



Centro Università degli Studi di Milano - Scuola per la diffusione delle Bioscienze

SOS ambiente: la natura risponde

Utilizzo di piante di Arabidopsis thaliana per la rilevazione di metalli pesanti nel suolo



Università degli Studi di Milano

INTRODUZIONE TEORICA: LE PIANTE COME BIOINDICATORI PER IL MONITORAGGIO AMBIENTALE

SCOPO DELL'ATTIVITA'

Lo scopo dell'attività è quello di rivelare la presenza di cadmio, un metallo pesante particolarmente tossico, nel suolo. Per fare questo utilizzeremo un approccio molecolare e la pianta *Arabidopsis Thaliana* come bioindicatore.

1 – Bioindicatori e bioaccumulatori

Un indicatore biologico, o **bioindicatore**, è un organismo (o un sistema biologico) che possiamo utilizzare per valutare una modificazione della qualità dell'ambiente. I bioindicatori, in presenza di uno stress naturale o antropico (ad esempio la presenza di un contaminante nel suolo), subiscono variazioni facilmente rilevabili del proprio stato naturale. Queste variazioni possono riguardare diversi livelli di organizzazione biologica: si va dai danni al patrimonio genetico, a modificazioni morfologiche e della vitalità, fino a variazioni nella struttura della comunità. Ad esempio: la qualità delle acque dolci può essere monitorata studiando la composizione delle comunità di invertebrati. La diminuzione della fertilità e del numero di specie di licheni (organismi simbiotici formati da un'alga ed un fungo) è invece indice di inquinamento atmosferico. Altre variazioni possono essere di tipo morfologico e funzionale. Ad esempio, sempre nei licheni, l'inquinamento atmosferico ne causa lo scolorimento e/o la riduzione del "corpo".



Fig.1: Usnea (barbe di bosco): lichene particolarmente sensibile alle alte concentrazioni di azoto



Fig.2: Xanthoria parietina: lichene amante dei composti azotati, per esempio quelli contenuti nel guano degli uccelli

Alcuni di questi organismi bioindicatori, però, non sopportano bene il cambiamento delle condizioni ambientali e quindi, una volta modificate le proprie caratteristiche, periscono. Altri bioindicatori, invece, hanno la capacità di resistere al cambiamento e sono anzi in grado di

sopravvivere alla presenza di un contaminante assimilato e di concentrarlo al proprio interno: si parla in questo caso di **bioaccumulatori**.

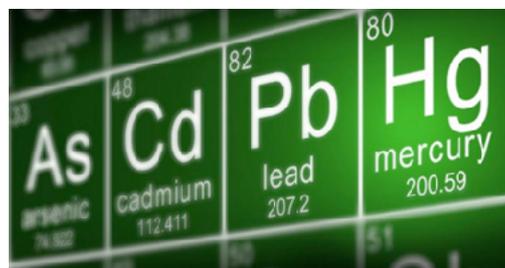
Le piante sono ottimi bioindicatori e bioaccumulatori, soprattutto per quanto riguarda la qualità del suolo e delle acque. L'utilizzo delle piante come bioindicatori presenta alcuni vantaggi, legati principalmente alla loro natura di organismi sessili, naturalmente adatti alla crescita sul suolo e la cui coltivazione è relativamente facile e poco costosa. Inoltre, le piante rappresentano il principale punto di ingresso degli inquinanti e dei composti tossici all'interno della catena alimentare umana e animale.

Avendo la capacità di accumulare al loro interno gli inquinanti, le piante sono anche gli organismi perfetti per il biorisanamento, più specificamente il **fitorisanamento**, di ambienti contaminati (vedi appendice alla fine della dispensa).

2 – La tossicità dei metalli pesanti

Tra i contaminanti più abbondanti e pericolosi presenti nell'acqua e nel suolo troviamo i metalli pesanti. Alcuni di essi, come il rame (Cu) e lo zinco (Zn), sono in realtà elementi essenziali per il funzionamento degli organismi, e diventano tossici solo ad alte concentrazioni. Ad esempio, il Rame svolge un ruolo fondamentale per la costituzione del complesso enzimatico della citocromo ossidasi necessario alla respirazione cellulare.

Altri metalli invece, come il Cadmio (Cd), il Mercurio (Hg) e il Piombo (Pb), non rientrano nel gruppo dei micronutrienti e non esplicano nessuna funzione biologica. Molti di essi sono tossici anche a concentrazioni molto basse e hanno effetti negativi sullo sviluppo e sulla crescita degli organismi.



La tossicità dei metalli pesanti si deve alla loro capacità di interagire nei meccanismi biologici a livello cellulare e molecolare. I metalli pesanti possono entrare all'interno delle cellule attraverso gli stessi sistemi di trasporto usati dai metalli essenziali. Una volta dentro la cellula, essi possono legarsi ai gruppi solfidrici delle proteine ed ai siti attivi degli enzimi che contengono ossigeno, zolfo o azoto in forma di gruppi $-OH$, $-COO^-$, $-SH$, $-NH_2$ inibendo la loro attività biologica o modificandone la struttura. Altri danni dovuti ai metalli pesanti sono di natura genotossica, causando l'alterazione dell'integrità strutturale e funzionale del DNA attraverso la modificazione delle basi azotate, la rottura della doppia elica e riarrangiamenti della molecola. Questi danni sono conseguenza dell'azione ossidante sul DNA esercitata dall'ossigeno attivo e da altri radicali liberi prodotti in reazioni redox catalizzate dai metalli.

L'effetto globale di questi meccanismi si manifesta in genere con un'alterazione delle funzioni della pianta come la fotosintesi, la respirazione, l'assorbimento di nutrienti minerali, o con alterazioni nella struttura della membrana e nell'espressione genica.

L'entità degli effetti tossici esercitati dai metalli dipendono da molteplici fattori quali: le concentrazioni raggiunte nei tessuti, i legami e le interazioni che si stabiliscono tra il metallo e i componenti cellulari, lo stato di ossidazione e la forma chimica in cui il metallo è assorbito o viene a contatto nei tessuti con le strutture che sono il bersaglio dell'azione.

3 – Il destino dei contaminanti ambientali nella catena alimentare

Molti inquinanti arrivano alle piante come conseguenza delle intense attività dell'uomo. Le sorgenti predominanti di origine antropica di metalli pesanti sono la combustione e i processi industriali, in particolare l'attività mineraria, le fonderie e le raffinerie, la produzione energetica e l'incenerimento dei rifiuti.

Attraverso le radici le piante assorbono ioni e composti chimici presenti nel terreno, che si diffondono poi all'intero corpo della pianta, incluse le parti eduli. Gli organismi autotrofi sono il punto di partenza delle catene alimentari da cui dipende l'esistenza degli organismi eterotrofi (consumatori). Per questo, i metalli pesanti non sono pericolosi solo per le piante o altri organismi che li assorbono direttamente dall'acqua e dal terreno, ma anche per tutti i consumatori più in alto nella catena alimentare.

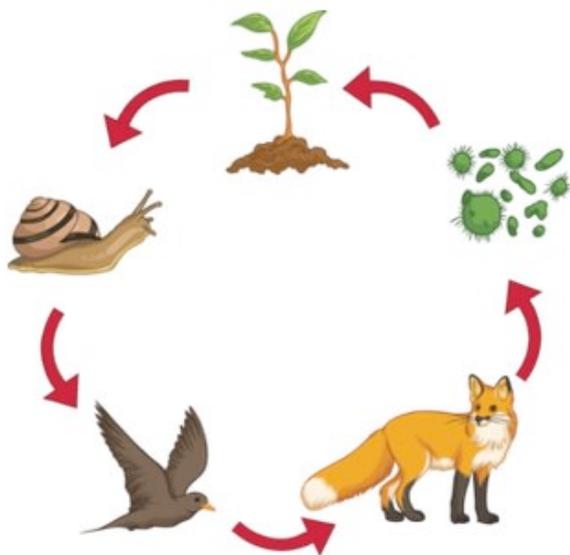


Fig.3: La catena alimentare rappresenta il flusso di energia e nutrienti attraverso diverse specie in un ecosistema. Il primo anello è rappresentato dai produttori primari, come le piante, o le alghe, che utilizzano l'energia solare per produrre cibo tramite la fotosintesi. Seguono i consumatori primari, come gli erbivori, che si nutrono dei produttori. I consumatori secondari, come i carnivori, si alimentano degli erbivori, e così via, fino ai decompositori, come funghi e batteri, che scompongono la materia organica e restituiscono i nutrienti al suolo.

Le sostanze tossiche che entrano nella catena alimentare, se non sono metabolizzate dagli organismi, come i metalli pesanti, si accumulano passando da un livello trofico all'altro (consumatori primari, secondari, terziari...). Tale processo di accumulo è detto **biomagnificazione**.

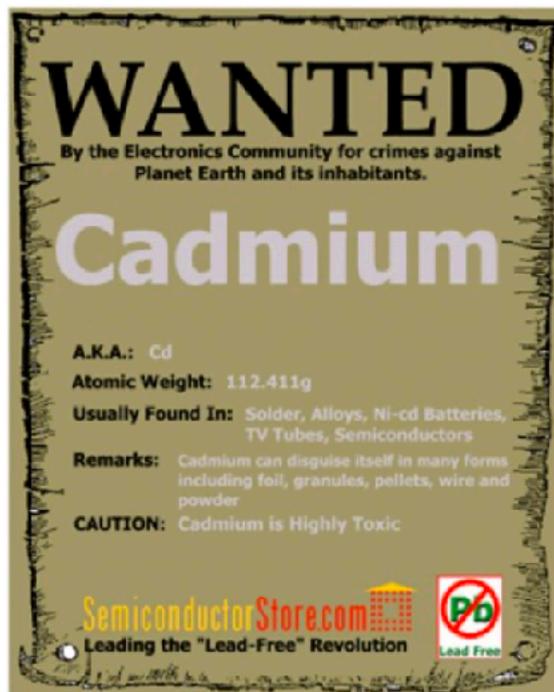
Ne consegue che i consumatori quaternari, come l'uomo, sono gli organismi maggiormente esposti a sostanze tossiche persistenti.

Un esempio noto è l'accumulo di DDT che negli anni '50-'60 ha determinato il declino in popolazioni di aquile e di altri rapaci, poiché causava un'eccessiva fragilità del guscio delle loro uova.

4 – Il caso del Cadmio

Tra i metalli non essenziali, il Cadmio è uno di quelli di maggior impatto rispetto sia all'esposizione delle piante sia all'accumulo nella catena alimentare. La sua rilevanza come contaminante ambientale e la sua mobilità relativamente alta nel sistema suolo-pianta hanno reso questo metallo tossico il più studiato nelle piante. Il Cadmio è un'impurità contenuta nei fertilizzanti a base di fosfati. Le quantità possono essere molto piccole, però il suo accumulo è costante e progressivo.

Il Cadmio è un elemento **biopersistente**: una volta assorbito da un organismo, rimane in esso per molti anni (dell'ordine di decine per gli uomini) prima di venire smaltito. Alcune proprietà tossicologiche del Cadmio derivano dalla sua somiglianza chimica con lo zinco, un micronutriente essenziale per piante, animali ed esseri umani.



Negli organismi vegetali, l'esposizione ad elevate concentrazioni di Cd^{2+} comporta l'inibizione della crescita, sia delle radici che della parte aerea della pianta, la comparsa di decolorazione delle foglie (clorosi fogliare), l'alterazione del bilancio idrico, l'inibizione dell'apertura stomatica ed una diminuzione della biosintesi della clorofilla. La tossicità del Cadmio potrebbe essere legata a interferenze con numerosi processi come il metabolismo dei carboidrati, l'assorbimento e la riduzione del nitrato, la catalisi enzimatica, il bilanciamento idrico e la fotosintesi. Si pensa che la maggior parte di questi effetti sia legata all'estrema capacità del Cadmio di legare i gruppi sulfidrilici delle proteine, portando all'inattivazione enzimatica. Inoltre, l'accumulo di Cadmio induce stress ossidativo, come evidenziato dalla formazione di specie reattive dell'ossigeno, quali l'anione superossido e il perossido d'idrogeno.

L'assorbimento di cadmio da parte degli esseri umani avviene principalmente attraverso il cibo. Alimenti ricchi di Cadmio (fegato, funghi, crostacei, mitili, polvere di cacao ed alghe secche) possono notevolmente aumentarne la concentrazione nel corpo umano.

Il cadmio è trasportato al fegato principalmente tramite il sangue. Nel fegato si lega alle metallothioneine (proteine caratterizzate da un alto contenuto in cisteina e con grande affinità per i metalli pesanti), per formare complessi che vengono poi trasportati ai reni. Qui il cadmio si accumula, danneggiando i meccanismi di filtrazione causando l'escrezione di proteine essenziali e zuccheri, arrecando danni anche al rene stesso. Occorre molto tempo prima che il Cadmio accumulato nei reni sia espulso dal corpo umano.

5 - I meccanismi di difesa delle piante

Nel corso dell'evoluzione le piante hanno sviluppato una serie di meccanismi implicati, a livello cellulare, nella detossificazione e quindi nella **tolleranza** ai metalli pesanti. Si possono distinguere due strategie: esclusione e resistenza.

Meccanismi di ESCLUSIONE: impediscono l'accumulo di concentrazioni tossiche nei siti sensibili all'interno della cellula, e quindi prevenendo gli effetti negativi.

La simbiosi con **funghi micorrizici** può essere considerata un meccanismo di esclusione poiché le micorrize possono alleviare gli effetti tossici dei metalli sulla pianta che le ospita. I funghi micorrizici sono organismi molto diffusi in natura che crescono dentro le radici delle piante e nel terreno circostante facilitando l'assorbimento minerale da parte della pianta grazie alle ife del fungo. Queste sembrano inoltre avere un ruolo nel ridurre il movimento dei metalli pesanti verso le radici della pianta ospite tramite la secrezione extracellulare di sostanze chelanti come la glomalina.

Un altro potenziale meccanismo di esclusione può essere individuato a livello della **parete cellulare**. Sembra che essa sia in grado di legare i metalli pesanti e limitarne quindi l'assorbimento da parte della pianta.

Meccanismi di RESISTENZA: riguardano in genere lo sviluppo di proteine che permettono alla pianta di resistere agli effetti dei metalli pesanti. Uno dei meccanismi forse più noti e studiati di tolleranza e detossificazione di metalli pesanti è la produzione, da parte della pianta, di proteine con un'alta affinità per i metalli, dette **FITOCHELATINE** (abbreviate come 'PC', dal termine inglese PhytoChelatin).

6 - Fitochelatine (PC), fitochelatina-sintasi (PCS) e glutazione

Le fitochelatine (PC) sono proteine con proprietà CHELANTI: sono ossia in grado di chelare (dal greco chēlé = forbice) i metalli pesanti schermanoli e facilitandone la segregazione, evitandone l'ingresso nelle vie metaboliche della cellula. Queste proteine appartengono alla famiglia delle metallothioneine e sono quindi caratterizzate da un alto contenuto in cisteina. Questo aminoacido contiene il gruppo solfidrico (-SH), che è in grado di formare complessi con i metalli pesanti. Le fitochelatine, ricche di gruppi SH, agiscono quindi da "tampone cellulare", complessando i metalli e facilitandone lo stoccaggio in una forma inerte. Le fitochelatine sono prodotte da enzimi chiamati Fitochelatine-Sintasi (PCS), attraverso la condensazione di più molecole di glutazione, un tripeptide costituito da tre amminoacidi: acido glutammico, cisteina e

glicina. Il glutatione è presente nelle piante, negli animali, nei funghi e in alcuni batteri a aceta. Grazie alla sua azione antiossidante, è in grado di prevenire i danni a importanti componenti cellulari causati dalle specie reattive dell'ossigeno, tra cui radicali liberi, perossidi, perossidi lipidici e metalli pesanti. Nelle piante è coinvolto nella gestione dello stress, proprio come precursore delle fitochelatine. Inoltre è essenziale per un'efficiente difesa contro alcuni agenti patogeni delle piante, quali *Pseudomonas siringae* e *Phytophthora brassicae*.

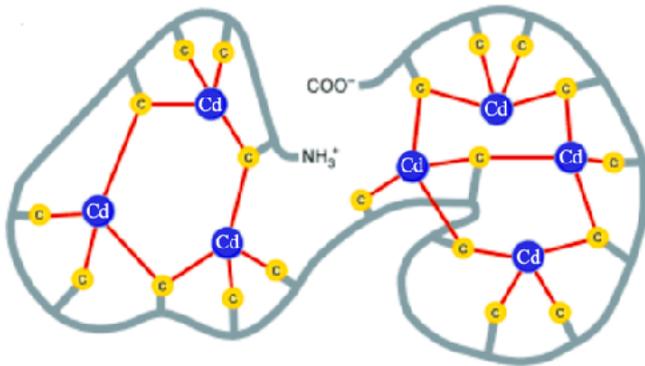


Fig.4: struttura semplificata di una fitochelatina. L'abbondanza di cisteine (C), che rappresentano un terzo di tutti gli amino acidi presenti, permette il legame con svariati metalli pesanti, come ad esempio il cadmio (Cd)

La produzione di fitochelatine avviene in modo metallo-dipendente, ovvero: se la pianta si trova in presenza/ha assunto grandi quantità di metalli, viene indotta la sintesi di nuove molecole di PCS che portano alla produzione delle fitochelatine. Se il contenuto di metallo diminuisce, la sintesi di PCS viene rallentata e quindi anche la produzione di PC.

Espressione genica

In biologia e genetica molecolare, l'espressione genica è il processo attraverso cui l'informazione contenuta in un gene (DNA) viene trascritta in un RNA messaggero (mRNA) che viene quindi "letto" e tradotto in una proteina.

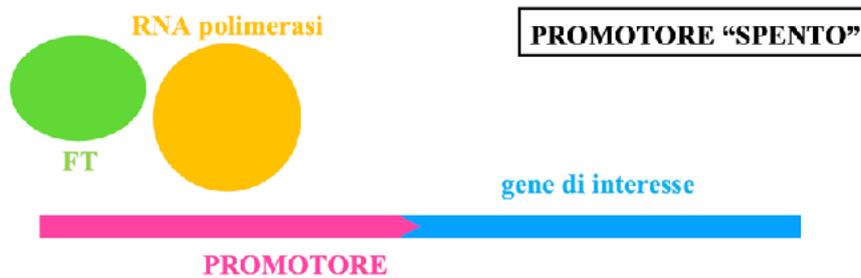
Il genoma di un organismo contiene le informazioni per produrre migliaia di proteine diverse. Non tutte però devono essere espresse in ogni momento. Se una proteina non è utile, per esempio se non è presente il suo substrato, sarebbe uno spreco di energia per la cellula produrre tale proteina.

Per questo motivo le cellule, sono in grado di "accendere" e "spegnere" la trascrizione di alcuni geni a seconda delle necessità e delle condizioni.

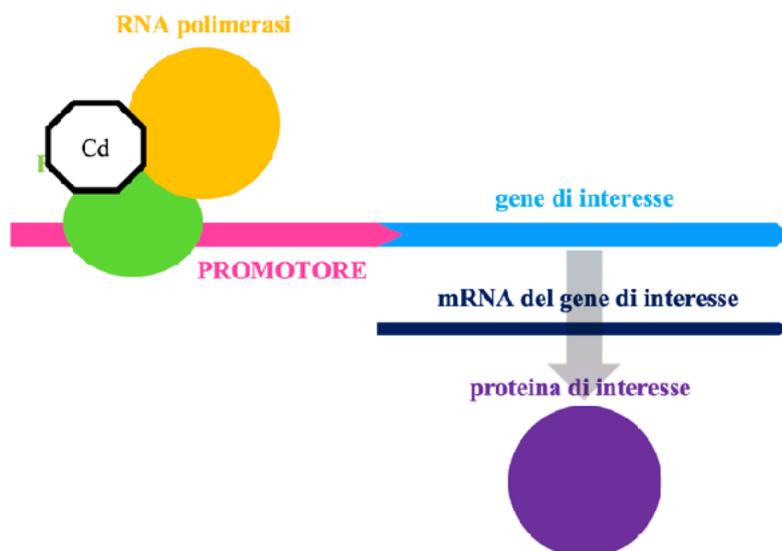
Questo processo è conosciuto come **regolazione dell'espressione genica** ed avviene mediante zone specifiche di DNA non codificante, posizionate generalmente a monte del gene di interesse. Queste regioni sono dette PROMOTORI e fungono da "interruttore" per l'attivazione/inattivazione della trascrizione. Lo stato di attivazione dipende dalla presenza o meno, sul promotore, di una classe di proteine chiamate fattori di trascrizione (FT). Questi, a loro volta, sono in grado di richiamare sul gene l'enzima RNA polimerasi necessario per la trascrizione, e quindi l'espressione della proteina.

Nel caso del gene della Fitochelatina sintasi (PCS), il fattore di trascrizione può legarsi al promotore solo in presenza di un metallo pesante, come il cadmio. In questo modo, se non ci sono metalli da

chelare, l'interruttore per l'espressione della PCS è spento perchè il FT non può legarsi al promotore. In queste cellule non si avrà l'mRNA del gene e quindi nemmeno la proteina (vedi figura).



L'interruttore si accende invece quando i metalli sono presenti ed è quindi utile l'azione delle fitochelatine. In queste condizioni il FT assieme al metallo pesante (Cd) si legherà al promotore, verrà prodotto l'mRNA e conseguentemente l'enzima PCS che a sua volta catalizzerà la sintesi delle fitochelatine. Questo significa che solo le piante esposte ai metalli pesanti produrranno l'mRNA PCS e, quindi, successivamente la proteina PC. La presenza di fitochelatine o di fitochelatina sintasi nei tessuti vegetali può essere quindi usata come indicatore molecolare della presenza di metalli pesanti nel terreno.



6 - Usiamo l'*Arabidopsis thaliana* per rivelare la presenza di Cd nel terreno

La pianta che abbiamo scelto come reporter è l'*Arabidopsis thaliana* (o arabetta comune): una pianta annuale, cosmopolita e molto comune sui sentieri e sui muri dei giardini. Appartiene alla famiglia delle *Brassicaceae*, la stessa del cavolo e della senape. L' *Arabidopsis thaliana* è l'organismo modello di elezione per lo studio della genetica e della biologia molecolare e cellulare nelle piante, grazie a una serie di vantaggi:

- *Piccole dimensioni*, che la rendono ideale negli spazi ristretti dei laboratori e delle serre negli istituti di ricerca;
- *Breve ciclo vitale*, di circa 6 settimane;
- *Elevata produttività di semi*, fino a 10.000 semi per pianta;
- *Capacità di auto-impollinarsi*;
- *Genoma di piccole dimensioni*, circa 135 milioni di basi (Mb), in soli cinque cromosomi.

Infine, *Arabidopsis* è la prima pianta da fiore di cui sia stato sequenziato il genoma, grazie a una ricerca avviata nel 1991 dalla Commissione Europea e basata sulla collaborazione dei laboratori di 15 paesi.

I geni *PCS* Cadmio-dipendenti in *Arabidopsis* sono 2 e sono distribuiti sui 2 dei 5 cromosomi, come mostrato nella figura che segue. *PCS1* e *PCS2* sono espressi abbondantemente nelle foglie e nelle radici e la loro espressione è indotta Cadmio e da altri metalli pesanti, tra cui il Piombo.



Nota bene: non è possibile determinare la presenza di Cd analizzando il DNA delle piante. Queste contengono il gene della PCS indipendentemente dalla presenza o meno del metallo pesante. La differenza consiste nell'effettiva trascrizione del gene e dalla successiva espressione della proteina. La rilevazione della proteina PCS è una strada percorribile, ma necessita di anticorpi specifici e di molto più tempo.

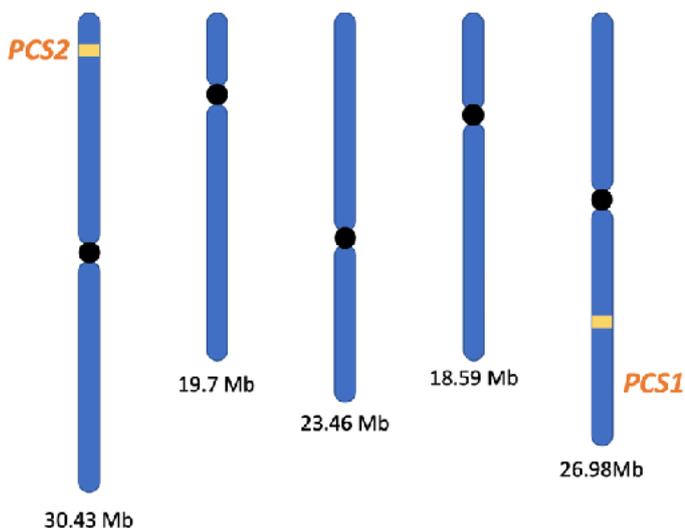
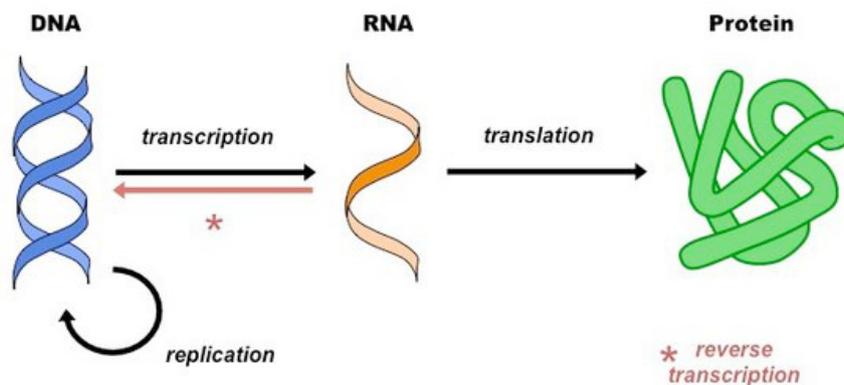


Fig.5 - Rappresentazione dei 5 cromosomi dell'*Arabidopsis thaliana*, con le rispettive dimensioni in megabasi (Mb). I due geni per le fitochelatine sintesi (*PCS1* e *PCS2*) sono localizzati rispettivamente sul cromosoma 5 e 1.

Molto più pratica è invece l'analisi degli acidi nucleici, che possono essere amplificati molte volte e visualizzati più facilmente. L'amplificazione di specifici tratti di DNA è possibile grazie alla tecnica della PCR, che però è in grado di amplificare solo tratti a doppio filamento. Per utilizzare questa tecnica sull'mRNA, che è a singolo filamento, è necessario un ulteriore passaggio. L'mRNA deve essere retro-trascritto ed essere convertito in una molecola di DNA a doppio filamento chiamata cDNA.

La retrotrascrizione

La retrotrascrizione, nota anche come trascrizione inversa, è un processo biologico mediante il quale l'RNA viene convertito in DNA. In un certo senso, questo processo contravviene al dogma fondamentale della biologia molecolare come enunciato da Francis Crick nel 1958. Originariamente, secondo questo principio l'informazione genetica fluisce dal DNA all'RNA e poi alle proteine. Negli anni successivi, la scoperta di processi aggiuntivi, proprio come la retrotrascrizione (dall'RNA al DNA) e la capacità dell'RNA di agire direttamente come enzima o come molecola regolatoria, hanno portato a un rifinitura del dogma, che rimane di fondamentale importanza per la comprensione del flusso dell'informazione genetica.



La retrotrascrizione è un processo cruciale per una classe di virus, detti retrovirus, che immagazzinano l'informazione genetica in forma di RNA. Una volta infettata una cellula, l'RNA di questi virus deve essere convertito in DNA in modo da poter essere integrato nel genoma dell'ospite. Questa conversione viene effettuata dalla trascrittasi inversa. Questo enzima virale è in grado di catalizzare l'allungamento di una catena di ribonucleotidi (RNA) su uno stampo di desossinucleotidi (DNA), ottenendo quindi un doppio filamento chiamato cDNA (ovvero DNA complementare).

Per la scoperta delle retrotrascrittasi virali, Howard Temin e David Baltimore hanno condiviso con Renato Dulbecco il premio Nobel per la Medicina nel 1975.

Descrizione e scopo dell'attività

Coltivazione delle piante

Per questa attività abbiamo prelevato due zolle di terreno nelle vicinanze di discariche abusive, allo scopo di analizzare la presenza di metalli pesanti. La zona di prelievo del terreno è stata geolocalizzata in modo da sapere, dopo l'analisi, dove procedere con l'eventuale risanamento.

Su ciascuno dei terreni, abbiamo fatto germogliare alcuni semi di *Arabidopsis* e li abbiamo fatti crescere per 10-14 giorni. I vasetti di terreno sono stati etichettati come #1 e #2. Sarà compito degli studenti individuare quale dei due contiene cadmio e quale no, sulla base dell'analisi molecolare dei geni espressi.

Estrazione dell'RNA totale, retrotrascrizione e amplificazione tramite PCR

Il primo passaggio consisterà nell'estrazione degli acidi nucleici (DNA ed RNA) a partire dalle foglie di *Arabidopsis*, cresciute su i due terreni.

Utilizzeremo quindi una trascrittasi inversa per retrotrascrivere l'RNA ed ottenere il cDNA. Tramite una reazione di PCR con primer specifici amplificheremo poi i cDNA di uno dei geni coinvolti nella sintesi delle fitochelatine sintasi (PCS2) e di un gene che codifica per un rRNA della subunità minore dei ribosomi di plastidi e mitocondri, detto S16. Quest'ultimo ci serve come controllo per verificare che estrazione, retrotrascrizione e amplificazione abbiano funzionato. Eseguiremo retrotrascrizione e amplificazione tramite PCR in un unico passaggio, utilizzando una procedura che permette di combinare le due reazioni.

I prodotti di PCR verranno quindi visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio, e saranno identificati in base al diverso peso molecolare. Il frammento derivato da PCS2 avrà infatti una lunghezza di 833 bp, mentre quello derivato da S16 di 418 bp.

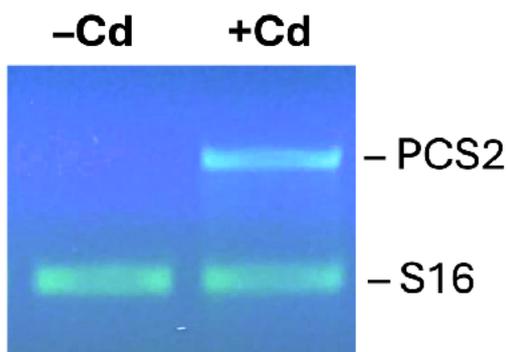


Fig.6 La presenza di una banda, a seguito di elettroforesi, indica l'avvenuta amplificazione del cDNA indicato. Mentre il frammento S16 dovrà essere presente in tutti campioni, il frammento PCS2 sarà rivelatore della presenza di cadmio nel terreno analizzato.

APPENDICI

A – Il fitorisanamento (*phytoremediation*) - fitoestrazione

Gli studi sulla tolleranza ai metalli delle piante non sono di esclusivo interesse scientifico ma vengono utilizzati anche in numerosi ambiti della tutela ambientale, come la **rivegetazione** di aree minerarie ed il **fitorisanamento** di siti contaminati da metalli pesanti.

Il fitorisanamento è una tecnica di bonifica ambientale che consiste fundamentalmente nell'utilizzo di piante per il trattamento delle matrici inquinate. Negli organismi bioaccumulatori come le piante, i metalli sono attivamente concentrati nei tessuti indipendentemente dalle concentrazioni del suolo, implicando quindi un'alta specializzazione fisiologica. L'immagazzinamento avviene grazie alla sintesi delle fitochelatine e allo stoccaggio in parti della pianta meno sensibili alla presenza dei metalli.

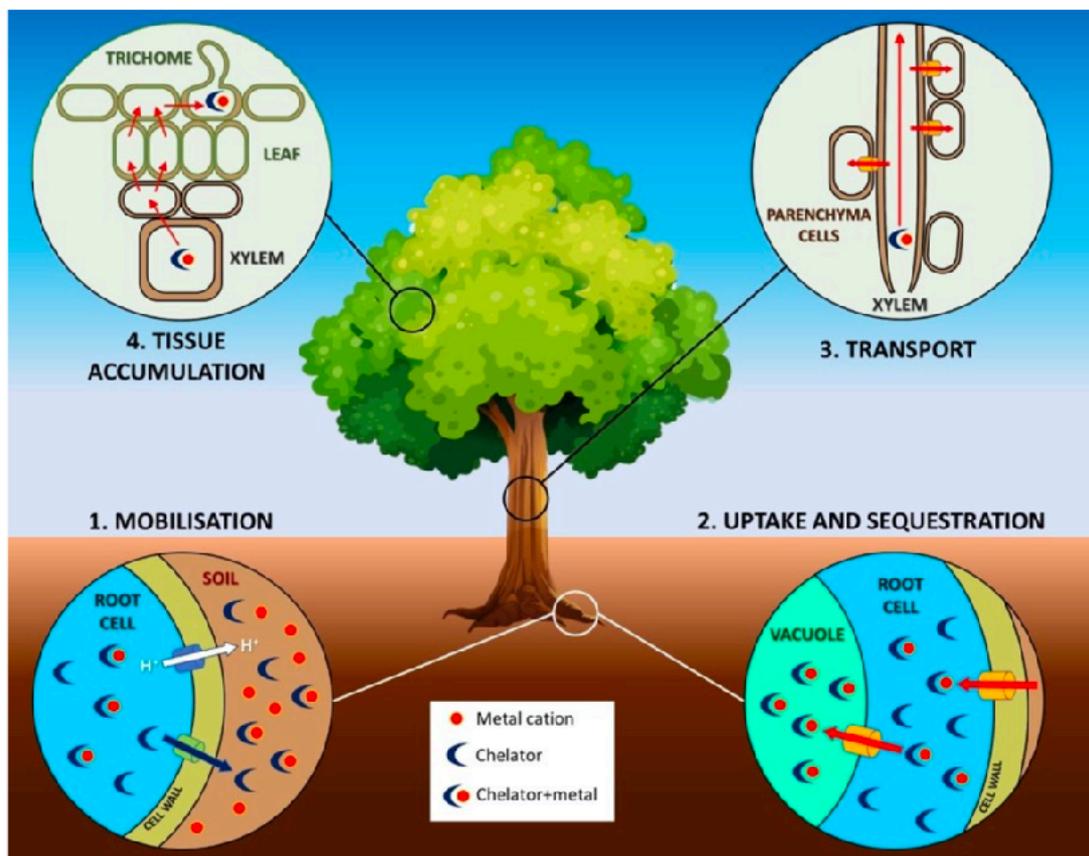
Le piante **iperaccumulatrici** sono in grado di accumulare concentrazioni di metallo eccezionalmente elevate, fino a 10000 mg kg⁻¹ per lo zinco, 100 mg kg⁻¹ per il cadmio e 1000 mg kg⁻¹ per il nichel. Queste specie costituiscono una risorsa biologica fondamentale e la loro introduzione in aree fortemente contaminate da metalli pesanti può costituire un contributo sostanziale alla rivegetazione e al recupero mediante tecniche di fitorisanamento.

Le tecniche che sfruttano il bioaccumulo dei metalli pesanti prendono il nome complessivo di **fitoestrazione**. Il processo di bioaccumulo può essere così schematizzato:

1. **MOBILITAZIONE:** le radici contribuiscono a rendere gli ioni metallici maggiormente disponibili per l'assorbimento acidificando la rizosfera (regione di suolo che circonda la radice) attraverso la secrezione di acido citrico. Il metallo pesante può essere quindi assorbito dalla cellula, oppure stoccato nella parete cellulare, dove non sarà dannoso per l'organismo.
2. **ASSORBIMENTO (uptake) DAL SUOLO:** i metalli pesanti non hanno un meccanismo specifico di uptake, ma l'ingresso nelle cellule vegetali avviene attraverso gli stessi sistemi di trasporto dei cationi essenziali come Zn⁺⁺, Ca⁺⁺ e Fe⁺⁺.
3. **ESPRESSIONE DELLE PCS e delle PC:** l'eccesso di metallo pesante nella cellula attiva la produzione di fitochelatine-sintasi (PCS) e successivamente delle fitochelatine (PC). Queste ultime chelano il metallo per facilitare lo spostamento attraverso la pianta o lo stoccaggio nel vacuolo. Come già descritto in precedenza, il livello di espressione delle PCS è dipendente dalla concentrazione del metallo pesante. Se la concentrazione è eccessiva, la pianta non riesce a gestire la tossicità del metallo e inibisce la sua crescita.
4. **TRASPORTO DA PARTE DELLO XILEMA:** il metallo chelato viene indirizzato allo xilema, per il trasporto e lo stoccaggio in altre parti della pianta.

5. **ACCUMULO**: la zona di maggiore accumulo del metallo pesante sono le radici ed i tricomi delle foglie, cellule specializzate con un grosso vacuolo.

Il coordinamento tra le funzioni di assorbimento, traslocazione e riserva è indispensabile per mantenere la concentrazione di metalli essenziali nei vari tessuti e compartimenti all'interno dei limiti fisiologici.



B – Legislazione: livelli inquinanti del Cadmio

Non esiste una definizione ufficiale di metallo leggero o pesante da parte della IUPAC, l'autorità internazionale che fissa e aggiorna la nomenclatura e la terminologia degli elementi e composti chimici, o da parte di organismi simili. Nonostante questo, numerosi articoli e pubblicazioni parlano genericamente di "metalli pesanti" e "leggeri" omettendo una chiara definizione o dando definizioni in contrasto tra loro basate sulla densità, sul peso atomico o altre proprietà chimiche.

Spesso all'aggettivo pesante è associato il concetto di tossicità anche se, di per sé, la densità di un metallo non ha un legame diretto con gli effetti sul corpo umano. La tossicità di una qualunque sostanza dipende dalla sua natura di composto chimico e dalla sua quantità. Un composto chimico può essere tossico pur essendo formato da atomi di elementi chimici che presi singolarmente non lo sono, e viceversa. Inoltre, una certa sostanza può essere ben tollerata o addirittura necessaria se al di sotto di una certa quantità (*minimum*).

Metalli indicati come "pesanti" messi tipicamente in correlazione alla loro tossicità e bioaccumulo nella catena alimentare sono: mercurio, cromo, cadmio, arsenico, piombo e recentemente uranio.

Vediamo **il caso del Cadmio**:

– Il Cadmio (Cd) è l'elemento chimico di numero atomico 48. Non è un metallo di transizione (poiché gli elementi di transizione sono definiti come gli elementi che al massimo numero di ossidazione formano almeno uno ione con un sottolivello *d* parzialmente riempito). Si trova nei minerali dello zinco e trova largo impiego per tre quarti nelle pile al nichel-Cadmio, mentre il quarto rimanente è principalmente usato per produrre pigmenti, rivestimenti e stabilizzanti per materie plastiche.

– Il Cadmio non riveste alcun ruolo biologico negli organismi pluricellulari. I suoi composti sono tossici perfino a basse concentrazioni e tendono ad accumularsi negli organismi e negli ecosistemi. La dose massima assumibile dal nostro corpo secondo l'OMS/FAO è di 7 µg/kg di peso corporeo alla settimana (Provisional Tolerable Weekly Intake, PTWI).

– L'inalazione di polveri di Cadmio provoca rapidamente problemi alle vie respiratorie ed ai reni, spesso fatali per insufficienza renale. L'ingestione provoca immediato avvelenamento e danneggia il fegato e i reni. I composti del Cadmio sono cancerogeni. Oltre a danneggiare i reni causano anche osteoporosi e osteomalachia.

– Nel maneggiare il Cadmio e i suoi composti è importante lavorare sotto una cappa aspirante in modo da non inalarne i vapori.

– L'esposizione a lungo termine al Cadmio dei lavoratori dei bagni galvanici per cadmiatura produce seri problemi di tossicità.

La normativa di riferimento oltre a quella italiana è fornita dall'OMS e dalle Direttive dell'UE I limiti massimi del Cadmio nelle acque sono:

- 5 µg/L (acque potabili)

- 10 µg/L (acque minerali)

Questa differenza è stata oggetto di polemiche perché autorizza in pratica ad imbottigliare acque minerali con dosi di Cadmio maggiori di quelle ammesse nelle acque potabili

I limiti massimi di Cadmio negli alimenti sono riportati nella tabella che segue (Reg. CE n. 466/2001 e modifiche successive).

Alimenti	Cadmio (mg/kg peso fresco)
Carni di bovini, ovini, suini, pollame escluse frattaglie	0,05
Carne di cavallo	0,2
Fegato di bovini, ovini, suini, pollame	0,5
Rognoni di bovini, ovini, suini, pollame	1
Muscolo di pesce	0,05
Muscolo di sogliola cuneata, anguilla, alice, pesce gallo, sgombro, cefalo, sarago fasciato, sardina, sardine, tonno	0,1
Crostacei, escluse carni scure di granchio, testa o torace di aragosta e analoghi grossi crostacei	0,5
Molluschi bivalvi	1
Cefalopodi (senza visceri)	1
Cereali, esclusi crusca, germi di frumento e riso	0,1
Crusca, germi di grano e riso	0,2
Germogli di soia	0,2
Ortaggi e frutta, esclusi ortaggi a foglia; erbe aromatiche, tutti i tipi di funghi, ortaggi a stelo, ortaggi da radice e patate	0,05
Ortaggi a foglia, erbe aromatiche, sedano rapa e tutti i funghi coltivati	0,2
Ortaggi a stelo, ortaggi da radice e patate, escluso sedano rapa. Nel caso delle patate ci si riferisce a patate sbucciate	0,1