

E. AGOSTINO¹, A. MACRÌ¹, V. ZAMMUTO¹, A. SPANÒ¹, M. T. CACCAMO², S. MAGAZÙ², G. GENOVESE¹, M. MORABITO¹, D. SPAGNUOLO¹, A. SMERIGLIO¹, D. TROMBETTA¹, M. S. NICOLÒ¹, C. GUGLIANDOLO¹.

¹ Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina, Viale Ferdinando Stagno D'Alcontres 31, 98166 Messina, Italia.

² MIFT, Università degli Studi di Messina, Viale Ferdinando Stagno D'Alcontres 31, 98166 Messina, Italia.
eleonora.agostino@studenti.unime.it

POLISACCARIDI ESTRATTI DA ALGHE MARINE INVASIVE COME BIOSORBENTI DI METALLI PESANTI PER UNA STRATEGIA DI BIOREMEDIATION

MARINE ALGAL POLYSACCHARIDES AS HEAVY METAL BIOSORBENTS FOR A BIOREMEDIATION STRATEGY

Abstract - Heavy metal pollution is one of the major concerns for environmental and human health. Invasive macroalgae produce large amounts of biomass often treated as waste, that could be transformed into an economic and eco-friendly resource. In this contest, we evaluated the biosorbent ability of polysaccharides (100 µg/ml) extracted from *Agardhiella subulata* (κ -carrageenan), *Sargassum muticum* (alginate) and *Ulva ohnoi* (ulvan) to remove arsenite (As^{III}), mercury (Hg^{II}) and vanadium (V^V) (100 ppm) from aquatic solutions. All extracts negligibly adsorbed arsenite, κ -carrageenan showed the highest adsorption level of V^V (52.5%), whereas alginate and ulvan adsorbed moderately Hg^{II} (about 30%). The biosorption mechanisms were attributed to electrostatic attractions between functional groups of alginate or ulvan and Hg^{II} , and between alginate or κ -carrageenan and V^V . For their ability to adsorb both Hg^{II} and V^V , κ -carrageenan and alginate could be proposed to develop bioremediation strategies alternative to physical or chemical techniques currently used for heavy metal removal.

Key-words: marine macroalgae, pollution, adsorption, ion exchange, eco-friendly.

Introduzione - I metalli pesanti (MP) come l'arsenico (As^{III}), il mercurio (Hg^{II}) ed il vanadio (V^V), provenienti da fonti sia geogeniche che antropogeniche, sono tra i principali inquinanti degli ambienti acquatici. La loro tossicità dipende principalmente dalla loro non degradabilità, concentrazione e speciazione (Spanò *et al.*, 2023). Questi metalli sono causa di un elevato rischio per la salute umana, ad esempio provocano danni al DNA, agli organi interni, ai tegumenti ed al sistema nervoso centrale e possono essere causa di tumori (Mitra *et al.*, 2022). La direttiva Europea 98/83/CE stabilisce i limiti di arsenico, mercurio e vanadio nell'acqua potabile rispettivamente di 10 µg/L, 1 µg/L e 50 µg/L. Attualmente le tecniche tradizionali e moderne, utilizzate per la rimozione degli MP nelle acque reflue, come coagulazione, flocculazione, precipitazione ecc., richiedono grandi quantità di energia ed inoltre comportano l'immissione di sostanze che possono essere causa di inquinamento ambientale (Ratnasari *et al.*, 2022). L'accumulo di biomassa algale in ambienti altamente antropizzati costituisce un problema per l'ecosistema locale, ma rappresenta spesso anche un rifiuto da smaltire per le comunità che abitano le zone costiere ed i corsi d'acqua interni (Morand *et al.*, 2005). Piuttosto che essere trattata come uno scarto, tale biomassa algale potrebbe essere utilizzata nella rimozione degli MP negli ambienti acquatici, come precedentemente riportato per *Sargassum* (Raize *et al.*, 2004). È noto che la capacità di bioadsorbimento della biomassa algale è principalmente correlata alla grande presenza di polisaccaridi, o ficocolloidi, nella parete cellulare, i quali possiedono gruppi chimici (ad es.: solfidrici, solfati e carbossili) che costituiscono siti di legame per i metalli pesanti (Ramesh *et al.*, 2023).

Il nostro studio ha avuto come scopo valutare la capacità di adsorbire l'arsenico (As^{III}), il mercurio (Hg^{II}) ed il vanadio (V^V) da parte di polisaccaridi solfati estratti da alghe marine invasive.

Materiali e metodi – Le macroalghe *Agardhiella subulata* (C. Agardh) Kraft & M.J.Wynne (Solieriaceae) ed *Ulva ohnoi* M.Hiraoka & S.Shimada (Ulvaceae) sono state prelevate dal Lago salmastro di Ganzirri, situato nella Riserva Naturale Orientata di Capo Peloro (Messina, Italia), mentre *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt (Phaeophyceae) proveniva dalla Laguna di Venezia (Italia) (Spagnuolo *et al.*, 2022). I polisaccaridi grezzi (PS) sono stati estratti con un metodo innovativo basato sull'uso del microonde, ottimizzato in termini di tempi e costi, e caratterizzati chimicamente. In dettaglio, gli estratti da *A. subulata*, *S. muticum* e *U. ohnoi* sono stati chimicamente identificati come κ -carraghenano, alginato ed ulvano (Spagnuolo *et al.*, 2022).

L'adsorbimento di As^{III} , Hg^{II} e V^V da parte di ciascun PS è stato testato seguendo il protocollo riportato da Naveed *et al.* (2020) con alcune modifiche. I PS liofilizzati sono stati sciolti in 10 mL di acqua ultrapura per ottenere soluzioni con concentrazioni finali di 100 $\mu\text{g/mL}$. Successivamente, alle soluzioni di ciascun PS sono stati aggiunti 100 ppm di $NaAsO_2$ (As^{III}) o NH_4VO_3 (V^V) o $HgCl_2$ (Hg^{II}) in acqua ultrapura e tali soluzioni sono state incubate a 30° C per 30 minuti in un agitatore rotante (150 rpm/min) per consentire il processo di adsorbimento. Le soluzioni di MP prive di PS sono state utilizzate come controllo. Successivamente tutte le soluzioni sono state dializzate attraverso una membrana con cutoff di 6-8 kDa (SpectraPor® Standard Grade RC membrana) per 12 ore. Gli ioni di MP rimasti all'interno del tubo dopo la dialisi (ovvero MP legati ai PS) sono stati quantificati utilizzando la Graphite Furnace - Atomic Absorption Spectrometry (GF-AAS) (EPA 200.9, Revisione 2.2.). La percentuale di MP adsorbiti dai PS è stata determinata mediante la seguente formula: Rapporto di rimozione metalli pesanti (%) = $MP_p / MP \times 100$; dove MP_p ed MP rappresentano la concentrazione finale di ciascun metallo pesante, in presenza o in assenza di ciascun PS.

Allo scopo di investigare eventuali cambiamenti molecolari e conformazionali dei singoli PS trattati con ciascun MP (As^{III} , Hg^{II} e V^V , 100 ppm), ciascuna soluzione, ottenuta come riportato sopra, è stata liofilizzata ed analizzata mediante Attenuated Total Reflection - Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR).

Risultati - La capacità di ciascun polisaccaride (100 $\mu\text{g/mL}$) di adsorbire As^{III} , Hg^{II} o V^V (100 ppm) viene riportata nella Fig. 1.

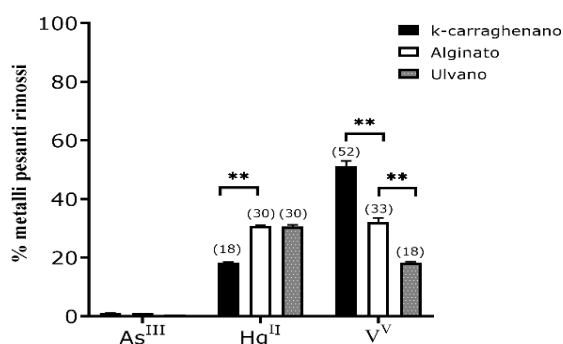


Fig. 1 - Capacità dei polisaccaridi algali grezzi (100 $\mu\text{g/mL}$) estratti da *A. subulata* (κ -carraghenano), *S. muticum* (alginato) ed *U. ohnoi* (ulvano) di adsorbire As^{III} , Hg^{II} e V^V (espressa in %) dopo 30 minuti di trattamento. I dati rappresentano la media \pm DS di tre repliche ($n = 3$). Significativamente differente ** $p \leq 0,01$.

Removal capacity of heavy metals (As^{III} , Hg^{II} and V^V) (%) of (100 $\mu\text{g/mL}$) polysaccharide extracted from *A. subulata* (κ -carrageenan), *S. muticum* (alginate) and *U. ohnoi* (ulvan) after 30 minutes treatment. Data represent the mean \pm SD for three replicates ($n = 3$). Significantly different ** $p \leq 0.01$.

Dopo 30 minuti di trattamento, tutti i PS avevano adsorbito in maniera trascurabile l'As^{III} (≤2%). L'alginato e l'ulvano hanno rimosso più efficacemente il Hg^{II} (30%) rispetto al κ-carraghenano (18,3%). Il κ-carraghenano ha mostrato il più alto livello di adsorbimento del V^V (52,5%), seguito dall'alginato (33,1%) e l'ulvano (18,5%). In presenza di As^{III}, Hg^{II} e V^V ciascuno degli spettri dei PS ha mostrato modifiche che sono state valutate come comparsa o scomparsa di picchi o slittamenti dei picchi stessi (Fig. 2). Tali modifiche osservate in ciascun spettro vengono riassunte nella Tab. 1.

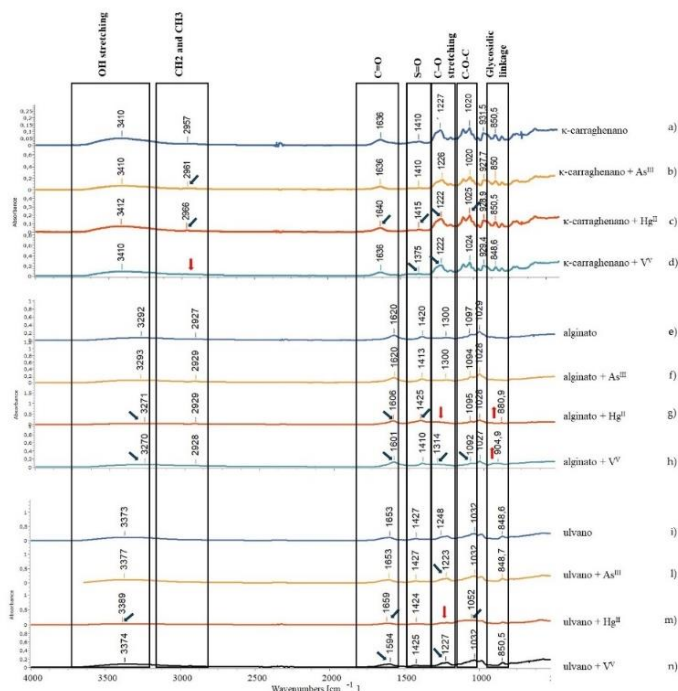


Fig. 2 - Comparazione degli spettri ATR-FTIR di κ-carraghenano (a), alginato (e) e ulvano (i) in presenza di As^{III} (b, f, l), Hg^{II} (c, g, m) e V^V (d, h, n). I principali cambiamenti degli spettri sono indicati come comparsa (frecche rosse verso l'alto) o scomparsa di picchi (frecche rosse verso il basso) o come picchi slittati (frecche blu verso destra o sinistra).

Comparison of ATR-FTIR spectra of κ-carrageenan (a), alginate (e), ulvan (i), in presence of As^{III} (b, f, l), Hg^{II} (c, g, m) and V^V (d, h, n). The main changes in the spectra are indicated as new (up red arrows), disappeared (down red arrows) or shifted peaks (left or right blue arrows).

Tab. 1 - Modifiche osservate negli spettri dei polisaccaridi κ-carraghenano, alginato e ulvano, espresse come comparsa di nuovi picchi, scomparsa di picchi o slittamento di picchi in presenza di As^{III}, Hg^{II} e V^V. (+) = modifica; (-) = nessuna modifica.

Changes observed in the spectra of κ-carrageenan, alginate and ulvan, expressed as the appearance of new peaks, disappearance of peaks or shifted peaks in the presence of As^{III}, Hg^{II} and V^V. (+) = change; (-) = no change.

Polisaccaridi	NUOVI PICCHI			PICCHI SCOMPARI			PICCHI SLITTATI		
	As ^{III}	Hg ^{II}	V ^V	As ^{III}	Hg ^{II}	V ^V	As ^{III}	Hg ^{II}	V ^V
κ-carraghenano	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Alginato	-	+	+	-	+	-	-	+	+
Ulvano	-	-	-	-	+	-	+	+	+

In presenza di As^{III} gli spettri di ciascun PS mostravano solo piccoli cambiamenti confermando le poche interazioni tra gli ioni metallici ed i PS. Lo spettro del κ-carraghenano ha mostrato cambiamenti significativi in presenza di Hg^{II} evidenziando lo spostamento di picchi attribuiti a CH₂/CH₃, C=O, S=O, C-O e C-O-C verso valori ad alta frequenza, indicando la formazione di nuovi legami tra il polisaccaride ed il metallo.

In presenza di V^V , sono stati riscontrati cambiamenti come la scomparsa del picco attribuito ai gruppi CH_2 e CH_3 e lo slittamento del picco relativo al gruppo $S=O$ e $C-O$ verso basse frequenze, suggerendo un riarrangiamento intramolecolare del polisaccaride. Diversamente, lo spettro dell'alginato ha mostrato cambiamenti sia in presenza di Hg^{II} che di V^V , come la comparsa del picco relativo al legame glicosidico e lo slittamento dei picchi corrispondenti rispettivamente ai gruppi $-OH$ e $C=O$, mentre solo in presenza di Hg^{II} si è osservata la scomparsa del picco attribuito al gruppo $C-O$ ed uno spostamento verso alte frequenze attribuito al gruppo $S=O$, indicando un significativo cambiamento strutturale dato dalla rottura e formazione di nuovi legami. Lo spettro dell'ulvano ha mostrato cambiamenti significativi in presenza di Hg^{II} , come la scomparsa del picco attribuito al gruppo $C-O$ e slittamenti dei picchi relativi ai gruppi $-OH$, $C=O$ e $C-O-C$ suggerendo una forte interazione ionica tra questi gruppi funzionali ed il metallo. In presenza di V^V lo spettro dell'ulvano ha esibito minori cambiamenti, evidenti sono gli spostamenti dei picchi attribuiti ai gruppi $C=O$ and $C-O$ a più basse frequenze confermando l'interazione debole tra polisaccaride e metallo e suggerendo possibili fenomeni di ossido-riduzione tra i gruppi funzionali dell'ulvano ed il metallo.

Conclusioni – I risultati ottenuti in questo studio hanno mostrato che il κ -carraghenano di *A. subulata*, l'alginato di *S. muticum* e l'ulvano di *U. ohnoi* possiedono un'efficiente capacità di adsorbire il Hg^{II} e il V^V , ma non l' As^{III} . In particolare, il κ -carraghenano era capace di adsorbire fortemente il V^V (52,5%), mentre sia l'alginato che l'ulvano erano capaci di rimuovere efficacemente il Hg^{II} (30%). In accordo con i risultati dell'ATR-FTIR, la capacità di adsorbimento è stata attribuita alla formazione di legami ionici tra i gruppi funzionali ($-OH$, $S=O$, $C=O$ e $C-O$) di ciascun polisaccaride e gli MP.

L'abbondanza di biomassa di specie algali marine invasive, sino ad ora considerata nociva per l'ambiente e fonte di rifiuto, può rappresentare una fonte di polisaccaridi utili per la rimozione dei metalli pesanti dagli ambienti acquatici.

Acknowledgements

Questo lavoro è stato supportato da: European Union – NextGenerationEU (SAMOTHRACE – PNRR – Missione 4, Componente 2, Investimento 1.5 – ECS00000022).

Bibliografia

- MITRA S., CHAKRABORTY A. J., TAREQ A. M., EMRAN T. B., NAINU F., KHUSRO A., SIMAL-GANDARA J. (2022) - Impact of heavy metals on the environment and human health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity. *J. King Saud Univ. Sci.*, **34** (3): 101865.
- MORAND P., MERCERON M. (2005) - Macroalgal Population and Sustainability. *J. Coast. Res.*, **21**: 1009–1020.
- NAVEED S., LI C., ZHANG J., ZHANG C., GE Y. (2020) - Sorption and transformation of arsenic by extracellular polymeric substances extracted from *Synechocystis* sp. PCC6803. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **206**: 111200.
- RAIZE O., ARGAMAN Y., YANNAI S. (2004) - Mechanisms of biosorption of different heavy metals by brown marine macroalgae. *Biotechnol. Bioeng.*, **87** (4): 451-458.
- RAMESH B., SARAVANAN A., SENTHIL KUMAR P., YAASHIKAA P.R., THAMARAI P., SHAJI A., RANGASAMY G. (2023) - A review on algae biosorption for the removal of hazardous pollutants from wastewater: limiting factors, prospects and recommendations. *Environ. Pollut.*, **327**: 121572.
- RATNASARI A., SYAFIYUDDIN A., SYAMIMI ZAIDI N., BENG HONG KUEH A., HADIBARATA T., DWI PRASYO D., RAVIKUMAR R., SATHISHKUMAR P. (2022) - Bioremediation of micropollutants using living and non-living algae - Current perspectives and challenges. *Environ. Pollut.*, **292 Part B**: 118474.
- SPAGNUOLO D., DI MARTINO A., ZAMMUTO V., ARNELI MINICANTE S., SPANÒ A., MANGHISI A., GUGLIANDOLO C., MORABITO M., GENOVESE G. (2022) - Conventional vs. innovative protocols for the extraction of polysaccharides from macroalgae. *Sustainability*, **14**: 5750.
- SPANÒ A., ZAMMUTO V., MACRÌ A., AGOSTINO E., NICOLÒ M. S., SCALA A., TROMBETTA D., SMERIGLIO A., INGEGNERI M., CACCAMO M.T., MAGAZÙ S., MARTINEZ M., LEON C. G., GUGLIELMINO S. P. P., GUGLIANDOLO C. (2023) - Arsenic adsorption and toxicity reduction of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* B3-15 of shallow hydrothermal vent origin. *J. Mar. Sci. Eng.*, **11**: 325.