

Workshop teorico-pratico

La microscopia elettronica SEM/ESEM nello studio dell'ambiente

14-16 Marzo 2016

Aula Magna Campus Scientifico "Enrico Mattei", Urbino
ARPAM, Dipartimento di Pesaro

AMIANTI E ALTRE FIBRE INORGANICHE, NATURALI E SINTETICHE, PRESENTI NELL'AMBIENTE: INDAGINE TRAMITE SEM-EDS PER LA VALUTAZIONE DEL FONDO AMBIENTALE E DI SITUAZIONI DI INQUINAMENTO

Elena Belluso, Silvana Capella

Dipartimento di Scienze della Terra, Università di Torino e Centro Interdipartimentale per lo Studio degli Amianti e di altri Particolati Nocivi "G. Scansetti", Università di Torino

E-mail: elena.belluso@unito.it - silvana.capella@unito.it

Anche se non è sempre evidente, viviamo in un mondo in cui le polveri aerodisperse (intese come particolato fine) sono ubiquitarie e in quantità anche molto elevate. Con un singolo respiro possiamo introdurre nell'apparato respiratorio anche 50 milioni di particelle con dimensioni pari o inferiori a 50 nm. Elevate quantità di particelle presenti nelle vie respiratorie, come è noto, possono provocare malattie anche gravi.

Tra i vari tipi di particelle "respirabili" vi sono anche fibre inorganiche (artificiali e naturali) con specifiche caratteristiche dimensionali: lunghezza $> \geq 5 \mu\text{m}$, diametro (larghezza) $\leq 3 \mu\text{m}$, rapporto lunghezza/diametro $\geq 3:1$ (WHO, 2006). Alcune, quali le fibre di amianto o particolari fibre inorganiche naturali (per esempio fluoroedenite asbestiforme) respirate in elevate quantità (come nel caso di esposizione professionale) possono determinare l'insorgenza di malattie cancerose. Secondo studi recenti, analoghi effetti negativi si possono avere anche a dosi basse se continuative. Al fine della prevenzione è perciò particolarmente importante determinare la presenza di possibili sorgenti di aerodispersione di tali fibre.

Per quanto riguarda le 6 specie mineralogiche classificate amianto, in Italia tremolite d'amianto e actinolite d'amianto sono aerodisperse da rocce

presenti nel territorio (sorgenti naturali) e non da materiali antropici, non essendo state utilizzate industrialmente. L'aerodispersione di fibre di crocidolite e amosite (grunerite d'amianto) si ha invece solamente da manufatti (sorgenti antropiche) poiché in Italia non sono naturalmente presenti rocce che li contengano. I restanti due amianti (crisotilo e antofillite d'amianto) sono invece presenti sia in sorgenti naturali sia in sorgenti antropiche (la seconda specie in quantità molto basse).

Numerose altre specie minerali con caratteristiche simili agli amianti (e definite asbestiformi) sono naturalmente presenti (localmente anche abbondanti) in rocce del territorio italiano e quindi aerodisperdibili e respirabili (per esempio sepiolite asbestiforme, antigorite asbestiforme). Sulla base di quanto sopra specificato, l'indagine su presenza e concentrazione in aria dei vari tipi di fibre inorganiche con dimensioni respirabili è particolarmente importante perché permette di rilevare situazioni di inquinamento e di identificare, per determinate specie, le specifiche sorgenti di dispersione. La tecnica che offre buona accuratezza e precisione nell'indagine, soprattutto laddove la concentrazione di fibre è modesta, è quella della microscopia elettronica in scansione (SEM) combinata con la spettrometria di dispersione di energia (EDS). L'indagine, a partire dalla prima fase di raccolta dell'aria, è regolamentata dal Decreto Ministeriale 6 settembre 1994, Ministero della Sanità (G.U. n.288, supplemento ordinario del 10 dicembre 1994); solamente i laboratori che hanno superato positivamente i programmi di qualificazione del Ministero della Salute hanno il riconoscimento ufficiale per effettuare analisi sugli amianti.

L'identificazione della natura delle fibre dimensionalmente respirabili è basata sulla composizione chimica per cui è necessario che il laboratorio possieda una banca dati interna (costruita mediante analisi di campioni a composizione chi-

mica nota) e che l'operatore abbia adeguata esperienza. Sulla base delle specie identificate e della loro concentrazione è possibile stabilire se è in atto una situazione di inquinamento e, in casi specifici, anche il tipo di sorgente di dispersione (Figura 1). In caso di identificazioni ambigue (per esempio per distinguere tra crisotilo e antigorite asbestiforme) sono necessarie indagini al microscopio elettronico in trasmissione (TEM) utilizzando osservazioni morfologiche, dati chimici (spettri EDS) e informazioni strutturali (diffrazioni elettroniche di aree selezionate: SAED) raccolti da singole fibre. Queste indagini permettono identificazioni univoche, ma in Italia non sono previste dalla normativa vigente (lo sono invece in altri paesi dell'Unione Europea, per esempio in Francia). Un altro tipo di indagine, particolarmente utile nel caso di sospetta presenza di sorgenti nascoste di aerodispersione di fibre inorganiche, prevede l'utilizzo di animali sentinella e l'impiego della tecnica SEM-EDS (Figura 1), analogamente a quanto previsto per i campioni di aria.

Anche per queste indagini, nel caso di identificazioni dubbie l'uso complementare di TEM-EDS è risolutivo. A Casale Monferrato (AL), dove è stato attivo fino al 1986 uno stabilimento di produzione di cemento-amianto, la presenza di materiale non compatto e respirabile (chiamato "polverino") non è ancora stata del tutto identificata. A tal fine, congiuntamente con ricercatori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, è stata condotta una ricerca su polmoni di ratti selvatici catturati in zone definite preventivamente in base a dati storici riportati su attività industriali e dei trasporti relativi ad amianto. Frammenti di polmoni prelevati dai ratti sono stati chimicamente digeriti secondo una procedura collaudata (Fornero *et al.*, 2009); la sospensione ottenuta è stata filtrata e i materiali inorganici depositati sul filtro sono stati esaminati tramite SEM-EDS. È stato così possibile identificare vari tipi di fibre inorganiche, attribuibili a differenti sorgenti sulla base delle conoscenze dell'area in esame, tra cui: specie non classificate amianto (biossido di titanio) e fibre di amianto (crocidolite e amosite) derivanti da sorgente antropica; amianto da sorgente naturale (tremolite d'amianto); amianto (crisotilo) da sorgente indefinita poiché attribuibile sia a materiali antropici sia a sorgenti naturali (Ardizzone *et al.*, 2014).

Attraverso il confronto con il residuo inorganico di polmoni di ratti vissuti in aree prive di amianto

da sorgenti antropiche, è stato quindi possibile rilevare che in alcune zone dell'area in esame c'è una situazione di inquinamento. Gli stakeholders hanno pertanto la possibilità di organizzare una campagna di indagini per identificare le specifiche sorgenti di inquinamento e programmare opportune bonifiche.

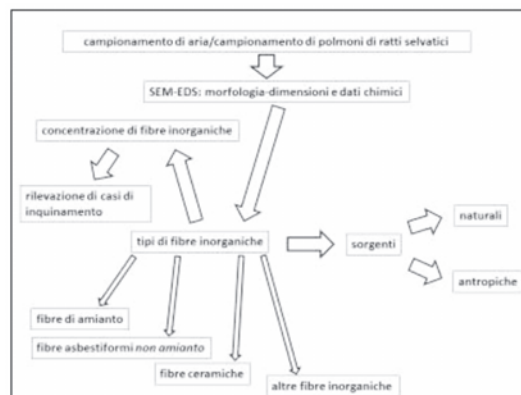


Figura 1. Schematico diagramma di flusso relativo a rilevazione e quantificazione di fibre inorganiche a partire da campioni di aria o campioni biologici di animali sentinella.

Bibliografia

- Ardizzone M, Vizio C, Bozzetta E et al.(2014) Sci. Total Environ, 479-480, 31-38
 Fornero E, Belluso E, Capella S et al.(2009) Sci. Total Environ. 407, 1010-1018
 WHO - World Health Organization(2006) Elimination of asbestos-related diseases. Geneva, 2006

IL RUOLO DEL SEM NELLA VALUTAZIONE DELLE ALTERAZIONI MORFOLOGICHE INDOTTE DA INQUINANTI NEGLI EPITELI RESPIRATORI DI ORGANISMI ACQUATICI

Elvira Brunelli, Rachele Macirella, Antonello Guardia

Dipartimento di Biologia, Ecologia e Scienze della Terra (DiBEST), Università della Calabria, Rende (CS)

E-mail: elvira.brunelli@unical.it

Tra le cause più comuni d'inquinamento degli ambienti acquatici rientrano le alterazioni di alcuni parametri abiotici quali: temperatura, pH e salinità e la contaminazione causata dal massiccio uso di sostanze chimiche a fini agricoli, industriali

e cosmetici. Gli effetti dell'inquinamento sugli ecosistemi vengono indagati attraverso analisi ecotossicologiche che possono essere mirate alla valutazione dei danni indotti a diversi livelli dell'organizzazione biologica; la finalità di tali studi, tra le altre, è di individuare i marker più efficaci in grado di segnalare situazioni a rischio nel loro stadio iniziale. In particolare le indagini ecotossicologiche su Vertebrati "non bersaglio", quali gli Anfibi, sono molto importanti alla luce degli attuali sforzi conservazionistici mirati a preservare gli ambienti umidi e limitare la perdita di biodiversità.

Per effettuare una corretta valutazione degli effetti di sostanze inquinanti si possono utilizzare diversi approcci metodologici e negli esperimenti qui riportati abbiamo valutato la risposta di diversi endpoint nelle medesime condizioni sperimentali. Prendendo in considerazione parametri diversi abbiamo avuto l'opportunità di mettere in risalto gli aspetti diagnostici dell'utilizzo della microscopia in generale e del SEM in particolare, negli studi ecotossicologici e di confrontare le capacità predittive di endpoint morfologici rispetto ad altri più comunemente utilizzati marker di stress e inquinamento. Abbiamo utilizzato come organo target l'apparato branchiale degli Anfibi perché altamente permeabile e direttamente esposto alle variazioni dell'ambiente acquatico.

Il declino delle popolazioni di Anfibi negli ultimi anni ha richiamato l'attenzione su questo complesso fenomeno. Oggi vi è un accordo generale sul fatto che il declino degli Anfibi sia una conseguenza delle attività umane oltre che alle normali fluttuazioni delle popolazioni animali.

L'acidificazione degli ecosistemi acquatici è ritenuta essere una delle possibili cause del declino degli Anfibi in particolare in Europa e Nordamerica. Abbiamo dimostrato, utilizzando larve di *Lissotriton italicus*, che dopo sole 48 ore di esposizione ad un valore di pH non letale (4.5) le alterazioni dell'apparato branchiale sono cospicue. L'analisi al SEM ha mostrato notevoli alterazioni morfologiche ma il fenomeno più evidente è stato la comparsa di uno strato esterno cheratinizzato che ricopre in maniera piuttosto uniforme la branchia. Tali alterazioni possono interferire con la respirazione e l'osmoregolazione e possono rappresentare un importante fattore di disturbo per le popolazioni naturali, contribuendo così al fenomeno di declino delle popolazioni di Anfibi nelle regioni acidificate. Accanto all'analisi morfologica al SEM abbiamo testato due endpoint di tipo com-

portamentale, comportamento trofico e attività di nuoto, nelle medesime condizioni sperimentali. Questi test hanno richiesto un numero di individui maggiore rispetto a quelli utilizzati per l'analisi al SEM; inoltre è stato necessario l'utilizzo di un apparato sperimentale complicato e del successivo uso di un software di analisi specifico. Altrettanto complessa è stata la procedura sperimentale che ha richiesto la manipolazione degli animali per isolarli nel corso delle analisi comportamentali, con il rischio potenziale di alterare i risultati dell'osservazione. È interessante notare come questi endpoint, molto utilizzati nei test ecotossicologici, non siano risultati maggiormente sensibili e dopo 24 ore non hanno messo in evidenza alterazioni significative così come non erano evidenti processi patologici a livello della morfologia branchiale.

Un altro fattore di inquinamento da noi valutato è l'aumento della concentrazione salina nelle acque dolci. Il fenomeno della salinizzazione secondaria degli habitat d'acqua dolce viene attribuita prevalentemente all'utilizzo dei sali antigelo, alla desertificazione ed a numerose altre attività antropiche quali disboscamento, eccessivo sfruttamento delle falde, attività industriali, urbane e agricole.

In questo caso abbiamo utilizzato le larve due specie, (*Bufo balearicus* e *Bufo bufo*), la prima delle quali maggiormente eurialina, esponendo i girini a concentrazioni saline crescenti e valutando poi la morfologia branchiale dopo 24, 48 e 96 ore. Abbiamo dimostrato che esiste una relazione negativa fra l'aumento della concentrazione salina e l'integrità della branchia per entrambe le specie considerate. I nostri risultati confermano che l'entità delle alterazioni è fortemente correlata con le preferenze ecologiche delle specie ma evidenziano inoltre che un aumento della salinità ha il potenziale di impattare anche le popolazioni di quelle specie che sono in grado di tollerare salinità moderate.

L'analisi delle branchie di *B. bufo* ha mostrato inoltre che lo stress salino induce alterazioni non solo della struttura ma anche della composizione cellulare ed è particolarmente interessante notare la comparsa della cellula tubulo-vescicolare (TVC). Anche in questo caso abbiamo valutato altri endpoint (mortalità) ed abbiamo dimostrato che concentrazioni saline molto basse, sebbene non siano letali durante una esposizione acuta, inducono precoci e importanti alterazioni a carico

dell'apparato branchiale.

Un'altra categoria da noi analizzata è quella dei pesticidi. In questo caso abbiamo scelto l'endosulfan, un insetticida organoclorurato altamente persistente. Abbiamo valutato gli effetti sull'apparato branchiale di *B. bufo* in risposta a diverse modalità di esposizione (acuta e cronica) ed a diverse concentrazioni. Oltre alle notevoli alterazioni dell'apparato branchiale abbiamo evidenziato, anche in questo caso, la comparsa della cellula tubulo-vescicolare dopo solo 96 ore di esposizione. La presenza delle TVC lascia ipotizzare che tali cellule possano avere un ruolo specie-specifico nella risposta della branchia alle alterazioni del mezzo acquatico. Abbiamo in seguito studiato gli effetti di tale pesticida dopo un'esposizione a lungo termine utilizzando concentrazioni molto basse e rilevabili in natura. I nostri esperimenti hanno messo in evidenza che concentrazioni che risultavano subletali durante l'esposizione acuta, sono divenute letali dopo esposizione a lungo termine o hanno avuto effetti negativi sulla crescita, il comportamento, le caratteristiche metamorfiche, causando inoltre l'insorgenza di gravi malformazioni e ritardi nello sviluppo. Fra le concentrazioni testate solo la più bassa (10 µg/l) sembrava non causare effetti negativi sui girini di *B. bufo*. Tuttavia l'analisi morfologica al SEM ha evidenziato che anche gli individui esposti alla concentrazione più bassa subiscono le stesse alterazioni presenti dopo esposizione alle altre concentrazioni con un andamento oltre che dose anche tempo dipendente. Risulta chiaro che per tutte le concentrazioni testate il primo effetto dell'endosulfan sulla specie studiata è l'alterazione dell'apparato branchiale seguita dall'alterazione di parametri comportamentali.

Un'altra sostanza da noi considerata è il chloryrifos (CPF), un pesticida che appartiene agli organofosfati. In questo studio, abbiamo esposto larve di *Rana dalmatina* a 3 concentrazioni di CPF rilevabili in natura per l'intero periodo larvale. Anche in questo caso abbiamo valutato diversi parametri nelle medesime condizioni sperimentali. Dall'analisi dei dati è emerso che il CPF non è in grado di indurre significativi effetti sulla sopravvivenza o su altri parametri di crescita e sviluppo. Tuttavia l'analisi al SEM ha dimostrato che in *Rana dalmatina* il CPF induce intense e precoci alterazioni a carico dell'apparato branchiale e che il grado delle alterazioni istopatologiche è strettamente legato alla concentrazione dell'inquinante

ed alla durata dell'esposizione. Il primo effetto osservabile è l'alterazione branchiale dopo 8 giorni di esposizione che precede qualunque altra alterazione (i.e. deformità, disordini comportamentali).

Dalle evidenze qui riportate si evince con chiarezza che l'analisi morfologica di organi target deve essere considerata un importante strumento per indagare gli effetti subletali dei contaminanti in particolar modo per la sua sensibilità e per la facilità di identificazione e quantificazione.

THE ELECTRON MICROSCOPY APPLIED TO STUDY ADHESION AND SURVIVAL STRATEGIES OF BACTERIA IN RESPONSE TO ENVIRONMENTAL STRESSES

Raffaella Campana, Michela Battistelli, Sabrina Burattini, Elisabetta Falcieri and Wally Baffone

Department of Biomolecular Sciences, University of Urbino, Italy

E-mail: wally.baffone@uniurb.it

Unfavorable environmental conditions induce bacteria species to adhere to different surfaces and, subsequently, develop a biofilm or to activate a survival state called viable but nonculturable (VBNC).

Biofilms are defined as oriented aggregations of microorganisms attached to each other or to a surface and enclosed in extracellular polymeric substance produced by themselves (Costerton *et al.*, 1999; Fleming and Wingender, 2010), that protect themselves and, in the case of human pathogens, to express their pathogenicity. The formation and development of biofilms is affected by many factors, including the specific bacteria strain, material surface properties, and environmental parameters such as the pH and nutrient levels and temperature (Abdallah *et al.*, 2014). Biofilms are prevalently constituted by a single species, but in the oral cavity biofilms are communities with several microbial species. The microbial diversity of oral communities can be studied by scanning electron microscopy (SEM), a useful imaging approach for the visualization of bacterial biofilms in their natural environments, including dental and biomaterial surfaces. Biofilm cells are more resistant to antimicrobial agents than planktonic bacteria, as they have a barrier which prevents or lessens the contact with antimicrobial agents (O'Toole and Kaplan, 2000).

In reference to this, we evaluated by SEM the effect of two antimicrobial substances, Carvacrol (1%) and Chlorhexidine (2%), on dual-species biofilm *in vitro* model grown up to 64.5 h on titanium disc surface and formed by *Streptococcus mutans* ATCC 25175, an usual inhabitant of the oral cavity, in combination with *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 or *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, microorganisms implicated in infection diseases. At established time-points (16.5, 40.5 and 64.5h), a visible decrease of cocci (*S. mutans*) and rod cells (*P. gingivalis* or *F. nucleatum*) in both treated biofilms, compared with control untreated samples, was observed. Figure 1 shows, at the representative time-point 40.5h, micrographs of different bacterial combination treated with Carvacrol and Chlorhexidine, respectively. The results indicates that the SEM could be used as preliminary tool for monitoring biofilm development and the effect of antimicrobials agents to delay bacterial colonization ability. Parallel, TEM analysis was performed to directly observe the ultrastructural changes induced by Carvacrol in the same oral bacterial strains. As shown in Figure 2, the exposure of pathogens to Carvacrol revealed that this compound seem to penetrate the cytoplasmic membrane, increasing the permeability and causing the shrinkage of the protoplasm and the loss of cytosolic material.

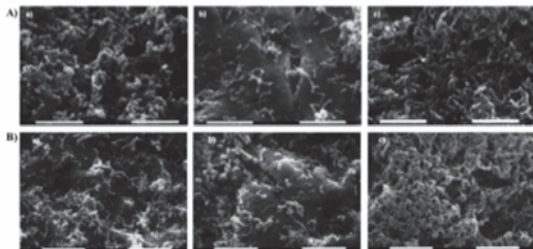


Figure 1. Scanning electron micrographs of multi-specie biofilms formed by *S. mutans* ATCC 25175 and *F. nucleatum* ATCC 25586 (A) and *S. mutans* ATCC 25175 and *P. gingivalis* ATCC 33277 (B) on titanium discs. The effect of Carvacrol (a) and Chlorhexidine (b) on biofilms development after 40.5h was compared to the untreated disc (c).

In the VBNC state, although still expressing various degrees of metabolic activity and possibly being able to cause infection (Ramamurthy *et al.*,

2014), the bacterial cells cannot be cultured on conventional laboratory media that normally support their growth. During entry into the VBNC state, bacteria acquire a coccal morphology, become smaller in size, and show changes in their protein and fatty acid profiles (Ramamurthy *et al.*, 2014). For this we have applied SEM in association with Flow Cytometry (FCM) to investigate how low temperature affects the morphological and physiological status, respectively, of an environmental *V. parahaemolyticus* strain during incubation in artificial seawater at 4°C. Moreover, since some authors have demonstrated the ability of this microorganism to “resuscitate” from the VBNC state (Oliver, 2005), SEM analyses was used to evaluate morphological features of the *V. parahaemolyticus* vegetative form after temperature upshift as shown in Figure 3. The used microscopical methodologies have provided useful data in relation to the state transitions of *V. parahaemolyticus* regarding the quantification of morphological variations during its entry into the VBNC state and following resuscitation after re-established optimal environmental conditions.

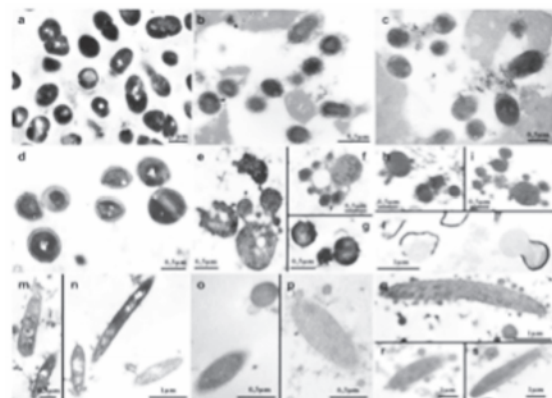


Figure 2. Transmission electronmicrographs (TEM). Effect of Carvacrol on *S. mutans* ATCC 25175: (a) untreated cells; (b) 5 min exposure; (c) 30 min exposure. Effect of Carvacrol on *P. gingivalis* ATCC 33287: (d) untreated cells; e, f, g 5 min exposure; c, h, i, l, 30 min exposure. Effect of Carvacrol on *F. nucleatum* ATCC 25586: m, n, untreated cells; o, p, 5 min exposure; q, r, s, 30 min exposure.

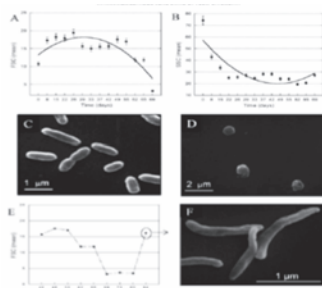


Figura 3. Morphological changes in *V. parahaemolyticus*, in ASW at 4°C until the VBNC state, examined by FCM and SEM analyses: (A) FCM analyses by scattering signal as Forward Light Scatter (FSC); (B) FCM analyses by scattering signal as Side Light Scatter (SSC); (C) SEM micrograph of *V. parahaemolyticus* cells maintained in ASW at 4°C at day 0 and day 42 (D) showing bacterial morphological changes from bacillar to coccal shape; (E) FCM analyses of FSC signal and SEM micrograph (F) of *V. parahaemolyticus* cells after resuscitation by temperature upshift.

References

- Abdallah M, Benoliel C, Drider D et al. (2014) Arch Microbiol, 196:453–472
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. (1999) Science, 284:1318.
- Flemming HC, Wingender J (2010) Nat Rev Microbiol, 8:623.
- Oliver JD. (2005) J Microbiol, 43:93-100.
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. (2000) Ann Rev Microbiol, 54:49-79
- Ramamurthy T, Ghosh A, Pazhani GP et al. (2014) Front Public Health, 2:103

CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DEL PM2.5 NELL'AREA DI ROMA

C. Fanizza¹, F. Inconorato¹, F. Ietto¹, M. Inglessis², M. Ferdinandi², C. Ferrari², B. De Berardis³

¹INAIL, DITSIPIA, Roma

²Istituto Superiore di Sanità, AMPP, Roma

³Istituto Superiore di Sanità, TESA, Roma

E-mail: c.fanizza@inail.it

Numerosi studi epidemiologici sono stati condotti dal '90 sugli effetti del particolato urbano aerodisperso (PM) sulla salute della popolazione esposta. Tali studi hanno evidenziato una significativa associazione tra livelli di PM10, in particolare di PM2.5, e aumento di morbilità e mortalità per malattie respiratorie e cardiovascolari. Alcuni

studi hanno mostrato inoltre una relazione tra gli effetti sulla salute osservati e alcune componenti del PM, in particolare del PM2.5 (Bell et al, 2014; Gent et al, 2009). Studi tossicologici *in vitro* hanno evidenziato che la tossicità del PM deriva dalla sua capacità di indurre stress ossidativo ed infiammazione nel polmone. Nonostante le evidenze epidemiologiche acquisite ed i numerosi studi tossicologici *in vivo* ed *in vitro* condotti in questi anni, non sono state ancora individuate le componenti o le caratteristiche fisiche e chimiche del PM in grado di spiegare la tossicità di tale inquinante. Per spiegare i meccanismi mediante i quali le particelle inalate possono produrre specie reattive dell'ossigeno sono state formulate differenti ipotesi, strettamente legate alle caratteristiche fisico-chimiche del particolato: 1) dimensioni delle particelle; 2) area di superficie delle particelle; 3) composizione chimica delle particelle; 4) chimica di superficie delle particelle, in particolare metalli di transizione, chinoni o idrocarburi poliaromatici sulla superficie delle particelle che, in presenza di riducenti biologici e ossigeno, generano radicali liberi attraverso cicli redox.

Appare quindi evidente l'importanza di caratterizzare da un punto di vista fisico-chimico le singole particelle che costituiscono il PM per determinarne forma, granulometria, composizione chimica e studiare la capacità del particolato fine e ultrafine di veicolare sulla superficie sostanze o composti tossici.

La microscopia elettronica a scansione e trasmissione, insieme alle spettrometrie ed esse associate (SEM/EDX, TEM/EDX, TEM/EELS), si è rivelata una tecnica analitica particolarmente adatta per caratterizzare le singole particelle e individuare le componenti del PM e può fornire un utile contributo nello studio della chimica di superficie delle singole particelle, della loro capacità di veicolare composti organici ed inorganici, nell'analisi dei processi di trasformazione che il PM subisce in atmosfera e nell'individuazione delle caratteristiche fisico-chimiche delle particelle in grado di spiegare gli effetti sulla salute della popolazione esposta. La microscopia elettronica a scansione munita di spettrometria a raggi X a dispersione di energia (SEM/EDX) è la tecnica analitica più versatile per la caratterizzazione delle singole particelle del PM. L'introduzione di sistemi di analisi semi-automatici ha fortemente ridotto i tempi di analisi. In tali sistemi le particelle vengono automaticamente rivelate mediante un

aumento del segnale degli elettroni secondari e/o retrodiffusi al di sopra di un livello di soglia fissato manualmente dall'operatore, corrispondente al segnale dovuto al substrato su cui è stato raccolto il PM. Questo sistema di analisi consente di determinare automaticamente una serie di parametri morfologici (diametro minimo, diametro massimo, diametro di Feret, fattore di forma, aspect ratio) e di acquisire, sempre automaticamente una volta terminata l'analisi morfologica, uno spettro EDX su un intervallo di energie (ROI) scelte dall'operatore, compiendo una scansione su ciascuna delle particelle individuate. Il set di dati ottenuto dalla microanalisi a raggi X è poi elaborato mediante tecniche di analisi statistica multivariata per individuare le componenti del PM.

In questo lavoro sono stati campionati, oltre al PM_{2.5}, presso la stazione di monitoraggio dell'Istituto Superiore di Sanità, i seguenti inquinanti gassosi: gli ossidi di azoto (NO_x), i composti organici volatili (COV), l'ozono (O₃) ed il biossido di zolfo (SO₂) ed il monossido di carbonio (CO). In quanto i precursori NO_x, COV, O₃, SO₂ contribuiscono, attraverso una serie di reazioni chimiche, alla formazione del particolato secondario.

La buona correlazione (0.8 coefficiente di Pearson) riscontrata durante il periodo invernale tra la concentrazione media oraria del CO e del PM_{2.5} indica una sorgente comune per questi due composti individuata nel traffico autoveicolare. Infatti il CO è considerato un marker del traffico in quanto l'origine antropica di tale inquinante è principalmente legata alla combustione incompleta dei carburanti usati negli autoveicoli. Lo stesso valore di correlazione (0.8 coefficiente di Pearson) è stato riscontrato per il periodo invernale tra la concentrazione media oraria degli NO_x e il PM_{2.5}.

L'analisi delle singole particelle mediante microscopia elettronica a scansione e la successiva elaborazione dei dati di microanalisi a raggi X mediante Cluster Analysis hanno permesso di individuare nel PM_{2.5} campionato sette tipologie (cluster) di particelle nel periodo invernale: particelle ricche di C (cluster 1), silicati (cluster 2), particelle metalliche (cluster 3), particelle ricche di Fe (cluster 4), carbonati (cluster 5), silice (cluster 6), solfati (cluster 7). Nel periodo estivo sono stati individuate le stesse tipologie tranne i solfati. Le particelle ricche di carbonio rappresentano la tipologia più abbondante in entrambi i periodi. Tali particelle derivano prevalentemente dal traffico autoveicolare e/o da impianti di combustione e

all'osservazione al SEM si presentano generalmente come sferule di dimensioni fra i 40 e i 70 nm. La caratterizzazione con la microanalisi a raggi X ha mostrato che gli aggregati "C-rich" agiscono come carrier di diversi elementi adsorbiti sulla loro superficie. Una significativa frazione delle particelle carboniose, trasporta un coating contenente zolfo legato alla presenza di solfati e di acido solforico adsorbito sulla superficie di tali particelle dovuti ai processi di ossidazione fotochimica dell'SO₂ atmosferico. Le particelle metalliche rappresentano il secondo cluster più importante nel periodo invernale ed il terzo nel periodo estivo. In questo gruppo sono state classificate particelle costituite da Al, Cr, Ni, Ti, Zn, Cu. I silicati comprendono feldspati, argille, inosilicati e silicati vetrosi, derivanti dall'erosione dei suoli e degli edifici. Queste particelle sono il secondo cluster nel periodo estivo ed il terzo nel periodo invernale. L'abbondanza più elevata durante il periodo estivo è dovuta all'effetto dei venti meridionali (sciocco) che trasportano particelle di argilla dall'Africa. Le particelle ricche di ferro sono costituite solo da ferro ed ossigeno. Le particelle appartenenti al gruppo dei carbonati sono carbonati di Ca e Mg e derivano dai processi di erosione del suolo e delle rocce e dal deterioramento degli edifici. Le particelle che costituiscono il cluster dei solfati sono composte principalmente da solfati di Ca e derivano da reazioni tra i materiali composti da carbonato di Ca (marmo, pietre calcaree, ecc.) ed i composti solforosi presenti nell'atmosfera, ma anche dal deterioramento di coperture e vernici che rivestono le pareti degli edifici. Questa tipologia di particolato è risultata presente nel solo periodo invernale con un'abbondanza dello 1%. L'origine antropica del biossido di zolfo deriva dalla combustione domestica degli impianti non metanizzati e in misura molto minore (5%) dalle emissioni dei veicoli diesel. Per questo motivo la concentrazione di questo inquinante presenta una variazione stagionale molto evidente, con i valori massimi nella stagione invernale, in particolare nel sito di campionamento i valori riscontrati in inverno erano quattro volte superiori rispetto a quelli del periodo estivo.

In conclusione nel sito in esame il traffico autoveicolare è la principale sorgente del PM_{2.5}, come dimostrato dall'elevata correlazione riscontrata tra la concentrazione media oraria del CO e del PM_{2.5}. Inoltre, l'utilizzo della microscopia elettronica a scansione munita di spettrometria a raggi X

a dispersione di energia consente di individuare le principali componenti del particolato dovute al traffico veicolare (particelle ricche di C e metalli) e l'identificazione degli elementi presenti su di esse fornisce informazioni utili per lo studio dei processi di trasformazioni che le particelle subiscono in atmosfera.

Bibliografia

- Gent JF, Koutrakis P, Belanger K et al. (2009) Symptoms and medication use in children and traffic-related sources of fine particle pollution. *Environ Health Perspect* 117:1168–1174.
- Bell ML, Ebisu K, Leaderer BP et al. (2014) Associations of PM_{2.5} Constituents and Sources with Hospital Admissions: Analysis of Four Counties in Connecticut and Massachusetts (USA) for Persons \geq 65 Years of Age. *Environ Health Perspect* 112(2).

OBSERVATION OF ROTIFER JAWS AT SEM IN ECOLOGY AND EVOLUTION

Diego Fontaneto¹, Giulio Melone²

¹National Research Council, Institute of Ecosystem Study, Verbania Pallanza, Italy

²University of Milan, Department of Life Sciences, Milano, Italy

E-mail: d.fontaneto@ise.cnr.it

The phylum Rotifera is a group of microscopic animals, usually much shorter than 1 mm, living in any habitat where water is available: rotifers can be found in permanent water bodies such as lakes, ponds, and rivers, but also in the water layer between soil particles, mosses and lichens, and in the meltwater of glaciers (Fontaneto and De Smet 2015). Rotifers are very diverse, and occupy different dietary niches, with species that are filter-feeders, predators, browsers, piercers, parasites, etc. Such diversity in the feeding strategies is revealed in the wide variety of shape of the hard pieces that form the masticatory apparatus, the trophi (Figure 1). Trophi reflect taxonomic differences (so that detailed differences are used for species identification), evolutionary relationships (trophi are used in the morphological classification of most taxonomic ranks), and ecological adaptations (trophi reflect different feeding adaptations).

The diversity of trophi shape and functions found applications in functional ecology. Given that different species are adapted to different feeding strategies in what are called feeding guilds (Obertegger *et al.* 2011) and that trophi reflect such feeding strategies, observation of the propor-

tion of trophi types in a sample, for example the ratio between the abundance of predator and microphagous trophi, can be used to identify the pollution level of the water body where the sample come from. Such approach in functional ecology started years ago with the saprobic system in rotifers (Sládek 1983), and has been already applied and extended in different studies.

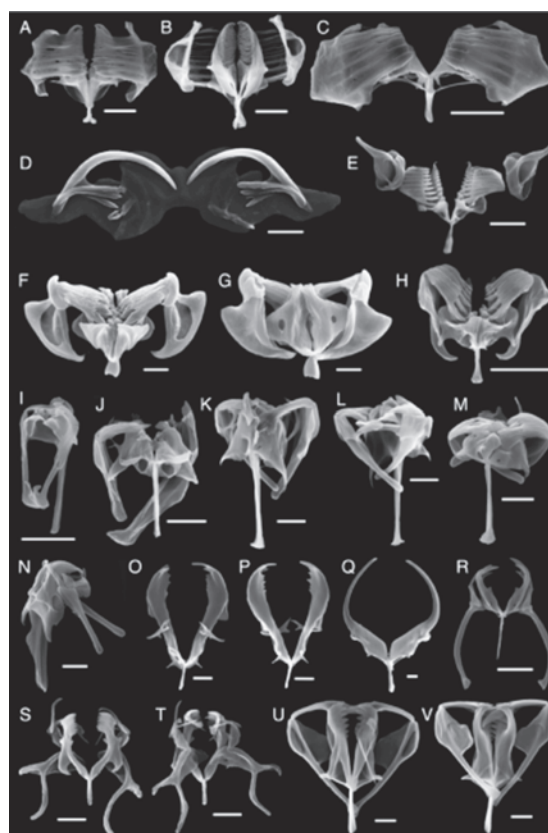


Figure 1. Different types of trophi in rotifers at SEM (modified from Fontaneto and De Smet, 2015). Scale bar = 10 micrometers.

Analyses of more detailed differences in trophi shape have been used also to address evolutionary questions on the role of adaptation in speciation processes, especially comparing different groups of rotifers (Fontaneto and Barraclough 2015), and applying quantitative approaches in the description of shapes, such as geometric morphometrics.

The literature of rotifer trophi and their applications in taxonomy, systematics and ecology is rather vast. For the reader interested in the use of SEM pictures of rotifer trophi, several SEM pictures, together with instructions on how to prepare the samples for SEM observation, can be found on the Rotifer Trophi Web Page (http://www.rotifera.hausdennatur.at/Rotifer_data/trophi/), within

the large framework of the Rotifer World Catalogue (Jersabek and Leitner 2013). An exhaustive explanation on how to prepare rotifer trophi for SEM is reported in De Smet (1998).

References

- De Smet WH (1998) Preparation of rotifer trophi for light and scanning electron microscopy. *Hydrobiologia* 387: 117-121.
- Fontaneto D, Barraclough TG (2015) Do species exist in asexuals? Theory and evidence from bdelloid rotifers. *Integrative and Comparative Biology* 55: 253-263.
- Fontaneto D, De Smet WH (2015) Rotifera, chapter 4. In Schmidt-Rhaesa, A. (ed), *Handbook of Zoology: Gastrotricha, Cycloneuralia and Gnathifera*, Vol. 3, Gastrotricha and Gnathifera De Gruyter, Berlin: 217-300.
- Jersabek CD, Leitner MF (2013) The Rotifer world catalog. World Wide Web electronic publication. Available from: <http://www.rotifera.hausdernatur.at>
- Obertegger U, Smith HA, Flaim G et al. (2011) Using the guild ratio to characterize pelagic rotifer communities. *Hydrobiologia* 662: 157-162.
- Sládek V (1983) Rotifers as indicators of water quality. *Hydrobiologia* 100: 169-201.

THE APPLICATION OF ELECTRON MICROSCOPES TO THE ENVIRONMENTAL BIOMONITORING: A BENTHIC FORAMINIFERAL PERSPECTIVE

Fabrizio Frontalini¹ and Davide Curzi²

¹Department of Pure and Applied Sciences, Urbino University, Urbino, Italy

²Department of Biomolecular Sciences, Urbino University, Urbino, Italy

E-mail: fabrizio.frontalini@uniurb.it

Benthic foraminifera, single-celled eukaryotes, have been proven to be suitable and reliable proxies of pollution impacts in marine and transitional marine environments ⁽¹⁾. They respond to adverse ecological conditions including pollution by changing assemblage compositions and parameters (diversity and density) as well as cellular ultrastructure. Although major advances have been achieved over 50-60 years, we are still far from fully understanding the benthic foraminiferal response, particularly at ultrastructure level, to pollution. On the basis of mesocosms' experiments with lead and mercury coupled with techniques of electron microscopes (transmission electron microscopy and environmental scanning electron microscopy associated with energy dispersive spectrometer), it was possible to iden-

tify changes in the ultrastructure of *Ammonia parkinsoniana* ^(2,3). An increase of lipid droplets characterized by a more electron-dense core, proliferation of residual bodies, a thickening of the organic lining, mitochondrial degeneration, autophagosome proliferation and the development of inorganic aggregates are among the main cytological alterations of benthic foraminifera in response to pollutant exposure. Interestingly, the presence of Hg within the foraminiferal cell has been, for the first time, identified. Mercury has mainly been localized in the organic linings of the foramen/septa, at the basal part of pores and as cytoplasmic accumulations (Figure 1). All these cytological modifications might be related to the pollutant-induced stress and some of them such as the thickening of organic lining might suggest a potential mechanism of protection adopted by foraminifera.

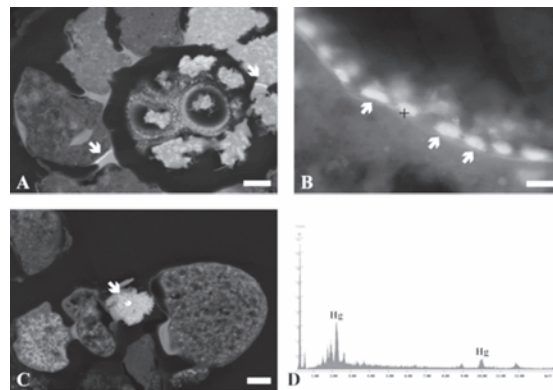


Figure 1. Hg accumulations (⚡) in the organic linings of the foramen/septa (A), at the basal part of pores (B) and as cytoplasmic accumulations (C). EDS spectrum of Hg accumulation (+: point analysis at picture B) (D). Bars: A: 20 μ m; B: 1.25 μ m; C: 15 μ m.

References

- Frontalini F, Coccioni, R (2011) Benthic foraminifera as bioindicators of pollution: A review of Italian research over the last three decades. *Revue de Micropaléontologie* 54, 115-127.
- Frontalini F, Curzi D, Giordano FM et al. (2015) Effects of lead pollution on *Ammonia parkinsoniana* (foraminifera): ultrastructural and microanalytical approaches. *Eur J Histochem* 59:2460.
- Frontalini F, Curzi D, Cesarini E et al. (2016) Mercury-Pollution Induction of Intracellular Lipid Accumulation and Lysosomal Compartment Amplification in the Benthic Foraminifer *Ammonia parkinsoniana*. submitted to PlosOne.

ELECTRON MICROSCOPY IN THE STUDY OF THE ECOLOGICAL DIVERSITY OF SELECTED MEDICINAL SPECIES PRESERVED AT THE GHIRARDI BOTANIC GARDEN (TOSCOLANO MADERNO, BRESCIA)

Claudia Giuliani^{1,2}, Laura Maleci Bini³, Gelsomina Fico^{1,2}

¹Department of Pharmaceutical Sciences (DISFARM), University of Milan, Milan, Italy

²Ghirardi Botanic Garden, University of Milan, Toscolano Maderno (Brescia), Italy

³Department of Biology (BIO), University of Florence, Florence, Italy

E-mail: claudia.giuliani@unimi.it; maleic@unifi.it; gelsomina.fico@unimi.it

The Ghirardi Botanic Garden (GBG, Toscolano Maderno, Brescia) of the Department of Pharmaceutical Sciences of the University of Milan is part of the Network of the Botanic Gardens of Lombardy. It has a long tradition in the cultivation, study and preservation of the genetic resources of medicinal species, in accordance with the priority tasks of the Convention on Biodiversity.

The plant heritage of GBG is the core-topic of a dedicated research project (IRIS code-2014-PDF-0363) integrating multidisciplinary studies on target-species. The main objective of the project is the characterization of the morphological and functional complexity of these plants, "observed" as interacting, dynamic components of their own ecosystem.

Indeed, a dual perception drives the whole work program: *phyto-centric*, through the study of the biotic mutualistic interactions, mediated by the emission of secondary metabolites, and *anthropo-centric* with the aim of assessing their importance for humans in the therapeutic, food and cosmetic sectors.

The work program includes: (i) the morphological characterization of the secretory tissues, (ii) the analysis of the phytochemical profiles, (iii) the analysis of the biological activities of the secondary metabolites; (iv) case-studies on their ecological and functional roles. In this perspective, GBG represents a "natural lab" for studying the morphological and phytochemical diversity of the selected plants in an integrated ecological framework.

As preliminary activities of the project, we addressed our interest towards a better understanding of the micro-morphology of the secreting structures of target-species belonging to the Lamiaceae family, well-known to produce terpenoid and phenolic substances, generally bioactive: *Lavandula dentata* L, *Salvia greggii* Grey, *Salvia blepharophylla* Brandege, *Salvia verticillata* L, *Salvia uliginosa* Benth, *Scutellaria caucasica*

A.Ham, *Scutellaria altissima* L, *Scutellaria brevibracteata* Stapf, *Teucrium chamaedrys* L.

Plant material was collected at anthesis in June 2015 and the samples were treated with the routine procedures for the micromorphological investigation using light microscopy and electron microscopy, allowing to observe: (i) the structure and distribution of glandular *indumentum* on both vegetative and reproductive organs, (ii) the histochemical nature of the secreted substances, (iii) the mode of production and release of the secretory products.

Indeed these structures, sites of the synthesis of bioactive compounds, are key-topics in the scientific research field, in viewing of a possible exploitation by humans.

The glandular *indumentum* displayed both peltate and capitate trichomes; four main morphotypes have been recognized (Figures 1 and 2):

- type A, present on leaves and inflorescences of all of the species, is a typical peltate hairs. It is constituted by a basal epidermal cell, a neck-cell and by a multicellular glandular head surrounded by a large subcuticular space in which the secretion is stored. In *Lavandula dentata*, the secretion is exclusively composed by terpenes, but in the other species its composition is more complex. Indeed, the responses to all the lipophilic stainings are positive as well as to Ruthenium Red and AlCl₃, indicating the presence of terpenes and also of major polysaccharidic and flavonoidic fractions. The ultrastructure of the active secreting cells confirms the results of the histochemical survey: the presence of both lipophilic and hydrophilic components appear as osmiophilic droplets immersed in an abundant granular matrix. The secreted material is released after cuticle rupture.
- type B is a short capitate hair widespread on both the vegetative and the reproductive organs of all the examined species. It is constituted by a basal epidermal cell, a neck-stalk cell and by a glandular head of 2-4 cells surrounded by a thin subcuticular space. Generally these trichomes present an exclusive polysaccharide secretion released through the intact cuticle. The ultrastructural observations confirm the histochemical results.
- type C is a long capitate trichomes observed only on *Salvia* species. It is composed by 1-2 epidermal cells, 2 stalk cells, 1 neck cell and by a globose head of 1-2 secretory cells surrounded by a storing chamber. The secretion proved positive to all the lipophilic stainings, particularly to the Nadi reagent, indicating that they are exclusive terpene producers. The cytoplasm of the secreting cells is rich in plastids containing starch granules and a well-developed smooth endoplasmic

reticulum, cellular compartments typical of a terpenoid secretion.

- type D is a long capitate trichomes observed only on the inflorescences of *Scutellaria* species. It is composed by 2 epidermal cells, 2-4 stalk cells, 1 neck cell and by 8 up to 18-20 secretory cells. Each secretory cells presents a small subcuticular space at the apex. The secretion is characterized by a complex composition, positive to lipophilic and hydrophilic dyes. Therefore, the secretory products are constituted of polysaccharides, terpenes and polyphenols. On the apex of each secreting cell a small portion of the cuticle layer raises, originating a small chamber in which electron-dense fibrillar or granular material is stored. Occasionally some prearranged openings for the release of the secretion were observed during SEM investigation, but most part of the secreting material seems to be extruded through the outer periclinal wall.

These highly-specialized secretory structures are characterized by different types of secretions: type B trichomes produce and release exclusively polysaccharides in all of the species; type C hairs in *Salvia* and type A hairs in *Lavandula dentata* are exclusive terpene producers. On the contrary, in all of the other species the secretion of type A, as well as type D trichomes in *Scutellaria*, is characterized by a complex mixture of both hydrophilic and lipophilic substances.

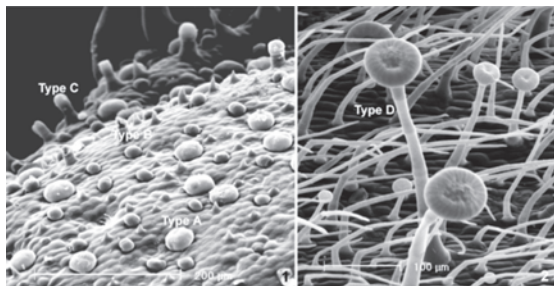


Figure 1. Glandular trichomes on the calyx abaxial side of *Salvia greggii*: peltate type A, type b short capitate, type C long capitate.

Figure 2. Type D long capitate trichomes on the calyx abaxial side of *Scutellaria altissima*.

The micromorphological diversity of the target-species was compared with their phytochemical profiles, through the analysis of the volatile organic compounds (VOCs) emitted from both leaves and flowers. The results indicated that distinctive volatiles characterize each species, presumably determining heterogeneous spectra of visitors and/or effective pollinators. In addition, each species exhibited divergent vegetative and floral bouquets, probably crucial in acting different func-

ional roles.

With the aim of combining these data with ecological information, we also performed some preliminary observations on the spectrum of insect visitors. These data, in combination with the micromorphological and phytochemical diversity, enabled us to raise some intriguing considerations about the adoption of different pollination strategies across the target-species.

SEM/EDX AND ESEM/EDX ON PLANT SAMPLES FOR METALS AND SEMIMETALS ANALYSIS

Marta Marmiroli, Elena Maestri, Nelson Marmiroli

Department of Life Science, University of Parma, Parma, Italy

E-mail: marta.marmiroli@unipr.it

Biological samples are non-compatible with the standard operational requirement of Scanning Electron Microscopy or transmission electron microscopy, that are high vacuum and electrons conductivity. For this reason they undergo several steps of “sample preparation” in order to achieve the best possible state to be inspected using electron beams. The more wide spread preparation techniques are: cryo drying followed by freeze etching and C (or Au) vacuum coating and chemical procedure consisting of fixation, staining, dehydration, resin embedding, sections cutting and coating with C (or Au) ⁽¹⁾. However physical and chemical interactions with the sample may lead to artifacts and loss of features. In the case when microanalysis is to be applied in combination with Scanning electron microscopy, most sample preparations strategies are counterproductive because they remove the original biological molecules and substitutes with other that are chemically analogous, but containing different atomic species. The starting elemental content is no longer available for the X-ray acquisition. When both the morphology and the elemental content are to be analyzed a gentler sample treatment is required. In the cases reviewed here, the scopes were: the elemental mapping of plant micro, macro-nutrients and contaminants to highlight organs and tissue distribution, to achieve a semi-quantitative measure of the most important elements, to correlate the presence of specific elements with morphological traits at the level of cell structure. This led us to the application of a simple, but effective sample preparation protocol: 0.5 - 1 mm cross-sections were cut from roots and stems, leaf were left untouched; drying at room temperature under fume hood. Samples with the smoothest surface were chosen after optic microscopy inspection, mounted on SEM slides or stubs using carbon

tape, vacuum coated with colloidal graphite. By means of this procedure the surface topography of the plant sections and of the leaf can be analyzed for both morphology using SEM and elements abundance using EDX. The analyses were performed under high vacuum with a Jeol 6400 Scanning Electron Microscope equipped with an Oxford X-ray Si(Li) detector with a Be window. Excitation voltage was set at 20 kV, ideal for heavy metals and metalloids K, and L, emission lines; the working distance was 12-14 mm, and the effective acquisition time for one scan was 60 s plus a lag time of 20 - 25%. The penetration depth, considering the above parameters and an average sample density of 1.5 - 2 g cm⁻³, was calculated to be 5 mm for the thickest tissues, rising to 5.5 mm for the less dense ones. The diameter of the electron beam, the most important factor for the quality of the horizontal resolution, was estimated at 1 mm for the 1000x magnification. These parameters were verified to be conserved though the different experiments. With the support of the LINK-ISIS, after 2007 INCA, software to implement the Oxford microprobe, two main categories of X-ray emission-based analyses were available. Point semi-quantitative analyses, using internal standards, and dot maps of elements of interest for some samples with a particularly uniform surface. Background subtraction and spectra deconvolution were automatically performed by the software through its internal standards databank.

Metal-hyperaccumulator plants constitute a cornerstone in the study of plant-metals interaction. According to the original definition, these are "terrestrial higher plants which are able to accumulate metallic elements in their dry matter to an exceptional degree" without showing symptoms of toxicity⁽²⁾. Among these *Alyssum bertolonii*, growing in the Tuscany (Italy), was reported to contain an extraordinarily high Ni content in the shoot dry matter, above 10 000 µg g⁻¹. *A. bertolonii* and its cogener non-hyperaccumulator *A. montanum*, growing on the same serpentine site, were analyzed for metals concentration and localization using SEM/EDX to acquire dot-maps of elements distribution within roots, shoots and leaves, and to perform a semi-quantitative analysis on the same organs. In *A. bertolonii*, a specific pattern of Ni distribution was detected, highest concentrations in parenchyma and sclerenchyma for the roots; in the stem epidermis for the shoots, and the leaf trichome base. This distribution was not observed in *A. montanum*. Other mineral nutrients, Mg, Ca, K, Fe, instead, had a similar distribution in the two species⁽³⁾.

Populus spp. are widely used for the commercial production of paper, pulp, and wood, they

constitute a fundamental ecological resource, and physiology, phenology and genetics of a number of species in this genus have been thoroughly investigated. The Western poplar (*P. trichocarpa*) in particular has been adopted as a model tree species and its genome has been fully sequenced⁽³⁾. The ability of several poplar clones to take-up Cd, its distribution and interaction with other elements, morphological changes associated with Cd content have been investigated using SEM/EDX. This was instrumental to associate plants physiological response to Cd with their genetic background, evaluated as SNPs level in target genes, and the proteome ensuing from Cd treatments. Cd tolerant clones shared a common increase in stem tissues lignification and suberization, these tissues were used for Cd sequestration^(4, 5).

Tomato is a major horticultural crop in both Europe and the US, but its fruit can be compromised by As contamination. Feeding of Si to tomato crops has been used to alleviate drought and salinity stress, but to date no attempt has been made to correlate Si supplementation with As uptake and its translocation to the aerial part of the plant, however Si treatment influenced As uptake in a strongly cultivar-dependent way. SEM/EDX dot maps of As, Si, and other nutrients, distribution within tomato organs cross sections were acquired to correlate the elements tissue distribution with the type of treatment and with the different cultivar types and genetic background⁽⁶⁾.

To overcome the drawbacks of high vacuum SEM/EDX, new technical solutions for the scanning microscope set-up have been investigated, so far the most successful is the environmental SEM (ESEM), where a low vacuum is maintained in the sample column, thanks to new-conception detectors scattered and backscattered electrons are acquired for imaging and, at the same time, a standard EDX detector can acquire the elements X-ray spectra. This technique is particularly useful to analyze fragile in vitro grown plants. In this case the delicate model plant *A. thaliana* was mounted on the microscope stub as fresh, morphology aberrations and elemental content were investigated, then associated with particular growth regimes. The experiments were performed using a ESEM FEG2500 FEI, operating in low-vacuum, the LFD (large field detector) allowed optimal SE imaging, while the cone PLA 500µm improved the signal available to the Bruker X-ray detector (manuscript in preparation)

References

- 1) Hajibagheri MAN (1999) Electron microscopy

Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology series, vol.17, Human Press, Totowa, New Jersey, USA.

- 2) Baker AJM (1989) *Biorecovery*, 1, 81-126.
- 3) Marmiroli M et al. (2004) *Plant Biosys*, 138, 231 – 243.
- 4) Marmiroli M et al. (2011) *Environ. Sci. Technol*, 45, 4497–4505.
- 5) Marmiroli M et al. (2013) *Chemosphere*, 93, 1333–1344.
- 6) Marmiroli M et al. (2014) *Environ. Exp. Bot*, 99, 9–17.

ADVANTAGES IN SEM USE DURING ENVIRONMENTAL REMEDIATION

F. Paglietti, S. Malinconico, B. Conestabile della Staffa, S. Bellagamba, P. De Simone

INAIL, Department of the Production Plants and Human Settlements, Roma
E-mail: f.paglietti@inail.it

INAIL scope is workers protection and assistance from any kind of damage resulting from work related accidents and occupational diseases freeing employers from any civil liability. INAIL Department of Production Plants and Human Settlements (DIT) in order to protect the health and environmental safety in conjunction with the presence of production facilities and human settlements realizes environmental investigations, evaluates safety and reliability of systems, proceeds to the overall risk assessment, measures and assess the physical and chemical hazards in air, water and soils, gives instructions in adverse events or emergency situations, identify possible remedies and corrective actions for remediation activities in contaminated sites, identifies best available techniques and procedures for the reduction of impacts on the territory, evaluates new and emerging risks related to the use of biotechnology in industry and agriculture, environmental microbiology, bioremediation, biotreatment of wastewater, etc..

To provide adequate technical and scientific contribution on asbestos problems, DIT created a specific Group focused on Asbestos risk to work, on health and environmental asbestos legislation, prevention and safety plans, training and information on asbestos risk, asbestos mapping, asbestos risk assessment, asbestos monitoring, planning and evaluation of remediation projects, naturally occurring asbestos, asbestos contaminated soils, asbestos waste and contaminated leachate. This Group works on applied researches for the identification and mapping of contaminated sites in Italy and to create specific operational protocols. These, for the safety of operators engaged in envi-

ronmental remediation work and to protect surrounding living environments. The Group, moreover, manage three laboratories for analysis of environmental matrix (two mobile laboratories) to make sampling and analysis, often on-site. These are equipped with SEM, Gas-mass, PCOM-PLM Microscopes, airborne samplers, and all the equipments for preparation for on-site analysis (vaporization, filtration, sputtering, balances, cupboards, etc.) and a meteo-climatic control unit.

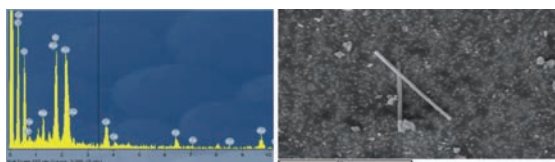


The importance of the use of such equipments, and in particular SEM on vehicle, is in:

1. on-site inspections;
2. immediacy of sampling and analytical response;
3. quality of the analytical response (on-site certification by a Public Body);
4. possibility of elaborate on-site immediate and long term risk reduction methodologies;
5. timely technical and scientific assistance during joint inspections with local Environmental and Health Authorities and Environmental Police;
6. action to deter illegal activity or mismanagement of emergency responses, environmental remediation and restoration of contaminated sites.
7. environmental and personal samplings during remediation different steps.
8. restitubility certification for site re-use (compulsory by SEM in Italian law).

Considering that in Italy there are 40 Superfund requiring remediation, for about 3% of the national territory distributed in all Italian regions, with different risk factors for human health and the environment, it is clear the importance of the use of such laboratories and in particular of SEM for analytical detection. A practical example is the Biancavilla case. Biancavilla Etnea (Catania, Sicily, Italy) is located on south-western side of the Etna volcano and in 1999 were noted an anomalous range of asbestos related diseases (~ 17%). Specific monitoring campaign realized by INAIL, ISS, University of Catania, ARPA Sicilia, etc, using SEM have shown that the pollutant is the mineral Fluoro-edenite, with fibres very thin (less than 1 μm in diameter) and relatively long (up to 50-80 μm). The main source of pollution turned out to be two breccia quarrying sites and all municipality soil, analyzed by SEM, was polluted at variable

concentrations. INAIL realized an early environmental investigation in urban areas, detecting very high concentration of Fluoro-edenite fibers (60-80f/l detected - threshold limit =1 f/l) in the quarries and the constant presence of airborne Fluoro-edenite all over the urban area.



Hence safety measures were implemented as: closing down quarrying sites and paving dirt roads, disposal of filling material, landfilling debris deriving from urbanization works and the excavation of metropolitan tunnel, special precautions during street sweeping, replacing the sweeper in use with asbestos specific equipment, all wet cleaning operations also at home, resurfacing the area of the contaminated sports ground with grassy layer, etc. After the adoption of the above-mentioned measures, to assess their effectiveness, INAIL carried out an additional monitoring by SEM to evaluate the airborne concentration in various urban neighborhoods. The analytical results confirmed the presence in all samples of Fluoro-edenite fibres in the urban area, but this time never exceeding the threshold value for urban environments of 1f/l as set by the WHO document "Air Quality Guidelines for Europe". So this paper highlights the important role of SEM use during monitoring campaigns carried out to identify, firstly the contamination source, and secondly, the most adequate remediation actions to adopt in contaminated sites.

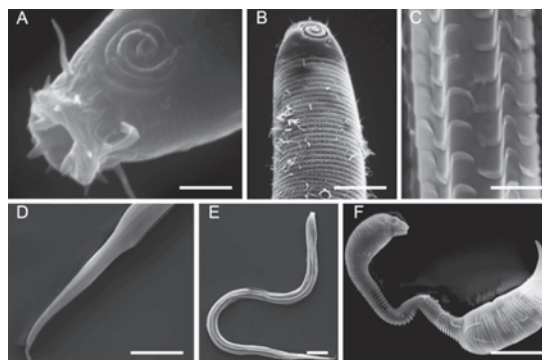
NEMATODI MARINI: ADATTAMENTI E STRATEGIE DI SOPRAVVIVENZA ALL'AMBIENTE

Federica Semprucci, Loretta Guidi, Maria Balsamo

Dipartimento di Scienze Biomolecolari (DISB), Università degli Studi di Urbino Carlo Bo, Campus Scientifico "E. Mattei", Urbino (PU), Italy
E-mail: maria.balsamo@uniurb.it

La granulometria del sedimento è un fattore chiave nel determinare la struttura e la biodiversità delle comunità meiobentoniche e dei nematodi (1-2). Pertanto, un'analisi statistica è stata effettuata su un set di campioni raccolti in due crociere scientifiche (2005 e 2007) nell'arcipelago maldiviano. In quest'occasione abbiamo testato le possibili variazioni di alcuni caratteri morfologici e funzionali dei nematodi (es. cavità boccale, forma del-

l'anfidio, ornamentazione della cuticola, forma della coda, e strategia di vita) a variazioni nella granulometria dei sedimenti e a diverse condizioni idrodinamiche (A-F). Nella crociera del 2005, sono stati analizzati i possibili cambiamenti di caratteri morfo-funzionali in nematodi di sabbie da fini a molto grossolane: tutti i caratteri sono risultati significativamente differenti. In particolare, le sabbie medio-grossolane sono apparse quelle a più elevata diversità sia tassonomica che morfo-funzionale. L'ornamentazione della cuticola e la strategia di vita erano ben diversificate anche in sabbie molto grossolane, mentre la forma della coda lo era solo in sedimenti fini. Questi dati contribuiscono a sottolineare quanto le sabbie medio-grossolane siano ricche di nicchie ecologiche per gli organismi della meiofauna, che non solo risultano qui più diversificati dal punto di vista tassonomico⁽³⁾, ma anche per aspetto morfologico e strategia adattativa.



Osservazione al SEM dei tratti morfo-funzionali considerati in questo studio: A, apparato boccale del genere *Dorylaimopsis*; B, anfidio multispiraleto del genere *Desmodora*; C, cuticola ad anelli orizzontali con creste longitudinali del genere *Ceramonema*; D, coda del genere *Halalaimus*; E, habitus del genere *Sabatieria* a strategia-r; F, habitus del genere *Metepsilonema* a strategia-k. Barre: A = 2,5 µm; B = 28 µm; C = 10 µm; D = 14 µm; E = 60 µm; F = 30 µm.

Quando gli stessi tratti biologici sono stati analizzati per verificare l'eventuale influenza di diversi livelli di idrodinamismo, ad eccezione della forma della coda, tutti hanno mostrato significative differenze. In particolare, il livello intermedio di energia è quello che è risultato correlato alla maggiore diversità: soltanto la forma della coda è apparsa più diversificata nel transetto caratterizzato dal livello di energia più basso. Questo confermerebbe anche la diversità tassonomica rilevata, e sarebbe in linea con la capacità dei nematodi di adattarsi ad un disturbo fisico di limitata intensità che anzi può favorirne la diversità (si veda la

teoria del disturbo intermedio di Connell e Slatyer, ⁴⁾. In conclusione, sabbie medio-grossolane e habitat con livello di energia intermedio sembrano favorire non solo un'ampia diversità tassonomica dei nematodi, ma anche una grande diversità di adattamenti morfologici e funzionali che riflette la loro grande eterogeneità in micro-nicchie.

References

1. Vanaverbeke J, Gheskiere T, Steyaert M et al. (2002) Nematode assemblages from subtidal sandbanks in the southern bight of the north sea: effect of small sedimentological differences. *J. Sea. Res.* 48, 197–207.
2. Semprucci F, Boi P, Manti A et al. (2010) Benthic communities along a littoral of the Central Adriatic Sea (Italy). *Helgol. Mar. Res.* 64, 101–115.
3. Semprucci F, Colantoni P, Baldelli G et al. (2010) The distribution of meiofauna on back-reef sandy platforms in the Maldives (Indian Ocean). *Mar. Ecol. Evol. Persp.* 31, 592–607.
4. Connell JH, Slatyer RD (1977) Mechanisms of succession in natural communities and their role in community stability and organisation. *Am. Nat.* 111, 1119–1144.

ULTRASTRUCTURAL APPROACH IN ENVIRONMENTAL MONITORING OF PHYTOPLANKTON, MICROPHYTOBENTHOS AND TOXIC MICROALGAE

Cecilia Toffi, Stefano Accoroni, Chiara Pennesi, Tiziana Romagnoli

*Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy
E-mail: c.toffi@univpm.it*

Algae are a heterogeneous group of organisms that accomplished their evolutive history in aquatic environment. These organisms live in a variety of aquatic habitats (e.g. seawater, lakes, rivers, saltmarshes, ice, thermal waters) even if some occur in terrestrial ones (e.g. soil, barks etc.). Some algal species can also establish important symbiotic relationships with other organisms.

The study of marine microalgae (i.e. unicellular microscopic algae) for monitoring purposes is traditionally carried out through light microscopy (LM), as it is a fast and low-cost method. However, the structural details that can be resolved through LM often do not allow their identification neither at the species level nor at higher taxonomical ranks.

Significant progresses have been achieved in the study of algal cells with the coming of electron microscopy era as new ultrastructural details have been observed. Therefore, a number of new species have been described while others have been revised and their taxonomic position emended. Nowadays,

modern systematics cannot disregard a deep ultrastructural analysis (associated with molecular analysis of gene sequences as well).

The capability to characterize a microalgal population at the species level is important for a number of ecologically significant reasons: some species could be used as indicators of climate changes, some others may have been introduced by anthropic activities (i.e. alien species), and some are toxin producers, with heavy impact in human and ecosystem health.

The scanning electron microscopy observation can be successfully applied to the study both of microalgae having (e.g. diatoms, thecate dinoflagellates, coccolithophyceans, or lacking (e.g. naked dinoflagellates, cryptophytes) a rigid cell wall.

The Critical Point Drying (CPD) preparation method allows the conservation of the organic structures and can be useful to observe the structure of the microalgal community, as it was originally arranged *in vivo*. This method has been used for studying both the epiphytic and the epizoic communities. Totti *et al.* ⁽¹⁾ investigated the epiphytic diatoms on several Icelandic seaweeds, highlighting that highly branched seaweeds with articulated showed a high level of colonization, while flat thalli with smooth surface mainly allowed the growth of erect diatoms. Regarding the epizoic microalgae, Bavestrello *et al.* ⁽²⁾ studied the relationships between benthic diatoms and hydrozoans, highlighting that hydroid colonies represent a mosaic of different microhabitats: in some species, each colony portion hosts different diatom species. This approach can also allow ecological studies, as algae can be identified and counted: the annual cycle of microphytobenthos community on *Eudendrium racemosum* showed that diatoms peaks occur in winter-spring, while cyanobacteria peaks in summer ⁽³⁾. The same approach has been applied to study the relationships between diatoms and Antarctic sponges: the diatom *Porannulus contentus* has been observed only in association with some sponge species where it form monospecific populations ⁽⁴⁾, while a diversified and complex community dominated by the diatom *Hyalodiscus* sp. live in association with the sponge *Sphaerotylus antarcticus* ⁽⁵⁾.

In the study of diatom systematics, and/or for a correct diatom identification, cleaning preparation methods are required to remove the organic component from the diatom frustule, allowing the observation of its siliceous nanostructures. New diatom species of both phytoplankton and microphytobenthos are currently described using such morphological ultrastructural approach (e.g. ⁶⁾). A number of phytoplankton studies used the SEM

ultrastructural approach to revise some important genera, such as the planktonic diatom *Skeletonema*, for which a number of new species have been described ⁽⁷⁾, allowing to define the actual biogeographic distribution of one of the most important planktonic genera ⁽⁸⁾.

The taxonomical resolution through EM appears particularly important whenever it is focused on potentially toxic taxa. For example, Lundholm *et al.* ⁽⁹⁾ resolved the taxonomy of *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* complex highlighting that it included four species (among which only two produce domoic acid - Amnesic Shellfish Poisoning) identifiable only by the *striae* details. The toxic *Alexandrium minutum* (involved in Paralytic Shellfish Poisoning) is distinguishable from the non-toxic *A. tamutum* only for the details of the plate tabulation ⁽¹⁰⁾. The EM was applied even to the studies on the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*, to define both morphometric ⁽¹¹⁾ and morphological details ⁽¹²⁾.

References

- Totti C, Poulin M, Romagnoli T et al. (2009) Epiphytic diatom communities on intertidal seaweeds from Iceland. *Polar Biology*, 32(11): 1681-1691.
- Bavestrello G, Cerrano C, Di Camillo C et al. (2008) The ecology of protists epibiotic on marine hydroids. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 88: 1611-1617.
- Romagnoli T, Bavestrello G, Cucchiari E et al. (2007) Microalgal communities epibiotic on the marine hydroid *Eudendrium racemosum* in the Ligurian Sea during an annual cycle. *Mar Biol* 151: 537-552.
- Cerrano C, Calcinai B, Cucchiari E et al. (2004) The diversity of relationships between Antarctic sponges and diatoms: the case of *Mycale acerata* Kirkpatrick, 1907 (Porifera, Demospongiae). *Polar Biol*, 27(4): 231-237.
- Totti C, Calcinai B, Cerrano C et al. (2005) Diatom assemblages associated with *Sphaerotylus antarcticus* (Porifera: Demospongiae). *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 85: 795-800.
- Pennesi C, Poulin M, De Stefano M et al. (2012) Morphological studies of some marine Mastogloia (Bacillariophyceae) belonging to section *Sulcatae*, including the description of new species. *J. Phycol.*, 48: 1248-1264.
- Sarno D, Kooistra WHCF, Medlin LK et al. (2005) Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae). II. An assessment of the taxonomy of *S. costatum*-like species with the description of four new species. *J Phycol* 41: 151-176.
- Kooistra WHCF, Sarno D, Balzano S et al. (2008) Global diversity and biogeography of *Skeletonema* species (Bacillariophyta). *Protist*, 159: 177—193.
- Lundholm N, Moestrup Ø, Hasle GR et al. (2003) A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* /*cuspidata* complex (Bacillariophyceae): what is *P. pseudodelicatissima*? *J. Phycol.* 39: 797–813.
- Montresor M, John U, Beran A et al. (2004) *Alexandrium tamutum* sp. nov. (Dinophyceae): a new nontoxic species in the genus *Alexandrium*. *J. Phycol.* 40, 398–411
- Accoroni S, Romagnoli T, Pichierri S et al. (2012) Morphometric analysis of *Ostreopsis cf. ovata* cells in relationship with environmental conditions and bloom phases. *Harmful Algae*, 19: 15-22.
- Honsell, G, Bonifacio, A, De Bortoli et al. (2013) New insights on cytological and metabolic features of *Ostreopsis cf. ovata* Fukuyo (Dinophyceae): a multidisciplinary approach. *PLoS One* 8 (2): e57291.

STUDIO ULTRASTRUTTURALE DEGLI EFFETTI SUGLI APPARATI IPO ED EPIGEI DELLA PIANTA IN RISPOSTA AD APPROCCI AGRONOMICI ECO-SOSTENIBILI

Alessandra Trinchera

Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA) e Centro di ricerca per lo studio delle relazioni tra pianta e suolo (RPS), Roma, Italia E-mail: alessandra.trinchera@crea.gov.it

L'applicazione della microscopia a scansione elettronica per studi ultrastrutturali nel settore agronomico sono di estremo interesse, soprattutto al fine di identificare strategie per limitare l'uso degli input chimici per la fertilizzazione, la protezione dalle fisiopatie e fisiopatologie, nonché il contenimento delle erbe infestanti in agricoltura. Si riportano di seguito alcuni esempi di ricerca che hanno previsto l'applicazione della microscopia elettronica in pressione variabile (30-10 Pa) su campioni vegetali. Lo strumento utilizzato è stato il microscopio EVO-MA 10 (Zeiss), equipaggiato con Beem-Sleeve Technology e lampada LaB₆ ad alta brillantezza, in grado di garantire elevate prestazioni analitiche, senza alcun pre-trattamento del campione biologico.

Tecniche di innesto delle ortive per fronteggiare le fisiopatologie - Una delle possibili strategie per fronteggiare le fisiopatologie dei alcuni vegetali si basa sull'uso dell'innesto, ossia sulla selezione di portinnesti resistenti al patogeno, in grado di trasferire tale resistenza anche all'innesto. In tal caso, la microscopia SEM in pressione variabile è stata utilizzata per uno studio sulla compatibilità istologica innesto/portinnesto tra il carciofo [innesto: *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* L.), cv. Romolo, R] ed il cardo (portinnesto: *Cynara cardunculus* subsp. *cardunculus*) coltivato (cv. Belgio, CC) e selvatico (cv. Sardo, WC), con l'obiettivo di ridurre la sensibilità del carciofo alla verticillosi. Tale studio ha permesso di identificare le combinazioni di innesto più promettenti attraverso la valutazione dell'evoluzione della unione

d'innesto all'interfaccia tra innesto/portinnesto, lo sviluppo del callo e la formazione di una completa vascolarizzazione (Trincherà *et al.*, 2013). Inoltre, è stato possibile evidenziare la formazione di desmotubuli contenenti plasmodesmata, quale primordi di connessione tra il portinnesto e l'innesto, mai rilevati nella combinazione cardo-carciofo (Figura 1, A-F), nonché la presenza di materiale pectinico sulle cellule dei tessuti all'interfaccia dell'innesto, in grado di favorire l'adesione fra i due bionti ed evitare la disidratazione dei tessuti durante l'innesto (Figura 1, G-L).

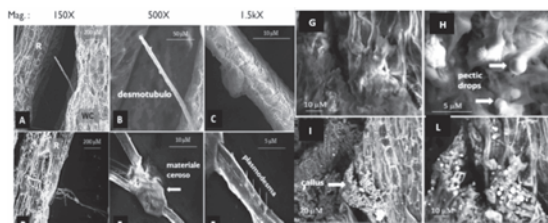


Figura 1. Desmotubulo e plasmodesma all'interfaccia dell'innesto tra carciofo (R) e cardo (WC e CC) (A-F); gocce di materiale pectico sulla superficie di innesto (G-L) (Detectors: VPSE e BSE; Chamber pressure: 20 Pa; Source: LaB₆; Mag.: A, D: 150X; B, E: 500X; C, F: 1.5 kX; I: 1.0 kX; G, L: 2.0 kX; H: 2,5 kX).

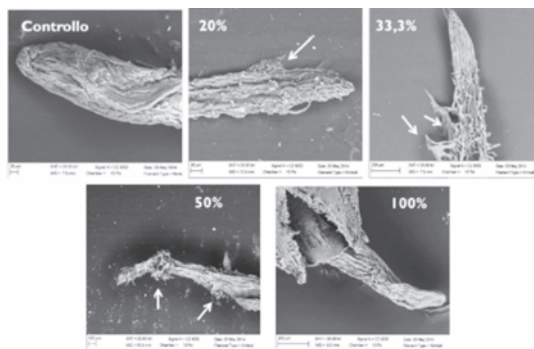


Figura 2. Effetto dell'apporto di estratti di segale a concentrazioni crescenti (0 - Controllo, 20, 33,3, 50 e 100% v/v) sullo sviluppo radicale del romice (Detector: BSE; Chamber pressure: 20 Pa; Source: LaB₆, Mag: 100-250X).

Effetto dell'uso di colture di copertura sullo sviluppo delle infestanti - Un altro esempio interessante di applicazione della microscopia SEM è costituito da studi sugli effetti allelopatici di piante cerealicole, ai fini del contenimento delle infestanti attraverso metodi compatibili con l'agricoltura biologica. Specificatamente, attraverso l'analisi SEM in pressione variabile, è stato valutato nella prima fase di germinazione l'effetto dell'apporto di estratti allelopatici di segale (*Secale cereale* L.) sullo sviluppo radicale di una infestante

target tipico dell'area mediterranea, il romice (*Rumex crispus* L.), simulando quanto si verifica in campo. I risultati hanno mostrato come l'apporto di estratti a concentrazione crescente (dil.: 0, 20%, 33,3 %, 50% e 100% v/v estratto in acqua) comporti una progressiva riduzione dello sviluppo della radichetta, fino alla degenerazione tissutale (al 50%) e alla completa inibizione di crescita quando applicati senza alcuna diluizione (al 100%) (Figura 2).

Effetto della gestione agronomica sulla micorizzazione radicale - Un'ultima esperienza riguarda l'applicazione della microscopia elettronica all'uso della pacciamatura verde in agricoltura biologica ed i suoi effetti sulla micorizzazione radicale del carciofo. Nello specifico, in questo caso sono stati confrontati apparati radicali di piante di carciofo [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.), cv. Jesino, Je] cresciute in presenza di pacciamatura verde (mix di erbe, selezionato, LM) e gli stessi apparati radicali di carciofo, cresciuti in assenza di pacciamatura (in presenza di erbe spontanee, no LM) studiandone lo sviluppo e l'entità della simbiosi micorrizica come positivi effetti della pacciamatura. Lo studio, che ha previsto campionamenti di campo biennali e analisi delle radici fresche in SEM-VP, hanno rivelato come la pacciamatura verde (Je LM) induca un incremento nello sviluppo di peli radicali ed un netto miglioramento nella simbiosi micorrizica rispetto al controllo (Je no LM), con indubbi vantaggi da parte del carciofo in merito alla sua capacità di assimilare il fosforo (Figura 3).

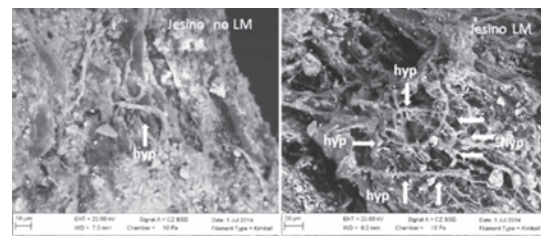


Figura 3. Ife micorriziche (hyp) di radici di carciofo (cv. Jesino), in assenza (no Je LM) e presenza (Je LM) di pacciamatura verde (Detector: BSE; Chamber pressure: 20 Pa; Source: LaB₆; Mag. 750X).

In conclusione, l'uso della microscopia SEM negli studi ultrastrutturali sulle colture fin qui proposti hanno permesso di individuare e teorizzare interessanti meccanismi fisiologici ed eco-fisiologici, successivamente verificati anche attraverso analisi di tipo chimico, biochimico e fisiologico. Per questo, la microscopia SEM può essere considerata in taluni casi un «apripista» per lo sviluppo di ricerche innovative, soprattutto

to nel campo della eco-fisiologia vegetale mirata alla tutela ambientale.

IDENTIFICAZIONE E ANALISI DI MARKER AMBIENTALI MEDIANTE MICROSCOPIA ELETTRONICA AMBIENTALE

Laura Valentini

Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università degli studi di Urbino, Italy
E-mail: laura.valentini@uniurb.it

Questo lavoro riporta una serie di casi di applicazione della microscopia elettronica a scansione (SEM) in problematiche ambientali, attraverso recenti ricerche condotte da diversi gruppi afferenti all'Università di Urbino, talora in collaborazione con altre università ed enti, pubblici e privati. Lo strumento utilizzato è un SEM di tipo ambientale (FEG-ESEM, Quanta 200, FEI, The Netherlands), provvisto di microsonda a raggi X (Energy Dispersive Spectroscopy EDS, EDAX, Mahwah, NJ, USA), di rilevatore per elettroni secondari (SE) e di rilevatore per elettroni retrodiffusi (BSE). Le analisi sono state condotte talora in condizioni di alto vuoto (pressioni attorno ai 10^{-6} torr), talora in condizioni di basso vuoto (pressioni fra 10^{-1} e 1 torr), oppure in modalità ESEM (pressioni fra 0,1 e 20 torr). I casi di studio riguardano tre grandi ambiti: aria, suolo e acqua.

Settore Aria

A - Un importante capitolo di questo settore riguarda la individuazione e caratterizzazione di materiali fibrosi aero-dispersi. In determinate situazioni a rischio, fra cui le bonifiche di siti, è necessario mettere in atto quelle procedure previste dalla normativa vigente allo scopo di monitorare la presenza di fibre aero-disperse, di classificarle e quantificarne la presenza per unità di volume di aria campionata. Fra le tante tipologie di fibre naturali o artificiali esistenti, è prioritario il riconoscimento di materiali fibrosi classificati come cancerogeni o come pericolosi per la salute umana, quali le fibre di amianto, le fibre ceramiche e le vetrose (Figura 1).

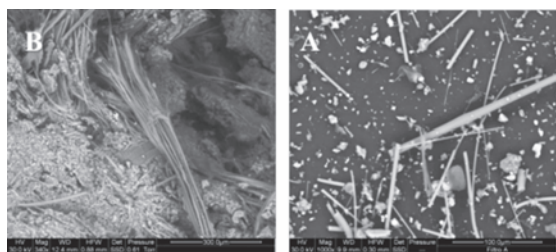


Figura 1. Fasci di fibre di crisotilo (A); fibre ceramiche e vetrose su filtro (B).

In particolare, i numerosi minerali dell'amianto (fra i più diffusi il crisotilo, la crocidolite e l'amosite), utilizzati in passato in vari ambiti (industria, edilizia, agricoltura, etc.), hanno la peculiarità di separarsi in fibre sottilissime, riconoscibili e classificabili in maniera precisa in microscopia elettronica, attraverso la combinazione fra l'analisi morfologica e l'analisi chimica in EDS.

B - I minerali dell'amianto, associati geneticamente a determinate tipologie di rocce (ofioliti e serpentiniti), sono presenti naturalmente nell'ambiente. Una recente ricerca svolta sul "Complesso di Pietra Parcellara", deposito caratterizzato dalla presenza di olistoliti con serpentiniti e breccie ofiolitiche (località La Costa, Parma), ha messo in evidenza la presenza di una fitta rete di vene riempite da minerali carbonatici. Il SEM ha permesso il riconoscimento di cristalli di calcite intimamente associati a crisotilo in fibre sottili, passando dall'aspetto massivo della calcite a quello fibroso del crisotilo (Figura 2).

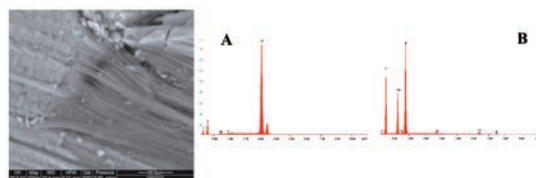


Figura 2. Passaggio dall'aspetto massivo (calcite; spettro A) a quello fibroso (crisotilo; spettro B).

Le fibre di crisotilo appaiono ben formate e come una estensione degli stessi cristalli di calcite. Una serie di analisi in EDS lungo l'interfaccia fra le fasi ha evidenziato una transizione composizionale graduale fra i due termini estremi. E' stata pertanto documentata per la prima volta la crescita di crisotilo entro vene di calcite; poiché tali vene carbonatiche sono estremamente diffuse in questo tipo di rocce, la presenza di crisotilo è un dato che potrebbe costituire un nuovo elemento di rischio ambientale ⁽¹⁾.

C - Il 14 aprile 2010, in seguito ad una eruzione esplosiva del vulcano islandese Eyjafjallajokull, è stata prodotta una nube di ceneri che si è innalzata nella troposfera fino a circa 9 km e, per effetto dei venti dominanti, si è dispersa progressivamente in direzione SE. Il passaggio della nube, documentato in Norvegia, in Olanda, in Germania ed in Grecia, ha provocato numerosi disagi, fra cui il blocco per giorni del traffico aereo in Europa. Analisi granulometriche, morfologiche e composizionali svolte su campioni di particolato filtrato da acqua piovana (i campioni sono stati raccolti a Rimini nell'arco temporale 19 aprile - 11 agosto

2010), hanno testimoniato il passaggio della nube anche in Italia⁽²⁾. Nell'eterogeneo particolato su filtro, infatti, sono comparsi in un momento preciso frequenti frammenti vetrosi dalla tipica morfologia spigolosa (glass-shards) oltre a cristalli sciolti (k-feldspato e pirosseno) riconducibili anche composizionalmente alla eruzione del vulcano (Figura 3).

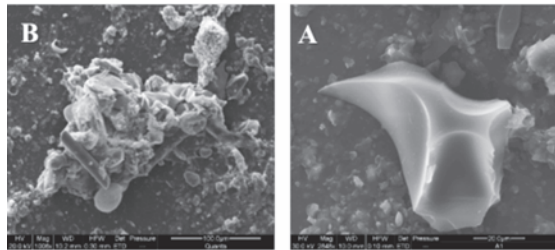


Figura 3. Aggregati particellari con cristalli (A); frammento vetroso (glass-shard; B).

D – Una interessante applicazione legata ai beni culturali riguarda una indagine in corso sulle superfici interne del giardino pensile del Palazzo Ducale di Urbino. Le cornici delle finestre sono realizzate con blocchi di arenaria (Arenaria di Sant'Ippolito) e calcare (Calcare Massiccio) e si presentano in uno stato di conservazione non ottimale essendo interessate da diverse tipologie di degrado (de-coesione, disgregazione, esfoliazione, etc.), oltre a diffusi sbiancamenti su tutta la superficie. Il campionamento di piccoli frammenti di materiale ha permesso di documentare la presenza di particelle estranee, legata a possibili trattamenti di pulitura e/o consolidamento o dovuta ad inquinamento ambientale. Frequente la presenza di particelle di: S e Ca (gesso connesso a processi di degrado da inquinanti gassosi o alla presenza di malte gessose di restauro); Ba e Sr (probabilmente dovuti ad un metodo di consolidamento utilizzato negli anni '60 per la sua azione de-solfatante e per ridurre la porosità); composti di Pb, Fe, Cr, Ti, Sn, Cu, Zn e Ni (probabilmente legati ad emissioni industriali e/o scarico degli autoveicoli; il Pb può essere legato anche a lastre di protezione ancora in parte presenti sulle cornici). Da approfondire la presenza occasionale di W, Au e terre rare.

Settore Suolo

E – È questo il caso di uno studio morfologico e chimico focalizzato sulle ghiandole digestive (hepatopaneas) di isopodi terrestri (*Porcellio scaber*) e rivolto alla valutazione di contaminanti nei suoli (Figura 4). Numerosi individui sono stati raccolti in area agricola non coltivata e presumibilmente non contaminata, di cui è stato analizzato anche il suolo. L'analisi in EDS sulle cellule di

hepatopaneas ha indicato la presenza degli stessi elementi chimici rilevati nel suolo (N, P, Cd, Mn, Cu, Ni, S, Zn, Al, Y, Fe, Cr e Th). Allo scopo di evidenziare la capacità di bio-accumulo di contaminanti da parte delle cellule digestive, alcuni isopodi sono stati trattati con un percolato di discarica (metalli pesanti, inquinanti inorganici, pesticidi, idrocarburi, solventi). In EDS è stata confermata la presenza di gran parte dei contaminanti, come elementi in traccia (V, Cr, Co, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Sb e Pb), accumulati nelle cellule di hepatopaneas, sottolineando la loro capacità di assimilare e accumulare elementi naturali o inquinanti contenuti nei suoli⁽³⁾.

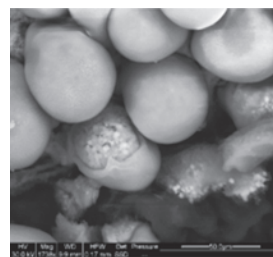


Figura 4. Cellule di hepatopaneas di isopodi terrestri (*Porcellio Scaber*).

Settore Acqua

F – Fondamentale il contributo del SEM nell'evidenziare la capacità di accumulo di metalli pesanti in foraminiferi bentonici. Immagini in BSE, accoppiate ad analisi in EDS, hanno permesso una chiara identificazione di accumuli di Hg sia a livello citoplasmatico che nei pori della superficie esterna di foraminiferi (Figura 5), testimoniando il loro ruolo di bio-indicatori in ambiente marino.

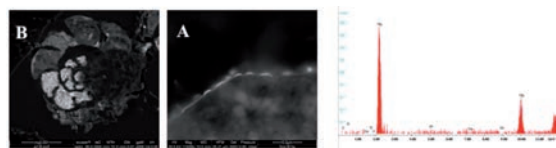


Figura 5 Cellule di hepatopaneas di isopodi terrestri (*Porcellio Scaber*).

G – Infine una ricerca che ha messo in evidenza le potenzialità del SEM anche in campo paleo-ambientale. Attraverso una serie di campioni di ittioliti è stata esaminata tutta la fase evaporitica (Formazione Gessoso Solifera) legata alla crisi di salinità del Messiniano, affiorante lungo la falesia del Monte Castellaro (Pesaro). Indagate le differenze morfologiche e composizionali tra individui pachiosostosi e non pachiosostosi (indice di pachiosostosi = diametro/lunghezza dell'apofisi) in

due specie fossili: *Aphanius crassicaudus* (Agassiz, 1839) e *Gobius* sp. (Linnaeus, 1758), entrambi pesci di laguna eurialini. Negli individui non pachiosostici è evidente la presenza di vasi sanguigni, talora interessati da un inizio di precipitazione di idrossiapatite. Tale tessuto osseo è infatti legato ad ambiente evaporitico in presenza di Mg (modulatore della formazione di idrossiapatite), il quale viene assorbito dall'individuo: l'analisi in EDS delle apofisi ne evidenzia la presenza, contrariamente a quanto accade nel sedimento inglobante che ne risulta privo. Le apofisi pachiosostiche, viceversa, sono caratterizzate da un tessuto osseo compatto e non vascolarizzato: con la precipitazione di Mg, l'individuo ne assorbe in minor misura dall'acqua, nelle apofisi non si rileva Mg, mentre compare nei sedimenti corrispondenti (4).

Ringraziamenti - Queste ricerche sono state svolte in collaborazione con: M. Letizia Amadori¹, Nicoletta Bedosti¹, Luciano Benini², Gaetano Cecchetti¹, Erica Cesarini¹, Rodolfo Coccioni¹, Davide Curzi¹, Giovanni De Falco³, Federica Fiesoletti⁴, Fabrizio Frontalini¹, Matteo Giordani¹, Pietro Gobbi¹, Anita Manti¹, Gabriele Matteucci⁴, Michele Mattioli¹, Roberto Mazzeo¹, Emanuela Molinaroli⁵, Stefano Papa¹,

Elena Pari⁴, Claudio Pizzagalli², Alberto Renzulli¹, Paolo Rossini⁴, Riccardo Santolini¹, Pierpaolo Tentoni⁴, Alessio Testoni⁴, Malamati Tsiola¹ (¹Università di Urbino; ²Arpam, Pesaro; ³IAMC-CNR, Oristano; ⁴Istituto di Ricerca Gruppo C.S.A, Rimini; ⁵Università Ca' Foscari, Venezia).

Bibliografia

1. Giordani M, Mattioli M, Valentini L, (2014). Chrysotile within calcite veins from Northern Apennines. Congresso SGI-SIMP, Rend. Soc. Geol. It. 2014, Suppl. n.1 al Vol. 31, p. 327.
2. Rossini P, Molinaroli E, De Falco G, Fiesoletti F, Papa S, Pari E, Renzulli A, Tentoni P, Testoni A, Valentini L, Matteucci G. (2011). April-May 2010 Eyjafjallajökull volcanic fallout over Rimini, Italy. Atmospheric Environment, 2011, 1-7.
3. Manti A, Valentini L, Mazzeo R, Cesarini E, Tsiola M, Santolini R, Papa S, (2011). Digestive glands of terrestrial isopods: a morphology study and a model for assesment of contaminants. MCM 2011 September 4-9 2011, Urbino, Italy pp. 389-390.
4. Bedosti N. (2016). La crisi di salinità del Messiniano: il contributo degli ittioliti del giacimento di Monte Castellaro (Pesaro). Tesi di Dottorato, Università di Urbino, XXVIII ciclo, 2016: pp. 244.