



**UNIVERSITA' DELLA CALABRIA**

Dipartimento di Biologia, Ecologia e Scienze della Terra

**Scuola di Dottorato**

"Life Sciences"

**Polo tematico**

**"Tecnologie per la gestione sostenibile delle risorse ambientali"**

**CICLO**

XXVII

**TITOLO TESI**

**Studio dei meccanismi della metallotolleranza nell'organismo modello**

***Scenedesmus acutus* (Chlorophyta – alghe verdi)**

**Settore Scientifico Disciplinare BIO/01 Area 05**

**Direttore:** Ch.mo Prof. (Marcello Canonaco)

**Supervisore:** Ch.mo Prof. (Radiana Cozza)

**Dottorando:** Dott. (Davide Cozza)

Firma

*A Federico*

## **INDICE**

Introduzione pag. 1

### **CAPITOLO 1: LE MICROALGHE**

1.1 Le microalghe: caratteristiche generali pag. 4

1.2 Le microalghe: importanza applicativa pag. 6

### **CAPITOLO 2: LE MICROALGHE E I METALLI PESANTI**

2.1 Microalghe e inquinamento da metalli pesanti pag. 9

2.2 Meccanismi di omeostasi e detossificazione da metalli pesanti pag. 11

2.3 Le fitochelatine pag. 13

2.4 Le metallothioneine pag. 15

2.5 Stress da metalli e cambiamenti epigenetici pag. 21

### **CAPITOLO 3: LA MICROALGA MODELLO *SCENEDESMUS ACUTUS***

3.1 *Scenedesmus acutus*: caratteristiche generali pag. 25

3.2 *Scenedesmus acutus*: metallotolleranza e risposta al cromo pag. 27

### **CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI**

4.1 Allestimento delle monoculture di *Scenedesmus acutus* pag. 33

4.2 Preparazione dei campioni per l'analisi al TEM pag. 34

4.3 Immunolocalizzazione della 5-metil-citosina pag. 35

4.3.1 Immunofluorescenza pag. 35

4.3.2 Immunogold	pag. 37
4.3.3 Acquisizione e analisi dei dati tramite software informatici	pag. 38
4.4. Estrazione degli acidi nucleici	pag. 38
4.4.1 Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA	pag. 40
4.5 PCR	pag. 41
4.6 PCR touch-down	pag. 42
4.7 Valutazione dei prodotti di PCR: elettroforesi su gel d'agarosio	pag. 42
4.8 Quantizzazione dei campioni	pag. 44
4.9 Purificazione dei campioni da gel d'agarosio	pag. 45
4.10 Sequenziamento	pag. 46

## **CAPITOLO 5: RISULTATI E DISCUSSIONE**

5.1 Allestimento delle colture	pag. 47
5.2 Analisi morfologica	pag. 48
5.3 Analisi ultrastrutturale	pag. 52
5.4 Analisi delle aree nucleari	pag. 54
5.5 Immunolocalizzazione della 5-metil-citosina	pag. 57
5.5.1 Immunofluorescenza	pag. 57
5.5.2 Immunogold	pag. 57
5.6 Isolamento e caratterizzazione di sequenze codificanti putative metallotioneine (Mts)	pag. 60
5.6.1 PCR con primers di pianta	pag. 60
5.6.2 PCR con primers disegnati su sequenze di alga	pag. 60

5.6.2.1 Risultati PCR touch-down MtChv	pag. 61
5.6.2.2 Sequenziamento dell'amplificato con primers MtChv	pag. 62
5.6.2.3 Analisi della sequenza	pag. 63
<i>CONCLUSIONI</i>	pag. 66
<i>TAVOLE FOTOGRAFICHE</i>	pag. 71
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	pag. 79
<i>PUBBLICAZIONI</i>	pag. 92
<i>RINGRAZIAMENTI</i>	pag. 93

## **Introduzione**

Lo sviluppo delle biotecnologie che utilizzano le alghe sono attualmente in un momento di forte interesse in relazione al loro enorme potenziale applicativo in diversi settori quali quello farmaceutico, alimentare, energetico e del disinquinamento di diverse matrici ambientali.

Per quanto riguarda il disinquinamento ambientale, oltre all'utilizzo delle tecnologie classiche, negli ultimi anni, si stanno sperimentando le "tecnologie verdi", che impiegano piante o altri organismi (funghi, batteri, alghe) per decontaminare e/o stabilizzare diverse matrici (aria, acqua, suolo) dagli inquinanti, compresi i metalli pesanti (biorimedio). L'inquinamento da metalli pesanti, sia di suoli che di ambienti acquatici, risulta particolarmente pericoloso a causa della persistenza dei metalli stessi e della loro possibilità di essere trasferiti e bioaccumulati nei diversi livelli trofici.

La comprensione dei meccanismi di come e perché le diverse specie di organismi siano differenzialmente sensibili e/o tolleranti alla presenza dei metalli pesanti, è pertanto di grande interesse per i risvolti applicativi di queste ricerche sia nel settore del biomonitoraggio che del biorimedio.

Per quanto riguarda le alghe, negli ultimi anni è stata verificata l'abilità di molti di questi organismi di assorbire metalli in tracce dall'ambiente acquatico (Megharaja et al. 2003; Shamsuddoha et al. 2006). È ampiamente documentato che nelle alghe si realizzano molti di quei meccanismi "chelanti" che avvengono anche nelle piante, con il coinvolgimento di peptidi (metallotioneine e fitochelatine) che sequestrano i metalli nei vacuoli e/o nei cloroplasti e mitocondri (reviewed in Mallick e Ray 2002). Nelle alghe avvengono anche meccanismi di esclusione che prevengono l'ingresso dei metalli (meccanismi di esclusione ad opera di polimeri extracellulari es. carboidrati) (Perales-Vela et al., 2006). Nonostante sia riconosciuto che tali organismi presentino meccanismi costitutivi di rimozione di metalli analoghi a quanto avviene nelle piante, i processi molecolari e cinetici che riguardano i siti di legame dei metalli alla superficie delle microalghe, l'eventuale ingresso e la successiva detossificazione, sono ancora poco conosciuti. La comprensione di questi meccanismi è fondamentale ai fini di eventuali applicazioni delle alghe in tecniche di biorimedio.

Uno strumento importante nel campo della ricerca, sono gli organismi mutanti (organismi difettivi o potenziati per una qualche funzione). Soprattutto gli organismi aploidi, quali molte alghe, possono evolvere rapidi adattamenti evolutivi della popolazione nei confronti degli stress biotici e abiotici, grazie all'insorgenza di mutazioni immediatamente manifeste (Baos

et al. 2002; Greig et al. 2003); è stato visto che in questi organismi, il passaggio alla riproduzione sessuale sembra essere innescato da situazioni di rischio per la sopravvivenza della popolazione, quasi come un modo per superare il numero sostenibile di mutazioni potenzialmente deleterie (Tüzel et al. 2001).

Proprio a seguito di riproduzione sessuale indotta da una prolungata coltura in presenza di cromo esavalente (Cr VI) è stato possibile isolare un ceppo di *Scenedesmus acutus* tollerante al Cr (Cr-t) e in grado di crescere senza subire effetti tossici anche a concentrazioni di Cr risultanti inibenti per la popolazione normale (wild type, Wt) (Corradi et al. 1995; Gorbi et al. 1996). Studi pregressi hanno evidenziato che i due ceppi presentano una diversa espressione genica a livello dei trascritti (Torelli et al. 2008); inoltre il ceppo Cr-t presenta un contenuto cellulare di zolfo e cisteina libera più elevato rispetto a quello del Wt (Gorbi et al. 2007). È stato visto che il metabolismo del solfato è spesso direttamente correlato alla tolleranza ai metalli pesanti, grazie all'importanza degli aminoacidi solforati nella produzione di composti riducenti come il glutatione, o di piccoli peptidi come le fitochelatine. Inoltre, il carattere della Cr tolleranza viene trasmesso in forma transiente alle generazioni successive, lasciando ipotizzare che dei meccanismi epigenetici siano alla base di tali adattamenti.

Nel corso di questo studio abbiamo approfondito le conoscenze dei due ceppi algali di *S. acutus*.

La prima fase del lavoro ha riguardato uno studio morfologico-ultrastrutturale del ceppo Wt e del Cr-t, osservati sia in assenza di cromo che in seguito a trattamenti con cromo esavalente Cr (VI). In una seconda fase, attraverso tecnica di immunolocalizzazione, abbiamo verificato la distribuzione delle 5-metil-citosine al fine di rilevare differenze nel pattern di metilazione dei due ceppi e confermare se meccanismi epigenetici potessero essere alla base della trasmissione della metallotolleranza alla progenie.

Successivamente è stata effettuata una prima indagine molecolare, volta a chiarire i meccanismi coinvolti nella tolleranza e/o detossificazione del Cr in questa microalga.

In merito ai meccanismi di metallotolleranza di *S. acutus*, lavori precedenti riportano dati sulla tolleranza al cadmio e il coinvolgimento del glutatione ridotto (GSH) e delle fitochelatine-MtIII (Torricelli et al., 2006). Nessun dato è presente in letteratura circa il coinvolgimento delle metallotioneine.

Le metallotioneine (MTs) sono peptidi a basso peso molecolare, ricchi di residui di cisteina con capacità di legare ioni di metalli pesanti attraverso legami metallo-tiolato. Inoltre, i tiolati delle MTs possono agire come potenti antiossidanti, e quindi tali proteine possono avere un ruolo nella protezione contro lo stress ossidativo (Hassinen et al., 2011).

Attualmente, le Mts delle piante, pMTs, sono state ampiamente identificate come una famiglia multigenica in angiosperme, gimnosperme e in macroalghe (*Fucus*) e costituiscono la *famiglia 15* nella classificazione globale delle MTs di Kägi (2001).

Ad oggi non si conoscono geni codificanti per Mts in microalghe. L'induzione di una proteina metallotioneina-like legante il cadmio è stata ritrovata solo nelle alghe unicellulari *Chlamidomonas sorokiniana* (Yoshida et al., 2006) e *Chlorella vulgaris* (Huang et al., 2009). In tale contesto, un'indagine genomica è di grande innovazione e interesse e potrebbe portare all'isolamento in *S. acutus*, di alcuni geni coinvolti nel trasporto e/o detossificazione dei metalli, aprendo eventuali prospettive di applicazione di tale organismo in ambito di tecniche di biorimediazione.

Vista la scarsità in banca dati di sequenze Mts-like appartenenti a microalghe, abbiamo usato come primo approccio, primers degenerati già usati per l'identificazione di una Mt di tipo 2 nella pianta *Silene nicaensis* (Cozza et al., 2013). In contemporanea abbiamo usato primers degenerati e gene specifici costruiti su ipotetiche sequenze note per i geni di interesse in altre Chlorophyceae (*Chlamidomonas reinhardtii* e *Chlorella vulgaris*) che ci hanno portato all'isolamento di una putativa proteina codificante per una Ptype-ATPasi di membrana impiegata nel trasporto di ioni metallici.

I risultati fin qui ottenuti sono riportati e discussi, evidenziando anche la difficoltà di intraprendere un'indagine genomica in questi organismi.



## Capitolo 1

### Le microalghe

#### 1.1 Le microalghe: caratteristiche generali

Con il termine di *microalghe* ci si riferisce a una serie di organismi procariotici e eucariotici che svolgono fotosintesi ossigenica, con range dimensionali da 0.2–2 µm (picoplancton) fino a forme filamentose di 100 µm e oltre (Barsanti e Gualtieri, 2006). Rientrano tra le microalghe anche i Cianobatteri (alghe verdi azzurre) classificati nel Dominio dei Batteri, ma ugualmente capaci di compiere la fotosintesi ossigenica.

Le microalghe sono organismi per gran parte planctonici, ma diverse specie sono anche a vita bentonica, su substrati rocciosi, sabbie, fanghi, e su organismi vegetali e animali di più grandi dimensioni. Le microalghe sono diffuse in tutti gli ambienti acquatici e diverse microalghe colonizzano, compatibilmente al tasso di umidità, anche ambienti subaerei. Alcune microalghe vivono come simbionti di organismi animali (protozoi, coralli, ascidie), funghi (licheni) e piante (es. la felce acquatica del genere *Azolla*).

In ambiente acquatico le microalghe, avendo evoluto efficienti sistemi di utilizzo dell'acqua, della CO<sub>2</sub> e dei nutrienti, costituiscono i maggiori produttori primari, responsabili del 30%-50% dell'ossigeno immesso in atmosfera (Barbato et al., 2012).

Dal punto di vista metabolico, oltre che autotrofe fotosintetiche, alcune microalghe possono essere eterotrofe o mixotrofe. Le microalghe autotrofe sono in grado di fissare la CO<sub>2</sub> presente in diverse forme, la CO<sub>2</sub> atmosferica, i carbonati solubili presenti in acqua, la CO<sub>2</sub> presente nei gas di scarico industriali. Si stima che per ogni Kg di biomassa microalgale prodotta (in peso secco) vengono fissati circa 1,8 kg di CO<sub>2</sub> (Demurtas et al., 2013).

Generalmente, la crescita delle microalghe dipende dalla disponibilità dei nutrienti. A tal proposito, grandi quantità di nutrienti hanno un effetto positivo sull'aumento della biomassa fitoplanctonica, che provoca, a sua volta, un aumento proporzionale di biomassa anche nei livelli trofici successivi. Tuttavia, eccessive concentrazioni di nutrienti sono rischiose per l'equilibrio dell'ecosistema, in quanto favoriscono fenomeni di *eutrofizzazione*. Solitamente questo fenomeno si manifesta in aree caratterizzate da

una forte antropizzazione (Smodlaka, 2010). Se non viene utilizzato come nutrimento, una volta terminato il proprio ciclo vitale, il fitoplancton in eccesso muore e sedimenta sui fondali, provocando pericolose condizioni di anossia con gravi conseguenze per l'ecosistema.

Per la loro funzione di produttori primari, le microalghe si collocano alla base delle catene trofiche in ambiente acquatico rivestendo così un importante ruolo ecologico.

Non di secondaria importanza sono gli aspetti applicativi delle microalghe in diversi settori, di cui si riporta più ampiamente nella sezione successiva.

Dal punto di vista della diversità microalgale, molto è ancora da esplorare, perché delle 800.000 specie di alghe esistenti stimate dalla Wageningen University, solo 35.000 microalghe sono state descritte e classificate in Regni, Divisioni e Classi.

I più importanti raggruppamenti microalgali sono riportati in tabella 1.

L'identificazione e la classificazione delle alghe planctoniche è tradizionalmente condotta con il microscopio ottico, che rileva le differenze nelle caratteristiche morfologiche delle cellule (Paris, 1997) e ne permette l'identificazione tramite l'utilizzo di chiavi dicotomiche. Sulla stessa linea viene utilizzata anche la microscopia elettronica, con l'osservazione dei caratteri cellulari ultrastrutturali. L'applicazione della biologia molecolare alle microalghe, grazie all'utilizzo di particolari tecniche quali DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), SSCP (Singlestrand conformation polymorphism), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e PCR, ha ampliato le possibilità della loro identificazione (Su et al., 2012). Inoltre, grazie all'utilizzo di marcatori selezionati sulle molecole di DNA o RNA quali microsatelliti, ITS-1 e 2, rDNA, COX-1 mtDNA, è possibile studiare le variazioni genetiche tra le varie specie e/o il grado di polimorfismo all'interno di esse (Penna et al., 2009).

REGNO	DIVISIONE	CLASSE	GENERE	NOME COMUNE
Prokaryota	Cyanophyta	Cyanophyceae	<i>Microcystis</i> , <i>Spirulina</i> , <i>Trichodesmium</i>	Alghie azzurre
Eukaryota	Cryptophyta	Cryptophyceae	<i>Cryptomonas</i> , <i>Rhodomonas</i>	Cryptomonadi
	Dinophyta	Dinophyceae	<i>Ceratium</i> , <i>Glenodinium</i>	Dinoflagellati
	Euglenophyta	Euglenophyceae	<i>Euglena</i>	Euglenoidi
	Chlorophyta	Chlorophyceae	<i>Chlamydomonas</i> , <i>Volvox</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Scenedesmus</i>	Alghie verdi
	Heterokontophyta	Chrysophyceae, Xanthophyceae, Bacillariophyceae,	<i>Synura uvella</i> , <i>Tribonema</i> , <i>Bacteriastrium</i>	Alghie dorate, alghie giallo/verdi, diatomee
	Rhodophyta	Bangiophyceae	<i>Porphyridium</i>	Alghie rosse

Tabella 1. Classificazione dei generi microalgali di maggiore interesse

## 1.2 Le microalghe: importanza applicativa

Negli ultimi decenni le microalghe sono state oggetto di intensi studi per i potenziali risvolti applicativi in diversi settori, da quello farmaceutico a quello alimentare, da quello energetico a quello ambientale.

Attualmente, le applicazioni commerciali delle microalghe sono principalmente nei settori degli integratori alimentari, della mangimistica, della cosmetica (Tab. 2).

Microalgae	Annual production	Producer country	Application and product	Price (€)
<i>Spirulina</i>	3000 tonnes dry weight	China, India, USA, Myanmar, Japan	Human nutrition Animal nutrition Cosmetics Phycobiliproteins	36 kg <sup>-1</sup> 11 mg <sup>-1</sup>
<i>Chlorella</i>	2000 tonnes dry weight	Taiwan, Germany, Japan	Human nutrition Cosmetics Aquaculture	36 kg <sup>-1</sup> 50 l <sup>-1</sup>
<i>Dunaliella salina</i>	1200 tonnes dry weight	Australia, Israel, USA, Japan	Human nutrition Cosmetics B-carotene	215-2150 kg <sup>-1</sup>
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	500 tonnes dry weight	USA	Human nutrition	
<i>Haematococcus pluvialis</i>	300 tonnes dry weight	USA, India, Israel	Aquaculture Astaxanthin	50 l <sup>-1</sup> 7150 kg <sup>-1</sup>
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	240 tonnes DHA oil	USA	DHA oil	43 g <sup>-1</sup>
<i>Shizochytrium</i>	10 tonnes DHA oil	USA	DHA oil	43 g <sup>-1</sup>

Tabella 2. Principali applicazioni commerciali delle microalghe (Brennan and Owende, 2010)

Per quanto concerne la tutela ambientale, diversi studi focalizzano l'attenzione per l'impiego di specie algali in tecniche di biorimediazione (McCormick and Cairns, 1994;

Muradov et al., 2014). Le attività umane possono, infatti, profondamente modificare la composizione biochimica delle acque, attraverso gli scarichi agricoli e industriali che possono determinare, a seconda del tipo di reflujo, un aumento dei livelli di nutrienti, di metalli pesanti, di pesticidi e/o di altri contaminanti. Grazie alle loro piccole dimensioni, le microalghe hanno un elevato rapporto superficie-volume; tali caratteristiche morfologiche favoriscono una rapida compartimentalizzazione degli inquinanti; inoltre questi organismi vantano un'ottima fitness riproduttiva e sono facilmente mantenuti in condizioni di coltura (Geoffroy et al., 2004; Dewez et al., 2005). Tutte queste caratteristiche permettono che le microalghe possano essere utilizzate come organismi test (biondicatori) in studi ambientali. Dal momento che la quantità e la qualità delle microalghe varia rispetto alle condizioni ambientali, le stesse microalghe possono fornire informazioni utili sulla qualità ambientale. Inoltre, l'analisi di alcune risposte fisiologiche (biomarkers) consente di valutare la tossicità di sostanze chimiche, di scarichi inquinanti e soprattutto di metalli pesanti (Munawar and Munawar, 1987; Geoffroy et al., 2004; Gomez de Barreda Ferraz et al., 2004; Dewez et al., 2005; Le Faucheur et al., 2006; Wei et al., 2006; Labra et al., 2007; Liebig et al., 2008; Rodriguez et al., 2008).

Per quanto riguarda il settore energetico, le microalghe sono state proposte come “*feedstock*” per la produzione di biocarburanti di terza generazione (Brennan e Owende, 2010; Mata et al, 2010). Rispetto alle piante coltivate come fonte energetica (soia, girasole, ecc.) le alghe presentano una serie di vantaggi. Le microalghe crescono infatti velocemente e possono essere coltivate su terreni marginali o desertici; inoltre hanno bisogno di molta meno acqua per kg di biomassa prodotta rispetto alle colture terrestri e molti ceppi possono essere coltivati in acque saline o salmastre. Infine, tra le proprietà che le caratterizzano, vi è la capacità di sequestrare la CO<sub>2</sub> dai gas di combustione di impianti industriali. Alcuni ceppi accumulano grandi quantità (30-40% sul peso secco) di trigliceridi, adatti per la produzione di biodiesel, mentre altri accumulano amido, adatto per la produzione di bioetanolo. Infine, rispetto alla coltivazione delle piante superiori, esse non richiedono l'applicazione di erbicidi o pesticidi.

Il limite della produzione di biodiesel a partire da biomassa algale, è però l'elevato costo di produzione, ancora troppo elevato; pertanto sono necessari ulteriori studi per l'applicazione di tale tecnologia a larga scala.

Infine, le microalghe stanno emergendo come un sistema alternativo per la produzione di farmaci. Anche in questo settore, il vantaggio è dato dal fatto di ridurre molto i tempi per avere la microalga “transgenica”, capace di produrre il composto di interesse, insieme con la sua facilità di coltivazione e sicurezza, in quanto le microalghe non sono veicolo di agenti patogeni umani o animali e sono generalmente considerate sicure agevolando così la produzione di proteine per uso umano. Il sistema modello *Chlamydomonas reinhardtii*, i cui genomi, rispettivamente nucleare e plastidiale, sono completamente sequenziati e facilmente trasformabili, è stato finora ampiamente usato per la produzione di proteine di interesse farmaceutico (Specht et al, 2010).

Rispetto a queste premesse, emerge che la genomica delle microalghe (e delle biotecnologie che fanno uso delle microalghe) che fino a pochi anni fa rappresentava uno studio di nicchia, attualmente richiama un interesse sempre maggiore da parte della comunità scientifica e dei diversi settori biotecnologici.

## Capitolo 2

### Le microalghe e i metalli pesanti

#### 2.1 Microalghe e inquinamento da metalli pesanti

Le attività umane hanno spesso profondamente modificato la composizione chimica dei corpi d'acqua in molte aree della superficie terrestre, in particolare per quanto riguarda i livelli di nutrienti (Paul and Meyer, 2001). Le condizioni fisiche, chimiche e biotiche sono cambiate soprattutto nei paesaggi urbani (Meyer et al., 2005), dove il deflusso delle acque superficiali, insieme agli scarichi urbani ed industriali comportano un maggiore carico di nutrienti, metalli, pesticidi e altri contaminanti nell'ambiente. Queste immissioni di inquinanti dall'esterno portano ad un degrado dei sistemi fluviali e delle comunità che li popolano (Paul and Meyer 2008). Gli organismi acquatici rispondono alle variazioni dei parametri biotici e abiotici che influenzano il loro habitat e, in tal modo, riescono a fornire un continuo report circa la qualità ambientale.

Lo sviluppo delle attività agricole ed industriali e la crescente pressione antropica hanno determinato alterazioni sempre più significative nei flussi degli elementi tra litosfera, idrosfera, atmosfera e biosfera. La contaminazione dell'ambiente acquatico, in modo particolare quella da metalli pesanti, costituisce uno dei maggiori problemi di tossicologia ambientale.

L'inquinamento da metalli pesanti, sia di suoli che di ambienti acquatici, risulta particolarmente pericoloso a causa della persistenza dei metalli stessi e della loro possibilità di essere trasferiti e bioaccumulati nei diversi livelli trofici.

Il termine "metallo pesante" si riferisce a quegli elementi metallici che presentano densità superiore a  $5 \text{ g/cm}^3$  (Holleman, 1999); i circa 40 elementi che rientrano in questa categoria, si comportano usualmente come cationi e sono caratterizzati da diversi stati di ossidazione (elementi metallici di transizione), da bassa solubilità dei loro ossidi, da grande attitudine a formare complessi e da grande affinità per i solfuri. In base a tali caratteristiche possono essere definiti "metalli pesanti" elementi chimici quali piombo, cadmio e mercurio, che pare non siano essenziali per il metabolismo e pertanto determinano fenomeni di tossicità anche a bassissima concentrazione intracellulare; altri

elementi pesanti, quali ferro, rame, zinco, cobalto e manganese sono micronutrienti essenziali per il metabolismo; tuttavia il loro apporto eccessivo risulta estremamente tossico (Siedlecka, 1995; Bargagli, 1998).

L'inquinamento da metalli pesanti di acque e suoli è aumentato notevolmente per effetto delle attività antropiche dovute principalmente a combustione di idrocarburi fossili, attività minerarie, uso di fertilizzanti, pesticidi e rifiuti urbani. Dal momento che la solubilità e la mobilità del metallo aumentano quando il pH dell'acqua diminuisce, i metalli risultano essere più tossici in acqua dolce piuttosto che in acque salate. I metalli in traccia immessi nell'ambiente, depositati sulla terra, nelle acque e nei sedimenti, sono inoltre soggetti a cicli geochimici globali, che ne determinano una continua circolazione tra i vari comparti ambientali e possono determinare gravi danni agli ecosistemi (Zenk, 1996).

Nell'ambito della problematica di disinquinamento di suoli contaminati da metalli, le tecnologie basate su metodi fisici (come flottazione, separazione magnetica e gravitazionale, setacci molecolari), procedure chimiche e trattamenti elettromagnetici, sono attualmente disponibili per separare o concentrare i metalli. Tuttavia la maggior parte di questi trattamenti tecnologici hanno elevati costi di installazione e di mantenimento e, in genere, richiedono specifiche conoscenze ingegneristiche (Bargagli, 1998). In alternativa esistono le "tecnologie verdi" che impiegano piante o altri organismi (funghi, batteri, alghe) per decontaminare e/o stabilizzare diverse matrici (suolo, aria, acqua) da diversi inquinanti compresi i metalli pesanti (biorisanamento). L'uso di piante selezionate e/o geneticamente modificate in grado di accumulare metalli pesanti, da utilizzare nel disinquinamento ambientale, è una delle tecnologie emergenti di maggiore interesse (fitorimediazione).

Di recente è stata verificata l'abilità di molte alghe di assorbire metalli in tracce dall'ambiente acquatico (Megharaja et al. 2003; Shamsuddoha et al. 2006). Per tali organismi, è ampiamente riconosciuto che i meccanismi che sono alla base della omeostasi dei metalli in tracce e della metallotolleranza sono in buona parte comuni alle piante. La cellula algale infatti deve contemporaneamente assumere i metalli in tracce essenziali ed escludere gli altri e/o detossificarne l'eccesso.

È ampiamente documentato che nelle alghe si realizzano molti di quei meccanismi "chelanti" che avvengono anche nelle piante, con il coinvolgimento di peptidi

(metallotioneine e fitochelatine) che sequestrano i metalli nei vacuoli e/o nei cloroplasti e mitocondri (Perales-Vela et al., 2006); nelle alghe avvengono anche meccanismi di esclusione che prevengono l'ingresso dei metalli (meccanismi di esclusione ad opera di polimeri extracellulari e carboidrati), e/o di efflusso attivo ATP dipendente e/o meccanismi enzimatici di speciazione ai fini della detossificazione (Nies, 1999).

Sia macro- che microalghe presentano meccanismi costitutivi di rimozione di metalli pesanti dal mezzo circostante (Raskin, 1996); ciò rende le alghe ottimi candidati per la loro applicazione in tecnologie di biorimediazione e/o in sistemi di biotrattamento.

Le specie algali presenti in siti inquinati potrebbero diventare utili indicatori ecologici. A tale scopo, è importante conoscere l'intervallo di tolleranza di queste specie a ciascun metallo. Alghe presenti in siti inquinati sono da considerarsi come specie metallo-tolleranti o metallo resistenti (Stokes, 1983). Ad oggi, ci sono solo pochi dati che riguardano tali studi che coinvolgono proprio le alghe verdi, organismi modello facili da coltivare anche in laboratorio (Pawlik-Skowronska, 2001). In tale contesto notevole interesse assumono le ricerche volte a individuare eventuali ceppi algali metallo-tolleranti al fine di incrementare la conoscenza sui meccanismi coinvolti nella tolleranza e/o omeostasi dei metalli pesanti e identificare enzimi e/o geni candidati nel trasporto e rimozione dei metalli dall'ambiente circostante.

## **2.2 Meccanismi di omeostasi e detossificazione da metalli pesanti**

I metalli pesanti costituiscono un fattore di stress per gli organismi acquatici, e le alghe, come altri organismi, adottano meccanismi di risposta per la tolleranza e/o detossificazione dei metalli. Alcuni metalli pesanti, in particolare rame e zinco, sono micronutrienti essenziali per una serie di processi fisiologici delle piante attraverso l'azione di enzimi Cu- e Zn- dipendenti. Questi ed altri ioni di metalli non essenziali, come cadmio, piombo e mercurio, sono altamente reattivi e di conseguenza possono essere tossici per le cellule viventi (Cobbet e Goldsbrough, 2002). Per sopravvivere, le piante hanno sviluppato meccanismi attraverso i quali sono in grado di mantenere il giusto equilibrio di nutrienti essenziali in diversi tessuti e stadi di sviluppo, attenuare l'accumulo di elementi e composti tossici e ridurre gli stress cellulari causati da agenti esogeni o fattori abiotici.



Per omeostasi e tolleranza dei metalli sono di fondamentale importanza i trasportatori di membrana, le famiglie ATPasi per il trasporto di metalli pesanti e una miriade di altre famiglie di proteine coinvolte nella risposta a vari stress (Blindauer et al., 2010; Palmer et al., 2009).

I principali sistemi di difesa sono rappresentati da sistemi di *immobilizzazione*, *esclusione* e presenza di agenti *chelanti* quali Fitochelatine e Metallotioneine.

Per *immobilizzazione* si intende il blocco degli ioni metallici a livello della parete cellulare oppure a livello dei carboidrati extracellulari; nel meccanismo di *esclusione* è invece la membrana cellulare a rappresentare il livello di difesa visto che gli ioni utilizzano i diversi canali presenti nella membrana plasmatica come punti di ingresso della cellula.

Per quanto riguarda gli agenti *chelanti*, essi sono conosciuti da tempo: si tratta di proteine e/o piccoli peptidi capaci di legare i metalli attraverso l'azione chelante dovuta alla loro struttura. I chelanti più noti sono le Fitochelatine e le Metallotioneine, entrambi legano i metalli pesanti e permettono la loro compartimentazione soprattutto nei vacuoli, ma anche nei cloroplasti e mitocondri (Rivetta et al, 1997).

## 2.3 Le Fitochelatine

Le Fitochelatine (PCs) sono essenzialmente polimeri del *glutatione* (GSH), tripeptide composto da acido  $\gamma$ -glutammico (Glu), cisteina (Cys) e glicina (Gly) (Fig.1). Il GSH è il tiolo più abbondante prodotto da animali, piante, protisti e batteri (Ahner et al.,2002; Noctor et al., 1998).

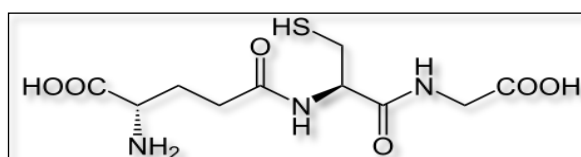


Figura 1. Struttura primaria del glutatione

Il GSH all'interno delle cellule svolge diverse importanti funzioni biochimiche, tra cui il mantenimento di condizioni riducenti per aminoacidi e proteine, protezione contro danni ossidativi e radiazioni, protezione contro un aumento di concentrazione di metalli e composti organici xenobiotici (Ahner et al., 2002; Noctor et al., 1998). Il glutatione è anche coinvolto nell'espressione dei geni deputati nei meccanismi di difesa (Noctor, 1998) ed è il peptide di base per la sintesi delle fitochelatine (Ahner et al.,2002).

Le PCs, come derivati del GSH, presentano la seguente struttura generale (Y-Glu-Cys)<sub>n</sub>-Gly, (Fig. 2) dove n rappresenta il numero di ripetizioni che varia in genere

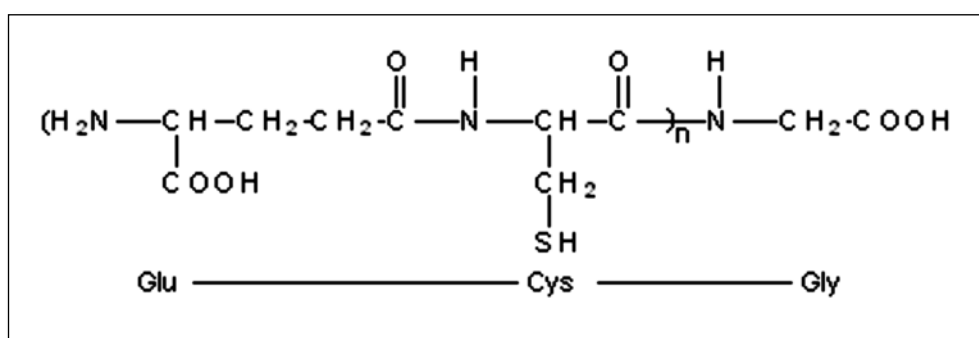


Figura 2. Struttura primaria delle fitochelatine

da 2 a 5 (Cobbett, 2000). Le PCs formano diversi complessi con gli ioni metallici grazie ai gruppi tiolici della cisteina che, sequestrando gli ioni per via dell'attività chelante, fanno in modo che non vi siano ioni liberi nel citosol. Attraverso la formazione di complessi, i metalli vengono poi trasportati a livello dei vacuoli attraverso carriers specifici.

La struttura delle fitochelatine rispecchia molto la sequenza amminoacidica del glutatione poichè, come il tripeptide, non possono essere prodotti genici primari, in quanto il legame  $\gamma$ -carbossil-ammidico non è sintetizzato a livello ribosomiale durante il processo di trasduzione. Ciò necessita di una particolare via biosintetica di tipo enzimatico attuata attraverso l'enzima inducibile Fitochelatina sintasi (PC-sintasi). La sintesi di PCs è attivata principalmente dalla presenza di cadmio, mentre l'induzione è minore in presenza di altri metalli.

La biosintesi delle PCs può essere regolata da diversi meccanismi (Cobbett, 2000); per esempio, nella pianta erbacea *Brassica juncea*, l'esposizione al Cd induce una maggiore richiesta di cisteina e GSH per la biosintesi delle fitochelatine. Ciò si riscontra in una coordinata regolazione della trascrizione dei geni coinvolti nell'assimilazione e nel trasporto del zolfo e nella biosintesi del glutatione (Cobbett, 2000).

La sintesi immediata di questi peptidi causa un improvviso impoverimento del pool intracellulare di GSH, ma questa perdita viene compensata dall'attivazione degli enzimi che sono coinvolti nella sintesi del GSH (Rueggsegger et al., 1992).

Ci sono molti studi condotti a livello di piante superiori sulla sintesi delle fitochelatine e sulla natura dei loro complessi con i metalli, tuttavia si conosce poco delle interazioni che le coinvolgono nelle microalghe. Lo studio di Ahner et al. (1995), ha esaminato la risposta della diatomea marina *Thalassiosira weissflogii* in seguito all'esposizione a vari metalli in tracce (Cd, Pb, Hg, Ni, Cu, Zn, Co, Ag), simulando concentrazioni presenti negli ambienti acquatici. È stato riscontrato che il Cd, e in minor misura Zn e Cu risultano essere i maggiori induttori di fitochelatine. Inoltre è stato osservato che la produzione di PCs non segue una semplice relazione stechiometrica rispetto alle concentrazioni dei metalli. È stato inoltre riportato (Wei et al., 2003) che la produzione di fitochelatine non dipende soltanto dall'esposizione dell'organismo al metallo, ma è piuttosto il risultato dell'interazione tra i vari metalli presenti che possono avere tra loro effetti antagonisti e sinergici. In accordo con lo studio di Kawakami et al., (2006a), lo Zn non esercita nessuna influenza sulla quantità di PCs prodotte dalle cellule di *P. tricornutum* esposte al Cu, mentre ha un effetto antagonista quando vengono esposte al Cd, probabilmente a causa della competizione per i siti di legame sulla membrana cellulare.

In *Scenedesmus vacuolatus* è stato visto che il livello di glutazione diminuisce dopo esposizione allo Zn mentre aumenta successivamente all'esposizione a Pb e Ag. La sintesi delle fitochelatine è stata invece indotta solo dall'esposizione a Cu e Pb. Il contenuto di glutazione e fitochelatine in *S. vacuolatus* non è risultato essere così sensibile in risposta all'esposizione di una serie di metalli e metalloidi (Le Fauchier et al., 2006).

## 2.4 Le Metallotioneine

I metalli pesanti possono essere complessati e detossificati, oltre che dalle PCs, anche dalle Metallotioneine (MTs), una famiglia di piccoli peptidi ricchi in cisteina. Caratteristica delle MTs è la presenza di domini ricchi in residui di Cys del tipo Cys-Cys, Cys-X-Cys e Cys-X-X-Cys dove X è rappresentato da un diverso amminoacido. Tali proteine sono inoltre caratterizzate da un basso peso molecolare (6-8 kDa). L'attività chelante è svolta, anche per le MTs, dai gruppi tiolici delle cisteine che riescono ad immobilizzare e complessare gli ioni di diversi metalli pesanti.

Nel 1985 le MTs furono convenzionalmente suddivise in 3 classi sulla base della MT di mammifero: nella "classe I" furono riunite le MT con struttura primaria correlabile a quella delle MT dei mammiferi, nella "classe II" le MT la cui sequenza non presentava omologia con le MT dei mammiferi, e nella "classe III" i metallopeptidi atipici, rinvenuti nelle piante, costituiti da unità  $\gamma$ -glutamyl-cisteiniche (es. le PCs) aventi alcune proprietà in comune con le MTs.

Con il progredire delle conoscenze sulle MTs, tale classificazione è risultata inadeguata e nel corso del 4° Meeting Internazionale sulle MTs (Kansas City (USA), 1997), è stato proposto un nuovo sistema di classificazione basato sia sulla similarità di sequenza che sulle relazioni filogenetiche. Questo sistema considera le MTs come una superfamiglia suddivisa in famiglie e sottofamiglie. Le Mts delle piante (pMTs) appartengono alla famiglia 15 (Binz PA, Kagi JHR (2001) Metallothionein. <http://www.bioc.uzh.ch/mtpage/MT.html>). Questa famiglia 15 è suddivisa in diverse sottofamiglie (p1 : plant MT type 1; p2: plant MT type2; p3 : plant MT type 3; p21: plant MT type 2x1; pec: plant EC MT-like protein) per similarità di sequenza e per i motivi conservati.

A differenza delle MTs di mammifero che contengono 20 residui Cys, il contenuto Cys nelle MTs delle piante è inferiore e con una grande varietà di motivi nelle diverse sottofamiglie.

Complessivamente nel database NCBI sono depositate 1013 sequenze di metallotioneina e, negli ultimi anni, un numero elevato di sequenze di MTs appartengono alle piante.

Per quanto riguarda le Mt vegetali, mentre ci sono dati per quanto riguarda quasi tutte i maggiori gruppi tassonomici terrestri (Fig. 3) per quanto riguarda le Alghe, sono presenti solo poche sequenze (Fig. 4).

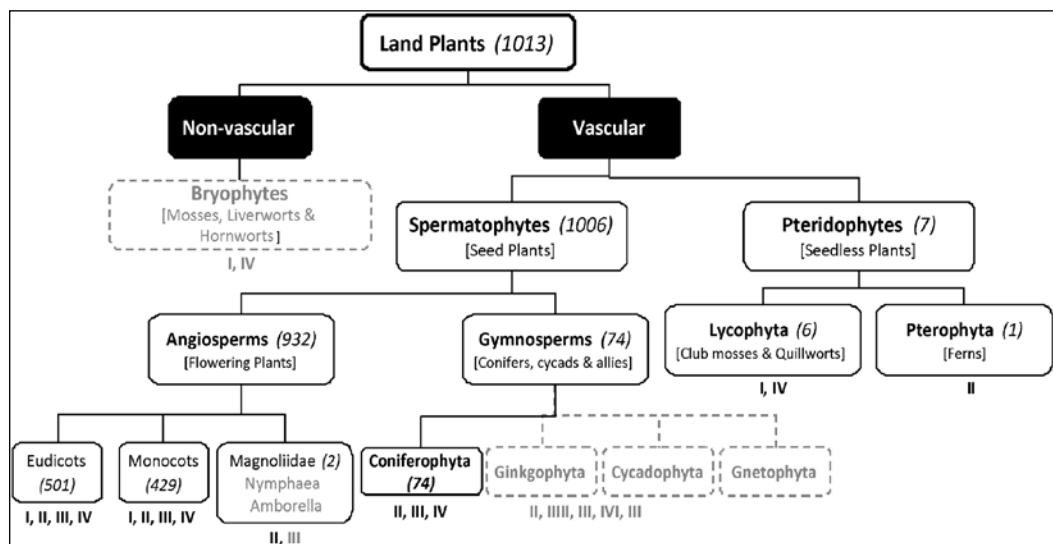


Figura 3. Distribuzione tassonomica delle pMT e delle sequenze metallotioneina-like depositate nel database NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov; recuperate 30.01.2013) (Oksana et al., 2013).



Figura 4. (a) L'allineamento delle sequenze MT nelle alghe, (b) allineamento della sequenza MT1a di *Arabidopsis thaliana* (UniProt Acc. P43392) con quella di *Sargassum binderi* (GenBank Acc. DV670160), (c) La sequenza della metallotioneina, SmtA, dal cianobatterio, *Synechococcus* sp. PCC7942. Cisteine e istidine sono state rispettivamente evidenziate in nero e grigio (Oksana et al., 2013).

In particolare la sequenza isolata in *Sargassum binderi* (alga bruna che dal punto di vista genetico è relativamente lontana dalle piante e dalle altre alghe), mostra una marcata similarità di sequenza con una Mt di tipo 1 di *A. thaliana*, a conferma che le Mts si sono evolute già nei progenitori delle piante. Questa ipotesi è ulteriormente suffragata dalla presenza di metallotioneine nei progenitori delle piante, i cianobatteri, tra cui *Gloeobacter violaceus*, specie che diverge dai cianobatteri prima dell'evoluzione del cloroplasto.

Ben caratterizzata è la Mt cianobatterica PCC 7942 di *Synechococcus*. Le osservazioni in merito alla sua capacità di legare i metalli sono da ascrivere alla sua particolare sequenza, con due istidine leganti i metalli, specifici residui aromatici e regioni povere in cisteina che si ripiegano ad uncino. La presenza di residui di istidina e zone relativamente povere di cisteina sono caratteri in parte condivisi con alcuni tipi di pMTs.

Il numero crescente di pMTs non sempre soddisfa i criteri di classificazione originale dei 4 archetipi di pMTs riportati nella classificazione originale.

In generale, le strutture primarie di tipo 1, 2 e 3 delle pMTs, condividono una topologia simile nell'organizzazione dei residui di cisteina. Tali residui, sono organizzati in due domini ricchi di Cys, separati tra loro da una regione *linker* povera di Cys, la cui lunghezza varia a seconda del tipo della pMT. Sequenze canoniche di tipo 1, come descritto da Robinson et al. (1993) e Cobbett e Goldsbrough (2003), sono ben rappresentate dalle pMTs che si trovano nelle specie di angiosperme quali *Zea mays*, *Allium sativum* e *Glycine max*. In questo archetipo, sei motivi CXC sono equamente distribuiti tra i domini ammino- e carbossi terminale, con ciascuna cisteina che occupa una specifica posizione conservata. Le regioni linker sono costituite da circa 40 aminoacidi e comprendono diversi aminoacidi carichi e aromatici. Varianti con un numero inferiore o superiore di residui di cisteina, che rientrano ugualmente nell'archetipo 1, sono presenti in alcune gimnosperme e briofite. In queste sequenze, variano le posizioni dei residui di cisteina contenuti nella regione N-terminale, mentre i motivi CXC al C-terminale rimangono interamente conservati. Anche la lunghezza della regione linker, povera di Cys, varia tra le diverse specie di piante, con briofite e gimnosperme che contengono sequenze più corte di quelle ritrovate nelle angiosperme. Un'eccezione è rappresentata dalle metallotioneine della famiglia delle

Brassicaceae, che con solo 7 aminoacidi, presentano una cortissima regione linker nonché una cisteina addizionale al C-terminale.

In monocotiledoni e dicotiledoni, ritroviamo l'archetipo 2 delle pMTs. In questo archetipo, un unico motivo CC segna l'inizio del dominio N-terminale e, a seguire, ci sono sempre tre aminoacidi prima di due motivi CXC altamente conservati (Fig. 5). La regione N-terminale, è scandita da un motivo CXXC, dove la X è prevalentemente una glicina, con varianti rappresentate da una lisina, arginina o serina. Al C-terminale, sei cisteine sono organizzate in tre motivi CXC che adottano la stessa disposizione di quelle del C-terminale delle angiosperme, dato da interpretare come un'indicazione di una relazione evolutiva tra questi due tipi (Fig. 5).

Le sequenze del tipo 3, sono caratterizzate dalla presenza, in angiosperme e gimnosperme, di quattro cisteine con una sequenza consenso di CXXCXCXDXXC, situata all'estremità N-terminale, con sei cisteine che formano un classico tipo 1 all'estremità C-terminale (di nuovo indicando una possibile collegamento evolutivo). Come per le pMT di tipo 2, la regione linker povera di Cys è lunga circa 30-40 aminoacidi. Varianti che differiscono nella posizione delle cisteine e nel numero, si possono trovare nelle specie vegetali *Nuphar advena* e sono ancora una volta osservate nella famiglia delle Brassicaceae. Quest'ultimo gruppo di sequenze contiene due residui di cisteina supplementari al C-terminale, in una sequenza consenso altamente conservata CKCKCGS (T / S) CSC (Fig. 5).

La topologia delle cisteine nelle pMT di Tipo 4 o EC pMT, è diversa da quella dei tipi 1-3. In alcune specie appartenenti alle angiosperme, 17 cisteine sono organizzate in tre regioni, separate da due regioni linker povere di Cys, lunghe tra i 15 e i 40 aminoacidi. La prima regione ricca di Cys ha sei cisteine disposti in un motivo consenso CXXCGCXXPCXXXXXC (K/R) C con una glicina e una prolina conservate. La seconda regione contiene ugualmente sei cisteine e una glicina, una prolina e due istidine in posizioni altamente conservate. La terza regione comprende infine cinque cisteine, organizzate ancora in modo del tutto conservato. Fra la seconda e la terza regione ricche in Cys, si può osservare una somiglianza sorprendente, non solo tra loro, ma anche col C-terminale di altri tipi di pMTs, sostenendo in tal modo una relazione evolutiva tra tutte e 4 le varianti delle pMT (Oksana et al., 2013).

Con 17 residui Cys, le proteine Ec o MT4 hanno il più alto contenuto di gruppi tiolici (Fig. 5), seguita dalle forme MT2 con 14, le forme MT1 con 12, e, infine, le proteine MT3 con soli 10 residui Cys.

Come già detto, nelle pMTs, la lunghezza delle sequenze amminoacidiche è generalmente superiore a quella osservata per le MT di mammifero. Considerando che queste ultime hanno masse intorno a 6,0 kDa, senza ioni metallici, le più grandi MTs vegetali vengono classificate nella sottofamiglia MT2 (circa 7,9 kDa), seguita dalle Ec (circa 7,7 kDa) e MT1 (circa 7,6 kDa), e infine, dalle MT3 (circa 6,8 kDa).

mammalian MTs	
MT1 ( <i>M. musculus</i> )	MDP-NCSSTGGSCNTSSCARNCHTSRRKSCSCCPVGCSPKCAQGGVCKG-----AADKRCCKA
MT2 ( <i>H. sapiens</i> )	MDP-NCSAAGDSCICAGSCKCKECKTSCRRKSCSCCPVGCSPKCAQGGVCKG-----ASDKSCCKA
MT3 ( <i>M. musculus</i> )	MDPETCFPTGGSCITCSDRCKCKGCKTNRKSKSCSCCPAGCEKCAKDVCKGEGAKAEAEKSCCCQ
MT4 ( <i>M. musculus</i> )	MDPGECICMSGGICICGDNCKTICSCRTCKRKSCECCPPGCAKCAKRGCKCKG-----GSDKSCCP
plant MTs	
plant MT1 proteins	
MT1 ( <i>C. arietinum</i> )	MSGNCGSSNCGDQCKCNKRSS-----GLSYVEAGETTETVVLGVGPTKIHEGAEMSVAAEDGCKCGSSCICDP-CNCK
MT1 ( <i>P. sativum</i> )	MSGCCGSSNCGDSCCNKRSS-----GLSYSEM-ETTETVILGVGPAKIHEGAEMSAASEDGGCKGDNCKCDF-CNCK
MT1 ( <i>T. durum</i> )	MS-CNCGSGSCSSDCKCGKMPDLTEQGSAAAQVAAVVVLGVAPENKAGQBEVA---AGQSGEGSCGDNCKCNP-CNC
MT1A* ( <i>A. thaliana</i> )	MADSNCGSSCKCGDSCCKEKNY-----GSDKSCCP
plant MT2 proteins	
MT2 ( <i>C. arietinum</i> )	MSCCGNCGGSSCKCGSGGCKMIPDMSVTEQTTSE--TLVMGVASGKTQHEGAEMGEGAENDGCKCGSNCTONPCK
MT2 ( <i>Q. suber</i> )	MSCCGNCGGSGCKCGSGGCKMIPDISSEKTTT-E--TLIVGVAPQKTHEGSEMVGVAEN-GCKCGSNCTONPCK
MT2 ( <i>A. marina</i> )	MSCCGNCGGAGCKCGSGGCKMIPDLGSEATAPAEALVL-GVAPLK-HEGAEMGEGAENGCKCGSNCTONPCK
MT2A ( <i>A. thaliana</i> )	MSCCGNCGGSGCKCGSGGCKMIPDLGSGETTTTETVVLGVAPAMKNQHEASGESNNAENDACKCGSDCKCDFCK
plant MT3 proteins	
MT3A ( <i>E. guineensis</i> )	MS-TGNCIDCADKSQCKKGNSSYGIEIIETEKSNINNVIDAPAAAEHEGN--CKCGASACVCKCGQ
MT3 ( <i>M. acuminata</i> )	MS-TGNCIDVDKSQCKKGNSSYGIDIVETEKSVDEVIIVAAEAAEHDGK--CKCGAACAIDCKCGN
MT3 ( <i>A. deliciosa</i> )	MSDKCGNCDADSSQCKKGNSS--IDIVETDKSVIDVVMGVPAE SGGK--CKCGSTSCVNCCKD
MT3* ( <i>A. thaliana</i> )	MSSNCGSCIDADKTQCKKGTSTHIDIVETQESMKEAMIMDVGAEN NANKCKCGSSCSQVNCCKCPN
plant Ec (or MT4) proteins	
Ec-1 ( <i>T. aestivum</i> )	MGDDDKCGCAVFCPPGGTGCRCISAR-SGAAAGEHTTCCGGEHCSONPACGREGTPSGRANRRANCSGAAVNCASCGSATA
Ec-1 ( <i>A. thaliana</i> )	MADTGKGSVAGCNDSGCPSPCPGGNSCRMR-EASAGDQGHMVCPGGEHCSONPACPKTQTQTSAGK----CTCGECCACASCAT
Ec-2 ( <i>A. thaliana</i> )	MADTGKGSASASCNDRGCPSPCPGGESCRCKMMSEASGDQEHNTCPGGEHCSONPACPKTQTQTSAGK----CTCGECCACATCAA
Ec ( <i>S. indicum</i> )	MADMRGSGVVDRCGCPSPCPGGIACRSTGGGDDTTT-EHKQCTCGEHCSONPACCKSEIRGTGKAE---CRCSTGCTCPTCAA

Figura 5. Allineamento delle sequenze amminoacidiche rappresentative dei mammiferi e delle famiglie delle metallotioneine (MT) delle piante. Le MT vegetali sono suddivise in quattro sottofamiglie che comprendono le proteine MT1, MT2, MT3, e Ec (o MT4). I residui di Cys sono evidenziati con sfondo nero, gli amminoacidi aromatici con uno sfondo grigio. I residui di His sono evidenziati da una cornice nera (Freisinger, 2011).



Le MTs mediano una risposta veloce e improvvisa, ma allo stesso tempo costante per quanto riguarda lo stress da metalli utilizzando come fonte energetica l'ATP che permette l'internalizzazione dei complessi MTs-metallo nei vacuoli, ma anche nei cloroplasti e mitocondri. La presenza dei complessi nei cloroplasti e mitocondri viene giustificata dai seguenti processi:

- 1) MTs sono sintetizzate nel citosol e solo dopo i complessi sono successivamente trasportati nel cloroplasto e mitocondri.
- 2) MTs sono sintetizzate all'interno dell'organello dove legano gli ioni metallici, che sono trasportati come ioni liberi e poi formano i complessi.
- 3) Entrambi i processi co-esistono e le MTs sono sintetizzate nei tre compartimenti cellulari.

La presenza di svariate EST nei database dimostra che le MTs sono dei trascritti molto abbondanti nelle piante. Recentemente, è stato visto che le MTs vegetali ricoprono un ruolo importante nello sviluppo del frutto, in quello delle radici e nella suberificazione, oltre che alla tolleranza ai metalli pesanti. Inoltre è stato dimostrato che le MTs vegetali intervengono durante stress abiotici quali ossidativo, disidratazione, senescenza e alterazioni ormonali (Waldron et al., 2009). L'espressione di tali proteine è inoltre tessuto-specifica (Rodriguez-Llorente et al., 2010). La funzione antiossidante delle MTs è attribuita alla presenza di un gran numero di residui di cisteina, che oltre a legare i metalli, svolgono un ruolo di scavenger dei ROS. Allo stesso modo, nel riso, metallotioneine di tipo 1 e di tipo 2 svolgono un ruolo diretto nel limitare l'ossidazione (Kumar et al., 2012).

Studi funzionali sugli archetipi da 1 a 3, hanno suggerito che le pMTs di un certo tipo possono svolgere ruoli diversi in diversi contesti biologici. Sarebbe a tale scopo altamente auspicabile intensificare gli sforzi per studiare la speciazione delle varie pMTs isolate dai rispettivi tessuti vegetali.

Come detto in precedenza, gli studi sulle Mts in alga sono molto carenti. Ad oggi, non sono stati evidenziati geni codificanti per le MTs in microalghe, anche se l'induzione di una proteina metallotioneine-like legante il cadmio è stata ritrovata nelle alghe unicellulari *Chlamidomonas sorokiniana* e *Chlamidomona svulgaris* (Huang et al., 2009).

## 2.5 Stress da metalli e cambiamenti epigenetici

Col termine di “variazioni epigenetiche”, si intende quelle modificazioni ereditabili che variano l’espressione genica pur non alterando la sequenza del DNA. Si tratta quindi di quei cambiamenti che influenzano il fenotipo lasciando inalterato il genotipo. A coniare tale termine fu Conrad Waddington nel 1940 per descrivere “le interazioni dei geni con l’ambiente, che portano il fenotipo in essere” (Murrell *et al.*, 2005).

Gli organismi vegetali trasmettono alle generazioni successive la memoria degli stress ambientali proprio attraverso meccanismi epigenetici. Quello che avviene in tali processi, sono delle modifiche nella struttura della cromatina che influenzano l’accessibilità di fattori regolatori dell’espressione genica.

Alla base dei cambiamenti epigenetici ci sono alcuni meccanismi quali: i) le modificazioni della conformazione istonica tramite processi di acetilazione e deacetilazione; ii) la metilazione di sequenze del DNA (metiloma), soprattutto a livello dei residui CG.

Entrambi i processi, modulando l’accessibilità dei relativi promotori, vanno a regolare l’attività e l’espressione dei geni, senza indurre mutazioni nel codice genetico.

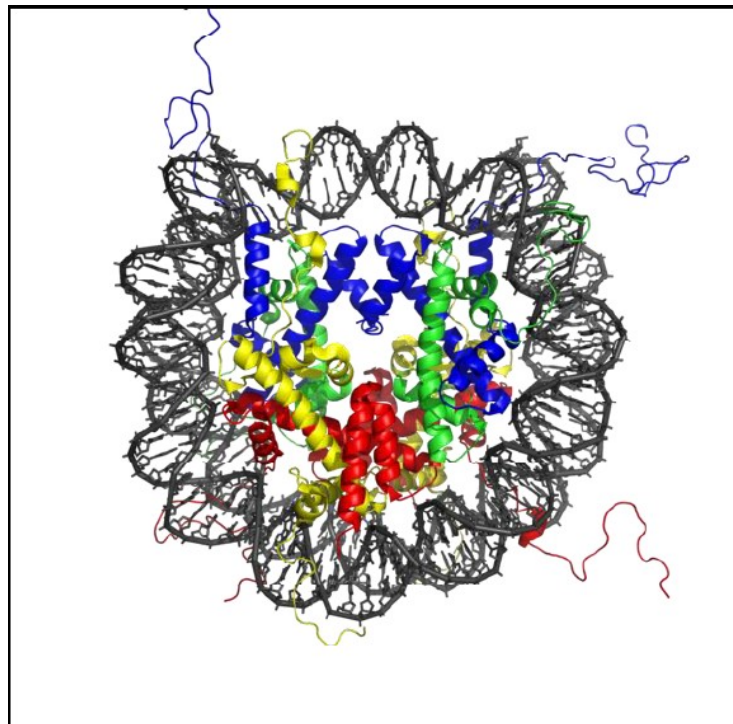


Figura 6. Struttura cristallina del nucleosoma vista dall'alto: in nero la doppia elica di DNA e in blu, verde, rosso e giallo gli

Per quanto riguarda la modificazione istonica, l'unità fondamentale della cromatina, il nucleosoma (Fig. 6), è costituito da un core proteico di otto proteine istoniche (due istoni H2A , due H2B , due H3 e due H4) attorno al quale si avvolge il DNA del core lungo circa 146 bp (Bowler et al., 2004). Come detto in precedenza, gli istoni sono soggetti a modificazioni quali *acetilazioni* e *deacetilazioni*, responsabili di cambiamenti conformazionali della cromatina. L'acetilazione prevede il trasferimento di un gruppo acetile su un residuo amminoacidico di lisina presente all'estremità N-terminale degli istoni che formano il nucleosoma. Questo legame causa la perdita della carica positiva della lisina e, di conseguenza, una minore affinità per i gruppi fosfato del DNA, che in quel punto si distende e permette l'attivazione dei processi che mediano la trascrizione. La deacetilazione, come processo inverso, implica la rimozione di un gruppo acetilico determinando la compattazione del DNA e impedendo così l'intervento dei fattori di trascrizione e reprimendo l'espressione di alcuni geni.

La regolazione della struttura della cromatina ha perciò un ruolo chiave nei meccanismi epigenetici: l'acetilazione e la deacetilazione degli istoni sono processi che regolano l'espressione genica alterando l'accessibilità della trascrizione del DNA, senza alterarne l'informazione genetica (Bowler et al., 2004).

Oltre agli istoni, anche lo stesso filamento di DNA può essere modificato per fini epigenetici. Una delle più importanti modificazioni post-replicative è rappresentata dalla metilazione. Il processo consiste nel legame di un gruppo metile (-CH<sub>3</sub>) a una base azotata. Differenti basi azotate possono subire tale modificazione, ma è senza dubbio la metilazione della citosina che riveste un'importanza cruciale. Questa reazione è catalizzata da enzimi chiamati *DNA metilasi*, che legano un gruppo metile al carbonio in posizione 5 di una citosina, trasformandola così in 5-metil-citosina. La funzione della metilazione è correlata all'attività trascrizionale. Condizioni di ipermetilazione corrispondono a processi di silenziamento genico, viceversa una scarsa metilazione determina una buona attività trascrizionale e un'espressione genica pronunciata.

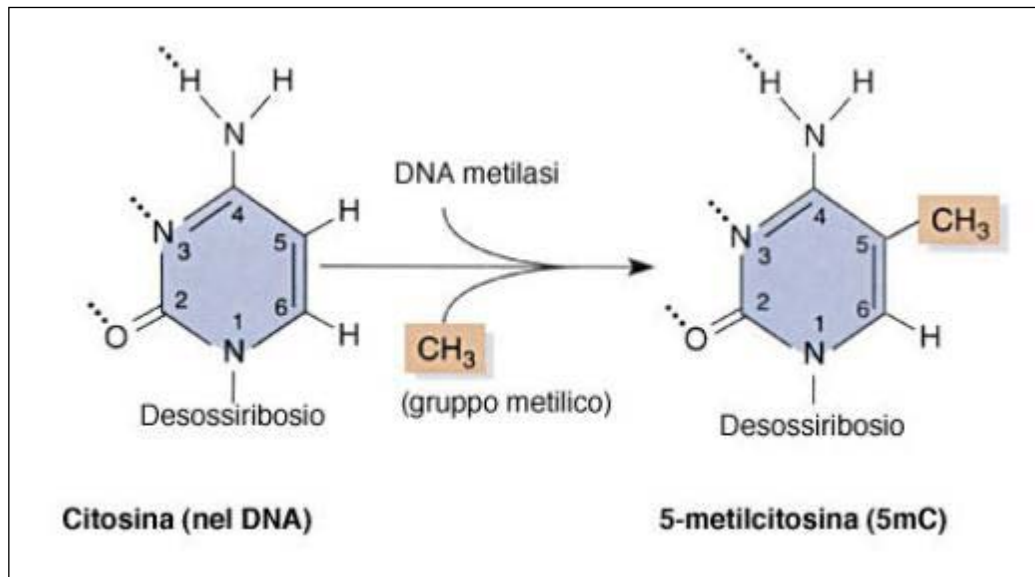


Figura 7. Formazione di 5-met-Cyt nel DNA ad opera dell'enzima DNA metilasi

La memoria degli stress può essere trasmessa per via epigenetica e correlata quindi a una variazione della metilazione del DNA. Alla base dei meccanismi di tolleranza da metalli pesanti (fattori di stress) possono esserci perciò dei meccanismi epigenetici. Nelle alghe ciò non è stato mai verificato.

Partendo dall'evidenza che la cromo tolleranza nel ceppo di *Scenedesmus acutus* (la microalga oggetto di questo lavoro di tesi) viene trasmessa alla progenie per diverse generazioni (Torricelli *et al.*, 2004), abbiamo ipotizzato che nel nostro ceppo, la variazione nel pattern di metilazione potrebbe essere alla base della cromo-tolleranza stessa.

L'ipotesi è che l'eccesso cromo costituisce un notevole fattore di stress per la microalga e la tolleranza acquisita è trasmessa alla progenie attraverso l'ereditarietà di un diverso stato di metilazione del DNA (che potrebbe determinare silenziamento o attivazione di geni coinvolti nel trasporto e/o nella detossificazione dei metalli) e che porta all'instaurarsi del ceppo Cr-tollerante.

Con queste premesse, una parte del lavoro sperimentale è stato rivolto a verificare eventuali variazioni nel pattern di metilazione del ceppo Cr-tollerante rispetto al ceppo normale non tollerante (Wild type). Il pattern di metilazione è stato valutato attraverso

un approccio *in situ* su cellula con la tecnica di immunogold (anticorpo anti- 5mCyt) illustrata nei capitoli successivi.

## Capitolo 3

### La microalga modello *Scenedesmus acutus*

#### 3.1 *Scenedesmus acutus*: caratteristiche generali

*Scenedesmus acutus* è una microalga unicellulare appartenente alla Divisione delle Chlorophyta (Tab. 3), caratterizzata da cromatofori di “tipo verde” e con clorofilla *a* e *b*. Il genere *Scenedesmus* è un genere cosmopolita, diffuso sia nelle aree costiere che estuariali ed è uno dei generi di acqua dolce più comune. Dal punto di vista morfologico, le cellule appaiono rotonde od ovoidali, a volte lobate, di colore verde

Classificazione Tassonomica	
Regno	Plantae
Sottoregno	Viridaeplantae
Infraregno	Chlorophyta
Divisione	Chlorophyta
Sottodivisione	Chlorophytina
Classe	Chlorophyceae
Ordine	Sphaeropleales
Famiglia	Scenedesmaceae
Genere	<i>Scenedesmus</i> (Meyen, 1829)
Specie	<i>Scenedesmus acutus</i>

Tabella 3. Classificazione tassonomica di *Scenedesmus acutus*

brillante. Generalmente sono provviste della parete cellulosica ma possono presentarsi anche nude.

La parete è composta, a partire dall'interno verso l'esterno, da cellulosa, parete intermedia e strato esterno.

La cellula presenta un unico cloroplasto che occupa quasi tutto il citoplasma periferico e che

presenta due strutture peculiari: la macchia oculare e il pirenoide.

La *macchia oculare*, chiamata anche stigma, è formata da globuli lipidici contenenti carotenoidi ed è visibile al microscopio ottico come una macchia rossa situata nella parte anteriore della cellula. Il *pirenoide*, che può essere bi- o trilobato, contiene l'enzima Rubisco che catalizza la prima reazione di fissazione dell'anidride carbonica, ed è inoltre coinvolto nella polimerizzazione degli zuccheri di riserva.

Nel cloroplasto oltre alla clorofilla *a* e *b*, sono presenti betacarotene e varie xantofille (violaxantina, luteina, zeaxantina, neoxantina). Le cellule presentano spesso 2 flagelli

uguali, ma in alcuni generi ve ne possono essere anche 4 o 8 la cui azione sincrona determina la propulsione che si svolge con movimenti omodinamici, lenti, direzionati in avanti e talvolta a zigzag.



Figura 8. *Scenedesmus acutus*, organizzazione in cenobio

*Scenedesmus acutus* (Fig. 8) presenta un ciclo metagenetico aplanonte e in condizioni normali si divide essenzialmente per via vegetativa, formando cenobi di 2-4-8 cellule che nelle condizioni colturali di laboratorio rapidamente si trasformano in cellule singole. Gli organismi aploidi possono evolvere rapidi adattamenti evolutivi della popolazione nei confronti degli stress biotici e abiotici, grazie alla insorgenza di mutazioni immediatamente manifeste (Baos et al. 2006). In questo tipo di organismi il passaggio alla riproduzione sessuale sembra essere innescato da situazioni di rischio per la sopravvivenza della popolazione, come un superamento del numero sostenibile di mutazioni potenzialmente deleterie (Tüzel et al. 2001).

Proprio a seguito di riproduzione sessuale indotta da una prolungata coltura in presenza di cromo è stato possibile isolare un ceppo di *S. acutus* tollerante il metallo (Corradi et al. 1995). Tale ceppo (Cr-tollerante) è in grado di crescere senza subire gli effetti tossici del cromo, anche se il metallo è presente a concentrazioni che risultano inibenti per la popolazione wild type; il ceppo conserva un ruolo inalterato anche sulla catena trofica, mantenendo il proprio valore nutrizionale per *Daphnia magna* (Gorbi et al. 2006). È stato inoltre visto che gli essudati del ceppo tollerante risultano avere effetti protettivi nei confronti del cromo sia sulle alghe del ceppo wild type sia su *D. magna* (Corradi et al. 1995; Gorbi et al. 2007).

### 3.2 *Scenedesmus acutus*: metallotolleranza e risposta al cromo

Le microalghe capaci di crescere nei siti inquinati da metalli pesanti, sono da considerarsi specie metallo-tolleranti o metallo-resistenti (Stokes, 1983). Con il termine tolleranza, si fa riferimento alla capacità di far fronte ad una eccessiva concentrazione di metallo mediante l'adozione di diverse strategie di adattamento, come ad esempio l'utilizzo di meccanismi di difesa e di detossificazione.

Studi condotti su specie del genere *Scenedesmus* (es. *S. quadricauda*) hanno evidenziato che le principali strategie che le popolazioni algali attuano per far fronte alla presenza di metallo possono ascrivere a tre meccanismi essenziali:

- bloccare il ciclo cellulare e riprenderlo quando le condizioni migliorano;
- generare una nuova popolazione di cellule mutate che presentano un genotipo favorevole;
- sviluppare una tolleranza adattativa in risposta al fattore determinante lo stress.

I metalli, quando raggiungono concentrazioni elevate, possono causare considerevoli alterazioni allo stato fisiologico delle cellule algali. Il genere *Scenedesmus*, in risposta alla presenza di elevate concentrazioni di cromo esavalente (CrVI), subisce alcune modificazioni strutturali nonché alterazioni del ciclo cellulare, passando da una riproduzione asessuata ad una sessuata (Corradi et al., 1995), come anticipato nel paragrafo precedente.

Gli effetti dello stress indotto dai metalli, possono essere paragonati agli effetti causati dalla carenza di nutrienti. È stato dimostrato che, in condizioni di deprivazione da solfato, in *S. acutus* si osserva un aumento di tolleranza transiente al Cr. Questo aumento di tolleranza transiente è dovuta ad un aumento del contenuto di cisteina libera e del pool di glutatione (precursore delle fitochelatine) in seguito ad una maggiore capacità di uptake del solfato che si instaura durante la deprivazione di questo nutriente (Gorbi et al., 2007). Questa evidenza suggerisce che l'aumentata tolleranza al Cr in carenza di solfato è legata ad un up-regolazione dei processi di uptake/assimilazione del solfato. Il maggior uptake di solfato e l'aumento di cisteina libera e di glutatione innescata dalla carenza di solfato, suggerisce che il ceppo Cr tollerante abbia un'aumentata sensibilità al decremento dei livelli intracellulari di solfato e/o di prodotti del solfato. Questo porterebbe ad una più precoce up-regolazione dei processi di up-take



e costituire uno dei primi meccanismi alla base della Cr tolleranza in questo ceppo di *S. acutus* (Gorbi et al., 2007).

Sempre in *S. acutus*, a seguito della deprivazione da solfato, sono state osservate variazioni proteiche a livello delle membrane, della parete e nella componente cellulare solubile (Torelli et al. 2009).

A supporto che il trasporto del solfato è legato all'ingresso del Cr, è l'evidenza che il Cr (VI) è attivamente trasportato attraverso le membrane biologiche utilizzando i trasportatori solfato e/o fosfato (Wallace et al, 1976;. Cervantes et al., 2001).

Più specificatamente per quanto concerne il cromo, esso è un elemento che non rientra tra i metalli essenziali, per questo motivo la cellula non dispone di trasportatori specifici per questo metallo. Il cromo è il settimo metallo per quantità presenti sulla crosta terrestre (Panda e Choudhury, 2005) ed è presente in natura prevalentemente nel suolo anche se può essere ritrovato in tutti i comparti ambientali. A causa del suo ampio uso nei processi industriali (produzione di acciaio e leghe, mattoni da forno, tinture, pigmenti, cromatura, nell'industria conciaria, processi conservativi del legno), grandi quantità di composti contenenti cromo vengono scaricati nell'ambiente (Kotas e Stasicka, 2000). Le concentrazioni presenti nell'acqua possono variare fra 0,1-117  $\mu\text{g l}^{-1}$  mentre le concentrazioni nel suolo possono arrivare fino a 125  $\text{g kg}^{-1}$  (Shanker et al., 2005).

Il cromo è un metallo di transizione situato nel gruppo VI-B della tavola periodica. Anche se è in grado di esistere in più stati di ossidazione, le forme più stabili e comuni sono il Cr (III) trivalente e il Cr (VI) esavalente, con diverse proprietà chimiche (McGrath e Smith 1990). Il Cr (VI) è di solito associato con l'ossigeno come ioni cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) o dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) (McGrath e Smith 1990). Al contrario, il Cr (III) nella forma di ossidi, idrossidi o solfati, è molto meno mobile ed esiste per lo più legato alla materia organica nel terreno e negli ambienti acquatici. Il Cr (VI) è un forte agente ossidante e in presenza di materia organica si riduce a Cr (III); questa trasformazione è più veloce in ambienti acidi (McGrath e Smith 1990). Tuttavia, livelli elevati di Cr (VI) possono superare la capacità riducente dell'ambiente e quindi persistere come un inquinante. Inoltre, il Cr (III) può anche essere ossidato a Cr (VI) in presenza di un eccesso di ossigeno, trasformandosi di nuovo nella forma più tossica (Vajpayee et al., 1999).

La maggior parte della letteratura pubblicata, indica il Cr (VI) come stato di ossidazione più tossico del Cr (III) (Munn et al, 2005;. Shanker et al., 2005); tuttavia i dati ottenuti da studi recenti non sono conformi a tale conclusione (Pereira et al, 2005).

Per quanto concerne le soglie di concentrazione permesse, la massima concentrazione (CMC) e la concentrazione continua (CCC) di cromo proposto da US EPA (2006) è rispettivamente di 574 e 74 mg/l. La concentrazione stabilita dalla relazione di valutazione dell'Unione europea in materia di composti contenenti cromo che non prevedono effetti nocivi (PNEC), è di 4,7 mg/L (Munn et al., 2005). Secondo Vignati et al. (2010), il cromo (III) può essere tossico per le alghe a concentrazioni inferiori di quelle stabilite dagli enti citati. La possibilità che il Cr (III) possa essere altamente tossico per le alghe e per altri organismi, potrebbero pertanto attualmente essere sottovalutate.

I meccanismi di Cr-resistenza in microrganismi e piante (Mallick and Rai, 2002; Cervantes et al., 2001) prevedono, come anticipato nel precedente capitolo, un ridotto accumulo del metallo nell'organismo, la formazione extracellulare di complessi esterni fra essudati cellulari ed il metallo, la precipitazione degli ioni nel citoplasma o nel vacuolo, l'attivazione di sistemi di difesa antiossidanti, la riduzione del Cr (VI). Pertanto, essendo il Cr un elemento tossico, non essenziale per le piante o altri microrganismi, questi non possiedono meccanismi specifici per la sua diffusione, che avviene attraverso trasportatori utilizzati per la captazione di elementi essenziali per il metabolismo vegetale. Il Cr (III) entra nelle cellule tramite diffusione passiva, mentre il Cr (VI) sembra essere attivamente trasportato attraverso le membrane biologiche o utilizzando i trasportatori solfato e/o fosfato (Wallace et al, 1976;. Cervantes et al., 2001). A prova di quanto detto, in un mutante di *Neurospora crassa*, la carenza di trasportatori del solfato porta alla cromo tolleranza (Marzluf, 1970; Paietta, 1990). Anche se le conoscenze circa il trasporto del cromo nelle alghe sono ridotte, differenze nei tassi di accumulo del metallo sono stati riportate per diversi taxa algali (De Filippis e Pallaghy, 1994). L'inibizione dei trasportatori del solfato a causa della competizione col cromato, è stata osservata nelle alghe verdi *Chlamydomonas reinhardtii* e *Monoraphidium braunii* (Perez-Castineira et al., 1998), evidenziando che anche in questi organismi il Cr (VI) entra nella cellula attraverso i trasportatori del solfato.

L'esistenza di complessi esterni alla cellula, dati da combinazioni di mucillagini o altri

esopolisaccaridi con il cromo, è stata riportata nel *Nostoc muscorum* (Weckesser et al., 1988) e in *Enterobacter cloacae* (Iyer et al., 2004). Esempi di chelazione metallica esterna, sono stati osservati anche in alghe unicellulari (Kaplan et al., 1987) e in un gran numero di alghe brune (Davis et al., 2003), grazie alla loro particolare composizione della parete cellulare. La formazione di complessi intracellulari con peptidi leganti i metalli, (Perales-Vela et al. 2006), è stata ampiamente osservata in microalghe sotto stress da diversi cationi di metalli pesanti. Recenti osservazioni indicano che la complessazione con tioli cellulari come il GSH (Shanker e Pathmanabhan, 2004) e con altri peptidi come le metallotioneine, (Shanker et al., 2004) può verificarsi anche in risposta alla presenza di cromo.

Uno dei principali effetti tossici del cromo è rappresentato dallo stress ossidativo derivante dalla generazione di Reactive Oxygen Species (ROS), stimolata sia dal trasferimento diretto di elettroni o relativo all'inattivazione della catena di trasporto mitocondriale e cloroplastica degli elettroni stessi. Un comune meccanismo di detossificazione nelle piante è rappresentato dall'induzione e/o dall'attivazione di enzimi antiossidanti che possono impedire la perossidazione lipidica e i conseguenti danni alle membrane cellulari. Gli incrementi dell'attività della superossido dismutasi (SOD) e della catalasi, successivi all'esposizione a cromo, sono stati riportati da diversi autori (Chatterjee and Chatterjee, 2000; Samantaray et al, 1999., 2001; Dixit et al., 2002). La riduzione di NADH o NADPH in relazione alla presenza di Cr (VI), è stata riportata nei batteri (Wang et al, 1989, 1990; Ohtake e Argento, 1994; Campos et al., 1995; Thacker e Madamwar, 2005) e nel lievito (Ramirez-Ramirez et al., 2004). Lovley e Phillips (1994) hanno individuato un ruolo specifico nella catalisi del citocromo c3 nella riduzione del Cr (VI) in *Desulfovibrio vulgaris*. Una riduzione fotochimica pH dipendente del Cr (VI), è stata osservata nell'alga verde *Chlorella vulgaris* (Deng et al., 2006). Han et al. 2007, suggeriscono che in *Chlorella miniata* la riduzione del cromato avvenga attraverso un modello cinetico in due fasi, sulla base di un meccanismo di bioassorbimento-bioriduzione, piuttosto che attraverso un processo di bioriduzione diretta.

Anche se i processi di disintossicazione extra ed intracellulari in risposta alla presenza di metalli pesanti sono stati documentati in alghe verdi unicellulari d'acqua dolce, i meccanismi di cromo tolleranza nelle microalghe rimangono tuttora poco conosciuti.

Per quanto riguarda le relazioni tra *S. acutus* ed il cromo, recentemente è stata evidenziata una diversa espressione genica a livello dei trascritti dei due ceppi anche in assenza del metallo (Torelli et al. 2008). Come già detto, il ceppo Cr-tollerante presenta un contenuto cellulare di zolfo e cisteina libera più elevato rispetto a quello del wild type (Gorbi et al. 2007). Il metabolismo del solfato è spesso direttamente correlato alla tolleranza ai metalli pesanti, grazie all'importanza degli aminoacidi solforati nella produzione di composti riducenti come il glutatione, o di piccoli peptidi come le fitochelatine. Paradossalmente in *S. acutus*, la deprivazione da solfato determina un aumento transiente della tolleranza al cromo sia nel ceppo wild type che nel ceppo Cr-tollerante (Gorbi et al. 2007; Torelli et al. 2009) e l'aumento di tolleranza è associato, soprattutto nel ceppo tollerante ad un forte aumento del contenuto di zolfo e della cisteina libera.

Questi dati sono in accordo con l'ipotesi dell'attivazione di un trasportatore ad alta affinità per il solfato, che interviene per sopperire le carenze nutrizionali che si generano durante la carenza di solfato e che potrebbe: i) ridurre la competizione solfato/cromato che in certa misura si verifica a livello dei trasportatori a bassa affinità per il solfato (date le caratteristiche steriche simili dei due anioni); ii) fornire maggiori quantità di composti riducenti necessari per limitare i danni da stress ossidativo indotti dal metallo. L'aumento di tolleranza al Cr, osservata a seguito di carenza di solfato, viene mantenuto anche dopo alcuni giorni di recovery in terreno standard, tempo compatibile con la formazione di successive generazioni, estendendosi quindi anche a cellule che non hanno subito direttamente lo stress. Questa tolleranza ereditata dalla progenie, ci ha fatto ipotizzare che meccanismi epigenetici potrebbero essere alla base della Cr-tolleranza in questo ceppo.

In questo contesto, il lavoro condotto durante questo periodo di dottorato ha riguardato tre livelli:

- i) Livello morfologico-ultrastrutturale, al fine di rilevare eventuali differenze tra i due ceppi di *S. acutus* rispettivamente wild type (wt) e cromo-tollerante (Cr-t) anche a seguito a trattamenti subletali di cromo;
- ii) Indagine epigenetica, attraverso immunolocalizzazione della 5-metilcitosina, al fine di rivelare differenze nel pattern di metilazione nucleare;

- iii) Livello molecolare, attraverso approccio classico con primers degenerati per isolamento e caratterizzazione di geni candidati eventualmente implicati nella metallotolleranza.

A quest'ultimo scopo la nostra attenzione è stata focalizzata ai peptidi chelanti metalli della classe delle metallotionenine (Mts), visto la totale assenza di dati in letteratura sulle Mts di microalghe. Per quanto riguarda gli studi molecolari, bisogna anche dire che attualmente la conoscenza del genoma di *Scenedesmus* è piuttosto scarsa e solo il genoma mitocondriale e cloroplastico sono stati sequenziati; un'indagine genomica si prospetta quindi di grande interesse soprattutto per i risultati che potrebbe fornire. Le conoscenze di base acquisite, oltre che concorrere ad una migliore comprensione della fisiologia di queste microalghe, potrebbero fornire degli spunti applicativi per le tecnologie di biorimediazione.

## Capitolo 4

### Materiali e metodi

#### 4.1 Allestimento delle monoculture di *Scenedesmus acutus*

I due ceppi di *Scenedesmus acutus*, rispettivamente Wild-type (Wt) e Cromo tollerante (Cr-t), sono stati gentilmente forniti dal Dipartimento di Scienze Ambientali dell'Università di Parma.

A partire dalle colture “*madri*” dei due ceppi, sono state allestite delle subcolture inoculando 1,6 ml di coltura madre in 40 ml di terreno di coltura standard preparato come indicato in Chiaudani et al., 1978 e riportato in tabella 4. Le subcolture dei due diversi ceppi sono state monitorate in due diverse condizioni di crescita: in fitotrone ad una temperatura di 22°C, con luce di moderata intensità (100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e sotto luce naturale. Partendo dalla stessa quantità di inoculo (circa  $15 \times 10^4$  cel/ml), il tasso di crescita è stato valutato ogni due giorni, prelevando 1ml di coltura e utilizzando per il conteggio una cameretta Sedgewick-Rafter.

SOLUZIONE	ELEMENTO	CONCENTRAZIONE
Soluzione 1:	NaNO <sub>3</sub>	25 g/l H <sub>2</sub> O distillata
Soluzione 2:	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,044 g/l H <sub>2</sub> O distillata
Soluzione 3:	MgCl <sub>2</sub>	12,17 g/l H <sub>2</sub> O distillata
Soluzione 4:	MgSO <sub>4</sub>	14,7 g/l H <sub>2</sub> O distillata
Soluzione 5:	CaCl <sub>2</sub>	4,41 g/l H <sub>2</sub> O distillata
Soluzione 6:	NaHCO <sub>3</sub>	15,0 g/l H <sub>2</sub> O distillata
Soluzione 7:	FeCl <sub>3</sub>	96, 0 mg/l H <sub>2</sub> O distillata
	Na <sub>2</sub> EDTA	300 mg/l H <sub>2</sub> O distillata
Soluzione 8:	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	185, 52 mg/l H <sub>2</sub> O distillata
	MnCl <sub>2</sub>	264,26 mg/l H <sub>2</sub> O distillata
	ZnCl <sub>2</sub>	3,271 mg/l H <sub>2</sub> O distillata
	CoCl <sub>2</sub>	0,78 mg/l H <sub>2</sub> O distillata
	CuCl <sub>2</sub>	0,011 mg/l H <sub>2</sub> O distillata
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	7,26 mg/l H <sub>2</sub> O distillata

Tabella 4. Composizione del terreno di crescita di *Scenedesmus acutus*

I test di tossicità sono stati effettuati su entrambe i ceppi, trattando le subcolture per 72 ore a concentrazioni di 1mg/l di Cr (VI) e di 2mg/l di Cr (VI).

I ceppi e i relativi trattamenti sono indicati come di seguito riportato:

- ceppo Wt senza trattamenti, CN;
- ceppo Cr-t senza trattamenti, CT;
- ceppo Wt trattato con 1mg/l di Cr (VI), N1;
- ceppo Wt trattato con 2mg/l di Cr (VI), N2;
- ceppo Cr-t trattato con 1mg/l di Cr (VI), T1;
- ceppo Cr-t trattato con 2mg/l di Cr (VI), T2.

#### **4.2 Preparazione dei campioni per l'analisi al TEM**

Per l'analisi ultrastrutturale al TEM, 50 ml di coltura di *S. acutus* prelevati all'ottavo giorno (corrispondente alla fase esponenziale di crescita), vengono sottoposti a centrifugazione a 3000 rpm per 15 minuti. Dopo aver eliminato il sovrnatante, il sedimento viene ricentrifugato a 7000 rpm per 5 minuti. A questo punto si rimuove nuovamente il sovrnatante, facendo attenzione a non smuovere il sedimento. Le alghe raccolte vengono fissate con 1 ml di una miscela di paraformaldeide al 4% e 50 µl di glutaraldeide al 3%, per quattro ore in camera fredda, sottoposte ad una blanda agitazione. Si effettua poi una centrifugazione a 7000 rpm per 4 minuti aggiungendo 2 ml di PBS 0,1M; si rimuove il sovrnatante e il pellet viene post-fissato in 1 ml di tetrossido di osmio per un'ora. Si procede con la disidratazione tramite una serie di lavaggi di 10 minuti in soluzioni di acetone a percentuale crescente (30, 50, 70, 90%) e con ulteriori tre lavaggi da 10 minuti in acetone al 100%. A questo punto si prosegue con l'infiltrazione graduale dei campioni in resina LR-White ed etanolo, e con incubazioni di 24 ore ognuna. I rapporti etanolo/resina sono rispettivamente di 3:1, 3:2, 1:1 fino ad arrivare all'infiltrazione in resina pura; dopo un ulteriore cambio di resina

pura, i campioni si lasciano polimerizzare, dopo aggiunta di catalizzatore, a 55°C per 24 ore.

Sezioni ultrafini di 60 nm sono state ottenute con l'ultramicrotomo Leica Ultra Cut UCT; le sezioni, poste su retini per microscopia elettronica, sono state metallizzate con grafite e successivamente osservate al microscopio elettronico a trasmissione Zeiss EM 900.

In parallelo, aliquote di coltura fresca dei ceppi wt (CN), Cr-t (CT) e dopo trattamento con Cr VI (1mg/l e 2mg/l), sono state filtrate con applicazione di vuoto leggero su filtri di policarbonato e processate per l'analisi al SEM ambientale e per l'analisi in spettrometria di massa ICP-MS, al fine di quantificare il Cr totale intracellulare. Per queste procedure ci si è avvalsi della gentile collaborazione dei colleghi del Laboratorio di Spettrometria di Massa ICP-MS del Dipartimento DiBest dell'UNICAL.

### **4.3 Immunolocalizzazione della 5-metil-citosina**

La reazione di immunolocalizzazione si basa sulla formazione di un complesso antigene-anticorpo che permette di localizzare la 5-metilcitosina a livello nucleare. Sui nostri campioni abbiamo verificato due diversi tipi di immunolocalizzazione: i) immunofluorescenza su cellula intera; ii) immunogold su sezioni ultrafini.

#### **4.3.1 Immunofluorescenza**

L'immunofluorescenza si basa sull'uso di anticorpi (Ab) coniugati a molecole reporter fluorescenti. Nel nostro caso un anticorpo secondario anti-mouse (che riconosce l'anticorpo primario anti-anti5metCyt) è coniugato al fluoroforo FITC. L'immunofluorescenza applicata su cellula intera, ha richiesto una preliminare digestione e/o allentamento della parete cellulare, per migliorare la penetrazione dell'Ab primario anti5metCyt. La parete cellulare di *S. acutus*, così come quella di molti altri membri della Chlorococcales, è una parete piuttosto spessa, con un cospicuo strato pectico, necessario per l'adesione delle cellule dei cenobi.



Prima delle fasi di immunolocalizzazione, le cellule sono state raccolte dal brodo di coltura, testando due diverse metodologie: i) raccolta per filtraggio e successiva fissazione su filtro; ii) raccolta per centrifugazione e fissazione in eppendorf.

Nel primo caso, 1 ml di coltura in fase esponenziale di crescita, viene fissato con 10 ml di paraformaldeide al 4% in PBS 10X per 1h. Lavato il fissativo, si aggiungono 2 ml di Enzyme Solution 1X (in cui sono presenti maceroenzima, pectoliasi e pectinasi) e si incuba a 37 °C per 1 h. Si inattivano poi gli enzimi a 90 °C per qualche minuto per poi lavare con 3 ml di PBS 10X per 3' per 2 volte. Si disidrata poi con 3 passaggi di 3' ognuno con etanolo al 70%, 95%, 99%. Ad ogni passaggio la componente liquida viene eliminata attraverso un sistema di filtraggio. A questo punto il filtro viene lasciato asciugare per qualche minuto sotto cappa prima delle fasi successive di immunolocalizzazione.

Nel seconda modalità di raccolta, 10 ml di coltura in fase esponenziale vengono centrifugati a 2500 rpm per 10' a 24 °C. I passaggi su descritti vengono fatti allo stesso modo, lavorando in provetta con il sedimento che viene di volta in volta raccolto attraverso successive centrifugate. Questa modalità porta ad una scarsa resa di materiale, pertanto la prima metodica di raccolta su filtro, risultata più vantaggiosa, è stata quella estesamente adottata.

Una volta digerita la parete, il filtro viene incubato in una soluzione di DMSO 0,5% in PBS 10X per 15' a temperatura ambiente, per diminuire l'autofluorescenza delle cellule; segue un' incubazione in BSA all'1% in PBS 0,1 M a pH 7,4 per 15' a temperatura ambiente. L'Ab primario anti-5mCyt (Aurion) viene diluito 1:50 in soluzione A (PBS 0,1M, 1% BSA, 0,1% Twin 20 a PH 7.4); il filtro viene quindi incubato per 2h in camera umida a temperatura ambiente. Seguono due lavaggi in soluzione A per 15' e quindi viene applicato l'Ab secondario (coniugato con fluoresceina tiocianato- FITC) diluito 1:25 in soluzione A con incubazione per 1h. Le fasi successive, eseguite in condizioni di bassa luce per evitare l'eccitazione e il decadimento del fluorocromo, consistono in: due lavaggi in PBS 10X per 3'; due lavaggi in H<sub>2</sub>O, ognuno di 3'. Il filtro e viene posto su vetrino e montato con Citifluor, controcolorato con DAPI (concentrazione finale 1µg/ml) e osservato al microscopio ottico a fluorescenza Leica DFC 490, corredato di filtri di eccitazione e di sbarramento specifici rispettivamente per Dapi e FITC.

### 4.3.2 Immunogold

La tecnica dell'Immunogold utilizza anticorpi coniugati a particelle sferiche di oro colloidale (diametro di 10 nm); gli Ab, una volta legati agli antigeni specifici, possono essere rilevati in microscopia ottica (attraverso una reazione redox che coinvolge le particelle d'oro) o in microscopia elettronica, dove l'oro si rileva come spot elettrondenso. L'anticorpo primario, così come nell'immunofluorescenza, è diretto contro la 5-metil-citosina ed è accoppiato all'anticorpo secondario, che riconosce un epitopo del primario, coniugato con le particelle d'oro. La posizione delle particelle è direttamente rilevabile al microscopio elettronico a trasmissione (TEM), poiché l'oro è opaco agli elettroni e forma, quindi, un'ombra scura sull'immagine del campione (Beninati – Tecniche istologiche).

Per gli esperimenti di immunolocalizzazione, le cellule di *S. acutus* vengono raccolte e incluse seguendo le stesse procedure di preparazione dei campioni per l'analisi ultrastrutturale al TEM, omettendo però il passaggio di post-fissazione in tetrossido di osmio, reagente che maschera gli antigeni che legano l'anticorpo. Si effettuano così direttamente ai lavaggi in acetone e si continua fino all'inclusione in resina come già riportato.

Preparati i retini con le sezioni ultrafini (60 nm) essi vengono processati per l'immunolocalizzazione. I retini vengono posti per 20' in una soluzione di glicina 0,05 M in PBS 0,1M; si procede poi all'inattivazione dei siti aspecifici tramite una soluzione di BSA al 5% in PBS 0,1M a pH 7.4 per 15'. Seguono 3 lavaggi di 5' ciascuno in un tampone di incubazione (PBS 10 mM, NaCl 150 mM, BSA 0,2%, NaN<sub>3</sub> 20 mM in H<sub>2</sub>O); viene quindi applicato l'anticorpo primario anti-5-metil-citosina testando due diverse diluizioni (1:80 e 1:50 in tampone di incubazione) e incubando a 4°C per tutta la notte. Gli anticorpi non legati vengono lavati con buffer di incubazione (6 lavaggi per 5' ognuno). Per la rilevazione del legame antigene-anticorpo, è stato usato un anticorpo secondario antimouse coniugato con particelle di oro (Aurion) usato a due diverse diluizioni, rispettivamente 1:50 e 1:10. L'incubazione viene fatta a temperatura ambiente per 2h. Si effettuano nuovamente 6 lavaggi della durata di 5' con buffer di incubazione ai quali seguono 3 lavaggi della stessa durata con PBS. Infine si effettua una post-fissazione con gluteraldeide al 2% in PBS per 10' e si effettua un ultimo lavaggio con PBS per 5'.

Dopo metallizzazione dei retini si procede all'analisi al TEM (Zeiss EM 900).

#### **4.3.3 Acquisizione e analisi dei dati tramite software informatici**

I parametri morfologici nucleari (area nucleo, aree etero/eu-cromatiche, numero e posizione degli spots corrispondenti ai siti metilati) sono stati rilevati e elaborati dal punto di vista statistico attraverso software informatici. Per ogni retino, sono state acquisite 15 immagini per un totale di 90 fotografie. Per l'acquisizione dei dati è stato utilizzato il programma informatico ImageJ.

Per ogni campione (Wt, Cr-t e corrispettivi trattamenti) sono state rilevate e stimate le superfici rispettivamente, nucleare totale e della frazione eu- ed eterocromatica. I parametri sono stati poi riportati come valore medio ( $\pm$  E.S.) e l'eucromatina e l'eterocromatina, espressa in percentuale rispetto alla superficie nucleare.

L'analisi quantitativa dei siti metilati è stata realizzata tramite conteggio della marcatura (numero degli spots) e rilevando anche se la localizzazione fosse su zone etero- o eucromatiche. Il valore è stato quindi espresso rispetto alla superficie misurata (densità di marcatura) in modo da pervenire ad un'analisi quali/quantitativa più precisa. I dati relativi alle misure dell'area nucleare, della marcatura e della densità ed il diametro cellulare sono stati raccolti ed organizzati in tabelle tramite l'utilizzo del software Microsoft Excel e successivamente elaborati in grafico attraverso l'utilizzo dell'apposito programma GraphPad Prism.

I risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica attraverso il test ANOVA (Bonferroni test  $P < 0.05$ ) ad una via, per validarne la significatività.

#### **4.4 Estrazione degli acidi nucleici**

L'estrazione del DNA genomico è stata effettuata su cellule algali sedimentate attraverso centrifugazione. Per la raccolta delle cellule, le subcolture vengono trasferite in tubi Falcon e centrifugate a 3000 rpm a 4 °C per 10 minuti, in aliquote successive di 10 ml, rimuovendo il surnatante e aggiungendo altra coltura. Alla fine il pellet viene pestellato aggiungendo azoto liquido. Per l'estrazione del DNA, lavorando in Eppendorff, al pellet si aggiunge 1 ml di buffer CTAB e 20  $\mu$ l di  $\beta$ -mercaptoetanololo, si

miscela con l'aiuto di un vortex e si lascia incubare per 1h a 65 °C agitando ogni 15 minuti.

Si aggiungono poi 980 µl di cloroformio/alcool isoamilico (in rapporto 24/1) e si miscela prima di centrifugare a 13000 rpm per 20 minutia, sempre a 4 °C . Al surnatante vengono poi aggiunti 700 µl di isopropanolo freddo e si trasferisce a -20 °C per almeno 20 minuti (fino a 24 ore) in modo da far precipitare il DNA. Si centrifuga poi a 13000 rpm a 4 °C per 20 minuti, si sversa il sovrnatante e si aggiungono 800 µl di etanolo freddo al 70%; si centrifuga nuovamente per 25 minuti a 13000 rpm a 4 °C. Si sversa tutto il surnatante, si lascia asciugare il pellet e si risospende in 10 µl di acqua RNAsi FREE.

Per l'estrazione dell'RNA, è stato utilizzato il kit *Rneasy Plant Mini Kit* (QUIAGEN®). Dopo aver raccolto le cellule centrifugando le subcolture per 10 minuti a 3000 rpm a 4°C, si pestella vigorosamente il pellet in azoto liquido. A questo punto si aggiungono 450 µl di RTL buffer e si vortexa vigorosamente. Si trasferisce il lisato nella colonnina viola del kit e si centrifuga per 2 minuti alla massima velocità. Si preleva il surnatante, facendo attenzione a non toccare il pellet, e si trasferisce in una nuova eppendorf e si aggiungono 1/2 volume di etanolo assoluto. A questo punto si trasferisce il campione nella colonnina rosa del kit e si centrifuga per 15 secondi alla massima velocità. Si aggiungono 700 µl di RW1 buffer , si centrifuga, si scarta il sovrnatante e si aggiungono 500 µl di RPE, centrifugando per 15 secondi alla massima velocità. Dopo un ulteriore lavaggio, si centrifuga ulteriormente per disidratare completamente il filtro. Infine si trasferisce la colonna rosa in una eppendorf da 1,5 ml e si risospende il campione con 30 µl di acqua RNAsi-free.

Per digerire il DNA eventualmente presente nell'estratto di RNA, si prepara una miscela come riportato nella tabella 5.

Digestione DNA
28,5 µl di RNA estratto
5 µl di Buffer
0,5 µl di DNAsi
0,25 µl di RNAsi inibitor
15,75 µl di H <sub>2</sub> O
50 µl Volume Finale

Tabella 5. Mix di reazione per la digestione del DNA

La mix viene incubata per 30 minuti a 37°C dopodiché si stoppa la reazione grazie all'aggiunta di 1/10 di volume di Acetato di Sodio (10mM) e 2 volumi di Etanolo assoluto. Successivamente il campione viene lasciato overnight a -20°C. Successivamente si centrifuga per 30 minuti a 13000 rpm a 4°C, si elimina il surnatante e si aggiunge 1 ml di etanolo al 70%; si ricentrifuga, si fa asciugare il pellet, e si risospende l'RNA purificato con 25 µl di acqua RNAsi FREE. Per verificare la positività dell'estrazione, 1/10 del volume viene caricato su gel di agarosio allo 0,8 % e sottoposto a corsa elettroforetica. La quantificazione del DNA/RNA estratto viene quindi effettuata mediante lo strumento *NanoDrop ND1000 UV-Vis Spectrophotometer*.

#### 4.4.1 Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA

La retrotrascrizione è quella reazione che consente di ottenere, a partire da un filamento stampo di RNA, una molecola di DNA ad esso complementare (cDNA). L'enzima trascrittasi inversa, necessita di una breve sequenza nucleotidica d'innescio (primer). Sfruttando la caratteristica dell'RNA messaggero di possedere una coda di circa 150–200 adenine (poliA) all'estremità 3', è possibile utilizzare come innescio un oligonucleotide costituito da una catena di timine (oligodT) complementari alle adenine presenti nel messaggero.

Per la retrotrascrizione dell'RNA è stato utilizzato il Kit *iScript Synthesis* fornito dalla ditta *BIO RAD*®.

La mix di reazione è descritta nella tabella seguente (Tab. 6).

Retrotrascrizione RNA
x µl di RNA (0,25 µg)
4 µl di Buffer 5x ( <i>iScript reaction mix</i> )
1 µl di trascrittasi ( <i>iScript reverse transcriptase</i> )
x µl di H <sub>2</sub> O sterile
20 µl Volume Finale

Tabella 6. Mix di reazione per la retrotrascrizione

Preparata la mix di reazione, il campione viene incubato a 25°C per 5 minuti, poi 42°C per 30 minuti e infine a 85°C per 5 minuti. Il cDNA ottenuto viene quantizzato con lo strumento *NanoDrop ND1000 UV-Vis Spectrophotometer*.

## 4.5 PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una metodica che permette l'amplificazione esponenziale in vitro di una determinata sequenza di DNA, sfruttando l'attività di sintesi della Taq polimerasi, estratta dal batterio *Thermophilus aquaticus*. È necessario che le estremità della sequenza da amplificare siano conosciute con sufficiente precisione per poter sintetizzare degli oligonucleotidi (*primers* senso e antisenso) che saranno ibridizzati alla sequenza stessa da sintetizzare e da cui saranno aggiunti via via i dNTP dall'enzima.

Al fine di isolare sequenze codificanti per putative metallothioneine (Mts) in *S. acutus*, abbiamo usato i primers riportati in tabella 7. In una prima fase, dato la mancanza di sequenze omologhe nel genere *Scenedesmus* e in generale di Mts nelle alghe verdi, e vista la relativa vicinanza filogenetica delle Chlorophyta con le piante, abbiamo usato primers degenerati disegnati per il genere *Silene* che erano risultati idonei per l'identificazione di una Mts di tipo 2 in *S. nicaensis* (Cozza et al., 2013).

Successivamente, sono stati disegnati e usati una nuova coppia di primers (Tab. 7) analizzando le sequenze di una ipotetica MT-like isolata in *Chlorella vulgaris* (MtChv) e di una ipotetica proteina tesmina, MT-like, isolata in *Chlamydomonas reinhardtii* (Tes). Le tesmine sono proteine coinvolte nel processo di spermatogenesi e presentano dei domini conservati, ricchi di Cisteine, che ci permettono di classificarle come MT-like (Sugihara et al., 1999; Andersen et al., 2007).

Primer	Sequenze
FW SnMT2	(5'-CGTGCTGTAATGGAAATTGTG-3')
BW SnMT2	(3'-GGTGCAAGGGTTGCACTGGC-5')
FW MtChv	(5'-ATGAAGGACACGCAGTGTGC-3')
BW MtChv	(3'-GCTGGTGCAGTCAGTGTGC-5')
FW Tes	(5'-TACTGCGARTGCTTTGCKTC-3')
BW Tes	(3'-CTGGAAGCACTCGCARTAC-5')

Tab. 7 Coppie di primers utilizzati su *Scenedesmus acutus* per isolamento MTs

L'amplificazione viene effettuata a specifiche temperature, ciascuna delle quali rappresenta una fase fondamentale:

□ *denaturazione*: trattamento del DNA ad alte temperature (94-95°C) al fine di separare le due catene di DNA, rendendo possibile l'accesso dei primers al filamento complementare;

□ *appaiamento*: i primers si appaiano alla sequenza complementare. La temperatura utilizzata in questo caso viene scelta in base alla temperatura di melting, cioè la

temperatura massima oltre la quale il primer si denatura e perde la capacità di appaiarsi in modo specifico alla sequenza di cDNA;

□ *estensione*: la Taq polimerasi sintetizza il filamento complementare al DNA stampo a partire dai due primers. La temperatura è di 72°C.

Nella tabella seguente (Tab. 8) viene descritta la mix dei reagenti per l'amplificazione del DNA.

PCR
10 µl di Buffer 5x (green GoTaq)
2 µl di template
1,5 µl Primer FW 10 µM
1,5 µl Primer BW 10 µM
1 µl di dNTPs
1 µl di Taq
50 µl volume finale

Tabella 8. Mix reagenti PCR

#### 4.6 PCR touch-down

Nell'utilizzo coppia di primers MtChv, abbiamo applicato la PCR touch-down. La tecnica "touch-down" consiste nel fare i primi cicli di PCR con una temperatura di annealing elevata per poi diminuire la temperatura di mezzo grado ogni ciclo, fino a stabilizzarsi su una temperatura "ottimale" per gli ultimi cicli (Don et al., 1991; Pratyush et al., 2012). Questo permette di migliorare i prodotti di PCR, soprattutto laddove compaiono bande spurie dovute ad appaiamenti aspecifici interni o esterni alle zone di innesco dei primer sul DNA target.

Questi prodotti alternativi spesso prevalgono sui prodotti di reazione, essendo dovuti ad amplificazioni casuali durante i cicli di PCR. Tali problematiche aumentano col numero dei cicli e si verificano spesso se il template target è presente in piccole concentrazioni, come nel nostro caso. Presumendo che le amplificazioni aspecifiche siano meno stabili rispetto a quelle specifiche, modifiche sulla concentrazione di  $Mg^{++}$  utilizzata nella reazione o l'aumento della temperatura di annealing, possono essere alcune delle accortezze adottate per risolvere tali problemi.

#### 4.7 Valutazione dei prodotti di PCR: elettroforesi su gel d'agarosio

Durante l'elettroforesi, grazie alla presenza dei gruppi fosfato ( $PO_4^{3-}$ ), le molecole di DNA ad alta carica negativa migrano verso l'anodo se sottoposte all'azione di un

opportuno campo elettrico (Fig. 9). Per eseguire la separazione elettroforetica di acidi nucleici, è necessario preparare un gel d'agarosio in tampone TBE (Tris-Borato-EDTA), alla concentrazione opportuna, con l'aggiunta di etidio bromuro, agente intercalante indispensabile per visualizzare il DNA durante la corsa elettroforetica.

L'etidio bromuro infatti, se stimolato da raggi ultravioletti (260-360 nm), emette fluorescenza arancione sulla frequenza dei 560 nm, pertanto è possibile illuminare il gel ad un transilluminatore, visualizzando i diversi campioni caricati. Le maglie reticolate del gel, permettono il passaggio di molecole di ugual dimensione o più piccole, rallentando il cammino delle molecole di dimensione maggiori. La misura delle maglie è direttamente proporzionale alla concentrazione iniziale d'agarosio.

Nel caricare campioni da PCR, non si usa nessun colorante, in quanto viene utilizzato quello presente nella reazione stessa; diversamente, quando si vanno a saggiare altri campioni, prima di essere caricati, ad essi viene aggiunto il blu di bromofenolo, un colorante che permette di seguire meglio il caricamento del campione stesso, fungendo da marker del fronte di migrazione. Inoltre, per poter stabilire la lunghezza dei frammenti di DNA in studio, si confrontano i campioni con uno specifico standard di riferimento costituito da una serie di frammenti di DNA di lunghezza, tecnicamente chiamato *ladder*.

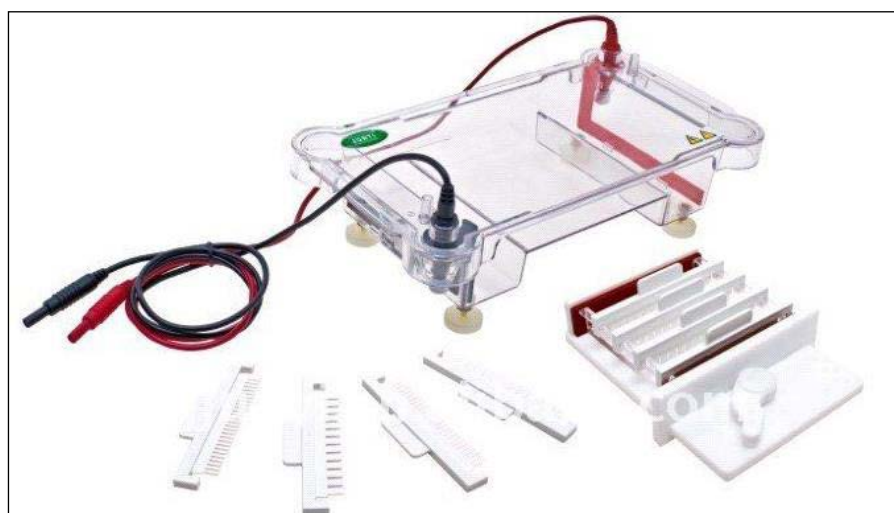


Figura 9. Camera elettroforetica per la corsa orizzontale



#### 4.8 Quantizzazione dei campioni

La quantificazione di DNA, RNA, cDNA e campioni purificati da gel, viene effettuata mediante lo strumento *NanoDrop ND1000 UV-Vis Spectrophotometer* (Fig. 10).

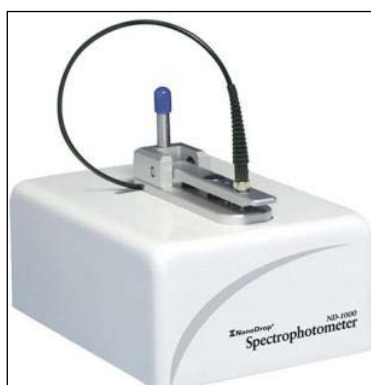


Figura 10. NanoDrop ND1000 UV-Vis Spectrophotometer

Lo strumento utilizza una tecnologia basata sulla tensione superficiale che piccoli volumi di liquidi esercitano quando si trovano collocati tra due superfici vicine; in tal modo una goccia di campione (1-1,5  $\mu$ l) posta sull'apposita piastra di lettura crea una colonna di liquido a diretto contatto con due fibre ottiche e può essere analizzata in modo semplice e veloce. Lo strumento esegue automaticamente la lettura del campione a 260 – 280 – 230 nm di lunghezza d'onda, ne calcola la concentrazione e i relativi rapporti per determinare il grado di purezza del campione analizzato. Un rapporto tra la densità ottica a 260 nm e 280 nm maggiore o uguale a 1.8, indica che l'estrazione del DNA è stata ben eseguita poiché abbiamo un buon rapporto tra DNA estratto e proteine che lo accompagnano. Un altro indice di purezza del campione è il rapporto tra le densità ottiche 260 e 230, che dovrebbe essere compreso tra 1.8 e 2.3 (Fig. 11).

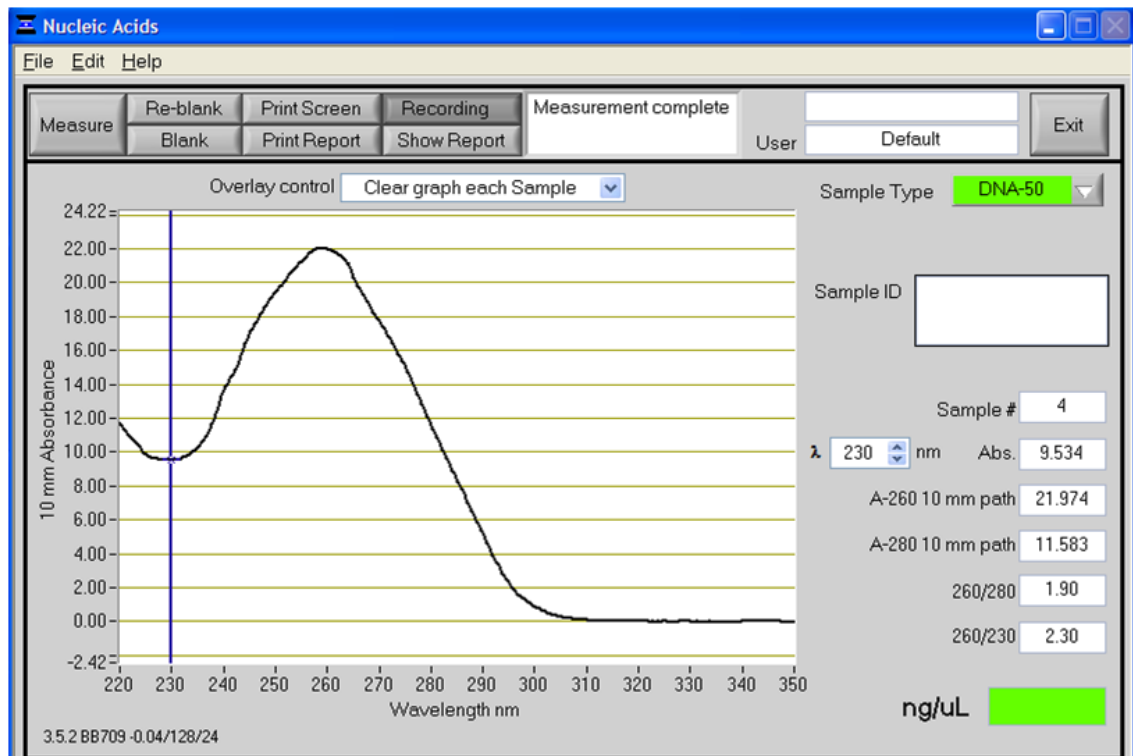


Figura 11. Esempio di quantizzazione con NanoDrop ND1000

#### 4.9 Purificazione dei campioni da gel d'agarosio

I frammenti amplificati di interesse, al termine della corsa elettroforetica, vanno estratti e purificati per verificarne la sequenza attraverso clonaggio in vettori plasmidici e sequenziamento. A questo scopo è stato utilizzato il kit *QIAquick Gel Extraction*.

Si taglia la banda di interesse dal gel con l'aiuto di un bisturi, cercando di essere quanto più possibile precisi. Si trasferisce quindi il frammento di gel in una eppendorf, lo si pesa e si aggiungono 3 volumi di buffer QG. Fatto ciò si lascia incubare a 50°C per 10 minuti, agitando ogni 2-3 minuti vigorosamente fino al completo scioglimento dell'agarosio. Successivamente si aggiunge 1 volume di isopropanolo, si mescola e si trasferisce la soluzione nella colonnina fornita dal kit *QIAquick*. Si centrifuga quindi per 1 minuto alla massima velocità e si elimina lo scarto presente nella colonnina di raccolta. In questa fase il DNA si lega alla membrana della colonnina. Si aggiungono altri 500 µl di buffer QG, si ricentrifuga e si elimina nuovamente lo scarto. Si aggiungono 750 µl di buffer PE e si centrifuga per 1 minuto alla massima velocità. Per rimuovere tutti i residui di etanolo dalla colonnina viene fatta una ulteriore centrifuga a vuoto. Si eluisce il DNA con 30 µl di buffer EB, centrifugando sempre per 1 minuto alla

massima velocità. La resa della purificazione viene valutata attraverso la quantizzazione al Nanodrop e visualizzata tramite una nuova corsa elettroforetica su gel d'agarosio.

#### **4.10 Sequenziamento**

Il sequenziamento del DNA è stato affidato al *Laboratorio Genechron* - C.R. ENEA (Roma). Il campione viene lavorato dall'analizzatore ABI3730 (48 capillari) basato sulla metodica di Sanger modificata per il *cycle sequencing*. La novità consiste nella marcatura dei ddNTP con fluorocromi di colore diverso per ogni singolo nucleotide: ogni volta che un ddNTP viene incorporato in una catena nascente di un acido nucleico, la polimerizzazione si arresta, ma in questo caso, anziché allestire 4 reazioni, i ddNTP sono distinguibili in base al diverso colore, per cui è possibile effettuare una singola reazione. I fluorocromi emettono fluorescenza a una specifica lunghezza d'onda che viene identificata da un sensore in seguito all'emissione di un raggio laser; successivamente questa informazione viene elaborata da un computer e convertita in un elettroferogramma. La tecnica di sequenziamento utilizzata non prevede l'allestimento del gel di sequenza in quanto sfrutta il principio dell'elettroforesi capillare: la separazione delle molecole di DNA è effettuata mediante un capillare di diametro estremamente ridotto alle cui estremità viene applicato un certo voltaggio che consente il movimento delle molecole nella soluzione. In prossimità del catodo le molecole attraversano una finestra all'interno della quale vengono rilevate da un raggio. Il segnale è inviato ad un registratore e quindi ad un computer.

Sono state inviate 6 repliche per ogni campione, per un totale di 24 repliche. I primer, utilizzati come innesco della reazione, sono T7 e Sp6, scelti poichè complementari, a monte e a valle, del frammento del DNA esogeno da cui si vuole ottenere la sequenza.

Il laboratorio sopracitato invia le sequenze ottenute sia in formato testo, sia in formato *.ab1*. I files in quest'ultimo formato possono essere aperti con una serie di programmi *open source* disponibili sul Web, tra cui *Chromas – Technelysium*, utilizzato per questo lavoro.

## Capitolo 5

### Risultati e discussione

#### 5.1 Allestimento delle colture

Il monitoraggio della crescita delle subcolture dei due diversi ceppi di *S. acutus*, tenute sia in fitotrone che in luce naturale, mostra delle curve di crescita leggermente diverse (Graf. 1-2). Nel fitotrone le subcolture raggiungono una maggiore densità e la fase esponenziale viene raggiunta tra il 2° e 10° giorno, con lievi differenze nella densità tra i due ceppi (Graf. 1-2).

Individuate le idonee condizioni di crescita, per tutte le procedure sperimentali riportate, i campioni sono stati prelevati in fase esponenziale da colture tenute in fitotrone.

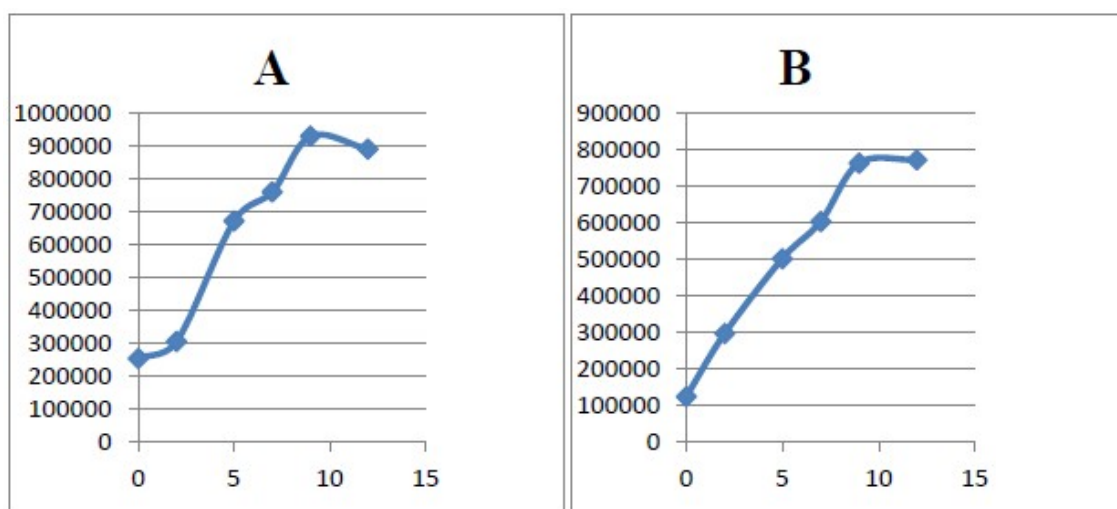


Grafico 1. Curva di crescita delle cellule Wt (A) e Crt (B) monitorate in un arco di tempo di 15 giorni, cresciute nel fitotrone ad una temperatura di 22 °C e intensità luminosa di 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

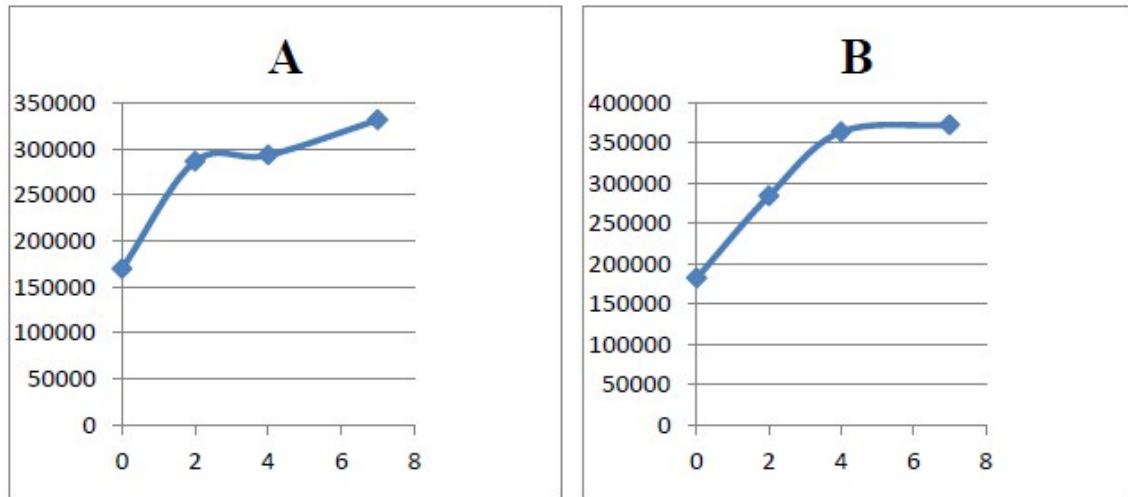


Grafico 2. Curva di crescita delle cellule Wt (A) e Cr-t (B) monitorate in un arco di tempo di 8 giorni, cresciute in luce naturale.

## 5.2 Analisi morfologica

L'osservazione delle cellule di *S. acutus* effettuata in microscopio a luce trasmessa, ha rilevato delle differenze significative per quanto riguarda le dimensioni cellulari, differenze che si accentuano dopo i trattamenti per 72h con Cr (VI) (Graf.3, Tav. 1 - 6). La misura del diametro cellulare ha infatti mostrato delle significative differenze sia tra i due ceppi (Wt e Cr-t) che dopo i trattamenti per 72 ore con 1mg/l e 2mg/l di Cr (VI) sia per quanto riguarda il ceppo Wt (N1,N2) che il ceppo Cr-t (T1, T2) (Graf.3;Tav. 3 - 6).

In particolare, il ceppo Wt presenta in media un diametro significativamente maggiore ( $8,8\pm 0,40 \mu\text{m}$ ) se paragonato al ceppo Cr-t ( $7,3\pm 0,27 \mu\text{m}$ ). I trattamenti inducono, in entrambe i ceppi, un aumento del diametro cellulare: alla concentrazione di 1 mg/l di Cr, il ceppo Wt mostra un diametro cellulare di  $10,4\pm 0,54 \mu\text{m}$ , maggiore rispetto al ceppo Cr-t ( $8,5\pm 0,30 \mu\text{m}$ ); il trattamento con 2 mg/l di Cr (VI) induce un ulteriore aumento del diametro in entrambi i ceppi (Wt  $11,8\pm 0,60 \mu\text{m}$ ; Cr-t  $11,4\pm 0,48 \mu\text{m}$ ) (Graf.3). I risultati indicano quindi che il trattamento con Cr, soprattutto la concentrazione di 2 mg/l, induce un precoce e significativo aumento nella larghezza media delle cellule di entrambi i ceppi, più considerevole nel ceppo Cr-t, quando lo si confronta con la situazione basale (Graf, 3; Tav. 3 - 6).

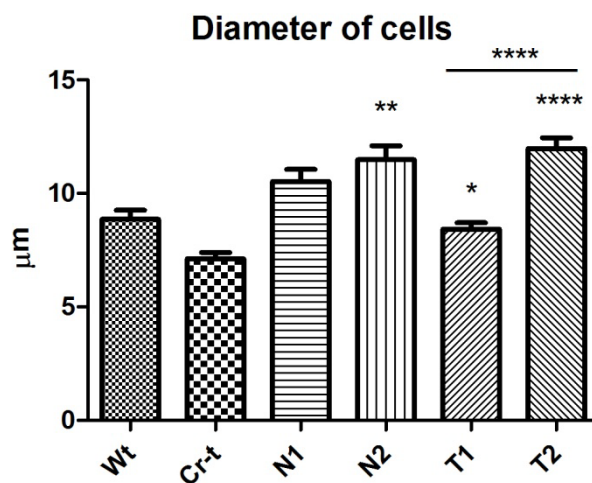


Grafico 3. Diametro cellulare ( $\mu\text{m}$ ) dei ceppi Wt e Cr-t e dopo trattamento con Cr (VI) 1mg/l (N1, T1) e 2mg/l (N2, T2).

La valutazione di parametri di crescita (curva di crescita e tasso di mortalità) a trattamenti più prolungati, riportata in lavori precedenti (Torelli et al., 2008; Gorbi et al., 2006) mostra come il trattamento con 1mg/l di Cr (VI) a 2, 4 e 7 giorni influenzi diversamente il tasso di crescita dei due ceppi. In particolare, la concentrazione di 1 mg/l di Cr (VI), inibiva completamente la crescita del ceppo Wt già dopo 2 giorni di trattamento (Graf. 4); la stessa concentrazione non influenzava invece la crescita del ceppo Cr-t (Graf.4).

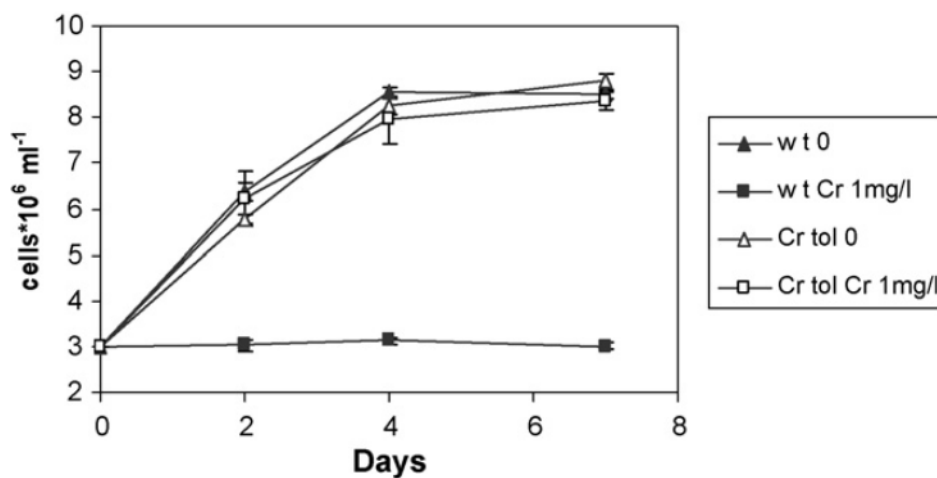


Grafico 4. Curva di crescita dei ceppi Wt e Cr-t e dopo trattamento con 1mg/l di Cr. (Torelli et. al., 2008)

Dopo 7 giorni di trattamento con 1mg/l di Cr (VI), la valutazione del tasso di mortalità cellulare (effettuato con saggio colorimetrico con il blu di metilene) ha mostrato un valore relativamente basso per il Wt (4,7%) se confrontato al Cr-t (8,7%) (Fig. 12). Tale dato è correlabile non tanto al trattamento con il cromo, bensì alla riduzione dei nutrienti causata dalla densità della coltura cellulare che, come precedentemente detto, è più alta nel ceppo Cr-t (tollerante il metallo e che quindi continua a crescere) (Graf. 4).

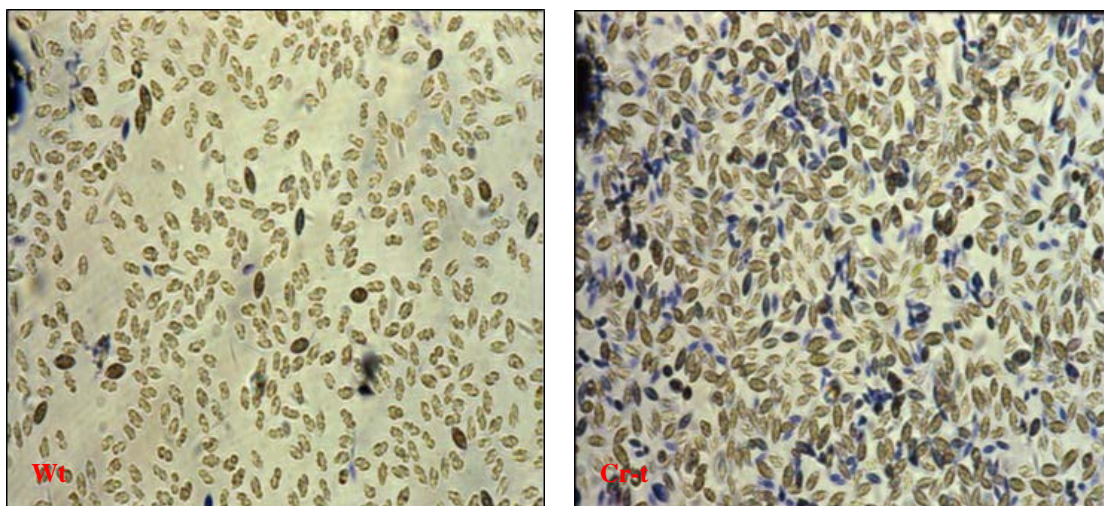


Figura 12. Saggio colorimetrico con il blu di metilene su Wt e Cr-t per valutare il *tasso di mortalità cellulare*.

Le differenze morfologiche nelle dimensioni cellulari tra Wt e Cr-t da noi riscontrate, sono state confermate anche dall'osservazione al SEM che mostra cellule di maggiori dimensioni nel Wt rispetto al Cr-t e soprattutto, la presenza di una cospicua quantità di mucillagine che riveste le cellule (Tav. 7-8). Inoltre, grazie all'utilizzo del detector collegato allo strumento, è stato possibile ottenere l'analisi chimica delle cellule dei due ceppi, che non ha mostrato però differenze negli elementi rilevati (Graf. 5-6).

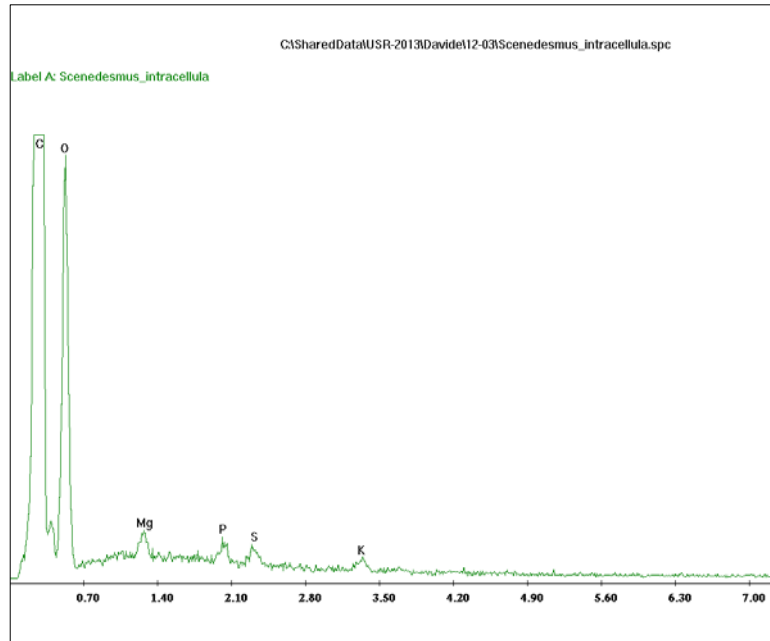


Grafico 5. Analisi chimica ESEM, Wt

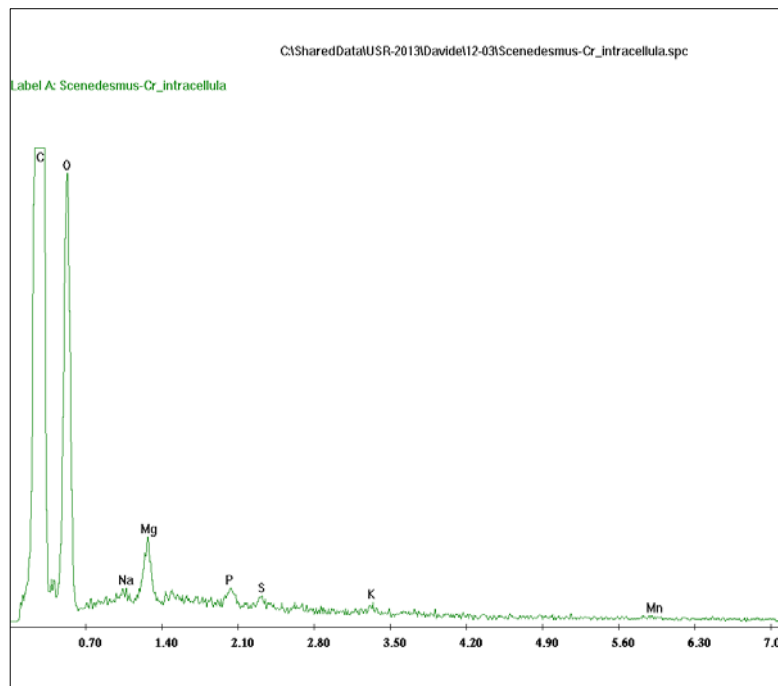


Grafico 6. Analisi chimica ESEM, Cr-t



### 5.3 Analisi ultrastrutturale

L'analisi ultrastrutturale dei due ceppi Wt e Cr-t ha mostrato delle differenze morfologiche significative a carico della parete e del comparto citoplasmatico. In particolare il ceppo Wt rispetto al Cr-t presenta una parete più spessa, stratificata e meno compatta (Tav. 9-10). Nel ceppo Wt sono infatti ben visibili i tre strati di cui è composta la parete cellulare, a partire dall'interno, un primo strato cellulosico, una parete intermedia e uno strato esterno (Tav. 9). L'organello che si evidenzia chiaramente in ogni cellula è il pirenoide (Tav. 11), intraplastidiale, spesso pedunculato, che appare sia bilobato che trilobato, in entrambi i ceppi. Tale organello è centro di fissazione dell'anidride carbonica (con la Rubisco concentrata nella parte scura centrale) e centro di accumulo di amido primario, che appare come una guaina. Nelle cellule è possibile osservare anche l'apparato di Golgi (Tav. 12) con le facce cis e trans ben visibili, deputato a rielaborare, selezionare ed esportare i prodotti cellulari. In alcune cellule si vedono numerosi proplastidi in formazione (Tav. 13), mentre risultano poco presenti strutture vacuolari, fatta eccezione dei granuli di amido (Tav. 14), presenti in grandi quantità. Ben visibili risultano anche mitocondri (Tav. 15) e il cloroplasto spesso a coppa (Tav. 15). È possibile osservare il nucleo che mostra eterocromatina addensata (Tav. 16), presente in alcuni casi anche sulla periferia della membrana nucleare, condizione questa molto variabile da cellula a cellula.

L'osservazione al TEM del ceppo Cr-t evidenzia alcune sostanziali ultrastrutturali rispetto al ceppo Wt. Restano invariate la morfologia del pirenoide così come la struttura di mitocondri e cloroplasti (Tav. 17-18). Diversamente dal Wt troviamo molti vacuoli distribuiti nel citoplasma, mentre sono numericamente inferiori i granuli di amido. Oltre ai vacuoli veri e propri sono presenti anche strutture simili a vescicole, caratteristiche di un citoplasma vescicolato già osservato in letteratura (La Rocca *et al.*, 2009) (Tav. 19-20). Queste differenze osservate sono correlabili alla metallotolleranza, dal momento che sono stati evidenziate anche in caso di trattamenti con il cadmio nell'alga *Chlamydomonas acidophila* (Nishikawa *et al.*, 2003).

Il trattamento con cromo esavalente ha indotto risposte morfologiche diverse nei due ceppi. Le cellule Wt trattate con 1mg/l di Cr (VI), indicate con N1, presentano un parziale distacco del plasmalemma (Tav. 21-22), iniziali lesioni a livello del cloroplasto (Tav. 21-22) e aumento dei granuli di amido (Tav. 21-22); alla stessa concentrazione, le cellule Cr-t (T1), presentano degenerazioni meno accentuate (Tav. 23-24). Questo

accumulo di granuli di amido potrebbe fungere da riserva energetica per la cellula, in risposta al deterioramento degli organuli indotto dai metalli pesanti (Wong et al., 1994). In entrambi i ceppi, ma soprattutto in N1, si rilevano numerose macchie elettrondense a livello dei vacuoli (Tav. 21-22), indicative del legame tra gruppi fosfato e tracce di Cr (Nishikawa et al., 2003; Aguilera et al., 2005).

Il ceppo Wt trattato con 2mg/l di Cr (VI), indicato con N2, presenta le stesse lesioni intracellulari già osservate in N1, ma più accentuate (Tav. 25-26), analogamente a quanto riportato in letteratura per trattamenti con il cadmio (Shanab *et al.*, 2012; La Rocca *et al.*, 2009).

Il trattamento del ceppo Cr-t con 2 mg Cr(VI)/l (T2) induce importanti alterazioni ultrastrutturali. T2 mostra numerose lesioni intracellulari, analogamente a quanto osservato da Shanab et al., (2012) e La Rocca et al., (2009) nei loro studi sugli effetti del cadmio su *Koliella antartica*. Come già osservato in N2, sono presenti prolungamenti nella parete cellulare (Tav. 29), distacco del plasmalemma, degenerazione di citoplasma e di cloroplasti, macchie elettrondense nei vacuoli (Tav. 27-28).

L'analisi del contenuto di Cr totale effettuato mediante IPC-MS, ha evidenziato differenze significative nel contenuto di Cr, sia tra i due ceppi (Wt /Cr-t) che dopo il trattamento a 72 ore con Cr (VI) alle concentrazioni di 1mg/l (N1, T1) e 2mg/l (N2, T2) (Graf. 7). In particolare, il ceppo Wt presenta un maggior contenuto di Cr rispetto al ceppo Cr-t, con concentrazioni quasi doppie del metallo in risposta al trattamento con 1 mg/l di Cr (N1:  $31,25 \pm 0,73$  ppm; T1:  $13,94 \pm 0,78$  ppm) (Graf. 7). Sono invece paragonabili invece i valori di N2 e T2 (Graf. 7).

I dati sulle quantità di Cr sono in accordo con quelli riportati in Gorbi et al. 2002, che ipotizzavano in *Scenedesmus* un meccanismo di esclusione del metallo e/o una sua diversa regolazione nell'up-take realizzata a livello di parete cellulare.

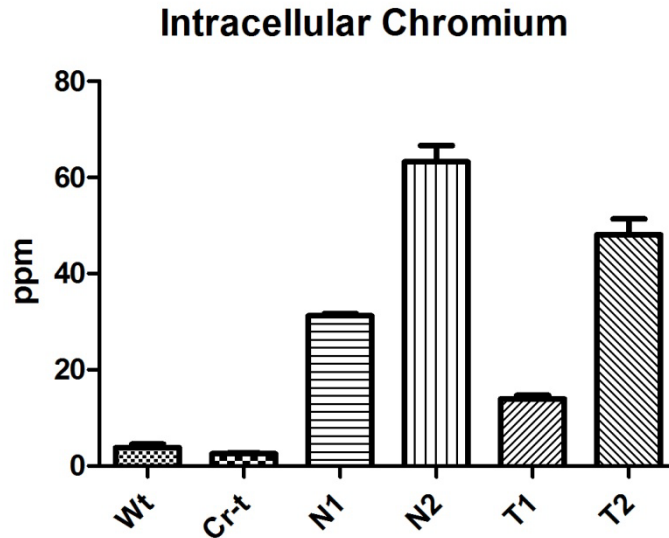


Grafico 7. Contenuto di Cr (ppm) misurato tramite ICP-MS nei ceppi Wt e Cr-t e dopo 72 ore con 1mg/l e 2mg/l di Cr (VI).

Questa ipotesi è supportata dai dati precedenti sulla crescita cellulare che mostrano infatti, che la crescita del ceppo Wild type risulta completamente inibita già in presenza di 1 mg/l di Cr (VI), mentre il ceppo Cr-t continua a proliferare seguendo una curva di crescita paragonabile a quella osservata in assenza di cromo (Torelli et al., 2007). Inoltre, dati molecolari sul mRNA totale, mostrano un diverso pattern di proteine del ceppo Cr-t rispetto al Wt, denunciando l'esistenza di alcune differenze metaboliche costitutive tra le due popolazioni (Corradi et al., 1995). Tuttavia non sono stati trovati ampliconi specificatamente espressi nel ceppo Wt e assenti nel ceppo Cr-t (Torelli et al., 2007).

#### 5.4 Analisi delle aree nucleari

Il confronto morfologico a livello nucleare dei due ceppi ha mostrato come il ceppo Wt non trattato (CN) presenti una superficie nucleare significativamente ridotta rispetto al Cr-t non trattato (CT) e una maggiore frazione eterocromatica. In particolare, la superficie media in CN è dell'ordine di  $783.000 \pm 37.000 \text{ nm}^2$ , di cui il 63% è di tipo eterocromatico e il 37% di tipo eucromatico; nel CT invece la superficie nucleare

media è dell'ordine di  $1.189.000 \pm 91.000 \text{ nm}^2$  con frazione etero- ed eucromatica più o meno equivalente (52% vs 48%). Sia in CN che in CT, l'eterocromatina presenta una distribuzione periferica che diventa a mosaico dopo i trattamenti (Graf. 8, 9; Tav. 32, 33).

Il trattamento con 1mg/l di Cr (VI) sul Wt (N1), induce un forte accrescimento della superficie nucleare, che raggiunge valori più del triplo rispetto a CN ( $2.655.597 \pm 239.000 \text{ nm}^2$ ) e con un marcato aumento della frazione eucromatica, che dal 37% passa al 59%, mentre la frazione eterocromatica si riduce al 41% (Graf. 8).

Il ceppo Cr-t dopo trattamento con 1 mg/l di Cr (VI) (T1), mostra anch'esso un aumento dell'area totale media dei singoli nuclei (da  $1.189.000$  a  $1.782.000 \text{ nm}^2$ ) ma in misura minore rispetto a quello che avviene in N1 e le percentuali dell'eu/eterocromatica si modificano leggermente, passando rispettivamente da 48% e 52% in CT a 58% e 42% in T1 (Graf. 9).

Il trattamento con 2 mg/l di Cr (VI) sul Wt (N2) induce una contrazione della superficie nucleare ( $1.989.672 \text{ nm}^2 \pm 131.000$ ), che resta comunque di dimensioni maggiori rispetto a CN; la superficie occupata dalle aree eucromatiche rispetto a quelle eucromatiche è di entità paragonabile a N1, con una prevalenza di eucromatina (56%) rispetto all'eterocromatina (43%) (Graf. 8).

Il trattamento del Cr-t con 2 mg/l di Cr (VI) (T2), non induce sostanziale variazione della superficie nucleare e della frazione eu/eterocromatica che rimane quasi invariata (57% e 43%) (Graf. 9).

Riassumendo, i trattamenti con Cr VI inducono un aumento delle dimensioni medie del nucleo e un corrispettivo aumento della frazione eucromatica rispetto a quella eterocromatica. Questa variazione è molto marcata nel ceppo Wt dopo il trattamento con la concentrazione di 1mg/l di Cr (VI) (N1); la concentrazione di Cr 2mg/l induce una leggera contrazione nelle dimensioni nucleari in entrambi i ceppi (N2 e T2), senza apportare significative variazioni nel rapporto eu-/etero cromatina (Graf. 8-9). Questo riarrangiamento interno della cromatina può essere alla base di una differente attività trascrizionale in risposta alla presenza del metallo, dato particolarmente evidente nel Wt.

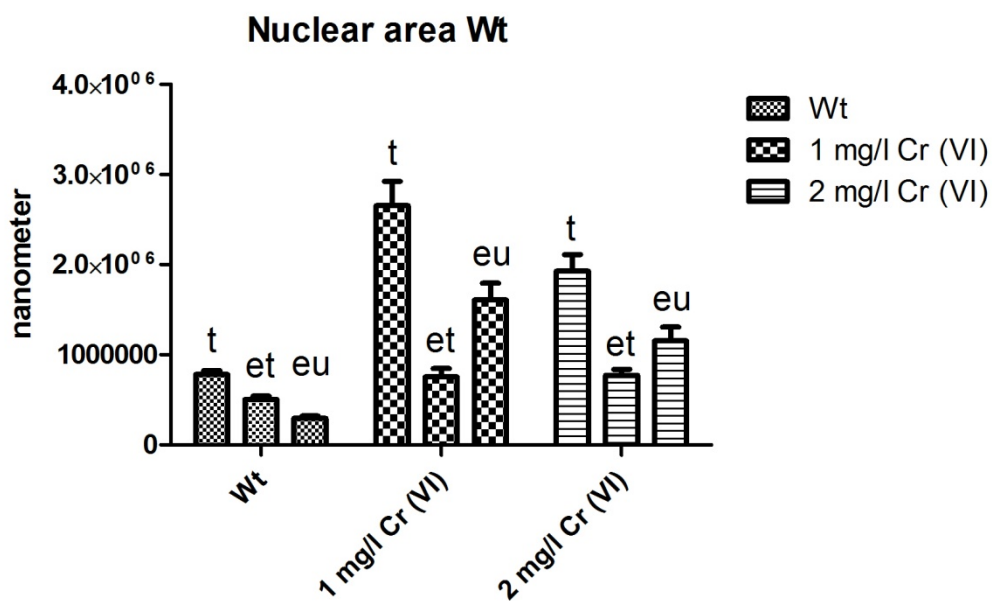


Grafico 8. Superficie nucleare media (nm<sup>2</sup>) nel ceppo Wt non trattato (CN) e dopo trattamento con Cr (VI) 1 mg/l ( N1) e 2 mg/l (N2).

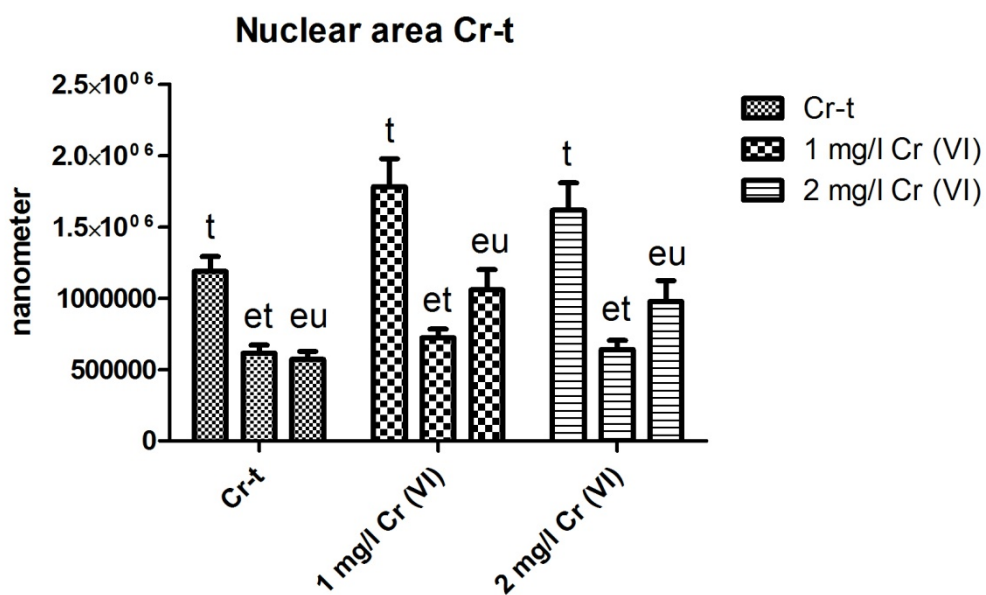


Grafico 9. Superficie nucleare media (nm<sup>2</sup>) nel ceppo Cr-t non trattato (CT) e dopo trattamento con Cr (VI) 1 mg/l ( T1) e 2 mg/l (T2).

## **5.5 Immunolocalizzazione della 5-metil-citosina**

### **5.5.1 Immunofluorescenza**

La localizzazione della 5 metil-citosina attraverso immunofluorescenza, viene rilevata come segnale verde (lunghezza di emissione del FITC, fluorocromo cui è coniugato l'Ab anti-5metilcitina) su uno fondo rosso scuro, dato dall' autofluorescenza delle cellule. Il segnale della marcatura è prevalentemente periferico nel Wt mentre è difficilmente rilevabile nel Cr-t (Tav. 30-31). Ciò fa ipotizzare una scarsa penetrazione dell'Ab, nonostante le fasi di digestione della parete; allo stesso tempo anche l'elevata autofluorescenza e le relative piccole dimensioni dell'organismo potrebbero interferire negativamente coprendo eventuali segnali puntiformi.

Questi problemi sono stati superati usando la tecnica Immunogold, che usa Ab coniugati a particelle d'oro, applicati su sezioni sottili e non su cellule intere.

### **5.5.2 Immunogold**

La marcatura delle particelle d'oro coniugate all'Ab anti-5metilcitidina, rilevata attraverso TEM, ha permesso di effettuare una stima sia qualitativa che quantitativa della distribuzione dei residui di 5-metil-citosina, sia sui ceppi tal quali (Wt e Cr-t) che dopo i trattamenti con Cr VI.

Come per la sezione precedente, CN rappresenta il ceppo Wt non trattato, N1 e N2 si riferiscono alle cellule Wt sottoposte al trattamento rispettivamente con 1mg/l e con 2mg/l di Cr (VI). CT è il ceppo Cr-t, T1 e T2 si riferiscono ai trattamenti con 1 mg/l e 2mg/l di Cr (VI) rispettivamente.

In entrambi i ceppi e in entrambi i trattamenti, la distribuzione della 5-metilcitosina è prevalentemente sulle aree eterocromatiche (Tav. 32-33). Dal momento che l'eterocromatina risulta essere prevalentemente periferica nei ceppi CN e CT non trattati, mentre ha una distribuzione più a mosaico dopo trattamento con Cr (sia in N1, N2 che T1, T2) anche la presenza delle 5-metil-citosine segue questo andamento (Tav. 34-35-36-37).

Pertanto in entrambi i ceppi, il trattamento con Cr (VI) induce un rimodellamento del pattern di metilazione, che da prevalentemente periferico passa a una distribuzione più a mosaico su tutto il nucleo.

Dal punto di vista quantitativo, la quantità di marcatura è stata stimata come densità ed è riferita sia alle rispettive superfici nucleari totali (metilazione totale), sia alle frazioni eu- ed eterocromatiche (metilazione eucromatica; metilazione eterocromatica) (Graf. 10-11). Questa analisi ha rivelato che i nuclei del Wt non trattato (CN), presentano una quantità di citosine metilate molto più elevata rispetto al Cr-t e che il trattamento con Cr (VI), sia a più bassa concentrazione (N1) che a più alta concentrazione (N2), induce una forte de-metilazione soprattutto delle zone eucromatiche dove raggiunge livelli paragonabili a quelli del Cr-t non trattato (CT) (Graf. 10-11). Alternativamente, il ceppo Cr-t che già di partenza è scarsamente metilato, risponde al trattamento T1 (1mg/l Cr VI) con una leggera variazione nella quantità di metilazione, che sembra aumentare ulteriormente con il secondo trattamento T2 (2mg/l Cr VI) a livello sia della frazione eterocromatica che della frazione eucromatica.

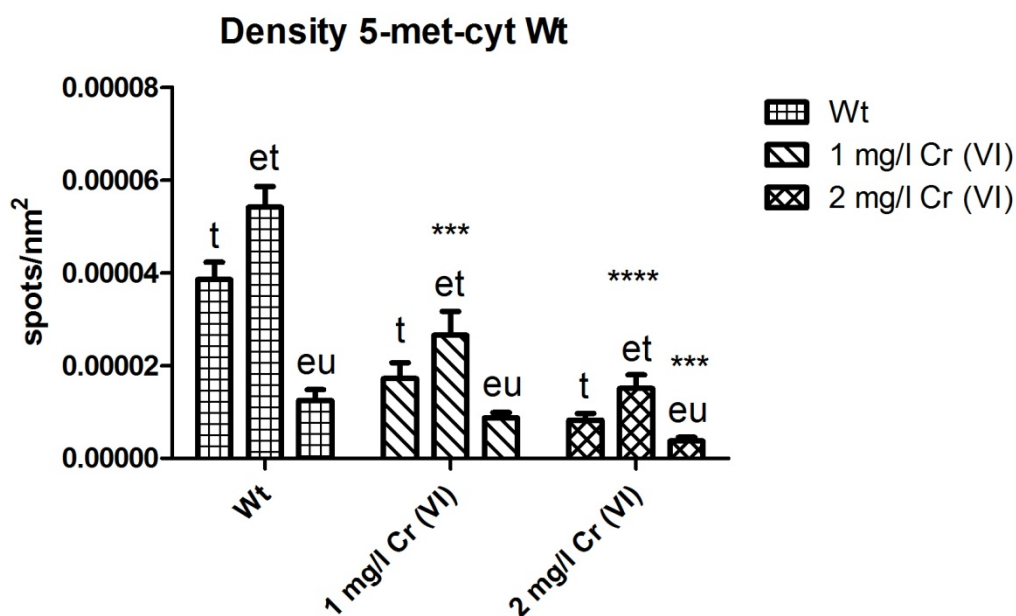


Grafico 10 Distribuzione della 5-met-cyt (densità di marcatura) nel ceppo wild type (Wt) e dopo trattamento con Cr VI.

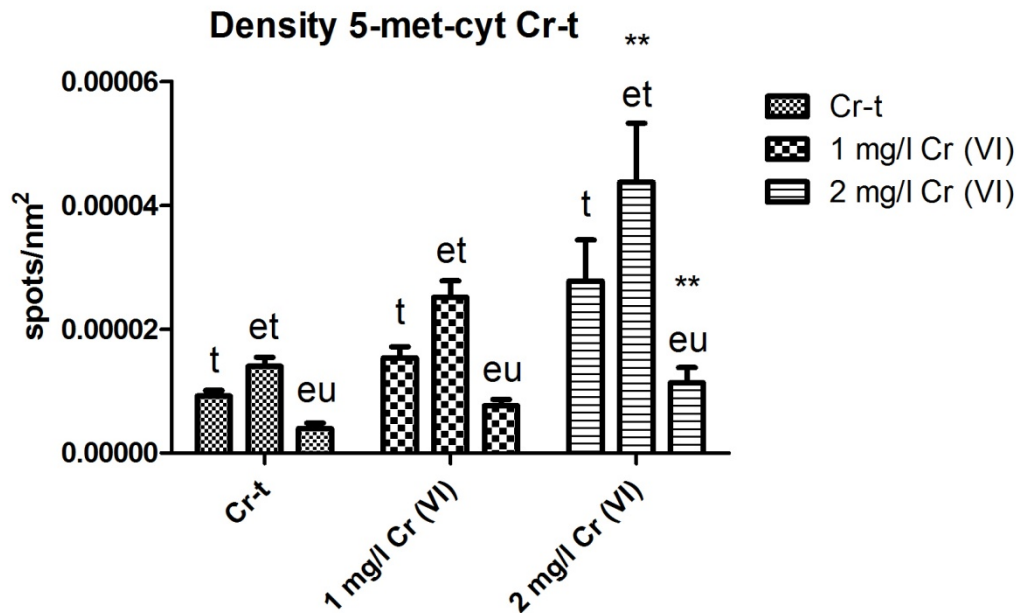


Grafico 11. Distribuzione della 5-met-cyt (densità di marcatura) nel ceppo Cr-tollerante (Cr-t) e dopo trattamento con Cr VI.

In conclusione, i due ceppi mostrano significative differenze sia nel modello di distribuzione delle 5-met-cyt (pattern di metilazione) che nella quantità di metilazione e rispondono diversamente ai trattamenti con il cromo. In particolare il ceppo Cr-t evidenzia una “ipometilazione” rispetto al Wt; quest’ultimo risponde al Cr (VI) attivando una forte de-metilazione che invece non si osserva nel Cr-t trattato.



## 5.6 Isolamento e caratterizzazione di sequenze codificanti putative metallotioneine (Mts)

### 5.6.1 PCR con primers di pianta

La PCR condotta con primers degenerati disegnati per il genere *Silene* (che hanno portato all'identificazione di una Mts di tipo 2 in *S. nicaensis* -*SnMT2*- (Cozza et al., 2013) e usati per *S. acutus* (vista la relativa vicinanza filogenetica delle Chlorophyta con le piante) ha prodotto, su DNA estratto dal ceppo Wt, una serie di amplificati che sottoposti a sequenziamento, sono risultati essere degli aspecifici (Fig. 13). Su cDNA i primers non hanno dato alcun risultato.

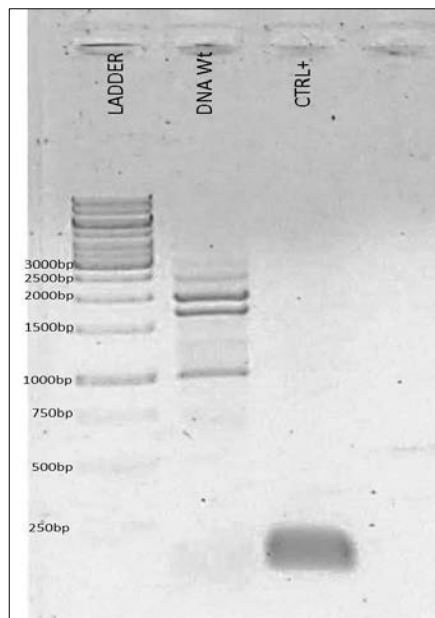


Figura 13. Elettroforesi dei prodotti di PCR con primers di SnMT2

### 5.6.2 PCR con primers disegnati su sequenze di alghe

Il cattivo funzionamento di primers di pianta, ci ha portato a disegnare nuovi primers a partire da ipotetiche sequenze presenti in banca dati per quanto riguarda Mts di alghe. In particolare i nuovi primers sono stati disegnati su una ipotetica proteina tesmina (Tes) MT-like, isolata in *Chlamydomonas reinhardtii* e su una sequenza MT-like isolata in *Chlorella vulgaris* (MtChv). Per quanto riguarda i primer Tes, i prodotti di PCR, sia su DNA che cDNA, non hanno dato risultati; mentre i primers MtChv hanno amplificato

solo su DNA genomico (Fig. 14). Il funzionamento di tali primers è stato reso possibile utilizzando una temperatura di ben 7 gradi inferiore a quella di Meltig (da 62 °C a 55 °C), a conferma della difficoltà che si riscontrano già dalla fase di PCR.

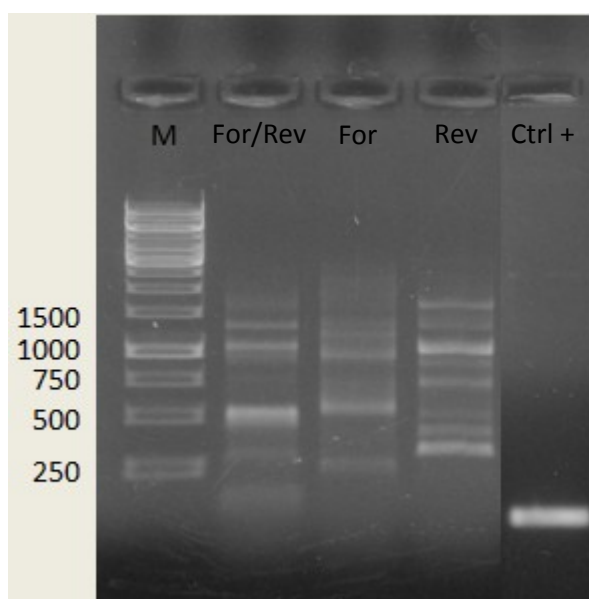


Figura 14. Elettroforesi dei prodotti di PCR su DNA genomico con primers MtChv

Non conoscendo il genoma di *Scenedesmus* e la relativa posizione di eventuali introni, tantomeno l'omologia con il genoma di *Chlorella*, alle stesse condizioni di PCR sono stati testati anche i singoli primer, i cui amplificati ci hanno permesso di discriminare i falsi positivi ottenuti dall'amplificazione For/Rev. L'altezza attesa della banda di interesse su *Chlorella* è di 619 bp su genomico, e di 288 bp, al netto di introni, su cDNA. Su *Scenedesmus* quindi la banda attesa dovrebbe essere compresa fra 288 bp ed un valore massimo ignoto, dato dalla possibile diversa posizione di eventuali introni. Nonostante tutto, è risultato necessario migliorare le condizioni della reazione per discriminare gli amplificati attesi.

#### 5.6.2.1 Risultati PCR touch-down MtChv

Come descritto nel precedente capitolo, la finalità della PCR touch-down è quella di ridurre il numero di bande aspecifiche quando si lavora con primer che si sa non appaiare perfettamente alla sequenza in esame. La temperatura di annealing viene gradualmente diminuita ad ogni ciclo. Quando la temperatura è elevata, si favorisce

l'appaiamento specifico delle basi tra il primer e il target amplificando così solo prodotti specifici. Nei cicli successivi la temperatura diminuisce. A questo punto i prodotti, già amplificati ed in eccesso, saranno preferenzialmente amplificati alle più permissive temperature di annealing.

Nel nostro caso, dall'iniziale temperatura di 60 °C siamo arrivati a lavorare alla temperatura ottimale di 55 °C precedentemente testata. Il decremento della temperatura è stato di 0,5 °C per 10 cicli, come riportato nella sezione di materiale e metodi.

Come per la classica PCR anche in questo caso sono stati testati i primer singolarmente.

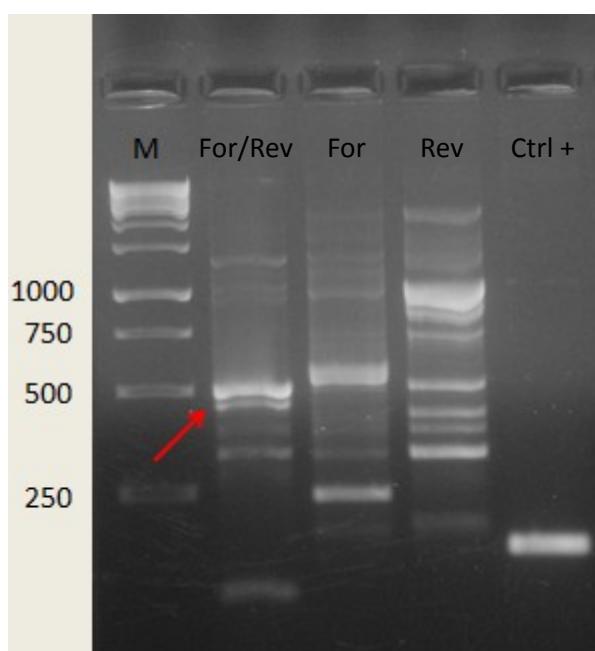


Figura 15. Elettroforesi PCR touch-down su DNA genomico con primers MtChv

Come evidenziato dalla freccia (Fig 15), è stato possibile isolare ed eluire una banda alta circa 500 bp, che rispetta i requisiti della banda attesa.

#### 5.6.2.2 Sequenziamento dell'amplificato con primers MtChv

La banda amplificata da entrambe i primers è stata eluita e sequenziata. Gli elettroferogrammi in *forward* ed in *reverse* sono stati letti separatamente, confrontati, e infine allineati grazie al programma online *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk.clustalw>), al

fine di ottenere una sequenza consenso. La sequenza ottenuta è costituita da 502 nucleotidi come di seguito riportata.

```
ATGAAGGACACGCAGTGTGCAGAAATTGGGGTAAAAATGTATTGAAGGCACTAAACAGAAAGGCAATGCCCGTTGAGAGT
GCCACCAGCGTGTCCATGTTGGTCTTGCCATGACGGGCTGCTTCCAGGCGTTGACGAAGTAGGACCGCCCCAGCCAGAA
CACCACCGGTGCTGACAGCGCCATCATAATCCAGTTGGCGCTGGGCGCATTTCATGAAGAACATACCCAATACGACCACTG
GAACGGATAGAATGCCTGCCACAAGGTTTCGCTTCTTCAGCGATTTCGACTGTCGCTGTTGCGCTTCTCTGTTGTACCTGC
TGAGGATCGTCAACGTCGACCACTAAGTCGTAGCCAATCGACTGTATTACCTGCTGCATCCCGGCCGGGGTAATCAGTTT
AGCGTCATACTCGACCGAAGCCGACTGGTTGGCGTAATTGACAGCCGCTTTCGCAATGCCGGGTGTATGGCTAAGCATGG
ACTCGACACTGACTGCACCAGC
```

### 5.6.2.3 Analisi della sequenza

La sequenza nucleotidica ottenuta è stata “blastata” utilizzando il programma online *Blastn* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Il blast della sequenza ha evidenziato la presenza di motivi conservati che ne permettono l’identificazione. La nostra sequenza così blastata viene identificata non come Mt, ma come una proteina transmembrana deputata al trasporto di metalli pesanti, più specificatamente come una P-type ATPase (HMAs) legante il Cu. (Fig. 16).

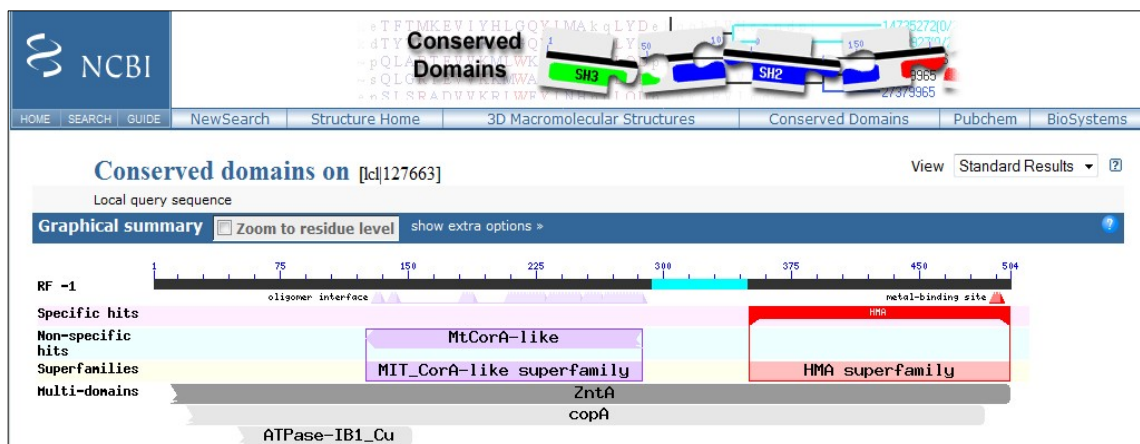


Figura 16. Analisi della sequenza. Identificazione con Blastn.

La sequenza nucleotidica, da noi denominata *ScaHMA* (*S. acutus Heavy Metal ATPase*) è stata tradotta in sequenza amminoacidica grazie all’ausilio del programma *ExPASy-Translate tool* (<http://web.expasy.org/translate/>). Essendo le omologie riscontrate su un frame negativo, la sequenza è stata prima reversata e complementata, ottenendo la seguente proteina dedotta:

```

AGAVSVESMLSHTPGIAKAAVNANQASASVEYDAKLITPAGMQQVIQSIGYDLVVDVDDP
QQVQQAQQRQYESLKKRTLWAGILSVPVVVLGMFFMNAPSANWIMMALSAPVVFWLGRS
YFVNAWKQARHGKTNMDTLVALSTGIAFLFSAFNTFYPQFWHTACPSX

```

La nostra proteina dedotta ScaHMA è stata allineata con altre sequenze di Cu<sup>+</sup>-ATPases isolate in alghe verdi e presenti in banca dati (Fig. 17). ScaHMA presenta alcuni domini conservati (evidenziati in nero in Fig. 15) presenti anche nelle Chlorophyceae *Chlamydomonas* e *Coccomyxa*; altrettanto presenti in *Chlorella* (Trebouxiophyceae) e *Bathycoccus* e *Ostreococcus* (Prasinophyceae).

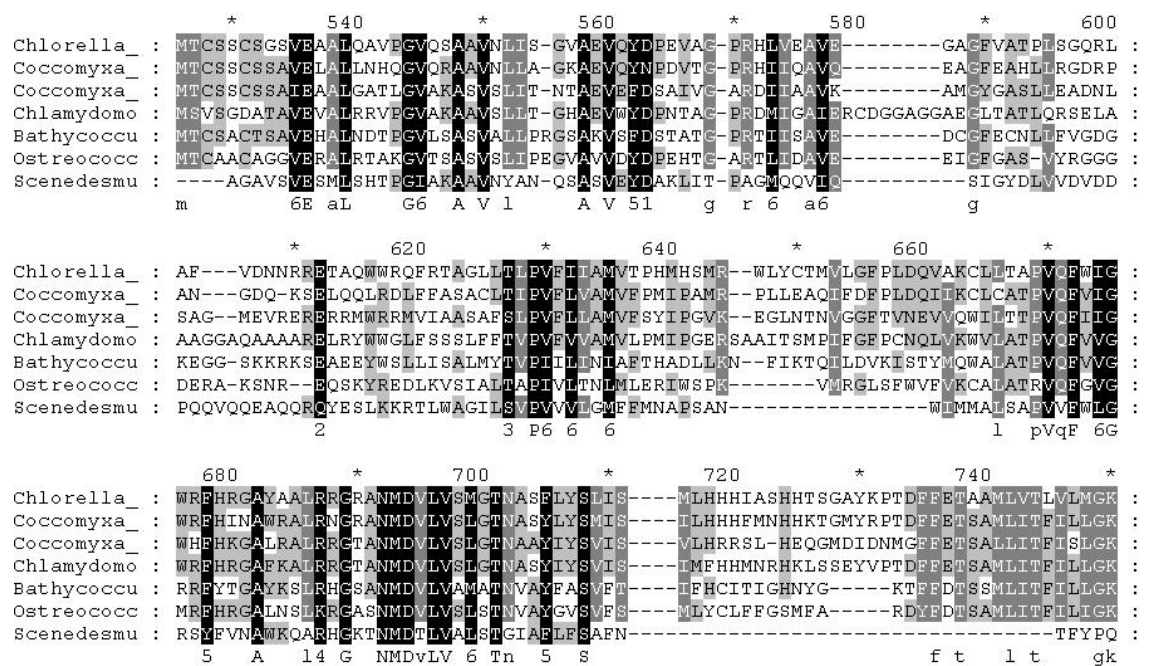


Figura 17. Allineamento di ScaHMA con altre sequenze di Cu<sup>+</sup>-ATPases in alghe verdi.

Le P-type ATPasi sono un gruppo di proteine di membrana che effettuano il trasporto attivo di vari ioni attraverso le membrane biologiche, rivestendo un ruolo cruciale per l'omeostasi degli ioni e nella composizione asimmetrica del doppio strato lipidico. Sebbene si ritrovino principalmente come intermedi fosfoenzimatici, le Cu<sup>+</sup>-ATPases mostrano anche motivi di sequenza specifici della sottoclasse ed elementi strutturali che sono collegati alla specificità e alla modulazione meccanicistica del trasporto.

Le Cu<sup>+</sup>-ATPases contengono anche domini di legame dei metalli pesanti (HMDBs) che forniscono una base per il controllo allosterico di attività della pompa (Mattle et al., 2013). Studi genetici e biochimici condotti su una serie di organismi modello hanno stabilito l'esistenza negli eucarioti di due tipi di trasportatori transmembrana del rame, le

P-type ATPasi che funzionano nella distribuzione del rame all'interno della cellula (Lutsenko e Petris, 2003), e la famiglia CTR dei trasportatori del rame (Puig e Thiele, 2002; De Feo et al, 2007), che hanno funzione di trasporto per il rame proveniente dall'ambiente esterno. Gli HMBDs sono tipicamente situati all'estremità N-terminale della P-type ATPasi e ne costituiscono parte integrante, una componente intracellulare non presente in altre sottoclassi. Questi siti di legame hanno spesso un'organizzazione simile alla ferredossina ( $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ ), che comprende una parte che prevede il contatto con il solvente e un motivo conservato CXXC all'estremità N-terminale che lega il rame (Banci et al., 2002). Recentemente, è stato identificato un secondo tipo di HMBD e l'analisi delle sequenze suggerisce l'esistenza di un terzo sito di legame, in cui lo ione si lega a residui (di nuovo un motivo CXXC) posizionati verso l'estremità C-terminale (Gourdon et al., 2011; Fu et al., 2013). La comprensione della cinetica e della specificità di legame degli ioni ai propri siti di legame, sono conoscenze necessarie per l'eventuale ingegnerizzazione di tali organismi e la loro applicazione nell'ambito del biorimedio.

## Conclusioni

Nell'ottica di comprendere i meccanismi che sono alla base della metallotolleranza in *S. acutus*, le analisi morfologiche dei due ceppi rispettivamente Wt e Cr-t, hanno evidenziato alcune sostanziali differenze. Già a livello di taglia cellulare, le cellule della coltura Wt presentano, in media, un diametro maggiore rispetto alle cellule Cr-t, in accordo con quanto evidenziato in Bauer et al. (2012) che riporta risultati analoghi in *Scenedesmus acutus* in studi in ambiente naturale. La risposta morfologica al trattamento con Cr (VI) per 72 h, si traduce con un significativo aumento del diametro cellulare in entrambi i ceppi e con un notevole incremento del volume cellulare in presenza della concentrazione maggiore (2 mg/l), indice di una crescita cellulare non seguita però da una normale divisione cellulare. Dati precedenti riportano che, trattamenti più prolungati (fino a 2 gg) con 1 mg/l di Cr (VI) inibiscono completamente la crescita del ceppo Wt, mentre il ceppo Cr-t continua a proliferare seguendo una curva di crescita paragonabile a quella osservata in assenza di cromo (Torelli et al., 2007). A supportare le differenze tra i due ceppi sono i dati di mRNAs differential display che mostrano un diverso pattern di proteine da parte del ceppo Cr-t rispetto al Wt, indicando l'esistenza di differenze metaboliche costitutive tra le due popolazioni (Corradi et al., 1995, 1998).

L'indagine condotta a livello ultrastrutturale ha rilevato che il comparto interessato è soprattutto la parete cellulare, che nel ceppo Wt risulta essere più spessa e stratificata. Dati in letteratura sulla tolleranza ai metalli in altre specie algali, fra cui *Micrasterias sp.*, evidenziano un ruolo importante della parete nella compartimentazione di ioni metallici (Volland et al. 2011).

I test di tossicità con Cr (VI), inducono variazioni nell'ultrastruttura in entrambi i ceppi ma in maniera più precoce e più marcata nel Wt. Le alterazioni riscontrate vanno da un parziale distacco del plasmalemma a lesioni dei mitocondri e del cloroplasto; un aumento dei granuli di amido si rileva in entrambi i ceppi, ma è ancora soprattutto nel Wt, dove compaiono numerose macchie elettrondense a livello dei vacuoli, indicative del legame tra gruppi fosfato e tracce di Cr (Nishikawa et al., 2003). Le alterazioni si accentuano con la concentrazione maggiore e compaiono anche nel ceppo Cr-t e, in entrambi i ceppi si evidenzia un citoplasma vescicolato. Queste osservazioni sono in linea con quanto riportato in Shanab et al. (2012) che evidenzia alterazioni analoghe in tre differenti microalghe, *Phormidium ambiguum*

(Cyanobacteria), *Pseudochlorococum typicum* e *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta), sottoposte a trattamenti con piombo, mercurio e cadmio.

Interessantemente, il ceppo Cr-t sviluppa, a questa concentrazione di Cr, numerosi prolungamenti, probabilmente derivanti dalla sintesi di essudati extracellulari che potrebbero essere coinvolti nei meccanismi di esclusione del metallo (Corradi et al., 1998; Gorbiet al., 2002). Questi meccanismi di esclusione e/o riduzione dell'up-take del Cr da parte del ceppo Cr-t, sono supportati dai nostri dati di ICP massa che mostrano come il ceppo Cr-t abbia una minore quantità di Cr nella cellula rispetto al ceppo wt.

Le osservazioni sulle variazioni dei caratteri nucleari (superficie, rapporto eu/eterocromatina), prima e dopo il trattamento con Cr VI, indicano che i trattamenti inducono un aumento delle dimensioni medie del singolo nucleo e un corrispondente aumento della frazione eucromatica rispetto a quella eterocromatica. Questa variazione è molto marcata nel Wt. Questo riarrangiamento interno della cromatina può essere alla base di una differente attività trascrizionale in seguito alla presenza di cromo, risposta questa particolarmente evidente nel ceppo Wt. Dati in letteratura su altri organismi riportano che la presenza di metalli induce riarrangiamento cromatinico e del pattern di metilazione (Greco et al., 2012; Wang et al., 2012).

I risultati sul pattern di metilazione dei due ceppi, rilevato attraverso immunolocalizzazione delle 5-metilcitosina, ci permette di ipotizzare che in *S. acutus* il carattere della metallotolleranza, trasmesso alle generazioni successive, possa avere una regolazione epigenetica. Infatti l'analisi quantitativa e qualitativa dei siti metilati ha evidenziato delle differenze sia nei due ceppi ma soprattutto in seguito ai trattamenti con Cr. In seguito ai trattamenti con Cr(VI) si assiste infatti, a un riarrangiamento nucleare che porta nel Wt all'aumento della percentuale di eucromatina e alla progressiva de-metilazione sia dell'eucromatina che dell'eterocromatina. Dal momento che la demetilazione ha come conseguenza un aumento della trascrizione e dell'espressione genica, si può ipotizzare che la cellula Wt, in risposta al Cr (VI), vada a esprimere una serie di geni che sono silenziati in condizioni di normalità. Inoltre, l'evidenza che il ceppo Cr-t abbia meno siti metilati rispetto al ceppo Wt, porta a ipotizzare che esso abbia alcuni geni attivi che nelle cellule Wt invece sono silenziati.

Le osservazioni ultrastrutturali, unite ai dati ottenuti dall'immunolocalizzazione della 5-metilcitosina, indicano che *Scenedesmus acutus*, già a tempi relativamente brevi di esposizione al



cromo esavalente (72h), attua risposte morfologiche volte alla tolleranza e/o detossificazione del metallo, soprattutto nel ceppo cromo-tollerante. Inoltre, la riorganizzazione interna della cromatina in seguito ai trattamenti, suggerisce che vengono parallelamente attivate dalla cellula delle risposte molecolari, come verosimilmente l'espressione di alcuni geni codificanti per proteine citoplasmatiche (fitochelatine e metallotioneine) e/o altri trasportatori di metalli, coinvolti nei meccanismi di metallotolleranza (Vandeghechuchte e Janssen, 2011; Doi et al., 2011).

L'indagine molecolare da noi condotta, proprio nell'ottica di migliorare le scarse conoscenze circa i meccanismi molecolari alla base della tolleranza e/o detossificazione dei metalli, ha però presentato delle difficoltà che ci ha impedito, in questa sede, di arrivare a dei risultati definitivi. La difficoltà di effettuare un'indagine molecolare su un organismo come *Scenedesmus* è correlata alla scarsa conoscenza del suo genoma (solo quello mitocondriale e cloroplastico sono stati sequenziati), ma anche di genomi di altre microalghe filogeneticamente correlate.

La nostra scelta di focalizzare l'attenzione su un gruppo di proteine chelanti i metalli quali le Mts, è stata dettata dal fatto che, sebbene molte sono le Mts di pianta, nessun dato è presente per le alghe verdi. Nonostante la relativa vicinanza filogenetica delle Cloroficee (a cui *S. acutus* appartiene) e le piante terrestri (entrambi nel dominio degli Archeplastida o Viridiplante), i primers usati per isolare una Mt nella pianta del genere *Silene* (Cozza et al., 2012) non hanno dato su *S. acutus* i risultati attesi. Abbiamo cercato quindi di considerare quanto a disposizione in banca dati, di organismi filogeneticamente più vicini al genere *Scenedesmus*, quali *Chlamydomonas* e *Volvox*, entrambe cloroficee. La ricerca di sequenze note ha portato a un'ipotetica proteina tesmina, MT-like, isolata in *Chlamydomonas reinhardtii* (le tesmine sono proteine coinvolte nel processo di spermatogenesi) che presenta dei domini conservati, ricchi di cisteine, (Sugihara et al., 1999; Andersen et al., 2007) e una ipotetica MT-like isolata in *Chlorella vulgaris*. Non disponendo di altre sequenze di alghe verdi e non conoscendo la posizione degli introni nel genoma di *Scenedesmus*, non è stato possibile fare alcun allineamento, disconoscendo pertanto se le zone su cui sono stati costruiti i primers siano effettivamente conservate o meno negli altri organismi. È da sottolineare che *Scenedesmus* appartiene alla classe delle Chlorophyceae mentre *Chlorella* viene classificata come Trebouxiophyceae (Fig. 17).

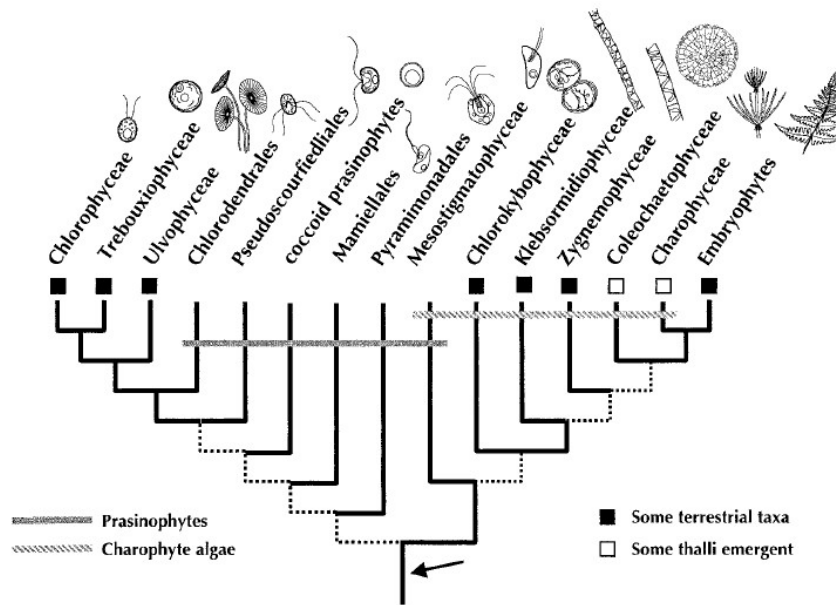


Figura 17. Sintesi delle relazioni filogenetiche tra le principali classi di alghe verdi determinate dall'analisi dei dati di sequenza del DNA. (Lewis e Mc Court, 2004).

Questa coppia di primers costruiti su *Chlorella* hanno consentito di isolare una sequenza che mostra alta omologia con proteine P- type-ATPasi di Chlorophyceae del genere *Chlamydomonas* e *Coccomyxa*, Trebouxiophyceae del genere *Chlorella* e Prasinophyceae del genere *Bathycoccus* e *Ostreococcus*.

Le P- type-ATPase sono pompe ATPasiche coinvolte nella traslocazione di metalli pesanti a livello di membrana cellulare, di tonoplasto, di membrane cloroplastiche (Kim et al., 2014; Takahashi et al., 2012) e rivestono un ruolo cruciale per l'omeostasi degli ioni e nella composizione asimmetrica del doppio strato lipidico.

Il clonaggio successivo di questa sequenza, da noi denominata ScaHMA consentirà la sua completa identificazione e il suo eventuale ruolo funzionale nei due ceppi analizzati. Comunque sia, nonostante si tratti di una proteina che lega cationi e quindi non direttamente correlata al trasporto del Cr (il Cr nella cellula entra come anione cromato), il suo coinvolgimento nei meccanismi di esclusione e/o detossificazione in *S. acutus*, rappresenta comunque un dato innovativo.

Lo studio molecolare di *Scenedesmus acutus*, seppure presenti molteplici difficoltà nel suo approccio, risulta essere di grande innovazione ed interesse. La difficoltà è data anche dalla

relativa distanza filogenetica che esiste tra i diversi gruppi algali che non permette di usare facilmente le sequenze di altre microalghe presenti in banca dati.

Rispetto poi alla comprensione dei meccanismi molecolari della metallotolleranza, quasi completamente sconosciuti in questa microalga e poco conosciuti in altre, essi meritano di sicuramente di essere indagati e approfonditi, non solo per arricchire le conoscenze di base, ma soprattutto per i potenziali risvolti applicativi in ambito ambientale.

## Tavole fotografiche

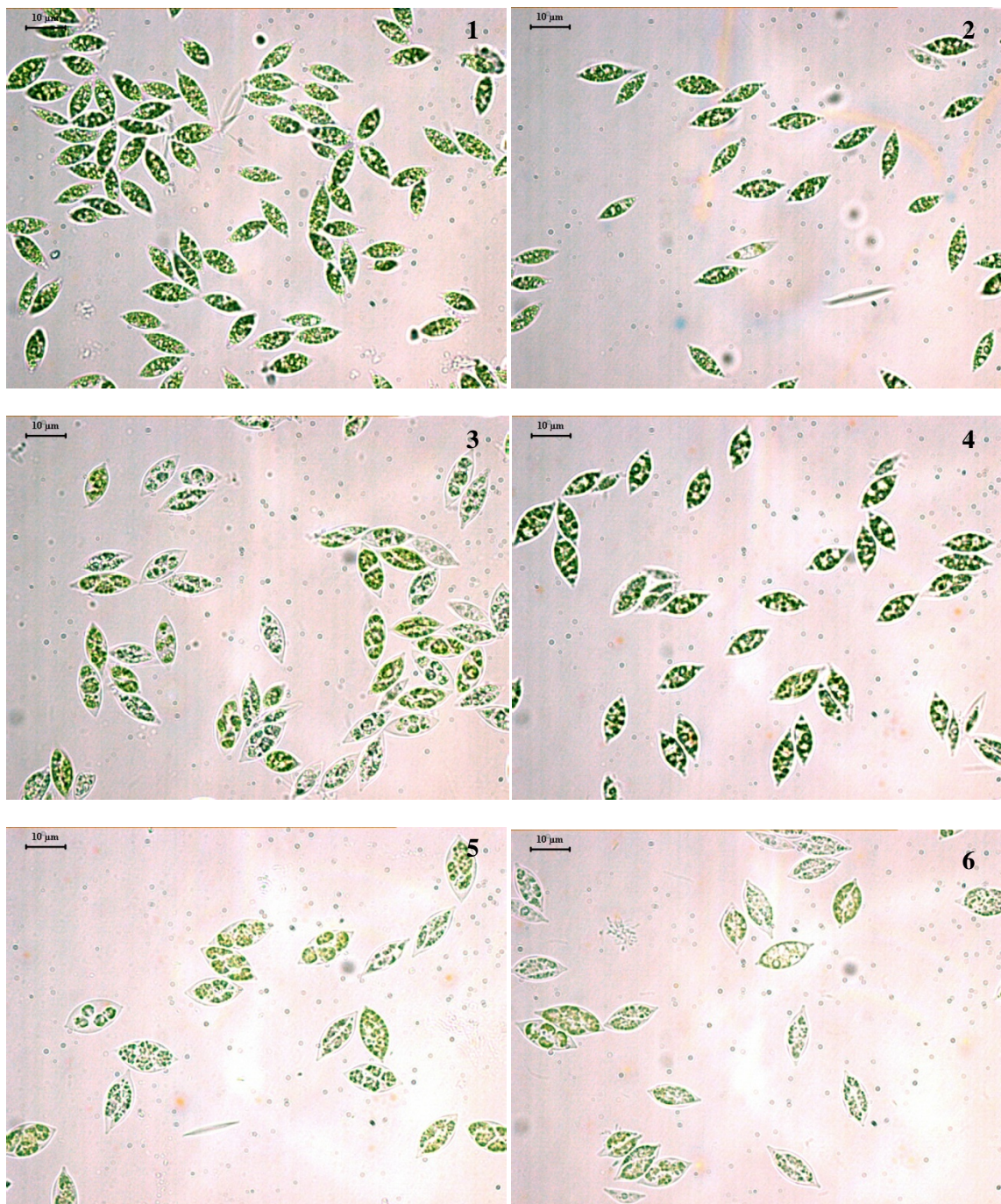


Tavola fotografica 1 - 6. Osservazioni in campo chiaro. 1: Wt, 2: Cr-t, 3: N1, 4: T1, 5: N2, 6: T2.

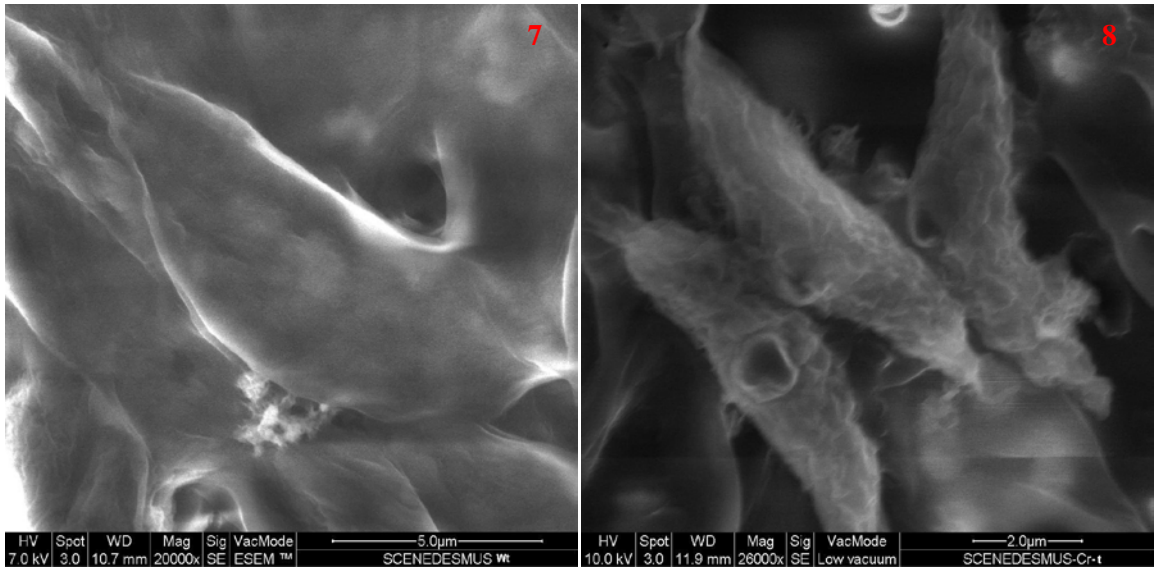


Tavola fotografica 7-8. Osservazioni al SEM. 7: Wt, 8: Cr-t.

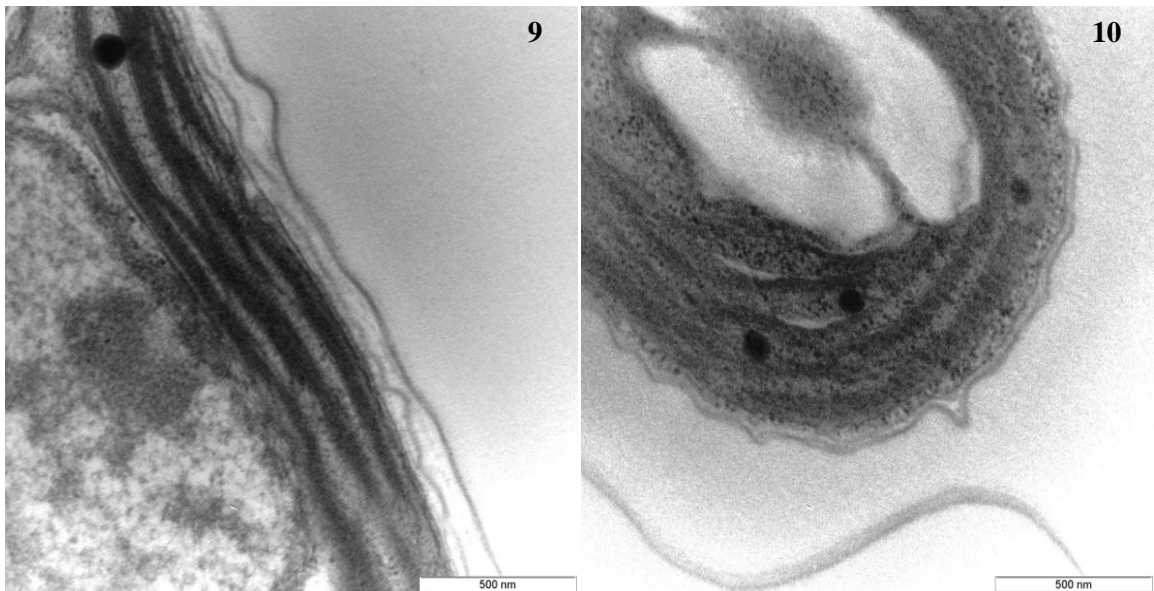


Tavola fotografica 9-10. Osservazione al TEM. Parete cellulare: 9: Wt, 10: Cr-t. .

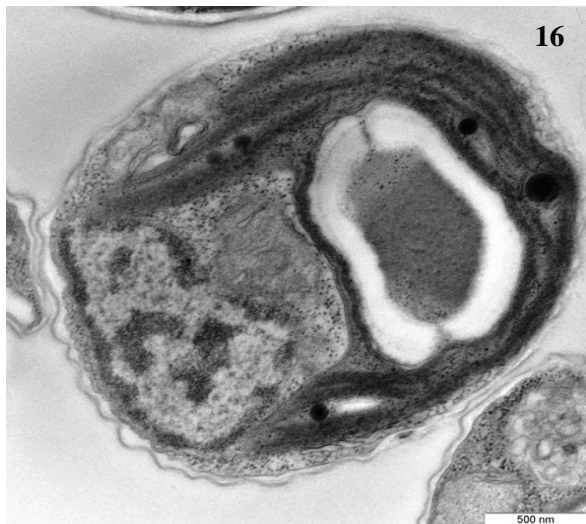
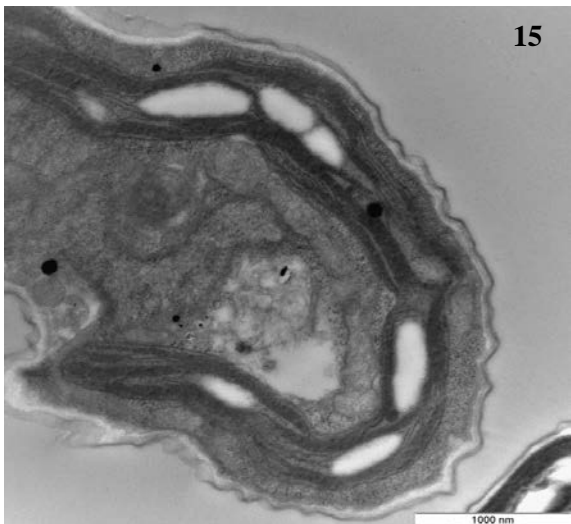
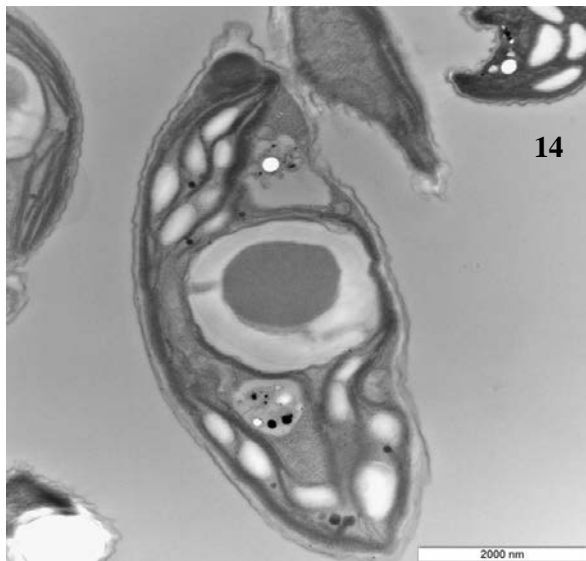
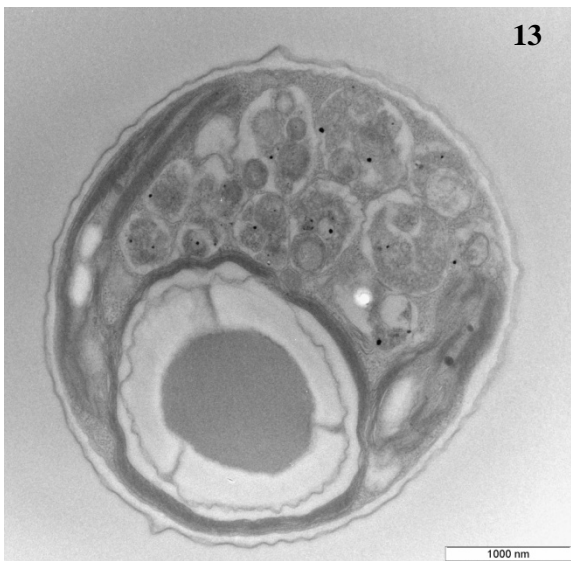
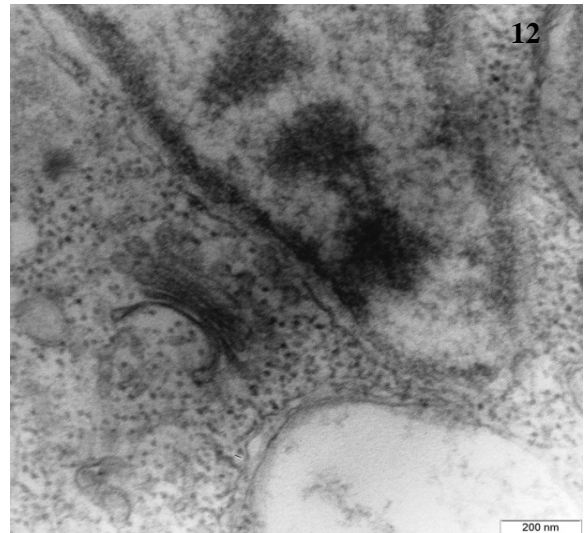


Tavola fotografica 11 - 16. Osservazione al TEM ceppo Wt. 11: pirenoide, 12: apparato di Golgi, 13: proplastidi, 14: granuli di amido, 15: cloroplasto e mitocondri, 16: nucleo con zone eu- ed eterocromatiche.

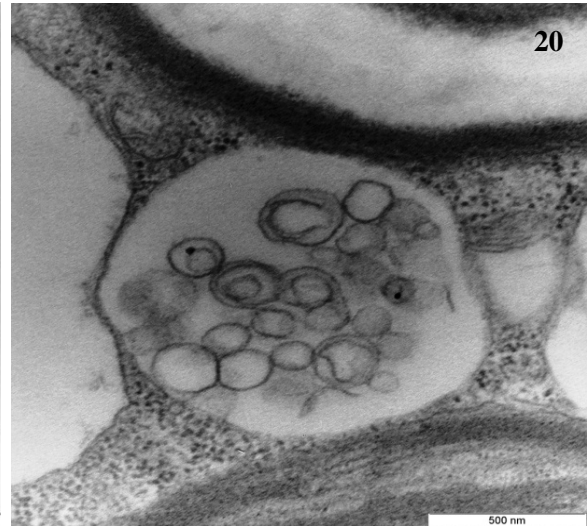
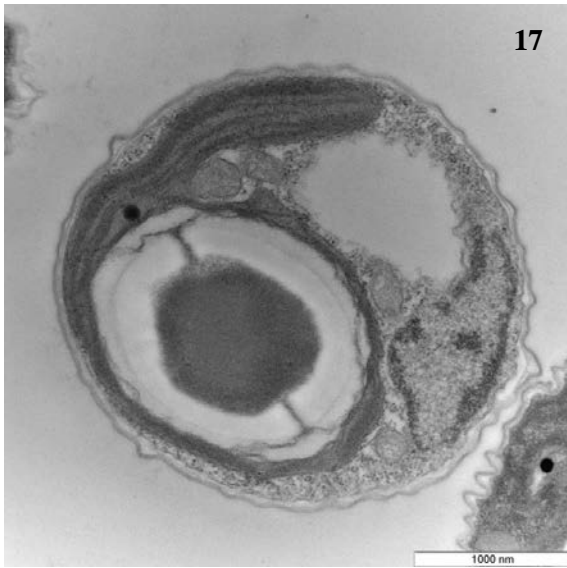


Tavola fotografica 17 - 20. Osservazione al TEM ceppo Cr-t. 17,18: organuli cellulari, 19,20: citoplasma vescicolato.

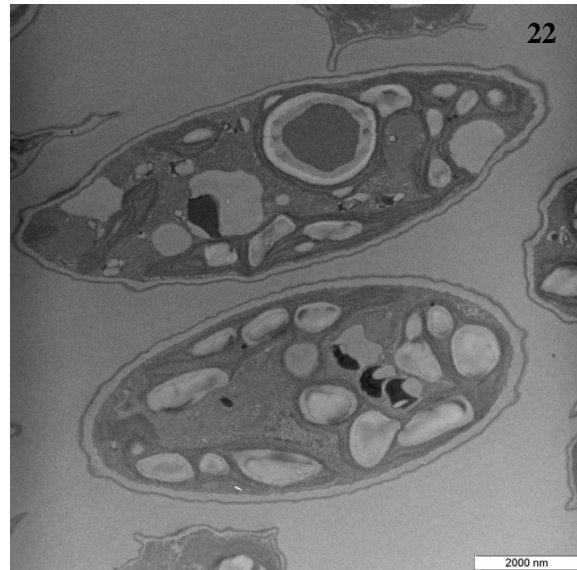


Tavola fotografica 21 - 22. Osservazione al TEM, N1. 21: parziale distacco dal plasmalemma, iniziale degenerazione del cloroplasto, 22: aumento granuli di amido, presenza di corpi elettrondensi.

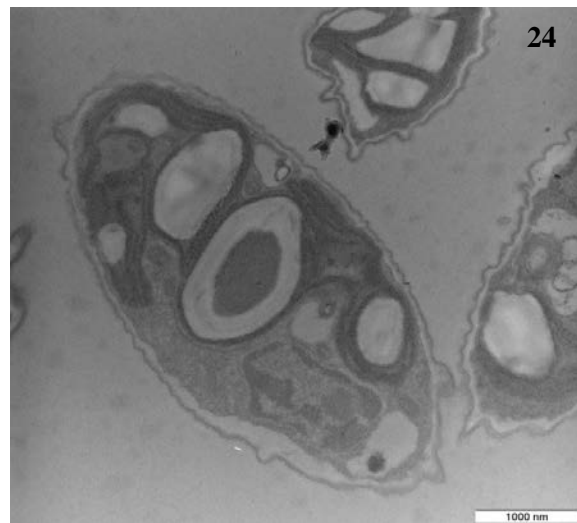
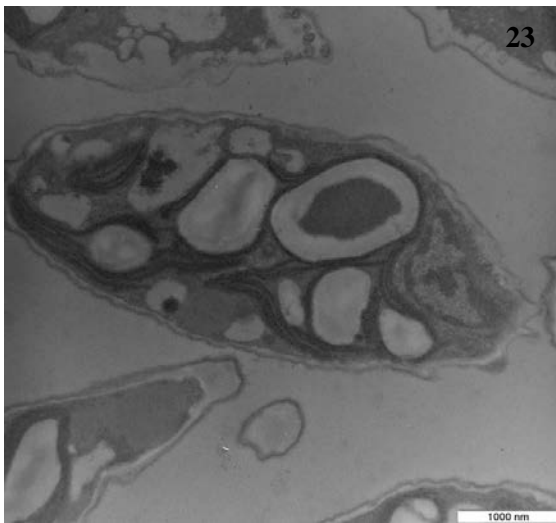


Tavola fotografica 23 - 24. Osservazione al TEM Cr-t, T1. 23,24: iniziale degenerazione del cloroplasto, presenza di corpi elettrondensi.



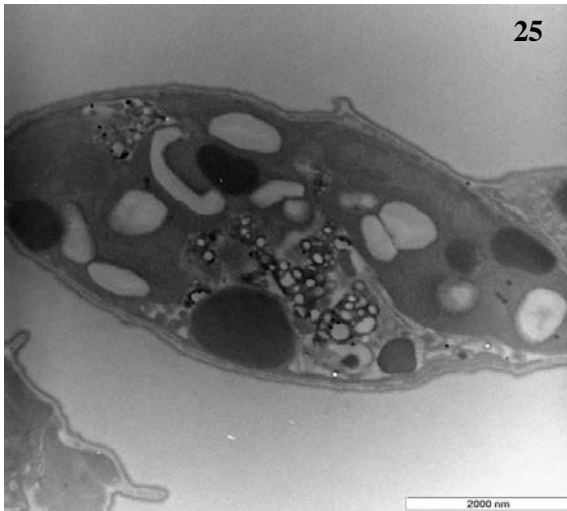


Tavola fotografica 25 - 26. Osservazioni al TEM Wt, N2. 25: presenza di numerosi corpi elettrondensi, accentuata degenerazione del cloroplasto, aumento notevole dei granuli di amido, 26: parziale distacco dal plasmalemma.

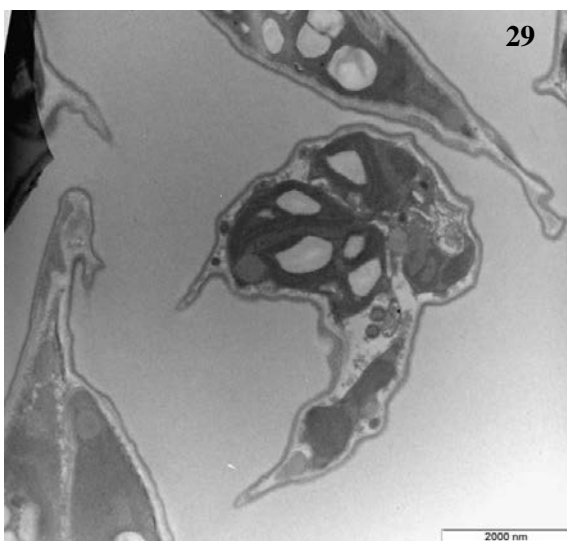
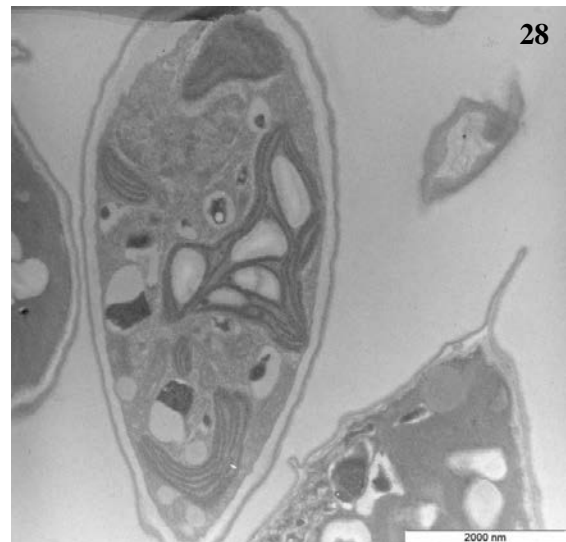
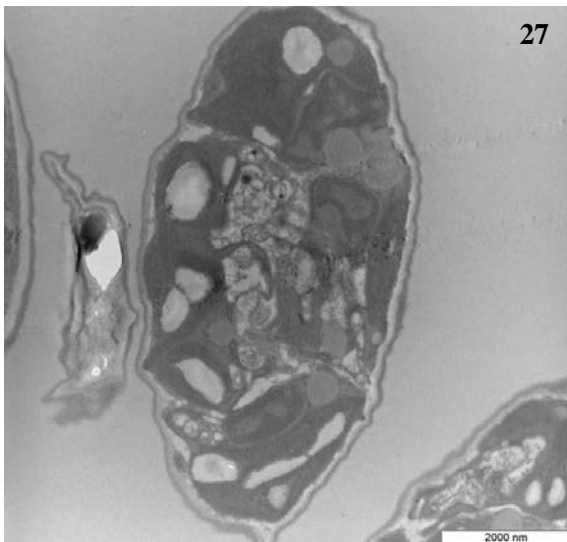


Tavola fotografica 27 - 29. Osservazioni al TEM, T2. 27,28: accentuata degenerazione del cloroplasto, aumento notevole dei granuli di amido, presenza di numerosi corpi elettrondensi, 29: prolungamenti della parete cellulare.

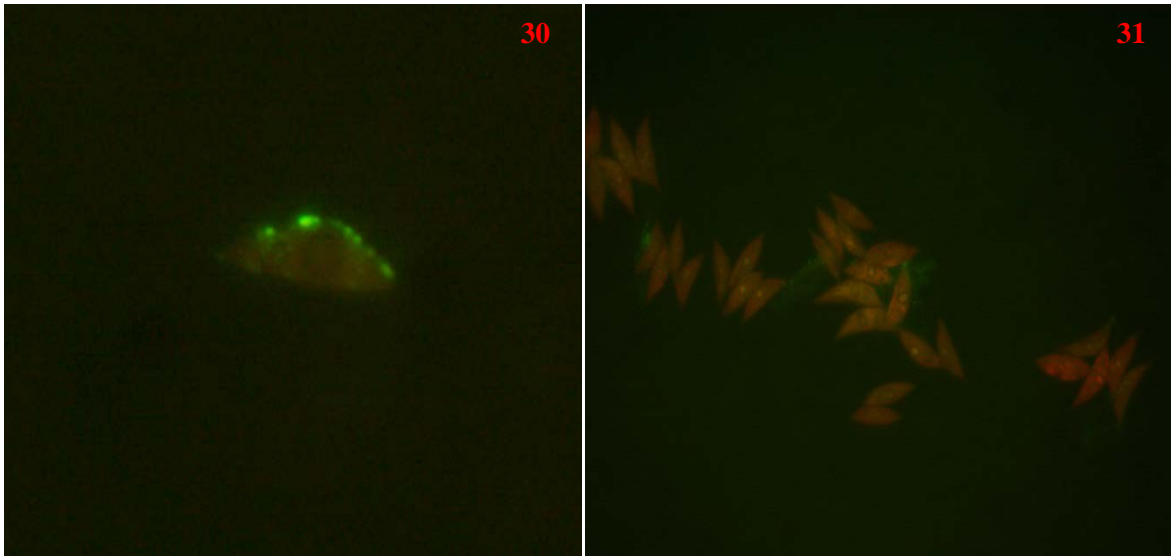
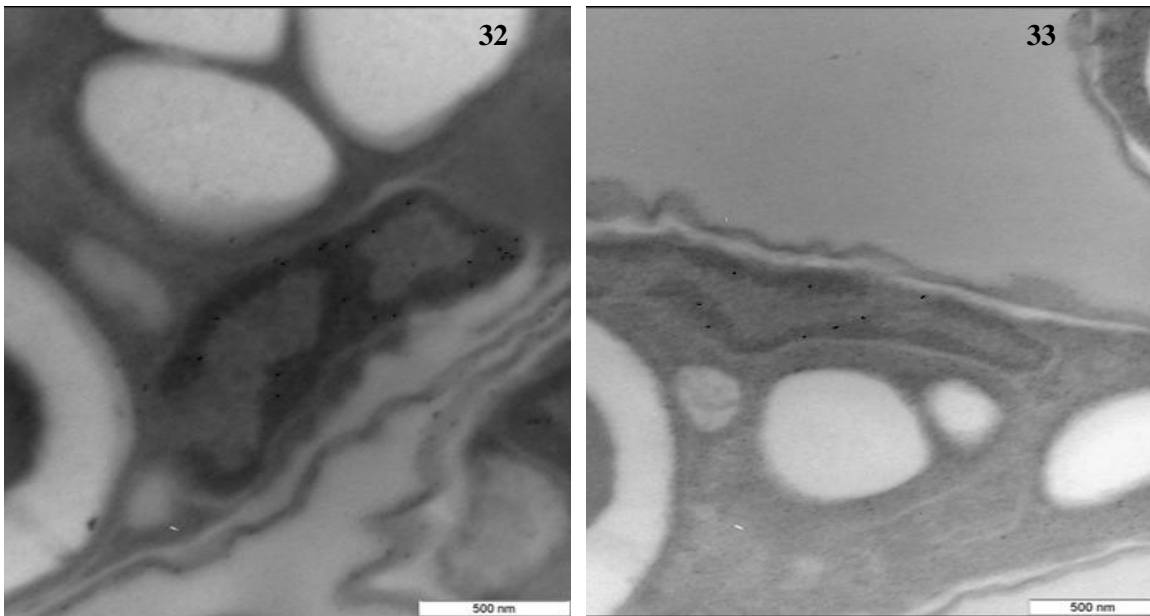


Tavola fotografica 30 - 31. Immunofluorescenza, localizzazione della 5 metil-citosina. 30: Wt, 31: Cr-t.



Tavole fotografiche 32 - 33. Immunogold, localizzazione della 5 metil-citosina. 32: Wt, 33: Cr-t.

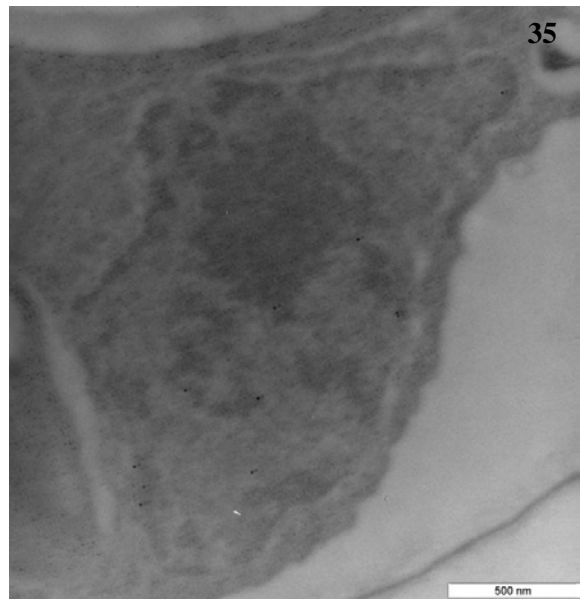
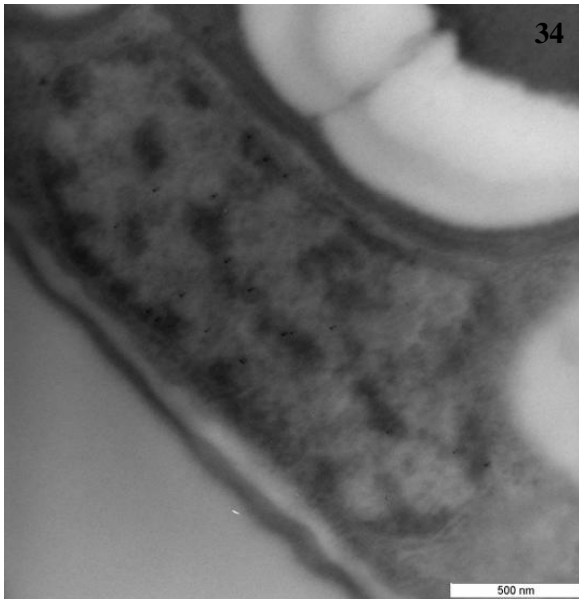


Tavola fotografica 34 - 35. Immunogold, localizzazione della 5 metil-citosina. 34: N1, 35: N2.

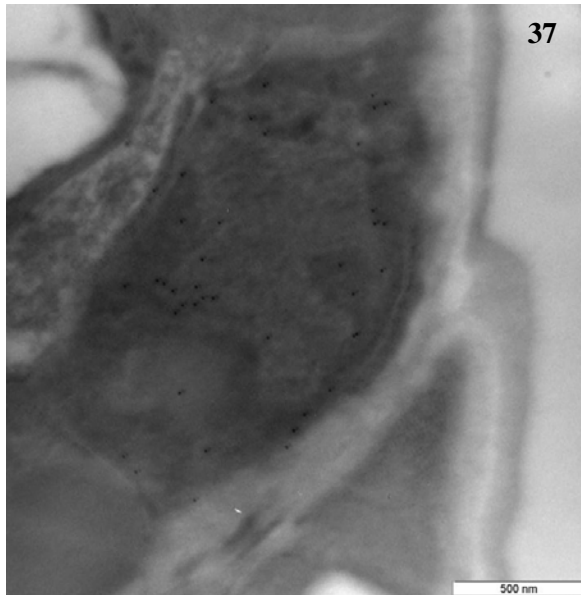
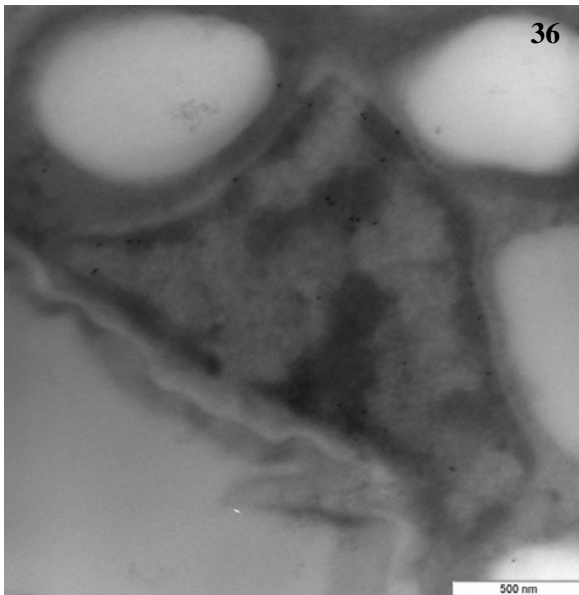


Tavola fotografica 36 - 37. Immunogold, localizzazione della 5 metil-citosina. 36: T1, 37: T2.

## Bibliografia

- **Aguilera A, Amils R. (2005).** Tolerance to cadmium in *Chlamydomonas* sp. (Chlorophyta) strains isolated from an extreme acidic environment, the Tinto River (SW, Spain). *Aquat Toxicol*; 75:316-29; PMID: 16225936.
- **Ahner B.A., Wei L., Oleson J.R., Ogura N., (2002).** Glutathione and other low molecular weight thiols in marine phytoplankton under metal stress. *Marine Ecology Progress Series* 232, 93-103.
- **Andersen S. U., Algreen-Petersen R., Hoedl M., Jurkiewicz A., Cvitanich C., Braunschweig U., Schauser L., Oh S., Twell D. and Jensen E. O. (2007).** The conserved cysteine-rich domain of a tesmin/TSO1-like protein binds zinc in vitro and TSO1 is required for both male and female fertility in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 58, No. 13, pp. 3657–3670.
- **Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., D'Onofrio, M., Gonnelli, L., Marhuenda-Egea, F. C. & Ruiz-Duenas, F. J. (2002).** Solution structure of the N-terminal domain of a potential copper-translocating P-type ATPase from *Bacillus subtilis* in the apo and Cu(I) loaded states. *J. Mol. Biol.* 317, 415–429.
- **Baos R, Jovani R, Pastor N, Tella JL, Jiménez B, Gómez G, González MJ, Hiraldo F. (2006).** Evaluation of genotoxic effects of heavy metals and arsenic in wild nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from southwestern Spain after a mining accident. *Environ Toxicol Chem* Oct;25(10):2794-803.
- **Barbato F, Campiotti CA, Giagnacovo G, Pignatelli V, Tumminelli D, Viola C, Diorato ES, (2012).** Sfruttamento delle microalghe: tra realtà e prospettive. *Periodico online di formazione edito da INCA*, anno VII – N.26 Aprile 2012.
- **Bargagli R. (1998a).** Chemical elements and plants life. In: *Trace elements in terrestrial plants: an ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery* 1-21.
- **Barsanti L, Gualtieri P, (2006).** *Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology*. CRC Taylor & Francis, New York.

- **Bauer D.E., Conforti V., Ruiz L., Gomez N. (2012).** An in situ test to explore the responses of *Scenedesmus acutus* and *Lepocinclis acus* as indicators of the changes in water quality in lowland streams. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 77 (2012) 71–78.
- **Bauer DE, Conforti V, Ruiz L, Go´mez N, 2012.** An in situ test to explore the responses of *Scenedesmus acutus* and *Lepocinclis acus* as indicators of the changes in water quality in lowland streams. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 77: 71–78.
- **Beninati S, 2013.** Tecniche istologiche – Università degli Studi di Roma "Tor Vergata".
- **Binz P.A., Kägi J.H.R. (2001).** Metallothionein. <http://www.bioc.uzh.ch/mtpage/MT.html>
- **Blindauer C. A. and Schmid R., (2010).** *Metallomics*, 2, 510–529.
- **Bowler C, Benvenuto G, Laflamme P, Molino D, Aline V. Probst AV, Tariq M, Paszkowski J, (2004).** Chromatin techniques for plant cells. *The Plant Journal* 39, 776–789 doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.0216.
- **Brennan L, Owende P (2010).** *Biofuels from microalgae-a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products.* *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 557-577.
- **Brennan L., Owende P. (2010).** Biofuels from microalgae-a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 557-577.
- **Campos, J., Martinez-Pacheco, M., Cervantes, C., (1995).** Hexavalent chromium reduction by a chromate-resistant *Bacillus* sp. strain. *Antonie van Leeuwenhoek* 68, 203–208.
- **Cervantes, C., Campos-Garcia, J., Devars, S., Gutierrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzman, J.C., Moreno-Sanchez, R., (2001).** Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 335–347.
- **Chatterjee, J., Chatterjee, C., (2000).** Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. *Environ. Pollut.* 109, 69–74.

- **Cobbett C. and Goldsbrough P. (2002).** Phytochelatins and Metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53,159-182.
- **Cobbett C. S. (2000).** Phytochelatins and their role in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* 123,825-33.
- **Corradi M. G., Gorbi G., Ricci A., Torelli A., Bassi M., (1995).** Chromium induced sexual reproduction gives rise to a Cr-tolerant progeny in *Scenedesmus acutus*. *Ecotoxicology Environ Saf.* 32(1):12-8.
- **Cozza R., Bruno L., Bitonti M. B. (2013).** Expression pattern of a type-2 metallothionein gene in a wild population of the psammophyte *Silene nicaeensis*. *Protoplasma* 250:381–389.
- **Davis, T.A., Volesky, B., Mucci, A., (2003).** Are view of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Res.* 37, 4311–4330.
- **De Feo, C.J., Aller, S.G., and Unger, V.M. (2007).** A structural perspective on copper uptake in eukaryotes. *Biometals* 20: 705–716.
- **De Filippis, L.F., Pallaghy, C.K., (1994).** Heavy metals: sources and biological effects. In: Rai, L.C., Gaur, J.P., Soeder, C.J. (Eds.), *Advances in Limnology Series: Algae and Water Pollution*. E. Scheizerbartsche Press, Stuttgart, pp. 31–77.
- **Demurtas O, Ferrante P, Giuliano G (2013).** Le microalghe come bio-fabbriche per composti ad elevato valore aggiunto. *EAI Speciale I-2013 Biotecnologie per lo sviluppo sostenibile*.
- **Deng, L., Wang, H., Deng, N., (2006).** Photoreduction of chromium(VI) in the presence of algae, *Chlorella vulgaris*. *J. Hazard. Mater. B* 138, 288–292.
- **Dewez, D., Geoffroy L., Vernet, G., Popovic, R., (2005).** Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquat.Toxicol.*74, 150–159.
- **Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R., (2002).** Chromium ions inactivate electron transport and enhance superoxide generation *in vivo* in pea (*Pisum sativum* L. cv: Azad) root mitochondria. *Plant Cell Env.* 25, 687–693.
- **Doi T, Puri P, McCann A, Bannigan J, Thompson J. (2011).** Epigenetic effect of cadmium on global de novo DNA hypomethylation in the cadmium-

induced ventral body wall defect (VBWD) in the chick model. *Toxicol Sci.* 2011 Apr;120(2):475-80.

- **Don R.H., Cox P.T., Wainwright B.J., Baker K. and Mattick J.S. (1991).** 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*, Vol. 19, No. 14.
- **Freisinger E. (2011).** Structural features specific to plant metallothioneins. *J Biol Inorg Chem* 16:1035–1045 DOI 10.1007/s00775-011-0801-z.
- **Fu, Y., Tsui, H. C., Bruce, K. E., Sham, L. T., Higgins, K. A., Lisher, J. P. et al. (2013).** A new structural paradigm in copper resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Chem. Biol.*, <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1168>.
- **Geoffroy, L., Frankart, C., Eullaffroy, P., (2004).** Comparison of different physiological parameter responses in *Lemnaminor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin. *Environ. Pollut.* 131, 233–241.
- **Gomez de Barreda Ferraz, D., Sabater, C., Carrasco, J.M., (2004).** Effects of propanil, tebufenozide and mefenacetone growth of four fresh water species of phyto- plankton: a microplate bioassay. *Chemosphere* 56, 315–320.
- **Gorbi et al., (2006).** Differential responses to Cr(VI)-induced oxidative stress between Cr-tolerant and wild-type strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Aquatic Toxicology* 79 (2006) 132–139.
- **Gorbi G., Torricelli E., Pawlik-Skowronska B., Sanità di Toppi L., Zanni C., Corradi M. G. (2006).** Differential responses to Cr(VI)-induced oxidative stress between Cr-tolerant and wild-type strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Aquatic Toxicology* 79 132–139.
- **Gorbi G., Zanni C., Corradi M. G., (2007).** Sulfur starvation and chromium tolerance in *Scenedesmus acutus*: a possible link between metal tolerance and the regulation of sulfur uptake/assimilation processes. *Aquatic Toxicology* 30;84(4):457-64.
- **Gourdon, P., Liu, X.-Y., Skjørringe, T., Morth, J. P., Møller, L. B., Pedersen, B. P. & Nissen, P. (2011).** Crystal structure of a copper-transporting PIB-type ATPase. *Nature*, 475, 59–64.
- **Greco M, Chiappetta A, Bruno L, Bitonti MB. (2012).** In *Posidonia oceanica* cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning. *J Exp*

Bot. 2012 Jan;63(2):695-709.

- **Guo J., Xu L., Su Y., Wang H., Gao S., Xu J., and Que Y., (2013).** *ScMT2-1-3*, Metallothionein Gene of Sugarcane, Plays an Important Role in the Regulation of Heavy Metal Tolerance/Accumulation. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume 2013, Article ID 904769, 12.
- **Han, X., Wong, Y.S., Wong, M.H., Tam, N.F.Y., (2007).** Biosorption and bioreduction of Cr(VI) by a microalgal isolate, *Chlorella miniata*. J. Hazard. Mater. 146, 65–72.
- **Hassinen V. H., Tervahauta A. I., Schat H., Karenlampi S.O. (2011).** Plant metallothioneins--metal chelators with ROS scavenging activity? Plant Biol., 13, 225-232.
- **Holleman D., (1999).** Microbial heavy-metal resistance. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51, 730–750.
- **Huang Z., Li L., Huang G., Yan Q., Shi B., Xu X. (2009).** Growth-inhibitory and metal-binding proteins in *Chlorella vulgaris* exposed to cadmium or zinc. Aquat. Toxicol., 91, 54-61.
- **Huang Z., Li L., Huang G., Yan Q., Shi B., Xu X., (2009).** Aquat. Toxicol., 91, 54-61.
- **Iyer, A., Mody, K., Jha, B., (2004).** Accumulation of hexavalent chromium by an exopolysaccharide producing marine *Enterobacter cloacae*. Marine Poll Bull. 49, 974–977.
- **Kaplan, D., Christiaen, D., Arad, S., (1987).** Chelating properties of extracellular polysaccharides from *Chlorella* spp. Appl. Environ. Microbiol. 53 (12), 2953–2956.
- **Kawakami S. K., Gledhill M., Achterberg E. P., (2006)a.** Effects of metal combination on the production of phytochelatins and glutathione by marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. BioMetals 19, 51-60.
- **Kim YH, Khan AL, Kim DH, Lee SY, Kim KM, Waqas M, Jung HY, Shin JH, Kim JG, Lee IJ. (2014).** Silicon mitigates heavy metal stress by regulating P-type heavy metal ATPases, *Oryza sativa* low silicon genes, and endogenous phytohormones. BMC Plant Biol. 2014 Jan 9;14:13. doi: 10.1186/1471-2229-14-13.



- **Kotaś J, Stasicka Z. (2000).** Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environ Pollut.* 2000 Mar;107(3):263-83.
- **Kotas, J., Stasicka, Z., (2000).** Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environ. Pollut.* 107, 263–283.
- **Ksheminska, H., Fedorovych, D., Babyak, L., Yanovych, D., Kaszycki, P., Kolczek, H. (2005).** Chromium(III) and (VI) tolerance and bioaccumulation in yeast: a survey of cellular chromium content in selected strains of representative genera. *Process Biochem.* 40, 1565–1572.
- **Kumar G., Kushwaha H. R., Panjabi-Sabharwal V., Kumari S., Joshi R., Karan R., Mittal S., Singla Pareek S. L. and Pareek A., (2012).** Clustered metallothionein genes are co-regulated in rice and ectopic expression of OsMT1e-P confers multiple abiotic stress tolerance in tobacco via ROS scavenging. *BMC Plant Biology*, 12:107.
- **La Rocca N., Andreoli C., Giacometti G. M., Rascio N., Moro I., (2009).** Responses of the Antarctic microalga *Koliella antartica* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) to cadmium contamination. *PHOTOSYNTHETICA* 47 (3): 471-479.
- **Labra, M., Bernasconi, M., Grassi, F., DeMattia, F., Sgorbati, S., Airoidi, R., Citterio, S., (2007).** Toxic and genotoxic effects of potassium dichromate in *Pseudokirchneriella subcapitata* detected by microscopy and AFLP marker analysis. *Aquat.Bot.* 86, 229–235.
- **Le Faucheur S, Schildknecht F, Behra R, Sigg L (2006).** Thiols in *Scenedesmus vacuolatus* upon exposure to metals and metalloids. *Aquat Toxicol.* 2006 Dec 30;80(4):355-61.
- **Le Faucheur, S., Schildknecht, F., Behra, R., Sigg,L., (2006).** Thiols in *Scenedesmus vacuolatus* upon exposure to metals and metalloids. *Aquat.Toxicol.*80, 355–361.
- **Leliaert F., Smith R., Moreau H., Herron M., Verbruggen H., Delwiche C. and De Clerck O. (2012).** Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31:1–46.
- **Lewis L. and Mc Court M. (2004).** GREEN ALGAE AND THE ORIGIN OF LAND PLANTS. *American Journal of Botany* 91(10): 1535–1556.

- **Liebig, M., Schmidt, G., Bontje, D., Kooi, B.W., Streck, G., Traunspurger, W., Knacker, T., (2008).** Direct and indirect effects of pollutants on algae and algivorous ciliates in an aquatic indoor microcosm. *Aquat. Toxicol.* 88, 102–110.
- **Lovley, D.R., Phillips, E.J.P., (1994).** Reduction of chromate by *Desulfovibrio vulgaris* and its *c3* cytochrome. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 726–728.
- **Lutsenko S, Tsivkovskii R, Walker JM (2003).** Functional properties of the human copper-transporting ATPase ATP7B (the Wilson’s disease protein) and regulation by metallochaperone Atox1. *Ann N Y Acad Sci* 986:204–211.
- **Mallick, N., Rai, L.C., (2002).** Physiological responses of non-vascular plants to heavy metals. In: Prasad, M.N.V., Strzałka, K. (Eds.), *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 111–147.
- **Marzluf, G.A., (1970).** Genetic and metabolic controls for sulfate metabolism in *Neurospora crassa*: isolation and study of chromate-resistant and sulfate transport-negative mutants. *J. Bacteriol.* 102, 716–721.
- **Mata TM, Martins AA, Caetano NS (2010).** *Microalgae for biodiesel production and other applications: A review*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:217-232.
- **Mattle D., Sitsel O., Autzen H., Meloni G., Gourdon P. and Nissen P. (2013).** On Allosteric Modulation of P-Type Cu<sup>++</sup>-ATPases. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2013.03.008> Edited by C. Kalodimos.
- **McCormick, P.V., Cairns Jr., J., (1994).** Algae as indicators of environmental change. *J. Appl. Phycol.* 6, 509–526.
- **McGrath, S.P. and Smith, S. (1990).** Chromium and nickel. In: *Heavy Metals in Soils* (Alloway, B.J., Ed.), pp. 125–150. Wiley, New York.
- **Megharaja, M., Ragusa, S.R. and Naidu, R. (2003).** Metal–algae interactions: implication of bioavailability. In: Naidu, R., Gupta, V.V.S.R., Rogers, S., Kookana, R.S., Bolan, N.S. and Adriano, D.C. (eds) *Bioavailability, Toxicity, and Risk Relationships in Ecosystems*, pp. 109–144. Science Publishers, Enfield, New Hampshire.
- **Meyer, J.L., Paul, M.J., Taulbee, W.K., (2005).** Stream ecosystem function in urbanizing landscapes. *J. North Am. Benthol. Soc.* 24 (3), 602–612.

- **Munawar, M., Munawar, I.F., (1987).** Phytoplankton bioassays for evaluating toxicity of in situ sediment contaminants. *Hydrobiology* 149, 87–105.
- **Munn, S.J., Allanou, R., Aschberger, K., Berthault, F., Cosgrove, O., Luotamo, M., Pakalin, S., Paya-Perez, A., Pellegrini, G., Schwarz-Schulz, B., Vegro, S. (Eds.), (2005).** Chromium trioxide; sodium chromate, sodium dichromate, ammonium dichromate, potassium dichromate, EUR 21508EN. In: European Union Risk Assessment Report, Vol. 53. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- **Muradov N, Taha M, Miranda AF, Kadali K, Gujar A, Rochfort S, Stevenson T, Ball AS, Mouradov A (2014).** Dual application of duckweed and azolla plants for wastewater treatment and renewable fuels and petrochemicals production. *Biotechnol Biofuels*. 2014 Feb 28;7(1):30. doi: 10.1186/1754-6834-7-30.
- **Murrell A, Rakyan VK, Beck S, (2005).** From genome to epigenome. *Human Molecular Genetics*, Vol. 14, Review Issue 1 R3–R10 doi:10.1093/hmg/ddi110.
- **Nies, D.H., (1999).** Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 730–750.
- **Nishikawa K., Yamakoshi Y., Uemura I., Tominaga N., (2003).** Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiology Ecology* 1;44(2):253-9.
- **Noctor G, Foyer, (1998).** Ascorbate and Gluthatione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* Jun;49:249-279.
- **Ohtake, H., Silver, S., (1994).** Bacterial detoxification of toxic chromate. In: Chaudhry, G.R. (Ed.), *Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals*. Dioscorides, Portland, OR, pp. 403–415.
- **Oksana I. Leszczyszyn, Hasan T. Imam and Claudia A. Blindauer, (2013).** *Metallomics*, 5, 1146.
- **Paietta, J.V., (1990).** Molecular cloning and analysis of the scon-2 negative regulatory gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 10, 5207–5214.
- **Palmer C. M. and Guerinot M. L., (2009).** *Nat. Chem. Biol.*, 5, 333–340.7.
- **Panda, S.K., Choudhury, S. (2005).** Chromium stress in plants. *Braz. J. Plant Physiol.*17, 95–102.

- **Paris G, (1997).** Fitoplancton: cenni di sistematica, identificazione e conteggio. *Biologia Ambientale*, n° 2.
- **Paul, M.J., Meyer, J.L., (2001).** Streams in the urban landscape. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 32, 333–365.
- **Paul, M.J., Meyer, J.L., (2008).** Streams in the urban landscape. In: Marzluff, J.M., Endlicher, W., Bradley, G., Simon, U., Shulenberger, E., Alberti, M., Ryan, C., ZummBrunen, C. (Eds.), *Urban Ecology*, Springer, New York, pp. 207–232 (Section III).
- **Pawlik-Skowronska, B., (2001).** Phytochelatin production in freshwater algae *Stigeoclonium* in response to heavy metals contained in mining water; effects of some environmental factors. *Aquat. Toxicol.* 52, 241–249.
- **Perales-Vela, H.V., Pena Castro, J.M., Canizares-Villanueva, R.O., (2006).** Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere* 64, 1–10.
- **Pereira, M.J., Resende, P., Azeiteiro, U.M., Oliveira, J., de Figueiredo, D.R. (2005).** Differences in the effects of metals on growth of two freshwater green algae (*Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak and *Gonium pectoral* Müller. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 515–522.
- **Perez-Castiñeira, J.R., Prieto, J.L., Gonzales-Arroyo, J.G., Vega, J.M., (1998).** Kinetic properties of sulfate uptakes in two types of eukaryotic green microalgae. *J. Plant Physiol.* 153, 324–331.
- **Pratyush Daliparthi D., Tiwari S., Kumar A., Singh Surya K. (2012).** A new approach to touch down method using betaine as co-solvent for increased specificity and intensity of GC rich gene amplification. *Gene* 497 (2012) 269–272.
- **Puig, S., Lee, J., Lau, M., and Thiele, D.J. (2002).** Biochemical and genetic analysis of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J. Biol. Chem.* 277: 26021–26030.
- **Ramirez-Ramirez, R., Calvo-Mendez, C., Avila-Rodriguez, M., Lappe, P., Ulloa, M., Vazquez-Juarez, R., Gutierrez-Corona, J.F., (2004).** Cr(VI) reduction in a chromate-resistant strain of *Candida maltosa* isolated from the leather industry. *Antonie van Leeuwenhoek* 85, 63–68.
- **Raskin I. (1996).** IBC Symposium on Phytoremediation, Washington DC, May 8.

- **Rivetta A., Negrini N., Cocucci M. (1997).** Involvement of Ca<sup>2+</sup> - calmodulin in Cd<sup>2+</sup> toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant Cell Environ.* 20,600-608
- **Robinson N. J., Tommey A. M., Kuske C. and Jackson P. J., (1993).** *Biochem. J.*, 295, 1–10.
- **Rodriguez, C., Rocchetta, I., Juarez, A., Tolivia, A., Conforti, V., (2008).** Toxicidad de los metales pesados sobre las microalgas: efectos bioquimicos, fisiologicos y morfologicos. In: Rial, A., Volpedo, A., Fernandez Reyes,L.(Eds.), Efecto de los cambios globales sobre la biodiversidad REDCYTED406RT0285 Efecto de los cambios globales sobre los humedales de Iberoamerica, BuenosAires, Argentina, pp.261–280.
- **Rodriguez-Llorente I. D., Perez-Palacios P., Doukkali B., Caviedes M. A. and Pajuelo E. (2010).** *Plant Sci.*, 178, 327–332.
- **Rüegsegger A., Brunold C., (1992).** Effect of cadmium on g-glutamylcysteine synthesis in maize seedlings. *Plant Physiol.* 99, 428-433.
- **Samantaray, S., Rout, G.R., Das, P., (1999).** Studies on differential tolerance of mungbean cultivars to metalliferous minewastes. *Agribiol. Res.* 52, 193–201.7
- **Samantaray, S., Rout, G.R., Das, P., (2001).** Induction, selection and characterization of Cr and Ni-tolerant cell lines of *Echinocloa colona* (L) in vitro. *J. Plant Physiol.* 158, 1281–1290.
- **Shamsuddoha, A.S.M., Bulbul, A. and Imamul Huq, S.M. (2006).** Accumulation of arsenic in green algae and its subsequent transfer to the soil–plant system. *Bangladesh J. Microbiol.*, 22 (2), 148–151
- **Shanab S., Essa A., Shalaby E., (2012).** Bioremoval capacity of three heavy metals by some microalgae species (Egyptian Isolates). *Plant Signaling & Behavior* 7:3, 1–8; Landes Bioscience.
- **Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S. (2005).** Chromium toxicity in plants. *Environ. Int.* 31, 739–753.
- **Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S. (2005).** Chromium toxicity in plants. *Environ. Int.* 31, 739–753.

- **Shanker, A.K., Djanaguiraman, M., Sudhagar, R., Jayaram, R., Pathmanabhan, G., (2004).** Expression of metallothionein 3 (MT3) like protein mRNA in Sorghum cultivars under chromium(VI) stress. *Curr. Sci. India* 86 (7), 901–902.
- **Shanker, A.K., Pathmanabhan, G., (2004).** Speciation dependent antioxidative response in roots and leaves of Sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench cv CO27) under Cr(III) and Cr(VI) stress. *Plant Soil* 265, 141–151.
- **Siedlecka A. (1995).** Some aspects of interaction between heavy metals and plant mineral nutrients. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 64:265-272.
- **Smodlaka S, (2010).** Modellizzazione della dinamica del fitoplancton nell’alto adriatico. Tesi di Laurea – Università degli Studi di Padova.
- **Specht E, Miyake-Stoner S, Mayfield S (2010).** *Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production.* *Biotechnol Lett.* 32(10):1373-83.
- **Stokes, P.M., (1983).** Responses of freshwater algae to metals. In: Round, F.E., Chapman, D.J. (Eds.), *Progress in Phycological Research*, vol. 2. Elsevier, NY, pp. 87–112.
- **Su C, Lei L, Duan Y, Zhang KQ, Yang J, (2012).** Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93(3):993-1003. doi: 10.1007/s00253-011-3800-7.
- **Sugihara T., Wadhwa R., Kaul S.C. and Mitsui Y. (1999).** A Novel Testis-Specific Metallothionein-like Protein, *Tesmin*, Is an Early Marker of Male Germ Cell Differentiation. *Genomics* 57, 130–136.
- **Takahashi R, Bashir K, Ishimaru Y, Nishizawa NK, Nakanishi H. (2012).** The role of heavy-metal ATPases, HMAs, in zinc and cadmium transport in rice. *Plant Signal Behav.* 2012 Dec;7(12):1605-7.
- **Thacker, U., Madamwar, D., (2005).** Reduction of toxic chromium and partial localization of chromium reductase activity in bacterial isolate DM1. *World J. Microb. Biot.* 21, 891–899.
- **Thanh T. Ngu and Martin J. (2009).** Stillman Metalation of Metallothioneins. *IUBMB Life*, 61(4): 438–446.
- **Torelli A, Marieschi M, Castagnoli B, Zanni C, Gorbi G, Corradi MG, (2008).** Identification of S2-T A63: a cDNA fragment corresponding to a gene

differentially expressed in a Cr-tolerant strain of the unicellular green alga *Scenedesmus acutus*. *Aquat Toxicol.* 2008 Mar 26;86(4):495-507.

- **Tüzel E, Sevim V, Erzan A. (2001).** Strategies for the evolution of sex. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* Dec;64(6 Pt 1):061908. Epub 2001 Nov 21.
- **Tukaj Z, Aksmann A. (2006).** Toxic effects of anthraquinone and phenanthrenequinone upon *Scenedesmus* strains (green algae) at low and elevated concentration of CO<sub>2</sub>. *Chemosphere.* 66(3):480-7.
- **US EPA (2006).** National Recommended Water Quality Criteria. Office of Water, Office of Science and Technology (4304T); <http://epa.gov/waterscience/criteria/nrwqc-2006.pdf>.
- **Vajpayee, P., Sharma, S.C., Tripathi, R.D., Rai, U.N. and Yunus, M. (1999).** Bioaccumulation of chromium and toxicity to photosynthetic pigments, nitrate reductase activity and protein content of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Chemosphere* 39, 2159-2169.
- **Vandegheuchte MB, Janssen CR (2011).** Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2014 Apr;764-765:36-45.
- **Vignati Davide A.L., Dominik Janusz, Beye Mamadou L., Pettine Maurizio, Ferrari Benoit J.D., (2010).** Chromium(VI) is more toxic than chromium(III) to freshwater algae: A paradigm to revise? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73 743–749.
- **Volland S., Lützb C., Michalkec B., Lütz-Meindla U. (2011).** Intracellular chromium localization and cell physiological response in the unicellular alga *Micrasterias*. *Aquatic Toxicology* 109 59– 69.
- **Waldron K. J., Rutherford J. C., Ford D. and Robinson N. J. (2009).** *Nature* 460, 823–830.
- **Wallace, A., Soufi, S.M., Cha, J.W., Romney, E.M., (1976).** Some effects of chromium toxicity on bush bean plants grown in soil. *Plant Soil* 44, 471– 473.
- **Wang, P., Mori, T., Toda, K., Ohtake, H., (1990).** Membrane-associated chromate reductase activity from *Enterobacter cloacae*. *J. Bacteriol.* 172, 1670–1672.
- **Wang, P., Mori, T., Komori, K., Sasatsu, K., Toda, K., Ohtake, H., (1989).** Isolation and characterization of an *Enterobacter cloacae* strain that reduces

hexavalent chromium under anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1665–1669.

- **Wang B, Li Y, Shao C, Tan Y, Cai L. (2012).** Cadmium and its epigenetic effects. *Curr Med Chem.* 2012;19(16):2611-20.
- **Weckesser, J., Hofman, K., Jurgens, U.J., Whitton, B.A., Raffelsberger, B., (1988).** Isolation and chemical analysis of the sheaths of the filamentous cyanobacteria *Calothrix parietina* and *C. scopulorum*. *J. Gen. Microbiol.* 134, 629–634.
- **Wei L. P., Donat J. R., Fones G., Ahner B. A., (2003).** Interactions between Cd, and Cu, and Zn influence particulate phytochelatin concentrations in marine phytoplankton: laboratory results and preliminary field data. *Environ. Sci. & Technol.* 37, 3609-3618.
- **Wei, D., Kisuno, A., Camella, T., Urano, K., (2006).** A new method for evaluating biological safety of environmental water with algae, daphnia and fish toxicity ranks. *Sci. Total Environ.* 371, 383–390.
- **Wong S. L., Nakamoto L., Wainwright J. F., (1994).** Identification of toxic metals in affected algal cells in assays of wastewaters. *Journal of Applied Phycology* 6: 405-414.
- **Yoshida N., Ishii K., Okuno T., Tanaka K. (2006).** Purification and characterization of cadmium-binding protein from unicellular alga *Chlorella sorokiniana*. *Current Microbiology*, 52, 460-463.
- **Zenk MH, (1996).** Heavy metal detoxification in higher plants. *Gene* 179:21-30.



Vol.3, No.2, 102-108 (2013)  
doi:10.4236/oje.2013.32012

Open Journal of Ecology

## **Trace metals in *Posidonia oceanica* in a coastal area of the Ionian Sea (Calabria, Italy)**

**Radiana Cozza<sup>\*</sup>, Adele Iaquina, Davide Cozza, Luisa Ruffolo**

Dipartimento di Biologia, Ecologia e Scienze della Terra, Università della Calabria, Arcavacata di Rende, Cosenza, Italy;

<sup>\*</sup>Corresponding Author: [radiana.cozza@unical.it](mailto:radiana.cozza@unical.it)

Received 25 January 2013; revised 26 February 2013; accepted 22 March 2013

*Journal of Water Resource and Protection*, 2013, \*, \*\*  
doi:10.4236/jwarp.2013.\*\*\*\*\* Published Online \*\* 2013 (<http://www.scirp.org/journal/jwarp>)

 Scientific  
Research

## **Phytoplankton Communities in a Coastal site of Natural Reserve “Lake of Tarsia-Mouth of river Crati”- Northern Ionian Sea, Calabria (Italy)**

**Alessandra Giulia Chiara Marincola, Luisa Ruffolo, Davide Cozza, Radiana Cozza**  
Department of Biology, Ecology and Earth Science, University of Calabria, Arcavacata di Rende, Italy  
e-mail: [radiana.cozza@unical.it](mailto:radiana.cozza@unical.it)

Received 4/09/2013

## **Ringraziamenti**

Giuro che non volevo farli ma voi cosa avreste letto? Guardare solo le figure era veramente un'operazione da 30 secondi, così arriverete almeno a 3 minuti e sarà più facile dire: bel lavoro, interessante, bravo, etc. etc. etc.

Scherzi a parte, alla fine della terza tesi della mia vita, la più difficile di tutte, non potevo esimermi dal ringraziare chi a suo modo ha contribuito alla stesura di questo lavoro.

Ringrazio quindi la Prof.ssa Cozza per la guida, il sostegno e la pazienza in questi 3 anni e ringrazio tutti coloro i quali hanno contribuito ad ampliare la sfera delle mie conoscenze.

Ringrazio tutti i colleghi, soprattutto Antonella, con la quale ho condiviso una bellissima esperienza di vita all'estero che mi ha dannatamente fatto capire quanto sia cosentino doc!

Ringrazio tutti i ragazzi che hanno lavorato al mio fianco, in primis Michele, che è stato il miglior attore non protagonista dell'epopea che ha riguardato lo studio molecolare.

Ringrazio Giovanni e Federico che con il loro affetto hanno reso sempre tutto più facile.

Ringrazio tutti i miei amici che hanno ascoltato spesso le mie sfuriate, pur non capendo nulla di quello che dicevo, non perché stessi delirando ma perché la biologia è per pochi!

Ringrazio la mia famiglia, che mettere in coda non vuol dire niente ma è solo perché sono sicuro che loro ci saranno sempre, nella buona e nella cattiva sorte.

Questa tesi è dedicata a Federico che poco più di un anno fa ci ha lasciati. Non ho ancora trovato una spiegazione per quello che è accaduto, forse quelli come lui non sono fatti per stare fra i comuni mortali. Certo che mi è mancato tanto, troppo e che di gente come lui ce ne vorrebbe tanta per far girare il Mondo nel verso giusto.

Non so cosa mi riserverà il futuro, non so se essere un dottore di ricerca alla fine aiuterà la mia carriera ma di cose ne ho imparate. Ho imparato che non bisogna mai scoraggiarsi ma che di passioni spesso non si campa, che il mondo del lavoro è duro, che a pensar male è peccato ma spesso ci si azzecca.

Buona fortuna a me, buona fortuna a tutti! #vediamopositivo