

1. Introduzione	3
1.1 <i>Brassica juncea</i> (L.) Czern	3
1.2 PGPB e batteri psicotolleranti	4
1.3 L'inquinamento del suolo da parte dei metalli pesanti	5
1.4 L'uso di PGPB nel fitorisanamento	7
2. Scopo della tesi	9
3. Materiali e metodi	10
3.1 Preparazione dei campioni per la microscopia ottica (MO) ed elettronica a trasmissione (TEM)	10
3.2 Preparazione di sezioni semifine per la microscopia ottica	14
3.3 Preparazione di sezioni ultrasottili per la microscopia elettronica	14
4. Risultati e discussione	14
4.1 Effetti dei metalli pesanti sulla morfologia fogliare dei cloroplasti fogliari di <i>Brassica juncea</i>	14
4.2 Effetti dei metalli pesanti sull'ultrastruttura dei cloroplasti fogliare di <i>Brassica juncea</i>	20
5. Conclusioni	27
6. Bibliografia e sitografia	28

1. Introduzione

1.1 *Brassica juncea* (L.) Czern

Brassica juncea (L.) Czern

Regno: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordine: Brassicales

Famiglia: Brassicaceae

Genere: *Brassica*

Specie: *B. juncea*



Figura 1: *Brassica juncea* (fonti: Dryades)

Brassica juncea (o senape indiana) è una pianta erbacea annuale appartenente alle Brassicaceae. Originaria dell'Asia, è diffusa anche in Nord America e in Europa centrale e meridionale come specie alloctona; in Italia si può trovare in Toscana, Emilia-Romagna, Lombardia e Trentino-Alto Adige nei campi e nei ruderali e si può trovare anche in ambienti umidi. È una specie vegetale con una distribuzione altitudinale che va da 0 m a 500 m sopra il livello del mare e ha il suo periodo di antesi tra fine Maggio e inizio Agosto. Il suo fusto, che si sviluppa per 30-70 cm con rami alterni, presenta una differenziazione a livello fogliare: infatti le foglie superiori sono sessili, lanceolate e più piccole di quelle basali, le quali sono picciolate e con margine basale dentato e apicale ovato.

L'infiorescenza è un racemo allungato con 4 petali e 4 sepali tutti di colore giallo.

Il frutto è una siliqua.

È una delle specie coinvolte nel fitorisanamento di terreni contaminati da metalli pesanti ma il suo utilizzo in questa pratica è ancora sperimentale (Poria *et al.*, 2022; Sandil, 2023).

1.2 PGPB e batteri psicrotolleranti

I PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) sono microorganismi che vivono nel suolo, in particolar modo nella rizosfera (per questo anche chiamati PGPR o Plant Growth Promoting Rhizobacteria), e sono in grado di facilitare la crescita delle specie vegetali presenti, mitigando gli effetti negativi che diversi stress possono avere su quest'ultime (Styczynski *et al.*, 2022; Poria *et al.*, 2022; Akhtar *et al.*, 2021).

I PGPB possono agire in maniera diretta e indiretta sulle piante:

- indirettamente, tramite l'inibizione dell'attività patogena da parte di funghi e batteri (operata tramite la produzione di sostanze dannose per quest'ultimi), l'induzione di una risposta sistemica potenziata e la regolazione dell'architettura radicale;
- direttamente, attraverso la produzione di biosurfattanti e siderofori che permettono alla pianta sia di utilizzare i nutrienti e gli elementi presenti nel suolo, tra cui i metalli, che di aumentare la produzione di fitormoni. Inoltre i biosurfattanti e i siderofori inducono una modificazione della struttura della comunità rizobatterica in termini di aumento di biodiversità (Cao *et al.*, 2022);

I siderofori sono molecole di piccole dimensioni che presentano un'alta affinità per il ferro e sono prodotti quando questo viene a mancare o è presente in quantità ridotte; invece, i biosurfattanti sono composti di natura chimica varia che sono prodotti dai microorganismi e presentano diverse funzioni che sono utili alle specie vegetali, tra cui un effetto antifungino e la capacità di aumentare la biodisponibilità dei composti nel suolo (Styczynski *et al.*, 2022).

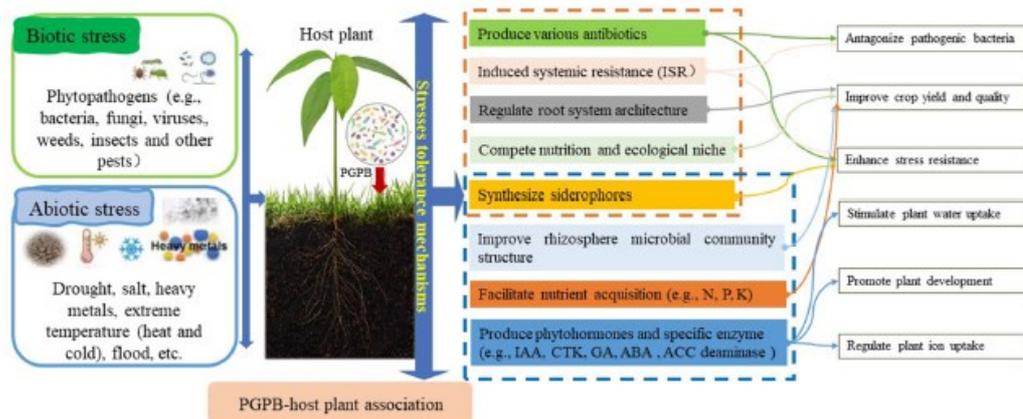


Figura 2: Meccanismi di resistenza dei PGPB agli stress abiotici e biotici (fonti: Mengyuan Cao, Mathiyazhagan Narayanan, Xiaojun Shi, Xinping Chen, Zhenlun Li, Ying Ma, 2022. Optimistic contributions of plant growth-promoting bacteria for sustainable agriculture and climate stress alleviation. Elsevier Inc, Environmental research 217 (2023) 114924)

Grazie alla produzione di queste biomolecole, i PGPB sono considerati una risposta agli stress la siccità e la presenza di metalli pesanti nel suolo, situazioni che le piante coltivate sono costrette ad affrontare a causa dei cambiamenti climatici e dell'inquinamento. Oltre a ciò, essi permettono anche una riduzione dell'utilizzo di sostanze che mantengono fertile e stabile il suolo al fine di incrementare il raccolto (Poria *et al.*, 2022; Cao *et al.*, 2022).

Tra la grande varietà di PGPB presenti e studiati, quelli maggiormente apprezzati in agricoltura sono quelli definiti come batteri psicotolleranti, ovvero microrganismi che possono crescere anche a basse temperature e quindi la produzione di siderofori a partire da essi è più sostenibile, perché altri microrganismi richiedono temperature più alte e la loro crescita in bioreattori è molto più dispendiosa (Styczynski *et al.*, 2022).

I siderofori derivanti da questi microrganismi rappresenterebbero una possibile soluzione per prevenire attacchi patogeni sulle piante da parte di batteri e funghi che sono attivi a basse temperature, oltre alla loro funzione primaria, cioè quella di rendere biodisponibile il ferro (Styczynski *et al.*, 2022).

1.3 L'inquinamento del suolo da parte dei metalli pesanti

Oltre ai danni provocati al suolo da parte dei cambiamenti climatici, numerose attività antropiche quali l'attività industriale, i gas di scarico delle automobili, lo smaltimento dei rifiuti provocano la fuoriuscita di particelle di metalli pesanti, quali As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb e Zn, che vanno a depositarsi nel suolo rimanendo per lunghi periodi, ad esempio per centinaia di migliaia di anni (Sharma *et al.*, 2023; Cao *et al.*, 2022).

I metalli pesanti possono essere rilasciati nel terreno anche attraverso una via geogenica: le rocce che li contengono subiscono diversi processi, tra cui erosione e lisciviazione, e i metalli entrano a far parte del suolo circostante. Le vie geogeniche contribuiscono però in maniera minore all'inquinamento da metalli pesanti rispetto all'introduzione antropica (Sandil, 2023).

Una volta nel terreno, i metalli pesanti possono andare a contaminare le acque di falda o possono essere assorbiti dalle piante, entrando perciò nella catena alimentare e andando sia ad impattare negativamente salute umana, sia a danneggiare la diversità del microbiota del suolo e le numerose proprietà di quest'ultimo (Cao *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2023; Yahaghi *et al.*, 2017).

La presenza di questi elementi tossici nelle piante coltivate è un rischio per la salute umana a causa del comportamento carcinogenico e mutagenico dei metalli pesanti. Una volta assimilati, provocano danni al sistema nervoso centrale e mutazioni e danni al DNA che si traducono in un incremento del rischio di patologie tumorali (Sandil, 2023).

I metalli pesanti influenzano i diversi processi fisiologici e biochimici delle piante, come la fotosintesi, la respirazione cellulare e l'assorbimento dei nutrienti, e il loro accumulo provoca effetti tossici, come sovrapproduzione di ROS, danni cellulari, in particolare al DNA, che portano a una riduzione dello sviluppo riproduttivo: tutto questo si traduce in una conseguente riduzione della produttività delle coltivazioni (Gamit e Amaresan, 2021; Poria *et al.*, 2022).

Element	Effect on plants
Pb	Reduction of germination percentage, inhibition of growth, reduction in biomass, plant height, leaf area, and number of leaves, decrease in protein content, hindered enzyme activity affecting the fixation of carbon dioxide
As	Inhibited seed germination, decreased seedling size, reduced leaf area, root, biomass, and edible part production, stunted growth, wilting, chlorosis, necrosis, damage to cell organelles, DNA damage, lipid peroxidation, protein degradation
Cd	Reduction in seed germination and length of shoot and root, diminished growth, decrease in nutrient concentration, chlorosis
Cr	Inhibition of germination, reduction in the growth of shoot and root, decreased biomass, and inhibition of nutrients uptake, wilting, chlorosis, delayed senescence, oxidative stress
Cu	Reduced growth, biomass, and seed production, malformation in the plant, chlorosis, necrosis, oxidative stress
Zn	Reduction in germination percentage, diminished growth, height, and biomass of plant, decrease in photosynthetic pigments concentration, alteration in chloroplast structure decreased activity of photosystem II, reduced absorption of nutrients
Ni	Inhibition of root and shoot growth, chlorosis, a decline in chlorophyll content, hindered enzyme activity affecting the Calvin cycle and carbon dioxide fixation, reduced absorption of nutrients
Hg	Inhibition of germination reduced plant height and formation of tiller and panicle, diminished flowering and edible part yield, chlorosis, inhibited photosynthesis and nutrient uptake, oxidative stress, inhibited enzyme activity

Figura 3: Effetti tossici dei metalli pesanti sulle piante (fonti: Recent trends in bioremediation of heavy metals. Sandil, Sirat. (2023). 10.1016/B978-0-323-96113-4.00027-5)

La presenza di metalli pesanti è stata inoltre riscontrata in terreni denominati “marginal land”, aree che presentano un suolo con proprietà inadatte all’agricoltura, dovute a diversi fattori come per esempio salinità elevata, ostacoli topografici, inquinanti organici ecc (Poria *et al.*, 2022).

1.4 L’uso dei PGPB nel fitorisanamento

Per risolvere i problemi legati alla presenza di metalli pesanti nel suolo, vengono usati i PGPB come tecnica di fitorisanamento, cioè un processo operato da determinate specie di piante che permette di stabilizzare, accumulare o degradare i componenti inquinanti del suolo (Poria *et al.*, 2022).

Tra la varietà di metodi di fitorisanamento, quelli legati ai metalli pesanti sono: fitoestrazione, fitostabilizzazione, fitovolatilizzazione e rizofiltrazione.

La fitoestrazione riguarda l’assorbimento tramite le radici dei metalli pesanti presenti nel suolo e nell’acqua ed eventualmente lo stoccaggio degli stessi negli organi aerei della pianta mentre nella rizofiltrazione lo stoccaggio dei metalli avviene a livello radicale; la fitostabilizzazione limita e lega gli inquinanti nel

suolo grazie a essudati radicali con cui formano complessi metallici; la fitovolatilizzazione trasforma i metalli assorbiti tramite le radici in composti volatili meno tossici (Poria *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2023).

Le diverse comunità batteriche che vengono utilizzate nell'applicazione di queste tecniche possono essere sia quelle già presenti nel terreno sia comunità batteriche esterne, che porterebbero ad un aumento della biodiversità del microbiota del suolo (Cao, 2022).

L'interazione tra le piante e i PGPB porta a una mitigazione degli effetti causati dai metalli pesanti, tramite diversi processi biochimici, ad un aumento della biomassa vegetale e ad un incremento della tolleranza, che si traduce in un miglioramento delle capacità di fitorimediale delle piante (Poria *et al.*, 2022).

Questi processi comprendono diversi meccanismi tra cui la formazione di complessi metallo-proteici, da parte di molecole come fitochelatine e metallotioneine, e il trasporto e il sequestro dei metalli pesanti grazie a trasportatori proteici (Poria *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2023).

Il fitorisanamento dei metalli pesanti in un'area inquinata dipende dalla capacità della pianta di trasferire questi elementi dalle radici agli organi aerei, dal tipo di metallo pesante che contamina il suolo, dalla sua concentrazione e dalla densità sia di piante che microorganismi che si trovano nell'area stessa (Poria *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2023).

Un passo avanti nello studio del fitorisanamento riguarda l'uso di specie vegetali geneticamente modificate, che però andrebbero valutate caso per caso e non generalizzate, e di comunità batteriche che implementano il risanamento e migliorano il suolo (questo permetterebbe l'utilizzo di piante che in un primo momento non si potevano coltivare in quel suolo a causa della loro sensibilità ai metalli pesanti) (Poria *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2023).

Le comunità microbiche del suolo sono generalmente costituite da alcuni specie dominanti e diverse nuove specie rare essenziali per il mantenimento delle interazioni biogeochimiche. L'identificazione di tutte le specie e delle loro attività attraverso il sequenziamento metagenomico potrebbe aiutare nell'applicazione di queste specie per la bonifica di siti contaminati (Sandil, 2023).

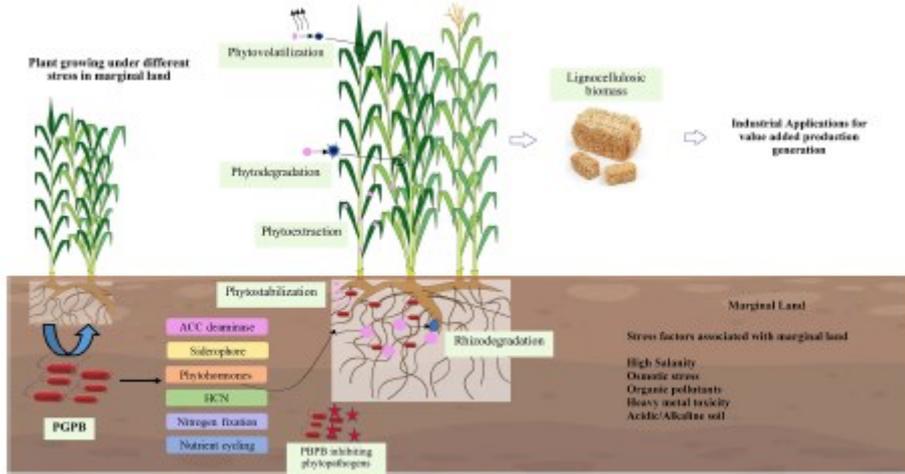


Figura 4: Metodi di fitorisanamento e ruolo dei PGPB (fonti: Vikram Poria, Klaudia Debiec-Andrzejewska, Angelika Fiodor, MArharyta Lyzohub, Nur Ajjiah, Surender Singh and Kumar Pranaw, 2022. Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) integrated phytotechnology: A sustainable approach for remediation of marginal lands. *Frontiers in plant science*. 13:999866. Doi: 10.33868/fpls.2022.999866)

2. Scopo della tesi

Nel campo dell'agricoltura ecosostenibile, il fitorisanamento tramite PGPB rappresenta una tecnica non invasiva per migliorare il suolo e le coltivazioni.

Tuttavia le comunità di microorganismi che vengono inoculate nel terreno tendono ad essere precocemente soppiantate dalle comunità batteriche preesistenti nella rizosfera, fornendo così degli effetti benefici temporanei e molto variabili. Per questo motivo l'utilizzo di siderofori e biosurfattanti prodotti da batteri psicotolleranti può rappresentare una soluzione a questi problemi.

In questo lavoro di tesi, che rappresenta una parte di un progetto di ricerca sull'utilizzo di metaboliti prodotti da un ceppo di batteri psicotolleranti, *Pseudomonas sp.* ANT_H12B e *Bacillus sp.* ANT_WA51, su piante di *Brassica juncea* sottoposte a diverse condizioni sperimentali comprendenti la crescita delle piante su un suolo incontaminato e contaminato da metalli pesanti e in presenza di siderofori in combinazione, rispettivamente, con biosurfattanti, acido ascorbico, M9 e GCL, sono stati analizzati gli effetti dei diversi trattamenti su foglie di *Brassica juncea* tramite osservazioni al microscopio ottico e al microscopio elettronico a trasmissione.

3. Materiali e metodi

3.1 Preparazione dei campioni per la microscopia ottica (MO) ed elettronica a trasmissione (TEM)

I semi di *Brassica juncea* sono stati fatti germinare in vasi con un terriccio contenente il 30% di perlite.

Dopo 10 giorni dalla loro germinazione, le piante sono state trasferite in vasi con suolo agrario che in precedenza era stato contaminato con una combinazione di metalli pesanti alle seguenti concentrazioni dopo essere stato lasciato condizionare per circa 1 mese:

- Ni → 150 mg/kg;
- Pb → 150 mg/kg;
- Cu → 250 mg/kg;
- Zn → 350 mg/kg;

Il suolo senza aggiunta di metalli pesanti è stato impiegato nella germinazione e nella crescita delle piante di controllo.

Le piante poi sono state suddivise in diversi trattamenti:

- 1) Piante cresciute su suolo non contaminato (-Met)
- 2) Piante cresciute su suolo non contaminato con aggiunta di siderofori (-Met + S)
- 3) Piante cresciute su suolo non contaminato con aggiunta di siderofori e biosurfattanti (-Met + S + BS)
- 4) Piante cresciute su suolo non contaminato con aggiunta di siderofori e M9 (-Met + S + M9)
- 5) Piante cresciute su suolo non contaminato con aggiunta di siderofori e acido ascorbico (-Met + S + AA)

- 6) Piante cresciute su suolo non contaminato con aggiunta di siderofori e GCL (-Met + S + GCL)
- 7) Piante cresciute su suolo contaminato (+Met)
- 8) Piante cresciute su suolo contaminato con aggiunta di siderofori (+Met + S)
- 9) Piante cresciute su suolo contaminato con aggiunta di siderofori e biosurfattanti (+Met + S + BS)
- 10) Piante cresciute su suolo contaminato con aggiunta di siderofori e M9 (+Met + S + M9)
- 11) Piante cresciute su suolo contaminato con aggiunta di siderofori e acido ascorbico (+Met + S + AA)
- 12) Piante cresciute su suolo contaminato con aggiunta di siderofori e GCL (+Met + S + GCL)

La sigla M9 si riferisce al medium di crescita dei batteri: è un trattamento che serve per verificare che l'effetto sia dovuto ai siderofori e non al medium dove i batteri sono stati considerati; la sigla GCL, invece, rappresenta il medium usato per la produzione dei siderofori. Nello specifico, esso rappresenta un medium modificato di GASN (Bultreys e Gheysen, 2000), in cui la concentrazione di glucosio impiegata come fonte di C è stata di 5.25 g L^{-1} , mentre quella di ammonio cloruro come fonte di azoto è stata di 1.35 g L^{-1} . In GCL il contenuto di fosfato e solfato era lo stesso di GASN. Il GCL consentiva la produzione di siderofori alla concentrazione di $600 \text{ } \mu\text{M}$ (mentre GASN determinava una concentrazione di $470 \text{ } \mu\text{M}$).

L'aggiunta di acido ascorbico (2.5 mM) in rapporto 1:1 (mL/g) nei suoli dei trattamenti 5 e 11 è stato effettuato per verificare la sua efficacia come riducente in grado di diminuire la quantità di siti dei minerali su cui i siderofori potrebbero essere adsorbiti.

I siderofori sono stati applicati al suolo alla concentrazione di $520 \text{ } \mu\text{M}$. La dose è stata determinata in base a test preliminari.

I biosurfattanti favoriscono l'adattamento microbico nella rizosfera stimolando la formazione di biofilm sulla superficie delle radici delle piante, nonché migliorando la motilità batterica. In aggiunta, i tensioattivi batterici aumentano

la biodisponibilità di composti idrofobici nel terreno e quindi ne aumentano la fertilità complessiva e la bagnabilità, e sono considerati efficaci agenti antifungini. Essi sono stati applicati alla dose di 10 mg/kg di suolo.

Le piante sono state allevate per 2 settimane in serra e poi raccolte per le indagini morfologiche e ultrastrutturali.

Campioni di foglie delle piante di controllo e sottoposte ai diversi trattamenti sono stati fissati con gluteraldeide 3% in tampone cacodilato 0,1 M (pH 6.9).

A seguire, sono stati eseguiti dei lavaggi dei campioni sempre con il tampone cacodilato per rimuovere la gluteraldeide in eccesso. È stata eseguita una post-fissazione con il tetrossido di osmio all'1% in tampone cacodilato 0,1 M, per 2 ore al buio, essendo il composto fotosensibile. È stato quindi eliminato il fissativo e sono stati eseguiti 3 lavaggi di 10 minuti ciascuno in soluzioni acquose contenenti etanolo a concentrazioni crescenti, 25%, 50% e 75%. La completa disidratazione è stata effettuata tramite 3 passaggi con etanolo al 100% e, successivamente, con 3 passaggi ulteriori di 10 minuti ciascuno con ossido di propilene.

Infine, è stata eseguita un'inclusione in resina epossidica (araldite), preparata in questo modo:

- Araldite A/M 27 mL;
- Anidride dodecilsuccinica (DDSA) 23 mL;
- Acceleratore 0,75 mL;

Il processo è stato eseguito trasferendo i campioni in miscele di ossido di propilene/resina sempre più concentrate per quest'ultimo componente, permettendo una completa ed omogenea diffusione della resina all'interno dei tessuti.

Il protocollo seguito è stato il seguente:

- Resina/ossido di propilene 1:3 per 60 minuti in stufa a 37-40°C in provette con i tappi ben chiusi;
- Resina/ossido di propilene 1:1 per 60 minuti in stufa a 37-40°C in provette con i tappi ben chiusi;

- Resina/ossido di propilene 3:1 per 60 minuti in stufa a 37-40°C in provette con i tappi ben chiusi;

In seguito, la miscela resina/ossido di propilene è stata sostituita con resina pura e le provette sono state messe in stufa per 2 ore a 37-40°C, prive di tappo per permettere l'evaporazione di tutto l'ossido di propilene residuo.

È stata infine eseguita l'inclusione dei campioni in box con resina pura e la polimerizzazione della resina è stata ottenuta ponendo i campioni per 24 ore in stufa a 40°C e successivamente per 3 giorni a 60°C.

Il ceppo batterico utilizzato in questo studio per la produzione di siderofori è stato *Pseudomonas* sp. ANT_H12B (numero di accesso GenBank: GCA_008369325.1), isolato da campioni di suolo antartico nell'Isola di King George (Antartide; coordinate GPS: 62 09.6010 S, 58 28.4640 W) (Romaniuk *et al.*, 2018). Il ceppo presenta diverse caratteristiche PGP (plant growth promoting), tra cui la biosintesi di siderofori (pireoverdina e acromobactina), la solubilizzazione del fosfato e la biosintesi di acido indoloacetico. I biosurfattanti (fengicina e surfattina) sono stati invece ottenuti da *Bacillus* sp. ANT_WA51 come riportato in Styczynski *et al.* (2022). Il ceppo ANT_WA51 è stato isolato dagli stessi campioni di suolo antartico descritti in precedenza (Romaniuk *et al.*, 2018).

Entrambi i ceppi presentano caratteristiche tipiche degli estremofili e sono in grado di crescere in un'ampia gamma di temperature: ANT_H12B nel range di 4 a 30°C e ANT_WA51 nel range di 10-37°C. Inoltre, mostrano proprietà alcalofile, ovvero ANT_H12B sopravvive in una soluzione di NaCl al 4%, mentre ANT_WA51, grazie alla sua capacità di formare spore, sopravvive fino al 10% di soluzione di NaCl. I ceppi sono attivi in un'ampia gamma di pH: ANT_H12B è in grado di crescere in un intervallo di pH da 4 a 12, ANT_WA51 in un intervallo di pH da 5 a 11.

3.2 Preparazione di sezioni semifine per la microscopia ottica

Dai campioni inclusi nella resina si sono state effettuate delle sezioni semifine con spessore di 1,5 μM con un ultra-microtomo *Reichert Ultracut S*. Le sezioni ottenute sono poi state raccolte su un vetrino porta oggetti e colorate con una soluzione di blu di toluidina all'1% in tetraborato di Na all'1%. Le sezioni poi sono state osservate con un microscopio ottico *Leitz Dialux 22*, dotato di fotocamera Opticam Pro₈.

3.3 Preparazione di sezioni ultrasottili per microscopia elettronica

Dai campioni inclusi nella resina sono state effettuate delle sezioni ultrasottili di circa 75 nm con un ultra-microtomo *Reichert Ultracut S*. Le sezioni ottenute sono poi state raccolte su retini di rame circolari a 200 mesh e successivamente contrastate con acetato di uranile in etanolo al 50% per 12 minuti e con citrato di piombo per 6 minuti. Le sezioni poi sono state osservate con un microscopio elettronico a trasmissione *FEI Tecnai G²* operante a 100 kV.

4. Risultati e discussione

4.1 Effetto di metalli pesanti sulla morfologia fogliare di *Brassica Juncea*

Le foglie in sezione trasversale di *Brassica juncea* sottoposte ai diversi trattamenti (fig. 2, 3, 4, 5, 6) osservate al microscopio ottico non differiscono di molto dalla foglia di controllo (fig. 1).

Il parenchima a palizzata della foglia di controllo (fig. 1) è composto da cellule che hanno più o meno la stessa dimensione mentre nelle foglie sottoposte ai vari trattamenti le cellule sono più allungate e nella sezione trasversale di *Brassica*

juncea trattata con siderofori e M9 (fig. 4) e con siderofori e GCL (fig. 6) gli strati che compongono il parenchima a palizzata aumentano di numero.

Nelle sezioni trasversali di foglia di *Brassica juncea* cresciute su suolo contaminato e sottoposte a vari trattamenti (fig. 8, 9, 10, 11, 12) il parenchima a palizzata e quello lacunoso differiscono dagli stessi tessuti presenti nella foglia di controllo (fig. 7).

Nella foglia di controllo il parenchima palizzata è formato da cellule molto allungate separate tra di loro e questa morfologia si riscontra anche nella sezione trasversale di foglia trattata con siderofori e GCL, nella quale si può notare anche che il tessuto lacunoso presenta ampi spazi intercellulari (fig. 12).

Nella sezione trasversale di foglia di *Brassica juncea* trattata con siderofori (fig. 8) le cellule che compongono sia il parenchima palizzata che quello lacunoso sono di dimensioni maggiori rispetto alla foglia di controllo (fig. 1).

Nella sezione trasversale di foglia di *Brassica juncea* trattata con siderofori e biosurfattanti si nota che il parenchima lacunoso è compatto, privo di spazi intercellulari e quindi meno differenziato (fig. 9).

La sezione trasversale di foglia di *Brassica juncea* trattata con siderofori e M9 mostra un tessuto a palizzata con cellule più o meno rotondeggianti distinto da un tessuto lacunoso poco differenziato (fig. 10).

Nella sezione trasversale di foglia di *Brassica juncea* trattata con siderofori e acido ascorbico si riscontra un'istologia del parenchima lacunoso caratterizzata da cellule rotondeggianti delimitate da spazi intercellulari (fig.11).

Anche nella foglia *Brassica juncea* trattata con siderofori e gcl si osserva la presenza di un parenchima lacunoso normalmente organizzato (fig. 12).

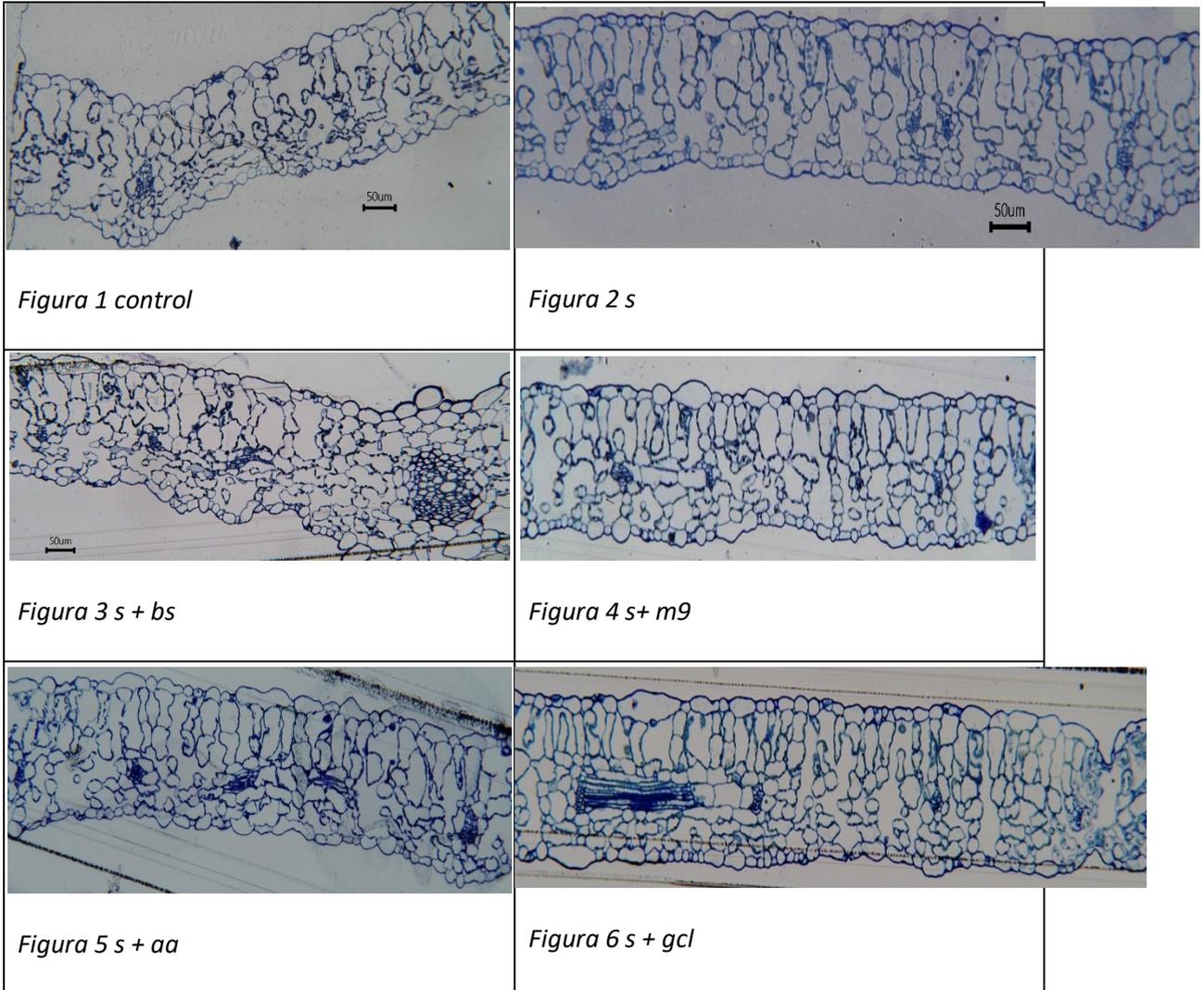


Fig. 1 Sezione trasversale semifina di foglia di *Brassica juncea* cresciuta su suolo non contaminato. Notare il tessuto a palizzata e il tessuto lacunoso.

Fig. 2 Sezione trasversale semifina di foglia di *Brassica juncea* cresciuta su suolo non contaminato con aggiunta di siderofori. Notare il tessuto a palizzata.

Fig. 3 Sezione trasversale semifina di foglia di *Brassica juncea* cresciuta su suolo non contaminato con aggiunta di siderofori e biosurfattanti. Si osserva il mesofillo fogliare compreso tra le due epidermidi e un fascio cribro-vascolare in sezione trasversale nella nervatura centrale.

Fig. 4 Sezione trasversale semifina di foglia di *Brassica juncea* cresciuta su suolo non contaminato con aggiunta di siderofori e M9. Notare il tessuto a palizzata.

Fig. 5 Sezione trasversale semifina di foglia di *Brassica juncea* cresciuta su suolo non contaminato con aggiunta di siderofori e acido ascorbico. Si osserva come nel mesofillo fogliare ci siano dei fasci cribro-vascolari in sezione longitudinale.

Fig. 6 Sezione trasversale semifina di foglia di *Brassica juncea* cresciuta su suolo non contaminato con aggiunta di siderofori e GCL. Notare il tessuto a palizzata e un fascio cribro-vascolare in sezione longitudinale.

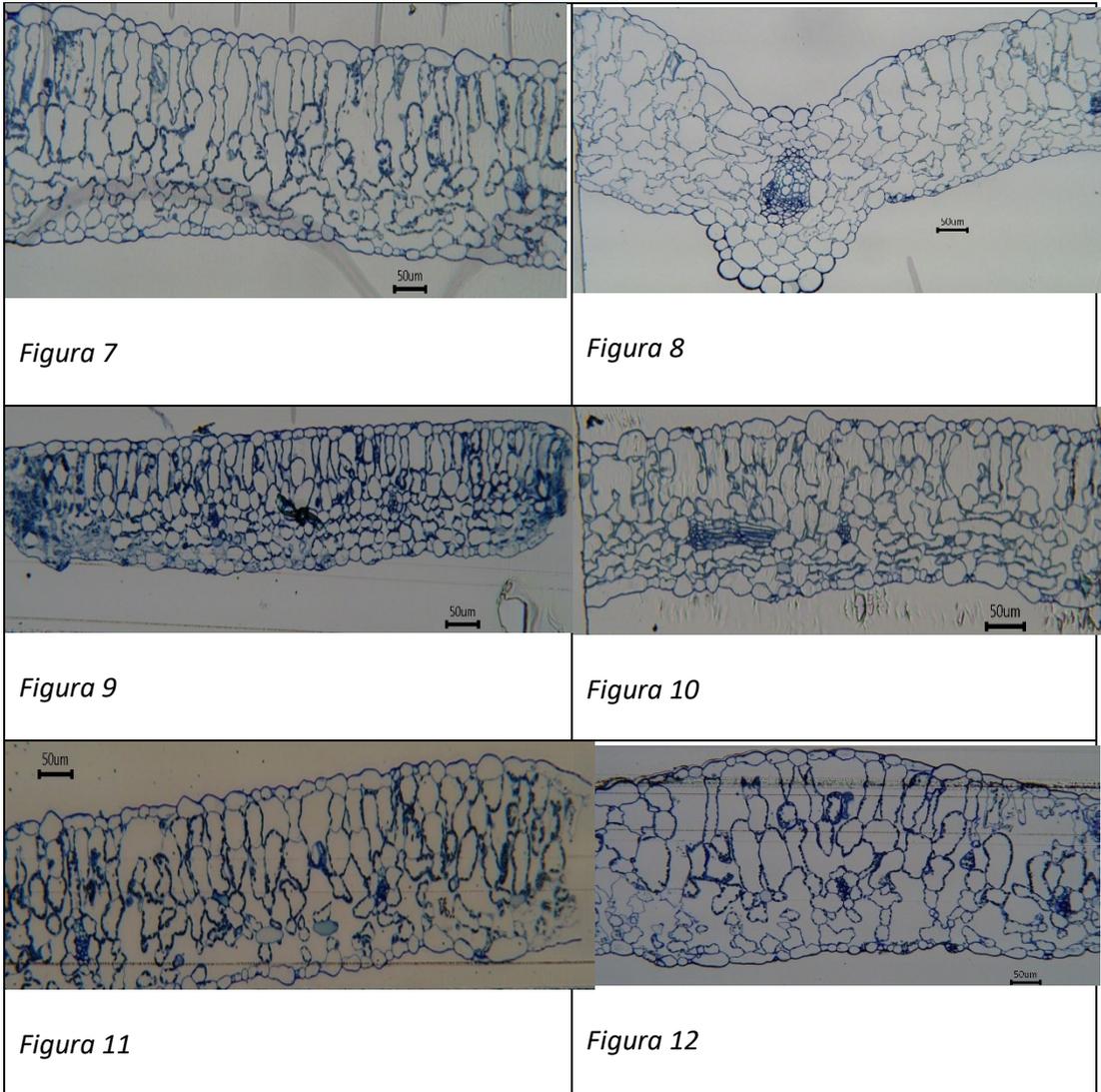


Figura 7

Figura 8

Figura 9

Figura 10

Figura 11

Figura 12

Fig. 7 Sezione trasversale semifina di foglia di *Brassica juncea* cresciuta su suolo contaminato. Si osserva il mesofillo fogliare compreso tra le due epidermidi.

Fig. 8 Sezione trasversale semifina di foglia di *Brassica juncea* cresciuta su suolo contaminato con aggiunta di siderofori. Notare il mesofillo fogliare e un fascio cribro-vascolare in sezione trasversale nella nervatura centrale.

Fig. 9 Sezione trasversale semifina di foglia di *Brassica juncea* cresciuta su suolo contaminato con aggiunta di siderofori e biosurfattanti. Notare il tessuto a palizzata.

Fig. 10 Sezione trasversale semifina di foglia di *Brassica juncea* cresciuta su suolo contaminato con aggiunta di siderofiro e M9. Si osserva nel mesofillo fogliare un fascio cribro-vascolare in sezione longitudinale.

Fig. 11 Sezione trasversale semifina di foglia di *Brassica juncea* cresciuta su suolo contaminato con aggiunta di siderofori e acido ascorbico. Notare il tessuto a palizzata e il tessuto lacunoso ben differenziati.

Fig. 12 Sezione trasversale semifina di foglia di *Brassica juncea* cresciuta su suolo contaminato con aggiunta di siderofori e GCL. Si osserva il tessuto a palizzata.

4.2 Effetti di metalli pesanti sull'ultrastruttura dei cloroplasti fogliari di *Brassica juncea*

I cloroplasti di controllo del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* cresciuta su suolo non contaminato presentano un sistema tilacoidale ben organizzato in tilacoidi granali e tilacoidi inter-granali e 2 granuli di amido di notevoli dimensioni (fig. 1).

I cloroplasti del mesofillo fogliare che sono stati sottoposti ai diversi trattamenti (fig. 2, 3, 4, 5, 6) (vedi paragrafo 3.1) presentano alcune caratteristiche ultrastrutturali differenti rispetto a quanto è stato evidenziato per i cloroplasti di controllo. Infatti nei cloroplasti sottoposti ai singoli trattamenti è possibile notare la presenza di granuli di amido di forma allungata e con dimensioni ridotte rispetto a quelli nei cloroplasti di controllo.

In particolare, i cloroplasti del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* trattata con siderofori, presentano grana costituiti da un numero ridotto di tilacoidi, collegati tra loro da tilacoidi inter-granali (fig. 2).

Nei cloroplasti del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* trattata con siderofori e biosurfattanti si osserva un sistema tilacoidale ben organizzato, con grana derivanti dall'impilamento di numerosi tilacoidi (fig. 3).

I cloroplasti del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* trattata con siderofori e M9 presentano membrane tilacoidali che appaiono dilatate e che formano un numero ridotto di grana (fig. 4).

Nei cloroplasti del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* trattata con siderofori e acido ascorbico lo stroma presenta numerosi e cospicui grana. (fig. 5).

I cloroplasti del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* trattata con siderofori e GCL presentano grana di diverse dimensioni, per la maggior parte derivanti dall'impilamento di pochi tilacoidi (fig. 6).

I cloroplasti del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* cresciuta su suolo contaminato dalla miscela di metalli pesanti testata presentano dei tilacoidi granali alcuni dei quali appaiono dilatati e che comunque formano grana, anche

se non ben definiti, collegati da tilacoidi inter-granali. Nello stroma è presente un granulo di amido di dimensioni notevoli considerevoli (fig. 7).

I cloroplasti del mesofillo fogliare che sono stati sottoposti ai diversi trattamenti presentano alcune caratteristiche ultrastrutturali differenti rispetto a quanto è stato evidenziato per i cloroplasti trattati solo con la miscela di metalli pesanti (fig. 8, 9, 10, 11, 12).

Nei cloroplasti del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* trattata con siderofori, i tilacoidi, fortemente dilatati, decorrono singoli nello stroma dove non è possibile riconoscere amido presentano (fig. 8).

I cloroplasti del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* trattata con siderofori e biosurfattanti presentano un sistema tilacoidale alterato, costituiti da tilacoidi che decorrono singoli nello stroma e che appaiono molto dilatati. Lo stroma, inoltre, presenta delle zone di rarefazione. (fig. 9).

Questa stessa organizzazione ultrastrutturale si ritrova nei cloroplasti del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* trattata con siderofori e M9 (fig. 10).

Nei cloroplasti del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* trattata con siderofori e acido ascorbico i tilacoidi appaiono dilatati e formanti alcuni grana che tuttavia esibiscono una struttura non ben definita. Nello stroma sono visibili granuli di amido di dimensioni considerevoli (fig. 11).

I cloroplasti del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* trattata con siderofori e GCL risultano piuttosto impattati dal punto di vista ultrastrutturale dal momento che sono presenti tilacoidi in numero molto ridotto e che non formano impilamenti granali. Lo stroma risulta occupato da abbondante amido e da una notevole quantità di globuli osmiofili. (fig. 12).

Gli effetti dei metalli pesanti in foglie di *Brassica juncea* sono stati evidenziati anche da Dalla Vecchia *et al.* (2023). In particolare i cloroplasti trattati con Se, Cd e una combinazione di Se + Cd subivano modificazioni ultrastrutturali che consistevano in alterazioni dei tilacoidi e in una diminuzione del numero di grana. Un lavoro condotto su *Brassica napus* L. (Li *et al.*, 2018), ha evidenziato che il Cr causava nei cloroplasti la comparsa di granuli di amido più grandi rispetto ai cloroplasti di controllo. Studi condotti sempre in questa specie hanno messo in

evidenza che il Cd impattava fortemente i tilacoidi dei cloroplasti, con una riduzione del numero di membrane e la presenza di grana ridotti (Filek *et al*, 2010). Queste evidenze sono in linea con quanto da noi osservato riguardo all'effetto della miscela di metalli pesanti testata sui cloroplasti fogliari di *Brassica juncea*. L'aggiunta di siderofori e biosurfattanti, tuttavia, non ha comportato un miglioramento dell'ultrastruttura degli organelli di foglie trattate con la miscela di metalli. Infatti i cloroplasti appaiono danneggiati nelle diverse situazioni sperimentali saggate, ad eccezione del trattamento con siderofori e acido ascorbico in cui si osserva un parziale ripristino di una regolare ultrastruttura.

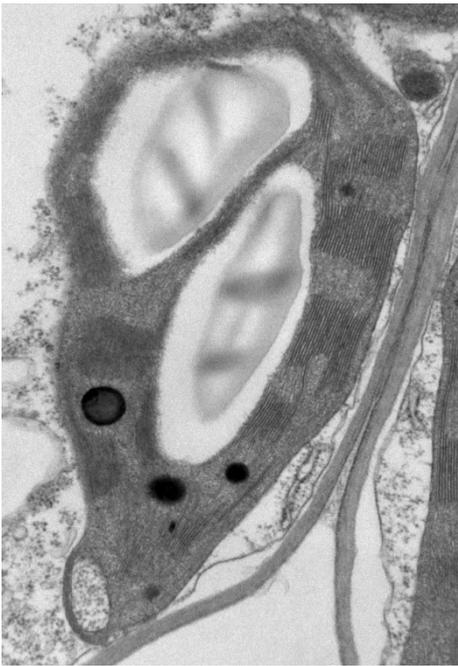


Figura 1



Figura 2



Figura 3

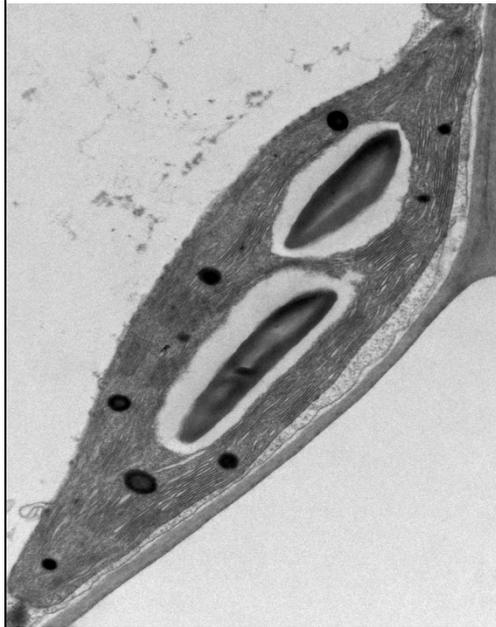


Figura 4

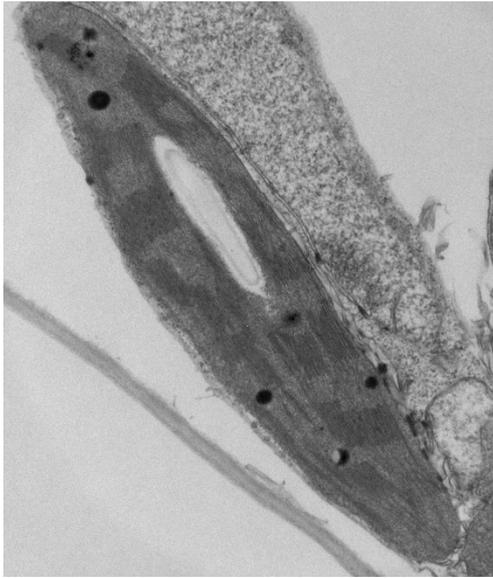


Figura 5



Figura 6

Fig. 1 Micrografia di cloroplasto di cellula del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* cresciuta su suolo non contaminato. Notare la presenza di tilacoidi granali e intergranali nell'organello. Sono evidenti 2 granuli di amido di notevoli dimensioni.

Fig. 2 Micrografia di cloroplasto di cellula del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* cresciuta su suolo non contaminato con aggiunta di siderofori. Si osserva la presenza di tilacoidi agranali e di 4 granuli di amido di cui uno di notevoli dimensioni.

Fig. 3 Micrografia di cloroplasto di cellula del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* cresciuta su suolo non contaminato con aggiunta di siderofori e biosurfattanti. Si osserva la presenza di voluminosi granuli di amido e di tilacoidi normalmente organizzati.

Fig. 4 Micrografia di cloroplasto di cellula del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* cresciuta su suolo non contaminato con aggiunta di siderofori e M9. Si possono notare i tilacoidi normalmente organizzati ed è evidente la presenza di 2 granuli di amido.

Fig. 5 Micrografia di cloroplasto di cellula del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* cresciuta su suolo non contaminato con aggiunta di siderofori e acido ascorbico. Si osservi l'abbondanza di tilacoidi granali. È presente un granulo di amido di notevoli dimensioni.

Fig. 6 Micrografia di cloroplasto di cellula del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* cresciuta su suolo non contaminato con aggiunta di siderofori e GCL. Notare i tilacoidi normalmente organizzati e un granulo di amido di dimensioni considerevoli.



Figura 7

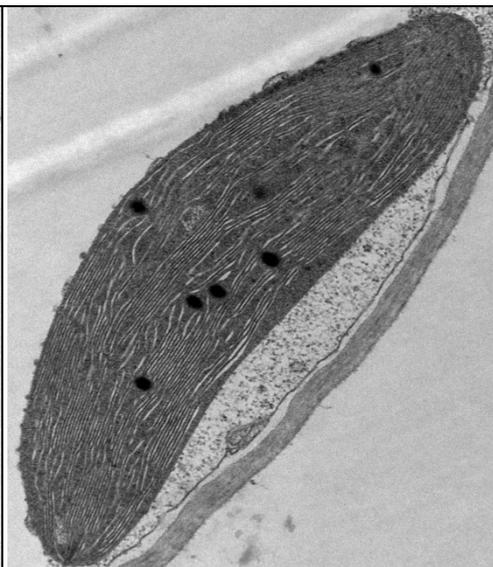


Figura 8

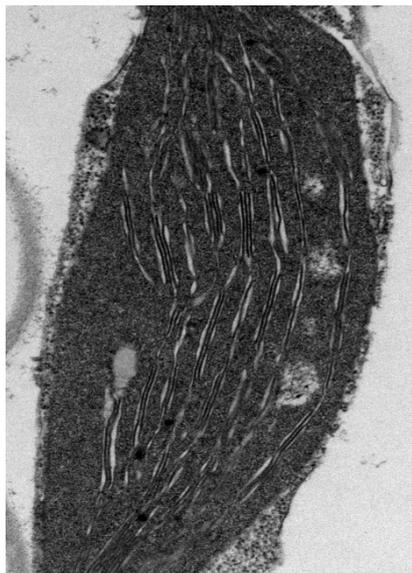


Figura 9



Figura 10



Figura 11

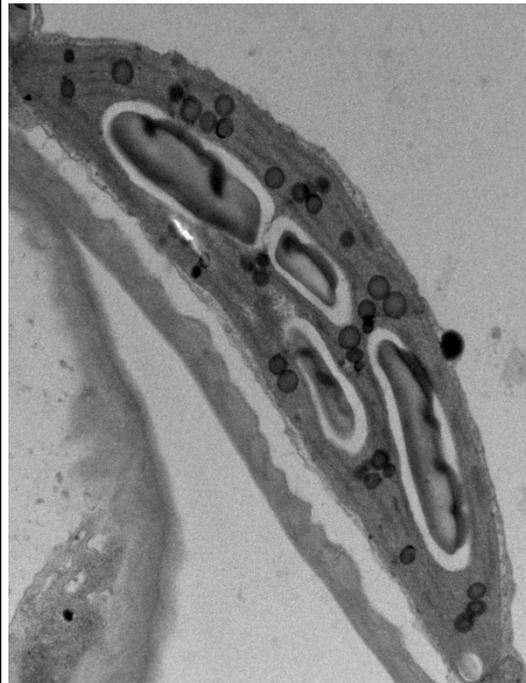


Figura 12

Fig. 7 Micrografia di cloroplasto di cellula del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* cresciuta su suolo contaminato. Si osserva la presenza di tilacoidi granali e di un granulo di amido.

Fig. 8 Micrografia di cloroplasto di cellula del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* cresciuta su suolo contaminato con aggiunta di siderofori. Notare come i tilacoidi siano compatti tra loro e si osserva l'assenza di granuli di amido.

Fig. 9 Micrografia di cloroplasto di cellula del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* cresciuta su suolo contaminato con aggiunta di siderofori e biosurfattanti. Si osserva come i tilacoidi siano compatti tra loro. È evidente la presenza di minuscoli granuli di amido

Fig. 10 Micrografia di cloroplasto di cellula del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* cresciuta su suolo contaminato con aggiunta di siderofiro e M9. Notare la presenza di un tilacoide granale e di tilacoidi agranali compatti fra loro.

Fig. 11 Micrografia di cloroplasto di cellula del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* cresciuta su suolo contaminato con aggiunta di siderofori e acido ascorbico. Si osserva la presenza di tilacoidi granali e di 3 granuli di amido di notevoli dimensioni.

Fig. 12 Micrografia di cloroplasto di cellula del mesofillo fogliare di *Brassica juncea* cresciuta su suolo contaminato con aggiunta di siderofori e GCL. Notare la presenza di tilacoidi di piccole dimensioni e di 4 granuli di amido.

5. Conclusioni

I risultati preliminari ottenuti dalle osservazioni ultrastrutturali condotte su cloroplasti di foglie di *Brassica juncea* sottoposte ai diversi trattamenti sperimentali suggeriscono che è sar  necessario testare diverse concentrazioni sia di siderofori che di biosurfattanti che consentano di ripristinare una normale ultrastruttura di questi organelli in presenza di metalli.

6. Bibliografia e sitografia.

- Akthar N., Ilyas N., Yasmin H., Sayyed R.Z., Hasnain Z., A. Elsayed E., El Enshasy H.A. Role of *Bacillus cereus* in Improving Growth and Phytoextractability of *Brassica Nigra* (L.) K. Koch in Chromium Contaminated Soil. *Molecules* 2021, 26, 1569. <https://doi.org/10.3390/molecules26061569>
- Bultreys A, Gheysen I. Production and comparison of peptide siderophores from strains of distantly related pathovars of *Pseudomonas syringae* and *Pseudomonas viridiflava* LMG 2352. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:325–31. doi: 10.1128/AEM.66.1.325-331.2000.
- Cao M., Narayanan M., Shi X., Chen X., Li Z., Ma Y., 2022. Optimistic contributions of plant growth-promoting bacteria for sustainable agriculture and climate stress alleviation. Elsevier Inc, *Environmental research* 217 (2023) 114924
- Filek, M., Kos'cielniak, J., Labanowska, M., Bednarska, E., Bidzin'ska, E., 2010. Selenium-induced protection of photosynthesis activity in rape (*Brassica napus*) seedlings subjected to cadmium stress. Fluorescence and EPR measurements. *Photosynthesis Research*, 105 (1), 27-37.
- Gamit H, Amaresan N. 2023. Role of methylotrophic bacteria in managing abiotic stresses for enhancing agricultural production. *Pedosphere*. 33(1): 49–60.
- Sharma JK., Kumar N., Singh NP. and Santal AR. (2023) Phytoremediation technologies and their mechanism for removal of heavy metal from contaminated soil: An approach for a sustainable environment. *Front. Plant Sci.* 14:1076876. doi: 10.3389/fpls.2023.1076876
- Li, L., Zhang, K., Gill, R.A., Islam, F., Farooq, M.A., Wang, J., Zhou, W., 2018. Ecotoxicological and Interactivw Effects of Copper and Chromium on Physiochemical, Ultrastructural, and Molecular Profiling in *Brassica napus* L. *BioMed Research International*.
- Poria V., Debiec-Andrzejewska K., Fiodor A., Lyzohub M., Ajjjah N., Singh S. and Pranaw K., 2022. Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) integrated

- phytotecnology: A sustainable approach for remediation of marginal lands. *Frontiers in plant science*. 13:999866. Doi: 10.33868/fpls.2022.999866
- Romaniuk K, Ciok A, Decewicz P, Uhrynowski W, Budzik K, Nieckarz M, et al. Insight into heavy metal resistome of soil psychrotolerant bacteria originating from King George Island (Antarctica) *Polar Biol.* 2018;41:1319–1333. doi: 10.1007/s00300-018-2287-4.
 - Sandil, Sirat. (2023). Recent trends in bioremediation of heavy metals. 10.1016/B978-0-323-96113-4.00027-5.
 - Styczynski M., Bieganski G., Rewerski PDB., Debiec-Andrzejewska K., Dziewit L., 2022. Application of Psychrotolerant Antarctic Bacteria and Their Metabolites as Efficient Plant Growth Promoting Agents. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 10:772891. Doi: 10.3389/fbioe.2022.772891
 - Yahaghi Z., Shirvani M., Nourbakhsh F., Coba de la Peña T., J. Pueyo J., and Talebi M., 2018. Isolation and Characterization of Pb-Solubilizing Bacteria and Their Effects on Pb Uptake by *Brassica juncea*: Implications for Microbe-Assisted Phytoremediation. *J. Microbiol. Biotechnol.* (2018), 28(7), 1156 – 1167, <https://doi.org/10.4014/jmb.1712.12038>
 - https://it.wikipedia.org/wiki/Brassica_juncea
 - https://www.actaplantarum.org/flora/flora_info.php?id=510006