



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Facoltà di Scienze MM.FF.NN

Dipartimento di Biologia

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA

XX CICLO

**STUDI TASSONOMICI, FILOGENETICI E FUNZIONALI DI
MICRORGANISMI FOTOSINTETICI ADATTATI AD ESTREMI DI
TEMPERATURA**

Coordinatore: Ch.mo Prof. Giorgio Casadoro

Supervisore: Ch.ma Prof. ssa Nicoletta Rascio

Dottoranda: Monica Di Bella

31 Gennaio 2008

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA
(XX CICLO)**

Dottoranda: MONICA DI BELLA

Titolo della tesi:

**STUDI TASSONOMICI, FILOGENETICI E FUNZIONALI DI
MICRORGANISMI FOTOSINTETICI ADATTATI AD ESTREMI DI
TEMPERATURA**

Riassunto

Il presente programma di ricerca ha riguardato lo studio morfologico, ultrastrutturale, fisiologico e tassonomico di una microalga psicrofila isolata da un campo di neve del ghiacciaio dell'Antelao (Dolomiti) e di alcuni cianobatteri delle acque termali del Comprensorio Euganeo.

Lo scopo della ricerca, condotta su questi interessanti microrganismi fotosintetici, viventi in habitat con così severe condizioni di temperatura, è stato quello di ottenere nuove informazioni sulle caratteristiche ultrastrutturali, la collocazione tassonomica e i meccanismi fisiologici che permettono loro di affrontare le severe condizioni di temperatura e le variazioni che questo fattore ambientale può subire.

Per la microalga verde psicrofila "*Chlorella*" *saccharophyla* sono state allestite colture alle temperature di 4, 8 e 16°C, per analizzare gli effetti sulle cellule algali delle variazioni della temperatura di crescita.

Le colture algali hanno dimostrato di rispondere positivamente all'aumento della temperatura, con un incremento della velocità di crescita. La salita della temperatura non interferiva con l'organizzazione ultrastrutturale delle cellule e non causava variazioni del loro contenuto in clorofille, mentre portava ad un aumento della quantità di carotenoidi e del rapporto carotenoidi/clorofille. La stabilità e funzionalità dei fotosistemi erano mantenute, come suggerito dai valori costanti dei rapporti Fv/Fm, dalla costante quantità di componenti polipeptidici

essenziali (D1 e LHCII) e dalla preservazione della corretta organizzazione ultrastrutturale delle membrane tilacoidali. All'aumento della temperatura di crescita si osservava un aumento significativo dell'attività fotosintetica delle colonie, misurata come emissione di ossigeno *in vivo*. Questa era plausibilmente dovuta all'aumento della velocità delle reazioni enzimatiche. Il confronto degli spettri di emissione di fluorescenza *in vivo* (a 77K) delle colture cresciute alle diverse temperature evidenziava una diminuzione dei picchi di emissione del PSII alle più alte temperature, suggerendo una transizione di stato dei fotosistemi dallo stato 1 (con il LHCII associato al PSII) allo stato 2 (con il LHCII trasferito al PSI). Questo cambio, che modificava la distribuzione dell'energia di eccitazione tra i fotosistemi era termo-modulato e poteva essere visto come una risposta adattativa delle cellule algali.

Per quanto riguarda la velocità di respirazione delle cellule algali, non è stata rilevata, interessanti, alcuna sostanziale differenza nelle colture cresciute alle differenti temperature. L'analisi della respirazione, effettuata dopo trattamento con inibitori specifici delle due distinte vie mitocondriali di trasporto elettronico, così come l'analisi Western condotta con un anticorpo contro l'ossidasi alternativa (AOX), suggerivano che la mancanza della diminuzione del consumo di ossigeno alle più basse temperature potesse dipendere da una elevata attività della via alternativa cianuro-resistente.

La temperatura più adatta alla crescita della microalga psicrofila, comunque, era quella di 4°C. Infatti, le temperature più alte, anche se mantenevano o addirittura incrementavano la velocità di crescita, portavano nel tempo ad una senescenza anticipata delle colture algali.

Il primo cianobatterio delle acque termali Euganee ad essere studiato è stato una forma coccoide che l'analisi filogenetica ha permesso di riconoscere come una nuova specie del genere *Cyanobacterium*. Questo cianobatterio è stato chiamato *Cyanobacterium aponinum*.

Le analisi condotte su colture mantenute a differenti temperature hanno dimostrato che *Cyanobacterium aponinum* cresceva a temperature nel range di circa 20-40°C. Comunque, in confronto con le cellule ovoidali cresciute a 30°C, quelle mantenute a 40°C, che erano diventate rotondeggianti e più voluminose,

mostravano una diminuzione dell'attività fotosintetica (misurata come emissione *in vivo* di ossigeno, riferita a quantità di clorofilla), una riduzione della quantità della proteina D1 del centro di reazione del PSII (evidenziata dall'analisi Western con un anticorpo specifico) e una diminuzione del rapporto Fv/Fm (misurato dall'emissione di fluorescenza della clorofilla *a*). Tutti questi risultati suggerivano una inibizione e un danno di alcune unità del PSII.

Interessantemente l'analisi dell'emissione di fluorescenza *in vivo* a 77K mostrava che l'aumento della temperatura di crescita da 30 a 40°C, in cellule esposte alle stesse condizioni di illuminazione, causava una transizione dei fotosistemi dallo stato 1, con i ficobilisomi legati al PSII allo stato 2, con i ficobilisomi legati al PSI. L'aumento della temperatura a 45°C causava la morte del cianobatterio in pochi giorni. La morte avveniva, sorprendentemente, attraverso un ordinato programma di eventi. Più precisamente, si determinava una graduale e direzionata demolizione dei pigmenti fotosintetici e dei tilacoidi dal centro verso la periferia delle cellule, evidenziata dalla scomparsa della autofluorescenza rossa della clorofilla. Inoltre, la colorazione con DAPI e l'analisi elettroforetica dimostravano che il DNA veniva degradato e l'analisi Western evidenziava l'aumento nelle cellule algali di una proteina riconosciuta da un anticorpo contro la caspasi-3 umana. Alla fine rimanevano solo "ghosts" delle cellule, che erano apparentemente integre ma prive di tilacoidi e di ogni altro componente interno riconoscibile.

Un ulteriore cianobatterio studiato è stata una forma filamentosa che cresceva in coltura a temperature più alte di 20°C e più basse di 55°C.

L'analisi filogenetica ha permesso di riconoscere il cianobatterio esaminato come una specie appartenente al genere *Leptolyngbya*, per cui è stato denominato *Leptolyngbya* sp. ETS-04.

Al microscopio a trasmissione il cianobatterio filamentoso cresciuto a 30°C era costituito da cellule rettangolari con tilacoidi periferici distribuiti parallelamente alla parete cellulare. I filamenti erano circondati da una guaina ben definita. L'aumento della temperatura a 40°C non modificava le caratteristiche ultrastrutturali delle cellule di *Leptolyngbya* sp. ETS-04. A 50°C, invece, il cianobatterio era caratterizzato da massicce guaine mucillaginose che potevano racchiudere più di un filamento. Su una base di peso secco, non si rilevavano

differenze sostanziali nei contenuti in pigmenti fotosintetici tra colture cresciute a 30 e 40°C. A 50°C, invece, tutti i pigmenti fotosintetici subivano una drastica diminuzione. I cambi di temperatura non interferivano con i rapporti tra ficobiliproteine, che mostravano sempre la preminenza (circa 70%) di ficocianobilina. L'emissione di fluorescenza *in vivo* (a 77K) delle cellule cianobatteriche, cresciute alle tre temperature non rivelava differenze sia con eccitazione a 560 nm (per le ficobiline) che a 440 nm (per la clorofilla *a*) e dimostrava che i fotosistemi si mantenevano nello stato di transizione 1, con i ficobilisomi associati al PSII. Il picco molto alto della ficocianina confermava la presenza di ficobilisomi molto ricchi in questo pigmento.

L'attività fotosintetica, misurata come emissione di ossigeno *in vivo*, riferita a quantità di clorofilla, diminuiva nelle colture cresciute a 50°C. Inoltre, a questa temperatura si osservava anche la riduzione dei valori del rapporto Fv/Fm (ricavati dall'emissione di fluorescenza della clorofilla *a*) Tutto ciò suggeriva una certa inattivazione del PSII.

Così la temperatura di 50°C, anche se permetteva la crescita delle colture di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 risultava essere già stressante per questo cianobatterio termale.

L'aumento della temperatura a 55°C portava alla morte di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 in pochi giorni. La morte avveniva per una massiccia demolizione delle cellule, con la persistenza di detriti cellulari all'interno delle guaine mucillaginose.

L'ultimo cianobatterio studiato è stato un ceppo filamentoso che è stato caratterizzato solo da un punto di vista morfologico, ultrastrutturale e filogenetico. Le caratteristiche di questo microrganismo erano confrontabili con quelle di *Conferva duplisecta* Pollini, descritta nel 1817 e mai più segnalata nel Distretto Euganeo. Le analisi morfologiche e ultrastrutturali e le analisi molecolari hanno permesso una più precisa definizione della tassonomia di questo cianobatterio, che è stato ascritto al genere *Oscillatoria*. Sulla base dei risultati ottenuti e della più recente tassonomia dei cianobatteri per questo isolato è stato suggerito il nome di *Oscillatoria duplisecta*.

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA
(XX CICLO)**

Dottoranda: MONICA DI BELLA

Titolo della tesi:

**TAXONOMICAL, PHYLOGENETIC AND FUNCTIONAL STUDIES ON
PHOTOSYNTHETIC MICRORGANISMS ADAPTED TO EXTREMES OF
TEMPERATURE**

Abstract

This research dealt with a morphological, ultrastructural, physiological and taxonomical study on a cryophilic microalga isolated from a snow field of the Antelao (Dolomiti) glacier and some cyanobacteria from the thermal waters of the Euganean District. The aim of the research on these interesting photosynthetic microorganisms, living in habitats with so severe temperature conditions, was to obtain new information about the ultrastructural features, the taxonomic collocation and the physiological mechanisms enabling them to cope with the severe temperature conditions and also with the changes in this environmental factor.

The green cryophilic microalga "*Chlorella*" *saccharophila*, was cultured at 4°, 8° and 16°C in order to analyze the effects of the change in growth temperature.

The algal cultures responded positively to the temperature rise, showing an increase of the growth rate. The rise of the growth temperature did not affect the ultrastructure of the cells and did not change their content in chlorophylls, while it led to an increase of both carotenoid amount and carotenoid/chlorophyll ratio. The stability and functionality of the photosystems were maintained, as suggested by the constant values of the Fv/Fm ratios, the unchanged quantity of essential

polypeptidic components (D1 and LHCII) and by the preservation of the correct ultrastructural organization of the thylakoidal membranes. At the rise of the growth temperature a significant increase of the photosynthetic activity, measured as *in vivo* oxygen emission, occurred. This was plausibly due to the increase of the rate of enzymatic reactions. The comparison of the *in vivo* fluorescence emission spectra (at 77K) of the algal cultures growth at the different temperatures evidenced a decrease of the emission peaks of PSII at the higher temperatures, suggesting a state transition of photosystems from state 1 (with LHCII associated to PSII) to state 2 (with LHCII moved to PSI). This change, which modified the excitation energy distribution between the photosystems was thermo-modulated and could be seen as an adaptive response of the algal cells.

As regards the respiration rate of the algal cells, it, interestingly, did not show substantial changes in cultures grown at the different temperatures. Respiration analyses, accomplished after treatments with inhibitors of the distinct mitochondrial electron transport pathways, as well as Western analysis carried out with an antibody against the alternative oxidase (AOX) suggested that the lack of decrease in oxygen consumption at the lower temperature could depend on a great activity of the alternative cyanide-resistant pathway.

The more suitable temperature for the growth of the cryophilic microalga, however, was that of 4°C. In fact, the higher temperatures, although maintaining and even increasing the growth rate, led in time to an anticipated senescence of the algal cultures.

The first cyanobacterium from the Euganean thermal waters which was studied was a coccoid strain that the phylogenetic analysis led to consider as a new species of the *Cyanobacterium* genus. This cyanobacterium was named *Cyanobacterium aponinum*.

Analyses carried out on cultures maintained at different temperatures showed that *C. aponinum* grew at temperatures in the range of about 20-40°C. However, in comparison with the ovoidal cells grown at 30°C, those maintained at 40°C, which had become roundish and larger, showed a decrease of photosynthesis (as *in vivo* O₂ emission referred to chlorophyll amount), a reduction of the quantity of D1 protein of the reaction centre of PSII, evidenced by Western analysis, and a

lowering of the Fv/Fm value (as chlorophyll fluorescence emission). All these results suggested an inhibition and a damage of some PSII units.

Interestingly, the analysis of *in vivo* fluorescence emission at 77K showed that the increase of growth temperature from 30° to 40°C in cells exposed to the same light conditions caused a transition of the photosystems from the state 1, with the phycobilisomes linked to the PSII, to the state 2, with the phycobilisomes linked to PSI.

The increase of the temperature at 45°C led to the death of the cyanobacterium in few days.

The death occurred surprisingly through an orderly programme of events. More precisely, a gradual and directed demolition of the photosynthetic pigments and thylakoids occurred from the centre towards the periphery of the cells, evidenced by a disappearance of chlorophyll autofluorescence. Moreover, the DAPI staining and the electrophoretic analysis showed that the DNA was degraded and a Western analysis demonstrated the increase in the algal cells of a protein recognized by an antibody against the human caspase-3. At the end, only ghosts of cells remained, which were apparently integral but lacking in thylakoids and in all the other recognizable cellular components.

Another cyanobacterium studied was a filamentous strain, which grew in culture at temperatures higher than 20°C and lower than 55°C.

The phylogenetic analysis led to consider the examined strain as a species belonging to the genus *Leptolyngbya*, so that it was named *Leptolyngbya* sp. ETS-04.

At the transmission electron microscope the strain grown at 30°C was constituted by rectangular cells with peripheral thylakoids arranged parallel to the cell wall. The filaments were surrounded by a well defined sheath. The increase of temperature at 40°C did not change the ultrastructural features of the *Leptolyngbya* sp. ETS-04 cells. At 50°C the cyanobacterium was characterized by huge mucilaginous sheaths, which could enclose more than one filament.

On a dry weight basis not substantial differences in photosynthetic pigments were found between cultures grown at 30 and 40°C. At 50°C, instead, all the pigment

contents decreased. The changes of temperature did not affect the phycobiliprotein ratios showing the preminence (about 70%) of phycocyanin.

The *in vivo* fluorescence emission (at 77K) of the cyanobacterium cells, grown at the three temperatures, did not exhibit remarkable differences both with excitation at 560 nm (for phycobilins) and at 440 nm (for chlorophyll a) and showed that the photosystems remained in the transition state 1. The very high peaks of the phycocyanin confirmed the presence of phycobilisomes very rich in this pigment.

The photosynthetic activity, measured as *in vivo* O₂ evolution on the basis of chlorophyll amount, decreased in the culture grown at 50°C. Furthermore, also a reduction in the Fv/Fm ratio values (as chlorophyll fluorescence emission) occurred at this temperature. All this suggested some inactivation of PSII.

Thus, the temperature of 50°C, although permitting the growth in culture of *Leptolyngbya* sp. ETS-04, results to be already stressing for this thermal strain.

The increase of the temperature at 55°C led to the death of the cyanobacterium in few days.

The death occurred through a massive demolition of the cells, with some debris remaining inside the mucilaginous sheaths.

The last cyanobacterium studied was a filamentous strain, which was characterized only from a morphological, ultrastructural and phylogenetic point of view.

The morphological features were comparable with those of *Conferva duplisecta* Pollini, described in 1817 and never more signalized in the Euganean District. Morphological, ultrastructural and molecular analyses allowed a more precise definition of the taxonomy of this cyanobacterium ascribing it to the genus *Oscillatoria*. On the basis of the obtained results and of the more recent cyanobacterium taxonomy the name suggested for this isolated was *Oscillatoria duplisecta*.

INDICE

<u>1. INTRODUZIONE</u>	1
1.1 I CLOROPLASTI	1
1.2 I PIGMENTI FOTOSINTETICI	3
1.2.1 Le clorofille	5
1.2.2 I carotenoidi	6
1.2.3 Le ficobiliproteine	7
1.3 STRUTTURA DELLA MEMBRANA FOTOSINTETICA	9
1.4 DISTRIBUZIONE DEI COMPLESSI MULTIPROTEICI NELLE MEMBRANE TILACOIDALI	12
1.5 LE TRANSIZIONI DI STATO	13
1.6 I MITOCONDRI	16
1.7 CATENA DI TRASPORTO MITOCONDRIALE NELLE CELLULE VEGETALI	17
1.8 OSSIDASI ALTERNATIVA MITOCONDRIALE (AOX)	20
1.9 ORGANISMI ESTREMOFILI	22
1.10 MORTE CELLULARE PROGRAMMATA	25
1.11 COMPENSORIO TERMALE EUGANEO	29
1.12 GENERALITÀ SUI CIANOBATTERI	31
1.13 CARATTERISTICHE CELLULARI DEI CIANOBATTERI	33
1.14 ORDINE Chroococcales	35
1.14.1 Genere <i>Cyanobacterium</i>	36
1.15 ORDINE Oscillatoriales	36
1.15.1 Genere <i>Leptolyngbya</i>	37
1.15.2 Genere <i>Oscillatoria</i>	37
1.16 L'AMBIENTE NIVALE	38
1.16.1 Il ghiacciaio dell'Antelao	38
1.17 GENERALITÀ SULLE Chlorophyta	39
1.17.1 Genere <i>Chlorella</i>	41

<u>2. SCOPO DEL LAVORO</u>	43
<u>3. MATERIALI E METODI</u>	47
3.1 ALLESTIMENTO E RINNOVO DELLE COLTURE	
CIANOBATTERICHE	47
3.1.1 Colture di <i>Oscillatoria duplisecta</i>	48
3.1.2 Colture di <i>Cyanobacterium aponinum</i> e	
<i>Leptolyngbya</i> sp. ETS-04	48
3.1.2.1 Colture di <i>Cyanobacterium aponinum</i> per	
l'indagine preliminare	48
3.1.2.2 Colture di <i>Cyanobacterium aponinum</i> per	
le analisi sperimentali	49
3.1.2.3 Colture di <i>Leptolyngbya</i> sp. ETS-04 per	
l'indagine preliminare	49
3.1.2.4 Colture di <i>Leptolyngbya</i> sp. ETS-04 per	
le analisi sperimentali	49
3.1.2.5 Colture di <i>Cyanobacterium aponinum</i> e	
<i>Cyanobacterium</i> sp. MBIC 10216 su terreno salato	50
3.2 ALLESTIMENTO E RINNOVO DELLE COLTURE	
ALGALI	50
3.3 MISURAZIONE DELLA CRESCITA DELLE COLTURE	
DI <i>Cyanobacterium aponinum</i>	52
3.4 MISURAZIONE DELLA CRESCITA DELLE COLTURE	
DI <i>Leptolyngbya</i> sp. ETS-04	52
3.5 MISURAZIONE DELLA CRESCITA DELLE COLTURE	
DI " <i>Chlorella</i> " <i>saccharophila</i>	53
3.6 MISURAZIONE DEL PESO SECCO	54
3.7 OSSERVAZIONE DEL MATERIALE FRESCO AL	
MICROSCOPIO OTTICO	54
3.8 COLORAZIONE DEL DNA CON DAPI	54
3.9 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER LA	
MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM)	55

3.10 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER L'OSSERVAZIONE AL MICROSCOPIO ELETTRONICO A TRASMISSIONE (TEM)	56
3.11 ALLESTIMENTO DELLE SEZIONI ULTRASOTTILI PER L'OSSERVAZIONE AL MICROSCOPIO ELETTRONICO A TRASMISSIONE (TEM)	57
3.12 ESTRAZIONE ED ANALISI DEI PIGMENTI FOTOSINTETICI CON METODO SPETTROFOTOMETRICO	58
3.12.1 Clorofille e carotenoidi	58
3.12.2 Ficobiliproteine	60
3.13 ESTRAZIONE ED ANALISI DEI PIGMENTI CON HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	61
3.14 MISURE DI EVOLUZIONE DI OSSIGENO E DI RESPIRAZIONE MEDIANTE L'ELETTRODO DI CLARK	63
3.14.1 Misure di evoluzione di ossigeno fotosintetico	64
3.14.2 Misure di consumo respiratorio di ossigeno	65
3.15 MISURE DI FLUORESCENZA <i>IN VIVO</i> A 77 K	65
3.16 MISURE DI FLUORESCENZA <i>IN VIVO</i> DELLE CELLULE CIANOBATTERICHE E ALGALI	66
3.17 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE TOTALI	68
3.18 QUANTIFICAZIONE DELLE PROTEINE	69
3.19 ANALISI PROTEICA MEDIANTE SDS-PAGE	69
3.20 IMMUNOBLOTTING	70
3.21 ESTRAZIONE DEL DNA DA COLTURE DI <i>Cyanobacterium</i> <i>aponinum</i>	71
3.22 ESTRAZIONE DEL DNA DA COLTURE DI <i>Oscillatoria duplisecta</i>	72
3.23 QUANTIFICAZIONE DEL DNA	73
3.24 VALUTAZIONE DELLA FRAMMENTAZIONE DEL DNA	74
3.25 AMPLIFICAZIONE DEL DNA MEDIANTE PCR	74
3.26 ANALISI DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE MEDIANTE ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO	77
3.27 PURIFICAZIONE DEL DNA AMPLIFICATO MEDIANTE TRATTAMENTO ENZIMATICO	78
3.28 INDAGINI MOLECOLARI	79

3.29 ELABORAZIONE STATISTICA	80
<u>4. RISULTATI E DISCUSSIONE</u>	81
4.1 LA MICROALGA PSICROFILA “ <i>Chlorella</i> ” <i>saccharophila</i>	81
4.1.1 Crescita delle colture algali alle diverse temperature	81
4.1.2 Morfologia e ultrastruttura delle cellule	82
4.1.3 Apparato fotosintetico e fotosintesi	84
4.1.4 Respirazione	88
4.1.5 Conclusioni	91
4.2 CIANOBATTERI DI AMBIENTE TERMALE	93
4.2.1 <i>Cyanobacterium aponinum</i>	93
4.2.1.1 Classificazione di <i>Cyanobacterium aponinum</i>	93
4.2.1.2 Crescita alle diverse temperature	94
4.2.1.3 Morfologia e ultrastruttura delle cellule	95
4.2.1.4 Pigmenti fotosintetici	96
4.2.1.5 Emissione di fluorescenza a 77 K	98
4.2.1.6 Attività fotosintetica	102
4.2.1.7 Effetti della temperatura di 45 °C sulle colture di <i>Cyanobacterium aponinum</i>	104
4.2.1.8 Conclusioni	109
4.2.2 <i>Leptolyngbya</i> sp. ETS-04	111
4.2.2.1 Classificazione di <i>Leptolyngbya</i> sp. ETS-04	111
4.2.2.2 Crescita alle diverse temperature	112
4.2.2.3 Morfologia e ultrastruttura delle cellule	113
4.2.2.4 Pigmenti fotosintetici	114
4.2.2.5 Emissione di fluorescenza a 77 K	116
4.2.2.6 Attività fotosintetica	118
4.2.2.7 Effetti dell’aumento della temperatura di crescita a 55 °C sulle colture di <i>Leptolyngbya</i> sp. ETS-04	119
4.2.2.8 Conclusioni	121
4.2.3 <i>Oscillatoria duplisecta</i>	123
4.2.3.1 Morfologia e ultrastruttura di <i>Oscillatoria duplisecta</i>	123

4.2.3.2 Classificazione di <i>Oscillatoria duplisecta</i>	124
4.2.3.3 Conclusioni	127
<u>5. BIBLIOGRAFIA</u>	129

1. INTRODUZIONE

1.1 I CLOROPLASTI

Nel corso dell'evoluzione alcuni organismi hanno acquisito la capacità di catturare l'energia luminosa e di convertirla in energia chimica attraverso il processo fotosintetico.

Evidenze chimiche e numerosi ritrovamenti fossili indicano che tale processo si è affermato sulla Terra circa 3,5 miliardi di anni fa ad opera di forme autotrofe che operavano una fotosintesi di tipo anossigenico. La comparsa della fotosintesi ossigenica, con la conseguente immissione di ossigeno nell'atmosfera, si ebbe quando i cianobatteri acquisirono la capacità di utilizzare l'acqua come donatore di elettroni (Olson & Blankenship, 2004).

Un successivo evento di endosimbiosi tra un procariote fotosintetico ossigenico (cianobatterio) e una cellula eucariote ancestrale eterotrofa, ha dato origine ai cloroplasti che sono la sede del processo fotosintetico (Cavalier-Smith, 2002; Nozaki, 2005).

Da un punto di vista strutturale, i cloroplasti sono organelli delimitati da una doppia membrana, l'*envelope*, che racchiude un ambiente interno, lo *stroma*, nel quale si trova un sistema di membrane ben organizzato detto sistema tilacoidale (Pupillo *et al.*, 2003).

La membrana esterna non è selettiva per molecole fino a 10 kDa e regola il trasferimento all'interno dell'organello di proteine strutturali e funzionali codificate dal DNA nucleare e sintetizzate nel citoplasma, necessarie all'attività dell'organello stesso.

La membrana interna, invece, regola il flusso di metaboliti e ioni inorganici tra citoplasma e ambiente interno al plastidio in modo altamente selettivo (Abdallah *et al.*, 2000).

Nello stroma sono localizzati il DNA plastidiale, di tipo procariotico, i ribosomi 70S e tutti i componenti necessari alla trascrizione e traduzione delle informazioni geniche (Raven *et al.*, 2002).

Nello stroma, inoltre, sono presenti numerosi enzimi tra cui quelli che operano nella fase buia della fotosintesi (o ciclo di Calvin-Benson). Tra questi il più abbondante è la Rubisco (ribulosio-1,5-bisfosfato carbossilasi/ossigenasi) che catalizza la fissazione della CO₂ nella prima reazione del ciclo di Calvin-Benson (Andrews-Lorimer, 1987).

Negli organismi fotosintetici eucarioti il sistema membranale interno è costituito da membrane (tilacoidali), che decorrono appaiate a formare i tilacoidi, che sono cisterne o sacculi appiattiti intercomunicanti e continui tra di loro, che possono essere impilati gli uni sugli altri a costituire i cosiddetti *grana* (tilacoidi granali), o decorrere singolarmente nello stroma collegando *grana* diversi (tilacoidi stromatici o intergranali) (Fig. A).

Nel complesso il sistema tilacoidale è un sistema di membrane chiuso che separa l'ambiente intratilacoidale o luminale da quello extratilacoidale o stromatico.

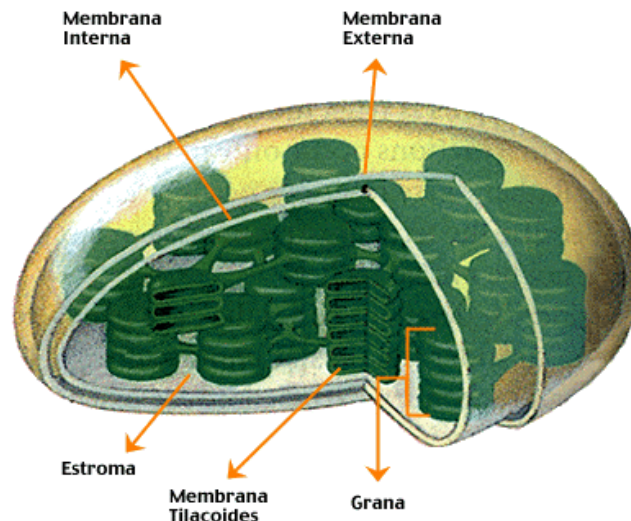


Figura A. Struttura del cloroplasto.

(Da www.puc.cl/sw_educ/biologia/bio100/imagenes/6)

Nei cianobatteri, procarioti, i tilacoidi sono sacculi membranali appiattiti non organizzati in grana come negli organismi eucarioti. Essi vengono considerati come proliferazioni della membrana plasmatica e sono disposti all'interno della cellula in modo diverso e specifico tanto da essere considerati un importante carattere tassonomico (possono decorrere perifericamente, parallelamente o radialmente alla parete, o prolungarsi nella zona centrale della cellula). In un

recente studio è stato ipotizzato che i tilacoidi dei cianobatteri formino in realtà dei compartimenti membranali chiusi, non più in continuità con la membrana plasmatica (Liberton *et al.*, 2006).

Nei tilacoidi sono inseriti i complessi funzionali in grado di condurre il trasporto di elettroni dall'acqua al NADP^+ nella fase luminosa della fotosintesi, ossia: il fotosistema II (PSII), il complesso dei citocromi b_6/f (cit b_6/f) e il fotosistema I (PSI). E' anche presente l'ATP-sintasi che opera nella sintesi di ATP.

Una peculiarità dei tilacoidi dei cianobatteri è che in essi, oltre ad essere presenti i componenti della catena di trasporto di elettroni fotosintetica, sono presenti anche quelli della catena di trasporto respiratoria. Le due catene sono connesse tra di loro attraverso trasportatori di elettroni comuni che sono il plastochinone e il complesso dei citocromi b_6/f (Hirano *et al.*, 1980).

1.2 I PIGMENTI FOTOSINTETICI

Affinché vi sia la conversione dell'energia luminosa in energia chimica, durante il processo fotosintetico, è necessaria la presenza di due classi di pigmenti ubiquitari negli organismi fotosintetizzanti: le clorofille e i carotenoidi. Nei cianobatteri e in alcuni gruppi algali (Alghe Rosse, Criptoficee) è presente anche un'altra classe specifica di pigmenti, le ficobiliproteine.

Nel corso dell'evoluzione si è assistito ad un cambiamento nell'assetto pigmentario degli organismi fotosintetici come adattamento alle diverse condizioni ambientali.

Nei cianobatteri, considerati progenitori dei cloroplasti, come pigmenti fotosintetici sono presenti la clorofilla *a*, le ficobiliproteine (*ficocianina*, *ficoeritrina* e *alloficocianina*) e i carotenoidi β -carotene e zeaxantina. La successiva comparsa degli organismi eucarioti fotoautotrofi, derivati dall'evento endosimbiotico con il cianobatterio, ha portato ad una diversificazione dei pigmenti fotosintetici che ha consentito la colonizzazione di ambienti marini differenti e un più ampio sfruttamento della luce per il processo fotosintetico. Ad esempio, le alghe rosse, che hanno mantenuto gli stessi pigmenti dei cianobatteri, hanno potuto adattarsi alle maggiori profondità utilizzando l'assorbimento da parte delle ficobiliproteine di luce nella regione centrale dello spettro, che penetra

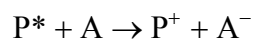
più in profondità nella colonna d'acqua. Nelle alghe verdi e nelle eteroconte (tra cui le alghe brune) sono scomparse le ficobiliproteine e accanto alla clorofilla *a* sono comparse forme di clorofilla, come la *b* (nelle alghe verdi) e la *c* (nelle alghe brune), che assorbono a lunghezze d'onda più corte di quelle della clorofilla *a*. Ancora nelle alghe brune e nelle altre eteroconte si sono evolute forme di xantofille (es: fucoxantina, dinoxantina) che hanno permesso di sfruttare la luce nella banda del verde. Nelle piante terrestri, derivate dalle alghe verdi, l'ambiente aereo, più omogeneo come qualità della luce, non ha portato a variazioni rilevanti del pattern di pigmenti fotosintetici, che si è mantenuto pressoché inalterato lungo tutta la scala evolutiva di questi organismi.

I pigmenti fotosintetici sono caratterizzati da un sistema di doppi legami coniugati con elettroni π (delocalizzati) molto mobili che consentono alla molecola di assorbire la luce nel visibile, eccitandosi e deeccitandosi (Young *et al.*, 1997).

Quando una molecola di pigmento che si trova nel suo stato fondamentale viene colpita da un fotone di appropriata lunghezza d'onda si eccita ed un elettrone π passa dal suo orbitale ad uno a più alta energia. Se in tale spostamento l'elettrone mantiene il suo spin antiparallelo a quello dell'elettrone omologo si ha uno stato eccitato di singoletto, se invece inverte il suo spin, che diventa quindi parallelo a quello dell'elettrone omologo, si ha uno stato eccitato di tripletto. Successivamente la molecola decade dallo stato eccitato allo stato fondamentale mediante meccanismi diversi.

I pigmenti definiti "*pigmenti antenna*" possono deeccitarsi mediante meccanismi di risonanza induttiva, trasferendo l'energia di eccitazione a molecole vicine che assorbono a lunghezza d'onda uguale o maggiore (Niyogi, 1999). Questo è il meccanismo mediante il quale l'energia luminosa viene convogliata verso la clorofilla del centro di reazione del fotosistema.

I pigmenti definiti "*pigmenti fotochimicamente attivi*" (P), localizzati nei centri di reazione, si deeccitano mediante il trasferimento dell'elettrone eccitato ad un accettore (A) che viene ridotto:



Questa reazione di separazione di carica costituisce la “*reazione fotochimica primaria*” (Whitmarsh & Govindjee, 1995).

Oltre a questi due meccanismi di decadimento, essenziali per la fotosintesi, ne esistono altri, che non sono utili per il processo fotosintetico.

Questi sono: il *decadimento non radiante*, che si realizza mediante dissipazione termica dell’energia di eccitazione, e il *decadimento radiante*, in cui l’energia viene persa attraverso l’emissione di un quanto di luce di lunghezza d’onda maggiore rispetto a quella del quanto assorbito. Il decadimento radiante può avvenire dallo stato di singoletto come “*fluorescenza*” ($t_{1/2} = 10^{-8}$ sec) o dallo stato di tripletto come “*fosforescenza*” ($t_{1/2} = 10^{-3}$ sec).

1.2.1 LE CLOROFILLE

Le clorofille sono pigmenti metallo-porfirinici appartenenti alla famiglia dei tetrapirroli. Sono caratterizzate da un anello tetrapirrolico ciclico, con un atomo di Mg coordinato al centro, e da un alcool alifatico a lunga catena, il fitolo, esterificato ad un residuo di acido propionico in posizione 7 (Kirk & Tinley-Basset, 1978).

Le clorofille assorbono la luce visibile nella fascia del rosso (tra 550 e 700 nm) e del blu (sotto i 480 nm) ed emettono fluorescenza nel rosso a lunghezze d’onda poco superiori a quelle di assorbimento.

Nei cianobatteri è presente esclusivamente clorofilla *a*, mentre negli organismi eucarioti verdi si distinguono due tipi di clorofilla, la clorofilla *a* e la clorofilla *b*, che differiscono rispettivamente per la presenza di un gruppo metilico o di un gruppo aldeidico in corrispondenza del C3 del secondo anello tetrapirrolico (Beale, 1999).

In soluzione le clorofille presentano picchi massimi di assorbimento della luce nel rosso attorno a 663 nm (clorofilla *a*) e a 645 nm (clorofilla *b*). *In vivo*, invece, si distinguono numerose forme spettrali, perché le clorofille si legano a proteine diverse per costituire i complessi antenna pigmento-proteina inseriti nelle membrane tilacoidali (Thornber *et al.*, 1991). Le clorofille dei complessi antenna assorbono la luce e la convogliano verso i pigmenti fotochimicamente attivi

localizzati nei centri di reazione dei fotosistemi e costituiti solo da molecole di clorofilla *a*.

1.2.2 I CAROTENOIDI

I carotenoidi sono composti isoprenoidi a 40 atomi di carbonio, caratterizzati da una porzione centrale lineare (con doppi legami coniugati) e da due estremità ciclizzate. Vengono distinti in due classi: *caroteni* idrocarburici, presenti soprattutto nei centri di reazione, e *xantofille*, che contengono atomi di ossigeno, localizzate principalmente nei complessi antenna (Raven *et al.*, 2002).

Negli organismi eucarioti verdi i maggiori rappresentanti di questi pigmenti sono il β -carotene e le xantofille luteina, violaxantina e neoxantina (Young *et al.*, 1997). Nei cianobatteri, invece, sono presenti principalmente β -carotene e zeaxantina; in molte specie si trovano anche echinenone, mixoxantofilla, oscilloxantina, β -criptoxantina (Pupillo *et al.*, 2003).

I carotenoidi assorbono la luce tra 390 e 530 nm, nella regione del viola-blu e trasferiscono l'energia di eccitazione alle clorofille. Sono importanti come pigmenti antenna, ma ancor più come pigmenti di protezione dell'apparato fotosintetico da eventuali danni fotoossidativi. Essi, infatti, sono in grado di deeccitare sia la clorofilla tripletto ($^3\text{Chl}^*$), sia l'ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$), entrambi dannosi, dissipando poi l'energia di eccitazione acquisita sottoforma di calore.

Negli organismi eucarioti verdi i carotenoidi svolgono un'ulteriore funzione protettiva in quanto sono in grado di ridurre la quantità di energia luminosa che raggiunge il centro di reazione del fotosistema II (PSII), dissipandola sottoforma di calore (dissipazione termica). Questo processo è condotto dalle xantofille nel cosiddetto "*ciclo della violaxantina*". In caso di un eccesso di energia radiante, la violaxantina presente nei complessi antenna del PSII, viene depossidata ad anteraxantina e poi a zeaxantina (Hirschberg, 2001), forme queste in grado di competere con le clorofille antenna per l'assorbimento dell'energia luminosa, che viene poi dissipata come calore (Huner *et al.*, 1998).

Ancora, negli organismi verdi eucarioti, è stato dimostrato recentemente che i carotenoidi possono svolgere anche un ruolo strutturale nella stabilizzazione e

protezione della fase lipidica delle membrane tilacoidali in condizioni di stress. Infatti, in organismi esposti a condizioni potenzialmente danneggianti, come una forte intensità luminosa o un'elevata temperatura, la violaxantina e i prodotti della sua deossidazione enzimatica sono in grado di disporsi tra i complessi proteici e la fase lipidica delle membrane tilacoidali attraversando perpendicolarmente il doppio strato lipidico. Questi carotenoidi ancorano i loro gruppi polari alle teste idrofiliche dei glicolipidi su entrambi i lati della membrana, portando ad una diminuzione della fluidità di quest'ultima e ad una maggiore stabilità, oltre che a una maggiore resistenza dei lipidi alla perossidazione (Havaux, 1998).

Entrambi i processi precedentemente citati non sono presenti nei cianobatteri che mancano della violaxantina, tuttavia questi organismi sono in grado di difendersi dagli eccessi di energia luminosa attuando il meccanismo delle transizioni di stato.

1.2.3 LE FICOBILIPROTEINE

Le ficobiliproteine, presenti esclusivamente nei cianobatteri, nelle alghe rosse e nelle Criptofitee, operano nel processo fotosintetico come pigmenti antenna. La luce assorbita viene trasferita alla clorofilla *a* e infine al pigmento fotochimicamente attivo del centro di reazione che conduce la reazione fotochimica primaria.

Le ficobiliproteine sono caratterizzate da un cromoforo, che è un tetrapirrolo lineare, definito bilina, che è legato covalentemente a un residuo di cisteina dell'apoproteina.

Le ficobiliproteine assorbono la luce nel visibile tra 550 e 670 nm e vengono distinte in base allo spettro di assorbimento. Le tre forme principali di pigmento sono:

- la *ficoeritrina* (PE, $\lambda_{Amax} = 565-575$ nm);
- la *ficocianina* (PC, $\lambda_{Amax} = 615-640$ nm);
- la *alloficocianina* (APC, $\lambda_{Amax} = 650-665$ nm).

L'alloficocianina e la ficocianina hanno come cromoforo una bilina chiamata *ficocianobilina*; la ficoeritrina ha invece una bilina definita *ficoeritrobilina*.

In alcuni cianobatteri sono stati ritrovati altri due tipi di biline, la *ficourobilina* e la *ficoviolabilina*. Questi cromofori addizionali consentono un miglior

assorbimento della luce in particolari regioni dello spettro (Samsonoff & MacColl, 2001).

In cianobatteri filamentosi eterocistici, come *Fischerella* sp., *Anabaena* sp. e *Nostoc* sp., è presente inoltre la *ficoeritrocianina* (PEC, $\lambda_{Amax} = 575$ nm) che ha come cromofori sia *ficoeritrobilina* che *ficocianobilina*.

Le ficobiliproteine sono costituite da due subunità (α e β) presenti in quantità equimolari che si possono associare tra loro, sottoforma di trimeri $(\alpha,\beta)_3$ o di esameri $(\alpha,\beta)_6$, a costituire delle unità discoidali. Esse si organizzano a costituire degli organuli chiamati *ficobilisomi* che possono avere una morfologia emidiscoideale o emisferica. Indipendentemente dalla morfologia, nei ficobilisomi si distinguono sempre due componenti: un “*core*”, costituito da alloficocianina agganciato alla membrana tilacoidale; e una regione periferica, con serie di unità discoidali impilate e disposte a raggiera al di sopra del “*core*”. Le pile di dischi sovrapposti sono costituite da unità di *ficocianina*, più interna e sempre associata al core, e di *ficoeritrina* (se presente) disposta più esternamente (Gantt *et al.*, 1976) (Fig. B).

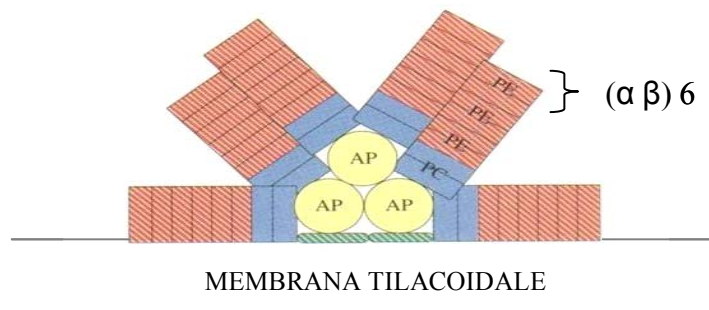


Figura B. Struttura di un ficobilisoma.

(Modificato da <http://amscampus.cib.unibo.it/archive/00002378/01/6>)

L'assemblaggio sovramolecolare dei ficobilisomi è reso possibile da polipeptidi definiti “*linker*” (Tandeau de Marsac & Cohen-Bazire, 1977).

Questi polipeptidi interagiscono con i dischi di *ficocianina* e di *ficoeritrina* mantenendone l'aggregazione e l'impilamento nella regione periferica del ficobilisoma. Nel “*core*” essi, oltre all'assemblaggio della *alloficocianina*, provvedono anche ad agganciare il *core* alla membrana tilacoidale associando così il ficobilisoma alla frazione intramembranale del fotosistema (MacColl, 1998).

Le ficobiliproteine funzionano come pigmenti antenna del PSII. L'energia luminosa viene assorbita dalla *ficoeritrina* e trasferita sequenzialmente alla *ficocianina*, poi all'*alloficocianina* e quindi alle molecole di clorofilla *a* dell'antenna interna del PSII. Da qui l'energia passa infine al pigmento P del centro di reazione del fotosistema (Van den Hoeck *et al.*, 1995; Sidler, 1994).

1.3 STRUTTURA DELLA MEMBRANA FOTOSINTETICA

Mentre la membrana fotosintetica dei batteri anossigenici contiene un solo tipo di fotosistema, quella degli organismi che evolvono ossigeno (cianobatteri, alghe e piante) contiene due diversi fotosistemi definiti fotosistema I (PSI) e fotosistema II (PSII).

I fotosistemi sono costituiti da due componenti distinte che cooperano tra di loro: il *centro di reazione*, altamente idrofobico, inserito nella membrana tilacoidale e contenente le clorofille fotochimicamente attive (P), e l'*antenna*, che raccoglie l'energia radiante e la veicola verso il centro di reazione (Buchanan *et al.*, 2003).

I due fotosistemi sono collegati da piccoli trasportatori di elettroni che lavorano cooperativamente nel trasferimento globale di elettroni dall'acqua (donatore iniziale di elettroni) al NADP⁺ (accettore finale).

In particolare il trasferimento di elettroni tra il PSII e il complesso dei citocromi b₆f è condotto da plastochinoni localizzati nella regione idrofobica della matrice della membrana tilacoidale, mentre quello tra il complesso dei citocromi b₆f e il PSI avviene attraverso una proteina contenente rame, detta plastocianina, presente sul lato luminale della membrana (Anderson & Anderson, 1988).

Infine, il trasporto di elettroni dal PSI al NADP⁺ avviene a carico di due proteine: la federossina e la federossina-NADP ossidoreduttasi, esposte verso lo stroma.

Il PSII dei cianobatteri ha somiglianze con quello dei Batteri Purpurei fotoautotrofi anossigenici. Esso comprende un centro di reazione, definito "di tipo II" o "a chinone", un'antenna interna e un'antenna esterna.

Il *centro di reazione* è costituito da un eterodimero (proteine D1 e D2) che lega una coppia di molecole di clorofilla *a* fotochimicamente attiva (P680). Fanno parte del centro di reazione: un citocromo b, definito cyt b559, e due

plastochinoni: il QA (che è il *partner* della clorofilla fotochimicamente attiva nella reazione fotochimica) e il QB. Associato al centro di reazione sul lato luminale si trova il complesso evolvente ossigeno (OEC) dove avviene la fotolisi dell'acqua. All'esterno del centro di reazione, profondamente inserita nella membrana tilacoidale, c'è l'*antenna interna* costituita da due complessi pigmento-proteina, definiti CP43 e CP47, contenenti molecole di clorofilla *a*. Infine, sul lato stromatico della membrana tilacoidale è collocata l'antenna esterna del PSII, costituita dal ficobilisoma.

Il PSII degli organismi eucarioti verdi è molto simile a quello dei cianobatteri. Infatti, è costituito dal centro di reazione eterodimerico (D1-D2) che contiene tutte le molecole coinvolte nella reazione fotochimica, tra cui il pigmento fotochimicamente attivo P680 e i plastochinoni QA e QB, ed è associato al complesso evolvente ossigeno (Barber *et al.*, 1997).

Anche negli organismi eucarioti verdi è presente l'antenna interna formata dai complessi CP43 e CP47 contenenti clorofilla *a*. L'antenna esterna è invece costituita dall'LHCII (Light Harvesting Chlorophyll *a/b* Complex II) (Thornber *et al.*, 1991). Questa antenna può contenere più di 200 molecole di clorofilla per unità di PSII, e la sua dimensione varia a seconda dell'intensità e delle caratteristiche spettrali della luce e della temperatura dell'ambiente. L'LHCII è formato da quattro distinti complessi costituiti da proteine e pigmenti quali clorofilla *a*, clorofilla *b* e xantofille. Il complesso maggiore è propriamente detto LHCII, i complessi minori sono conosciuti come CP29 (29 kDa), CP26 (26 kDa) e CP24 (24 kDa), (Jansson, 1994).

Mediante studi di cristallizzazione è stato possibile mettere in evidenza che il complesso maggiore (LHCII) è presente in forma di trimero (Butler & Kühlbrandt, 1988), mentre i complessi minori CP24, CP29 e CP26 si trovano in forma di monomeri (Bassi & Dainese, 1992).

Secondo un modello proposto da Barber e collaboratori (1997), i CP monomerici sarebbero connessi al nucleo centrale del PSII, formando un ponte tra quest'ultimo e l'antenna maggiore LHCII.

Il complesso dei citocromi b_6f dei cianobatteri e degli organismi fotosintetici eucarioti è un dimero costituito da quattro subunità principali: il citocromo f , il citocromo b_6 , la proteina definita subunità IV e la proteina F_2-S_2 “di Rieske” (Gantt, 1994; Marder & Barber, 1989).

Questo complesso funziona come un enzima plastochinolo-plastocianina ossidoreduttasi. Esso accoppia al trasferimento di elettroni dal plastochinolo (la forma ridotta del plastochinone) alla plastocianina la traslocazione di protoni, attraverso la membrana tilacoidale, dallo stroma al lume intratilacoidale. In tal modo si genera il gradiente protonico che verrà utilizzato per la sintesi di ATP.

Il PSI dei cianobatteri è correlabile dal punto di vista strutturale a quello dei batteri fotosintetici anossigenici verdi, con un centro di reazione di tipo “Fe-S”. Il *core* del PSI è costituito da: un eterodimero (PsaA/PsaB) a cui sono legati il pigmento fotochimicamente attivo costituito da un dimero di Chl a (P700), una catena di accettori di elettroni come A_0 (molecola di clorofilla a), A_1 (molecola di fillochinone), e una serie di centri Fe-S. Al *core* sono anche legate un centinaio di molecole di clorofilla a che costituiscono l’antenna del fotosistema (Xu *et al.*, 2001).

Il PSI dei cianobatteri manca di un’antenna esterna distinta. Oltre alle proteine dell’eterodimero, fanno parte del PSI delle proteine accessorie per le quali non si conosce ancora la precisa funzione (Xu *et al.*, 2001).

Il PSI degli organismi eucarioti verdi, ha un *core* eterodimerico (PSI-A, PSI-B) organizzato come quello del fotosistema dei cianobatteri. A questo è associata una antenna esterna detta LHCI (Light Harvesting Chlorophyll a/b Complex I) che contiene molecole di clorofilla a , clorofilla b e xantofille (Mullet *et al.*, 1980).

Nel PSI degli organismi eucarioti verdi oltre alle proteine dell’eterodimero sono presenti numerose proteine accessorie. Tra queste la proteina PsaG, che serve come ancora per il legame dell’LHCI al *core* del fotosistema e la proteina PsaH, coinvolta nelle piante superiori nel legame dell’LHCII durante le transizioni di stato (Ben-Shem *et al.*, 2004).

Il percorso degli elettroni durante il processo fotosintetico è il seguente: gli elettroni liberati in seguito alla fotolisi dell’acqua vengono trasferiti al P680 del

centro di reazione del PSII dove passano ai plastochinoni in seguito alla reazione fotochimica primaria. Dai plastochinoni gli elettroni vengono ceduti al complesso dei citocromi b_6f e alla plastocianina che li cede al P700 del centro di reazione del PSI. La reazione fotochimica primaria, condotta in quest'ultimo pigmento, trasferisce elettroni alla ferredossina che tramite la ferredossina-NADP ossidoreduttasi li cede infine al NADP^+ riducendolo a NADPH.

I protoni rilasciati nel lume tilacoidale, derivati dalla fotolisi dell'acqua e dalle reazioni di ossido-riduzione a carico del *pool* dei plastochinoni, generano un gradiente elettrochimico sfruttato dall'ATP-sintasi per sintetizzare ATP in un processo definito fotosforilazione (Barber, 1995).

1.4 DISTRIBUZIONE DEI COMPLESSI MULTIPROTEICI NELLE MEMBRANE TILACOIDALI

Nei cloroplasti delle piante superiori e delle alghe verdi, i complessi multiproteici coinvolti nelle reazioni della fase luminosa della fotosintesi sono distribuiti in modo non omogeneo nelle membrane tilacoidali. Infatti, nelle regioni granali in cui due membrane sono appressate è presente il PSII, mentre il PSI è localizzato prevalentemente nelle membrane tilacoidali singole dove si trova anche il complesso dell'ATP-sintasi. Il complesso dei citocromi b_6f , invece, è distribuito uniformemente nelle membrane tilacoidali (Anderson & Anderson, 1988).

Questa diversa distribuzione dei complessi multiproteici dipende dalle loro caratteristiche di densità di carica superficiale. Il PSII, infatti, ha una densità di carica negativa superficiale molto bassa a causa delle caratteristiche di superficie della sua antenna esterna (LHCII), per cui le unità di questo fotosistema tendono ad attrarsi tra di loro e ad attrarre aree ricche in PSII sulle membrane tilacoidali contrapposte, creando delle zone membranali appressate definite partizioni.

Il PSI, invece, ha una carica superficiale negativa alta per cui tra le unità di questo fotosistema si generano delle forze di repulsione che determinano la sua distribuzione nelle membrane tilacoidali singole, cioè quelle stromatiche e quelle terminali e marginali dei grana (Barber, 1982).

Questa separazione spaziale dei fotosistemi gioca un ruolo nella distribuzione dell'energia luminosa tra i fotosistemi, migliorando l'efficienza fotosintetica e

riducendo il rischio di fotoinibizione. Infatti, i fotosistemi e le loro antenne non sono vicini, per cui non vi è il rischio che l'energia luminosa venga deviata dal PSII verso il PSI (che assorbe a lunghezze d'onda maggiori), con conseguente impossibilità per il PSII di condurre la reazione fotochimica.

Nei cianobatteri, come è noto, non ci sono *grana* e non si realizza una precisa separazione laterale dei fotosistemi. In alcuni cianobatteri (es. *Synechococcus* sp. PCC 7942), comunque, si è visto che i complessi del PSI sono distribuiti in modo radiale disomogeneo, con alte concentrazioni nelle membrane tilacoidali più distali della cellula cianobatterica. Questa caratteristica non è generale nei cianobatteri. Per esempio *Synechocystis* sp. PCC 6803 non mostra questa disomogeneità nella distribuzione dei fotosistemi (Sherman *et al.*, 1994).

1.5 LE TRANSIZIONI DI STATO

Una strategia adottata sia dai cianobatteri che dagli organismi eucarioti verdi per equilibrare la distribuzione dell'energia radiante tra i due fotosistemi sono le cosiddette "transizioni di stato". Queste hanno luogo in particolari condizioni di luce e sono regolate dallo stato di riduzione dei plastochinoni (Taiz & Zeiger, 1998).

Nei cianobatteri le transizioni di stato si realizzano con la migrazione, da un fotosistema all'altro, dei ficobilisomi, che in condizioni normali costituiscono l'antenna principale del PSII. La migrazione è determinata da fosforilazione/defosforilazione di componenti polipeptidici dei ficobilisomi (Allen *et al.*, 1985).

Il segnale che determina la transizione è, come negli organismi eucarioti verdi, il livello redox dei plastochinoni.

In condizioni di luce assorbita preferenzialmente dal PSII (luce gialla assorbita dai ficobilisomi), il flusso di elettroni immessi dal PSII nella catena di trasporto è più elevato della capacità di drenaggio del PSI. Ciò comporta un aumento di plastochinoni ridotti (PQH₂) che fanno da segnale per l'attivazione di una chinasi di membrana che fosforila dei componenti polipeptidici del *core* dei ficobilisomi determinando il distacco dal resto del PSII di questa antenna che migra e si lega al PSI. Quando i ficobilisomi sono associati al PSI si dice che le cellule

cianobatteriche si trovano nello “stato 2” (cioè nello stato indotto da un eccesso di luce assorbita dal PSII).

Viceversa, in condizioni di luce assorbita preferenzialmente dal PSI (luce rossa assorbita dalla clorofilla *a* del PSI), si ha un aumento di attività di questo fotosistema che drena velocemente il flusso di elettroni lungo la catena di trasporto portando i plastochinoni verso uno stato ossidato (PQ). Ciò comporta un’inattivazione della chinasi e la defosforilazione, ad opera di una fosfatasi di membrana, dei componenti polipeptidici dei ficobilisomi che si staccano dal PSI e tornano ad agganciarsi al PSII. In questa configurazione si dice che le cellule cianobatteriche si trovano in “stato 1” (cioè nello stato in cui prevale la luce assorbita dal PSI, o comunque non si determina un eccesso di illuminazione del PSII) (Manodori & Melis, 1986; Allen *et al.*, 1989; Campbell *et al.*, 1998) (Fig. C).

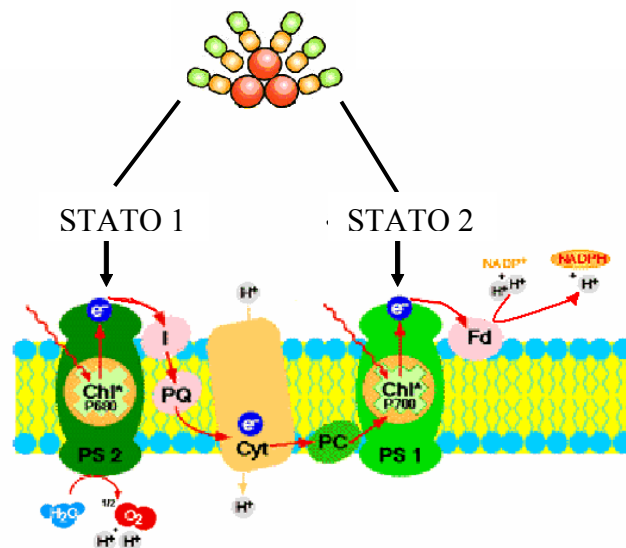


Figura C. Transizioni di stato nei cianobatteri.

(Modificato da

http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/photosynthesis_1/graphics/memb.gif)

E' da tener presente che nel caso dei cianobatteri allo stato redox dei plastochinoni partecipa anche il flusso di elettroni respiratorio. Ciò è dovuto al fatto che nelle membrane tilacoidali dei cianobatteri, oltre alla catena di trasporto fotosintetica è

presente anche quella respiratoria e che queste due catene hanno come componenti comuni i plastochinoni (Hirano *et al.*, 1980; Scherer *et al.*, 1987).

Nelle piante superiori le transizioni di stato si realizzano con la migrazione dell'LHCII, l'antenna principale del PSII, da un fotosistema all'altro con un meccanismo del tutto simile a quello dei cianobatteri (Fig. D).

Infatti, in condizioni di luce assorbita preferenzialmente dal PSII (luce 2), l'aumento del *pool* di plastochinoni ridotti è il segnale per l'attivazione di una chinasi tilacoidale che, fosforilando l'LHCII, determina un aumento della sua carica negativa superficiale e il successivo distacco dal fotosistema. L'LHCII (una frazione mobile di questo) si allontana dalla partizione, arriva alla membrana tilacoidale singola e si aggancia al PSI, tramite il polipeptide H (PsaH), portando i fotosistemi nello stato di transizione 2. Nel caso, invece, che prevalga una luce assorbita preferenzialmente dal PSI (luce 1), lo stato ossidato dei plastochinoni inattiva la chinasi. La defosforilazione dell'LHCII, catalizzata da una fosfatasi tilacoidale, determina il ritorno dell'antenna sul PSII. In questa situazione i fotosistemi si trovano “nello stato 1” (Buchanan *et al.*, 2003).

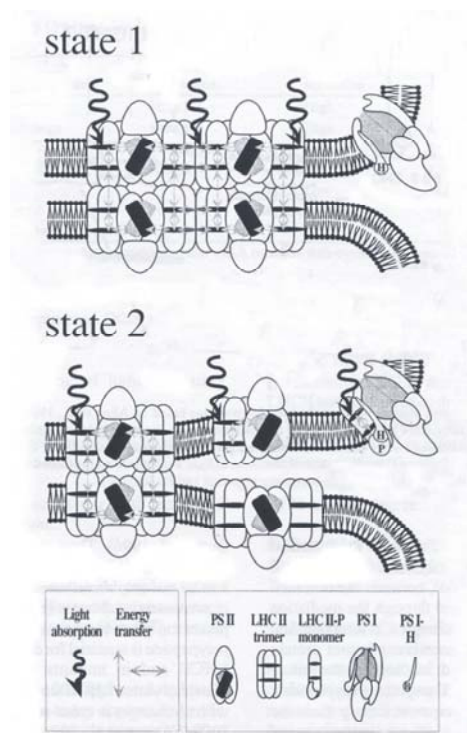


Figura D. Rappresentazione delle transizioni di stato (Larkum, 2003).

Per quanto riguarda le transizioni di stato nelle alghe verdi, le informazioni a tutt'oggi disponibili sono scarse. Tuttavia i pochi studi condotti suggeriscono che vi siano alcune differenze nei meccanismi che regolano questo processo. In particolare, dal momento che nel PSI delle alghe non è presente il PsaH, il legame dell'LHCII al PSI, nel passaggio da "stato 1" a "stato 2", deve avvenire in modo diverso rispetto alle piante superiori (Larkum, 2003).

1.6 I MITOCONDRI

I mitocondri sono organelli tipici degli organismi eucarioti che si sono originati in seguito ad un evento di endosimbiosi tra un batterio aerobio ed una iniziale cellula eucariotica anaerobia. Hanno forma sferica o ellissoidale, con un diametro di 0,5-1 μm e lunghezza variabile fra 1-3 μm .

Ciascun mitocondrio è circondato da due membrane altamente specializzate che regolano gli scambi fra l'ambiente interno all'organello e il citoplasma.

La membrana esterna è ricca di una proteina di trasporto, definita *porina*, che forma grossi canali acquosi che permettono la libera diffusione di molecole con massa fino a 10 kDa. La membrana interna, invece, è altamente selettiva perché il suo doppio strato lipidico è ricco del fosfolipide cardiolipina che la rende particolarmente impermeabile agli ioni. Inoltre, questa membrana contiene numerose proteine di trasporto che regolano il flusso di ioni e metaboliti tra la matrice mitocondriale e il citoplasma (Alberts *et al.*, 2003).

La membrana interna forma una serie di pieghe verso l'interno, definite *creste*.

L'ambiente interno dei mitocondri costituisce la *matrice* in cui sono presenti: il DNA mitocondriale procariotico, i ribosomi 70S e l'intero macchinario necessario per la sintesi proteica. Nella matrice sono contenuti, inoltre, tutti gli enzimi solubili delle vie metaboliche dell'organello, tra cui quelli del ciclo dell'acido citrico.

I mitocondri sono la sede della respirazione aerobica, processo mediante il quale substrati organici vengono ossidati a CO_2 e H_2O con produzione di ATP.

Il piruvato, prodotto nel citoplasma dalla glicolisi, viene ossidato nei mitocondri nel ciclo dell'acido citrico (ciclo di Krebs), con la produzione di NADH e FADH_2 . Questi coenzimi ridotti si riossidano cedendo gli elettroni a dei complessi

proteici della catena di trasporto respiratoria. Gli elettroni vengono ceduti alla fine ad una molecola di ossigeno che viene ridotta ad H_2O . Durante questo trasferimento elettronico, si ha la formazione attraverso la membrana mitocondriale di un gradiente protonico elettrochimico che verrà sfruttato dalla ATP sintasi per sintetizzare ATP (Nicholls & Ferguson, 1992).

1.7 CATENA DI TRASPORTO MITOCONDRIALE NELLE CELLULE VEGETALI

La catena di trasporto mitocondriale degli organismi eucarioti è localizzata nelle creste della membrana mitocondriale interna ed è costituita da quattro complessi multiproteici (Trumpower & Gennis, 1994) (Fig. E):

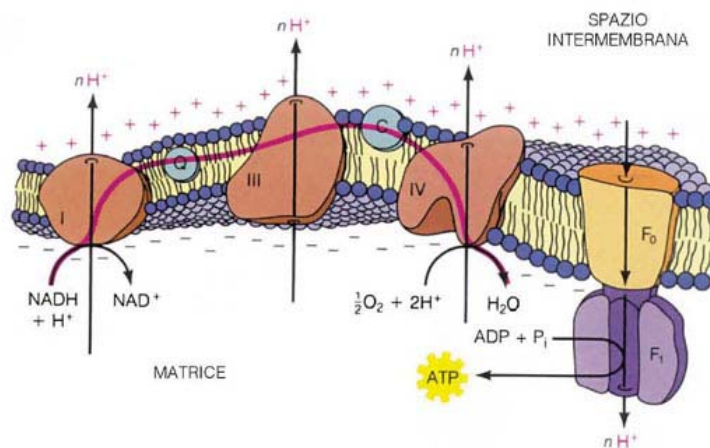


Figura E. Catena di trasporto mitocondriale.

(Da [http://xoomer.alice.it/cyrano2510/catena%20respiratoria\(new\)](http://xoomer.alice.it/cyrano2510/catena%20respiratoria(new)))

- il COMPLESSO I (noto anche come complesso della NADH deidrogenasi) è un grosso complesso multiproteico con peso molecolare di circa 850 kDa. Esso ossida il NADH, prodotto dal ciclo dell'acido citrico, trasferendo gli elettroni sull'ubichinone che viene quindi ridotto. L'ubichinone è un cofattore idrofobico mobile, che può raccogliere due elettroni da vari trasportatori (passando ad ubichinolo) e trasportarli lungo la membrana mitocondriale interna. Al flusso di elettroni attraverso il complesso I è associata una traslocazione di protoni dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrana, pertanto questo complesso

rappresenta il primo sito di fosforilazione ossidativa, cioè un sito accoppiante che accoppia la traslocazione di elettroni alla sintesi di ATP.

Il complesso I può essere inibito dal rotenone;

- il COMPLESSO II è rappresentato dalla succinato deidrogenasi, l'unico enzima del ciclo dell'acido citrico associato alla membrana mitocondriale. Questo enzima (con un FAD legato covalentemente) ossida il succinato a fumarato trasferendo poi gli elettroni all'ubichinone.

Il malato, in grado di competere con il succinato come substrato di reazione, si comporta da inibitore del complesso II;

- il COMPLESSO III o complesso del citocromo bc_1 , è costituito da un citocromo con due gruppi eme di tipo b , un citocromo c_1 , una proteina ferro-zolfo (detta di "Rieske") e da cinque polipeptidi che formano il *core*. Questo complesso rappresenta il secondo sito accoppiante in quanto trasferisce elettroni dall'ubichinolo, che è la forma ridotta dell'ubichinone, al citocromo c , con traslocazione di protoni dalla matrice allo spazio intermembrana.

Il complesso III può essere inibito dall'antimicina e dal mixotiazolo.

Il citocromo c è una proteina mobile situata sulla superficie esterna della membrana mitocondriale interna e trasporta un elettrone alla volta verso il complesso IV.

- il COMPLESSO IV o citocromo c ossidasi è un complesso multiproteico, contenente due gruppi eme di tipo a e due centri redox a rame, che trasferisce gli elettroni ricevuti dal citocromo c (sul lato esterno della membrana) all'ossigeno (nella matrice): ogni quattro molecole di citocromo c riossodate la citocromo c ossidasi riduce una molecola di ossigeno a due di acqua. Nella citocromo c ossidasi il trasporto di elettroni è associato ad un trasferimento di protoni attraverso la membrana mitocondriale, per cui questo complesso rappresenta il terzo sito accoppiante.

La citocromo c ossidasi può essere inibita dal cianuro di potassio (KCN), dall'azide (NaN_3) e dal monossido di carbonio (CO).

Oltre a questi complessi proteici della catena respiratoria, comuni a tutti gli organismi aerobi, nei mitocondri vegetali sono presenti dei complessi aggiuntivi e un'ossidasi terminale alternativa (Buchanan *et al.*, 2003).

In particolare (Fig. F), sul lato interno della membrana mitocondriale, rivolte verso la matrice, sono presenti una NADH deidrogenasi e una NAD(P)H deidrogenasi, insensibili al rotenone, che trasferiscono elettroni dal NADPH all'ubichinone senza accoppiare a tale trasferimento una traslocazione di protoni. L'energia liberata viene quindi persa sotto forma di calore (Møller *et al.*, 1993). Sempre sulla membrana interna, ma rivolte verso lo spazio intermembrana, sono presenti una NADH e una NAD(P)H deidrogenasi (calcio dipendenti), anch'esse insensibili al rotenone, che si ritiene siano coinvolte nella regolazione del rapporto tra NAD(P)^+ e NAD(P)H citoplasmatici.

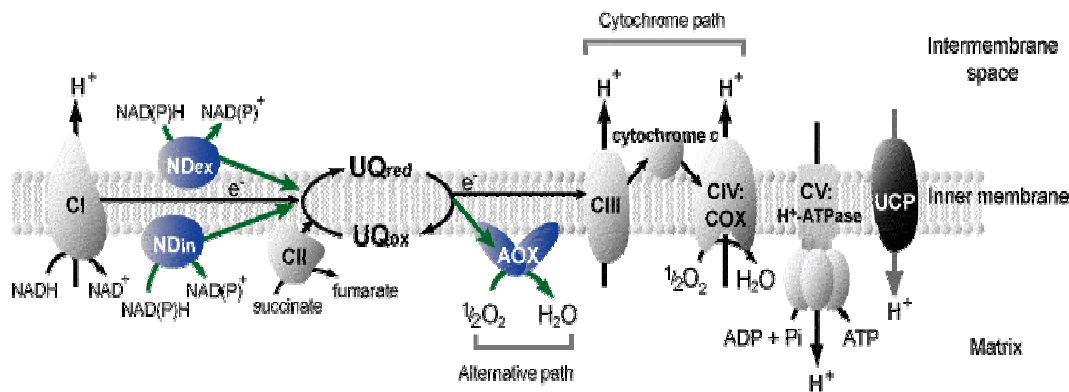


Figura F. Catena di trasporto elettronico mitocondriale nelle cellule vegetali.

(Da http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/en/undergraduate/img/research_07)

I mitocondri vegetali presentano anche un percorso alternativo di riduzione dell'ossigeno, attraverso una ossidasi terminale distinguibile dalla citocromo c ossidasi per la sua insensibilità al cianuro. In questo percorso definito “via cianuro resistente”, l'ubichinolo trasferisce gli elettroni ricevuti dal NAD(P)H e dal FAD direttamente ad un'ossidasi alternativa (AOX) che li cede all'ossigeno (Moore & Siedow, 1991). Questa via non è associata ad una traslocazione di protoni attraverso la membrana per cui non porta alla produzione di ATP. L'energia viene liberata sotto forma di calore e quindi la via cianuro resistente è una “via termogenica”. Il passaggio degli elettroni attraverso l'AOX esclude i complessi III

e IV che sono importanti siti di traslocazione protonica, cosicché l'attivazione di questa via riduce la produzione di ATP nei mitocondri (Siedow & Umbach, 2000; Vanlerberghe & Ordog, 2002).

1.8 OSSIDASI ALTERNATIVA MITOCONDRIALE (AOX)

L'AOX è una proteina di 35-37 kDa presente nelle piante, nei lieviti (Sakaio *et al.*, 1993), nelle alghe (Eriksen & Lewitus, 1999) e in procarioti (Stenmark & Nordlund, 2003).

Negli organismi eucarioti vegetali l'AOX è codificata da geni nucleari (Finnegan *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 1997).

In alcune piante sono presenti diverse isoforme di AOX. In soia, ad esempio, se ne distinguono ben tre isoforme (McCabe *et al.*, 1998).

L'AOX viene sintetizzata nel citoplasma e poi trasportata nella membrana interna del mitocondrio dove è presente come omodimero. I due dimeri sono tenuti insieme da interazioni non covalenti e da un ponte disolfuro che si instaura tra due cisteine altamente conservate che si trovano nelle regioni N-terminali dei due monomeri (Fig. G).

Le regioni C-terminali, come quelle N-terminali, sono esposte verso la matrice e contengono dei centri per legare metalli di transizione, si pensa atomi di Fe, necessari per l'attività catalitica dell'enzima (Umbach *et al.*, 1994; Umbach *et al.*, 2004).

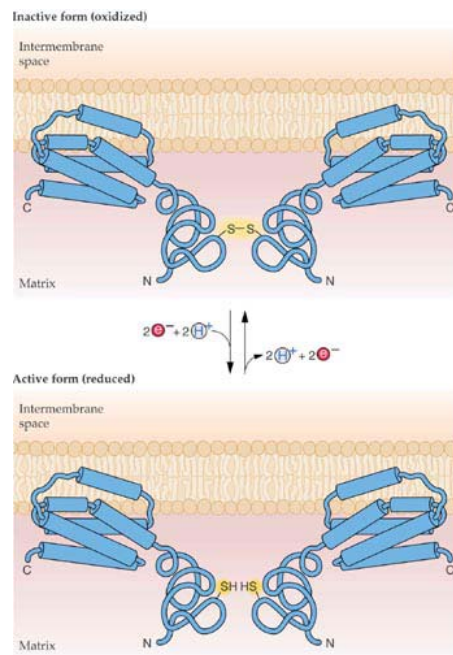


Figura G. Meccanismo proposto di regolazione dell'ossidasi alternativa.

(Da Buchanan *et al.*, 2003)

L'enzima si attiva in seguito alla riduzione del ponte disolfuro (-S-S-) a solfidrile (-SH HS-), che sembra avvenire ad opera della tioredossina (Buchanan *et al.*, 2003). L'attività dell'enzima viene regolata anche a livello di espressione genica. L'espressione dell'AOX è influenzata da vari fattori di stress (come: freddo, stress ossidativi, attacco di patogeni) e da fattori che ostacolano il flusso di elettroni attraverso la catena respiratoria dei citocromi. Il controllo dipende dalla disponibilità di carbonio e di potere riducente (Vanlerberghe & McIntosh, 1997). Infatti, l'attività di questo enzima incrementa notevolmente in presenza di elevate quantità di α -chetoacidi, come il piruvato, che portano l'ossidasi alternativa a competere con la via citocromica e a fungere da valvola di sfogo, evitando la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Millar *et al.*, 1993; 1996; Umbach *et al.*, 1994; Umbach & Siedow, 1993; Hoefnagel *et al.*, 1995). Il trasporto elettronico mitocondriale, assieme a quello dei cloroplasti, rappresenta uno dei potenziali siti di formazione di ROS. In caso di un eccesso di potere riducente, prodotto dal ciclo di Krebs, oppure in particolari condizioni di stress (freddo), la via dei citocromi si satura velocemente per cui potrebbe esserci trasferimento di elettroni direttamente dal complesso I all'ossigeno con

formazione di ROS. In questi casi l'AOX rappresenta una valvola di sicurezza per impedire che i componenti della catena respiratoria possano raggiungere stati di riduzione troppo elevati. Allo stesso tempo, è opportuno che in condizioni di elevata richiesta energetica l'AOX sia poco attiva in modo che la via citocromica sia pienamente funzionale (Møller, 2001; Vanlerberghe & McIntosh, 1997).

L'efficacia dell'AOX, nel ridurre la produzione mitocondriale di ROS, fa pensare ad un suo possibile coinvolgimento anche nel controllo della morte cellulare programmata (Vanlerberghe *et al.*, 2002).

L'AOX è insensibile agli inibitori dei complessi III (antimicina A e mixotiazolo) e IV (azide, cianuro, monossido di carbonio), ma è efficacemente inibita dall'acido salicilidrossiamico (SHAM) (Laties, 1982).

1.9 ORGANISMI ESTREMOFILII

Un organismo che cresce in una condizione ambientale estrema è definito "estremofilo", se le condizioni sono più di una viene definito "poliestremofilo", come è il caso di *Sulfolobus acidocaldarius*, un Archea che vive a pH 3 e alla temperatura di 80°C.

Per condizioni estreme si intendono sia estremi fisici (come temperatura, radiazioni, pressione) sia estremi chimici (come disidratazione, salinità, nutrienti, pH).

In particolare, il parametro temperatura influenza un ampio spettro di componenti cellulari e metabolici nonché la crescita degli organismi.

Gli ambienti caratterizzati da temperature elevate sono generalmente associati a zone in cui si manifestano fenomeni termali e vulcanici, in cui la temperatura può raggiungere valori anche di 400°C. All'estremo opposto si trovano le fredde zone artiche e antartiche che hanno temperature comprese fra -40°C e +20°C.

Sulla base della temperatura di crescita gli organismi vengono distinti in:

- ipertermofili (optimum di crescita a circa 75°C con massimi di 110°C);
- termofili (optimum di crescita a 50°C con un massimo di 70°C);
- mesofili (crescita 20°- 45°C);
- psicrofili (crescita da -10°C fino a circa 25°C)

(www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/microbes/thermo.htm).

La temperatura agisce modificando la fluidità delle membrane e destabilizzando la struttura di proteine e acidi nucleici, inoltre altera la stabilità dell'apparato fotosintetico. Ad esempio, la temperatura di 100°C normalmente denatura le proteine e gli acidi nucleici, e incrementa la fluidità delle membrane a livello letale. Ancora, la clorofilla viene degrata a 75°C impedendo che possa avvenire il processo fotosintetico determinando di conseguenza la morte dell'organismo (Rothschild & Mancinelli, 2001).

Appare chiaro che gli organismi termofili, come anche gli psicrofili, per poter colonizzare gli ambienti avversi in cui normalmente vivono, hanno dovuto evolvere una serie di meccanismi di tolleranza al fine di mantenere la stabilità, la flessibilità e la funzionalità delle loro molecole biologiche.

Gli enzimi sintetizzati dai termofili e dagli ipertermofili sono termostabili e sono conosciuti come “termozimi” o “termoenzimi”, mentre quelli prodotti dai mesofili sono noti come “mesozimi” (Vieille *et al.*, 1996).

I termozimi possono essere usati come modello per comprendere la termostabilità (Li *et al.*, 2005).

Diversi studi hanno messo in evidenza come la termostabilità sia una proprietà acquisita da una proteina attraverso la combinazione di molte piccole modificazioni strutturali, che vengono raggiunte mediante il cambiamento di qualche aminoacido con altri, o la modulazione di forze canoniche (come legami a idrogeno, interazioni idrofobiche, interazioni con ioni) (Fields, 2001; Scandurra *et al.*, 1998).

Studi di mutagenesi sito-diretta e di comparazione di struttura e stabilità dei termozimi e dei mesozimi, hanno rivelato importanti fattori che contribuiscono alla maggiore stabilità dei primi rispetto ai secondi, anche se non c'è un singolo meccanismo universale che promuove la termostabilità (Fontana, 1991; Ladenstein & Antranikian, 1998).

I fattori che contribuiscono alla stabilità includono interazioni intermolecolari addizionali (es: legami a idrogeno, interazioni elettrostatiche, interazioni idrofobiche, legami disolfuro, legami con metalli) e più generalmente la struttura conformazionale. In particolare, i termozimi sono generalmente più rigidi dei mesozimi. L'incremento della rigidità è essenziale per preservare la loro struttura cataliticamente attiva alle alte temperature e per proteggere la proteina dal

dispiegamento. Tutti gli enzimi aumentano la rigidità attraverso la stabilizzazione delle α -eliche e l'ottimizzazione delle interazioni elettrostatiche (Li *et al.*, 2005).

Cambiamenti piuttosto lievi nella struttura degli enzimi possono condurre a grandi cambiamenti nella termostabilità (Vieille & Zeikus, 2001).

La stabilità, la flessibilità e la funzionalità delle proteine alle alte temperature vengono mantenute anche mediante la produzione, da parte degli organismi termofili, di soluti termostabilizzanti. Questa strategia risulta particolarmente vantaggiosa perché permette agli organismi di adattarsi ad ampi range di temperatura semplicemente modulando la concentrazione di questi soluti (Martins *et al.*, 1997).

Negli organismi termofili fotoautotrofi la tolleranza alle alte temperature dipende principalmente dal mantenimento di un apparato fotosintetico stabile e funzionale. I cianobatteri termofili sono organismi con un apparato fotosintetico ossigenico particolarmente termostabile, anche se non è stato ancora chiarito come facciano a stabilizzarlo alle alte temperature (Inoue *et al.*, 2000; Nishiyama *et al.*, 1999). Da studi fisiologici, condotti su questi microrganismi, è risultato che il PSI è maggiormente termostabile nei cianobatteri termofili rispetto ai mesofili, e anche il PSII mostra una maggiore termostabilità (Nishiyama *et al.*, 1999). Non ci sono invece indicazioni circa la termostabilità del complesso dei citocromi b_6f , della plastocianina e di altri componenti dell'apparato fotosintetico (Balme *et al.*, 2001).

Nella stabilizzazione dell'apparato fotosintetico un ruolo importante sembra essere giocato anche dai lipidi delle membrane tilacoidali: mono- e digalattolipidi, sulfogalattolipidi e fosfatidilglicerolo (Wada *et al.*, 1994; Gombos *et al.*, 1994).

Le variazioni di parametri ambientali, tra cui la temperatura, determinano infatti cambiamenti adattativi nella composizione lipidica delle membrane, nei rapporti tra le classi molecolari (Maslova *et al.*, 2004), nel grado di saturazione degli acidi grassi (Wada *et al.*, 1994; Gombos *et al.*, 1994) e nell'espressione ed attività di alcuni enzimi coinvolti nel loro metabolismo, come le desaturasi (Sakamoto & Bryant, 1997).

All'opposto estremo di temperatura, cambiamenti generali nella composizione aminoacidica si realizzano anche negli enzimi di organismi adattati a vivere in ambienti freddi. Gli enzimi termofili e psicrofili, infatti, non usano stratagemmi

distinti per mantenere un appropriato bilancio tra flessibilità e stabilità, ma gli stessi fattori stabilizzanti possono essere trovati in entrambi (Fields, 2001).

Benché ci siano meno dati disponibili riguardo gli enzimi psicrofili, rispetto a quelli relativi agli enzimi termofili, diversi studi hanno permesso di stabilire che a basse temperature le proteine vengono stabilizzate mediante l'aumento delle interazioni forti, i ponti salini e i ponti disolfuro, mentre nei termofili aumentano le interazioni idrofobiche (Feller *et al.*, 1997; Gianese *et al.*, 2002).

Per quanto riguarda la fluidità della membrana, che tende a diminuire all'abbassarsi della temperatura, gli organismi psicrofili si adattano incrementando la percentuale di acidi grassi insaturi nei lipidi di matrice (Rothschild & Mancinelli, 2001).

Esistono indicazioni che la fluidità della membrana gioca un ruolo centrale nella percezione sia delle alte che delle basse temperature. L'irrigidimento delle membrane tilacoidali sembra modificare i profili di espressione dei geni *heat-shock*, suggerendo che il meccanismo di percezione della temperatura possa risiedere in queste membrane (Horvath *et al.*, 1998).

Ancora, alcuni organismi per adattarsi agli ambienti freddi hanno sviluppato particolari sistemi come una parete particolarmente spessa o la produzione di sostanze anticongelanti (Kawecka, 1986).

1.10 MORTE CELLULARE PROGRAMMATA

La “morte cellulare programmata” (PCD), o “apoptosi”, è un meccanismo di “suicidio cellulare” geneticamente controllato e finemente regolato affinché esso venga attivato solamente in determinate cellule e al momento giusto (Sanmartin *et al.*, 2005).

Negli organismi animali si possono distinguere due tipi di morte cellulare: la necrosi e l'apoptosi.

La morte per necrosi è conseguente a traumi di varia entità come: ipossia, ipertermia, infezione virale, esposizione ad agenti tossici. Questi eventi portano ad una perdita dell'integrità delle membrane degli organelli, incluso il nucleo, con conseguente rilascio del loro contenuto, fino alla rottura della membrana plasmatica e degradazione del DNA in modo aspecifico (Schwartz *et al.*, 1993).

L'apoptosi, a differenza della necrosi, non è un processo casuale. E' la cellula stessa che trascrivendo geni specifici, sintetizzando nuovi enzimi e consumando energia, inizia e porta avanti un processo di morte finemente regolato (Arnoult *et al.*, 2002).

Negli animali l'apoptosi è un fenomeno che si realizza attraverso una serie di eventi morfologici che prevedono: una riduzione del volume citosolico della cellula, il mantenimento dell'integrità degli organuli interni almeno nelle fasi iniziali del processo, la disgregazione del nucleolo a livello nucleare, la condensazione e frammentazione della cromatina in porzioni di 180 pb o multipli detti "ladders" (in seguito al taglio del DNA *linker* tra i nucleosomi). La cromatina degradata si compatta in masserelle che si spostano verso la periferia del nucleo ed insieme ad altri frammenti di materiale nucleare raggiungono poi la membrana plasmatica, dove vengono circondati da evaginazioni di quest'ultima che fanno assumere alla cellula un aspetto a bolle ("blebbing"). Queste bolle successivamente si staccano dalla cellula e vengono fagocitate dai macrofagi o da cellule vicine, senza che ci sia una reazione infiammatoria (Chowdhury *et al.*, 2006; Vianello *et al.*, 2007; Buchanan *et al.*, 2003).

Per quanto riguarda gli organismi vegetali diverse tipologie di PCD vengono attivate: nella senescenza, nella formazione dell'endosperma nei cereali (Gray, 2004), nella differenziazione degli elementi di conduzione dello xilema (Kuriyama & Fukuda, 2002; Thomas *et al.*, 2003), nella formazione dell'aerenchima (Gunawardena *et al.*, 2001), nello sviluppo del fiore (Caporali *et al.*, 2003), ed ancora nella risposta a stress abiotici (come luce, temperatura, salinità, carenza di nutrienti). Anche la "risposta ipersensibile" (HR), con cui le piante resistenti contrastano i tentativi di infezione da parte di organismi potenzialmente patogeni, è un esempio di PCD (Heath, 2000; Lam, 2004). Nonostante siano state identificate queste tipologie di PCD, vi è ancora discussione sul fatto se esse siano realmente da considerare come casi di morte cellulare programmata. Ciò è dovuto al fatto che esse si realizzano con eventi notevolmente differenti da quelli degli organismi animali. Infatti, nelle cellule vegetali la presenza della parete cellulare impedisce l'assorbimento dei corpi apoptotici da parte delle cellule adiacenti e anche se la parete non fosse presente, perché digerita o degradata, tra le cellule vegetali non ci sono fagociti. Inoltre,

nelle piante durante la PCD non sempre si osserva la condensazione della cromatina o la frammentazione del DNA.

Pertanto le cellule vegetali degradano il loro contenuto mediante autofagia, con la formazione di vescicole, gli autofagosomi, che inglobano porzioni del citosol, compresi organelli interi, che a loro volta vengono inglobati nel vacuolo e poi degradati da enzimi idrolitici contenuti in quest'ultimo (Buchanan *et al.*, 2003).

Negli animali il processo apoptotico è regolato da proteine che, a seconda dello stimolo apoptotico, possono essere raggruppate in due grandi famiglie: quella delle caspasi e quella delle proteine Bcl-2 (*B-cell lymphoma gene 2*), proteine intracellulari che regolano l'attivazione delle procaspasi (Zong *et al.*, 2005).

Le caspasi ("c" come cisteina nel sito catalitico; "Asp" come acido aspartico riconosciuto come sito di taglio; "asi" come tutti gli enzimi litici) appartengono ad una famiglia di cistein proteasi citosoliche, evolutivamente conservate già dal nematode *Caenorhabditilis elegans* fino all'uomo (Marks & Berg, 1999).

Le caspasi nella cellula sono presenti come forme zimogene (procaspasi), con bassa attività biologica. Nella forma di procaspasi (32-56 kDa) sono costituite da quattro domini: un predominio N-terminale, una subunità grande (17-21 kDa), una subunità piccola (10-13 kDa) e una regione *linker* tra subunità piccola e grande (Riedl & Shi, 2004). L'attivazione avviene in seguito al taglio proteolitico tra il predominio N-terminale e la subunità grande e tra la subunità piccola e il *linker*, per cui la forma attiva è costituita da due eterodimeri (subunità grande/subunità piccola) legati a dare un tetramero con due siti attivi (Liang & Fesik, 1997).

Le caspasi modulando l'attività di proteine regolatrici, inducono la degradazione del DNA in modo indiretto legandosi ad un inibitore (ICAD) normalmente legato ad una endonucleasi attivata da caspasi (CAD) (Enari *et al.*, 1998). La caspasi-3 scinde il legame ICAD-CAD, rendendo l'endonucleasi libera di agire. La CAD è responsabile della formazione di frammenti di DNA di 180 pb o multipli interi.

Nonostante nelle cellule vegetali sia stata individuata un'attività "*caspase-like*", che viene inibita da inibitori delle caspasi animali, non sono ancora stati identificati i corrispondenti omologhi delle caspasi animali. Data la correlazione nella sequenza e nella struttura terziaria con le caspasi animali, le proteine ipotizzate a ricoprire il ruolo di "*caspase-like*" nelle piante sono: gli enzimi

proteolitici vacuolari (VPEs) e le metacaspasi, entrambe proteasi cisteiniche (Woltering *et al.*, 2002).

Nonostante le differenze fino ad ora riportate, il meccanismo di morte cellulare nelle piante e negli animali risulta essere abbastanza conservato (Lam, 2004).

Il processo di morte cellulare programmata sembra essere diffuso anche tra gli organismi unicellulari come nel caso di *Chlamydomonas reinhardtii* (Moharikar *et al.*, 2006) e di *Dunaliella tertiolecta* (Segovia *et al.*, 2003).

Nonostante questo processo sia stato considerato inizialmente un fenomeno eucariotico, esistono indicazioni che eventi simili a quelli della morte cellulare programmata possano avvenire anche in batteri (Bayles, 2003) e in cianobatteri (Lee & Rhee, 1997).

Per quanto riguarda i cianobatteri, comunque, le evidenze morfologiche e biochimiche di morte cellulare programmata sono a tutt'oggi molto scarse. In letteratura, infatti, si trovano solo due lavori in cui vengono portate evidenze sperimentali di morte cellulare programmata in *Anabaena* sp. (Ning *et al.*, 2002) e *Trichodesmium* spp. (Berman-Frank *et al.*, 2004). Questi due cianobatteri filamentosi, infatti, vanno incontro a morte cellulare programmata quando sottoposti a stress ambientali, come ipersalinità (nel caso di *Anabaena*) o carenze nutrizionali e alta irradianza (nel caso di *Trichodesmium*).

Per questi organismi è stato ipotizzato che la PCD possa essere utilizzata come strategia per aiutare la popolazione, in condizioni di stress o di carenza di nutrienti, ad eliminare le cellule vecchie e danneggiate fornendo alle cellule più giovani e integre composti organici essenziali (Bidle & Falkowski, 2004).

1.11 COMPENSORIO TERMALE EUGANEO

Il Parco Regionale dei Colli Euganei, situato nella parte sud-occidentale della provincia di Padova, si estende per circa 200 Km² ed è conosciuto in tutta Italia e a livello internazionale per le sue acque termali. Il territorio interessato dall'attività termale ha una superficie di circa 60 Km² e occupa l'area ad est del comprensorio euganeo in corrispondenza dei comuni di Abano, Montegrotto, Galzignano e Battaglia Terme. L'origine del termalismo euganeo è stata dibattuta a lungo. Nel secolo scorso si pensava che fosse imputabile alla passata attività vulcanica, in seguito si pensò ad una mescolanza fra acque vulcaniche e acque piovane riscaldate dai corpi vulcanici in via di raffreddamento. Studi più recenti (Piccoli *et al.*, 1976) hanno permesso di chiarire che la provenienza e le modalità di riscaldamento delle acque sono indipendenti dal vulcanesimo che ha generato i colli, ritenuto troppo antico per rappresentare ancora una sorgente attiva di calore. Analisi chimiche hanno stabilito che le acque sono di natura meteorica e che raggiungono il suolo in un'area montana individuata nel territorio delle Piccole Dolomiti (Recoaro, Schio, Valdagno, monte Pasubio....). Qui le acque iniziano un lento cammino di discesa attraverso rocce calcaree raggiungendo profondità di 3000-4000 m. Durante la discesa, per il normale calore interno della terra, le acque aumentano costantemente la loro temperatura raggiungendo i 170-200°C e si arricchiscono di sali minerali grazie allo sgretolamento delle rocce attraversate. Misurazioni con materiali radioattivi indicano in almeno 25 anni il tempo necessario alle acque per compiere il percorso sotterraneo, stimato essere di un centinaio di chilometri, dopo di che, a causa della pressione idraulica dell'intero bacino sotterraneo, l'acqua è costretta a risalire in corrispondenza dei Colli Euganei, dove sgorga ad una temperatura di circa 87°C, a causa del parziale raffreddamento durante la fase di risalita (Fig. I) (Piccoli *et al.*, 1976).

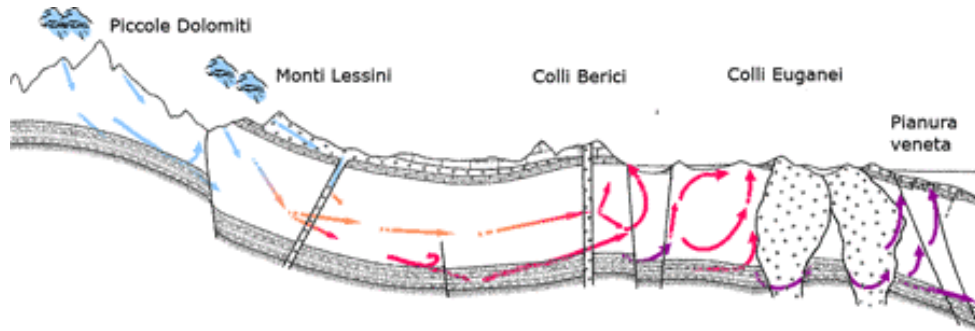


Fig.I. Schema del circuito idrotermale Euganeo-Berico (da Piccoli *et al.*, 1976).

Quest'acqua, dal punto di vista chimico, è classificata come un'acqua salso-bromo-iodica ipertermale con un residuo fisso a 180°C di 5-6 gr di sali disciolti per litro (Piccoli *et al.*, 1975).

Quest'acqua termale oltre ad essere utilizzata nella balneoterapia e nelle terapie inalatorie, viene impiegata nella "maturazione", conservazione e rigenerazione del fango termale conferendo a quest'ultimo importanti effetti terapeutici (Galzigna *et al.*, 1996; Galzigna & Bellometti, 1999).

I fanghi vengono originati dalla commistione di acqua termale con sostanze minerali associate a materia organica originaria, apportata dall'acqua o neoformatisi nell'ecosistema. Essi vengono classificati in base alla natura delle varie componenti in: fango *sorgivo* (primario o naturale) che è quello apportato da una "torbida" sotterranea e fango *vergine* (secondario) dato dal sedimento superficiale che viene a contatto diretto con l'acqua minerale.

Il fango del bacino termale euganeo è rappresentato quasi esclusivamente da fango *vergine* (secondario), prelevato dai fondali dei laghetti di Arquà e Lispida situati anch'essi nel Comprensorio Termale Euganeo, che viene sottoposto poi a maturazione una volta giunto negli stabilimenti termali. Esso è costituito da tre diverse componenti:

- una solida di tipo argilloso (argilla azzurra);
- una idrotermale, rappresentata dall'acqua termale;
- una biologica, definita "bioglea", rappresentata da microalghe e cianobatteri.

La maturazione del fango, necessaria per ottimizzare le caratteristiche terapeutiche del fango, consiste nel lasciar "riposare" con acqua termale alla temperatura di 50°C, in apposite vasche e per un periodo non inferiore ai 60

giorni, l'argilla blu (un silicato di alluminio) estratta dai laghetti di Arquà e Lospida. Questo trattamento, oltre a modificare le caratteristiche fisico-chimiche del fango, favorisce la crescita di specifiche comunità di microrganismi in particolare di microalghe (diatomee) e cianobatteri, che sono responsabili oltre che della formazione, sulla superficie del fango, di caratteristiche coperture di colore verde-azzurro (Andreoli & Rascio, 1975; Tolomio *et al.*, 2002; 2004), anche della produzione di tutta una serie di metabolici secondari, in particolare solfoglicolipidi, che conferiscono al fango notevoli capacità terapeutiche (Lalli *et al.*, 2004).

1.12 GENERALITA' SUI CIANOBATTERI

I cianobatteri, impropriamente chiamati fino a poco tempo fa “alghe azzurre” o “alghe blu-verdi” (Pupillo *et al.*, 2003), sono un gruppo di microrganismi fotoautotrofi che giocano un ruolo cruciale, già dal Precambriano, nell'immissione di ossigeno nell'atmosfera (Schopf, 2000).

Sono un gruppo molto eterogeneo di organismi procarioti fotoautotrofi e costituiscono uno dei principali phyla di eubatteri, quello delle Cyanophyta (o Cyanobacteria) (Woese, 1987).

I cianobatteri comprendono circa 2000 specie, appartenenti a 150 generi, raggruppate all'interno di un'unica classe, quella delle Cyanophyceae. La tassonomia dei cianobatteri è stata oggetto nel corso degli anni di numerose controversie ed è stata più volte modificata in seguito alle informazioni acquisite utilizzando via via diversi e più moderni metodi di indagine (Van den Hoek *et al.*, 1995; Whitton & Potts, 2000).

Secondo il sistema di classificazione proposto da Anagnostidis & Komàrek (1988), i cianobatteri possono essere suddivisi in cinque ordini:

- Chroococcales
- Oscillatoriales
- Nostocales
- Stigonematales
- Pleurocapsales.

Grazie a recenti indagini di tipo molecolare (Castenholz, 2001) all'interno di questi cinque ordini si possono individuare tutta una serie di sottordini.

I cianobatteri sono in grado di colonizzare una grande varietà di habitat inclusi ambienti estremi come ghiacciai, deserti, ambienti ipersalini e ambienti termali (Tamagnini *et al.*, 2002; Pupillo *et al.*, 2003). Sono diffusi nel suolo ma anche in ambienti marini e di acqua dolce. Alcune specie vengono definite endolitiche perché in grado di vivere all'interno di rocce carbonatiche, coralli e alghe rosse calcaree, altre, definite epilittiche, colonizzano la superficie di rocce umide.

Tra i cianobatteri ci sono forme in grado di tollerare sia alte che basse intensità luminose, e alti livelli di radiazioni UV. Altri cianobatteri tollerano stress idrico e disseccamento e possono sopravvivere anche in presenza di elevati livelli di salinità.

Molte specie di cianobatteri sono in grado di fissare l'azoto atmosferico e di instaurare simbiosi con altri organismi (Van den Hoek *et al.*, 1995; Pupillo *et al.*, 2003) sia animali (spugne, protozoi) che vegetali (funghi, alghe, piante terrestri).

Alcuni cianobatteri producono metaboliti secondari con azione antimicrobica, come è il caso di *Fischerella muscicola*, che produce fischerellina A, e di *Scytonema hoffmanni* che produce cianobatterina, sostanze in grado di inibire la crescita di altri cianobatteri e di organismi fotoautotrofi in generale (Gross *et al.*, 1991; Hagmann & Jüttner, 1996; Gleason & Baxa, 1986).

I cianobatteri possono rappresentare anche un rischio per la salute umana e per l'equilibrio di molti ecosistemi. In particolare alcune specie appartenenti ai generi *Oscillatoria*, *Nodularia*, *Microcystis* e *Anabaena*, sono in grado di formare grosse "fioriture" sulla superficie di laghi, fiumi e mari, conosciute anche con il termine di "water bloom", e di rilasciare potenti epatotossine e neurotossine. Queste sono responsabili di grosse morie di pesci, crostacei e di altri animali che si approvvigionano di queste acque e sono pericolose anche per l'uomo (Chorus, 2001; Stal *et al.*, 2003; Van den Hoek *et al.*, 1995).

I cianobatteri sono produttori di un'ampia varietà di metaboliti, molti dei quali non fanno parte del metabolismo primario (Scott, 1991).

I cianobatteri dei generi *Nostoc* e *Stigonema* costituiscono, dopo gli attinomiceti, i maggiori produttori naturali di sostanze ad attività chemioterapica (Carmichael, 1992), tra cui di particolare interesse sono gli antibiotici e gli anticancerogeni.

Sulla complessità biologica di questi prodotti dei cianobatteri basti pensare che una varietà di *Lyngbya majuscula* sintetizza una molecola che, a seconda che contenga o meno Br, ha attività tumorale o proprietà antineoplastica (Mynderse *et al.*, 1977).

I cianobatteri trovano impiego anche nell'alimentazione umana e animale. E' comunque da tenere presente che i cianobatteri producono metaboliti secondari, come le biotossine, il cui effetto non è sempre noto, che cianobatteri non tossici possono divenire improvvisamente tossici e che tale mutamento non può essere regolato poiché non sono ancora noti i meccanismi che ne stanno alla base.

1.13 CARATTERISTICHE CELLULARI DEI CIANOBATTERI

I cianobatteri sono organismi Gram- che presentano una notevole diversificazione morfologica e dimensionale. In questo gruppo, infatti, rientrano specie unicellulari, coloniali e filamentose con dimensioni variabili da 0,2 μm a 200 μm . Come tutti i procarioti hanno cellule prive di compartimentazione interna (Van den Hoeck *et al.*, 1995). Tuttavia questi organismi sono considerati più complessi degli altri procarioti perché presentano un sistema interno di membrane tilacoidali, dove risiedono i componenti delle catene di trasferimento elettronico fotosintetica e respiratoria.

Le cellule cianobatteriche sono rivestite da un *envelope* cellulare costituito, partendo dall'esterno, da: una serie di strati, definiti anche "rivestimento cellulare", esterni alla parete; la parete pluristratificata costituita da una regione interna di peptidoglicano (mureina) e una più esterna di lipopolisaccaridi; (Hoiczyk & Hansel, 2000). Il rivestimento cellulare che circonda la parete viene definito in maniera diversa dai diversi autori. Ad esempio Bertocchi e collaboratori (1990) e De Phillips & Vincenzini (1998) indicano con il termine di "mucillagine" il materiale gelatinoso disperso intorno all'organismo, ma che non riflette la forma delle cellule; definiscono "capsula" uno strato spesso dai contorni definiti e chiamano "guaina" uno strato sottile che circonda la cellula o addirittura gruppi di cellule, visibile al microscopio ottico anche senza colorazione. Secondo Komàrek & Anagnostidis (1989) i diversi involucri con la loro forma, struttura,

stratificazione, stabilità, sono specie- o generi-specifici e pertanto possono rappresentare un importante carattere nella classificazione tassonomica.

E' opinione comune che questi strati esterni siano necessari per proteggere le cellule dal disseccamento.

Nel citoplasma delle cellule cianobatteriche si ritrovano ribosomi 70S e il DNA, che è localizzato al centro della cellula in una zona definita "nucleoplasma" o "centroplasma", non racchiuso da un involucro nucleare (Van den Hoeck *et al.*, 1995). Possono esserci anche vescicole gassose che regolano il galleggiamento delle cellule a certi livelli nella colonna d'acqua. Ancora nel citoplasma si possono distinguere tutta una serie di inclusi costituiti da sostanze di riserva come: granuli di cianoficina, un polimero costituito da quantità equimolari di arginina e acido aspartico, che rappresenta una riserva di azoto; granuli di glicogeno e poli- β -idrossibutirrato che rappresentano riserve di carbonio (Flores & Herrero, 1994) e granuli di polifosfato che servono come riserva di fosfato.

Molto importante è l'accumulo di "amido cianofitico" o "amido delle cianoficee", un glucano molto simile al glicogeno e all'amilopectina presente nell'amido delle piante superiori (Fuhs, 1973; Meeuse, 1962). Questi granuli sono normalmente dislocati tra i tilacoidi.

Infine nel citoplasma si trovano anche i carbossisomi, corpi poliedrici che contengono anidraasi carbonica e Rubisco (ribulosio-1,5-bifosfato carbossilasi/ossigenasi) e sono coinvolti nell'assimilazione del carbonio inorganico.

Oltre ad organizzare il carbonio, molti cianobatteri sono in grado di fissare l'azoto atmosferico. Come noto l'enzima che catalizza tale processo, la nitrogenasi, è inattivata dall'ossigeno, pertanto i cianobatteri in grado di produrre ossigeno tramite la fotosintesi, hanno evoluto una serie di strategie al fine di consentire l'attività di questo enzima. Un primo tipo di strategia consiste in una separazione spaziale delle cellule in cui avviene l'azotofissazione, le eterocisti, dalle cellule vegetative. Le eterocisti, presenti all'apice del tricoma o lungo il filamento a intervalli regolari, non producono ossigeno perché in esse il PSII viene demolito (Stall, 1995). Esse, inoltre, sono circondate da uno spesso involucro che ostacola l'entrata dell'ossigeno dall'ambiente esterno. La comunicazione tra eterocisti e

cellule vegetative viene garantita dalla presenza di microplasmodesmi (Wolk *et al.*, 1994).

Un secondo tipo di strategia consiste nella separazione temporale della fotosintesi e dell'azotofissazione, così che la prima viene condotta di giorno alla luce e la seconda di notte al buio (Stall, 1995; Barsanti & Gualtieri, 2006). La separazione temporale dei due eventi è regolata dall'orologio biologico. Questa è stata la prima evidenza di ritmo circadiano nei procarioti (Golden *et al.*, 1997).

Per quanto riguarda la riproduzione, nei cianobatteri unicellulari questa avviene per scissione binaria con invaginazione della membrana e della parete cellulare all'equatore della cellula. In quelli filamentosi, invece, la riproduzione avviene mediante frammentazione del tricoma con formazione di ormogoni. Quest'ultimi sono brevi catene in cui le cellule sono in generale più corte e di diametro minore rispetto alle cellule vegetative. Questo tipo di riproduzione in molte specie avviene per frammentazione del filamento a livello di particolari cellule dette necridi (Pupillo *et al.*, 2003).

Numerosi fattori ambientali come la luce, i nutrienti, la temperatura, il pH, stimolano o inibiscono la formazione degli ormogoni (Tandeau de Marsac, 1994). La riproduzione può avvenire anche per sporulazione. Si formano cellule dette acineti, di dimensioni molto maggiori di quelle vegetative e con pareti ispessite. Queste cellule sono ricche di materiale di riserva (glicogeno, granuli di cianoficina) che permette la loro sopravvivenza, in uno stato di dormienza, in condizioni sfavorevoli (Van den Hoek *et al.*, 1995).

1.14 ORDINE CHROOCOCALES

L'ordine Chroococcales comprende cianobatteri unicellulari solitari, caratterizzati da uno strato esterno mucillaginoso, o coloniali, che non formano però veri filamenti.

Questo ordine è costituito da organismi con cellule sferiche, ovali, irregolari raramente a forma di fuso, con struttura uniforme.

La principale caratteristica degli organismi di questo genere è che presentano cellule con membrane tilacoidali disposte a livello parietale parallelamente alla parete.

La divisione cellulare avviene mediante fissione binaria, con divisione della cellula madre in due parti uguali. Le due cellule figlie crescono fino a raggiungere le dimensioni della cellula madre e poi vanno incontro ad una successiva divisione (Komàrek & Anagnostidis, 1999).

1.14.1 Genere *Cyanobacterium*

Il genere *Cyanobacterium* è stato istituito, assieme al genere *Cianocete*, da Rippka & Cohen-Bazire nel 1983. Questo genere consente di distinguere sulla base di differenze nella sequenza in basi del DNA e di alcune caratteristiche biochimiche, come la resistenza ai cianofagi, alcuni cianobatteri coccoidi che un tempo venivano erroneamente classificati come appartenenti al genere *Synechococcus*. Le caratteristiche ultrastrutturali e biochimiche osservate nella specie tipo, *Cyanobacterium stanieri* (Rippka & Cohen-Bazire, 1983), confermano questo nuovo genere (Komàrek *et al.*, 1999, 2004).

Il genere *Cyanobacterium* comprende 2 (secondo Rippka *et al.*, 2001), 7 (secondo Komàrek & Anagnostidis, 1999) o 12 (secondo Komàrek *et al.*, 2004) specie.

Gli organismi appartenenti a questo genere sono caratterizzati da cellule solitarie, talvolta riunite in gruppi irregolari ma senza formare colonie, di forma coccoide o cilindrica con estremità arrotondate. Le cellule crescono fino a raggiungere una dimensione prestabilita e poi vanno incontro a divisione. Si riproducono per scissione binaria, trasversalmente all'asse longitudinale della cellula, pertanto si originano due cellule figlie isomorfiche (Rippka & Cohen-Bazire, 1983).

1.15 ORDINE OSCILLATORIALES

L'ordine delle Oscillatoriales è caratterizzato da organismi filamentosi con tricomi costituiti da cellule vegetative che non si differenziano in eterocisti e acineti.

A questo ordine appartengono 6 famiglie, rispettivamente quelle delle: Borziaceae, Homoeotrichaceae, Oscillatoriaceae, Phormidiaceae, Schizothrichaceae e Pseudanabaenaceae (Anagnostidis & Komàrek, 1988).

In particolare all'interno della famiglia delle Pseudanabaenaceae viene collocato il genere *Leptolyngbya*, mentre all'interno di quella delle Oscillatoriaceae si ritrova il genere *Oscillatoria*.

1.15.1 Genere *Leptolyngbya*

Il genere *Leptolyngbya*, genere tipo della famiglia delle Pseudanabaenaceae, di cui fanno parte anche i generi *Leibleina* e *Planktolyngbya*, è caratterizzato da cianobatteri filamentosi, solitari o raggruppati in colonie, con tricomi molto sottili di diametro inferiore ai 3 μm .

La specie tipo di questo genere è *Leptolyngbya boryana* (Gomont) (Anagnostidis & Komàrek, 1988).

I cianobatteri appartenenti a questo genere non presentano eterocisti, acineti, flagelli e vescicole gassose, mentre presentano i tipici granuli di cianoficina e di polifosfati (Bellezza *et al.*, 2003). Hanno tricomi con cellule apicali rotondeggianti o coniche (Albertano & Kovacik, 1994). Alla fine dei tricomi si liberano gli ormogoni, senza la formazione di cellule necritiche.

1.15.2 Genere *Oscillatoria*

Gli organismi appartenenti a questo genere sono forme prevalentemente di acqua dolce, talvolta marine, che solitamente formano intrecci macroscopici stratificati, solo raramente tricomi isolati. Presentano talli spesso più larghi di 6,8 μm e di lunghezza variabile fino a 70 μm . Sono normalmente privi di una guaina di rivestimento che si è vista comparire solo occasionalmente in condizioni di stress. I tricomi sono mobili grazie a dei movimenti rotatori direzionati verso sinistra o verso destra.

Le singole cellule sono corte, di forma discoidale, di larghezza spesso doppia rispetto all'altezza, oppure cilindriche, rettangolari o leggermente arrotondate, talvolta incurvate alle estremità, prive di costrizioni a livello delle pareti laterali.

Il contenuto cellulare è omogeneo, talvolta può presentare granuli di sostanze di riserva.

La riproduzione avviene per frammentazione del tallo mediante la formazione di necridi, per cui si liberano degli ormogoni mobili più o meno corti (Anagnostidis & Komàrek, 1988).

1.16 L'AMBIENTE NIVALE

L'ambiente nivale, come quello termale, è un habitat inospitale per la maggior parte degli organismi fotosintetici in quanto presenta condizioni severe di temperatura, intensità luminosa e scarsità di nutrienti. Nonostante ciò diversi studi hanno evidenziato che alcuni organismi fotoautotrofi, in particolare microalghe, sono in grado di colonizzare questo ambiente così avverso.

Nell'ambito delle microalghe adattate a vivere nell'ambiente nivale fino ad ora sono state segnalate circa 100 specie della divisione Chlorophyta appartenenti prevalentemente ai generi *Chlamydomonas*, *Chloromonas*, *Koliella*, *Raphidonema*, *Scotiella* e *Stichococcus* (Hoham *et al.*, 2002).

1.16.1 IL GHIACCIAIO DELL'ANTELAO

Il ghiacciaio dell'Antelao, con i suoi 3263 m d'altitudine, è la vetta più alta del Cadore, sopravanzata soltanto, nelle Dolomiti, dalla Marmolada (3343 m). Tradizionalmente è definito il re delle Dolomiti, per la sua imponenza, ma anche perché con un po' di fantasia, guardando la sua poderosa mole dall'alta Val del Boite, vi si può intravedere una figura di sovrano.

La struttura del monte è compatta, tutta convergente sulla vetta più alta. Nei pressi della sommità si trovano altre tre cime importanti: la Menini (3177 m), la Chiggiato (3163 m) e la Fanton (3142 m).

L'Antelao è delimitato a nord dal gruppo delle Marmarole ed il punto di confine è dato da Forcella Piccola; da ovest fino a sud è delimitato dalla valle del Boite e infine ad est si trova Calalzo.

Il versante meridionale domina la media e bassa Val del Boite con uno sbalzo di ben 2300 m di pareti rocciose, solcate dal profondo e ripidissimo canale detto Valòn dell'Antelao.

Il versante occidentale, rivolto verso la conca di San Vito di Cadore è caratterizzato dalla lunga schiena settentrionale di lastroni rocciosi. A nord-est domina la presenza di due fra i più spettacolari ghiacciai delle Dolomiti: il Ghiacciaio Superiore ed il Ghiacciaio Inferiore, separati fra loro da uno sperone

roccioso, che poi si protende verso la Val d'Oten allargandosi nella lunga dorsale della cima Cadin (2613 m) e del monte Ciauderona (2587 m).

Verso sud-est si trova la Cima Fanton, la vetta più orientale dell'Antelao. La bassa dorsale delle Crode di San Piero chiude la parte rocciosa di questo versante, che si prolunga verso est con il verde e panoramico crinale del Monte Trànego (1849 m) esaurendosi poi sopra Pieve di Cadore e Calalzo.

Dal colosso scendono verso la Val del Boite ripidi e scoscesi valloni per lo più impercorribili perché rovinati da frane o interrotti da salti. Due belle valli scendono invece verso nord-est solcate da rivi glaciali: l'alta Val d'Oten e la Val Antelao, entrambe terminano con due belle cascate.

La conformazione compatta dell'Antelao non consente traversate escursionistiche, invece vari itinerari di grande interesse panoramico ed ambientale si sviluppano sui suoi fianchi.

1.17 GENERALITA' SULLE CHLOROPHYTA

Le alghe sono organismi eucarioti distribuiti tra il regno dei Protista e quello delle Plantae (Whittaker & Margulis, 1978).

Le alghe sono organismi tipicamente acquatici diffusi sia nei mari che nelle acque dolci. Le forme pluricellulari hanno un “corpo” privo di foglie, radici e fusto, definito tallo. Si distinguono, comunque, alghe che hanno esteso il loro habitat alla terra ferma, principalmente in luoghi umidi, dove sono presenti soprattutto forme microscopiche. Questi organismi presentano una notevole variabilità morfologica e dimensionale e ciò ha sempre reso difficile la loro collocazione tassonomica, soprattutto in passato, quando quest'ultima si basava essenzialmente sulla microscopia ottica ed elettronica (Mattox & Stewart, 1984; Melkonian, 1989).

Una divisione algale importante è quella delle Chlorophyta i cui componenti, conosciuti anche come alghe verdi, presentano somiglianze con le piante superiori (Lewis & MacCourt, 2004). Le alghe verdi hanno cloroplasti che contengono clorofille *a* e *b*, β -carotene e xantofille (luteina, violaxantina, zeaxantina e neoxantina) (Gerola, 1995). Spesso nei plastidi è presente un incluso, il pirenoide, ricco in anidride carbonica e Rubisco, che rappresenta un importante carattere

tassonomico (Van den Hoek *et al.*, 1995). Le pareti cellulari sono costituite da cellulosa e pectine, e le sostanze di riserva sono rappresentate principalmente da amido (Graham & Wilcox, 2000). Si distinguono dalle altre alghe verdi ad habitus sifonale, che presentano pareti prive di cellulosa e contengono particolari xantofille, come la sifonoxantina o la sifoneina (Round, 1984).

Le Chlorophyta sono distribuite sia in ambienti acquatici (dolci e salati) che in ambienti terrestri umidi, come sui tronchi degli alberi, sulle foglie delle piante, in simbiosi con funghi, epizoiche su alcuni animali, su rocce. Queste alghe, inoltre, si ritrovano anche nell'ambiente subaereo sottoforma di spore durature e in ambienti estremi come ghiacciai e campi nivali.

All'interno di questa divisione esiste un'enorme variabilità morfologica. Essa comprende, infatti, organismi unicellulari microscopici, singoli o coloniali; organismi pluricellulari filamentosi, altri con tallo cenobiotico ad organizzazione sifonale (una singola cellula plurinucleata) o sifonocladale (più cellule plurinucleate).

Le alghe verdi si riproducono sia in modo sessuato che asessuato. La riproduzione sessuata, che avviene mediante la formazione di gameti, può essere sia isogama che oogama. Nella riproduzione asessuata si distinguono organismi che si riproducono per semplice divisione cellulare, mediante produzione di spore (zoospore e aplanospore) o per frammentazione del tallo, nel caso delle specie pluricellulari (Gerola, 1995).

La divisione delle Chlorophyta comprende quattro classi (Friedl, 1995):

Prasinophyceae;

Chlorophyceae;

Trebouxiophyceae;

Ulvophyceae.

In particolare la classe delle Trebouxiophyceae comprende i generi *Stichococcus*, *Koliella*, *Raphidonema* e parecchie specie del genere *Chlorella*, che fino a poco tempo fa venivano erroneamente incluse nelle Chlorophyceae (Friedl, 1997).

1.17.1 Genere *Chlorella*

Le alghe appartenenti al genere *Chlorella* sono in grado di colonizzare un'ampia gamma di ambienti acquatici e terrestri, compresi ambienti estremi come campi di neve, siti vulcanici e geotermali (Huss *et al.*, 2002).

La classificazione delle alghe appartenenti a questo genere è stata oggetto di numerose revisioni. Attualmente grazie a studi molecolari basati sul confronto delle sequenze geniche del 18S rDNA, è stato possibile definire che gli organismi che possono essere classificati come appartenenti al genere *Chlorella* sono da ricercare sia all'interno della classe delle Chlorophyceae che all'interno di quella delle Trebouxiophyceae. Infatti, secondo l'ultima revisione effettuata si distinguono: le vere *Chlorelle*, che comprendono le specie vicine a *Chlorella vulgaris*, che è la specie tipo del genere *Chlorella*, e le false “*Chlorelle*”, scritte tra apici, che sono tutte le altre che fanno parte di un gruppo distribuito tra la classe delle Trebouxiophyceae e quella delle Chlorophyceae.

Solo quattro specie possono essere considerate vere *Chlorelle*: *C. vulgaris* Beijerinck, *C. lobophora* Andreyeva, *C. sorokiniana* Shih et Krauss, e *C. kessleri* Fott et Nováková (Huss *et al.*, 1999).

Questa distinzione, basata su dati molecolari, è supportata anche da indagini strutturali e biochimiche. Infatti si è potuto constatare che nelle vere *Chlorelle* il pirenoide è circondato da una guaina di amido ed è attraversato da una serie di tilacoidi, mentre nelle false “*Chlorelle*” la struttura è molto più variabile. Per esempio, in “*Chlorella*” *saccharophila* il pirenoide non è circondato dalla guaina di amido ed è attraversato da un solo tilacoide ondulato e irregolare. Non solo, anche la composizione chimica della parete cellulare può essere un buon carattere discriminante. Nelle vere *Chlorelle* è costituita da glucosammine, mentre in “*Chlorella*” *saccharophila*, ad esempio, è costituita da glucani (Ikeda & Takeda, 1995).

Le alghe appartenenti al genere *Chlorella* sono alghe unicellulari di forma coccoide, prive di flagelli. Esse si riproducono per via vegetativa mediante autosporulazione all'interno di particolari cellule, dette autosporangi (~10 µm), che, alla rottura della parete, possono liberare da 8 a 32 cellule vegetative (~5-6 µm), a seconda della specie.

Non sono ancora noti i fattori che inducono la formazione e la liberazione delle autospore (Agrawal & Singh, 2001).

2. SCOPO DEL LAVORO

Esistono organismi in grado di adattarsi ad habitat in cui uno o più fattori ambientali (come luce, temperatura, pH, disponibilità d'acqua, concentrazione salina) possono raggiungere valori che sembrano incompatibili con la conduzione delle funzioni vitali. Gli habitat più estremi sono colonizzati principalmente da batteri non fotosintetici, ma anche microrganismi fotoautotrofi ossigenici, come cianobatteri e microalghe possono mettere in atto meccanismi adattativi che permettono loro di sopravvivere e svilupparsi in condizioni ambientali particolarmente severe. La maggiore difficoltà di questi organismi fotosintetici consiste nella necessità di salvaguardare la funzionalità dell'apparato fotosintetico, particolarmente complesso e sensibile alle condizioni di stress, per mantenere, anche nelle condizioni ambientali più limitanti, il guadagno fotosintetico essenziale per la loro sopravvivenza.

Molte informazioni sono disponibili sui batteri estremofili, sulla loro biodiversità, sulle loro caratteristiche metaboliche e adattative e sulle loro applicazioni biotecnologiche. Ancora scarse sono invece le conoscenze sulla biodiversità e sui meccanismi alla base dei processi adattativi alle condizioni ambientali severe di microrganismi fotosintetici. Lo studio della tassonomia e della filogenesi, così come delle strategie strutturali e funzionali di adattamento di cianobatteri e microalghe a tali condizioni, costituisce quindi un campo di ricerca ancora aperto e molto affascinante da cui si possono attendere nuove informazioni di sicuro interesse non solo scientifico ma anche applicativo, sulla biodiversità di questi ambienti difficili, sulle strategie adattative e sulla plasticità strutturale, metabolica e fisiologica degli organismi fotoautotrofi in grado di colonizzarli.

I campi di neve delle regioni montane di alta quota e gli ambienti termali costituiscono habitat decisamente severi a cui, comunque, più specie di cianobatteri e di microalghe hanno mostrato di sapersi adattare.

La segnalazione dell'esistenza di microrganismi vegetali in grado di vivere sulle nevi risale all'inizio del secolo scorso. Da allora sono state trovate più di 100 specie di microalghe psicrofile, appartenenti principalmente alle Chlorophyta,

adattate a vivere sui campi di neve. A tutt'oggi, comunque, le conoscenze sulle numerose specie algali delle nevi sono per lo più limitate alla distribuzione geografica e alla tassonomia di alcune di esse. Notevole interesse, quindi, riveste lo studio dei caratteri fisiologici e funzionali di questi microrganismi psicrofili, in particolare della funzionalità dell'apparato fotosintetico, per la loro utilità nel chiarimento dei meccanismi adattativi alle condizioni di estrema severità del loro ambiente di crescita e alle repentine variazioni dei parametri ambientali (luce e temperatura) che in esso si possono determinare.

All'estremo opposto degli psicrofili sono da collocare i microrganismi fotosintetici termofili, che vivono a temperature elevate in zone caratterizzate da fenomeni termali e di vulcanesimo secondario. La biodiversità dei microrganismi fotoautotrofi di questi ambienti è piuttosto limitata ed è rappresentata essenzialmente da cianobatteri che tollerano temperature fino a 50-60°C, arrivando all'estremo di 73°C nel caso unico di *Synechococcus lividus*. Finora sono state segnalate una decina di specie termofile appartenenti principalmente ai generi *Synechococcus*, *Mastigocladus* e *Phormidium*.

Nei cianobatteri termofili, così come nelle microalghe psicrofile, la tolleranza alle severe condizioni ambientali dipende da una serie di meccanismi adattativi e, necessariamente, dalla capacità di mantenere un apparato fotosintetico stabile e funzionale. Gli studi condotti finora su un numero limitato di specie, non hanno ancora fatto piena luce su molti aspetti fisiologici e funzionali di questi microrganismi. Così lo studio di cianobatteri termofili costituisce un campo di ricerca aperto, dove molte domande aspettano ancora una risposta.

Lo scopo della presente ricerca è stato quello di acquisire nuove conoscenze su una microalga psicrofila, raccolta da un campo di neve del ghiacciaio dell'Antelao (Dolomiti) e su alcuni cianobatteri termofili del Comprensorio termale Euganeo.

La ricerca si è proposta di evidenziare le caratteristiche strutturali ed ultrastrutturali dei microrganismi in esame e di analizzare i meccanismi biochimici e fisiologici messi in atto per adattarsi alle severe condizioni di temperatura, ma anche per rispondere alle possibili variazioni di questo limitante parametro ambientale. Inoltre, per i cianobatteri termofili, si è ritenuto interessante verificarne la collocazione tassonomica e filogenetica, al fine di chiarire se essi

appartenessero a specie già segnalate in altri ambienti termali o se fossero forme nuove, endemiche del Comprensorio oggetto di studio.

Per raggiungere questi obiettivi sono state allestite colture dei diversi microrganismi di interesse in un ampio range di temperature allo scopo di stabilire l'intervallo di valori di questo parametro ambientale in cui gli organismi potevano vivere e svilupparsi. Alle diverse temperature di crescita selezionate sono state poi condotte indagini strutturali e funzionali sugli organismi cianobatterici e sulla microalga psicrofila.

Sono state studiate le caratteristiche morfologiche ed ultrastrutturali delle cellule mediante microscopia ottica ed elettronica a trasmissione e scansione, riservando particolare interesse all'organizzazione delle membrane tilacoidali.

Sono state analizzate con tecniche spettrofotometriche e di HPLC le diverse classi di pigmenti fotosintetici, verificando, in particolare, le forme di carotenoidi sintetizzate, vista la fondamentale funzione di questi pigmenti nella protezione dell'apparato fotosintetico in diverse condizioni di stress.

Attenzione è stata riservata, nei cianobatteri, alla composizione dei ficobilisomi che, come antenna del fotosistema secondo, sono la componente più dinamica ed adattabile alle variazioni delle condizioni ambientali.

L'attività fotosintetica dei microrganismi è stata valutata ossigraficamente dall'emissione di ossigeno fotosintetico *in vivo* e nella microalga la stessa metodica è stata applicata anche all'analisi dell'attività respiratoria.

L'assemblaggio dei fotosistemi è stato verificato fluorimetricamente analizzando gli spettri di emissione di fluorescenza *in vivo* delle cellule a 77K e la funzionalità dell'apparato fotosintetico è stata definita dalle misure di emissione di fluorescenza della clorofilla *a in vivo* mediante un fluorimetro PAM (pulse amplitude modulated).

Prove immunologiche con anticorpi specifici sono state allestite allo scopo di analizzare eventuali variazioni termo-dipendenti di componenti essenziali delle membrane fotosintetiche e, nel caso della microalga psicrofila, di quelle respiratorie.

Su cianobatteri esposti a temperature eccessive sono state condotte indagini al microscopio ottico ed elettronico, prove immunologiche e analisi elettroforetiche del DNA, per definire gli eventi che portavano alla morte delle cellule.

L'indagine tassonomica e filogenetica dei cianobatteri termofili è stata condotta con tecniche molecolari utilizzando come markers il gene 16S rDNA, ampiamente utilizzato in indagini filogenetiche su questi organismi, e gli ITS rDNA, spaziatori interni, che permettono di risolvere relazioni a livello generico, specifico e sottospecifico.

3. MATERIALI E METODI

3.1 ALLESTIMENTO E RINNOVO DELLE COLTURE CIANOBATTERICHE

Le colture dei cianobatteri *Cyanobacterium aponinum*, *Leptolyngbya* sp. ETS-04 ed *Oscillatoria duplisecta*, sono state allestite in beute utilizzando il terreno di coltura BG11, il migliore per la crescita di questi organismi (Rippka *et al.*, 1979). Il terreno dopo essere stato autoclavato è stato stabilizzato ad un valore di pH compreso tra 7.3 e 7.5 che, come riportato in letteratura, favorisce la crescita dei cianobatteri (Castenholz, 1988).

La composizione di questo terreno è di seguito riportata in tabella (Tabella A).

COMPONENTI	CONCENTRAZIONE
NaNO ₃	1.5 g/l
K ₂ HPO ₄	40 mg/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	75 mg/l
CaCl ₂	36 mg/l
C ₆ H ₈ O ₇	6 mg/l
Ferro Ammonio Citrato	6 mg/l
EDTA	1 mg/l
Na ₂ CO ₃	20 mg/l
H ₃ BO ₃	2.86 mg/l
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.81 mg/l
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.222 mg/l
NaMoO ₄ · 5H ₂ O	0.390 mg/l
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.079 mg/l
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.0494 mg/l

Tabella A- Componenti del terreno BG11.

Al fine di garantire la massima sterilità tutti i materiali usati durante l'allestimento delle colture sono stati sterilizzati in autoclave ed inoltre le operazioni di inoculo dell'organismo, di prelievo per le analisi e di rinnovo delle colture madri sono state sempre effettuate sotto cappa a flusso laminare. Per lo stesso motivo ad ogni passaggio sia i tappi, che il collo delle beute, sono stati flambati per cercare di evitare al massimo eventuali contaminazioni batteriche.

3.1.1 Colture di *Oscillatoria duplisecta*

Colture del cianobatterio filamento *Oscillatoria duplisecta* sono state allestite su terreno BG11, alla temperatura di 40°C, con fotoperiodo di 12 ore e ad un'intensità luminosa di 40 μmol di fotoni $\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.1.2 Colture di *Cyanobacterium aponinum* e *Leptolyngbya* sp. ETS-04

Per questi due cianobatteri sono state allestite inizialmente colture a temperature diverse allo scopo di condurre un'indagine preliminare per definire il range di temperature tollerato, entro cui effettuare le analisi ultrastrutturali e fisiologiche. Successivamente, per le analisi sperimentali, sono state allestite colture alle temperature selezionate in base ai risultati dell'indagine preliminare.

3.1.2.1 Colture di *Cyanobacterium aponinum* per l'indagine preliminare

Per l'indagine preliminare sul cianobatterio coccoide *Cyanobacterium aponinum* sono state allestite in beute da 1 litro colture a 10, 15, 20, 30, 40, 45 e 50°C, partendo da inoculi prelevati da una coltura madre mantenuta a 30°C. Le colture, contenenti 600 ml di terreno BG11 e circa $50\cdot 10^4$ cell/ml, sono state esposte ad un fotoperiodo di 12 ore e ad un'intensità luminosa di 12 μmol di fotoni $\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

La stima della concentrazione cellulare della coltura madre, per l'inoculo, è stata effettuata mediante il metodo della conta delle cellule con camera di Bürker.

La tolleranza del cianobatterio alle diverse temperature è stata valutata dall'aumento del numero di cellule nella coltura dopo quattro settimane dall'inoculo iniziale.

3.1.2.2 Colture di *Cyanobacterium aponinum* per le analisi sperimentali

Per le analisi morfologiche, ultrastrutturali e fisiologiche, sono state allestite colture del cianobatterio nello stesso terreno BG11 e nelle stesse condizioni di fotoperiodo e di illuminazione, alle temperature di 20, 30 e 40°C. L'indagine preliminare aveva infatti dimostrato che la crescita delle colture del cianobatterio era mantenuta in questo range di temperatura. Alla temperatura di 15°C e inferiori le colture non crescevano, mentre alla temperatura di 45°C si osservava la morte del cianobatterio nel giro di una settimana.

E' stata inoltre allestita una coltura a 45°C allo scopo di seguire gli eventi cellulari che portavano alla morte del cianobatterio.

3.1.2.3 Colture di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 per l'indagine preliminare

Per l'indagine preliminare sul cianobatterio filamentoso *Leptolyngbya* sp. ETS-04 sono state allestite in beute da 1 litro colture a 15, 20, 30, 40, 50, 55 e 60°C, partendo da inoculi prelevati da una coltura madre mantenuta a 30°C.

L'organizzazione filamentosa del cianobatterio e la sua tendenza a formare intrecci compatti (che per praticità verranno definiti "feltri") ha reso impossibile utilizzare il numero di cellule come misura dell'inoculo iniziale e della successiva crescita della coltura. Per tale motivo, come inoculi iniziali sono stati utilizzati dischetti di feltro cianobatterico ottenuti con un foratappi del diametro di 8 mm e posti in 150 ml di terreno BG11 in beute da 250 ml.

Le colture sono state esposte ad un fotoperiodo di 12 ore e ad un'intensità luminosa di $40 \mu\text{moli di fotoni} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

La tolleranza del cianobatterio alle diverse temperature è stata ricavata dall'aumento delle dimensioni del feltro per la sua espansione dal dischetto iniziale, dopo quattro settimane dall'inoculo.

3.1.2.4 Colture di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 per le analisi sperimentali

Per le analisi morfologiche, ultrastrutturali e fisiologiche sono state allestite colture del cianobatterio nello stesso terreno BG11 e nelle stesse condizioni di

fotoperiodo e di illuminazione, alle temperature di 30, 40 e 50°C. L'indagine preliminare aveva infatti dimostrato che la crescita delle colture del cianobatterio era mantenuta in questo range di temperatura. A temperature inferiori a 30°C la crescita delle colture cianobatteriche era estremamente bassa. Alla temperatura di 55°C il cianobatterio moriva nel giro di pochi giorni.

E' stata inoltre allestita una coltura a 55°C allo scopo di seguire gli eventi cellulari che portavano alla morte del cianobatterio.

3.1.2.5 Colture di *Cyanobacterium aponinum* e *Cyanobacterium* sp. MBIC 10216 su terreno salato

Colture di *Cyanobacterium aponinum* e del ceppo giapponese di cianobatterio *Cyanobacterium* sp. MBIC 10216 sono state allestite a 30°C sia su terreno BG11 in acqua dolce che su terreno BG11 in acqua di mare (con salinità del 3.4%).

Le colture di *Cyanobacterium aponinum* nei due terreni sono state allestite partendo da inoculi prelevati da colture madri cresciute in terreno BG11 in acqua dolce. Le colture di *Cyanobacterium* sp. MBIC 10216 nei due terreni sono state allestite partendo da inoculi prelevati da colture madri cresciute in terreno BG11 in acqua di mare.

Tutte le colture, contenenti inizialmente circa $50 \cdot 10^4$ cell/ml in 600 ml di terreno, sono state esposte ad un fotoperiodo di 12 ore e ad un'intensità luminosa di $12 \mu\text{moli di fotoni} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.2 ALLESTIMENTO E RINNOVO DELLE COLTURE ALGALI

Le colture di "*Chlorella*" *saccharophila* sono state allestite, rispettando le stesse norme di sterilità precedentemente riportate per le colture cianobatteriche, in terreno BASAL MEDIUM arricchito con estratto di suolo e micronutrienti (Schlösser, 1994).

L'estratto di suolo è stato ottenuto sottoponendo del terreno da giardino (non trattato con fertilizzanti), diluito in acqua deionizzata, a due bolliture successive di

un'ora ciascuna in un intervallo di 24 ore. Una volta raffreddato il terreno è stato filtrato utilizzando una pompa a vuoto e una serie di filtri con maglie di dimensioni decrescenti (da 2 μm a 0.2 μm). Il terreno è stato poi sterilizzato in autoclave e mantenuto a -80°C fino al momento dell' utilizzo.

I componenti del terreno BASAL MEDIUM sono riportati in tabella (Tabella B):

COMPONENTI	CONCENTRAZIONE
KNO_3	0.2 g/ litro
K_2HPO_4	0.02 g/ litro
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.02 g/ litro
Estratto di suolo	40 ml/ litro
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.0005 mg/ litro
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0.001 mg/ litro
H_3BO_3	0.005 mg/ litro
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.0005 mg/ litro
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.0005 mg/ litro
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.025 μg / litro
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	3.5 mg/ litro
EDTA	4 mg/ litro

Tabella B. Componenti del terreno BASAL MEDIUM.

Per le indagini sperimentali sono state allestite, in beute da 1 litro, colture a 4, 8 e 16°C contenenti circa $0.75 \cdot 10^6$ cell/ml. Tali colture sono state esposte ad un fotoperiodo di 12 ore e ad un'intensità luminosa di $20 \mu\text{moli di fotoni} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

La stima della concentrazione cellulare della coltura madre, per l'inoculo iniziale, è stata effettuata mediante il metodo della conta delle cellule con camera di Bürker.

3.3 MISURAZIONE DELLA CRESCITA DELLE COLTURE DI *Cyanobacterium aponinum*

La crescita delle colture di *Cyanobacterium aponinum* mantenute a 20, 30 e 40°C è stata seguita nel tempo mediante il metodo di misurazione dell'aumento della densità ottica.

Su piastre a pozzetti multipli sono state allestite diverse file, corrispondenti alle diverse temperature di crescita testate, di otto pozzetti contenenti ognuno 200 µl della coltura in esame. E' stata allestita anche una fila di otto pozzetti contenenti il terreno di coltura che fungeva da bianco.

Quindi mediante il lettore di piastre Multiskan Ex (Lab System) è stata effettuata la misura della densità ottica delle colture alla lunghezza d'onda di 750 nm.

Le misure sono state condotte ad intervalli di 4 giorni e sono proseguite per 5 mesi.

Ad ogni valore di densità ottica della coltura cianobatterica è stata sottratta la media dei valori di densità ottica del terreno di coltura (bianco) ed è stata calcolata la media e la deviazione standard dei valori così ottenuti.

Infine i dati numerici sono stati inseriti in grafico sull'asse delle ordinate, mentre sull'asse delle ascisse è stato posto il tempo, inteso come numero di giorni trascorsi dall'inoculo iniziale.

3.4 MISURAZIONE DELLA CRESCITA DELLE COLTURE DI *Leptolyngbya* sp. ETS-04

L'organizzazione filamentosa di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 e la formazione degli intrecci compatti di filamenti ha reso impossibile utilizzare il numero di cellule o la densità ottica come parametri per la misurazione della crescita delle colture alle diverse temperature (30, 40, e 50°C). A tale scopo è stato messo a punto ed utilizzato il sistema qui di seguito riportato.

Da colture madri già adattate alle temperature di crescita di 30, 40 e 50°C, sono stati prelevati, con il sistema del foratappi, dei dischetti di feltro del diametro di 8 mm. Questi sono stati poi divisi in due parti uguali, di cui una è stata posta a

crescere in una beuta da 250 ml con 150 ml di terreno di coltura BG11, mentre l'altra è stata usata per estrarre la clorofilla (valore del punto 0) usando come solvente l'N,N-dimetilformammide (metodo descritto nel paragrafo 3.12).

Per ciascuna temperatura sono state allestite 16 subcolture divise in due serie di 8 beute ciascuna. Le subcolture sono state poi poste nelle condizioni di luce e temperatura precedentemente riportate (vedi paragrafo 3.1). Ad intervalli di 4-5 giorni le intere masse cianobatteriche di due beute sono state raccolte, filtrate separatamente (con filtri Millipore da 2 µm) ed utilizzate per l'estrazione e la quantificazione della clorofilla.

La velocità di crescita di questo cianobatterio filamentoso è stata stimata valutando l'incremento nel tempo del contenuto in clorofilla dell'intera massa colturale. E' stata calcolata la media e la deviazione standard dei valori così ottenuti.

Infine i dati numerici sono stati inseriti in grafico sull'asse delle ordinate, mentre sull'asse delle ascisse è stato posto il tempo, inteso come numero di giorni trascorsi dall'inoculo iniziale.

3.5 MISURAZIONE DELLA CRESCITA DELLE COLTURE DI “*Chlorella*” *saccharophila*

La crescita della microalga “*Chlorella*” *saccharophila* è stata seguita attraverso il metodo della conta diretta del numero di cellule a tempi progressivi dal momento dell'inoculo.

Per la conta è stato usato un microscopio ottico (*Leitz Dialux 22*) ed un emocitometro di Bürker.

I valori numerici ottenuti, riferiti ad un volume unitario (1 ml di coltura), sono stati inseriti in grafico sull'asse delle ordinate, mentre sull'asse delle ascisse è stato inserito il tempo, indicato come numero di giorni trascorsi dall'inoculo. I dati sono stati rielaborati in chiave logaritmica e le curve di crescita sono state costruite basandosi sul tasso di crescita.

3.6 MISURAZIONE DEL PESO SECCO

Per la misurazione del peso secco campioni di colture del cianobatterio *Leptolyngbya* sp. ETS-04, ottenuti mediante filtrazione con filtri Millipore (2 µm), sono stati asciugati il più accuratamente possibile, pesati e posti successivamente a seccare in stufa a 80°C fino al raggiungimento di un peso costante.

3.7 OSSERVAZIONE DEL MATERIALE FRESCO AL MICROSCOPIO OTTICO

Durante la fase di crescita esponenziale, sono stati allestiti dei vetrini con campioni delle colture cianobatteriche e microalgali cresciute nelle diverse condizioni sperimentali, allo scopo di definire le caratteristiche cellulari degli organismi in esame *in vivo* al microscopio ottico. Le osservazioni sono state effettuate mediante un microscopio ottico (*Leica DMR*), operante sia in luce visibile che in fluorescenza, munito di telecamera digitale collegata ad un analizzatore di immagine. Per le osservazioni in fluorescenza, i campioni sono stati eccitati con luce UV (340-380 nm), per indurre la caratteristica autofluorescenza rossa della clorofilla (Fry, 1988).

Osservazioni della autofluorescenza della clorofilla sono state effettuate con lo stesso metodo anche su campioni a fresco di colture di *Cyanobacterium aponinum* esposte per 2, 4 e 6 giorni a 45°C e di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 esposte per 1-3 giorni a 55°C.

3.8 COLORAZIONE DEL DNA CON DAPI

La colorazione del DNA delle cellule cianobatteriche di *Cyanobacterium aponinum* è stata effettuata con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole), un colorante fluorescente che si lega al solco minore della doppia elica del DNA intercalandosi tra le basi adenina-timina (de Pinto *et al.*, 2002).

Le cellule, collocate su un vetrino da microscopia, sono state colorate con DAPI (5 µg/ml) e visualizzate con un microscopio ottico a fluorescenza (*Leica DMR*)

con un filtro di eccitazione tra 340 e 380 nm e un filtro di barriera di 430 nm. Il DNA era evidenziato dalla emissione di fluorescenza nel blu.

3.9 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER LA MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM)

Aliquote delle colture dei cianobatteri *Cyanobacterium aponinum* e *Oscillatoria duplisecta* e della microalga "*Chlorella*" *saccharophila*, cresciute nelle diverse condizioni sperimentali sono state raccolte e centrifugate. Ai pellet così ottenuti è stata aggiunta una quantità di glutaraldeide al 6% in tampone cacodilato 0.1 M (pH 6.9), in modo che ogni campione fosse completamente ricoperto.

Per la preparazione di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 pezzetti di feltro sono stati posti direttamente nello stesso fissativo.

Tutti i campioni sono stati poi lasciati in frigorifero a 4°C per 24 ore.

Successivamente è stata eseguita una post-fissazione con il tetrossido di osmio 1% (OsO₄) in tampone cacodilato 0.1 M (pH 6.9) alla temperatura di 4°C per due ore al buio.

I campioni sono stati poi disidratati in soluzioni acquose di etanolo a concentrazioni crescenti secondo il seguente protocollo:

- Etanolo 25% : 2 cambi in 20 minuti;
- Etanolo 30% : 2 cambi in 20 minuti;
- Etanolo 50% : 2 cambi in 20 minuti;
- Etanolo 70% : 2 cambi in 20 minuti;
- Etanolo 85% : 1 cambio in 10 minuti;
- Etanolo 90% : 1 cambio in 10 minuti;
- Etanolo 95% : 1 cambio in 10 minuti;
- Etanolo 100% : 2 cambi in 20 minuti.

I campioni, successivamente sottoposti al "*critical point drying*" e a metallizzazione con un film d'oro (Au), sono stati infine osservati con un microscopio elettronico a scansione (*Stereoscan 260-Cambridge, England*) operante a 25 KV.

3.10 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER L'OSSERVAZIONE AL MICROSCOPIO ELETTRONICO A TRASMISSIONE (TEM)

Campioni delle diverse colture cianobatteriche e microalgali, cresciute nelle differenti condizioni sperimentali sono stati fissati in glutaraldeide e post-fissati in tetrossido di osmio, come riportato nel paragrafo precedente.

Successivamente sono stati sottoposti a disidratazione in soluzioni acquose di etanolo a concentrazioni crescenti:

- Etanolo 25% : 3 cambi in 15 minuti;
- Etanolo 50% : 3 cambi in 15 minuti;

I campioni sono stati poi contrastati in una soluzione di acetato di uranile in alcool al 75% e mantenuti al buio per 30 minuti.

Sono stati sottoposti ad un'altra serie di disidratazioni secondo il seguente protocollo:

- Etanolo 95% : 2 cambi in 10 minuti;
- Etanolo 95% : per tutta la notte;
- Etanolo assoluto : 1 cambio in 5 minuti;
- Etanolo assoluto : 1 cambio in 20 minuti;
- Etanolo assoluto : 1 cambio in 35 minuti.

Successivamente sono stati eseguiti 3 cambi in 15 minuti con ossido di propilene e infine si è proceduto all'inclusione in resina dei campioni.

La resina è di natura epossidica e viene preparata mescolando i reattivi nelle seguenti proporzioni:

- 27 cc Araldite/AM
- 23 cc Anidride dodecil-succinica (DDSA)
- 0.75 cc Acceleratore (C)

Araldite e DDSA sono stati mescolati con attenzione al fine di evitare la formazione di bolle d'aria e successivamente è stato aggiunto l'acceleratore goccia a goccia. Sono state quindi preparate le miscele (resina/ossido di propilene) da utilizzare nei successivi passaggi, ovvero cinque diluizioni in ossido di

propilene a concentrazioni crescenti di resina. Quindi i campioni sono stati posti in successione nelle seguenti miscele:

- resina/ossido di propilene 1:5 per 60 minuti a 35°C in stufa, in provetta con tappi ben chiusi;
- resina/ossido di propilene 1:3 per 60 minuti a 35°C in stufa, in provetta con tappi ben chiusi;
- resina/ossido di propilene 1:1 per 60 minuti a 35°C in stufa, in provetta con tappi ben chiusi;
- resina/ossido di propilene 3:1 per 60 minuti a 35°C in stufa, in provetta con tappi ben chiusi;
- resina/ossido di propilene 5:1 per tutta la notte a 35°C in stufa, in provetta con tappi ben chiusi.

Il giorno seguente è stata effettuata l'inclusione vera e propria dei diversi campioni. Dapprima questi sono stati posti in resina pura per due ore in stufa a 30-35°C in provette con i tappi aperti, per permettere la totale evaporazione dell'ossido di propilene, poi sono stati trasferiti in apposite cellette, contenenti resina pura, in stufa a 40°C per 24 ore ed infine a 60°C per 3 giorni, per la polimerizzazione completa della resina.

3.11 ALLESTIMENTO DELLE SEZIONI ULTRASOTTILI PER L'OSSERVAZIONE AL MICROSCOPIO ELETTRONICO A TRASMISSIONE (TEM)

I diversi campioni inclusi in resina sono stati tagliati in sezioni ultrasottili di circa 80-90 nm di spessore, utilizzando una lama di diamante montata su un ultramicrotomo (*Ultracut Reichert Jung*).

Le sezioni sono state raccolte su retini di rame, ricoperti di una sottile pellicola di collodio, e poi contrastate con citrato di piombo per un'ora al buio in capsule Petri ed in presenza di idrossido di sodio (NaOH).

Infine, i retini, sono stati lavati, utilizzando acqua distillata, lasciati asciugare e successivamente carbonati.

Le sezioni sono state osservate con un microscopio elettronico a trasmissione (*Hitachi H300*) operante a 75 KV.

3.12 ESTRAZIONE ED ANALISI DEI PIGMENTI FOTOSINTETICI CON METODO SPETTROFOTOMETRICO

3.12.1 Clorofille e carotenoidi

Pezzetti di colture di *Leptolyngbya* sp. ETS-04, opportunamente filtrate con un filtro Millipore da 2 μm , e pellet di aliquote delle colture di *Cyanobacterium aponinum* e della microalga "*Chlorella*" *saccharophila* (ottenuti come riportato nei paragrafi precedenti), sono stati risospesi in N,N-dimetilformammide (Moran & Porath, 1980), un solvente in grado di estrarre le clorofille e i carotenoidi. I campioni sono stati poi mantenuti per due giorni in frigorifero ad una temperatura di 4°C (Wellburn, 1994).

L'estratto così ottenuto è stato analizzato, dopo centrifugazione, con uno spettrofotometro a doppio raggio (*GBC UV/VIS 918*).

L'analisi dei pigmenti è stata effettuata mediante letture eseguite alle seguenti lunghezze d'onda:

- $\lambda = 664 \text{ nm}$ per la clorofilla *a* (Chl *a*)
- $\lambda = 647 \text{ nm}$ per la clorofilla *b* (Chl *b*)
- $\lambda = 480 \text{ nm}$ per i carotenoidi

Le concentrazioni del contenuto di clorofilla *a* e di carotenoidi nelle cellule cianobatteriche sono state determinate utilizzando la formula di Lambert-Beer:

$$[\text{Chl}a] = \frac{1000 \cdot A_{664}}{\alpha}$$

$$[\text{Car}_{\text{tot}}] = \frac{1000 \cdot A_{480}}{\beta}$$

Dove:

[Chl *a*] = concentrazione in µg/ml di clorofilla *a* nel campione;

[Car_{tot}] = concentrazione in µg/ml di carotenoidi totali nel campione;

A₆₆₄, A₄₈₀ rappresentano i valori di assorbanza dei pigmenti rilevati rispettivamente a 664 nm e 480 nm in N,N-dimetilformamide (DMF);

α = coefficiente di estinzione specifico per la clorofilla *a* in DMF pari a 88.74 (Moran R., 1982);

β = coefficiente di estinzione specifico per i carotenoidi totali pari a 245 (Welburn, 1994).

Per le colture di *Cyanobacterium aponinum* le concentrazioni della clorofilla e dei carotenoidi sono state riferite a numero di cellule (calcolato sulle aliquote di coltura utilizzate per le analisi).

Per le colture di *Leptolyngbya* sp. ETS-04, le concentrazioni dei pigmenti sono state riferite al peso secco dei campioni. A tale scopo sono stati allestiti con il sistema del foratappi dischetti di feltro di 8 mm di diametro. La metà di ogni dischetto è stata utilizzata per l'estrazione dei pigmenti, l'altra metà per la misurazione del peso secco.

Nel caso della microalga "*Chlorella*" *saccharophila* i valori quantitativi dei pigmenti sono stati ottenuti mediante l'uso dei coefficienti di estinzione proposti da Porra *et al.* (1989). Le formule utilizzate sono le seguenti:

$$[\text{Chl } a] = (12 \cdot A_{664}) - (3.11 \cdot A_{647});$$

$$[\text{Chl } b] = (20.78 \cdot A_{647}) - (4.88 \cdot A_{664});$$

$$[\text{C}_{\text{tot}}] = [(1000 \cdot A_{480}) - (1.12 \cdot \text{Chl } a) - (34.07 \cdot \text{Chl } b)] / 245$$

Nelle formule A₆₆₄, A₆₄₇ e A₄₈₀ rappresentano i valori di assorbanza dei pigmenti alle rispettive lunghezze d'onda.

Le concentrazioni delle clorofille e dei carotenoidi sono state riferite a numero di cellule (calcolato sulle aliquote di coltura utilizzate per le analisi).

3.12.2 Ficobiliproteine

Per stimare il contenuto in ficobiliproteine, aliquote delle colture di *Cyanobacterium aponinum* in fase esponenziale e di *Oscillatoria duplisecta* sono state filtrate con un filtro Millipore da 2 µm per ottenere i pellet. Dalle colture di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 sono stati invece prelevati dischetti di feltri e si è proceduto come descritto per l'analisi dei pigmenti clorofilliani.

I campioni così ottenuti sono stati pesati e triturati in un mortaio, che è stato mantenuto costantemente congelato in azoto liquido. La polvere ottenuta è stata poi risospesa in tampone salino (sodio fosfato 0.01 M, pH 7.0; NaCl 0.15 M) e posta in frigorifero a 4°C per 24 ore. Gli estratti contenenti le ficobiliproteine sono stati quindi centrifugati a 3500 g per 10 minuti e successivamente analizzati con uno spettrofotometro a doppio raggio (*GBC UV/VIS 918*) alle seguenti lunghezze d'onda:

- $\lambda = 562$ nm per la ficoeritrina (PE);
- $\lambda = 615$ nm per la ficocianina (PC);
- $\lambda = 652$ nm per l'alloficocianina (APC).

Le quantità di ficobiliproteine presenti negli estratti sono state determinate mediante l'applicazione delle seguenti formule riportate in letteratura (Bennet & Bogorad, 1973):

$$[PC] = \frac{A_{480} - 0.474 \cdot (A_{652})}{5.34}$$

$$[APC] = \frac{A_{652} - 0.208 \cdot (A_{615})}{5.09}$$

$$[PE] = \frac{A_{562} - 2.41 \cdot [PC] - 0.849 \cdot [APC]}{9.62}$$

Dove:

[PC], [APC], [PE] sono rispettivamente le concentrazioni in mg/ml di ficocianina, alloficocianina e ficoeritrina nel campione analizzato;

A_{615} , A_{652} , A_{562} sono i valori di assorbanza rilevati a 615 nm, 652 nm e 562 nm in tampone salino.

Come già riportato per clorofilla e carotenoidi, anche le concentrazioni di ficobiliproteine sono state riferite, in *Cyanobacterium aponinum* e *Leptolyngbya* sp. ETS-04 rispettivamente a numero di cellule e a peso secco. Per *Oscillatoria duplisecta* è stato considerato solo il valore percentuale delle diverse forme di ficobiliproteine.

3.13 ESTRAZIONE ED ANALISI DEI PIGMENTI CON HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

L'estrazione dei pigmenti fotosintetici è stata condotta a temperatura ambiente e in presenza di luce molto debole.

Nel caso delle colture cianobatteriche, aliquote di colture di *Cyanobacterium aponinum* e pezzetti di feltro delle colture di *Leptolyngbya* sp. ETS-04, in fase di crescita esponenziale, sono stati centrifugati per 4 minuti a 3500 g. Dopo aver eliminato il surnatante sono stati risospesi in 250 μ l di acetone freddo 100% e addizionati di una quantità appropriata di biglie di vetro (diametro 710-1.180 μ m). I campioni sono stati poi vorticati a temperatura ambiente per 3 minuti, in modo tale da ottenere la rottura delle cellule. L'omogenato ottenuto è stato lasciato riposare per 5 minuti e successivamente è stato sottoposto a centrifugazione. Il surnatante (contenente i pigmenti) è stato raccolto in una provetta sterile opportunamente riposta al buio. Il pellet di cellule rimasto è stato invece nuovamente riestratto, per poter così assicurare la completa estrazione di tutti i pigmenti presenti nei campioni.

Mediante insufflazioni di azoto i surnatanti contenenti i pigmenti estratti sono stati portati a secco e conservati a -20°C (Komárek *et al.*, 1999).

Al momento dell'analisi i campioni sono stati risospesi in 1 ml di acetone 100% e solo 20 μ l di ciascun campione sono stati iniettati in colonna per essere analizzati.

Nel caso di “*Chlorella*” *saccharophila* aliquote delle colture cresciute nelle diverse condizioni sperimentali sono state centrifugate a 2000 g per 10 minuti. I pellet così ottenuti sono stati macinati finemente con azoto liquido e una piccola quantità di sabbia di quarzo in un mortaio. La polvere così ottenuta è stata risospesa aggiungendo 5 ml di miscela di estrazione, costituita da acetone-esano in rapporto 80:20. La sospensione è stata centrifugata a 2000 g per 3 minuti, in modo da garantire la completa rottura cellulare. Successivamente il surnatante è stato recuperato e trasferito in una provetta di vetro con tappo. Il pellet rimasto è stato addizionato nuovamente di 1 ml di soluzione di estrazione e ricentrifugato. Queste operazioni sono state ripetute fino ad ottenere un surnatante incolore.

Il surnatante complessivo, di color verde, è stato addizionato di una uguale quantità di acqua distillata quindi centrifugato a 2000 g per 10 minuti. In questo modo si sono ottenute due fasi ben distinte: una inferiore costituita da acqua-acetone, una superiore con i pigmenti sciolti in esano. La fase superiore è stata conservata, mentre all’inferiore è stato aggiunto 1 ml di esano ed è stata ricentrifugata, in modo da recuperare i pigmenti eventualmente rimasti in essa.

Le fasi superiori contenenti i pigmenti sono state tirate a secco insufflando azoto e poi conservate a -20°C fino al momento dell’analisi.

Per l’analisi l’estratto secco dei pigmenti è stato risospeso in 1 ml di acetone al 100%.

L’analisi dei pigmenti degli organismi in esame è stata effettuata mediante HPLC a fase inversa, utilizzando un cromointegratore *AGILENT 1100 Series* fornito di rilevatore UV-VIS e di DAD (diode array detector).

Un’aliquota, pari a 20 μl , di ogni estratto è stata iniettata in una colonna Zorbax®Ods Analytical (4.6 x 250 mm; 5-micron) dotata di precolonna.

La fase mobile, pompata al flusso di 2 ml/min, era costituita da:

- Soluzione A: Acetonitrile : Metanolo : Tris (0.1 M, pH 8) in rapporto 79 : 8.7 : 3.3;
- Soluzione B: Metanolo : Esano in rapporto 4:1;

L'eluizione è stata effettuata secondo il seguente schema (Komàrek *et al.*, 1999):

Soluzione A [%]	Soluzione B [%]	Tempi di eluizione (min)
100	0	4
0	100	2.5
0	100	6
100	0	2

Il gradiente di eluizione impiegato è stato quindi il seguente: 100% di soluzione A per i primi 4 minuti isocraticamente, seguito da 2.5 minuti a gradiente lineare fino a raggiungere il 100% di soluzione B.

Dopo i successivi 6 minuti al 100% di soluzione B, si hanno 2 minuti a gradiente lineare per ritornare così al 100% di soluzione A.

La colonna è stata poi riequilibrata per 6 minuti in 100% di soluzione A prima della successiva iniezione del campione.

L'identificazione dei diversi componenti è stata ottenuta programmando il rivelatore con specifiche lunghezze d'onda di eccitazione (450 nm), comparando i tempi di ritenzione con quelli rilevati per standard di riferimento e confrontando le caratteristiche degli spettri di assorbimento delle singole frazioni cromatografiche con quelli presenti in letteratura (Jeffrey *et al.*, 1997).

3.14 MISURE DI EVOLUZIONE DI O₂ E DI RESPIRAZIONE MEDIANTE L'ELETTRODO DI CLARK

Utilizzando un ossigrafo (*YSI-5331, Spring Instruments*) è stato possibile misurare ossigraficamente *in vivo*, sui campioni cianobatterici e su quelli microalgali, l'emissione di ossigeno utilizzata come indice dell'attività fotosintetica e

l'assorbimento di ossigeno utilizzato come indice dell'attività respiratoria, secondo il metodo di Ishii *et al.* (1997).

L'ossigeno evoluto e quello consumato sono stati rilevati da un elettrodo di Clark costituito da un catodo di platino (Pt) ed un anodo d'argento (Ag), connessi elettricamente da una soluzione elettrolitica di cloruro di potassio (KCl). Una sottile membrana di teflon, imbevuta dell'elettrolita, ricopre il catodo impedendo il contatto diretto col campione e grazie ad essa avviene la diffusione dell'ossigeno.

Tra gli elettrodi è stata indotta una differenza di potenziale, pari a 600-800 mV, che comporta la riduzione dell'ossigeno al catodo che da O₂ diventa OH⁻. Grazie alla contemporanea ossidazione dell'argento metallico a ione argento all'anodo, si ha la produzione degli elettroni necessari per la reazione di riduzione. Gli ioni argento si combinano con gli ioni cloruro a dare cloruro d'argento (AgCl).

La corrente generata attraverso questa reazione redox può essere misurata perchè proporzionale alla concentrazione di ossigeno al catodo (Walker, 1997).

Quindi all'interno di un'apposita camera viene posto il campione, continuamente mantenuto in agitazione, poi viene inserito l'elettrodo e può avere inizio l'analisi.

3.14.1 Misure di evoluzione di ossigeno fotosintetico

Le misure di emissione di ossigeno derivante dal processo fotosintetico, effettuate sia sulle colture cianobatteriche che su quelle microalgali in fase di crescita esponenziale, sono state condotte illuminando i campioni con luce saturante di intensità pari a 3000 μmol di fotoni $\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Per *Cyanobacterium aponinum* i campioni da analizzare sono stati preparati centrifugando a 3500 g per 4 minuti aliquote di coltura, fino ad arrivare alla concentrazione di circa $20\cdot 10^6$ cellule in un volume finale di 3 ml di terreno di coltura.

Nel caso di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 pezzetti di feltro sono stati frammentati finemente e risospesi in 3 ml di terreno di coltura.

I campioni di "*Chlorella*" *saccharophila* da analizzare sono stati preparati centrifugando a 2000 g per 10 minuti aliquote di coltura in fase di crescita

esponenziale, fino ad arrivare alla concentrazione di circa $90 \cdot 10^6$ cellule in un volume finale di 3 ml di terreno di coltura.

Per risalire alla quantità di clorofilla presente nei campioni, una volta condotta l'analisi le intere aliquote delle colture di *Cyanobacterium aponinum* e "*Chlorella*" *saccharophila* e tutti i frammenti di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 sono stati recuperati dalla camera dell'ossigrafo, filtrati e risospesi in N,N-dimetilformammide per l'estrazione dei pigmenti.

3.14.2 Misure di consumo respiratorio di ossigeno

Le misure di consumo respiratorio di ossigeno, effettuate solo per la microalga "*Chlorella*" *saccharophila*, sono state condotte al buio, su campioni preparati come descritto nel paragrafo precedente.

Su questa microalga sono state condotte anche analisi del consumo di ossigeno in presenza di inibitori della respirazione.

A tale scopo al terreno di coltura contenente i campioni da analizzare sono stati aggiunti KCN (5 mM), per inibire il flusso di elettroni respiratorio lungo la via dei citocromi, oppure SHAM (5 mM, preparato utilizzando come solvente Metossietanolo anidro al 99.3%), per inibire il flusso di elettroni respiratorio nel percorso alternativo cianuro resistente.

3.15 MISURE DI FLUORESCENZA *IN VIVO* A 77 K

In colonie cianobatteriche e microalgali, cresciute nelle diverse condizioni sperimentali ed in fase di crescita esponenziale, sono stati analizzati gli spettri di emissione di fluorescenza *in vivo* a 77K utilizzando uno spettrofluorimetro *Luminescence Spectrometer LS 50B* (Perkin Elmer).

Pellet ottenuti per centrifugazione di aliquote di colture di *Cyanobacterium aponinum* e "*Chlorella*" *saccharophila* e di pezzi di feltro di *Leptolyngbya* sp. ETS-04, sono stati macinati in azoto liquido e risospesi in una soluzione di PEG (polietilenglicole 4000) al 15%.

Dopo analisi quantitativa delle clorofille presenti nelle sospensioni così ottenute, effettuata mediante estrazione con DMF e lettura allo spettrofotometro dei

pigmenti di una piccola aliquota, i campioni sono stati diluiti con la stessa soluzione di PEG in modo da ottenere una concentrazione finale di clorofilla di 15 µg/ml.

Aliquote dei campioni così preparati sono state inserite in capillari di quarzo, velocemente congelati in azoto liquido ed analizzati.

Per le colture cianobatteriche le misure sono state condotte alle lunghezze d'onda di eccitazione di 440 nm per la clorofilla e 560 nm per le ficobiliproteine (Mamuro *et al.*, 2002), con letture degli spettri di emissione effettuate nell'intervallo tra 600 nm e 800 nm. Per le colture microalgali le misure sono state condotte sempre nell'intervallo da 600 nm a 800 nm ma alla sola lunghezza d'onda di eccitazione di 440 nm. Le analisi sono state effettuate sempre con slit 4.

3.16 MISURE DI FLUORESCENZA *IN VIVO* DELLE CELLULE CIANOBATTERICHE E ALGALI

L'assorbimento della radiazione luminosa causa il passaggio degli elettroni delle clorofille da livelli energetici fondamentali a livelli elettronici più energetici. Tali elettroni, successivamente, ritornano agli stati fondamentali in diversi modi, ma sempre attraverso il rilascio di energia.

In vivo, l'energia radiante assorbita dalla clorofilla dell'antenna del fotosistema II (PSII) viene in minima parte dissipata sottoforma di fluorescenza e calore, e per la maggior parte inviata al centro di reazione per la reazione fotochimica di separazione di carica.

Se il PSII funziona correttamente, l'emissione di fluorescenza rimane minima nel tempo. Quando invece viene alterato il trasferimento elettronico nel centro di reazione o viene ostacolato il trasferimento dell'energia d'eccitazione da parte delle antenne verso il centro di reazione stesso, la probabilità di emissione di fluorescenza aumenta. Questo accade quando il PSII è esposto ad una luce saturante, che determina una mancanza di accettori in forma ossidata, poiché l'intensità della luce è tale da ridurre tutti gli accettori chinonici disponibili. In questa situazione i centri di reazione si considerano "chiusi". In condizioni di luce non saturante il flusso elettronico avviene regolarmente, grazie alla disponibilità di chinoni ossidati. In questo caso i centri di reazione sono considerati "aperti," il

PSII funziona normalmente e di conseguenza la fluorescenza viene efficacemente smorzata.

Le misure di emissione di fluorescenza possono essere perciò utilizzate per determinare lo stato di funzionalità del PSII (Maxwell & Johnson, 2000).

L'indice di efficienza fotosintetica del PSII (Genty *et al.*, 1989) è rappresentato dal rapporto

$$\mathbf{Fv/Fm} \quad \text{con } \mathbf{Fv=Fm-Fo}$$

Dove:

- **F₀** è la fluorescenza di base. Si misura, dopo aver mantenuto il campione al buio per 5 minuti, illuminando gli organismi vegetali con una luce modulata di bassa intensità non saturante. In queste condizioni il flusso elettronico avviene normalmente grazie alla disponibilità di accettori chinonici ossidati. I centri di reazione sono quindi considerati aperti ed il PSII funziona regolarmente.

- **F_m** è la fluorescenza massima. Si misura utilizzando dei flash di luce saturante, della durata di 1 secondo e ripetuti ogni 20 secondi. L'intensità della luce è tale da ridurre tutti gli accettori chinonici disponibili. In questa situazione viene alterato il trasferimento elettronico ed i centri di reazione sono considerati chiusi (Walker, 1997). La progressiva chiusura dei centri di reazione porta alla massima emissione di fluorescenza, che diventa il processo più agevole per dissipare energia.

Valori di Fv/Fm prossimi al valore 0.8 indicano una buona funzionalità del PSII nelle piante (Genty *et al.*, 1989).

Nei cianobatteri contribuiscono al fenomeno della fluorescenza non solo le molecole di clorofilla *a* presenti nei centri di reazione, ma anche le ficobiliproteine dei ficobilisomi antenna, che presentano uno spettro di fluorescenza che si sovrappone a quello della clorofilla *a*. Ciò determina la registrazione per i cianobatteri di elevati livelli di F₀ che si riflettono in un abbassamento del rapporto Fv/Fm, il quale, generalmente, si attesta su valori tra 0.3 e 0.4 a seconda delle specie (Lin *et al.*, 2004). E' inoltre da tener presente che nelle membrane tilacoidali dei cianobatteri, in quanto procarioti, avvengono contemporaneamente sia i flussi elettronici respiratori sia i flussi fotosintetici che condividono numerosi trasportatori di elettroni intermedi. Questo fenomeno rende necessaria la misurazione di Fm dopo la somministrazione ai cianobatteri, precedentemente esposti ad una luce attinica, di un flash di luce saturante, in

grado di attivare maggiormente il flusso elettronico fotosintetico a scapito di quello respiratorio (Campbell *et al.*, 1998).

Lo studio dell'emissione di fluorescenza *in vivo* è stato condotto su aliquote di colture di *Cyanobacterium aponinum* e di "*Chlorella*" *saccharophila* e su pezzetti di feltri di *Leptolyngbya* sp. ETS-04, in fase esponenziale di crescita alle diverse temperature. Durante le misure di fluorescenza i campioni erano collocati in capsule Petri.

Le misure sono state effettuate con un fluorimetro a luce di ampiezza modulata (DUAL PAM 100), utilizzando una lampada in grado di fornire una luce attinica saturante di intensità pari a $3000 \mu\text{moli di fotoni m}^{-2} \text{sec}^{-1}$.

3.17 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE TOTALI

L'estrazione delle proteine totali dalle colture in fase di crescita esponenziale è avvenuta utilizzando il metodo proposto da Millenaar *et al.* (2002).

Aliquote di colture di *Cyanobacterium aponinum* e di "*Chlorella*" *saccharophila*, sono state centrifugate fino ad ottenere pellet e campioni di feltri di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 sono stati raccolti mediante filtrazione. Il tutto è stato successivamente congelato in azoto liquido e conservato alla temperatura di -80°C fino al momento dell'estrazione.

Per l'estrazione i campioni sono stati pestati in un mortaio, congelando il materiale con azoto liquido, e risospesi in $500 \mu\text{l}$ di una soluzione contenente Tris-HCl (62.5 mM, pH 6.8), SDS (2%), glicerolo (10%) e blu di bromofenolo (0.001%). I campioni sono stati poi trasferiti in una eppendorf, fatti bollire 5 minuti e centrifugati a 16000 g in modo da separare l'estratto proteico di interesse dalle componenti insolubili.

3.18 QUANTIFICAZIONE DELLE PROTEINE

Per la determinazione delle proteine totali è stato usato il metodo di Marder & Barber (1989).

Sono state preparate delle soluzioni standard con concentrazioni crescenti da 0.1 a 1 mg/ml di siero-albumina bovina in SDS 1%.

Da ogni campione è stata prelevata un'aliquota di 10 µl che è stata risospesa in un volume di 100 µl con SDS 1%.

Una quantità pari a 10 µl di ogni soluzione standard e di ogni soluzione di campione è stata fatta assorbire su un foglio di carta Whatmann 3MM e lasciata asciugare. Successivamente la carta è stata lavata in acetone per eliminare la presenza di clorofilla e colorata per 15 minuti in una soluzione di Coomassie Brilliant Blue R250 al 2% in 50% di metanolo e 7% di acido acetico.

La decolorazione è stata effettuata dopo alcuni lavaggi in acqua, con una soluzione di metanolo al 20% ed acido acetico al 7% per 12 ore.

La determinazione del contenuto in proteine è stata condotta mediante un'indagine visiva, confrontando le macchie colorate dei campioni con quelle delle soluzioni standard.

3.19 ANALISI PROTEICA MEDIANTE SDS-PAGE

Sulle proteine totali estratte dai campioni delle diverse colture cianobatteriche e microalgali è stata condotta l'analisi elettroforetica su gel di poliacrilamide in presenza di SDS, secondo il metodo di Laemmli (1970) con le modifiche introdotte da Gounaris *et al.* (1988).

Il gel risolutore era costituito da 12% acrilamide, urea 6 M e TRIS-HCl 0.8 M pH 8.83. La polimerizzazione del gel veniva ottenuta aggiungendo TEMED (0.03%) e APS (0.05%). Il gel spaziatore era costituito da acrilamide al 6% (p/v) e TRIS-HCl 125 mM a pH 6.8. La polimerizzazione veniva determinata dall'aggiunta di TEMED (0.03%) e APS (0.05%).

Il tampone di corsa inferiore conteneva TRIS 25 mM e glicina 192 mM. Il tampone superiore aveva la medesima composizione a parte un'aggiunta di SDS (1% p/v).

La corsa elettroforetica è stata effettuata a 20 mA per gel (a corrente saturante) per 12-14 ore a temperatura ambiente. Dopo l'elettroforesi, i gel sono stati colorati con Comassie Brilliant Blue R-250, 50% (v/v) metanolo, 10% (v/v) acido acetico e decolorati con 10% (v/v) metanolo, 7% (v/v) acido acetico.

Questo colorante, che si lega alle proteine, permette di verificare il corretto caricamento dei gel ed eventuali differenze nel *pattern* proteico dei diversi campioni.

3.20 IMMUNOBLOTTING

Per eseguire i saggi immunologici le proteine, risolte mediante SDS-PAGE, sono state trasferite elettroforeticamente dal gel su di una matrice di nitrocellulosa (Sartorius 0.45 µm), utilizzando un tampone di trasferimento costituito da 3 mM Na₂CO₃, 10 mM NaHCO₃ e 10% (v/v) metanolo (Dunn, 1986).

Il trasferimento è stato condotto a 450 mA per 3 ore a 4°C.

Le proteine sono state visualizzate mediante colorazione del filtro di nitrocellulosa con Rosso Ponceau (0.2 % (p/v) in 3% (p/v) acido tricloroacetico) e successiva decolorazione in acqua deionizzata.

Al fine di saturare tutti i siti della nitrocellulosa ancora in grado di legare proteine, il filtro è stato incubato in latte parzialmente scremato in TBS (Tris Buffer Saline: 10 mM Tris pH 7.4; 150 mM NaCl) per 30 minuti.

Dopo 2 lavaggi in TBS 1 M di 5 minuti ciascuno, il filtro è stato incubato a temperatura ambiente con l'anticorpo primario diluito in TBS per tutta la notte.

Il filtro di nitrocellulosa è stato poi sottoposto a 5 lavaggi di 5 minuti ciascuno in TBS e 0.25% di TWEEN 20 per rimuovere l'anticorpo primario in eccesso. Quindi è stato incubato per un'ora con un'anticorpo secondario antirabbit coniugato con Biotina (SIGMA) in TBS 1:3000.

Il filtro è stato nuovamente lavato 5 volte con TBS 1 M, in modo da eliminare l'anticorpo secondario in eccesso. Successivamente il filtro è stato incubato per 30

minuti a temperatura ambiente con ExtrAvidina coniugata con fosfatasi alcalina (SIGMA) in TBS 1:3000.

Il filtro è stato nuovamente sottoposto a 4 lavaggi da 5 minuti in TBS e alla fine è stato messo per almeno 5 minuti in tampone di reazione per la fosfatasi alcalina (AP buffer contenente: 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ e 100 mM Tris-HCl pH 9.6).

L'attività enzimatica della fosfatasi alcalina è stata evidenziata aggiungendo 66 µl di nitro blu tetrazolio (50 mg/ml in 100% N-N' dimetilformamide) e 33 µl di 5 bromo-4-cloro-3-indoil fosfato (50 mg/ml in 70% N-N' dimetilformamide) in 10 ml di tampone di reazione.

Come anticorpi primari sono stati utilizzati anticorpi policlonali contro le seguenti proteine:

- D1 del centro di reazione del PSII (gentilmente fornito dal Prof. R. Barbato) diluizione 1:3000;
- LHCII dell'antenna esterna del PSII (gentilmente fornito dal Prof. R. Barbato) diluizione 1:3000;
- LSU subunità grande della Rubisco (gentilmente fornito dalla Dott. N. La Rocca) diluizione 1:5000;
- CASPASI-3-umana (Inalco) diluizione 1:200;
- AOX (gentilmente fornito dal Prof. T. Elthon) diluizione 1:1000;

3.21 ESTRAZIONE DEL DNA DA COLTURE DI *Cyanobacterium aponinum*

Aliquote di colture di *Cyanobacterium aponinum*, cresciute a 30 °C o esposte per periodi crescenti (2 e 6 giorni) a 45°C, sono state centrifugate fino ad ottenere dei pellet che sono stati congelati in azoto liquido e conservati alla temperatura di -80°C. Al momento dell'analisi questi campioni sono stati pestati separatamente in un mortaio, mantenuto costantemente congelato con azoto liquido, fino ad ottenere una polvere sottile e risospesi in 3 ml di buffer di estrazione precedentemente riscaldato a 65°C (CTAB 2%, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, Tris-

HCl 100 mM pH 8, β -mercaptoetanolo 0.2%). Successivamente i campioni sono stati riscaldati in un bagnetto a 65°C per un'ora. Dopo l'incubazione è stata fatta un'estrazione con 3 ml di soluzione CHCl₃-Alcool Isoamilico (24:1). Per permettere la separazione del campione in tre fasi (una fase acquosa superiore contenente gli acidi nucleici, un disco proteico intermedio e un deposito di residui sottostanti) i campioni sono stati centrifugati a 4°C per 15 minuti a 1300 g.

Successivamente è stata prelevata la fase acquosa superiore, con estrema attenzione per evitare rotture del DNA genomico, e vi sono stati aggiunti 50 μ l di NaAc 3 M e 1 ml di etanolo freddo. I campioni sono stati incubati per tutta la notte a 20°C, dopo averli mescolati lentamente per inversione. Il giorno successivo i campioni sono stati centrifugati a 19000 g per 15 minuti a 4°C e il pellet così ottenuto è stato lavato con 500 μ l di etanolo 70% e nuovamente centrifugato a 1900 g per 5 minuti a 4°C. Dopo aver eliminato il surnatante, il pellet è stato fatto asciugare e successivamente risospeso in 100-400 μ l di Tris-EDTA (EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.4) a seconda delle dimensioni del pellet. I campioni sono stati quindi incubati con Rnasi 0.5 mg/ml (Boheringer Mannheim) a 4°C per 40 minuti. Quindi il DNA è stato quantificato utilizzando uno spettrofotometro e misurando l'assorbanza a 260 nm.

3.22 ESTRAZIONE DEL DNA DI *Oscillatoria duplisecta*

Il DNA del cianobatterio filamentoso *Oscillatoria duplisecta* è stato estratto mediante l'utilizzo del kit "Genomic DNA purification kit #K0512" (Fermentas[®]) che permette di isolare e purificare il DNA da contaminanti ed enzimi inibitori in modo da poter essere poi amplificato mediante PCR.

Il materiale cianobatterico è stato prelevato dalla coltura in condizioni di sterilità, trasferito in una o più provette sterili e centrifugato alla massima velocità (11000 g) per 3 minuti. Tale operazione è stata ripetuta più volte al fine di ottenere un pellet sufficiente su cui poter effettuare l'estrazione.

Al pellet, macinato in un mortaio con l'aiuto di una piccola quantità di sabbia di quarzo, sono stati aggiunti 200 μ l di tampone TAE (Tris-acetato 40 mM, 1 mM EDTA pH 8) e 400 μ l di soluzione di lisi fornita dal kit ed il tutto è stato incubato per 5 minuti in un bagnetto termostatico a 65°C. Dopo aggiunta di 600 μ l di

cloroformio, agitazione e centrifugazione (3 minuti ad 11000 g) si è ottenuta una fase acquosa superiore contenente il DNA. Questa è stata raccolta, addizionata di 800 µl di soluzione di precipitazione (preparata diluendo 80 µl della soluzione fornita dal kit (10X) in 720 µl di acqua milliQ) e nuovamente centrifugata (3 minuti a 11000 g) per ottenere il pellet di DNA.

Successivamente il DNA è stato sciolto in 100 µl di NaCl 1.2 M, a cui sono stati aggiunti 300 µl di etanolo assoluto freddo, ed è stato fatto precipitare per una notte in freezer a -20°C.

L'estrazione è stata completata centrifugando il campione a 11000 g per 3 minuti, eliminando il surnatante e lavando il pellet di DNA in 300 µl di etanolo freddo al 70%. Dopo aver eliminato completamente l'etanolo, il DNA purificato è stato sciolto in un volume di acqua adeguato, variabile dai 5 ai 10 µl, a seconda della quantità di pellet ottenuto.

3.23 QUANTIFICAZIONE DEL DNA

Il DNA estratto dalle diverse colture di *Cyanobacterium aponinum*, *Leptolyngbya* sp. ETS-04 e *Oscillatoria duplisecta* è stato quantificato mediante uno spettrofotometro UV-VIS (Beckman Coulter DU 530).

E' stata effettuata una scansione dei diversi campioni per valori di lunghezza d'onda compresi nell'intervallo tra 240 e 320 nm. Il picco massimo di assorbanza per gli acidi nucleici si ottiene ad una lunghezza d'onda pari a 260 nm, mentre per le proteine è pari a 280 nm. A questi valori di assorbanza deve essere sottratto il valore rilevato a 320 nm, in cui teoricamente non assorbono né gli acidi nucleici né le proteine. Un rapporto A_{260}/A_{280} superiore a 1.8 indica un soddisfacente grado di purezza del DNA. Per la misurazione sono stati usati 60 µl di ciascun campione ed una cuvetta con cammino ottico pari a 1 cm. A questo punto per determinare la concentrazione del DNA si è applicata la legge di Lambert-Beer, adattata al DNA:

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g/ml}) = 50 \cdot A_{260}$$

Un'unità di assorbanza (O.D. densità ottica) corrisponde ad una soluzione acquosa con una concentrazione di 50 µg/ml di DNA (Wilson & Walker, 2004).

3.24 VALUTAZIONE DELLA FRAMMENTAZIONE DEL DNA

Sul DNA estratto dalle colture di *Cyanobacterium aponinum* cresciute a 30°C o esposte per 2 o 6 giorni a 45°C è stata condotta una analisi elettroforetica su gel di agarosio. Questa tecnica permette di separare frammenti di DNA in base alla loro dimensione.

A tale scopo è stato utilizzato un gel di agarosio all'1.5% sciolto in un tampone TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, 1 mM EDTA pH 8) e contenente etidio bromuro (0.25 µg/ml). L'etidio bromuro permette di visualizzare le bande del DNA poiché si intercala nella molecola, assorbe luce alla lunghezza d'onda di 350-320 nm e la riemette come fluorescenza a 590 nm.

I campioni per l'elettroforesi sono stati preparati aggiungendo al DNA il colorante orange G (7-Hydroxy-8-phenylazo-1,3-naphthalenedisulfonicacid) nella misura di ¼ rispetto al volume finale. In parallelo ai campioni è stato fatto correre nel gel un marcatore di DNA, come scala di riferimento per i pesi molecolari.

Per la corsa elettroforetica sono stati caricati circa 10 µg di DNA di ciascun campione ed è stato applicato un campo elettrico di 70 Volts per circa due ore.

Le immagini sono state acquisite mediante il programma "Quantity One" (BioRad).

3.25 AMPLIFICAZIONE DEL DNA MEDIANTE PCR

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è una tecnica condotta *in vitro* che permette l'amplificazione di specifiche regioni del genoma mediante la *Taq DNA polimerasi*, un enzima termostabile isolato dall'eubatterio termofilo *Thermus aquaticus*. La reazione avviene attraverso la ripetizione di una serie di cicli (30-40 cicli per un frammento di 1300-1800 bp), ognuno dei quali caratterizzato da tre tappe:

-denaturazione del templatato per pochi minuti ad una temperatura compresa tra i 92 ed i 95°C; è importante che la denaturazione del DNA sia completa per permettere un allineamento ottimale dei *primer* di amplificazione, evitando una possibile rinaturazione;

-allineamento dei *primer* alle sequenze complementari: in questa tappa si ha probabilmente il punto critico dell'intera reazione ossia la scelta della temperatura di appaiamento dei *primer*: se questa è troppo alta, non si ha appaiamento; se è troppo bassa, si ha un notevole incremento di appaiamenti non specifici;

-estensione dei *primer* appaiati generalmente condotta a 72°C, temperatura ottimale per l'attività della *Taq* che lavora ad un ritmo di aggiunta di 60 basi al secondo.

Nell'allestire una PCR, si prepara una *mix* contenente i vari reagenti, ognuno dei quali avrà un ruolo preciso nel procedere dell'amplificazione; a questa miscela verrà infine aggiunto il DNA.

Mix per un volume finale di 50 µl:

Componenti	Quantità in µl	Concentrazione
H ₂ O milliQ	30-35	
Tampone	5	10X
MgCl ₂	4-7	25 mM
<i>Primer</i> senso	2.5	10 µM
<i>Primer</i> antisenso	2.5	10 µM
dNTP	1	10 mM
<i>Taq</i>	0.5-0.8	5 unità/µl

Il tampone 10X è costituito da KCl (500 mM) e da Tris-HCl (200 mM, pH 8.3).

I dNTP sono una miscela equimolare di dATP, dCTP, dGTP, dTTP.

La *Taq polimerasi* utilizzata necessita di una quantità di DNA su cui lavorare pari a 80-100 ng. Tale valore non è molto rigido e rappresenta quindi un parametro variabile per ottenere risultati soddisfacenti. In genere, infatti, si effettuano prove diverse aggiungendo alla mix quantità variabili di DNA estratto: 50 ng, 75 ng, 100 ng.

L'MgCl₂ influenza l'attività dell'enzima in quanto forma complessi solubili con i dNTP producendo un substrato attivo riconosciuto dalla *polimerasi*. La quantità di questo sale introdotta nella *mix* costituisce un secondo fattore variabile al fine di ottimizzare la resa della reazione.

I *primer* scelti per una reazione di amplificazione, in genere, devono avere le seguenti caratteristiche:

- non presentare strutture secondarie interne
- avere una distribuzione bilanciata di G/C e domini ricchi in A/T
- non presentare complementarità tra le estremità 3'.

La temperatura di *annealing* dei *primer* scelta costituisce una media tra le temperature specifiche di ciascun *primer*, anche se quella ottimale (che permette di ottenere l'amplificato senza determinare appaiamenti multipli) viene evidenziata sperimentalmente mediante prove successive, a temperature diverse.

Per l'amplificazione del frammento genomico corrispondente al 16S rDNA dei cianobatteri filamentosi *Leptolyngbya* sp. ETS-04 e *Oscillatoria duplisecta* sono stati utilizzati i primer 16S1 e 16S2 (Tab. C) sviluppati da Kobayashi (dati non pubblicati) sulla sequenza genica del 16S rDNA di *Synechococcus elongatus* (GenBank D83715).

I parametri fisici delle reazioni di amplificazione del 16S rDNA dei due organismi in studio sono riassunti nello schema qui sotto riportato:

	Temperatura	Durata
Denaturazione iniziale	95°C	2'

N° di cicli: 40

Denaturazione	95°C	45''
Appaiamento	58°C	30''
Estensione	72°C	45''

N° di cicli: 1

Estensione finale	72°C	5'
Terminazione	4°C	5'

Per il sequenziamento del frammento genomico corrispondente al 16S rDNA dei due cianobatteri filamentosi sono stati invece utilizzati dei primer, precedentemente disegnati nel laboratorio dove ho svolto la mia tesi di dottorato sull'allineamento di sequenze geniche del 16S rDNA di alcuni cianobatteri filamentosi riportate in GenBank. I primer utilizzati, indicati come 16S3, 16S4, 16S5 e 16S6 sono riportati in Tabella C.

Sigla	Sequenza dei <i>primer</i>	Orientamento	Posizione
16S1	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	Senso	+1 → +20
16S2	5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'	Antisenso	+1453 → +1433
16S3	5'-CTACGGGAGGCAGCAGTG-3'	Senso	+304 → +321
16S4	5'-CACTGCTGCCTCCCGTAG-3'	Antisenso	+321 → +304
16S5	5'-ATACCCAGTAGTCCTAG-3'	Senso	+731 → +748
16S6	5'-TAAACCACATACTCCACC-3'	Antisenso	+898 → +881

Tabella C. Elenco dei *primer* utilizzati per amplificare e sequenziare il gene 16S rDNA di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 e *Oscillatoria duplisecta*.

3.26 ANALISI DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE MEDIANTE ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

Per verificare la riuscita della reazione di amplificazione, si è proceduto effettuando un'elettroforesi utilizzando un gel di agarosio all'1% in tampone TAE 1X.

5 µl dei campioni ottenuti mediante PCR sono stati caricati assieme ad 1 µl di tampone di caricamento 6X, costituito da Blu di bromofenolo 0.25% (p/v). Per determinare le dimensioni dei prodotti di PCR sono stati usati degli standard di DNA di dimensioni e concentrazioni note che vengono fatti correre in parallelo con i campioni. Durante la corsa elettroforetica, un alimentatore applica un campo elettrico di circa 5 volt/cm che permette la migrazione dei frammenti.

Alla fine della corsa elettroforetica, il gel viene esposto ai raggi UV in modo da rendere visibili le bande di DNA "colorate" con il bromuro di etidio. In questo modo è possibile verificare se la reazione di PCR è stata positiva e inoltre

determinare le dimensioni e la concentrazione dei prodotti di PCR confrontandoli con lo *standard* di riferimento.

3.27 PURIFICAZIONE DEL DNA AMPLIFICATO MEDIANTE TRATTAMENTO ENZIMATICO

Per il processo di sequenziamento del gene di interesse, il DNA amplificato deve essere:

-pulito, ossia privo di sali o proteine

-unico, ovvero il risultato dell'amplificazione deve essere rappresentato da una singola banda; infatti la presenza di più bande indica una non specificità di appaiamento dei *primer* che potrebbe pregiudicare la riuscita della reazione di sequenziamento.

La purificazione dei prodotti di PCR comporta l'eliminazione di *primer*, dNTP ed enzimi, componenti utilizzati per la reazione di amplificazione.

I prodotti di amplificazione del frammento genomico 16S rDNA dei due cianobatteri filamentosi *Leptolyngbya* sp. ETS-04 e *Oscillatoria duplisecta* sono stati purificati mediante trattamento enzimatico. Tale trattamento si basa sul protocollo suggerito dal centro di sequenziamento BMR-Genomics (www.bmr.genomics.it).

Inizialmente è necessario stimare la concentrazione di DNA necessaria per la reazione di sequenziamento: il servizio di sequenziamento richiede una quantità di DNA sufficiente almeno per due reazioni che necessitano, ciascuna, precisamente di 1-2 ng di DNA ogni 100 bp del gene in esame. Nel caso del gene 16S rDNA, costituito approssimativamente da 1500 bp, per due reazioni di sequenziamento sono necessari 60 ng di DNA.

Si procede, quindi, trasferendo la quantità precisa di prodotto di PCR, stimata precedentemente mediante elettroforesi, in appositi tubini ed aggiungendo gli enzimi esonucleasi I (5 unità/μl) e fosfatasi alcalina (1 unità/μl).

Si prosegue poi mettendo i campioni nel termociclatore che esegue il seguente programma:

Temperatura	Durata
37°C	15'
80°C	15'
4°C	10'

Al termine della reazione si aggiunge il *primer* per il sequenziamento (concentrazione 6.4 μM) e si lasciano seccare i campioni nel termociclatore a coperchio aperto, ad una temperatura di 65°C, per un tempo sufficiente a far evaporare la componente acquosa (circa 20 minuti ogni 5 μl di campione). A questo punto il campione viene consegnato al centro di sequenziamento.

3.28 INDAGINI MOLECOLARI

Analisi delle sequenze

I prodotti di PCR purificati sono stati inviati al centro di sequenziamento dove sono state determinate le sequenze del gene di interesse.

I cromatogrammi ricavati sono stati analizzati utilizzando il programma CHROMAS 1.55 disponibile presso il sito del BMR-Genomics, che permette la visione e la correzione dei singoli cromatogrammi. Per ottenere la sequenza consenso dell'intero gene, i singoli cromatogrammi, ottenuti mediante il sequenziamento parziale dei prodotti di PCR, sono stati assemblati tra loro utilizzando il programma DNASTAR. Infine è stato impiegato il programma BLAST (Altschul *et al.*, 1990) per confrontare le sequenze determinate con quelle disponibili presso la banca dati NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Filogenesi molecolare

Le ricostruzioni filogenetiche sono stati condotte applicando il metodo delle matrici di distanza.

L'assunto teorico è che tra i vari alberi filogenetici che possono essere costruiti, deve essere scelto quello la cui topologia comporta il minimo livello di divergenza tra tutte le sequenze che vanno a costituire il *data set* (*principio di evoluzione*

minima). Dato quindi un allineamento multiplo di sequenze, queste vengono confrontate a coppie (*pairwise comparison*) considerando tutte le possibili combinazioni. Le differenze riscontrate tra ciascuna coppia, ossia il numero di basi nucleotidiche diverse, vengono trasformate in distanza filogenetica. Questa distanza viene calcolata secondo modelli diversi di evoluzione molecolare che possono stimare in modo differente l'evoluzione basata su transizioni, trasversioni, trasformazioni da una base azotata all'altra, ecc.

Una volta scelto il modello di evoluzione che si adatta meglio al *data set* in studio si procede alla formazione di una matrice di distanza che viene successivamente utilizzata per costruire l'albero filogenetico.

Il metodo impiegato per costruire gli alberi filogenetici, basati su matrici di distanza, ottenuti nella mia tesi è quello di *neighbour-joining* (Saitou & Nei, 1987). Le analisi filogenetiche basate su questo metodo sono state condotte utilizzando il programma MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004).

Infine per valutare la robustezza delle topologie degli alberi filogenetici di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 e di *Oscillatoria duplisecta* è stato applicato il test statistico di bootstrap (Felsenstein, 1985).

3.29 ELABORAZIONE STATISTICA

I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza univariata (ANOVA) mediante il software SPSS (Norušis, 1993).

Le differenze tra le medie sono state valutate utilizzando il test Duncan's multiple range (DMRT) ($P < 0.005$). Negli istogrammi valori non significativamente diversi sono indicati da lettere uguali. Lettere diverse indicano invece valori significativamente diversi.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 LA MICROALGA PSICROFILA “*Chlorella*” *saccharophila*

“*Chlorella*” *saccharophila* è una microalga psicrofila che era stata trovata e raccolta su un campo di neve del ghiacciaio dell’Antelao.

Questa microalga era stata messa in coltura nel laboratorio dove è stata condotta la presente ricerca, ma non era stata ancora ben caratterizzata dal punto di vista fisiologico ed adattativo.

Un’indagine preliminare aveva comunque permesso di stabilire che, pur trattandosi di un organismo nivale, “*Chlorella*” *saccharophila* poteva sopravvivere fino a temperature vicine ai 20°C.

Si è ritenuto quindi interessante condurre uno studio allo scopo di analizzare le possibili strategie adattative di questa microalga psicrofila all’aumento della temperatura, confrontando parametri strutturali e fisiologici in colture cresciute a 4, 8 e 16°C.

Le indagini hanno riguardato la caratterizzazione morfologica e ultrastrutturale delle cellule di “*Chlorella*” *saccharophila* con tecniche di microscopia ottica ed elettronica a trasmissione e scansione, la misurazione dei pigmenti fotosintetici mediante tecniche spettrofotometriche, fluorimetriche e di HPLC e la valutazione, mediante analisi ossigrafiche fluorimetriche e immunocitochimiche delle attività fotosintetiche e respiratorie della microalga alle diverse temperature di crescita.

4.1.1 CRESCITA DELLE COLTURE ALGALI ALLE DIVERSE TEMPERATURE

Dal confronto delle curve di crescita (Fig. 1) è risultato che, indipendentemente dalla temperatura, le colture algali mantenevano una crescita esponenziale per

oltre due mesi, passando in fase stazionaria quasi contemporaneamente dopo circa 75-80 giorni dall'inoculo.

Nelle alghe messe in coltura a 4°C la crescita iniziava dopo una lag fase di qualche giorno, mentre a 8 e 16°C l'inizio era più rapido.

L'andamento della crescita delle colture a 4 e 8°C nella fase esponenziale era del tutto confrontabile, mentre nelle colture mantenute a 16°C era accelerata e portava alla fine della stessa fase ad un numero di cellule più elevato.

Nella successiva fase stazionaria, però, sia le colture cresciute a 16°C che quelle cresciute a 8°C subivano un graduale decremento del numero di cellule, mentre nelle colture cresciute a 4°C il numero di cellule manteneva una buona stabilità nel tempo.

Quindi le temperature più alte, pur permettendo la crescita delle colture algali o addirittura accelerandola (nel caso dei 16°C), sembravano accelerare la senescenza delle colture stesse.

Nelle colture mantenute a 16°C si poteva supporre che la senescenza anticipata fosse dovuta alla più rapida crescita nella fase esponenziale e quindi ad una più veloce deplezione dei nutrienti del terreno di coltura. L'anticipo della senescenza, però, si manifestava anche nelle colture mantenute a 8°C, la cui velocità di crescita era confrontabile con quella delle colture tenute a 4°C. Ciò suggeriva che la senescenza anticipata dipendesse in realtà dalle temperature di crescita, elevate per la microalga psicrofila.

4.1.2 MORFOLOGIA E ULTRASTRUTTURA DELLE CELLULE

Dalle osservazioni al microscopio ottico è risultata la presenza, nelle colture di "*Chlorella*" *saccharophila* in fase esponenziale, a 4°C, di tre componenti cellulari, riconoscibili per le diverse dimensioni (Fig. 2a): elementi molto voluminosi di forma sferica, che risultano essere autosporangi contenenti autospore ancora racchiuse dalla parete della cellula madre, cellule piccole e generalmente affusolate, corrispondenti ad autospore già liberatesi dall'involucro materno e cellule mature, di maggiori dimensioni e di forma rotondeggiante.

Gli stessi tipi di cellule erano presenti nelle colture in fase esponenziale cresciute alle due più alte temperature. Nelle colture a 16°C, che mostravano una più elevata velocità di crescita, erano particolarmente numerosi gli autosporangi (Fig. 2b,c).

I diversi elementi cellulari erano ancor più distinguibili al microscopio elettronico a scansione (Fig. 3a). Questo tipo di osservazione, inoltre, permetteva di riconoscere sulla superficie delle cellule autosporangiali ancora chiuse i settori corrispondenti alle singole autospore (Fig. 3b) e di documentare la rottura della loro parete che portava, alla fine, alla liberazione delle autospore stesse (Fig. 3c).

Mediante indagini effettuate al microscopio elettronico a trasmissione sono state caratterizzate ultrastrutturalmente le diverse componenti cellulari, corrispondenti a stadi differenti del ciclo vitale di "*Chlorella*" *saccharophila*.

Come mostrato in Fig. 4a, le progressive divisioni che avvenivano nell'autosporangio portavano alla formazione di numerose autospore che erano separate da setti divisorii. Nelle singole autospore, inizialmente pressate tra loro e di forma poliedrica, si poteva già distinguere il cloroplasto con un pirenoide circondato da plastoglobuli. In seguito le autospore si separavano, diventando indipendenti le une dalle altre e assumendo profili più regolari (Fig. 4b), per liberarsi successivamente in seguito alla rottura della parete della cellula autosporangiale. Le giovani autospore libere, generalmente di forma affusolata, avevano un cloroplasto già bene organizzato, ma con un sistema tilacoidale ancora piuttosto ridotto (Fig. 4c). La loro successiva crescita e differenziazione portava alla formazione di cellule vegetative mature di maggiori dimensioni e di forma rotondeggiante.

Nelle cellule mature (Fig. 5a) di "*Chlorella*" *saccharophila* la gran parte del volume cellulare era occupato da un cloroplasto a coppa che conteneva un sistema tilacoidale molto abbondante e un pirenoide di grandi dimensioni, attraversato da rari profili tilacoidali ad andamento circonvoluto e bordato da una serie di plastoglobuli. Attorno al pirenoide non erano presenti granuli di amido che invece erano distribuiti nello stroma del plastidio, tra le membrane del sistema tilacoidale.

Le diverse temperature di crescita non modificavano l'organizzazione ultrastrutturale delle cellule di "*Chlorella*" *saccharophila*, come risulta evidente

dal confronto tra le figure 5a e 5b, che mostrano due cellule mature, rispettivamente di una coltura cresciuta a 4°C (Fig. 5a) e di una coltura cresciuta a 16°C (Fig. 5b), entrambe in fase esponenziale.

4.1.3 APPARATO FOTOSINTETICO E FOTOSINTESI

L'analisi spettrofotometrica dei pigmenti fotosintetici, rivelava che le variazioni della temperatura di crescita non portavano a cambiamenti significativi nei contenuti in clorofille totali (Fig. 6a), così come nei rapporti clorofilla *a*/clorofilla *b* (Fig. 6b) delle colture algali in fase esponenziale.

Alle due più elevate temperature di crescita, però, si osservava un incremento del contenuto in carotenoidi (Fig. 6a), che si rifletteva in un aumento del rapporto carotenoidi/clorofille (Fig. 6c). Ciò suggeriva che l'aumento della temperatura di crescita venisse percepito dalle cellule algali come una blanda condizione di stress. E' noto, infatti, che un aumento nella sintesi di carotenoidi rappresenta una risposta di difesa dei cloroplasti nei confronti di diverse condizioni ambientali stressanti (Pupillo *et al.*, 2003).

Al fine di evidenziare se l'aumento della temperatura di crescita avesse effetto oltre che sulle quantità di questi pigmenti anche sullo spettro delle forme di carotenoidi sintetizzate, è stata condotta un'analisi all'HPLC.

In tutti i cromatogrammi delle colture cresciute alle diverse temperature, uno dei quali è riportato come esempio in Fig. 7, risultava la presenza, oltre ai picchi delle clorofille *a* e *b*, dei picchi dei carotenoidi propri degli organismi fotosintetici verdi. Più precisamente, i tempi di ritenzione dei singoli picchi e la verifica, ricavata per ciascuno di essi dagli specifici spettri di assorbimento, hanno portato a riconoscere: neoxantina, violaxantina, anteraxantina e β -carotene.

Ai picchi di questi carotenoidi si aggiungevano, lungo il cromatogramma, piccoli picchi che per tempi di ritenzione e spettri di assorbimento non erano ascrivibili a pigmenti noti. Dal confronto dei cromatogrammi non risultavano effetti sostanziali della temperatura né sulle forme di carotenoidi sintetizzate né sui rapporti quantitativi tra i diversi pigmenti. La percentuale di β -carotene, rimaneva costante e tra le xantofille si osservava solo un graduale e contenuto incremento della violaxantina correlato ad un decremento dell'anteraxantina (Fig. 8).

Una prima indagine sull'attività fotosintetica delle colture algali cresciute alle diverse temperature è stata condotta utilizzando come parametro l'emissione di ossigeno *in vivo*. L'analisi, condotta ossigraficamente su colture in fase esponenziale, ha evidenziato un aumento di tale emissione all'aumentare della temperatura di crescita (Fig. 9) indicando un incremento dell'attività fotosintetica delle cellule algali e dimostrando, di conseguenza, il mantenimento della funzionalità dell'apparato fotosintetico all'aumentare della temperatura.

Una conferma del mantenimento dell'efficienza fotosintetica delle colture algali all'aumento della temperatura di crescita è derivato dall'analisi dell'emissione di fluorescenza della clorofilla *a* con la misurazione del rapporto F_v/F_m , che indica lo stato di funzionalità del PSII e viene considerato come indice di funzionalità dell'intero apparato fotosintetico (Maxwell & Johnson, 2000).

Questa analisi, effettuata fluorimetricamente sulle diverse colture algali in fase di crescita esponenziale, ha dimostrato che il rapporto F_v/F_m si manteneva su valori attorno a 0.55 alle tre temperature di crescita (Fig. 10). I valori del rapporto F_v/F_m misurati nelle colture algali erano più bassi di quelli riportati generalmente per le piante superiori, ma vicini a quelli registrati in altri organismi algali (Hanelt *et al.*, 2003). La stabilità del valore del rapporto F_v/F_m nelle colture cresciute alle diverse temperature, comunque, indicava che lo stato di funzionalità del fotosistema secondo e dell'intero apparato fotosintetico non veniva influenzato dalle variazioni della temperatura di crescita.

Un'ulteriore verifica dello stato del PSII è stata effettuata analizzando la presenza nelle membrane tilacoidali di "*Chlorella*" *saccharophila* di componenti proteici essenziali del fotosistema. L'analisi Western (Fig. 11), condotta con anticorpi specifici per le proteine D1 (del centro di reazione) e LHCII (dell'antenna periferica), ha dimostrato che le variazioni della temperatura di crescita non modificavano sostanzialmente la quantità di queste proteine nelle membrane fotosintetiche delle cellule algali.

Una analisi Western effettuata con un anticorpo contro la subunità grande (LSU) della Rubisco, l'enzima chiave delle reazioni buie del carbonio, ha inoltre rivelato

(Fig. 11) che anche la quantità di questo enzima stromatico non veniva modificata dalla variazione delle temperature di crescita delle colonie algali.

Da tutto ciò si poteva dedurre che nelle colture di "*Chlorella*" *saccharophila* l'incremento della fotosintesi all'aumento della temperatura di crescita, documentato dalla maggiore emissione di ossigeno fotosintetico, non dipendesse da un aumento quantitativo di proteine e pigmenti fotosintetici o di proteine enzimatiche, ma fosse dovuto piuttosto al mantenimento della funzionalità dell'apparato fotosintetico ed alla accelerazione, alla salita della temperatura, delle reazioni termo-dipendenti.

Allo scopo di definire se le variazioni della temperatura di crescita avessero qualche effetto sull'assetto dei fotosistemi delle cellule algali è stata analizzata, infine, l'emissione di fluorescenza *in vivo* a 77K di colture di "*Chlorella*" *saccharophila* in fase esponenziale, cresciute alle tre diverse temperature.

In tutti gli spettri (Fig. 12), ottenuti utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 440 nm, si distinguevano i tre picchi di emissione di fluorescenza che, andando dalle lunghezze d'onda minori verso quelle maggiori, corrispondevano all'LHCII al PSII e al PSI (Satoh & Butler, 1978).

I tre picchi, nelle piante superiori, sono collocati, rispettivamente, a 685, 695 e 735 nm (Satoh & Butler, 1978). In "*Chlorella*" *saccharophila* il picco di emissione del PSI era invece spostato a 725 nm, un valore vicino a quello che in letteratura viene riportato per il picco di fluorescenza dei cianobatteri (Mimuro *et al.*, 2002). L'anticipazione del picco di fluorescenza del PSI, comunque, si riscontrava in tutti gli spettri algali e quindi era da considerarsi una caratteristica del fotosistema di "*Chlorella*" *saccharophila* non attribuibile ad alterazioni dovute alla temperatura.

Dal confronto degli spettri di emissione di fluorescenza risultava invece che le variazioni della temperatura di crescita delle colture algali portavano a cambiamenti interessanti nei picchi propri del fotosistema secondo. Più precisamente, la salita della temperatura di crescita sia a 8 che a 16°C determinava una riduzione dell'altezza di entrambi i picchi di emissione di questo fotosistema, con il conseguente aumento del rapporto di fluorescenza PSI/PSII. Una simile

variazione del rapporto di fluorescenza tra i due fotosistemi è interpretabile come un cambiamento nella distribuzione dell'energia di eccitazione in favore del PSI, conseguente alla transizione dei fotosistemi dallo stato 1 (con LHCII associato al PSII) allo stato 2 (con LHCII associato al PSI).

E' noto che le transizioni di stato dei fotosistemi, che si realizzano attraverso la migrazione dell' LHCII tra PSI e PSII, sono una strategia messa in atto da alghe verdi e piante superiori per mantenere una distribuzione equilibrata di energia radiante tra i fotosistemi in condizioni di luce che porterebbero alla sovraeccitazione di uno dei due. Esse quindi dipendono generalmente dalle condizioni di illuminazione e vengono modulate dallo stato redox dei plastochinoni nelle membrane tilacoidali (Satoh & Fork, 1983; Buchanan *et al.*, 2003).

Nel caso di "*Chlorella*" *saccharophila* la transizione di stato dei fotosistemi dipendeva non dalle condizioni di illuminazione, che erano le stesse per le diverse colture analizzate, ma dalla temperatura a cui erano state mantenute le cellule algali. Una simile transizione di stato, in risposta all'aumento di temperatura, era stata rilevata anche in foglie di spinacio da Weis (1984). E' quindi plausibile ritenere che in natura la distribuzione dell'energia di eccitazione tra i fotosistemi possa essere modulata non solo dalla luce, ma anche dalla temperatura. Secondo Weis la regolazione della distribuzione dell'energia di eccitazione tra i fotosistemi nella acclimatazione all'aumento della temperatura potrebbe essere dovuta a cambiamenti delle forze elettrostatiche alla superficie delle membrane tilacoidali. Ciò porterebbe ad un appressamento più blando dei tilacoidi a livello delle partizioni e alla migrazione laterale di unità del PSII, con un più intimo mescolamento dei complessi pigmento-proteina e un aumento della probabilità del trasferimento di energia di eccitazione dall'LHCII-PSII al PSI.

La possibilità di modulare il flusso di energia nei fotosistemi adattandolo alle variazioni di temperatura, oltre che di luce, acquista una notevole importanza, come strategia adattativa per il mantenimento dell'efficienza fotosintetica, in un organismo, come "*Chlorella*" *saccharophila*, adattato a vivere in un ambiente in cui entrambi questi fattori possono subire rapide e consistenti variazioni.

4.1.4 RESPIRAZIONE

L'analisi dell'attività respiratoria, misurata ossigraficamente *in vivo* come consumo di ossigeno al buio (Fig. 13), ha evidenziato che la respirazione delle colture algali cresciute alle tre diverse temperature si manteneva su valori confrontabili, mostrando addirittura una certa tendenza a diminuire, all'aumentare della temperatura di crescita.

E' noto che la temperatura influenza la respirazione e che tra respirazione e temperatura esiste una relazione diretta dovuta alla elevata termo-dipendenza delle cinetiche della maggior parte delle reazioni metaboliche (Raison, 1980). In piante di climi freddi, però, è stato spesso rilevato che un abbassamento della temperatura porta non ad una diminuzione bensì ad un aumento della velocità di respirazione. L'incremento della respirazione alle basse temperature di crescita viene vista come una strategia adattativa degli organismi di ambienti freddi e si ritiene che dipenda dall'aumentato coinvolgimento della via cianuro resistente (definita anche via dell'ossidasi alternativa AOX) nel consumo respiratorio di ossigeno (Purvis & Shewfelt, 1993).

I risultati ottenuti con l'analisi ossigrafica del consumo di ossigeno delle colture algali hanno portato ad ipotizzare che l'elevata attività respiratoria di "*Chlorella*" *saccharophila*, alle basse temperature potesse dipendere, come per altri organismi di ambienti freddi, dalla attivazione della via dell'AOX.

Allo scopo di verificare il livello della via cianuro resistente nelle cellule della microalga psicrofila e di analizzare la sua partecipazione alla respirazione alle diverse temperature di crescita sono state condotte analisi del consumo respiratorio di ossigeno delle colonie algali in presenza di inibitori specifici delle due vie mitocondriali di trasporto elettronico e precisamente: di cianuro di potassio (KCN) che inibisce la via dei citocromi e di acido salicilidrossiammico (SHAM) che inibisce la via cianuro resistente.

L'estrema variabilità delle concentrazioni riportate in letteratura per l'utilizzo di questi inibitori ha reso necessario l'allestimento di una serie di analisi preliminari con quantità crescenti dei due inibitori. Ciò allo scopo di individuare la concentrazione di ciascuno di essi sufficiente a causare la maggiore inibizione della specifica via respiratoria nella microalga in esame. In figura 14 vengono

riportati, come esempio, i risultati ottenuti con le diverse concentrazioni di SHAM, che hanno permesso di scegliere per le prove di inibizione la concentrazione di SHAM 5 mM. La stessa concentrazione di inibitore si è rivelata utile per le prove da condurre con KCN.

Sorprendentemente, né il trattamento con SHAM né quello con KCN hanno portato a diminuzioni consistenti del consumo di ossigeno di "*Chlorella*" *saccharophila* al variare della temperatura (Fig. 15).

Ciò suggeriva che, a tutte le temperature, nella microalga psicrofila fossero presenti e operanti entrambi i percorsi respiratori e che l'inibizione di uno di questi venisse in gran parte compensata dall'attività dell'altro. In tal modo gli elettroni che non potevano fluire attraverso la via interrotta da un dato inibitore potevano essere deviati e fluire lungo l'altra via, arrivando all'ossigeno attraverso l'ossidasi terminale specifica, con il mantenimento del consumo respiratorio.

Questo risultato acquisiva una particolare importanza se si considera che generalmente, in un organismo vegetale non esposto a stress da basse temperature, la respirazione cianuro resistente rende conto solo del 10-15% del consumo totale di ossigeno (Ribas-Carbo *et al.*, 1995) e che la sua attività viene incrementata dall'abbassamento della temperatura.

Nel caso di "*Chlorella*" *saccharophila*, invece, le variazioni di temperatura non sembravano avere effetti rilevanti sul livello della respirazione cianuro resistente. Infatti, in seguito al trattamento con KCN, che inibiva la via dei citocromi, il consumo di ossigeno delle cellule algali risultava essere sempre di poco inferiore a quello di controllo. Ciò suggeriva la potenzialità della microalga di attivare efficacemente la via cianuro resistente a tutte le temperature di crescita e, di conseguenza, portava a supporre che nei mitocondri fossero sempre presenti livelli costitutivamente alti di AOX.

Allo scopo di verificare questa ipotesi, su cellule algali cresciute alle tre diverse temperature è stata condotta un'analisi Western con un anticorpo specifico per l'AOX. L'analisi (Fig. 16) ha confermato, a tutte le temperature di crescita, la presenza, nel pattern elettroforetico delle proteine della microalga, di bande confrontabili come quantità e riferibili sia alla forma attiva che a quella inattiva dell'AOX.

La presenza costante di AOX nei mitocondri delle cellule di "*Chlorella*" *saccharophila* fornisce a questa microalga psicrofila il notevole vantaggio di poter adattare rapidamente il metabolismo respiratorio alle variazioni di temperatura e alle condizioni di freddo anche intenso che sono prevedibili nel suo ambiente naturale. Questa capacità può essere vista come una strategia di sopravvivenza, se si considera la fondamentale funzione preventiva della via cianuro resistente contro la formazione di ROS alle basse temperature.

4.1.5 CONCLUSIONI

Dai risultati delle prove sperimentali effettuate sulla microalga nivale "*Chlorella*" *saccharophila* è risultato che:

"*Chlorella*" *saccharophila* vive a basse temperature, ma è in grado di rispondere positivamente all'aumento della temperatura, nel range vitale, accelerando la velocità di crescita ed incrementando l'attività fotosintetica.

La crescita alle diverse temperature è accompagnata da alcuni adattamenti metabolici e funzionali che interessano sia l'apparato fotosintetico che quello respiratorio.

L'aumento della temperatura di crescita non altera l'organizzazione ultrastrutturale della microalga e non ne modifica i contenuti in clorofilla, incrementando però la sintesi dei carotenoidi, con un aumento dei rapporti quantitativi carotenoidi/clorofilla. Alle diverse temperature di crescita cambia l'assetto dei fotosistemi e la distribuzione dell'energia tra PSII e PSI. I fotosistemi, che nelle cellule cresciute a 4°C si trovano nello stato di transizione 1, con l'LHCII regolarmente associato al PSII passano in quelle cresciute alle più alte temperature allo stato 2 con lo spostamento dell'antenna sul PSI. Interessantemente queste transizioni di stato, che generalmente sono indotte da variazioni dello spettro dell'energia radiante, nella microalga psicrofila risultano essere termo-modulate, dal momento che le colonie algali cresciute alle diverse temperature erano esposte alle stesse condizioni di illuminazione.

A tutte le temperature la microalga mantiene la piena efficienza dei fotosistemi e incentiva l'attività fotosintetica, plausibilmente per la maggiore velocità delle reazioni enzimatiche che sono temperatura-dipendenti.

Interessantemente, all'abbassamento della temperatura di crescita non si determina nelle cellule algali l'atteso decremento dell'attività respiratoria, ma viene mantenuto un livello costante di respirazione, che anzi tende ad incrementare. Ciò risulta correlabile con la presenza nei mitocondri della microalga criofila di quantità costitutivamente elevate di AOX, l'ossidasi terminale del flusso elettronico cianuro resistente. In tal modo, all'abbassamento anche repentino della temperatura ambientale, le cellule possono attivare

rapidamente questa via respiratoria, la cui funzione è quella di prevenire la produzione, indotta dal freddo, di specie reattive dell'ossigeno, estremamente pericolose.

Seguendo la crescita delle alghe per un periodo prolungato, risulta che delle tre temperature testate la più indicata per la sopravvivenza a lungo termine di "*Chlorella*" *saccharophila* è la più bassa (4°C). Le temperature più elevate, infatti, permettono la crescita delle colonie algali o addirittura ne incrementano la velocità, ma ne anticipano poi nel tempo la senescenza.

4.2 CIANOBATTERI DI AMBIENTE TERMALE

Sulla superficie dei fanghi delle vasche termali di Abano Terme e Montegrotto si sviluppano abbondanti popolazioni di cianobatteri, che formano coperture spesse e compatte (Fig. 17) costituite da intrecci di forme filamentose tra cui possono inserirsi individui coccoidi. Al microscopio elettronico a scansione è possibile vedere lo stretto intreccio dei filamenti cianobatterici (definiti “feltri” per la loro consistenza e compattezza) e distinguere in una stessa copertura la coesistenza di cianobatteri diversi (Fig. 18).

4.2.1 *Cyanobacterium aponinum*

4.2.1.1 CLASSIFICAZIONE DI *Cyanobacterium aponinum*

Dai fanghi di uno stabilimento termale di Abano Terme, alla temperatura di circa 40-42°C, era stata isolata una forma di cianobatterio coccoide (Fig. 18) che, per le caratteristiche morfologiche e strutturali sembrava appartenere al genere *Cyanobacterium*. Per una più precisa collocazione tassonomica di questo organismo, indicato inizialmente come *Cyanobacterium* sp. ETS-03, era stata condotta nel laboratorio del prof. Andreoli un’indagine di tipo molecolare, utilizzando come markers 16S rDNA e ITS rDNA.

L’albero filogenetico ricavato da questa indagine (Fig. 19) aveva confermato l’appartenenza del ceppo euganeo al genere *Cyanobacterium* ed aveva rivelato che esso si collocava molto vicino (era *sister taxon* con un 98% di identità) a *Cyanobacterium* sp. MBIC 10216, un ceppo coccoide (indicato come termofilo) isolato in Giappone da una stazione termale marina alla temperatura di circa 37°C. Analisi dei pigmenti fotosintetici però avevano evidenziato differenze significative nei due ceppi, suggerendo che potesse trattarsi di due specie diverse.

Il primo approccio sperimentale condotto nel presente lavoro di tesi su un cianobatterio termofilo del comprensorio Euganeo ha avuto quindi lo scopo di verificare, con ulteriori indagini, se il ceppo giapponese e quello euganeo

appartenessero alla stessa specie o fossero invece specie diverse del genere *Cyanobacterium*.

Per tale motivo, sono state allestite colture a 30°C del ceppo euganeo e del ceppo giapponese sia in terreno BG11 dolce che in terreno BG11 salato. E' risultato che entrambi i ceppi sopravvivevano nei due terreni di coltura ma si diversificavano notevolmente per forma e dimensioni (Fig. 20).

In terreno salato il ceppo giapponese marino aveva cellule rotondeggianti molto piccole che non subivano modificazioni morfologiche quando venivano trasferite in terreno dolce. Le cellule del ceppo euganeo, ovoidali nel terreno dolce, quando venivano trasferite in terreno salato subivano invece drammatiche alterazioni morfologiche, aumentando di dimensioni e assumendo forme molto allungate e irregolari.

Questi risultati hanno permesso di escludere che i due ceppi in esame appartenessero alla stessa specie.

Il cianobatterio coccoide isolato dalle acque termali di Abano era quindi da considerarsi una specie nuova, non compresa fra quelle già conosciute.

A questo organismo è stato assegnato il nome di *Cyanobacterium aponinum* (Moro *et al.*, 2007).

Su *Cyanobacterium aponinum*, messo in coltura nel nostro laboratorio, sono poi state condotte tutte le indagini qui di seguito riportate, con lo scopo di caratterizzarlo anche da un punto di vista ultrastrutturale e fisiologico.

4.2.1.2 CRESCITA ALLE DIVERSE TEMPERATURE

Un'indagine preliminare sulla crescita di *Cyanobacterium aponinum*, condotta ponendo colture pure a temperature di 10-15-20-30-40-45-50°C e misurandone la crescita dopo quattro settimane, ha evidenziato che le colture cianobatteriche crescevano nel range di temperatura tra 20 e 40°C.

A temperature inferiori a 20°C le colture sopravvivevano ma avevano una crescita pressoché nulla. A temperature superiori a 40°C, invece, esse manifestavano fenomeni di sofferenza, evidenziati anche visivamente dalla loro rapida depigmentazione.

Indagini più precise e dettagliate sulla velocità di crescita delle colture di *Cyanobacterium aponinum* al variare della temperatura sono state quindi condotte a 20-30-40°C, utilizzando come parametro l'aumento della loro densità ottica (Miller & Castenholz, 2000).

Dalle analisi è risultato (Fig. 21) che a 20°C le colture cianobatteriche si mantenevano per circa 15-16 settimane in fase esponenziale, entrando poi in fase stazionaria. A 30°C la velocità di crescita delle colture nelle prime 15 settimane era del tutto paragonabile a quella della temperatura più bassa, ma, a differenza di quanto avveniva a 20°C, la crescita a 30°C si manteneva ancora in fase esponenziale dopo oltre 20 settimane. A 40°C, infine, la crescita delle colture cianobatteriche era decisamente più lenta ed entrava in fase stazionaria, dopo circa 16-17 settimane, con un valore di densità ottica, e quindi di quantità di cellule, che era approssimativamente la metà di quello delle colture cresciute a 30°C.

Delle tre temperature quindi, la più adatta alla crescita di *Cyanobacterium aponinum* risultava essere la temperatura di 30°C, che manteneva più a lungo una attiva crescita delle cellule cianobatteriche.

Su colture di *Cyanobacterium aponinum* mantenute a 20, 30 e 40°C e in fase di crescita esponenziale sono state effettuate tutte le successive indagini morfologiche e fisiologiche, allo scopo di analizzare le risposte del cianobatterio alle variazioni della temperatura di crescita.

4.2.1.3 MORFOLOGIA E ULTRASTRUTTURA DELLE CELLULE

Già dalle analisi al microscopio ottico è risultato che la variazione della temperatura di crescita aveva effetto sulla forma e le dimensioni delle cellule di *Cyanobacterium aponinum*. Alle più basse temperature (20 e 30°C) le cellule apparivano di forma ovoidale (Fig. 22a,c) mentre a 40°C esse assumevano forma rotondeggiante, aumentando di dimensione (Fig. 22e). L'osservazione al microscopio a fluorescenza, dopo eccitazione con luce UV, mostrava la caratteristica autofluorescenza rossa della clorofilla distribuita omogeneamente in tutte le cellule (Fig. 22b,d,f).

L'analisi al microscopio elettronico a scansione confermava le variazioni di forma e dimensione delle cellule e permetteva di effettuare misure precise. Nella coltura cresciuta a 20°C (Fig. 23a) le cellule erano ovoidali e misuravano in media 2.5 µm in lunghezza e 1.8 µm in larghezza. Alla temperatura di crescita di 30°C (Fig. 23b) la forma delle cellule non cambiava ma le dimensioni salivano a circa 3.5 x 1.8 µm. Infine, a 40°C (Fig. 23c) le cellule assumevano forma sferoidale e diametro medio di 3.5 µm.

Nelle micrografie delle colture cresciute alle tre diverse temperature numerose cellule di *Cyanobacterium aponinum* si presentavano in divisione binaria equatoriale, la forma di divisione propria di questo cianobatterio. Le cellule, inoltre, avevano la superficie ricoperta di materiale mucillaginoso che si estrofletteva formando filamenti e briglie che potevano connettere più microorganismi portando alla formazione di aggregati cellulari. Ciò era particolarmente visibile nella coltura cresciuta a 20°C (Fig. 23a). Le guaine mucillaginose, comunque erano proprie delle singole cellule che rimanevano distinte anche se imbrigliate negli ammassi cellulari.

Al microscopio elettronico a trasmissione erano visibili, all'esterno delle cellule cresciute a 20°C (Fig. 24a), le numerose briglie formate dalla guaina mucillaginosa.

All'interno delle cellule erano presenti numerose membrane tilacoidali distribuite in tutta la massa citoplasmatica e inclusioni di sostanze di riserva.

L'aumento della temperatura di crescita (Fig. 24b,c) non modificava sostanzialmente l'organizzazione ultrastrutturale delle cellule di *Cyanobacterium aponinum*.

4.2.1.4 PIGMENTI FOTOSINTETICI

Dall'analisi spettrofotometrica dei pigmenti fotosintetici, riferiti a numero di cellule, risultava che l'aumento della temperatura di crescita portava ad un incremento nei contenuti in clorofilla *a* e ficobiliproteine delle colture cianobatteriche (Fig. 25a,b). L'incremento di questi pigmenti fotosintetici alle più alte temperature di crescita poteva essere messo in relazione con il fatto che le

singole cellule, di aumentate dimensioni, contenevano plausibilmente anche una maggiore quantità di membrane tilacoidali.

L'incremento più rilevante si riscontrava nelle ficobiliproteine (Fig. 25b), che aumentavano la loro concentrazione di oltre dieci volte tra 20 e 40°C. Ciò determinava un aumento dei valori dei rapporti ficobiliproteine/clorofilla *a* da 0.27 a 20°C a ben 1.3 a 40°C (Fig. 25c).

I rapporti percentuali tra le diverse ficobiliproteine (Fig. 25d) subivano alcune variazioni al variare della temperatura di crescita. Interessantemente, i rapporti erano molto simili nelle cellule cresciute alle temperature estreme di 20 e 40°C, con la percentuale massima di ficocianina (attorno al 50%) e la percentuale minima di ficoeritrina (attorno al 13-15%). Nelle cellule cresciute a 30°C le percentuali di questi due pigmenti erano più vicine, con la ficocianina al 35% circa e la ficoeritrina attorno al 24%.

All'aumento della temperatura di crescita corrispondeva anche un aumento significativo dei contenuti cellulari in carotenoidi totali (Fig. 26a).

Se però si consideravano i rapporti carotenoidi/clorofilla (Fig. 26b) si osservava che i valori più elevati venivano raggiunti alle temperature di crescita di 20 e 40°C con il valore massimo a quest'ultima temperatura. Nelle colture cresciute a 30°C il rapporto tra i due tipi di pigmento si manteneva su un valore più basso. Ciò indicava che per il cianobatterio questa era la temperatura di crescita migliore, considerando che un incremento del rapporto carotenoidi/clorofilla è generalmente indice di una condizione di stress.

Allo scopo di verificare se le diverse temperature di crescita oltre alla quantità totale modificassero lo spettro dei carotenoidi sintetizzati, è stata condotta un'analisi con HPLC.

Dai cromatogrammi delle colture cresciute a tutte e tre le temperature, uno dei quali è riportato in Fig. 27, oltre al picco della clorofilla *a*, è risultata la presenza, indicata dal tempo di ritenzione e confermata dalle caratteristiche degli specifici spettri di assorbimento, dei picchi di β -carotene e zeaxantina. Entrambe queste forme di carotenoidi sono presenti oltre che nei cianobatteri anche nelle piante superiori. Nelle piante, però, la zeaxantina è una forma intermedia della via biosintetica delle xantofille, mentre nei cianobatteri rappresenta il prodotto finale

più abbondante di tale via (Hirschberg & Clamovic, 1994). Nei cromatogrammi, inoltre, era distinguibile il picco della mixoxantofilla-3, una particolare forma di xantofilla caratteristica solo di organismi cianobatterici (Karsten & Garcia-Pichel, 1996). Appressato al picco del β -carotene era presente il picco di un pigmento non identificato. Tale picco, infatti, per tempo di ritenzione e spettro di assorbimento, non era ascrivibile ad alcun carotenoide noto.

Dal confronto dei cromatogrammi non si rilevavano effetti della temperatura sullo spettro dei carotenoidi sintetizzati.

Alle diverse temperature di crescita variavano invece i rapporti percentuali tra β -carotene e xantofille (zeaxantina + mixoxantofilla-3) (Fig. 28). In particolare si osservava un rapporto β -carotene/xantofille più elevato alle temperature estreme di crescita (20 e 40°C), con il valore massimo (2.03) nelle colture cresciute a 40°C. Nelle colture cresciute a 30°C il rapporto tra i due pigmenti scendeva invece al valore di 1.16.

E' noto che nei cianobatteri i rapporti quantitativi dei carotenoidi possono variare con le condizioni di crescita, anche se le forme predominanti dei pigmenti rimangono le stesse (Hirschberg & Chamovitz, 1994). Nel caso di *Cyanobacterium aponinum* la crescita alle temperature meno propizie di 20 e 40°C portava ad un incremento della sintesi del β -carotene mentre la crescita alla temperatura più adatta di 30°C favoriva la sintesi delle xantofille.

4.2.1.5 EMISSIONE DI FLUORESCENZA A 77K

L'assetto dei fotosistemi nelle membrane tilacoidali delle cellule di *Cyanobacterium aponinum* cresciuto alle diverse temperature è stato valutato mediante l'analisi dell'emissione di fluorescenza *in vivo* a 77K.

Sono stati registrati separatamente due distinti spettri di emissione di fluorescenza ottenuti eccitando le cellule con una luce di lunghezza d'onda di 560 nm, assorbita preferenzialmente dai pigmenti dei ficobilisomi, o con una luce di lunghezza d'onda di 440 nm, assorbita dalla clorofilla *a* del PSI e PSII (Mimuro *et al.*, 2002).

In tutti gli spettri ottenuti con eccitazione a 560 nm (Fig. 29) erano visibili cinque picchi di emissione di fluorescenza che, iniziando dalle lunghezze d'onda più

corte erano: il picco della ficocianina a 648 nm e il vicino picco della alloficocianina a 658 nm, i due picchi della clorofilla *a* del PSII a 684 nm e 696 nm e infine l'unico picco della clorofilla *a* del PSI a 720 nm (Mimuro *et al.*, 2002).

Il confronto degli spettri di emissione di fluorescenza ha evidenziato un fenomeno di particolare interesse.

E' risultato che nelle colture cresciute a 20 e 30°C il picco di emissione del PSI prevaleva su quelli del PSII, indicando che i fotosistemi delle cellule cianobatteriche si trovavano nello stato di transizione 2, cioè con i ficobilisomi associati al PSI (Campbell *et al.*, 1998). Nelle colture cresciute a 40°C, invece, i picchi di fluorescenza del PSII prevalevano decisamente sul picco del PSI. La fluorescenza massima, a 684 nm, corrispondeva al picco PBS+Clorofilla *a* del PSII, indicando che i fotosistemi si trovavano nello stato di transizione 1, con i ficobilisomi associati al PSII (Campbell *et al.*, 1998).

Nei cianobatteri, come nelle alghe e nelle piante superiori, le transizioni di stato sono un meccanismo che viene utilizzato per mantenere una equilibrata distribuzione di energia radiante tra i fotosistemi, in condizioni di illuminazione che porterebbero ad una sovraeccitazione di uno dei due (Campbell *et al.*, 1998).

Il passaggio da uno stato all'altro è modulato dallo stato redox dei plastochinoni. Più precisamente, l'aumento di plastochinoni ridotti porta i fotosistemi nello stato 2, con i ficobilisomi associati al PSI, mentre la loro diminuzione determina l'associazione dei ficobilisomi al PSII con la transizione allo stato 1.

Nelle alghe e nelle piante superiori le transizioni di stato, che si realizzano nei cloroplasti con la migrazione dell'antenna LHCII tra i due fotosistemi, sono regolate dallo stato redox dei plastochinoni determinato dal flusso di elettroni fotosintetico nella catena di trasporto tilacoidale. Esse quindi dipendono strettamente dall'attività dei fotosistemi e dal flusso di elettroni tra di essi. Nei cianobatteri, invece, le transizioni di stato possono essere influenzate oltre che dal flusso di elettroni fotosintetico, anche dal flusso di elettroni respiratorio, che può partecipare alla determinazione dello stato redox dei plastochinoni nelle membrane tilacoidali. Ciò è dovuto al fatto che nelle membrane cianobatteriche sono presenti sia le catene di trasporto di elettroni fotosintetiche che quelle

respiratorie, con i plastochinoni che operano come trasportatori intermedi di elettroni comuni alle due vie (Hirano *et al.*, 1980).

Quindi, come è stato dimostrato in *Synechococcus* (Mullineaux & Allen, 1986), oltre alla luce, anche la respirazione, contribuendo allo stato redox dei plastochinoni, può essere direttamente coinvolta nella modulazione delle transizioni di stato dei fotosistemi.

Questo potrebbe spiegare gli adattamenti riscontrati nelle colture di *Cyanobacterium aponinum* alle diverse temperature. Nelle tre condizioni di crescita, infatti, sia l'intensità di illuminazione che lo spettro della radiazione luminosa rimanevano invariati. Era quindi da escludere un effetto della luce sull'assetto dei fotosistemi, mentre era più plausibile supporre un coinvolgimento del flusso di elettroni respiratorio nelle membrane tilacoidali. Le situazioni riscontrate nelle cellule di *Cyanobacterium aponinum* potrebbero essere spiegate assumendo che alle temperature di crescita più basse un più lento flusso di elettroni attraverso la catena respiratoria avesse incrementato il livello redox dei plastochinoni, con il mantenimento dei fotosistemi nello stato 2 e l'associazione dei PBS al PSI. Alla temperatura più alta una accelerazione del flusso respiratorio avrebbe contribuito, invece, alla diminuzione del pool di plastochinoni ridotti, con la stabilizzazione dei fotosistemi nello stato 1 e l'associazione dei PBS al PSII.

Mullineaux & Allen (1986) discutendo i risultati ottenuti con *Synechococcus*, sottolineano che nei cianobatteri la cooperazione del flusso elettronico respiratorio e di quello fotosintetico nel controllo delle transizioni di stato può avere un ruolo importante nella regolazione delle interazioni tra metabolismo respiratorio e fotosintetico, oltre che nel bilanciamento della distribuzione dell'energia tra i due fotosistemi. Questi autori suggeriscono che nei cianobatteri il controllo delle transizioni di stato mediante lo stato redox dei plastochinoni, risultante dai flussi elettronici fotosintetici e respiratori, permetta di regolare la distribuzione dell'energia di eccitazione tra i fotosistemi, adattandola alle domande metaboliche della cellula.

Ciò potrebbe correlarsi con le transizioni di stato rilevate in *Cyanobacterium aponinum* alle diverse temperature di crescita, se si considera che le variazioni di temperatura influenzano sicuramente il metabolismo cellulare.

La verifica dell'ipotesi che le transizioni di stato termo-dipendenti di *Cyanobacterium aponinum* siano determinate principalmente da variazioni del flusso elettronico respiratorio nelle membrane tilacoidali richiederebbe la quantificazione della respirazione alla luce alle diverse temperature di crescita delle colonie. Nelle cellule vegetali eucariotiche l'analisi della respirazione viene generalmente effettuata misurando il consumo di ossigeno al buio (per escludere le interferenze della fotosintesi). Sfortunatamente nei cianobatteri il valore di respirazione cellulare misurato al buio non è riferibile alla respirazione delle cellule in condizioni di luce (Mullineaux & Allen, 1986). La luce, infatti, incrementa la velocità di respirazione delle cellule, portandola a valori diversi da quelli registrati al buio (Shyam *et al.*, 1993).

Attualmente, quindi, l'ipotesi che nelle transizioni di stato rilevate nelle cellule di *Cyanobacterium aponinum* siano coinvolti cambiamenti delle velocità di flusso elettronico respiratorio nelle membrane tilacoidali, per quanto plausibile, rimane speculativa.

Un'ulteriore interessante informazione, relativa all'assetto dei fotosistemi nelle membrane tilacoidali di *Cyanobacterium aponinum* cresciuto alle diverse temperature è derivata dall'analisi degli spettri di emissione di fluorescenza dopo eccitazione con luce di 440 nm, assorbita preferenzialmente dalla clorofilla *a* dei due fotosistemi. In tutti gli spettri (Fig. 30) si distinguevano il picco di emissione del PSI (a 720 nm) e i due picchi di emissione del PSII (a 684 nm per i pigmenti dell'antenna interna e a 696 nm, per quelli dei centri di reazione).

Alle temperature di crescita più basse (20 e 30°C), però, si osservava una notevole prevalenza del picco del PSI su quelli del PSII, con un rapporto tra l'altezza del picco massimo del PSII (696 nm) e quella del picco del PSI (720 nm) di circa 0.28. Alla temperatura di 40°C, invece, si riscontrava un innalzamento dell'emissione di fluorescenza del PSII, con la salita a circa 0.40 del rapporto tra l'altezza del picco di emissione a 696 e quello a 720 nm.

Questa variazione dello spettro suggeriva un cambiamento dei rapporti stechiometrici tra i due fotosistemi nelle membrane tilacoidali del cianobatterio alla più alta temperatura di crescita e si correlava bene con la transizione di stato registrata in precedenza. È stato infatti dimostrato che cellule cianobatteriche fatte crescere in condizioni di luce che inducono lo stato di transizione 2 non solo

spostano i PBS sul PSI, ma riducono anche il numero di unità del PSII, con una caduta del rapporto PSII/PSI a valori attorno a 0.27 (Manodori & Melis, 1986; Allen *et al.*, 1989). Nelle cellule cianobatteriche fatte crescere in condizioni che inducono lo stato di transizione 1, invece, i rapporti PSII/PSI risultano essere più elevati, arrivando a valori anche di 0.70 (Manodori & Melis, 1986; Allen *et al.*, 1989). Anche questi aggiustamenti stechiometrici dei due fotosistemi, nel nostro caso indotti dalla temperatura, rientrano nelle strategie messe in atto dai cianobatteri per una distribuzione equilibrata di energia tra i fotosistemi. Vengono indicati come “acclimatazione cromatica” (Allen *et al.*, 1989) e sono regolati anch’essi dallo stato redox dei plastochinoni (Fujita & Murakami, 1987; Allen *et al.*, 1989).

Dalla letteratura risulta infine che nei cianobatteri le transizioni di stato sono accompagnate anche da variazioni dei rapporti tra ficobiliproteine e clorofilla *a*. In particolare, in condizioni di illuminazione che inducono lo stato di transizione 2 dei fotosistemi il rapporto ficobiliproteine/clorofilla *a* risulta piuttosto basso, con valori attorno a 0.40. In luce che induce lo stato di transizione 1 tale rapporto sale a valori di circa 1.3 (Manodori & Melis, 1986).

Interessantemente, variazioni dei valori dei rapporti ficobiliproteine/clorofilla *a* confrontabili con quelli riportati da Manodori & Melis (1986) erano stati rilevati anche nelle cellule di *Cyanobacterium aponinum* alle diverse temperature di crescita. Nelle colture del cianobatterio il rapporto ficobiliproteine/clorofilla *a*, che si manteneva su valori più bassi alle temperature di 20 e 30°C, saliva al valore di 1.3 alla temperatura di 40°C. In *Cyanobacterium aponinum* quindi, le variazioni della temperatura di crescita inducevano, in associazione con le transizioni di stato termo-modulate, aggiustamenti delle dimensioni dell’antenna maggiore dei fotosistemi, paragonabili a quelli rilevati, per altri cianobatteri, nelle transizioni di stato foto-indotte.

4.2.1.6 ATTIVITÀ FOTOSINTETICA

L’attività fotosintetica di *Cyanobacterium aponinum*, alle diverse temperature di crescita, è stata valutata mediante misurazione con elettrodo di Clark, dell’ossigeno emesso *in vivo* dalle colture (Fig. 31a,b).

Le analisi hanno evidenziato che alle temperature di crescita di 20 e 30°C l'emissione di ossigeno delle colture cianobatteriche si manteneva pressoché costante quando riferita ad unità di clorofilla (Fig. 31b) mentre aumentava all'aumento della temperatura se riferita a numero di cellule (Fig. 31a). Ciò era plausibilmente da attribuire ai maggiori contenuti in pigmenti delle singole cellule cresciute a 30°C rispetto a quelle cresciute a 20°C ed era anche una riprova della stabilità dell'apparato fotosintetico alle due temperature.

L'emissione di ossigeno fotosintetico diminuiva invece nelle colonie cianobatteriche cresciute a 40°C e questa diminuzione era particolarmente evidente quando l'emissione veniva riferita a unità di clorofilla (Fig 31b). Ciò indicava una riduzione dell'efficienza fotosintetica e lasciava supporre una possibile alterazione dell'apparato fotosintetico e in particolare uno stato di fotoinibizione del PSII.

Le informazioni ottenute con le misurazioni dell'emissione di ossigeno *in vivo* delle colonie cianobatteriche sono state rafforzate dai risultati dalle analisi di emissione di fluorescenza della clorofilla *a* condotte con un fluorimetro con luce ad impulsi di ampiezza modulabile. Da queste analisi si sono sempre ottenuti valori di F_v/F_m molto più bassi di quelli che normalmente si ottengono con le cellule eucariotiche, ma questa è una caratteristica delle cellule cianobatteriche, dovuta al fatto che l'antenna periferica del PSII è costituita da ficobiliproteine e non da clorofille (Lin *et al.*, 2004). Come riportato in Fig. 32, nelle cellule di *Cyanobacterium aponinum* cresciute alle temperature di 20 e 30°C il rapporto F_v/F_m si manteneva su valori di circa 0.35, mentre l'aumento della temperatura di crescita a 40°C causava una diminuzione del rapporto F_v/F_m a un valore di circa 0.29. Ciò confermava una certa perdita di attività del PSII nelle cellule del cianobatterio alla più alta temperatura di crescita.

E' noto che una caduta dell'attività del PSII può essere conseguente a numerosi eventi di protezione o di danno del fotosistema. Essa, ad esempio, può dipendere dalla riduzione della quantità di energia luminosa che arriva al centro di reazione del PSII mediante dissipazione non radiante di parte dell'energia che arriva all'antenna periferica del fotosistema. La fotoinibizione, però, può essere correlata ad un reale danno subito dal centro di reazione del fotosistema, e più precisamente

dalla proteina D1, che è la componente del PSII più sensibile a tutte le condizioni di stress.

Si è ritenuto quindi interessante valutare i livelli della proteina D1 nelle cellule cianobatteriche cresciute alle tre diverse temperature, mediante una analisi Western effettuata con un anticorpo specifico per questa proteina.

Da questa analisi è risultato (Fig. 33) che alle due temperature di crescita più basse i livelli di D1 nelle membrane tilacoidali delle cellule cianobatteriche erano confrontabili, mentre a 40°C la quantità di proteina D1 era ridotta. Ciò indicava che la diminuzione dell'attività fotosintetica riscontrata a questa temperatura coinvolgeva il danno di un certo numero di unità del PSII.

Così, per le cellule di *Cyanobacterium aponinum* 40°C era già una temperatura stressante, che limitava la velocità di crescita delle colonie e interferiva con la conduzione della fotosintesi. Ciò si collegava al fatto che una temperatura di poco superiore (45°C) causava la morte di questo cianobatterio.

4.2.1.7 EFFETTI DELLA TEMPERATURA DI 45°C SULLE COLTURE DI *Cyanobacterium aponinum*

Le indagini preliminari sulla crescita delle colture cianobatteriche avevano evidenziato che l'aumento della temperatura a 45°C portava, nel giro di una settimana, alla morte delle cellule di *Cyanobacterium aponinum*, evidenziata dalla decolorazione della coltura (Fig. 34).

Al fine di definire gli eventi che caratterizzavano la morte di questo cianobatterio sono state allestite colture a 45°C e si sono condotte una serie di indagini dopo 2, 4 e 6 giorni di permanenza a questa temperatura.

L'analisi spettrofotometrica dei pigmenti fotosintetici riferiti a numero di cellule (Fig. 35), ha evidenziato che già dopo due giorni a 45°C la quantità di ficobiliproteine aveva subito una sostanziale diminuzione, mentre i contenuti in clorofilla e carotenoidi non mostravano variazioni significative. Ciò indicava che i pigmenti dei ficobilisomi risultavano essere i più sensibili allo stress termico.

Dopo 4 giorni si riscontrava una riduzione notevole di tutti i tipi di pigmenti fotosintetici, ulteriormente aggravata dopo 6 giorni di permanenza a 45°C.

Osservazioni al microscopio ottico a fluorescenza, dopo eccitazione con luce UV, hanno permesso di evidenziare nel tempo una scomparsa graduale dell'autofluorescenza rossa della clorofilla. Dopo 2 giorni a 45° C le cellule cianobatteriche si presentavano ancora ben pigmentate (Fig. 36a) e con un'elevata ed omogenea autofluorescenza della clorofilla (Fig. 36b). Ciò indicava che non era ancora avvenuta una riduzione consistente di questo pigmento.

Dopo 4 e 6 giorni a 45° C, invece, si osservava in un numero sempre maggiore di cellule la perdita dell'autofluorescenza della clorofilla (Fig. 36d, f) che indicava una degradazione del pigmento fotosintetico.

La caduta dell'autofluorescenza della clorofilla non avveniva omogeneamente in tutta la cellula, ma si realizzava secondo un preciso modello spaziale. Essa iniziava dalla regione centrale delle cellule per estendersi poi verso la periferia, creando immagini cellulari caratterizzate da una banda di fluorescenza periferica (cellule a "occhiello rosso") (Fig. 36d, f), che suggerivano uno smantellamento graduale e direzionato delle membrane tilacoidali e dei pigmenti in esse contenuti. Questa ipotesi veniva confermata dalle osservazioni al microscopio elettronico di cellule esposte per periodi diversi alla temperatura di 45°C.

Dopo 2 giorni a 45°C la maggior parte delle cellule manteneva una buona organizzazione ultrastrutturale con abbondanti membrane tilacoidali (Fig. 37a).

Nelle colture esposte per 4 e 6 giorni a 45°C la situazione ultrastrutturale delle cellule, invece, era piuttosto varia. Le cellule presentavano diversi gradi di alterazioni, con le condizioni più severe che predominavano in quelle sottoposte per più lungo tempo all'elevata temperatura.

Una attenta osservazione delle alterazioni ultrastrutturali permetteva di ricostruire un modello di demolizione cellulare che iniziava con un diradamento delle membrane tilacoidali (Fig. 37b) e proseguiva con uno smantellamento di queste membrane nella regione centrale della cellula e la persistenza di tilacoidi più periferici (Fig. 37c). La successiva demolizione anche di questi tilacoidi portava alla situazione estrema in cui non si distinguevano più strutture interne (Fig. 37d) e le cellule assumevano un aspetto diafano di "corpse" cianobatterici (Ning *et al.*, 2002). Lo shock termico, quindi, sembrava attivare nelle cellule di *Cyanobacterium aponinum* un programma controllato di autodistruzione.

L'esposizione alla temperatura di 45°C causava anche una degradazione del DNA del cianobatterio. Ciò era evidenziato al microscopio ottico dalla graduale caduta nel tempo della risposta dell'acido nucleico alla colorazione con DAPI (Fig. 38). Il danno al DNA era riscontrabile anche nelle micrografie al microscopio elettronico. Nelle cellule esposte a 45°C, infatti, si osservava la comparsa nella regione centrale di masse elettrondense (Fig. 37b, c), interpretabili come addensamenti di DNA, mai osservate nelle cellule cianobatteriche cresciute alle più basse temperature.

La demolizione del DNA è un evento proprio nella morte cellulare programmata ed anzi la frammentazione del DNA (laddering) viene considerata un evento marker per il suo sicuro riconoscimento (Collins *et al.*, 1997).

Quindi, per verificare se nella morte cellulare di *Cyanobacterium aponinum*, indotta dalla troppo elevata temperatura, si producesse questo tipo di danno del DNA, è stata effettuata una analisi elettroforetica sull'acido nucleico estratto da cellule cresciute a 30°C e da cellule mantenute a 45°C per 2 e 6 giorni.

Questa analisi (Fig. 39) ha permesso di evidenziare, nelle cellule esposte all'alta temperatura, lo stato di degradazione del DNA, documentato dalla comparsa, nelle corsie corrispondenti, del tipico "smear".

E' noto che nei processi di morte cellulare programmata delle cellule animali la degradazione del DNA avviene mediante la rottura (laddering) della molecola in frammenti di circa 180 pb (o multipli) visibili come bande distinte nella corsa elettroforetica (Bortner *et al.*, 1995).

Nelle cellule vegetali la degradazione del DNA non sempre è associata con la comparsa delle bande a basso peso molecolare. La molecola del DNA, infatti, può subire una rottura randomizzata, con la formazione di uno smear, che viene comunque considerato come una dimostrazione della demolizione dell'acido nucleico (Vacca *et al.*, 2004; Gunawardena *et al.*, 2005).

In realtà, anche in cellule animali la demolizione del DNA nella morte cellulare programmata può avvenire secondo modelli diversi, con la formazione di oligonucleosomi, ma anche di grossi frammenti molecolari. Per cui, secondo Bortner *et al.* (1995), non il preciso modello di degradazione del DNA, bensì la degradazione genomica stessa è da considerare un buon indicatore di morte cellulare programmata.

Così, le evidenze fornite dalla microscopia ottica ed elettronica e la riprova ottenuta con l'analisi del DNA sembrano suggerire che in *Cyanobacterium aponinum* la morte delle cellule indotta dallo stress termico coinvolga eventi riportabili a un modello di morte cellulare programmata o comunque avvenga secondo un preciso programma di morte cellulare.

Negli organismi eucariotici multicellulari la morte cellulare programmata è un processo di “suicidio cellulare” necessario per l'omeostasi e lo sviluppo dei tessuti e degli organi (Samuilov *et al.*, 2000). In letteratura, comunque, si trovano documentate evidenze morfologiche e biochimiche di particolari programmi di morte ipotizzati come morte cellulare programmata anche in organismi algali unicellulari (Zuppini *et al.*, 2007).

Sebbene la morte cellulare programmata sia stata considerata inizialmente un fenomeno proprio di organismi eucariotici, esistono indicazioni che eventi riferibili a morte cellulare programmata possano avvenire anche in batteri (Bayles, 2003) e in cianobatteri (Lee & Rhee, 1997).

Per quanto riguarda, in particolare, i cianobatteri, le informazioni sull'argomento, sono a tutt'oggi molto scarse. In letteratura, infatti, si trovano solo due lavori in cui vengono portate evidenze sperimentali di morte cellulare programmata in *Anabaena* sp. (Ning *et al.*, 2002) e *Trichodesmium* spp. (Berman-Frank *et al.*, 2004). Questi due cianobatteri filamentosi, infatti, vanno incontro a morte cellulare programmata quando sottoposti a stress ambientali, come ipersalinità (nel caso di *Anabaena*) o carenze nutrizionali e alta irradianza (nel caso di *Trichodesmium*). Per questi organismi è stato ipotizzato che la morte cellulare programmata possa essere utilizzata come strategia per aiutare la popolazione, in condizioni di stress o di carenza di nutrienti, ad eliminare le cellule vecchie e danneggiate fornendo alle cellule più giovani e integre composti organici essenziali (Bidle & Falkowski, 2004).

Berman-Frank *et al.*, (2004) nelle cellule di *Trichodesmium* spp. indotte a morire, avevano condotto una analisi Western per rivelare la presenza di caspasi, utilizzando un anticorpo policlonale diretto contro la caspasi-3-umana. Gli autori avevano documentato un incremento nel tempo della banda riconosciuta da questo anticorpo.

Si è quindi ritenuto interessante verificare la presenza della caspasi-3 anche nelle cellule di *Cyanobacterium aponinum* esposte per periodi diversi alla temperatura di 45°C. A tale scopo è stata condotta un'analisi Western con il medesimo anticorpo contro la caspasi-3-umana. L'analisi (Fig. 40) ha rivelato, già nelle cellule di *Cyanobacterium aponinum* cresciute a 30 e 40°C, la presenza di una banda con peso molecolare nello stesso range di quella segnalata da Berman-Frank *et al.* in *Trichodesmium* spp. Questa banda, riconosciuta dall'anticorpo contro la caspasi-3-umana mostrava un rilevante incremento nelle cellule esposte per periodi crescenti alla temperatura di 45°C.

Questa ulteriore riprova rafforza l'idea che anche nel cianobatterio coccoide *Cyanobacterium aponinum* si realizzino eventi riferibili a un preciso modello di morte cellulare. Per confermare questa idea, comunque, saranno necessari ulteriori studi.

4.2.1.8 CONCLUSIONI

Il cianobatterio coccoide isolato dalle popolazioni che colonizzano i fanghi termali del Comprensorio Euganeo si è rivelato essere una specie nuova, appartenente al genere *Cyanobacterium*, a cui è stato dato il nome di *Cyanobacterium aponinum*.

Le indagini sperimentali hanno dimostrato che questo microorganismo è in grado di vivere e crescere in un range di temperatura che va da 20 a 40°C circa, con una crescita migliore alla temperatura di 30°C.

La temperatura di crescita influenza la forma e la dimensione delle cellule che da ovoidali alle più basse temperature si ingrossano e diventano sferoidali alla temperatura più elevata. All'aumento della temperatura di crescita le cellule, ricche di tilacoidi, producono più pigmenti fotosintetici, in particolare ficobiliproteine, plausibilmente per la maggiore quantità di membrane nell'aumentato volume cellulare. Le diverse temperature di crescita hanno effetto sui rapporti carotenoidi/clorofilla e ficobiliproteine/clorofilla e modificano anche i rapporti percentuali tra le diverse forme di ficobiliproteine.

All'aumento della temperatura cambia l'assetto dei fotosistemi. Questi alle temperature di crescita più basse si trovano nello stato 2, con i ficobilisomi associati al PSI mentre nelle cellule cresciute a 40°C passano allo stato 1, con i ficobilisomi associati al PSII e un incremento del rapporto stechiometrico PSII/PSI. Essendo costanti alle diverse temperature l'intensità e lo spettro della luce fornita al cianobatterio è plausibile supporre che in queste transizioni di stato termo-modulate giochino un ruolo i flussi di elettroni respiratori.

La temperatura di 40°C produce già uno stato di stress nel cianobatterio con una diminuzione dell'efficienza fotosintetica e la perdita di unità funzionali del PSII.

L'aumento della temperatura a 45°C causa in pochi giorni la morte di *Cyanobacterium aponinum*, che risulta quindi essere una specie mesofila più che termofila.

L'esposizione delle cellule del cianobatterio alla temperatura letale porta alla degradazione dei pigmenti fotosintetici, alla demolizione delle membrane tilacoidali e alla degradazione del DNA. Tutto ciò avviene secondo un definito modello temporale e spaziale ed è accompagnato dall'aumento nelle cellule di una

proteina riconosciuta da un anticorpo contro la caspasi-3-umana. Lo stress termico, quindi, induce in questo microrganismo un preciso modello di morte cellulare.

4.2.2 *Leptolyngbya* sp. ETS-04

Nelle popolazioni cianobatteriche che colonizzano le superfici dei fanghi termali di Abano Terme e Montegrotto veniva frequentemente trovato, a temperature anche superiori a 50°C, un microorganismo filamentoso particolarmente sottile (Fig. 18).

Osservazioni preliminari sulle caratteristiche morfologiche e strutturali di questo cianobatterio, isolato e messo in coltura nel nostro laboratorio, suggerivano che esso appartenesse al genere *Leptolyngbya*.

4.2.2.1 CLASSIFICAZIONE DI *Leptolyngbya* sp. ETS-04

Per una più precisa collocazione tassonomica è stata condotta un'indagine molecolare utilizzando come marker il gene 16S rDNA.

L'amplificazione ed il successivo sequenziamento di questo gene ha permesso di ottenere una sequenza di 1475 bp, che è stata confrontata con sequenze omologhe disponibili in GenBank utilizzando il programma BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Queste analisi hanno portato a verificare che il 16S rDNA dell'organismo in studio presentava un'elevata identità con sequenze appartenenti al genere *Leptolyngbya*. È stato quindi costruito un data set costituito da 35 sequenze di cianobatteri, 21 dei quali appartenenti alle Pseudanabaenaceae, disponibili in GenBank. Il data set è stato quindi utilizzato per la costruzione di un albero filogenetico, applicando il metodo neighbour-joining (NJ) (Fig. 41). Dalla topologia dell'albero si può rilevare che il cianobatterio isolato a Montegrotto Terme forma un *cluster* con Oscillatoriales UVFP2, un cianobatterio filamentoso che, come specificato in GenBank (AJ630648), è stato isolato da un "biofilm" o "mat" presente in acque termali calde e sulfuree della Spagna (Fuente Podrida). Questo *cluster*, anche se risulta ben separato (80% di bootstrap) da due gruppi di cianobatteri entrambi rappresentanti del gruppo "LPP-group B" (*sensu* Rippka *et al.*, 1979), sembra rientrare in un gruppo più ampio che contiene *Leptolyngbya boryana*, specie tipo del genere *Leptolyngbya* (Komárek & Anagnostidis, 2005). Ciò comproverebbe che anche il nostro isolato sia una specie di questo

genere, che è stata per questo motivo denominata *Leptolyngbya* sp. ETS-04. L'analisi filogenetica così ottenuta mostrava comunque varie discrepanze. Ne sono un esempio *Oscillatoria neglecta* Lemmermann, *Oscillatoria* sp. OSP, *Phormidium* sp. MBIC 10025, *Plectonema* sp. F3 e *Phormidium autumnale* (Agardh) Trevisan ex Gomont che, come risulta dalla figura 41, dovrebbero essere rinominate come specie del genere *Leptolyngbya*.

Per rafforzare la collocazione tassonomica del nostro ceppo termale è stato effettuato anche il sequenziamento dell'ITS rDNA.

La sequenza è risultata di 250 pb in lunghezza e, diversamente da altri cianobatteri non presentava tRNA. Al momento, però, in GenBank sono reperibili poche sequenze dell'ITS di altre *Leptolyngbya*. Pertanto questo dato al momento non è utilizzabile e rappresenta solo un'informazione relativa a questa frazione ribosomale, utile per future analisi filogenetiche.

4.2.2.2 CRESCITA ALLE DIVERSE TEMPERATURE

L'indagine preliminare sulla crescita di *Leptolyngbya* sp. ETS-04, condotta ponendo colture pure a temperature crescenti da 20 a 60°C, aveva evidenziato che questo cianobatterio cresceva nel range di temperature comprese tra 30 e 50°C.

Al di sotto di 30°C le cellule sopravvivevano ma non si osservava una crescita della colonia. Al di sopra dei 50°C, invece, le cellule mostravano fenomeni di sofferenza che portavano alla completa decolorazione e alla morte della colonia in pochi giorni alla temperatura di 55°C.

Indagini più precise e dettagliate sulla velocità di crescita delle colture di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 al variare della temperatura sono state quindi condotte alle temperature di 30, 40 e 50°C, che permettevano la sopravvivenza e lo sviluppo del cianobatterio.

La natura filamentosa di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 ha impedito di ricavare la velocità di crescita delle colture dall'aumento del numero di cellule o dall'incremento della densità ottica. Come parametro di valutazione è stato quindi utilizzato l'incremento nel tempo della clorofilla dell'intera massa cianobatterica, partendo dal valore iniziale dell'inoculo.

Come mostrato in Fig. 42 la maggiore velocità di crescita delle colture del cianobatterio si otteneva con la temperatura di 40°C. A questa temperatura la coltura, dopo cinque settimane dall'inoculo, era ancora in fase di crescita esponenziale e aveva raggiunto, come contenuto in clorofilla, un valore doppio rispetto a quello della coltura cresciuta a 30°C. Quest'ultima, inoltre, a quella data era già entrata in fase stazionaria. Particolarmente rilevante era la ridotta velocità di crescita della coltura a 50°C, che suggeriva che questa temperatura creava già una condizione di stress per il cianobatterio in esame.

Su colture di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 mantenute a 30, 40 e 50°C e in fase di crescita esponenziale sono state effettuate tutte le successive indagini morfologiche e fisiologiche, allo scopo di caratterizzare il cianobatterio da un punto di vista ultrastrutturale e fisiologico e di analizzarne le risposte alle variazioni della temperatura di crescita.

4.2.2.3 MORFOLOGIA E ULTRASTRUTTURA DELLE CELLULE

Le osservazioni al microscopio ottico dei filamenti di *Leptolyngbya* sp. ETS-04, condotte sia in luce visibile che dopo eccitazione con luce UV, hanno evidenziato che a tutte le temperature di crescita saggiate le cellule degli interi filamenti erano vive e dotate della tipica autofluorescenza rossa della clorofilla *a* (Fig. 43). Quindi la più alta temperatura (50°C) influenzava negativamente la crescita della colonia ma non sembrava causare evidenti alterazioni o morte di cellule cianobatteriche.

Al microscopio elettronico a trasmissione le singole cellule dei filamenti cresciuti a 30°C apparivano di forma rettangolare, con dimensioni di circa $1.8 \times 2.8 \mu\text{m}$, e caratterizzate dalla presenza di tilacoidi periferici che correvano paralleli alla superficie cellulare (Fig. 44b). Inoltre, attorno ad ogni cellula e lungo l'intero filamento era presente una guaina ben definita di materiale extracellulare (Fig. 44a, b, c).

L'aumento della temperatura di crescita a 40°C non modificava sostanzialmente le caratteristiche ultrastrutturali interne delle cellule di *Leptolyngbya* sp. ETS-04. L'ulteriore incremento della temperatura di crescita a 50°C induceva invece la

produzione all'esterno delle cellule di cospicue guaine mucillagginose nelle quali si potevano distinguere una regione interna lassa e di aspetto granuloso-vescicolato e una più esterna di aspetto compatto (Fig. 45b, c).

Inoltre, sezioni longitudinali (Fig. 45a) e trasversali (Fig. 45b) mostravano che un'unica guaina poteva inglobare più di un filamento cianobatterico.

In un cianobatterio filamentoso la guaina esterna si origina dalle cellule di un singolo filamento che ne risulta regolarmente delimitato, come mostrano le micrografie di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 cresciuta a 30°C (Fig. 44a-c). Quindi la coesistenza all'interno di una stessa guaina, di più filamenti del cianobatterio cresciuto a 50°C potrebbe dipendere o da una irregolarità nelle divisioni cellulari o da una difficoltà delle cellule divise di liberarsi dalla abbondante guaina esterna per frammentare il filamento e produrre ormogoni.

Le osservazioni al microscopio elettronico a scansione mostravano il fitto intreccio di filamenti che produceva i “feltri” compatti delle colture cianobatteriche (Fig. 46a). A più alto ingrandimento si potevano distinguere le frammentazioni dei filamenti del cianobatterio cresciuto a 40°C (Fig. 46c), più frequenti di quelle dei cianobatteri cresciuti a 30°C (Fig. 46b). Ciò era da mettere in relazione con la più elevata velocità di crescita di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 a 40°C. La proliferazione dei cianobatteri filamentosi mediante la formazione di ormogoni per frammentazione dei filamenti preesistenti è, infatti, una forma di riproduzione comune in questi microrganismi.

Nei filamenti sviluppatasi sia a 30 che a 40°C si potevano inoltre riconoscere chiaramente le singole cellule allineate (Fig. 46b, c). Nei cianobatteri cresciuti a 50°C, invece, le cellule che costituivano i filamenti non erano distinguibili. Ciò a causa della presenza delle massicce guaine extracellulari che conferivano ai filamenti anche uno spessore maggiore (Fig. 46d).

4.2.2.4 PIGMENTI FOTOSINTETICI

L'analisi spettrofotometrica dei pigmenti fotosintetici, riferiti al peso secco del cianobatterio filamentoso, rivelava una variazione poco significativa dei valori di clorofilla *a* e dei carotenoidi totali all'aumentare della temperatura di crescita da 30 a 40°C. Mentre l'ulteriore incremento della temperatura a 50°C portava ad una

riduzione dei valori di entrambi questi pigmenti (Fig. 47a, b). Un andamento analogo si riscontrava nei contenuti cellulari in ficobiliproteine (Fig. 47c).

Dall'analisi delle percentuali delle diverse ficobiliproteine (Fig. 47d) emergeva la presenza di una quantità particolarmente elevata di ficocianina, che si manteneva attorno al 70% a tutte le temperature di crescita delle colonie cianobatteriche. Notevolmente scarsi erano invece i contenuti in ficoeritrina che, come valore massimo, arrivavano al 7% nelle cellule cresciute a 50°C. La alloficocianina, infine, si attestava su valori del 25-27% alle diverse temperature di crescita. La predominanza di ficobiliproteine con cromofori blu, come la ficocianina e la alloficocianina, è una caratteristica generale dei cianobatteri, da cui deriva il tipico colore verde-azzurro delle cellule (Van Den Hoek *et al.*, 1995). Comunque, in diverse specie, tra cui anche *Cyanobacterium aponinum* oggetto di studio della presente tesi, la percentuale di ficocianina si mantiene su valori più bassi, raggiungendo raramente valori attorno al 50% per l'abbondanza di alloficocianina, mentre i valori della ficoeritrina si aggirano sul 15-20% (Moro *et al.*, 2007). La rilevante quantità di ficocianina, quindi, sembra essere una interessante peculiarità delle cellule di *Leptolyngbya* sp. ETS-04.

Il rapporto quantitativo tra ficobiliproteine e clorofilla *a*, calcolato sui valori medi dei pigmenti (Fig. 48a), si manteneva su valori simili nelle colture cresciute a 30 e 40°C, mentre in quelle cresciute a 50°C il valore del rapporto diminuiva. Ciò dimostrava che a questa più alta temperatura di crescita la caduta dei pigmenti ficobilinici era maggiore di quella della clorofilla *a*, rivelando così una loro più elevata termo-sensibilità.

Il rapporto quantitativo tra carotenoidi e clorofilla *a* (Fig. 48b), invece, aveva andamento contrario, aumentando alla temperatura di 50°C rispetto alle temperature più basse. Dal momento che i carotenoidi svolgono un'importante funzione protettiva dell'apparato fotosintetico in diverse condizioni di stress (Pupillo *et al.*, 2003), l'aumento del rapporto carotenoidi/clorofilla, oltre alla riduzione dei contenuti di entrambi i pigmenti nelle cellule cianobatteriche, era un ulteriore segnale del fatto che la temperatura di 50°C era già piuttosto stressante per le colture di *Leptolyngbya* sp. ETS-04.

Al fine di verificare se le diverse temperature di crescita avessero effetto oltre che sulla quantità totale di carotenoidi anche sullo spettro delle forme di pigmento sintetizzate, è stata condotta un'analisi con HPLC.

Dai cromatogrammi delle colture cresciute a tutte e tre le temperature, uno dei quali è riportato in Fig. 49, oltre al picco della clorofilla *a*, è risultata la presenza, indicata dal tempo di ritenzione e confermata dalle caratteristiche degli specifici spettri di assorbimento, dei picchi predominanti di β -carotene, zeaxantina e del picco della mixoxantofilla-3. Era inoltre appena rilevabile il picco della isozeaxantina che indicava la presenza di tracce di questa forma di pigmento. Anche in *Leptolyngbya* sp. ETS-04, così come già rilevato in *Cyanobacterium aponinum*, appressato al picco del β -carotene era presente il picco di un pigmento che, per tempo di ritenzione e spettro di assorbimento, non era ascrivibile ad alcun carotenoide noto.

Dal confronto dei cromatogrammi risultava che l'aumento della temperatura di crescita delle cellule cianobatteriche non aveva effetto sullo spettro dei carotenoidi sintetizzati, ma induceva un rilevante incremento dei rapporti percentuali tra β -carotene e xantofille (zeaxantina + mixoxantofilla-3) (Fig. 50), che arrivavano al valore massimo di 1.18 a 50°C. In *Leptolyngbya* sp. ETS-04, quindi, l'aumento della temperatura di crescita favoriva la sintesi del β -carotene rispetto a quella delle due xantofille. Ciò era in accordo con quanto segnalato da Hirschberg & Chamovitz (1994) e cioè che le variazioni delle condizioni di crescita delle cellule cianobatteriche possono influenzare la distribuzione percentuale dei carotenoidi mantenendo però le forme predominanti di questi pigmenti.

4.2.2.5 EMISSIONE DI FLUORESCENZA A 77K

L'assetto dei fotosistemi nelle membrane tilacoidali di *Leptolyngbya* sp. ETS-04, alle diverse temperature di crescita, è stato valutato mediante l'analisi degli spettri di emissione di fluorescenza *in vivo* a 77K delle colture cianobatteriche.

Sono stati registrati due distinti spettri di emissione di fluorescenza, ottenuti eccitando le cellule con luce a 560 nm, assorbita preferenzialmente dai pigmenti

dei ficobilisomi, o con luce a 440 nm, assorbita preferenzialmente dalla clorofilla *a* dei due fotosistemi (Mimuro *et al.*, 2002).

Negli spettri ottenuti con eccitazione delle cellule a 560 nm (Fig. 51) erano visibili quattro picchi: il predominante picco della ficocianina a 648 nm, i due picchi della clorofilla *a* del PSII a 684 nm e a 696 nm e il picco della clorofilla *a* del PSI a 720 nm (Mimuro *et al.*, 2002).

Rispetto agli spettri di emissione di fluorescenza riportati in letteratura per altri cianobatteri (Campbell *et al.*, 1998) ed agli spettri di *Cyanobacterium aponinum* registrati nel presente lavoro di tesi (Fig. 29), quelli di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 mostravano una ridotta fluorescenza della clorofilla *a* dei due fotosistemi e quindi rapporti molto elevati tra il picco di emissione della ficocianina del ficobilisoma e quelli del PSII e del PSI. Ciò poteva essere messo in relazione con la presenza nelle membrane tilacoidali del cianobatterio di ficobilisomi particolarmente ricchi in ficocianina.

Gli spettri di emissione di fluorescenza delle cellule di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 cresciute alle diverse temperature non mostravano sostanziali differenze.

Per quanto bassi, i picchi di emissione relativi al PSII erano sempre superiori al picco di emissione del PSI. Ciò, anche associato con la prevalenza del picco a 684 nm, corrispondente alla clorofilla *a* dell'antenna del PSII, dimostrava che i fotosistemi delle cellule cianobatteriche si trovavano costantemente nello stato 1, con i ficobilisomi associati al PSII (Campbell *et al.*, 1998).

Quindi, a differenza di quanto era stato rilevato in *Cyanobacterium aponinum*, in *Leptolyngbya* sp. ETS-04 non si determinavano transizioni di stato dei fotosistemi all'aumento della temperatura di crescita nel range di valori analizzato.

Anche il confronto degli spettri di emissione di fluorescenza ottenuti dopo eccitazione delle cellule con luce di 440 nm, assorbita preferenzialmente dalla clorofilla *a* dei due fotosistemi (Fig. 52), non evidenziava differenze significative nelle cellule del cianobatterio cresciuto alle diverse temperature. In tutti gli spettri erano visibili il picco predominante del PSI a 725 nm e i due picchi minori del centro di reazione del PSII a 696 nm e dell'antenna interna di questo fotosistema a 684 nm. Inoltre, era ancora presente un picco molto elevato di emissione della ficocianina attorno a 646 nm. Generalmente gli spettri di emissione di fluorescenza ottenuti eccitando le cellule cianobatteriche con luce di 440 nm

mostrano picchi di ficocianina molto bassi rispetto ai picchi della clorofilla *a* dei due fotosistemi (vedi Fig. 30). La persistenza di un così elevato picco della ficocianina negli spettri di emissione di *Leptolyngbya* sp. ETS-04, anche dopo eccitazione con questa lunghezza d'onda, è ulteriormente da correlare con la presenza sulle membrane fotosintetiche del cianobatterio di ficobilisomi particolarmente ricchi in questa ficobiliproteina.

4.2.2.6 ATTIVITÀ FOTOSINTETICA

Come parametro per la valutazione dell'attività fotosintetica delle colture di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 cresciute alle diverse temperature, è stata considerata la quantità di ossigeno emessa dalle cellule *in vivo*.

All'aumento della temperatura di crescita da 30 a 40°C l'emissione di ossigeno delle colture, riferita a quantità di clorofilla *a*, subiva una diminuzione molto contenuta, mentre, l'aumento della temperatura a 50°C portava ad un dimezzamento della quantità di ossigeno emesso (Fig. 53a). Poiché la quantità di ossigeno emesso era stata rapportata ad una stessa quantità di clorofilla, la caduta dell'emissione e quindi dell'attività fotosintetica delle colture cresciute a 50°C non poteva dipendere dal loro più basso contenuto in clorofilla (vedi Fig. 47a). Era quindi plausibile supporre che l'elevata temperatura di crescita alterasse in qualche modo la funzionalità dei fotosistemi.

Allo scopo di chiarire le risposte ottenute con le misure ossigrafiche, sulle colture di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 cresciute alle diverse temperature sono state effettuate misure di emissione di fluorescenza della clorofilla *a* utilizzando un fluorimetro con luce ad impulsi di ampiezza modulabile. Dalle analisi è risultato (Fig. 54) che nelle colture cresciute a 30 e 40°C i valori del rapporto Fv/Fm si mantenevano su valori superiori a 0.3, ritenuti normali per le cellule cianobatteriche (Lin *et al.*, 2004). Nelle colture cresciute a 50°C, invece, il rapporto Fv/Fm superava di poco il valore di 0.20. Ciò dimostrava la riduzione dell'attività del fotosistema II e di conseguenza la perdita dell'efficienza fotosintetica delle cellule cianobatteriche.

Quindi per *Leptolyngbya* sp. ETS-04 la temperatura di crescita di 50°C si confermava come una temperatura stressante, che, pur permettendo la

sopravvivenza delle colture, ne rallentava la crescita e ne riduceva l'attività fotosintetica.

L'ulteriore aumento della temperatura a 55°C causava la morte di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 evidenziata dalla perdita di pigmentazione delle colture.

4.2.2.7 EFFETTI DELL'AUMENTO DELLA TEMPERATURA DI CRESCITA A 55°C SULLE COLTURE DI *Leptolyngbya* sp. ETS-04

L'indagine preliminare sulla crescita delle colture cianobatteriche aveva evidenziato che *Leptolyngbya* sp. ETS-04 andava incontro a morte nel giro di pochi giorni se veniva sottoposta alla temperatura di 55°C.

Allo scopo di seguire nel tempo gli eventi che portavano alla morte del cianobatterio sono state allestite colture alla temperatura di 55°C e si sono analizzate al microscopio ottico ed elettronico le alterazioni cellulari dopo 1, 2 e 3 giorni di mantenimento alla temperatura letale.

Le osservazioni al microscopio ottico a fluorescenza hanno permesso di rilevare nelle singole cellule dei filamenti cianobatterici la perdita della clorofilla *a*, chiaramente dimostrata dalla caduta dell'autofluorescenza rossa dopo eccitazione con luce UV. La scomparsa del pigmento fotosintetico avveniva inizialmente solo in alcune cellule lungo un filamento, come evidenziato dall'aspetto "tratteggiato" assunto dai filamenti dopo 1 giorno di esposizione all'alta temperatura (Fig. 55b). Dopo due giorni di mantenimento a 55°C la perdita di autofluorescenza era più accentuata e coinvolgeva un maggior numero di cellule e più lunghi tratti di filamenti (Fig. 55d), portando dopo 3 giorni di esposizione a 55°C alla scomparsa pressoché totale dell'autofluorescenza della clorofilla in tutte le cellule dei filamenti cianobatterici (Fig. 55f).

L'analisi al microscopio elettronico a trasmissione ha permesso di seguire nel tempo le alterazioni cellulari che portavano alla morte di *Leptolyngbya* sp. ETS-04. Le cellule inoculate da una coltura madre cresciuta a 40°C, che si presentavano di aspetto normale (Fig. 56a), in seguito al trattamento con la temperatura letale mostravano inizialmente una dilatazione dei tilacoidi e

alterazioni citoplasmatiche (Fig. 56b). Seguivano poi massicci eventi degenerativi che portavano alla totale demolizione delle cellule, lasciando alla fine frammenti di queste all'interno delle spesse guaine mucillaginose (Fig. 56c,d). Questi eventi non erano sincronizzati nelle cellule di un filamento, ma avvenivano in tempi diversi nelle diverse cellule, causando la scomparsa, in tratti sempre più lunghi del filamento stesso, dell'autofluorescenza della clorofilla, in corrispondenza delle cellule che via via morivano.

Quindi, a differenza di quanto riscontrato in *Cyanobacterium aponinum*, la morte di *Leptolyngbya* sp. ETS-04, causata dall'eccessiva temperatura, non si realizzava secondo una precisa e ordinata sequenza di eventi che producevano alla fine "ghost" di cellule apparentemente integre, ma avveniva attraverso la massiccia demolizione delle intere masse cellulari.

4.2.2.8 CONCLUSIONI

L'analisi filogenetica condotta sul cianobatterio filamentoso isolato dalle popolazioni che colonizzano i fanghi termali del Comprensorio Euganeo ha permesso di stabilire che esso appartiene al genere *Leptolyngbya*. Esso è *sister taxon* di un cianobatterio filamentoso, identificato come *Oscillatoriales UVFP2* (AJ630648), ed isolato da un "biofilm" presente in acque termali calde e sulfuree della Spagna. Questo *cluster* rientra in un gruppo più ampio che contiene *Leptolyngbya boryana*, specie tipo del genere *Leptolyngbya* (Komárek & Anagnostidis, 2005). Ciò comproverebbe che il nostro isolato sia una specie di questo genere, che è stato per questo motivo denominato *Leptolyngbya* sp. ETS-04.

Dalle analisi sperimentali è risultato che questo organismo cresce a temperature superiori a 20°C e inferiori a 55°C. Delle temperature analizzate tra 30 e 50°C quella più adatta alla crescita del cianobatterio è risultata essere la temperatura di 40°C.

Le temperature di crescita di 30 e 40°C non influenzano l'ultrastruttura delle cellule di *Leptolyngbya* sp. ETS-04, di forma rettangolare e organizzate in lunghi e regolari filamenti circondati da una guaina mucillaginosa. L'aumento della temperatura a 50°C porta invece a cambiamenti nell'organizzazione strutturale ed ultrastrutturale del cianobatterio. Vengono prodotte massicce guaine mucillaginose e si determinano irregolarità nella disposizione delle cellule all'interno di un filamento.

Alle temperature di 30 e 40°C le colture di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 mantengono valori confrontabili dei contenuti in pigmenti fotosintetici, caratterizzati da una particolare abbondanza in ficocianina tra le ficobiliproteine.

Alla temperatura di crescita di 50°C, invece, diminuiscono i contenuti in pigmenti fotosintetici, che presentano ancora la stessa prevalenza della ficocianina sulle altre ficobiliproteine, aumenta il rapporto carotenoidi/clorofilla mentre diminuisce il rapporto ficobiliproteine/clorofilla.

Anche l'attività fotosintetica e la funzionalità del fotosistema secondo si mantengono costanti alle due più basse temperature di crescita, per diminuire sensibilmente alla temperatura di 50°C.

La temperatura di 50°C quindi, risulta essere già stressante per questo microorganismo. Comunque, la sua capacità di sopravvivenza e di crescita, sebbene limitata, a questa temperatura lo indica come cianobatterio termale.

A differenza di quanto avviene in *Cyanobacterium aponinum* l'assetto dei fotosistemi delle cellule di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 non si modifica al variare della temperatura di crescita, permanendo nello stato di transizione 1, con i ficobilisomi associati al PSII.

L'esposizione del cianobatterio alla temperatura di 55°C ne determina la morte in pochi giorni. Questa non avviene, come in *Cyanobacterium aponinum*, secondo una ordinata sequenza di eventi cellulari, ma si realizza attraverso la demolizione totale delle masse cellulari. Interessantemente, la morte non è sincronizzata nelle cellule di un filamento, ma avviene in tempi diversi per cellule diverse.

4.2.3 *Oscillatoria duplisecta*

Nel corso di campionamenti condotti sulle vasche di stoccaggio dei fanghi di uno stabilimento termale di Montegrotto Terme è stato raccolto un cianobatterio che insolitamente formava feltri galleggianti sulla superficie dell'acqua che ricopriva i fanghi. Questi feltri si presentavano di colore marrone-nerastro e con una consistenza simile a ciocche di capelli (Fig. 57).

Il successivo isolamento ed allevamento nel terreno liquido di coltura BG11 ha permesso di condurre una serie di analisi che hanno portato all'identificazione dell'organismo in esame. Le analisi hanno riguardato indagini morfologiche, ultrastrutturali e molecolari.

4.2.3.1 MORFOLOGIA E ULTRASTRUTTURA DI *Oscillatoria duplisecta*

Data la colorazione nerastra del feltro, piuttosto insolita rispetto ai classici feltri verde-azzurro che si sviluppano sulla superficie dei fanghi termali del Comprensorio termale Euganeo (Fig. 17), il primo approccio è stato quello di verificare la composizione delle ficobiliproteine presenti in questo organismo. L'analisi spettrofotometrica ha evidenziato un'elevata percentuale di ficoeritrina (43.5%) e una minore percentuale di ficocianina (29%) e di alloficocianina (27.5%). Questa dominanza della ficoeritrina sulle altre ficobiliproteine giustificava la colorazione nero-brunastra dei feltri che, invece, per la maggior parte dei cianobatteri assumono una colorazione blu-verde per la dominanza della ficocianina.

Analisi morfologiche, condotte al microscopio ottico, hanno evidenziato che il cianobatterio era filamentoso, costituito da lunghi tricomi cilindrici isopolari, dritti e non ramificati, caratterizzati da una guaina molto sottile (Fig. 58a).

I tricomi, inoltre, presentavano cellule intercalari di forma discoidale caratterizzate da una larghezza variabile da 40 a 50 μm e una lunghezza di circa 10 μm (Fig. 58a). Le cellule apicali, invece, erano emisferiche, più piccole delle cellule intercalari, con una larghezza compresa tra 28 e 30 μm ed una lunghezza

di circa 15 μm (Fig. 58a, b). Le cellule apicali, inoltre, erano caratterizzate dalla presenza di una struttura, denominata caliptra (Fig. 58a), che è stata evidenziata anche da successive indagini ai microscopi elettronico a scansione (Fig. 58d) e a trasmissione (Fig. 59a, b). La caliptra, riconoscibile per le dimensioni minori rispetto alle cellule apicali e per una parete ispessita, costituisce un importante carattere sistematico (Komárek & Anagnostidis, 2005).

I tricomi del cianobatterio in studio presentavano inoltre costrizioni a livello delle pareti trasversali delle cellule dei filamenti, tali da conferire alle cellule un aspetto a “botticella” (Fig. 58a, b). Le costrizioni erano evidenti anche dall’osservazione al microscopio elettronico a trasmissione (Fig. 59c). Questo carattere, specialmente se confermato da studi al microscopio elettronico a trasmissione, può essere utilizzato come una caratteristica interspecifica del genere *Oscillatoria* (Komárek & Anagnostidis, 2005).

L’analisi al microscopio ottico ha permesso di osservare che nel cianobatterio in studio la riproduzione avveniva mediante la formazione di corti filamenti, definiti ormogoni (Fig. 58c), che si originavano in seguito alla morte di cellule del tricoma, dette “necridi” (Fig. 58b). Le cellule del filamento, inoltre, si dividevano per scissione binaria dando luogo a due cellule figlie di dimensioni minori rispetto alla cellula madre. Una volta raggiunte le dimensioni di quest’ultima, le cellule andavano incontro a un’ulteriore divisione.

L’indagine condotta al microscopio elettronico a trasmissione ha evidenziato la presenza nelle cellule di numerose membrane tilacoidali che decorrevano parallele tra di loro con un andamento sinuoso e che occupavano gran parte del volume cellulare (Fig. 59b).

4.2.3.2 CLASSIFICAZIONE DI *Oscillatoria duplisecta*

Per l’identificazione tassonomica di questo cianobatterio filamentoso è stata condotta un’indagine molecolare. Il DNA genomico, estratto da colture axeniche di questo microorganismo, è stato utilizzato per l’amplificazione mediante PCR del gene 16S rDNA.

E’ stata così ottenuta una sequenza genica di 1371 bp. L’analisi della nuova sequenza con il programma BLAST ha permesso di verificare che il 16S rDNA

del ceppo in studio presentava una alta identità (98%) con la sequenza di *Oscillatoria princeps* Vaucher ex Gomont (ceppo NIVA-CYA 150) isolata dalle acque di un fiume in Tailandia (Suda *et al.*, 2002). Secondo Suda *et al.* (2002) questo ceppo deve essere considerato ceppo tipo di *O. princeps*, che rappresenta la specie tipo del genere *Oscillatoria* (Komárek & Anagnostidis, 2005).

E' stato quindi costruito un data set di sequenze, disponibili in GenBank, utilizzato poi per la costruzione di un albero filogenetico, applicando il metodo neighbour-joining (NJ). L'albero filogenetico ottenuto ha evidenziato che il ceppo euganeo era *sister taxon* di *Oscillatoria princeps* NIVA-CYA 150 (Fig. 60). Ciò era supportato da un valore di bootstrap elevato (99%). L'analisi ha quindi permesso di stabilire con certezza che il ceppo euganeo era sicuramente una specie del genere *Oscillatoria*. L'albero filogenetico inoltre ha evidenziato che il genere *Oscillatoria* è polifiletico. L'alta identità tra la sequenza di *O. princeps* e quella del ceppo da noi isolato (98%) poteva suggerire che i due ceppi fossero morfotipi della stessa specie. Tuttavia, *O. princeps*, pur presentando dimensioni simili e la medesima colorazione nerastra dei filamenti del ceppo euganeo, non aveva comunque costrizioni a livello delle pareti trasversali e non presentava la caliptra (Tab. 1).

	Caliptra	Costrizioni pareti trasversali	Dimensioni	Colore dei tricomi
<i>O. sp. ETS-06</i>	+	+	+	+
<i>O. bonnemaisonii</i>	-	+	-	-
<i>O. margaritifera</i>	+	+	-	-
<i>O. princeps</i>	-	-	+	+

Tab. 1. Caratteristiche morfologiche dei differenti ceppi di *Oscillatoria* utilizzate per l'identificazione del cianobatterio in esame.

I risultati ottenuti dalle indagini morfologiche ed ultrastrutturali accomunavano il ceppo euganeo anche con altre specie del genere *Oscillatoria*. In particolare, sulla

base della più recente chiave tassonomica dei cianobatteri appartenenti all'ordine delle Oscillatoriales (Komárek & Anagnostidis, 2005), *O. bonnemaisonii* Crouan ex Gomont e *O. margaritifera* Kützing ex Gomont erano le due specie che presentavano caratteristiche morfologiche più simili al ceppo da noi isolato nel Comprensorio Euganeo (Tab. 1).

Comunque, *O. margaritifera* e *O. bonnemaisonii* presentano costrizioni a livello delle pareti trasversali, ma vivono in habitat marino-salmastri e i loro tricomi di color verde-oliva sono di dimensioni minori rispetto al ceppo da noi isolato. Mentre, *O. margaritifera*, pur avendo la caliptra, presenta le estremità dei tricomi arcuate (Komárek & Anagnostidis, 2005).

L'approccio polifasico utilizzato in questo studio per identificare il cianobatterio isolato dal Comprensorio termale Euganeo ha quindi permesso di verificare che questo ceppo non era ascrivibile a nessuna delle specie finora descritte.

La consultazione di testi storici riguardanti la biodiversità degli organismi del Comprensorio termale Euganeo ha segnalato la presenza di cianobatteri filamentosi, identificati come specie appartenenti al genere *Conferva* (syn. *Oscillaria*) (Pollini, 1817). Dalle descrizioni di questi organismi risulta che *Conferva duplisecta* è la specie morfologicamente più simile al nostro isolato. Entrambi gli organismi infatti presentano tricomi marrone-nerastri, dimensioni molto simili e cellule dei tricomi con aspetto a "botticella".

Sulla base dei nostri risultati e della più recente tassonomia dei cianobatteri (Guiry, 2006) viene quindi proposta la rinominazione del ceppo isolato dal Comprensorio Euganeo come *Oscillatoria duplisecta*. Le indagini ultrastrutturali e molecolari, ottenute in questo studio, hanno contribuito quindi ad incrementare le precedenti informazioni morfologiche su questo organismo (Pollini 1817) e a definirne la sua collocazione tassonomica.

4.2.3.3 CONCLUSIONI

Il ritrovamento insolito di ciuffi galleggianti di colore nero-brunastro sulla superficie dell'acqua che ricopriva i fanghi di una vasca termale del Comprensorio termale Euganeo, ha portato a condurre uno studio tassonomico dell'organismo responsabile della formazione di tali feltri. Analisi morfologiche, ultrastrutturali e molecolari condotte su questo cianobatterio filamentoso hanno permesso di identificarlo e di collocarlo filogeneticamente come una specie appartenente al genere *Oscillatoria*.

La caratterizzazione di questo cianobatterio ha permesso di stabilire che si trattava di una forma già segnalata dal Pollini (1817) nel Comprensorio Termale Euganeo e da lui identificata come *Conferva duplisecta*.

Sulla base dei risultati ottenuti e considerata la costante evoluzione della tassonomia dei cianobatteri è stata proposta per questo organismo la nuova denominazione di *Oscillatoria duplisecta*.

In questo caso non è possibile definire per ora se si tratti di una specie mesofila o termofila, in quanto non è stata investigata la sua tolleranza alle variazioni di temperatura.

I risultati filogenetici ottenuti per questo microorganismo come per gli altri due cianobatteri oggetto di questa tesi di dottorato sottolineano l'importanza di questo tipo di studi applicati all'ambiente termale Euganeo. Infatti tutte le forme isolate e caratterizzate sono risultate essere forme nuove, endemiche del Comprensorio in studio, mai prima segnalate in altri ambienti.

L'estrema selettività dimostrata rende quindi l'ambiente termale Euganeo particolarmente interessante anche per futuri studi sulla biodiversità dei microrganismi che lo colonizzano.

6. BIBLIOGRAFIA

Abdallah F., Salamini F. & Leister D., 2000. A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplast of *Arabidopsis*. *Trend Plant. Sci.*, 5: 141-142.

Agrawal S.C. & Singh V., 2001. Viability of dried cells, and survivability and reproduction under water stress, low light, heat and UV exposure in *Chlorella vulgaris*. *Isr. J. Plant Sci.*, 49: 27-32.

Albertano P. & Kovacik L., 1994. Is the genus *Leptolyngbya* (Cyanophytes) an homogeneous taxon? *Algol. Stud.*, 75: 37-51.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Wattson J.D., 2003. *Molecular biology of the cells*. Garland Publ. Inc., New York, pp. 1216.

Allen J.F., Mullineaux C.W., Sanders C.E. & Melis A., 1989. State transitions, photosystem stoichiometry adjustment and non-photochemical quenching in cyanobacterial cells acclimated to light absorbed by photosystem I or photosystem II. *Photosynth. Res.*, 22: 157- 166.

Allen J.F., Sanders C.E. & Holmes N.G., 1985. Correlation of membrane protein phosphorylation with excitation energy distribution in the cyanobacterium *Syneccoccus* 6301. *FEBS Lett.*, 193: 271-275.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J., 1990. Basic local alignment search tool.-*J. Mol. Biol.*, 215: 403-410.

Anagnostidis K. & Komàrek J., 1988. Modern approach to the classification system of the *Cyanophytes*. 3-Oscillatoriales. –*Arch. Hydrobiol., Algol. Stud.*, 50: 327-472.

Anderson J.M. & Anderson B., 1988. The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion. *Trends Biochem. Sci.*, 13: 351-355.

Andreoli C. & Rascio N., 1975. The algal flora in the thermal baths of Montegrotto Terme (Padua). Its distribution over one-year period. *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.*, 60: 857-871.

Andrews T.J. & Lorimer G.H., 1987. Rubisco: Structure, mechanisms and prospects for improvement. In: *The Biochemistry of Plants*, Vol. 10, Hatch M.D., & Boardman N.K., eds, pp. 131-218. Academic Press, San Diego.

Arnoult D., Akarid K., Grodet A., Petit P.X., Estaquier J. & Ameisen J.C., 2002. On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death Differ.*, Vol. 9: 65-81.

Balme A., Hervas M., Campos L.A., Sancho J., De la Rosa M. & Navarro A., 2001. A comparative study of the thermal stability of plastocyanin, cytochrome c(6) and photosystem I in thermophilic and mesophilic cyanobacteria. *Photosynth. Res.*, 70: 281-289.

Barber J., 1982. Influences of surfaces charges on thylakoid structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 33: 261-295.

Barber J., 1995. Short-circuiting the z-scheme. *Nature*, 376: 388-389.

Barber J., Nield J., Morris P., Zheleva D. & Hakamer B., 1997. The structure, function and dynamics of photosystem two. *Physiol. Plant.*, 100: 817-827.

Barsanti L. & Gualtieri P., 2006. *Algae. Anatomy, biochemistry and biotechnology.* Taylor & Francis ed. pp. 209-249.

Bassi R. & Dainese P., 1992. A supramolecular antenna complex from photosystem II membranes. *Eur. J. Biochem.*, 204: 317-326.

Bayles K.W., 2003. Are the molecular strategies death contro apoptosis conserved in bacteria? *TRENDS Microbiol.*, 11: 306-311.

Beale S.I., 1999. Enzyme of chlorophyll biosynthesis. *Photosynth. Res.*, 60: 43-73.

Bellezza S., Paradossi G., De Philippis R. & Albertano P., 2003. *Leptolyngbya* strains from Roman Hypogean: cytochemical and physico-chemical characterization of exopolysaccharides. *J. Applied Phycol.*, 15: 193-200.

Bennet A. & Bogorad L., 1973. Complementary chromatic adaptation in filamentous blue-green alga. *J. Cell Biol.*, 58: 419-435.

Ben-Shem A., Frolow F. & Nelson N., 2004. Evolution of photosystem I- from symmetry through pseudosymmetry to asymmetry. *FEBS Lett.*, 564: 274-280.

Berman-Frank I., Bidle K.D., Haramaty L. & Falkowski P.G., 2004. The demise of the marine cyanobacteria, *Trichodesmium* spp., via an autocatalyzed cell deth pathway. *Limnol. Oceanogr.*, 49: 997-1005.

Bertocchi C., Navarini L. & Cesáro A., 1990. Polysaccharides from Cyanobacteria. *Carbohydr. Polym.*, 12:127-153.

Bidle K.D. & Falkowski P.G., 2004. Cell death in planktonic, photosynthetic microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2: 643-655.

Bortner C.D., Oldenburg N.B.E. & Cidlowski A., 1995. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trend Cell Biol.*, 5: 21-26.

Buchanan B.B., Grissem W. & Jones R.L., 2003. Biochimica e biologia molecolare delle piante. Zanichelli ed. pp. 525-560.

Butler P.J.G. & Kühlbrandt W., 1988. Aggregate size of the light-harvesting chlorophyll a/b protein in detergent solution. PNAS USA, 85: 3797-3801.

Campbell D., Hurry V., Clarke A.K., Gustafsson P. & Öquist G., 1998. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62: 667-683.

Caporali E., Spada A., Marziani G., Failla O. & Scienza A., 2003. The arrest of development of abortive reproductive organs in the unisexual flower of *Vitis vinifera* spp. *silvestris*. Sex. Plant Reprod., 15: 291-300.

Carmichael W.W., 1992. Cyanobacteria secondary metabolites. A Review. J. Appl. Bacteriol., 72: 445-459.

Castenholz R.W., 1988. Culturing methods for Cyanobacteria. In: A.N. Glazer and L. Packer (eds), Cyanobacteria. Methods of enzymology, 167: 68-100.

Castenholz R.W., 2001. Phylum BX. *Cyanobacteria*. Oxygenic Photosynthetic Bacteria. In: Boone D.R. and Castenholz R. W. (eds), Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed., 473-599. Springer, New York.

Cavalier-Smith T., 2002. Chloroplast Evolution: Secondary Symbiogenesis and Multiple Losses. Curr. Biol., 12: 62-64.

Chorus I., 2001. Cyanotoxins – Occurrence, causes, consequences. Springer – Verlag Berlin Heidelberg New York, pp. 357.

Chowdhury I., Tharakan B. & Bhat G.K., 2006. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. Cell. Mol. Biol. Lett., 11: 506-525.

Collins J.A., Schandi C.A., Young K.K., Vesely J. & Willingham M.C., 1997. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.*, 45: 923-934.

De Philippis R. & Vicenzini M., 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiol. Rev.*, 22: 151-175.

de Pinto M.C., Tommasi F. & De Gara L., 2002. Changes in the antioxidant system as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco Bright- Yellow 2 cells. *Plant Physiol.*, 130: 698-708.

Dunn S.D., 1986. Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of protein in gels on the recognition of proteins in western blotting with monoclonal antibodies. *Annu. Biochem.*, 157: 144-153.

Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A. & Nagata S., 1998. A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391: 43-50.

Eriksen N.T. & Lewitus A.J., 1999. Cyanide resistant respiration in diverse marine phytoplankton. Evidence for the widespread occurrence of the alternative oxidase. *Aquat. Microb. Ecol.*, 17: 145-152.

Feller G., Arpigny J.L., Narinx E. & Gerday C., 1997. Molecular adaptations of enzymes from psychrophilic organism. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 118: 495-499.

Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.

Fields P.A., 2001. Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comp. Biochem. Physiol.*, 129: 417-431.

Finnegan P.M., Whelan J., Millar A.H., Zhang Q., Smith M.K., Wiskich J.T. & Day D.A., 1997. Differential expression of the multigene family encoding the Soybean mitochondrial alternative oxidase. *Plant Physiol.*, 114: 455-466.

Flores E. & Herrero A., 1994. Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. In: Bryant, D.A. (ed), *The molecular biology of cyanobacteria*, pp. 487-517, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Fontana A., 1991. Analysis and modulation of protein stability. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2: 551-560.

Friedl T., 1995. Inferring taxonomic position and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae: a phylogenetic analysis of 18S ribosomal RNA sequences from *Dictyochloropsis reticulata* and from members of the genus *Myrmecia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae Cl. Nov.). *J. Phycol.*, 31: 632-639.

Friedl T., 1997. The evolution of the Green Algae. *Plant System. Evol.*, 11: 87-101.

Fry S.C., 1988. *The Growing Plant Cell Wall: Chemical and Metabolic Analysis.* Longman Scientific and Technical, Harlow.

Fuhs G.E., 1973. Cytochemical examination. In *The Biology of Blue-green Algae*, ed. Carr N.G & Whitton B.A., pp. 117-143. Blackwell, Oxford.

Fujita Y. & Murakami A., 1987. Regulation of electron transport composition in cyanobacterial photosynthetic system: stoichiometry among photosystem I and II complexes and their light-harvesting antennae and Cythochrome b₆/f complex. *Plant Cell Physiol.*, 28: 1547-1553.

Galzigna L. & Bellometti S., 1999. La maturation de la boue termale et sa mesure. Première partie. Presse termale et climatique, 1: 23-26.

Galzigna L., Moretto C. & Lalli A., 1996. Physical and biochemical changes of thermal mud after maturation. Biomed & Pharmother, 50: 306-308. Elsevier, Paris.

Gantt E., 1994. Supramolecular membrane organization. In: The Molecular Biology of Cyanobacteria (Bryant D. A.,ed.), Kluwer Academy Publishers, London, pp. 119-138.

Gantt E., Lipschultz C.A. & Zilinskas B., 1976. Further evidence for a phycobilisome model from selective dissociation, fluorescence emission, immunoprecipitation, and electron microscopy. Biochim. Biophys. Acta, 430: 375-388.

Genty B., Briantais J.M. & Baker N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochim. Biophys. Acta, 990: 87-92.

Gerola F.M., 1995. Biologia e diversità dei vegetali. UTET, Torino, pp 826.

Gianese G., Bossa F. & Pascarella S., 2002. Comparative structural analysis of psychrophilic and meso and thermophilic enzyme. Proteins: Structure, Function and Genetics. 47:236-249.

Gleason F.K. & Baxa C.A., 1986. Activity of the natural algicide, cyanobacterin, on eukaryotic microorganisms. FEMS Microbiol. Lett., 33: 85-88.

Golden S.S., Ishiura M., Hirschie Jonson C. & Kondo T., 1997. Cyanobacterial circadian rhythms. Annu. Rev. Plant Phys., 48: 327-354.

-
- Gombos Z., Wada H., Hideg E. & Murata N., 1994.** The Unsaturation of Membrane Lipids Stabilizes Photosynthesis against Heat Stress. *Plant Physiol.*, 104: 563-567.
- Gounaris K., Chapman D.J. & Barber J., 1988.** The interaction between the 33kDa manganese stabilizing protein and D1/D2-cytochrome b559 complex. *FEBS Lett.*, 34: 374-378.
- Graham L.D. & Wilcox L.W., 2000.** *Algae*. Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J.
- Gray J., 2004.** Paradigms of the evolution of programmed cell death. In: Gray J. (ed) *Programmed Cell Death in Plants*. CRC Press, Boca Raton, pp. 1-25.
- Gross E.M., Wolk C.P. & Jüttner F., 1991.** Fischerellin, a new allelochemical from freshwater cyanobacterium *Fischerella muscicola*. *J. Phycol.* 27: 686-692.
- Guiry M.D., 2006.** AlgaeBase version 4.1. Worldwide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>.
- Gunawardena A.H., Pearce D.M., Jackson M.B., Hawes C.R. & Evans D.E., 2001.** Characterisation of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). *Planta*, 212: 205-214.
- Gunawardena A.H.L.A.N., Sault K., Donnelly P., Greenwood J.S. & Dengler N.G., 2005.** Programmed cell death and leaf morphogenesis in *Monstera obliqua* (Araceae). *Planta*, 221: 607-618.
- Hagmann L. & Jüttner F., 1996.** Fischerellin A, a novel Photosystem II-inhibiting allelochemical of the cyanobacterium *Fischerella muscicola* with antifungal and herbicidal activity. *Tetrahedron Lett.*, 37: 6539-6542.

Hanelt D., Wiencke C. & Bischof K., 2003. Marine macroalgae. In: "Photosynthesis in Algae (Larkum A.W.D., Douglas S.E. & Raven J.A. eds.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 413-435.

Havaux M., 1998. Carotenoids as membrane stabilizer in chloroplasts. *Trends Plant Sci.*, 3: 147-151.

Heath M.C., 2000. Hypersensitive response-related cell death. *Plant Mol. Biol.*, 44: 321-334.

Hirano M., Satoh K. & Katoh S., 1980. Plastoquinone as a common link between photosynthesis and respiration in a blue-green alga. *Photosynth. Res.* 1: 149-162.

Hirschberg J. & Clamovic D., 1994. Carotenoids in cyanobacteria. In: Brayant D. (ed), *Advances in photosynthesis: The molecular biology of cyanobacteria.* Kluwer Academic Publishers, 1: 559-579.

Hirschberg J., 2001. Carotenoids biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4: 210-218.

Hoefnagel M.H.N., Millar A.H., Wiskich J.T. & Day D.A., 1995. Cytochrome and alternative respiratory pathways compete for electrons in the presence of pyruvate in soybean mitochondria. *Arc. Biochem. Biophys.*, 318: 394-400.

Hoham R.W., Bonome T.A, Martin C.W. & Leebens-Mack J.H., 2002. A combined 18S rDNA and *rbcL* phylogenetic analysis of *Chloromonas* and *Chlamydomonas* (Chlorophyceae, Volvocales) emphasizing snow and other cold-temperature habitats. *J. Phycol.*, 38: 1051-1064.

Hoiczky E. & Hansel A., 2000. Cyanobacterial Cell Walls: News from an Unusual Prokaryotic Envelope. Minireview. *J. Bacteriol.*, Vol. 182, No. 5 pp. 1191-1199.

Horvath I., Glatz A., Varvasovszki V., Török Z., Páli T., Balogh G., Kovács E., Nádasdi L., Benkő S., Joó F. & Vígh L., 1998. Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of *hsp17* as a “fluidity gene.” PNAS, 95: 3513–3518.

Huner N.P.A., Gunnar Ö. & Sarhan F., 1998. Energy balance and acclimation to light and cold. Trends Plant Sci., 3: 224-230.

Huss V.A.R., Ciniglia C., Cennamo P., Cozzolino S., Pinto G. & Pollio A., 2002. Phylogenetic relationships and taxonomic position of *Clorella*-like isolates from low pH environments (pH< 3.0). BMC Evol. Biol., 2:1-9.

Huss V.A.R., Frank C., Hartmann E.C., Hirmer M., Kloboucek A., Seidel B.M., Wenzeler P. & Kessler E., 1999. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). J. Phycol., 35: 587-598.

Ikeda T. & Takeda H., 1995. Species-specific differences of pyrenoids in *Chlorella* (Chlorophyta). J. Phycol., 31 : 813-818.

Inoue N., Emi T., Yamane Y., Kashino Y., Koike H. & Satoh K., 2000. Effects of high-temperature treatments on a thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus vulcanus*. Plant Cell Physiol., 41: 515-522.

Ishii R., Yamagishi T.Y. & Murata Y., 1997. On a method for measuring photosynthesis and respiration of leaves slices with an oxygen electrode. Jap. J. Crop. Sci., 46: 53-57.

Ito Y., Saisho D., Nakazone M., Tsutsumi N. & Hirai A., 1997. Transcript levels of tandem-arranged alternative oxidase genes in rice are increased by low temperature. Gene, 203: 121-129.

-
- Jansson S., 1994.** The light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1184: 1-19.
- Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C. & Wright S.W., 1997.** Data for identification of 47 Key phytoplankton pigments. In: *Phytoplankton Pigments in Oceanography*. UNESCO Publishing (Eds), Paris, pp. 449-553.
- Karsten U. & Garcia-Pichel F., 1996.** Carotenoids and mycosporine-like aminoacid compounds in members of the genus *Microcoleus* (Cyanobacteria): a chemosystematic study. *Syst. App. Microbiol.*, 19: 285-294.
- Kawecka B., 1986.** Ecology of snow algae. *Polish Polar Research*, 7: 407-415.
- Kirk J.T.O. & Tilney-Bassett R.A.E., 1978.** Mutations affecting the carotenoids of the chromoplast. In: "The Plastids". Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance. Freeman and Co. Ltd., p 860.
- Komàrek I., Cepàk V., Kaštovský J. & Sulek J., 2004.** What are the cyanobacterial general *Cyanothece* and *Cyanobacterium*? Contribution to the combined molecular and phenotype taxonomic evaluation of cyanobacterial diversity. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 153 (Algol. Stud. 113): 1-36.
- Komàrek J. & Anagnostidis K., 1989.** Modern approach to the classification system of *Cyanophytes*. 4-Nostocales. *Arch. Hydrobiol., Algol. Stud.*, 56: 247-345.
- Komàrek J. & Anagnostidis K., 1999.** Cyanoprokaryota 1. Chroococcales. In Ettl H., Gärtner G., Heynig H. & Mollenhauer D. (eds), *Süßwassersflora von Mitteleuropa*. Fischer, Stuttgart-Jena.
- Komàrek J. & Anagnostidis K., 2005.** Cyanoprokaryota 2. Oscillatoriales. In B. Büdel, G. Gärtner, L. Krienitz & M. Schagerl eds. *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Elsevier GmbH, München, pp.1-759.

Komàrek J., Kopecky J. & Cepák V., 1999. Generic characters of the simplest cyanoprokaryotes Cyanobium, Cyanobacterium and Synechococcus. *Cryptogamie Algol.*, 20: 209-222.

Kumar S., Tamura K. & Nei M., 2004. MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.*, 5: 150-163.

Kuriyama H. & Fukuda H., 2002. Developmental programmed cell death in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5: 568-573.

Ladenstein R. & Antranikian G., 1998. Proteins from hyperthermophiles: stability and enzymatic catalysis close to the boiling point of water. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 61: 37-85.

Laemli U., 1970. Cleavage of the structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 3865-3868.

Lalli A., Andreoli C., Ceschi Berrini C., De Appolonia F. & Marcolongo G., 2004. Anti-inflammatory active principles in Euganean thermal mud. n° brevetto: 05100038.8.

Lam E., 2004. Controlled cell death, plant survival and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, 5: 305-314.

Larkum A.W.D., 2003. Light-Harvesting Systems in Algae. In: "Photosynthesis in Algae (Larkum A.W.D., Douglas S.E. and Raven J.A. eds.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 277-304.

Laties G.G., 1982. The cyanide-resistant, alternative path in higher plant respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 33: 519-555.

Lee D.Y. & Rhee P.M.M., 1997. Structures in a blue-green alga resembling prolamellar bodies. *Protoplasma*, 64: 67-74.

Lewis L.A. & McCourt R.M., 2004. Green Algae and the origin of the Land Plants. *Amer. J. Bot.* , 91 (10): 1535-1556.

Li W.F., Zhou X.X. & Lu P., 2005. Structural features of thermozymes. *Biotechnol. Adv.*, 23: 271-281.

Liang H. & Fesik S.W., 1997. Three-dimensional structures of proteins involved in programmed cell death. *J. Mol. Biol.* 274(3):291–302.

Liberton M., Berg R.H., Henser J., Roth R. & Pakrasi H.B., 2006. Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Protoplasma*, 227: 129-138.

Lin Y., Manabu H., Kashino Y, Koike H., Tuzi S. & Satoh K, 2004. Tolerance to freezing stress in cyanobacteria, *Nostoc commune* and some cyanobacteria with various tolerances to drying stress. *Polar Biosci.*, 17: 56-68.

MacColl R., 1998. Cyanobacterial phycobilisomes. *J. Struct. Biol.* 124: 311-334.

Manodori A. & Melis A., 1986. Cyanobacterial acclimation to photosystem I or photosystem II light. *Plant Physiol.* 82: 185-189.

Marder J.B. & Barber J., 1989. The molecular anatomy and function of thylakoids proteins. *Plants Cell Environ.*, 12: 595-614.

Marks N. & Berg M.J., 1999. Recent advances on neuronal caspases in development and neurodegeneration. *Neurochem. Int.* 35, 195-220.

Martins L.O., Huber R., Huber H., Stetter K.O., Da Costa M.S. & Santos H., 1997. Organic solutes in iperthermophilic Archea. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 896- 902.

Maslova I.P., Mouradyan E.A., Lapina S.S., Klyachko-Gurvich G.L. & Los D.A., 2004. Lipid Fatty Acid Composition and Thermophilicity of Cyanobacteria. *Plant Physiol.*, Vol. 51, No. 3, pp. 353-360.

Mattox K. & Stewart K.D., 1984. Classification of the green algae: A concept based on comparative cytology. In “Systematics of the Green Algae”. (Irvine D.M.Eds.), London-Orlando, Academic Press, pp. 29-72.

Maxwell K. & Johson G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.*, 51: 659-668.

McCabe T.C., Finnegan P.M., Millar A.H., Day D.A. & Whelan J., 1998. Differential expression of alternative oxidase genes in soybean cotyledons during postgerminative development. *Plant Physiol.*, 118: 675-682.

Meeuse B.J.D., 1962. Storage products. In *Physiology and Biochemistry of Algae*, ed. Lewin R.A., pp.289-313. Academic Press, New York.

Melkonian M., 1989. Phylum Chlorophyta: introduction to the Chlorophyta. In “Handbook of Protoctista” (Margulis L., Corliss J. O., Melkonian M. and Chapman eds.), Jones and Barlett, Boston, 597-599.

Millar A.H., Hoefnagel M.H.N., Day D.A. & Wiskich J.T., 1996. Specificity of the organic acid activation of alternative oxidase in plant mitochondria. *Plant Physiol.* 111: 613-618.

Millar A.H., Wiskich J.T., Whelan J. & Day D.A., 1993. Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett.*, 329: 259-262.

Millenaar F.F., Gonzales-Meler M.A., Siedow J.N., Wagner A.M. & Lambers H., 2002. Role of sugars and organic acids in regulating the concentration and activity of the alternative oxidase in *Poa annua* roots. *J. Exp. Bot.*, 53: 1081-1088.

Miller S.R. & Castenholz R.W., 2000. Evolution of thermotolerance in hot spring Cyanobacteria of the genus *Synechococcus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 4222-4229.

Mimuro M., Ookubo T., Takahashi D., Sakawa T., Akimoto S., Yamazaki I. & Miyashita H., 2002. Unique fluorescence properties of a cyanobacterium *Gloeobacter vilaceus* PCC 7421: reasons for absence of the long-wavelength PSI Chl *a* fluorescent at -196°C. *Plant Cell Physiol.*, 43: 587-594.

Moharikar S., D'Souza J.S., Kulkarni A.B. & Rao B.J., 2006. Apoptotic-like cell death pathway is induced in unicellular Chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) cells following UV radiation: detection and functional analyses. *J. Phycol.*, 42: 423-433.

Møller I.M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 561-591.

Møller I.M., Rasmusson A.G. & Fredlung K.M., 1993. NAD(P)H ubiquinone oxidoreductases in plant mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 25: 377-384.

Moore A.L. & Siedow J.N., 1991. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 1059: 121-140.

Moran R. & Porath D., 1980. Chlorophyll determination in intact tissue using N,N'-dimethylformamide. *Plant Physiol.*, 77: 483-485.

Moran R., 1982. Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N,N'-dimethylformamide. *Plant Physiol.*, 69: 1376-1381.

Moro I., Rascio N., La Rocca N., Di Bella M. & Andreoli C., 2007. *Cyanobacterium aponinum*, a new Cyanoprokaryote from the microbial mat of Euganean thermal springs (Padua, Italy). *Algol. Stud.* 123: 1-15.

Mullet J.E., Burke J.J. & Arntzen C.J., 1980. Chlorophyll proteins of photosystem I. *Plant Physiol.*, 65: 814-822.

Mullineaux C.W. & Allen J.F., 1986. The state transition in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 can be driven by respiratory electron flow into the plastoquinone pool. *FEBS*, 205: 155-160.

Mynderse J.S., Moore R.E., Kashiwagi M. & Morton T.R., 1977. Antileukemic activity in the Oscillatoriaceae: isolation of debromoaplisiatxin from *Lyngbya*. *Science*, 196: 538-540.

Nicholls D.G. & Ferguson S.J., 1992. *Bioenergetics 2*. London Academic Press.

Ning S. B., Guo H. L., Wang L. & Song Y. C., 2002. Salt stress induces programmed cell death in prokaryotic organism *Anabaena*. *J. Appl. Microbiol.*, 93: 15-28.

Nishiyama Y., Los D.A. & Murata N., 1999. PsbU, a protein associated with photosystem II is required for acquisition of cellular thermotolerance in *Synechococcus* species PCC 7002. *Plant Physiol.*, 120: 301-308.

Niyogi K.K., 1999. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50: 333-359.

Norušis. M.J., 1993. *SPSS for Windows advanced statistics*. Chicago: SPSS Inc.

Nozaki H., 2005. A new scenario of plastid evolution: plastid primary endosymbiosis before the divergence of “Plantae”, emended. *J. Plant Res.*, 118(4): 247-255.

Olson J.M. & Blankenship R.E., 2004. Thinking about the evolution of photosynthesis. *Photosynth Res.*, 80(1-3): 373-386.

Piccoli G., Bellati R., Binotti C., Di Lallo E., Sedea R., Dal Prà A., Cataldi R., Gatto G.O., Ghezzi G., Marchetti M., Bulgarelli G., Schiesaro G., Panichi C., Tongiorgi E., Baldi P., Ferrara G.C., Massari F., Medizza F., Iliceto V., Norinelli A., De Vecchi G.P., Gregnanin A., Piccirillo E.M. & Sbettega G., 1976. Il sistema idrotermale euganeo-berico e la geologia dei Colli Euganei. *Memorie degli Istituti di Geologia e Mineralogia dell'Università di Padova*, 30: 1-266.

Piccoli G., Sedea R., Bellati R. & Di Lallo E., 1975. Note illustrative della carta geologica dei Colli Euganei alla scala 1:25000. 38 pp., 1 carta geol. 1:25.000, Società Cooperativa Tipografica, Padova. *PROTO DECIMA F.*, 1966 - Note stratigrafiche sul sottosuolo di Abano Terme.

Pollini C., 1817. Sulle alghe viventi nelle terme euganee, con un indice delle piante rinvenute sui colli Euganei. *Biblioteca Italiana (Milano)*, 7: 414-486.

Porra R.J., Thompson W.A. & Kriedermann P.E., 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equation for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with different solvents: verification of the concentration of chlorophylls standard by absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 975: 348-394.

Pupillo P., Cervone F., Cresti M. & Rascio N., 2003. *Biologia Vegetale*. Zanichelli, Bologna. pp. 20-22.

Purvis A.C. & Shewfelt R.L., 1993. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? *Physiol. Plant.*, 88: 712-718.

Raison J.K., 1980. Effect of low temperature on respiration. In DD Davies, ed, *The Biochemistry of Plants, Vol 2: Metabolism and respiration.* Academic Press, New York, pp. 613-626.

Raven P.H., Evert R.F. & Eichorn S.E., 2002. *Biologia delle piante.* Sesta edizione. Zanichelli.

Ribas-Carbo M., Berry J.A., Yakir D., Giles L., Robinson S.A., Lennon A.M. & Siedow J.N., 1995. Electron Partitioning between the Cytochrome and Alternative Pathways in Plant Mitochondria. *Plant Physiol.*, 109: 829-837.

Riedl S.J. & Shi Y., 2004. Molecular mechanism of caspase regulation during apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, 5: 897-906.

Rippka R. & Cohen-Bazire G., 1983. The cyanobacteriales: a legitimate order based on the type strain *Cyanobacterium stanieri*? *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 134B: 21-36.

Rippka R., Castenholz R.W. & Herdam M., 2001. Form-genus III. *Cyanobacterium* Rippka and Cohen-Bazire 1983. In: Boone D. R., Castenholz R. W. (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edn. Vol. 1, Springer-Verlag, New York, pp. 497-498.

Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M. & Stanier R.Y., 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 111: 1-61.

Rothschild L.J. & Mancinelli R., 2001. Life in extreme environments. *Nature.* Vol. 409: 1092-1101.

Round F.E., 1984. The systematics of the Chlorophyta: An Historical Review. Leading to Some Modern Concepts (Taxonomy of the Chlorophyta III). In: "Systematics of the Green Algae". (Irvine D.M.Eds.), London-Orlando, Academic Press, 1-27.

Saitou N. & Nei M., 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425.

Sakajo S., Minagawa N. & Yoshimoto A., 1993. Characterization of the alternative oxidase protein in the yeast *Hansenula anomala*. *FEBS Lett.*, 318: 310-312.

Sakamoto T. & Bryant D.A., 1997. Temperature-regulated mRNA accumulation and stabilization for fatty acid desaturase genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Mol. Microbiol.*, 23 (6), pp.1281-1292.

Samsonoff W.A. & MacColl R., 2001. Biliproteins and phycobilisomes from cyanobacteria and red algae at the extremes of habitat. *Arch. Microbiol.*, 176: 400-405.

Samuilov V.D., Oleskin A.V. & Lagunova E.M., 2000. Programmed cell death. *Biochem.*, 65: 873-887.

Sanmartin M., Jaroszewski L., Raikhel N.V. & Rojo E., 2005. Caspase. Regulating Death Since the Origin of Life. *Plant Physiol.*, 137: 841-847.

Satoh K. & Butler W.L., 1978. Low temperature spectral characteristics of subchloroplast fractions purified from spinach. *Plant Physiol.*, 61: 373-379.

Satoh K. & Fork D.C., 1983. Changes in the distribution of light energy between the two photosystems in spinach leaves. *Photosynth. Res.*, 4: 71-79.

Scandurra R., Consalvi V., Chiaraluce R., Politi L. & Engel P.C., 1998. Protein thermostability in extremophiles. *Biochimie*, 80: 933-941.

Scherer S., Almon H. & Böger P., 1987. Interaction of photosynthesis, respiration and nitrogen fixation in cyanobacteria. *Photosynt. Res.*, 15: 95-114.

Schlösser U.G., 1994. SAG-Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingerl. Catalogue of strains 1994. *Bot. Acta*, 107: 113-186.

Schopf J.W., 2000. The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial Lineage. In: Whitton B. A. and Potts M. (ed.), *The ecology of Cyanobacteria*, pp.13–35. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Schwartz L.M., Smith S.W., Jones M.E. & Osborne B.A., 1993. Do all programmed cell deaths occurs via apoptosis? *PNAS*, 90: 980-984.

Scott W.E., 1991. Occurrence and significance of toxic cyanobacteria in southern Africa. *Water Sci. Technol.*, 23: 175-180.

Segovia M., Haramaty L., Berges J.A. & Falkowski P.G., 2003. Cell death in the unicellular chlorophyte *Dunaliella tertiolecta*. A hypothesis on the evolution of apoptosis in higher plants and metazoans. *Plant Physiol.*, 132: 99-105.

Sherman D.M., Troyan T.A. & Scherman L.A., 1994. Localization of Membrane Proteins in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Plant Physiol.* 106 (1): 251-262.

Shyam R., Raghavendra A.S. & Sane P.V., 1993. Role of dark respiration in photoinhibition of photosynthesis and in reactivation in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Physiol. Plant.*, 88: 446-452.

Sidler W., 1994. Phycobilisomes and phycobiliprotein structures. In Bryant DA (ed) *The molecular biology of Cyanobacteria*, Kluwer, Dordrecht, pp.139-216.

Siedow J.N. & Umbach A.L., 2000. The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochim. Biophys. Acta* 1459: 432-439.

Stall L.J., 1995. Physiological ecology of cyanobacteria in mats and other communities. *New Phytol.*, 131: 1-32.

Stall L.J., Albertano P., Bergman B., von Brockel K., Gallone J.R., Hayes P.K., Sivonen K. & Walsby A.E., 2003. BASIC: Baltic Sea Cyanobacteria. An investigation of the structure and dynamics of water blooms of Cyanobacteria in the Baltic Sea-response to a changing environment. *Cont. Shelf Res.*, 23: 1695-1714.

Stenmark P. & Nordlund P., 2003. A prokaryotic alternative oxidase present in the bacterium *Novosphingobium aromaticivorans*. *FEBS Lett.*, 552: 189-192.

Suda S., Watanabe M.M., Otsuka S., Maharkant W., Yongmanitchai W., Nopartneraporn N., Liu Y. & Day J.G., 2002. Taxonomy revision of water-bloom-forming species of oscillatoroid cyanobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 52: 1577-1595.

Taiz & Zeiger, 1998. Plant physiology second edition. Sinauer Associated, Inc., Publisher. p. 185.

Tamagnini P., Axelsson R., Lindberg P., Oxelfelt F., Wünschiers R. & Lindblad P., 2002. Hydrogenases and Hydrogen Metabolism of Cyanobacteria. *Microb. Mol. Biol. Rev.*, Vol. 66, No. 1 p. 1-20.

Tandeau de Marsac N. & Cohen-Bazire G., 1977. Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 1635-1639.

Tandeau de Marsac N., 1994. Differentiation of hormogonia and relationships with other biological process. In: Bryant D.A. (ed), *The molecular biology of Cyanobacteria*, pp. 825-842. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Thomas H., Ougham H.J., Wagstaff C. & Stead A.D., 2003. Defining senescence and death. *J. Exp. Bot.*, 54:1127-1132.

Thornber J.P., Morishige D.T., Anaudau S. & Peter G.F., 1991. Chlorophyll carotenoid proteins of higher plant thylakoids In: *Chlorophylls* (Scheer H., ed.), CRC Press, Ann. Arbour, pp. 549-585.

Tolomio C., Ceschi Berrini C., De Appollonia F., Galzigna L., Masiero L., Moro I. & Moschin E., 2002. Diatoms in the thermal mud of Abano Terme, Italy (Maturation period). *Arch. Hydrobiol./Suppl. Algal. Stud.*, 105: 11-27.

Tolomio C., De Appollonia F., Moro I. & Ceschi Berrini C., 2004. Thermophilic microalgae growth on different substrates and at different temperatures in experimental tanks in Abano Terme (Italy). *Arch. Hydrobiol./Suppl. Algal. Stud.*, 111: 145-157.

Trumpower B.L. & Gennis R.B., 1994. Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: The enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton traslocation. *Annu. Rev. Biochem.*, 63: 675-716).

Umbach A.L. & Siedow J.N., 1993. Covalent and non-covalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. *Plant Physiol.* 103: 845-854.

Umbach A.L., Vicki S.N. & Siedow J.N., 2004. Regulation of plant alternative oxidase activity: A tale of two cysteines. *Biochim. Biophys. Acta*, 1757(2):135-42.

Umbach A.L., Wiskich J.T. & Siedow J.N., 1994. Regulation of alternative oxidase kinetics by piruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria. *FEBS Lett.*, 348: 181-184.

Vacca A., de Pinto M.C., Valenti D., Passarella S., Marra E. & De Gara L., 2004. Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco bright-yellow 2 cells. *Plant Physiol.*, 134: 1100-1112.

Van den Hoek C., Mann D.G. & Jahns H.M., 1995. *Algae. An introduction to phycology.* Cambridge University Press, Cambridge.

Vanlerberghe G.C. & McIntosh L., 1997. Alternative oxidase: from gene to function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 703-734.

Vanlerberghe G.C. & Ordog S.H., 2002. Alternative oxidase: integrating carbon metabolism and electron transport in plant respiration. In: Foyer, C.H., Noctor, G. (Eds.), *Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon and Respiratory Metabolism.* Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 173-191.

Vanlerberghe G.C., Rbson C.A. & Yip J.Y.H., 2002. Induction of mitochondrial alternative oxidase in response to a cell signal pathway down-regulation the cytochrome pathway prevets programmed cell death. *Plant Physiol.*, 129:b 1829-1842.

Vianello A., Zancani M., Peresson C., Petrusa E., Casolo V., Krajňàková J., Patui S., Braidot E. & Macri F., 2007. Plant mitochondrial pathway leading to programmed cell death. *Physiol. Plantarum*, 129: 242-252.

Vieielle C. & Zeikus J.G., 2001. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65: 1-43.

Vieille C., Burdette D.S. & Zeikus J.G., 1996. Thermozyms. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 2: 1-83.

Wada H., Gombos Z. & Murata N., 1994. Contribution of membrane lipids to the ability of the photosynthetic machinery to tolerate temperature stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 4273-4277. *Plant Biology*.

Walker D., 1997. The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. The University of Sheffield Press.

Weis E., 1984. Short term acclimation of spinach to high temperatures. *Plant Physiol.*, 74: 402-407.

Wellburn A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Plant Physiol.*, 144: 307-313.

Whitmarsh J. & Govindjee J.A., 1995. The photosynthetic process *Encyclopedia of Applied Physics*, 13: 513-532.

Whittaker R.H. & Margulis L., 1978. Protist classification on the kingdoms of organism. *BioSystems*, 10: 3-18.

Whitton B.A. & Potts M., 2000. Introduction to the cyanobacteria. In: Whitton B.A. & Potts M. (eds), *The Ecology of Cyanobacteria*, pp. 1-10. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Wilson K. & Walker J., 2004. Principles and Techniques of Practical Biochemistry. Cambridge University Press, 423.

Woese C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 232-245.

Wolk C.P., Ernest A. & Elhai J., 1994. Heterocyst metabolism and development. In: Bryant D.A. (ed), *The molecular biology of cyanobacteria*, pp. 769-823. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Woltering E.J., van der Bent A. & Hoerberichts F.A., 2002. Do plant caspases exist? *Plant Physiol.*, 130: 1764-1769.

Xu W., Tang H., Wang Y. & Chitnis P.R., 2001. Proteins of the cyanobacterial photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* 1507: 32-40.

Young A.J., Orset S. & Tsavolas A. J., 1997. Carotenoids in higher plant photosynthesis. In: *Handbook of Photosynthesis*. (Pessaraki Ed.), Martin Dekker, Inc, New York, pp. 575-596.

Zhong Q., Gao W., Du F. & Wang X., 2005. Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* 121: 1085–1095.

Zuppini A., Andreoli C. & Baldan B., 2007. Heat stress: an inducer of programmed cell death in “*Chlorella*” *saccharophila*. *Plant Cell Physiol.* 48 (7): 1000-1009.

SITI INTERNET CONSULTATI:

www.puc.cl/sw_educ/biologia/bio100/imagenes/6

<http://amscampus.cib.unibo.it/archive/00002378/01/6>

http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/photosynthesis_1/graphics/memb.gif

[http://xoomer.alice.it/cyrano2510/catena%20respiratoria\(new\)](http://xoomer.alice.it/cyrano2510/catena%20respiratoria(new))

http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/en/undergraduate/img/research_07

www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/microbes/thermo.htm

www.bmr.genomics.it

www.ncbi.nlm.nih.gov/

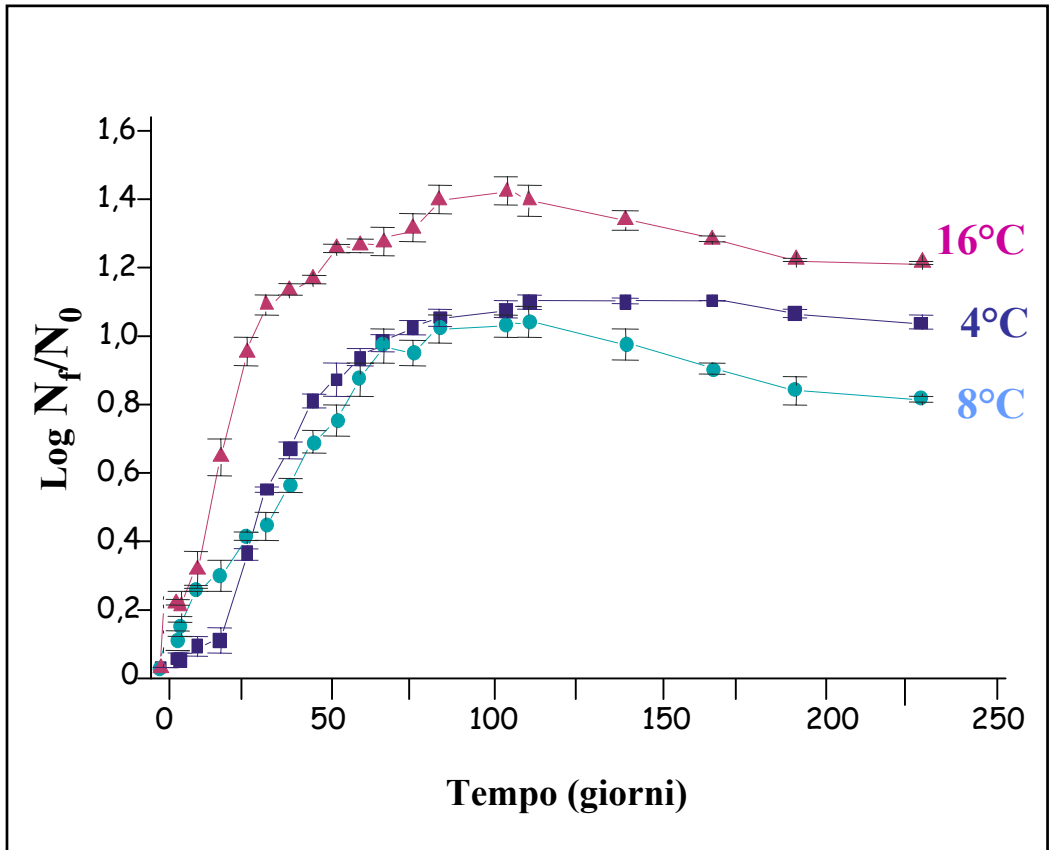


Fig. 1. Curve di crescita di "*Chlorella*" *saccharophila* a diverse temperature.

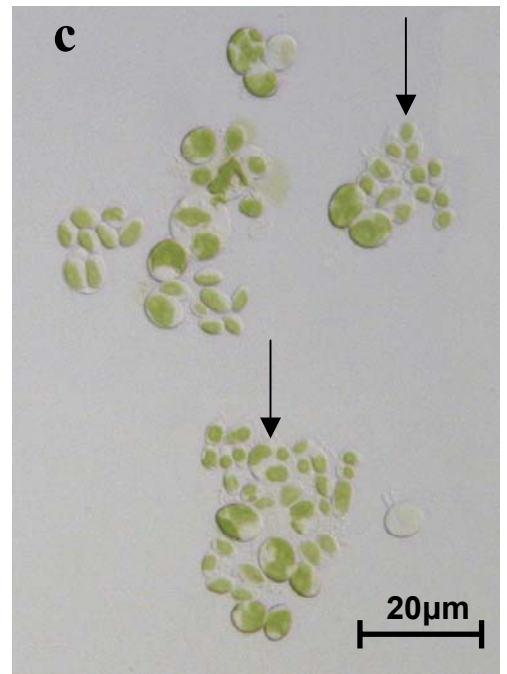
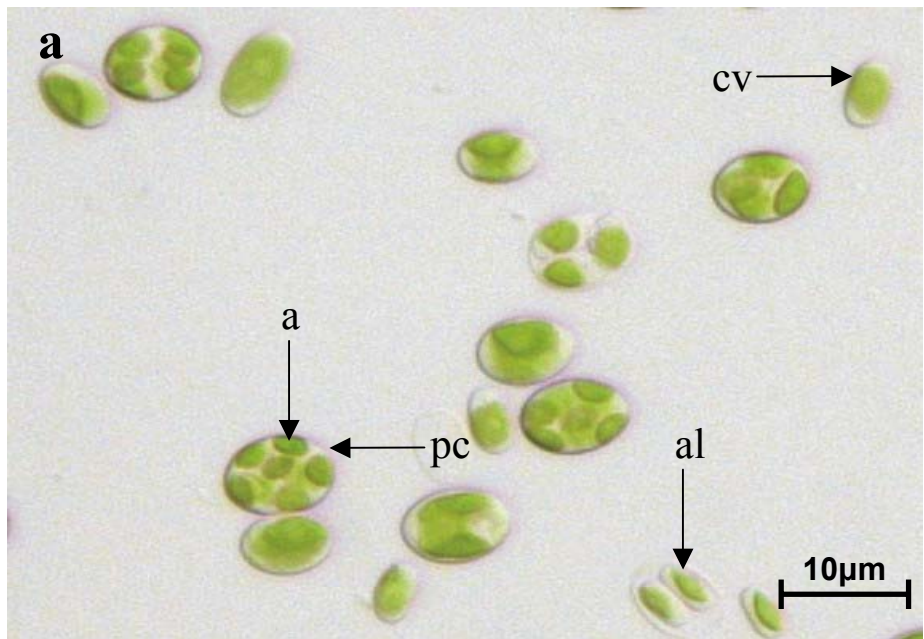


Fig. 2. Micrografie al microscopio ottico di colture di “*Chlorella*” *saccharophila* cresciute a diverse temperature.

a. Cellule cresciute a 4°C. Si riconoscono gruppi di autospore (a) delimitate dalla parete (pc) della cellula madre, le autospore libere (al) e le cellule vegetative singole (cv).

b,c. Cellule cresciute a 16°C. Le figure 2b e 2c rappresentano due successive micrografie dello stesso campo. In figura 2c si possono notare le autospore (frecche) liberate dagli autosporangi che le contenevano nella figura 2b (frecche).

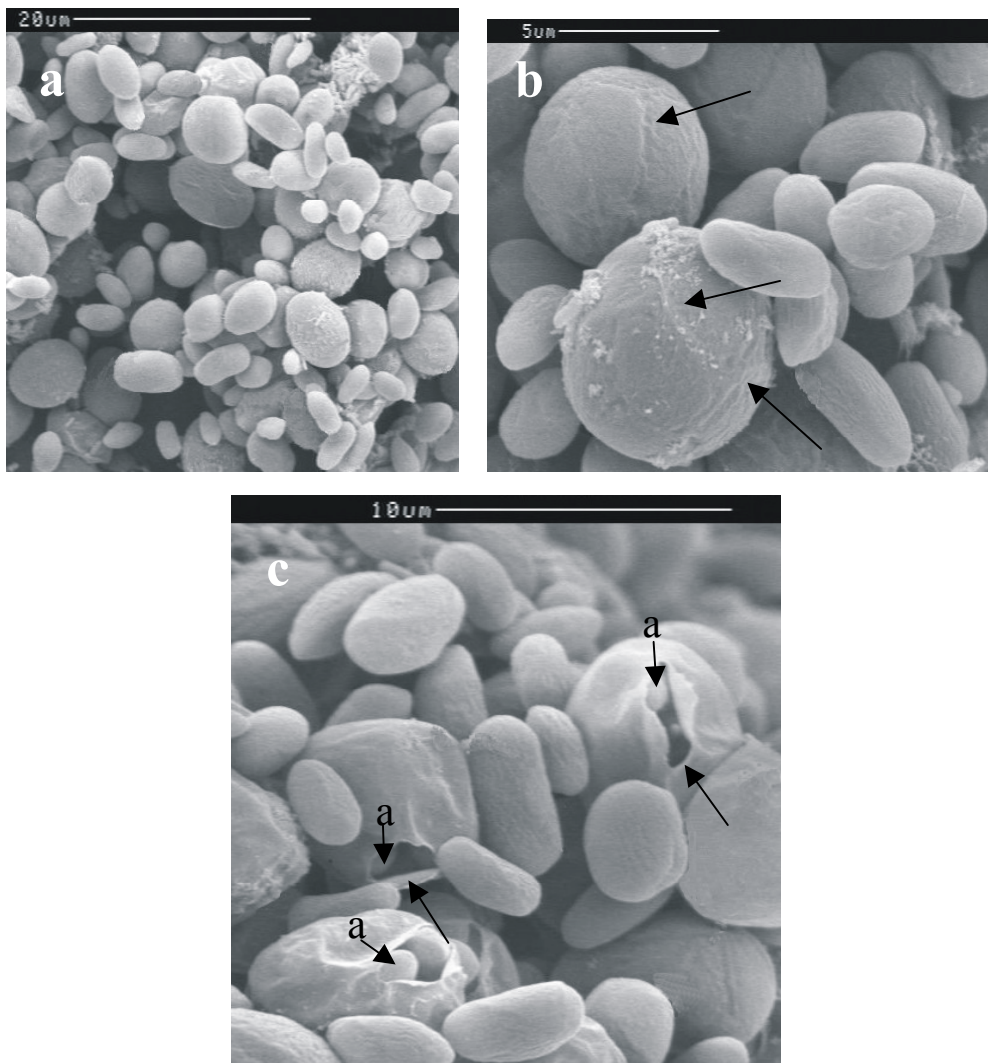


Fig. 3. Micrografie al microscopio elettronico a scansione di colture di "*Chlorella*" *saccharophila* cresciute a 4°C.

a. Si possono distinguere forme cellulari di diverse dimensioni.

b. Negli autosporangi si riconoscono i settori parietali (frecche) che delimitano le singole autospore.

c. In seguito alla rottura della parete degli autosporangi (frecche) si ha la liberazione delle autospore (a).

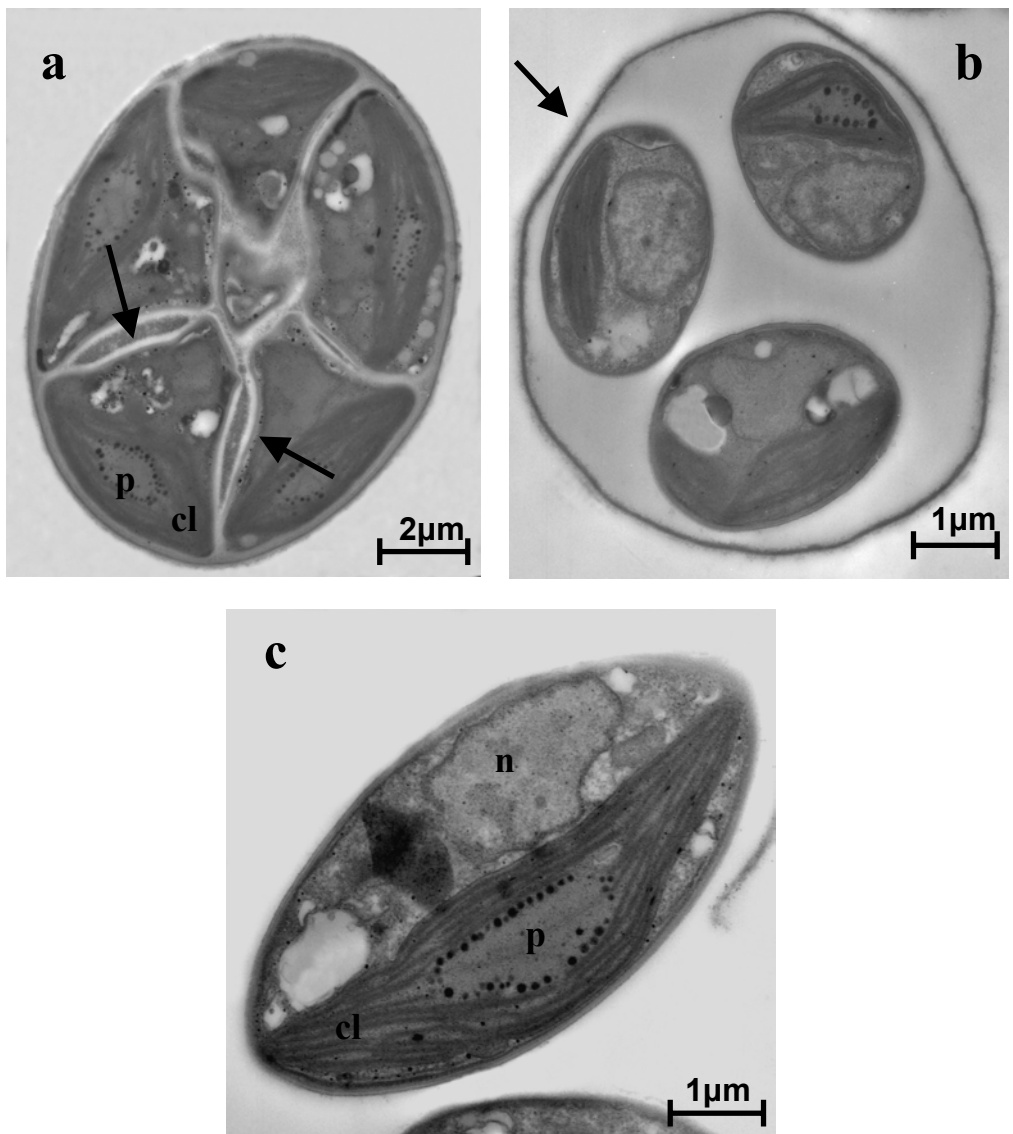


Fig. 4. Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione di cellule di "*Chlorella*" *saccarophila* cresciute a 4°C.

a. Le pareti delle autospore poliedriche iniziano a separarsi (freccie). Nelle singole autospore è riconoscibile il cloroplasto (cl) con il pirenoide (p).

b. Le autospore completamente separate e di forma più ovoidale rimangono all'interno della cellula madre fino alla rottura della parete di quest'ultima (freccia).

c. Giovane autospora libera caratterizzata da un cloroplasto con sistema tilacoidale ridotto (cl = cloroplasto, p = pirenoide, n = nucleo).

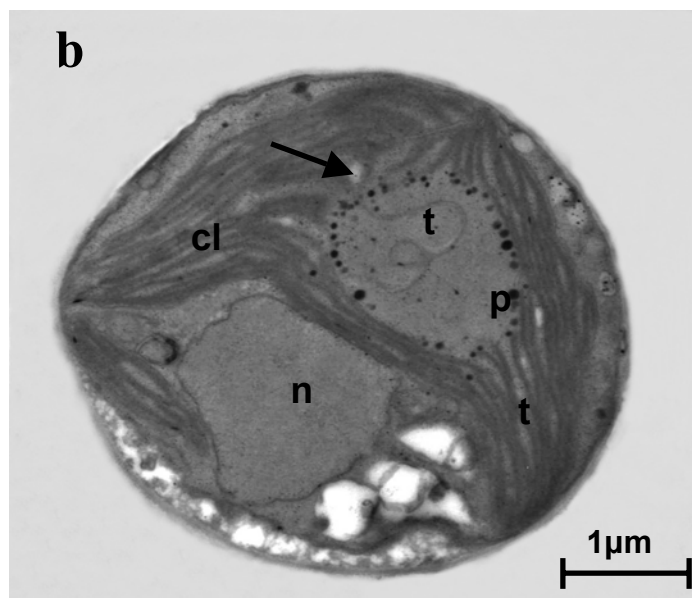
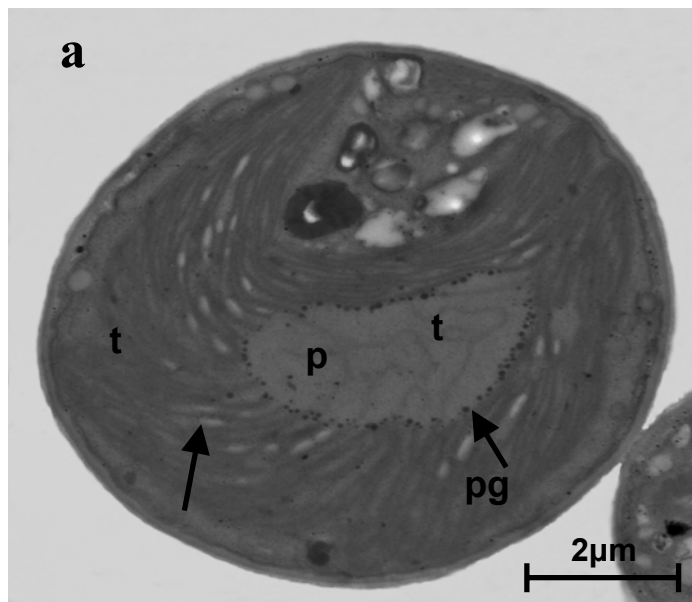


Fig. 5. Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione di cellule di “*Chlorella*” *saccharophila* cresciute a diverse temperature.

a. Cellula matura cresciuta a 4°C caratterizzata da un cloroplasto a coppa particolarmente voluminoso e ricco di tilacoidi (t). Il pirenoide (p) è attraversato da alcuni profili tilacoidali circonvoluti (t) ed è circondato da piccoli plastoglobuli (pg). L’amido (freccia) è distribuito nello stroma.

b. Cellula vegetativa cresciuta a 16°C. L’ultrastruttura è del tutto paragonabile a quella osservata nella figura a (cl =cloroplasto, p =pirenoide, t = tilacoidi, freccia = amido, n = nucleo).

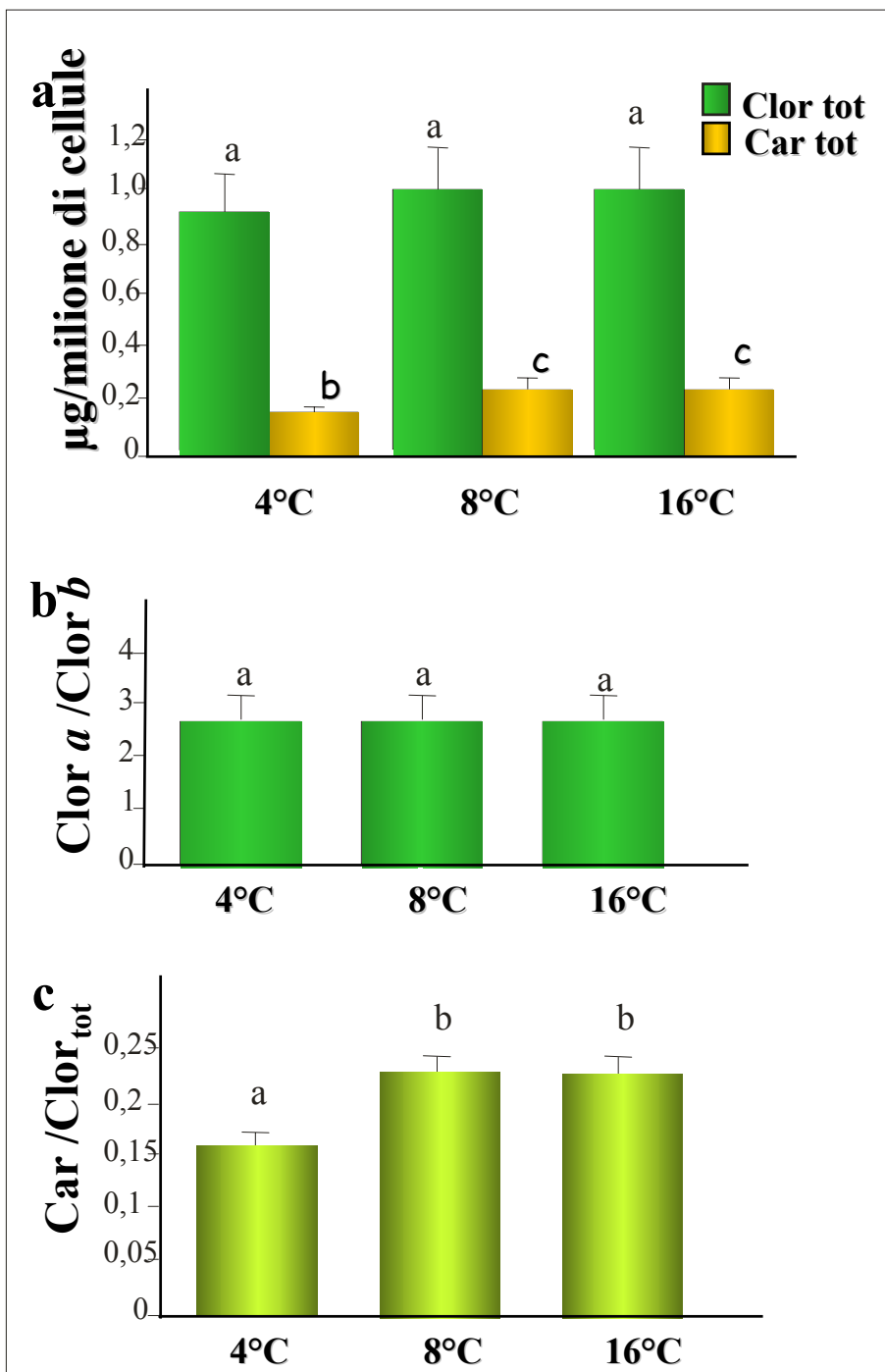


Fig. 6. Quantità di pigmenti fotosintetici, riferite a numero di cellule, e rapporti fra i diversi pigmenti in colture in fase esponenziale di *Chlorella saccharophila* cresciute a diverse temperature.

- a.** Quantità di clorofilla totale ($a+b$) e carotenoidi totali.
- b.** Rapporti clorofilla a / clorofilla b (Clor a /Clor b).
- c.** Rapporti carotenoidi / clorofille totali (Car/Clor_{tot}).

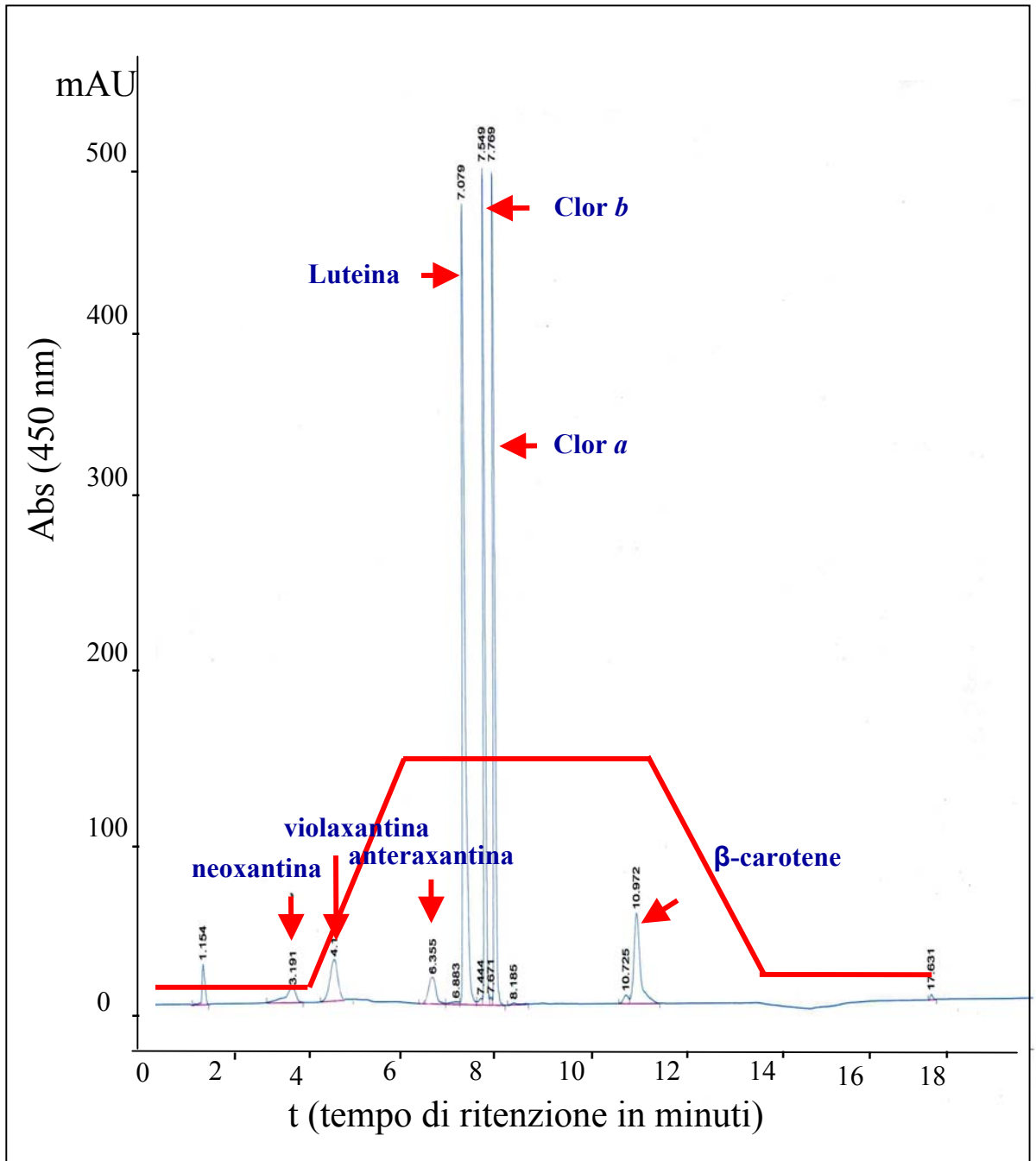


Fig. 7. Cromatogramma ottenuto con HPLC dei pigmenti fotosintetici di colture di "*Chlorella*" *saccharophila* cresciute a 8°C. La linea rossa indica l'andamento del flusso negli estratti della soluzione B da 0 a 100%.

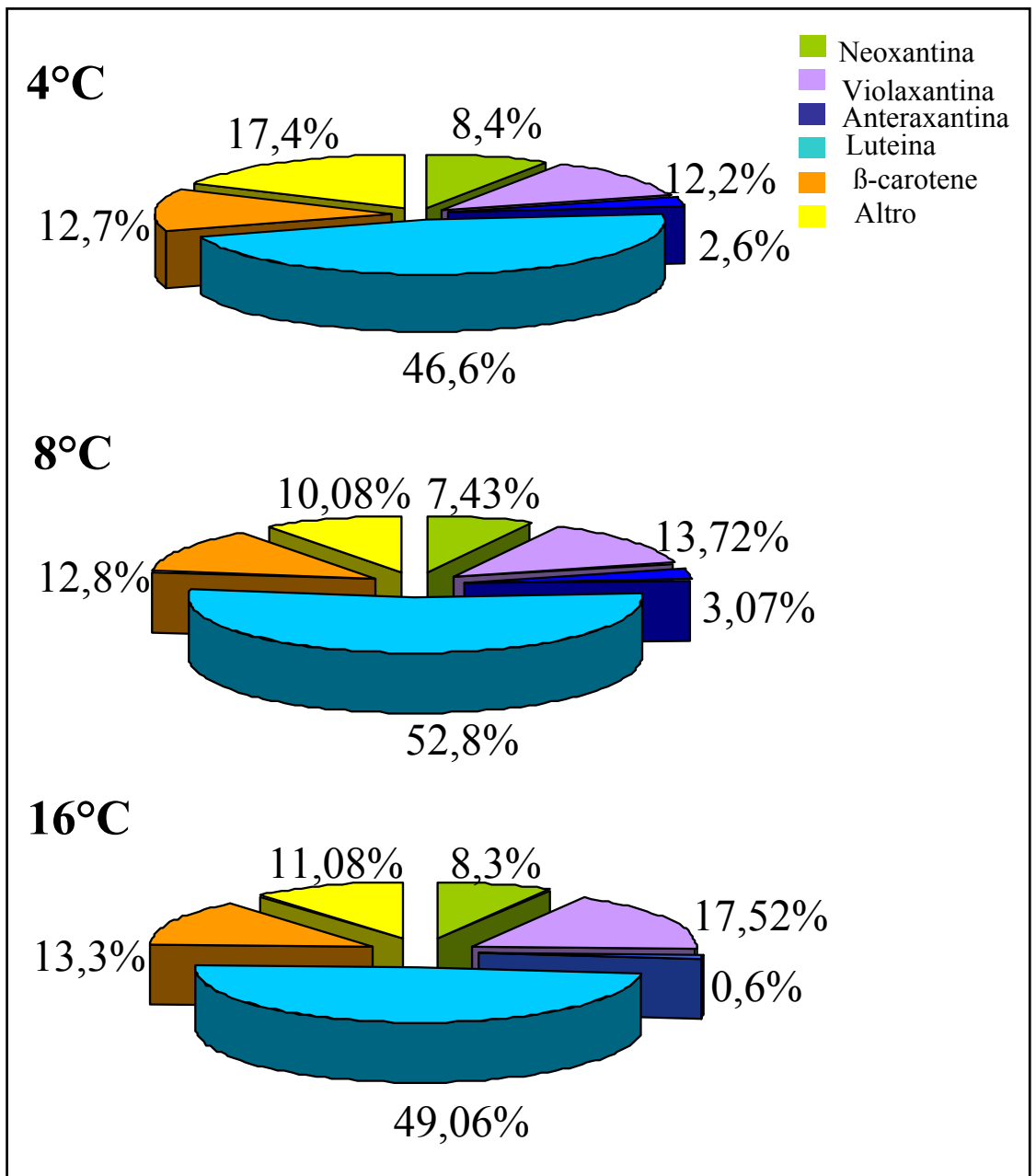


Fig. 8. Diagrammi a torta indicanti le percentuali dei diversi carotenoidi in colture in fase esponenziale di *Chlorella* *saccharophila* cresciute a diverse temperature. (Il termine “Altro” definisce la percentuale costituita dalla somma di una serie di picchi minimi e non attribuibili a pigmenti noti).

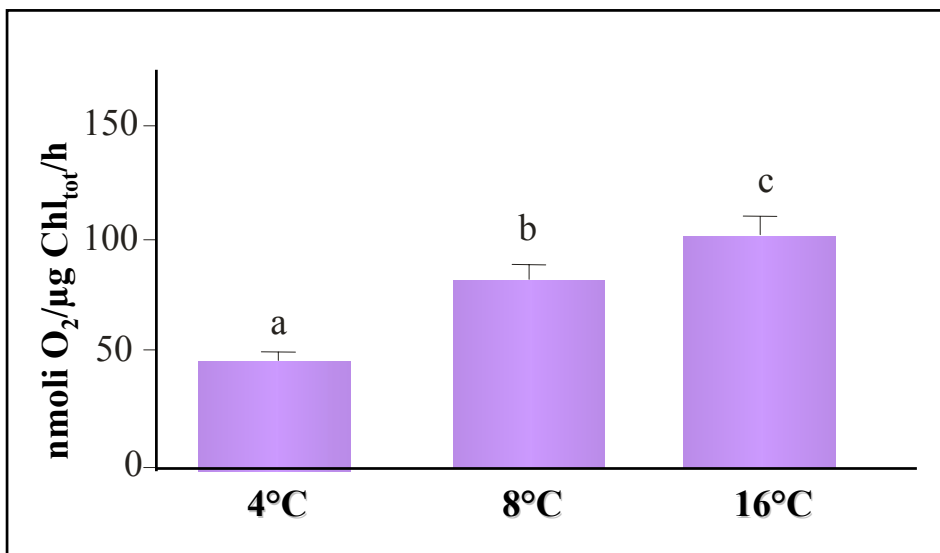


Fig. 9. Emissione di ossigeno alla luce in colture algali in fase esponenziale di “*Chlorella*” *saccharophila* cresciute alle diverse temperature.

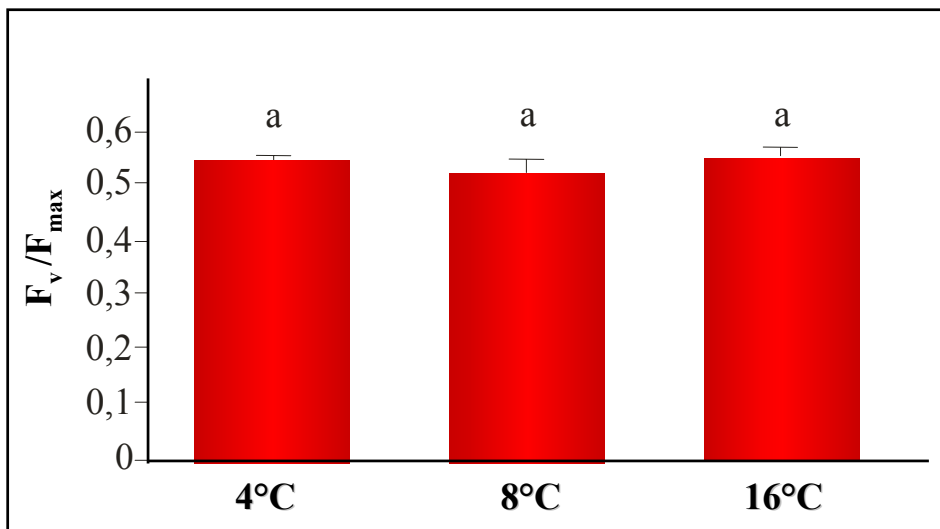


Fig. 10. Valori del rapporto F_v/F_m in colture algali di “*Chlorella*” *saccharophila* in fase esponenziale cresciute alle diverse temperature.

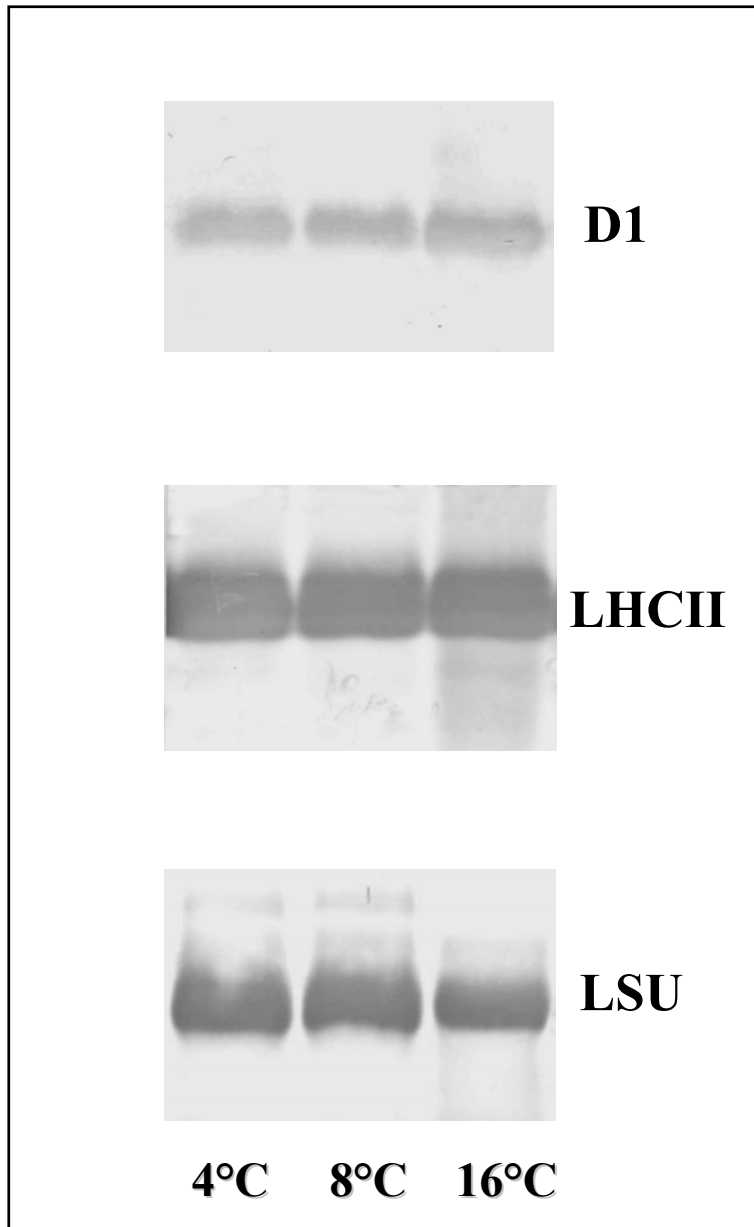


Fig. 11. Analisi Western dei contenuti di proteine LHCII, D1 e della subunità grande (LSU) della Rubisco, in cellule di colture algali di "*Chlorella*" *saccharophila* in fase esponenziale cresciute alle diverse temperature.

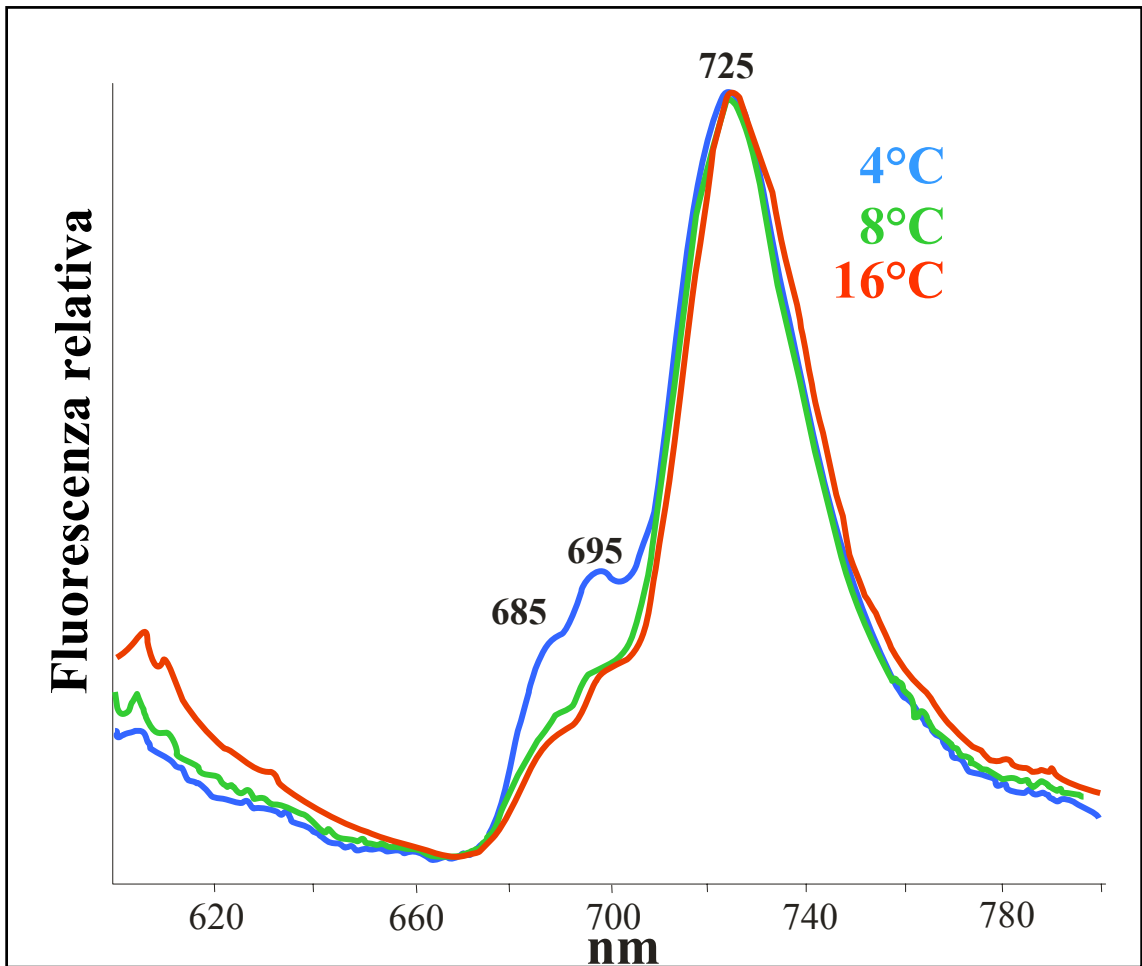


Fig. 12. Spettri di emissione di fluorescenza *in vivo* a 77K di colture di "*Chlorella*" *saccharophila* cresciute a diverse temperature, ottenuti con luce di eccitazione di 440 nm.

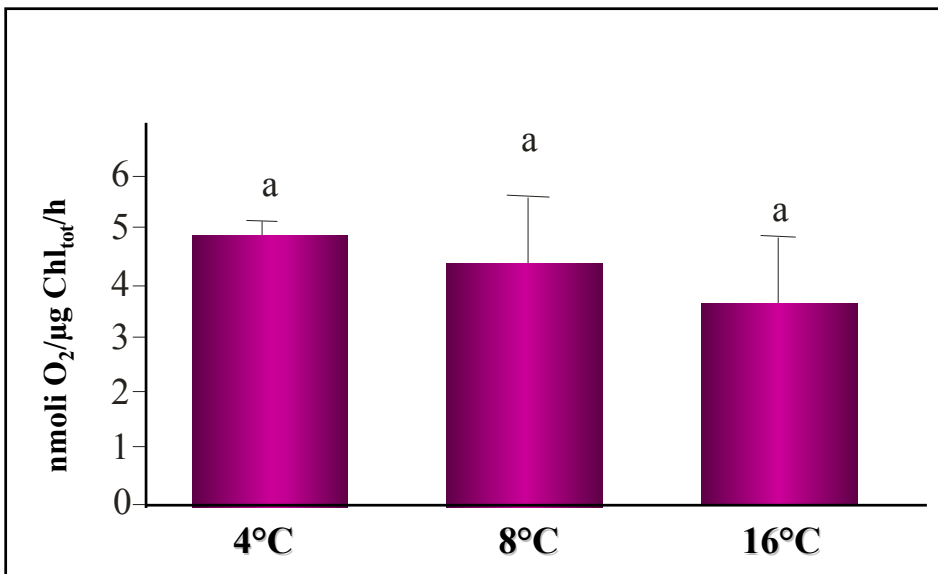


Fig. 13. Consumo di ossigeno al buio in colture algali in fase esponenziale di “*Chlorella*” *saccharophila* cresciute alle diverse temperature.

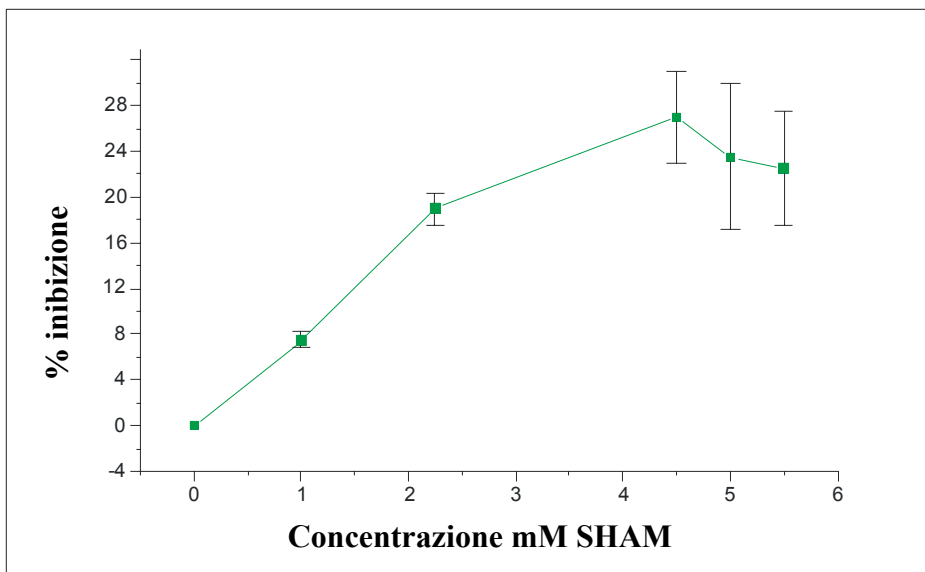


Fig. 14. Prove di inibizione del consumo respiratorio di ossigeno con concentrazioni crescenti di SHAM in colture algali di “*Chlorella*” *saccharophila* in fase esponenziale e cresciute alla temperatura di 8°C. L’inibizione viene indicata come % rispetto ai valori del controllo (100%).

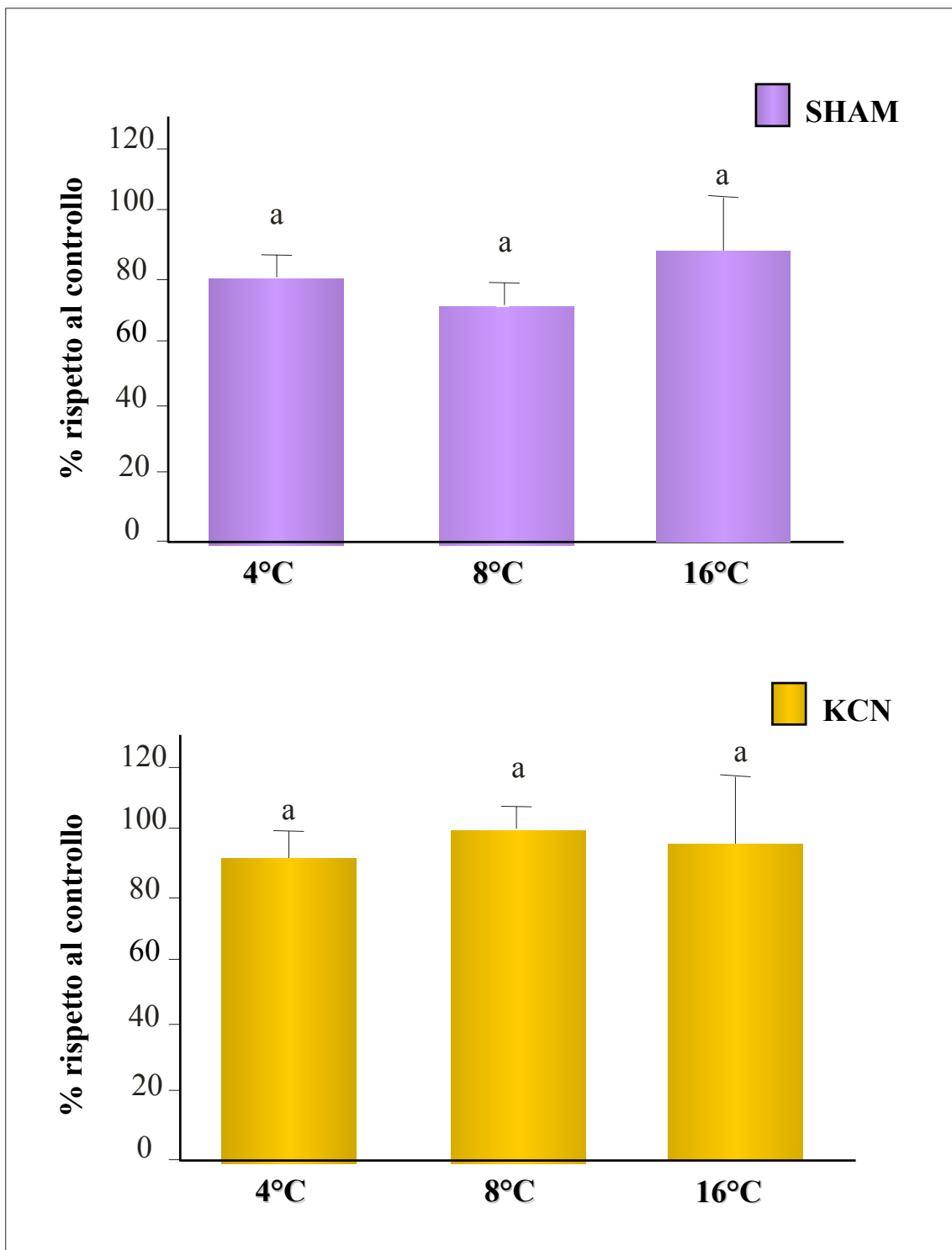


Fig. 15. Inibizione del consumo di ossigeno al buio in colture algali di “*Chlorella*” *saccarophila* in fase esponenziale alle diverse temperature di crescita, dopo trattamento con SHAM (5mM) o con KCN (5mM). I valori indicano la percentuale di consumo di ossigeno rispetto al consumo del controllo (100%).

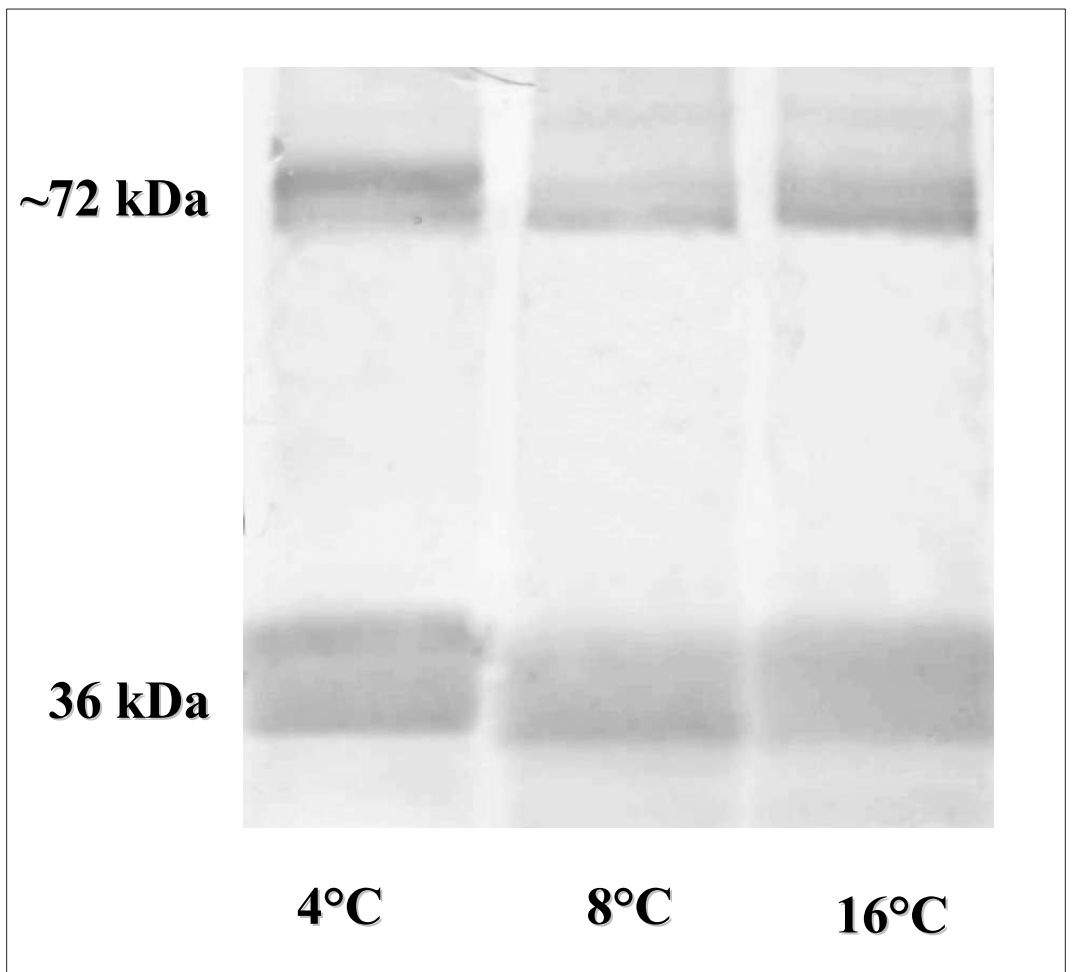


Fig. 16. Analisi Western dei contenuti della proteina AOX in cellule di colture algali di "*Chlorella*" *saccharophila* in fase esponenziale cresciute alle diverse temperature. Sono visibili la banda della forma attiva a 36kDa e quella della forma inattiva a circa 72kDa.



Fig. 17. Feltri compatti verde-azzurro di popolazioni cianobatteriche sulla superficie del fango in una vasca termale.

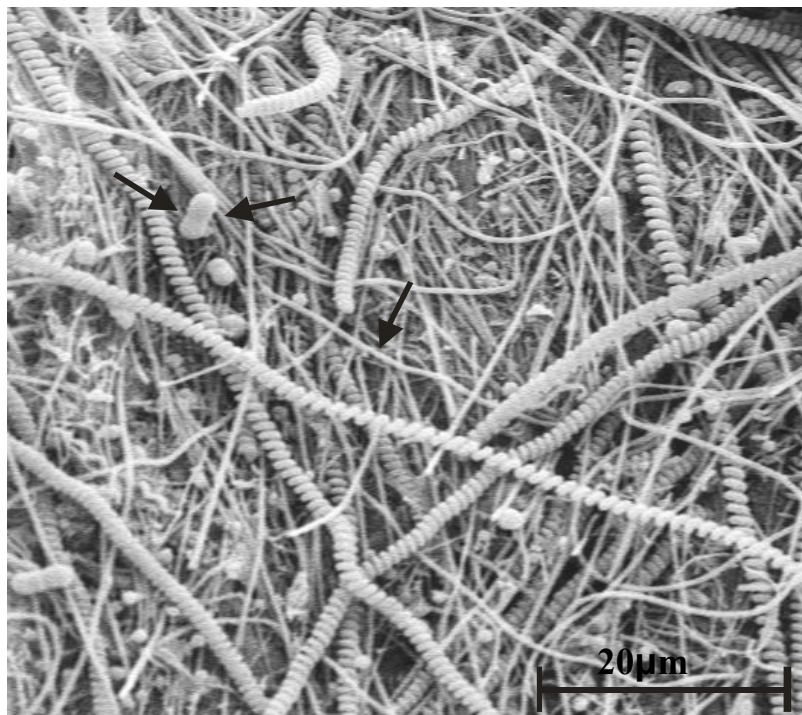


Fig. 18. Micrografia al microscopio elettronico a scansione di un feltro cianobatterico. Si riconoscono *Cyanobacterium aponinum* (doppia freccia) e *Leptolyngbya* sp. ETS-04 (freccia).

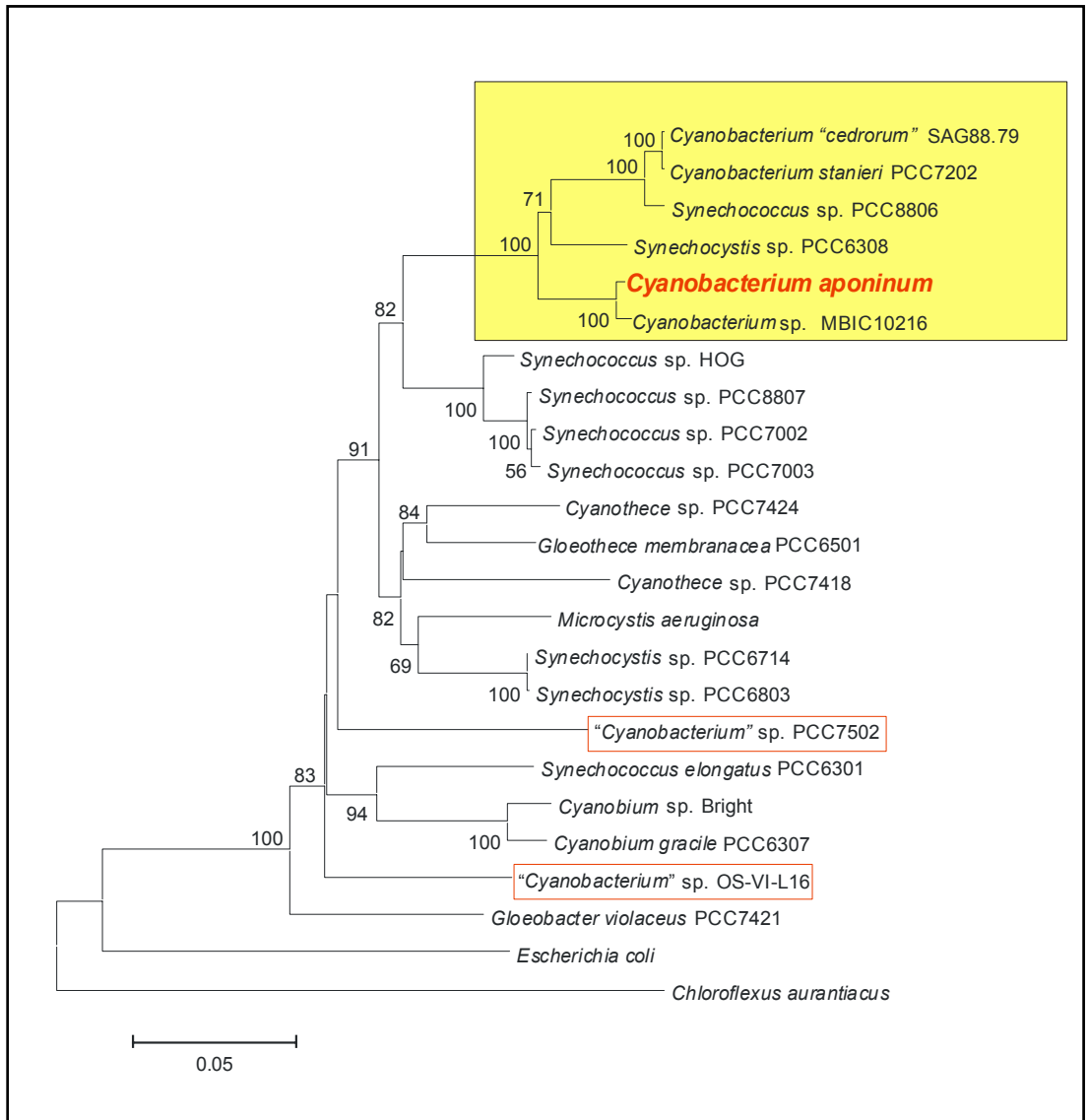


Fig. 19- NJ. Albero filogenetico basato sulle sequenze del 16S rDNA e costruito con il programma MEGA3.1. I numeri posti in prossimità dei nodi indicano i valori di bootstrap (> 50) espressi in percentuale. In giallo è evidenziato il "cluster" comprendente i taxa del genere *Cyanobacterium*. Il riquadro in rosso, invece, evidenzia due taxa segnalati come appartenenti a questo genere. In basso viene riportata la scala di distanza espressa sempre in valore percentuale (Moro *et al.*, 2007).

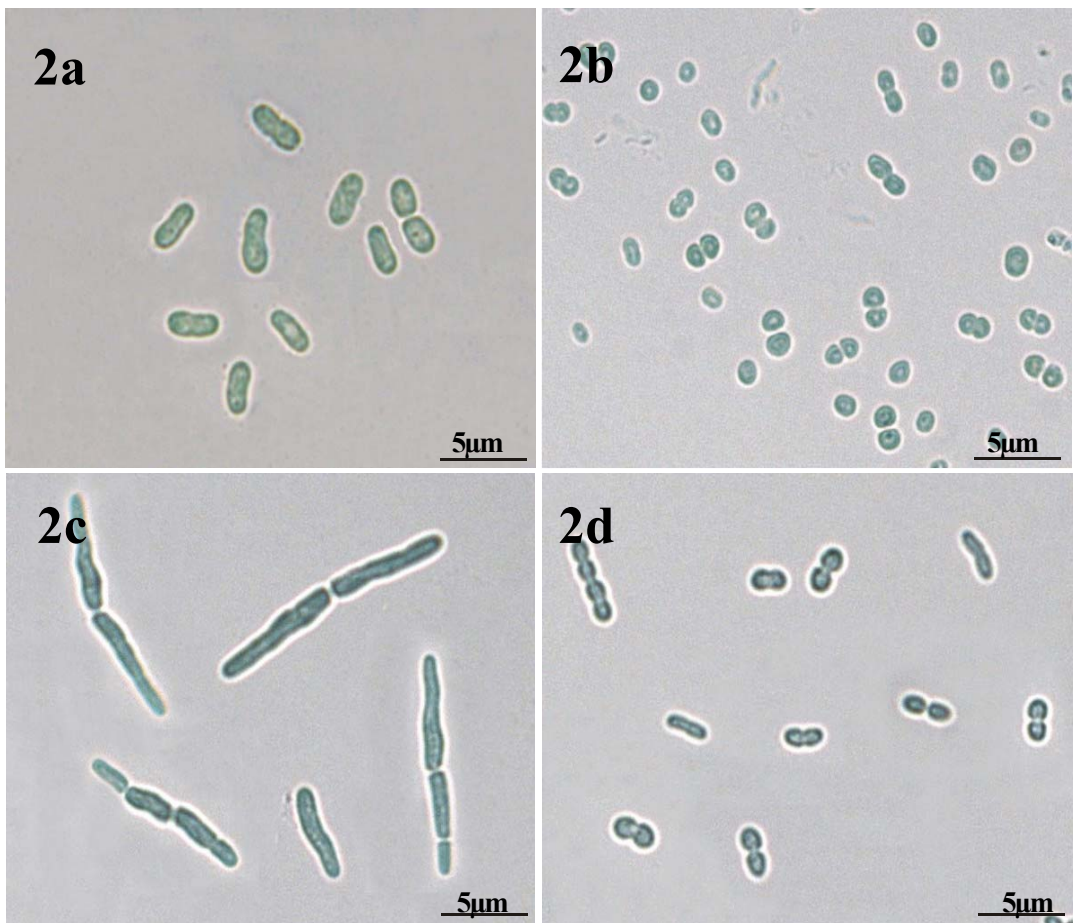


Fig. 20. Micrografie al microscopio ottico di cellule di *Cyanobacterium aponinum* (2a, 2c) e *Cyanobacterium* sp. MBIC 10216 (2b, 2d) cresciute a 30°C in terreno BG11 dolce (2a, 2b) e in terreno BG11 salato (2c, 2d).

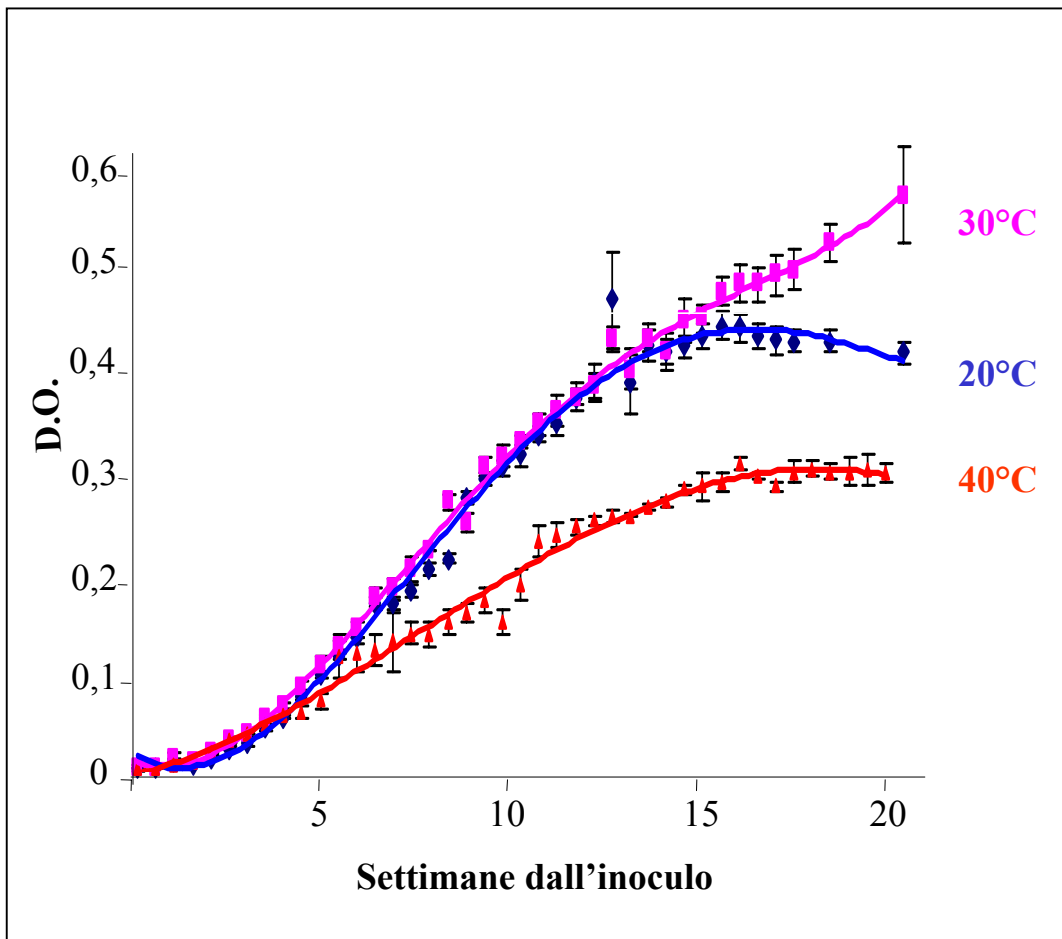


Fig. 21. Curve di crescita di *Cyanobacterium aponinum* a diverse temperature. I numeri in ascissa indicano le settimane dall'inoculo, quelli in ordinata indicano l'aumento dei valori di densità ottica (D.O.) delle colture rilevati ad intervalli di quattro giorni.

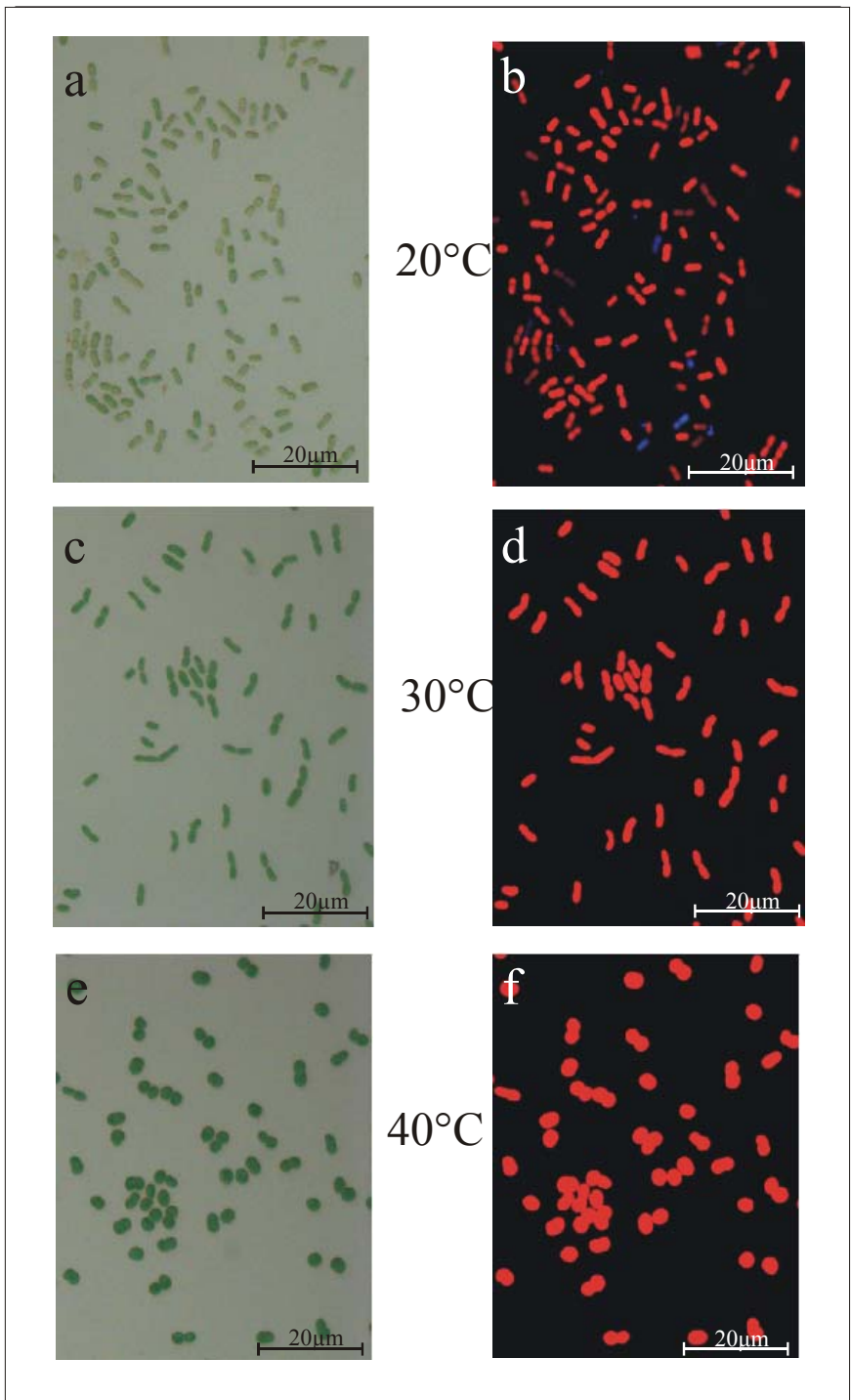


Fig. 22. Immagini al microscopio ottico di cellule di *Cyanobacterium aponinum* cresciute a diverse temperature.

Le cellule aumentano di dimensioni e cambiano forma all'aumentare della temperatura.

Le figure a destra (b, d, f), mostrano l'autofluorescenza rossa della clorofilla (dopo eccitazione con luce UV) delle cellule rappresentate a sinistra (a, c, e).

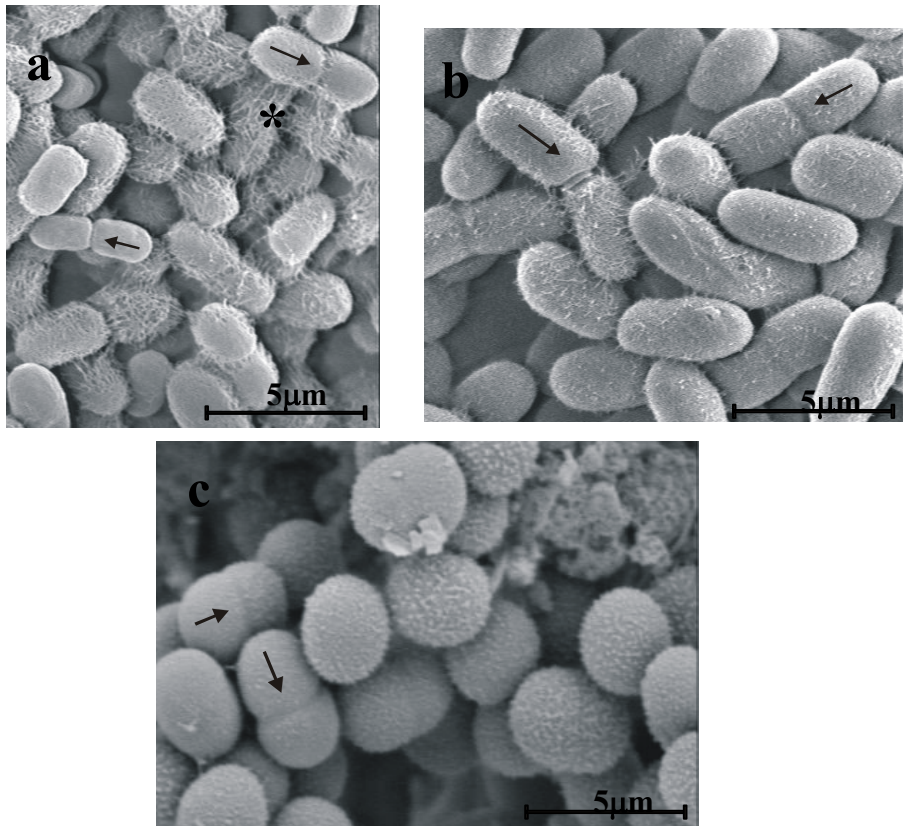


Fig. 23. Micrografie al microscopio elettronico a scansione di cellule di *Cyanobacterium aponinum* cresciute a diverse temperature.

a. Cellule cresciute a 20°C. Le cellule hanno forma ovoidale. E' visibile l'abbondante materiale mucillaginoso con briglie di connessione fra le cellule (asterisco). Notare i solchi corrispondenti al piano di divisione binaria (freccie) delle cellule.

b. Cellule cresciute a 30°C. Le cellule hanno ancora forma ovoidale. Si riconoscono i solchi che indicano cellule in divisione binaria (freccie).

c. Cellule cresciute a 40°C. Le cellule hanno forma sferoidale. Sono visibili cellule in divisione, con setti in posizione equatoriale (freccie).

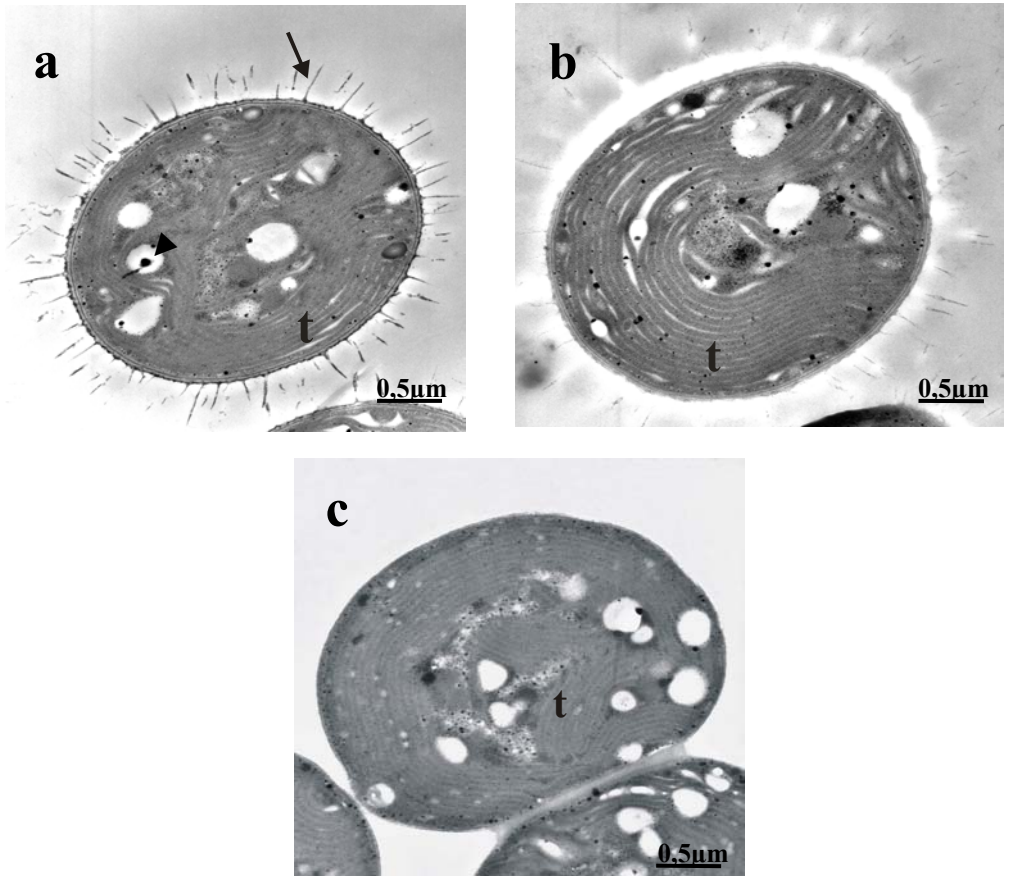


Fig. 24. Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione di cellule di *Cyanobacterium aponinum* cresciute alle diverse temperature.

a. Cellula cresciuta a 20°C. Sono visibili le numerose briglie della guaina mucillaginosa esterna (freccia). Nella cellula si riconoscono tilacoidi (t) e inclusi di materiali di riserva (punta di freccia).

b. Cellula cresciuta a 30°C. Notare l'elevato numero di tilacoidi (t).

c. Cellula cresciuta a 40°C. Masse di tilacoidi (t) sono distribuite in tutto il volume cellulare.

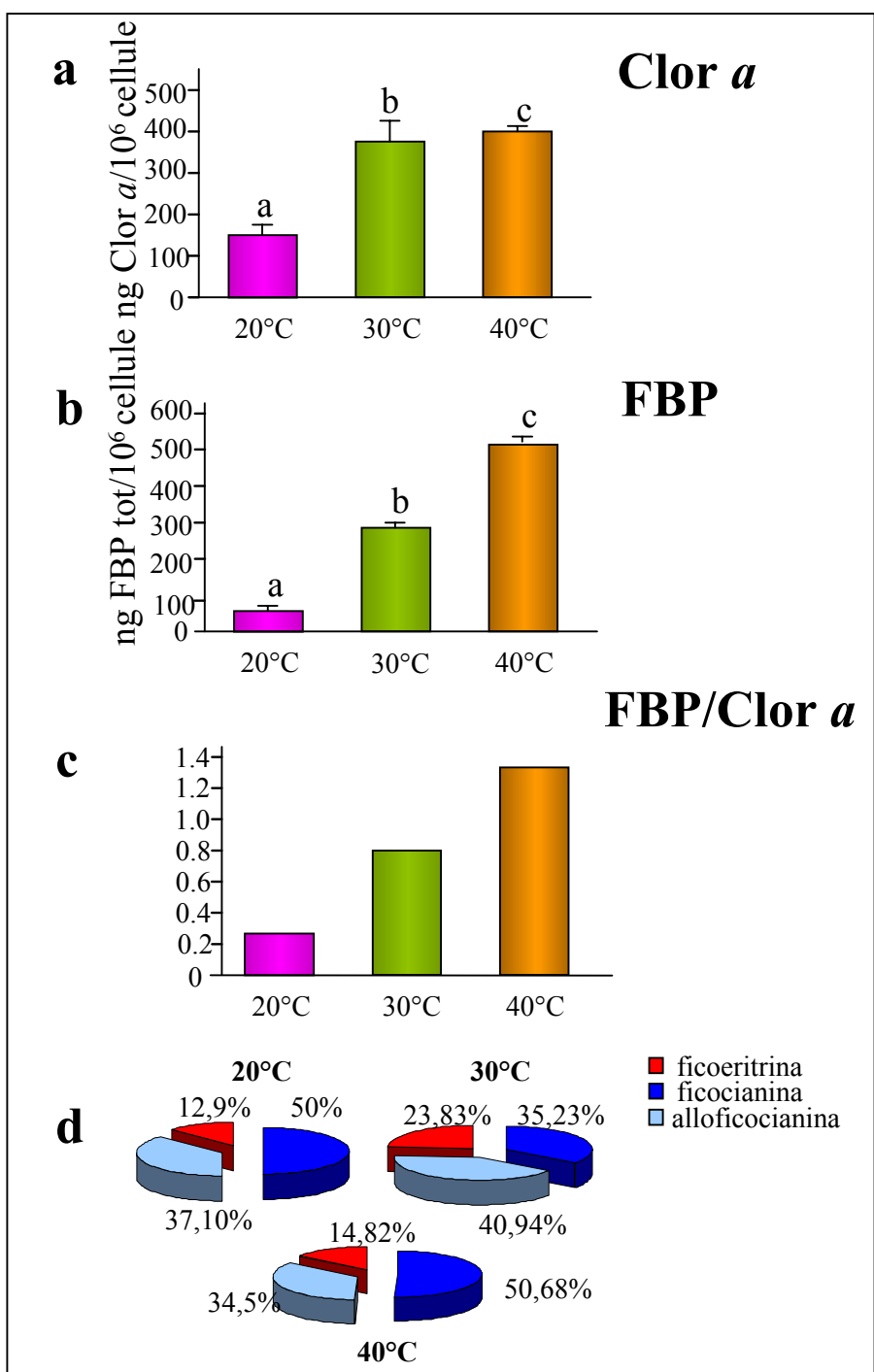


Fig. 25. Quantità di pigmenti fotosintetici, riferite a numero di cellule, e rapporti fra i diversi pigmenti in colture in fase esponenziale di *Cyanobacterium aponinum* cresciute a diverse temperature.

a. Contenuti in clorofilla *a* (Clor *a*).

b. Contenuti in ficobiliproteine (FBP).

c. Rapporto ficobiliproteine/clorofilla *a* (FBP/Clor *a*).

d. Percentuali delle diverse ficobiliproteine in colture di *Cyanobacterium aponinum* cresciute alle diverse temperature.

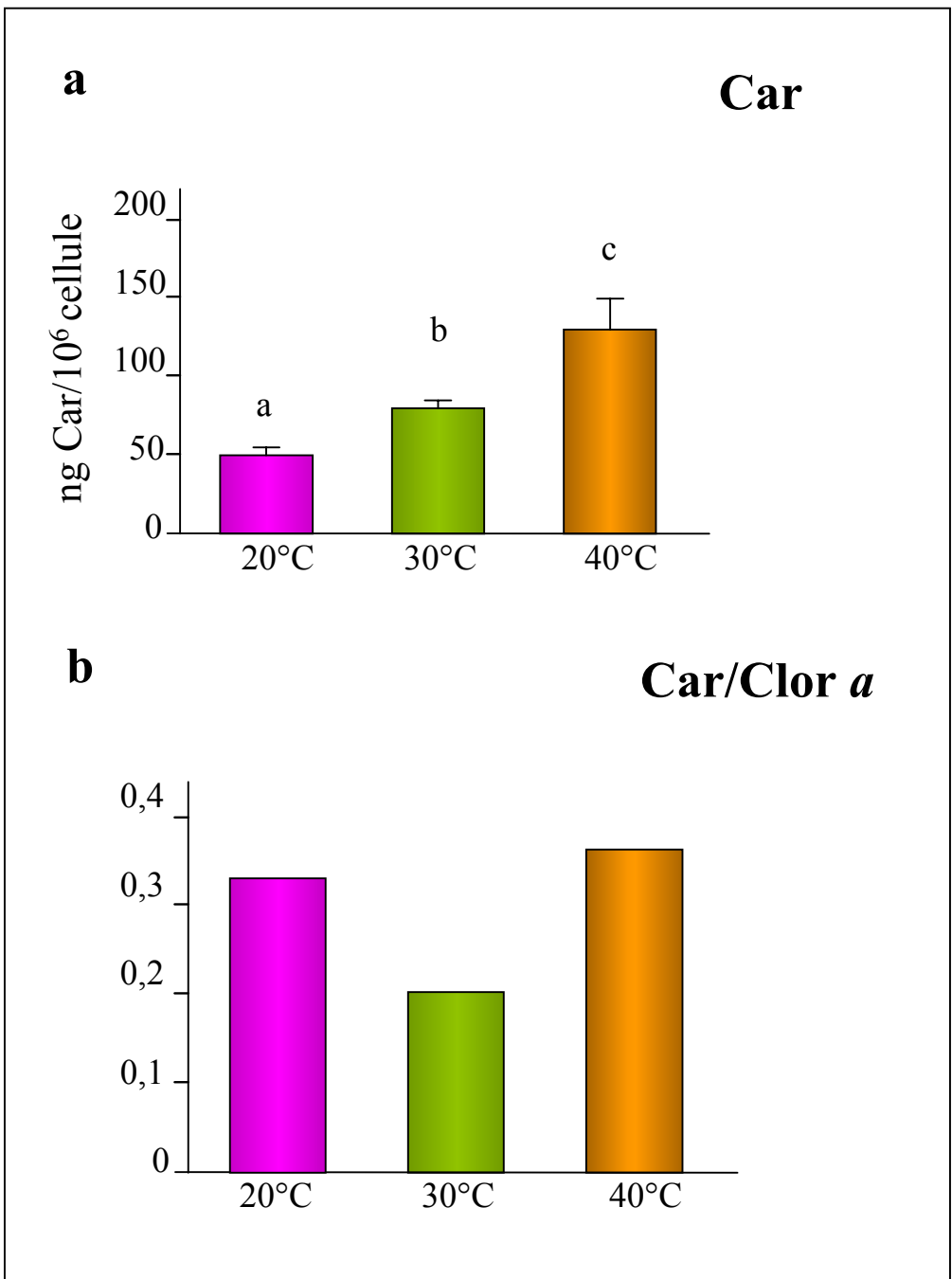


Fig. 26. Quantità di carotenoidi, riferita a numero di cellule, e rapporti carotenoidi e clorofilla in colture in fase esponenziale di *Cyanobacterium aponinum* cresciute alle diverse temperature.

a. Contenuti in carotenoidi (Car).

b. Rapporto carotenoidi/clorofilla *a* (Car/Clor *a*).

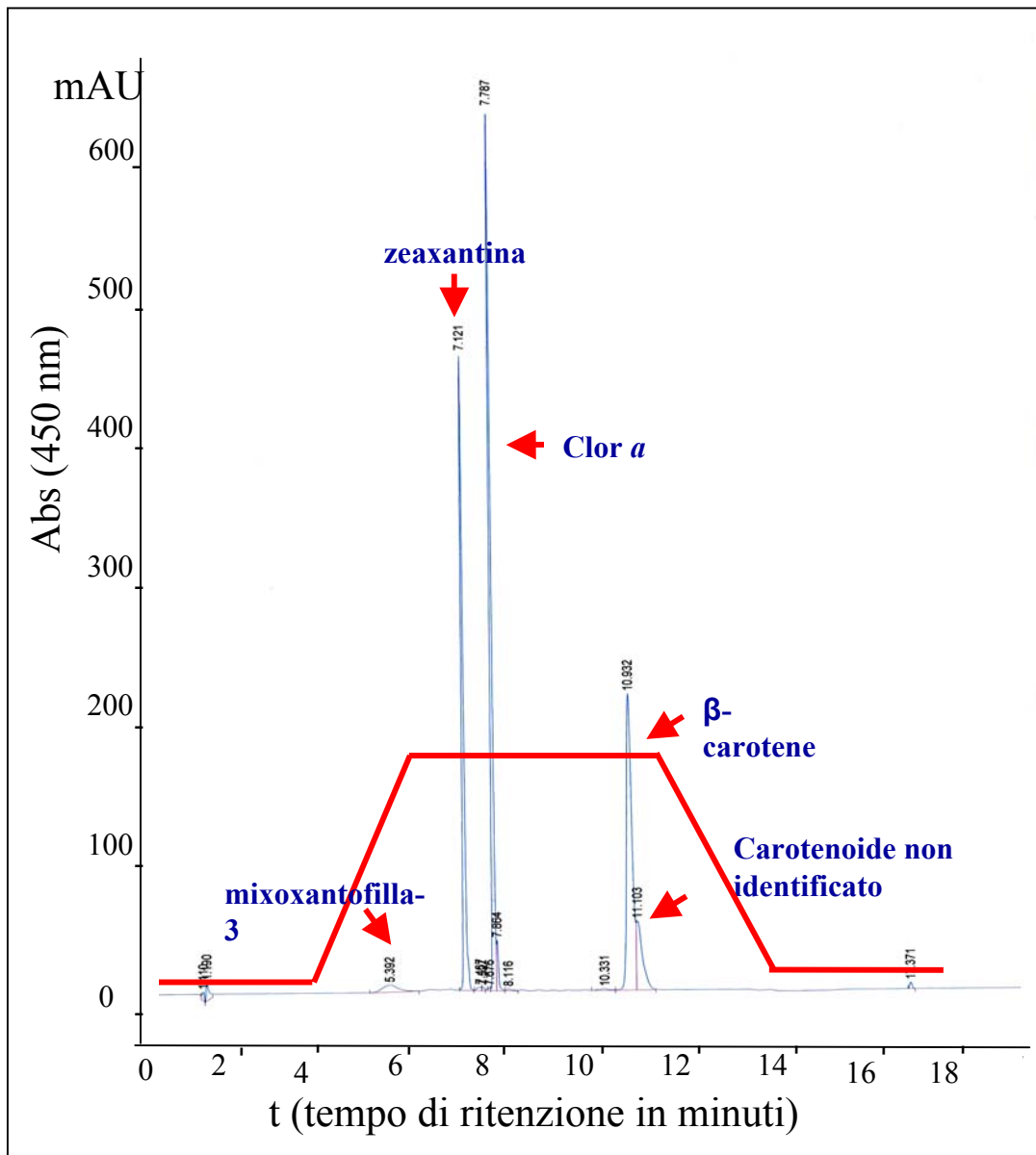


Fig. 27. Cromatogramma ottenuto con HPLC dei pigmenti fotosintetici di colture di *Cyanobacterium aponinum* cresciute a 30°C. La linea rossa indica l'andamento del flusso negli estratti della soluzione B da 0 a 100%.

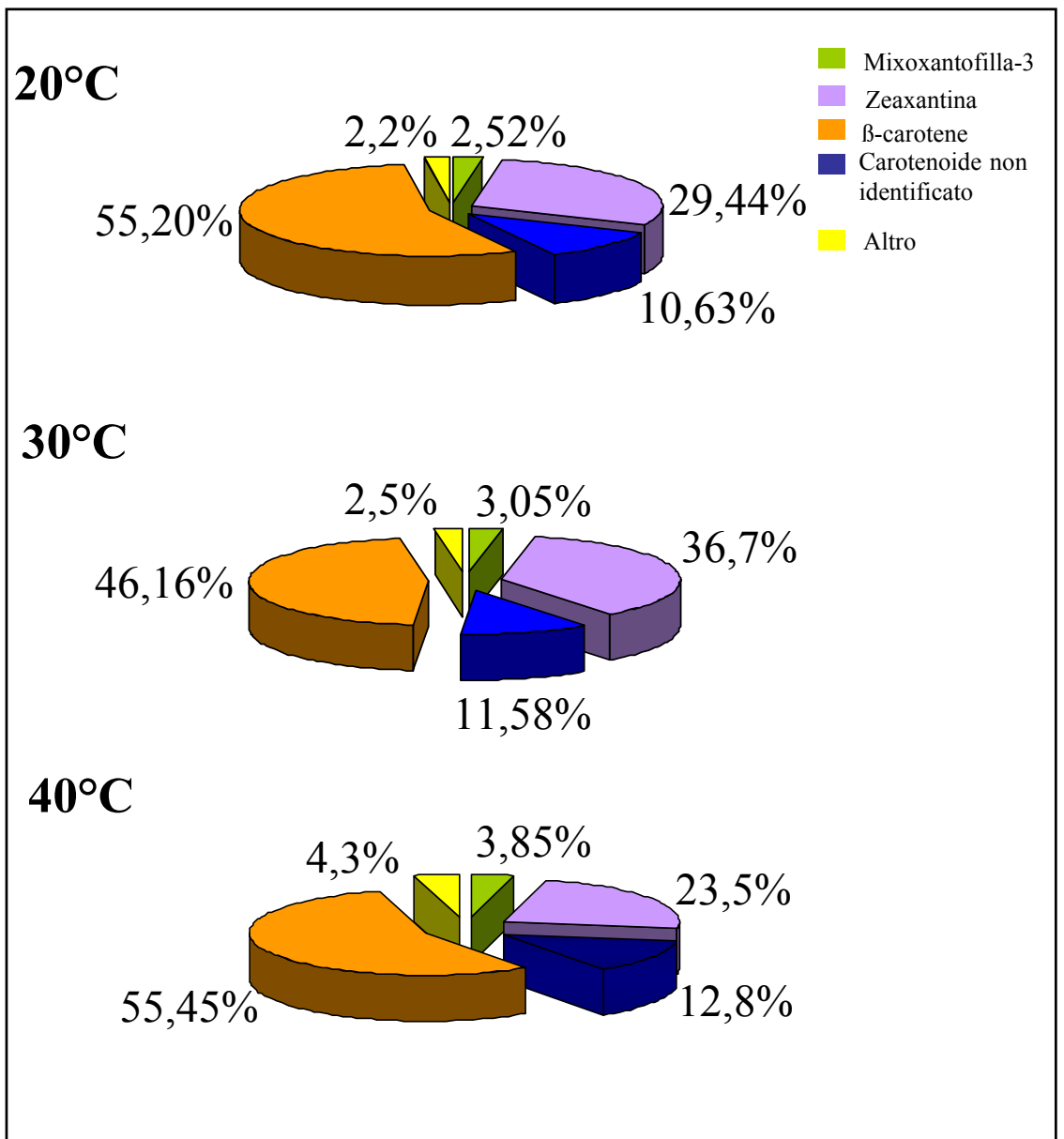


Fig. 28. Diagrammi a torta indicanti le percentuali dei diversi carotenoidi in colture in fase esponenziale di *Cyanobacterium aponinum* cresciute a diverse temperature. (Il termine “Altro” definisce la percentuale costituita dalla somma di una serie di picchi minimi e non attribuibili a pigmenti noti).

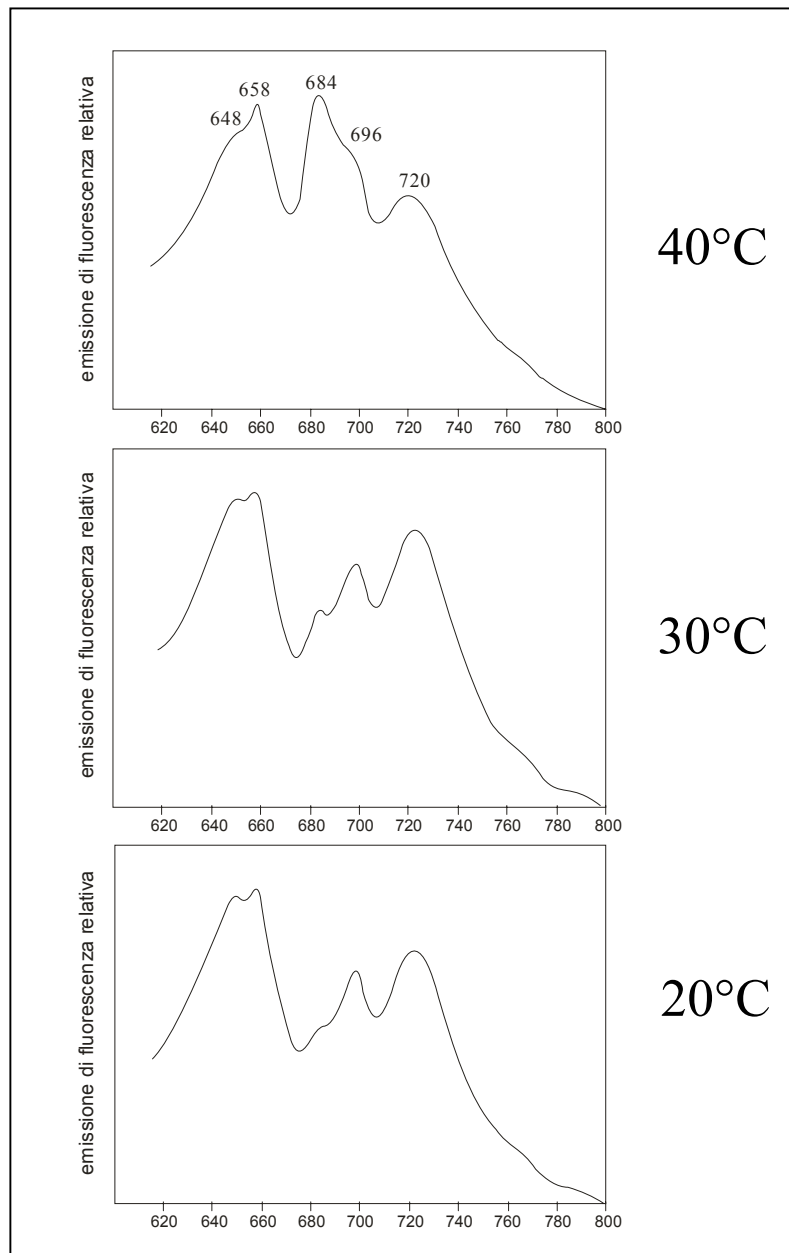


Fig. 29. Spettri di emissione di fluorescenza *in vivo* a 77K di colture di *Cyanobacterium aponinum* alle diverse temperature, ottenuti con luce di eccitazione a 560 nm.

Picchi di emissione:

648 nm = Ficocianina

658 nm = Alloficocianina

684 nm = Clorofilla *a* del PSII (antenna)

696 nm = Clorofilla *a* del PSII (centro di reazione)

720 nm = Clorofilla *a* del PSI

Gli spettri sono stati normalizzati al picco più elevato.

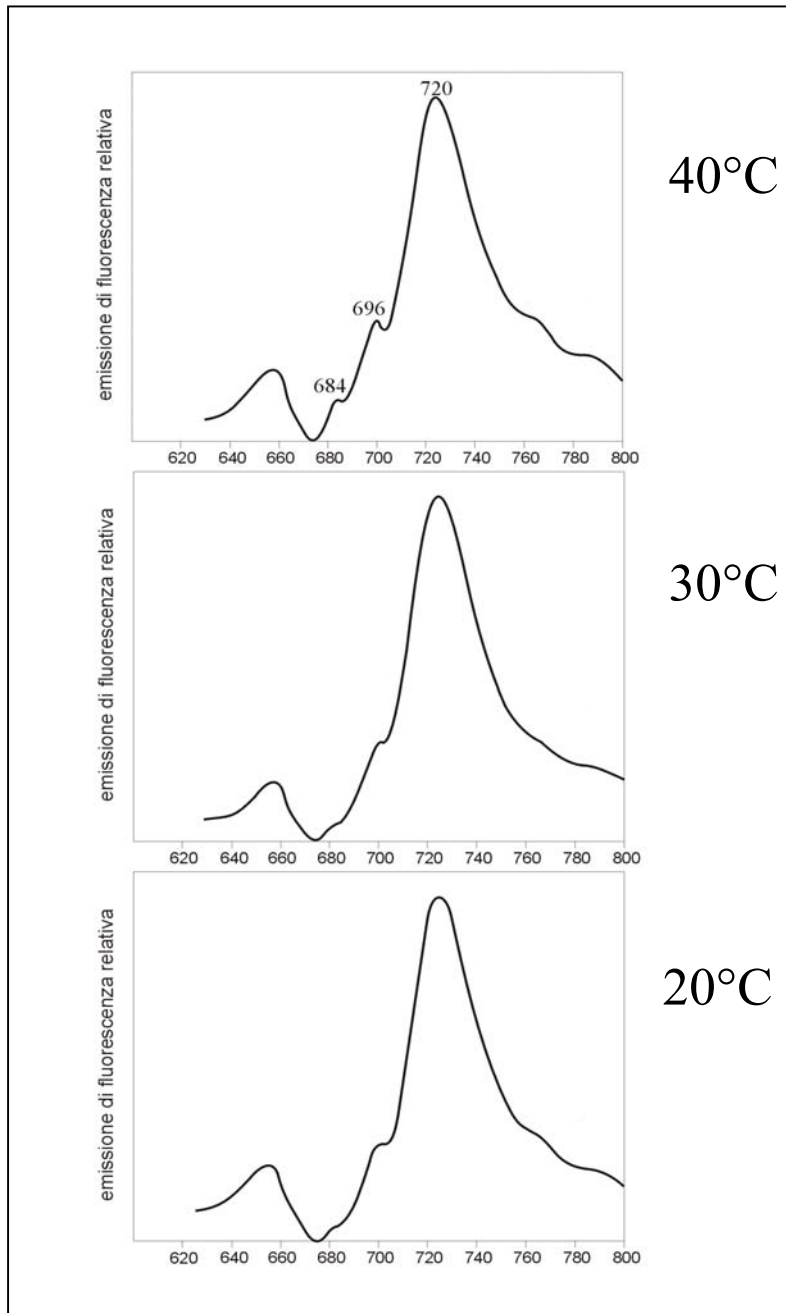


Fig. 30. Spettri di emissione di fluorescenza *in vivo* a 77K di colture di *Cyanobacterium aponinum* alle diverse temperature, ottenuti con luce di eccitazione a 440 nm.

Picchi di emissione:

684 nm = Clorofilla *a* PSII (antenna)

696 nm = Clorofilla *a* del PSII (centro di reazione)

720 nm = Clorofilla *a* del PSI

Il picco a sinistra è proprio dell'emissione di fluorescenza delle ficobiliproteine.

Gli spettri sono stati normalizzati al picco più elevato.

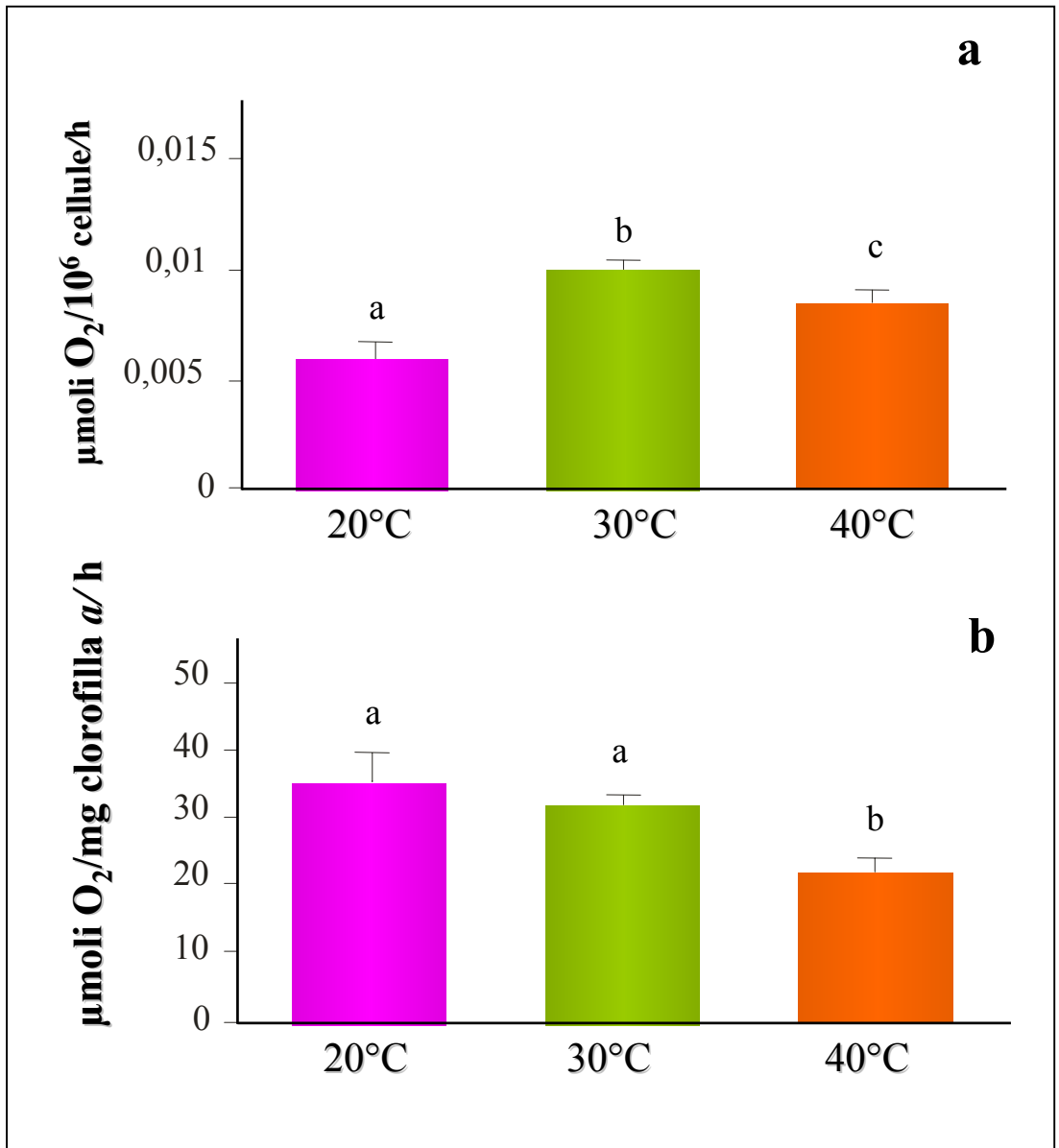


Fig. 31. Emissione di ossigeno fotosintetico *in vivo* alla luce da colture in fase esponenziale di *Cyanobacterium aponinum* cresciute alle diverse temperature.

a. L'emissione di ossigeno è riferita a numero di cellule.

b. L'emissione di ossigeno è riferita a quantità di clorofilla *a*.

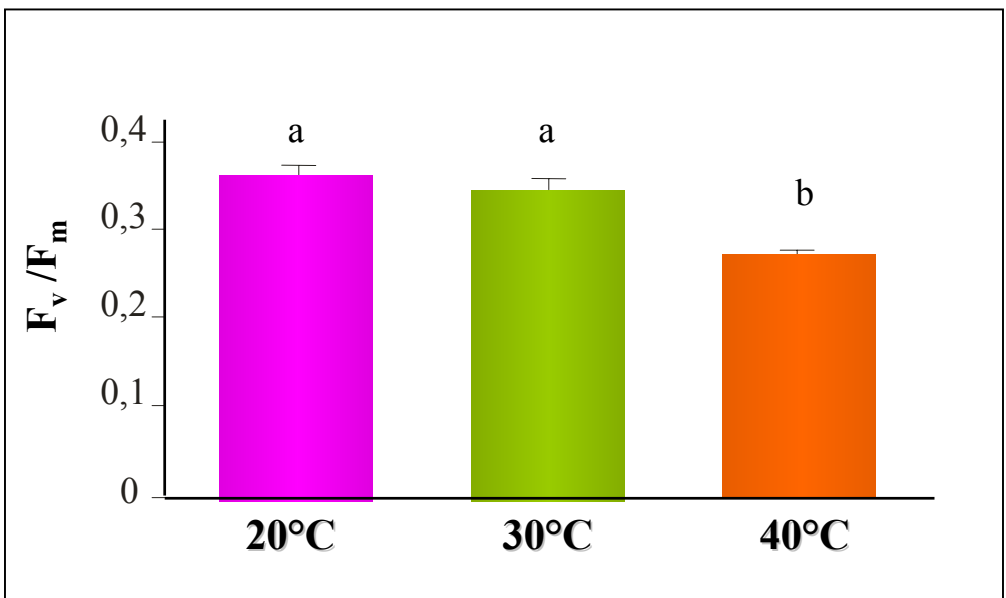


Fig. 32. Valori di F_v/F_m in colture in fase esponenziale di *Cyanobacterium aponinum* alle tre diverse temperature.

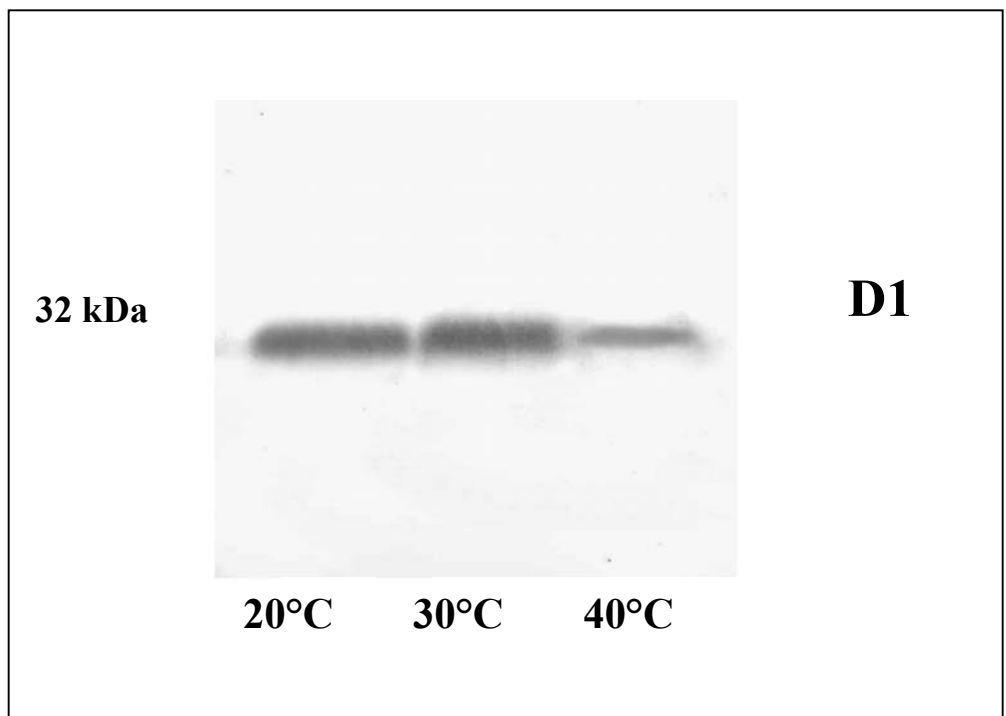


Fig. 33. Analisi Western del contenuto della proteina D1 nei tilacoidi di cellule in fase esponenziale di *Cyanobacterium aponinum* alle diverse temperature di crescita.

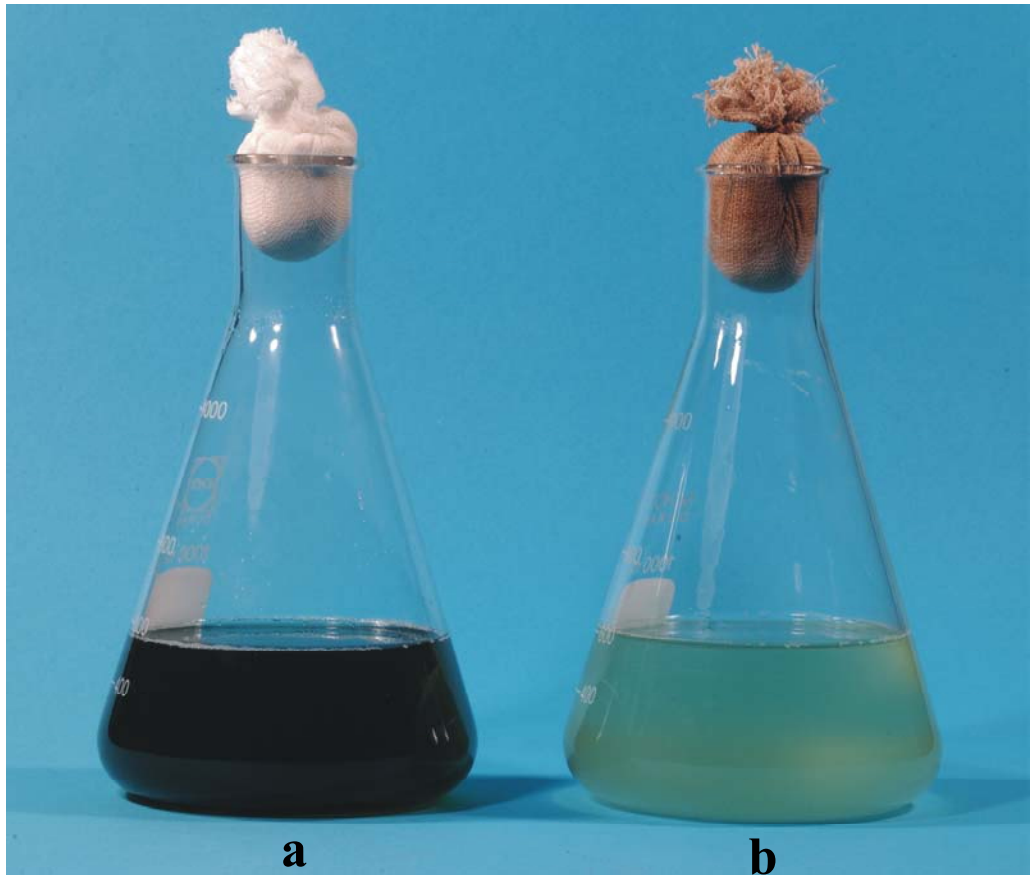


Fig. 34. Coltura di *Cyanobacterium aponinum* prima dell'esposizione a 45°C (a).

Coltura di *Cyanobacterium aponinum* dopo una settimana di mantenimento a 45°C (b).

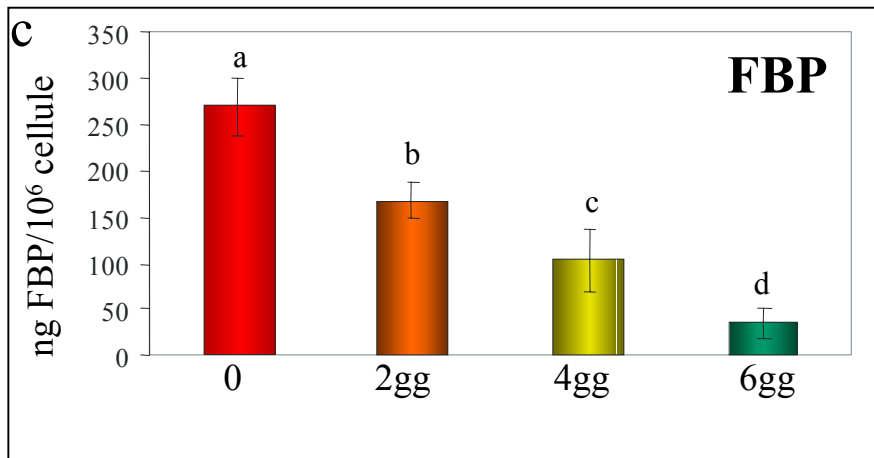
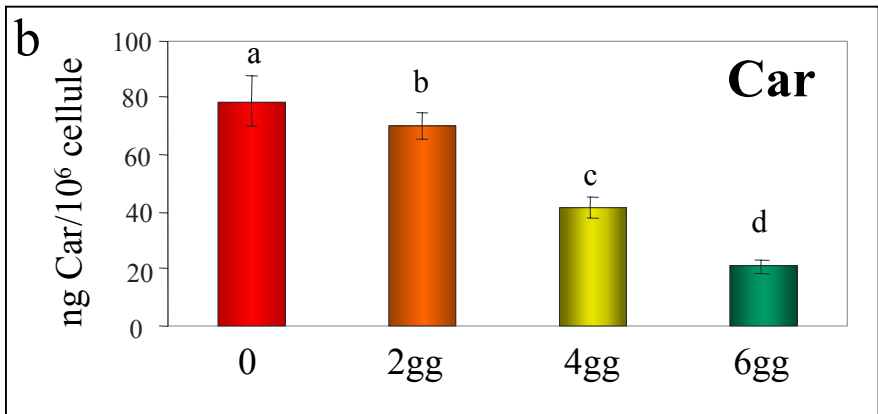
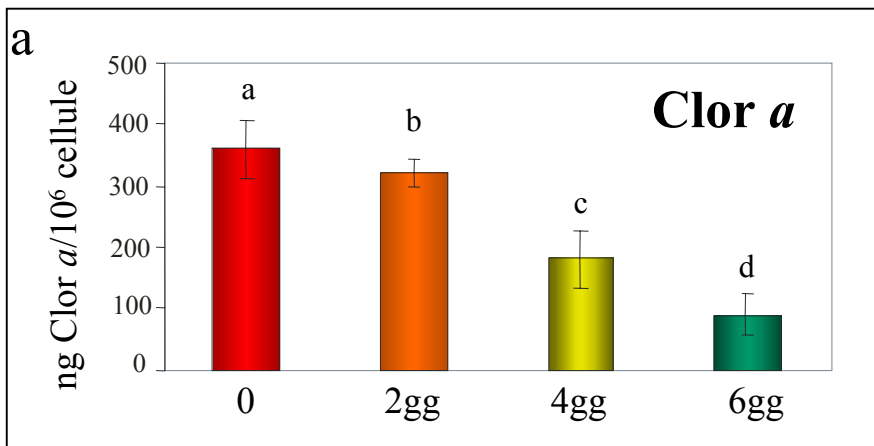


Fig. 35. Contenuti in pigmenti fotosintetici di colture di *Cyanobacterium aponinum* cresciute a 30°C (0) e dopo 2, 4, e 6 giorni di mantenimento a 45°C. I valori dei pigmenti sono in ng/10⁶ cellule.

a. Contenuti in clorofilla *a* (Clor *a*).

b. Contenuti in carotenoidi (Car).

c. Contenuti in ficobiliproteine (FBP).

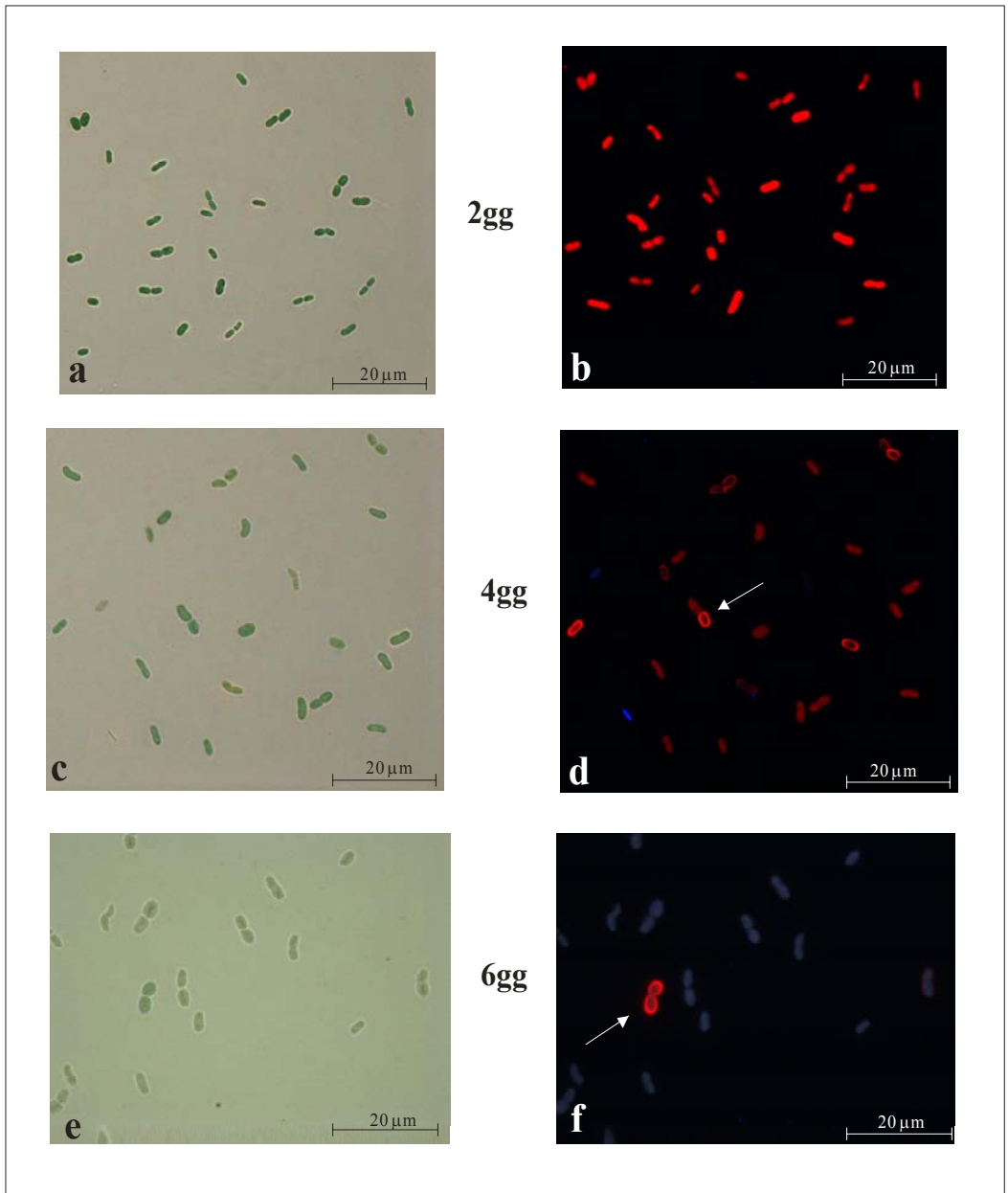


Fig. 36. Immagini al microscopio ottico di cellule di *Cyanobacterium aponinum* tenute per 2 giorni (2gg), 4 giorni (4gg) e 6 giorni (6gg) a 45°C. Le figure a destra (b, d, f) mostrano l'autofluorescenza rossa della clorofilla (dopo eccitazione con luce UV) delle cellule rappresentate nelle figure a sinistra (a, c, e).
 Notare nelle figure d ed f cellule con una banda di fluorescenza periferica (freccie). Le cellule prive di clorofilla non emettono fluorescenza rossa.

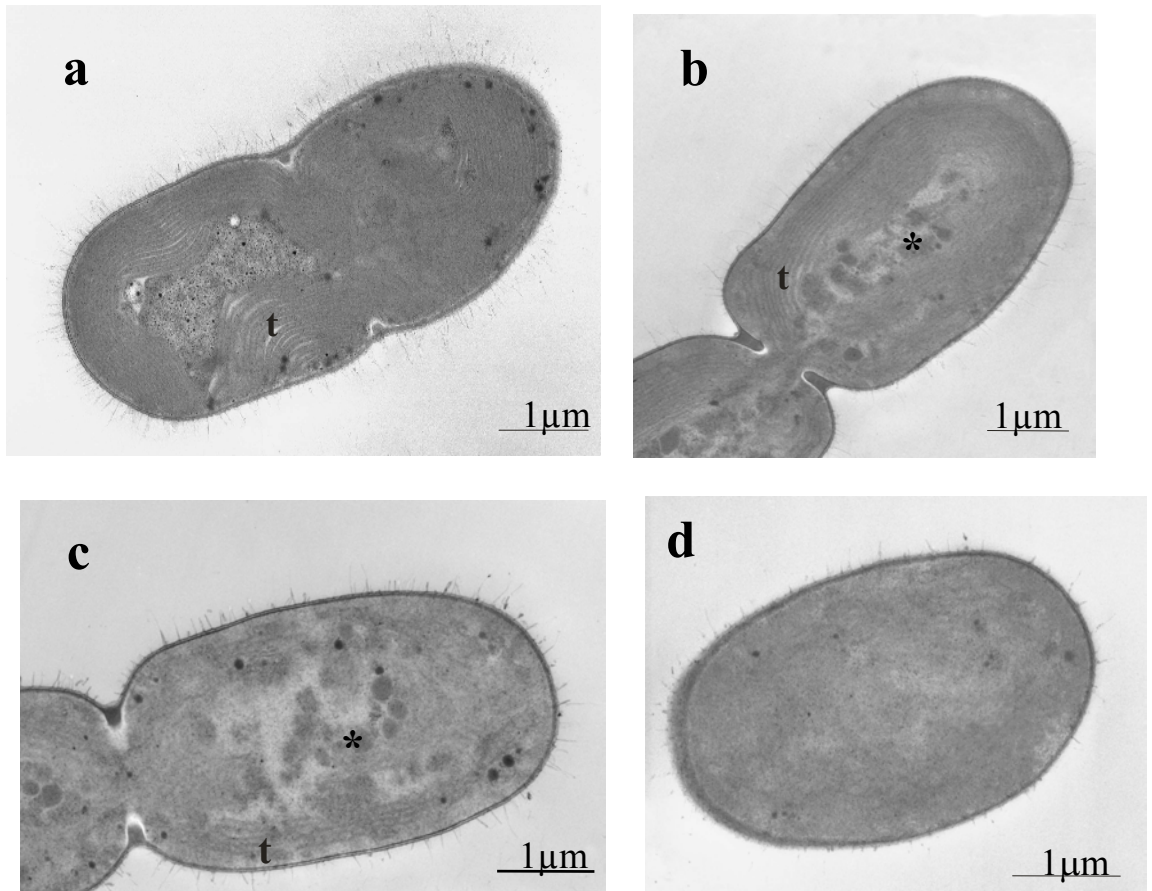


Fig. 37. Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione di cellule di *Cyanobacterium aponinum* in coltura esposta per diversi giorni a 45°C.

a. Cellula di *Cyanobacterium aponinum* esposta per 2 giorni a 45°C. L'organizzazione ultrastrutturale è ben conservata. I tilacoidi (t) sono numerosi.

b. Cellula di *Cyanobacterium aponinum* esposta per 4 giorni a 45°C. Notare il diradamento dei tilacoidi (t). Nella regione centrale sono visibili masse scure interpretabili come addensamenti di DNA (asterisco).

c. Cellula di *Cyanobacterium aponinum* esposta per 6 giorni a 45°C. Pochi tilacoidi (t) sono visibili nella regione periferica della cellula. Nella regione centrale sono presenti ancora masse addensate formate possibilmente da DNA degradato (asterisco).

d. Cellula di *Cyanobacterium aponinum* esposta per 6 giorni a 45°C. Nella cellula, molto alterata, non sono più distinguibili componenti interni.

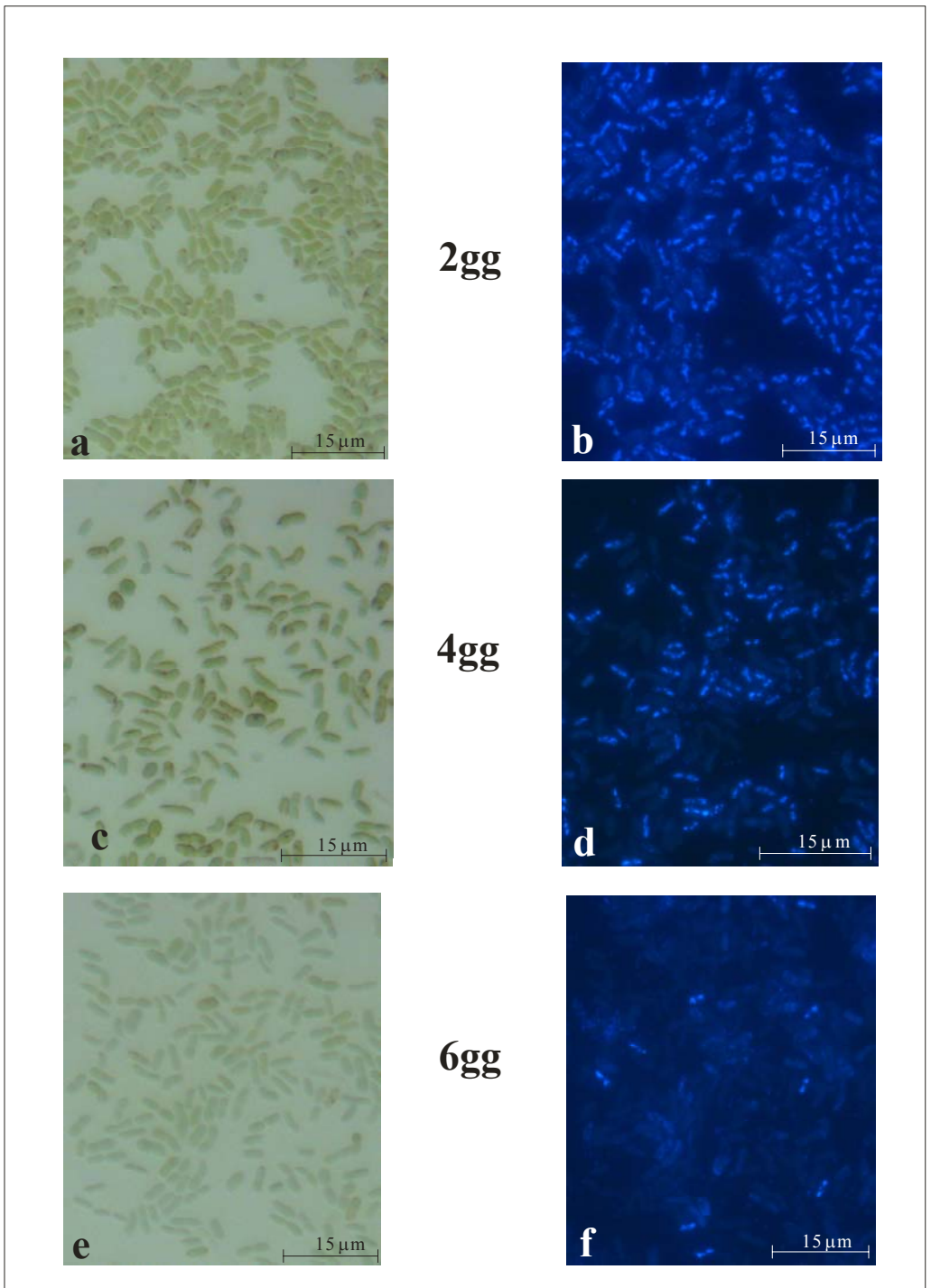


Fig. 38. Immagini al microscopio ottico di cellule di *Cyanobacterium aponinum* mantenute per 2 giorni (2gg), 4 giorni (4gg) e 6 giorni (6gg) a 45°C. Le figure a destra (b, d, f) mostrano la risposta alla colorazione del DNA con DAPI delle cellule rappresentate nelle figure a sinistra (a, c, e).

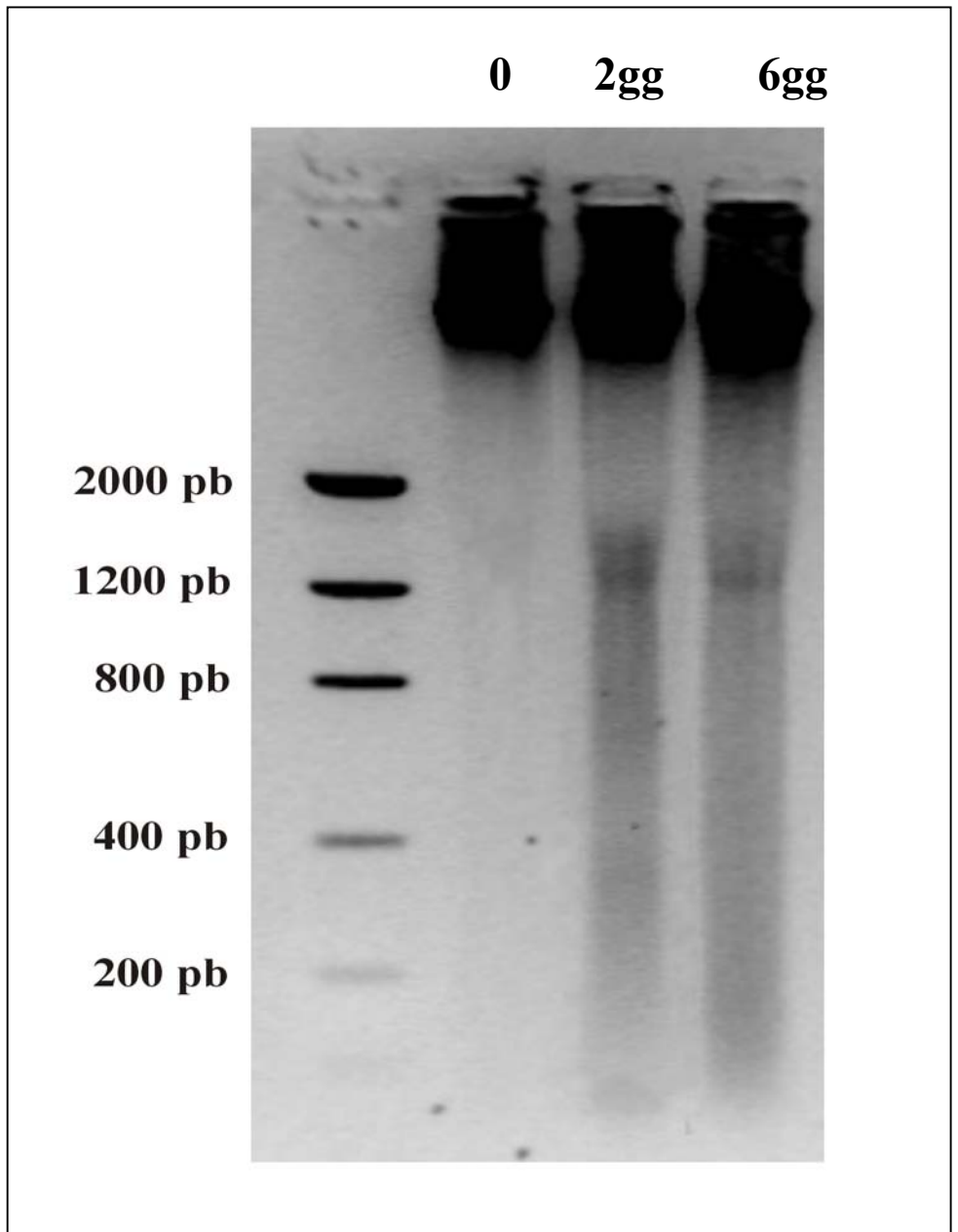


Fig. 39. Corsa elettroforetica su gel di agarosio di DNA estratto da cellule di *Cyanobacterium aponinum* cresciute a 30°C (0) e da cellule tenute per 2 giorni (2gg) e 6 giorni (6gg) a 45°C.

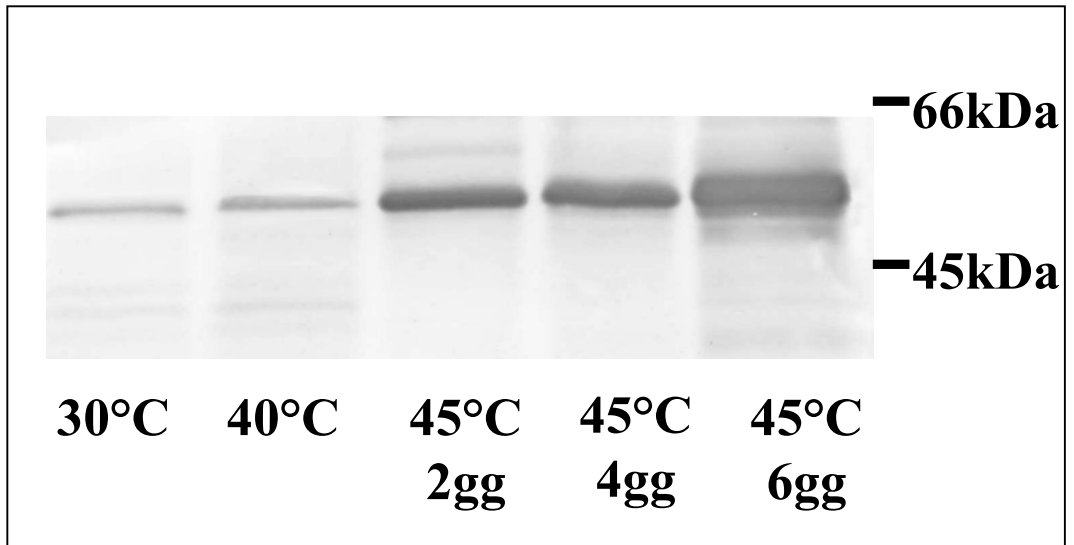


Fig. 40. Analisi Western del contenuto della proteina caspasi-3 in cellule di *Cyanobacterium aponinum* cresciute a 30°C e 40°C (controlli) e in cellule tenute per 2 giorni (2gg), 4 giorni (4gg) e 6 giorni (6gg) a 45°C.

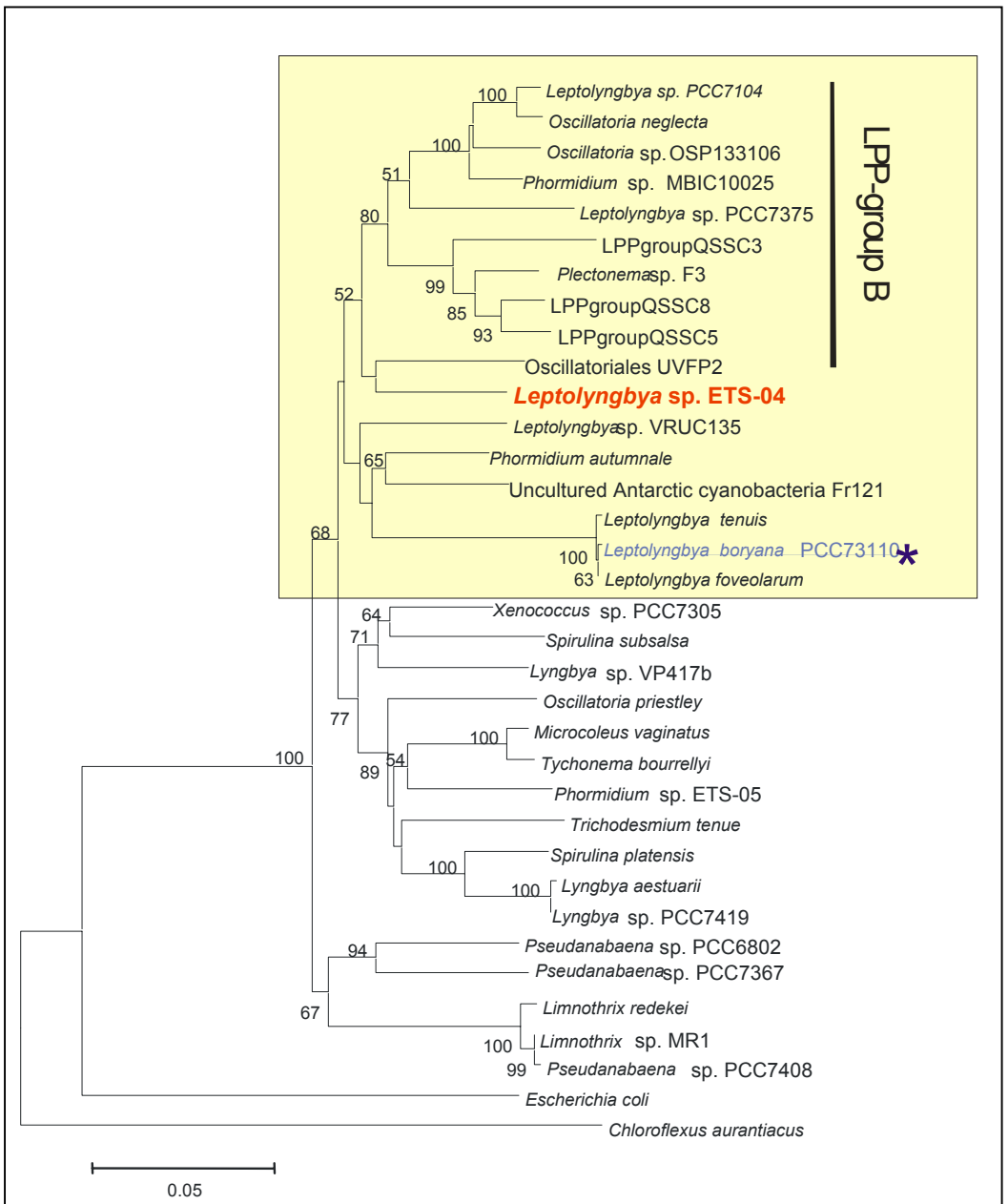


Fig. 41. NJ. Albero filogenetico basato sulle sequenze del 16S rDNA e costruito con il programma MEGA3.1. I numeri posti in prossimità dei nodi indicano i valori di bootstrap (>50) espressi in percentuale. In giallo è evidenziato il "cluster" comprendente vari taxa che sono da includere nel genere *Leptolyngbya*. In rosso è indicato il ceppo Euganeo oggetto di questa tesi ed indicato come *Leptolyngbya* sp. ETS-04. In blu è indicata la specie tipo del genere *Leptolyngbya* (*L. boryana*). In basso viene riportata la scala di distanza espressa sempre in valore percentuale.

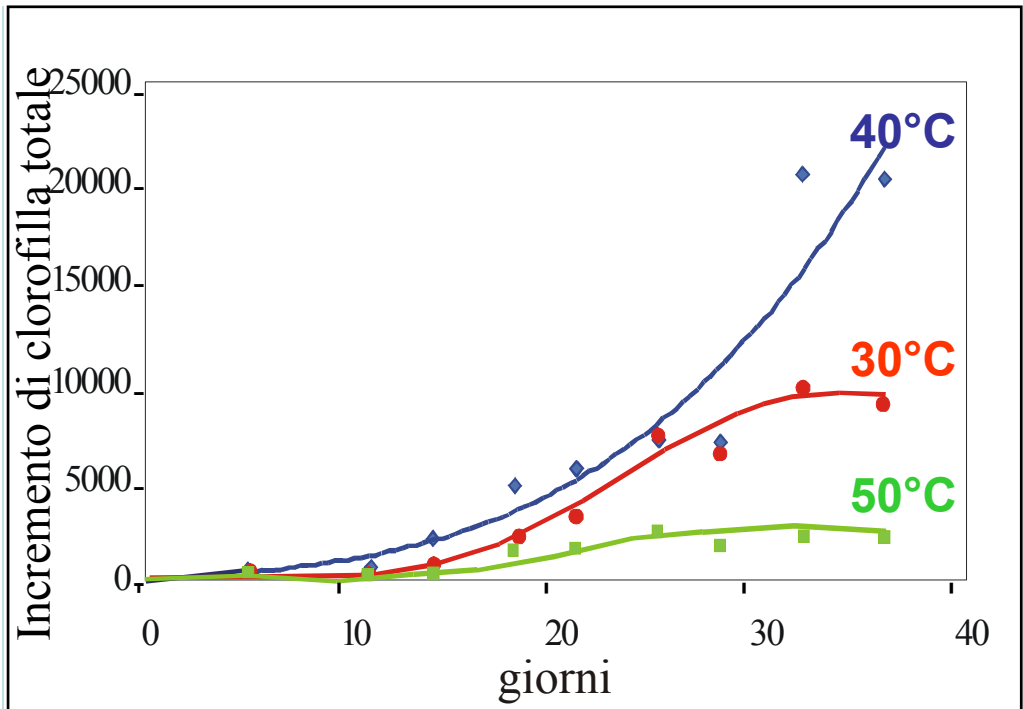


Fig. 42. Velocità di crescita di colture di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 alle diverse temperature, misurata come incremento del contenuto totale di clorofilla *a*.

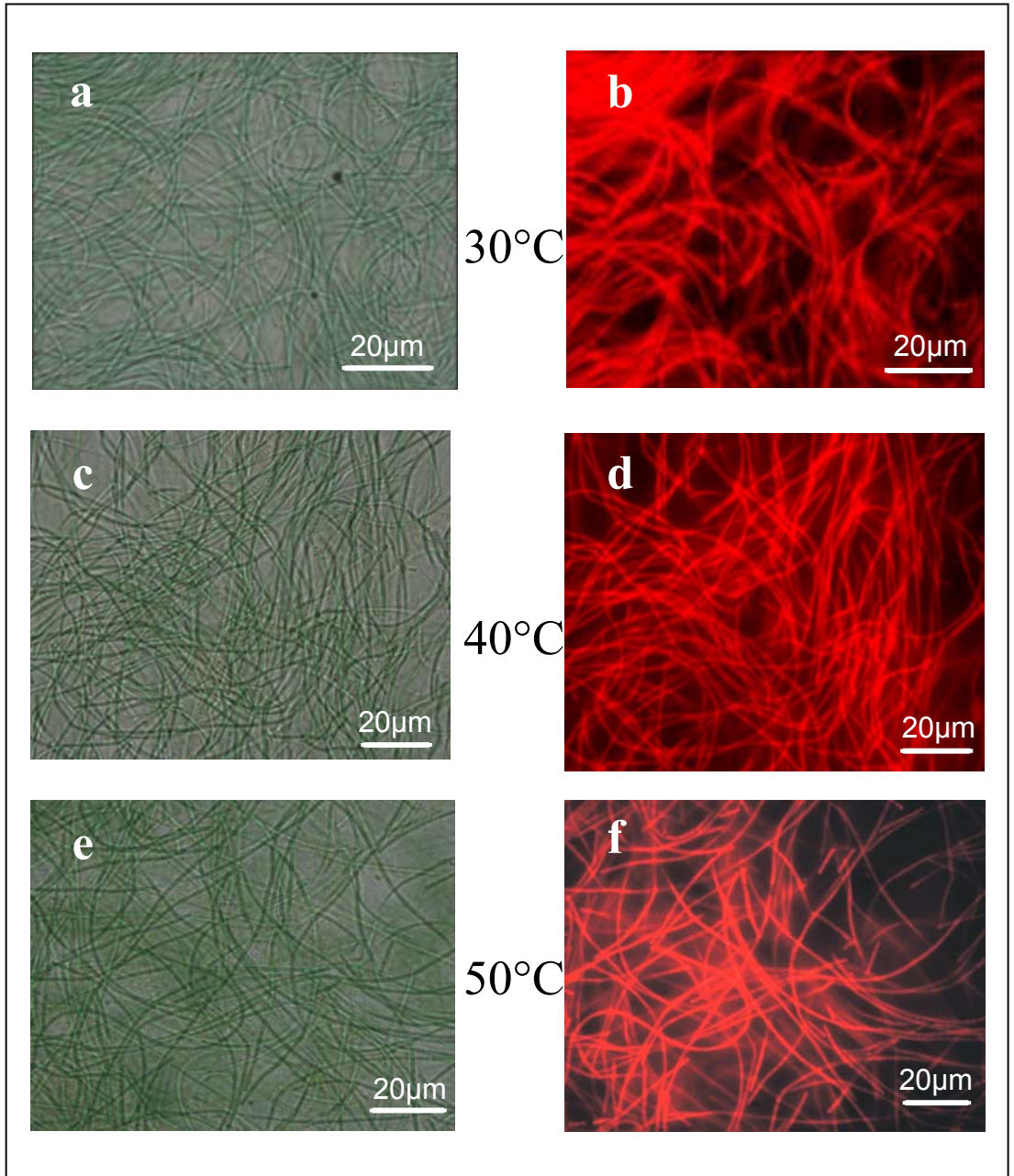


Fig. 43. Micrografie al microscopio ottico di intrecci dei filamenti di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 da colonie sviluppatesi alle tre temperature di crescita. Le figure a, c, e, mostrano i filamenti verde-azzurri del cianobatterio in luce visibile. Le figure b, d, f, mostrano l'autofluorescenza rossa della clorofilla degli stessi filamenti cianobatterici dopo eccitazione con luce UV.

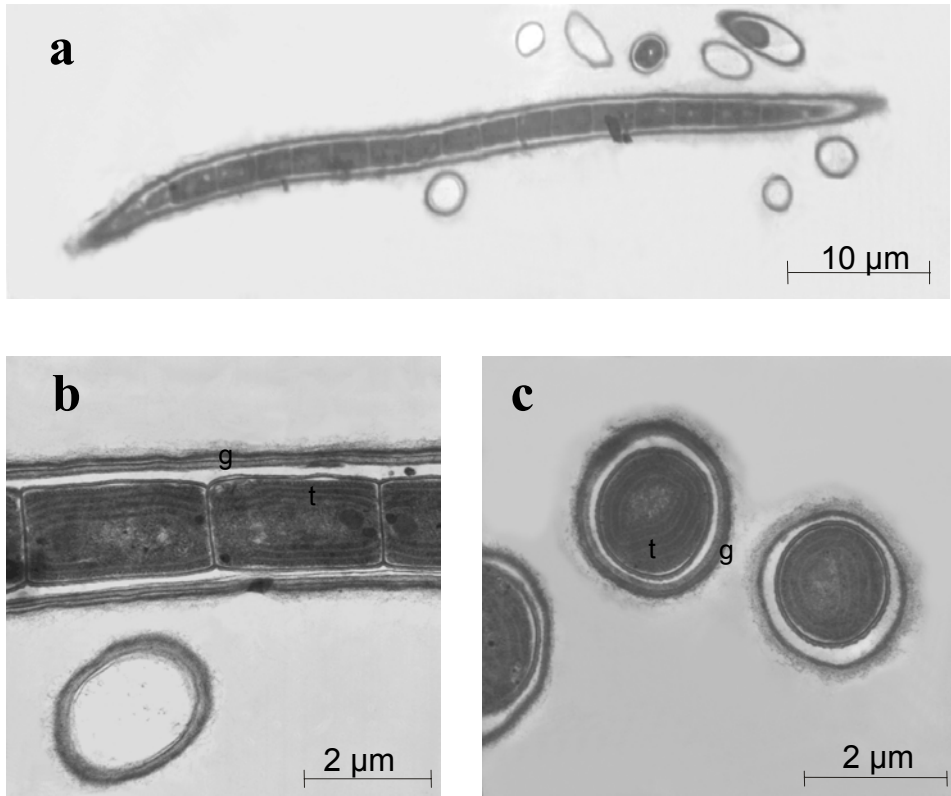


Fig. 44. Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 cresciuta a 30°C.

a. Sezione longitudinale di un filamento di *Leptolyngbya* sp. ETS-04.

b. Nel filamento di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 a più alto ingrandimento si distinguono le singole cellule contenenti ciascuna file di tilacoidi (t) paralleli. Notare la guaina extracellulare (g).

c. Sezione trasversale di cellule cianobatteriche (t = tilacoidi; g = guaina).

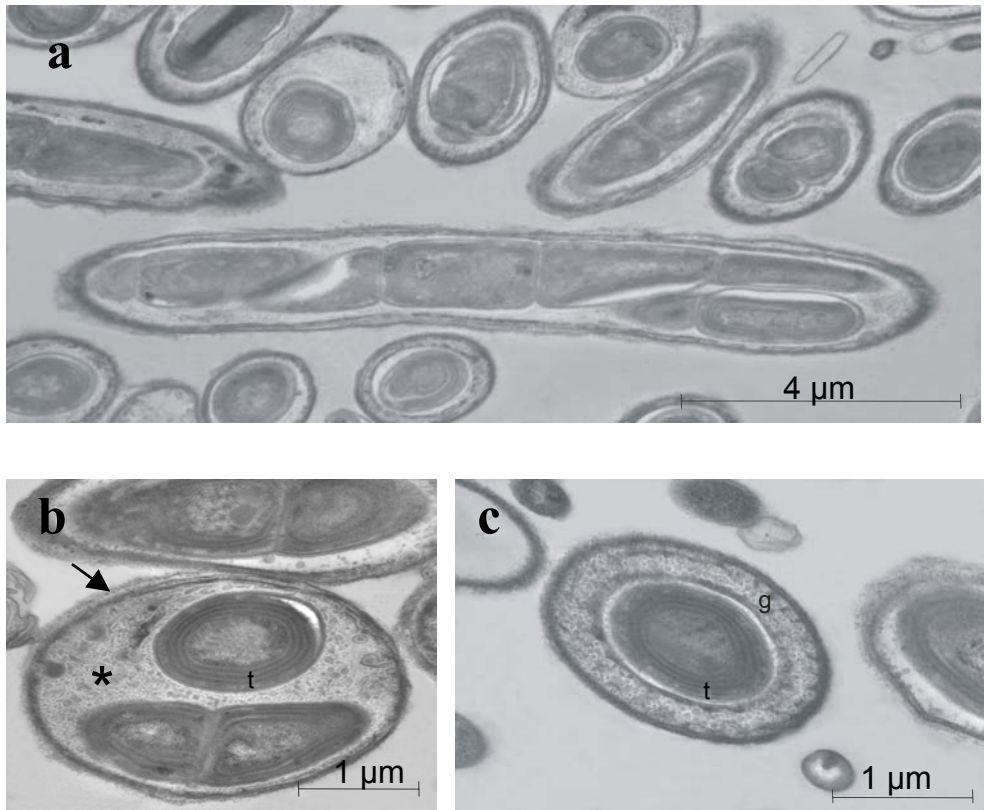


Fig. 45. Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 cresciuta a 50°C.

a. Sezione longitudinale di un filamento mostrante la disposizione irregolare delle cellule all'interno della guaina.

b. Più cellule cianobatteriche racchiuse in un'unica guaina extracellulare. Notare nella guaina la massa interna di materiale granulare-vescicolato (asterisco) e la regione esterna compatta della guaina (freccia). (t = tilacoidi).

c. Cellula singola di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 circondata dalla spessa guaina extracellulare (g) (t = tilacoidi).

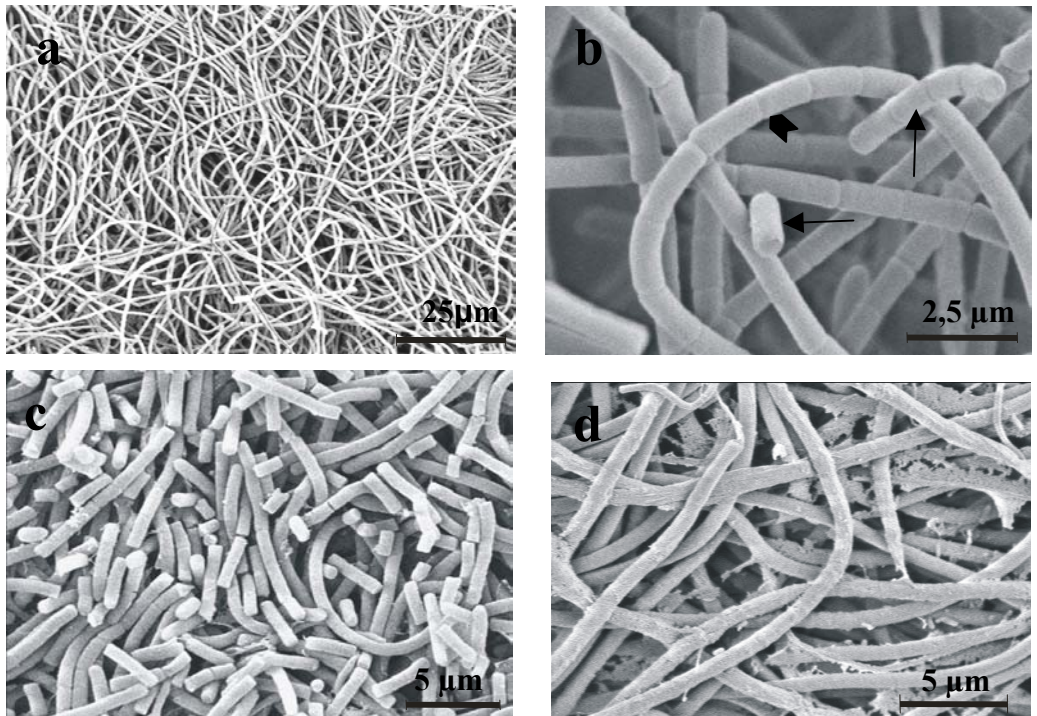


Fig. 46. Micrografie al microscopio elettronico a scansione di colture di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 cresciuta alle diverse temperature.

a. Micrografia di una coltura di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 cresciuta a 30°C mostrante l'intreccio dei filamenti cianobatterici.

b. Coltura cresciuta a 30°C. Si distinguono le singole cellule dei filamenti (punta di freccia) e alcuni ormogoni (frece).

c. Coltura cresciuta a 40°C. Notare l'elevata frammentazione dei filamenti.

d. Coltura cresciuta a 50°C. I filamenti hanno maggior spessore e non si distinguono le singole cellule che li compongono.

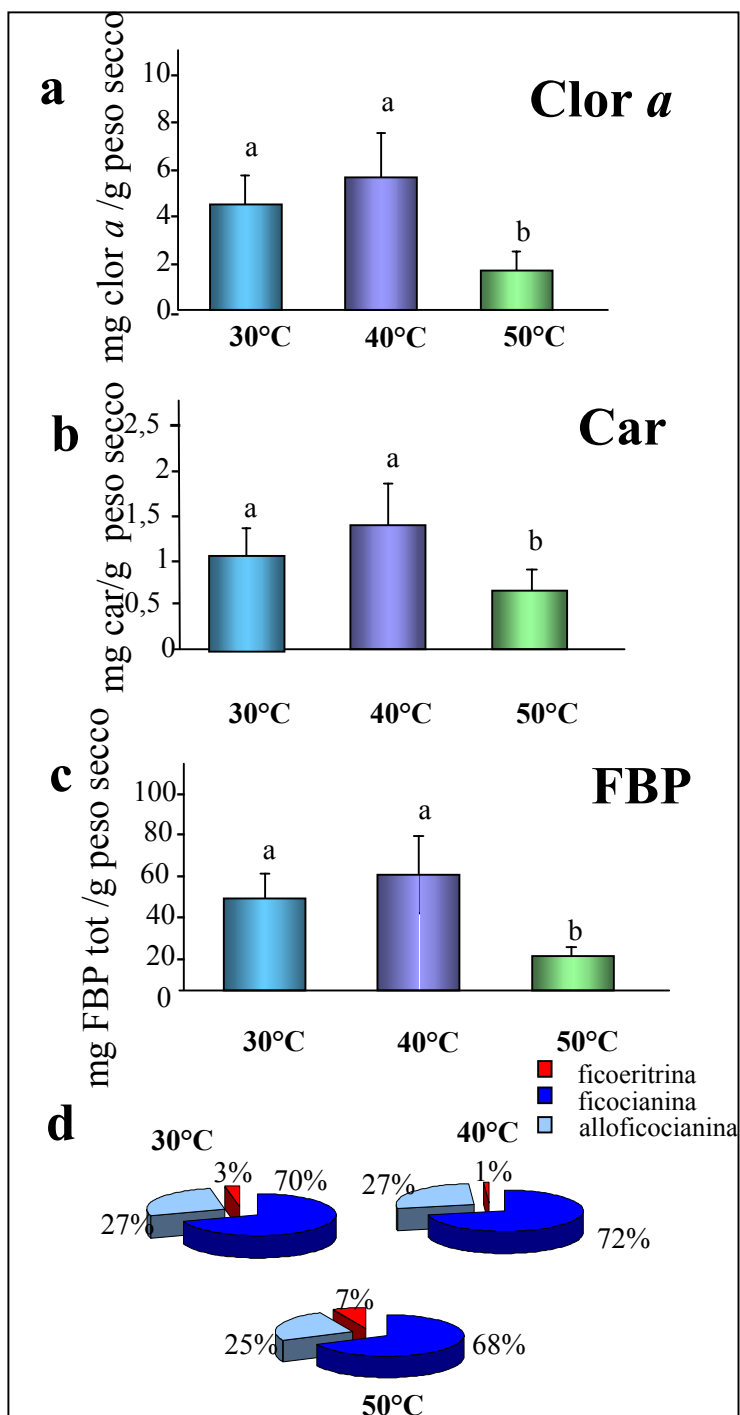


Fig. 47. Quantità di pigmenti fotosintetici, riferite a peso secco, in colture in fase esponenziale di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 cresciute a diverse temperature.

a. Contenuti in clorofilla a (Clor a).

b. Contenuti in carotenoidi (Car).

c. Contenuti in ficobiliproteine (FBP).

d. Percentuali delle diverse ficobiliproteine in colture di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 cresciute alle diverse temperature.

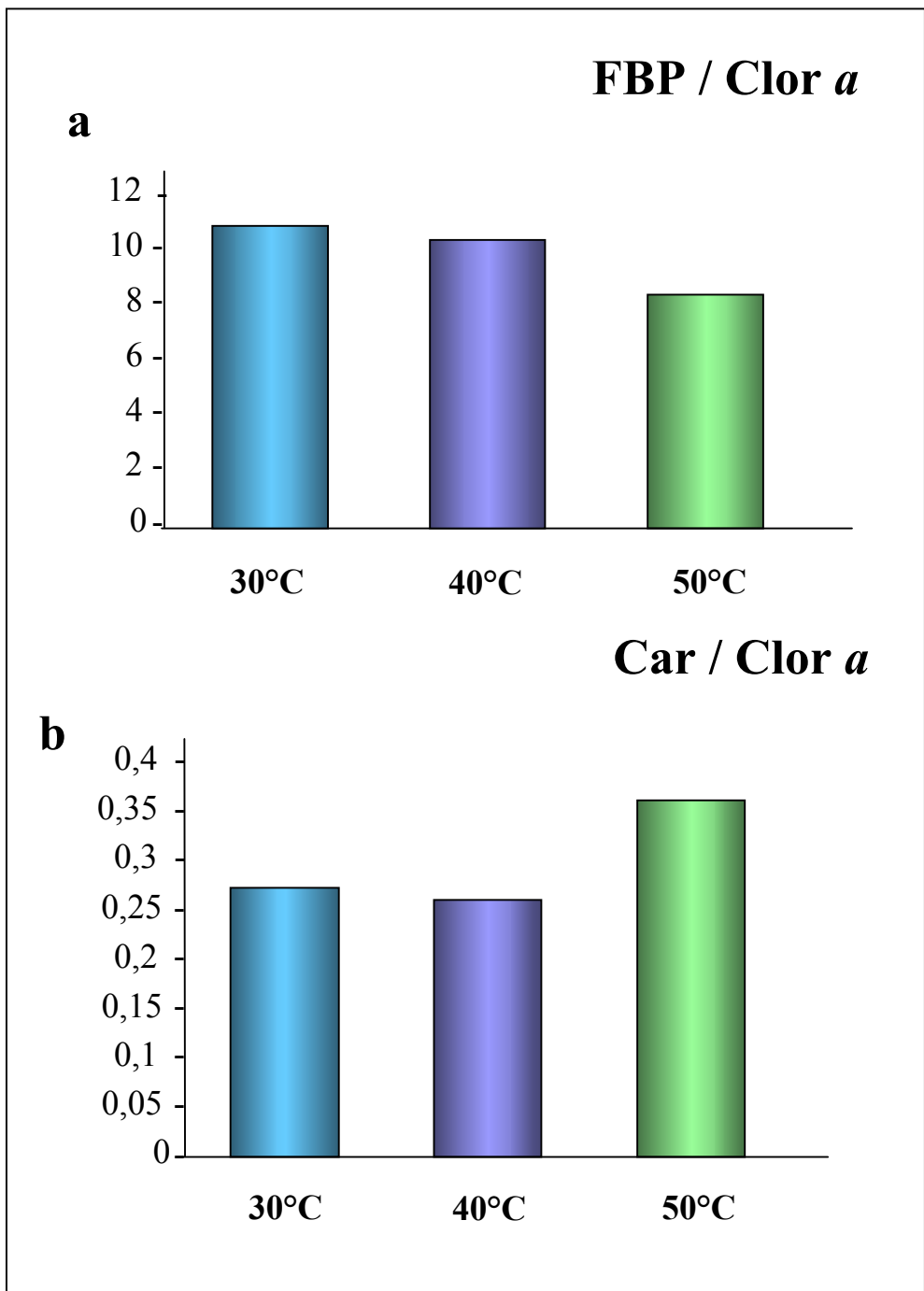


Fig. 48. Rapporti fra i diversi pigmenti fotosintetici in colture di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 cresciute alle diverse temperature.

a. Rapporto ficobiliproteine/clorofilla *a* (FBP/Clor *a*).

b. Rapporto carotenoidi/clorofilla *a* (Car/Clor *a*).

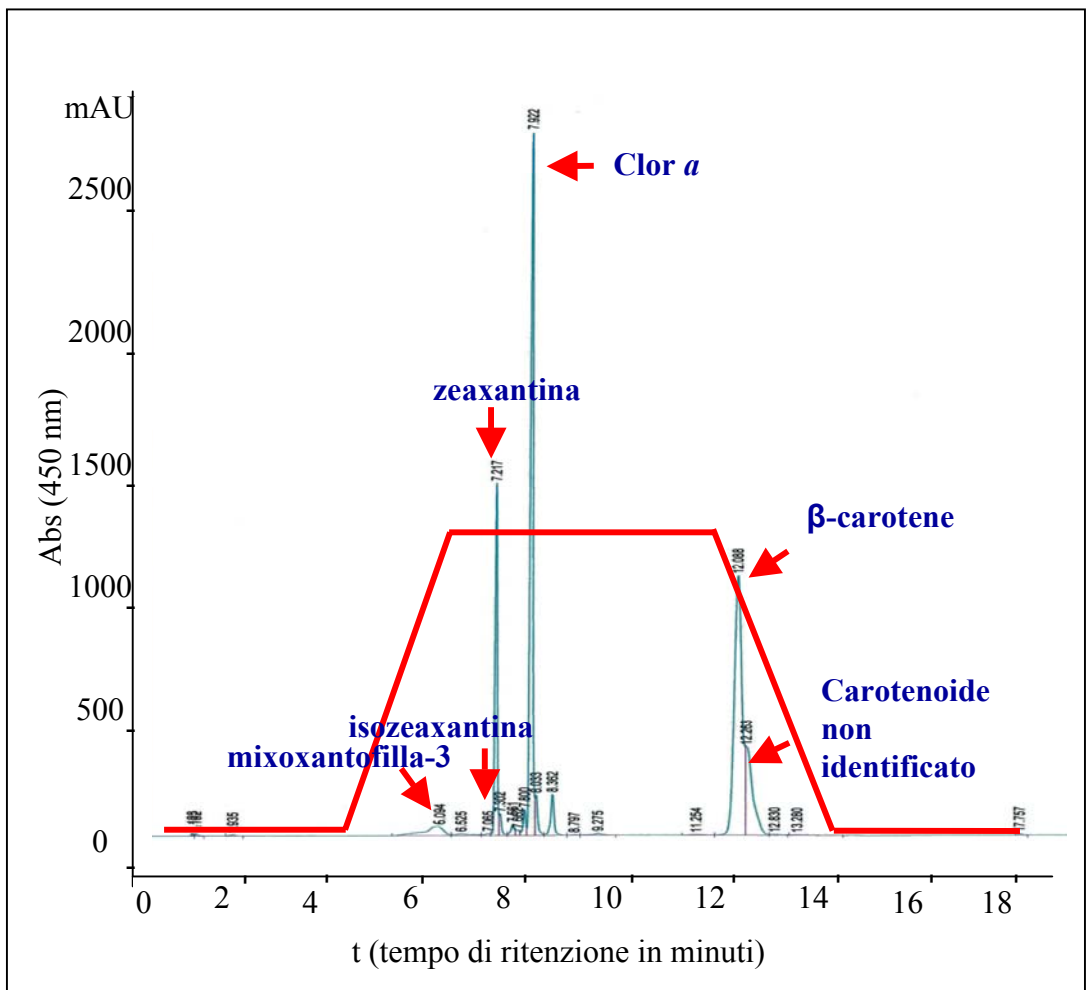


Fig. 49. Cromatogramma ottenuto con HPLC dei pigmenti fotosintetici di colture di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 cresciute a 30°C. La linea rossa indica l'andamento del flusso negli estratti della soluzione B da 0 a 100%.

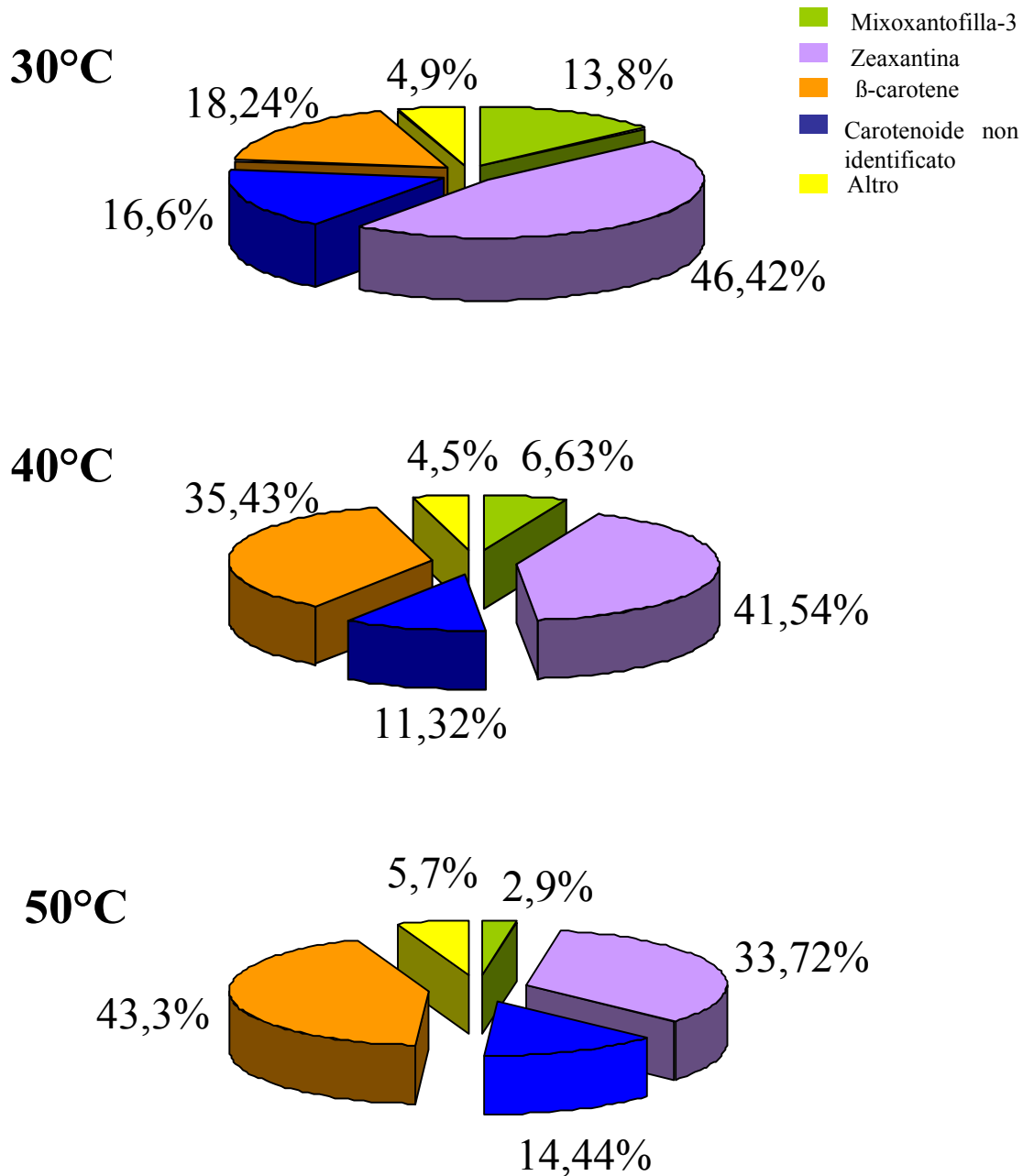


Fig. 50. Diagrammi a torta indicanti le percentuali dei diversi carotenoidi in colture in fase esponenziale di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 cresciute a diverse temperature. (Il termine “Altro” definisce la percentuale costituita dalla somma di una serie di picchi minimi e non attribuibili a pigmenti noti).

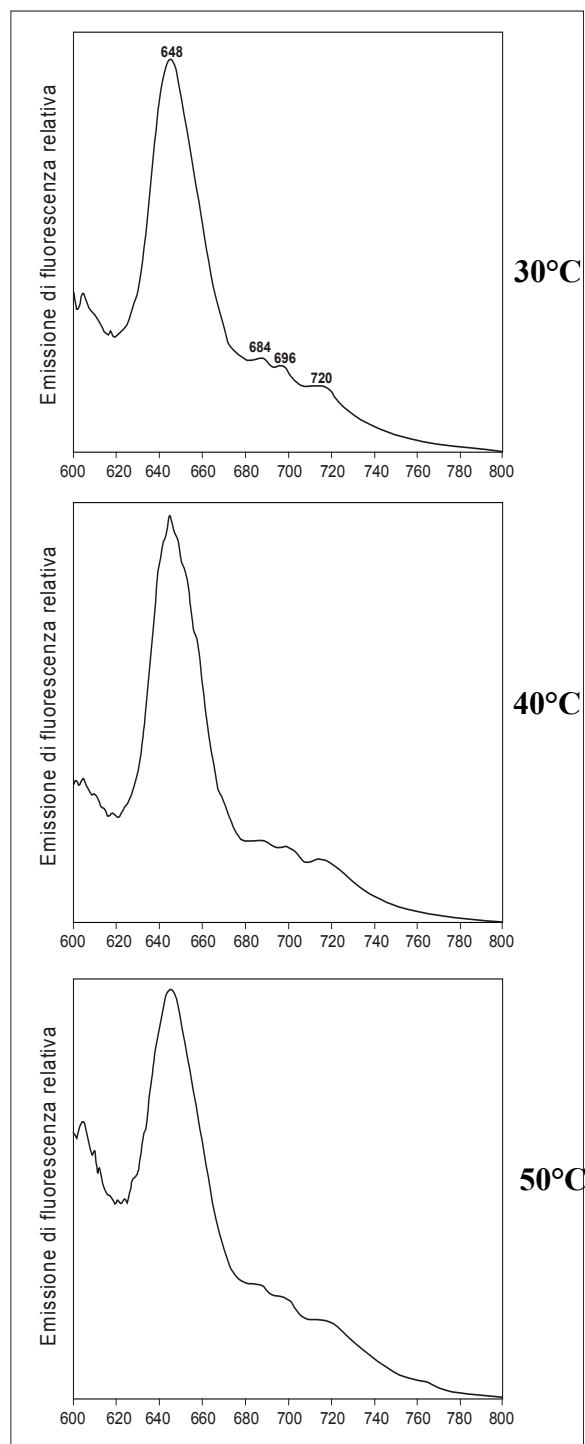


Fig. 51. Spettri di emissione di fluorescenza *in vivo* a 77K di colture di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 alle diverse temperature, ottenuti con luce di eccitazione a 560 nm.

Picchi di emissione:

648 nm = Ficocianina

684 nm = Clorofilla *a* del PSII (antenna)

696 nm = Clorofilla *a* del PSII (centro di reazione)

720 nm = Clorofilla *a* del PSI

Gli spettri sono stati normalizzati al picco più elevato.

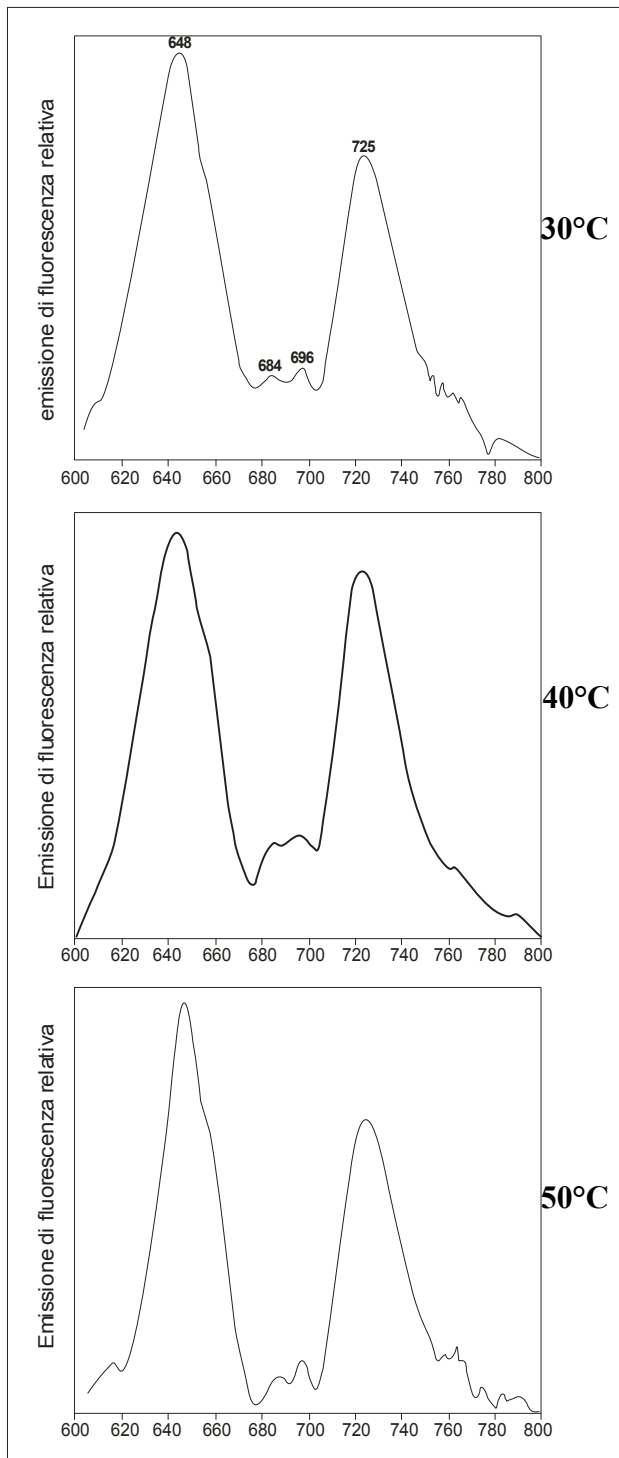


Fig. 52. Spettri di emissione di fluorescenza *in vivo* a 77K di colture di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 alle diverse temperature, ottenuti con luce di eccitazione a 440 nm.

Picchi di emissione:

648 nm = Ficocianina

684 nm = Clorofilla *a* del PSII (antenna)

696 nm = Clorofilla *a* del PSII (centro di reazione)

720 nm = Clorofilla *a* del PSI

Gli spettri sono stati normalizzati al picco più elevato.

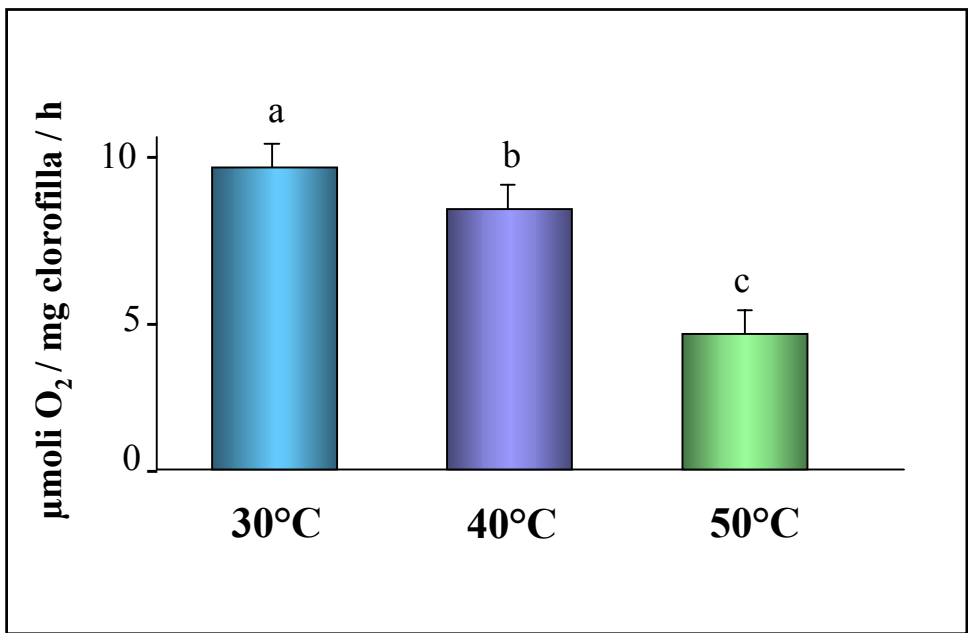


Fig. 53. Emissione di ossigeno fotosintetico *in vivo* alla luce di colture in fase esponenziale di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 cresciute alle tre diverse temperature. L'emissione di ossigeno è riferita a quantità di clorofilla *a*.

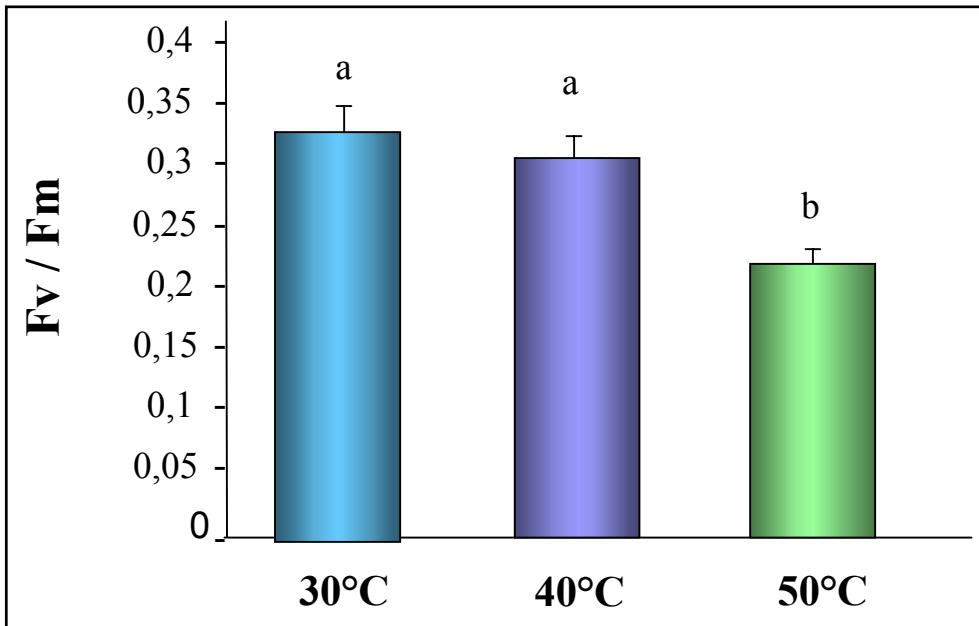


Fig. 54. Valori del rapporto F_v/F_m di colture in fase esponenziale di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 alle tre diverse temperature.

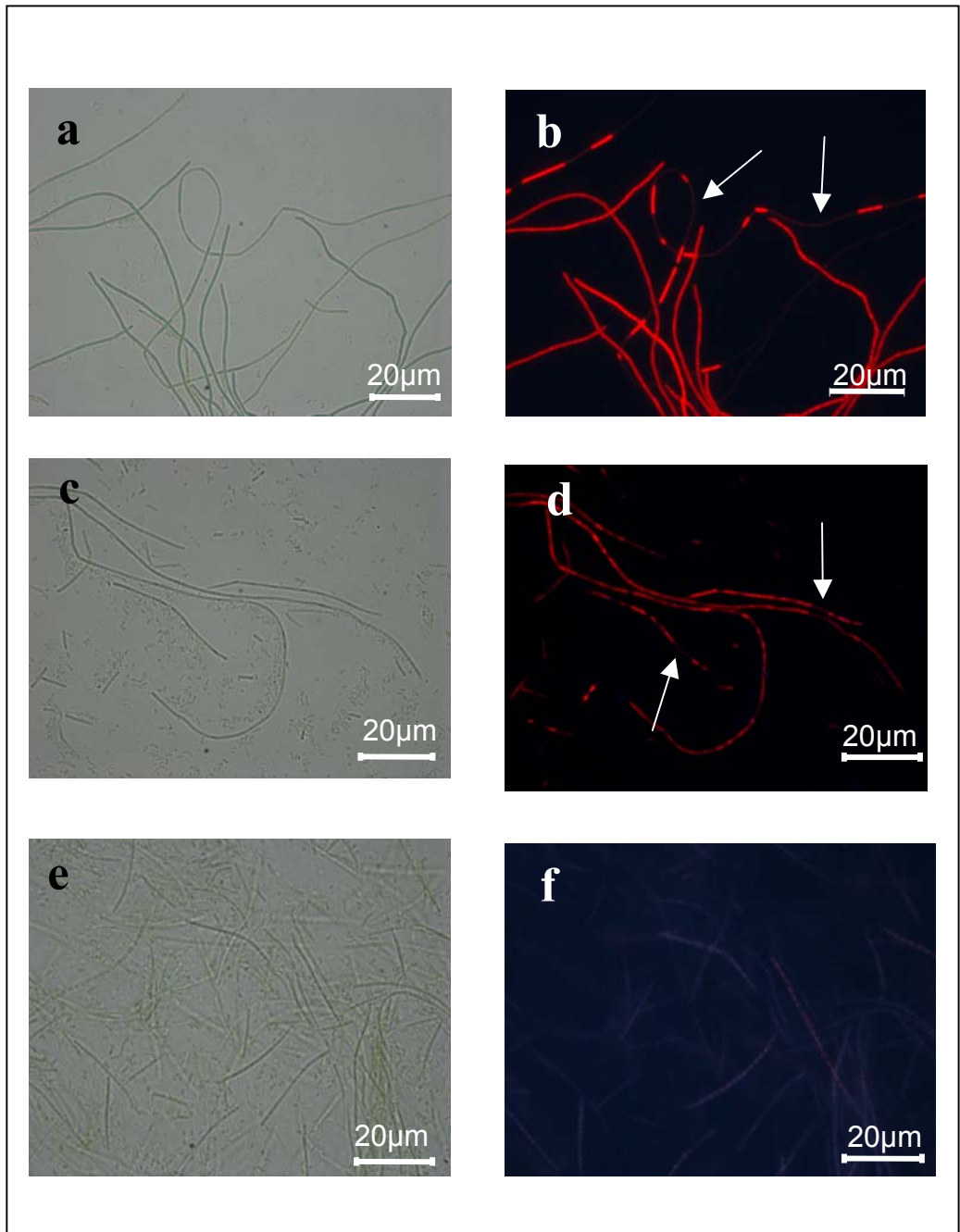


Fig. 55. Immagini al microscopio ottico di cellule di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 tenute per 1 giorno (a, b), 2 giorni (c, d) e 3 giorni (e, f) a 55°C. Le figure a destra (b, d, f) mostrano l'autofluorescenza rossa della clorofilla (dopo eccitazione con luce UV) delle cellule rappresentate nelle figure a sinistra (a, c, e).
 Notare nelle figure b e d la scomparsa della fluorescenza della clorofilla in alcune cellule di uno stesso filamento (freccie). Le cellule prive di clorofilla non emettono fluorescenza rossa. In figura f si osserva la totale perdita di emissione di fluorescenza da parte di interi filamenti.

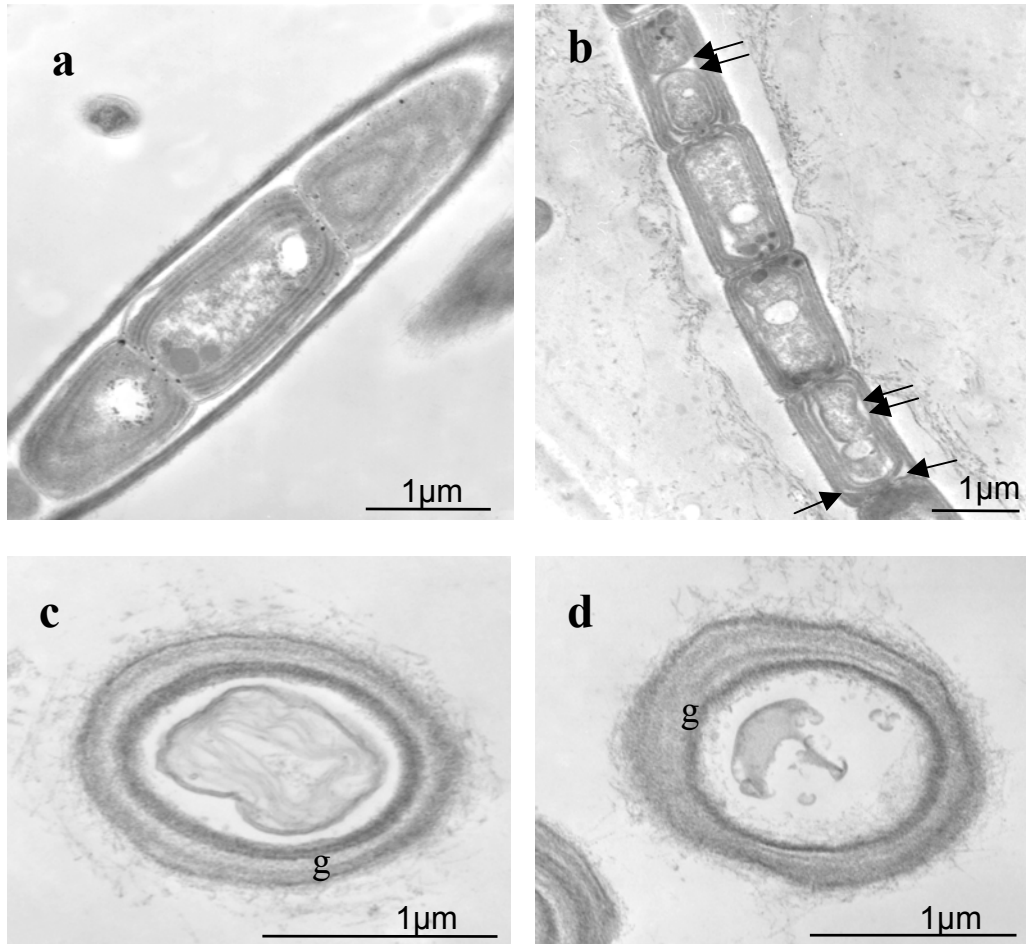


Fig. 56. Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 prima e dopo esposizione alla temperatura di 55°C.

a. Filamento di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 cresciuta a 40°C con cellule di aspetto normale.

b. Filamento esposto per un giorno a 55°C. Le cellule hanno tilacoidi dilatati (freccie) e citoplasmici alterati (doppie freccie).

c. Cellula esposta a 55°C e fortemente danneggiata. (g = guaina).

d. Cellula morta per esposizione a 55°C. (g = guaina).



Fig. 57. Feltro di *Oscillatoria duplisecta* ritrovato sulla superficie dell'acqua che ricopriva i fanghi di una vasca termale.

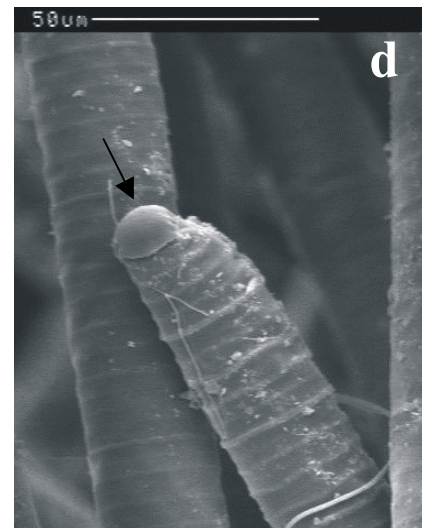
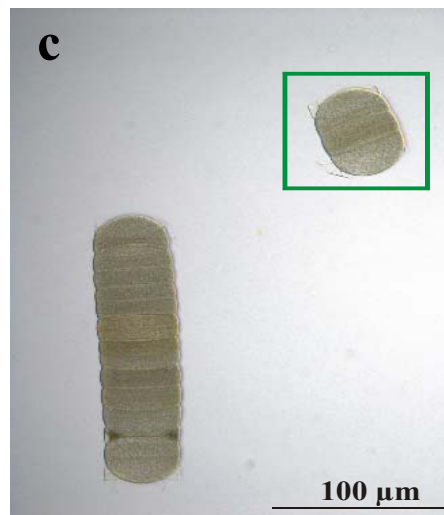
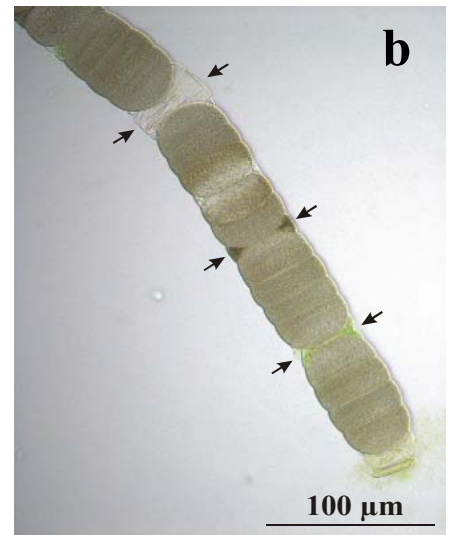
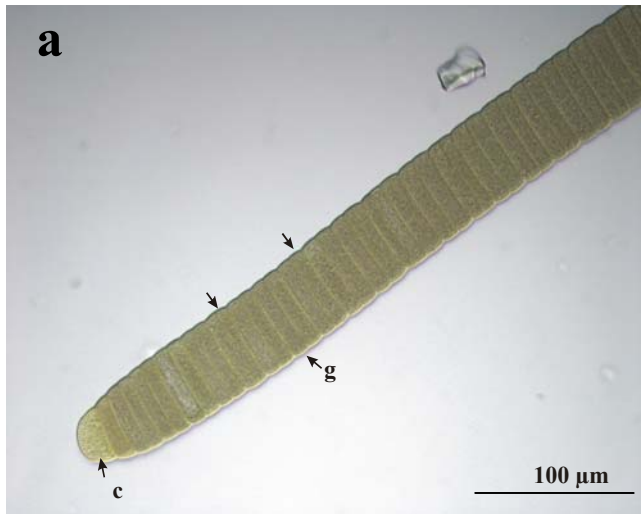


Fig. 58. Micrografie di *Oscillatoria duplisecta*.

a. Immagine al microscopio ottico di un tricoma di *Oscillatoria duplisecta*. Notare le costrizioni delle pareti trasversali (freccie), la sottile guaina che avvolge il tricoma (g) e la presenza della caliptra (c).

b. Immagine al microscopio ottico della frammentazione di un tricoma che avviene mediante l'ausilio di necridi (freccie).

c. Micrografia all'ottico mostrante un corto tricoma. Nel riquadro è visibile un ormogone appena formato.

d. Immagine al microscopio elettronico a scansione di tricomi di *Oscillatoria duplisecta*. Notare la presenza della caliptra (freccia).

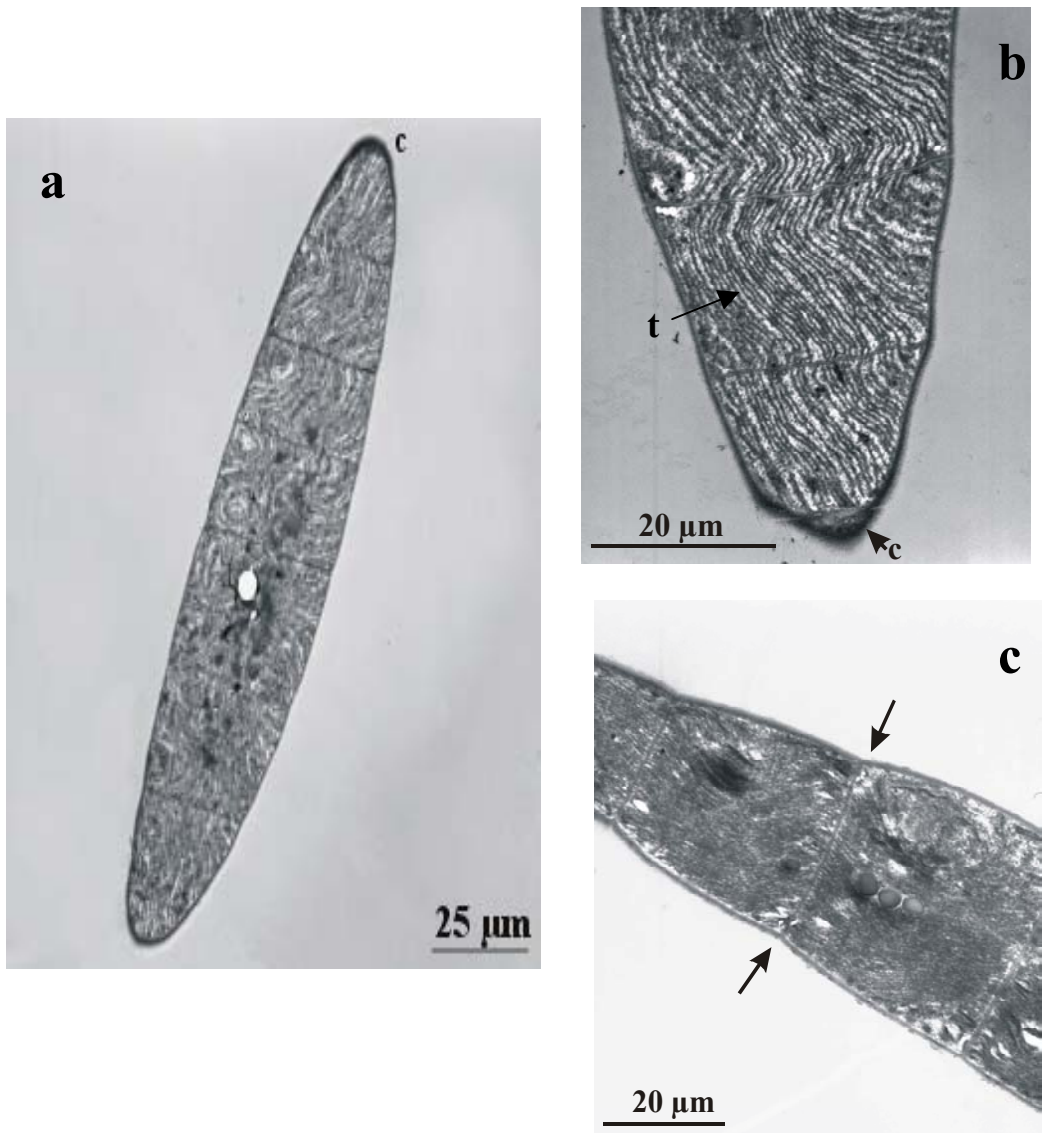


Fig. 59. Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione di *Oscillatoria duplisecta*.

a. Immagine al microscopio elettronico a trasmissione di un tricoma di *Oscillatoria duplisecta*. (c= caliptra).

b. Frammento apicale di un tricoma di *Oscillatoria duplisecta* mostrante numerosi tilacoidi paralleli tra di loro (t) e la caliptra (c).

c. Micrografia al TEM mostrante le costrizioni delle pareti trasversali di un tricoma (freccie) di *Oscillatoria duplisecta*.

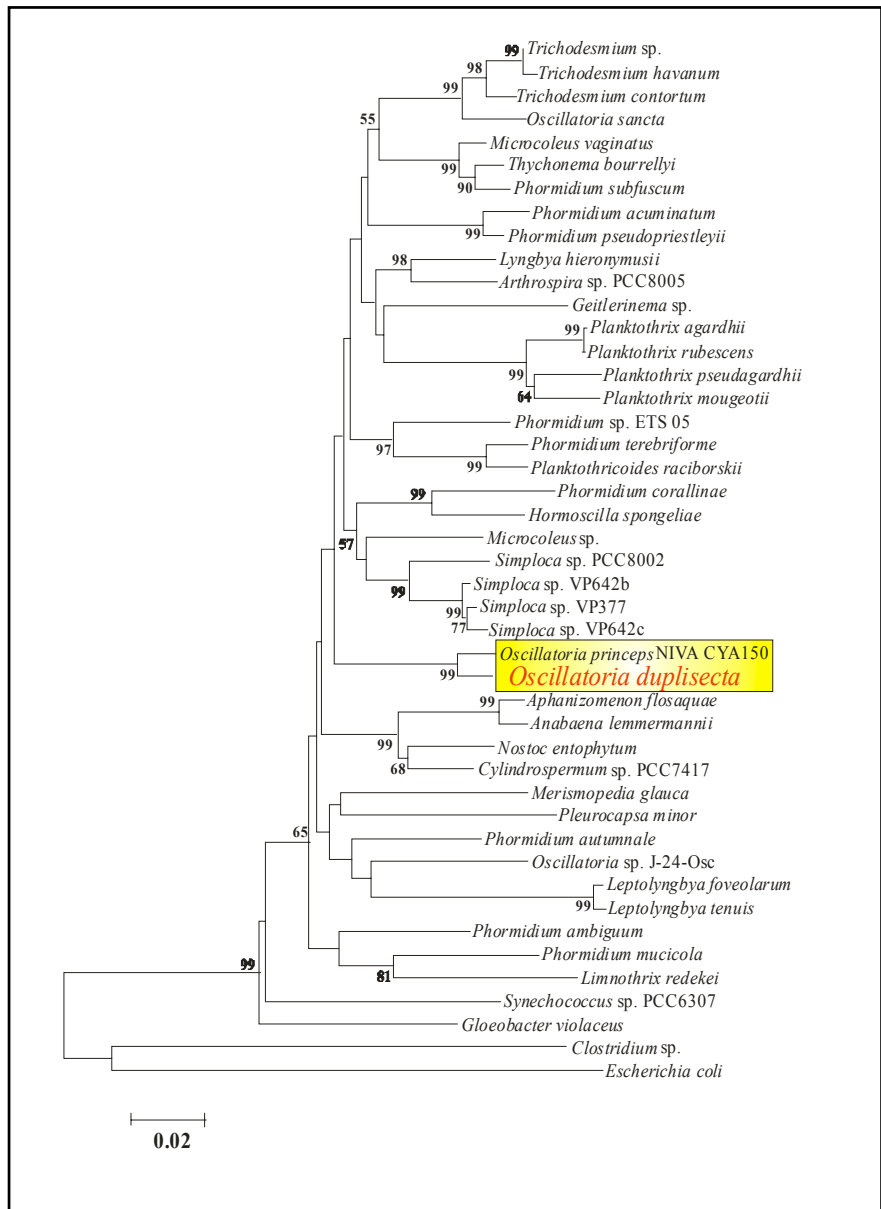


Fig. 60. NJ. Albero filogenetico basato sulle sequenze del 16S rDNA e costruito con il programma MEGA3.1. I numeri in prossimità dei nodi indicano i valori di bootstrap espressi in percentuale e > 50%. In giallo è evidenziato il “cluster” comprendente la specie tipo del genere *Oscillatoria* (*O. princeps*) ed il ceppo Euganeo (*Oscillatoria duplisecta*). Il riquadro verde, invece, evidenzia due taxa appartenenti al genere *Oscillatoria*. In basso è riportata la scala di distanza espressa sempre in valore percentuale.