



UNIVERSITÀ DI PISA

Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Tesi di Laurea Specialistica in Biologia Marina

Anno Accademico 2007-2008

**Meccanismi di detossificazione
messi in atto dalla diatomea
marina**

**Thalassiosira weissflogii
in risposta all'esposizione di
mercurio**

Biosintesi di fitochelatine e
volatilizzazione del mercurio

Relatore: D.ssa Elisabetta Morelli

Candidata: Barbara Bellini

Indice

Riassunto	4
Abstract	6
Capitolo primo: introduzione	8
1 Caratteristiche chimico-fisiche del mercurio	9
2 Il mercurio nell'ambiente	10
3 Il mercurio nel Mar Mediterraneo	13
4 Tossicità del mercurio e bioaccumulo	15
5 Ciclo biogeochimico del mercurio	17
6 Produzione di mercurio gassoso disciolto	19
7 Interazione tra metalli in tracce e fitoplancton	23
8 Tioli non proteici intracellulari	25
8.1 Glutazione	25
8.2 Fitochelatine	26
8.2.1 Struttura	26
8.2.2 Biosintesi	27
8.2.3 Funzioni delle fitochelatine	31
9 Induzione di fitochelatine in alghe fitoplanctoniche	32
Scopo della tesi	34
Capito secondo: Materiali e Metodi	35

1	Prelievo e mantenimento dell'acqua di mare	36
2	Colture di <i>Thalassiosira weissflogii</i>	36
3	Conta cellulare	39
4	Calcolo della velocità di crescita	40
5	Esperimenti di esposizione al mercurio	40
5.1	Determinazione dei gruppi tiolici non proteici	42
5.2	Determinazione della produzione di DGM	45
6	Determinazione della concentrazione di mercurio totale disciolto	50
6.1	Determinazione del mercurio cellulare e intracellulare	51
7	Reagenti	52
Capitolo terzo: Risultati e Discussione		54
1	Effetto del mercurio sulla velocità di crescita di <i>T. weissflogii</i>	55
2	Effetto del mercurio sui tioli non proteici	57
3	Cinetica del pool dei tioli non proteici	61
4	Esperimenti di produzione di mercurio gassoso	65
Conclusioni		73
Bibliografia		74

Riassunto

Il mercurio esiste a livello di tracce in tutti gli ambienti acquatici, ma qualche volta è rilasciato nell'ambiente dall'attività umana. Secondo alcune stime, circa l'80% del mercurio immesso nell'ambiente deriva da fonti naturali e il rimanente 20% è di origine antropica. Il mercurio è un metallo pesante altamente tossico per tutti gli organismi viventi, in quanto non ha nessuna riconosciuta attività biologica e tende ad accumularsi lungo la catena alimentare. I microrganismi acquatici, che costituiscono il primo anello della catena alimentare, hanno sviluppato molteplici strategie di adattamento per neutralizzare gli effetti tossici dovuti ad una presenza eccessiva di questo elemento nelle acque. In particolare sono stati riportati: a) meccanismi chimici di membrana che permettono una riduzione dell'assimilazione del metallo, b) processi di volatilizzazione o eliminazione tramite conversione in specie chimiche volatili, c) rilascio di sostanze organiche con capacità complessante, d) chelazione intracellulare in complessi innocui per l'organismo.

E' nota dalla letteratura la presenza di specie volatili del mercurio disciolte nell'acqua di mare (DGM- Dissolved Gaseous Mercury), costituite per il 90% da Hg^0 , che passano dall'acqua all'atmosfera a causa della loro alta volatilità. L'origine di queste specie di mercurio nei sistemi acquatici non è stata ancora completamente chiarita. Numerosi studi hanno dimostrato l'esistenza di un processo enzimatico di riduzione del $Hg(II)$ a Hg^0 in alcune specie di batteri, altri riportano l'esistenza di processi abiotici di riduzione del mercurio di natura fotochimica, infine, alcuni lavori ipotizzano l'esistenza di un processo di produzione di mercurio gassoso ad opera di alghe fitoplanctoniche, ma il meccanismo di riduzione è ancora sconosciuto.

L'accumulo di metalli pesanti, incluso il mercurio, induce nelle microalghe la sintesi di peptidi intracellulari detossificanti, chiamati fitochelatine (PC). Le PC sono peptidi polimeri

del glutatione, hanno la struttura primaria $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, con n che varia da 2 a 11, e hanno la funzione di sequestrare in complessi stabili gli ioni metallici.

Lo scopo della mia tesi è quello di studiare i principali meccanismi di difesa messi in atto da un'alga marina fitoplanctonica in risposta all'esposizione al mercurio, focalizzando lo studio sia sulla produzione di mercurio gassoso, sia sulla sintesi di glutatione e fitochelatine. A questo scopo sono state utilizzate colture di laboratorio della diatomea marina *Thalassiosira weissflogii* esposte, sotto condizioni controllate, a concentrazioni crescenti di mercurio. Il glutatione e le PC sono state quantificate attraverso una tecnica cromatografica basata sulla derivatizzazione pre-colonna con una sonda fluorescente, il monobromobimano (mBrB) e sulla separazione dei peptidi tramite HPLC con colonna a fase inversa. La produzione di DGM da parte di *T. weissflogii* è stata determinata tramite uno spettrofotometro a fluorescenza atomica dei vapori freddi del Hg, opportunamente modificato in modo da misurare quantità nell'ordine di picogrammi.

I risultati ottenuti hanno mostrato che l'esposizione al mercurio induce la sintesi di PC nella diatomea *T. weissflogii*, in quantità crescente all'aumentare della concentrazione del mercurio in soluzione. Inoltre, risultati preliminari indicano una produzione di mercurio gassoso in colture della stessa alga, sia in condizione di esposizione alla luce che al buio. Gli stessi esperimenti hanno anche evidenziato il contributo del mezzo di coltura, arricchito di essudati cellulari, alla formazione di mercurio gassoso.

Abstract

Mercury is naturally occurring in all aquatic environments, but it can be released into the environment due to anthropogenic activity. It has been estimated that 80% of mercury in the environment derives from natural sources and 20% from anthropogenic sources. Mercury is a toxic heavy metal because it has not a recognized biological activity and it can be accumulated through the food chain. Aquatic microorganisms, which are the first level of the food chain, have developed many adaptation strategies to neutralize toxic effects at high mercury concentration in seawater. In particular, these mechanisms regard a) membrane chemical mechanisms that allow a reduction of metal uptake, b) metal volatilization or elimination processes through its conversion to volatile chemical forms, c) release of organic substances capable to complex mercury, d) intracellular chelation into innocuous compounds for the organisms.

It is well known in literature the presence of volatile dissolved forms of mercury in seawater, named DGM (Dissolved Gaseous Mercury)(90% of Hg^0), which are transferred from the water to the atmosphere because of their high volatility. The sources of these forms of mercury in aquatic systems is not well established. Many studies have demonstrated the existence of enzymatic reduction processes of mercury in some microorganisms, others observed the existence of a photochemical abiotic production of DGM and finally, a few studies assumed the existence of DGM production by microalgae, although this mechanism is poorly known.

The accumulation of heavy metals, including mercury, in microalgae induces the synthesis of intracellular peptides for metal detoxification, named phytochelatins (PC). PC are cysteine-rich peptides with general structure $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, with $n = 2$ to 11, synthesized

by the constitutive enzyme phytochelatin synthase, which is activated by the presence of metals ions.

The aim of this thesis is the study of the main mechanisms of defense acting in a phytoplanktonic alga exposed to mercury. The present study was focalized both on the production of dissolved gaseous mercury (DGM) and on the effect of the metal exposure on the intracellular pool of non protein thiols (phytochelatins and glutathione). The unicellular marine diatom *Thalassiosira weissflogii* was grown in controlled conditions and exposed to increasing mercury concentration. GSH and PC have been estimated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with a reverse-phase column, after derivatization with the fluorescent tag monobromobimane (mBrB). DGM production by *T. weissflogii* has been determined by using the Cold Vapour Atomic Fluorescence Spectrometer Mercury Detector (Tekran 2500).

The results show that in *T. weissflogii* the synthesis of PC increased with the mercury concentration in solution. Our results also demonstrate that mercury- exposed cultures of the same alga are able to produce a measurable fraction of dissolved gaseous mercury, both in light and dark conditions. Finally, the contribution of the culture medium to the formation of gaseous mercury has been evaluated.

Capitolo primo

Introduzione

1. Caratteristiche chimico fisiche del mercurio

Il mercurio è un elemento chimico con numero atomico 80 e peso atomico 200,59; è un metallo avente colore argenteo che occupa il gruppo IIB dei metalli di transizione nella Tavola Periodica degli Elementi.

Esso è anche l'unico metallo che temperatura ambiente si trova allo stato liquido.

Si può trovare in tre stati di ossidazione diversi: come mercurio elementare con stato di ossidazione 0, +2 (caratteristica che condivide con gli altri elementi del gruppo IIB, zinco e cadmio), e nello stato +1 che si trova solamente nella forma chimica Hg_2^{2+} .

A temperatura ambiente (25°), si trova nell'aria con un tasso di volatilizzazione pari a $0.007 \text{ mg cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ (Grier, 1968).

Il mercurio è caratterizzato da un'alta tensione superficiale, da un'alta conduttività termica e da una bassa resistività elettrica. Difficilmente si trova in ambiente allo stato liquido puro; al contrario è molto presente sottoforma di composti inorganici che risultano dall'unione del mercurio con elementi non metallici come il cloro, lo zolfo o l'ossigeno, o con composti organici, particolarmente importanti a causa della loro presenza nell'ambiente e della loro alta tossicità. Il mercurio, inoltre, è altamente reattivo con l'ozono, alogeni, perossidi e idrogeni, acido nitrico e acido solforico concentrato (Andren and Nriagu, 1979). La tendenza del mercurio è quella di formare legami covalenti piuttosto che legami ionici. Andren and Nriagu (1979) affermano che il mercurio e alcuni suoi composti mostrano capacità catalitiche tra cui la proprietà di ridurre il perossido di idrogeno e convertire l'acetilene ad acetaldeide attraverso la catalisi del solfato di mercurio.

La chimica biologica del mercurio è caratterizzata dall'elevata affinità dei composti mercuriali per i gruppi tiolici, dall'alta stabilità del suo legame con il carbonio e dall'elevata solubilità dei composti organici, nell'acqua e nei solventi organici rispetto ad altri metalli; inoltre il mercurio elementare e il metilmercurio possono facilmente attraversare le membrane biologiche e provocare grosse conseguenze da un punto di vista tossicologico.

Punto di ebollizione:	357°C
Punto di fusione:	-38.9°C
Densità relativa (acqua=1):	13.5
Solubilità in acqua:	insolubile
Tensione di vapore, Pa a 20°C:	0.26
Densità di vapore relativa (aria=1):	6.93
Lunghezza di legame Hg-Hg	3,005 Å

Tab 1.1: caratteristiche del mercurio elementare

2. Il mercurio nell'ambiente

La tossicità del mercurio è nota sin dall'antichità anche se studi rigorosi sulla sua tossicità presero il via solo pochi anni dopo il Novecento.

Il mercurio oggi rappresenta uno dei metalli più tossici (sia nelle forme organiche che inorganiche) e viene riconosciuto come un pericolo ambientale di grande entità (Wilkinson et al., 1989 ; Schoeder et al., 1994).

Il mercurio è presente nell'ambiente attraverso due tipi di fonti: sorgenti naturali e antropiche. Le prime sono costituite da quelle già presenti nell'era pre-industriale e si riferiscono ai processi naturali come erosione delle rocce, emissioni prodotte da eruzioni vulcaniche ed emissioni di mercurio elementare dalle superfici acquatiche, dai suoli e dalla vegetazione (Lindqvist et al., 1994; 1984).

Secondo le ipotesi di Mason et al., (1994), le emissioni naturali totali di mercurio ammontano all'incirca a 1600 tonnellate all'anno.

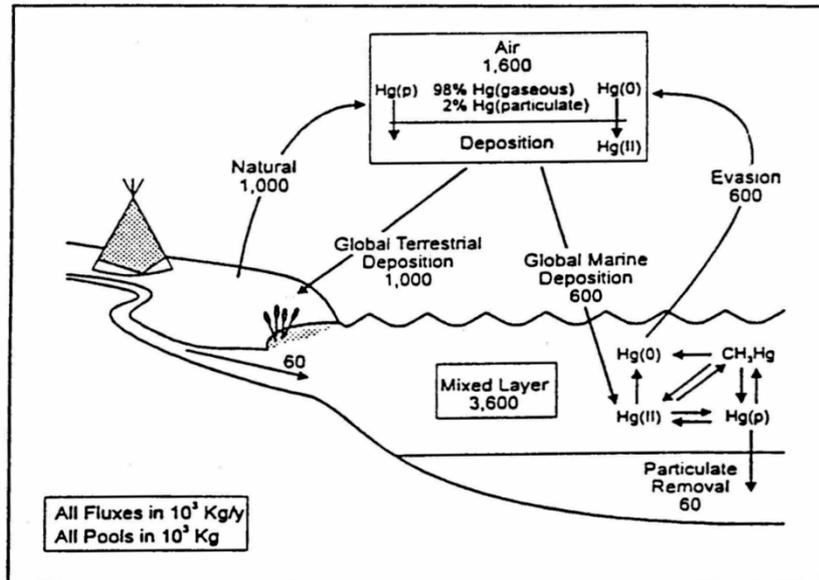


Fig 1.1: Stima delle emissioni di mercurio atmosferico nel periodo pre-industriale (Mason et al., 1994).

Per quanto riguarda le sorgenti antropiche, il mercurio ha largo impiego nella preparazione di prodotti chimici industriali e in campo elettrico ed elettronico. Il mercurio infatti viene usato nelle apparecchiature elettriche ed elettroniche, per la realizzazione di interruttori, elettrodi, pile, pompe di diffusione, termometri, barometri, sfigmomanometri e strumenti da laboratorio in genere. Viene scelto perché liquido, opaco e di elevata densità. Il suo impiego nelle industrie è anche associato alla produzione diffusa di soda caustica e cloro.

In campo medico, l'amalgama di mercurio con altri metalli è usato per realizzare le otturazioni dentali.

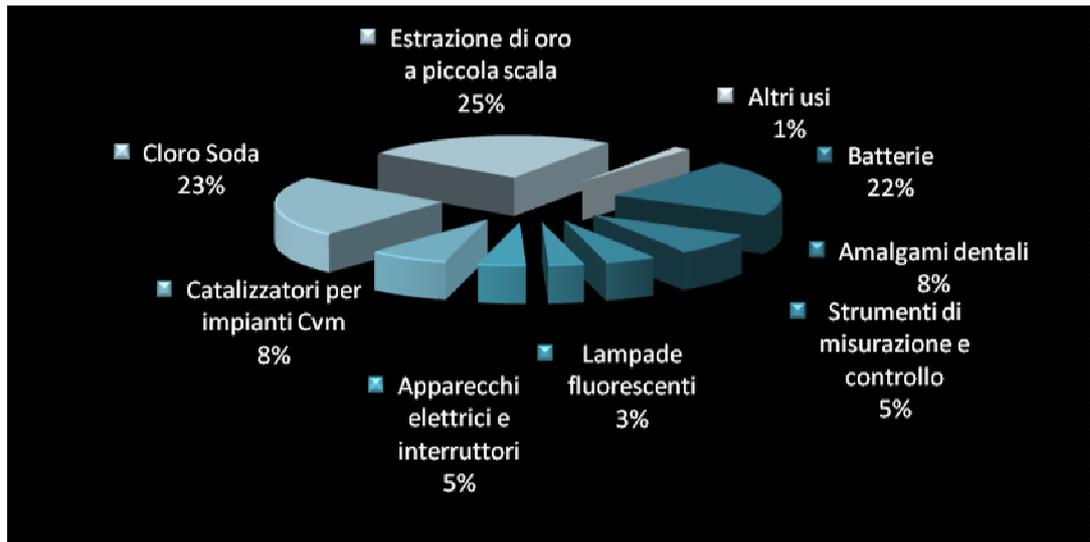


Fig 1.2: Principali impieghi del mercurio e dei suoi composti

La maggiore fonte antropica di mercurio nelle acque sembra essere costituita dalle emissioni di centrali elettriche alimentati a carbone e da celle elettrolitiche a catodo di mercurio negli impianti cloro-soda. Tuttavia la liberazione di significative quantità di mercurio si verifica anche in processi che riguardano l'estrazione di metalli preziosi come oro e argento, l'uso di pesticidi in agricoltura e l'incenerimento di rifiuti nelle discariche (Linqvist et al., 1984). Mason et al. (1994) affermano che le emissioni totali di mercurio di origine antropica ammontano a circa 5000 tonnellate all'anno.

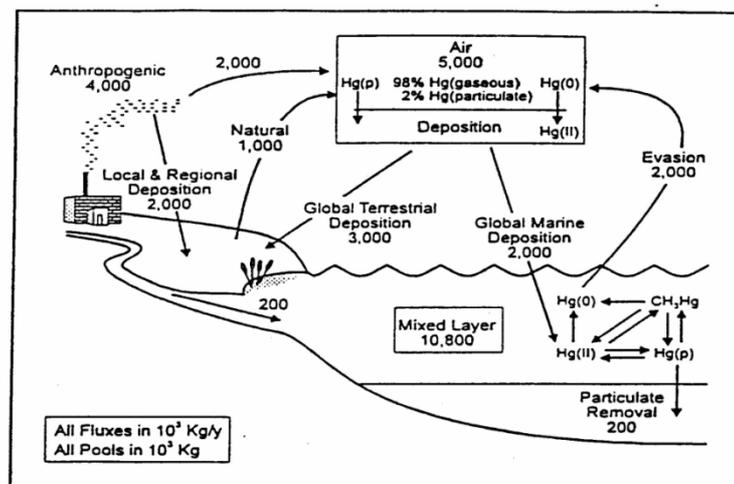


Fig 1.3: Stima delle attuali sorgenti antropiche di mercurio atmosferico (Mason et al., 1994).

3. Il mercurio nel Mar Mediterraneo

Nel bacino del Mediterraneo sono presenti sorgenti antropiche e sorgenti naturali di mercurio di notevole entità. Esso è infatti caratterizzato da un'anomalia geologica legata alla presenza di estesi depositi di cinabro (HgS) e da un'intensa attività geotermica. Circa il 60% dei depositi di mercurio di tutto il mondo è localizzato proprio nel bacino del Mediterraneo (Ferrara et al., 1997). Per quanto riguarda le concentrazioni di mercurio nel Mediterraneo, Seritti et al., nel 1986 hanno trovato valori compresi tra 0,3-8,0 ng l⁻¹ di mercurio legato al particolato e 1,7-12,2 ng l⁻¹ di mercurio nella fase disciolta.

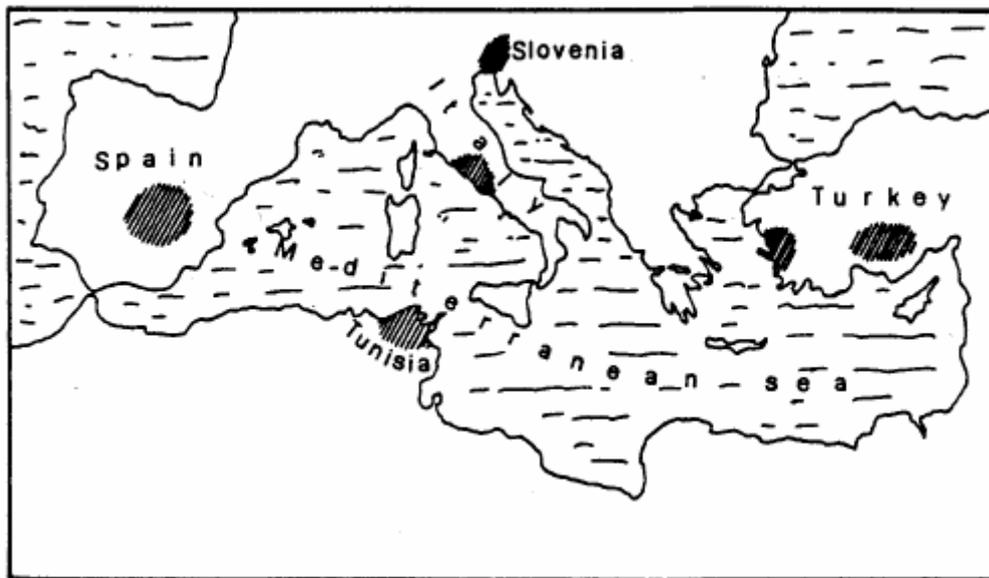


Fig 1.4: Mappa dei principali depositi di cinabro nel bacino del Mediterraneo

Nel bacino del Mediterraneo il mercurio proviene, come detto poco sopra, sia da fonti antropiche che naturali. Le caratteristiche geologiche e idrogeologiche, come lo scarso ricambio idrico verso gli altri mari e l'alta temperatura ambientale che caratterizza il Mar Mediterraneo per gran parte dell'anno, favoriscono i meccanismi biologici, fisici e fotochimici responsabili della formazione e dell'emissione dai suoli e dalle acque del mercurio

elementare (Ferrara et al., 1997). I vulcani attivi che incidono maggiormente sulla quantità di mercurio emesso nell'atmosfera, e di conseguenza nel Mediterraneo, sono Stromboli, Vulcano ed Etna.

Dal 1905 al 1974 anche la miniera toscana di Abbadia presso il Monte Amiata ha contribuito all'incremento di mercurio nell'atmosfera (circa 1 ton a⁻¹, Edner et al., 1992). Infine, Ferrara et al., (2000), sottolineano la significatività dell'emissione di mercurio dalla superficie acquatica, in quanto rappresenta circa 60 tonnellate all'anno e costituisce quindi la maggiore fonte naturale per l'atmosfera superando la quantità prodotta dai vulcani (0.6-1.3 t annue).

4. Tossicità del mercurio e bioaccumulo

La tossicità e la tossicocinetica del mercurio negli animali e nell'uomo dipendono dalla sua forma chimica.

Le specie chimiche più tossiche del mercurio per le forme viventi sono costituite da mercurio elementare e dal metilmercurio, che viene assimilato con la dieta (Schweinsberg, 1994).

Il mercurio elementare e inorganico rilasciati nell'aria dalle attività minerarie, di fusione, industriali e dalla combustione dei combustibili fossili, si depositano nel suolo, nelle acque e da qui nei sedimenti dove si trasformano in metil-mercurio. Lungo la catena alimentare il metil-mercurio è soggetto al bio-accumulo e alla bio-magnificazione, in particolare nella rete trofica acquatica. In ambiente marino, infatti, alcuni microrganismi sono in grado di operare la trasformazione del mercurio in composti organici, come mono e dimetilmercurio. Per la metilazione di cationi di metalli pesanti sono indispensabili donatori di gruppi metile che abbiano la funzione di coenzimi. I composti organo-mercuriali sono in grado di attraversare le membrane cellulari determinando un accumulo all'interno degli organismi, in concentrazioni crescenti man mano che si sale di livello trofico nella catena alimentare.

Il metilmercurio passa da un livello al successivo della catena alimentare marina: dal plancton agli invertebrati, ai pesci e poi ai grandi predatori, nei quali tale accumulo raggiunge concentrazioni molto elevate che ne rendono difficile l'eliminazione. Ciò è dovuto al fatto che le molecole di mercurio metilato, per le loro piccole dimensioni, riescono a superare senza difficoltà le membrane biologiche e penetrare all'interno delle cellule, dove possono legarsi ai gruppi sulfidrilici delle proteine, per i quali hanno un'alta affinità. Se questo avviene, si può avere denaturazione della proteina, con perdita della funzionalità. Per la sua lipofilità attraversa facilmente anche la placenta con conseguenze tossiche che possono portare ad alterazioni dello sviluppo del cervelletto nel feto. Il metilmercurio può anche inattivare le basi uracile e timina degli acidi nucleici con conseguenze negative per l'organismo (Khera, 1979). Il mercurio elementare è volatile e viene assorbito nel tratto respiratorio per inalazione tramite le vie aeree, mentre è trascurabile l'assorbimento nel tratto gastro-intestinale. L'assorbimento gastro-intestinale del mercurio inorganico è compreso nell'intervallo del 10-30%. Una volta assorbito, il mercurio inorganico si distribuisce principalmente nei reni e, in minor misura, nel fegato. La principale conseguenza tossicologica del mercurio inorganico è costituita da un danno a carico dei reni.

Il problema dell'intossicazione da Hg ha interessato l'igiene alimentare in seguito a ripetuti episodi epidemici verificatisi negli ultimi 40 anni e le autorità sanitarie hanno promosso una serie di misure precauzionali (Harada, 1995).

Il principale apporto di Hg è fornito dagli alimenti, in particolare quelli ittici (Baldini et al., 1994); questo perché le specie ittiche eliminano molto lentamente il mercurio assorbito. L'accumulo nei pesci è maggiore nel tessuto muscolare rispetto a quello adiposo e circa il 90% del mercurio presente nei pesci si trova sotto forma di metilmercurio (Guandalini and Mantovani, 1988). I pesci del Mediterraneo manifestano livelli più alti di concentrazione di mercurio rispetto a quelli dell'Atlantico; questo è legato alla presenza di formazioni

geologiche ricche di mercurio e alle caratteristiche di temperature elevate e di elevata insolazione che potrebbero favorire l'attività batterica di metilazione delle forme inorganiche del mercurio.

La legislazione italiana, in attuazione di una direttiva comunitaria (Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea, 1991), fissa un livello massimo di $0,5 \text{ mg Kg}^{-1}$ nelle parti commestibili dei prodotti della pesca. Il Comitato congiunto FAO-WHO ha stabilito un limite provvisorio tollerabile di assunzione settimanale per il mercurio totale (0,3 mg per un adulto di 60 Kg) e per il metilmercurio (0,2 mg per un adulto di 60 Kg).

5. Ciclo biogeochimico del mercurio

Lo studio biogeochimico del mercurio è di fondamentale importanza, in quanto legato strettamente all'analisi della tossicità e della bioaccumulabilità dei suoi composti.

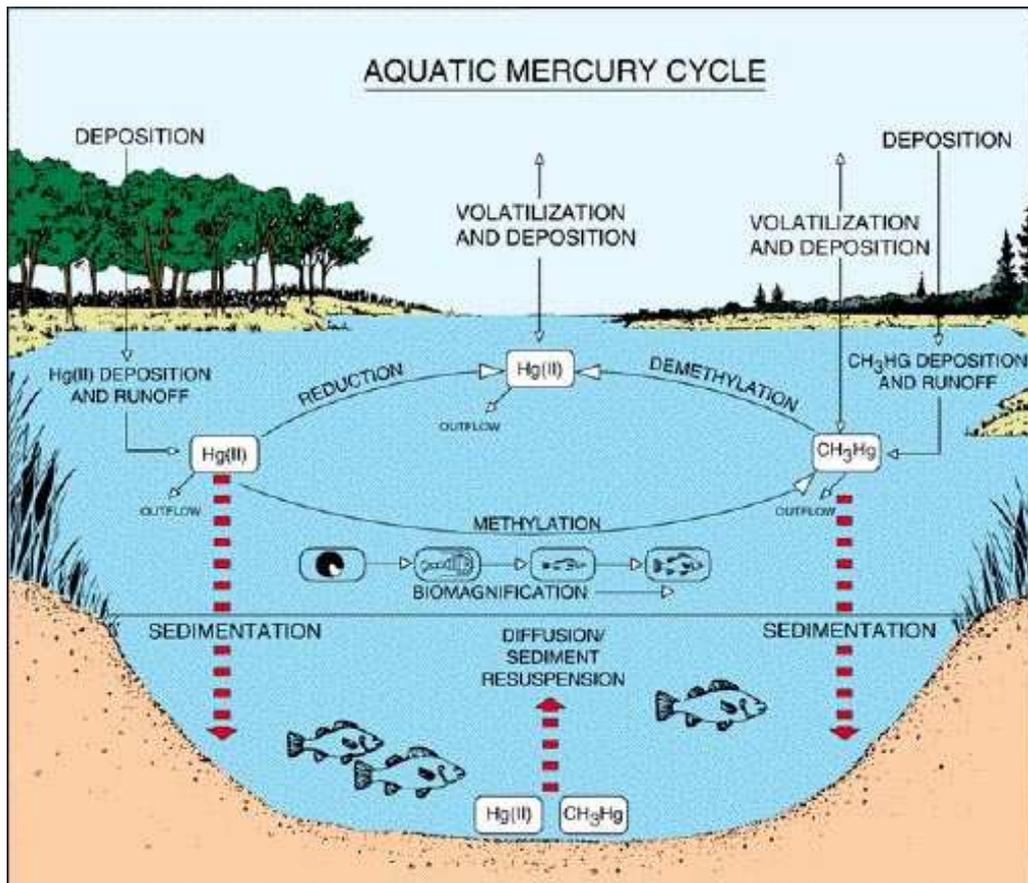


Fig 1.5: Schema del ciclo biogeochimico del mercurio

Il passaggio del mercurio all'atmosfera, è dovuto alla conversione nel suolo e nell'acqua del mercurio inorganico divalente a mercurio elementare e/o dimetilmercurio che non persistono a lungo negli ambienti acquatici, poiché sono specie molto volatili. Sono responsabili della metilazione, sia processi biotici dovuti a trasformazioni biochimiche operate da microrganismi, che processi abiotici, come reazioni con acidi umici e fulvici. Dopo il

passaggio nell'atmosfera, segue la riossidazione del mercurio elementare in forme solubili in acqua che poi ricadono sottoforma di deposizioni secche e umide (Linqvist et al., 1984).

Il ciclo atmosferico determina, quindi, un lungo periodo in cui il mercurio elementare può risiedere negli strati atmosferici per periodi variabili che vanno da qualche mese a uno o due anni, con una conseguente possibilità di trasporto anche a grandi distanze dalla fonte di emissione (Schroeder, 1989).

Il mercurio depositato o trasportato sulle superfici acquatiche può subire diverse trasformazioni tra cui la formazione di metilmercurio a partire da mercurio inorganico divalente (Hg^{2+}). Questo ne determina il progressivo aumento e accumulo negli organismi fino ai vertici della catena trofica marina (fenomeno noto come bioaccumulazione) anche se il metilmercurio costituisce solo una piccola parte del mercurio totale dell'ecosistema acquatico (Linqvist et al., 1984).

Oltre al processo di metilazione, possono verificarsi processi di riduzione nella colonna d'acqua che formano specie chimiche volatili le quali possono ritornare in superficie (Fitzgerald et al., 1991); queste specie chimiche sono denominate con l'acronimo DGM (Dissolved Gaseous Mercury) e il mercurio elementare ne costituisce circa il 90% (Hudson et al., 1994).

In ambiente marino, il passaggio delle forme volatili di mercurio dalla superficie acquatica all'atmosfera rimuove dalla colonna d'acqua una parte di Hg^0 che non è disponibile per i processi ossidativi e il successivo fenomeno di bioaccumulazione (Clarkson et al., 1994)

6. Produzione di mercurio gassoso disciolto

Le emissioni oceaniche di DGM verso l'atmosfera rappresentano un importante fenomeno che può essere paragonato alle emissioni terrestri (Lindberg et al., 2000). Il flusso di mercurio all'interfaccia acqua/aria dipende dalla differenza di concentrazione di mercurio gassoso nell'acqua (DGM) e nell'aria (TGM, Total Gaseous Mercury), e dal suo coefficiente di diffusività. Perché abbia luogo l'emissione di mercurio dalla superficie acquatica all'atmosfera è necessario quindi, che si formino nella colonna d'acqua il mercurio elementare e le altre specie chimiche volatili.

E' nota in letteratura l'importanza della produzione abiotica di DGM indotta dalla radiazione solare (Alberts et al., 1974; Nriagu, 1994; Xiao et al., 1994). Le prime testimonianze si sono avute, infatti, già nel 1974, quando Alberts et al. dimostrarono che gli acidi umici purificati provenienti dai sedimenti di uno stagno, in soluzione acquosa, erano in grado di ridurre l' Hg^{2+} (substrato della reazione di riduzione) ad Hg° , e che la riduzione avveniva in misura maggiore a pH leggermente acido (10% Hg° prodotto in più a pH 6,5 che a pH 8,2).

In particolar modo, il ruolo fondamentale della luce del sole nel processo di formazione di DGM è stato studiato e testimoniato in alcuni laghi canadesi ed artici da Amyot et al. (1994, 1997a, 1997c, 2000), che hanno osservato valori maggiori della concentrazione di DGM durante le ore di massima insolazione, provando per la prima volta l'esistenza di un andamento giornaliero della concentrazione di DGM (nel lago Ranger la concentrazione di DGM raggiunge valori notturni di 12 pg l^{-1} e diurni di 18 pg l^{-1} ; nel Lago Ontario essa varia tra 30 e 50 pg l^{-1} ; in Artico essa varia tra 32 e 61 pg l^{-1}).

La fotoriduzione potrebbe coinvolgere due diverse reazioni: reazioni fotochimiche che riguardano le sostanze umiche (Albert et al., 1974; Matthiessen et al., 1998), oppure reazioni di fotolisi dei complessi di Hg^{2+} a formare Hg° (Sanemasa et al., 1983).

Anche l'ossidazione di DGM può avvenire nella superficie acquatica e questo è dovuto alla forte irradiazione degli UV (Lalonde et al., 2001), alla presenza di cloro e bromo (Horvat et al., 2001), o alla produzione di radicali idrossilici, come è stato dimostrato in esperimenti di laboratorio condotti da Lin e Pehkonen (1999), da Gardfeldt et al. (2001) e da Mason et al. (2001).

La presenza di materia organica disciolta, indicata con l'acronimo DOM, potrebbe giocare un ruolo molto consistente nelle reazioni di formazione di DGM (Costa and Liss, 1999, 2000): essa rappresenta un importante agente complessante del mercurio nel sistema acquatico, e influenza le caratteristiche chimico-fisiche di questo metallo aumentando la mobilità e diminuendo la sua biodisponibilità e il suo bioaccumulo lungo la catena trofica (Benoit et al., 2001).

E' probabile che siano specifiche frazioni di DOM, come la materia organica contenente gruppi chelanti o solfurei, responsabili della riduzione del mercurio. In particolare le sostanze umiche sono state identificate come sorgente di materia organica in grado di agire in modo fotosensibilizzante nelle reazioni fotochimiche marine (Spokes and Liss, 1995). Si ritiene, quindi, che la materia organica potrebbe costituire una intermediaria per la riduzione dell' Hg^{2+} . In contrasto, un aumento nella concentrazione di DOC (Dissolved Organic Carbon) tenderebbe a diminuire la sua capacità di riduzione (Mason et al., 1999), suggerendo che la complessazione del mercurio da parte dei ligandi organici possa diminuire la concentrazione di Hg^{2+} che non sarebbe più disponibile per la riduzione ad Hg^0 .

I dati presenti in letteratura sulla formazione di mercurio elementare disciolto, suggeriscono oltre alla formazione abiotica di DGM, è stata suggerita anche una riduzione biotica di Hg^{2+} , grazie ad alcuni studi condotti nell'Oceano Pacifico che hanno dimostrato l'importanza che possono rivestire gli organismi viventi nella formazione diretta di DGM (Kim e Fitzgerald, 1986; 1988). E' stato osservato che la concentrazione di DGM nell'acqua di mare superficiale

dell'Oceano Pacifico generalmente varia spostandosi lungo l'Equatore; essa cresce parallelamente alla diminuzione della temperature superficiali e all'aumento della concentrazione di nitriti e nitrati lungo la linea Equatoriale. Basse temperature e ricchezza in nutrienti delle acque sono indicatori di zone di risalita di acque profonde in superficie (zone di upwelling). L'Hg⁰ può essere prodotto in profondità dalla flora batterica associata al sedimento marino e successivamente trasportato in superficie nelle zone di "upwelling".

Studi riguardanti la formazione di mercurio elementare da parte di microrganismi sono stati condotti per la prima volta da Moore (1960) che, in uno studio su isolati di *Staphylococcus aureus*, osservò la resistenza dei batteri ai composti inorganici e organici del mercurio (HgR). Più recentemente sono stati effettuati studi condotti in laboratorio, che hanno mostrato un possibile intervento da parte dei batteri nella formazione di Hg⁰ in campioni di acqua provenienti da diverse aree contaminate da attività industriali del Tennessee ed dal fiume Isonzo (Barkay et al., 1991; Barkay, 2003). In questo studio è stato osservato che le comunità microbiche risultavano resistenti ad elevate concentrazioni di mercurio, e che la maggiore attività di riduzione dell'Hg²⁺ aggiunto ai campioni proveniva da quelli non inattivati al calore, evidenziando l'importanza dell'attività batterica nella formazione di DGM.

Amyot et al. (1994, 1997a) hanno condotto studi sull'andamento giornaliero di DGM in funzione della profondità, in campioni prelevati da acque lacustri; negli strati più profondi sono state osservate concentrazioni maggiori di DGM, rispetto agli strati superficiali, a causa di perdite di DGM per volatilizzazione. Più tardi, Ferrara et al. (2003) hanno determinato i profili di profondità della concentrazione di DGM in campioni di acqua di mare nel Mediterraneo orientale ed occidentale, ed è risultato che i valori della concentrazione di DGM aumentano in relazione all'aumento della profondità, dimostrando che anche in

profondità avviene una produzione di mercurio elementare dovuto all'attività batterica e/o geotettonica.

E' stato studiato anche il processo di riduzione del mercurio ad opera di microrganismi eucariotici. Nello studio condotto da Bentz (1977), e Ben-Bassat e Mayer (1987, 1988) su colture di alghe verdi del genere *Chlorella*, è stato osservato che la formazione di Hg^0 diminuisce in funzione dell'inibizione della fotosintesi.

Studi condotti su organismi eucariotici di acqua dolce (Devars et al., 2000, Kelly et al., 2007) hanno evidenziato la capacità di questi microrganismi di effettuare una significativa volatilizzazione di mercurio come meccanismo di detossificazione. In particolar modo, Devars et al.,(2000) suggeriscono una volatilizzazione biologica di mercurio in *Euglena gracilis*, che varia in funzione della densità cellulare e della concentrazione di mercurio in soluzione. Gli stessi autori trovano che la produzione di Hg^0 è un meccanismo indipendente dalla luce.

Si pensa che le alghe verdi e le diatomee siano capaci di effettuare una riduzione di Hg^{2+} con modalità simili a quelle note per la riduzione di altri metalli come Cu^{2+} e Fe^{3+} (Jones et al., 1985; 1986). In particolar modo, in uno studio condotto da Mason et al., (1995) sulla diatomea *Thalassiosira weissflogii*, sono state avanzate tre diverse possibilità di riduzione:

- operata dai composti organici dell'alga rilasciati nel mezzo,
- operata dai composti della parete cellulare,
- operata dal un complesso enzimatico del plasmalemma della cellula.

Sembra inoltre evidente da studi in laboratorio che il tasso di produzione di mercurio elementare in colture marine di organismi fitoplanctonici sia funzione della dimensione e della densità delle cellule (Mason et al., 1995); in particolar modo, organismi di dimensioni minori come i cianobatteri, che hanno un diametro inferiore a 3 μm , sembrano essere i

principali riduttori di mercurio a parità di clorofilla a (6,6 pmol di Hg⁰ prodotto per µg di clorofilla a al giorno).

Infine, recenti studi condotti da Lanzilotta et al., (2004) su colture di fitoplancton marino (*Chaetoceros* sp.) dimostrano che la luce del sole è responsabile della foto-attivazione di una particolare frazione della materia organica disciolta contenente gruppi cromoforici (CDOM, Chromophoric Organic Matter). Gli autori ipotizzano che l'assorbimento della radiazione luminosa intervenga nei meccanismi di riduzione del mercurio, così dimostrando un ruolo fondamentale degli essudati rilasciati da questi organismi nei processi di riduzione biologica del mercurio.

7. Interazione tra metalli in tracce e fitoplancton

Nell'ambiente acquatico, gli elementi metallici si trovano sotto forma di ioni metallici e/o legati a composti organici ed inorganici e la loro tossicità è dovuta al fatto che essi possono formare complessi non specifici con siti funzionali di biomolecole come enzimi, alterando la loro normale funzione metabolica.

Alcuni metalli, quali rame, zinco, ferro e nichel, detti essenziali, sono importanti micronutrienti coinvolti in varie funzioni nei sistemi viventi. Altri metalli come piombo, cadmio, mercurio e argento sono detti non essenziali, e possono inibire la crescita cellulare degli organismi viventi risultando tossici e talvolta letali.

Tuttavia anche importanti micronutrienti, come rame e zinco, possono inibire il metabolismo cellulare a concentrazioni intracellulari troppo elevate.

Alcuni metalli come Cd, Hg, Pb sono capaci di entrare all'interno delle cellule e creare gravi effetti negli organismi, come inibizione della crescita, denaturazione delle proteine,

mutazioni a livello del DNA, problemi legati alla riproduzione, fino ad arrivare alla morte dell'organismo (Bryan and Langston, 1992).

Il fitoplancton marino riveste un'importanza cruciale nella catena alimentare acquatica, poiché rappresenta il punto di entrata dei metalli, sia essenziali che non essenziali, che si accumulano fino a livelli trofici più alti. La presenza di alte concentrazioni di metallo può inibire la crescita delle alghe unicellulari e può portare fino alla morte dell'organismo.

Alcuni studi hanno dimostrato che alcune specie fitoplanctoniche possono rispondere alla tossicità dei metalli attraverso la produzione di composti antiossidanti (Sunda et al., 2002), o attraverso un meccanismo di chelazione e sequestro intracellulare dei metalli in eccesso (Gekerel et al., 1988, Kawakami et al., 2006). Un meccanismo ampiamente diffuso, sviluppato in piante, funghi e alghe, utilizza peptidi intracellulari polimeri del glutatione, conosciuti con il nome di fitochlatine. Questi peptidi hanno la capacità di complessare i metalli per mantenere l'omeostasi e per la detossificazione, (Rauser, 1995; Zenk, 1996);

8. Tioli non proteici intracellulari

8.1 Glutathione

Il glutathione (GSH) è un tripeptide composto da acido γ -glutammico (Glu), cisteina (Cys), e glicina (Gly), ed è il tiolo più abbondante prodotto da animali, piante, protisti e batteri (Ahner et al., 2002; Noctor et al., 1998).

Il glutathione ha varie funzioni biochimiche importanti all'interno delle cellule, tra cui il mantenimento di condizioni riducenti per aminoacidi e proteine, una protezione contro danni ossidativi e radiazioni, e contro un aumento di concentrazione di metalli e composti organici xenobiotici (Ahner et al., 2002; Noctor et al., 1998). Il glutathione è anche coinvolto nell'espressione dei geni coinvolti nei meccanismi di difesa (Noctor, 1998), ed è il peptide di base per la sintesi delle fitochelatine (Ahner et al., 1995).

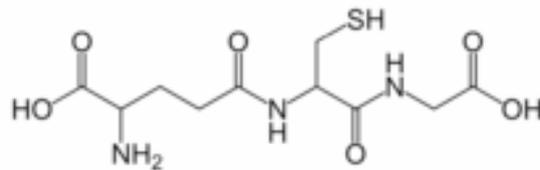


Fig 1.6: Struttura del GSH

8.2 Fitochelatine

Nel 1985, Grill et al., hanno descritto per la prima volta la struttura primaria di questi peptidi a basso peso molecolare, che erano stati trovati in una pianta vascolare, *Rauvolfia serpentina*, legati al cadmio.

Le fitochelatine (PC_n) svolgono un ruolo chiave per la tolleranza dei metalli negli organismi vegetali, in quanto sono capaci di legare gli ioni metallici entrati nella cellula. La presenza di fitochelatine è stata confermata in oltre 200 specie differenti di piante appartenenti ai *taxa* *Phytophyta*, *Briophyta*, *Pteridophyta* e *Spermatophyta* (Gekeler et al., 1988).

Le PC sono una famiglia di peptidi con una struttura generale $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ (con n che va da 2 a 11), sintetizzate dall'enzima costitutivo fitochelatina sintetasi, attivato dalla presenza di ioni metallici (Grill et al., 1985; 1989).

Grazie all'alto contenuto di cisteina le PC legano questi ioni formando complessi metallici intracellulari, riducendone la concentrazione all'interno delle cellule (Scarano & Morelli, 2002). Per alcune piante è stato mostrato che non tutte le specie di ioni metallici, capaci di indurre PC, sono capaci di formare complessi stabili "metalli-PC" (Maitami et al., 1996). La conoscenza di questi meccanismi è un fattore chiave per capire il loro ruolo e la tolleranza degli organismi viventi ai metalli pesanti.

8.2.1 Struttura

In generale le fitochelatine sono costituite da varie ripetizioni del dipeptide γ -glutammil-cisteina, in cui il residuo di acido glutammico è legato al residuo di cisteina mediante un legame isopeptidico, e da un residuo di glicina terminale.

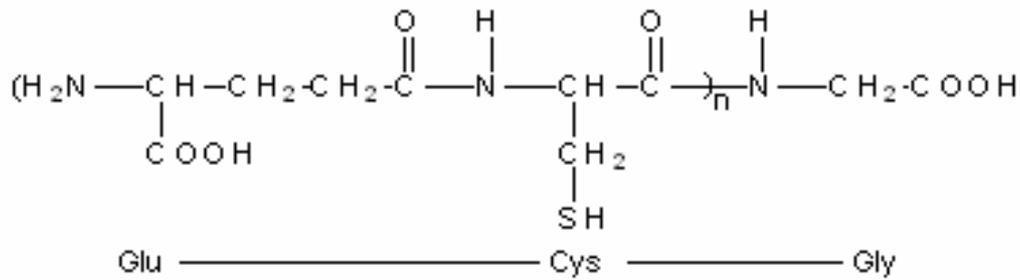


Figura 1.7: Struttura primaria delle fitochelatine.

Questa struttura rispecchia la sequenza amminoacidica del glutatione, suggerendone il coinvolgimento durante la biosintesi delle fitochelatine.

Alcune piante contengono composti simili ma non identici alle PC canoniche. In alcuni studi condotti da Rauser, 1995, è risultato che alcune leguminose producevano un tripeptide omologo al glutatione, l'omoglutatione di formula γ -Glu-Cys- β -Ala; per analogia con l'omoglutatione, il termine coniato per indicare tali composti è omofitochelatine (Grill et al., 1988). Successivamente sono state identificate altre famiglie nelle graminacee costituite da peptidi con struttura primaria $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$ (Klapheck et al., 1994) e nel mais un'altra famiglia con struttura $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Glu}$ (Meuwly et al., 1995). In accordo con la terminologia proposta da Zenk et al., 1996, gli omologhi delle PC con residuo C-terminale diverso dalla glicina, sono indicati in genere con il termine isofitochelatine (iso-PC).

8.2.2 Biosintesi

La struttura delle fitochelatine rispecchia molto la sequenza amminoacidica del glutatione; anch'esse, come il tripeptide, non possono essere prodotti genici primari, poiché il legame γ -carbossil-ammidico non è sintetizzato a livello ribosomiale durante il processo di trasduzione. Ciò suggerisce che abbiano una particolare via biosintetica di tipo enzimatico.

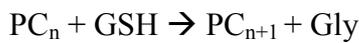
La biosintesi delle PC_n può essere regolata da diversi meccanismi (Christopher S Cobbett, 2000); per esempio, nella pianta erbacea *Brassica juncea*, l'esposizione al Cd induce una maggiore richiesta di cisteina e GSH per la biosintesi delle fitochelatine. Ciò si riscontra in una coordinata regolazione della trascrizione dei geni coinvolti nell'assimilazione e nel trasporto del zolfo e nella biosintesi del glutatione (Christopher S Cobbett, 2000). Studi condotti su piante di *Arabidopsis*, esposte a Cd e Cu, determinano un incremento della trascrizione dei geni che codificano per glutatione riduttasi e gli enzimi coinvolti nella biosintesi del GSH: γ -glutamilmcisteina sintetasi (GCS) e glutatione sintetasi (GS) (Xiang & Oliver, 1998).

Studi cinetici condotti su cellule in sospensione di *R. serpentina*, esposte a Cd, hanno mostrato che, a seguito dell'esposizione a tale metallo, i livelli di glutatione diminuiscono rapidamente e nello stesso tempo inizia ad aumentare la concentrazione di fitochelatine senza una evidente fase di latenza (lag) (Grill et al., 1987). L'assenza di tale fase suggerisce che l'enzima coinvolto nella sintesi di fitochelatine sia costitutivo (Zenk, 1996) in quanto, solitamente, l'induzione di enzimi mediante trascrizione e traduzione richiede un intervallo che va da 1 a 3 ore.

La sintesi immediata di questi peptidi causa un improvviso impoverimento del pool intracellulare di GSH, ma questa perdita viene compensata dall'attivazione degli enzimi che sono coinvolti nella sintesi del GSH (Rüeggsegger et al., 1990; Rüeggsegger & Brunold, 1992).

La sintesi enzimatica del GSH è ben conosciuta e avviene in 2 fasi: la γ -glutamilmcisteina sintetasi, in presenza di ATP, catalizza il legame tra glutammato e cisteina per formare il dipeptide γ -Glu-Cys. E' inoltre necessaria una ulteriore reazione che permetta l'aggiunta di una Gly a tale dimero e questo avviene grazie al glutatione sintetasi, anch'esso ATP dipendente. Il GSH così sintetizzato viene utilizzato successivamente come precursore delle fitochelatine.

E' stato possibile ottenere maggiori informazioni sulla biosintesi delle PC grazie all'isolamento nella pianta perenne *Silene cucubalus*, dell'enzima che catalizza tale processo (Grill et al.,1989). Questo enzima trasferisce unità di γ -glutammilcisteina da una molecola donatrice ad una molecola accettrice. All'inizio la reazione comporta la traspetidazione dell'unità γ -Glu-Cys del glutatione su una seconda molecola di glutatione per formare PC_2 , mentre in stadi successivi di incubazione, su molecole di fitochelatine preformate per produrre oligomeri di una unità superiore:



L'enzima è stato denominato γ -glutammilcisteina dipeptidil traspeptidasi o più comunemente Fitochelatina sintetasi.

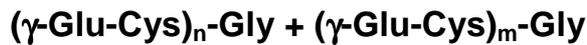


Figura 1.8 (Ragni, 2001). Schema generale della reazione di biosintesi delle fitochelatine catalizzata dall'enzima Fitochelatina sintetasi. Gli indici "n" ed "m" indicano il numero di unità di γ -glutammil-cisteina ripetute e sono compresi fra 1 e 11; quando "n" e "m" sono uguali a 1 il glutatione è utilizzato come accettore e donatore di unità di γ -Glu-Cys.

[Cys = cisteina; Glu = acido glutammico; Gly = glicina]

Studi di laboratorio condotti sull'attività enzimatica hanno mostrato che l'enzima è attivato dai seguenti metalli secondo un ordine decrescente di efficacia: $Cd^{2+} > Ag^+ > Pb^{2+} > Cu^+ > Hg^{2+} > Zn^{2+} > Sn^{2+} > Au^{3+} > As^{5+} > In^{3+} > Tl^{3+} > Ge^{4+} > Bi^{3+} > Ga^{3+}$ (Rausser, 1995). La regolazione della Fitochelatina sintetasi svolge un ruolo chiave nel controllo della biosintesi

delle fitochelatine. Tale processo si verifica entro pochi minuti dall'esposizione al metallo ed è indipendente da sintesi proteica *de novo*: l'enzima è costitutivamente espresso e quindi la sua regolazione avviene a livello post-traduzionale. Studi condotti da Vatamaniuk et al., 2000 su piante di *Arabidopsis thaliana* chiariscono il meccanismo d'azione della Fitochelatina sintetasi. Il modello proposto prevede che una volta entrato all'interno della cellula vegetale, il metallo si complessa con delle molecole di glutatione; tale complesso (Me-GSH) va a legarsi successivamente all'enzima che nella forma inattiva presenta una forma random coil (come un filamento non avvolto); quando il Me del complesso si lega all'enzima, questo subisce un cambiamento di conformazione passando da una forma random coil ad una globulare attiva. L'enzima attivo può, quindi, effettuare la sintesi delle fitochelatine, durante la quale, il substrato dell'enzima è costituito da glutatione o altre fitochelatine, già preesistenti nella cellula, su cui l'enzima aumenta la lunghezza della catena.

Grill et al. (1988) riportano che colture di cellule vegetali inoculate in terreni arricchiti in nutrienti subiscono una rapida induzione ed un accumulo di fitochelatine, che termina solo quando il terreno si impoverisce di ioni liberi. L'interruzione della sintesi di fitochelatine e dell'accumulo di metalli, è seguita da un rapido abbassamento della concentrazione cellulare di fitochelatine durante la fase stazionaria di crescita. Questo fenomeno è stato attribuito dagli autori ad un processo di degradazione delle fitochelatine, che può avvenire in seguito al distacco dei metalli dai rispettivi complessi facilitato dall'ambiente acido presente all'interno del vacuolo. I singoli aminoacidi possono rientrare nel citosol per essere riutilizzati, mentre i metalli possono essere legati agli acidi organici presenti all'interno del vacuolo.

8.2.3 Funzioni delle fitochelatine

I primi studi importanti per conoscere il ruolo delle fitochelatine, sono stati condotti su piante superiori (Steffens et al., 1986); sono state selezionate cellule di pomodoro capaci di crescere in terreni di coltura con concentrazioni di Cd normalmente letali. La produzione di fitochelatine in queste cellule era significativamente maggiore rispetto alle linee cellulari non resistenti e, se trattate con butionina sulfossimina (BSO), perdevano tale capacità.

Altri studi condotti in vitro da Kneer e Zenk, 1992, mostrano che le fitochelatine possono svolgere un ruolo chiave di protezione per l'attività enzimatica di molti enzimi sensibili ai metalli. Sebbene sia dimostrato chiaramente che le PC possono avere un ruolo importante nella detossificazione, resta ancora da chiarire se questa sia la funzione principale o se abbiano un ruolo secondario (Cobbett, 2000). Un ulteriore ruolo proposto per le fitochelatine è il loro coinvolgimento nell'omeostasi dei metalli pesanti, regolando, cioè, la disponibilità di ioni metallici liberi nella cellula vegetale (Grill et al., 1988), nel metabolismo del Fe e dei solfuri (Zenk, 1996).

9. Induzione di fitochelatine in alghe fitoplanctoniche

In letteratura, molti sono gli studi condotti a livello di piante superiori sulla sintesi delle fitochelatine e sulla natura dei loro complessi con i metalli, ma pochi sono quelli che riguardano le alghe fitoplanctoniche. In particolar modo, essi riguardano la relazione tra la concentrazione di metalli e la produzione di PC, la risposta a vari metalli e il confronto tra specie diverse (Ahner & Morel 1995; Ahner et al., 1995; Knauer et al., 1998). Pochi sono i lavori sulla formazione di complessi PC-ioni metallici nelle alghe fitoplanctoniche (Scarano & Morelli, 2002); la maggior parte degli studi su questi complessi hanno riguardato più le specie di piante terrestri superiori (Kneer & Zenk. 1992; Hu & Wu, 1998; Rauser, 2000; Vacchina et al., 2000). Inoltre in letteratura i dati disponibili sull'induzione di PC nel fitoplancton riguardano essenzialmente metalli pesanti come Cd, Pb, Cu e Zn (Morelli & Scarano, 2001; 2004; Morelli et al., 2002, 2005; Ahner et al., 1995; Kawakami et al., 2006) e solo pochi studi hanno riguardato il mercurio (Ahner et al., 1995). Lo studio di Ahner et al., (1995), ha esaminato la risposta della diatomea marina *Thalassiosira weissflogii* in seguito all'esposizione a vari metalli in tracce (Cd, Pb, Hg, Ni, Cu, Zn, Co, Ag) in concentrazioni simili a quelle presenti negli ambienti acquatici. I risultati di questo studio mostrano che il Cd, e in minor misura Zn e Cu risultano essere i maggiori induttori di fitochelatine. Inoltre è stato osservato che la produzione di PC non segue una semplice relazione stechiometrica rispetto alle concentrazioni dei metalli.

E' stato inoltre riportato (Wei et al., 2003) che la produzione di fitochelatine non dipende soltanto dall'esposizione dell'organismo ad un singolo metallo, ma è piuttosto il risultato dell'interazione tra i vari metalli presenti che possono avere tra loro effetti antagonistici e sinergici. In accordo con lo studio di Kawakami et al., (2006a), lo Zn non esercita nessuna influenza sulla quantità di PC prodotte dalle cellule di *P. tricornutum* esposte al Cu, mentre

ha un effetto antagonista quando vengono esposte al Cd, probabilmente a causa della competizione per i siti di legame sulla membrana cellulare.

Pochi sono i lavori condotti per valutare l'effetto del mercurio sul pool dei tioli non proteici; Gupta et al., (1998) hanno messo in evidenza che sia il glutatione che le PC costituiscono il principale meccanismo di detossificazione del mercurio nelle piante acquatiche *Hydrilla verticillata* e *Vallisneria spiralis*. Satoh et al. (2002) hanno determinato la concentrazione intracellulare di cisteina e glutatione in cinque specie di fitoplancton marino, *Tetraselmis tetrathele*, *Phorphyridium purpureum*, *Pavlova sp.*, *Isochrysis sp.*, *Pleurochrysis carterae*, e hanno esaminato le loro relazioni rispetto alla tolleranza al mercurio. I risultati di questo lavoro mostrano che le concentrazioni intracellulari dei tioli non proteici riflettono l'attività antiossidante cellulare e la suscettibilità al mercurio nelle cinque specie esaminate.

Scopo della tesi

Il mercurio è uno dei metalli pesanti più tossici, privo di qualsiasi funzione biologica e viene riconosciuto come un pericolo ambientale di grande entità.

E' noto dalla letteratura che gli organismi fitoplanctonici marini sono capaci di mettere in atto meccanismi di detossificazione in risposta all'esposizione ai metalli pesanti. Uno dei meccanismi di detossificazione più studiati riguarda la sintesi di fitochelatine (PC). Molti sono gli studi presenti in letteratura che riguardano l'induzione di PC in risposta all'esposizione a vari metalli pesanti quali Cd, Pb, Zn e Cu in organismi fitoplanctonici marini (Kawakami et al., 2006). Ad oggi in letteratura, invece, sono disponibili pochi dati sulla sintesi di fitochelatine in seguito all'esposizione al mercurio in questi organismi (Ahner et al., 1995).

Numerosi studi hanno dimostrato la produzione di mercurio gassoso ad opera di batteri (Mason et al., 1995, Mason et al., 1994, Lanzillotta et al., 2004) e hanno individuato in un complesso enzimatico la capacità di effettuare la riduzione sia delle forme organiche che inorganiche di mercurio. Scarsi sono invece i dati riguardanti questo processo negli organismi eucariotici e, se anche alcuni autori hanno ipotizzato la capacità delle microalghe fitoplanctoniche di produrre mercurio gassoso disciolto, nessuno ha effettuato misure dirette di questa produzione.

Scopo di questa tesi è stato quello di valutare l'importanza di questi processi in un'alga fitoplanctonica marina. A tal fine sono stati condotti esperimenti di laboratorio con la diatomea marina *Thalassiosira weissflogii* esposta a concentrazioni crescenti di mercurio in modo da determinare sia il contributo di questa microalga alla produzione di DGM, che l'induzione di PC in risposta a questo metallo.

Capitolo secondo

Materiali e metodi

1. Prelievo e mantenimento dell'acqua di mare

L'acqua di mare utilizzata per le colture è stata prelevata in una zona incontaminata a largo dell'isola Capraia, nell'arcipelago toscano, ad una profondità poco inferiore al livello superficiale. Appena possibile l'acqua di mare è stata filtrata su membrane Millipore (nitrate di cellulosa) a porosità 0.45 μm , mediante un sistema di filtrazione a pressione e trasferita in contenitori di polietilene, precedentemente lavati con una soluzione di acido nitrico al 10%.

L'acqua di mare filtrata è stata poi conservata in camera fredda ad una temperatura di circa +4 °C fino al momento della sua utilizzazione.

2. Colture di *Thalassiosira weissflogii*

Nel presente studio è stata utilizzata la diatomea marina *Thalassiosira weissflogii* ((Grunow in Van Hemck) Fryxell & Haxle 1977), acquistata presso il centro "Culture Collection of Algae and Protozoa", Dunstoffsuoge Marine Laboratory, UK.



Fig 2.1: *Thalassiosira weissflogii*

Dimensioni	Diametro = 5-32 μm
Tipo	Diatomea
Peso secco	9%
Distribuzione	Ampia
Forma di vita	Solitaria
Colore	Varia da marrone chiaro, al verde-giallo
Note	Trovata a bassi livelli di salinità
Sinonimi	<i>Thalassiosira fluviatilis</i> Hustedt 1926
Regno	<i>Planta</i>
Subphylum	<i>Chromista</i>
Divisione	<i>Bacillariophyta</i>
Classe	<i>Coccinodiscophyceae</i>
Ordine	<i>Thalassiosirales</i>
Famiglia	<i>Thalassiosiraceae</i>
Genere	<i>Thalassiosira</i>
Specie	<i>Weissflogii</i>

Fig 2.2:Caratteristiche di *Thalassiosira weissflogii*

Questa microalga è stata coltivata in laboratorio in condizioni axeniche, in camera termostata, regolata ad una temperatura di 21 °C, illuminata con luce fluorescente (100 μM fotoni $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) con un ritmo luce:buio di 16:8 h.

Il terreno di coltura è costituito da acqua di mare naturale e da vari nutrienti. Nella tabella sono elencate le quantità di nutrienti da aggiungere all'acqua di mare, in accordo con il mezzo f/2 leggermente modificato (Guillard, 1975).

Nutrienti	Concentrazione molare
NaNO₃	8.8·10 ⁻⁴
NaH₂PO₄·H₂O	3.63·10 ⁻⁵
Na₂SiO₃·9H₂O	5·10 ⁻⁵
CuSO₄·5H₂O	8·10 ⁻⁹
ZnSO₄·7H₂O	1.53·10 ⁻⁸
MnCl₂·4H₂O	1.8·10 ⁻⁷
Na₂MoO₄·2H₂O	5.2·10 ⁻⁹
CoCl₂·6H₂O	8.4·10 ⁻⁹
FeCl₃·6H₂O	2.3·10 ⁻⁶
EDTA	2.3·10 ⁻⁶
Vitamina B₁₂	0.01 µg/l
Biotina	0.01 µg/l
Tiamina B₁	200 µg/l

Fig 2.3: Nutrienti e concentrazioni aggiunti all'acqua di mare

Il terreno di coltura è stato sterilizzato sotto cappa sterile a flusso laminare mediante l'uso di un set di filtrazione, precedentemente sottoposto a trattamento in autoclave, con filtri del tipo Millipore a porosità di 0.2 µm sterilizzati singolarmente.

Per mantenere le cellule in una fase di crescita esponenziale, le colture cellulari sono state mantenute inoculando periodicamente un'aliquota da una coltura madre in un nuovo terreno di coltura sterile.

3. Conta cellulare

Le conte cellulari sono state eseguite al microscopio ottico invertito (Zeiss) per mezzo della “camera di Neubauer” (Fig 2.4)

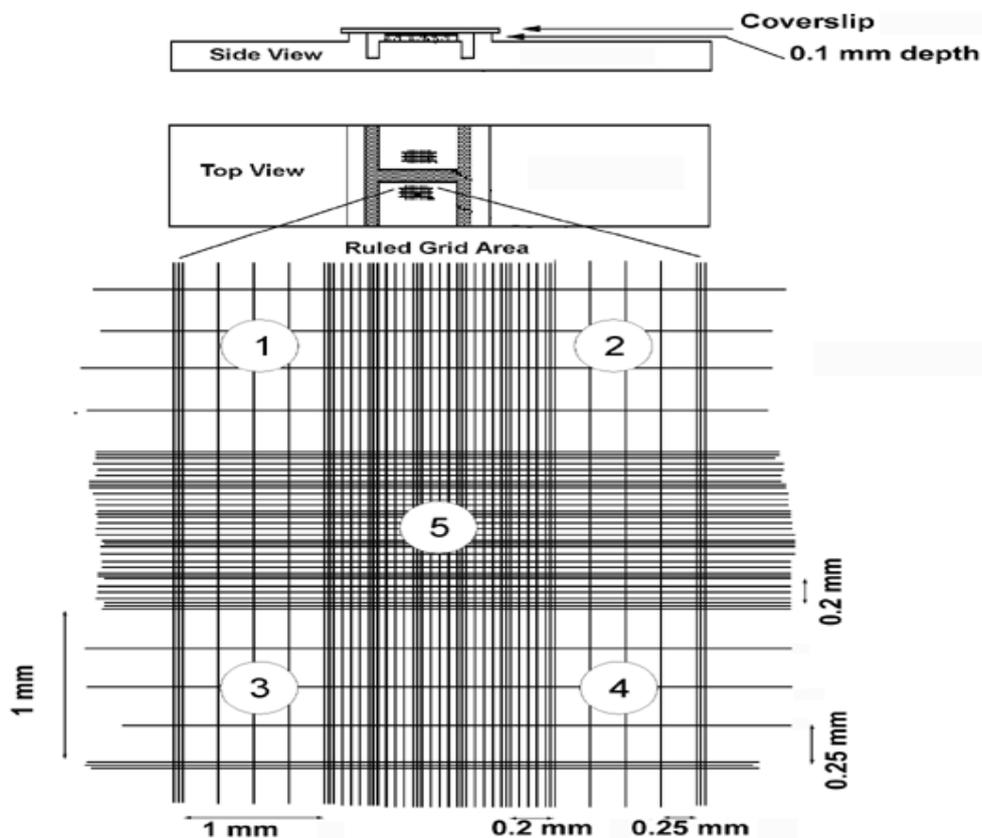


Fig 2.4: camera di Neubauer

Le cellule sono state contate all'interno dei quadrati 1, 2, 3 e 4 e per stimare la densità cellulare, espressa in numero di cellule/ml è stata utilizzata la seguente formula:

$$\text{numero di cellule} \times 10^4/\text{ml} = \frac{\text{cellule contate}}{\text{superficie di conta (cm}^2\text{)} \times \text{profondità della camera (cm)} \times \text{diluizione}}$$

Superficie di conta = 4 quadrati = 0.04 cm²

Profondità della camera = 0.01 cm

4. Calcolo della velocità di crescita

La crescita delle colture è stata valutata durante la fase esponenziale mediante la conta cellulare al momento dell'inoculo (t_0) e dopo 6 giorni. La velocità di crescita (μ), espressa come raddoppiamenti/giorno, è calcolata tramite la seguente equazione:

$$\mu = 1/t \log_2 (N/N_0)$$

dove t è il tempo di crescita espresso in giorni, N e N_0 sono i numeri di cellule calcolati, rispettivamente, al tempo t ed al tempo zero.

5. Esperimenti di esposizione al mercurio

Sono stati condotti tre diversi esperimenti di esposizione al mercurio in colture di *T. weissflogii*: il primo per valutare l'effetto del mercurio sulla velocità di crescita, il secondo per studiare l'andamento del pool intracellulare di tioli non proteici in risposta al Hg, e il terzo per misurare la produzione di mercurio gassoso da parte della microalga.

Per quanto riguarda il primo esperimento, colture di *T. weissflogii* del volume di 100 ml, sono state fatte crescere per 6 giorni in mezzi costituiti da acqua di mare naturale arricchita di nutrienti (N, P, Si e vitamine in concentrazioni equivalenti a quelle del mezzo f/2) e addizionata con il Hg alle seguenti concentrazioni: 0, 5, 10, 25, 50, 75, 125, 150, 250, 500 e 750 nM. Il mezzo di coltura, sterilizzato mediante filtrazione, veniva inoculato con volumi opportuni delle colture di mantenimento in modo da ottenere una concentrazione iniziale di

1×10^3 cellule/ml. Dopo 6 giorni di crescita algale, la coltura veniva sottoposta alla conta cellulare allo scopo di calcolare la velocità di crescita.

Per quanto riguarda il secondo esperimento, colture di *T. weissflogii* (volume = 1000 ml) sono state fatte crescere per 2 giorni (a meno che specificato diversamente), in un mezzo di coltura contenente acqua di mare naturale arricchita di nutrienti, come sopra riportato, e addizionata con concentrazioni crescenti di mercurio da 5 a 250 nM. Anche in questo caso, l'inoculo veniva calcolato in modo da ottenere una concentrazione iniziale di 1×10^6 cellule/l. Dopo 2 giorni di crescita esponenziale (densità cellulare da 1 a $1,5 \times 10^7$ cellule/l), un volume di 700 ml di coltura veniva filtrato mediante filtri a membrana con porosità di 1.2 μm (Millipore), e le cellule raccolte per la determinazione dei tioli non proteici. Un'aliquota di 50 ml della coltura veniva utilizzata per la determinazione della concentrazione del mercurio intracellulare. A questo scopo, le cellule venivano raccolte su filtro (1.2 μm , Millipore) e sottoposte a tre lavaggi successivi della durata di 2 minuti ciascuno, con una soluzione di EDTA 1mM in acqua di mare, e a tre risciacqui consecutivi con acqua di mare. Le cellule così raccolte venivano risospese in 1 ml di HNO_3 diluito in acqua (0.14 M) e sottoposte a un trattamento di mineralizzazione.

Per quanto riguarda il terzo esperimento, la misura della produzione di DGM è stata eseguita su una coltura di *T. weissflogii* (volume = 300ml), coltivata in un mezzo contenente acqua di mare naturale arricchita di nutrienti e addizionato di Hg (concentrazione iniziale = 5 nM). L'aggiunta di Hg veniva eseguita nel terreno sterile, dopodiché il mezzo veniva fatto equilibrare per 3 giorni, prima di inoculare le alghe. Anche in questo esperimento, veniva effettuato un inoculo in modo da ottenere una densità cellulare iniziale di 1×10^6 cellule/l. Le misure della produzione di DGM sono state eseguite su aliquote di 50 ml delle colture di *T. weissflogii* al secondo e quarto giorno di crescita, utilizzando la procedura descritta nel paragrafo 5.2. Un'aliquota di 50 ml della coltura veniva utilizzata per la determinazione

della concentrazione del mercurio cellulare. A questo scopo, le cellule venivano raccolte su filtro (1.2 μm , Millipore), risospese in 1 ml di HNO_3 diluito in acqua (0.14 M) e sottoposte a un trattamento di mineralizzazione.

Un esperimento aggiuntivo di misura della produzione di DGM è stato condotto su cellule uccise con formaldeide. Il trattamento con la formaldeide è stato così eseguito: 50 ml di coltura sono stati filtrati mediante filtri a membrana di porosità 1.2 μm (Millipore), dopodiché le cellule sono state risospese per 10 minuti in una soluzione di formaldeide al 1.6% in acqua di mare (2 ml di formaldeide al 40% in 50 ml). Successivamente le cellule sono state filtrate (1.2 μm), risciacquate con acqua di mare e infine risospese nello stesso mezzo di provenienza.

5.1 Determinazione dei gruppi tiolici non proteici

Le cellule di *T. weissflogii* esposte al mercurio e raccolte su filtro (vedi paragrafo precedente), sono state risospese in 1.5 ml di HCl 0.1 M / 5 mM di DTPA e distrutte mediante sonicazione (Sonopuls Ultrasonic Homogenizer, Baldelin) per 3 minuti con cicli ripetuti di 0.3 secondi, mantenendo il campione in un bagno a ghiaccio. Le cellule omogeneizzate sono state poi centrifugate (19000 g, 45 minuti) ed il soprannatante è stato usato per la determinazione dei tioli non proteici. Questi (glutazione e fitochelatine) sono stati determinati e quantificati mediante cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC), con una colonna a fase inversa, dopo derivatizzazione con il tracciante fluorescente mBrB (Fahey and Newton, 1987; Newton et al, 1981).

Per la derivatizzazione dei gruppi tiolici è stata seguita la procedura indicata da Rijstenbil and Wijnholds (1996), con alcune modifiche. In una eppendorf oscurata, sono stati messi 400 μl di soprannatante ed effettuate le aggiunte di 200 μl di HEPPS 0.4 M / DTPA 5 mM,

pH 9, e di 20 μl di TCEP 10 mM, per ridurre i gruppi tiolici ossidati. E' stato verificato che, in tali condizioni, una quantità di 100 pmoli di glutatione ossidato (GSSG) veniva quantitativamente convertita in GSH (Morelli e Scarano, 2001). Questa reazione è stata effettuata in stufa, in condizioni di buio, per 15 minuti ad una temperatura di 45 °C. Successivamente sono stati aggiunti 40 μl di mBrB 10mM in acetonitrile e la reazione di derivatizzazione è stata lasciata andare per 15 minuti a 45 °C. Dopo un'aggiunta di 40 μl di Cys 100mM, la reazione è stata proseguita ancora per 15 minuti in stufa alla stessa temperatura. E' stato realizzato tale procedimento con lo scopo di far reagire il mBrB in eccesso e ridurre il numero di picchi che possono interferire durante l'analisi (Ahner et al, 1995). Infine, la reazione è stata bloccata con l'aggiunta di 40 μl di MSA 2M. La miscela di derivatizzazione conteneva, in totale, 740 μl di campione.

I derivativi sono stati separati con colonna a fase inversa Alltech C-18 5 μm (250 mm \times 4,6 mm) e rivelati ad una lunghezza d'onda di emissione di 470 nm (lunghezza d'onda di eccitazione = 380 nm). L'eluente è costituito da una miscela di due solventi: il solvente A è composto da TFA 0.1% e il solvente B è costituito da 100% acetonitrile. Per l'eluizione dei campioni è stato programmato un gradiente lineare che porta la concentrazione di B dal 10% al 12% in 15 minuti e dal 12% al 28% nei successivi 40 minuti. Aumentando la percentuale dell'eluente B, sono separati per primi i composti più polari, quindi le fitochelatine a catena più corta (molecole meno idrofobiche) e successivamente variando la concentrazione di B, quelli più apolari (polimeri a catena più lunga). La velocità del flusso in colonna dell'eluente era di 1 ml \times min⁻¹. Per pulire la colonna, prima di ogni iniezione del nuovo campione, l'eluente è stato portato al 100% di acetonitrile per 5 minuti e riequilibrato passando al 10% di acetonitrile per 10 minuti.

Il tempo di ritenzione delle fitochelatine è stato confrontato con campioni standard di PC₂, PC₃ e PC₄, gentilmente forniti dal Prof. M.H. Zenk, dell'Università di Monaco (Germania) che sono stati ottenuti da *Silene vulgaris* (Friederich et al, 1998).

Per determinare la concentrazione delle PC è stato usato il rapporto tra l'area di picco e la concentrazione delle soluzioni standard di GSH. Tale rapporto è risultato lineare nell'intervallo di concentrazione di GSH da 4 a 400 pmol; in figura 2.2 è riportata la retta di calibrazione: il limite di rilevabilità era vicino a 1 pmol. La concentrazione totale di PC cellulare era espressa come somma delle unità γ -Glu-Cys quantificate in ogni picco cromatografico relativo alle fitochelatine.

La quantità di fitochelatine veniva normalizzata per cellula utilizzando la seguente formula:

$$\text{num moli iniettate } \gamma\text{-Glu-Cys} \times \frac{V_{MD}(\mu\text{l})}{V_{\text{iniettato}}(\mu\text{l})} \times \frac{V_{\text{sopranatante}}(\mu\text{l})}{V_{\text{sopranatante nella MD}}(\mu\text{l})} \times \frac{1}{\text{num cell. nel sopranatante}} = \frac{\text{num moli } \gamma\text{-Glu-Cys}}{\text{cell.}}$$

dove V è il volume e MD è la miscela di derivatizzazione.

Il sistema HPLC è costituito da due pompe Shimadzu LC-10 AD, una valvola di iniezione Rheodyne 7725 collegata ad un loop da 100 μ l ed un rivelatore di fluorescenza Shimadzu RF-10 AXL. I cromatogrammi sono stati elaborati su PC utilizzando il software Chromatoplus.

5.2. Determinazione della produzione di DGM

La produzione di DGM è stata misurata in cellule di *T. weissflogii*, sia in condizioni di luce che di buio, utilizzando il dispositivo mostrato nello schema seguente:

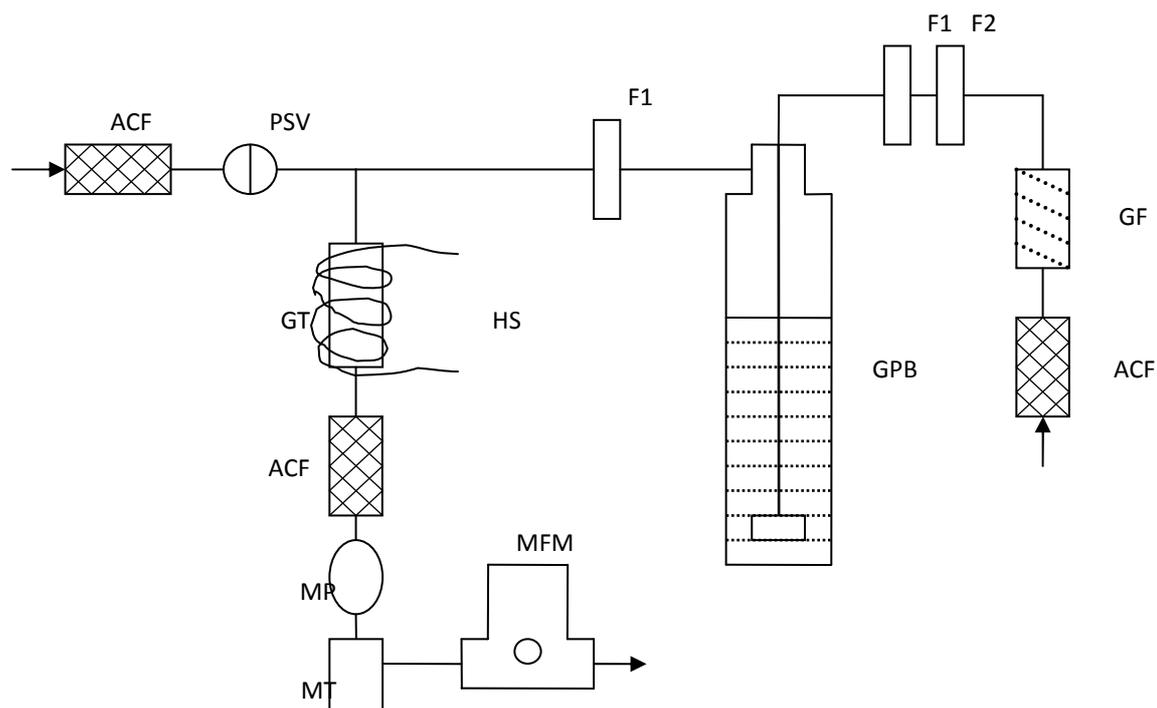


Fig. 2.5: Dispositivo sperimentale per la determinazione della produzione di DGM.

ACF = Activated Carbon Filter; PSV = Pinch Solenoid Valve; F1 = 0.20 μm Teflon Filter; F2 = 0.45 μm Teflon Filter; GF = Gold Filter; GPB = Glass Pyrex Bottle; GT = Gold Trap; HS = Heating System; MP = Membrane Pump; MT = Moisture Trap; MFM = Mass Flow Meter.



Fig 2.6: Dispositivo utilizzato per le misure di produzione di DGM

Questo consiste di una pompa a membrana (MP) che aspira l'aria esterna, regolata ad un flusso di 700 ml min^{-1} . L'aria passa attraverso un filtro ad oro (GF) e uno a carboni attivi (ACF), al fine di eliminare le tracce di mercurio presenti nell'aria e attraverso due filtri di Teflon sterili con pori del diametro rispettivamente di $0,45$ (Sartorius 16555)(F2) e di $0,20 \mu\text{m}$ (Sartorius 16534)(F1), in modo da sterilizzare l'aria aspirata. L'aria così purificata,

attraversa una bottiglia di vetro Pyrex del volume di 100 ml, munita di gorgogliatore (GPB), nella quale viene posto il campione (50 ml). L'aria in uscita passa attraverso un filtro sterile (0,20 μm , Sartorius 16534) (F1) e arriva ad una trappola ad oro (GF), costituita da un tubetto in quarzo (lunghezza 12,0 cm, diametro interno 0,4 cm) contenente 1,0 g di lana di oro, tenuta in posizione da lana di quarzo.

Durante l'estrazione la trappola ad oro è mantenuta ad una temperatura di circa 50 °C da una resistenza in nichel-cromo avvolta attorno alla trappola ad oro (HS), per evitare problemi legati alla condensa del vapor acqueo ed alla conseguente diminuzione di efficienza di cattura del mercurio. Un secondo filtro a carboni attivi (ACF), inserito tra la trappola ad oro e la pompa a membrana, protegge la trappola ad oro da possibili contaminazioni di mercurio elementare provenienti dalla pompa, dalla trappola di vapori (MT) e dal flussimetro (MFM).

Alla fine del processo di estrazione la pressione all'interno della bottiglia è riportata al valore della pressione atmosferica mediante l'apertura di una valvola a solenoide.

La DGM, essendo costituita da composti volatili, passa dalla fase acquosa alla fase di vapore e, in seguito al gorgogliamento, viene trasportata fino alla trappola ad oro, sulla quale forma l'amalgama e si preconcentra. Nei nostri esperimenti abbiamo usato un tempo di estrazione di 10 minuti. Le misure sono state condotte a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) in assenza di luce.

Allo scopo di determinare l'efficienza di estrazione della DGM, sono stati condotti cicli consecutivi di misure nelle nostre condizioni sperimentali. Durante la prima estrazione è stato misurato più del 95% della DGM contenuta nel campione, in accordo con il bilancio di massa nella parte superiore della bottiglia di estrazione con l'equilibrio del Hg^0 tra la fase acquosa e quella del gas riportato da Gardfeldt et al., (2001). Le successive estrazioni presentano un valore praticamente costante, che è stato considerato come valore del "bianco".

La produzione di DGM è stata misurata sia in condizioni di buio che di luce in colture di *T. weissflogii* esposte ad una concentrazione di 5 nM di Hg, nelle stesse colture di *T. weissflogii* trattate con formaldeide, e nel mezzo di coltura ottenuto filtrando le stesse colture con un filtro da 1,2 μm . La produzione di DGM in condizioni di buio è stata ottenuta mantenendo in assenza di luce la bottiglia contenente il campione per un tempo di 20 minuti e successivamente la DGM prodotta è stata estratta per 10 minuti con il dispositivo sopra descritto.

La produzione di mercurio gassoso in condizioni di luce è stata ottenuta esponendo la bottiglia alla luce di un neon ($100 \mu\text{M}$ fotoni $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) per un tempo di 20 minuti. Anche in questo caso la DGM prodotta è stata estratta in assenza di luce come descritto precedentemente.

Il mercurio preconcentrato sulla trappola ad oro è stato determinato usando uno spettrofotometro a fluorescenza (“TEKRAN” Cold Vapour Atomic Fluorescence Spectrometer 2500) che ha un limite di rivelazione estremamente basso (0,1 pg di mercurio) ed è perciò in grado di fornire misure molto accurate delle basse concentrazioni di mercurio elementare che sono state indagate.

La trappola ad oro è stata riscaldata fino a circa 500 °C utilizzando lo stesso sistema di riscaldamento usato per evitare la condensa del vapor acqueo; il mercurio così rilasciato è trasportato alla cella dello spettrofotometro a fluorescenza utilizzando argon puro come gas di trasporto, con un flusso di 3 ml min^{-1} mantenuto stabile da un sistema elettronico di controllo del flusso.

Il sistema è stata calibrato utilizzando microsiringhe “Hamilton gas-tight” da 25 μl per iniettare nella trappola ad oro concentrazioni crescenti di aria satura di vapori di mercurio elementare prelevata da un generatore di vapori di mercurio. Esso è costituito da un contenitore mantenuto ad una temperatura di 8°C contenente poche gocce di mercurio

elementare. Questo passa in forma di vapore nell'aria all'interno del generatore, finché quest'ultima non viene saturata. La pressione all'interno del generatore è mantenuta uguale a quella ambiente. La concentrazione di mercurio all'interno del generatore è funzione della sua temperatura.

6. Determinazione della concentrazione di mercurio totale disciolto

Le misure di concentrazione di Hg totale disciolto nel mezzo di coltura, sono state eseguite utilizzando lo spettrofotometro ad assorbimento atomico GARDIS 3, dopo mineralizzazione del campione. In fig 2.7 è riportata l'apparecchiatura usata per il pre-trattamento del campione, realizzata in linea con lo spettrofotometro.



Fig 2.7: Spettrofotometro ad assorbimento atomico

Il campione da analizzare veniva opportunamente diluito (da 100 μ l a 1 ml in 20 ml di acqua milli-Q), acidificato con 100 μ l di HNO₃ Suprapur, e sottoposto a foto-ossidazione (lampada UV a media pressione) per 5 minuti in un bagno a ghiaccio. La mineralizzazione del

campione è stata eseguita per rompere i legami fra l' Hg^{2+} e le molecole organiche ed inorganiche disciolte (Ferrara et al., 2001). Dopo il processo di foto-ossidazione, il campione è stato trasferito in un tubo di reazione al quale sono stati aggiunti 200 μl di una soluzione 0,4 M di SnCl_2 per ridurre l' Hg^{2+} disciolto in soluzione ad Hg^0 , che è l'unica specie chimica di mercurio che può essere rilevata dallo spettrofotometro. Il campione è stato gorgogliato con aria priva di mercurio per 5 minuti ad un flusso di 300 ml min^{-1} . Il mercurio estratto dal campione è stato amalgamato su oro e misurato mediante lo spettrofotometro ad assorbimento atomico. Lo spettrofotometro opera rivelando l'assorbimento, da parte degli atomi di mercurio, ad una lunghezza d'onda di 253,7 nm.

Sono stati ottenuti valori di bianco variabili da 1 a 5 pg di mercurio. Per la taratura dello spettrofotometro è stata utilizzata la stessa procedura descritta nel paragrafo 5.2 per la taratura dello spettrofotometro Tekran.

Rispetto alla versione originale, lo spettrofotometro è stato modificato inserendo all'esterno una trappola ad oro di pre-concentrazione che, potendo essere riscaldata a 50°C, riduce i problemi legati alla formazione di acqua di condensazione. La presenza di questa trappola esterna evita anche che l'aria passi all'interno della cella d'assorbimento per tutto il tempo di estrazione, determinandone una possibile contaminazione (Ferrara e Mazzolai, 1998). Le modifiche introdotte e la doppia amalgamazione su oro hanno permesso di raggiungere un limite di rivelabilità di 0,5 pg di mercurio.

6.1 Determinazione del mercurio cellulare e intracellulare

Le misure della concentrazione di mercurio cellulare e intracellulare sono state eseguite utilizzando lo spettrofotometro ad assorbimento atomico GARDIS 3, dopo aver eseguito la seguente procedura di mineralizzazione del campione. La sospensione cellulare, preparata

come descritto nel paragrafo 5, è stata mescolata con 1 ml di una miscela di HNO_3 e H_2O_2 in rapporto 2:1. Il campione è stato posto in stufa a 45°C per 16 ore per ottenere una completa mineralizzazione del campione. Questa procedura di mineralizzazione è stata validata utilizzando un campione certificato di plancton (T6, Fresh Water Plankton) contenente 185 ng/g di Hg. I risultati ottenuti con questo metodo di mineralizzazione indicano un'efficienza del 90%. La quantità di mercurio associata al campione veniva misurata utilizzando l'apparato descritto per la misura del Hg disciolto, omettendo la fase di foto-ossidazione, poiché, in questo caso, i campioni erano già stati mineralizzati.

7. Reagenti

Tutta la vetreria (beute, bottiglie, cilindri ecc.) è stata lavata, attraverso 3 passaggi con acido nitrico (Carlo Erba), diluito al 5% con acqua e seguiti da successivi risciacqui con acqua milli-Q.

Tutti i reagenti erano di grado analitico: acido di etilenetriamminopentacetico (DTPA), glutatione ridotto (GSH), cisteina, monobromobimano (mBrB) sono stati acquistati da Fluka; Tris (2-carbossietil) fosfina (TCEP) da Molecular Probes; acido 4-(2-idrossietil)-piperazina-1-propano-sulfonico (HEPPS) e HgCl_2 da Sigma; acido metansulfonico (MSA), di grado Suprapur, da Merck; HCl , di grado Suprapur, formaldeide (40%), acetonitrile, acido trifluoroacetico (TFA), di grado HPLC ed infine SnCl_2 da Carlo Erba. La soluzione di SnCl_2 veniva preparata aggiungendo 100 g del sale a 100 ml di HCl ; la soluzione così ottenuta veniva mescolata fino ad ottenere il completo scioglimento del sale e successivamente, versata in una bottiglia contenente 900 ml di acqua distillata. La soluzione veniva fatta gorgogliare con un flusso d'aria purificato dal passaggio attraverso una trappola a carbone

attivo, per circa un'ora, per eliminare eventuali tracce di mercurio. La soluzione stock di HgCl_2 utilizzata negli esperimenti era di concentrazione 10^{-2} M.

Le soluzioni di TCEP, mBrB e SnCl_2 erano preparate giornalmente. Le altre soluzioni venivano preparate periodicamente e conservate, al buio, in camera fredda ad una temperatura di $+4$ °C.

Capitolo terzo

Risultati e discussione

1. Effetto del Hg sulla velocità di crescita di *T. weissflogii*

L'effetto dell'esposizione al mercurio sulla velocità di crescita di *T. weissflogii* è stata investigata conducendo esperimenti di esposizione in mezzi di coltura contenenti concentrazioni crescenti di Hg (0, 5, 10, 25, 50, 75, 125, 150, 250, 500 e 750 nM).

Le colture, con densità iniziale di 1×10^6 cellule L^{-1} , sono state mantenute per 6 giorni. La velocità di crescita della coltura di controllo era di 1.0 ± 0.1 raddoppiamenti $giorno^{-1}$ (n=3). I risultati sono mostrati in Fig 3.1

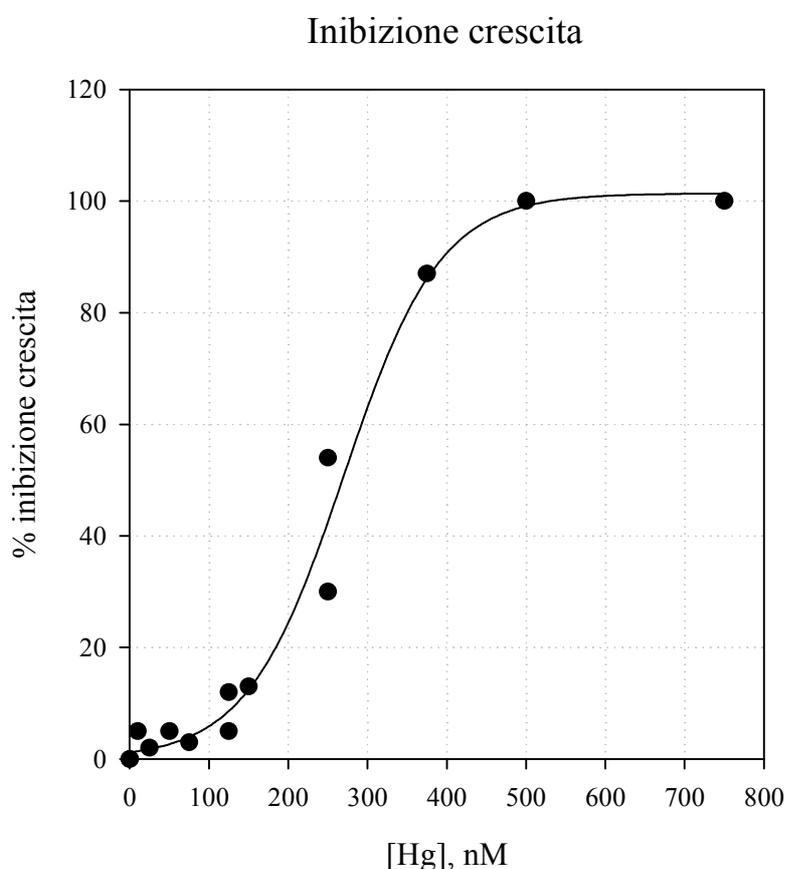


Fig 3.1 Curva di inibizione di crescita

Dal grafico si evince che nell'intervallo di concentrazione di Hg da 5 a 500 nM la velocità di crescita diminuiva gradualmente riflettendo così una inibizione della crescita causata dal Hg.

In tutte le colture abbiamo osservato una crescita esponenziale, tuttavia abbiamo notato che

l'aggiunta di mercurio allungava la fase di latenza (dati non riportati). Dal grafico si può stimare che le cellule subiscono il 50 % di inibizione della crescita ad una concentrazione di 250 nM di Hg, mentre a concentrazioni minori di 150 nM non si osservano effetti tossici significativi, tanto che in questo intervallo di concentrazione, l'inibizione di crescita non supera il 20%. Si individua, quindi, un intervallo di concentrazione di Hg, tale che non risulti tossico o letale per le cellule e provochi solo un leggero abbattimento della velocità di crescita $\geq 15-20\%$. Per evitare effetti tossici nel corso dei successivi esperimenti di esposizione al mercurio, abbiamo sempre usato dosaggi ben tollerati dall'alga, e non è mai stata superata la concentrazione di 150 nM.

2. Effetto del Hg sui tioli non proteici

Un aspetto di questo lavoro è stato quello di indagare l'effetto dell'esposizione al mercurio sulla sintesi di tioli non proteici, poiché in letteratura sono presenti pochi studi su tale

produzione in funzione dell'esposizione al Hg. A questo scopo le cellule dell'alga fitoplanctonica *T. weissflogii* sono state incubate per un tempo di 48 ore in mezzi di coltura a cui sono stati aggiunti concentrazioni crescenti di Hg (da 5 a 150 nM) ed è stata saggiata la produzione dei tioli non proteici. In figura 3.2 sono riportati i cromatogrammi relativi ad una coltura esposta a 150 nM di Hg (fig. 3.2 A) e alla coltura di controllo (fig. 3.2 B).

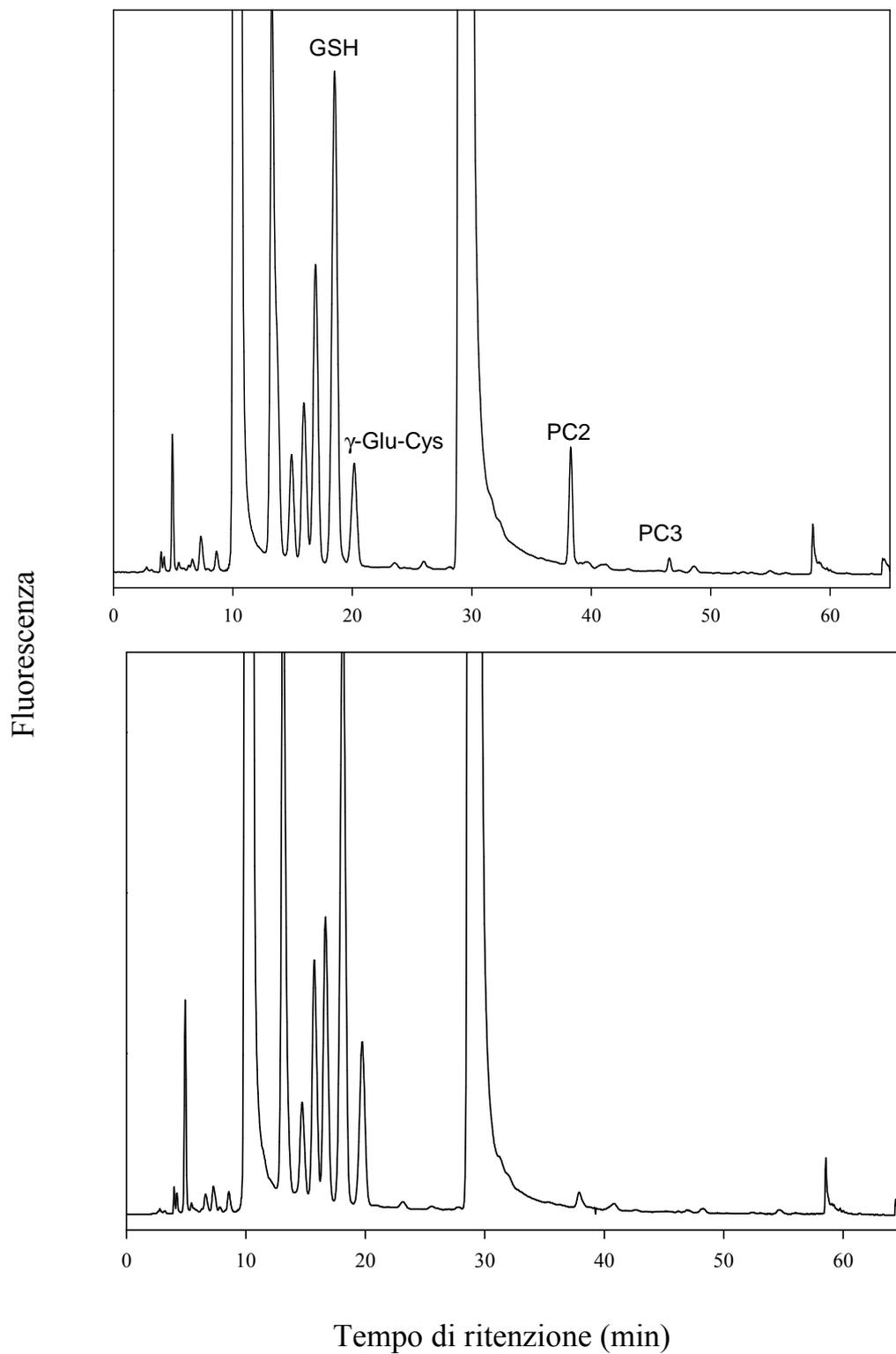


Fig 3.2: Cromatogramma della prova con esposizione a 150 nM di Hg e del suo controllo

Il cromatogramma mostra una induzione di fitochelatine durante l'esposizione al Hg, ma non si ritrova negli estratti di cellule non trattate, a testimoniare l'esistenza di un processo di detossificazione operato dalle PC. I risultati delle analisi dei tioli non proteici e del mercurio intracellulare in funzione della [Hg] aggiunto sono mostrati in Fig 3.3

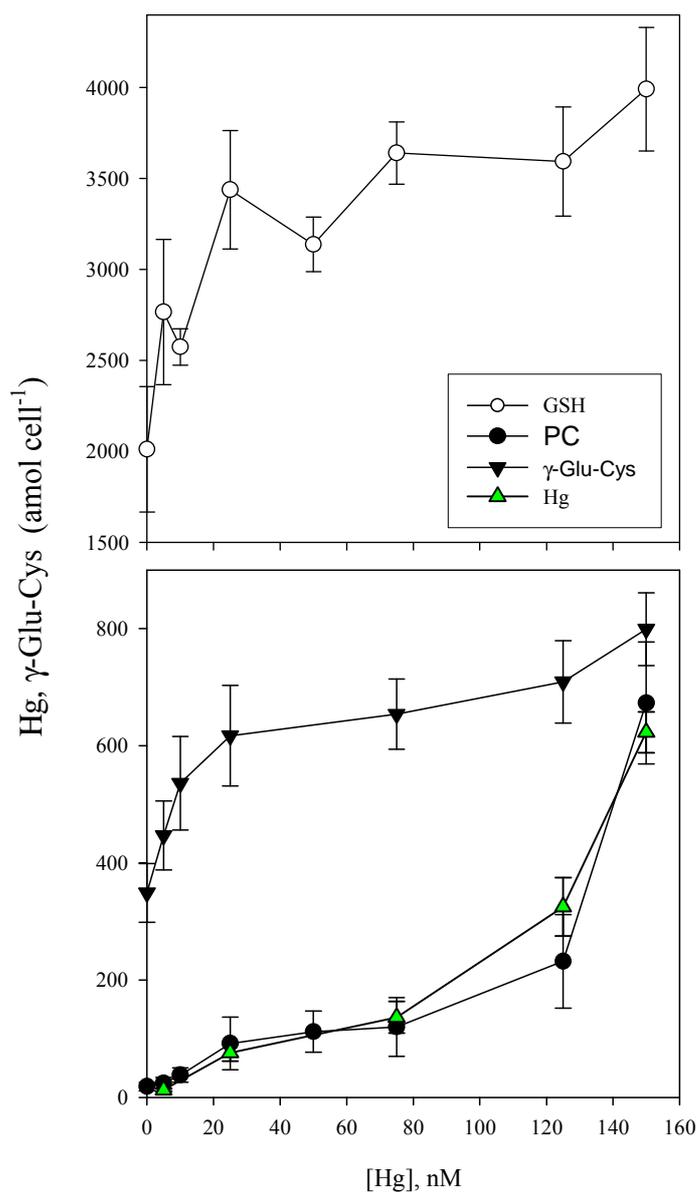


Fig 3.3: Andamento dei tioli non proteici in risposta all'esposizione di mercurio

Per quanto riguarda l'assimilazione del metallo, la Fig. 3.3 mostra che i valori di Hg intracellulare tendono ad aumentare in relazione alla concentrazione del Hg nel mezzo esterno

Si individua che le cellule rispondono all'aggiunta di Hg aumentando il pool dei tioli non proteici. Il glutatione è il peptide presente in maggior quantità in tutto l'intervallo di concentrazione di Hg e in particolar modo si osserva un aumento della sintesi di GSH anche alle concentrazioni più basse di Hg. A 150 nM la sua quantità è raddoppiata rispetto al controllo.

La concentrazione di γ -Glu-Cys, un intermedio nella sintesi del glutatione, era significativamente minore di quella del GSH, sia nel controllo che nelle cellule esposte al Hg, ma anche il suo livello aumentava al crescere della concentrazione di mercurio nel mezzo.

L'esposizione al mercurio induceva anche la sintesi di PC ma, nelle nostre condizioni di esposizione, esse erano rilevabili solo a concentrazioni più elevate di Hg, maggiori di 25 nM.

La loro concentrazione aumentava al crescere dell'esposizione al mercurio, seguendo una precisa relazione dose-risposta.

E' possibile osservare che dopo 48 ore di esposizione al Hg, la percentuale di oligomeri individuali è costituita da un intervallo tra 85-100% di PC₂, e tra 0-15% di PC₃, mentre oligomeri con un grado di polimerizzazione ≥ 3 non sono mai stati trovati in nessuna delle nostre prove.

In figura si può anche osservare che esiste un rapporto 1.1 tra la concentrazione di PC e la concentrazione di mercurio intracellulare. Dato che è noto dalla letteratura (Mehra et al., 1996) che sono necessari 2 gruppi SH per legare uno ione Hg(II), si può ipotizzare che le fitochelatine non siano in quantità sufficienti a legare tutto il mercurio intracellulare. Dato che i nostri risultati mostrano un aumento della concentrazione intracellulare degli altri tioli

non proteici in risposta a dosi crescenti di Hg, si può ipotizzare che, oltre alle PC, anche il GSH e i peptidi γ -Glu-Cys possano rivestire un ruolo nel sequestro intracellulare del Hg. I nostri risultati risultano essere in accordo con lo studio di Gupta et al., (1998), in cui viene osservata la sintesi di PC e tioli non proteici in piante acquatiche esposte al mercurio. Gli autori suggeriscono che il GSH, oltre le PC, possa fungere come legante per il Hg, costituendo quindi, una possibile risposta alla detossificazione del metallo.

3. Cinetica del pool dei tioli non proteici

L'andamento del pool dei tioli non proteici in funzione del tempo di esposizione è stata studiata ad una concentrazione di Hg (150 nM), tale da poter permettere di stimare la sintesi delle PC.

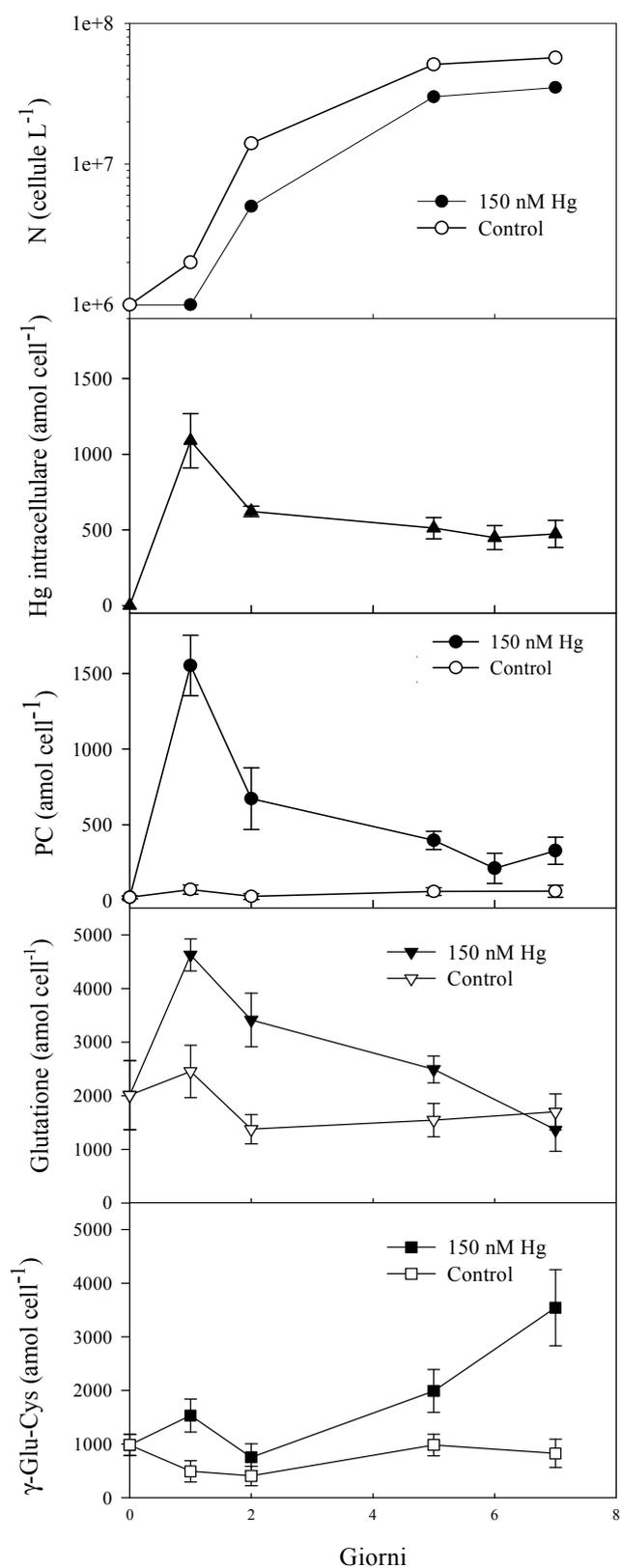


Fig 3.4: Cinetica del pool dei tioli non proteici

Le cellule esposte al metallo mostrano la massima concentrazione di mercurio intracellulare subito dopo il primo giorno di esposizione. Successivamente si osserva una diminuzione di tale valore, in concomitanza con un decremento delle concentrazioni degli altri tioli non proteici. I risultati ottenuti mostrano che le fitochelatine vengono sintetizzate a partire dall'inizio del primo giorno di esposizione, in relazione ad una maggiore concentrazione di Hg intracellulare, dopodiché la loro concentrazione diminuisce.

Riguardo al GSH esso è un peptide costitutivo nelle cellule e la sua presenza è dovuta alle molteplici funzioni biochimiche che esso svolge all'interno delle cellule. Tuttavia la risposta del GSH al trattamento di Hg mostra un iniziale aumento rispetto al controllo, che diminuisce nel tempo fino a ripristinare i valori iniziali dopo il settimo giorno. L'aumento della sintesi di GSH iniziale suggerisce che questo peptide sia coinvolto nella detossificazione del mercurio.

La concentrazione intracellulare dei peptidi γ -Glu-Cys aumenta lentamente nel tempo, con un forte incremento a partire dal terzo giorno di esposizione, raggiungendo i massimi valori al settimo giorno. Poiché questi peptidi sono un intermedio della sintesi del glutatione, il loro aumento in concomitanza con un abbassamento della concentrazione del GSH fortemente suggerisce la presenza di un processo di degradazione del GSH e, forse, anche delle fitochelatine.

Questi risultati sono in accordo con esperimenti condotti da Morelli and Scarano (2001), in cui cellule di *Phaeodactylum tricornutum* esposte al Cd mostravano una diminuzione di PC in concomitanza ad una perdita del Cd intracellulare, suggerendo un meccanismo di degradazione e/o rilascio di complessi metallo-PC. Inoltre Lee et al. (1996) dimostrarono che la microalga *T. weissflogii* è capace di esportare complessi PC-Cd come meccanismo di detossificazione per questo metallo.

A concentrazioni tali che non implicano sintesi di PC (5 nM di Hg), si è comunque osservato un abbassamento del livello di Hg intracellulare (da 20,6 a 6,7 amol/cell al 1° e al 7° giorno rispettivamente), ma non sono state osservate variazioni significative della concentrazione di GSH rispetto al controllo. Da questi risultati quindi, si evince che sono presenti processi di perdita del mercurio. Questo può essere dovuto ai processi di diluizione del citoplasma dovuti alla crescita esponenziale delle cellule, tuttavia può essere ipotizzata l'esistenza di processi di perdita mediante produzione di mercurio gassoso.

4. Esperimenti di produzione di mercurio gassoso

Allo scopo di misurare il contributo cellulare ai processi di volatilizzazione del mercurio, è stata seguita la distribuzione del mercurio in una coltura di *T. weissflogii* durante la fase di crescita esponenziale e, a tempi diversi (2 e 4 giorni), è stata misurata la produzione di DGM.

Dopo l'aggiunta di Hg (5 nM), e prima di inoculare la coltura, il terreno è stato fatto stabilizzare per 3 giorni. Alla fine dei 3 giorni il mercurio in soluzione (3,2 nM) era il 64 % di quello iniziale. Questa perdita può essere dovuta in parte a processi di adsorbimento sulle pareti del recipiente, tuttavia risultati preliminari hanno mostrato la presenza di una elevata produzione di DGM durante i primi giorni dopo l'aggiunta di Hg, in accordo con studi di Lanzillotta et al., (2004). Questi autori riportano che l'aggiunta del metallo provoca una immediata formazione di Hg^0 dovuta ad una produzione abiotica. Facendo equilibrare il mercurio nel mezzo prima dell'esposizione delle cellule, è stato quindi evitato il mascheramento della produzione biotica di DGM da parte della iniziale produzione abiotica. L'andamento del mercurio totale disciolto presente nel mezzo arricchito, ma senza aggiunta di cellule, riportato in fig 3.5, mostra una leggera diminuzione di concentrazione di mercurio, nel corso dei 7 giorni dell'esposizione, probabilmente ancora dovuto agli stessi processi di volatilizzazione non biologica.

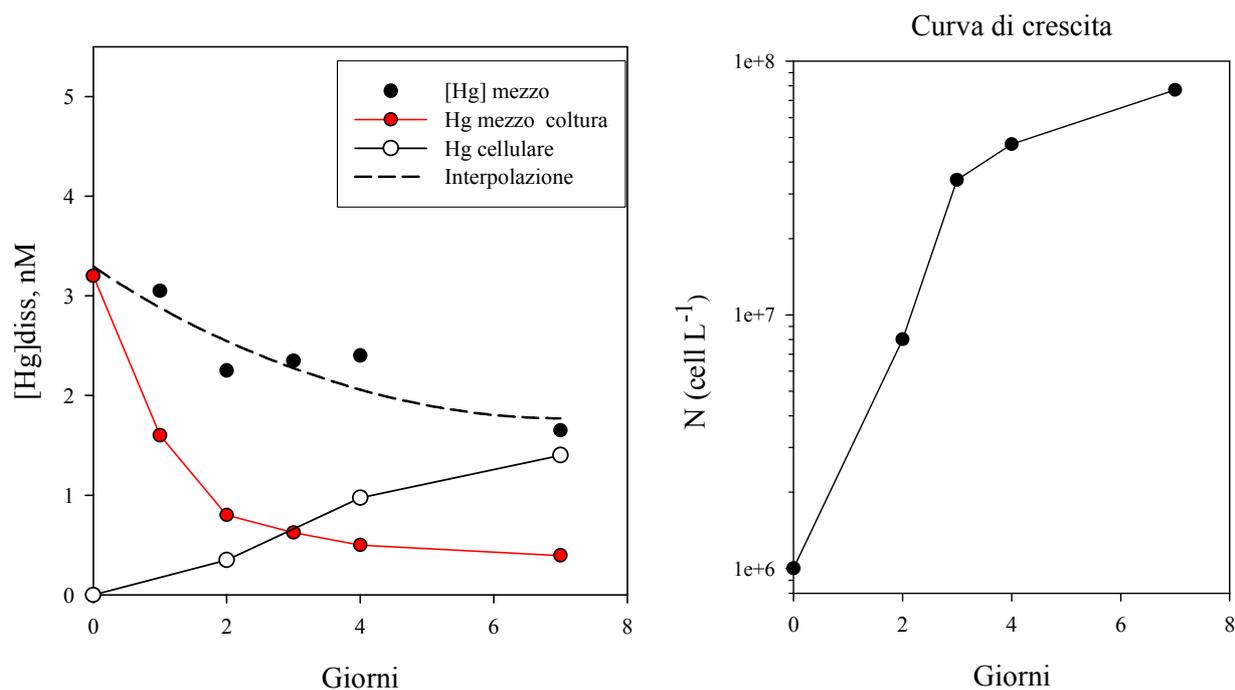


Fig 3.5 A: Relazione tra la concentrazione di mercurio nel mezzo e il mercurio cellulare
 3.5 B: Curva di crescita

Dalla figura 3.5 appare anche che l'aggiunta di cellule provoca una drastica diminuzione della concentrazione di mercurio in soluzione, dovuta, almeno in parte, all'assimilazione del metallo da parte delle cellule. Poiché nei sette giorni di esposizione le cellule sono in fase di divisione (come è possibile osservare nelle curve di crescita della figura 3.5 B), la quantità di Hg associata alle cellule aumenta nel tempo.

Allo scopo di valutare l'importanza delle cellule nella formazione di DGM, sono state effettuate misure per determinare la produzione di mercurio gassoso al secondo e quarto giorno di esposizione al Hg, durante la fase di crescita esponenziale. Tali misure sono state effettuate sia nella coltura che nel mezzo dopo aver rimosso le cellule per filtrazione, per isolare il contributo cellulare (Fig 3.6).

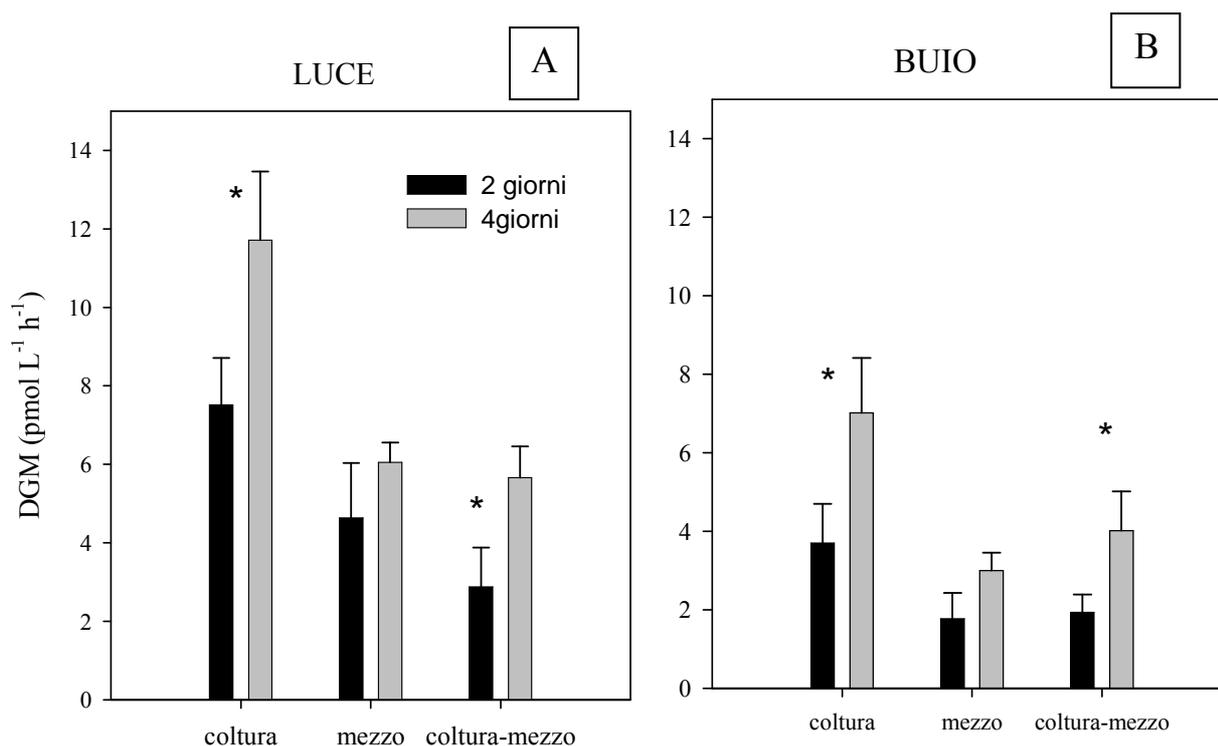


Fig 3.6: Risultati della produzione di DGM in condizioni di luce (A) e in condizioni buio (B)
L'asterisco (*) indica una differenza significativa a livello del 95 %

I risultati della produzione di DGM sono stati riportati sia in condizioni di luce (grafico A), che di buio (grafico B). In generale è possibile osservare una maggiore produzione di mercurio gassoso al quarto giorno piuttosto che al secondo. Poiché, come detto precedentemente, il mercurio in soluzione ha subito una drastica diminuzione ed è aumentata la concentrazione di mercurio cellulare, si ipotizza che questa maggiore produzione presente al quarto giorno, possa dipendere dall'aumento delle cellule in soluzione.

Da un confronto tra i risultati riportati in condizioni di luce e buio, si può osservare che la produzione di DGM nelle colture esposte alla luce risulta sempre essere maggiore rispetto al buio, e questa maggiore produzione è attribuibile al mezzo di coltura. Questo risultato

mostra che il mezzo, arricchito degli essudati cellulari, aumenta la capacità di produrre mercurio gassoso se irraggiato con la luce artificiale.

In accordo con i nostri risultati, Costa and Liss (2000), in esperimenti di irraggiamento controllato di campioni di acqua di mare arricchiti con concentrazioni crescenti di acidi umici, trovano che la reazione di produzione di mercurio gassoso è dipendente dalla concentrazione di DOC (dissolved organic carbon) e dall'intensità della radiazione solare.

I nostri risultati sono anche in accordo con studi di Xiao et al., (1994), Ferrara et al., (2001) e Lanzillotta et al., (2002), nei quali viene riportato che la luce gioca un ruolo chiave nei processi di formazione di DGM e in particolar modo, la maggiore produzione di DGM avviene nel periodo di radiazione solare più intensa. Sebbene i nostri esperimenti siano stati effettuati in condizione di luce artificiale ($100 \mu\text{M fotoni m}^{-2}\text{s}^{-1}$), con una radiazione luminosa molto meno intensa di quella solare, si evince, comunque, l'importanza che svolge la luce nei processi di formazione di DGM.

L'esistenza di una significativa produzione di DGM nel mezzo filtrato è in accordo con studi di Lanzillotta et al., (2002), in cui gli autori ipotizzano un ruolo fondamentale degli essudati rilasciati da questi organismi nei processi di riduzione biologica del mercurio mediata dalla radiazione solare.

Avendo effettuato misure sia in presenza di cellule di *T. weissflogii*, che nel mezzo filtrato, è possibile calcolare per differenza il contributo delle sole cellule alla formazione di DGM. I valori ottenuti mostrano l'esistenza di un significativo contributo delle cellule alla produzione di DGM, suggerendo che esista un processo di riduzione del mercurio operato da microrganismi eucariotici.

Riportando tutti i valori di produzione di DGM in relazione al numero di cellule contate durante ogni esposizione, si può osservare l'esistenza di una relazione positiva tra la densità cellulare e la produzione di DGM, sia in condizione di luce che di buio, come è riportato in

figura 3.4. Il grafico mostra l'esistenza di una stretta dipendenza tra i valori di DGM ottenuti e la densità cellulare misurata nella coltura, confermando il contributo cellulare alla produzione di DGM in coltura.

Studi condotti da Mason et al. (1995), riportano la capacità del fitoplancton eucariotico, inclusa la diatomea *T. weissflogii* utilizzata anche nei nostri esperimenti, di ridurre Hg ad Hg⁰. In questo studio la concentrazione iniziale a cui sono state esposte le microalghe era di 0,5 nM di Hg, mentre tutte le nostre prove di produzione di DGM sono state condotte ad una concentrazione iniziale 10 volte superiore (5 nM). Da un confronto tra le stime di produzione di mercurio elementare riportate da Mason et al., (1995) e i nostri risultati, è possibile osservare un generale accordo (tab.3.1). Infatti, a simili densità cellulari, il nostro studio mostra una produzione di DGM circa 10 volte superiore rispetto a quella trovata da Mason et al., (1995) sulla stessa microalga, che è in accordo con la maggiore esposizione al Hg utilizzata nei nostri esperimenti (vedi tab. 3.1).

	Cellule/L	Hg ⁰ (amol/cell/day)
<i>T.weissflogii</i>	1.1 x 10 ⁷	6.3
<i>T.weissflogii</i>	5.1 x 10 ⁷	2.7
<i>T.weissflogii</i> (Mason et al., 1995)	7.5 x 10 ⁶	0.48
<i>T.weissflogii</i> (Mason et al., 1995)	7.7 x 10 ⁷	0.29

Tab 3.1: Confronto tra i risultati riportati da Mason et al., (1995) e i nostri studi

Questi risultati fortemente suggeriscono che esista un processo di riduzione del mercurio operato da microrganismi eucariotici.

Riportando tutti i valori di produzione di DGM in relazione al numero di cellule contate durante ogni esposizione, si può osservare l'esistenza di una relazione positiva tra la densità cellulare e la produzione di DGM, sia in condizione di luce che di buio, come è riportato in figura 3.1. Il grafico mostra l'esistenza di una stretta dipendenza tra i valori di DGM ottenuti e la densità cellulare misurata nella coltura.

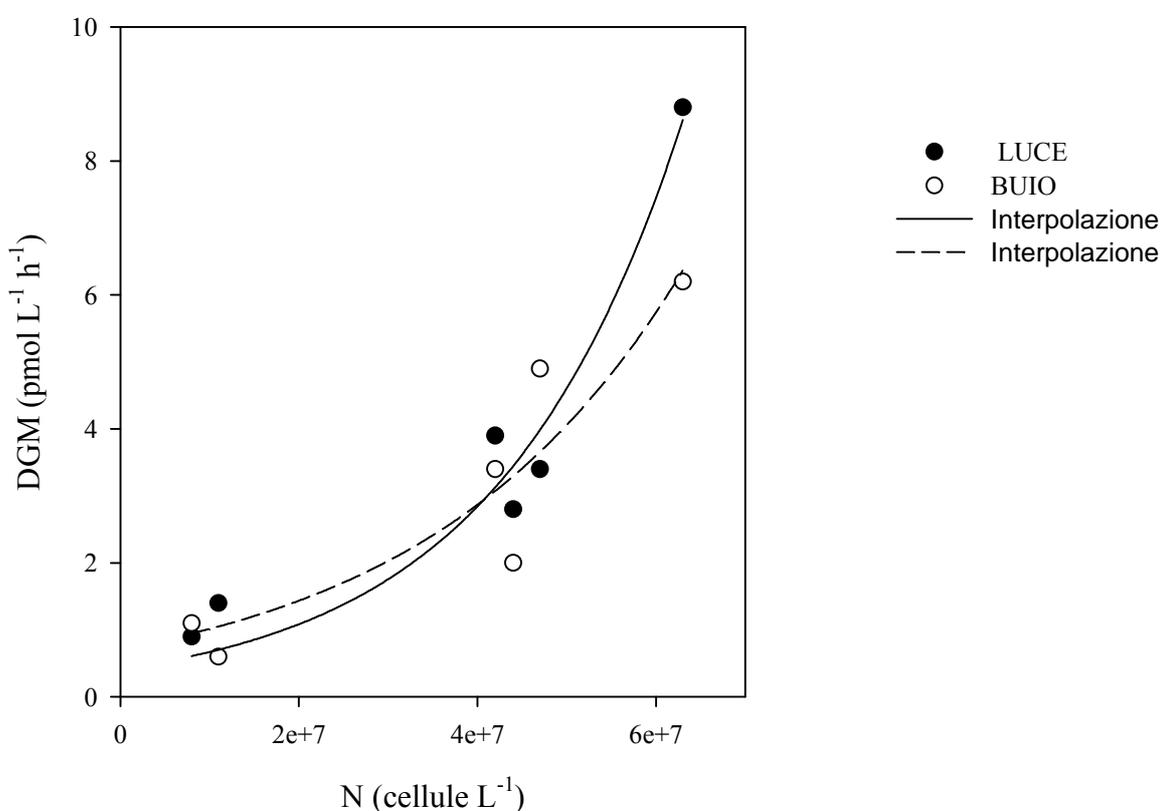


Fig 3.7 Relazione tra il numero di cellule e la produzione di DGM

Per ottenere un'ulteriore prova a conferma del contributo cellulare alla produzione di DGM, è stato effettuato un terzo tipo di esperimento, uccidendo le cellule mediante formaldeide.

I risultati sono riportati in figura 3.8:

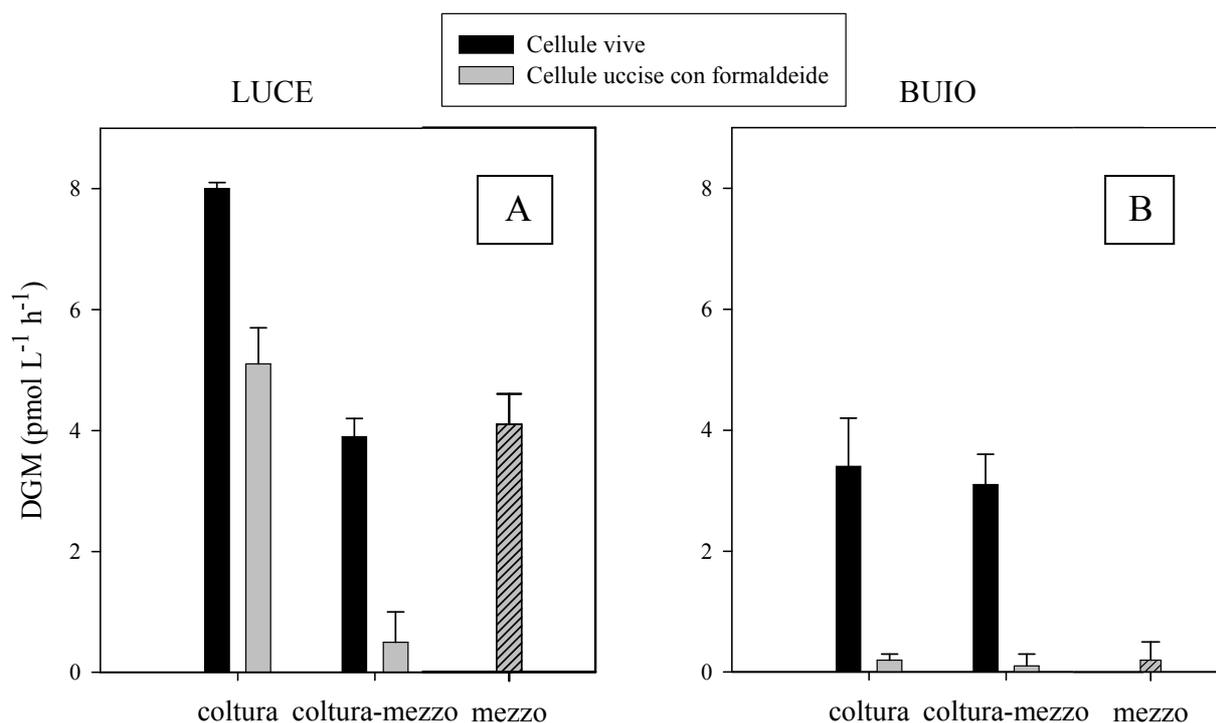


Fig 3.8: Risultati della produzione di DGM in cellule vive e uccise in condizioni di luce(A) e di buio (B)

E' possibile osservare che la produzione di mercurio gassoso misurata nelle colture con cellule trattate con formaldeide ha subito una drastica diminuzione, rispetto a quella misurata nelle colture con cellule non trattate. I valori di DGM calcolati per determinare il contributo cellulare indicano che le cellule uccise, sia al buio che alla luce, non producono quantità misurabili di DGM.

Sebbene la produzione di DGM nelle colture con cellule uccise in condizioni di luce risulti avere valori piuttosto alti, questi sono da attribuire alla sostanza organica rilasciata dalle cellule, come evidenziato dai valori di DGM misurati nel mezzo filtrato. Questi risultati

confermano l'esistenza di un processo di formazione di mercurio gassoso operato dalle diatomee marine.

Tuttavia, poiché è nota dalla letteratura l'esistenza di batteri mercurio-riducenti che operano questi meccanismi di riduzione del mercurio nei sistemi acquatici (Barkay et al., 1991, 2003, Poulain et al., 2004), i dati ottenuti non smentiscono l'ipotesi di una possibile attività nelle reazioni di riduzione del mercurio, legata alla presenza di batteri epibionti e/o endosimbionti, che possono essere associati alle cellule. Ulteriori studi sono necessari per chiarire questo aspetto, e per comprendere i meccanismi cellulari responsabili della riduzione del mercurio in microrganismi eucarioti.

Conclusioni

Questo lavoro è volto a valutare l'importanza di due particolari meccanismi di detossificazione che agiscono nella diatomea marina *T. weissflogii* in risposta all'esposizione al mercurio: la sintesi di tioli non proteici e la produzione di mercurio gassoso.

I nostri risultati mostrano che il mercurio assimilato dalle cellule viene detossificato seguendo due diversi meccanismi: il primo, osservato a basse concentrazioni di Hg (≤ 5 nM), consiste in un processo di trasformazione del mercurio disciolto in specie volatili (DGM) che quindi vengono rilasciate all'atmosfera, e il secondo, osservato a concentrazioni maggiori di Hg (da 10 a 150 nM), implica il coinvolgimento del pool dei tioli non proteici, come le fitochelatine, il glutatione e le γ -Glu-Cys.

I nostri risultati chiaramente mostrano che la diatomea marina *T. weissflogii*, quando esposta al mercurio, risponde con un aumento della sintesi di tioli non proteici. Sebbene in letteratura siano presenti lavori in cui è documentato che le microalghe fitoplanctoniche possono sintetizzare questi peptidi per la detossificazione, la capacità di sintetizzare fitochelatine in risposta al mercurio, è stata poco studiata.

L'andamento nel tempo del pool dei tioli non proteici, studiato in una coltura esposta per 7 giorni a 150 nM Hg, ha mostrato una massima induzione di PC e GSH subito al primo giorno di esposizione al mercurio, in concomitanza con un maggiore accumulo di Hg intracellulare, seguita da un lento abbassamento di entrambi, al procedere del tempo di esposizione. Tali risultati suggeriscono un coinvolgimento delle PC e del GSH in un immediato sequestro di questi ioni metallici in complessi stabili, seguito da processi di rilascio e/o degradazione.

A concentrazioni più basse di mercurio (5 nM), alle quali sembra che non sia implicato il meccanismo di sintesi delle fitochelatine, anche se si osserva un aumento della sintesi del

GSH, è stato possibile osservare che la diatomea *T. weissflogii* risponde con un differente meccanismo di detossificazione, che consiste nella produzione di mercurio gassoso.

Questo lavoro contiene i primi risultati su misure dirette di produzione di DGM in organismi fitoplanctonici, sia in condizioni di illuminazione, che in assenza di luce. Alcuni autori ipotizzano, infatti, una produzione di mercurio gassoso da parte di microrganismi eucarioti, ma queste supposizioni derivano da dati indiretti, ottenuti da calcoli teorici.

Questo lavoro può essere inquadrato in uno studio più generale, volto alla valutazione dell'importanza delle microalghe marine alla produzione di mercurio elementare e alla comprensione del ciclo biogeochimico del mercurio.

E' noto dalla letteratura, che le emissioni dalla superficie acquatica rappresentano il 30% delle emissioni annue globali di questo metallo verso l'atmosfera.

La dimostrazione di una produzione di DGM, sia in condizioni di buio, che di luce, operata dalle diatomee marine, non è stata confrontata con le emissioni biotiche operate dai batteri e con quelle abiotiche dovute alla radiazione solare. Tuttavia queste microalghe, costituendo parte essenziale della biomassa marina, ed essendo presenti nella zone eufotica della colonna d'acqua, potrebbero rivestire un ruolo importante all'interno del ciclo biogeochimico del mercurio, soprattutto in relazione ad un bacino chiuso come il Mar Mediterraneo.

Bibliografia

Ahner B.A., Kong S., Morel F.M.M. (1995) Phytochelatin production in marine algae. 1. An interspecies comparison. *Limnol. Oceanog.* 40, 649-657.

Ahner B.A., Morel F.M.M. (1995) Phytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals. *Limnol. Oceanog.* 40, 658- 665.

Ahner B.A., Wei L., Oleson J.R., Ogura N. (2002) Glutathione and other low molecular weight thiols in marine phytoplankton under metal stress. *Marine Ecology Progress Series* 232, 93-103.

Andren A. W. and Nriagu J. O. (1979). The global cycle of mercury. Chapt. 1. In: *The biogeochemistry of mercury in the environment* (ed. Nriagu J. O.). Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1-22.

Alberts J. J., Schindler J. E. and Miller R. W. (1974). Elemental mercury evolution mediated by humic acid. *Science* 184, 895-897.

Amyot M., Mierle G., Lean D. and McQueen D. (1994). Sunlight-induced formation of dissolved gaseous mercury in lake waters. *Environ. Sci. Technol.* 28, 2366-2371.

Amyot M., Mierle G., Lean D. and McQueen D. J. (1997a). Effect of solar radiation on the formation of dissolved gaseous mercury in temperate lakes. *Geochim. Cosmochim. Acta* 61, 975-987.

Amyot M., Gill G. A. and Morel F. M. M. (1997b). Production and loss of dissolved gaseous mercury in coastal seawater. *Environ. Sci. Technol.* 31, 3606-3611.

Amyot M., Lean D. and Mierle G. (1997c). Photochemical formation of volatile mercury in high Arctic Lakes. *Environ. Toxicol. Chem.* 16(10), 2054-2063.

Amyot M., Lean D. R. S., Poissant L. and Doyon M. R. (2000). Distribution and transformation of elemental mercury in the St. Lawrence River and Lake Ontario. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57 (suppl. 1), 155-163.

Barkay T., Turner R. R., Vandenberg A. and Liebert C. (1991). The relationship of Hg(II) volatilization from freshwater pond to the abundance of mer genes in the gene pool of the indigenous microbial community. *Microb. Ecol.* 21, 151-161.

Barkey T., Miller S. M. and Summers A. O. (2003). Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 355-384.

Ben-Bassat D. and Mayer A. M. (1987). Reduction of mercury chloride by *Chlorella*: evidence for a reducing factor. *Physiol. Plant.* 40, 157-162.

Ben-Bassat D. and Mayer A. M. (1988). Light-induced Hg volatilization and O₂ evolution in *Chlorella* and the effect of DCMU and methylamine. *Physiol. Plant.* 42, 33-38.

Benoit J. M., Mason R. P., Gilmour C. C. and Aiken G. R. (2001). Constants for mercury binding by dissolved organic matter isolates from the Florida Everglades. *Geochim. Cosmochim. Acta* 65, 4445-4451.

Bentz M. (1977). Investigation on the simultaneous uptake and release of mercury by *Dunaliella tertiolecta*. *Mar. Biol.* 41, 89-92.

Bryan GW, Langston WJ (1992) Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: *Environ Pollut* 1992;76(2):89-131.

Christopher S. Cobbett (2000) Phytochelatin Biosynthesis and Function Heavy Metal Detoxification. *Curr Opin Plant Biol* 3; 211-216.

Clarkson T. W. (1994). The toxicology of mercury and its compounds. Chapt. VIII.1. In: *Mercury pollution. Integration and synthesis.* (eds. Watras C. J. and Huckabee J. W.). Lewis Publishers, 631-641.

Costa M. and Liss P. (1999). Photoreduction of mercury in sea water and its possible implication for Hg⁰ air-sea fluxes. *Mar. Chem.* 68, 87-95.

Costa M. and Liss P. (2000). Photoreduction and evolution of mercury from seawater. *Sci Total Environ.* 261, 125-135.

Devars S, Aviles C, Cervantes C, Moreno-Sancez R (2000) Mercury uptake and removal by *Euglena Gracilis*. *Arch. Microbiol* 164; 175-180.

Edner H., Ragnarson P., Svamberg S., Wallinder E., De Liso A., Ferrara R. and Maserti B. E. (1992). Differential absorption Lidar mapping of atmospheric atomic mercury in Italian geothermal fields. *J. Geophys. Res.* 97, 3779-3786.

Fahey R.C., Newton G.L. (1987) Determination of low-molecular-weight thiols using monobromobimane fluorescent labelling and high-performance liquid chromatography. In: Jakoby W.B., Griffith O.W., eds. *Methods in Enzymol.* 143. Academic Press New York, 85-96.

Ferrara R., Maserti B. E., Andersson M., Edner H., Ragnarson P. and Svanberg S. (1997). Mercury degassing rate from mineralized areas in the Mediterranean basin. *Water, Air and Soil Poll.* 93, 59-66.

Ferrara R., Mazzolai B. (1998). A dynamic flux chamber to measure mercury emission from aquatic system. *Sci. Total Environ.* 215, 51-57.

Ferrara R., Mazzolai B., Lanzillotta E., Nucaro E. and Pirrone N. (2000a). Temporal trends in gaseous mercury evasion from the Mediterranean seawater. *Sci. Total Environ.* 259, 183-190.

Ferrara R., Mazzolai B., Lanzillotta E., Nucaro E. and Pirrone N. (2000b). Volcanoes as emission sources of atmospheric mercury in the Mediterranean basin. *Sci. Total Environ.* 259, 115-121.

Ferrara R., Lanzillotta E., Ceccarini C. (2001). Dissolved gaseous mercury concentration and mercury evasion flux from seawater in front of a chlor-alkali plant. *Environ. Technol.* 22, 971-978.

Ferrara R., Ceccarini C., Lanzillotta E., Gardfeldt K., Sommar J., Horvat M., Logar M., Fajon V. and Kotnik J. (2003). Profiles of dissolved gaseous mercury concentration in the Mediterranean seawater. *Atmos. Environ.* 37, S85-S92.

Fitzgerald W. F., Mason R. P. and Vandal G. M. (1991). Atmospheric cycling and air-water exchange of mercury over mid-continental lacustrine regions. *Water, Air and Soil Poll.* 56, 745-767.

Friederich M., Kneer R., Zenk M.H. (1998) Enzymic synthesis of phytochelatin in gram quantities. *Phytochem.* 49, 2323-2329.

Gardfeldt K., Feng X., Sommar J., Lindqvist O. (2001). Total gaseous mercury exchange between air and water at river and sea surfaces in Swedish coastal regions. *Atmos. Environ.* 35(17), 3027-3038.

Gekeler W., Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H. (1988) Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Arch. Microbiol.* 150, 197-202.

Grier N. (1968). Mercury. In: The Enciclopedia of Chemical Elements (ed. Hampel, C.a.). Reinhold, New York, 401-412.

Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H. (1985) Phytochelatins: the principal heavy metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230, 674-676.

Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H. (1987) Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallathioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 439-443.

Grill E., Thumann J., Winnacker E.L., Zenk M.H. (1988a) Induction of heavy-metal binding phytochelatins by inoculation of cell cultures in standard media. *Plant Cell Rep* 7, 375-378.

Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H. (1988b) Occurrence of heavy-metal binding phytochelatins in plants growing in a mining refuse area. *Experimen.* 44, 539-540.

Grill E., Loeffler S., Winnacker E-L., Zenk M.H. (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6838-6842.

Guandalini E. and Mantovani A. (1988). Il metilmercurio nei prodotti ittici. *Ambiente Risorse Salute*. Marzo, 8-11.

Guillard R.R.L. (1975) Cultures of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith W.L., Chanley M.H. (eds), Culture of marine invertebrates animals, pp 29-60. Plenum, New York.

Gupta M., R.D Tripathi, U.N Rai and P. Chandra (1998) Role of Glutathione and Phytochelatin in Hydrilla Verticillata royle and Vallisneria Spiralis L. Under mercury stress. Chemosphere vol 37 No. 4, pp 785-800.

Harada M. (1995). Minamata Disease: Methylmercury Poisoning in Japan Caused by Environmental Pollution. *Toxicol.* 25, 1-24.

Horvat M., Kotnik J., Fajon V., Logar M., Zvonaric T., Pirrone N. (2001) Speciation of mercury in waters of the Mediterranean Sea. In: Hines M.E., Horvat M., Faganeli J. editors. RMZ – Materials and Geoenvironment. Workshop on mercury in the Idria Region and Northern Adriatic. Portoroz, vol. 48(1), pp. 241-252.

Hu S, Wu M. (1998) Cadmium sequestration in the marine macroalga *Kappaphycus alvarezii*. *Mol Mar Biol Biotechnol* 7, 97-104.

Hudson R. J. M., Gherini S. A., Watras C. J. and Porcella D. B. (1994). Modelling the biogeochemical cycle of mercury in lakes: the MCM model and its application to the MTL lakes. In: Watras C.J., Huckabee J.W. editors. Mercury Pollution Integration and Synthesis. Lewis Publishers, Boca Raton, USA. Chapt. V.1, pp. 473-526.

Jones G. J., Waite T. D. and Smith J. D. (1985). Light-dependent reduction of copper(II) and its effect on cell-mediated, thiol-dependent superoxide production. *Biochem. Res. Comm.* 128, 1031-1036.

Jones G. J., Palenik B. P. and Morel F. M. M. (1986). Trace metal reduction by phytoplankton: the role of plasmalemma redox enzymes. *J. Phycol.* 23, 237-244.

Kawakami S.K., Gledhill M., Achterberg E.P. (2006) Effects of metal combination on the production of phytochelatins and glutathione by marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *BioMetals* 19, 51-60.

Kawakami S.K., Gledhill M., Achterberg E.P. (2006) Production of phytochelatins and glutathione by marine phytoplankton in response to metal stress. *J. Phycol.* 42, 975-989.

Kelly DJ, Budd K, Lefebvre DD (2007). Biotransformation of mercury in pH-stat cultures of eukaryotic freshwater algae *Arch Microbiol.* Jan;187(1):45-53.

Khera K. S. (1979). Teratogenic and genetic effects of mercury toxicity. Chapt. 19. In: *The biogeochemistry of mercury in the environment* (ed. Nriagu). Elsevier/North.Holland Biomedical Press, 503-518.

Kim J. P. and Fitzgerald W. F. (1986). Air partitioning of mercury in the Equatorial Pacific Ocean. *Science* 23, 1131-1133.

Kim J. and Fitzgerald W. F. (1988). Gaseous mercury profiles in the Tropical Pacific Oceans. *Geophys. Res. Letters* 15, 40-43.

Klapheck S., Fliegner W., Zimmer I. (1994) Hydroxymethyl-phytochelatins [(γ -glutamylcysteine)_n-serine] are metal-induced peptides of the Poaceae. *Plant Physiol.* 104, 1325-1332.

Knauer K., Ahner B., Xue H.B., Sigg L. (1998) Metal and phytochelatin content in phytoplankton from freshwater lakes with different metal concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 2444-2452.

Kneer R., Zenk M. H. (1992). Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochem.* 31, 2663-2667.

Lalonde J.D., M. Amyot, A.M.L. Kraepiel, F.M.M. Morel. (2001). Photooxidation of Hg(0) in artificial and natural waters. *Environ. Sci. Technol.* 35: 1367-1372.

Lanzillotta E., Ceccarini C., Ferrara R. (2002). Photo-induced formation of dissolved gaseous mercury in coastal and offshore seawater of the Mediterranean basin. *Sci. Total Environ.* 300/1-3, 193-201.

Lanzillotta E., Ceccarini C., Ferrara R., Dini F., Frontini F.P., Banchetti R (2004). Importance of the biogenic organic matter in photo-formation of dissolved gaseous mercury in a culture of the marine diatom *Chaetoceros* sp. *Sci. Total Environ.*

Lee J.G., Ahner B.A., Morel F.M.M. (1996) Export of cadmium and phytochelatin by the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Environ. Sci. & Technol.* **30**, 1814-1821.

Lin C.-J., Pehkonen S. (1999) Aqueous phase reactions with free radicals and chlorine: implications for atmospheric mercury chemistry. *Chem.* **38**, 1253-1263.

Lindberg S. E., Vette A. F., Miles C. and Schaedlich F. (2000). Mercury speciation in natural waters: measurements of dissolved gaseous mercury with a field analyzer. *Biogeochem.* **48**(2), 237-259.

Lindqvist O., Jernelov A., Johansson K. and Rodhe H. (1984). Mercury in the Swedish environment. Global and local sources. National Swedish Environment Protection Board, Report snv pm 1816.

Lindqvist O. (1994). Atmospheric cycling of mercury: an overview. In: Watras C.J., Huckabee J.W. editors. *Mercury Pollution Integration and Synthesis*. Lewis Publishers, Boca Raton, USA. Chapt. II.1, pp. 181-185.

Maitani T., Kubota H., Sato K., Yamada T. (1996). The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol.* **110**: 1145-1150.

Mason R. P., Fitzgerald W. F. and Morel M. M. (1994). The biogeochemical cycling of elemental mercury: anthropogenic influences. *Geochem. Cosmochem. Acta.* **58**, 3191-3198.

Mason, R.P., Morel, F.M.M. and Hemond, H. F. (1995) The role of microorganism in elemental mercury formation in natural waters. *Water, Air and Soil Poll.* 80, 775-787.

Mason R. P., Lawson N. M. and Sheu G. R. (1999). Mercury in the Atlantic Ocean: factors controlling air-sea exchange of mercury and its distribution in the upper waters. *Deep-Sea Res.* 46, 937-956.

Mason R. P. and Sullivan K. A. (1999). Mercury in the South and Equatorial Atlantic. *Deep-Sea Res. II* 46, 937-956. *Biochem. J.* (1996) 314 (73–82).

Mason R.P., Lawson N.M., Sheu G.R. (2001). Mercury in the Atlantic Ocean: factors controlling air-sea exchange of mercury and its distribution in the upper waters. *Deep-Sea Res. II* 48, 2829-2853 .

Matthiessen A. (1998) Reduction of divalent mercury by humic substances- kinetic and quantitative aspects. *Sci Total Environ*; 213:177-183.

Mehra, Jose Mielat, V. Ramana Kodati, Rizwana Abdullah Thomas C. Hunter and Priti Mulchandani (1996) Optical spectroscopic and reverse-phase HPLC analyses of Hg(II) binding to phytochelatins. *Biochem J.* 15; 314(Pt 1): 73–82.

Meuwly P., Thibault P., Schwan A.L., Rauser W.E. (1995) Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. *Plant J.* 7, 391-400.

Moore, B. (1960). A new screen test and selective medium for the rapid detection of epidemic strains of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* ii, 453-458.

Morelli E, Scarano G. (2001) Synthesis and stability of phytochelatins induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar Environ Res* 52, 383-395.

Morelli E., Cruz B.H., Somovigo S., Scarano G. (2002) Speciation of cadmium- γ -glutamyl peptides complexes in cells of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Sci.* 163, 807-813.

Morelli E, Scarano G. (2004) Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant scie.* vol.167 n°2, pp. 289-296.

Morelli E, Mascherpa MC, Scarano G (2005). Biosynthesis of phytochelatins and arsenic accumulation in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* in response to arsenate exposure *Biometals.* Dec;18(6):587-93.

Newton G.L., Dorian L., Fahey R.C. (1981) Analysis of biological thiols: derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 114, 383-387.

Noctor G, Foyer (1998). Ascorbate and Gluthatione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* Jun;49:249-279.

Nriagu J. O. (1994). Mechanistic steps in the photoreduction of mercury in natural waters. *Sci Total Environ.* 154, 1-8.

Poulain AJ, Amyot M, Findlay D, Telor S, Barkay T, Hintelmann H.(2004) Biological and photochemical production of dissolved gaseous mercury in a boreal lake. *Limnol.Oceanog.*49:2265-2275.

Rauser W.E. (1995) Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis and function. *Plant Physiol.* 109, 1141-1149.

Rauser W.E.(2000) Roots of maize seedlings retain most of their cadmium through two complexes. *J Plant Physiol* 109, 1141-1149.

Rijstenbil J.W., Wijnholds J.A. (1996) HPLC analysis of non protein thiols in planktonic diatoms: pool size, redox state and response to copper cadmium exposure. *Mar. Biol.* 127, 45-54.

Rüegsegger A., Brunold C. (1992) Effect of cadmium on γ -glutamylcysteine synthesis in maize seedlings. *Plant Physiol.* 99, 428-433.

Rüegsegger A., Schmutz D., Brunold C. (1990) Regulation of glutathione synthesis by cadmium in *Pisum sativum*. *L. Plant Physiol.* 93, 1579-1584.

Sanemasa, I., Kobayashi, T., Deguchi, T., Nagai, H., (1983). The disproportionation constants of mercury (I) in dilute solution II. *Bull. Chem. Soc.Jpn.*56, 1231-1232.

Satoh M. Yoshinobu H.; Yoshioka Ai ; Kobayashi M. ; Oyama Y. (2002). Determination of cellular levels of nonprotein thiols in phytoplankton and their correlations with susceptibility to mercury *Journal of phycology*, vol. 38, n°5, pp. 983-990.

Scarano G, Morelli E. (2002) Characterization of cadmium- and lead-phytochelatin complexes formed in a marine microalga in response to metal exposure. *Biometals*. Jun;15(2):145-51.

Schroeder W. H., Munthe J. and Lindqvist O. (1989). Cycling of mercury between water, air and soil compartments. *Water, Air and Soil Poll.* 48, 337-347.

Schroeder W. H., Ebinghaus R. and Shoeib M. (1994). Atmospheric mercury measurements in the Northern Hemisphere from 56° to 82.5° N latitude. *Water, Air and Soil Poll.* 80, 1217-1226.

Schweinsberg F. (1994). Risk estimation of mercury intake from different sources. *Toxicol. Letters*. 72, 181-186, 345-351.

Seritti A., Ferrara R., Morelli E., Barghigiani C. and Petrosino A. (1986). Trace metals in marine environment in relation to the study of their biogeochemical cycle. *Chem. Ecol.* 2, 49-53.

Spokes L. J. and Liss P. S. (1995). Photochemically induced redox reactions in seawater. I. Cations. *Marine Chem.* 49, 201-213.

Steffens J.C., Hunt D.F., Williams B.G. (1986) Accumulation of non-protein metal-binding polypeptides (γ -glutamyl-cysteinyl)_n-Glycine in selected cadmium-resistant tomato cells. *J. Biol. Chem.* 261 (30), 13879-13882.

Sunda W, Kieber DJ, Kiene RP, Huntsman S. (2002) An antioxidant function for DMSP and DMS in marine algae. *Nature*. Jul 18;418(6895):317-20.

Vacchina V., R. Lobinski, M. Oven and M.H. Zenk (2000) Signal identification in size-exclusion HPLC-ICP-MS chromatograms of plant extracts by electrospray tandem mass spectrometry *Journal Anal. Atomic Spectr.*, 15 (5), pp 529-534.

Vatamaniuk O. K., Mari S., Lu Y.-P., Rea P. A. (2000). Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase; blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *J. Biol. Chem.* 275, 31451-31459.

Wei L.P., Donat J.R., Fones G., Ahner B.A. (2003) Interactions between Cd, and Cu, and Zn influence particulate phytochelatin concentrations in marine phytoplankton: laboratory results and preliminary field data. *Environ. Sci. & Technol.* 37, 3609-3618.

Wilkinson S.C., K.H. Goulding and P.K. Robinson (1989) Mercury accumulation and volatilization in immobilized algal cell systems. *Biotechnology Letters* Vol 11 No 12 861-864.

Xiang C, Oliver DJ. (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in Arabidopsis. *Plant Cell. Sep;10(9):1539-50.*

Xiao Z. F., Munthe J., Strömberg D. and Lindqvist O. (1994). Photochemical behaviour of inorganic mercury compounds in aqueous solution. In: Watras C. J., Huckabee J. W. editors. *Mercury Pollution Integration and Synthesis.* Lewis Publishers, Boca Raton, USA. Chapt. VI.6, pp. 581-591.

Zenk M.W. (1996) Heavy metals detoxification in higher plants – a review. *Gene* 179, 21-30.

Zhang H. and Lindberg S. (2000). Air/water exchange of mercury in the Everglades I: the behavior of dissolved gaseous mercury in the Everglades Nutrient Removal Project. *Sci. Total Environ.* 259, 123-133.