



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN

" BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA ED ECOLOGIA "

CICLO XXXVI

***Meccanismi di tolleranza al cromo in alghe verdi unicellulari
d'acqua dolce: ruolo del metabolismo del solfato***

Settore Scientifico Disciplinare BIO/01

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Viaroli Pierluigi

Tutore:

Chiar.ma Prof.ssa Torelli Anna

Chiar.mo Prof. Bolpagni Rossano

Dottorando: Molinari Giuseppe

Anni Accademici 2020/2021 – 2022/2023

Sommario

Abstract	5
1 Introduzione	6
Metalli pesanti	6
1.1.1 Effeti tossici metalli pesanti	7
1.1.2 Risposte alla tossicità dei metalli pesanti	8
1.2 Cromo	11
1.2.1 Mobilità.....	13
1.2.2. Caratteristiche chimico/fisiche	14
1.2.3 Effetti tossici del cromo.....	14
1.2.4 Risposte alla tossicità del cromo.....	16
1.2.5 SIR/SED	17
1.3 Pathway dello zolfo	19
1.3.1 Arilsolfatasi	19
1.3.2 Trasportatori del Solfato	20
1.3.3. Assimilazione	22
1.3.3.1 ATS	23
1.3.3.2 APR.....	24
1.3.3.3 SIR	24
1.3.3.3 CSC.....	25
Produzione di H₂S ed attività desulfidrasica	27
1.4 Scenedesmus acutus	28
2 Materiali e Metodi	32
2.1 Preparazione terreno di coltura.....	32
2.2 Deprivazione di zolfo e risposta al trattamento con cromo.....	33
2.3 Estrazione di DNA genomico	34
2.4 Quantificazione del DNA genomico.....	35
2.5 Elettroforesi del DNA su gel di agarosio	36
2.6 Eluizione da gel di agarosio.....	36
2.7 Estrazione RNA totale	36
2.8 Precipitazione dell'RNA con LiCl	37
2.9 Quantificazione RNA.....	38
2.10 Reazione di DNAsi.....	38
2.11 Retrotrascrizione dei campioni trattati con DNAsi	39
2.12 Identificazione dei geni di interesse e progettazione dei primer	40
2.13 Multiplex PCR	42

2.14 Saggio attività enzimatica	45
2.14.1 Preparazione estratto grezzo	45
2.14.2 Quantificazione proteine totali	46
2.14.3 Saggio attività OAS-TL	46
2.14.4 Saggio attività cisteina desulfidrasica	47
2.15 Sequenziamento	48
2.16 Analisi bioinformatica e statistica	48
2.17 Campionamento presso sorgenti di acquifero ofiolitico.....	49
2.18 Selezione delle singole colonie sterili	50
2.19 Test ecotossicologico	50
2.20 Riconoscimento attraverso chiavi morfologiche	51
2.21 Identificazione tramite analisi DNA Barcoding	51
2.22 Test di tolleranza al cromo	53
Scopo del lavoro	54
3 Risultati e discussione.....	55
3.1 Prima Parte	55
3.1.1 Analisi dell'Espressione dei Geni Responsabili della Sintesi di Cisteina	55
3.1.2 O-ACETILSERINA-TIOLO-LIASI	59
3.1.3 Cisteina Desulfidrasa.....	70
3.2 Seconda Parte	79
3.2.1 Test ecotossicologico	79
3.2.2 Isolamento dei ceppi algali	82
3.2.3 DNA barcoding e sequenziamento	84
3.2.4 Test di tolleranza al cromo	91
5 Conclusioni	98
Parte uno	98
Parte due	99
6 Riferimenti Bibliografici	100

Abstract

La disponibilità di zolfo e il suo metabolismo, in particolare i prodotti terminali del pathway come cisteina e glutatione giocano un importante ruolo nella tolleranza da metalli pesanti, cromo compreso, in particolare nella detossificazione dello stress ossidativo che la riduzione dei metalli pesanti spesso comporta, fenomeno noto come Sulfur Enhanced Defence (SED).

Nella prima parte di questo progetto abbiamo investigato il ruolo degli enzimi coinvolti nella sintesi di cisteina in due ceppi con differente tolleranza al Cr(VI) di *Scenedesmus acutus*. Infatti, in seguito ad un periodo di deprivazione di zolfo seguito da un ripristino dei nutrienti, entrambi i ceppi mostrano un' aumentata tolleranza al cromo e concentrazione più alte di cisteina libera, aumento particolarmente forte nel ceppo Cr-tollerante. L'aumento dell'attività di sintesi di cisteina trovato è in linea con l'aumentata espressione dei geni coinvolti nel complesso cisteina sintasi, in particolare *SaSAT1*, *SaOAS-TL2* e *SaOAS-TL4*. L'analisi delle possibili fonti di solfuro ha evidenziato una differenza nei livelli di espressione dell'enzima D-cisteina desulfidasi fra i due ceppi, inoltre questa attività è maggiore in tutte le condizioni testate rispetto all'attività L-cisteina desulfidasi, differenza particolarmente accentuata nel ceppo cromo tollerante. Una differente regolazione fra i due ceppi dei livelli di D-cisteina potrebbe essere alla base del grande aumento dei livelli di questo aminoacido al ripristino dei nutrienti dopo un periodo di deprivazione di zolfo, dal momento che la forma D è, al contrario della forma L, esclusa dai sistemi di regolazione a feedback negativo del pathway del solfato.

La seconda parte del progetto si proponeva di verificare se l'aumento della produzione di cisteina fosse un meccanismo comune anche in altre specie algali adattate ad ambienti sottoposti a stress da cromo. Per fare ciò abbiamo isolato e identificato differenti specie di microalghe dalle sorgenti del monte Prinzerà, montagna di origine ofiolitica vicino a Parma, Italia, dove le concentrazioni medie di cromo esavalente registrate durante l'anno sono pari a 12 Cr(VI) µg/L. L'analisi di tolleranza al cromo effettuata su alcune delle specie isolate ha confermato una tolleranza a concentrazioni di cromo superiori a quelle presenti nelle acque campionate. Comparando la tolleranza al cromo di due ceppi dell'alga *Chromochloris zofingiensis* (ceppo isolato dalla sorgente del monte Prinzerà e ceppo commerciale CCAP 211/14) abbiamo verificato come, per quanto questa specie sembri naturalmente poco sensibile ai metalli pesanti, l'ecotipo isolato mostri una maggiore tolleranza, e sia quindi un organismo adatto per espandere gli studi sulla tolleranza al cromo esavalente.

1 Introduzione

Metalli pesanti

Ad oggi, come dimostrano differenti tentativi che si sono succeduti negli anni, ancora non esiste una definizione univoca di metallo pesante. Una definizione univoca non è argomento banale dal momento che il termine, e liste varie di metalli pesanti, vengono usati anche in ambito legale (Duffus, 2002). Sono state fatte negli anni differenti proposte di suddivisione e categorizzazione, come per esempio quella portata da Appenroth nel 2010, di dividere i metalli pesanti in tre categorie: i metalli di transizione, i metalli delle terre rare e un gruppo eterogeneo formato principalmente da metalloidi ed elementi formanti ossidi anfoteri chiamato gruppo del piombo (Appenroth, 2010). Nel lavoro di Ali e Khan (2018) troviamo non solo un'approfondita panoramica sugli eventi storici sulla questione ma anche la definizione oggi più comunemente usata di metallo pesante in biologia e nelle scienze ambientali, ovvero metalli con una densità maggiore di 5g/cm^3 e un numero atomico superiore a 20 (H. Ali & Khan, 2018). Nonostante questo, ancora oggi in molti lavori l'arsenico, un non metallo, viene spesso incluso fra i metalli pesanti (Carrillo & Borthakur, 2021; Kumar et al., 2015). A livello ancora più pratico e generale, molti lavori che parlano generalmente di metalli pesanti si vanno a concentrare su quel gruppo di elementi, As, Pb, Cr, Cd, Hg, Cu, Zn e pochi altri, particolarmente inquinanti e la cui concentrazione in suoli e acque è molto aumentata negli ultimi decenni per effetto antropico. I metalli pesanti sono infatti ubiquitari nell'ambiente ma la loro presenza nella crosta terrestre, quando non sregolata dall'attività umana, è spesso in tracce, rappresentando per la maggior parte dei casi, con l'eccezione di ferro e alluminio, meno dello 0,1% in peso (Kumar et al., 2015).

Le principali sorgenti di contaminazione da metalli pesanti nell'ambiente sono imputabili sia a cause naturali, sia a fattori antropogenici. Le cause umane sono differenti e sono spesso il motivo delle forme di inquinamento più grave. Fra le principali cause antropiche troviamo: attività industriali, scarichi di fanghi contaminati da impianti di trattamento delle acque reflue, uso di concimi chimici e attività agricole, estrazione e purificazione dei minerali (Chai et al., 2021; Kumar et al., 2015; Luo et al., 2009; Satarug et al., 2003).

I metalli pesanti possono essere divisi in due grandi categorie, quelli essenziali alla crescita di un organismo, fondamentali per la formazione di enzimi e proteine, e quelli non essenziali. Limitandoci

a considerare gli organismi vegetali, fra i metalli essenziali troviamo: Fe, Mn, Zn, Cu, Mg, Mo e Ni, mentre fra i non essenziali, o comunque con funzioni biologiche e fisiologiche non ben delineate, abbiamo: Cd, Sb, Cr, Pb, As, Co, Ag, Se e Hg. Ovviamente anche i metalli considerati essenziali, se presenti in eccesso, possono risultare tossici (Emamverdian et al., 2015).

1.1.1 Effetti tossici metalli pesanti

I metalli pesanti possono avere effetti citotossici, genotossici e mutageni. I metalli pesanti, inoltre, data solitamente la difficoltà degli organismi nello smaltirli, vanno frequentemente incontro a fenomeni di bioaccumulo e, a seguire, di biomagnificazione.

Il bioaccumulo è quel meccanismo attraverso il quale gli organismi assimilano e immagazzinano sostanze tossiche ad una velocità maggiore rispetto alla capacità di smaltirle. Di conseguenza, c'è un incremento progressivo della loro concentrazione interna rispetto all'ambiente esterno (Clemens Stephan, 2001; Pinto et al., 2003; X.-E. Yang et al., 2005). L'accumulo all'interno del singolo organismo ha come conseguenza naturale il progressivo aumento dei livelli della sostanza lungo la catena trofica, fenomeno noto come biomagnificazione (Chai et al., 2021; Macfarlane & Burchett, 2001; Satarug et al., 2003). La conseguenza ovvia è che questi metalli, una volta rilasciati nell'ambiente, partendo dai produttori primari percorrono la catena alimentare, finendo per influenzare anche la dieta umana e la nostra salute (Balkhair & Ashraf, 2016; Jitar et al., 2015).

I metalli pesanti sono noti per catalizzare la formazione di ROS, che includono radicali liberi come l'anione superossido, il radicale idrossile, e il perossido di idrogeno. Questi composti altamente reattivi possono danneggiare cellule e tessuti attraverso vari meccanismi (Chai et al., 2021; Flora et al. 2008, n.d.; Vannini et al., 2011). I principali effetti dati da concentrazioni elevati di ROS sono: perossidazione lipidica, che va a danneggiare gli acidi grassi insaturi nelle membrane cellulari, portando alla loro degradazione e compromettendo l'integrità cellulare; modificazione delle proteine, che può riguardare amminoacidi critici, alterandone quindi la struttura e la funzione; danno ossidativo al DNA, con varie tipologie di lesioni possibili, come rotture del filamento, mutazioni, cross-linking e modificazioni della topologia, che possono portare a mutazioni o morte cellulare. (S. Ali et al., 2013; D. Liu et al., 2008).

Un aumento non controllato delle ROS può portare, oltre alle tipologie di danno appena descritte, anche effetti indiretti. Il metabolismo cellulare, infatti, attraverso processi come la fotosintesi e la respirazione, contribuisce naturalmente alla generazione di ROS, con vari percorsi metabolici e

reazioni enzimatiche coinvolti in tale produzione (Akter et al., 2021). Le ROS non vengono solo prodotte in modo passivo, come conseguenza del normale metabolismo, ma anche attraverso l'azione di ossidasi specifiche. Queste molecole sono centrali per la cellula e in ogni compartimento cellulare, nucleo compreso, si trovano differenti pathway che utilizzano le ROS come molecole segnale (Baxter et al., 2014; Mittler et al., 2004, 2022). Un loro squilibrio può quindi avere come conseguenze anche una de-regolazione di differenti pathway metabolici.

Un eccessivo accumulo di metalli pesanti può portare alla diminuzione dell'attività fotosintetica delle cellule vegetali (Andosch et al., 2015; Pandey & Sharma, 2003; Volland et al., 2012, 2014). Dato l'ovvio ruolo della fotosintesi per la crescita e la sopravvivenza delle piante, la sua inibizione da parte dei metalli pesanti può portare a una riduzione della crescita cellulare, oppure, nei casi di esposizione prolungata o ad alte concentrazioni, alla morte della cellula (Burkhardt et al., 2001; Sundarmoorthy et al., 2015; Xie et al., 2005).

1.1.2 Risposte alla tossicità dei metalli pesanti

Le strategie che le cellule vegetali introducono per fare fronte al pericolo posto dalla contaminazione dei metalli pesanti sono molteplici. Per semplificare possiamo però raggrupparle in tre grandi categorie: riduzione dell'assorbimento, chelazione e sequestro delle sostanze tossiche, attenuazioni dello stress ossidativo.

1.1.2.1. Riduzione dell'assorbimento

Barriere fisiche, come le pareti cellulari, possono accumulare metalli pesanti, legati a proteine o silicati, come è stato visto per *Silene vulgaris* (Bringezu et al., 1999). Cationi bi o trivalenti possono anche legarsi ai gruppi carbossilici delle pectine. La parete cellulare agisce da ovvia barriera fisica, tuttavia il ruolo più attivo nella difesa dai metalli pesanti operato dalla parete rimane ad oggi controverso e non approfondito (Ejaz et al., 2023).

Anche essudati cellulari possono diminuire l'assorbimento andando a chelare all'esterno della cellula i composti tossici o modificandoli in specie meno mobili (J. L. Hall, 2002)

Per quanto riguarda l'assorbimento e il trasporto selettivo, esistono differenti classi di trasportatori di metalli coinvolti nell'assorbimento e nell'omeostasi generale di questi elementi, che possono quindi andare a giocare un ruolo chiave nella tolleranza. Esempi includono le ATPasi di tipo CPx, implicate nel trasporto di metalli essenziali e potenzialmente tossici come Cu, Zn, Cd e Pb,

trasportatori della famiglia Nramp, legati al trasporto di ioni metallici bivalenti, che giocano un ruolo nell'assorbimento di Fe e Cd. La loro alterazione può aumentare la resistenza al Cd o, se sovraespressi, portare a ipersensibilità (Bastien Thomine et al., 2000). Alcune proteine della Famiglia CDF, coinvolte nel trasporto di Zn, Cd e Co funzionano nell'assorbimento di metalli pesanti, altre nel loro efflusso, trovandosi nelle membrane plasmatiche o intracellulari. Nel genoma di *A. thaliana* sono stati identificati 15 geni appartenenti ai trasportatori della famiglia ZIP, capaci di trasportare ferro, zinco, manganese e cadmio (Williams et al., n.d.; Yang et al., 2005).

1.1.2.2 Chelazione e sequestro

La chelazione riduce la reattività degli ioni metallici ed è quindi uno strumento fondamentale per ridurre la tossicità indotta dai metalli pesanti. Le molecole chelanti si distinguono in due principali categorie: molecole ad alto peso molecolare e molecole a basso peso molecolare (Carrillo & Borthakur, 2021).

Fra i ligandi ad alto peso molecolare i principali esponenti sono: polisaccaridi, fitochelatine e metallotioneine. Modificazioni dei polisaccaridi di parete e un ispessimento della parete cellulare sono risposte comuni alla tossicità da metalli pesanti. Ma non è solo un aumento della robustezza strutturale: cellulosa, emicellulosa e pectina hanno funzione chelante su differenti metalli (Carrillo & Borthakur, 2021).

Le fitochelatine sono brevi sequenze peptidiche sintetizzate dalla fitochelatina sintasi (PC sintasi) a partire dal glutatione, molecola con struttura $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n = 2-11$). La PC sintasi viene stimolata dalla presenza di metalli pesanti; tuttavia, una sovraespressione forzata di fitochelatine può aumentare la sensibilità ai metalli, come dimostrato in piante di *A. thaliana* da Lee e colleghi (Lee et al., 2003). Per questo fenomeno controintuitivo vengono proposti in questo lavoro differenti spiegazioni, fra cui la possibile tossicità dei componenti delle fitochelatine, in particolare la cisteina, e una possibile eccessiva chelazione anche degli elementi essenziali alla cellula. Anche un eccessivo consumo di glutatione per la sintesi di fitochelatine potrebbe essere la causa di un' aumentata sensibilità ai metalli. Il glutatione rappresenta infatti solitamente la prima linea di difesa dal danno ossidativo, mentre le fitochelatine entrano in gioco in un secondo momento, insieme alle superossido dismutasi e alle catalasi, enzimi preposti a controllare i livelli delle ROS una volta che queste molecole si sono formate (Jozefczak et al., 2014).

Le metallotioneine sono piccole proteine (4-8 kDa) presenti sia in piante che animali, anche se gli organismi vegetali presentano solitamente famiglie di questo enzima più grandi e complesse. Sono solitamente composte da due regioni ricche in cisteina unite da una regione linker. La struttura di queste proteine viene stabilizzata dal legame con ioni metallici, da qui la sua elevata capacità chelante. In *A. thaliana* è stata osservata forte induzione del gene MT2 in seguito ad esposizione a Cu; in differenti esperimenti di complementazione di mutanti per le metallotioneine si è osservato un aumento della tolleranza ai metalli pesanti quando queste proteine venivano espresse (Kumar et al., 2015). Tuttavia, ad oggi, non abbiamo ancora una comprensione completa della regolazione trascrizionale delle metallotioneine e del loro ruolo nell'omeostasi dei metalli.

Come abbiamo detto, oltre ai chelanti ad alto peso molecolare appena descritti, le cellule fanno ampio uso anche di chelanti a basso peso molecolare; come: acido malico e acido malonico, glutatione e differenti aminoacidi, fra cui: istidina, prolina, serina, glicina e cisteina (Ejaz et al., 2023; Kocaman, 2023), ed altri aminoacidi non proteinogenici (Bloem et al., 2015, Z. Yang et al., 2022).

La nicotinamide e l'acido mugineico sono coinvolti principalmente nell'omeostasi del ferro. Diversi tipi di stress abiotico portano ad alti livelli di prolina; tuttavia, ad oggi non si è ancora certi se la sua azione sia di tipo chelante oppure se abbia un effetto più indiretto. L'istidina è un chelante a basso peso, comune e molto interessante; infatti, rispetto ai chelanti principali cui abbiamo accennato prima, con l'eccezione della prolina, non contiene zolfo e presenta quantità minori di azoto. L'istidina potrebbe quindi fare parte di quelle molecole che intervengono in caso congiunto di stress causato da concentrazioni elevate di metalli pesanti e stress dati da carenza di nutrienti. Gli effetti dell'unione di questi due differenti tipi di stress è argomento poco studiato nonché una delle più importanti lacune nella nostra conoscenza dei processi di omeostasi dei metalli (Carrillo & Borthakur, 2021). È noto che la glutammina sia un precursore della sintesi dell'istidina (Winkler & Ramos-Montañez, 2009) e in *A. thaliana* si è osservato un aumento di glutammina in seguito a deprivazione di zolfo (Nikiforova et al., 2006). Questo potrebbe per esempio indicare una sostituzione dei chelanti tiolici con l'istidina in caso di stress congiunto.

1.1.2.3 Attenuazione dello stress ossidativo

Le HSPs, (Heat Shock Proteins) sono una classe di proteine chaperonine la cui principale funzione è quella di evitare la denaturazione di altre proteine, andando a stabilizzare il corretto folding durante

fenomeni di shock termico e stress ossidativo. È stato dimostrato che alti livelli di metalli pesanti portino ad un aumento dell'espressione delle HSPs. (Kumar et al., 2015)

I miRNA (micro RNA) sono molto importanti per la regolazione genica. I miRNA partecipano alla regolazione genica attraverso taglio targettizzato e repressione della traduzione degli mRNA. Differenti miRNA specifici per stress da metallo pesante sono stati trovati nelle piante. In *B. napus* l'aumento dell'espressione di miRNA395 ha portato ad un minore stress ossidativo da Cd e, quando esposte al cadmio, queste piante mostravano un aumento delle concentrazioni cellulari di glutatione e di altre forme di tioli non proteici, insieme ad una maggiore espressione dei trasportatori del solfato SULTR 1(Noman & Aqeel, 2017).

Le cellule possono anche convertire le ROS in molecole meno tossiche(Pinto et al., 2003). La superossido dismutasi (SOD) è un enzima antiossidante fondamentale in questo contesto, ha varie isoforme, tra cui FeSOD, MnSOD, CuZnSOD e NiSOD, che differiscono in termini di struttura, origine e localizzazione cellulare (Wolfe-Simon et al., 2005). La CuZnSOD, ad esempio, si trova prevalentemente nel citosol, nei cloroplasti e nei mitocondri (Abreu & Cabelli, 2010; Gill et al., 2015). Queste isoforme convertono le ROS in molecole meno reattive, prevenendo ulteriori danni (Kehrer, 2000). Catalasi (CAT), ascorbato perossidasi (APX) e glutatione reduttasi (GR) sono altri importanti enzimi che si attivano per fornire un effetto antiossidante(Emamverdian et al., 2015).

1.2 Cromo

Il cromo, elemento con numero atomico 24 posizionato nel gruppo VI-B della tavola periodica, possiede un peso atomico di 51,996 e una densità di 7,19 g/cm³. Tra gli elementi, occupa il settimo posto in termini di abbondanza sulla crosta terrestre. La sua scoperta avvenne nel 1798 grazie al chimico francese Vauquelin, che lo individuò nel minerale crocoite, (Shanker et al., 2005; Zayed & Terry, 2003).

Il cromo è presente in vari stati di ossidazione nell'ambiente ma si manifesta principalmente nelle due forme più stabili: trivalente, Cr(III), ed esavalente, Cr(VI) (Kotasâ & Stasicka, 2000).

Le concentrazioni ambientali di cromo mostrano una notevole variabilità a seconda del contesto geografico e del tipo di compartimento ambientale. Nel suolo, le concentrazioni di cromo variano tipicamente tra 10 e 50 mg/kg, ma possono raggiungere livelli estremamente elevati, fino a 2200 –

2650 mg/kg, in terreni specifici come rocce ultramafiche e terreni serpentini (Chrysochoou et al., 2016). Le concentrazioni in acque dolci in aree ultramafiche si attestano generalmente tra 0,2 e 180 µg/L, valore quindi quasi sempre superiore al limite di 5 µg/L imposto in Italia e spesso anche superiore a quello di 50 µg/L imposto dalla World Health Organization (WHO) (Tumolo et al., 2020); solitamente la frazione di cromo esavalente si attesta attorno all'80% del cromo totale (Chrysochoou et al., 2016). Nelle aree fortemente industrializzate, le concentrazioni di cromo possono essere significativamente più alte. Ad esempio, in diversi suoli di aree industrializzate indiane si riscontrano livelli di cromo trivalente dai valori simili a quelli che si trovano in ambienti ultramafici, con quantità che possono avere picchi oltre i 3000 mg/Kg (Ratnalu et al., 2022). Anche in Europa livelli di cromo fra 70-90 mg/Kg non sono infrequenti, sia per cause naturali che antropiche, come uno scorretto smaltimento delle scorie del processamento dei minerali o dei prodotti di scarto delle industrie conciarie (Tumolo et al., 2020). Le concentrazioni nelle acque reflue delle industrie sono severamente regolamentate ma i limiti concessi sono molto superiori a quelli che si trovano in natura, si parla di 1000 µg /L per il cromo esavalente, la forma maggiormente regolamentata, e 5000 µg /L per i livelli di cromo totale, con limiti anche più alti per particolari industrie (Singh et al., 2022).

Nel settore industriale, oltre il 60% della produzione mondiale di cromo viene impiegato nella fabbricazione di leghe e acciaio inossidabile. Le nazioni dove si ha un maggiore utilizzo industriale di questo metallo sono Kazakistan, Sud Africa, Cina ed India (Wakeel et al., 2020). L'uso del cromo si estende anche a settori quali la concia dei pellami, la chimica specializzata e la conservazione del legno (Dixit et al., 2002; Khan, 2001). In particolare, gli scarichi di aziende di tintura e di deposizione elettrochimica sono tra le principali responsabili del rilascio di cromo in acque, aria e suoli (Ardila et al., 2017; Chai et al., 2021; Crini & Lichtfouse, 2019; Tchounwou et al., 2012). Questo ampio utilizzo del cromo ha portato perciò a significative conseguenze di carattere ambientale. Si è infatti osservato un aumento progressivo dei livelli di cromo biodisponibile nel nostro ecosistema negli ultimi decenni (Shanker et al., 2005). Nonostante la sua importanza e le sue evidenti implicazioni ambientali, la ricerca scientifica sul cromo non ha raggiunto lo stesso livello di approfondimento riservato in passato ad altri metalli tossici (Shanker et al., 2005). Nell'ultimo decennio invece sono aumentati molto i dati a disposizione sul cromo, sulle sue origini e sulle metodologie di danno, questo da quando è stata riconosciuta la sua pericolosità, tanto che la United States Environmental Protection Agency (USEPA) lo ha inserito fra le 14 sostanze più pericolose per gli organismi viventi (Sharma et al., 2020). Rimangono comunque moltissime zone d'ombra ed è quindi ancora pressante la necessità di una maggiore comprensione degli impatti ambientali e sanitari associati al cromo, enfatizzando la

necessità di ricerche più approfondite e specifiche in questo ambito.

1.2.1 Mobilità

Il Cr(III) ha un ruolo essenziale nel metabolismo degli esseri umani e degli animali dove è importantissimo per il metabolismo di tutti i macronutrienti, (Bai et al., 2015; Eskin NA, 2016; Sahu et al., 2013; Sharma et al., 2020), la WHO consiglia un'assunzione giornaliera tra i 50 e i 200 µg di Cr(III) al giorno per un uomo adulto (WHO Denmark 2000). A dosi superiori anche il Cr trivalente pone un rischio per la salute, ma il cromo esavalente rimane dalle 10 alle 100 volte più tossico per l'uomo (Sharma et al., 2020).

Non essendo invece, come già accennato, essenziale per la fisiologia delle piante, le cellule vegetali, contrariamente a quelle animali, mancano di pathway di assorbimento e assimilazione specifici per questo elemento. Entrambe le forme stabili del cromo (Cr(III) e Cr(VI)) presentano comunque un certo grado di assorbimento da parte delle cellule vegetali. Le forti differenze chimico/fisiche presenti fra le due specie fanno tuttavia sì che cromo esavalente e cromo trivalente utilizzino meccanismi differenti per l'ingresso all'interno della cellula vegetale. L'assorbimento del Cr trivalente è infatti principalmente di tipo passivo (Shanker et al., 2005), mentre il cromo esavalente entra all'interno della cellula grazie al trasporto attivo. Il trasporto attivo nonostante la mancanza di trasportatori specifici è possibile grazie alla somiglianza degli ioni cromato con altri anioni che invece sono fondamentali per la pianta. Il tipo di trasportatori prevalentemente sfruttato dal cromo esavalente sono infatti i trasportatori del solfato e del fosfato. La relazione tra cromo e zolfo è infatti un argomento cruciale in molteplici studi e parte di questa relazione si basa sulla notevole somiglianza nelle caratteristiche chimico-fisiche degli anioni cromato e solfato (Cervantes et al., 2001; Kotasá & Stasicka, 2000). L'assorbimento del cromato attraverso i trasportatori per il solfato è stato osservato in una vasta gamma di organismi, non solo piante ma anche batteri, lieviti e mammiferi (Holland & Avery, 2011). La competizione data dalla similitudine delle strutture porta alla conseguenza che l'esposizione al cromo induce effetti simili a quelli della carenza di zolfo, sia a livello di trasportatori che in alcuni passaggi del successivo percorso di assimilazione (Pereira et al., 2008).

1.2.2. Caratteristiche chimico/fisiche

La stabilità, solubilità e tossicità dei due stati ossidativi più stabili del cromo variano enormemente. Il Cr(III) si trova principalmente sotto forma di idrossidi, ossidi e solfati, in particolare nei suoli, mentre la forma più comune del Cr(VI) è legata all'ossigeno in cromati o dicromati, entrambe forme con un notevole potenziale ossidante (Shanker et al., 2005; Singh et al., 2022). Il Cr(VI) possiede una elevata mobilità, mentre il Cr(III) tende a essere meno mobile e mostra una maggiore affinità con la materia organica rispetto alla forma esavalente (Becquer et al., 2003). È interessante notare che l'ambiente circostante può influenzare la transizione tra queste due forme; in particolare, il Cr(VI) può ridursi a Cr(III) in presenza di composti organici, soprattutto in ambienti con pH acido dal momento che la reazione di riduzione richiede il consumo di protoni (Choppala et al., 2013). In generale, la biodisponibilità dei metalli pesanti aumenta al diminuire del pH del terreno di coltura. (S. Ali et al., 2011; Choppala et al., 2013). Nello studio di Ali e colleghi del 2011, su piante di Orzo, è stato evidenziato come il cromo esavalente abbia un effetto maggiore sulla crescita della pianta quando posta in un terreno con pH 4 rispetto ad un terreno con pH neutro. L'adsorbimento, che riflette la disponibilità di specie libere di Cr(VI) nel suolo, non solo è stato dimostrato aumentare a pH compresi fra 2 e 7 ma anche in terreni con alti contenuti di ferro ed alluminio. (Choppala et al., 2013).

1.2.3 Effetti tossici del cromo

Sono tre i principali meccanismi con cui il cromo porta a danno cellulare. Il primo è la già accennata competizione per ioni fondamentali per la cellula, come fosfato e solfato. Le altre due tipologie di danno invece sono: la produzione di ROS, con conseguente danno ossidativo e il danno diretto al DNA; quest'ultima, diversamente dalle prime due, legata in particolare alla forma trivalente del cromo (Fang et al., 2014).

1.2.3.1 Formazione di specie reattive dell'ossigeno

Ad oggi si ritiene che quello dato dalle specie reattive dell'ossigeno sia il la tipologia di danno di maggiore entità imputabile alla tossicità del cromo, nello specifico alla forma esavalente (S. Ali et al., 2011; Shahid et al., 2017) (D. Liu et al., 2008; Ma et al., 2016; Unal et al., 2010). Si ritiene infatti che l'aumento della concentrazione di ROS sia da attribuirsi principalmente alla riduzione del Cr(VI) a Cr(III) (Fang et al., 2014; Medeiros et al., 2003; Vignati et al., 2010; Yu et al., 2007; X. H. Zhang et al., 2007). Esperimenti condotti su cellule di lievito e linee cellulari umane Jurkat usando cromo esavalente e cromo trivalente uniti ad un forte agente riducente (DTT) sembrano confermare questo dato. La presenza del DTT porta ad un aumento dei danni al DNA quando usato assieme al Cr(VI), rispetto all'esposizione del DNA al solo Cr(VI). Questo non avviene invece per il Cr(III), dove la presenza del DTT porta anzi ad una blanda diminuzione dei danni registrati al DNA (Fang et al., 2014).

1.2.3.2 Danno diretto a proteine e DNA

I metalli pesanti possono legarsi direttamente al DNA, formando addotti che possono causare mutazioni o impedire la replicazione e la trascrizione. Sia cromo trivalente che esavalente portano a danni al DNA, ma il cromo trivalente in misura maggiore (Fang et al., 2014). L'interazione del cromo con il DNA può alterare la sua conformazione, influenzando la stabilità del genoma e la funzione dei cromosomi. Inoltre, test effettuati con bromuro di etidio, sembrerebbero indicare che, mentre il Cr(VI) possiederebbe proprietà intercalanti, il Cr(III) andrebbe invece a modificare la topologia delle molecole di DNA, a livello tale da rendere impossibile l'intercalazione del DNA con le molecole di bromuro di etidio (Fang et al., 2014). Modifiche topologiche di questo tipo possono andare ad influenzare i meccanismi di riparazione del DNA, aumentando il rischio di accumulo di danni genetici.

Oltre che con il DNA, le diverse forme del cromo interagiscono direttamente con alcune proteine, legandosi a esse e alterandone la funzionalità. Questo legame diretto può portare a una disfunzione proteica, influenzando negativamente i processi cellulari in cui queste proteine sono coinvolte (Sharma et al., 2020). Il cromo va a diminuire per esempio l'attività dell'enzima nitrato riduttasi e interferisce con l'ATPasi. Allo stesso tempo induce l'attività degli enzimi antiossidanti come la SOD e la catalasi, probabilmente come risposta diretta alla formazione di radicali superossidi (Dixit et al., 2002; Shanker et al., 2005). In piante d'orzo, per esempio, la presenza di cromo esavalente nel

terreno di coltura è stata dimostrata indurre un aumento significativo dell'attività di molti enzimi antiossidanti come la superossido dismutasi (SOD), perossidasi (POD), ascorbato perossidasi (APX), glutatione reduttasi (GR) e catalasi (CAT) (S. Ali et al., 2011).

1.2.3.3 Considerazioni finali sulla tossicità delle differenti specie del cromo

Allo stato attuale il Cr(VI) viene considerato la forma più tossica e pericolosa, sia per le specie vegetali che quelle animali (Kumar et al., 2015), la legislazione sul cromo esavalente è di conseguenza maggiormente stringente rispetto alle altre specie. In numerosi studi infatti, il Cr(VI) viene riportato come la forma più tossica. Questo perché all'atto pratico, la biodisponibilità del Cr(III) è talmente inferiore a quella del Cr(VI) da risultare nocivo solo in condizioni particolari: quando pH e composizione del terreno ne aumentano la disponibilità, quando è presente in alcune sue forme più solubili oppure quando presente a concentrazioni particolarmente elevate. In realtà quale delle due forme sia più tossica è questione dibattuta da tempo e tuttora aperta (Vignati et al., 2010). Possiamo cercare di riassumerla dicendo che l'elevata tossicità percepita del Cr(VI) è causata dalla sua maggiore solubilità e la sua capacità di attraversare le membrane cellulari grazie al trasporto attivo mentre i danni apportati al DNA sono soprattutto imputabili alla forma trivalente (Fang et al., 2014).

1.2.4 Risposte alla tossicità del cromo

Piante e microrganismi hanno sviluppato differenti meccanismi specifici per ridurre l'assorbimento del cromo, ed in particolare il cromo esavalente (Cervantes et al., 2001; Mallick & Ra, 2002). Tali meccanismi includono: la diminuzione del numero di trasportatori del solfato, come nei mutanti di *Neurospora crassa* (Marzluf, 1970; Paietta, 1990); la chelazione o complessazione esterna, come la complessazione del cromo extracellulare da parte di polisaccaridi di parete o mucillagini in organismi come *Enterobacter cloacae* (Iyer et al., 2004), la secrezione di molecole chelanti in alghe come *Euglena gracilis* (Lira-Silva et al., 2011) e in numerose alghe brune (Davis et al., 2003; Wang & Chen, 2009); oppure la riduzione esterna alla cellula e conseguente immobilizzazione, nel terreno, del cromo trivalente.

Il cromo intracellulare può essere inattivato dai peptidi chelanti come il glutatione ridotto (GSH), prodotto principale del sistema di assimilazione del solfato o da altri composti solforati come la cisteina, andando a formare dei complessi tiolati (Brauer et al., 1996; Brauer & Wetterhahn, 1991). Il GSH, un tripeptide con molteplici funzioni metaboliche nelle piante, viene sintetizzato nei plastidi e nel citosol e trasportato in vari organelli, inclusi i mitocondri dove si trova a concentrazioni superiori rispetto al cloroplasto (Kolb et al., 2010; Moran et al., 2000; Volland et al., 2012). Il GSH gioca un ruolo importante nella detossificazione del Cr(VI), sia legandosi col suo gruppo sulfidrilico e formando un complesso GS-CrO₃⁻, con riduzione da Cr(VI) a Cr(V) (Brauer & Wetterhahn, 1991), sia neutralizzando le ROS prodotte dalla presenza di cromo (Panda, 2007; Upadhyay & Kumar Panda, 2010). Minore sembra invece essere il ruolo delle fitochelatine, normalmente coinvolte nella chelazione di ioni metallici bivalenti, ma alcuni dati riportano la chelazione di stadi intermedi di riduzione del cromato intracellulare (Shahid et al., 2017).

Alla chelazione fa seguito la compartimentalizzazione. Questa, che riguardi il cromo o altri metalli pesanti, avviene in vari distretti cellulari, con l'accumulo nel sistema vascolare dell'apparato radicale, nei tessuti inerti di fusto e foglie, nelle pareti cellulari e nei vacuoli (Choudhury & Kumar Panda, 2005; P. A. Mangabeira et al., 2006; P. A. O. Mangabeira et al., 2004; Shanker & Pathmanabhan, 2004; Volland et al., 2012).

Alcuni batteri possiedono sistemi NADH e NADPH dipendenti per ridurre il cromo da Cr(VI) a Cr(III) all'interno delle cellule, si pensa che una riduzione controllata aiuti a ridurre il danno ossidativo (Deng et al., 2006; Han et al., 2007; Thacker & Madamwar, 2005). Inoltre, alcuni batteri e archea presentano un meccanismo di trasporto attivo del cromato all'esterno delle cellule mediante proteine della famiglia CHromate Resistance (CHR), che funzionano come trasportatori antiporto cromato/solfato (Nies et al., 1998).

1.2.5 SIR/SED

Come visto nei paragrafi precedenti, molti dei composti coinvolti nella chelazione dei metalli e nella mitigazione dello stress ossidativo, derivano dal metabolismo della cisteina. Inoltre, anche forme non organiche dello zolfo svolgono un ruolo attivo nella difesa (Vojtovič et al., 2021). Tali meccanismi di difesa coinvolgono il solfuro e portano ad un aumento della capacità delle piante di far fronte a

stress biotici e abiotici, un fenomeno noto come Sulfur Induced Resistance o Sulfur Enhanced Defence (SIR/SED) (Bloem et al., 2015; Höller et al., 2010; Nazar et al., 2011; Nocito et al., 2006).

Gli esperimenti su cellule di lievito hanno indicato che la tossicità del cromato è influenzata dalla concentrazione di solfato: ad alte concentrazioni di solfato (30 mM), il cromato diventa tossico a concentrazioni tra 200 e 400 μM , mentre in condizioni standard di solfato (100 μM), concentrazioni di cromato di 15-20 μM sono sufficienti per inibire significativamente la crescita. Inoltre, il profilo di espressione proteica delle cellule di lievito trattate con basse concentrazioni di cromato e basse concentrazioni di solfato risulta simile a quello delle cellule trattate con alte concentrazioni di cromato ed alte concentrazioni di solfato (Pereira et al., 2008).

In *Brassica juncea* la presenza di cromato va a stimolare la sintesi di tutti i geni coinvolti nell'assimilazione del solfato. La maggiore espressione di questi geni porta a sua volta ad un accumulo dei prodotti terminali del pathway, in particolare cisteina e GSH (Schiavon et al., 2008).

Nel 2013 Ali e colleghi hanno indagato gli effetti del solfuro di idrogeno (H_2S), derivato dal NaHS, sull'orzo coltivato in condizioni idroponiche sotto stress da cromo evidenziando che l' H_2S può aumentare la tolleranza delle piante al cromo. In particolare, l'aggiunta di NaHS ha leggermente migliorato la crescita delle piante e la fotosintesi rispetto ai controlli, indicando che l' H_2S gioca un ruolo nell'alleviare lo stress da cromo (S. Ali et al., 2013).

Analogamente, Ding et al. (2019) hanno studiato gli effetti dell'aggiunta di solfato esogeno (SO_4^{2-}) nel mezzo di coltura di *Arabidopsis thaliana* sottoposta a stress da cromo. I loro risultati hanno mostrato che l'aggiunta di 100 μM di solfato di sodio induce un significativo recupero nei parametri di crescita delle piante, inclusa la lunghezza delle radici e la biomassa delle piantine. È stato visto che l'apporto di solfato riduce l'accumulo di cromo nelle radici, facilita il suo trasporto dalle radici alle foglie e diminuisce la produzione di malonildialdeide (MDA). Inoltre, lo studio ha osservato un aumento nei livelli di glutatione (GSH), clorofille a e b, ed enzimi come la superossido dismutasi (SOD), la perossidasi (POD) e la catalasi (CAT). La presenza di solfato ha inoltre ridotto il numero di cellule morte nelle radici e prevenuto danni ai cloroplasti (Ding et al., 2019).

Mustafa e Komatsu (2016), riportano che l'accumulo di proteine coinvolte nell'assimilazione del solfato correla con un aumento dello scavenging delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e sia una risposta adattativa a diversi metalli pesanti, come Cu, Al, Cd, As, e Cr (Mustafa & Komatsu, 2016). In piante di soia tolleranti all'alluminio, per esempio, è stata dimostrata la correlazione fra un aumento

di proteine coinvolte nel metabolismo dello zolfo e l'eliminazione di specie reattive dell'ossigeno (Duressa et al., 2010). Questo è collegato alla sintesi di importanti composti di difesa descritti precedentemente e legati al metabolismo del solfato, come fitochelatine (PCs), metallotioneine (MTs) e GSH (C. Cobbett & Goldsbrough, 2002; C. S. Cobbett, 2000; Panda, 2007; Upadhyay & Kumar Panda, 2010).

1.3 Pathway dello zolfo

Lo zolfo (S) è un nutriente essenziale per tutti gli organismi, presente in aminoacidi come cisteina e metionina, co-enzimi, gruppi prostetici, solfo lipidi, peptidi solforati e diversi metaboliti secondari. Le alghe acquisiscono lo zolfo principalmente come solfato (SO_4^{2-}), la forma più abbondante di S inorganico in natura. La maggior parte dell'assimilazione dello zolfo avviene nei cloroplasti, eccetto per *Euglena gracilis* dove avviene nei mitocondri (Brunold & Schiff, 1976; Koprivova & Kopriva, 2016; Takahashi et al., 2011).

1.3.1 Arilsolfatasi

Come detto, la forma assimilabile di zolfo nei vegetali è lo ione solfato (SO_4^{2-}), che si trova come anione inorganico nelle soluzioni del suolo e ambienti acquatici oppure può trovarsi complessato con altre molecole. Gli enzimi utilizzati dalle cellule vegetali per rendere lo ione complessato nuovamente disponibile sono le arilsolfatasi periplasmiche.

Chlamydomonas reinhardtii possiede due copie principali di questo gene, ARS1 e ARS2, che sono over-esprese in caso di deprivazione di zolfo. L'analisi del genoma di *C. reinhardtii* ha rivelato la possibile presenza di 18 copie ipotetiche di ARS, organizzate in cluster, suggerendo un'origine evolutiva comune e meccanismi regolativi simili (Gonzalez-Ballester & Grossman, 2009; Ravina et al., 2002).

Le ARS, principalmente eucariotiche, vengono rilasciate nel mezzo extracellulare e facilitano l'approvvigionamento di solfato esterificato esterno, rompendo i legami estere tra solfato e sostanze organiche. L'espressione di ARS in *C. reinhardtii* è regolata dalla disponibilità di SO_4^{2-} . In condizioni di bassa disponibilità di SO_4^{2-} , questa alga mostra una serie di risposte, tra cui la sintesi di ARS

extracellulari ma questa viene rapidamente inibita quando il solfato è reintegrato nel mezzo colturale. Non è ancora noto se i diversi geni ARS codifichino per proteine con differente specificità per il substrato, diversa localizzazione cellulare o differenti proprietà catalitiche (Gonzalez-Ballester & Grossman, 2009; Hagelueken et al., 2006; Kahnert & Kertesz, 2000; Ravina et al., 2002).

1.3.2 Trasportatori del Solfato

Nelle alghe troviamo quattro tipologie principali di trasportatori del solfato: i co-trasportatori H^+/SO_4^{2-} della famiglia SULTR (tipici degli organismi vegetali), i co-trasportatori Na^+/SO_4^{2-} della famiglia SLC13 (presenti negli animali), gli antiporti anione/ SO_4^{2-} della famiglia SLC26 e i trasportatori di tipo ABC localizzati nelle membrane dei cloroplasti di alcune alghe, briofite e streptofite, simili ai trasportatori che si trovano nei batteri. Questi ultimi non sono stati trovati nelle piante superiori finora analizzate (Grosche et al., 2012; Kugita et al., 2003; Lemieux et al., 2007; Ohyama et al., 1988; Takahashi et al., 2012; Turmel et al., 2005).

Nell'alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* sono stati identificati sei putativi trasportatori del solfato situati sul plasmalemma. Questi includono tre co-trasportatori H^+/SO_4^{2-} (SULTR1, SULTR2, SULTR3) e tre co-trasportatori di tipo animale Na^+/SO_4^{2-} (SLT1, SLT2 e SLT3). Altre alghe verdi, come *Volvox carteri* e *Ostreococcus tauri*, presentano un numero differente di trasportatori SLT e SULTR. La presenza di entrambe le tipologie di trasportatori permette alle alghe di sopravvivere in diverse condizioni ambientali, utilizzando il tipo di trasportatore più adatto in base al pH e alla disponibilità di Na^+ (Pootakham et al., 2010).

In *C. reinhardtii*, i trascritti di SULTR2, SLT1 e SLT2 aumentano in seguito alla deprivazione di zolfo, mentre il trascritto di SULTR1 diminuisce drasticamente e quelli di SULTR3 e SLT3 rimangono invariati. Questo incremento di trascritto per SULTR2, SLT1 e SLT2 è seguito da un aumento dei corrispondenti polipeptidi nelle successive 24 ore, con un successivo calo quando il solfato è reintrodotta nel mezzo colturale. I trasportatori SULTR2, SLT1 e SLT2 agiscono quindi come trasportatori inducibili ad alta affinità (Pootakham et al., 2010).

1.3.2.1 Trasportatori della Famiglia SULTR

I trasportatori SULTR (SULphate TRansporter) vegetali sono stati identificati per la prima volta attraverso complementazione funzionale in ceppi di lievito contenenti mutazioni nei geni del solfato (Smith et al., 1995), i trasportatori della famiglia SULTR negli organismi vegetali sono composti da 10-14 domini α -elica transmembrana e da un dominio STAS (Sulfate Transporter Anti-Sigma factor antagonist) sul lato citosolico con funzione regolativa. Questo dominio è collegato alla porzione transmembrana tramite un'area poco conservata di lunghezza variabile nota come dominio linker. In *Arabidopsis thaliana*, mutazioni nel dominio STAS impediscono l'accumulo di SULTR1;2, mentre variazioni nel dominio linker riducono l'efficienza del canale nell'importare solfato. Sequenze simili a SULTR, alcune delle quali contenenti domini STAS, sono state trovate in diverse alghe oltre a *Chlamydomonas reinhardtii* (Giordano & Prioretti, 2016; Gonzalez-Ballester & Grossman, 2009; Shibagaki & Grossman, 2006; Smith et al., 1995)

1.3.2.2 Trasportatori della Famiglia SLT

I trasportatori SLT (Sac1 Like Transporters) sono stati identificati in *Chlamydomonas reinhardtii* attraverso l'analisi del genoma dell'alga (Merchant et al., 2007) e la ricerca di omologie con sequenze di trasportatori del solfato di piante, animali e batteri (Pootakham et al., 2010). I membri della famiglia SLT in *Chlamydomonas*, ovvero SLT1, SLT2 e SLT3, hanno forte similitudine con i co-trasportatori $\text{Na}^+/\text{SO}_4^{2-}$ della famiglia SLC13. Ognuno di questi trasportatori contiene 10-12 domini transmembrana e un loop intracellulare con un dominio TrkA-C, la cui funzione esatta non è completamente conosciuta, ma si ritiene sia implicata nella regolazione dell'attività del trasportatore del solfato (Pootakham et al., 2010).

1.3.2.3 Trasportatore di Tipo ABC per il Solfato

Nelle alghe, il trasporto del solfato all'interno del cloroplasto avviene tramite un trasportatore di tipo ABC, composto da sei subunità. Queste includono: due subunità transmembrana eterodimeriche (SULP1 e SULP2) che formano il canale di ingresso per il solfato; due subunità SBP (substrate binding protein) sul versante citosolico, per facilitare il legame con il solfato, e due subunità Sabc (stroma-

ATP binding protein) sul versante cloroplastico, per il trasporto attivo ATP-dipendente. Queste proteine sono codificate da geni simili ai geni dei procarioti per il trasporto del solfato. In *C. reinhardtii* l'aumento del trascritto e della proteina SULP1 in seguito alla deprivazione di zolfo indica l'importanza di questo trasportatore e l'impossibilità di creare un mutante difettivo del gene SULP1 suggerisce che sia essenziale per la sopravvivenza di quest'alga (Melis & Chen, 2005).

I trasportatori ABC sono presenti nei cianobatteri e nel rivestimento cloroplastico interno delle alghe verdi. Questo sistema di trasporto è responsabile dell'importo del solfato nel cloroplasto, dove avviene l'assimilazione primaria del solfato e la biosintesi di cisteina e metionina. Il trasporto è energizzato dall'idrolisi dell'ATP. Le particolarità strutturali del complesso eterodimerico SulP-SulP2 sono direttamente correlate alla sua funzione. Non sono stati identificati trasportatori simili in altri organismi e il meccanismo di trasporto del solfato nei cloroplasti delle piante vascolari rimane sconosciuto. Inoltre, la comprensione dettagliata del trasporto di solfato in *C. reinhardtii* non può essere trasferita direttamente ad altre microalghe, poiché è facile aspettarsi un comportamento differente tra alghe d'acqua dolce e alghe marine, data l'elevata e costante concentrazione di solfato negli oceani (Giordano et al., 2005; Lindberg & Melis, 2008; Melis & Chen, 2005; Takahashi et al., 2012).

1.3.3. Assimilazione

Una volta entrato nel cloroplasto il solfato deve essere ridotto e incorporato in molecole organiche. La produzione di solfito dal solfato è energeticamente sfavorevole e praticamente impossibile senza abbassare il potenziale redox del solfato. Il solfato assorbito dall'ambiente deve quindi essere attivato per diventare utile nel processo di assimilazione dello zolfo. In Figura 1.1 è riportato uno schema riassuntivo degli enzimi coinvolti nel processo di assimilazione del solfato.

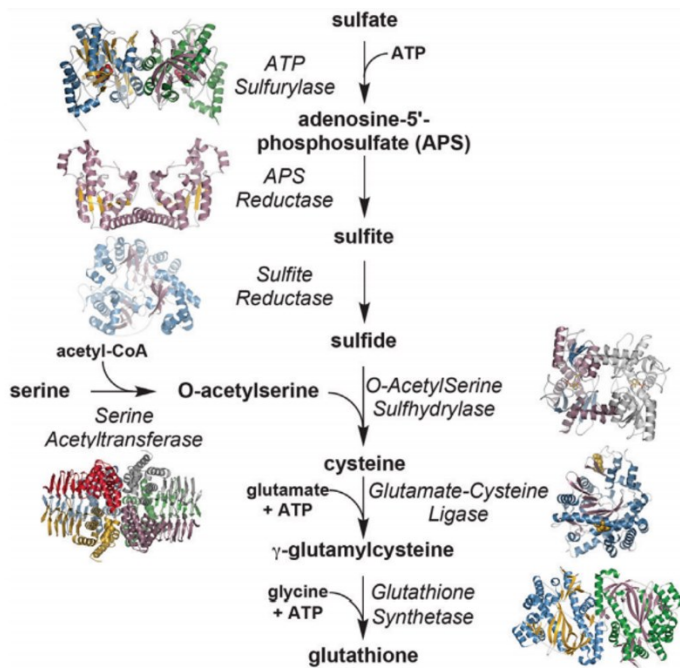


Figura 1.1: Rappresentazione schematica degli enzimi (in corsivo) e dei metaboliti (in **grassetto**) facenti parte del pathway di assimilazione del solfato (tratto da Jez, 2019).

1.3.3.1 ATS

L'ATP sulfurylase (ATP: sulfate adenylyl transferase, EC 2.7.7.4) svolge un ruolo cruciale nel pathway di assimilazione dello zolfo nelle piante. Questo enzima catalizza il primo passo energetico, trasformando il solfato e l'adenosina 5'-trifosfato (ATP) in adenosina-5'-fosfosolfato (APS) e in fosfato inorganico P_{pi} (Koprivova & Kopriva, 2016; Takahashi et al., 2011). La presenza di Mg²⁺ è necessaria per il legame del solfato nel sito attivo dell'enzima, che poi separa i due gruppi fosfato terminali dell'ATP, trasferendo l'adenosina 5'-monofosfato (AMP) sul solfato e rilasciando il pirofosfato con Mg (Farley et al. 1976, Shaw and Anderson 1974).

In organismi come diatomee, dinoflagellati e aptofiti, la reazione dell'ATS è abbinata all'idrolisi del pirofosfato da parte di una pirofosfatasi. Nelle piante, i geni ATS variano in numero: la maggior parte delle piante superiori possiede almeno due geni ATS, ad eccezione di *Selaginella moellendorffi* che ne ha solo uno (Kopriva et al., 2009). Inizialmente si pensava che le alghe verdi avessero un unico gene ATS (Prioretti et al., 2014), ma studi più recenti hanno rivelato la presenza di almeno due sequenze amminoacidiche omologhe nelle alghe verdi. Le due isoforme di *C. reinhardtii* sono regolate dal gene SAC1 (Sulfur ACclimation protein 1), e la loro espressione aumenta in condizioni di carenza di zolfo (Allmer et al., 2006; Yildiz' et al., 1996; Z. Zhang et al., 2004).

1.3.3.2 APR

L'adenosina-5'-fosfosolfato (APS), generata dall'azione delle ATP sulfurylase (ATS), può intraprendere due percorsi distinti: essere ridotta dalla APS reductase (APR) o fosforilata dalla APS kinase (APSK) per formare 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosolfato (PAPS). Quest'ultimo può essere utilizzato in processi di solfatazione o reimmesso nel processo di assimilazione attraverso la PAPS reductasi. La distribuzione dell'APS tra queste due vie è regolata dalle condizioni ossido-riduttive: in ambienti ossidanti, che favoriscono la formazione di disolfuri, si osserva un aumento dell'attività dell'APR e una diminuzione della produzione di PAPS da parte dell'APSK (Jez, 2019).

L'APR, codificata da un unico gene in *C. reinhardtii*, svolge un ruolo fondamentale nel pathway di assimilazione dello zolfo, influenzando la riduzione di APS a solfito (SO_3^-) e adenosina monofosfato (AMP), usando il glutatione ridotto come donatore di elettroni. La sua importanza è evidenziata dal fatto che molti trattamenti che influenzano l'APR non hanno effetti sugli altri enzimi del percorso di assimilazione (Kopriva & Koprivova, 2004; Z. Zhang et al., 2004).

La distinzione tra ATS, APR e APSK non è sempre chiara. Ad esempio, nei dinoflagellati, ATS e APR sono fusi in una singola proteina, mentre un'organizzazione analoga tra ATS e APSK è stata osservata nei metazoi e nelle diatomee (Prioretti et al., 2014). In *Physcomitrella patens*, la solfito reductasi (SIR) sembra giocare un ruolo cruciale nella regolazione del percorso di assimilazione del solfato, dal momento che le due isoforme di APR presenti in questa briofita non sono influenzate dai trattamenti che regolano questo enzima nelle piante superiori (Wiedemann et al., 2007).

1.3.3.3 SIR

La solfito reductasi (SIR) è l'enzima che riduce il solfito (SO_3^-) generato dalla APS reductase (APR) a solfuro. In *Chlamydomonas reinhardtii*, esistono tre geni SIR: due di tipo ferredoxina (SIR1 e SIR2) e uno di tipo batterico (SIR3) che utilizza NADPH come cofattore. L'espressione di SIR1 e SIR2 aumenta in condizioni di carenza di zolfo. Inoltre, sono state trovate SIR di tipo batterico nei genomi nucleari di alcune diatomee e alghe rosse, sebbene la loro funzione rimanga ancora poco chiara (Gonzalez-Ballester & Grossman, 2009; Z. Zhang et al., 2004).

1.3.3.3 CSC

La fissazione dello zolfo ridotto all'interno di una molecola organica avviene attraverso l'inserimento del solfuro su O-acetilserina (OAS) per produrre cisteina. Questa reazione è catalizzata dall'O-acetilserina(tiolo)liasi (OASTL). La serina-acetiltransferasi (SAT) è responsabile della produzione di OAS a partire da serina e acetil-coenzima A (Takahashi et al., 2011; Wirtz & Hell, 2006). OASTL e SAT formano il Complexo della Cisteina Sintasi (CSC), che è soggetto a regolazione post-traduzionale basata sull'associazione/dissociazione delle due subunità. Il CSC catalizza la formazione della prima forma ridotta organica dello zolfo (Kopriva et al., 2002). È noto che sia OASTL che SAT siano presenti in tutti i principali compartimenti cellulari (Lunn et al., 1990; Ruffet et al., 1995). SAT è composta da due domini, all'n terminale troviamo la regione preposta al legame con altre proteine SAT, mentre il c terminale, dove la struttura è principalmente quella del foglietto beta, è la parte destinata al legame con OASTL e dove risiede anche il sito catalitico (Vaara, 1992; Wirtz et al., 2001). I dati suggeriscono che il sito attivo sia funzionante quando SAT si trova in forma di trimero (Gorman & Shapiro, 2004; Olsen et al., 2004; Pye et al., 2004). Tuttavia, la struttura quaternaria è più complessa ed è formata da un dimero di trimeri, dalla forma simile a un cilindro, con le regioni C terminali catalitiche dei due trimeri localizzate alle due estremità opposte, e le regioni N terminali a formare il core della struttura (Hindson et al., 2000). La struttura di OASTL è più semplice. È una proteina globulare, che porta legato il coenzima piridossal-5'-fosfato (PLP) nel sito catalitico. Le OASTL formano fra di loro un dimero. Quando OAS-TL è unito a formare un dimero i due siti catalitici si affacciano dallo stesso lato della molecola (Wirtz & Hell, 2006). La struttura del complesso CSC non è ancora stata determinata attraverso cristallografia. Diversi lavori che tengono conto delle dimensioni dei singoli componenti e del CSC completo suggeriscono che quest'ultimo sia formato da 6 SAT, (il dimero di trimeri) e 4 OASTL due dimeri indipendenti fra loro (Campanini et al., 2005; Wirtz & Hell, 2006). I due dimeri di OASTL interagiscono con le SAT al loro estremo C terminale, come già detto, e quindi agli estremi del cilindro. Molti dati, sia predittivi che cristallografici sembrano suggerire un possibile legame con gli ultimi 10 aminoacidi dell'estremo C terminale di SAT con il sito catalitico di OASTL. Quindi la porzione C terminale andrebbe a competere con OAS per l'ingresso nel sito attivo (Huang et al., 2005).

Nella sintesi di cisteina, il fattore limitante è SAT (Berkowitz et al., 2002; Droux et al., 1998; Kawashima et al., 2005; Ruffet et al., 1994). Sono stati osservati infatti livelli di cisteina e GSH più elevati che nei controlli in piante di *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana* e *Solanum tuberosum*

che sovra-esprimevano SAT in misura molto maggiore rispetto a piante che sovra-esprimevano OASTL (Blaszczyk et al., 1999; Harms et al., 2000; Noji & Saito, 2002; Sirko et al., 2004; Wirtz & Hell, 2003). L'aumento che comunque si registra quando si ha una sovra-espressione di OASTL potrebbe essere legato al fatto che SAT mostra un forte aumento della sua affinità col substrato quando è complessata nel CSC rispetto a quando si trova nella forma libera (Droux et al., 1998). Quindi una sovrabbondanza di OASTL rispetto a SAT aumenta l'attività di quest'ultima, come dimostrano esperimenti in vitro (Ruffet et al., 1994). Al contrario OASTL possiede una ridottissima affinità al substrato quando si trova legata nel complesso (Berkowitz et al., 2002; Droux et al., 1998; Kredich et al., 1969). Inoltre, si ha anche un effetto sulla stabilità del CSC dovuto ai due substrati, infatti mentre OAS destabilizza il complesso, il solfuro contribuisce a stabilizzarlo (Berkowitz et al., 2002; Droux et al., 1998) OAS destabilizza il complesso già a livelli di concentrazione fisiologica (Berkowitz et al., 2002), ma in vivo questo suo effetto è solitamente compensato dal solfuro e dal rapido consumo di OAS per formare cisteina.

In alcuni studi su *A. thaliana* la cisteina sembra inibire la forma citosolica di SAT, forse in un sistema di controllo di feed back che va a legare i livelli di cisteina con quelli di OAS (ki Saito, 2000; Noji et al., 1998). In generale il CSC sembra avere anche un importante funzione regolatrice e di controllo. Molecola centrale in questo sembrerebbe essere OAS (Hell & Hillebrand, 2001). Quando i livelli di solfuro all'interno della cellula sono normali, il CSC è assemblato, SAT produce OAS che viene subito convertita a cisteina dai dimeri di OASTL non associati nel CSC. Quando i livelli di solfuro calano, si accumula OAS, dal momento che non si riesce più a formare nuova cisteina, mancando il substrato. Aumento di OAS e calo di solfuro portano alla dissociazione del CSC e quindi al calo drastico dell'attività di SAT (Wirtz et al., 2006). Da studi basati su microarray in *A.thaliana* si è potuto notare come i livelli di OAS abbiano anche un effetto sull'espressione di differenti geni (Hirai et al., 2003).

Diversi autori individuano nelle OASTL, oltre allo loro principale attività, anche una attività L-cisteina desulfidrasica. Questa attività secondaria è stata vista ed analizzata su proteine ricombinanti purificate di *Solanum tuberosum* (Riemenschneider et al., 2005).

Come detto, la cisteina è la prima forma organica dello zolfo e la prima molecola in cui si uniscono il metabolismo dello zolfo e dell'azoto. Questo aminoacido è anche usato dalla cellula come fonte di zolfo. Concentrazioni eccessive di cisteina sono dannose per la cellula dato che la cisteina va a ridurre il ferro a Fe(II) che a sua volta può creare danni ossidativi.

Dato che la sintesi di cisteina avviene nei tre compartimenti cellulari in cui si ha sintesi proteica (citosol, cloroplasto e mitocondrio), e dato che l'assimilazione riduttiva del solfato avviene nel cloroplasto, in *A. thaliana* è stata indagata in modo dettagliato l'origine del solfuro di idrogeno, necessario per la sintesi di cisteina nei differenti compartimenti cellulari.

Nel cloroplasto, dove la produzione di solfuro segue un percorso apparentemente più lineare, esistono solo due vie, il solfuro prodotto da SIR partendo dal solfito e il solfuro prodotto dall'attività secondaria delle OAS-TL cloroplastiche (Vojtovič et al., 2021).

Nel citosol, dove avviene la maggiore produzione di cisteina (Krueger et al., 2009), sono state invece evidenziate tre vie di produzione del solfuro e tutte partono dalla cisteina. All'attività secondaria di OASTL si unisce l'attività della L-cisteina desulfurasi che produce L-alanina e zolfo elementare che viene convertito in solfuro con reazioni non enzimatiche (Heidenreich et al., 2005; Turowski et al., 2012; Van Hoewyk et al., 2008). L'ultima via di produzione del solfuro partendo da L-cisteina nel citosol è anche la principale e riguarda la L-cisteina desulfidasi (L-DES) che produce solfuro di idrogeno, ammoniaca e piruvato (Álvarez et al., 2010). Le L-DES hanno struttura molto simile alle OASTL e spesso vengono assegnate alla stessa classe enzimatica in seguito a classificazione dei dati omici. Le desulfidasi sono enzimi importanti per l'omeostasi della cisteina e quando assenti portano ad un aumento dei livelli di quest'ultima che a sua volta porta ad un aumento della tolleranza allo stress ossidativo (Vojtovič et al., 2021).

Il mitocondrio è il compartimento più complesso per quanto riguarda la produzione di solfuro. Anche qui una parte della produzione è a carico dell'attività secondaria della OASTL mitocondriale, inoltre è stata vista una produzione di solfuro e beta-ciano alanina a partire da acido cianidrico e cisteina a carico della beta cianoalanina sintasi (CAS) (Blumenthal et al., 1963; García et al., 2013). In *A. thaliana* inoltre è presente nel mitocondrio un'altra fonte possibile di solfuro; nel genoma di *Arabidopsis* infatti sono presenti due geni codificanti per D-cisteina desulfidasi (D-DES). Le D-DES

appartengono ad un'altra famiglia proteica rispetto alle L-DES e producono sempre ammoniaca, piruvato e solfuro ma avendo ovviamente come substrato un D aminoacido, la D-cisteina (Riemenschneider et al., 2005). L'esistenza di enzimi che hanno come substrato gli enantiomeri D degli aminoacidi apre un capitolo molto interessante; tuttavia, il ruolo e l'omeostasi dei D-AA nelle piante è tuttora poco conosciuto e poco approfondito e compreso (Riemenschneider et al., 2005; Vojtovič et al., 2021).

1.4 *Scenedesmus acutus*

Scenedesmus acutus (Meyen, 1829) (Fig. 1.2), rinominato *Tetradesmus obliquus* in alcune classificazioni recenti, è un membro della classe Chlorophyceae, appartenente all'ordine delle Sphaeropleales e alla famiglia delle Scenedesmaceae. Questa alga verde unicellulare è diffusa in ambienti acquatici dolci, ad eccezione di corsi d'acqua con forti correnti, e presenta una distribuzione cosmopolita (Guiry and Guiry, 2024).

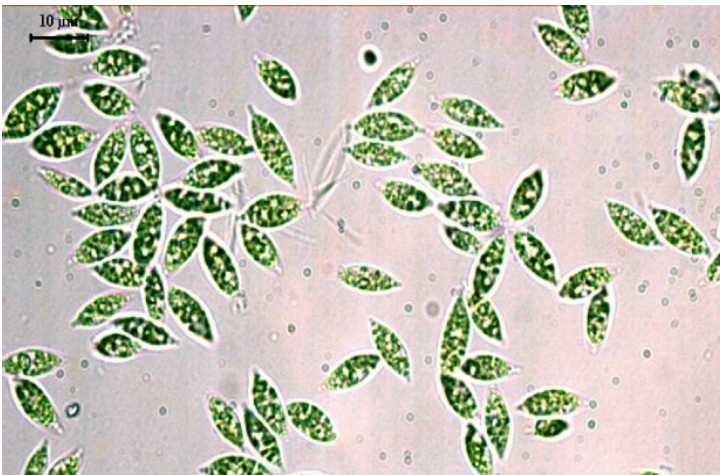


Figura 1.2: Fotomicrografia (LM) di *Scenedesmus acutus*.

Il genere *Scenedesmus* è caratterizzato da diversità morfologica e dalla sua capacità di formare cenobi, piccole colonie di cellule, solitamente composte da quattro unità (anche se possono occasionalmente essere due o otto), disposte parallelamente l'una accanto all'altra. Queste cellule, che possono essere fusiformi o ellittiche, sono aploidi e mostrano una varietà di forme: sferiche, ellissoidali, allungate o fusiformi, con dimensioni che variano da 3 a 78 µm in lunghezza e da 2 a 10

µm in larghezza ogni cellula contiene un nucleo singolo e un cloroplasto parietale unico con un pirenoide (Corradi et al., 1995).

Le Chlorophyceae sono dotate di pigmenti fotosintetici simili a quelli delle piante terrestri, come la clorofilla a, la clorofilla b e i carotenoidi, e immagazzinano amido come riserva energetica. A livello riproduttivo, *Scenedesmus acutus* si moltiplica principalmente in modo vegetativo attraverso l'autosporulazione, con ogni cellula che dà origine a una nuova colonia figlia. La riproduzione sessuale, caratterizzata dalla formazione di gameti flagellati, è possibile, in seguito alla esposizione ad ambienti sfavorevoli o condizioni di stress (Corradi et al., 1995).

Le ricerche su questo organismo si sono recentemente concentrate sulla sua possibile applicazione industriale nella produzione di cibo e carburanti come produttore di acidi grassi. Il genere *Scenedesmus* è stato anche valutato per un suo utilizzo nelle biorimediazione (Ardila et al., 2017; Breuer et al., 2012; Remmers et al., 2017).

Nel nostro laboratorio è stato selezionato un ceppo di *Scenedesmus acutus* tollerante al cromo (Cr-t), trattando la popolazione wild-type (wt) con una concentrazione subletale di cromo esavalente (Cr(VI)) pari a 1 mg/l per un periodo prolungato. Questo trattamento ha portato alla selezione di un ceppo capace di crescere e riprodursi anche in presenza di concentrazioni di Cr(VI) che normalmente inibiscono la crescita del ceppo selvatico. Inoltre, questa tolleranza è una caratteristica ereditabile che viene infatti mantenuta anche dopo lunghi periodi di coltura in medium privo di cromo (Corradi et al., 1995).

Studi effettuati sui ceppi wt e Cr-t hanno rivelato che, oltre alla tolleranza al cromo, il ceppo Cr-t mostra co-tolleranza a rame (Cu), zinco (Zn) e, in misura moderata, al cadmio (Cd) (Abd-El-Monem et al., 1998; Torricelli et al., 2004). Inoltre, in presenza di Cr(VI), il ceppo Cr-t mantiene livelli più elevati di clorofilla e di attività fotosintetica rispetto al ceppo selvatico. A basse intensità luminose, l'accumulo di cromo è meno elevato in entrambi i ceppi, suggerendo che l'assorbimento del metallo sia un processo dipendente dall'energia (Gorbi et al., 2001).

Dal punto di vista morfologico, entrambi i ceppi mostrano dimensioni cellulari simili in condizioni standard, ma l'esposizione a concentrazioni crescenti di Cr(VI) induce un blocco nella divisione cellulare, determinando un aumento significativo della dimensione delle cellule. Queste modifiche sono accompagnate da un incremento della vacuolizzazione, del numero di granuli di amido, della

dimensione del pirenoide e dall'accumulo di precipitati ad alta densità nel citoplasma, oltre a un aumento significativo della dimensione del nucleo, più pronunciato nel ceppo wt (Cozza et al., 2016).

Il ceppo Cr-tollerante mostra differenze metaboliche anche in assenza di cromo nel medium di coltura, come una maggiore velocità di crescita e differenze nel contenuto proteico totale e negli essudati extracellulari, che differiscono anche nel contenuto di carboidrati (Corradi et al., 1998).

Il ceppo tollerante al cromo di *Scenedesmus acutus* rappresenta quindi un esempio di adattamento a condizioni ambientali sfavorevoli, ed un interessante caso di studio sulla tolleranza ai metalli pesanti.

Il mantenimento per alcuni giorni (tre o sette) in un terreno completamente privo di zolfo ha lo stesso effetto su entrambi i ceppi: non si ha più divisione cellulare e si riscontra invece un aumento delle dimensioni della singola cellula. Entrambi i ceppi, in seguito a questo trattamento, mostrano un aumento di tolleranza al cromo quando esposte a questo metallo in seguito al ripristino in un terreno completo. Questo aumento di tolleranza, contrariamente a quella mostrata di norma dal ceppo tollerante è però transiente e viene perso se il trattamento con cromo viene effettuato dopo 48 h del ripristino del terreno standard (Gorbi et al., 2007).

Il ceppo Cr-tollerante è in grado di crescere anche in presenza di concentrazioni di Cr(VI) che inibiscono completamente la crescita nel wild-type, mantenendo un contenuto di clorofilla e tassi di fotosintesi superiori. Anche se la disponibilità di zolfo è fondamentale per la resistenza a molti stress biotici e abiotici, si è osservato che la deprivazione di zolfo per 7 giorni induce un aumento transitorio della tolleranza al cromo in entrambi i ceppi (Gorbi et al., 2007) Dopo la deprivazione di zolfo, i ceppi hanno aumentato la loro capacità di assorbire zolfo, ripristinando rapidamente il pool di GSH e aumentando i livelli di cisteina libera. Queste risposte suggeriscono che la maggiore tolleranza al Cr(VI) dopo la deprivazione di zolfo fosse legata alla sovra-regolazione del processo di assorbimento/assimilazione dello zolfo (Gorbi et al., 2007) Inoltre, è stato dimostrato che anche una deprivazione di zolfo di 3 giorni induceva un aumento della tolleranza al cromo in entrambi i ceppi. È stato ipotizzato che sotto stress da deprivazione di zolfo, l'attivazione dei percorsi di assorbimento/assimilazione dello zolfo possa avere due conseguenze dirette relative alla tolleranza/detossificazione del Cr: l'inibizione dell'assorbimento di Cr e l'aumento dell'accumulo e della disponibilità di solfati per la produzione di molecole contenenti zolfo per la detossificazione del Cr. Questi meccanismi potrebbero essere diversamente prevalenti nei due ceppi: nel wild-type si è ipotizzato che la riduzione dell'assorbimento di Cr attraverso l'induzione di trasportatori di solfato

ad alta affinità, mentre nel ceppo Cr-tollerante la strategia principale sembrerebbe essere l'aumento della capacità detossificante (Marieschi et al., 2015).

Il trattamento con Cr(VI) induce una variazione nel rapporto eucromatina/eterocromatina in entrambi i ceppi, suggerendo che il rimodellamento della cromatina potrebbe essere alla base della differenziazione nell'espressione genica e nella tolleranza al metallo. Per acquisire ulteriori informazioni sul rimodellamento della cromatina nucleare, (Cozza et al., 2016) hanno analizzato la metilazione del DNA tramite immunolocalizzazione della 5-metil-citosina, prima e dopo l'esposizione al Cr(VI). I risultati hanno evidenziato un basso livello di metilazione nel genoma di *S. acutus*. È stato riscontrato che il nucleo delle cellule wt presentava una maggiore quantità basale di citosine metilate rispetto a quelle del ceppo Cr-t. Dopo i trattamenti con Cr, le cellule wt hanno mostrato un forte calo della metilazione, principalmente nella frazione eterocromatica, mentre il ceppo Cr-t (con un iniziale livello di metilazione più basso rispetto al wt) aumentava il proprio livello di metilazione dopo l'esposizione al Cr. Questi risultati hanno suggerito l'esistenza di un legame stretto tra il pattern di metilazione e la tolleranza al metallo nei ceppi Cr-tolleranti di *S. acutus*. Questo legame è stato ulteriormente confermato dal lavoro di Ferrari e colleghi, in cui sono stati confrontati i livelli di metilazione nell'intero genoma dei due ceppi, ed è stata riscontrata una relazione fra la cromo tolleranza e la ipometilazione nel contesto CG. Nello stesso lavoro si è osservata una differente metilazione e trascrizione di sei geni legati al pathway del solfato nel ceppo cromo tollerante, indicando che meccanismi epigenetici sono coinvolti nella regolazione basale di questo pathway e potenzialmente correlati alla risposta allo stress da cromo (Ferrari et al., 2020).

2 Materiali e Metodi

2.1 Preparazione terreno di coltura

Per le colture algali è stato preparato il terreno standard liquido (US, EPA 1971) raddoppiando la concentrazione sia dei macro che dei micro nutrienti, come indicato in (Marieschi et al., 2015). La concentrazione finale del terreno utilizzato è riportata nella tabella 2.1.

Elemento	Concentrazione Finale
NaNO ₃	51,0 mg/L
K ₂ HPO ₄	2,088 mg/L
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	24,34 mg/L
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	29,4 mg/L
CaCl ₂ 2 H ₂ O	8,82 mg/L
NaHCO ₃	30,0 mg/L
FeCl ₃	192,0 µg/L
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	600,0 µg/L
H ₃ BO ₃	371,04 µg/L
MnCl ₂	528,52 µg/L
ZnCl ₂	6,542 µg/L
CoCl ₂	1,56 µg/L
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	0,022 µg/L
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	14,52 µg/L

Tabella 2.1 – Composizione modificata del terreno di coltura liquido US EPA (1978) utilizzato per le colture algali.

Per praticità operativa, stock più concentrati di terreno sterile vengono preparati separatamente e sono poi diluiti con acqua sterile per la preparazione del terreno alla concentrazione necessaria.

Per il terreno solido viene invece preparato agar 1,8% in acqua, sterilizzandolo in autoclave. Al momento dell'utilizzo l'agar viene sciolto mediante riscaldamento e ad esso viene aggiunto pari volume di terreno di crescita sterilizzato a parte, per ottenere una soluzione finale di agar 0,9%.

Tutte le colture sono state mantenute in condizioni axeniche in camera climatizzata ad una temperatura di 24 ± 1 °C un'intensità luminosa di 3000 lux, fotoperiodo di 16h ed areazione continua per evitare il deposito delle cellule.

2.2 Deprivazione di zolfo e risposta al trattamento con cromo

Negli esperimenti che prevedevano la coltura in terreno privo di zolfo, aliquote delle colture madri in crescita esponenziale, sono state centrifugate per 10 minuti a 2200 xg e lavate con acqua distillata. I pellet sono stati risospesi alla concentrazione di 3×10^6 cellule/mL in 200 mL di terreno standard (+S) contenente MgSO_4 (29,4 mg/L), oppure in terreno deprivato di zolfo (-S). Dato che il solfato di magnesio rappresenta l'unica fonte di zolfo, per ripristinare la concentrazione di magnesio nel terreno deprivato di zolfo è stato necessario raddoppiare il quantitativo di MgCl_2 . Dopo 7 giorni di crescita in terreno +S (cellule unstarved) o in terreno -S (cellule S-starved) alle medesime condizioni descritte sopra, le cellule di entrambi i ceppi sono state raccolte per centrifugazione, lavate e trattate con Cr(VI), fornito come dicromato di potassio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$).

Per il trattamento con cromo, le cellule di entrambi i ceppi sono state esposte al Cr(VI) a concentrazione di 1 mg/L e 2 mg/L, queste concentrazioni sono pari al valore LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) rispettivamente del ceppo wt e del ceppo cromo tollerante. Trattamenti e controlli sono stati ripetuti per almeno 3 volte. La densità cellulare iniziale (3×10^6 cellule/mL) è stata scelta in accordo con studi precedenti (Gorbi and Corradi, 1993; Corradi et al., 1995; Torricelli et al., 2004; Gorbi et al., 2007) per essere certi della risposta all'intossicazione da metallo. Da qui in avanti, il termine S-replete sarà utilizzato per indicare le cellule pre-coltivate in assenza di zolfo e successivamente trasferite in terreno standard, mentre il termine S-sufficient sarà utilizzato per indicare le cellule pre-coltivate in terreno standard e successivamente trasferite e mantenute in terreno standard. Alcuni esperimenti di deprivazione di zolfo sono stati effettuati coltivando le alghe per 24h in terreno standard e in terreno -S.

2.3 Estrazione di DNA genomico

Componenti e concentrazioni finali del tampone utilizzato per l'estrazione del DNA genomico sono riportati in Tabella 2.2

Componenti	Concentrazione finale
Tris-HCl pH 8.0 (1M)	100 mM
EDTA pH 8.0 (0,5M)	20 mM
NaCl (3M)	1,4 M
CTAB (9%) (*)	2%(p/v)
β -mercaptoetanolo (100%) (*)	2%(v/v)
H ₂ O sterile	/

Tabella 2.2 Concentrazione finale del tampone di estrazione. I componenti contrassegnati con (*) sono aggiunti immediatamente dopo la rottura cellulare.

L'estrazione del DNA genomico è stata eseguita col seguente protocollo:

1. Il campione di coltura algale pari a 400 milioni di cellule è stato raccolto e centrifugato a 5000xg per 10 minuti a T ambiente;
2. Il pellet ottenuto è stato lavato in H₂O sterile e nuovamente centrifugato a 5000xg per 10 minuti a T ambiente eliminando il surnatante. L'operazione è stata ripetuta due volte per rimuovere i residui di terreno di coltura;
3. Il pellet è stato infine risospeso in 758 μ L di tampone di estrazione privo di β -mercaptoetanolo e CTAB, per evitare la formazione di schiuma nel passaggio successivo di rottura;
4. Successivamente a un ciclo di rottura con French Press a 2,71 kbar è stato recuperato il lisato, e a questo sono stati aggiunti 222 μ L di CTAB e 20 μ L di β -mercaptoetanolo. L'estratto è stato mantenuto a 4°C per almeno 3 minuti e agitato di tanto in tanto;
5. Ciascun estratto, dopo l'aggiunta di 124 μ L di NaCl/BSA [4,54M NaCl, 3,63%(p/v) BSA] e 2 μ L di RNAsi A è stato incubato a 37°C per 30 minuti per rimuovere l'RNA. BSA (Siero Albumina Bovina) è una proteina che crea un'interfaccia tra la fase organica e la fase acquosa, rendendo più agevole il recupero della fase acquosa nei passaggi successivi. La presenza di NaCl facilita l'azione della RNAsi;

6. L'RNAsi è stata rimossa aggiungendo pari volume di cloroformio/alcol isoamilico (24/1). I campioni sono stati tenuti in ghiaccio per 3 minuti e agitati periodicamente, e successivamente centrifugati a 20000xg per 10 minuti a 4°C e recuperata la fase acquosa contenente il DNA;
7. Il passaggio precedente è stato ripetuto due volte per recuperare completamente il DNA. Una volta recuperata nuovamente la fase acquosa, il DNA è stato precipitato aggiungendo pari volume di isopropanolo, mescolando per inversione e ponendolo a -80°C per almeno 30 minuti;
8. I campioni sono stati quindi centrifugati a 20000xg per 30 minuti a 4°C, e il surnatante eliminato;
9. Il DNA precipitato è stato lavato per 2 volte aggiungendo 300 µL di etanolo 70% (v/v) e centrifugando a 20000xg per 10 minuti a 4°C per rimuovere i residui dei sali usati per la precipitazione;
10. Infine, il DNA viene lasciato asciugare all'aria per 5-10 minuti e poi risospeso in 50 µL di tampone TE 0,5X.

Il DNA ottenuto è stato conservato a -20°C.

2.4 Quantificazione del DNA genomico

La quantità del DNA estratto è stata effettuata mediante NanoDrop™ One (Thermo Scientific™, Waltham, MA).

L'integrità del DNA ottenuto è stata effettuata mediante elettroforesi su gel di agarosio caricando su gel di agarosio 2 µL di DNA estratto (per ogni campione). Il confronto con un campione di riferimento a concentrazione nota (DNA *Zea mays* a 150 ng/µL) consentiva una ulteriore quantificazione del DNA estratto. Il gel è stato fotografato con fotocamera digitale CANON Power Shot A620 e analizzato con il programma Gel Analyzer 2010.

2.5 Elettroforesi del DNA su gel di agarosio

I campioni di DNA sono stati analizzati su gel di agarosio in tampone TAE (TrisAcetato-EDTA). e visualizzato mediante la presenza di etidio bromuro alla concentrazione finale di 0,05 µg/mL. La percentuale di agarosio impiegata è stata variata in base alla lunghezza dei frammenti in esame.

2.6 Eluizione da gel di agarosio

Analizzando i profili elettroforetici delle amplificazioni eseguite si sono individuate bande di particolare interesse, le quali sono state eluite da gel di agarosio utilizzando il Quiaquick Gel Purification kit (Quiagen, Valencia, CA), seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

2.7 Estrazione RNA totale

Per entrambi i ceppi l'RNA è stato estratto da aliquote di colture algali da pre-coltura di 7 giorni in terreno standard o privo di zolfo (T0) e da colture S-sufficient e S-replete dopo 24, 48 e 72 ore di ripristino del mezzo standard con e senza aggiunta di cromo. Per ciascun ceppo e per ciascuna condizione sono stati raccolti mediante centrifugazione 200 mL di terreno di coltura. Il precipitato algale è stato lavato per due volte con acqua distillata. Tutti i passaggi a temperatura ambiente sono stati effettuati con la massima rapidità possibile per evitare la degradazione dell'RNA contenuto nelle cellule. Tutti i campioni sono stati congelati con azoto e posti a -80 °C. Terminata la raccolta i campioni sono stati liofilizzati e successivamente si è proceduto alla lisi cellulare attraverso frantumazione meccanica con pestello e mortaio in azoto liquido. Sui campioni così ottenuti si è proceduto alla estrazione.

Componenti e concentrazioni finali del tampone di estrazione per l'RNA sono riportati in Tabella 2.3

Componenti	Concentrazione finale
Tris-HCl pH 7.5 (DEPC)	100 mM
EDTA pH 8.0 (DEPC)	20 mM
NaCl (DEPC)	1.4 M
CTAB (DEPC)	2% (p/v)

β -mercaptoetanololo	2% (v/v)
H ₂ O (DEPC)	

Tabella 2.3 Concentrazione finale del tampone di estrazione per l'RNA

1. Ad un'aliquota (10-20mg) del campione lisato sono stati aggiunti 882 μ L di tampone di estrazione e 18 μ L di β -mercaptoetanololo.
2. I campioni sono stati incubati a 65°C per 45min.
3. è stato recuperato il surnatante al quale si è aggiunto pari volume di cloroformio/alcol isoamilico (24/1) e si è mescolato il campione così ottenuto per almeno 3min.
4. Le miscele ottenute sono state centrifugate a 14000 rpm (20000 \times g) per 10min a 4°C. (punto 3 e 4 sono stati ripetuti due/tre volte a seconda della pulizia del campione)
5. è stata recuperata la fase acquosa e si è proceduto alla precipitazione aggiungendo pari volume di isopropanolo 100%, mescolando delicatamente per inversione, incubando in freezer a -80°C per ½h (oppure -20°C per 1h) e successivamente centrifugando a 14000 rpm per 30min a 4°C ed eliminando il surnatante.
6. L'RNA così ottenuto è stato lavato due volte aggiungendo 300 μ L di etanolo 70%(v/v) DEPC, centrifugando a 14000 rpm per 10min a 4°C ed eliminando il surnatante.
7. Il precipitato è stato lasciato asciugare e poi risospeso in 200 μ L di H₂O DEPC.

2.8 Precipitazione dell'RNA con LiCl

Questa reazione viene eseguita per eliminare eventuali tracce di DNA che possono contaminare l'RNA estratto. Tutte le soluzioni sono state preparate con H₂O DEPC.

1. L'RNA è stato precipitato con pari volume di LiCl (10 mM preparato con H₂O DEPC) e lasciato in ghiaccio per 4 ore, trascorse le quali i campioni sono stati centrifugati a 12000-14000 x g a 4°C per 25 minuti
2. I pellet sono stati risospesi in 100 μ l di H₂O DEPC e successivamente precipitati per 1h a -20°C con 0,1 volumi di acetato di sodio 3 M pH 5,2, 2 volumi di EtOH 100% e 2 μ L di EDTA 0,5 M

3. I campioni sono stati centrifugati a 12000-14000 x g a 4°C per 30 minuti e i pellet ottenuti sono stati lavati con ETOH al 70% per 2 volte
4. Il surnatante è stato eliminato ed il pellet è stato essiccato sottovuoto per eliminare tracce di alcol. I pellet sono stati risospesi in 30 µl di H₂O DEPC

2.9 Quantificazione RNA

Dopo l'estrazione e la precipitazione con LiCl l'RNA è stato quantificato mediante NanoDrop™ One (Thermo Scientific™, Waltham, MA).

2.10 Reazione di DNAsi

Questa reazione è utilizzata per eliminare eventuali tracce di DNA che possono contaminare la preparazione di RNA e falsare i risultati delle reazioni di RT-PCR. Reazione eseguita in un volume di 50 µL. Sono stati messi in reazione 5 µg di RNA con 5 U di DNasi (1U x µg di RNA). Per eliminare eventuali attività da parte di possibili RNasi nella reazione sono stati aggiunti 1,5 µL di Inibitore RNasi con concentrazione iniziale pari a 34,8 U/µL in modo da avere una concentrazione finale di inibitore in reazione pari a 1 U/µL. Alla reazione sono stati aggiunti 5 µL di Tampone 10X ed infine è stata portata a volume con H₂O DEPC.

La reazione è stata incubata a 37°C per 30 minuti, al termine dei quali è stata fermata con 1 µL di EDTA. Dopo aver portato il volume a 100 µL con altra H₂O DEPC. È stato aggiunto pari volume di Fenolo-Cloroformio, i composti miscelati e l'omogenato centrifugato. La fase acquosa contenente l'RNA è stata separata dal Fenolo-Cloroformio ed è stata precipitata aggiungendo 2 volumi di etanolo 100% e 1/10 di volume di sodio acetato 3 M. Dopo due lavaggi con etanolo 70%, l'RNA è stato quindi essiccato e risospeso in 10 µL H₂O DEPC.

2.11 Retrotrascrizione dei campioni trattati con DNAsi

La retrotrascrizione degli RNA trattati con DNAsi è stata eseguita preparando due miscele (MIX A e MIX B). La composizione della miscela MIX A è mostrata nella Tabella 2.4, per un volume finale di 30 μL si compone di:

Componenti	Volume Finale
RNA	5 μL
Oligo(dT) 50 M	0,75 μL
Esameri-Promega 252 μM	0,7 μL
H2O DEPC	23,55 μL

Tabella 2.4 Composizione MIX A

La miscela MIX A, con volume finale di 30 μL , è stata portata a 70°C in bagno termostatico per 5 minuti e successivamente messa in ghiaccio, per risolvere le strutture secondarie dell'RNA e consentire l'appaiamento dei primer. Contemporaneamente a questo viene preparata la miscela MIX B, per un volume finale di 20 μL . La composizione della miscela MIX B è mostrata in Tabella 2.5.

Componenti	Volume Finale
Buffer 5X	10 μL
dNTP 2 5mM	1,25 μL
1Inibitore dell'RNAsii (1U/1L)*	1,5 μL
1MMLV Promega reverse transcriptase (200U/1L)*	1 μL
H2O DEPC	6,25 μL

Tabella 2.5 Composizione MIX B, i componenti segnati con * sono stati aggiunti dopo l'incubazione a 37°C

La reazione viene condotta nel thermal cycler MJ-RESEARCH PTC-100 (Marshall Scientific, Hampton, NH) utilizzando il seguente protocollo.

La reazione è stata incubata a 37°C e dopo 10 minuti sono stati aggiunti l'enzima e l'inibitore a ciascun campione. La reazione è stata mantenuta a 37°C per 90 minuti, al termine dei quali è stata fermata portando la temperatura a 70°C per 15 minuti. Terminata la reazione i campioni sono stati centrifugati e conservati a -20°C per essere utilizzati successivamente nelle reazioni di PCR, talvolta diluiti se eccessivamente concentrati. L'effettiva riuscita della retrotrascrizione è stata controllata in PCR con primer specifici di *Scenedesmus acutus* di un gene la cui espressione è nota nelle condizioni testate. I primer utilizzati come controllo sono stati quelli del gene S2TA63 (Torelli et al., 2008), che codifica per una proteina di parete ricca in cisteina la cui trascrizione durante S starvation viene repressa.

2.12 Identificazione dei geni di interesse e progettazione dei primer

L'identificazione di geni candidati, appartenenti al percorso di assorbimento/assimilazione dello zolfo, è stata effettuata con il seguente approccio: inizialmente, per ciascun gene, è stata costruita una sequenza consenso utilizzando le sequenze geniche presenti nel database (NCBI) di altre alghe verdi filogeneticamente vicine a *S. acutus*. Successivamente, la sequenza consenso ottenuta è stata allineata sul genoma di *T. obliquus* UTEX 393. Nella regione identificata del genoma di *T. obliquus*, sono stati progettati dei primer che sono stati utilizzati per amplificare i corrispondenti frammenti sia nel DNA genomico che nel cDNA attraverso la PCR (Reazione a Catena della Polimerasi). Infine, i prodotti della PCR sono stati caricati su gel di agarosio (preparato in tampone 1X TAE (40 mM Tris, 20 mM acido acetico, 1 mM EDTA), eluiti, purificati e sequenziati.

I primer utilizzati per l'amplificazione dei diversi geni sono elencati in Tabella 2.6.

Gene	Primer	Sequenza	Tm (°C)
<i>SaSIR1</i>	SaSIR1For1	5'-CAGCTGCTGCAGCAGAGG-3'	60
	SaSIR1For2	5'-CATGCAGCTGATGAAGTTCC-3'	60
	SaSIR1Rev1	5'-CAGCGGCTTGAAGTCCTGG-3'	62
	SaSIR1Rev2	5'-CCCATTCAGCTTCTGCAGC-3'	60
<i>SaSIR3</i>	SaSIR3For1	5'-TGGGAAACAGCATGAGCACG-3'	62
	SaSIR3For2	5'-GATGACAAGGACACGGTGC-3'	60

Gene	Primer	Sequenza	Tm (°C)
	SaSIR3Rev1	5'-GTTGCTGGGCCATATGCCC-3'	62
	SaSIR3Rev2	5'-ACCACACACGTAGAAGTGG-3'	60
	SaSIR3Rev3	5'-CACACGTCCCTCTCGTAGC-3'	62
<i>SaOASTL1</i>	SaOASTL1For	5'-TGTACCTGAACAGCGTGACG-3'	62
	SaOASTL1Rev	5'-AGCGTCGAAGCTCCACAGC-3'	62
<i>SaOASTL2</i>	SaOASTL2For Met	5'-TGGTTGACAAAGAAGGGCAG-3'	60
	SaOASTL2For1	5'-TGAAGAGACATTGGCAAGCG-3'	62
	SaOASTL2Rev1	5'-TTCAACAGCTGCATCATCCG-3'	60
	SaOASTL2Rev2	5'-ACAAAAGCAAGCCCCCTGC-3'	60
<i>SaOASTL3</i>	SaOASTL3For	5'-GTTGCAATCCAGGCTACACC-3'	60
	SaOASTL3Rev	5'-CGTCCCGCATCTTGATGCG-3'	62
<i>SaOASTL4</i>	SaOASTL4For1	5'-CCAACAAGAAGATCAAGGGC-3'	60
	SaOASTL4For2	5'-CACTCCAGACTCCTTCATCC-3'	62
	SaOASTL4Rev1	5'-GTGGTCTCGTAGTGACGC-3'	62
	SaOASTL4Rev2	5'-CGTCGAAGGTCATCTTCTCC-3'	62
	SaOASTL1.3.4(*)	5'-AGATCCAGGGCATCGGCG-3'	60
<i>SaSAT1</i>	SaSAT1ForMet	5'-ATGCAGCTGGCACAGCAGC-3'	62
	SaSAT1RevEst	5'-CATAGTCCAGGATGAAGTCC-3'	60
<i>SaSAT2</i>	SaSAT2For1	5'-GTGAATGTCAGTTTGGGAGC-3'	60
	SaSAT2For2	5'-CTGGCTGTTGACCTGCACC-3'	62
	SaSAT2Rev1	5'-CAGCAGTGACACATTGTTGC-3'	60
	SaSAT2Rev2	5'-CATACTCCGGGTCCTCTGC-3'	62
<i>SaD-DES</i>	D-DES For0	5'-AGTGACAGCAAGCCACASC-3'	60
	D-DES For Met	5'-ATGGCATCGCTGCAGTACC-3'	60
	D-DES For1	5'-GGAGGCATACAGTCCAACC-3'	60

Gene	Primer	Sequenza	Tm (°C)
	D-DES Rev1	5'-GATGTAGTAGGGCTTCTTGC-3'	60
	D-DES Rev Est	5'-ATGGCTGCGCTCACGTCC-3'	60
<i>SaRBCS</i>	SaRubi F	CCCCTCTCAGCGATGACC	60
	SaRubi R	GGTCCAGTACCTGTTGTCG	60

Tabella 2.6 Primer utilizzati per i differenti tentativi di amplificazione e sequenziamento dei geni di interesse. * Il primer *SaOASTL1.3.4* è stato progettato per poter funzionare s

2.13 Multiplex PCR

La Multiplex PCR (Chamberlain et al., 1988) prevede l'utilizzo di più coppie di primer, ciascuna specifica per una sequenza bersaglio, al fine di amplificare contemporaneamente più sequenze di DNA o cDNA. Amplificando due sequenze distinte in una singola miscela di reazione è possibile valutarne l'abbondanza relativa, eliminando disparità dovute alle differenze che normalmente si riscontrano conducendo due reazioni separate. Questa tecnica richiede che le coppie di primer abbiano Tm paragonabili e che non formino appaiamenti eterologhi tra loro, che siano altamente specifiche e non amplifichino sequenze spurie, infine i prodotti di amplificazione devono avere dimensioni relativamente simili, ma differenti e distinguibili su gel elettroforetico. Per effettuare una co-amplificazione corretta si determinano empiricamente le concentrazioni di utilizzo per ciascuna coppia di primer ed il numero ottimale di cicli di PCR, in modo che entrambe le bande d'interesse siano visibili e quantificabili. Tale tecnica è stata utilizzata per ottenere le effettive variazioni di espressione dei frammenti genici *SaOASTL1*, *SaOASTL2*, *SaOASTL3*, *SaOASTL4*, *SaSAT1*, *SaSAT2*, *SaSIR1* e *SaD-DES* nei campioni T0 dopo una deprivazione di zolfo di 24h rapportando il segnale della sequenza target in ciascun campione di cDNA con il rispettivo valore del segnale del gene per la subunità piccola (Rbcs) della Rubisco usato come riferimento. La Rubisco è stata scelta come riferimento interno perché, anche se nelle condizioni sperimentali da noi testate la sua espressione può variare, il suo trascritto è talmente abbondante che è possibile renderne costante l'amplificazione svincolandola dall'abbondanza iniziale nei vari campioni, mediante l'utilizzo di una concentrazione limitante di primer in reazione. Sia per la sequenza di riferimento che per gli amplificati di interesse sono state utilizzate coppie di primer specifici, costruite sulle sequenze di *Scenedesmus acutus* (indicati con la sigla Sa).

La reazione Multiplex è stata da prima messa a punto variando sia la concentrazione di ciascuna coppia dei primer, in un intervallo tra le 5 e le 12,5 pmoli, sia il numero di cicli di amplificazione (30-38). Il rapporto 12,5 pmol / 5 pmol, rispettivamente del gene bersaglio e di RBCs, si è rivelato ottimale per tutti i geni testati ed è stato quindi utilizzato per tutte le reazioni riportate. Il numero di cicli di amplificazione ottimale per ottenere risultati chiari e riproducibili dopo le prove si è attestato nel range compreso fra 33 e 38 cicli a secondo del gene analizzato. Dove non diversamente specificato nel testo le reazioni finali sono state condotte con un rapporto primer target/primer riferimento di 12,5/5 pmoli. Dopo l'iniziale messa a punto, la reazione è stata condotta nel thermal cycler MJ Research PTC-100 (Marshall Scientific, Hampton, NH) in un volume finale pari a 25 µL. La composizione della miscela di reazione è indicata in Tabella 2.7

Componenti	Volume Finale
cDNA	/
Taq Buffer 10X	2,5 µL
MgCl ₂ 25 mM	2 µL
DMSO	0,75 µL
dNTP 2,5 mM	2 µL
SA Primer FOR 10 µM	1,25 µL
SA Primer REV 10 µM	1,25 µL
RBCs Primer FOR 10 µM	0,5 µL
RBCs Primer REV 10 µM	0,5 µL
Taq 5U/µl	0,2 µL
H ₂ O	A volume

Tabella 2.7 Componenti e volume finale per ciascuno di essi per la preparazione della miscela di reazione per PCR Multiplex

Nella Tabella 2,8 riportata sotto sono indicate le coppie di primer utilizzate per le reazioni di PCR Multiplex, così come le condizioni di reazione. La sequenza e le caratteristiche di ogni primer usato nella reazione sono riportati nella Tabella 2.6.

Gene	Coppia di primer	Target/RBCS (pmol/pmol)	N° di Cicli	Ta reazione (°C)
<i>SaSIR1</i>	SIR1For2 SIR1Rev1	12,5/5	35	60
	SaSIR3For1 SaSIR3Rev1	12,5/5	38	58
	SaSIR3For2 SaSIR3Rev2	12,5/5	38	60
	SaSIR3For1 SaSIR3Rev3	12,5/5	38	58
<i>SaSAT1</i>	SAT1Fest SAT1Revest	12,5/5	35	60
<i>SaSAT2</i>	SAT2SaFest SAT2ToRest	12,5/5	35	60
<i>SaOASTL1</i>	SaOASTL1F SaOASTL1R	12,5/5	35	60
<i>SaOASTL2</i>	SaOASTLFor2 SaOASTLRev2	12,5/5	38	60
<i>SaOASTL3</i>	SaOASTL3F SaOASTL3R	12,5/5	35	60
<i>SaOASTL4</i>	SaOASTL134Fest ToOASTL4RevEst	12,5/5	35	60
<i>SaD-DES</i>	SoDESFor1 SoDESRevC	12,5/5	35	58

Tabella 2.7 Primers utilizzate nelle reazioni di PCR multiplex assieme ai primer per RBCS. Per ogni reazione sono riportati anche il rapporto fra i primer dei geni di interesse e i primer RBCS, il numero di cicli di reazione e la temperatura di annealing.

Le reazioni sono state effettuate secondo il programma seguente:

94°C 5 minuti

35-38 cicli:

- 94°C 40 secondi

- 60°C 40 secondi
- 72°C 40 secondi

72°C 5 minuti

4 °C ∞

I prodotti sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio (addizionato di bromuro di etidio) con un passaggio di corrente di 100 V e visualizzati mediante trans-illuminatore UV.

2.14 Saggio attività enzimatica

2.14.1 Preparazione estratto grezzo

Sono stati preparati gli estratti grezzi da alghe di entrambi i ceppi coltivate per 7 giorni in terreno standard o privo di zolfo (tempi zero) e dopo 24 e 48 ore dal ripristino del terreno standard (S-sufficient e S-replete) addizionato con 0, 1 o 2 mg /L di Cr(VI) dopo 24 e 48 ore dal ripristino del terreno standard.

Per ciascuna condizione è stato prelevato un volume di coltura corrispondente a 400 milioni di alghe.

I campioni raccolti sono stati centrifugati a temperatura ambiente (3500 xg per 4 minuti) e il precipitato algale è stato successivamente lavato prima in H₂O e poi in tampone di estrazione (tampone fosfato 50 mM, pH 7,5, 10 µM di PLP e 1 mM di DTT).

Prima della rottura la coppa del distruttore cellulare è stata preparata effettuando cicli di lavaggio con H₂O distillata e raffreddata in ghiaccio prima dell'uso. La rottura è stata effettuata con ciclo unico con il "One Shot" Cell Disrupter (Constant Systems Ltd., England) impostato a 2700 bars. Recuperato l'omogenato questo è stato centrifugato a 11000xg per 15 minuti a 4°C.

Il surnatante, ossia l'estratto grezzo, è stato trasferito in nuove eppendorf. Per ogni campione sono state preparate 3 aliquote, contenenti 0,5 - 0,6 ml ciascuna per evitare eccessivi cicli di congelamento/scongelamento nei successivi saggi enzimatici.

Gli estratti grezzi sono stati congelati in azoto liquido per poi essere conservati a -80°C.

2.14.2 Quantificazione proteine totali

Per determinare la concentrazione proteica degli estratti grezzi le proteine solubili sono state quantificate su aliquote di estratto mediante saggio Biorad basato sul metodo Bradford, (Bradford, 1976), seguendo le indicazioni del fornitore.

2.14.3 Saggio attività OAS-TL

L'attività di sintesi di cisteina da parte di OAS-TL è stata valutata sugli estratti grezzi, secondo il protocollo descritto in (Salbitani & Carfagna, 2017), dopo opportuna messa a punto su campioni di *Scenedesmus acutus*. L'attività dell'OASTL è stata determinata colorimetricamente come formazione di cisteina (Gaitonde, 1967).

Le singole reazioni finali per ciascun campione sono state effettuate in 100 μ L. La composizione della miscela di reazione è descritta in Tabella 2.8.

Soluzioni stock	Campione	Concentrazione finale
1 M HEPES/KOH, pH 7.2	10 μ L	100 mM
100 mM OAS	10 μ L	10 mM
100 mM DTT	5 μ L	5 mM
Estratto grezzo	65 μ L*	
50 mM Na ₂ S	10 μ L	5 mM
Volume finale	100 μ L	

Tabella 2.8 Composizione della Miscela di Reazione per saggio OASTL. *Per ogni campione sono stati messi in reazione 5 μ g di proteine totali. I campioni sono stati normalizzati portando ciascuno ad un volume di 65 μ L con aggiunta di acqua distillata sterile al momento della reazione.

Dopo aver preparato e miscelato il mix di reazione, i campioni sono stati incubati a 50°C per 5 minuti.

La reazione è stata poi arrestata aggiungendo 50 μ L di TCA 20% (v/v). Sono quindi stati successivamente aggiunti ad ogni campione 100 μ L di acido acetico glaciale e 200 μ L di soluzione di ninidrina (preparata sciogliendo 0,12 g di ninidrina in 3 ml di acido acetico glaciale e 2 ml HCl 37%). Dopodiché i campioni sono stati incubati a 100°C per 5 minuti per consentire lo sviluppo della

reazione colorimetrica e successivamente raffreddati in acqua a 10°C per altri 5 minuti per fermare la reazione.

Sono stati quindi aggiunti 550 µL di etanolo (96%) per stabilizzare il colore, ed è stato letto il valore di assorbanza a 560 nm.

2.14.4 Saggio attività cisteina desulfidrasica

Sugli estratti grezzi è stato effettuato il test enzimatico per quantificare l'attività Desulfidrasica. Sono stati effettuati con questo protocollo sia il test per valutare l'attività L-cisteina desulfidrasica che quello per l'attività D-cisteina desulfidrasica.

Per ogni campione sono stati messi in reazione 50 ug di proteine totali, il volume dei campioni prima di effettuare il saggio è stato standardizzato a 200µL con H₂O distillata sterile. La miscela di reazione è indicata in tabella 2.9, ogni campione è stato preparato in un volume finale di 1mL.

Reagente	Campione	Concentrazione Finale
TRIS	100 µL	100 mM
DTT	2,5 µL	2,5 mM
L-Cys/D-Cys *	8 µL	0,8 mM
Estratto grezzo	200 µL	-
H ₂ O	689,5 µL	-

Tabella 2.9 Composizione della Miscela di Reazione per saggio Desulfidrasico. *è stato usato come substrato di reazione L-cisteina o D-cisteina a seconda del test eseguito. I due enantiomeri della cisteina sono stati utilizzati alle stesse concentrazioni.

Dopo aver preparato i campioni questi sono stati incubati a 37°C per 15 minuti.

Dopo i 15 minuti la reazione è stata fermata aggiungendo 100 µL di Soluzione Stopper1 (FeCl₃ 30 mM in HCl 1,2 N) e 100 µL di Soluzione Stopper2 (N,N-dimetil-p- fenilendiammina dicloridrato 20 mM in HCl 7.2 N). I campioni sono stati mantenuti al buio per 20 minuti ed è stato successivamente letto il valore di assorbanza a 670 nm.

La retta di taratura è stata costruita utilizzando Na₂S, in un range di concentrazione finale compreso fra lo 0 e i 100 µM.

2.15 Sequenziamento

I campioni da sequenziare sono stati inviati presso la ditta BRM Genomics (Via Redipuglia 21A, 35131 Padova, Italia). Il sequenziamento è effettuato con metodo Sanger.

2.16 Analisi bioinformatica e statistica

Le analisi di omologia di sequenza sono state effettuate utilizzando BlastX e Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), ClustalOmega (<http://www.clustal.org/omega/>) e ClustalX (Larkin et al., 2007). Le sequenze nucleotidiche sono state tradotte in sequenze di amminoacidi utilizzando il programma TranslateTool (web.expasy.org/translate/). Ricerca dei domini conservati e sequenze consenso sono state effettuate con ScanProsite (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>) (De castro et al., 2006). Le previsioni e le analisi delle strutture proteiche sono state eseguite tramite il sito Alphafold (Jumper et al., 2021) e i modelli 3D sono stati visualizzati attraverso il programma The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.4 Schrödinger, LLC. La localizzazione dei potenziali siti di taglio cTP è stata predetta utilizzando il server ChloroP 1.1 (Emanuelsson et al., 1999). L'analisi filogenetica è stata effettuata con sia con il software MEGA X (Kumar et al., 2018) sia con programma FigTree, <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. La visualizzazione degli alberi è stata effettuata grazie al visualizzatore di alberi filogenetici iTOL (<https://itol.embl.de/>) (Letunic 2021). Per reperire le corrette informazioni tassonomiche sulle specie algali si è ricorso al database Algaebase (<https://www.algaebase.org/>) (Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2024).

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il programma informatico: SPSS-22 (IBM, Chicago, IL). Tutte le reazioni di PCR sono state replicate almeno tre volte. Le differenze significative tra i vari trattamenti sono state valutate mediante ANOVA univariata dopo aver verificato l'omogeneità delle varianze mediante il test di Levene (1960). Per i confronti multipli invece è stato utilizzato il test di Duncan. Nei grafici lettere diverse indicano campioni significativamente diversi e le barre di errore corrispondono alla deviazione standard.

2.17 Campionamento presso sorgenti di acquifero ofiolitico

I campionamenti sono stati eseguiti presso sorgenti cromifere situate sul monte Prinzera, montagna ofiolitica in provincia di Parma, Italia.

Il monte è di origine vulcanica e le sorgenti d'acqua che si trovano sulle sue pendici mostrano concentrazioni di cromo generalmente superiori ai limiti di legge di 5 µg/L (Tumolo et al., 2020). La raccolta di acqua e di parte del terriccio umido è stata effettuata a livello della scaturigine da una sorgente e di parte del terriccio umido lungo il percorso del ruscello. La portata della sorgente è interessata da cambiamenti stagionali associati ai regimi pluviometrici stagionali. Sono stati inoltre prelevati 2L di acqua separatamente per analizzare i parametri chimico-fisici dell'acqua ed effettuare il test ecotossicologico.

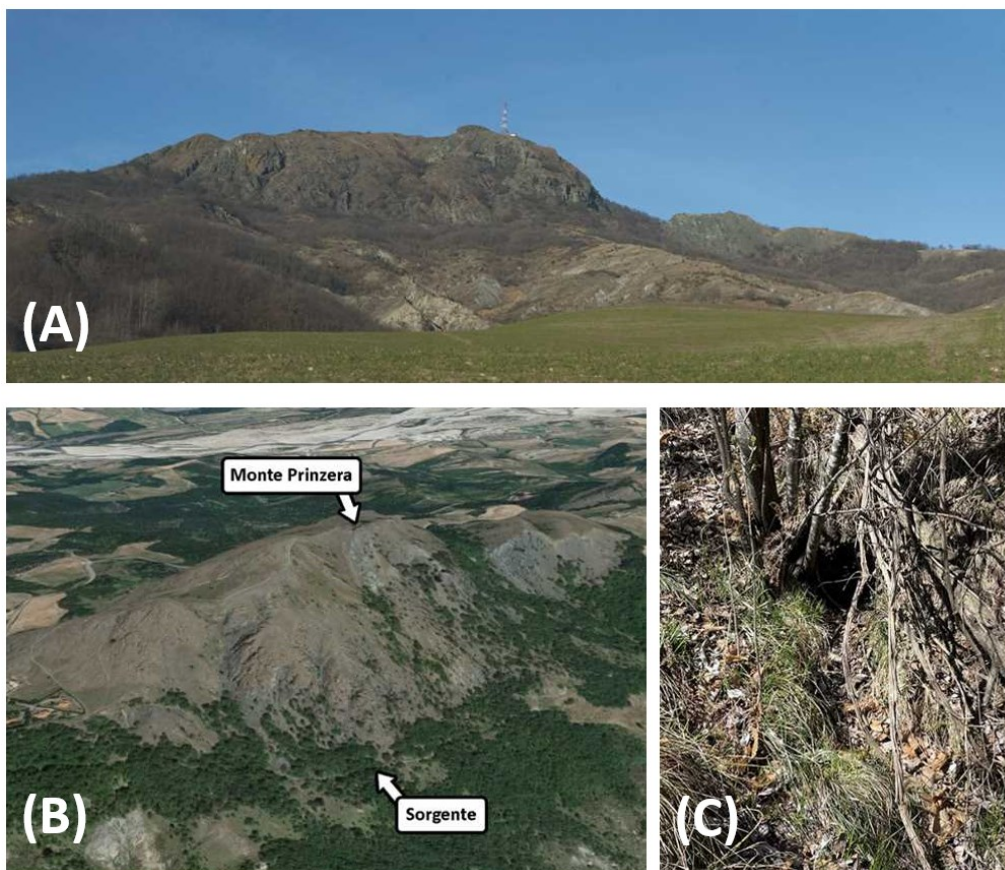


Figura 2.1 (A) Profilo del Monte Prinzera, montagna di origine ofiolitica che presenta scarsa vegetazione Chelli et al., 2016). (B) Monte Prinzera con indicato il punto di campionamento presso sorgente di origine ofiolitica. (C) Scaturigine della sorgente.

2.18 Selezione delle singole colonie sterili

Per poter confrontare geneticamente le differenti specie presenti nei campioni analizzandone il genoma, è stato indispensabile l'ottenimento di colture sterili esente da contaminazioni batteriche, o di altre specie algali.

I campioni di acqua e terriccio sono stati rabboccati con terreno di coltura, posti in beute e posizionati in cella climatica a temperatura di 24 ± 1 °C e fotoperiodo di 16 ore per consentire la crescita algale. Sono state preparate piastre contenenti terreno standard addizionato di agar. Le colture così ottenute sono state piastrate su terreno standard solido e mantenute in camera climatizzata nelle stesse condizioni descritte per le colture in terreno liquido.

Le colonie così ottenute sono state trasferite su piastre master. Fra le colonie isolate su master sono state selezionate le colonie algali e trasferite su terreno liquido standard con aggiunta di antibiotici secondo il protocollo presente in (Kan & Pan, 2010). Queste colture sono state successivamente piastrate su terreno solido contenente antibiotici per isolare le colonie pure. Dalle colonie così ottenute si è poi proceduto alla preparazione della coltura in terreno liquido per le successive analisi.

2.19 Test ecotossicologico

Sull'acqua prelevata al monte Prinzerà sono state effettuate misure per determinarne le caratteristiche di conducibilità e di pH. L'analisi della tossicità dovuta alla presenza di contaminanti è stata effettuata attraverso un test di inibizione della crescita dell'alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* secondo il metodo standard OECD Guideline N° 201 (2006) (Oecd Guideline N° 201, 2006)

L'acqua raccolta alla sorgente del monte Prinzerà è stata centrifugata immediatamente prima del saggio per rimuovere potenziali batteri che potessero falsare i risultati del test.

Il test è stato effettuato in terreno di crescita (U.S. EPA, 1978). Nelle 6 repliche di controllo il terreno è stato preparato portando a volume i componenti con H₂O distillata, mentre nelle 6 repliche di trattamento i sali del terreno diluiti con l'acqua proveniente dalla sorgente del monte Prinzerà. Sono

state effettuate misure di conducibilità elettrica sia nel terreno controllo che in quello da testare, preparato con l'acqua raccolta al monte Prinzera.

La concentrazione di cellule iniziale da utilizzare per permettere una crescita esponenziale durante tutto l'esperimento e massimizzare l'esposizione delle alghe all'agente tossico, nel caso di *Pseudokirchneriella subcapitata*, è di 10^4 cellule/ml (OECD Guideline N° 201, 2006). Le beute contenenti le alghe vengono poste in agitazione in una cella climatica con fotoperiodo di 16 ore e una temperatura di 24 ± 1 °C.). La crescita algale è stata controllata ogni 24 ore attraverso la camera contaglobuli di Neubauer.

Ad inizio e fine saggio è stato misurato il pH in ognuna delle condizioni testate.

2.20 Riconoscimento attraverso chiavi morfologiche

Uno dei metodi adottati per il riconoscimento delle specie algali è stato l'utilizzo di chiavi dicotomiche, basate sull'analisi di caratteristiche morfologiche visibili a microscopio. Le chiavi dicotomiche utilizzate sono "Les Algues d'eau douce. Initiation à la systématique. Tome I: Les Algues Vertes" (Bourelly P., 1966) e "A key to common algae. Freshwater estuarine and some coastal species" (Bellinger E.G., 1992). Per le diatomee è invece stato utilizzato l'"Atlante delle diatomee bentoniche dei corsi d'acqua italiani" (ISPRA, 2014).

2.21 Identificazione tramite analisi DNA Barcoding

Per avere una maggiore sicurezza nella determinazione delle specie algali si è proceduto alla loro identificazione molecolare mediante DNA Barcoding. Per l'analisi dei campioni raccolti sono stati usati diversi marcatori genici utilizzati l'identificazione di diversi gruppi algali:

- *rbcl*: Gene del cloroplasto coinvolto nella fotosintesi, comune nelle alghe verdi e diatomee (J. D. Hall & Lewis, 2010).

- ITS (Internal Transcribed Spacer): Regioni del DNA ribosomiale nucleari, compresa fra la subunità maggiore e la subunità minore del RNA ribosomiale offre alta risoluzione per l'identificazione delle specie ed è stata largamente usata per l'identificazione delle alghe verdi (J. D. Hall & Lewis, 2010).
- TufA: Gene utilizzato specificamente per le alghe verdi, il gene tufA codifica per una proteina essenziale nel processo di traduzione, nota come fattore di elongazione Tu (EF-Tu) (J. D. Hall & Lewis, 2010).
- Cox1 mitochondrial marker cytochrome oxidase subunit I: gene mitocondriale molto usato per l'identificazione di specie animali, è stato dimostrato essere un buon marcatore nell'identificazione delle alghe rosse. (Sounders 2005)

I primer utilizzati per i diversi marcatori sono riportati in tabella 2,10.

Marcatori	Primer
ITS	ITS2F 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAA-3' (Chen et al., 2010)
	ITS2R 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3' (Chen et al., 2010)
	ITS1 5'-AGGAGAAGTCGTAACAAGGT-3' (J. D. Hall & Lewis, 2010)
	ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White et al., 1990)
TufA	TufA F 5'-TGAAACAGAAMAWCGTCATTATGC -3' (Famà et al., 2002)
	TufA R 5'-CCTTCNCGAATMGCRAAWCGC -3' (Famà et al., 2002)
	TufA.50F 5'-TGGATGGTGCTATTYTAGTTG -3' (J. D. Hall & Lewis, 2010)
	TufA.50F 5'-TGGATGGTGCTATTYTAGTTG -3' (J. D. Hall & Lewis, 2010)
NCSSU	NewcocSSUF 5'-GTCGGCGAGGTTACTTTGAG-3' (J. D. Hall & Lewis, 2010)
	NewcocSSUR 5'-ACCGGAATCAACCTGACAAG-3' (J. D. Hall & Lewis, 2010).
rbcl	Dtrbcl2F 5'-TCAGAACGGACTCGAATTTAAA-3' (Lang & Kaczmariska, 2011)
	Dtrbcl2R 5'-CCAATWGTACCACCACCYAAT-3' (Daugbjqf & Andersen, 1997)
	Fw_rbcL_192: 5'-GGTACTTGGACAACWGTWTGGAC- 3' (Hadi et al., 2016)
	Rv_rbcL_657: 5'-GAAACGGTCTCKCCARCGCAT- 3' (Hadi et al., 2016)
	rbcL-M379 5'-FGGTTTCAAAGCTYTWC GTGC-3' (McManus & Lewis, 2011)
	Rv_rbcL_1089 5' – ATACCACGRCTACGRTCTTT – 3' (Hadi et al., 2016)
Cox1	GazF1 5'-TCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' Saunders, 2005

GazR1 5'-ACTTCTGGATGTCCAAAAAYCA-3' Saunders, 2005

Tabella 2,10 Primer utilizzati per DNA Barcoding.

2.22 Test di tolleranza al cromo

Per testare la tolleranza al cromo delle specie algali isolate, è stato condotto un esperimento per analizzare la loro capacità di crescita in presenza di diverse concentrazioni di cromo esavalente. Le concentrazioni di Cr(VI), fornite sotto forma di bicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$), testate nei campioni includono 0 mg /L come controllo, e poi 0.125, 0.5, 1 e 1.5 mg /L. Per ogni concentrazione, sono state effettuate tre repliche utilizzando un terreno di crescita standard (secondo le indicazioni dell'U.S. EPA, 1978), inoculando le alghe prelevate da una coltura in fase esponenziale, rinnovata tre o 5 giorni prima della preparazione del test, a seconda dei tassi di crescita specifici per ogni specie.

La durata del test di tolleranza è stata modulata in base alle cinetiche di crescita di ogni specie. La densità algale iniziale era di 1×10^6 cellule/ml. L'esperimento è stato condotto in provette da 100 ml, mantenute in condizioni controllate di gorgogliamento in una cella climatica con un fotoperiodo di 16 ore e una temperatura compresa tra i 21 e i 24 °C. La crescita algale è stata monitorata sia utilizzando la camera contaglobuli di Neubauer sia misurando la densità ottica alla lunghezza d'onda di 650 nm, 670 nm e 750nm.

Scopo del lavoro

Il mio progetto di dottorato si poneva due obiettivi paralleli. Il primo era quello di approfondire le conoscenze sui meccanismi di tolleranza al cromo e la loro relazione con il metabolismo del solfato nell'alga verde *Scenedesmus acutus*, utilizzando due ceppi di questo organismo con differente tolleranza ai metalli pesanti. In lavori precedenti del nostro gruppo è stata dimostrata una correlazione fra la deprivazione di zolfo e un aumento transiente della tolleranza al cromo esavalente sia nel ceppo wild type che nel ceppo cromo tollerante (Gorbi et al., 2007; Marieschi et al., 2015). Il ceppo cromo tollerante mostra anche livelli costitutivamente maggiori delle forme organiche dello zolfo, in particolare cisteina, rispetto al wild type. Inoltre, in seguito a deprivazione di zolfo, il ceppo cromo tollerante aumenta in maniera significativamente maggiore rispetto al wild type la concentrazione di cisteina cellulare libera. Lo scopo principale del primo obiettivo della mia attività di dottorato riguardava quindi l'analisi della regolazione della sintesi della cisteina nei due ceppi in differenti condizioni, concentrandoci sulla parte terminale del pathway di sintesi dell'amminoacido ovvero sugli enzimi solfito reductasi (SIR) e sul complesso cisteina sintasi (CSC) formato dagli enzimi O-acetilserina (tiolo) liasi (OAS-TL) e serina acetiltransferasi (SAT). Nel mio progetto l'attenzione si è concentrata soprattutto sullo studio dell'espressione genica e dell'attività enzimatica di OAS-TL. È infatti noto, nelle piante superiori, che alcuni stress ambientali come carenza di zolfo, azoto, carbonio ed esposizione a metalli pesanti possano indurre ad un aumento dei livelli di espressione di OAS-TL (Domínguez-Solís et al., 2001; Takahashi & Saito, 1996). Inoltre, in piante transgeniche, la sovraespressione di OAS-TL porta ad una riduzione del danno ossidativo (Noji et al., 2001; Saito et al., 1994; Youssefian et al., 2001) e migliora la tolleranza ai metalli pesanti (Domínguez-Solís et al., 2001).

Il secondo obiettivo del mio progetto voleva invece andare a verificare se le osservazioni effettuate sul nostro organismo modello potessero essere estese ad altre specie algali trovate in natura in ambienti contaminati da cromo. Si tratta quindi di un obiettivo ad ampio respiro e a lungo termine. Durante il mio dottorato ci siamo occupati della prima parte di questo progetto, ovvero l'individuazione di siti idonei di campionamento, l'isolamento e l'identificazione delle specie algali trovate e l'analisi della tolleranza al cromo esavalente di queste ultime.

3 Risultati e discussione

3.1 Prima Parte

3.1.1 Analisi dell'Espressione dei Geni Responsabili della Sintesi di Cisteina

La ricerca dei geni di interesse era stata fatta nel nostro laboratorio ricercando nei file Contig del genoma non ancora annotato di *Teradesmus obliquus* UTEX 393 (considerato sinonimo di *Scenedesmus acutus*) (Carreres et al., 2017) le sequenze omologhe ai geni del pathway del solfato nel genoma annotato dell'alga modello *Chlamydomonas reinhardtii*. All'interno del genoma di *C. reinhardtii* sono presenti tre geni *SIR*, due geni *SAT* e 4 geni *OAS-TL* (Gonzalez-Ballester & Grossman, 2009). Sulle sequenze identificate in *T. obliquus* erano stati costruiti i primer per isolare i corrispettivi geni in *S. acutus* (Ferrari et al., 2020). I geni così identificati erano stati denominati (per omologia con le sequenze di *Chlamydomonas*): *SaSir1* (GenBank: QPT54870.1), *SaSir3* (GenBank: QPT54871.1), *SaSat1* (GenBank: QPT54868.1), *SaSat2* (GenBank: QPT54869.1), *SaOAS-TL1* (GenBank: AIZ00783.2), *SaOAS-TL2* (GenBank: QPT54866.1), *SaOAS-TL3* (GenBank: AIZ00784.2), *SaOAS-TL4* (GenBank: QPT54867.1).

Sulle sequenze di questi geni sono stati disegnate coppie di primer da utilizzare nell'analisi di espressione. I primer utilizzati sono elencati in tabella 2.6. Per ogni gene sono state progettate più coppie di primer e successivamente utilizzate quelle che davano una migliore amplificazione negli esperimenti di PCR multiplex.

In entrambi i ceppi è stato valutato l'effetto di deprivazione di zolfo sui livelli di espressione dei geni coinvolti nella sintesi di cisteina. I livelli di espressione sono stati valutati a seguito di coltura per 24h in terreno standard (+S) o in terreno privo di zolfo (-S).L'analisi è stata condotta attraverso PCR Multiplex che prevedevano la contemporanea amplificazione dei frammenti genici dei trascritti di *SaOAS-TL1-4*, *SaSIR1*, *SaSIR3*, *SaSAT1-2* e di un gene di riferimento interno, ovvero il gene codificante per la subunità piccola della Rubisco (*SaRbcs*), che aveva dato buoni risultati in lavori precedenti nel nostro laboratorio (Sardella et al., 2019). Seppur vero che la carenza di un nutriente fondamentale come lo zolfo vada a influenzare differenti cicli metabolici, fotosintesi compresa, l'abbondanza di questo trascritto in ogni condizione testata ci ha comunque permesso di standardizzare la quantità di amplificato rendendo limitante la quantità di primer per questo gene.

L'intensità della banda di amplificazione della sequenza bersaglio è stata espressa per ciascun gene come percentuale del totale dell'amplificazione per ciascuna corsia, inteso come somma delle intensità delle bande di amplificazione ottenute dallo standard (Rbcs) e dal bersaglio per ogni corsia.

SIR1

Il grafico raffigurante l'espressione percentuale di *SaSIR1* nelle quattro condizioni testate è riportato in Figura 3.1. Questo gene è espresso in maniera costitutiva e nel ceppo cromo tollerante il livello di espressione del gene è leggermente più elevato rispetto al wild type ed in entrambi i ceppi sembra esserci una lieve induzione da deprivazione di zolfo. Nonostante il trend sia abbastanza chiaro, nessuna delle differenze osservate fra i livelli di espressione è risultata significativa ($p < 0,05$).

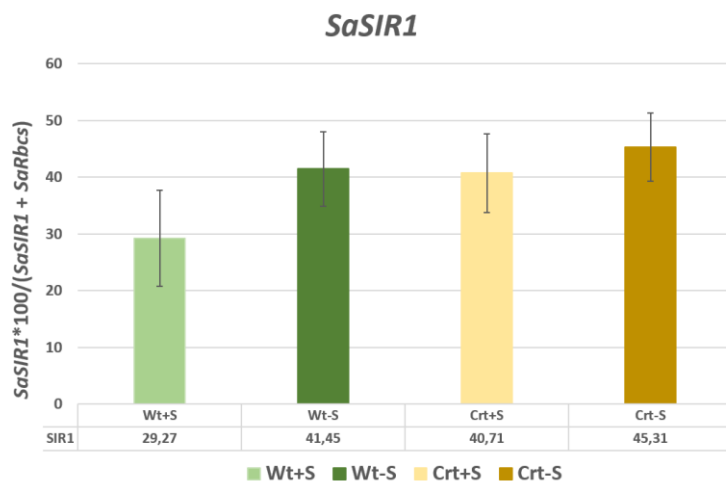


Figura 3.1 Espressione di *SIR1* nei due ceppi, wild type (Wt) e cromo tollerante (CrT) di *S. acutus* nelle condizioni di coltura in terreno standard (+S) e privo di zolfo (-S) per 24h. Reazione di PCR con 35 cicli di amplificazione. L'espressione di *SIR1* viene indicata come percentuale riferita alla somma della intensità delle bande di amplificazione per il gene di interesse ed il gene di riferimento (Rbcs) in ciascuna corsia.

SIR3

Per il gene *SaSIR3* con nessuna delle coppie di primer testate siamo riusciti ad ottenere un amplificato, forse per problemi nella identificazione iniziale della sequenza.

SAT

I livelli di espressione genica calcolati per le due isoforme di SAT sono riportati in Figura 3.2. *SaSAT1* e *SaSAT2* sono entrambe espresse in maniera costitutiva e mostrano lo stesso trend di espressione,

ovvero nessuna differenza fra ceppi né in terreno standard né in terreno privo di zolfo e blanda induzione, data da deprivazione di zolfo in entrambi i ceppi ma significativa solo nel caso di *SaSAT1*.

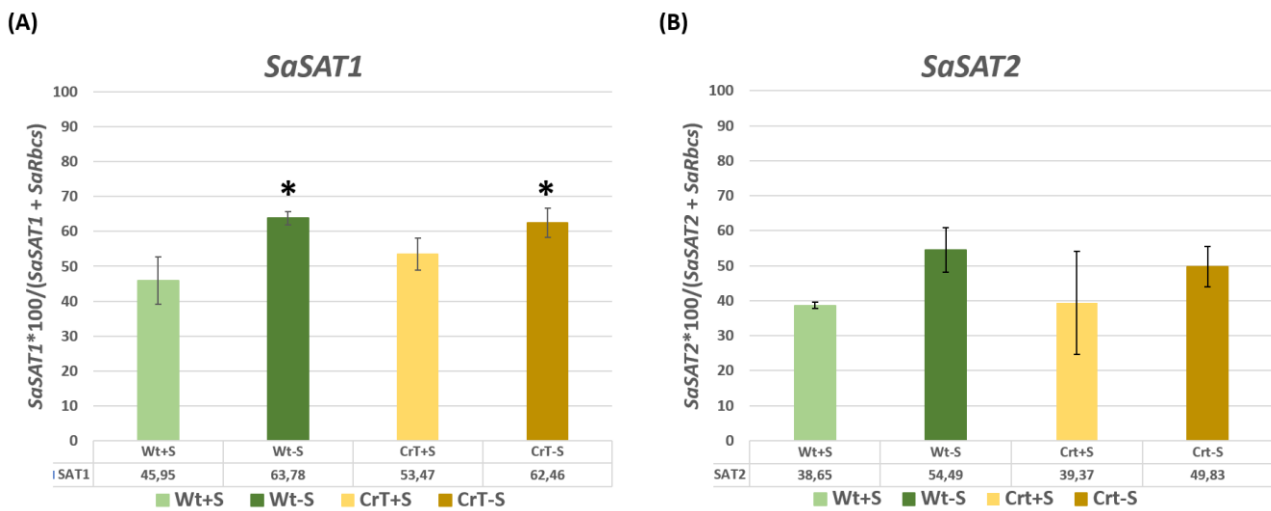


Figura 3.2 Espressione di SAT1 (A) e SAT2 (B) nei due ceppi, wild type (Wt) e cromo tollerante (CrT) di *S. acutus*, nelle condizioni di coltura in terreno standard (+S) e privo di zolfo (-S) per 24h. Reazione di PCR con 35 cicli di amplificazione. L'espressione dei geni di interesse viene indicata come percentuale riferita alla somma della intensità delle bande di amplificazione per il gene di interesse ed il gene di riferimento (Rbcs) in ciascuna corsia. La differenza significativa fra terreno (+S e -S) all'interno dello stesso ceppo è indicata con * con $p < 0.05$

OAS-TL

Delle quattro isoforme di OAS-TL, tre mostrano espressione costitutiva e inducibilità a seguito di deprivazione di zolfo. Come mostrato in Figura 3.3 A e 3.3 C, *SaOAS-TL1* e *SaOAS-TL3* hanno livelli di espressione paragonabili e sono le forme meno suscettibili alla deprivazione di zolfo. Infatti, *SaOAS-TL3* (Figura 3.3 c) aumenta la propria espressione molto debolmente e l'aumento registrato non risulta significativo e *SaOAS-TL1* (Figura 3,3 a) mostra un aumento significativo ($p < 0,05$) solo nei livelli di espressione del ceppo wild type in seguito a deprivazione di zolfo. Si osserva un aumento anche nei livelli di espressione del ceppo cromo tollerante; tuttavia, questo aumento non è significativo a causa dei livelli più alti presenti in questo ceppo in terreno +S.

Anche la forma *SaOAS-TL4* (Figura 3,3 d) risulta costitutivamente espressa e presenta i livelli di espressione più alti fra tutte le forme in ognuna delle condizioni testate. In questa forma l'aumento di espressione dopo 24h di deprivazione di zolfo risulta altamente significativo ($p < 0,01$) per entrambe i ceppi. Non si è osservata nessuna differenza significativa fra ceppi nelle diverse condizioni nutrizionali per nessuna delle forme *SaOAS-TL1*, *SaOAS-TL3* e *SaOAS-TL4*.

SaOAS-TL2 (Figura 3.3 b) è la forma con i più bassi livelli di espressione, tanto che per visualizzarne l'amplificato è stato necessario aumentare il numero di cicli di reazione. I livelli di espressione per questo enzima sono nulli o quasi per entrambi i ceppi in presenza di zolfo e si osserva un'induzione altamente significativa ($p < 0,01$) a seguito di deprivazione di zolfo per entrambi i ceppi. Questo sembrerebbe indicare *OAS-TL 2* come un gene non coinvolto nei pathway basali di controllo dei livelli di questo aminoacido ed invece specifico nella risposta a stress ambientali, nello specifico alla carenza di zolfo.

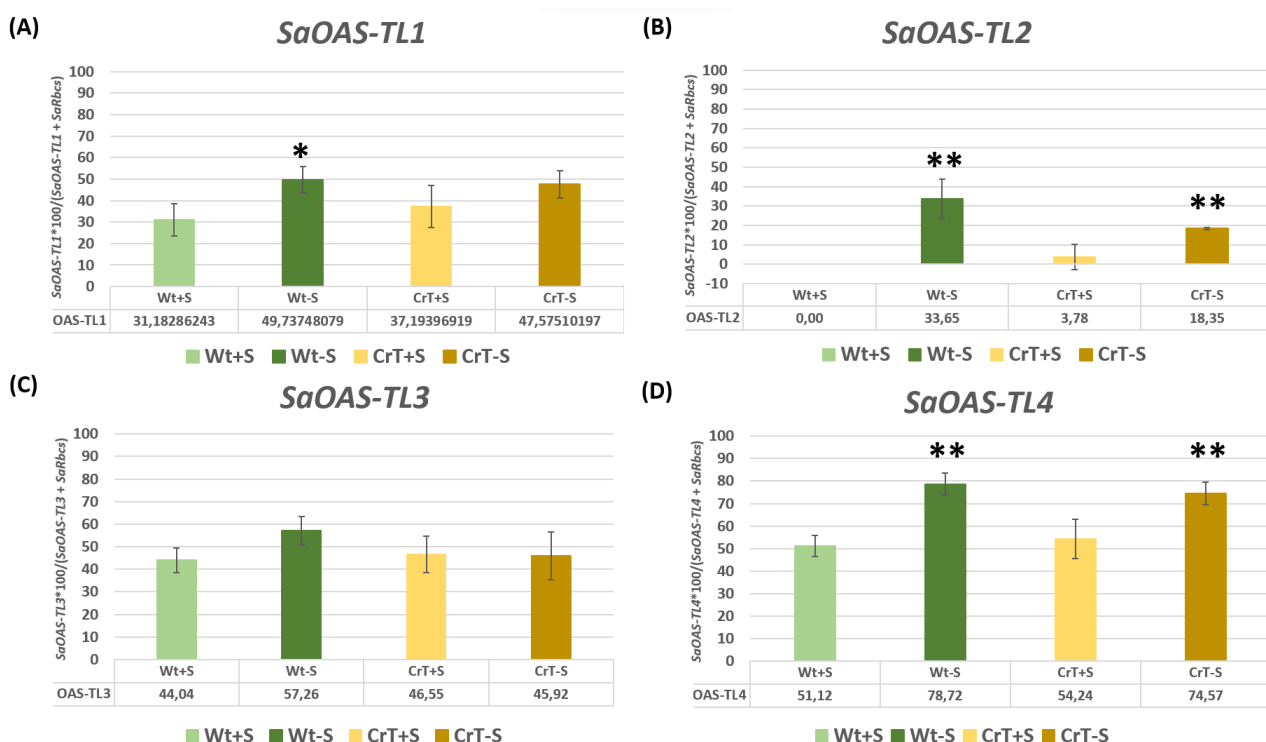


Figura 3,2 Espressione di *OAS-TL1* (a) e *OAS-TL2* (b), *OAS-TL3* (c) e *OAS-TL4* (d) nei due ceppi, wild type (Wt) e cromo tollerante (CrT) di *S. acutus*, nelle condizioni di coltura in terreno standard (+S) e privo di zolfo (-S), per 24h. Reazione di PCR con 35 cicli di amplificazione per *OAS-TL1*, *OAS-TL3* e *OAS-TL4* e reazione di PCR con 38 cicli di reazione per *OAS-TL2*. L'espressione dei geni di interesse viene indicata come percentuale riferita alla somma della intensità delle bande di amplificazione per il gene di interesse ed il gene di riferimento (*Rbcs*) in ciascuna corsia. La differenza significativa fra terreno (+S e -S) all'interno dello stesso ceppo è indicata con * con $p < 0.05$ e ** con $p < 0.01$.

Sebbene tutte e 4 le forme di *OAS-TL* mostrino inducibilità da carenza di zolfo, *SaOAS-TL4* e *SaOAS-TL2* sembrano essere le forme più attive nella risposta allo stress nutrizionale. L'aumento di espressione osservato a seguito di deprivazione di zolfo nei geni analizzati è in accordo con quanto riportato in letteratura, in *Chlamydomonas* infatti i geni codificanti per *SAT1* (Ravina et al., 2002) *SIR1*, *OAS-TL1*, e *OAS-TL3* e *SAT2* risultano meno sensibili alle variazioni di zolfo nel terreno di coltura e non mostrano un aumento di espressione significativo in seguito a deprivazione di zolfo (González-Ballester et al., 2010) mentre *OAS-TL4* risulta altamente inducibile (González-Ballester et al., 2010;

Z. Zhang et al., 2004). In contrasto alla letteratura invece risulta il comportamento di *SaOAS-TL2* che in *Chlamydomonas* non risulta inducibile da carenza di zolfo (Z. Zhang et al., 2004).

3.1.2 O-ACETILSERINA-TIOLO-LIASI

3.1.2.1 Analisi Filogenetica

L'elevata risposta delle OAS-TL alla carenza di solfato potrebbe essere responsabile dell'aumentata sintesi di cisteina e dell'aumento transiente di tolleranza al cromo osservato in entrambe i ceppi durante il recovery dopo un periodo di deprivazione di zolfo (Gorbi et al., 2007; Sardella et al., 2019). Partendo da questa considerazione, abbiamo approfondito le analisi su questo enzima.

Le sequenze di *S. acutus* sono state utilizzate per ricercare in banca dati le sequenze omologhe in vari gruppi algali. Le sequenze ottenute sono state quindi allineate e utilizzate per ricostruire un albero filogenetico.

In Figura 3.4 è riportato l'albero ottenuto unendo tutti i risultati delle ricerche di omologia, limitata ai soli organismi algali, delle quattro isoforme di OAS-TL.

L'albero è composto da due rami separati, nel ramo principale sono raggruppate le sequenze omologhe a *SaOAS-TL1*, *SaOAS-TL3* e *SaOAS-TL4*, i cui sub-cluster sono indicati rispettivamente dai cerchietti giallo, blu, e verde in figura 3.4 mentre il ramo secondario, dove sono presenti un numero inferiore di sequenze, contiene le sequenze omologhe a *SaOAS-TL2* (ramo indicato dal cerchietto rosso in Figura 3.4). In analisi filogenetiche più estese comprendenti anche piante superiori (dato non mostrato), troviamo che la maggioranza delle sequenze di piante superiori appartengono al ramo principale e mostrano in particolare omologia con OAS-TL4. Questa isoforma sembra quindi essere quella maggiormente evoluta fra le quattro analizzate.

All'interno delle alghe verdi, sia le Chlorophyceae che le Trebouxiophyceae possiedono quattro isoforme. Mentre nelle Mamiellophyceae nella nostra analisi siamo riusciti ad isolare soltanto tre isoforme, che hanno una distribuzione simile, sia per numero che per posizione all'interno dell'albero, a quella delle sequenze di diatomee. I restanti gruppi algali, come le rhodophytae,

mostrano un numero minore di isoforme, con solo due forme presenti, una nel ramo principale (forme 1, 3, 4) e una nel ramo secondario (forma 2).

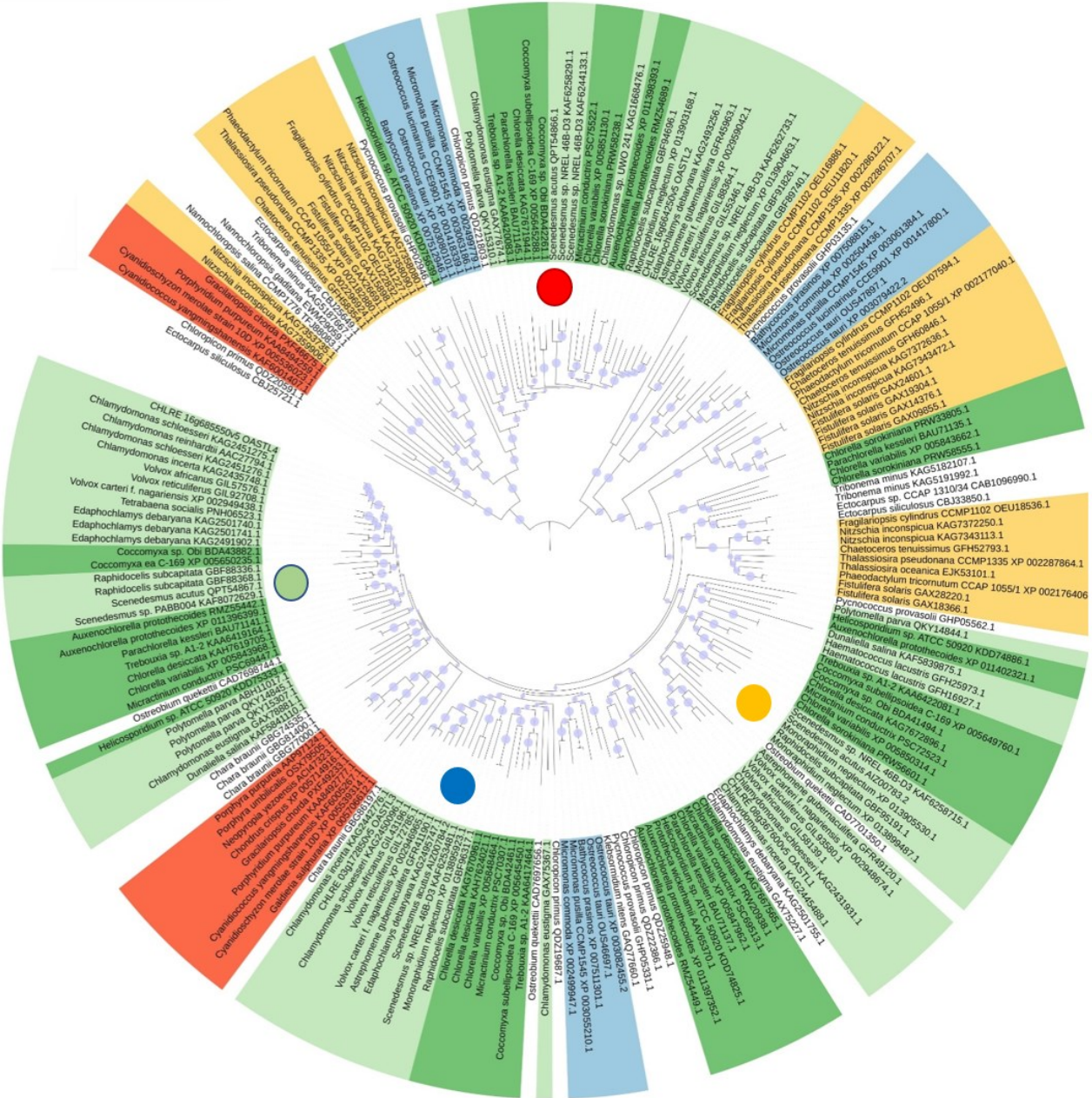


Figura 3.4 Albero filogenetico di OAS-TL nei differenti gruppi algali. Il ramo specifico per ognuna delle quattro isoforme di *S. acutus* è indicato con un pallino colorato: in rosso OAS-TL2, in giallo OAS-TL1, in blu OAS-TL3 ed in verde OAS-TL4. Colorate in rosso troviamo le sequenze appartenenti alle Rhodophyte; in giallo le sequenze appartenenti alle Bacillariophyceae; in azzurro le sequenze di mamiellophyceae; in verde scuro le sequenze di Trebouxiophyceae; in verde chiaro le Chlorophyceae. Albero prodotto con il software MEGA utilizzando il metodo di clustering Neighbor joining con un valore di bootstrap di 1000, partendo da allineamento di sequenze omologhe effettuato con l'algorithm ClustalW. L'albero ottenuto è stato visualizzato con il software iTOL, rooted a midpoint. I valori di bootstrap sono rappresentati dai pallini azzurri, significatività maggiore del valore corrisponde ad area maggiore del pallino.

L'analisi estesa, ampliando la ricerca a 1000 sequenze omologhe, ha mostrato per le forme *SaOAS-TL 1*, *SaOAS-TL3* e *SaOAS-TL4* elevata omologia con sequenze algali e di piante superiori, mentre per *SaOAS-TL2* su 1000 sequenze omologhe solo 150 appartenevano a organismi fotosintetizzanti, mentre le restanti 850 sequenze appartenevano a organismo fungini. Questo dato, unito alla divergenza netta ottenuta da analisi filogenetica fra OAS-TL2 e le altre isoforme potrebbe avere due possibili spiegazioni: la prima farebbe ipotizzare che *SaOAS-TL2* abbia una localizzazione cellulare non cloroplastica e che sia quindi la forma citosolica o mitocondriale dell'enzima; la seconda possibile spiegazione potrebbe invece essere legata ad una funzione differente di OAS-TL2 rispetto alle altre tre forme di questo enzima.

3.1.2.2 Localizzazione cellulare

Per meglio comprendere il dato filogenetico si è cercato di stimare la localizzazione cellulare delle differenti forme di OAS-TL di *S. acutus*, utilizzando gli svariati algoritmi disponibili con questa funzione. Le localizzazioni cellulari stimate delle differenti OAS-TL di *S. acutus* sono riportate in tabella 3.1. È purtroppo immediatamente evidente che non ci sia una univocità nelle localizzazioni indicate per nessuna delle isoforme considerate. *SaOAS-TL 1*, *SaOAS-TL 3* e *SaOAS-TL 4* vengono localizzate nel mitocondrio o nel cloroplasto a seconda dello strumento utilizzato. Anche in questo caso OAS-TL 2 si presenta come la più divergente fra le isoforme, ed è anche la forma che presenta maggiore variabilità fra le possibili localizzazioni. In OAS-TL2 è anche interessante notare come nessun programma utilizzato la identifichi come forma cloroplastica, evidenza, per quanto debole, in linea con le nostre conclusioni dell'analisi filogenetica.

Nel tentativo di ottenere un dato più chiaro, soprattutto per OAS-TL1, OAS-TL3 e OAS-TL4, abbiamo effettuato una analisi espansa utilizzando anche le sequenze omologhe di altre alghe verdi (dati non riportati). Queste analisi non ci hanno tuttavia consentito di ottenere delle indicazioni aggiuntive rispetto a quelle già ottenute attraverso l'analisi delle sequenze di *S. acutus*.

Questi strumenti di analisi bioinformatica, addestrati su sequenze di piante superiori, mostrano spesso il limite di non identificare correttamente i peptidi di transito presenti nelle proteine algali. In *Arabidopsis thaliana* sono presenti 5 forme di questo enzima, 8 se si considerano anche le

proteine OAS-TL-like riportate da Álvarez e collaboratori (2010), con differenti localizzazioni cellulari (Kawashima et al., 2005), tuttavia, dato che le sequenze di piante superiori presentano in massima parte omologia forte con OAS-TL4, e che nessuna delle sequenze di *Arabidopsis* clusterizza nel gruppo di appartenenza di SaOAS-TL2, non ci è stato possibile traslare le indicazioni per le localizzazioni delle proteine di *Arabidopsis* ai vari enzimi di *S. acutus*.

	WOLFP SORT	TargetP	CELLO	DeepLoc	PredAlgo	Protein Prowler	Multiloc 2
OAS-TL1	Mitocondrio / Cloroplasto	Membrana tilacoidale	Mitocondrio / Cloroplasto	Cloroplasto	Mitocondrio	Cloroplasto	Cloroplasto
OAS-TL2	EXTRA	Altro	Mitocondrio	Mitochondrion	Pathway secretorio	Mitocondrio/ Altro	Mitocondrio/ Citosol
OAS-TL3	Cloroplasto	Membrana tilacoidale	Cloroplasto	Cloroplasto	Mitocondrio	Mitocondrio	Cloroplasto
OAS-TL4	Mitocondrio	Membrana tilacoidale	Cloroplasto	Cloroplasto	Cloroplasto	Mitocondrio/ Altro	Cloroplasto

Tabella 3.1 Localizzazione cellulare predetta per le differenti forme di OAS-TL di *Scenedesmus acutus* ottenuta utilizzando algoritmi presenti su diversi siti di predizione.

Nel tentativo di caratterizzare meglio, in particolare OAS-TL2, e per cercare di ovviare ai limiti intrinseci di questi algoritmi, abbiamo esteso l'analisi anche alle sequenze di piante superiori filogeneticamente vicine ad OAS-TL2 (dati non mostrati). Anche in questo caso è stata osservata grande variabilità nelle indicazioni, sia tra sequenze, sia tra i risultati ottenuti con i differenti algoritmi utilizzati.

Nell'organismo modello *C. reinhardtii* la sintesi di cisteina sembra limitata al cloroplasto ed è stato postulato che la presenza in molteplici compartimenti cellulari dell'attività di sintesi di cisteina che si registra nelle piante vascolari sia una caratteristica evolutasi successivamente (Giordano & Prioretti, 2016). In realtà, come dimostrato sperimentalmente da Carfagna e colleghi, (Carfagna et al., 2011), esiste un isoforma citosolica di OAS-TL, in aggiunta alla forma cloroplastica, nell'alga verde *Chlorella sorokiniana*.

Tuttavia, ad oggi, la mancanza di studi approfonditi su un numero di specie ampio non consentono di fornire una risposta chiara alla localizzazione cellulare delle OAS-TL in alghe e alla evoluzione della compartimentalizzazione della produzione di cisteina (Giordano & Prioretti, 2016).

3.1.2.3 Analisi Strutturale

Per capire meglio le differenze fra le varie forme di OAS-TL in *Scenedesmus acutus* abbiamo effettuato un'analisi strutturale più dettagliata. Purtroppo, esistono pochi studi su queste proteine in alghe, quindi non abbiamo trovato nelle banche dati modelli cristallografici da analizzare e l'analisi si è quindi inizialmente focalizzata sul modello cristallografico della proteina *AtOAS-TL* di *A. thaliana* (*AtOASS*) corrispondente alla forma citosolica dell'enzima (codice UniProt: P47998). Le informazioni ottenute sono state quindi utilizzate per inferire sulle proprietà delle OAS-TL di *S. acutus*.

Bonner e colleghi hanno effettuato un'analisi cristallografica e biochimica approfondita della struttura di *AtOASS* e hanno svolto esperimenti di mutagenesi volti a comprendere quali fossero i residui determinanti per l'attività enzimatica. L'enzima attivo si trova in forma di omodimero, il monomero è composto da due domini strutturali beta/alpha, un più piccolo dominio N-terminale (residui 45–150) ed un più grande dominio C-terminale (residui 3–44 e 151–303) (Bonner et al., 2005).

Il dominio catalitico delle OAST-TL individuato mediante Prosite (de Castro et al., 2006) è condiviso con quello delle cistationina beta-sintasi, ed ha la seguente sequenza consenso: K-x-E-x(3,4)-[PAF]-[STAGC]-x-S-[IVAPM]-K-x-R-x-[STAG]-x(2)-[LIVM]. Questa sequenza consenso è stata ottenuta usando un ampio spettro di organismi, comprendenti tutti i regni. La lisina del gruppo K-x-R è l'aminoacido responsabile del legame con il PLP nel sito attivo, così come dimostrano lavori su piante superiori (Bonner et al., 2005) e batteri (Rege et al., 1996).

Questa lisina presente nel sito attivo lega il PLP formando una base di Schiff interna, l'O-acetilserina scalza il PLP dal legame con la lisina iniziando la prima mezza reazione e producendo un intermedio di alfa-aminoacrilato legato al PLP. La seconda mezza reazione coinvolge l'aggiunta di zolfo all'intermedio, generando così un'aldimina esterna con la serina. La lisina del sito attivo reagisce con questo intermedio, rilasciando cisteina e rigenerando la base di Schiff (Tai & Cook, 2001).

La lisina catalitica non è l'unico aminoacido responsabile del corretto legame con il PLP. Nella sequenza di AtOASS formano legami idrogeno diretti con il piridossalfosfato la G181, T182, G183 e T185. H157 e T185 invece formano legami idrogeno indiretti con il PLP mediati da molecole d'acqua.

Nella sequenza di *A. thaliana* completano il sito attivo i residui 74-78 (TSGNT) che formano l'altro lato del sito attivo. Questi sono responsabili della corretta interazione con la molecola di solfuro.

Caratteristica di OAS-TL è anche quella di formare il complesso cisteina sintasi con SAT. In AtOASS sono stati individuati tre aminoacidi (K217, H221 e K222), facenti parte di un loop altamente conservato fra due alfa eliche vicine al solco di ingresso del sito attivo. Mutanti portanti mutazioni puntiformi su tre aminoacidi polari di questo loop: K217A, H221A, e K222A, non hanno mostrato una riduzione dell'attività enzimatica di OAS-TL ma sono incapaci di formare un complesso stabile con AtSAT.

Sovrapponendo la struttura di AtOASS e le strutture predette attraverso AlphaFold (Jumper et al., 2021) delle quattro isoforme di *S. acutus* (Figura 3.5) si può notare come OAS-TL2 (Figura 3.5 B) sia la forma che più si discosta dalla struttura di *A thaliana*, mentre quella che più la ricalca è la forma OAS-TL4 (Figura 3.5 D). Questo è atteso e ricalca il dato filogenetico.

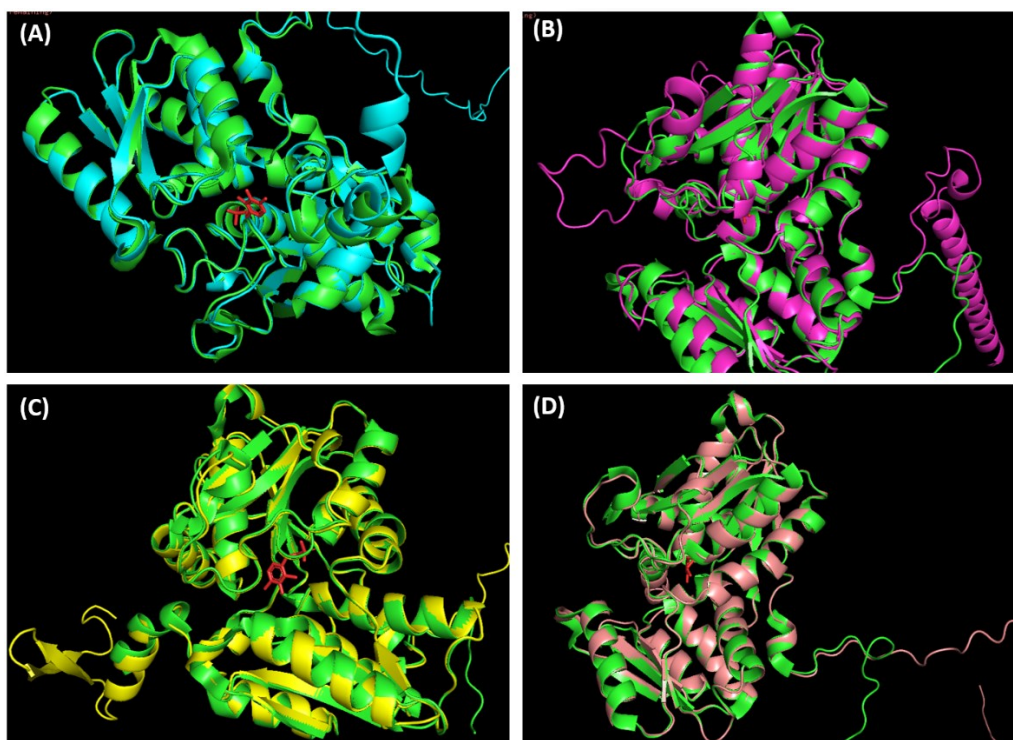


Figura 3.5: Sovrapposizione fra la struttura cristallografica di AtOASS, in verde, e le predizioni di struttura ottenute con AlphaFold di: SaOAS-TL1 (A), in azzurro; SaOAS-TL2 (B), in viola; SaOAS-TL3 (C), in giallo; SaOAS-TL4 (D), in rosa. In rosso è indicata la molecola di PLP. Strutture sovrapposte ed immagine realizzata con il programma PyMOL (versione 2.5.4).

serina, ovvero la differenza che osserviamo su SaOAS-TL2; tuttavia, mutazioni dell'asparagina in alanina hanno portato ad una riduzione dell'ordine di 10^5 dell'efficienza cinetica (Km/Kcat).

Indagando più a fondo l'importanza di questi residui anche in organismi non fotosintetizzanti, in un articolo del 2004, Fujita e Takegawa hanno studiato l'effetto di mutazioni su due geni potenzialmente codificanti per cisteina sintasi di *Schizosaccharomices pombe*, rispettivamente *cys1a* (codice GeneBank: NP_595332.1) e *cys1b* (codice GeneBank: NP_593343.1). La capacità di sintesi di cisteina è stata testata attraverso esperimenti di inattivazione genica. I mutanti difettivi di *cys1a* per crescere avevano bisogno di una fonte di cisteina esterna, mentre i mutanti *cys1b* erano in grado di crescere anche in terreno privo di cisteina (Fujita & Takegawa, 2004). Questo sembrerebbe indicare che in *Schizosaccharomices pombe* *cys1b* non abbia capacità di sintesi di cisteina. Nella Figura 3.7 sono allineate le due sequenze di *S. pombe* citate assieme alla sequenza OAS-TL2 di *Scenedesmus acutus*. Nel riquadro in arancione dell'immagine è evidenziato il sito di legame al solfuro. OAS-TL2 presenta le stesse differenze amminoacidiche in questo sito che troviamo nella proteina *cys1b*, ovvero la forma senza capacità di sintesi di cisteina in *S. pombe*.

<i>cys1a</i>	GRTPLIRLNTLSNETGCNIIAKAEFQNPGGSVKDRRAAYVVRDAEKKGKLSRG--GTIVE	79
<i>cys1b</i>	GNTKMVRIKSLSQATGCDILAKAEFLNPGNSPKDRVALQMIRTAEEENGDLVPYQSNVAVYE	110
OASTL2	GNTPLIRIASLSEQTGCEILGKAEFLNPGGSVKDRVALRIVEETLASGQLQPG--GLITE	118
	. :.*: :**:* **:*.*.* **:*.* **:*.* :.. : .*. * . : *	
<i>cys1a</i>	GTAGNTCIGLAHIARARGYKCVIYMPNTQSQAIDTLKFLGAEVHPVPVAPFSNPLNYNH	139
<i>cys1b</i>	GTAGSTCISIAMLCCLGYDSRIYMPDQSKEKSDILELLGAHVQRVTPAPIVDPNHFVN	170
OASTL2	GTAGSTCVSLAMVAAAVGCHCFIAMPDDAAVEKAQLLQALGAEVRLRPVSITHPEHPVN	178
	***.* :.*: .. : * .. * ** : * : * : **:* : . : .* : :	

Figura 3.7 Porzione di allineamento fra SaOAS-TL2 e *cys1a* e *cys1b* di *S. pombe*. Nel riquadro arancione la porzione del sito attivo responsabile del legame col la molecola di solfuro durante la reazione.

È possibile quindi, in base a queste considerazioni, supporre che SaOAS-TL2 non sia una cisteina sintasi. Una risposta alla sua possibile funzione potrebbe trovarsi nel lavoro di Álvarez e colleghi (Álvarez et al., 2010). In questo lavoro si dimostra sperimentalmente come la proteina OAS-TL-like citosolica di *A. thaliana* (codice UniProt: F4K5T2), anch'essa con una differenza nel sito di legame al solfuro (TSGNT), ovvero una glicina (G) al posto della serina (S), abbia in realtà un'attività L-cisteina desulfidrasica.

Come detto precedentemente, oltre alla reazione enzimatica di sintesi della cisteina, le OAS-TL devono avere la capacità di formare un legame con SAT andando a costituire il complesso cisteina

sintasi. Nel riquadro viola della Figura 3.6 è evidenziato il loop conservato (KPGPHK) indicato come necessario per la corretta interazione con SAT e quindi della formazione del complesso cisteina sintasi. SaOAS-TL2 mostra una inserzione di 16 aminoacidi che va ad interrompere questa porzione di sequenza, che è inoltre mancante dei due residui HK terminali indicati come necessari per la corretta formazione del legame con SAT. La sequenza di legame con SAT nelle OAS-TL all'interno degli organismi fotosintetizzanti è altamente conservato, tanto che ha consentito a Salbitani e collaboratori (Salbitani et al., 2014), di effettuare una purificazione per affinità di OAS-TL dell'alga verde *Chlorella sorokiniana* utilizzando la forma citosolica di SAT (AtSAT5) di *A. thaliana*. La sua mancanza o alterazione potrebbe quindi indicare una diversa attività o una diversa capacità di intervenire nella formazione del complesso CSC.

Le indicazioni ottenute dal confronto con le sequenze di *A. thaliana* sembrerebbero indicare per SaOAS-TL2 una diversa capacità di interagire col solfuro e una ridotta capacità di legame con SAT. Quanto detto potrebbe portare ad ipotizzare per questo enzima o una attività diversa dalla sintesi di cisteina o comunque una ridotta capacità di formare il complesso CSC e quindi di intervenire sulla regolazione della formazione di OAS ed una probabile prevalente attività come dimero libero. Per quanto questo potrebbe sicuramente essere un'ulteriore indicazione della funzione differente dalla sintesi di cisteina per SaOAS-TL2, è tuttavia vero che le informazioni ricavate su OAS-TL dalle analisi condotte su *A. thaliana* potrebbero però non bastare per le forme OAS-TL2 presenti in alghe, data la maggiore omologia di questa isoforma con sequenze di organismi non fotosintetici

Le informazioni ottenute dall'analisi filogenetica e strutturale sembrano quindi indicare una localizzazione non cloroplastica per SaOAS-TL2 e potenzialmente anche una funzione L-cisteina desulfidrasica. La scarsità di studi dettagliati su sequenze OAS-TL di organismi algali ci rendono impossibile, tuttavia, assegnare con certezza queste caratteristiche a questa proteina.

3.1.2.4 Test Attività OAS-TL

Per verificare se la deprivazione di zolfo e la presenza di Cr(VI) all'interno del terreno di coltura avessero un effetto sull'attività enzimatica di OAS-TL, abbiamo valutato l'attività di sintesi di cisteina nei due ceppi di *S. acutus* in differenti condizioni. Il saggio è stato effettuato su alghe pre-coltivate per sette giorni in terreno completo (S-sufficient) o in terreno privo di zolfo (S-replete) e

successivamente rimesse in coltura in terreno standard addizionato con 0, 1 e 2mg/L di Cr(VI). I campionamenti sono stati effettuati al termine della pre-coltura per i tempi zero, e dopo 24 e 48 ore dal rinnovo dei nutrienti. L'attività enzimatica è espressa come μmoli di cisteina prodotta per mg di proteina totale al minuto.

In figura 3.8 è riportato l'effetto della carenza di zolfo e delle differenti concentrazioni di cromo nel ceppo wild type (figura 3.8 A) e nel ceppo cromo tollerante (figura 3.8 B). In entrambi i ceppi, al tempo zero, l'attività di sintesi di cisteina è fortemente indotta nella condizione S-replete rispetto alla condizione S-sufficient. L'attività enzimatica si mantiene stabile nella condizione S-sufficient sia alle 24 che alle 48 ore. Nella condizione S-replete l'attività cala in modo altamente significativo dopo 24 ore dal ripristino dei nutrienti e il calo continua in modo non significativo alle 48 ore, rimanendo comunque a livelli significativamente più alti rispetto a quelli osservati nella condizione S-sufficient.

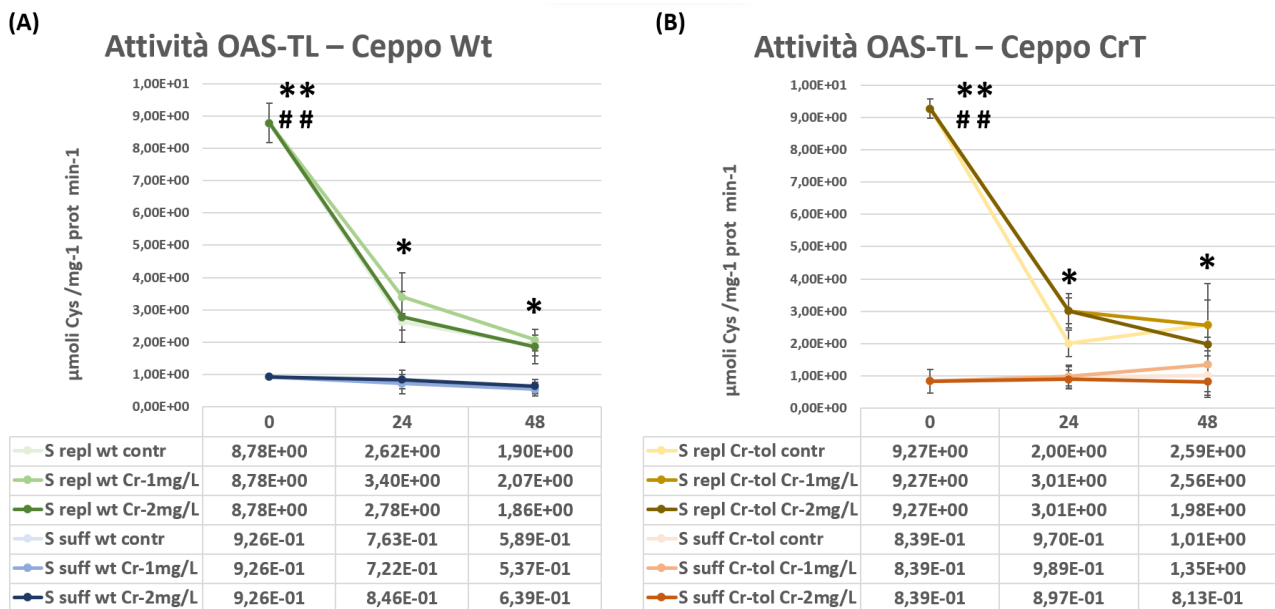


Figura 3.8: Attività di sintesi della cisteina nel ceppo Wild Type (A) e cromo tollerante (B), espressa come μmoli di cisteina prodotta per mg di proteine totali al minuto. In azzurro sono rappresentate le colture wild type S-sufficient, In verde le condizioni wild type S-replete, In marrone le condizioni cromo tollerante S-sufficient. In ocra le condizioni cromo tollerante (S-replete). Nei toni più chiari dei rispettivi colori sono riportate le condizioni controllo mentre le colture trattate con 1 mg/L di Cr(VI) e 2 mg/L di Cr(VI) sono rappresentate con toni progressivamente più scuri dello stesso colore. La differenza significativa fra le condizioni S-sufficient e S-replete all'interno dello stesso ceppo è indicata con * ($p < 0.05$) oppure ** ($p < 0.01$). La differenza significativa fra i tempi zero e le 24 ore all'interno della condizione S-replete è indicata con ## ($p < 0.01$).

3.1.2.5 Test Attività L-cisteina desulfidrasica.

L'aumentata attività enzimatica di OASTL osservata dopo deprivazione di zolfo potrebbe essere imputata all'aumentata espressione di tutte le forme di *SaOAS-TL* a seguito di deprivazione di zolfo, ed in particolare all'attivazione di *SaOASTL2* e *SaOASTL4*. Queste osservazioni potrebbero spiegare gli alti valori di cisteina osservati nella condizione S-replete in lavori precedenti (Gorbi et al., 2007; Sardella et al., 2019). Per la produzione di cisteina occorrono, come detto, O-acetil serina (OAS) e solfuro. Maggiore disponibilità di OAS potrebbero derivare dall'attivazione di *SaSAT1* indotta dalla carenza di solfato, mentre per quanto riguarda la disponibilità di solfuro non abbiamo evidenziato aumenti significativi di espressione a carico di *SaSIR1* e purtroppo non siamo riusciti a produrre dati a carico dell'espressione di *SaSIR3*. Tuttavia, dati di letteratura indicherebbero queste due forme come cloroplastiche e, nel lavoro di Sardella e colleghi (2019), è stato dimostrato come l'attività dell'enzima ATP solforilasi (ATS), enzima a monte del pathway di riduzione del solfato, sia inferiore in entrambi i ceppi nella condizione S-replete rispetto alla condizione S-sufficient al tempo zero. È quindi difficile immaginare che il solfuro necessario per la produzione delle quantità di cisteina osservate provenga da questa via metabolica.

La cellula vegetale però, oltre alla via cloroplastica, dispone di altre possibili vie di produzione del solfuro nel mitocondrio o nel citosol attraverso la degradazione di cisteine grazie all'azione di cys desulfidrasi che sono state dimostrate contribuire al mantenimento dell'omeostasi di cisteina in condizioni di stress ambientali in *Arabidopsis* (Álvarez et al., 2010). Il processo di consumo di cisteina per produrre solfuro e generare nuova cisteina parrebbe non molto sensato, ma potrebbe innescarsi durante il periodo di deprivazione di zolfo a valle dell'azione delle proteasi coinvolte nel riarrangiamento delle proteine cellulari nell'ottica di economizzare zolfo. L'enzima potrebbe quindi agire su residui di cisteina provenienti da altre proteine o attingendo a pool di cisteina contenuti nel glutatione (GSH). Durante il periodo di deprivazione di zolfo infatti sono stati osservate significative riduzioni di GSH in *S. acutus* (Gorbi et al., 2007; Sardella et al., 2019) e *C. sorokiniana* (Carfagna et al., 2011) e nei livelli di proteine solubili in *C. reinhardtii* (Takahashi et al., 2001; Z. Zhang et al., 2004).

Vie alternative di produzione del solfuro, oltre a quella di assimilazione riduttiva dello zolfo nel cloroplasto, sono di estrema importanza per le cellule data l'elevata valenza che questa molecola riveste come molecola segnale per innescare risposte a vari stress (H. Liu et al., 2021; Q. Zhang et al., 2020). Per questo motivo abbiamo deciso di analizzare anche l'attività desulfidrasica.

3.1.3 Cisteina Desulfidrasa

3.1.3.1 Analisi bioinformatica

La ricerca delle sequenze di Cys desulfidrasa è stata effettuata in banca dati partendo dalle sequenze dell'organismo modello *A. thaliana* sulla base delle informazioni sull'attività L-cisteina desulfidrasica in differenti piante superiori (Kurmanbayeva et al., 2022; Riemenschneider et al., 2005). In *Arabidopsis* oltre all'enzima L-Cys desulfidrasa (codice UniProt: F4K5T2) sono presenti due forme dell'enzima D-cisteina desulfidrasa. La forma DCYD1_ARATH (codice UniProt: F4HYF3), viene descritta come una D-cisteina desulfidrasa con elevata affinità per la D-cisteina, mentre la seconda isoforma (DCYD2_ARATH, codice UniProt: A1L4V7) viene descritto come un enzima capace di accettare entrambi gli enantiomeri della cisteina come substrato. Questi enzimi condividono alcune caratteristiche con le OAS-TL e sono entrambe appartenenti alla famiglia di enzimi PLP dipendenti e dati di letteratura riportano una attività desulfidrasica come attività collaterale delle OAS-TL stesse.

La ricerca effettuata su database di sequenza algali, usando come query le sequenze DCYD1 e DCYD2, conducono a sequenze di D-Cys algali, la sequenza di L-Cys- desulfidrasa (codice UniProt: F4K5T2) ha restituito in *Scenedesmus acutus* e negli altri organismi algali solo sequenze di OAS-TL; questo lascerebbe supporre che nelle alghe l'attività L-Cys desulfidrasica sia a carico dell'attività collaterale delle OAS-TL (Kurmanbayeva et al., 2022).

Nell'immagine 3.9 è riportato una parte del logo di sequenza ottenuto con sequenze omologhe ad entrambe le sequenze di *A. thaliana*. Nei riquadri rossi sono evidenziate due differenti porzioni del sito attivo, responsabili del corretto legame con il PLP. Con una freccia rosso scuro è indicata la lisina catalitica, con una freccia viola è invece indicata un'asparagina, altro aminoacido importante per il legame con il cofattore piridossal fosfato. Mentre le forme omologhe alla sequenza DCYD1 di *A. thaliana* presentano una asparagina in questa posizione, le forme omologhe a DCYD2 presentano un'alanina. Nelle piante le isoforme che presentano l'alanina in questa posizione sono catalogate come forme mitocondriali. Questa mutazione si è rivelata altamente capace di discernere fra le due forme di questo gene nelle analisi filogenetiche da noi effettuate.

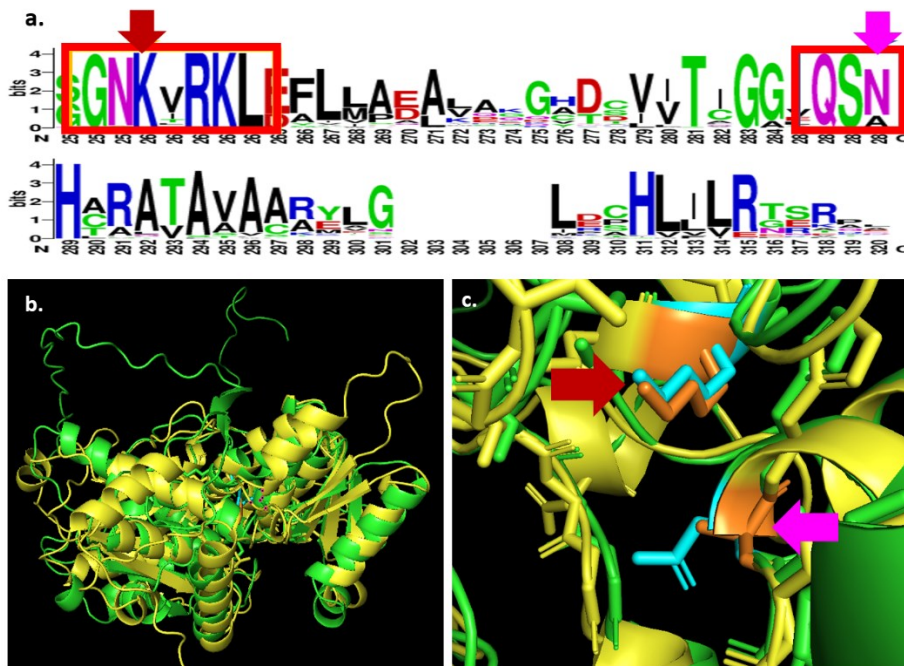


Figura 3.9 (a.) Logo del sito attivo dell'enzima D-cisteina desulfidasi ottenuto da sequenze di organismi algali. Nei riquadri rossi sono indicate due porzioni particolarmente conservate del sito attivo, importanti per il corretto legame con il piridossalfosfato. con una freccia rosso scuro è indicata la lisina catalitica mentre con una freccia lilla è indicata un'asparagina (aminoacido facente parte del sito attivo e che contribuisce al legame con il PLP) che in alcune sequenze è mutato in alanina. (b.) Sovrapposizione delle strutture predette delle due isoforme di *A. thaliana*. In verde DCYD1 e in giallo DCYD2. (c.) Ingrandimento all'interno del sito attivo. Sono evidenziati la lisina catalitica (freccia rosso scuro) e l'asparagina/alanina (freccia lilla). In blu troviamo i residui della forma DCYD1, in arancione quelli della forma DCYD2.

Nell'albero filogenetico riportato in figura 3.10, ottenuto dall'allineamento di una selezione di sequenze algali, possiamo vedere una separazione netta in due rami, corrispondenti alle due isoforme di *A. thaliana*. Un ramo principale, segnato in verde, con le sequenze omologhe a DCYD1 ed un ramo secondario, segnato in giallo, dove invece si trovano le sequenze omologhe a DCYD2. Non tutti i gruppi algali presentano entrambe le isoforme; in particolare, nelle Chlamydomonadales e nelle Trebouxiophyceae sono presenti due forme di desulfidasi, come indicato dalle sequenze che clusterizzano in entrambe i rami, quindi sia la desulfidasi che accetta come substrato sia L che D-cisteina che quella con elevata affinità per D-cisteina. In *Scenedesmus acutus* così come in altre alghe appartenenti alle Sphaeropleales sembrano apparentemente presenti solo sequenze omologhe a DCYD1 (forma portante l'asparagina nel sito attivo, ad alta affinità per la D-cisteina).

Nelle Sphaeropleales quindi l'attività desulfidrasica a carico della L-Cys sarebbe molto probabilmente lasciata all'attività collaterale delle OAS-TL.

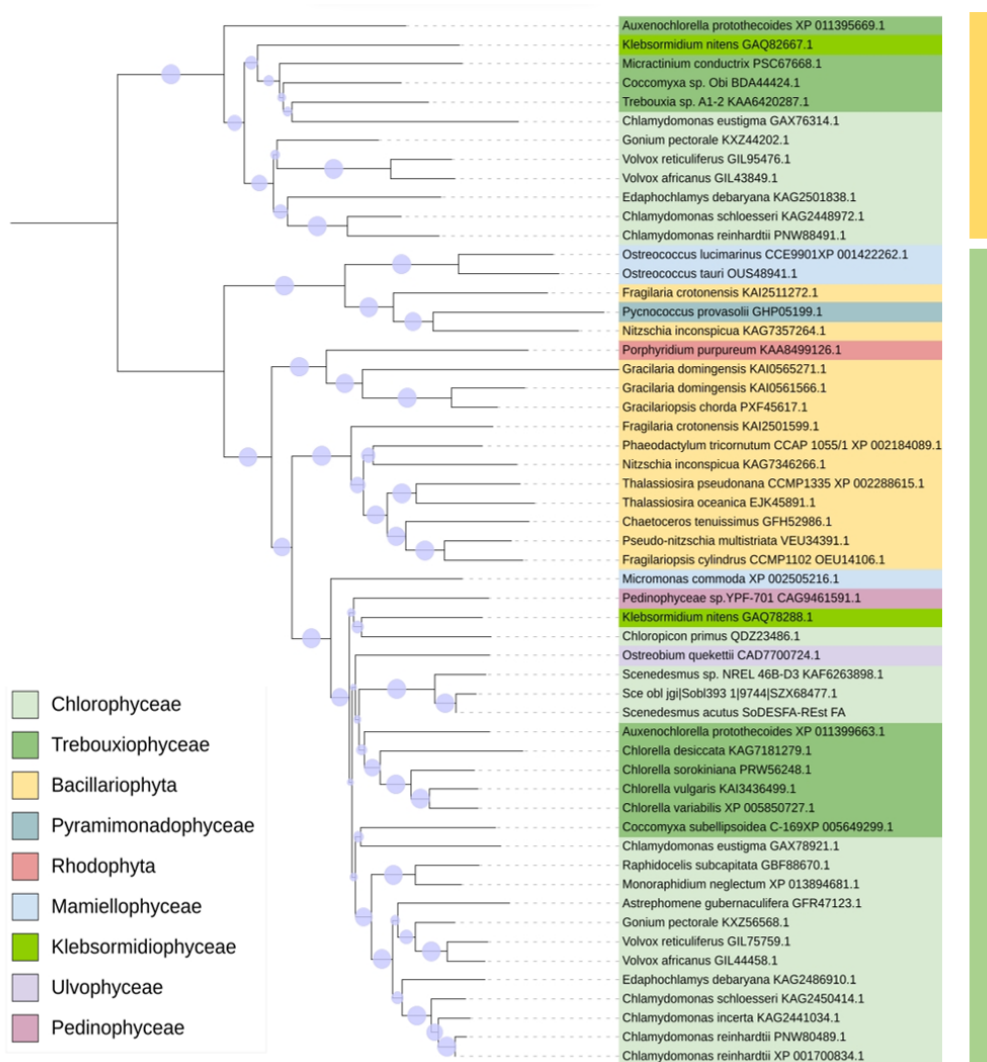


Figura 3.10 Albero filogenetico di D-DES nei differenti gruppi algali. Il ramo degli organismi omologhi all'enzima DCYD1 di *A. thaliana* (portante l'asparagina nel sito attivo) è indicato da una linea verde a fianco, mentre il ramo degli organismi omologhi all'enzima DCYD2 di *A. thaliana* (portante l'alanina nel sito attivo) è indicato da una linea gialla. Albero prodotto con il software MEGA utilizzando il metodo di clustering Neighbor joining con un valore di bootstrap di 1000, partendo da allineamento di sequenze omologhe effettuato con l'algoritmo ClustalW. L'albero ottenuto è stato visualizzato con il software iTOL, rooted a midpoint. I valori di bootstrap sono rappresentati dai pallini azzurri, significatività maggiore del valore corrisponde ad area maggiore del pallino.

Per capire se l'attività D-cisteina desulfidasi fosse la causa della produzione di solfuro necessaria per la sintesi di cisteina osservata abbiamo disegnato primer sulle sequenze algali di *Scenedesmus* e *Tetrademus* trovate in banca dati ed abbiamo isolato il gene D-DES su cDNA di *S. acutus* (sequenza non ancora sottomessa in banca dati). Sulla sequenza di *S. acutus* sono stati successivamente costruiti primer specifici per l'analisi di espressione in PCR multiplex per verificare se ci fosse una differenza di espressione di D-Cys DES fra i due ceppi oppure una induzione da privazione di zolfo.

3.1.3.2 Espressione genica

Il grafico raffigurante l'espressione percentuale di SaD-DES nei due ceppi, wild type e cromo-tollerante, coltivati per 24h in terreno standard (+S) o in terreno privo di zolfo (-S), è riportato in Figura 3.10. Il gene *SaD-DES* è debolmente espresso in modo costitutivo in entrambi i ceppi. Nel ceppo cromo tollerante troviamo livelli significativamente superiori rispetto al ceppo wild type. Non sono state osservate variazioni significative indotte da deprivazione di zolfo.

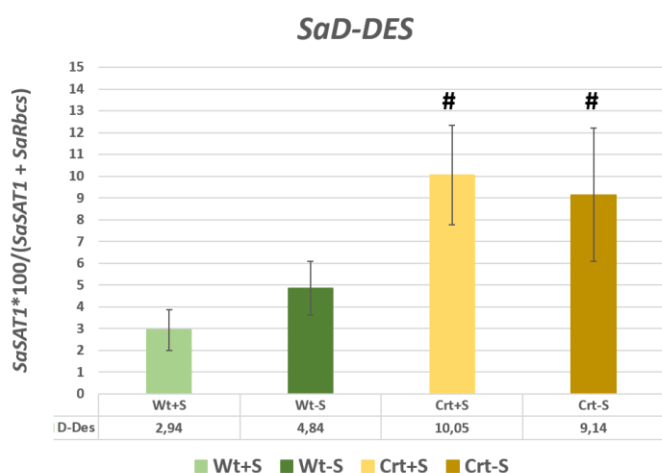


Figura 3.11 Espressione di *SaD-DES* nei due ceppi, wild type (Wt) e cromo tollerante (CrT) di *S. acutus*, nelle condizioni di coltura in terreno standard (+S) e privo di zolfo (-S) per 24h. Reazione di PCR con 35 cicli di amplificazione. L'espressione dei geni di interesse viene indicata come percentuale riferita alla somma della intensità delle bande di amplificazione per il gene di interesse ed il gene di riferimento (Rbcs) in ciascuna corsia. La differenza significativa fra ceppi all'interno dello stesso terreno (+S e -S) è indicata con # con $p < 0.05$.

3.1.3.3 Attività Cisteina Desulfidrasica

Ci siamo inoltre chiesti se la presenza di una desulfidasi specifica per le D-cisteine e l'assenza di un gene certo invece per la L-cisteina potesse portare a differenti livelli di attività fra i due enzimi

Così come il saggio per l'attività di OAS-TL anche il saggio per l'attività L-desulfidrasica e D-desulfidrasica è stato effettuato su alghe pre-coltivate per sette giorni in terreno completo o in terreno privo di zolfo e successivamente rimesse in coltura in terreno standard, addizionato con 0, 1 e 2 mg/L di Cr(VI). I campionamenti sono stati effettuati al termine della pre-coltura per i tempi zero, e dopo 24 e 48 ore dal rinnovo dei nutrienti. L'attività enzimatica è espressa come μmoli di solfuro prodotto per mg di proteina totale al minuto.

3.1.3.3.1 Saggio attività L-Cys desulfidrasica

Sia nel ceppo wild type (figura 3.12 A) che nel ceppo cromo tollerante (Figura 3.12 B), la precoltura di sette giorni induce un aumento dell'attività L-cisteina desulfidrasica. I livelli di attività al tempo zero sono più alti nella condizione S-replete, ma non in modo significativo. In seguito al ripristino dei nutrienti si assiste ad un calo progressivo dell'attività in entrambi i ceppi e in entrambe le condizioni di precoltura, fino al ritorno ai livelli basali. Non sono presenti effetti significativi dipendenti dalla concentrazione di cromo.

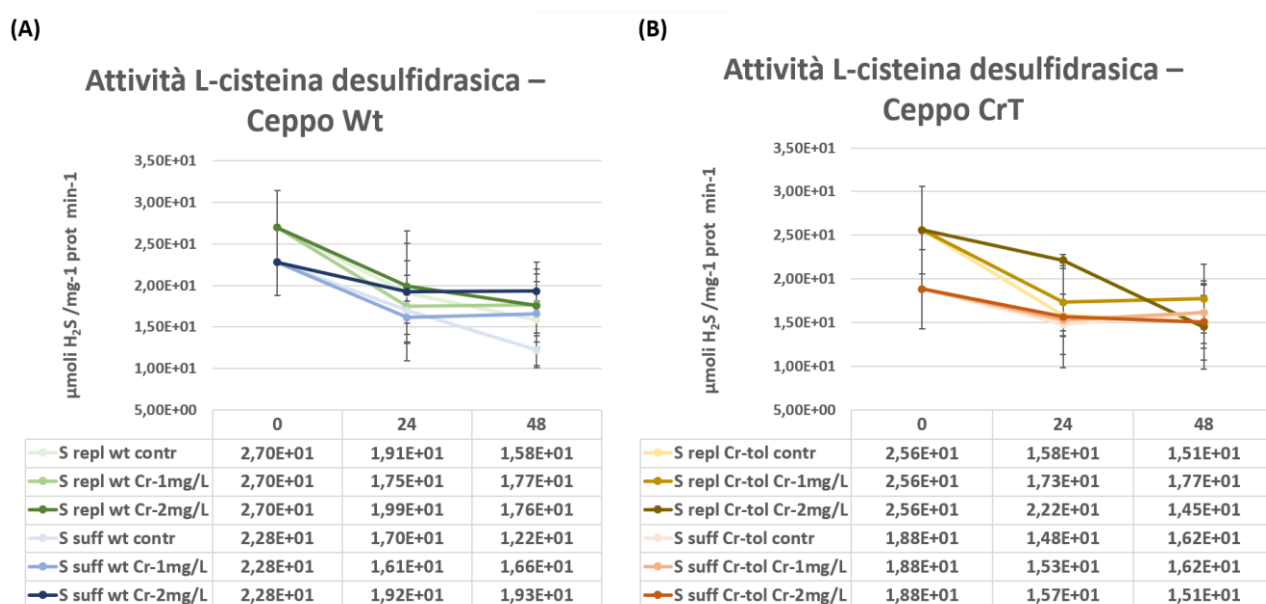


Figura 3.12: Attività L-cisteina desulfidrasica nel ceppo Wild Type (A) e cromo tollerante (B), espressa come μmoli di solfuro prodotto per mg di proteine totali al minuto. In azzurro sono rappresentate le colture wild type S-sufficient, In verde le condizioni wild type S-replete, In marrone le condizioni cromo tollerante S-sufficient. In oca le condizioni cromo tollerante (S-replete). Nei toni più chiari dei rispettivi colori si riportate le condizioni controllo mentre le colture trattate con 1 mg/L di Cr(VI) e 2 mg/L di Cr(VI) sono rappresentate con toni progressivamente più scuri dello stesso colore.

I valori elevati riscontrati nelle cellule S-sufficient al tempo zero potrebbero essere imputati al parziale esaurimento dei nutrienti al termine della precoltura di sette giorni.

3.1.3.3.2 Saggio attività D-Cys desulfidrasica

I differenti livelli di espressione fra ceppi osservati a carico del gene *SaD-DES* ci hanno indotto a chiederci se una maggiore attività D-cisteina desulfidrasica nel ceppo cromo tollerante potesse

essere parte di una regolazione differente dell'omeostasi della D-cisteina nel ceppo cromo tollerante rispetto al wild type.

Nella Figura 3.13 è riportato il grafico che mostra i livelli di attività D-cisteina desulfidrasica nelle differenti condizioni testate nel ceppo wild type (figura 3.13 A) e nel ceppo cromo tollerante (figura 3.13 B). Il risultato dell'analisi ricalca molto da vicino quello già visto per l'attività L-cisteina desulfidrasica. Infatti, anche in questo caso abbiamo un aumento dei livelli dell'attività dato dalla precoltura. L'attività D-cisteina desulfidrasica è significativamente maggiore al tempo zero nelle condizioni S-replete rispetto alle condizioni S-sufficient per entrambi i ceppi. L'attività si riduce progressivamente verso i livelli basali alle 48 ore dal ripristino dei nutrienti.

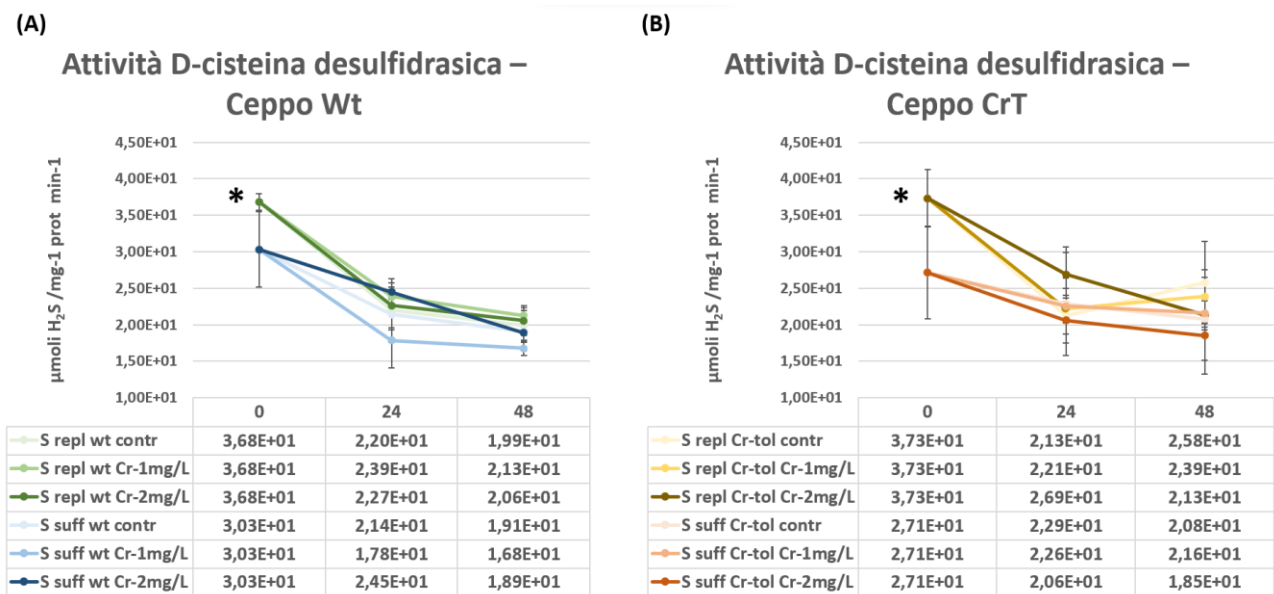


Figura 3.13: Attività D-cisteina desulfidrasica nel ceppo Wild Type (A) e cromo tollerante (B), espressa come μmoli di solfuro prodotto per mg di proteine totali al minuto. In azzurro sono rappresentate le colture wild type S-sufficient, In verde le condizioni wild type S-replete, In marrone le condizioni cromo tollerante S-sufficient. In ocra le condizioni cromo tollerante (S-replete). Nei toni più chiari dei rispettivi colori sono riportate le condizioni controllo mentre le colture trattate con 1 mg/L di Cr(VI) e 2 mg/L di Cr(VI) sono rappresentate con toni progressivamente più scuri dello stesso colore. La differenza significativa fra le condizioni S-sufficient e S-replete all'interno dello stesso ceppo è indicata con * ($p < 0.05$)

3.1.3.3.3 Comparazione fra l'attività L-cisteina desulfidrasica e l'attività D-cisteina desulfidrasica

I grafici rappresentati in Figura 3.14 comparano l'attività L-Cys e D-Cys desulfidrasiche osservate. Al termine della precoltura in terreno +S entrambe i ceppi mostrano una attività D-Cys desulfidrasica maggiore rispetto a quella L-Cys desulfidrasica. Questa differenza risulta significativa nel ceppo Cr-tollerante ($27,15 \pm 6,37$ contro $18,84 \pm 4,53 \mu\text{moli mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$) (figura 3.14 B) ma non nel ceppo wild type ($30,31 \pm 5,19$ contro $22,76 \pm 4 \mu\text{moli mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$) (figura 3.14 A). Al termine della

coltura in terreno privo di zolfo le differenze fra l'attività dei due enzimi si accentuano, diventando significativa nel ceppo wild type ($36,82 \pm 1,17$ contro $26,98 \pm 4,45 \mu\text{moli mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$) (figura 3.14 C) e altamente significativa nel ceppo cromo tollerante ($37,31 \pm 3,94$ contro $25,59 \pm 4,98 \mu\text{moli mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$) (figura 3.14 D). Dopo il ripristino dei nutrienti le attività di entrambi gli enzimi si abbassano e le differenze fra loro non risultano più significative. L'attività dell'enzima non pare influenzata dalla presenza del cromo quanto dalla disponibilità di zolfo.

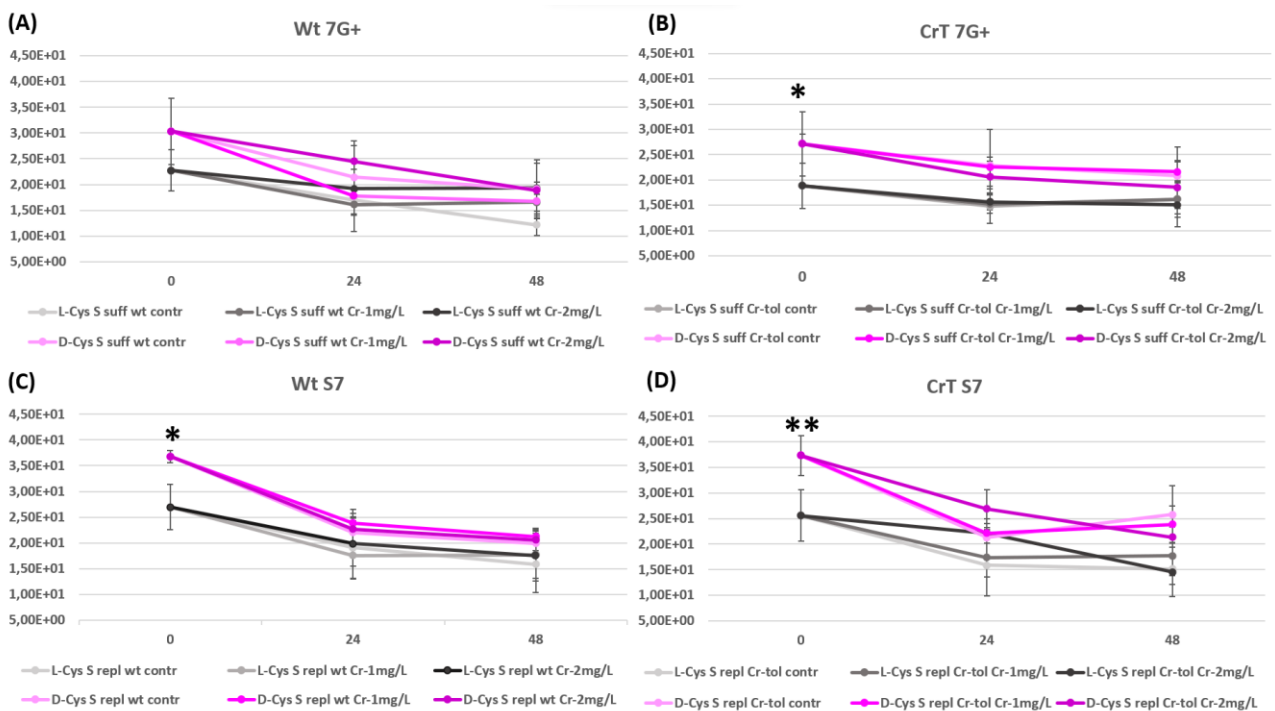


Figura 3.14: Comparazione dell'attività L-cisteina desulfidrasica e l'attività D-cisteina desulfidrasica nel ceppo wild type S sufficient (A), cromo tollerante S sufficient (B), wild type S replete (C), e cromo tollerante S replete (D). L'attività è espressa come $\mu\text{moli di solfuro prodotto per mg di proteine totali al minuto}$. In viola è riportata l'attività D-cisteina desulfidrasica, in grigio l'attività L-cisteina desulfidrasica. Nei toni più chiari dei rispettivi colori sono riportate le condizioni controllo mentre le colture trattate con 1 mg/L di Cr(VI) e 2 mg/L di Cr(VI) sono rappresentate con toni progressivamente più scuri dello stesso colore. La differenza significativa fra dell'attività L-cisteina desulfidrasica e l'attività D-cisteina desulfidrasica è indicata con * ($p < 0.05$) oppure ** ($p < 0.01$)

Nonostante la maggior espressione di *SaD-DES* nel ceppo cromo tollerante, non abbiamo riscontrato significative differenze nella attività dell'enzima fra ceppi, questa apparente discrepanza potrebbe essere data dal fatto che l'analisi di espressione e di attività sono state analizzate a tempi differenti. L'analisi di espressione è stata infatti condotta dopo 24h di deprivazione di zolfo mentre l'attività è stata valutata dopo 7 giorni di precultura ed in queste condizioni l'attività dell'enzima aumenta anche nelle alghe coltivate in presenza di zolfo, quando cioè l'elevata densità algale di una coltura che ha ormai raggiunto il plateau riporta presumibilmente ad una limitazione nella disponibilità dei nutrienti.

L'attività desulfidrasica sembra quindi maggiormente elevata a carico del substrato D-cys per la quale nelle Sphaeropleales è presente l'enzima specifico, mentre l'attività L-desulfidrasica potrebbe essere solo a carico dell'attività collaterale delle OAS-TL. Le caratteristiche di OASTL2: mutazioni significative sia nel sito di legame al solfuro sia nel sito della formazione di legame con SAT, in parte simili a DES1 di *A. thaliana* (codice UniProt: F4K5T2), la sua bassa espressione e la sua induzione in condizioni $-S$, potrebbero far pensare che la principale attività di questa forma sia l'attività desulfidrasica. Questo potrebbe essere in accordo con la sua presunta collocazione mitocondriale, data la grande omologia con OAS-TL di organismi non fotosintetizzanti, compartimento dove avviene prevalentemente la degradazione degli aminoacidi solforati e dove nelle piante superiori, a fronte di una attività di SAT dell'80%, si riscontra solo un 10% di attività di OAS-TL, rispetto al 45% di attività riscontrata nel cloroplasto e nel citosol (Hell & Wirtz, 2008).

La maggiore attività della D-cys desulfidrasasi, e la maggior espressione costitutiva di questo enzima nel ceppo cromo tollerante, aprono una interessante prospettiva di indagine, dato che la presenza di un enzima di questo tipo implica la presenza all'interno della cellula di un pool di D-aminoacidi. I D-aminoacidi sono stati per lungo tempo considerati tossici per gli organismi viventi e si riteneva fossero assorbiti solo dall'ambiente. La questione è ancora poco studiata e non completamente chiarita, ma alcuni studi inducono a ipotizzare che le piante possano produrre D-aminoacidi a partire dagli enantiomeri L attraverso reazioni di racemizzazione, deaminazione e transaminazione (Kolukisaoglu & Suarez, 2017). Questi D-aminoacidi hanno una importante funzione strutturale nella produzione della parete dei cianobatteri, è quindi ipotizzabile che la loro via di sintesi sia rimasta all'interno delle cellule vegetali.

L'abbondanza di dati che indicano la presenza di D-aminoacidi fa comunque ipotizzare che questi enantiomeri non siano solo accidentalmente assorbiti dall'ambiente ma che abbiano un ruolo nei processi fisiologici delle piante. Una possibilità è che questi aminoacidi possano servire come riserva di azoto (Moe, 2013; Vranova et al., 2012). A tal proposito, un accumulo di D-cisteina potrebbe anche costituire una riserva di zolfo accumulata dalle cellule in condizioni di abbondante disponibilità di questo nutriente per far fronte a momenti di deprivazione. Inoltre, è stato ipotizzato un legame fra i D-aminoacidi e le specie reattive dello zolfo (RSS) nella risposta delle piante agli stress ambientali (Yamasaki et al., 2019). L'aumento dell'attività D-cys desulfidrasica con conseguente aumento di produzione di solfuro è stato in effetti osservato in risposta a stress da siccità (Jin et al., 2011; Scuffi et al., 2014), nella modulazione della produzione di ROS durante la maturazione dei frutti di

pomodoro (Zhao et al., 2023) e nella mitigazione dello stress da cadmio (S. Ali et al., 2013). L'aumento del solfuro all'interno della cellula potrebbe essere implicato in due modi nella risposta allo stress: 1) svolgendo un ruolo primario come mediatore del segnale (Gotor et al., 2015; He et al., 2018), 2) rendendo disponibile uno dei substrati per la sintesi di cisteina, non più ottenibile dalla normale via di riduzione cloroplastica in caso di limitato ingresso di solfato, e conseguente aumento di produzione di GSH.

Dato che solo l'enantiomero L-cisteina svolge una funzione di regolazione a feedback negativo sul pathway di assimilazione del solfato, come indicato dal lavoro di Bolchi e collaboratori in mais (Bolchi et al., 1999), la conversione nel D-enantiomero potrebbe costituire una strategia per rimuovere uno dei prodotti del pathway ed impedirgli di intervenire sulla regolazione a feedback. Questo potrebbe spiegare: il grande aumento di cisteina osservato nel ceppo Cr-tollerante durante il recovery dopo 7 giorni di deprivazione di zolfo (Gorbi et al., 2007; Sardella et al., 2019), senza il conseguente silenziamento a feedback del pathway di assimilazione del solfato; e le ipotesi degli autori secondo cui i due ceppi avrebbero una diversa sensibilità ai livelli intracellulari di zolfo con conseguente alterata regolazione a feedback negativo del pathway. Una maggiore riserva di zolfo di questo tipo potrebbe essere collegata alla maggiore prontezza di risposta e alla diversa capacità di detossificazione del Cr(VI) del ceppo tollerante.

Nei lavori citati tuttavia i livelli di cisteina osservati erano misurati come cisteina libera totale, ulteriori indagini a carico della quantità relativa dei due enantiomeri sarebbero necessarie per chiarire se la capacità di convertire la L-cisteina nell'enantiomero possa avere un ruolo nell'accumulo di zolfo e nella diversa tolleranza dei due ceppi di *S. acutus*.

3.2 Seconda Parte

In questa seconda parte del lavoro mi sono occupato di recuperare, identificare e analizzare campioni algali da fonti d'acqua contaminate da cromo. Il luogo di campionamento è stato individuato presso una sorgente sul monte Prinzera, rilievo ofiolitico situato nell'appennino parmense. In questa località sono stati effettuati diversi studi da gruppi di ricerca del nostro Dipartimento, interessati all'aspetto geologico e biologico di questo monte metallifero. La sorgente prescelta per il campionamento è monitorata da anni da colleghi geologi e mostra livelli di Cr(VI) variabili nel corso dell'anno e dipendenti dalla portata del flusso d'acqua, comunque mediamente superiori (12 µg/L) ai limiti consentiti per legge (50µg/L per il cromo totale e 5µg/L per il cromo esavalente) (Segadelli et al., 2017; Volpe, 2021). Date le limitazioni alla mobilità imposte dalla emergenza COVID 19 fino ad aprile 2021 e la scarsa piovosità dell'inverno-primavera 2020-2021 non ci era stato possibile effettuare il campionamento all'inizio del primo anno di dottorato come era in programma; quindi, tutta la seguente attività è stata possibile dal secondo anno in poi.

I campionamenti di acqua alla sorgente sono stati effettuati nel periodo marzo-aprile 2022. Le prime analisi sono state effettuate sui parametri dell'acqua e sulla sua potenziale tossicità per gli organismi acquatici (Oecd Guideline N° 201, 2006), parallelamente si è proceduto all'isolamento di popolazioni pure degli organismi rinvenuti a livello della scaturigine della sorgente (campione comprendente acqua e suolo), sui quali effettuare l'identificazione con metodi molecolari e le successive analisi di tolleranza al cromo.

3.2.1 Test ecotossicologico

L'acqua prelevata dalle sorgenti del monte Prinzera è stata analizzata per misurarne i parametri chimico- fisici prima di utilizzarla per preparare il terreno di coltura ed effettuare i test di ecotossicità secondo il protocollo standard OECD 201 (Oecd Guideline N° 201, 2006).

Come riportato in tabella 3.2 l'acqua della sorgente ha un pH di 7,8 e una conducibilità elettrica molto elevata di 432µS. La concentrazione di cromo nell'acqua alla data del prelievo era di 11,2 µg/L, quest'ultimo dato è stato ricavato da analisi effettuata su campionamento alla stessa data effettuata dai colleghi geologi (Volpe, 2021).

	Acqua controllo	Acqua Sorgente Prinzerà
Conducibilità (μS)	5,4	432
pH	7,5	7,8
Concentrazioni Cr(VI) ($\mu\text{g/L}$)	/	11,2

Tabella 3.2 Parametri chimico/fisici (pH, conducibilità e concentrazione di cromato) nelle acque della Sorgente del monte Prinzerà, dell'acqua utilizzata per i controlli.

Il saggio ecotossicologico è stato quindi effettuato secondo il protocollo standard OECD 201 (Oecd Guideline N° 201, 2006), diluendo i sali del terreno con l'acqua della sorgente del Prinzerà e confrontando la crescita algale di *Pseudokirchneriella subcapitata* (attualmente rinominata *Raphidocelis subcapitata*) nel terreno così preparato con la crescita algale delle colture controllo, coltivate in terreno preparato diluendo i sali in acqua distillata. I parametri chimico-fisici dei terreni di coltura dei controlli (C) e dei campioni preparati con l'acqua della sorgente (P) sono riportati in tabella 3.3

	Terreno Controllo	Terreno Sorgente Prinzerà
Conducibilità (μS)	72	520
pH	8,03	8,52
Concentrazioni Cr(VI) ($\mu\text{g/L}$)	/	11,2

Tabella 3.3 Parametri chimico/fisici (pH, conducibilità e concentrazione di cromato) nei terreni di coltura dei controlli (C) e dei campioni preparati con l'acqua della sorgente (P)

L'andamento della biomassa è stato monitorato per 72h e al termine dell'esperimento è stato verificato che fossero mantenute le condizioni di validità del saggio, ovvero:

- 1) variazioni del pH dei controlli tra inizio e fine coltura non eccedente le 1,5 unità
- 2) aumento di almeno 16 volte della biomassa dei controlli
- 3) coefficiente medio di variazione dei tassi specifici di crescita (CV%) per ogni giorno del test <35%

I risultati del test, riportati in figura 3.15, mostrano come l'acqua della sorgente del monte Prinzerà abbia un effetto significativamente inibente ($p < 0,05$) sulla crescita algale sin dall'inizio della coltura, attestandosi ad un tasso di inibizione medio del 17,829% alle 72h.

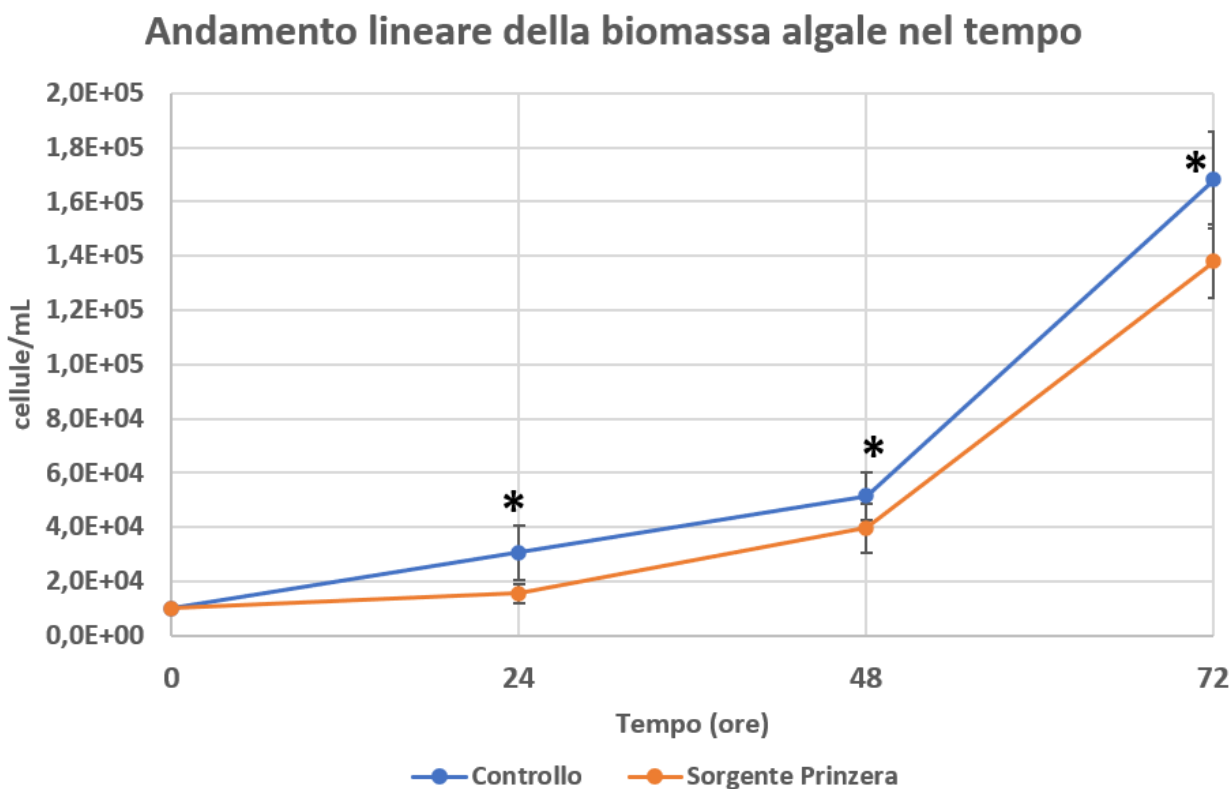


Figure 3.15 Andamento lineare della biomassa algale per entrambi i campioni alle 72 ore. La significatività ($p < 0,05$) della differenza fra i controlli e i campioni Sorgente Prinzerà calcolata con t-student è indicata con *

La significativa riduzione della crescita alle 72 ore conferma la capacità inibitoria dell'acqua della sorgente del monte Prinzerà e indica che la stazione scelta per il campionamento rappresenta un luogo di possibile insorgenza di risposta adattativa allo stress ambientale per gli organismi che lo popolano.

L'agente di stress potrebbe essere la presenza non elevatissima ma costante di Cr(VI), anche se non è possibile escludere che l'elevata concentrazione elettrolitica registrata sia essa stessa fonte di stress.

3.2.2 Isolamento dei ceppi algali

I campioni di acqua prelevati dalla sorgente sono stati piastrati su terreno solido e da queste piastre iniziali le colonie che via via si sviluppavano sono state isolate e poste su piastre master. Le colonie che si sono sviluppate più precocemente (individuate dai numeri 1-30) mostravano una maggiore eterogeneità, mentre quelle sviluppatesi più tardivamente si sono dimostrate appartenere essenzialmente a due specie probabilmente con capacità di crescita più lenta.

Delle 61 colonie ottenute 27 erano di specie algali, mentre le restanti sono risultate batteriche ed in casi sporadici cianobatteriche. Ad un primo esame al microscopio alcune colonie sono risultate composte di organismi appartenenti a taxa differenti e sono state quindi ripiastrate per selezionare colonie pure. In questo primo step di selezione sono state osservate diverse diatomee pennate che sono state però purtroppo in gran parte perse durante il processo di selezione.

Le specie algali cresciute sulle piastre master sono state osservate al microscopio ottico durante la fase di selezione. Nella figura 3.16 sono raffigurate alcune delle specie algali (identificate col numero della colonia sulle piastre master) che presentavano caratteristiche morfologiche abbastanza diversificate da essere considerate specie differenti.

Molte delle specie isolate sul monte Prinzeria presentano una dimensione inferiori ai 20 μm , (alcune anche al di sotto dei 5 μm) e dettagli che sarebbero fondamentali per la loro caratterizzazione non sono visibili al microscopio ottico. Questo ha limitato seriamente la nostra capacità di identificare correttamente le specie, considerando anche variazioni morfologiche dovute a differenti stadi vegetativi o condizioni ambientali che influenzano dimensioni e colorazione. Infine, la tassonomia, in particolare delle alghe, è un campo in rapida evoluzione grazie ai progressi nelle tecniche molecolari, risultando in frequenti cambi di nome delle specie e richiedendo aggiornamenti continui delle chiavi dicotomiche per mantenerne l'accuratezza. Per l'identificazione delle varie specie si è quindi deciso di ricorrere a tecniche molecolari.

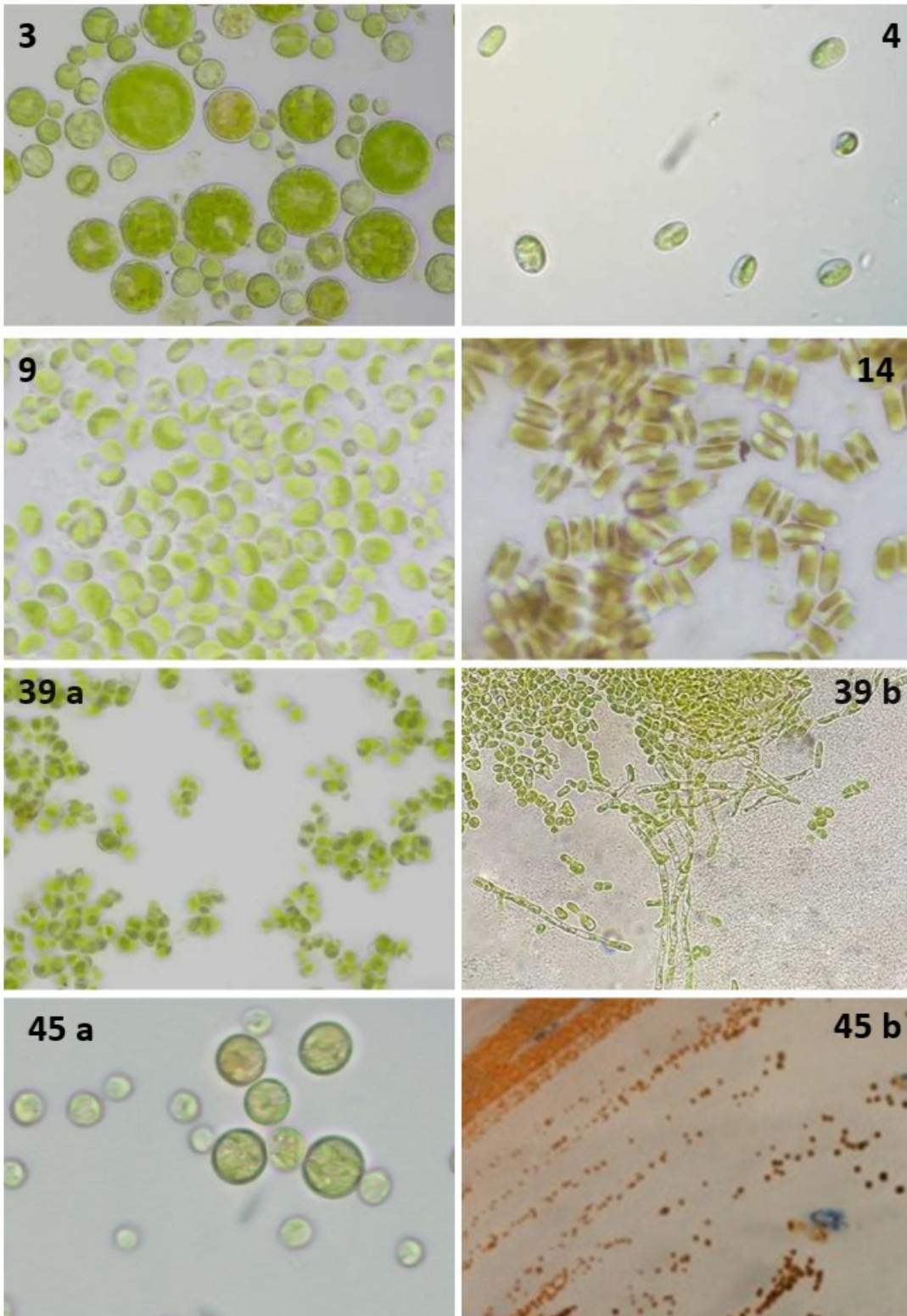


Figura 3.16: (3) *Bracteacoccus polaris*; (4) *Neocystis brevis*; (9) *Vischeria* sp.; (14) *Sellaphora minima*; (39) *Pseudopleurococcus printzii* cresciuto in terreno liquido (39 a) e su terreno solido (39 b); (45) *Chromochloris zofingiensis*, immagine al microscopio (45 a), foto da piastra di colonie mature con colorazione rosso/arancio.

3.2.3 DNA barcoding e sequenziamento

Per poter quindi identificare in modo preciso le specie isolate, abbiamo utilizzato la tecnica del DNA barcoding, applicando differenti marcatori. Le sequenze ottenute sono state inviate in banca dati e successivamente allineate con le sequenze omologhe per ottenere gli alberi filogenetici.

Fra i marcatori utilizzati TufA si è dimostrato quello in grado di poter discriminare un numero maggiore di specie algali, i risultati ottenuti con TufA sono stati confermati con altri marcatori come ITS o SSU. Per l'identificazione delle diatomee sono stati invece utilizzati i marcatori rbcL e Cox1. Di seguito sono riportati i tre alberi filogenetici ottenuti con i marcatori TufA (figura 3.17), ITS (figura 3.18), RbcL (figura 3.19) e Cox1 (figura 3.20), in versione semplificata per questioni di chiarezza espositiva.

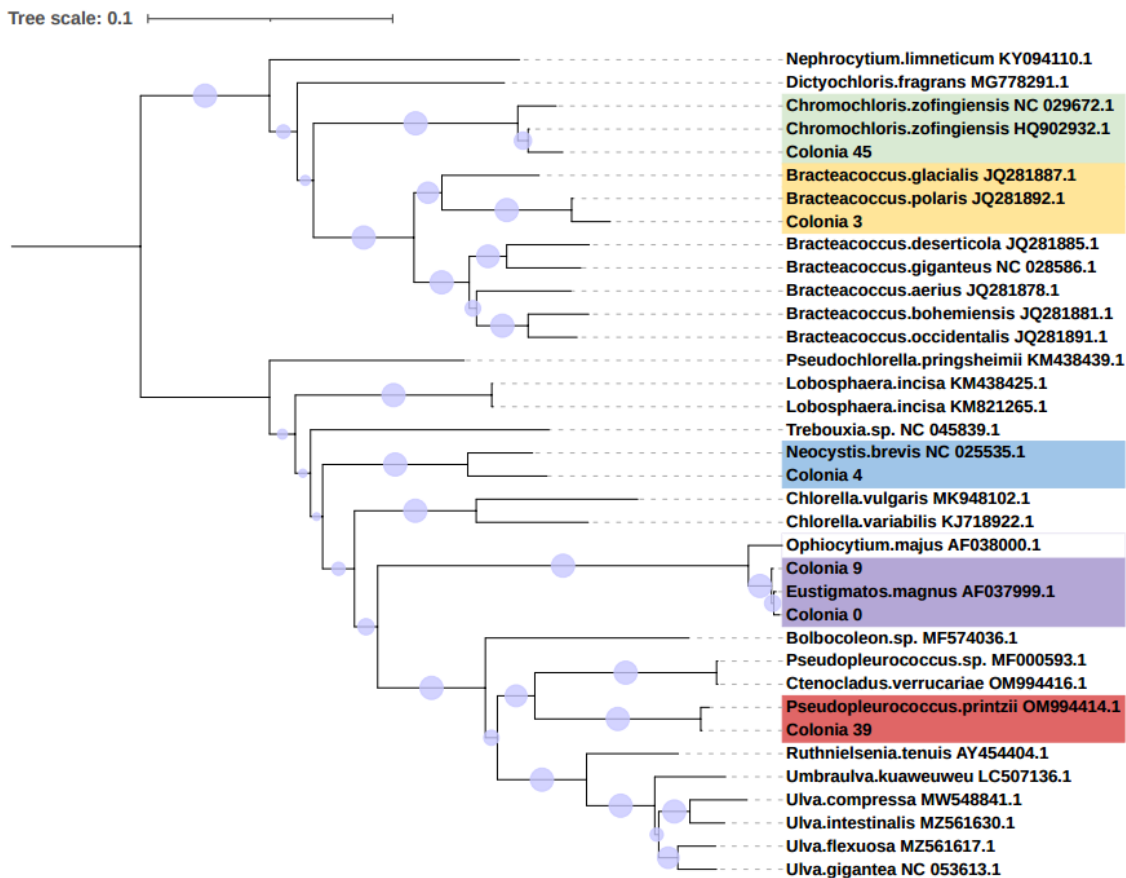


Figure 3.17: Albero filogenetico per il marcatore TufA. Costruito da un campione di sequenze omologhe prodotte dalle ricerche per omologia delle sequenze delle differenti specie analizzate. In verde sono evidenziate le sequenze di Chromochloris zoofingensis; in giallo sono evidenziate le sequenze del genere Bracteaococcus; in blu le sequenze di Neocystis brevis; in viola le sequenze del genere Eustigmatos (sinonimo di Vischeria) e in rosso le sequenze di Pseudopleurococcus printzii. Albero prodotto con il software MEGA utilizzando il metodo di clustering Neighbor Joining con un valore di bootstrap di 1000, partendo da allineamento di sequenze omologhe effettuato con l'algoritmo ClustalW. L'albero ottenuto è stato visualizzato con il software iTOL, rooted a midpoint. I valori di bootstrap sono rappresentati dai pallini azzurri, significatività maggiore del valore corrisponde ad area maggiore del pallino.

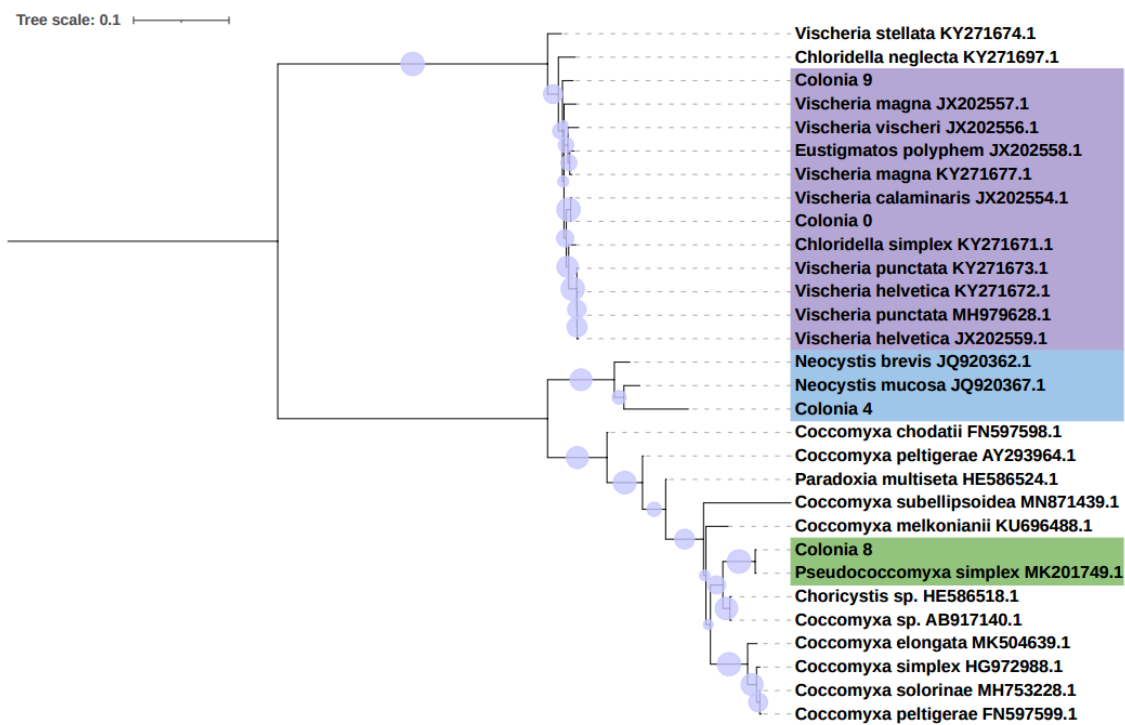


Figure 3.18 Albero filogenetico per il marcatore ITS. Costruito da un campione di sequenze omologhe prodotte dalle ricerche per omologia delle sequenze delle differenti specie analizzate. In viola sono evidenziate le sequenze del genere *Vischeria* (sinonimo di *Eustigmatos*), in blu le sequenze di *Neocystis brevis*; in verde sono evidenziate le sequenze di *Pseudococcomyxa simplex*. Albero prodotto con il software MEGA utilizzando il metodo di clustering Neighbor Joining con un valore di bootstrap di 1000, partendo da allineamento di sequenze omologhe effettuato con l'algoritmo ClustalW. L'albero ottenuto è stato visualizzato con il software iTOL, rooted a midpoint. I valori di bootstrap sono rappresentati dai pallini azzurri, significatività maggiore del valore corrisponde ad area maggiore del pallino.

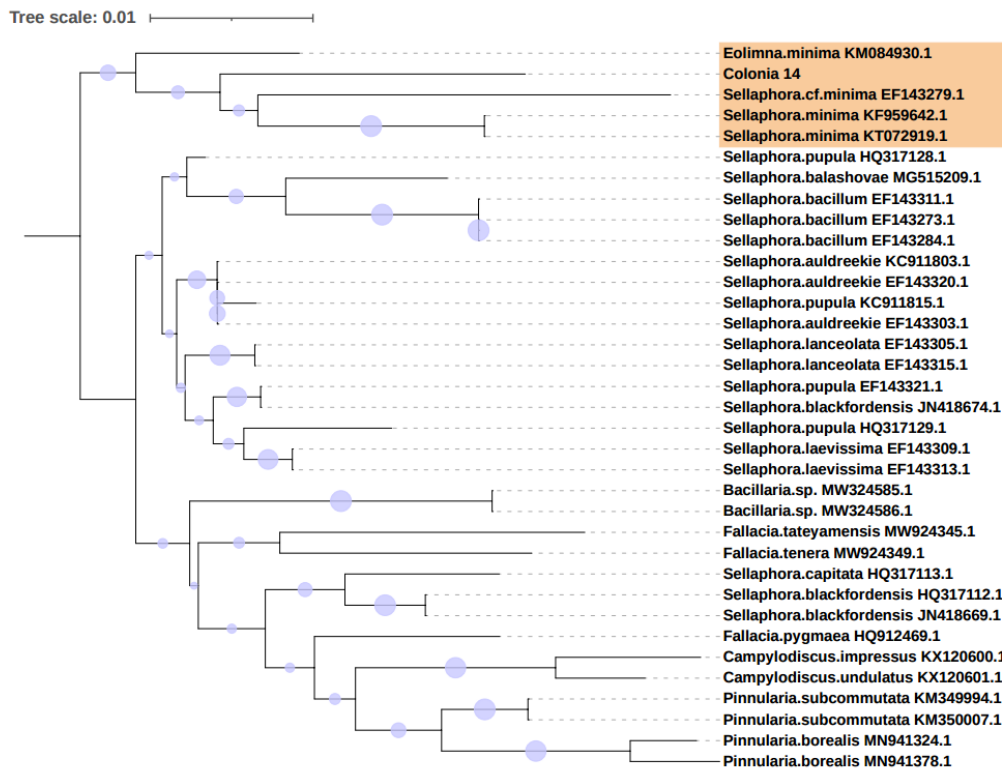


Figure 3.19 Albero filogenetico per il marcatore RbcL. Costruito da un campione di sequenze omologhe prodotte dalle ricerche per omologia della sequenza della colonia 14. In marroncino chiaro sono evidenziate le sequenze di *Sellaphora minima* (sinonimo di *Eolimna minima*). Albero prodotto con il software MEGA utilizzando il metodo di clustering Neighbor Joining con un valore di bootstrap di 1000, partendo da allineamento di sequenze omologhe effettuato con l'algoritmo ClustalW. L'albero ottenuto è stato visualizzato con il software iTOL, rooted a midpoint. I valori di bootstrap sono rappresentati dai pallini azzurri, significatività maggiore del valore corrisponde ad area maggiore del pallino.

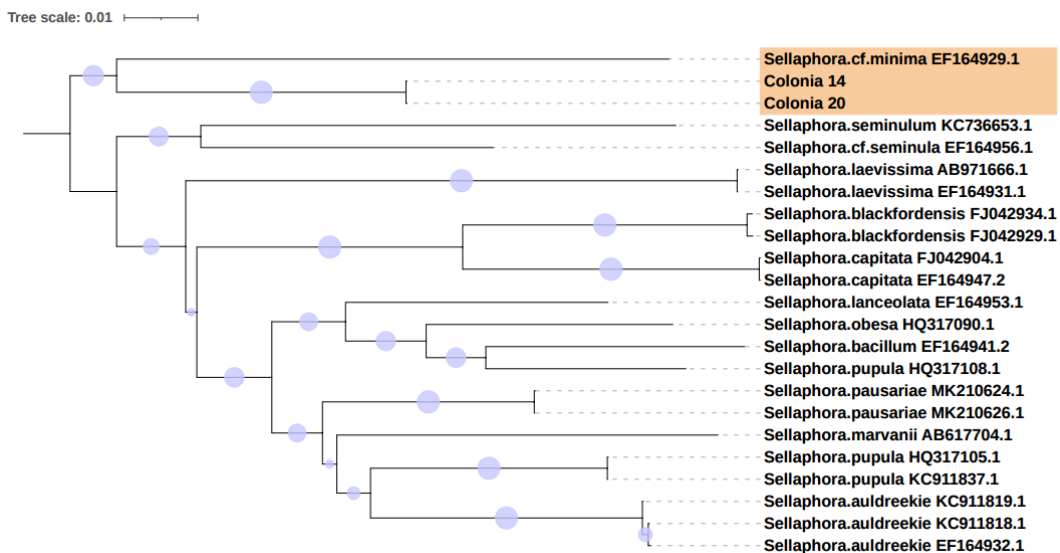


Figura 3.20 Albero filogenetico per il marcatore Cox1. Costruito da un campione di sequenze omologhe prodotte dalle ricerche per omologia delle sequenze delle colonia 14 e 20. In marroncino chiaro sono evidenziate le sequenze di *Sellaphora minima* (sinonimo di *Eolimna minima*). Albero prodotto con il software MEGA utilizzando il metodo di clustering Neighbor Joining con un valore di bootstrap di 1000, partendo da allineamento di sequenze omologhe effettuato con l'algoritmo ClustalW. L'albero ottenuto è stato visualizzato con il software iTOL, rooted a midpoint. I valori di bootstrap sono rappresentati dai pallini azzurri, significatività maggiore del valore corrisponde ad area maggiore del pallino.

Nella tabella 3.4 sono riassunti i risultati ottenuti per l'analisi tramite DNA barcoding. Come detto, TufA è stato il marcatore che ci ha permesso una discriminazione più ad ampio spettro. ITS e SSU sono stati utilizzati spesso come complementari a TufA per avere una conferma del risultato. Per l'analisi delle diatomee, fra i marcatori utilizzati, Rbcl e Cox1 si sono dimostrati i migliori.

Colonia	Marker per DNA Barcoding	Identità	Ordine
0	TufA, ITS	<i>Vischeria</i> sp. 1	Eustigmatales
3	TufA, SSU	<i>Bracteacoccus polaris</i>	Sphaeropleales
4	TufA, ITS	<i>Neocystis brevis</i>	Sphaeropleales
5	TufA, SSU	<i>Bracteacoccus</i> sp.	Sphaeropleales
8	SSU, ITS	<i>Pseudococcomixa simplex</i>	Chlorellales
9	TufA, ITS	<i>Vischeria</i> sp. 2	Eustigmatales
14, 20	Rbcl, Cox1	<i>Sellaphora minima</i>	Naviculales
31, 33, 34, 35, 37, 39-44, 46-50	TufA	<i>Pseudopleurococcus printzii</i>	Ulvaes
36, 38, 45	TufA, SSU	<i>Chromochloris zofingiensis</i>	Sphaeropleales

Tabella 3.4: Nella tabella sono riportate tutte le colonie identificate, i marker usati per il DNA Barcoding, l'identità trovata e l'ordine di appartenenza per ogni specie identificata.

Le specie algali trovate appartengono per la maggior parte al phylum Chlorophyta (66%), mentre il 33% appartengono al Heterokontophyta. Sicuramente il secondo phylum è sottorappresentato dal momento che una grossa parte delle diatomee è stata persa durante la selezione. Il nostro obiettivo non era tuttavia misurare la biodiversità dell'ecosistema campionato ma trovare in questo organismi adattati allo stress da cromo.

Le alghe appartenenti alle colonie 38 e 45 sono state entrambe identificate come appartenenti alla specie *Chromochloris zofingiensis* attraverso analisi genetica. La colonia 36 invece è stata identificata attraverso una comparazione delle caratteristiche morfologiche sia micro che macroscopiche con le altre due colonie identificate. I marker utilizzati per l'identificazione sono stati TufA e SSU, entrambi hanno mostrato un buon livello di discriminazione nell'individuazione di questa specie.

Chromochloris zofingiensis (Dönn) Fučíková & L.A.Lewis 2012 è un'alga verde unicellulare che appartiene all'ordine delle Sphaeropleales. Le cellule giovani contengono singolo nucleo e singolo cloroplasto parietale, tonda od ovale, e sono molto simili ad altre alghe coccoidi come *Bracteacoccus* e *Chlorella*. Le cellule mature contengono multipli cloroplasti parietali e sono polinucleate. Inoltre, nelle cellule mature abbiamo un aumento della quantità di carotenoidi (3.16 45, b), oltre che un aumento di dimensioni. I cloroplasti mancano di un pirenoide. La riproduzione avviene tramite autospore. Non presenta flagelli o ciclia (Fučíková & Lewis, 2012).

Le alghe appartenenti alla colonia 3 sono state identificate nella specie *Bracteacoccus polaris*. Per analogia morfologica abbiamo identificato anche la colonia 5 come appartenente allo stesso genere, pur non arrivando, mancando i dati genetici e considerando le difficoltà intrinseche presenti nell'analisi morfologica delle alghe coccoidi, a considerarli con certezza come appartenete alla stessa specie.

Il genere *Bracteacoccus*, appartenente all'ordine delle Sphaeropleales, comprende alghe verdi coccoidi di dimensioni variabili da 4 a 110 µm hanno forma sferica o leggermente ellittica, e possono formare aggregati. Polinucleata e con multipli cloroplasti nella sua forma matura, si riproduce sia attraverso aplanospore che zoospore biflagellate. Non ci sono osservazioni di una riproduzione sessuata. Nella forma vegetativa queste alghe mostrano una spessa parete cellulare. Nelle cellule mature si ha presenza di pigmenti arancioni (Fučíková et al., 2013).

Bracteacoccus è adattabile a un'ampia gamma di condizioni ambientali e può essere trovato sia in ambienti acquatici dolci che terrestri. Compresi ambienti fortemente inquinati (Allaguvatova et al., 2022; Patova & Dorokhova, 2008).

Le alghe appartenenti alla colonia 4 sono state identificate come appartenenti alla specie *Neocystis brevis*. Per quest'alga sono stati utilizzati i marcatori ITS e TufA. L'analisi genetica di questa specie è stata particolarmente coerente con diversi marcatori e siamo arrivati ad individuare il genere anche con marker meno discriminanti per il mondo algale come SSU (dato non mostrato).

Secondo Algaebase (<https://www.algaebase.org>), il sito di riferimento per la tassonomia algale, il genere *Neocystis* appartiene all'ordine delle Sphaeropleales, tuttavia la sua collocazione appare controversa, infatti un lavoro recente (Gaysina et al., 2021) colloca (o ri-colloca) questo genere all'interno delle Trebouxiophyceae. Anche le nostre osservazioni sembrerebbero concordare con questa classificazione. Queste alghe sono tipicamente unicellulari e si presentano con forma ellittica.

Hanno dimensioni relativamente piccole, con lunghezza inferiore ai 10 μm . È un genere presente in un ampio spettro di ambienti terrestri, inclusi habitat estremi. Queste alghe, quando cresciute su terreno solido, producono una sostanza mucillaginosa che ricopre le colonie (Allaguvatova et al., 2022; Gaysina et al., 2021).

Le alghe appartenenti alle colonie 0 e 9 sono state identificate come appartenenti al genere *Vischeria*. L'identificazione è avvenuta utilizzando i marcatori tufA e ITS, come mostrato negli alberi riportati nella figura 3.17 e nella figura 3.18. Pur appartenendo allo stesso genere, la loro localizzazione filogenetica le distingue potenzialmente come due specie differenti, sono quindi state rinominate come *Vischeria sp1* e *Vischeria sp2*.

Il genere *Vischeria* appartiene all'ordine delle Eustigmatales ed è caratterizzato da alghe piccole (attorno ai dieci μm), ma alcune specie mostrano anche cellule di dimensioni maggiori. Questo genere possiede solitamente un singolo cloroplasto giallo verde che presenta solitamente un pirenoide. Formano autospore, solitamente dalle 2 alle 4 per cellula (Temraleeva & Portnaya, 2023).

Le alghe appartenenti alla colonia 8 sono state identificate come appartenenti alla specie *Pseudococcomyxa simplex*. Questa è l'unica alga verde fra quelle da noi utilizzate dove il marcatore TufA non si è dimostrato efficace. Sono stati utilizzati in questo caso quindi i marcatori SSU e ITS.

Pseudococcomyxa simplex (Mainx) Fott 1981, appartenente all'ordine delle Chlorellales. Presente in differenti ambienti estremi come costa antartiche e terreni limitrofi a fumarole vulcaniche. Comprende alghe verdi unicellulari mononucleate attorno ai 7-12 μm di lunghezza, di forma ellissoidale o piriformi. La riproduzione avviene attraverso produzione di 2-8 autospore. Le cellule sono caratterizzate da un singolo cloroplasto parietale senza pirenoide che va a ricoprire quasi interamente la parete cellulare (Broady, 1987).

Le diatomee delle colonie 14 e 20 sono state entrambe identificate come *Sellaphora minima*. Questa identificazione è avvenuta sfruttando i marcatori RbcL e Cox1.

Sellaphora minima (Grunow) 1990 è una diatomea appartenente all'ordine delle Naviculales. Il frustolo ha forma differente a seconda del lato osservato. La faccia valvare presenta forma ellittica con estremità arrotondate con rafe dritto e sottile lungo la parte assiale. La faccia connettiva mostra invece forma rettangolare con angoli leggermente arrotondati. Presenta due cloroplasti di colore giallo/bruno e che appaiono dalla faccia valvare come due nastri parietali che corrono lungo il lato

lungo della cellula. La lunghezza di questa cellula varia molto passando da alghe di dimensione inferiore ai 5 µm ad alghe lunghe più di 15 µm (Granetti, 1968).

Le rimanenti colonie appartenenti alle alghe verdi, che mostravano tutte una forte omologia morfologica, sono state tutte identificate come appartenenti alla specie *Pseudopleurococcus printzii* attraverso l'analisi della colonia 39 con il marcatore TufA.

Pseudopleurococcus printzii (Vischer) 1933 è un'alga verde appartenente all'ordine delle Ulvales. Quest'alga tende a formare aggregati, ad assumere forma allungata/cilindrica in coltura solida (figura 3.16 39, b), In coltura liquida invece mostra una tendenza a rigonfiarsi (figura 3.16 39, a). Le prime cellule che tendono a cambiare forma sono quelle poste ai bordi. Nella forma allungata il cloroplasto parietale è solitamente confinato al centro della cellula dando ai filamenti che vengono a formarsi un aspetto bandeggiato. *Pseudopleurococcus printzii* presenta una parete cellulare molto spessa e un solo cloroplasto che può variare in forma e dimensioni (Johnson & John, 1990).

In siti contaminati collegati a miniere abbandonate di zinco e rame in Polonia le Chlorophyte (42-55%) costituiscono il gruppo algale più rappresentato, seguito dai cianobatteri e dalle Heterokontophyte (13-21%). Fra le Heterokontophyte trovate sono presenti anche specie appartenenti al genere *Eustigmatos* (sinonimo di *Vischeria*) (Trzcińska & Pawlik-Skowrońska, 2008). Dall'analisi delle specie algali su terreni contaminati da metalli pesanti (in particolare nickel e rame) nella tundra artica, sono state trovate differenti specie isolate nei nostri rilevamenti sul monte prinzera, per esempio: *Neocystis brevis*, *Bracteacoccus* e *Pseudococcomyxa simplex* (Redkina & Shalygina, 2021). In suoli contaminati della tundra artica presso miniere di carbone sono state trovate alghe appartenenti al genere *Bracteacoccus* e *Pseudococcomixa simplex* (Patova & Dorokhova, 2008) Il genere *Eustigmatos* così come il genere *Bracteacoccus* sono stati trovati su suoli serpentini in Sud Affrica (Venter et al., 2015). Non ci sono riferimenti riguardo la presenza di *Chromochloris zofingensis* in ambienti contaminati da metalli pesanti. Tuttavia, quest'alga ha subito diversi cambi di nome, e solo recentemente è stata identificata appartenente al genere *Chromochloris* (Fučíková & Lewis, 2012). Questo potrebbe aver portato a identificarla in passato come appartenente al genere *Bracteacoccus*, *Chlorella* o al genere *Muriella*.

3.2.4 Test di tolleranza al cromo

Dal momento che le acque prelevate dal monte Prinzerza hanno mostrato un potenziale inibente pari al 17%, le alghe trovate in quelle condizioni sono buoni candidati per cercare una tolleranza ai metalli pesanti, in particolare al cromo. Per individuare ceppi tolleranti sono stati effettuati test di tolleranza valutando la capacità delle alghe di crescere in presenza di concentrazioni di Cr(VI) sulle alghe delle colonie 4 (*Neocystis* sp), 3 (*Bracteacoccus* sp.) e 38 (*Chromochloris zofingensis*). Le specie analizzate appartengono all'ordine delle Sphaeropleales, come *S. acutus*, tranne forse *Neocystis*, per la quale permane il dubbio dell'appartenenza alle Trebouxiophyceae.

Data la differente velocità di crescita, i test per le diverse specie algali hanno avuto durata diversa. La crescita della colonia 4 è stata analizzata in un arco temporale di 4 giorni, mentre le colonie 3 e 38 sono state analizzate nell'arco di 11 giorni.

Le specie testate sono state coltivate in presenza di differenti concentrazioni di Cr(VI), ovvero: 0 mg/L, 0,125 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, e 1,5 mg/L. L'andamento della crescita è stato seguito mediante conteggio con camere contaglobuli per *Neocystis*. Per *Bracteacoccus* e *Chromochloris* l'eterogeneità di dimensioni, la presenza di autospore in numero variabile fino a 32-64 all'interno della parete della cellula madre e il rilascio di zoospore flagellate di piccole dimensioni hanno invece reso molto complesso il conteggio per cui l'andamento delle loro cinetiche è stato seguito mediante lettura dell'assorbanza, dopo aver controllato la corrispondenza di linearità fra i due metodi di analisi.



Figura 3.21 Test di tolleranza al Cr(VI) in *Neocystis brevis* dopo 96h di coltura. Partendo da sinistra: concentrazioni di cromo esavalente di 1,5, 1, 0,5 e 0,125 mg/L. A destra le 3 repliche di controllo. Si può notare una riduzione della colorazione verde all'aumentare della concentrazione di cromo alle 96 ore.

3.2.4.1 *Neocystis brevis* – Colonia 4

Neocystis brevis è in grado di crescere in presenza di una concentrazione di 0,125mg/L di Cr(VI), concentrazione alla quale non si osserva nessuna differenza significativa rispetto al controllo. Questa concentrazione è 10 volte superiore a quella riscontrata nell'acqua del monte Prinzera nel periodo in cui abbiamo effettuato il campionamento (12,5 µg/L). La crescita risulta invece significativamente rallentata in presenza di una concentrazione di 0,5 mg/L Cr(VI), e completamente inibita alle concentrazioni di a 1 e 1,5 mg/L.

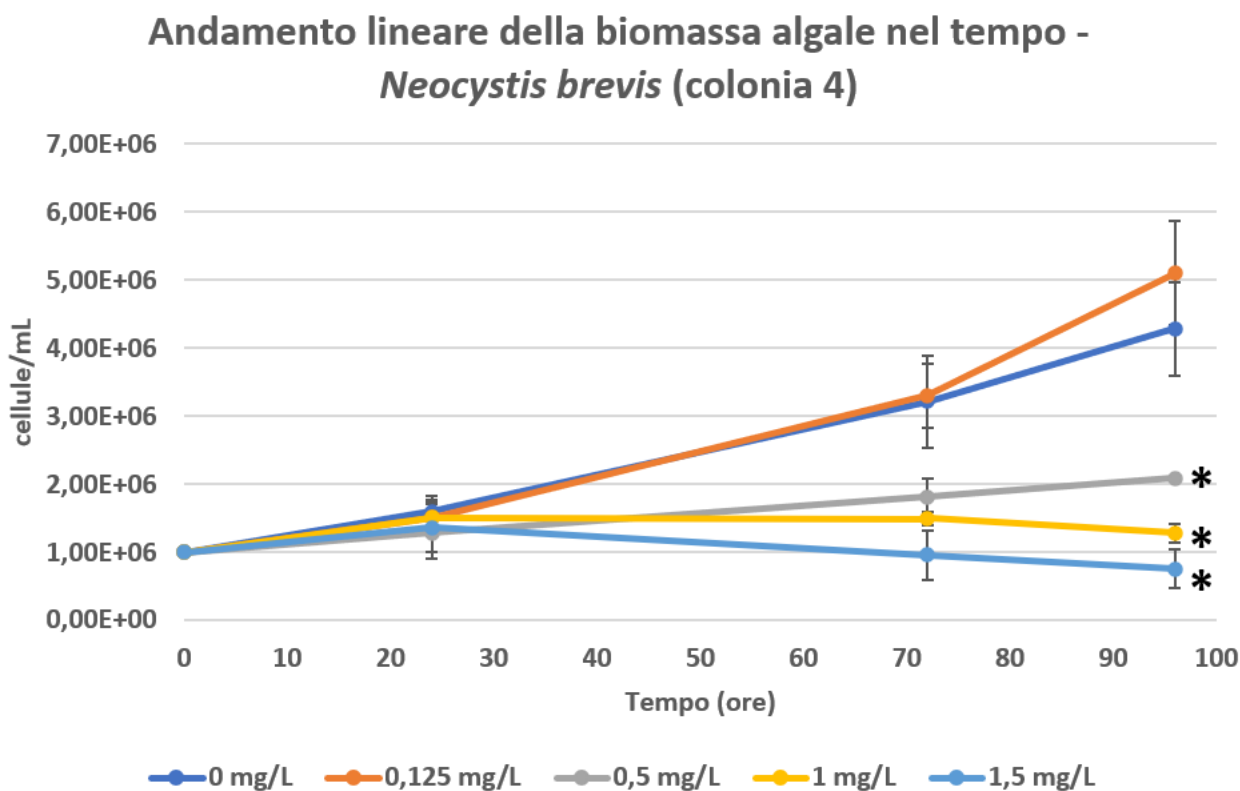


Figura 3.22 Valori medi della crescita *Neocystis brevis* nel tempo con 5 concentrazioni differenti di Cr(VI). Con * sono indicate le condizioni che subiscono una inibizione significativa ($p < 0.05$) della crescita rispetto al controllo (0 mg/L) al termine dell'esperimento.

3.2.4.2 *Bracteacoccus polaris*. - Colonia 3

Bracteacoccus polaris mostra una crescita lenta, il test è stato quindi effettuato nell'arco di 11 giorni. Per quest'alga non sono state rilevate differenze significative fra la capacità di crescita in presenza di differenti concentrazioni di Cr(VI). Nonostante questo, è possibile che le difficoltà nella quantificazione e quindi l'elevata deviazione standard abbiano nascosto della significatività

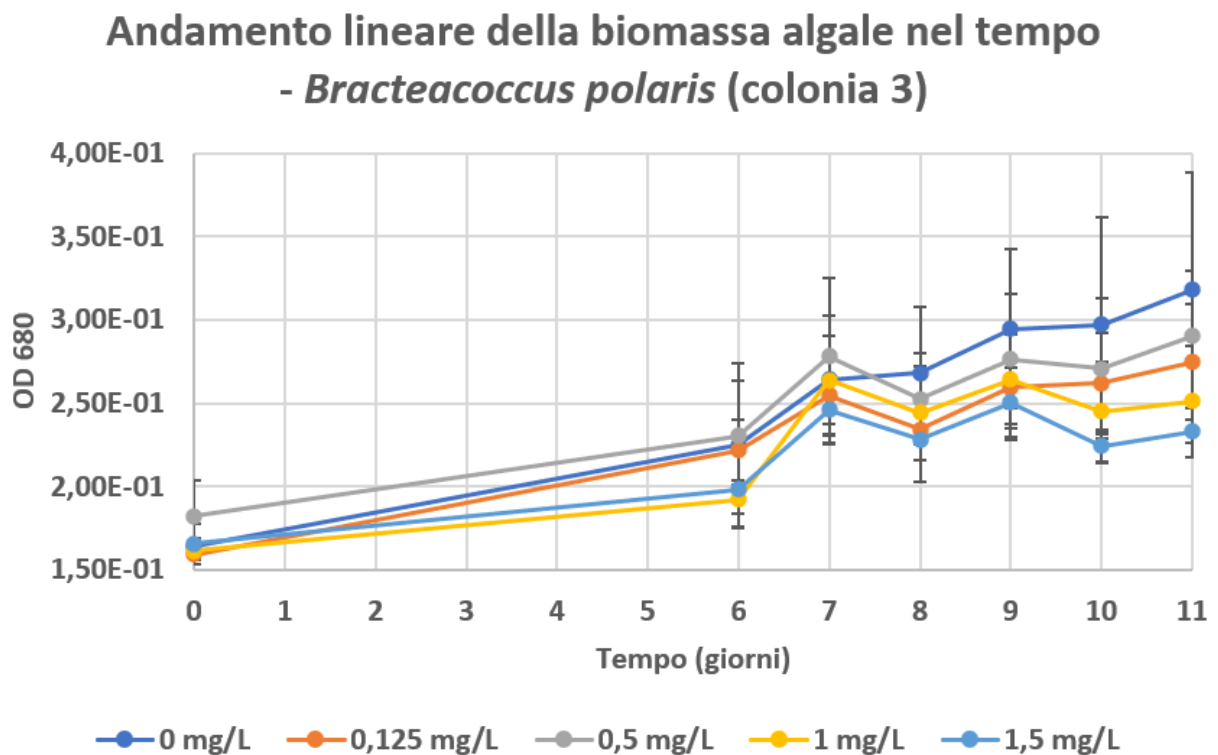


Figure 3.23 Valori medi della crescita *Bracteacoccus polaris* nel tempo con 5 concentrazioni differenti di Cr(VI). Con * sono indicate le condizioni che subiscono una inibizione significativa ($p < 0.05$) della crescita rispetto al controllo (0 mg/L) al termine dell'esperimento.

3.2.4.3 *Chromochloris zofingiensis* - Colonia 38

Anche nel caso di *Chromochloris zofingiensis* ci troviamo di fronte ad un'alga dalla crescita lenta, paragonabile a *Bracteacoccus*. Il test di tolleranza è stato effettuato quindi anche in questo caso nell'arco di 11 giorni. *Chromochloris* mostra tolleranza fino a una concentrazione di 1 mg/mL di Cr(VI). Alla concentrazione di 1,5 mg/mL di Cr(VI) si osserva un calo significativo della crescita che comunque non è completamente inibita.

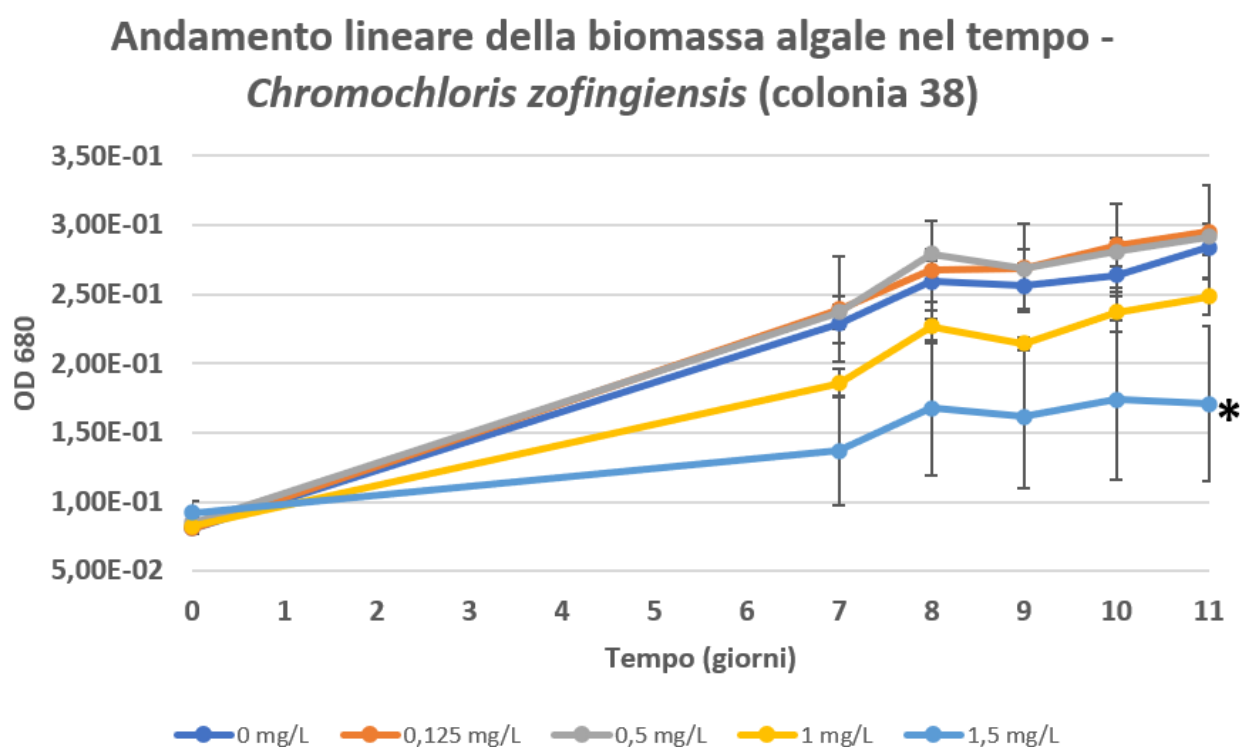


Figure 3.24 Valori medi della crescita *Chromochloris zofingiensis* (colonia 38) nel tempo con 5 concentrazioni differenti di Cr(VI). Con * sono indicate le condizioni che subiscono una inibizione significativa ($p < 0.05$) della crescita rispetto al controllo (0 mg/L) al termine dell'esperimento.

Tutte le alghe testate hanno quindi mostrato un certo livello di tolleranza al cromo, a concentrazioni più o meno elevate a seconda delle specie, e comunque superiori di almeno 10 volte a quelle mediamente presenti nell'acqua della sorgente di provenienza. Questo conferma che il luogo scelto per il campionamento ha effettive potenzialità di indurre, grazie alla pressione ambientale, la selezione di popolazioni algali tolleranti al metallo. Tuttavia, dato che molti stress hanno riposte incrociate fra loro, rimane da chiarire se l'adattamento sia indotto dalla presenza costante di cromo

nell'ambiente o piuttosto dall'elevata conducibilità elettrica dell'acqua della sorgente. Il fatto che le specie algali ritrovate siano state rilevate anche in altri suoli contaminati da metalli (Patova & Dorokhova, 2008; Trzcińska & Pawlik-Skowrońska, 2008; Venter et al., 2015), lascia comunque aperto il dubbio se le specie ritrovate nella sorgente del Monte Prinzera siano organismi naturalmente estremofili capaci di vivere in ambienti particolari oppure ecotipi di una specie "neutrale" adattati ad uno stress ambientale.

3.2.4.4 *Chromochloris zofingiensis* - CCAP 211/14

Per verificare che la tolleranza al cromo osservata non sia dovuta ad una tolleranza intrinseca della specie ma ad adattamenti specifici dei ceppi isolati da noi nelle acque della sorgente, il test di tolleranza è stato effettuato anche sul ceppo commerciale CCAP 211/14 di *Chromochloris zofingiensis*. Il ceppo CCAP 211/14 è stato quindi coltivato nelle stesse condizioni già utilizzate per il ceppo di *C. zofingiensis* isolato sul monte Prinzera. Il ceppo CCAP 211/14 ha mostrato una crescita molto maggiore rispetto a quella delle alghe della colonia 38. Questa differenza nel controllo fra i due ceppi non è attualmente sotto esame, ma merita di essere indagata perché potrebbe rappresentare una differente necessità nutrizionale del ceppo di *Chromochloris* isolato sul Prinzera. Per quanto riguarda il cromo, il ceppo CCAP 211/14 ha mostrato una diminuzione significativa della crescita alla concentrazione pari a 1 mg/L e 1,5 mg/L.

Andamento lineare della biomassa algale nel tempo - *Chromochloris zofingiensis* (CCAP 211/14)

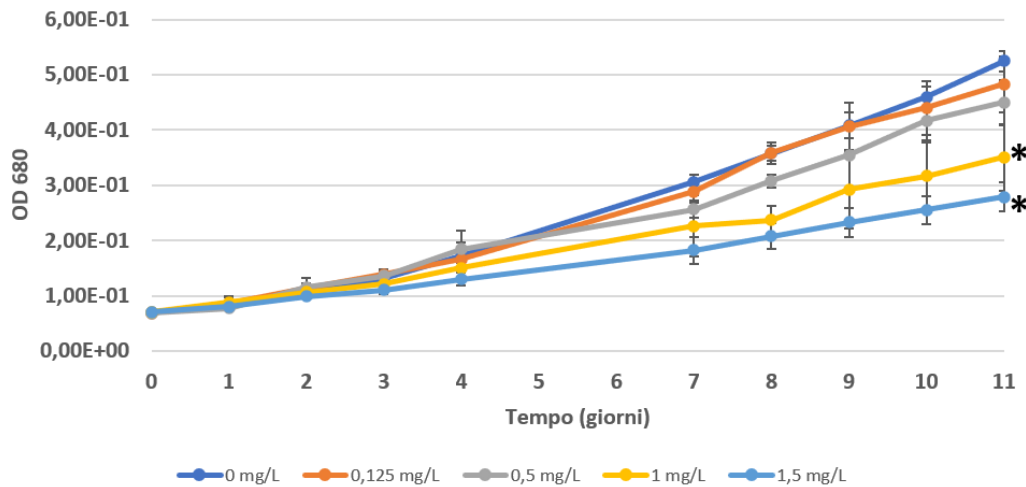


Figure 3.25 Valori medi della crescita *Chromochloris zofingiensis* (ceppo CCAP 211/14) nel tempo con 5 concentrazioni differenti di Cr(VI). Con * sono indicate le condizioni che subiscono una inibizione significativa ($p < 0.05$) della crescita rispetto al controllo (0 mg/L) al termine dell'esperimento.

3.2.4.5 Comparazione della Percentuale di Inibizione dei due ceppi di *Chromochloris zofingiensis*

Per poter meglio confrontare i due ceppi abbiamo calcolato la percentuale di inibizione media a ciascuna concentrazione di cromo. Come riportato in figura 3.26, in presenza di 1 mg/L di Cr(VI) il ceppo CCAP 211/14 mostra un'inibizione della crescita del $33,75 \pm 10,2\%$ a fronte di una inibizione del $12,45 \pm 5,46\%$ osservata nel ceppo del Monte Prinzer. Questa differenza risulta altamente significativa ($p < 0,01$) mentre la significatività delle differenze osservate ($50,98 \pm 8,23\%$ nel ceppo CCAP211/14 e $37,48 \pm 8,43\%$ nel ceppo del Momte Prinzer) si riduce ($p < 0,05\%$) alla concentrazione di 1,5 mg/L di Cr(VI), quando anche il ceppo del Monte Prinzer mostra segni di inibizione della crescita.

Queste osservazioni evidenziano che la specie *C. zofingiensis* può essere naturalmente tollerante ma che il ceppo isolato al Prinzer mostra un maggiore adattamento alla presenza di Cr(VI).

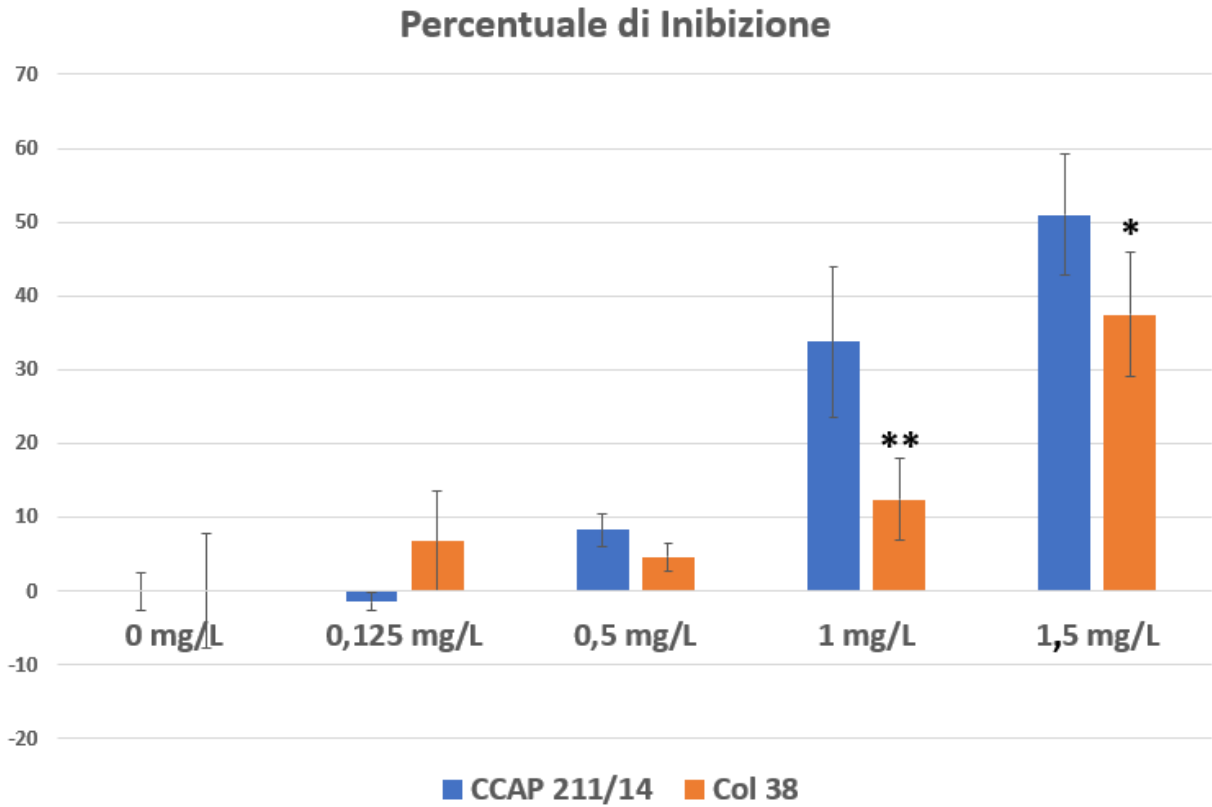


Figure 3.26: Grafico riportante i valori delle percentuali di inibizioni medie dei due ceppi di *Chromochloris zoefingensis* dopo undici giorni di esposizione a 5 differenti concentrazioni di cromo(VI). La significatività della differenza nei valori di inibizione percentuale fra i due ceppi alla stessa concentrazione è riportata con * ($p < 0.05$) oppure ** ($p < 0.01$).

5 Conclusioni

Parte uno

La deprivazione di zolfo per 24 ore non ha portato a variazioni dei livelli di trascritto del gene coinvolto nella sintesi di solfuro analizzato (*SaSIR1*). Il dato è tuttavia incompleto dal momento che non è stato possibile analizzare i livelli di espressione di *SaSIR3*. Nei geni coinvolti nella formazione del complesso cisteina sintasi abbiamo osservato induzione in seguito a deprivazione di zolfo per *SaSAT1*, *SaOAS-TL4* e, contrariamente ai dati di letteratura riguardanti *C. reinhardtii*, *SaOAS-TL2*. Oltre a essere fortemente indotto *SaOAS-TL2* è anche l'unica delle quattro isoforme di OAS-TL a non essere espressa costitutivamente o a essere espressa a livelli quasi non detectabili.

L'analisi filogenetica conferma quanto noto in letteratura, ovvero che *SaOAS-TL2* è la forma strutturalmente più divergente fra le quattro OAS-TL. Questo enzima sembrerebbe mancare del sito di legame per SAT e mostra inoltre differenze nella porzione del sito attivo deputata all'interazione con il solfuro. Queste due caratteristiche potrebbero indicare una sua presenza esclusivamente come dimero libero o addirittura una funzione L-cisteina desulfidrasica. La sua presenza anche in organismi non fotosintetizzanti lascerebbe ipotizzare che questa sia la forma citosolica o mitocondriale

L'analisi dell'attività L e D-cisteina desulfidrasica ha evidenziato un aumento dei livelli di attività in seguito a deprivazione di zolfo di sette giorni per entrambi i ceppi. In tutte le condizioni testate l'attività D-cisteina desulfidrasica è risultata maggiore che quella L-desulfidrasica. La differenza fra le due attività è maggiore nel ceppo cromo tollerante e si accentua in condizioni di deprivazione di solfato. E' interessante notare che i livelli di espressione del gene D-cisteina desulfidrasa nel ceppo cromo tollerante siano significativamente maggiori rispetto a quelli osservati nel ceppo wild type.

Questo suggerisce una maggiore presenza di D-cisteina nel ceppo cromo tollerante. Dal momento che la L-cisteina ha effetto a feedback negativo sul pathway del solfato, la produzione di D-cisteina potrebbe essere una strategia per accumulare zolfo organico in una forma non coinvolta nel sistema di controllo. L'enantiomero D potrebbe quindi andare a costituire una riserva pronta di solfuro in caso di risposta allo stress.

Parte due

I test di ecotossicità condotti sulle acque della sorgente del monte Prinzerà hanno confermato la sua capacità di inibizione della crescita algale. Tutte le alghe testate fra quelle isolate sul monte Prinzerà hanno mostrato livelli di tolleranza a concentrazioni di cromo almeno 10 volte superiori a quelle mediamente registrate nell'acqua della sorgente, confermando che il luogo scelto per il campionamento ha effettive potenzialità di selezionare popolazioni algali indotte dalla pressione ambientale a tollerare il cromo. Rimane da chiarire se l'adattamento sia indotto dalla presenza costante di cromo nell'ambiente o piuttosto alla elevata conducibilità elettrica dell'acqua della sorgente. Molte delle specie ritrovate sono comuni ad altri suoli contaminati da metalli, è quindi possibile che le specie ritrovate siano estremofile e non ecotipi adattati di una specie neutrale. Tuttavia test di tolleranza condotti da noi su due ceppi dell'alga *Chromochloris zofingiensis* (ceppo isolato dalla sorgente del monte Prinzerà e ceppo commerciale CCAP 211/14) evidenziano che la specie *C. zofingiensis* può essere naturalmente tollerante ma che il ceppo isolato al Prinzerà mostra una maggiore tolleranza alla presenza di Cr(VI). Il ceppo di *Chromochloris zofingiensis* potrà quindi essere utilizzato in studi successivi per poter espandere la conoscenza dei meccanismi di tolleranza al cromo esavalente.

6 Riferimenti Bibliografici

- Abd-El-Monem, H. M., Corradi, M. G., & Gorbi, G. (1998). Toxicity of copper and zinc to two strains of *Scenedesmus acutus* having different sensitivity to chromium. In *Environmental and Experimental Botany* (Vol. 40).
- Abreu, I. A., & Cabelli, D. E. (2010). Superoxide dismutases—a review of the metal-associated mechanistic variations. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* (Vol. 1804, Issue 2, pp. 263–274). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.005>
- Akter, S., Khan, M. S., Smith, E. N., & Flashman, E. (2021). Measuring ROS and redox markers in plant cells. In *RSC Chemical Biology* (Vol. 2, Issue 5, pp. 1384–1401). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d1cb00071c>
- Ali, H., & Khan, E. (2018). What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term ‘heavy metals’—proposal of a comprehensive definition. In *Toxicological and Environmental Chemistry* (Vol. 100, Issue 1, pp. 6–19). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/02772248.2017.1413652>
- Ali, S., Bai, P., Zeng, F., Cai, S., Shamsi, I. H., Qiu, B., Wu, F., & Zhang, G. (2011). The ecotoxicological and interactive effects of chromium and aluminum on growth, oxidative damage and antioxidant enzymes on two barley genotypes differing in Al tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 70(2–3), 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.09.002>
- Ali, S., Farooq, M. A., Yasmeen, T., Hussain, S., Arif, M. S., Abbas, F., Bharwana, S. A., & Zhang, G. (2013). The influence of silicon on barley growth, photosynthesis and ultra-structure under chromium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 89, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.015>
- Allaguvatova, R. Z., Nikulin, A. Y., Nikulin, V. Y., Bagmet, V. B., & Gaysina, L. A. (2022). Study of Biodiversity of Algae and Cyanobacteria of Mutnovsky and Gorely Volcanoes Soils (Kamchatka Peninsula) Using a Polyphasic Approach. *Diversity*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/d14050375>
- Allmer, J., Naumann, B., Markert, C., Zhang, M., & Hippler, M. (2006). Mass spectrometric genomic data mining: Novel insights into bioenergetic pathways in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proteomics*, 6(23), 6207–6220. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600208>
- Álvarez, C., Calo, L., Romero, L. C., García, I., & Gotor, C. (2010). An O-Acetylserine(thiol)lyase homolog with l-Cysteine desulfhydrase activity regulates cysteine homeostasis in arabidopsis. *Plant Physiology*, 152(2), 656–669. <https://doi.org/10.1104/pp.109.147975>
- Andosch, A., Höftberger, M., Lütz, C., & Lütz-Meindl, U. (2015). Subcellular sequestration and impact of heavy metals on the ultrastructure and physiology of the multicellular freshwater alga *Desmidium swartzii*. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 10389–10410. <https://doi.org/10.3390/ijms160510389>
- Appenroth, K. J. (2010). Definition of “Heavy Metals” and Their Role in Biological Systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 19–29. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02436-8_2
- Ardila, L., Godoy, R., & Montenegro, L. (2017). Sorption Capacity Measurement of *Chlorella Vulgaris* and *Scenedesmus Acutus* to Remove Chromium from Tannery Waste Water. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 83(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/83/1/012031>

- Bai, J., Xun, P., Morris, S., Jacobs, D. R., Liu, K., & He, K. (2015). Chromium exposure and incidence of metabolic syndrome among American young adults over a 23-year follow-up: The CARDIA Trace Element Study. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep15606>
- Balkhair, K. S., & Ashraf, M. A. (2016). Field accumulation risks of heavy metals in soil and vegetable crop irrigated with sewage water in western region of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(1), S32–S44. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.023>
- Bastien Thomine, S., Wang, R., Ward, J. M., Crawford, N. M., & Schroeder, J. I. (2000). Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. *PNAS*. www.pnas.org
- Baxter, A., Mittler, R., & Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 65, Issue 5, pp. 1229–1240). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert375>
- Becquer, T., Quantin, C., Sicot, M., & Boudot, J. P. (2003). Chromium availability in ultramafic soils from New Caledonia. *The Science of the Total Environment*, 301, 251–261.
- Berkowitz, O., Wirtz, M., Wolf, A., Kuhlmann, J., & Hell, R. (2002). Use of biomolecular interaction analysis to elucidate the regulatory mechanism of the cysteine synthase complex from Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 30629–30634. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111632200>
- Blaszczyk, A., Brodzik, R., & Sirko, A. (1999). Increased resistance to oxidative stress in transgenic tobacco plants overexpressing bacterial serine acetyltransferase. *The Plant Journal*, 20(2), 237–243.
- Bloem, E., Haneklaus, S., & Schnug, E. (2015). Milestones in plant sulfur research on sulfur-induced-resistance (SIR) in Europe. *Frontiers in Plant Science*, 5(JAN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00779>
- Blumenthal, S. G., Hendrickson, H. R., Abrol, Y. P., And, ~, & Conn, E. E. (1963). Cyanide Metabolism in Higher Plants III. THE BIOSYNTHESIS OF &CYANOALANINE*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 243(20), 5302–5307.
- Bolchi, A., Petrucco, S., Tenca, P. L., Foroni, C., & Ottonello, S. (1999). Coordinate modulation of maize sulfate permease and ATP sulfurylase mRNAs in response to variations in sulfur nutritional status: stereospecific down-regulation by L-cysteine. In *Plant Molecular Biology* (Vol. 39). <http://psort.nibb.ac.jp>
- Bonner, E. R., Cahoon, R. E., Knapke, S. M., & Jez, J. M. (2005). Molecular basis of cysteine biosynthesis in plants: Structural and functional analysis of O-acetylserine sulfhydrylase from Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry*, 280(46), 38803–38813. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505313200>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 72, 248–254.
- Brauer, S. L., Hneihen, A. S., McBride, J. S., & Wetterhahn, K. E. (1996). Chromium(VI) Forms Thiolate Complexes with γ -Glutamylcysteine, N-Acetylcysteine, Cysteine, and the Methyl Ester of N-Acetylcysteine.
- Brauer, S. L., & Wetterhahn, K. E. (1991). Chromium(VI) Forms a Thiolate Complex with Glutathione. *J. Am. Chem. Soc*, 113, 3001–3007. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>

- Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B., & Wijffels, R. H. (2012). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology*, 124, 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.003>
- Broady, P. A. (1987). The morphology, distribution and ecology of *Pseudococcomyxa simplex* (Mainx) Fott (Chlorophyta, Chlorellaceae), a widespread terrestrial Antarctic alga. *Polar Biology*, 7(1), 25–30. <https://doi.org/10.1007/BF00286820>
- Brunold, C., & Schiff, J. A. (1976). Studies of Sulfate Utilization of Algae. *Plant Physiology*, 57(3), 430–436. <https://doi.org/10.1104/pp.57.3.430>
- Burkhardt, S., Reiter, R. J., Tan, D.-X., Diger Hardeland, R., Cabrera, J., & Karbownik, M. (2001). DNA oxidatively damaged by chromium(III) and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin, N¹-acetyl-N²-formyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid. In *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (Vol. 33). www.elsevier.com/locate/ijbcb
- Campanini, B., Speroni, F., Salsi, E., Cook, P. F., Roderick, S. L., Huang, B., Bettati, S., & Mozzarelli, A. (2005). Interaction of serine acetyltransferase with O⁻acetylserine sulfhydrylase active site: Evidence from fluorescence spectroscopy. *Protein Science*, 14(8), 2115–2124. <https://doi.org/10.1110/ps.051492805>
- Carfagna, S., Salbitani, G., Vona, V., & Esposito, S. (2011). Changes in cysteine and O-acetyl-l-serine levels in the microalga *Chlorella sorokiniana* in response to the S-nutritional status. *Journal of Plant Physiology*, 168(18), 2188–2195. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.07.012>
- Carreres, B. M., de Jaeger, L., Springer, J., Barbosa, M. J., Breuer, G., van den End, E. J., Kleinegris, D. M. M., Schäffers, I., Wolbert, E. J. H., Zhang, H., Lamers, P. P., Draaisma, R. B., Martins dos Santos, V. A. P., Wijffels, R. H., Eggink, G., Schaap, P. J., & Martens, D. E. (2017). Draft genome sequence of the oleaginous green alga *Tetrademus obliquus* UTEX 393. *Genome Announcements*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01449-16>
- Carrillo, J. T., & Borthakur, D. (2021). Methods for metal chelation in plant homeostasis: Review. In *Plant Physiology and Biochemistry* (Vol. 163, pp. 95–107). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.03.045>
- Cervantes, C., García, J. S. C.-G., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Carlos Torres-Guzmán, J., & Moreno-Sánchez, R. (2001). *Interactions of chromium with microorganisms and plants*. www.fems-microbiology.org
- Chai, W. S., Cheun, J. Y., Kumar, P. S., Mubashir, M., Majeed, Z., Banat, F., Ho, S. H., & Show, P. L. (2021). A review on conventional and novel materials towards heavy metal adsorption in wastewater treatment application. In *Journal of Cleaner Production* (Vol. 296). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126589>
- Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Ranier, J. E., Nguyen, N., & Caskey, C. T. (1988). Nucleic Acids Research Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, 16(23), 11141–11156.
- Chelli, A., Segadelli, S., Vescovi, P., & Tellini, C. (2016). Large-scale geomorphological mapping as a tool to detect structural features: the case of Mt. Prinzera ophiolite rock mass (Northern Apennines, Italy). *Journal of Maps*, 12(5), 770–776. <https://doi.org/10.1080/17445647.2015.1072115>
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, Y., Li, X., Jia, X., Lin, Y., & Leon, C. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*, 5(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613>

- Choppala, G., Bolan, N., & Seshadri, B. (2013). Chemodynamics of chromium reduction in soils: Implications to bioavailability. *Journal of Hazardous Materials*, 261, 718–724.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.03.040>
- Choudhury, S., & Kumar Panda, S. (2005). TOXIC EFFECTS, OXIDATIVE STRESS AND ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN MOSS TAXITHELIUM NEPALENSE (SCHWAEGR.) BROTH. UNDER CHROMIUM AND LEAD PHYTOTOXICITY. *Water, Air, and Soil Pollution*, 167, 73–90.
- Chrysochoou, M., Theologou, E., Bompoti, N., Dermatas, D., & Panagiotakis, I. (2016). Occurrence, Origin and Transformation Processes of Geogenic Chromium in Soils and Sediments. In *Current Pollution Reports* (Vol. 2, Issue 4, pp. 224–235). Springer. <https://doi.org/10.1007/s40726-016-0044-2>
- Clemens Stephan. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212, 475–486.
- Cobbett, C., & Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 53, pp. 159–182).
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154>
- Cobbett, C. S. (2000). Update on Heavy Metal Stress Phytochelatins and Their Roles in Heavy Metal Detoxification PLANTS MAKE TWO TYPES OF PEPTIDE METAL-BINDING LIGANDS: MTs AND PCs. In *Plant Physiology* (Vol. 123). www.plantphysiol.org
- Cozza, D., Torelli, A., Veltri, A., Ferrari, M., Marieschi, M., & Cozza, R. (2016). Ultrastructural features, chromium content and in situ immunodetection of 5-methyl-cytosine following Cr (VI) treatment in two strains of *Scenedesmus acutus* M. (Chlorophyceae) with different chromium sensitivity. *European Journal of Phycology*, 51(3), 294–306. <https://doi.org/10.1080/09670262.2016.1157902>
- Crini, G., & Lichtfouse, E. (2019). Advantages and disadvantages of techniques used for wastewater treatment. In *Environmental Chemistry Letters* (Vol. 17, Issue 1, pp. 145–155). Springer Verlag.
<https://doi.org/10.1007/s10311-018-0785-9>
- Daugbjerg, N., & Andersen, R. A. (1997). A MOLECULAR PHYLOGENY OF THE HETEROKONT ALGAE BASED ON ANALYSES OF CHLOROPLAST-ENCODED rbcL SEQUENCE DATA'. In *J Phycol* (Vol. 33).
- Davis, T. A., Volesky, B., & Mucci, A. (2003). A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. In *Water Research* (Vol. 37, Issue 18, pp. 4311–4330). Elsevier Ltd.
[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00293-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00293-8)
- de Castro, E., Sigrist, C. J. A., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P. S., Gasteiger, E., Bairoch, A., & Hulo, N. (2006). ScanProsite: Detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Research*, 34(WEB. SERV. ISS.).
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl124>
- Deng, L., Wang, H., & Deng, N. (2006). Photoreduction of chromium(VI) in the presence of algae, *Chlorella vulgaris*. *Journal of Hazardous Materials*, 138(2), 288–292.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.04.062>
- Ding, G., Jin, Z., Han, Y., Sun, P., Li, G., & Li, W. (2019). Mitigation of chromium toxicity in *Arabidopsis thaliana* by sulfur supplementation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109379>

- 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 and Environment*, 25, 687–693. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2002.00843.x>
- Domínguez-Solís, J. R., Gutiérrez-Alcalá, G., Romero, L. C., & Gotor, C. (2001). The Cytosolic O-Acetylserine(thiol)lyase Gene is Regulated by Heavy Metals and Can Function in Cadmium Tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, 276(12), 9297–9302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009574200>
- Droux, M., Ruffet, M.-L., Douce, R., & Job, D. (1998). Interactions between serine acetyltransferase and O-acetylserine (thiol) lyase in higher plants Structural and kinetic properties of the free and bound enzymes. *Eur. J. Biochem*, 255, 235245.
- Duffus, J. H. (2002). “HEAVY METALS”-A MEANINGLESS TERM? (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem*, 74(5), 1999–2001.
- Duressa, D., Soliman, K., & Chen, D. (2010). Identification of aluminum responsive genes in Al-tolerant soybean line PI 416937. *International Journal of Plant Genomics*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/164862>
- Ejaz, U., Khan, S. M., Khalid, N., Ahmad, Z., Jehangir, S., Fatima Rizvi, Z., Lho, L. H., Han, H., & Raposo, A. (2023). Detoxifying the heavy metals: a multipronged study of tolerance strategies against heavy metals toxicity in plants. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1154571>
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., & Xie, Y. (2015). Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Scientific World Journal*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/756120>
- Eskin NA, M. (2016). Chromium: Is It Essential and Is It Safe? *Vitamins & Minerals*, 05(01). <https://doi.org/10.4172/2376-1318.1000e144>
- Famà, P., Wysor, B., Kooistra, W. H. C. F., & Zuccarello, G. C. (2002). Molecular phylogeny of the genus *Caulerpa* (Caulerpales, Chlorophyta) inferred from chloroplast *tufA* gene. *Journal of Phycology*, 38(5), 1040–1050. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.t01-1-01237.x>
- Fang, Z., Zhao, M., Zhen, H., Chen, L., Shi, P., & Huang, Z. (2014). Genotoxicity of tri- and hexavalent chromium compounds in vivo and their modes of action on DNA damage in vitro. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103194>
- Ferrari, M., Torelli, A., Marieschi, M., & Cozza, R. (2020). Role of DNA methylation in the chromium tolerance of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae) and its impact on the sulfate pathway regulation. *Plant Science*, 301. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110680>
- Fučíková, K., Flechtner, V. R., & Lewis, L. A. (2013). Revision of the genus *Bracteacoccus* Tereg (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on a phylogenetic approach. *Nova Hedwigia*, 96(1–2), 15–59. <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2012/0067>
- Fučíková, K., & Lewis, L. A. (2012). Intersection of *Chlorella*, *Muriella* and *Bracteacoccus*: Resurrecting the genus *Chromochloris* Kol et Chodat (Chlorophyceae, Chlorophyta). In *Fottea* (Vol. 12, Issue 1). <http://pediastrum.eeb.uconn.edu/>
- Fujita, Y., & Takegawa, K. (2004). Characterization of Two Genes Encoding Putative Cysteine Synthase Required for Cysteine Biosynthesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60(2), 306–311. www.sanger.ac.uk/Projects/S

- Gaitonde, M. K. (1967). A Spectrophotometric Method for the Direct Determination of Cysteine in the Presence of Other Naturally Occurring Amino Acids. In *Biochem. J* (Vol. 104).
- García, I., Rosas, T., Bejarano, E. R., Gotor, C., & Romero, L. C. (2013). Transient transcriptional regulation of the CYS-C1 gene and cyanide accumulation upon pathogen infection in the plant immune response. *Plant Physiology*, 162(4), 2015–2027. <https://doi.org/10.1104/pp.113.219436>
- Gaysina, L. A., Allaguvatova, R. Z., & Eliáš, M. (2021). The first record of genus *Neocystis* from Kamchatka volcano soils, confirmed by genetic data. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 663(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/663/1/012009>
- Gill, R. A., Zang, L., Ali, B., Farooq, M. A., Cui, P., Yang, S., Ali, S., & Zhou, W. (2015). Chromium-induced physio-chemical and ultrastructural changes in four cultivars of *Brassica napus* L. *Chemosphere*, 120, 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.029>
- Giordano, M., Norici, A., & Hell, R. (2005). Sulfur and phytoplankton: Acquisition, metabolism and impact on the environment. In *New Phytologist* (Vol. 166, Issue 2, pp. 371–382). <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01335.x>
- Giordano, M., & Prioretti, L. (2016). Sulphur and Algae: Metabolism, Ecology and Evolution. In *The Physiology of Microalgae* (pp. 185–209). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_9
- González-Ballester, D., Casero, D., Cokus, S., Pellegrini, M., Merchant, S. S., & Grossman, A. R. (2010). RNA-Seq analysis of sulfur-deprived *Chlamydomonas* cells reveals aspects of acclimation critical for cell survival. *Plant Cell*, 22(6), 2058–2084. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.071167>
- Gonzalez-Ballester, D., & Grossman, A. R. (2009). Sulfur: From Acquisition to Assimilation. In *The Chlamydomonas Sourcebook* (second edition).
- Gorbi, G., Corradi, M. G., Invidia, M., & Bassi, M. (2001). Light intensity influences chromium bioaccumulation and toxicity in *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48(1), 36–42. <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.2000>
- 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*, 84(4), 457–464. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.006>
- Gorbi, G., & Corradi, M. G. (1993). Chromium Toxicity on Two Linked Trophic Levels I. Effects of Contaminated Algae on *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 25(1), 64–71. <https://doi:10.1006/eesa.1993.1007>
- Gorman, J., & Shapiro, L. (2004). Structure of serine acetyltransferase from *Haemophilus influenzae* Rd. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(9), 1600–1605. <https://doi.org/10.1107/S0907444904015240>
- Gotor, C., Laureano-Marín, A. M., Moreno, I., Aroca, Á., García, I., & Romero, L. C. (2015). Signaling in the plant cytosol: Cysteine or sulfide? In *Amino Acids* (Vol. 47, Issue 10, pp. 2155–2164). Springer-Verlag Wien. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1786-z>
- Granetti, B. (1968). Studio comparativo della struttura e del ciclo biologico di due diatomee di acqua dolce: *Navicula minima* grun. e *navicula seminulum* grun: I. struttura e ciclo biologico di *navicula minima* grun. coltivata in vitro. *Giornale Botanico Italiano*, 102(2), 133–158. <https://doi.org/10.1080/11263506809426446>

- Grosche, C., Funk, H. T., Maier, U. G., & Zauner, S. (2012). The chloroplast genome of *Pellia endiviifolia*: Gene content, RNA-editing pattern, and the origin of chloroplast editing. *Genome Biology and Evolution*, 4(12), 1349–1357. <https://doi.org/10.1093/gbe/evs114>
- Hadi, S. I. A., Santana, H., Brunale, P. P. M., Gomes, T. G., Oliveira, M. D., Matthiensen, A., Oliveira, M. E. C., Silva, F. C. P., & Brasil, B. S. A. F. (2016). DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters. *PLoS ONE*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149284>
- Hagelueken, G., Adams, T. M., Wiehlmann, L., Widow, U., Kolmar, H., Tü Mmler ‡, B., Heinz, D. W., & Schubert, W.-D. (2006). *The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from Pseudomonas aeruginosa, defines a third class of sulfatases.* www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0510501103
- Hall, J. D., & Lewis, L. A. (2010). An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. *Cryptogamie Algologie*, 31(4), 529–555. <https://www.researchgate.net/publication/263192887>
- Hall, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 1–11.
- 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*. *Journal of Hazardous Materials*, 146(1–2), 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.11.053>
- Harms, K., Von Ballmoos, P., Brunold, C., Ho, R., Fgen, È., & Hesse, H. (2000). Expression of a bacterial serine acetyltransferase in transgenic potato plants leads to increased levels of cysteine and glutathione. *The Plant Journal*, 22(4), 335–345.
- He, H., Li, Y., & He, L. F. (2018). The central role of hydrogen sulfide in plant responses to toxic metal stress. In *Ecotoxicology and Environmental Safety* (Vol. 157, pp. 403–408). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.060>
- Heidenreich, T., Wollers, S., Mendel, R. R., & Bittner, F. (2005). Characterization of the NifS-like domain of ABA3 from *Arabidopsis thaliana* provides insight into the mechanism of molybdenum cofactor sulfuration. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4213–4218. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411195200>
- Hell, R., & Hillebrand, H. (2001). Plant concepts for mineral acquisition and allocation. *Plant Biotechnology*, 12, 161–168.
- Hell, R., & Wirtz, M. (2008). Metabolism of Cysteine in Plants and Phototrophic Bacteria. In *sulfur metabolism in phototrophic organism*.
- Hindson, V. J., Moody, P. C. E., Rowe, A. J., & Shaw, W. V. (2000). Serine Acetyltransferase from *Escherichia coli* Is a Dimer of Trimers* Downloaded from. In *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (Vol. 275, Issue 1). <http://www.jbc.org/>
- Hirai, M. Y., Fujiwara, T., Awazuhara, M., Kimura, T., Noji, M., & Saito, K. (2003). *Global expression profiling of sulfur-starved Arabidopsis by DNA macroarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition.*
- Holland, S. L., & Avery, S. V. (2011). Chromate toxicity and the role of sulfur. *Metallomics*, 3(11), 1119–1123. <https://doi.org/10.1039/c1mt00059d>
- Höller, K., Király, L., Künstler, A., Müller, M., Gullner, G., Fattinger, M., & Zechmann, B. (2010). Enhanced Glutathione Metabolism Is Correlated with Sulfur-Induced Resistance in Tobacco mosaic virus-Infected

- Genetically Susceptible *Nicotiana tabacum* Plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI*, 23(11), 1448–1459. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Huang, B., Vetting, M. W., & Roderick, S. L. (2005). The active site of O-acetylserine sulfhydrylase is the anchor point for bienzyme complex formation with serine acetyltransferase. *Journal of Bacteriology*, 187(9), 3201–3205. <https://doi.org/10.1128/JB.187.9.3201-3205.2005>
- Iyer, A., Mody, K., & Jha, B. (2004). Accumulation of hexavalent chromium by an exopolysaccharide producing marine *Enterobacter cloacae*. *Marine Pollution Bulletin*, 49(11–12), 974–977. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.06.023>
- Jez, J. M. (2019). Structural biology of plant sulfur metabolism: From sulfate to glutathione. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 70, Issue 16, pp. 4089–4103). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz094>
- Jin, Z., Shen, J., Qiao, Z., Yang, G., Wang, R., & Pei, Y. (2011). Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 414(3), 481–486. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.090>
- Jitar, O., Teodosiu, C., Oros, A., Plavan, G., & Nicoara, M. (2015). Bioaccumulation of heavy metals in marine organisms from the Romanian sector of the Black Sea. *New Biotechnology*, 32(3), 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.11.004>
- Johnson, L. R., & John, D. M. (1990). Observations on *dilabifilum* (Class chlorophyta, order chaetophorales sensu stricto) and allied genera. *British Phycological Journal*, 25(1), 53–61. <https://doi.org/10.1080/00071619000650051>
- Jozefczak, M., Keunen, E., Schat, H., Blik, M., Hernández, L. E., Carleer, R., Remans, T., Bohler, S., Vangronsveld, J., & Cuypers, A. (2014). Differential response of *Arabidopsis* leaves and roots to cadmium: Glutathione-related chelating capacity vs antioxidant capacity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.07.001>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kahnert, A., & Kertesz, M. A. (2000). Characterization of a sulfur-regulated oxygenative alkylsulfatase from *Pseudomonas putida* S-313. *Journal of Biological Chemistry*, 275(41), 31661–31667. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005820200>
- Kan, Y., & Pan, J. (2010). A one-shot solution to bacterial and fungal contamination in the green alga *Chlamydomonas Reinhardtii* culture by using an antibiotic cocktail. In *Journal of Phycology* (Vol. 46, Issue 6, pp. 1356–1358). <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00904.x>
- Kawashima, C. G., Berkowitz, O., Hell, R., Noji, M., & Saito, K. (2005). Characterization and expression analysis of a serine acetyltransferase gene family involved in a key step of the sulfur assimilation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 137(1), 220–230. <https://doi.org/10.1104/pp.104.045377>
- Kehrer, J. P. (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149, 43–50. www.elsevier.com/locate/toxicol

- Khan, A. G. (2001). Relationships between chromium biomagnification ratio, accumulation factor, and mycorrhizae in plants growing on tannery effluent-polluted soil. *ENVIRONMENT INTERNATIONAL*, 26, 417–423. www.elsevier.com/locate/envint
- ki Saito, K. (2000). Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 188–195.
- Kocaman, A. (2023). Combined interactions of amino acids and organic acids in heavy metal binding in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 18(1). <https://doi.org/10.1080/15592324.2022.2064072>
- Kolb, D., Müller, M., Zellnig, G., & Zechmann, B. (2010). Cadmium induced changes in subcellular glutathione contents within glandular trichomes of Cucurbita pepo L. *Protoplasma*, 243(1), 87–94. <https://doi.org/10.1007/s00709-009-0043-x>
- Kolukisaoglu, Ü., & Suarez, J. (2017). D-Amino Acids in Plants: New Insights and Aspects, but also More Open Questions. In *Amino Acid - New Insights and Roles in Plant and Animal* (pp. 155–169). InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68539>
- Kopriva, S., & Koprivova, A. (2004). Plant adenosine 5'-phosphosulphate reductase: The past, the present, and the future. *Journal of Experimental Botany*, 55(404), 1775–1783. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh185>
- Kopriva, S., Mugford, S. G., Matthewman, C., & Koprivova, A. (2009). Plant sulfate assimilation genes: Redundancy versus specialization. In *Plant Cell Reports* (Vol. 28, Issue 12, pp. 1769–1780). <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0793-0>
- Kopriva, S., Suter, M., Von Ballmoos, P., Hesse, H., Krähenbühl, U., Rennenberg, H., & Brunold, C. (2002). Interaction of sulfate assimilation with carbon and nitrogen metabolism in Lemna minor. *Plant Physiology*, 130(3), 1406–1413. <https://doi.org/10.1104/pp.007773>
- Koprivova, A., & Kopriva, S. (2016). Sulfur metabolism and its manipulation in crops. *Journal of Genetics and Genomics*, 43(11), 623–629. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.07.001>
- Kotasâ, J., & Stasicka, Z. (2000). Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *ENVIRONMENTAL POLLUTION*, 107, 263–283. www.elsevier.com/locate/envpol
- Kredich, N. M., Becker, M. A., & Tomkins, G. M. (1969). Purification and characterization of cysteine synthetase, a bifunctional protein complex, from Salmonella typhimurium. *Journal of Biological Chemistry*, 244(9), 2428–2439. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)78241-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)78241-6)
- Krueger, S., Niehl, A., Lopez Martin, M. C., Steinhäuser, D., Donath, A., Hildebrandt, T., Romero, L. C., Hoefgen, R., Gotor, C., & Hesse, H. (2009). Analysis of cytosolic and plastidic serine acetyltransferase mutants and subcellular metabolite distributions suggests interplay of the cellular compartments for cysteine biosynthesis in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment*, 32(4), 349–367. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01928.x>
- Kugita, M., Kaneko, A., Yamamoto, Y., Takeya, Y., Matsumoto, T., & Yoshinaga, K. (2003). The complete nucleotide sequence of the hornwort (*Anthoceros formosae*) chloroplast genome: Insight into the earliest land plants. *Nucleic Acids Research*, 31(2), 716–721. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg155>
- Kumar, R., Mishra, R. K., Mishra, V., Qidwai, A., Pandey, A., Shukla, S. K., Pandey, M., Pathak, A., & Dikshit, A. (2015). Detoxification and Tolerance of Heavy Metals in Plants. In *Plant Metal Interaction: Emerging Remediation Techniques* (pp. 335–359). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00013-8>

- Kurmanbayeva, A., Bekturova, A., Soltabayeva, A., Oshanova, D., Nurbekova, Z., Srivastava, S., Tiwari, P., Dubey, A. K., & Sagi, M. (2022). Active O-acetylserine-(thiol) lyase A and B confer improved selenium resistance and degrade I-Cys and I-SeCys in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 73(8), 2525–2539. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac021>
- Lang, I., & Kaczmarska, I. (2011). A protocol for a single-cell pcr of diatoms from fixed samples: Method validation using ditylum brightwellii (T. West) grunow. *Diatom Research*, 26(1), 43–49. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2011.573703>
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Lee, S., Moon, J. S., Ko, T. S., Petros, D., Goldsbrough, P. B., & Korban, S. S. (2003). Overexpression of Arabidopsis phytochelatase synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress. *Plant Physiology*, 131(2), 656–663. <https://doi.org/10.1104/pp.014118>
- Lemieux, C., Otis, C., & Turmel, M. (2007). A clade uniting the green algae Mesostigma viride and Chlorokybus atmophyticus represents the deepest branch of the Streptophyta in chloroplast genome-based phylogenies. *BMC Biology*, 5. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-2>
- Levene, Howard (1960). "Robust tests for equality of variances". In Ingram Olkin; Harold Hotelling; et al. (eds.). *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling*. Stanford University Press. pp. 278–292.
- Lindberg, P., & Melis, A. (2008). The chloroplast sulfate transport system in the green alga Chlamydomonas reinhardtii. *Planta*, 228(6), 951–961. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0795-0>
- Lira-Silva, E., Ramírez-Lima, I. S., Olín-Sandoval, V., García-García, J. D., García-Contreras, R., Moreno-Sánchez, R., & Jasso-Chávez, R. (2011). Removal, accumulation and resistance to chromium in heterotrophic Euglena gracilis. *Journal of Hazardous Materials*, 193, 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.07.056>
- Liu, D., Zou, J., Wang, M., & Jiang, W. (2008). Hexavalent chromium uptake and its effects on mineral uptake, antioxidant defence system and photosynthesis in Amaranthus viridis L. *Bioresource Technology*, 99(7), 2628–2636. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.045>
- Liu, H., Wang, J., Liu, J., Liu, T., & Xue, S. (2021). Hydrogen sulfide (H₂S) signaling in plant development and stress responses. *ABIOTECH*, 2(1), 32–63. <https://doi.org/10.1007/s42994-021-00035-4>
- Lunn, J. E., Droux, M., Martin, J., & Douce, R. (1990). Localization of ATP Sulfurylase and O-Acetylserine(thiol)lyase in Spinach Leaves. *Plant Physiol*, 94, 1345–1352. www.plantphysiol.org
- Luo, L., Ma, Y., Zhang, S., Wei, D., & Zhu, Y. G. (2009). An inventory of trace element inputs to agricultural soils in China. *Journal of Environmental Management*, 90(8), 2524–2530. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2009.01.011>
- Ma, J., Lv, C., Xu, M., Chen, G., Lv, C., & Gao, Z. (2016). Photosynthesis performance, antioxidant enzymes, and ultrastructural analyses of rice seedlings under chromium stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(2), 1768–1778. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5439-x>

- Macfarlane, G. R., & Burchett, M. D. (2001). Photosynthetic Pigments and Peroxidase Activity as Indicators of Heavy Metal Stress in the Grey Mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Marine Pollution Bulletin*, 42(3), 233–240.
- Mallick, N., & Ra, L. C. (2002). PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF NON-VASCULAR PLANTS TO HEAVY METALS. In *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants* (pp. 111–147).
- Mangabeira, P. A., Mielke, M. S., Arantes, I., Dutruch, L., Silva, D. da C., Barbier, F., de Almeida, A. A. F., Oliveira, A. H., Severo, M. I. G., Labejof, L., Rocha, D. C., Rosa, T. S., Santana, K. B., Gavrilov, K. L., Galle, P., Levi-Setti, R., & Grenier-Loustalot, M. F. (2006). Bioaccumulation of chromium in aquatic macrophyte *Borreria scabiosoides* Cham. & Schldl. *Applied Surface Science*, 252(19), 6816–6819. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2006.02.118>
- Mangabeira, P. A. O., Labejof, L., Lamperti, A., De Almeida, A. A. F., Oliveira, A. H., Escaig, F., Severo, M. I. G., Silva, D. D. C., Saloes, M., Mielke, M. S., Lucena, E. R., Martins, M. C., Santana, K. B., Gavrilov, K. L., Galle, P., & Levi-Setti, R. (2004). Accumulation of chromium in root tissues of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. in Cachoeira river - Brazil. *Applied Surface Science*, 231–232, 497–501. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2004.03.195>
- Marieschi, M., Gorbi, G., Zanni, C., Sardella, A., & Torelli, A. (2015). Increase of chromium tolerance in *Scenedesmus acutus* after sulfur starvation: Chromium uptake and compartmentalization in two strains with different sensitivities to Cr(VI). *Aquatic Toxicology*, 167, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.08.001>
- 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. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 716–721.
- McManus, H. A., & Lewis, L. A. (2011). Molecular phylogenetic relationships in the freshwater family hydrodictyaceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae), with an emphasis on *Pediastrum Duplex*. *Journal of Phycology*, 47(1), 152–163. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00940.x>
- Medeiros, M. G., Rodrigues, A. S., Batoréu, M. C., Laires, A., Rueff, J., & Zhitkovich, A. (2003). Elevated levels of DNA-protein crosslinks and micronuclei in peripheral lymphocytes of tannery workers exposed to trivalent chromium. *Mutagenesis*, 18(1), 19–24. <http://mutage.oxfordjournals.org/>
- Melis, A., & Chen, H. C. (2005). Chloroplast sulfate transport in green algae - Genes, proteins and effects. *Photosynthesis Research*, 86(3), 299–307. <https://doi.org/10.1007/s11120-005-7382-z>
- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L. K., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W. F., Qu, L. H., Nelson, D. R., Sanderfoot, A. A., Spalding, M. H., Kapitonov, V. V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., ... Zhou, K. (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318(5848), 245–251. <https://doi.org/10.1126/science.1143609>
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
- Mittler, R., Zandalinas, S. I., Fichman, Y., & Van Breusegem, F. (2022). Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(10), 663–679. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00499-2>
- Moe, L. A. (2013). Amino acids in the rhizosphere: From plants to microbes. *American Journal of Botany*, 100(9), 1692–1705. <https://doi.org/10.3732/ajb.1300033>

- Moran, J. F., Aki Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, M. A., Rubio, M. C., Clemente, M. R., Brewin, N. J., & Becana, M. (2000). Glutathione and Homoglutathione Synthetases of Legume Nodules. Cloning, Expression, and Subcellular Localization 1. *Plant Physiology*, *124*, 1381–1392. www.plantphysiol.org
- Mustafa, G., & Komatsu, S. (2016). Toxicity of heavy metals and metal-containing nanoparticles on plants. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1864*(8), 932–944. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.02.020>
- Nazar, R., Iqbal, N., Masood, A., Syeed, S., & Khan, N. A. (2011). Understanding the significance of sulfur in improving salinity tolerance in plants. *Environmental and Experimental Botany*, *70*(2–3), 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.09.011>
- Nies, D. H., Koch, S., Wachi, S., Peitzsch, N., & Saier, M. H. (1998). CHR, a Novel Family of Prokaryotic Proton Motive Force-Driven Transporters Probably Containing Chromate/Sulfate Antiporters. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, *180*(21), 5799–5802.
- Nikiforova, V. J., Bielecka, M., Gakière, B., Krueger, S., Rinder, J., Kempa, S., Morcuende, R., Scheible, W. R., Hesse, H., & Hoefgen, R. (2006). Effect of sulfur availability on the integrity of amino acid biosynthesis in plants. *Amino Acids*, *30*(2), 173–183. <https://doi.org/10.1007/s00726-005-0251-4>
- Nocito, F. F., Lancilli, C., Crema, B., Fourcroy, P., Davidian, J. C., & Sacchi, G. A. (2006). Heavy metal stress and sulfate uptake in maize roots. *Plant Physiology*, *141*(3), 1138–1148. <https://doi.org/10.1104/pp.105.076240>
- Noji, M., Inoue, K., Kimura, N., Gouda, A., & Saito, K. (1998). Isoform-dependent Differences in Feedback Regulation and Subcellular Localization of Serine Acetyltransferase Involved in Cysteine Biosynthesis from *Arabidopsis thaliana** Downloaded from. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, *273*(49), 32739–32745. <http://www.jbc.org/>
- Noji, M., & Saito, K. (2002). Molecular and biochemical analysis of serine acetyltransferase and cysteine synthase towards sulfur metabolic engineering in plants. *Amino Acids*, *22*, 231–243.
- Noji, M., Saito, M., Nakamura, M., Aono, M., Saji, H., & Saito, K. (2001). Cysteine Synthase Overexpression in Tobacco Confers Tolerance to Sulfur-Containing. *Physiology*, *126*(3), 973–980. <https://www.jstor.org/>
- Noman, A., & Aqeel, M. (2017). miRNA-based heavy metal homeostasis and plant growth. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*(11), 10068–10082. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8593-5>
- Oecd Guideline N° 201. (2006). *Freshwater alga and Cyanobacteria, Growth inhibition Test*.
- Ohyama, K., Kohchi, T., Fukuzawa, H., Sano, T., Umesono, K., & Ozeki, H. (1988). Gene organization and newly identified groups of genes of the chloroplast genome from a liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Photosynthesis Research*, *16*, 7–22.
- Olsen, L. R., Huang, B., Vetting, M. W., & Roderick, S. L. (2004). Structure of serine acetyltransferase in complexes with CoA and its cysteine feedback inhibitor. *Biochemistry*, *43*(20), 6013–6019. <https://doi.org/10.1021/bi0358521>
- Paietta, J. V. (1990). Molecular Cloning and Analysis of the scon-2 Negative Regulatory Gene of *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology*, *10*(10), 5207–5214. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.10.5207-5214.1990>
- Panda, S. K. (2007). Chromium-mediated oxidative stress and ultrastructural changes in root cells of developing rice seedlings. *Journal of Plant Physiology*, *164*(11), 1419–1428. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.01.012>

- Pandey, N., & Sharma, C. P. (2003). Chromium interference in iron nutrition and water relations of cabbage. *Environmental and Experimental Botany*, 49, 195–200. www.elsevier.com/locate/envexpbot
- Patova, E. N., & Dorokhova, M. F. (2008). Green algae in tundra soils affected by coal mine pollutions. *Biologia*, 63(6), 831–835. <https://doi.org/10.2478/s11756-008-0107-y>
- Pereira, Y., Lagniel, G., Godat, E., Baudouin-Cornu, P., Junot, C., & Labarre, J. (2008). Chromate causes sulfur starvation in yeast. *Toxicological Sciences*, 106(2), 400–412. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn193>
- Pinto, E., Sigaud-Kutner, T. C. S., Leitão, M. A. S., Okamoto, O. K., Morse, D., & Colepicolo, P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. In *Journal of Phycology* (Vol. 39, Issue 6, pp. 1008–1018). <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x>
- Pootakham, W., Gonzalez-Ballester, D., & Grossman, A. R. (2010). Identification and regulation of plasma membrane sulfate transporters in chlamydomonas. *Plant Physiology*, 153(4), 1653–1668. <https://doi.org/10.1104/pp.110.157875>
- Prioretti, L., Gontero, B., Hell, R., & Giordano, M. (2014). Diversity and regulation of ATP sulfurylase in photosynthetic organisms. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 5). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00597>
- Pye, V. E., Tingey, A. P., Robson, R. L., & Moody, P. C. E. (2004). The structure and mechanism of serine acetyltransferase from Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 40729–40736. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403751200>
- Ratnal, G. V., Dhakate, R., & More, S. (2022). Distribution and human health hazard appraisal with special reference to chromium in soils from Peenya industrial area, Bengaluru City, South India. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 20(1), 79–100. <https://doi.org/10.1007/s40201-021-00757-z>
- Ravina, C. G., Chang, C. I., Tsakraklides, G. P., McDermott, J. P., Vega, J. M., Leustek, T., Gotor, C., & Davies, J. P. (2002). The sac mutants of Chlamydomonas reinhardtii reveal transcriptional and posttranscriptional control of cysteine biosynthesis. *Plant Physiology*, 130(4), 2076–2084. <https://doi.org/10.1104/pp.012484>
- Redkina, V. V., & Shalygina, R. R. (2021). Algae and cyanobacteria in soils polluted with heavy metals (Northwest Russia, Murmansk region). *Czech Polar Reports*, 11(2), 279–290. <https://doi.org/10.5817/CPR2021-2-19>
- Rege, V. D., Kredich, N. M., Tai, C.-H., Karsten, W. E., Schnackerz, K. D., & Cook, P. F. (1996). A Change in the Internal Aldimine Lysine (K42) in O-Acetylserine Sulfhydrylase to Alanine Indicates Its Importance in Transamination and as a General Base Catalyst †. 35, 13485–13493. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Remmers, I. M., Hidalgo-Ulloa, A., Brandt, B. P., Evers, W. A. C., Wijffels, R. H., & Lamers, P. P. (2017). Continuous versus batch production of lipids in the microalgae Acutodesmus obliquus. *Bioresource Technology*, 244, 1384–1392. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.093>
- Riemenschneider, A., Riedel, K., Hoefgen, R., Papenbrock, J., & Hesse, H. (2005). Impact of reduced O-acetylserine(thiol)lyase isoform contents on potato plant metabolism. *Plant Physiology*, 137(3), 892–900. <https://doi.org/10.1104/pp.104.057125>

- Ruffet, M.-L., Droux, M., & Douce, R. (1994). Purification and Kinetic Properties of Serine Acetyl transferase Free of O-Acetylserine (thiol) lyase from Spinach Chloroplasts'. *Plant Physiol*, *104*, 597–604. www.plantphysiol.org
- Ruffet, M.-L., Lebrun, M., Droux, M., & Douce, R. (1995). Subcellular distribution of serine acetyltransferase from *Pisum sativum* and characterization of an *Arabidopsis thaliana* putative cytosolic isoform. *Eur. J. Biochem*, *227*, 500–509.
- Sahu, P. P., Pandey, G., Sharma, N., Puranik, S., Muthamilarasan, M., & Prasad, M. (2013). Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation. *Plant Cell Reports*, *32*(8), 1151–1159. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1462-x>
- Saito, K., Kurosawa, M., Tatsuguchi, K., Takagi, Y., & Murakoshi, L. (1994). Modulation of Cysteine Biosynthesis in Chloroplasts of Transgenic Tobacco Overexpressing Cysteine Synthase [O-Acetylserine(thio1)-lyase]'. *Plant Physiol*, *106*, 887–895.
- Salbitani, G., & Carfagna, S. (2017). Extraction and Activity of O-acetylserine(thiol)lyase (OASTL) from Microalga *Chlorella sorokiniana*. *BIO-PROTOCOL*, *7*(12). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2342>
- Salbitani, G., Wirtz, M., Hell, R., & Carfagna, S. (2014). Affinity purification of O-acetylserine(thiol)lyase from *Chlorella sorokiniana* by recombinant proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Metabolites*, *4*(3), 629–639. <https://doi.org/10.3390/metabo4030629>
- Sardella, A., Marieschi, M., Mercatali, I., Zanni, C., Gorbi, G., & Torelli, A. (2019). The relationship between sulfur metabolism and tolerance of hexavalent chromium in *Scenedesmus acutus* (Spheropleales): Role of ATP sulfurylase. *Aquatic Toxicology*, *216*. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105320>
- Satarug, S., Baker, J. R., Urbenjapol, S., Haswell-Elkins, M., Reilly, P. E. B., Williams, D. J., & Moore, M. R. (2003). A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicology Letters*, *137*, 65–83. www.elsevier.com/locate/toxlet
- Schiavon, M., Pilon-Smits, E. A. H., Wirtz, M., Hell, R., & Malagoli, M. (2008). Interactions between Chromium and Sulfur Metabolism in *Brassica juncea*. *Journal of Environmental Quality*, *37*(4), 1536–1545. <https://doi.org/10.2134/jeq2007.0032>
- Scuffi, D., Álvarez, C., Laspina, N., Gotor, C., Lamattina, L., & García-Mata, C. (2014). Hydrogen sulfide generated by L-cysteine desulfhydrase acts upstream of nitric oxide to modulate abscisic acid-dependent stomatal closure. *Plant Physiology*, *166*(4), 2065–2076. <https://doi.org/10.1104/pp.114.245373>
- Segadelli, S., Vescovi, P., Chelli, A., Petrella, E., de Nardo, M. T., Gargini, A., & Celico, F. (2017). Hydrogeological mapping of heterogeneous and multi-layered ophiolitic aquifers (Mountain Prinzera, northern Apennines, Italy). *Journal of Maps*, *13*(2), 737–746. <https://doi.org/10.1080/17445647.2017.1376228>
- Shahid, M., Shamshad, S., Rafiq, M., Khalid, S., Bibi, I., Niazi, N. K., Dumat, C., & Rashid, M. I. (2017). Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review. *Chemosphere*, *178*, 513–533. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.074>
- Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., & Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment International*, *31*(5), 739–753. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.02.003>

- Shanker, A. K., & Pathmanabhan, G. (2004). Speciation dependant antioxidative response in roots and leaves of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench cv CO 27) under Cr(III) and Cr(VI) stress. *Plant and Soil*, *265*, 141–151.
- Sharma, A., Kapoor, D., Wang, J., Shahzad, B., Kumar, V., Bali, A. S., Jasrotia, S., Zheng, B., Yuan, H., & Yan, D. (2020). Chromium bioaccumulation and its impacts on plants: An overview. *Plants*, *9*(1). <https://doi.org/10.3390/plants9010100>
- Shibagaki, N., & Grossman, A. R. (2006). The role of the STAS domain in the function and biogenesis of a sulfate transporter as probed by random mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(32), 22964–22973. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603462200>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, *7*. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Singh, S., Kumar Naik, T. S. S., Chauhan, V., Shehata, N., Kaur, H., Dhanjal, D. S., Marcelino, L. A., Bhati, S., Subramanian, S., Singh, J., & Ramamurthy, P. C. (2022). Ecological effects, remediation, distribution, and sensing techniques of chromium. *Chemosphere*, *307*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135804>
- Sirko, A., Błaszczuk, A., & Liszewska, F. (2004). Overproduction of SAT and/or OASTL in transgenic plants: A survey of effects. *Journal of Experimental Botany*, *55*(404), 1881–1888. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh151>
- S.J.S. Flora, Megha Mittal, & Ashish Mehta. (2008). Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res*, *128*, 501–523.
- Smith, F. W., Ealing, P. M., Hawkesfordt, M. J., & Clarkson, D. T. (1995). Plant members of a family of sulfate transporters reveal functional subtypes (ion transport/sulfate uptake). *Plant Biology*, *92*, 9373–9377.
- Sundarmoorthy, P., Sankarganesh, K., Selvaraj, M., Baskaran, L., & Chidambaram, A. A. (2015). Chromium induced changes in soybean (*Glycine max* L.) metabolism. *World Scientific News*, *16*, 125–158. www.worldscientificnews.com
- Tai, C. H., & Cook, P. F. (2001). Pyridoxal 5'-phosphate-dependent α,β -elimination reactions: Mechanism of O-Acetylserine sulfhydrylase. *Accounts of Chemical Research*, *34*(1), 49–59. <https://doi.org/10.1021/ar990169l>
- Takahashi, H., Braby, C. E., & Grossman, A. R. (2001). Sulfur economy and cell wall biosynthesis during sulfur limitation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, *127*(2), 665–673. <https://doi.org/10.1104/pp.010257>
- Takahashi, H., Buchner, P., Yoshimoto, N., Hawkesford, M. J., & Shiu, S. H. (2012). Evolutionary relationships and functional diversity of plant sulfate transporters. *Frontiers in Plant Science*, *2*(119). <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00119>
- Takahashi, H., Kopriva, S., Giordano, M., Saito, K., & Hell, R. (2011). Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: Molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annual Review of Plant Biology*, *62*, 157–184. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103921>

- Takahashi, H., & Saito, K. (1996). Subcellular Localization of Spinach Cysteine Synthase Isoforms and Regulation of Their Gene Expression by Nitrogen and Sulfur. *Physiology*, *112*(1), 273–280. <https://about.jstor.org/terms>
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. *EXS*, *101*, 133–164. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
- Temraleeva, A. D., & Portnaya, E. A. (2023). Morphological and Molecular Genetic Analyses of the Genus *Vischeria* (Eustigmatophyceae, Ochrophyta) in the Algal Collection of Soil Science Institute. *Doklady Biological Sciences*, *508*(1), 20–31. <https://doi.org/10.1134/S0012496622700132>
- Thacker, U., & Madamwar, D. (2005). Reduction of toxic chromium and partial localization of chromium reductase activity in bacterial isolate DM1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *21*(6–7), 891–899. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-6557-7>
- Torelli, A., Marieschi, M., Castagnoli, B., Zanni, C., Gorbi, G., & Corradi, M. G. (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*. *Aquatic Toxicology*, *86*(4), 495–507. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.12.010>
- Torricelli, E., Gorbi, G., Pawlik-Skowronska, B., Di Toppi, L. S., & Corradi, M. G. (2004). Cadmium tolerance, cysteine and thiol peptide levels in wild type and chromium-tolerant strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Aquatic Toxicology*, *68*(4), 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.020>
- Trzcińska, M., & Pawlik-Skowrońska, B. (2008). Soil algal communities inhabiting zinc and lead mine spoils. *Journal of Applied Phycology*, *20*(4), 341–348. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9259-3>
- Tumolo, M., Ancona, V., De Paola, D., Losacco, D., Campanale, C., Massarelli, C., & Uricchio, V. F. (2020). Chromium pollution in European water, sources, health risk, and remediation strategies: An overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(15), 1–25. <https://doi.org/10.3390/ijerph17155438>
- Turmel, M., Otis, C., & Lemieux, C. (2005). The complete chloroplast DNA sequences of the charophycean green algae *Staurastrum* and *Zygnema* reveal that the chloroplast genome underwent extensive changes during the evolution of the Zygnematales. *BMC Biology*, *3*(22). <https://doi.org/10.1186/1741-7007-3-22>
- Turowski, V. R., Busi, M. V., & Gomez-Casati, D. F. (2012). Structural and functional studies of the mitochondrial cysteine desulfurase from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, *5*(5), 1001–1010. <https://doi.org/10.1093/mp/sss037>
- Unal, D., Isik, N. O., & Sukatar, A. (2010). Effects of Chromium VI Stress on Photosynthesis, Chlorophyll Integrity, Cell Viability, and Proline Accumulation in Lichen *Ramalina farinacea*1. *Russian Journal of Plant Physiology*, *57*(5), 664–669. <https://doi.org/10.1134/S1021443710050092>
- Upadhyay, R., & Kumar Panda, S. (2010). BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY Influence of Chromium Salts on Increased Lipid Peroxidation and Differential Pattern in Antioxidant Metabolism in *Pistia stratiotes* L. *Arch. Biol. Technol.* v.53 n, *5*(5), 1137–1144.
- Vaara, M. (1992). Eight bacterial proteins, including UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase (LpxA) and three other transferases of *Escherichia coli*, consist of a six-residue periodicity theme. *FEMS Microbiology Letters*, *97*, 249–254.

- Van Hoewyk, D., Pilon, M., & Pilon-Smits, E. A. H. (2008). The functions of NifS-like proteins in plant sulfur and selenium metabolism. *Plant Science*, 174(2), 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.10.004>
- Vannini, C., Domingo, G., Marsoni, M., Bracale, M., Sestili, S., Ficcadenti, N., Speranza, A., Crinelli, R., Carloni, E., & Scocianti, V. (2011). Proteomic changes and molecular effects associated with Cr(III) and Cr(VI) treatments on germinating kiwifruit pollen. *Phytochemistry*, 72(14–15), 1786–1795. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.06.001>
- Venter, A., Levanets, A., Siebert, S., & Rajakaruna, N. (2015). A preliminary survey of the diversity of soil algae and cyanoprokaryotes on mafic and ultramafic substrates in South Africa. *Published in Australian Journal of Botany*, 63, 341–352.
- Vignati, D. A. L., Dominik, J., Beye, M. L., Pettine, M., & Ferrari, B. J. D. (2010). Chromium(VI) is more toxic than chromium(III) to freshwater algae: A paradigm to revise? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(5), 743–749. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.01.011>
- Vojtovič, D., Luhová, L., & Petřivalský, M. (2021). Something smells bad to plant pathogens: Production of hydrogen sulfide in plants and its role in plant defence responses. *Journal of Advanced Research*, 27, 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.09.005>
- Volland, S., Bayer, E., Baumgartner, V., Andosch, A., Lütz, C., Sima, E., & Lütz-Meindl, U. (2014). Rescue of heavy metal effects on cell physiology of the algal model system *Micrasterias* by divalent ions. *Journal of Plant Physiology*, 171(2), 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.10.002>
- Volland, S., Lütz, C., Michalke, B., & Lütz-Meindl, U. (2012). Intracellular chromium localization and cell physiological response in the unicellular alga *Micrasterias*. *Aquatic Toxicology*, 109, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.11.013>
- Volpe, F. (2021). *Studio dei fattori idrodinamici che influenzano la presenza naturale di Cromo nelle acque sorgive di acquiferi ofiolitici: l'esempio del Mt. Prinzerà (Appennino Settentrionale)*.
- Vranova, V., Zahradnickova, H., Janous, D., Skene, K. R., Matharu, A. S., Rejsek, K., & Formanek, P. (2012). The significance of D-amino acids in soil, fate and utilization by microbes and plants: Review and identification of knowledge gaps. *Plant and Soil*, 354(1–2), 21–39. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1059-5>
- Wakeel, A., Xu, M., & Gan, Y. (2020). Chromium-induced reactive oxygen species accumulation by altering the enzymatic antioxidant system and associated cytotoxic, genotoxic, ultrastructural, and photosynthetic changes in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21030728>
- Wang, J., & Chen, C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, 27(2), 195–226. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.002>
- Wiedemann, G., Koprivova, A., Schneider, M., Herschbach, C., Reski, R., & Kopriva, S. (2007). The role of the novel adenosine 5'-phosphosulfate reductase in regulation of sulfate assimilation of *Physcomitrella patens*. *Plant Molecular Biology*, 65(5), 667–676. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9231-2>
- Williams, L. E., Pittman, J. K., & Hall, J. L. (2000). Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465, 104–126. www.elsevier.com/locate/bba
- Winkler, M. E., & Ramos-Montañez, S. (2009). Biosynthesis of Histidine. *EcoSal Plus*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.6.1.9>

- Wirtz, M., Berkowitz, O., Droux, M., & Diger Hell, R. È. (2001). The cysteine synthase complex from plants Mitochondrial serine acetyltransferase from *Arabidopsis thaliana* carries a bifunctional domain for catalysis and protein±protein interaction. *J. Biochem*, 268, 686–693. <http://www.ipk-gatersleben.de>
- Wirtz, M., & Hell, R. (2003). Production of cysteine for bacterial and plant biotechnology: Application of cysteine feedback-insensitive isoforms of serine acetyltransferase. *Amino Acids*, 24(1–2), 195–203. <https://doi.org/10.1007/s00726-002-0313-9>
- Wirtz, M., & Hell, R. (2006). Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: Structural, biochemical and regulatory properties. *Journal of Plant Physiology*, 163(3), 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.11.013>
- Wolfe-Simon, F., Grzebyk, D., Schofield, O., & Falkowski, P. G. (2005). The role and evolution of superoxide dismutases in algae. *Journal of Phycology*, 41(3), 453–465. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.00086.x>
- Xie, H., Wise, S. S., Holmes, A. L., Xu, B., Wakeman, T. P., Pelsue, S. C., Singh, N. P., & Wise, J. P. (2005). Carcinogenic lead chromate induces DNA double-strand breaks in human lung cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 586(2), 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.06.002>
- Yamasaki, H., Ogura, M. P., Kingjoe, K. A., & Cohen, M. F. (2019). D-cysteine-induced rapid root abscission in the water fern *azolla pinnata*: Implications for the linkage between d-amino acid and reactive sulfur species (RSS) in plant environmental responses. *Antioxidants*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/antiox8090411>
- Yang, X.-E., Jin, X.-F., Feng, Y., & Islam, E. (2005). Molecular Mechanisms and Genetic Basis of Heavy Metal Tolerance/ Hyperaccumulation in Plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(9), 1025–1035. <http://www.blackwell-synergy.comhttp://www.chineseplantscience.com>
- Yang, Z., Yang, F., Liu, J. L., Wu, H. T., Yang, H., Shi, Y., Liu, J., Zhang, Y. F., Luo, Y. R., & Chen, K. M. (2022). Heavy metal transporters: Functional mechanisms, regulation, and application in phytoremediation. *Science of the Total Environment*, 809. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151099>
- Yildiz', F. H., Davies, J. P., & Grossman, A. (1996). Sulfur Availability and the SAC7 Gene Control Adenosine Triphosphate Sulfurylase Gene Expression in *Chlamydomonas reinhardtii*'. *Plant Physiol*, 11, 669–675. www.plantphysiol.org
- Youssefian, S., Nakamura, M., Orudjev, E., & Kondo, N. (2001). Increased Cysteine Biosynthesis Capacity of Transgenic Tobacco Overexpressing an O-Acetylserine(thiol) Lyase Modifies Plant Responses to Oxidative Stress. *Physiology*, 126(3), 1001–1011. <https://about.jstor.org/terms>
- Yu, X. Z., Gu, J. D., & Huang, S. Z. (2007). Hexavalent chromium induced stress and metabolic responses in hybrid willows. *Ecotoxicology*, 16(3), 299–309. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0129-6>
- Zayed, A. M., & Terry, N. (2003). Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant and Soil*, 249, 139–156. <http://www.jstor.org>
- Zhang, Q., Cai, W., Ji, T. T., Ye, L., Lu, Y. T., & Yuan, T. T. (2020). WRKY13 enhances cadmium tolerance by promoting D-cysteine desulfhydrase and hydrogen sulfide production1. *Plant Physiology*, 183(5), 345–357. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01504>

- Zhang, X. H., Liu, J., Huang, H. T., Chen, J., Zhu, Y. N., & Wang, D. Q. (2007). Chromium accumulation by the hyperaccumulator plant *Leersia hexandra* Swartz. *Chemosphere*, 67(6), 1138–1143. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.11.014>
- Zhang, Z., Shrager, J., Jain, M., Chang, C. W., Vallon, O., & Grossman, A. R. (2004). Insights into the survival of *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur starvation based on microarray analysis of gene expression. *Eukaryotic Cell*, 3(5), 1331–1348. <https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1331-1348.2004>
- Zhao, Y. Q., Hu, K. Di, Yao, G. F., Wang, S. Y., Peng, X. J., & Zhang, H. (2023). A D-cysteine desulfhydrase, SIDCD2, participates in tomato fruit ripening by modulating ROS homeostasis and ethylene biosynthesis. *Horticulture Research*, 10(3). <https://doi.org/10.1093/hr/uhad014>