
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

VINCENZO ALBERGONI, ESTER PICCINNI

Regolazione e tolleranza per i metalli in *Euglena gracilis*

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 66 (1979), n.3, p. 209–213.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1979_8_66_3_209_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

Biologia. — *Regolazione e tolleranza per i metalli in Euglena gracilis* (*). Nota di VINCENZO ALBERGONI e ESTER PICCINNI, presentata (**) dal Corrisp. B. BATTAGLIA.

SUMMARY. — Some data are reported on the biological effects of an excess of copper and cadmium on axenic cultures of *Euglena gracilis*. Copper does not affect growth, whereas cadmium inhibits it. Copper is excreted by the cells linked to a glycopeptide of a low molecular weight and cadmium is sequestered by a protein of high molecular weight. This protein is not excreted and therefore cadmium is more toxic than copper. The data fit a regulatory model that can be applied also to other compounds like thioneins.

Negli organismi animali esiste assai di frequente un certo grado di tolleranza verso condizioni ambientali sfavorevoli, e quindi anche per numerosi agenti inquinanti tra i quali i metalli.

Una forma elementare di tolleranza per i metalli viene realizzata mediante la chelazione dello ione metallo, con conseguente riduzione della sua tossicità. Sotto questo aspetto il più noto e studiato sistema di detossificazione è rappresentato dalle metallotioneine; queste sono proteine particolarmente ricche di cisteina, inducibili in risposta alla somministrazione di molti metalli, e che legano contemporaneamente metalli diversi, tra i quali è sempre presente anche lo zinco (Cherian and Goyer, 1978 [3], Kojima and Kägí, 1978 [6]).

Va però rilevato che la concentrazione dei metalli nelle cellule e/o negli organismi tende, almeno in molti casi, a rimanere entro limiti definiti. Questa capacità di regolazione è efficace solo entro un certo ambito di valori di concentrazione ambientali, e sembra diversa per metalli differenti.

La regolazione del contenuto di qualsiasi sostanza può essere realizzata, negli organismi viventi, in due modi: l'uno è la diminuzione dell'assorbimento dal mezzo esterno, traducibile in senso lato come diminuzione della permeabilità; l'altro è la messa in opera di sistemi escretori per controbilanciare il maggiore afflusso.

Lo studio degli effetti tossici dei metalli negli organismi è quindi lo studio dei sistemi di detossificazione in senso stretto (chelazione), sia di quelli di regolazione; entrambi questi sistemi potrebbero essere riconducibili ad un unico schema funzionale.

Nel tentativo di verificare una tale ipotesi abbiamo progettato una serie di ricerche, utilizzando come primo materiale sperimentale il protozoo *Euglena gracilis*. Fra i metalli abbiamo scelto il rame ed il cadmio. Il rame è un oligoele-

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Biologia Animale dell'Università di Padova, nell'ambito del progetto finalizzato del C.N.R. « Promozione della qualità dell'ambiente », contratto di ricerca 78.01091.90 115.6732.

(**) Nella seduta del 10 marzo 1979.

mento essenziale, costituente di diversi sistemi enzimatici ubiquitari; i suoi valori di concentrazione sono mediamente costanti e caratteristici nelle varie specie. Esso può tuttavia, se presente in elevata quantità, diventare un inquinante assai dannoso.

Il cadmio non ha alcuna funzione biologica documentata; tende ad accumularsi negli organismi e rappresenta un inquinante assai comune nell'ambiente idrico.

A colture di *Euglena gracilis* coltivate sterilmente in medium sintetico, è stato aggiunto Cu o Cd come solfato, sino alla concentrazione di 10 e 5 $\mu\text{g/ml}$ rispettivamente.

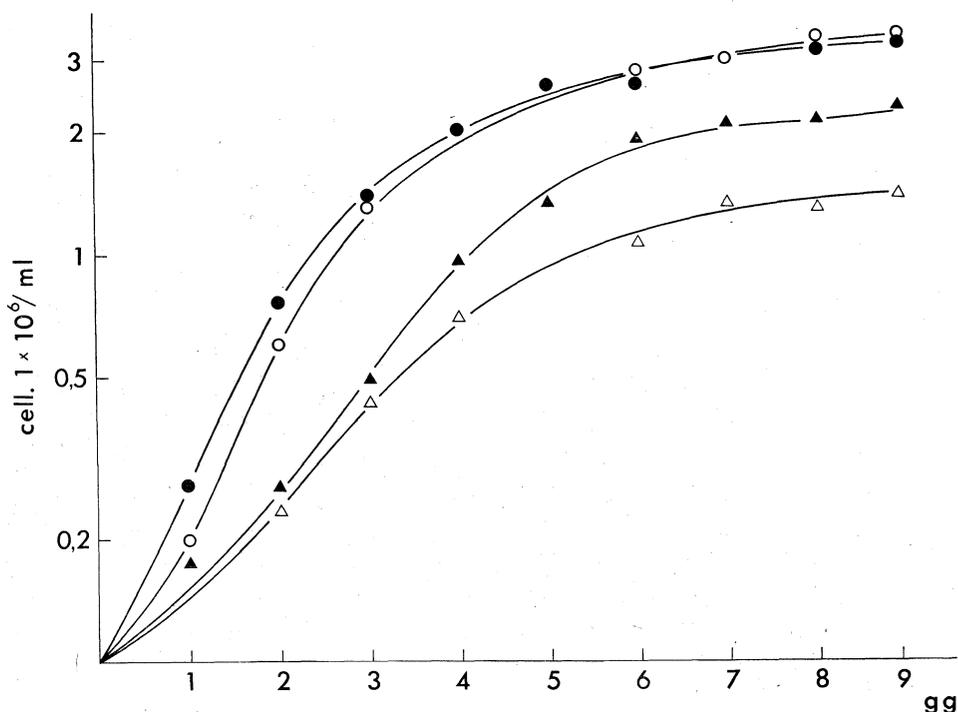


Fig. 1. - Curva di accrescimento di *Euglena gracilis* in presenza di rame e cadmio. Al momento della semina alle colture è stato aggiunto: Cd 3 $\mu\text{g/ml}$: ▲; Cd 5 $\mu\text{g/ml}$: △; Cu 10 $\mu\text{g/ml}$: ○; Controllo: ●.

È stato seguito l'andamento della crescita, la ripartizione del metallo fra cellule e ambiente, dosando anche lo zinco.

I metalli sono stati determinati con spettrofotometria ad assorbimento atomico. Mediante gel cromatografia su colonne di Sephadex è stato frazionato il supernatante cellulare per individuare le componenti macromolecolari contenenti i metalli in esame. Tali analisi sono state anche eseguite sul terreno di coltura al termine della fase logaritmica di crescita.

Le proteine sono state dosate con il metodo di Lowry *et al.* (1951 [7]) e con la determinazione dell'azoto con la ninidrina; gli zuccheri con il metodo

all'orcino e con quello al fenolo-ac. solforico. (François *et al.*, 1955 [5]; Dubois *et al.*, 1956 [4]).

I risultati ottenuti indicano che l'accrescimento in presenza di rame, anche alla dose di 10 µg/ml, è simile ai controlli, con un ritmo di reduplicazione di 16 ore e 50'; non vi è alcun segno di danno cellulare o riduzione della motilità.

In presenza di cadmio l'accrescimento è invece rallentato in proporzione alla dose; con 5 µg/ml il tempo di reduplicazione è di 30 ore. Si nota anche una lieve riduzione della motilità senza evidenti alterazioni della morfologia cellulare (fig. 1).

La quantità di rame nel terreno rimane pressochè costante durante tutto il periodo di crescita. Anche nelle cellule il metallo rimane entro valori assai bassi rispetto alla concentrazione esterna. Il cadmio invece viene progressivamente sottratto al mezzo di coltura. Le ripartizioni dei metalli al 9° giorno sono riportate in Tabella I.

TABELLA I.

	Medium	Cellule
Controllo (Cu)	0,8	0,06
5 µg Cu	4,7	0,29
5 µg Cd	0,44	1,96
10 µg Cu	8,8	0,33

Contenuto in rame e cadmio al 9° g, nel terreno (µg/ml) e nelle cellule (µg/1 · 10⁶ cell.). Al momento della semina alle colture è stato aggiunto: Cu 5 µg/ml, 10 µg/ml, Cd 5 µg/ml.

Le misure di ripartizione dello zinco tra medium e cellule hanno dato valori diversi a seconda che le colture sono state trattate con rame o con cadmio. In presenza di rame aumenta lo zinco extracellulare; ciò non si verifica nelle colture in presenza di cadmio (Tabella II).

Dal terreno di coltura è stato separato un glicopeptide di peso molecolare inferiore a 10000 D. Al glicopeptide isolato dal terreno dei controlli è legato solo zinco; a quello isolato dai terreni dei campioni trattati con rame è legato sia rame che zinco; lo zinco è in quantità più elevata che nel controllo.

Un glicopeptide dello stesso P.M. è presente anche nel citosol. A questo glicopeptide è legato solo zinco nei controlli e rame e zinco nelle cellule di colture trattate con rame.

Nelle colture trattate con cadmio la maggior parte del metallo si ritrova nel citosol, legato, insieme allo zinco, a composti di elevato P.M., superiore a 80.000 D, che mancano invece nei controlli.

TABELLA II.

	Cu		Zn		Cd	
	Terreno	Cellule	Terreno	Cellule	Terreno	Cellule
Controllo (*)	0,7	0,07	0,7	0,22	—	—
10 μg Cu (*)	8,5	0,6	3,7	0,13	—	—
5 μg Cd (**).	—	—	0,2	0,55	0,4	1,96

Contenuto in rame, cadmio e zinco nel terreno ($\mu\text{g}/\text{ml}$) e nelle cellule ($\mu\text{g}/1 \cdot 10^6$ cell.). Al momento della semina delle colture è stato aggiunto: Cu 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Cd 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

(*) Dati riferiti al 5° g di coltura.

(**) Dati riferiti al 9° g di coltura.

I dati precedentemente riportati indicano che rame e cadmio vengono prontamente legati a molecole organiche, con conseguente riduzione della loro tossicità.

La differente risposta di *Euglena* al trattamento con i due metalli può essere spiegata mediante un unico schema operativo nel quale si collocano tutti i dati sperimentali. Il contenuto di rame intracellulare è controllato, mediante un meccanismo a feedback. Il rame che penetra in eccesso rispetto alle richieste minime o si lega al glicopeptide già esistente oppure induce la formazione ex novo di questo e dopo si lega ad esso.

Questo glicopeptide, che oltre al rame lega anche lo zinco intracellulare in proporzione alla sua concentrazione, verrebbe quindi escreto. Ne consegue quindi che dopo un certo tempo si ritrovano nel terreno di coltura i due metalli chelati, mentre contemporaneamente diminuisce lo zinco intracellulare, proprio per la aumentata escrezione del complesso glicopeptide-metalli formato per mantenere basso il livello di rame.

In altri termini si ha un depauperamento in zinco provocato dall'eccesso di rame. Ciò si accorda con numerosi dati della letteratura sull'argomento; stati di carenza di vari metalli compaiono nei vertebrati quando nella dieta vi è un metallo in eccesso (Mills, 1970 [8]; Underwood 1971 [10]). Il modello funzionale da noi proposto per *Euglena* fornisce una adeguata spiegazione di queste interazioni fra metalli.

Il meccanismo regolativo operante in presenza di rame non riesce invece a funzionare completamente in presenza di cadmio. Ciò va attribuito alla formazione di complessi macromolecolari verosimilmente incompatibili con un processo di escrezione a causa dell'elevato peso molecolare.

Questa sequenza di eventi non contrasta con la possibilità che ioni liberi presenti nel mezzo esterno vengano in certi casi direttamente chelati da

secreti cellulari (Aaronson, 1977 [1]; Aaronson, 1973 [2]; Steemann *et al.*, 1970 [9]).

Sulla base di tutte queste considerazioni riteniamo di poter concludere che molte forme di tolleranza ai metalli pesanti presenti in dosi elevate dipendono dalla capacità di regolazione dei diversi organismi. In *Euglena* tale funzione è svolta da un glicopeptide; in altri organismi si formano metallothioneine o chelatine, di P.M. intorno a 10.000, nelle quali non è mai stata descritta una parte glicidica. Il ruolo di detossificazione di queste metallothioneine o chelatine può essere riinterpretato nel quadro di un meccanismo regolativo fondamentale presente in tutti gli organismi.

La risposta ai metalli non aventi alcun ruolo fisiologico, come il cadmio, coinvolge gli stessi sistemi cellulari operanti nel caso dei metalli essenziali. In questo caso però si formano dei chelati anomali per qualche carattere chimico-fisico, e pertanto le cellule non riescono ad attuare il processo di escrezione: di qui l'accumulo progressivo e la maggiore tossicità del metallo.

BIBLIOGRAFIA

- [1] S. AARONSON (1977) - V Congr. of Protozool., New York, n. 39.
- [2] S. AARONSON (1973) - *Ochromonas: a model system for the study of phytoflagellate and algae secretion into environment*. « Bull. Ecol. Res. Commun » (Stockholm), 17, 367-370.
- [3] M. G. CHERIAN and R. A. GOYER (1978) - *Metallothioneins and their role in metabolism and toxicity of metals* « Life Sciences », 23, 1-10.
- [4] M. DUBOIS, K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, P. A. REBERS and F. SMITH (1956) - *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. « Ann. Chem. », 28, 350-356.
- [5] C. FRANÇOIS, R. D. MARSHALL and A. NEUBERGER (1962) - *Carbohydrates in protein*. 4. *The determination of mannose in hen's-egg albumin by radioisotope dilution*. « Biochem. J. », 83, 335-341.
- [6] Y. KOJIMA and J. H. R. KÄGI (1978) - *Metallothionein*. « Trends in Biochem. Science », 3, 90-93.
- [7] O. H. LÖWRY, N. Y. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. Y. RANDALL (1951) - *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. « J. Biol. Chem. », 193, 265-275.
- [8] C. F. MILLS ed. (1970) - *Trace element metabolism in animals*-1, E. and S. Livingstone, Edinburgh and London.
- [9] E. STEEMANN NIELSEN and S. WIUM-ANDERSEN (1970) - *Copper ions as poison in the sea and in freshwater*. « Marine Biology », 6, 93-97.
- [10] E. J. UNDERWOOD (1971) - *Trace elements in human and animal nutrition*. Academic Press, New York-London.