediana (Fig. 12 D frecce). Nella parete delle pith cells T2-Co le pectine esterificate sono distribuite in modo uniforme, ad esclusione degli angoli dei punti di contatto tra le cellule, in cui sono presenti ampi spazi intercellulari (Fig 12E).

In T2-Met, come osservato per le pectine de esterificate, Le pectine metil esterificate non vengono risassorbite agli angoli dei punti di contatto fra le cellule, limitando la formazione degli spazi intercellulari (Fig 12E, F; frecce).

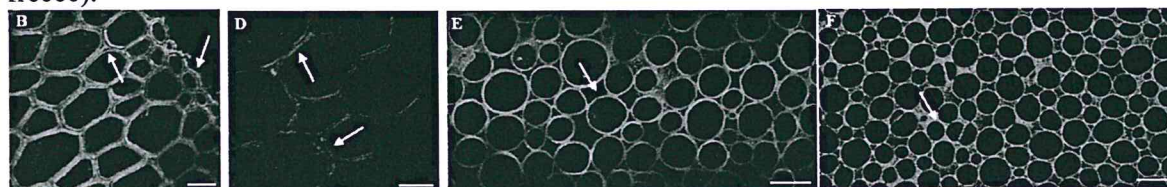


Fig. 12. (B, E) Rizomi di *T. palustris* JIM7 (T2-Co); (D, F) JIM7 (T2-Met).

L'analisi dei profili elettroforetici delle foglie e dei rizomi di *T. palustris* tramite elettroforesi su poliacrilamide 1D non hanno mostrato alcuna alterazione tra i campioni T2-Co ed i campioni T2-Met (Fig. 13A). I rizomi, dove i dati ICP hanno mostrato la maggiore concentrazioni dei metalli, sono stati analizzati anche tramite elettroforesi 2D ed anche in questo caso non sono state osservate differenze tra Co e Met (Fig. 13B).

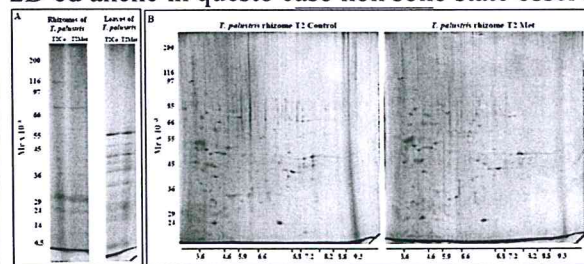


Fig. 13. *T. palustris* (A) Elettroforesi 1D foglie e rizomi; (B) Elettroforesi 2D rizomi.

Gli stessi campioni di *T. latifolia* sono stati analizzati tramite elettroforesi 1D; nessuna alterazione nel profilo elettroforetico è stato osservato tra i campioni T2-Co e T2-Met di foglie (Fig. 14A); Al contrario in rizomi di *T. latifolia* l'analisi elettroforetica 1D ha mostrato la diminuzione di polipeptidi con massa molecolare compresa tra 40 e 55 kDa (Fig. 14A, bande 1-3) ed l'aumento di un polipeptide di 56 kDa (Fig 14A, banda4) in piante T2-Met, rispetto al Co. L'analisi tramite spettrometria di massa ha permesso di identificare i 4 polipeptidi (Fig. 14B).

Per comprendere il ruolo delle proteine presenti in maniera differenziale nei campioni trattati rispetto al controllo, I polipeptidi sono stati tagliati da gel 1D e sottoposti ad identificazione tramite analisi to MALDI TOF/TOF MS (collaborazione con Prof Luca Bini, vedi sopra). L'analisi tramite spettrometria di massa ha identificati proteine appartenenti all'apparato citoscheletrico: α - e β -tubulina sono state identificate nelle bande 1 e 2, rispettivamente, mentre la banda 3 è stata identificata come actina, suggerendo che la presenza dei metalli induce una diminuzione delle proteine citoscheletriche e probabilmente delle alterazione nel pattern di distribuzione dei microtubuli e dei filamenti di actina. Nella banda 4 sono state identificate tre diversi polipeptidi, di cui quello più probabile (98%) è la cullina, una proteina coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare (Fig. 14B).

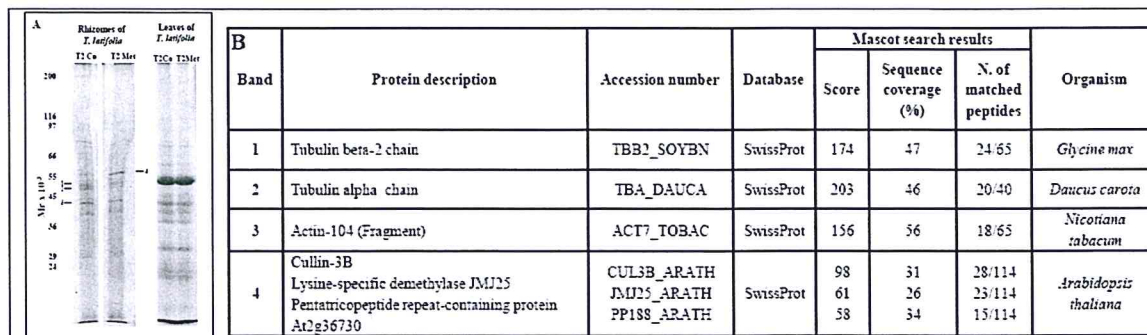


Fig. 14. *T. latifolia* (A) elettroforesi 1D analitiche di estratti proteici di foglie e rizomi (20 µg/lane); (B) analisi MS/MS.

L'analisi tramite elettroforesi 2D ha confermato differenze nel profilo elettroforetico tra T2-Co e T2.Met in *T. latifolia* (vedi report intermedio). Tuttavia la mancanza di riproducibilità nelle spot espresse differenzialmente tra Co e Met nei vari esperimenti fatti ci ha indotto ad usare i polipeptidi osservati tramite elettroforesi 1D per gli esperimenti di spettrometria di massa. Le variazioni di tubuline ed actine sono state confermate da esperimenti di western blotting usando Abs primari, anti β -tub (acquistato fattura Sigma n. 1792) ed anticorpi secondari (anti-mouse) già presenti in Lab. Esperimenti preliminari di immunofluorescenza sono stati tentati senza successo usando gli Abs anti- β tub e falloidina marcata (TRITC) (fattura Sigma 2995).

I reattivi per lo sviluppo delle reazioni di western (parte del materiale in ft Sigma 7110/7111) e la BSA per la saturazione (fattura 2995) delle membrane PVDF (già presenti in Lab) sono stati acquistati.

Bibliografia

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Moscatelli, A., Gagliardi, A., Maneta-Peyret, L., Bini, L., Stroppa, N., Onelli, E., Landi, M., Idilli, A. I., Moreau, P. (2015). Characterisation of detergent-insoluble membranes in pollen tubes of *Nicotiana tabacum* (L.). *Biol. Open* 1-22 doi:10.1242/bio.201410249.
- Rabilloud, T. (2009). Membrane proteins and proteomics: love is possible, but so difficult. *Electrophoresis* 30 Suppl. 1, S174-S180.
- Valcu, C.M. and Schlink, K. (2006). Efficient extraction of proteins from woody plant samples for two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 6, 4166-4175.

OR3. Disseminazione. Unità coinvolte: UO.1 Dipartimento di Bioscienze - UO2 Dipartimento VESPA.

1- Incontro con allevatori per discussione delle criticità.

2- Presentazione a convegni:

-Giugno 2017-Congresso: GREEN JOBS FOR A GREENER FUTURE: Università, Ricerca e Impresa unite per raccontare il mondo delle Biotecnologie dall'Agroalimentare, alla Chimica Verde all'Eco-Industria. Titolo presentazione: Le piante come alternativa agli antibiotici negli allevamenti intensivi. Milano, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Area della Ricerca Via Alfonso Corti, 12, 20133 Milano

Giugno 2017- Congresso dell'ASSOCIAZIONE ITALIANA SCIENZE PRODUZIONI ANIMALI

-Hejna M, Gottardo D, Baldi A, Dell'Orto V, Cheli F, Zaninelli M, Rossi L, 2018. Review: Nutritional ecology of heavy metals. *Animal*. 1-15 (doi:10.1017/S175173111700355X).

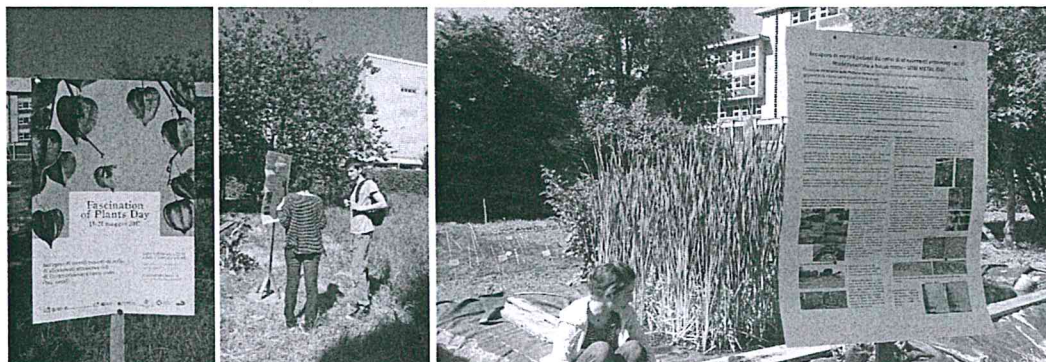
-Hejna M, Stroppa N, Moscatelli A, De Nisi D, Dell'Orto V, Pilu SR, Baldi A, Rossi L. 2017. Phytoremediation as an innovative approach to control heavy metals output from livestock. *Italian Journal of Animal Science* vol.16: s1, 128.

Presentazioni CONGRESSO del corso di Dottorato VAS.

-Hejna M, Moscatelli A, Stroppa N, Pilu SR, De Nisi D, Baldi B, Rossi L. 2018. Plant-based strategies to control the zinc output from swine production. *International Journal of Health, Animal Science, Food Safety*. Vol. V, No. 1s: 59-60.

-Hejna M, Baldi A, Onelli E, Gottardo D, Pilu SR, Dell'Orto V, Zaninelli M, Rossi L. 2017. Evaluation of heavy metals in intensive animal production systems. *Italian Journal of Animal Science*, vol.16: s1, 97.

3- Il progetto è stato presentato in occasione del Fascination of Plants Day, tenutosi il 13 maggio 2017 presso l'Orto Botanico Città Studi (vedi foto sotto).



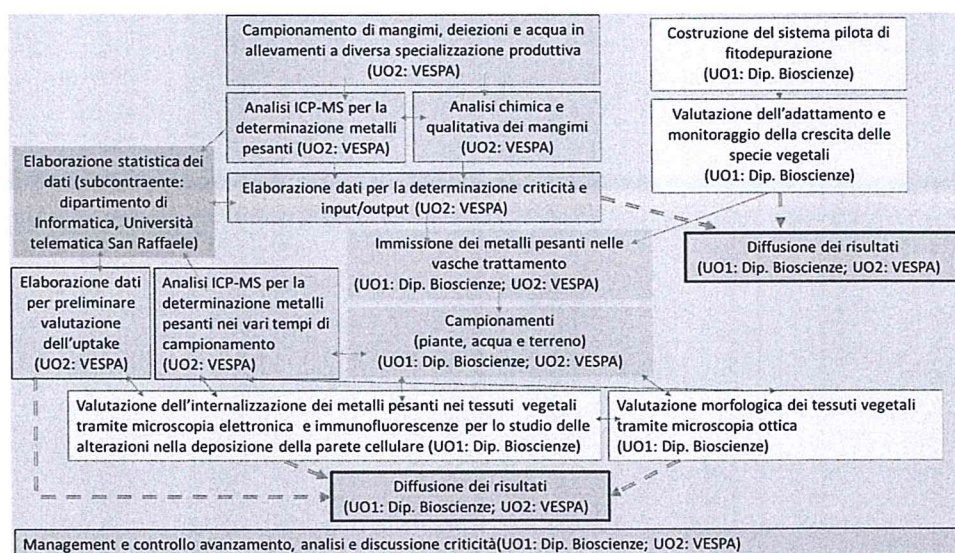
- 4- L'attività di disseminazione del progetto è stata promossa attraverso due articoli in:
 Green Planner <https://www.greenplanner.it/2017/06/26/metalli-pesanti-lowmetal/>
 NOVA Sole24Ore <http://nova.ilsole24ore.com/progetti/piante-apposta-per-pulire-le-citta/>
- 5- Il progetto e gli approcci sperimentali utilizzati sono stati oggetto di un seminario di due ore tenuto dalla Dr.ssa Nadia Stroppa e dalla Dr.ssa Monica Heina nell'ambito delle lezioni del corso di Laboratory Methods for Biodiversity (LM Sc. della Natura-Università degli Studi di Milano) nella.a.2017-2018. Inoltre
- 6- Inoltre i dati preliminari sono stati oggetto di lezioni accademiche presso i corsi di laurea di Medicina Veterinaria e Scienze delle Produzioni Animali.
- 7- Partecipazione agli eventi del festival dello sviluppo sostenibile 2018, <http://festivalsvilupposostenibile.it/2018>
- 8- tre articoli scientifici sono in preparazione dal titolo:
- Phytoremediation process as an innovative approach to control Zn and Cu output from swine farming system
 - Evaluation of Zn and Cu input/output from intensive animal production systems in North of Italy
 - Phytodepuration of water contaminated by metals using *T. latifolia* and *T. palustris*: a case of study.

10.3 Descrizione delle interazioni tra le UUOO partecipanti, eventuali collaborazioni esterne ed imprese (inserire diagramma) max 1 pag

Data la tematica e l'approccio multidisciplinare la ricerca ha visto coinvolti i Dipartimenti di Bioscienze (responsabile scientifico e coordinatore del progetto: Prof. Alessandra MOSCATELLI) e Dipartimento Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la sicurezza alimentare – VESPA, dell'Università degli Studi di Milano (responsabile scientifico per il Dipartimento VESPA: dott.ssa Luciana ROSSI).

Il Dipartimento di Bioscienze ha messo inoltre a disposizione le competenze dell'assegnista di ricerca dott.ssa Nadia Stroppa (la cui attività è dedicata al 100% al progetto), della dott.ssa Elisabetta Onelli, del Dr. Marco Caccianiga, e del personale dell'Orto Botanico Città Studi.

Analogamente il Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la sicurezza alimentare - VESPA ha messo a disposizione del progetto le competenze dell'assegnista di ricerca dott.ssa Monika Hejna (la cui attività è dedicata al 100% al progetto), della prof.ssa Antonella Baldi, del Prof. Vittorio Dell'Orto, della dott.ssa Raffaella Rebutti, del dott. Diego De Nisi, della dott.ssa Angela Lombardi nell'ultima fase del suo dottorato. Le attività della dott.ssa Lombardi, avendo lei terminato il contratto con UNIMI, sono state poi completate dalla dott.ssa Valentina Caprarulo.



A tale progetto ha collaborato inoltre laboratorio di informatica dell'Università Telematica San Raffaele per l'elaborazione statistica dei dati ottenuti. I dati raccolti sono stati elaborati statisticamente e presentati in un

report finale il 18/12/2017. Tali elaborati, che saranno messi a disposizione degli allevatori, serviranno soprattutto nelle situazioni critiche per mettere a punto dei correttivi studiati sulla realtà produttiva specifica. Questo aspetto è fondamentale in quanto per predire delle strategie di controllo dell'emissione di metalli inquinanti che risultino realmente efficaci.

I risultati raggiunti sono stati costantemente condivisi tra le unità operative attraverso riunioni bimensili in cui venivano anche monitorato il raggiungimento degli obiettivi progettuali.

L'interazione tra i gruppi di ricerca è rappresentata schematicamente nel diagramma DI Pert sopra riportato.

Tutti i ricercatori inclusi in questo progetto hanno collaborato alla fase di disseminazione, aspetto importante per trasferire le conoscenze raggiunte ad un ampio pubblico che non sia ristretto alla sola comunità scientifica. In particolare, la descrizione del progetto e lo stato di avanzamento delle sue attività sono state promosse attraverso campagne di informazione e sensibilizzazione via social network (Facebook, Twitter) con lo scopo di avvicinare il grande pubblico alle tematiche ambientali, di tutela e prevenzione dell'inquinamento del suolo. Inoltre, l'impianto di fitodepurazione e le finalità del progetto sono state presentate ai visitatori dell'Orto Botanico Città Studi, in occasione del Fascination of Plant Day che si è tenuto in data 13 maggio 2017.

10.4 Ostacoli occorsi ed azioni correttive messe in atto (max 1 pag)

N° WP	Ostacolo occorso	Azione correttiva
OR.1	1. Allevatori non disponibili a campionamenti presso le loro strutture	1. Ampliato il numero di richieste di disponibilità e aumentato il numero di campionamenti
	2. Resistenza degli allevatori a fornire mangime aziendale per campionamento	2. Assicurare anonimato nella diffusione dei risultati e acquisto di materie prime.
	3. Concentrazioni rilevate fuori range	3. Diluizione dei campioni
	4. Campioni di mangime con contenuto di metalli pesanti essenziali superiore ai limiti consentiti in mangimi senza additivi.	4. Acquisto e analisi delle materie prime per la valutazione del contenuto naturale di metalli pesanti nelle stesse.
OR.2	5. I tessuti vegetali di specie diverse differiscono nella composizione della parete cellulare. La procedura standard di disidratazione ed inclusione ha richiesto delle modifiche	5. Abbiamo cambiato la procedura allungando i tempi di disidratazione per ogni miscela di Etanolo. Sono state effettuate 3 prove diverse per ottimizzare il protocollo.
	6. Inagibilità per 2 mesi dei locali adibiti alla microscopia nel Dip. di Bioscienze (vedi report intermedio).	6. Concessa proroga del progetto di due mesi (report intermedio)
	7. Per le osservazioni al TEM, nel progetto è riportata la tecnica di HPRF. Sono state fatte delle prove non fruttuose. L'elevata quantità di acqua delle specie in esame, avrebbe richiesto molti esperimenti, con ulteriore allungamento dei tempi.	7. Data la buona preservazione dei tessuti ottenuta con la fissazione chimica, abbiamo proceduto con quel tipo di approccio. L'osservazione al TEM ha permesso di evidenziare alterazioni nello spessore della parete in piante T2-Met, inducendoci ad approfondire lo studio della composizione della parete in rizomi
	8. UO. BIOSCIENZE - La centrifuga Beckman, il microscopio ottico Leica e l'ultramicrotomo hanno evidenziato dei problemi di funzionamento.	8. Per tutti questi strumenti è stato effettuato un intervento tecnico di riparazione e manutenzione, previsto inizialmente da budget per i microtomi a disposizione del Dipartimento
	9. A causa dell'attivazione degli assegni di	9. Al fine di svolgere al meglio l'attività di ricerca

ricerca con contenuto anticipo rispetto alla data di inizio del progetto, come da decreto, il valore impiegato per il personale risulterebbe inferiore al previsto.

abbiamo dedicato tale avanzo al prolungamento degli assegni di ricerca attivati mediante idonea collaborazione a progetto di due mesi per le due assegniste già assegnate al progetto.

10. I costi per lo svolgimento di missioni connesse alle prove sperimentali (Dip. Bioscienze) si sono rivelati inferiori rispetto all'atteso, in quanto l'unità ha potuto beneficiare di servizi interni per il trasporto di materiali (piante e altri campioni). I costi per la partecipazione a congressi di settore hanno evidenziato parimenti una riduzione, grazie alla partecipazione a iniziative di divulgazione organizzate dagli stessi Dipartimenti, che hanno quindi minimizzato le spese di trasferta (circa 464 Euro su un totale di 668 Euro nella voce di spesa Coordinamento).

10. Tale contrazione è stata compensata entro i limiti previsti dalle Linee guida, con una maggiore necessità di materiali di consumo necessari allo svolgimento delle prove sperimentali, di servizi e di manutenzioni.

11. La dott.ssa Angela Lombardi (UO VESPA) ha terminato il contratto di lavoro con UNIMI per presa servizio in altra struttura.

11. La sua attività è stata portata a termine sia dagli altri membri del team di ricerca sia dalla dottoressa Valentina Caprarulo, che ha preso servizio a ottobre 2017 prima con contratto di collaborazione poi con assegno di ricerca.

12. Il pagamento della attività (conclusasi in data 18/12/2017) del laboratorio di informatica del San Raffaele, non è avvenuto nei tempi operativi del progetto a causa di problemi tecnici di emissione e ricezione della fattura elettronica tra i due istituti universitari.

12. Il pagamento della attività di consulenza è avvenuto dopo la scadenza del progetto sebbene la fattura sia stata emessa e l'attività si sia conclusa molto prima rispetto alla chiusura del progetto. Tale attività, come descritto nella presente relazione tecnica è stata fondamentale per la realizzazione degli obiettivi prefissati dal progetto. Si allega a supporto, tra i giustificativi di spesa, la relazione tecnica realizzata dal fornitore a seguito della propria attività di consulenza

13. Nel budget speso per le missioni del Dipartimento VESPA sono incluse 3 missioni antecedenti l'avvio ufficiale del progetto ma comunque successive alle fasi di accettazione del finanziamento. Una missione è riferita ad un congresso internazionale a Gent della società scientifica Molecular Farming, dove sono stati discusse le principali innovazioni nell'impiego delle piante come sistema di produzione di molecole ad interesse globale. La seconda è relativa alla partecipazione ad un congresso di NutriMI, la più grande community di Professionisti della Salute nel campo dell'Alimentazione e della Nutrizione. La terza è riferita invece ad una visita presso un mangimificio di riferimento del territorio Cremonese.

13. Tali missioni hanno rivestito una importanza fondamentale nella gestione delle attività progettuali, data la rilevanza internazionale e il focus dei due congressi. Il confronto con la comunità scientifica internazionale sia nell'ambito delle green biotechnologies che nella medicina umana ha permesso di guidare meglio il piano di lavoro nell'ottica della multidisciplinarietà. In particolare sono state considerate le alternative biotecnologiche disponibili nella comunità scientifica in termini di fitorimedio e si sono definiti meglio le criticità, nell'ambito della medicina umana, connesse alla presenza di metalli pesanti nelle produzioni agricole (animali e vegetali).

Vista l'esigenza di partire per tempo con la fase di campionamento nelle aziende agricole il contatto con l'azienda mangimistica ci ha invece permesso inizialmente di individuare un ventaglio di allevatori che si sono poi in seguito resi

disponibili all'indagine successiva.

14. Nel budget previsto per il Dipartimento VESPA erano previsti 7.000 euro relativi alla voce C "Spese per attività esterna", suddivisi rispettivamente in 3.000 euro di Consulenze e 4.000 euro per manutenzioni e riparazioni. In sede di rendicontazione risultano spesi solamente circa 1.800 euro per consulenze tecniche, relativi alla summenzionata fattura del laboratorio di informatica del San Raffaele ed una cifra di poco superiore ai 5mila euro relativa alle manutenzioni

14. Durante il corso delle attività progettuali, si sono rese necessarie maggiori attività di manutenzione e riparazione alla strumentistica di laboratorio rispetto a quanto preventivato. Nello specifico sono state effettuate manutenzioni e riparazioni sulle celle frigorifere, su un generatore di azoto, su un Microscopio Nikon e su ulteriore apparecchiatura maggiormente descritta nel rendiconto analitico. Sono state invece necessarie meno consulenze esterne rispetto al preventivato, in quanto si è riusciti a svolgere internamente grazie al Personale del Dipartimento adibito al Progetto le attività originariamente previste.

16. Si segnala che per quanto riguarda la documentazione relativa ai mandati di pagamento delle fatture attribuite al Progetto, questi riguardano solamente il pagamento della parte imponibile delle stesse, rispetto invece alla totalità (imponibile+Iva), in quanto i due Dipartimenti coinvolti, come tutta la Pubblica Amministrazione, sono soggetti allo split payment.

16. Per tale motivo si allega una dichiarazione firmata da parte dell'amministrazione centrale dell'Università degli Studi di Milano che attesta e certifica che tutta la parte relativa all'Iva dovuta per le fatture attribuite al Progetto Low Metal da parte dei due Dipartimenti coinvolti (UO VESPTA e UO BIOSCIENZE) è stata regolarmente versata tramite F24 durante tutta la durata delle attività progettuali.

Timbro Istituzione 	Il coordinatore del progetto <i>nome e cognome: Alessandra Moscatelli</i> <i>firma</i> 
--	---

RENDICONTO COMPLESSIVO (A cura del responsabile di gestione del progetto)

Voci di costo	Periodo Finale				
	Costo approvato ⁷	Contributo concesso ⁸	Importo rendicontato		Totale
			UO 1	UO 2	
A1) Personale a tempo determinato	57.000	54.150	26.138,79	34.356,14	60.494,93
A2) Missioni nazionali ed estere	6.000	5.700	465,51	3105,22	3.570,73
Subtotale Personale	63.000	59.850	26.604,30	37.461,36	64.065,66
B) Materiale di consumo	58.000	55.100	34.235,76	35.144,85	69.380,61
C) Attività esterne	16.750	15.912,50	10.427,34	7.102,06	17.529,4
C1 – Consulenze	3.000	2.850		1.830	1.830
C2 – Convenzioni					
C3 - Manutenzioni ecc.	8.750	8.312,50	4.937,34	5.272,06	10.209,40
C4 - Servizi	5.000	4.750	5.490		5.490
C5 - fitti					
D) Attrezzature					
E) Spese generali	13.775	13.086,25	7.124,74	7.970,83	15.095,57
F) Coordinamento	1.378	1.309,10		854,42	854,42
TOTALE	152.903	145.257,85	78.392,14	87.679,10	166.925,66

Timbro Istituzione beneficiaria del contributo 	Il responsabile di gestione nome e cognome: Stefania Varotto firma: <i>Stefania Varotto</i>
--	---

Note alla compilazione

Nota generale: per la compilazione utilizzare carattere Times New Roman, non inferiore a 11, considerando che a tali criteri si riferisce la lunghezza massima delle parti testuali da compilare, ove indicato.

¹ Indicare DM di concessione.

² Indicare DM di concessione.

³ Indicare DM di concessione.

⁴ In caso di progetto di durata superiore a 36 mesi indicare nella colonna a fianco a quale periodo si riferiscono le attività descritte.

⁵ Solo per progetti di durata superiore a 36 mesi.

⁶ le spese rendicontate devono essere pari al 70% dell'importo percepito a titolo di anticipo sul contributo complessivo previsto per l'intero progetto, pertanto a tale quota concorrono le percentuali di spesa di ciascuna UUOO; è possibile che una delle UO concorra in misura minore al raggiungimento del 70 % e comunque non inferiore al 50% dell'importo ricevuto come anticipo; in tal caso la quota di contributo "mancante" dovrà essere compensata dalle spese dell' altra istituzione partecipante.

⁷ Riferito al costo complessivamente approvato.

⁸ Indicare per ogni voce l'importo corrispondente alla % ricevuta del contributo complessivo ottenuto.