



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE

INDIRIZZO BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA

XXIII CICLO

**TERMOTOLLERANZA, FISIOLOGIA E TASSONOMIA
DI CIANOBATTERI DEL COMPENSORIO
TERMALE EUGANEO**

Direttore della scuola: Ch.mo Prof. Giuseppe Zanotti

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giorgio Casadoro

Supervisore: Ch.mo Prof. Nicoletta Rascio

Dottorando: Maria Alessia Fuiano

31 Gennaio 2011



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE

INDIRIZZO BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA

XXIII CICLO

**TERMOTOLLERANZA, FISIOLOGIA E TASSONOMIA
DI CIANOBATTERI DEL COMPENSORIO
TERMALE EUGANEO**

Direttore della scuola: Ch.mo Prof. Giuseppe Zanotti

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giorgio Casadoro

Supervisore: Ch.mo Prof. Nicoletta Rascio

Dottorando: Maria Alessia Fuiano

31 Gennaio 2011

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA XXIII CICLO

Dottoranda: Maria Alessia Fuiano

RIASSUNTO

Titolo della Tesi:

TERMOTOLLERANZA, FISILOGIA E TASSONOMIA DI CIANOBATTERI DEL COMPRESORIO TERMALE EUGANEO

Sui fanghi delle vasche idrotermali del Comprensorio Termale Euganeo si sviluppano abbondanti popolazioni di cianobatteri, sia filamentosi che coccoidi, che formano spesse coperture compatte. Questi microrganismi fotosintetici ossigenici sono presenti su fanghi esposti a temperature molto variabili a seconda che la vasca che li contiene venga rifornita con acqua termale (ad elevata temperatura) o che venga mantenuta a riposo per un certo periodo.

Il presente progetto di ricerca si inserisce in un più ampio programma di studio della bioglea fotoautotrofa ossigenica del Comprensorio Termale Euganeo con l'obiettivo di approfondire le conoscenze su questi interessanti microrganismi termotolleranti dei quali, ancor oggi, si conosce poco sia dal punto di vista tassonomico che fisiologico ed adattativo.

Una ricerca articolata che integri aspetti strutturali, funzionali e tassonomici può fornire nuove informazioni sulla biodiversità di questi ambienti limitanti, sui meccanismi adattativi e sulla plasticità strutturale e metabolica degli organismi che li occupano.

Dei diversi tipi di cianobatteri, prelevati dalla superficie del fango delle vasche idrotermali di Abano Terme, sono stati considerati in questo studio due ceppi, ETS-09 ed ETS-10 (dove ETS sta per Euganean Thermal Spring), ottenuti in coltura pura mediante la tecnica della diluizione su piastra.

Le caratteristiche cellulari di ETS-09, rilevate con le iniziali indagini morfologiche ed ultrastrutturali, così come la sua composizione in pigmenti fotosintetici, suggerivano che l'organismo in esame potesse appartenere ai generi *Cyanothece*, *Halothece* o *Euhalothece*. ETS-09, come le specie del genere *Cyanothece*, era in grado di fissare l'azoto atmosferico. Questa capacità è stata dimostrata dal ritrovamento nel suo genoma dei geni *nifH* e *NifD* e dalla capacità dell'organismo di crescere in terreno privo di nutrienti azotati senza conseguenze sulla velocità di crescita e sulle caratteristiche cellulari. Dalla coltura di ETS-09 a diverse temperature è risultato che

la termotolleranza di questo microrganismo non era molto elevata, portandolo a sopravvivere, per un tempo limitato, a 45°-47°C.

I risultati delle analisi filogenetiche condotte utilizzando come *marker* molecolari i geni 16S rDNA ed *rbcL* sono state di particolare interesse, portando a suggerire che ETS-09 possa appartenere ad un genere nuovo filogeneticamente distante dai generi *Cyanothece*, *Halothece* ed *Euhalothece* a cui l'organismo era stato avvicinato inizialmente in base alle sue caratteristiche strutturali e fisiologiche.

Le indagini morfologiche, ultrastrutturali e fisiologiche condotte sul secondo cianobatterio coccoide (ETS-10) hanno evidenziato caratteristiche comuni con organismi del genere *Chroococcus*.

Il ritrovamento nel genoma dei geni *nifD* e *nifH* e la capacità di crescere in terreno privo di nutrienti azotati hanno dimostrato che anche ETS-10 era in grado di fissare N₂.

Dalle indagini condotte su colture allestite a diverse temperature è risultato, infine, che, analogamente al ceppo precedente, la termotolleranza di ETS-10 era piuttosto limitata permettendo al cianobatterio di sopravvivere solo per breve tempo a 45-47°C.

Nel caso di ETS-10, le analisi filogenetiche condotte utilizzando come *marker* molecolari i geni 16S rDNA ed *rbcL*, hanno confermato l'iniziale ipotesi di appartenenza del cianobatterio al genere *Chroococcus*. Le topologie ottenute, dopo un'analisi filogenetica utilizzando i due diversi *marker*, infatti, sono congruenti e indicano l'inclusione di ETS-10 in un clade comprendente la maggior parte di specie di *Chroococcus*. Dal momento che nei *data set* sono state inserite le sequenze di tutte le specie di *Chroococcus* disponibili in GenBank più quelle di tutte le specie di *Chroococcus* da me acquistate presso le banche algali, è possibile ipotizzare che ETS-10 possa appartenere ad una nuova specie del genere *Chroococcus* per cui si suggerisce il nome di *Chroococcus aponinus*.

THERMOTOLLERANCE, PHYSIOLOGY, AND TAXONOMY OF CYANOBACTERIA FROM THE EUGANEAN THERMAL DISTRICT

The muds of the hydrothermal tanks of the Euganean District (Padova, Italy) are colonized by populations of cyanobacteria, both coccoid and filamentous, which can adapt themselves to drastic and sudden changes of the water temperature.

This research project is part of a broader program of study on the oxygenic photoautotrophic biogeochemistry of the Euganean Thermal District. The aim of this study is to increase knowledge about these interesting thermotolerant organisms, of which little is known from a taxonomic, physiological, as well as adaptive point of view.

A research integrating the structural, functional and taxonomic aspects can provide new information on the biodiversity of these extreme environments and on the adaptive mechanisms and structural and metabolic plasticity of the organisms which colonize them.

This research deals with ETS-09 and ETS-10, two of the different cyanobacteria isolated from the muds of the hydrothermal tanks of the Euganean District.

The features of ETS-09 cells, derived from morphological and ultrastructural analyses, as well as its composition in photosynthetic pigments, suggested that this cyanobacterium could belong to *Cyanothece*, *Halothece* or *Euhalothece* genera.

Like *Cyanothece* strains, ETS-09 was able to fix atmospheric nitrogen, since it could grow well in an organic nitrogen-free medium without effects on the growth rate and cell characteristics. Moreover, a molecular analysis led to the finding of the *nifH* and *nifD* genes, coding for subunits of the enzyme nitrogenase, in its genome.

The analysis of ETS-09 cultures grown at different temperatures showed that the cyanobacterium thermotolerance was low, being it able to survive only some days at 45-47°C. The results of phylogenetic analyses, carried out using the 16S rDNA and *rbcL* genes as molecular markers, led to the hypothesis that ETS-09 may belong to a new genus, phylogenetically far from *Cyanothece*, *Halothece*, and *Euhalothece* genera.

Morphological, ultrastructural and physiological analyses carried out on the second cyanobacterium, ETS-10, showed features similar to strains belonging to the genus *Chroococcus*. The finding of *nifH* and *nifD* genes in its genome and the ability of growing in a medium without organic nitrogen proved that also ETS-10 was able to fix nitrogen.

Finally, also in this case, analyses performed on cultures grown at different temperatures showed that the thermotolerance of ETS-10 was quite limited, being the organism able to live at 45-47°C only for short time. The phylogenetic analyses, based on the 16S rDNA and *rbcL* genes, confirmed the initial hypothesis that the cyanobacterium belongs to the genus *Chroococcus*. In fact, the obtained topologies were congruent and indicated the inclusion of ETS-10 in a clade with most of the

Chroococcus species. As the constructed data sets included all the *Chroococcus* sequences available in GenBank plus the sequences of all the *Chroococcus* species obtained from international culture collection, we hypothesize that ETS-10 could be a new species of the genus *Chroococcus*, for which we suggest the name *Chroococcus aponinus*.

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
<i>1.1 I CIANOBATTERI.....</i>	1
1.1.1 Caratteristiche cellulari dei cianobatteri.....	2
1.1.2 Apparato fotosintetico dei cianobatteri	5
1.1.3 Cianobatteri azotofissatori.....	10
<i>1.2 CLASSIFICAZIONE E TASSONOMIA DEI CIANOBATTERI</i>	12
<i>1.3 ORGANISMI ESTREMOFILI</i>	15
<i>1.4 L'AMBIENTE TERMALE EUGANEO.....</i>	16
2. SCOPO.....	19
3. MATERIALI E METODI.....	21
<i>3.1 RACCOLTA E ISOLAMENTO IN COLTURA DEI CIANOBATTERI.....</i>	21
<i>3.2 ALLESTIMENTO E RINNOVO DELLE COTURE CIANOBATTERICHE</i>	22
<i>3.3 MISURAZIONE DELLA CRESCITA DELLE COLTURE CIANOBATTERICHE</i>	22
<i>3.4 ANALISI MORFOLOGICHE, ULTRASTRUTTURALI E FISIOLOGICHE.....</i>	23
3.4.1 Osservazione del materiale fresco al microscopio ottico	23
3.4.2 Microscopia elettronica a scansione (SEM).....	23
3.4.3 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)	23
3.4.4 Colorazioni per la microscopia ottica.....	24
3.4.5 Colorazioni per la microscopia elettronica a trasmissione	25
<i>3.5 ANALISI DELL'ASSETTO PIGMENTARIO DEI CIANOBATTERI</i>	26
3.5.1 Analisi dei pigmenti fotosintetici idrosolubili con metodo spettrofotometrico....	26
3.5.2 Analisi dei pigmenti fotosintetici liposolubili con metodo spettrofotometrico	27
3.5.3 Analisi dei carotenoidi mediante HPLC (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)	27
<i>3.6 ELABORAZIONE STATISTICA DEI DATI.....</i>	28
<i>3.7 ANASISI MOLECOLARI</i>	28
3.7.1 Selezione e mantenimento in coltura di ulteriori ceppi cianobatterici	28
3.7.2 Estrazione e quantificazione del DNA	29
3.7.3 Amplificazione del DNA mediante PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	29
3.7.4 Analisi dei prodotti di PCR, purificazione e successivo sequenziamento.....	30
3.7.5 Selezione dei dati e allineamento delle sequenze.....	31
3.7.6 Analisi filogenetiche.....	32
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	33
<i>4.1 ETS-09.....</i>	33
4.1.1 Crescita del cianobatterio ETS-09 a 30°C.....	33
4.1.2 Morfologia delle cellule cianobatteriche al microscopio ottico	33
4.1.3 Ultrastruttura delle cellule cianobatteriche al microscopio elettronico a scansione e a trasmissione	34

4.1.4	Contenuti in pigmenti fotosintetici delle cellule cianobatteriche	36
4.1.5	Capacità di azoto-fissazione del cianobatterio ETS-09	36
4.1.6	Crescita delle colture in terreno privo di nutrienti azotati e caratteristiche delle cellule cianobatteriche	37
4.1.7	Crescita delle colture di ETS-09 a 40°C.....	38
4.1.8	Caratteristiche delle cellule cianobatteriche cresciute a 40°C	39
4.1.9	Il limite di termo-tolleranza di ETS-09	40
4.1.10	La morte di ETS-09 a 50°C	40
4.1.11	Indagine molecolare della posizione filogenetica di ETS-09	41
4.1.12	Conclusioni ETS-09	43
Documentazione dei dati sperimentali ETS-09		
4.2	ETS-10.....	45
4.2.1	Crescita del cianobatterio ETS-10 a 30°C.....	45
4.2.2	Morfologia delle cellule cianobatteriche al microscopio ottico.....	45
4.2.3	Ultrastruttura delle cellule cianobatteriche al microscopio elettronico a scansione e a trasmissione.....	45
4.2.4	Contenuti in pigmenti fotosintetici delle cellule cianobatteriche	47
4.2.5	Capacità di azoto-fissazione del cianobatterio ETS-10	48
4.2.6	Crescita delle colture in terreno privo di nutrienti azotati e caratteristiche delle cellule cianobatteriche	48
4.2.7	Crescita delle colture di ETS-10 a 40°C.....	49
4.2.8	Caratteristiche delle cellule cianobatteriche cresciute a 40°C	50
4.2.9	Il limite di termo-tolleranza di ETS-10	52
4.2.10	La morte di ETS-10 a 50°C	53
4.2.11	Analisi molecolari	53
4.2.12	Conclusioni ETS-10	56
Documentazione dei dati sperimentali ETS-10		
BIBLIOGRAFIA		59

1. INTRODUZIONE

1.1 I CIANOBATTERI

I cianobatteri sono un gruppo molto eterogeneo di organismi procarioti fotoautotrofi e costituiscono uno dei principali *phyla* di eubatteri, quello delle Cyanophyta (o Cyanobacteria) (Woese, 1987); impropriamente chiamati fino a poco tempo fa “alghe azzurre” o “alghe blu-verdi” (Pupillo *et al.*, 2003), sono stati i principali protagonisti della storia naturale del nostro pianeta. Nel tracciare il corso dell’evoluzione e dei mutamenti ecologici essi rappresentano una svolta decisiva nell’evoluzione del processo fotosintetico (Pasqua *et al.*, 2008). I reperti fossili e la filogenesi molecolare hanno datato la loro origine al Precambiano. Formazioni rocciose di origine biogenica, chiamate stromatoliti, sono state trovate in depositi fossili vecchi di 2,7 miliardi di anni. Queste stromatoliti si sono formate quando l’ossigeno ancora non era presente nell’atmosfera primordiale e si pensa che possano esser state costruite da organismi molto simili agli attuali cianobatteri che, evolvendo ossigeno grazie alla fotosintesi, diedero inizio alla trasformazione dell’atmosfera della Terra da riducente a ossidante (Mauseth, 2006).

I cianobatteri, considerati organismi ubiquitari e dalle notevoli capacità pionieristiche (Van den Hoek *et al.*, 1995), 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. Oltre a ciò esistono segnalazioni di alcune specie di cianobatteri termofili appartenenti più comunemente ai generi *Synechococcus*, *Mastigocladus* e *Phormidium* (Castenholz, 1968; Anagnostidis and Komárek, 1988; Miller and Castenholz, 2000). Questi microorganismi tollerano temperature di 50°C-60°C (Edwards *et al.*, 1997, Balme *et al.*, 2001), arrivando, nel caso unico di *Synechococcus lividus*, all'estremo di 73°C, che è la più alta temperatura sopportata da un organismo fotoautotrofo (Edwards *et al.*, 1997).

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 and Jüttner, 1996; Gleason and 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. A proposito 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.

1.1.1 Caratteristiche cellulari dei cianobatteri

I cianobatteri sono organismi procarioti fotoautotrofi appartenenti al gruppo degli Eubatteri Gram negativi. Sono organismi unici nel loro genere poiché rappresentano i soli procarioti a svolgere una fotosintesi ossigenica simile a quella delle piante superiori in cui due fotosistemi (PSI e PSII) sono connessi in serie.

Questi organismi presentano una notevole diversificazione morfologica e dimensionale; a questo gruppo appartengono infatti specie con dimensioni variabili da 0,2 μm a 200 μm , sia unicellulari coccoidi che filamentose. In quest'ultimo caso le cellule sono impilate l'una sull'altra a formare lunghi filamenti (detti tricomi), che possono essere ramificati o uniseriati. Ci sono, inoltre, alcune specie in cui le singole cellule sono tenute insieme da una guaina mucillaginosa a formare aggregazioni, chiamate colonie. Tra le specie filamentose se ne conoscono alcune che sviluppano una vera e propria differenziazione a livello strutturale e funzionale delle diverse cellule che le compongono. Esse formano, infatti, cellule particolari, dette eterocisti, che non conducono la fotosintesi ossigenica e sono circondate da una parete estremamente spessa. Queste cellule rappresentano i siti per la fissazione dell'azoto

atmosferico che comporta una reazione biochimica svolta attraverso un sistema enzimatico chiamato nitrogenasi.

Molti cianobatteri filamentosi che formano eterocisti sviluppano anche un secondo tipo cellulare chiamato acinete. Gli acineti sono simili a spore che possono germinare quando le condizioni sono favorevoli alla crescita. Queste forme di resistenza permettono all'organismo di sopravvivere durante i periodi sfavorevoli e rappresentano uno dei metodi riproduttivi adottati dai cianobatteri. Oltre a questo tipo, la riproduzione vegetativa può avvenire attraverso scissione binaria (forme unicellulari) o frammentazione del filamento (generi filamentosi); la riproduzione sessuale, invece, è assente e il trasferimento genetico avviene attraverso lo scambio di plasmidi (Van den Hoek et al., 1995).

Come tutti i procarioti, i cianobatteri hanno cellule prive di compartimentazione interna (Van den Hoek *et al.*, 1995) anche se l'organizzazione cellulare risulta più complessa perché presentano un sistema interno di membrane tilacoidali, dove risiedono i componenti delle catene di trasferimento elettronico fotosintetica e respiratoria.

Strutturalmente le singole cellule sono delimitate da un rivestimento (*envelope*) composto da quattro strati: uno strato elettroneutro, a contatto con il plasmalemma (la cui composizione non è stata ancora del tutto chiarita); un'altro intermedio, più rigido, di mureina (un peptidoglicano), e due strati esterni lipopolisaccaridici, che complessivamente costituiscono la membrana esterna (Wolk, 1973). In molti casi, esternamente all' *envelope*, possiamo trovare un ulteriore rivestimento cellulare formato da una massa gelatinosa di polisaccaridi idrati con funzione di protezione dell'organismo (Gantt, 1994).

A seconda del loro spessore e della loro struttura si distinguono tre diversi tipi di polisaccaridi extracellulari (EPS) prodotti dai cianobatteri: guaina, capsula e mucillagine (De Philippis and Vincenzini, 1998). In particolare, con il termine di "mucillagine" si intende il materiale gelatinoso disperso intorno all'organismo, ma che non riflette la forma delle cellule; si definisce "capsula" uno strato spesso e compatto dai contorni definiti e "guaina" uno strato sottile a contatto con la cellula o addirittura gruppi di cellule, visibile al microscopio ottico anche senza colorazione. Gli EPS risultano essere composti di almeno dieci diversi tipi di monosaccaridi, dei quali il più abbondante è generalmente il glucosio, seguito da galattosio, mannosio e ramnosio (De Philippis and Vincenzini, 1998). Sembra che gli EPS siano prodotti in risposta a vari fattori ambientali, fornendo alla cellula protezione contro situazioni di stress, come il disseccamento, e giocando un ruolo importante nell'ancoraggio al substrato e nel movimento (De Philippis and Vincenzini, 1998; Tamaru *et al.*, 2005). L'interno della cellula è occupato principalmente dalle membrane tilacoidali che si estendono dalla membrana plasmatica; sono presenti, inoltre, materiale nucleare ammassato in posizione centrale in una regione denominata nucleoplasma, ribosomi 70S, vescicole gassose che regolano il galleggiamento (Fig. A).

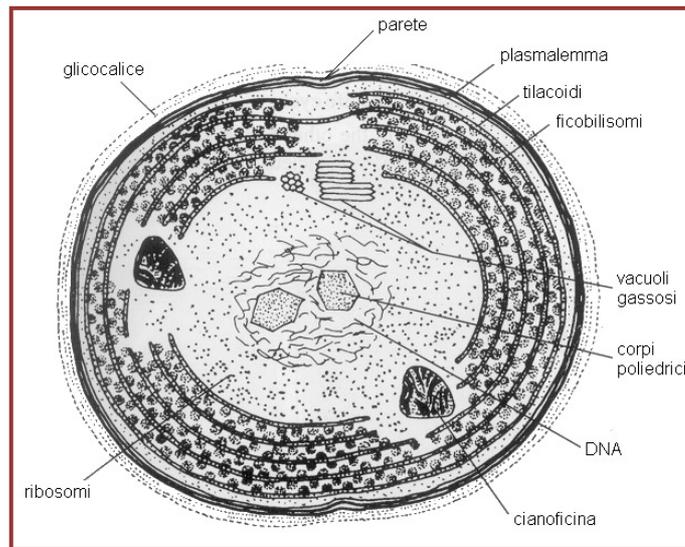


Figura A. Rappresentazione schematica di una cellula ciano batterica (Pupillo *et al.*, 2003)

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 and Herrero, 1994) e granuli di polifosfato, che servono come riserva di fosfato.

Molto importante è l'accumulo di "amido delle Cyanophyceae", un glucano molto simile al glicogeno e all'amilopectina presente nell'amido delle piante superiori. Questi granuli sono normalmente dislocati tra i tilacoidi.

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

I lipidi sono tra le più importanti riserve energetiche e giocano un ruolo fondamentale come componenti strutturali della maggior parte delle membrane cellulari. Chimicamente si tratta di esteri di acidi grassi e alcoli che comprendono un vasto gruppo di composti organici strutturalmente distinti quali grassi, cere, fosfolipidi, glicolipidi ecc.

I cianobatteri contengono una significativa quantità di lipidi (grassi e oli) con composizione simile agli oli vegetali. Alcune specie sono ricche anche di acidi grassi insaturi quali l'acido linoleico (18: 2 ω 6) e l'acido γ -linolenico (18: 3 ω 3) e i loro derivati: l'acido eicosapentaenoico (20: 5 ω 3) e l'acido arachidonico (20: 4 ω 6). Questi acidi grassi sono una componente essenziale della dieta umana ed animale e sono diventati importanti additivi alimentari in acquacoltura (Borowitzka, 1988).

I lipidi dei cianobatteri sono generalmente esteri di glicerolo e acidi grassi (sia saturi che insaturi). I trigliceridi sono i più comuni lipidi di riserva e nei cianobatteri possono costituire più dell'80% della componente lipidica totale (Tornabene *et al.*,

1983). Oltre a questi gli altri lipidi maggiormente rappresentati sono i sulfochinovosil-digliceridi (SQDG), i monogalattosil-digliceridi (MGDG), i digalattosil-digliceridi (DGDG) e il fosfatidil-glicerolo (PG) che compongono la matrice lipidica delle membrane cellulari e delle membrane tilacoidali.

1.1.2 Apparato fotosintetico dei cianobatteri

Pigmenti fotosintetici

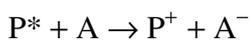
Tutti gli organismi fotosintetici ossigenici usano come fonte di energia la luce visibile, con lunghezze d'onda da 400 a 700 nm che, per essere convertita in energia chimica, deve come prima cosa venire assorbita.

Le molecole responsabili di questa funzione sono dette pigmenti fotosintetici. Clorofille e carotenoidi sono due classi di pigmenti ubiquitari negli organismi fotosintetizzanti, mentre le ficobiliproteine sono presenti nei cianobatteri e in alcuni gruppi algali (Alghe Rosse, Criptofitee).

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).

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 and Govindjee, 1995).

Piante, alghe e cianobatteri sintetizzano tutti clorofilla *a* (Chl *a*) come pigmento fondamentale. Si tratta di una molecola composta da un anello tetrapirrolico (porfirina) simile alla struttura che si trova nel gruppo prostetico eminico dell'emoglobina e dei citocromi, con la differenza che la Chl *a* al centro dell'anello presenta complessato un atomo di magnesio invece che di ferro e che lega una lunga catena laterale idrofobica di fitolo (C₂₀) che rende la molecola estremamente apolare. I picchi massimi di assorbimento della Chl *a* corrispondono a 430 nm per la luce blu e a 663 nm per la luce rossa (Buchanan *et al.*, 2003).

Un secondo gruppo di molecole di pigmenti trovate in tutti gli organismi fotosintetici è costituito dai 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, che contengono nella molecola un sistema coniugato di doppi legami, presenti soprattutto nei centri di reazione, e xantofille, che in più contengono atomi di ossigeno nei loro anelli terminali, localizzate principalmente nei complessi antenna.

Assorbono la luce tra 390 e 530 nm, un intervallo in cui l'assorbimento della clorofilla è relativamente debole, e trasferiscono l'energia di eccitazione alle clorofille. La loro funzione principale è comunque, oltre a quella di pigmenti antenna, quella di proteggere l'apparato fotosintetico dai danni foto ossidativi.

Nelle condizioni di alta luce gli organismi fotoautotrofi possono assorbire una quantità di luce maggiore a quella in realtà necessaria per la fotosintesi. L'eccitazione eccessiva della clorofilla può portare la molecola allo stato di tripletto ($^3\text{Chl}^*$) che si deeccita cedendo l'energia all'ossigeno con la formazione di ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$). Questa forma reattiva dell'ossigeno può diminuire l'efficienza della fotosintesi (fotoinibizione) e può danneggiare componenti essenziali come i lipidi membranali, le stesse clorofille e il DNA cellulare. I carotenoidi sono in grado di deeccitare sia la clorofilla tripletto che l'ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$) dissipando poi l'energia di eccitazione acquisita sotto forma di calore.

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. A questi pigmenti, presenti anche nelle piante superiori, si aggiungono forme di carotenoidi particolari ed esclusive dei cianobatteri, come il chetocarotenoide echinenone, e il carotenoide glicoside mixoxantofilla (Hirschberg and Clamovic, 1994).

Le ficobiliproteine, che assorbono luce nell'intervallo tra i 500 e i 650 nm e sono responsabili della caratteristica colorazione blu-verde dei cianobatteri, 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. Sono cromoproteine che hanno come cromofori tetrapirroli lineari (ficobiline) derivati dalla stessa via biosintetica dell'eme e della clorofilla. Sono solubili in acqua e non contengono uno ione metallico associato. Le ficobiline sono legate alla componente proteica attraverso legami tioetere tra un residuo di cisteina della proteina e un sostituito vinilico della ficobilina e formano tre classi principali di pigmenti cromoproteici:

- FICOERITRINA (**PE**) : λ max 565-575 nm
- FIOCOCIANINA (**PC**) : λ max 615-640 nm
- ALLOFIOCOCIANINA (**APC**) : λ max 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 aggiuntivi consentono un miglior assorbimento della luce in particolari regioni dello spettro (Samsonoff and 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 (α,β)₃ o di esameri (α,β)₆, a costituire delle unità discoidali. Queste 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).

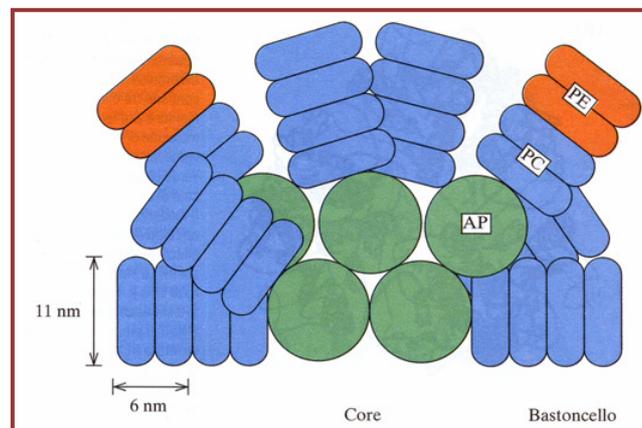


Figura B. Modello schematico di un ficobilisoma emidiscoideale in cianobatteri (Buchanan *et al.*, 2003).

L'assemblaggio sovramolecolare dei ficobilisomi è reso possibile da polipeptidi definiti “linker” (Tandeau de Marsac and 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 fotochimicamente attivo (P) del centro di reazione del fotosistema (Van den Hoeck *et al.*, 1995).

Membrana tilacoidale

I cianobatteri presentano all'interno della cellula un complesso sistema di membrane tilacoidali sede delle reazioni di trasferimento elettronico (catena di trasporto degli elettroni) sia della fotosintesi che della respirazione. I tilacoidi vengono considerati proliferazioni della membrana plasmatica, ma in un recente studio condotto su *Synechocystis* sp. PCC 6803 è stato riportato che in questo cianobatterio le membrane tilacoidali sembrano essere fisicamente separate dalla membrana plasmatica, suggerendo che esse possano costituire il primo esempio di compartimentazione cellulare nei procarioti (Liberton *et al.*, 2006). Nei cianobatteri i tilacoidi si presentano come sacculi appiattiti di membrane non impilate e non si differenziano in grana (sacculi appressati), come invece avviene nei cloroplasti delle piante superiori. Possono proliferare in maniera diversa all'interno della cellula a seconda della specie (perifericamente, radialmente, parallelamente alla parete o verso l'interno), per questo vengono considerate un importante carattere tassonomico.

L'apparato fotosintetico dei cianobatteri è situato nelle membrane tilacoidali e consta di due fotosistemi, i cui centri di reazione sono collegati in serie, invece che di un solo fotosistema come nei batteri con fotosintesi anossigenica.

La notevole corrispondenza di caratteri sia strutturali che funzionali tra le membrane tilacoidali dei cianobatteri e quelle dei cloroplasti degli eucarioti fotoautotrofi trova spiegazione nell'ipotesi ormai accettata che prevede l'origine dei cloroplasti attraverso un evento di endosimbiosi tra un eucariote ancestrale eterotrofo e un cianobatterio (Nozaki, 2005). Questa teoria trova conferma anche in recenti studi di tipo filogenetico (Sato, 2002).

Nei tilacoidi sono presenti, come nelle alghe eucariote e nelle piante superiori, il fotosistema I (PSI) e il fotosistema II (PSII) che cooperano al trasferimento di elettroni dall'acqua al NADP⁺ (Fig.C).

Il PSII è costituito da un centro di reazione che contiene la forma fotochimicamente attiva di clorofilla *a* (P680) e da una antenna interna formata da due complessi pigmento-proteina, chiamati CP43 e CP47 per il peso molecolare della componente proteica. In questa antenna sono presenti come pigmenti molecole di clorofilla *a*. Al PSII è associato il complesso evolvente ossigeno, in cui avviene la fotolisi dell'acqua.

Il PSI è formato da un core in cui è presente la clorofilla *a* fotochimicamente attiva (P700) ed un certo numero di molecole di clorofilla *a* come pigmenti antenna.

Il trasferimento di elettroni fotosintetico coinvolge, oltre ai fotosistemi, una catena di trasportatori di elettroni. Gli elettroni prodotti dalla fotolisi dell'acqua vengono trasferiti, attraverso la reazione fotochimica che avviene nel centro di reazione del PSII, al plastochinone. Da qui essi passano al complesso dei citocromi (Cit $b_6 f$) e

alla plastocianina, che li cede al centro di reazione del PSI. La reazione fotochimica condotta da questo fotosistema trasferisce elettroni alla ferredossina che a sua volta li cede al NADP^+ riducendolo a NADPH . Al flusso di elettroni dal plastochinone al Cyt $b_6 f$ è associata una traslocazione di protoni attraverso la membrana tilacoidale, con la formazione del gradiente protonico necessario per la sintesi di ATP condotta dall'ATP sintasi. Una peculiarità delle membrane tilacoidali dei cianobatteri è data dalla presenza sul lato citoplasmatico dei ficobilisomi (PBS). Questi sono generalmente associati al PSII e rappresentano il principale sistema antenna di raccolta della luce.

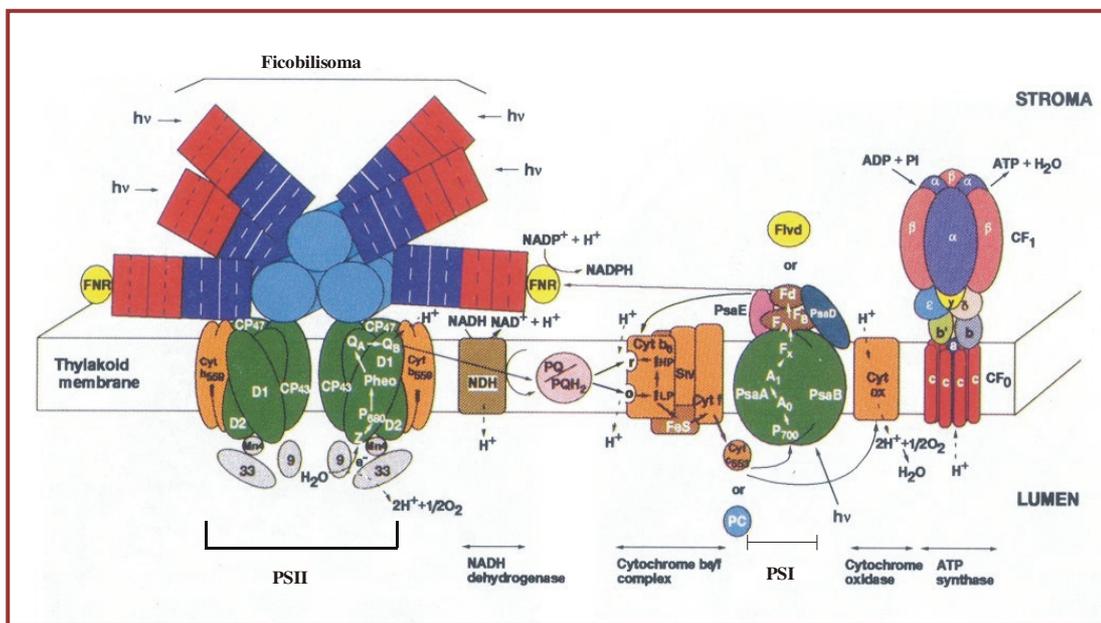


Figura C. Schema dei principali complessi multiproteici presenti nelle membrane tilacoidali dei cianobatteri. Sono riportati i maggiori componenti coinvolti nel trasporto di elettroni fotosintetico e respiratorio (Brayant, 1995).

Un'ulteriore peculiarità della membrana tilacoidale dei cianobatteri è data dal fatto che essa in questi microrganismi procariotici fotoautotrofi e aerobi, oltre a contenere i componenti della catena di trasporto di elettroni fotosintetica, contiene anche quelli della catena di trasporto respiratoria (Fig. C).

Le due catene inoltre sono intimamente accoppiate e connesse attraverso trasportatori di elettroni comuni che sono il plastochinone e il complesso dei citocromi $b_6 f$ (Hirano *et al.*, 1980).

1.1.3 Cianobatteri azotofissatori

L'azoto (N_2) costituisce quasi l'80% dell'atmosfera, ma l'eccezionale stabilità del suo triplo legame covalente, lo rende inaccessibile al metabolismo delle piante. La capacità di ridurre l' N_2 atmosferico a NH_3 è limitata a una varietà di procarioti, denominati azotofissatori o microrganismi diazotrofi, largamente distribuiti in tutti gli ecosistemi, sia come organismi liberi che come simbionti di un considerevole numero di piante. In tutti questi organismi la reazione di fissazione dell'azoto avviene tramite un complesso enzimatico, la nitrogenasi (Fig. D).

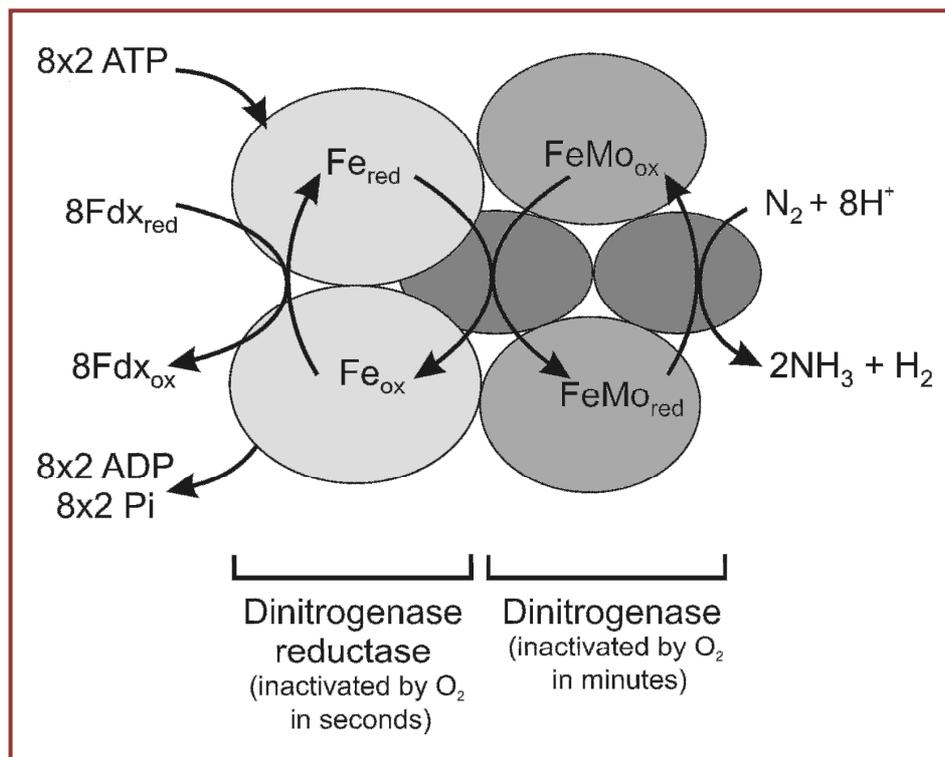


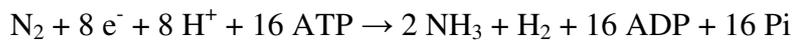
Figura D. Complesso enzimatico della nitrogenasi (da Rascio and La Rocca, 2008).

Quest'ultima consiste di due distinti enzimi: la dinitrogenasi riduttasi e la dinitrogenasi. La dinitrogenasi riduttasi è un omodimero (α_2) costituito da due ferroproteine e del peso di circa 70 kDa con un gruppo $4Fe-4S$ che lega l'ATP e trasferisce elettroni alla dinitrogenasi. Questa è un eterotetramero ($\alpha_2\beta_2$), del peso di circa 220 kDa, costituito da proteine con centri $FeMo$. La dinitrogenasi contiene due gruppi $Mo-Fe-S$ e un numero variabile di gruppi $Fe-S$ e lega l' N_2 atmosferico. Entrambi questi enzimi sono estremamente sensibili all'ossigeno che ne causa la rapida inibizione. Il complesso enzimatico della nitrogenasi è codificato da un insieme di operoni correlati, costituenti un regulone chiamato regulone *nif* (*nitrogen fixation*).

Nel regulone *nif* sono pretesi, tra gli altri, i geni strutturali: *Nif H* che codifica per la proteina dell'omodimero della dinitrogenasi reductasi, *Nif D* e *Nif K* che codificano, rispettivamente, per le subunità α e β dell'eterotetramero della dinitrogenasi.

La trascrizione dei geni *nif* è molto controllata ed è il meccanismo principale con cui viene regolata l'attività del complesso enzimatico.

Nella reazione di riduzione dell'azoto, la dinitrogenasi reductasi ossidata accetta un elettrone da un donatore, solitamente la ferredossina ridotta o la flavodossina ridotta, e lega due molecole di ATP. Questo legame causa un cambio conformazionale della Fe-proteina abbassando il suo potenziale redox (da -300 a -400 mV). La Fe-proteina così ridotta trasferisce l'elettrone alla dinitrogenasi ossidata con la simultanea idrolisi di entrambi gli ATP. Infine la FeMo-proteina trasferisce l'elettrone (e un protone) all' N_2 legato al MoFe-cofattore. Per ridurre una molecola di N_2 in 2 molecole di NH_3 sono necessari 6 elettroni e 6 reazioni consecutive di ossido-riduzione accoppiate all'idrolisi di 2ATP per ciascun elettrone che passa per il complesso della nitrogenasi. Inoltre, la nitrogenasi recluta protoni (H^+) all'interno della cellula, così che per ogni N_2 , ridotto a due NH_3 , due H^+ vengono ridotti a H_2 , con il coinvolgimento di altri due elettroni e l'idrolisi di altri 4 ATP. La reazione totale catalizzata dalla nitrogenasi negli organismi diazotrofi risulta essere:



Nell'ambito degli organismi azotofissatori liberi un particolare interesse viene attribuito ai cianobatteri, come conseguenza della loro larga distribuzione in tutti gli ambienti sia terrestri che acquatici e del loro peculiare metabolismo fotosintetico. I cianobatteri, infatti, sono gli unici organismi procarioti a svolgere una fotosintesi ossigenica, fatto che, apparentemente, renderebbe la fissazione dell'azoto un evento paradossale.

Ciò nonostante, un gran numero di questi microrganismi sono in grado di fissare l'azoto in condizioni aerobiche, producendo O_2 attraverso la fotosintesi.

Molti cianobatteri filamentosi risolvono il paradosso fotosintesi ossigenica-diazotrofia separando spazialmente i due processi. Essi formano, infatti, cellule specializzate non-fotosintetiche chiamate eterocisti all'interno delle quali si viene a formare un ambiente anossico indispensabile per l'attività della nitrogenasi. Nelle eterocisti il fotosistema secondo viene demolito e di conseguenza cessa l'attività ossigenica della fotosintesi. Inoltre le eterocisti sono caratterizzate da una spessa parete che ha il ruolo di prevenire la diffusione di gas attraverso la cellula, proteggendo così la nitrogenasi dall'ingresso dell' O_2 . Tuttavia la parete non può costituire una barriera completamente impermeabile poiché in tale caso impedirebbe anche l'entrata dell'azoto atmosferico, indispensabile per la fissazione. Inoltre i gas possono raggiungere il citoplasma delle eterocisti attraverso i siti di giunzione (microplasmodesmi) con le attigue cellule vegetative che svolgono la fotosintesi e

producono O₂. Perciò le eterocisti hanno sviluppato sistemi che permettano loro di rimuovere l'ossigeno che riesce ad entrare, quali la presenza di emo-proteine nelle regioni periferiche del citoplasma e alti livelli di respirazione cellulare (Rascio and La Rocca, 2008).

Di notevole interesse ecologico è stato l'inaspettato ritrovamento di alcune specie cianobatteriche filamentose non-eterocistiche o addirittura unicellulari in grado di fissare l'azoto. Questi cianobatteri sono molto abbondanti nelle popolazioni fitoplanctoniche di molti ecosistemi acquatici e sono responsabili della maggior parte della produzione di carbonio organico fornito all'ecosistema.

In particolare, per quanto riguarda i cianobatteri coccoidi, la fissazione dell'azoto è stata rilevata in specie quali *Synechococcus* sp. (Leòn *et al.*, 1986; Mitsui *et al.*, 1986; Spiller *et al.*, 1987), *Cyanothece* sp. (Reddy *et al.*, 1993; Schneegurt *et al.*, 1994), *Gloecapsa* sp. (Mitsui *et al.*, 1986) e *Crocospaera watsonii* (Waterbury *et al.*, 1988).

Questi organismi, essendo unicellulari, non possono compartimentare spazialmente la diazotrofia separandola dalla fotosintesi. Essi hanno quindi adottato la strategia di separare i due eventi temporalmente. Più precisamente l'attività della nitrogenasi e la fissazione dell'azoto sono limitate alle ore notturne (al buio), quando la fotosintesi è inattiva (Mitsui *et al.*, 1986; Bergman *et al.*, 1997; Golden *et al.*, 1997). Ulteriori studi hanno dimostrato che queste oscillazioni giornaliere nell'attività della nitrogenasi sono, in realtà, indipendenti dalle condizioni di luce e seguono piuttosto un ritmo circadiano (Schneegurt *et al.*, 1994; Arieli *et al.*, 1996).

Tale scoperta è stata di grande rilievo scientifico in quanto si è trattato del primo ritmo circadiano riconosciuto in organismi procarioti, e ha portato a smentire il precedente dogma secondo cui l'orologio biologico era caratteristico solo degli eucarioti.

1.2 CLASSIFICAZIONE E TASSONOMIA DEI CIANOBATTERI

La classificazione tassonomica dei cianobatteri si è a lungo basata soltanto su caratteri morfologici e citologici (Ishida *et al.*, 1997), secondo i codici botanici ma anche secondo il codice batteriologico (Rippka *et al.*, 1979). Solo successivamente, però, in seguito all'impiego da parte di Woese (1987) delle sequenze geniche del 16S rDNA per ricostruire i rapporti filogenetici tra organismi, i cianobatteri furono riconosciuti come una nuova divisione di procarioti e collocati, quindi, tra gli eubatteri.

La classificazione dei cianobatteri è stata, ed è tuttora, sottoposta a numerose revisioni e questo, assieme alla compresenza dei due diversi approcci di classificazione, quello batteriologico e quello botanico, rende difficoltoso collocare questi organismi sia a livello micro che macrosistemico (Marquardt and Palinska,

2007). Si stima, ad esempio, che più del 50% dei cianobatteri in coltura nelle banche algali sia stato identificato in maniera scorretta, portando a ricostruzioni filogenetiche sbagliate (Komárek and Anagnostidis, 1999). Negli ultimi 20 anni le tecniche molecolari hanno introdotto un nuovo approccio alla filogenesi e alla tassonomia dei cianobatteri. Recentemente, l'approccio batteriologico e quello botanico stanno convergendo in un metodo di tipo polifasico, per creare una classificazione basata non solo su caratteristiche morfologiche, citologiche, ecologiche e biochimiche, ma anche genetiche (Garcia-Pichel *et al.*, 2001; Hoffmann, 2005; Hoffmann *et al.*, 2005; Komárek and Anagnostidis, 2005; Marquardt and Palinska 2007).

Il codice di classificazione generalmente più utilizzato è quello recentemente proposto da Komárek and Anagnostidis (2005). Secondo tale sistema di classificazione, basato esclusivamente sui caratteri morfologici e citologici, il *phylum* Cyanophyta risulta costituito dall'unica classe Cyanophyceae e suddiviso in quattro ordini:

- Chroococcales (comprende tutte le forme coccoidi, sia a vita solitaria sia tenute insieme da materiale polisaccaridico a formare aggregazioni, definite colonie);
- Oscillatoriales (comprende specie filamentose, con filamenti uniseriati e non in grado di formare eterocisti);
- Nostocales (comprende specie filamentose, con filamenti uniseriati e in grado di formare eterocisti);
- Stigonematales (comprende specie filamentose, con filamenti che possono presentare ramificazioni e in grado di formare eterocisti).

L'utilizzo dei dati molecolari ha messo in evidenza che molti dei generi della precedente classificazione, come *Microcystis*, *Arthrospira*, *Cylindrospermum*, risultano essere monofiletici; mentre altri, come *Anabaena* e *Aphaizomenon*, risultano essere polifiletici. Per questo motivo Hoffmann e collaboratori (2005) hanno proposto una nuova classificazione, basata principalmente sui dati molecolari e su caratteri ultrastrutturali, in cui hanno ritenuto necessario riorganizzare la classificazione dei cianobatteri a livello sopragenerico. I dati molecolari, come mostrato in figura E, mettono in evidenza la necessità di abbandonare la classica divisione tra cianobatteri coccoidi e filamentosi. Questa ipotesi è confermata dalla congruenza fra i dati molecolari e la distribuzione delle membrane tilacoidali all'interno delle cellule.

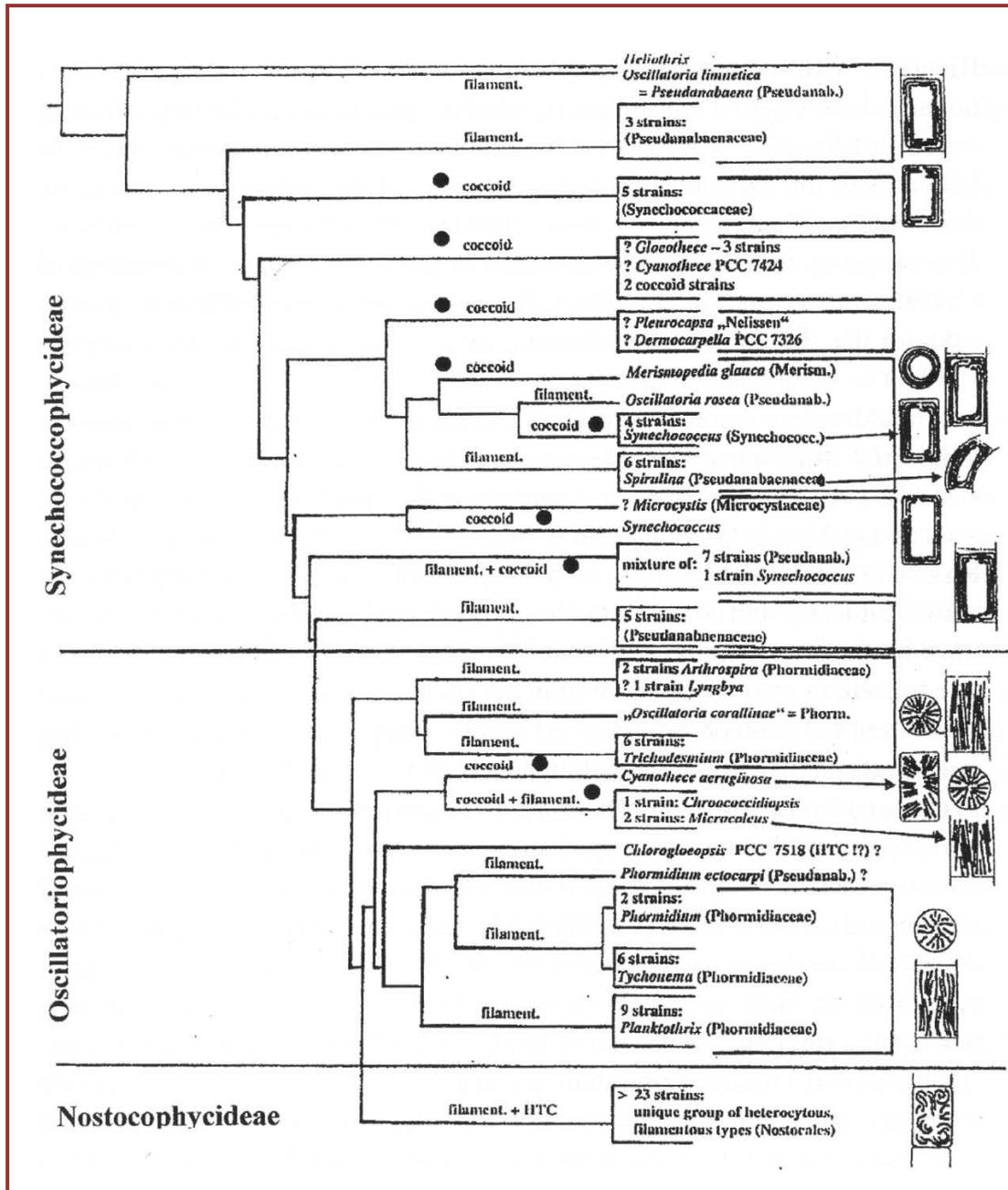


Figura E. Estratto di un albero filogenetico, costruito utilizzando il gene marker 16S rDNA. Accanto è mostrata la distribuzione dei tilacoidi all'interno delle cellule (da Hoffmann et al., 2005).

L'interazione dei dati molecolari con quelli morfologici e citologici, presenza o assenza di tilacoidi, distribuzione dei tilacoidi e presenza di cellule specializzate, ha permesso di suddividere la classe delle Cyanophyceae nelle seguenti sottoclassi (Hoffmann et al., 2005):

- Gloeobacterophycidae
- Synechococcophycidae
- Oscillatoriofycidae
- Nostocofycidae

1.3 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).

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 adattativi.

I cianobatteri termofili riescono a sopportare temperature molto elevate attuando meccanismi di tolleranza come il mantenimento della stabilità, flessibilità e funzionalità delle proteine (Fields, 2001). Ciò avviene mediante la modificazione

della composizione amminoacidica delle molecole proteiche (Haney *et al.*, 1999) oppure mediante la produzione di soluti termostabilizzanti (Stamatakis and Papageorgiou, 1993; Martins *et al.*, 1997). Nei cianobatteri termofili comunque la tolleranza alle alte temperature dipende necessariamente dal mantenimento di un apparato fotosintetico stabile e funzionale in modo da permettere a questi microrganismi un guadagno fotosintetico. Nonostante recenti studi fisiologici abbiano rilevato che nei cianobatteri termofili la termostabilità del PSI è maggiore che nei cianobatteri mesofili (Balme *et al.*, 2001) e che il PSII mostra anch'esso una certa stabilità (Nishiyama *et al.*, 1999), non si sono ancora del tutto compresi i meccanismi adattativi attraverso i quali i cianobatteri termofili stabilizzano il loro apparato fotosintetico sopravvivendo così a temperature estreme (Inoue *et al.*, 2000).

1.4 L'AMBIENTE 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 non è da imputare alla passata attività vulcanica delle rocce che costituiscono i Colli Euganei, bensì ad una termalizzazione prodotta da una circolazione profonda delle acque in presenza di un gradiente geotermico normale. Analisi accurate hanno stabilito che le acque termali dell'intero bacino euganeo sono di natura meteorica e raggiungono il suolo in un'area montana individuata nel territorio delle piccole Dolomiti. Qui iniziano un lento cammino di discesa penetrando all'interno di sistemi di fratture delle rocce sedimentarie, fino alla profondità di circa 3000-4000 metri, raggiungendo i 170-200°C per gradiente geotermico e arricchendosi di sali minerali provenienti dallo sgretolamento delle rocce. In corrispondenza dei Colli Euganei l'acqua è costretta a risalire rapidamente in superficie, sospinta dalla pressione idraulica dell'intero bacino sotterraneo (Fig. F) (Piccoli *et al.*, 1976).

Quest'acqua, definita ipertermale, sgorga ad una temperatura di circa 87°C a causa del parziale raffreddamento durante la fase di risalita. Presenta un residuo a 180°C di 5-6 gr/l. I principali anioni presenti sono cloruri, solfati e bicarbonato, mentre come cationi si ritrovano sodio, potassio, calcio e magnesio. Infine quest'acqua contiene anche una discreta quantità di silice (Piccoli *et al.*, 1976).

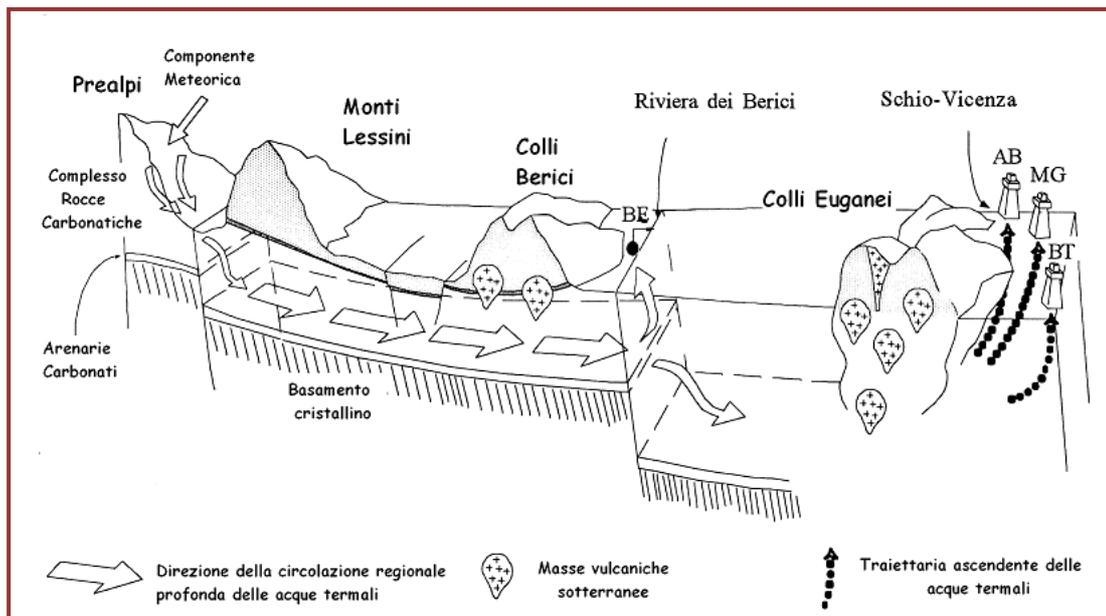


Figura F. Circolazione regionale delle acque termali euganee (da Gherardi *et al.*, 1999)

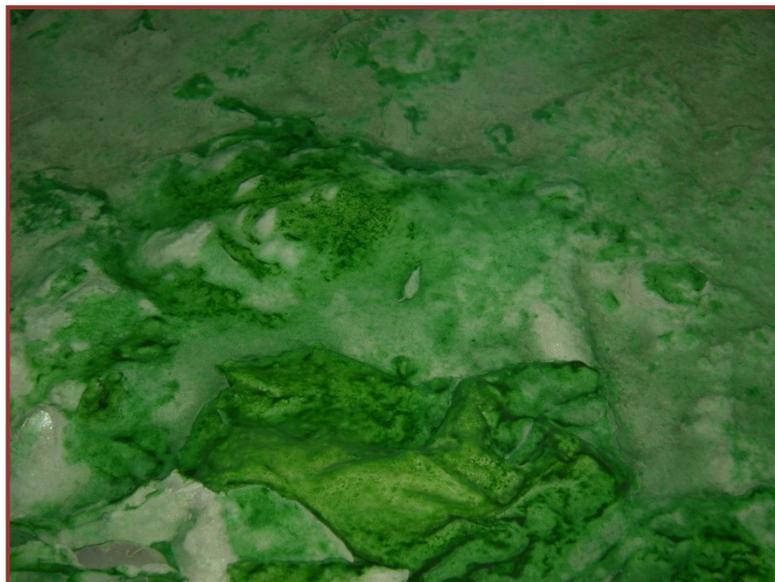
Numerosi studi hanno evidenziato che l'acqua termale del bacino euganeo, assieme anche ai fanghi termali, ha effetti terapeutici (Galzigna *et al.*, 1996; Galzigna and Bellometti, 1999), per cui trova largo impiego nella balneoterapia, nelle terapie inalatorie e soprattutto nel trattamento con fango termale.

Il fango termale, estratto dai fondali dei bagnetti di Arquà Petrarca e Lispida (localizzati anch'essi nel Comprensorio Euganeo), è utilizzato a fini terapeutici (Galzigna *et al.*, 1996; Galzigna and Bellometti, 1999). Esso è costituito da tre componenti:

- una solida di tipo argilloso;
- una idrotermale, rappresentata dall'acqua termale;
- una biologica, definita bioglea, rappresentata da alcune microalghe, prevalentemente *Bacillariophyceae* (Diatomee), e, principalmente, da cianobatteri

(Andreoli and Rascio, 1975; Tolomio *et al.*, 2002; 2004).

Le microalghe colonizzano il fango sia in superficie che nei primi centimetri di profondità (circa 20 cm) (Tolomio *et al.*, 2002), i cianobatteri invece colonizzano la superficie dei fanghi dove formano caratteristici feltri di colore verde-azzurro (Fig. G).



Fiura G. Caratteristici feltri cianobatterici, di colore verde-azzurro, che ricoprono la superficie del fango termale in una vasca di maturazione.

La colonizzazione da parte di questi organismi avviene prevalentemente durante il processo di maturazione del fango termale. Durante tale processo il fango termale viene costantemente irrorato con acqua termale a 40-50°C che ne modifica le caratteristiche chimico-fisiche (es. plasticità, viscosità, ecc.), sottoponendo gli organismi che lo colonizzano a continue variazioni, anche drastiche, dei diversi parametri ambientali.

Pietro D'Abano (1257-1315), medico e filosofo, fu il primo a segnalare la presenza di organismi nei fanghi termali del Comprensorio Euganeo, ma solo a partire dal XIX secolo sono stati effettuati studi specifici sull'argomento. In particolare il lavoro di Trevisan (1870) indica la presenza nelle Terme Euganee di più di 100 specie di organismi termofili.

Tra il 2005 e il 2006, un monitoraggio condotto nel nostro laboratorio su 83 Hotel ha messo in luce l'elevata biodiversità di tale ambiente, mostrando infatti la presenza di 12 *taxa*, dei quali 5 (*Cyanobacterium aponinum* ETS-03, *Leptolyngbya* sp. ETS-04, *Oscillatoria duplisecta* ETS-06, *Phormidium* sp. ETS-05, *Spirulina* spp.) sono stati caratterizzati a livello morfologico, ultrastrutturale e molecolare (Ceschi-Berrini *et al.*, 2004; Moro *et al.*, 2007a, 2007b, 2010); 3 sono stati rilevati mediante la tecnica DGGE (*Lyngbya* sp.; *Oscillatoria* sp. (cf. *Oscillatoria princeps*); *Spirulina* sp. (cf. *Spirulina labyrinthiformis*)) e 6 sono stati evidenziati al solo microscopio ottico (*Chroococcus* sp.; *Hormoscilla* sp.; *Nostoc* sp., *Pseudoanabaena* sp., *Synechococcus* sp. e *Merismopedia* sp.) (Marcon, 2004-2005; Cara, 2005-2006; Gasparini, 2006-2007). Nuove indagini sono tuttora in corso al fine di isolare e caratterizzare altri ceppi di cianobatteri da tale ambiente, la cui biodiversità è ancora sottostimata.

2. SCOPO

Scopo del presente progetto di ricerca è stato quello di proseguire lo studio della bioglea fotoautotrofa ossigenica del Comprensorio Termale Euganeo, a tutt'oggi l'unico dei comprensori termali italiani per cui è stata impostata una ricerca integrata sui microrganismi fotosintetici che colonizzano i fanghi.

Il fango termale del Comprensorio Euganeo per le sue proprietà benefiche è conosciuto sin dai tempi dei Romani. Gli effetti terapeutici del fango termale non dipendono solo dal calore, ma sono anche dovuti alla presenza nel fango stesso di sostanze di origine biologica (Galzigna *et al.*, 1996; Ceschi-Berrini *et al.*, 2004) prodotte dalla bioglea che colonizza le superfici dei fanghi delle vasche idrotermali. Sui fanghi si sviluppano infatti abbondanti popolazioni di cianobatteri, sia filamentosi che coccoidi, che formano spesse coperture compatte.

Questi microrganismi fotosintetici ossigenici sono presenti su fanghi esposti a temperature molto variabili, a seconda che la vasca che li contiene venga rifornita costantemente con acqua termale o venga mantenuta a riposo per un certo periodo. Nel primo caso la temperatura può raggiungere valori anche di 60°C, nel secondo può scendere a meno di 30°C, per poi risalire con il successivo rifornimento di acqua termale. Di conseguenza i cianobatteri sulla superficie del fango vengono esposti a un ampio range di temperatura e a variazioni anche rapide di questo parametro ambientale, a cui devono far fronte mediante strategie adattative. Quindi i cianobatteri che colonizzano le superfici dei fanghi oltre alla termotolleranza devono avere anche una notevole capacità di adattamento a variazioni repentine della temperatura ambientale.

L'obiettivo principale è stato quello di approfondire le conoscenze su questi interessanti microrganismi termoresistenti, dei quali ancor oggi si conosce poco, sia dal punto di vista tassonomico che fisiologico ed adattativo.

Lo studio della tassonomia, così come delle strategie strutturali e funzionali degli organismi fotosintetici termoresistenti, è un campo di ricerca ancora aperto e molto affascinante, che può fornire nuove informazioni sulla biodiversità di questi ambienti limitanti, sui meccanismi adattativi e sulla plasticità strutturale e metabolica degli organismi che li occupano.

In particolare, il presente progetto di dottorato ha riguardato lo studio di due microorganismi coccoidi isolati ad Abano Terme da una popolazione cianobatterica e mantenuti in coltura pura nel nostro laboratorio. I due ceppi sono stati indicati con la sigla ETS-09 e ETS-10, dove l'acronimo ETS sta per Euganean Thermal Spring.

Su questi cianobatteri coccoidi sono state condotte indagini morfologiche, ultrastrutturali e fisiologiche alle temperature di crescita 30°C e 40°C, allo scopo di valutare le eventuali conseguenze sulle cellule della variazione di questo parametro ambientale.

Alle due differenti temperature:

- è stata valutata la velocità di crescita dei cianobatteri misurando l'incremento della densità ottica delle colture;
- è stata definita con osservazioni al microscopio ottico, in luce visibile e in fluorescenza, e al microscopio elettronico a scansione e trasmissione la morfologia e l'organizzazione ultrastrutturale delle cellule;
- sono stati analizzati qualitativamente e quantitativamente i pigmenti fotosintetici con metodi spettrofotometrici e di HPLC;
- sono state effettuate misure dell'attività fotosintetica registrando l'emissione di ossigeno fotosintetico dalle colture cianobatteriche mediante analisi ossigrafiche.

Infine è stata analizzata la capacità di crescita delle colture dei due ceppi in esame a temperature crescenti da 40°C a 50°C, allo scopo di definirne il limite di termotolleranza.

Si è ritenuto interessante indagare anche se i cianobatteri in studio manifestassero la proprietà di azotofissazione, sia verificando la presenza nel loro genoma di geni per la nitrogenasi (*nifD* e *nifH*) che valutando la capacità delle colture cianobatteriche di svilupparsi, a 30°C, in totale assenza di minerali azotati. Anche sui cianobatteri eventualmente cresciuti in mancanza di nutrienti azotati sono state programmate le indagini morfologiche, ultrastrutturali e fisiologiche.

E' stata inoltre condotta un'indagine molecolare, utilizzando un approccio multigenico, per definire una precisa collocazione tassonomica degli organismi in esame, utilizzando come geni *marker* il 16S rDNA, che codifica per la subunità piccola dei ribosomi, e l'*rbcL*, che codifica per la subunità grande dell'enzima Rubisco, entrambi comunemente usati in studi di caratterizzazione di cianobatteri (Moro *et al.* 2007).

Per la conduzione dell'indagine filogenetica si è reso necessario aumentare il numero di sequenze di ceppi di confronto disponibili nei *Data Base*, ottenendole da ceppi cianobatterici acquistati da diverse banche algali mondiali.

3. MATERIALI E METODI

3.1 RACCOLTA E ISOLAMENTO IN CULTURA DEI CIANOBATTERI

Campioni di feltri cianobatterici, dal caratteristico colore verde-azzurro, sono stati raccolti dalle vasche di stoccaggio del fango termale di diversi Hotel di Abano e Montegrotto Terme. Al momento del prelievo l'acqua delle vasche presentava una temperatura di circa 35°C ed un pH di 6.8. Successivamente, in laboratorio, parti di questi feltri sono stati messi in coltura in terreno solido e liquido BG11 (Rippka *et al.*, 1979) (tab. A) e posti a temperatura ambiente. Il materiale sviluppatosi è stato poi utilizzato per allestire, tramite delle piastre di diluizione, colture pure che sono state mantenute, sempre a temperatura ambiente, in terreno liquido BG11 (colture di mantenimento). Dalle colture così allestite sono stati ottenuti i due cianobatteri oggetto di questa tesi: ETS-09 ed ETS-10.

COMPONENTI	mg/L
NaNO ₃	1500
K ₂ HPO ₄ * 3H ₂ O	40
MgSO ₄ * 7H ₂ O	75
CaCl ₂ * 2H ₂ O	36
Acido citrico	6
Ferro ammonio citrato	6
EDTA	1
Na ₂ CO ₃	20
H ₃ BO ₃	0,476
MnCl ₂ * 4H ₂ O	0.30
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0,036
NaMoO ₄ * 5H ₂ O	0,065
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,013
Co(NO ₃) ₂ * 6H ₂ O	0,0083

Tabella A. Composizione del terreno BG1 (Rippka et al., 1979).

3.2 ALLESTIMENTO E RINNOVO DELLE COTURE CIANOBATTERICHE

A partire dalle colture inizialmente allestite sono stati effettuati dei nuovi inoculi, sempre in terreno liquido BG11, per ottenere colture “madri” da mantenere a diverse condizioni di temperatura. Le colture dei cianobatteri ETS-09 ed ETS-10 sono state poste a crescere ad intensità luminose rispettivamente di 40 e 10 μmol di fotoni $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con un fotoperiodo di 12 ore e mantenute a cinque diverse temperature (30°C, 40°C, 45°C, 47°C e 50°C).

In tutte le condizioni testate la fonte di luce era rappresentata da lampade fluorescenti a luce bianca (L 30W/827, OSRAM), opportunamente regolate, e la temperatura veniva mantenuta tramite appositi bagnetti termostatici.

Dalle colture “madri”, adattate alle diverse condizioni di temperatura per almeno un mese, sono stati effettuati altri inoculi. Le nuove colture così ottenute sono state utilizzate per gli esperimenti.

Per verificare se gli organismi in studio fossero in grado di fissare l’azoto sono state allestite colture a 30°C e 40°C e alle stesse condizioni di illuminazione e fotoperiodo, utilizzando un terreno di coltura BG11 in cui il nutriente azotato (NaNO_3) era stato sostituito con NaCl in concentrazione equimolare (terreno BG11₀) (Rippka, 1988).

3.3 MISURAZIONE DELLA CRESCITA DELLE COTURE CIANOBATTERICHE

Per valutare la crescita dei microrganismi in esame, mantenuti nelle diverse condizioni di coltura, è stato utilizzato il metodo della misurazione della densità ottica (D.O.) della coltura a tempi progressivi (circa ogni 3-4 giorni) dal momento dell’inoculo. Per tale analisi è stata utilizzata una piastra ELISA; in tre file, ognuna di otto pozzetti, sono stati versati 200 μl della coltura in analisi da tre diverse beute con medesima data di inoculazione, condizione di crescita e D.O. di partenza; una quarta fila, invece, è stata preparata come bianco con solo il terreno BG11. Le aliquote utilizzate per l’allestimento dei pozzetti sono state prelevate da colture opportunamente omogeneizzate, tramite blanda sonicazione (sonicatore BRANSON 1200), in modo da garantire una distribuzione omogenea delle cellule cianobatteriche.

Per la misurazione della densità ottica è stato utilizzato un lettore di piastre ELISA (Multiskan Ex, Lab System) ad una lunghezza d’onda di 750 nm.

L’analisi dei dati ha permesso di stabilire i giorni in cui gli organismi si trovavano in fase esponenziale di crescita; tutti gli esperimenti sono stati pertanto condotti al 28° giorno di crescita di entrambi gli organismi alle diverse condizioni sperimentali.

3.4 ANALISI MORFOLOGICHE, ULTRASTRUTTURALI E FISIologiche

3.4.1 Osservazione del materiale fresco al microscopio ottico

L'osservazione al microscopio ottico dei campioni dei cianobatteri in esame è stata eseguita, durante la fase esponenziale della curva di crescita, allestendo dei vetrini con alcune gocce delle colture sviluppatesi nelle diverse condizioni di crescita. I preparati sono stati osservati mediante un microscopio ottico (Leica DMR5000) operante sia in luce visibile che in fluorescenza e munito di una telecamera digitale collegata ad un analizzatore di immagini. Per le osservazioni in fluorescenza i campioni sono stati eccitati con luce UV (filtro con lunghezza d'onda di eccitazione a 340-380 nm e di sbarramento a 430nm) per indurre la caratteristica autofluorescenza rossa della clorofilla (Fry, 1988). Inoltre, è stato utilizzato un filtro verde con lunghezza d'onda di eccitazione a 546 nm e di sbarramento a 580nm, per eccitare le ficobiliproteine ed indurre la loro autofluorescenza rossa.

3.4.2 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

Campioni delle colture cianobatteriche cresciute nelle diverse condizioni sperimentali sono stati fissati per 2 ore in glutaraldeide al 6% in tampone cacodilato 0.1 M (pH 6.9), post-fissati per altre 2 ore in tetrossido di osmio (OsO₄) 1% in tampone cacodilato 0.1 M (pH 6.9) e sottoposti a disidratazione mediante soluzioni di alcool etilico a concentrazioni crescenti (Moro *et al.*, 2007).

I campioni, successivamente sottoposti al “*critical point drying*” e alla metallizzazione con oro, sono stati infine osservati con un microscopio elettronico a scansione (Stereoscan 260-Cambridge) operante a 25 kV.

3.4.3 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

Campioni delle colture cianobatteriche cresciute nelle diverse condizioni sperimentali sono stati fissati per 2 ore in glutaraldeide al 6% in tampone cacodilato 0.1 M (pH 6.9), post-fissati per alte due ore in tetrossido di osmio 1% e disidratati mediante soluzioni acquose di alcool etilico a concentrazioni crescenti.

Successivamente è stato sostituito l'alcool con ossido di propilene e si è proceduto all'inclusione in Araldite (Durcupan® ACM Fluka) (Moro *et al.*, 2007).

Mediante un ultramicrotomo (Ultracut Reichert-Jung), sono state ottenute sezioni ultrasottili (80-90 nm di spessore) dei vari campioni, successivamente contrastate prima con una soluzione satura di acetato di uranile in acqua e poi con citrato di piombo. L'osservazione delle sezioni è stata effettuata con un microscopio elettronico a trasmissione (Hitachi H300) operante a 75 kV.

3.4.4 Colorazioni per la microscopia ottica

Colorazione con blu di toluidina basica

Sezioni semifine (1 μm) ottenute all'ultramicrotomo (Ultracut Reichwert-Jung) dagli stessi campioni cianobatterici allestiti per la microscopia elettronica a trasmissione, sono state raccolte su vetrini portaoggetto e fissate alla fiamma. Le sezioni sono state ricoperte con alcune gocce di toluidina basica (1% di blu di toluidina e 1% di tetraborato di sodio in acqua distillata) e il vetrino è stato fatto riscaldare alla fiamma fino alla comparsa dei primi fumi di evaporazione. Successivamente è stato effettuato un abbondante lavaggio con acqua distillata e infine il vetrino è stato asciugato alla fiamma e osservato al microscopio ottico. Questo colorante evidenzia in modo generale tutte le strutture delle cellule dei cianobatteri in modo da renderle più facilmente osservabili.

Le osservazioni delle cellule cianobatteriche sottoposte a questa colorazione, così come a tutte le altre colorazioni applicate alla microscopia ottica sono state effettuate con un microscopio Leica DMR 5000.

Colorazione con blu di toluidina acida

Sezioni semifine dei campioni, ottenute come descritto sopra, raccolte su vetrini portaoggetto e fissate alla fiamma sono state ricoperte per 12 ore con gocce di blu di toluidina acida (0.05% blu di toluidina in acqua distillata, portata a pH 0.5 con HCl) e poi lavate abbondantemente con HCl 1M. Successivamente le sezioni sono state lavate con acqua distillata e infine il vetrino, asciugato alla fiamma, è stato osservato al microscopio ottico. Questa colorazione permette di evidenziare i polisaccaridi acidi, attraverso una reazione di metacromasia purpurea (Mc Cully, 1970; Novotny and Forman, 1975).

Colorazione con alcian blu in acido acetico (pH 2.5)

Aliquote di campioni cianobatterici freschi sono state poste in provette eppendorf e centrifugate per 3 minuti a 3500g. Il surnatante è stato tolto e sostituito con alcian blu allo 0,1%, in acido acetico al 0,5N (pH 2.5) e lasciato agire per 10 minuti a temperatura ambiente. Successivamente si sono effettuati numerosi lavaggi con terreno liquido BG11, centrifugando i campioni se necessario, fino ad ottenere un surnatante quasi trasparente. Il pellet finale è stato posto su un vetrino portaoggetto ed osservato al microscopio ottico. Questa colorazione evidenzia i gruppi carbossilici degli esopolisaccaridi delle guaine (Crayton, 1982).

Colorazione con alcian blu in HCl (pH 0.5)

Aliquote di campioni cianobatterici freschi sono stati posti a centrifugare per 3 minuti a 3500g. Il surnatante è stato sostituito con il colorante alcian blu all'0,1% in acido cloridrico 0,5N (pH 0,5) e lasciato agire per 10 minuti a temperatura ambiente.

In seguito sono stati eseguiti numerosi lavaggi con il terreno BG11, centrifugando i campioni se necessario, fino ad ottenere un surnatante quasi trasparente. Il pellet finale è stato posto su un vetrino portaoggetti ed osservato al microscopio ottico. Questa colorazione è specifica per gli esopolisaccaridi con gruppi solfati legati (Crayton, 1982).

Colorazione del DNA con DAPI

La colorazione del DNA è stata effettuata con Dapi (4', 6-diamidino-2-phenylindole), un composto che si lega al solco minore della doppia elica del DNA intercalandosi tra le basi adenina-timina (de Pinto *et al.*, 2002).

Cellule cianobatteriche sono state fissate in paraformaldeide 4% in PBS pH 7 per circa 15-20 minuti, successivamente sono stati effettuati due lavaggi con PBS per togliere tutto il fissativo in eccesso. Sospensioni cellulari sono state incubate con DAPI (concentrazione 3 µg/ml) per circa 10 minuti a temperatura ambiente, successivamente sono stati centrifugati. I campioni sono stati sottoposti ad una serie di lavaggi con PBS e ogni volta centrifugati. Infine sono stati allestiti dei vetrini e visualizzati tramite microscopio a fluorescenza (Leica DMR) con filtro di eccitazione tra 340-380 nm e un filtro di barriera di 430 nm. Il DNA è evidenziato dall'emissione in fluorescenza nel blu.

3.4.5 Colorazioni per la microscopia elettronica a trasmissione

Colorazione con acido periodico – tiosemicarbazide – proteinato d'argento (PATAg)

Sezioni ultrasottili di 85 nm dei campioni poste su retini d'oro sono state trattate con acido periodico all'1% in acqua e con tiosemicarbazide all'1% in acido acetico al 10% a cui è seguito un trattamento al buio con il proteinato d'argento all'1% in acqua. Si è proseguito poi con l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione senza il contrasto con acetato di uranile e il citrato di piombo (Thièry, 1967).

Per verificare la validità della reazione, sono stati effettuati i seguenti controlli:

1. Ossidazione con acido periodico e trattamento con proteinato d'argento senza l'aggiunta della tiosemicarbazide.
2. Ossidazione con acqua ossigenata al 5 – 10% per 25 minuti, seguita dal trattamento con tiosemicarbazide e proteinato d'argento per eliminare l'osmio senza ossidare i gruppi glicolici ed evidenziare così un'eventuale reazione positiva spuria dovuta alla presenza di gruppi aldeidici reattivi preesistenti e non prodotti dalla reazione ossidativa dell'acido periodico.

Questa colorazione viene adoperata per evidenziare i polisaccaridi composti da zuccheri con gruppi vic-glicolici (Thièry, 1967), che vengono visualizzati dalla presenza sulle molecole dei granuli elettrondensi di argento. Risultano positivi i polisaccaridi che hanno monomeri legati principalmente tra C₁ e C₄, come ad

esempio i glucani. Le ramificazioni riducono il numero di vic-glicoli liberi reattivi e quindi indeboliscono la risposta. Sono invece negativi i polisaccaridi con legami tra C₁ e C₃ o tali da eliminare i gruppi vic-glicolici o quelli con numerose ramificazioni.

Colorazione con acido fosfotungstico

Per evidenziare la presenza di proteine all'interno della guaina del cianobatterio ETS-10 è stato applicato il metodo descritto da Silverman and Glick nel 1969. I campioni sono stati fissati in glutaraldeide 1% in tampone potassio-fosfato 0.1M, successivamente sono stati trattati con acido fosfotungstico in 6.25% Na₂SO₄ e lavati con acetato d'ammonio 2%. Dopo le disidratazioni in alcool, portato a pH 2.0 con acido formico, e ossido di propilene i campioni sono stati inclusi in Araldite (Durcupan® ACM Fluka). I campioni sono stati infine tagliati all'ultramicrotomo con una lama munita di una vaschetta colma di una soluzione di HCl 0.01N.

3.5 ANALISI DELL'ASSETTO PIGMENTARIO DEI CIANOBATTERI

3.5.1 Analisi dei pigmenti fotosintetici idrosolubili con metodo spettrofotometrico

Per stimare il contenuto in ficobiliproteine, aliquote delle colture dei cianobatteri in studio sono state filtrate con un filtro Millipore da 2 µm. I campioni così ottenuti sono stati frantumati con mortaio e pestello, mantenendoli costantemente in azoto liquido, e alla polvere ottenuta è stata aggiunta un'opportuna quantità di tampone fosfato (NaH₂PO₄ 0.01M, NaCl 0.15M, pH 7). Dopo 24 ore a 4°C gli estratti sono stati centrifugati a 3500g per 10 min e successivamente analizzati mediante uno spettrofotometro (Beckam DU-530) in spettro continuo.

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

$$[PC] = \frac{A_{615} - 0.474 \cdot (A_{652})}{5.34}$$

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

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

Dove:

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

A₆₁₅, A₆₅₂ e A₅₆₂= valori di assorbanza rilevati a 615 nm, 652 nm, e 562 nm in tampone salino.

3.5.2 Analisi dei pigmenti fotosintetici liposolubili con metodo spettrofotometrico

Per stimare il contenuto in clorofilla *a* e carotenoidi, aliquote delle colture dei cenobatteri in studio sono state filtrate con un filtro Millipore da 2 µm. I filtri sono stati poi immersi completamente in 2 ml di N,N-dimetilformamide un solvente che permette di estrarre le clorofille e i carotenoidi (Moran and Porath, 1980). Il tutto è stato mantenuto al buio a 4°C per 24 ore (Wellburn, 1994). Il giorno successivo gli estratti sono stati centrifugati per 5 minuti a 3500g e il surnatante ottenuto è stato utilizzato per effettuare l'analisi dei pigmenti mediante letture allo spettrofotometro (Beckam DU-530) in spettro continuo.

I valori quantitativi di clorofilla-*a* e carotenoidi sono stati ottenuti utilizzando le seguenti formule (Sakamoto and Brayant, 1998):

$$[\text{Chl } a] = (A_{664} - A_{750}) \times 11,92$$

$$[\text{Car}_{\text{tot}}] = \{(A_{461} - A_{750}) - 0.046 \times (A_{664} - A_{750})\} \times 4$$

Dove:

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

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

A₆₆₄, A₄₈₀, A₇₅₀ = valore di assorbanza rilevato rispettivamente a 664 nm, a 461 nm e a 750 nm in dimetilformamide (DMF).

3.5.3 Analisi dei carotenoidi mediante HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

E' stato analizzato il contenuto di carotenoidi di campioni prelevati dalle diverse condizioni di crescita allestite, mediante analisi all'HPLC.

I pigmenti liposolubili sono stati estratti aggiungendo al campione acetone 90% e una quantità appropriata di biglie di vetro (diametro 710-1180 µm). I campioni sono stati vorticati per 3 minuti e dopo centrifugazione il surnatante è stato raccolto in una provetta mentre il pellet rimasto è stato riestratto, per assicurare la completa estrazione di tutti i pigmenti presenti nel campione. I surnatanti contenenti i pigmenti estratti sono stati portati a secco mediante insufflazioni di azoto e risospesi in acetone 100%. I campioni così ottenuti sono stati sottoposti a corsa cromatografica in fase inversa, mediante un apparecchio per HPLC (Agilent 1100) costituito da una colonna in silice (Lichrospher® 100 RP-18, 5µm – Merck) e da un rivelatore UV-VIS e a diodi (*DAD: Diode-Array-Detector*), secondo il metodo riportato in Komárek *et al.* (1999).

L'identificazione dei diversi pigmenti è stata ottenuta programmando il rivelatore con specifiche lunghezze d'onda di eccitazione (450 nm) e comparando l'ordine di eluizione e le caratteristiche degli spettri di assorbimento delle singole frazioni cromatografiche con quanto presente in letteratura (Jeffrey *et al.*, 1997; Lakatos *et al.*, 2001; Takaichi *et al.*, 2005).

3.6 ELABORAZIONE STATISTICA DEI DATI

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 (DNRT) (PL 0.0005).

Negli istogrammi valori non significativamente diversi sono indicati lettere uguali. Lettere diverse indicano invece valori significativamente diversi.

3.7 ANASISI MOLECOLARI

3.7.1 Selezione e mantenimento in coltura di ulteriori ceppi cianobatterici

Dopo una preliminare ricerca bioinformatica è stato possibile osservare che nei *database* informatici non erano disponibili sequenze di *Cyanothece aeruginosa*, specie tipo del genere, a cui ETS-09 sembrava appartenere dalle indagini morfologica e ultrastrutturale. Inoltre erano presenti pochissime sequenze di rappresentanti del genere *Chroococcus* a cui sembrava invece appartenere ETS-10. Sono stati quindi ordinati da diverse banche algali tutti i ceppi cianobatterici appartenenti a tali generi allo scopo di amplificare e determinare, anche per questi organismi, le sequenze dei *marker* molecolari da utilizzare nelle successive analisi filogenetiche. Per il genere *Chroococcus* non era più disponibile in alcuna banca algale la specie tipo *Chroococcus rufescens*. Gli *strain* utilizzati in questo lavoro sono stati acquistati presso le seguenti banche algali (tab. B): Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen (SAG), Culture Collection of Algal Laboratory (CCALA), Coimbra Collection of Algae (ACOI).

Per i diversi ceppi cianobatterici studiati sono state allestite colture, impiegando terreni di coltura specifici per i vari organismi (tab. B). I protocolli che illustrano la composizione e la modalità di preparazione dei diversi terreni di coltura sono disponibili presso i siti *web* delle banche algali (www.epsag.uni-goettingen.de/; acoi.ci.uc.pt/acoi_list.php; www.butbn.cas.cz/ccala/).

Organismo	Codice banca algale	Terreno di coltura
<i>Cyanothece aeruginosa</i>	SAG 87.79	MiEB ₁₂
<i>Cyanothece aeruginosa</i>	ACOI 2011	L-M7
<i>Chroococcus turgidus</i>	SAG 36.85	ASNIII
<i>Chroococcus turgidus</i>	ACOI 39	L-M7
<i>Chroococcus minutus</i>	CCALA 56	BG11
<i>Chroococcus cf. membraninus</i>	CCALA 54	BG11
<i>Chroococcus cohaerens</i>	ACOI 699	L-S ₂ T ₂
<i>Chroococcus minor</i>	ACOI 693	L-S ₂ T ₂

Tabella B. Elenco degli organismi acquistati presso le banche algali e rispettivi terreni di coltura.

3.7.2 Estrazione e quantificazione del DNA

L'estrazione del DNA è stata eseguita utilizzando il “*Genomic DNA purification kit #K0512*” (Fermentas[®]). Questo kit permette di isolare e purificare il DNA da contaminanti ed enzimi inibitori in modo da poterlo poi amplificare mediante PCR.

Prima di procedere con la reazione di amplificazione è stata stimata, attraverso una misura spettrofotometrica a 260 nm, la concentrazione del DNA nel campione in esame.

3.7.3 Amplificazione del DNA mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate, a partire dal DNA genomico estratto, mediante una *Taq* DNA polimerasi (FISHER) e un termociclatore in grado di lavorare in gradiente (peqSTAR96, EUROCLONE).

Nella tabella C rappresentata qui di seguito vengono riportati i parametri fisici delle reazioni di amplificazione

Step		Temperatura	Durata
Denaturazione iniziale	cicli : 1	95°C	5'
Denaturazione		95°C	45''
Appaiamento	cicli:	<i>primer</i> dipendente	30''
Estensione	30	72°C	lunghezza gene dipendente
Estensione finale	cicli : 1	72°C	5'
Terminazione	cicli : 1	4°C	5'

Tabella C. Parametri fisici delle reazioni di amplificazione.

Poiché non sempre l'utilizzo di un solo determinato *marker* molecolare si è rivelato adeguato a chiarire i rapporti filogenetici fra i cianobatteri, in questa tesi si è optato per un approccio multigenico. La scelta dei diversi *marker* molecolari è stata effettuata basandosi soprattutto su quanto disponibile in letteratura.

I *marker* molecolari utilizzati per la caratterizzazione degli organismi in studio sono stati il gene 16S rDNA e il gene *rbcL*. Sia per l'amplificazione che per il

sequenziamento sono stati utilizzati *primer* disponibili in letteratura o *primer* da me disegnati a volte diversi a seconda dell'organismo in studio (tab. D).

Per verificare a livello molecolare la capacità di azotofissazione degli organismi in studio, inoltre, si è voluto cercare la presenza nel genoma dei geni *nifD* e *nifH*, i quali codificano per due componenti del complesso multiproteico della nitrogenasi (Henson *et al.*, 2004). I *primer* utilizzati per l'amplificazione e il successivo sequenziamento sono riportati insieme agli altri nella tabella sottostante.

Gene	Sigla	Sequenza dei <i>primer</i>	Referenze
16S rDNA	16S1	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	Kobayashi
	16S2	5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'	
	16S3	5'-CTACGGGAGGCAGCAGTG-3'	Già a disposizione presso il laboratorio
	16S4	5'-CACTCGTGCCTCCCGTAG-3'	
	16S5	5'-ATACCCCAGTAGTCTAG-3'	
	16S6	5'-TAAACCACATACTCCACC-3'	Nübel <i>et al.</i> , 1997
	106F	5'-CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA-3'	
	359F	5'-GGGGAATYTTCCGCAATGGG-3'	
	781R _a	5'-GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT-3'	
	781R _b	5'-GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT-3'	Da me disegnati
	500F	5'-GAGGATGCAAGCGTTATCCG-3'	
805F	5'-AATGGGATTAGATACCCAGTAGTC-3'		
<i>rbcL</i>	GF-AB	5'- GARTCTTCIACYGGTACYTGGAC -3'	Tomitani <i>et al.</i> , 2006
	GR-D	5'- TGCCAIACGTGGATACCACC -3'	
	GF-C	5'- CTTYACYCAAGACTGGGCTTC -3'	
	GR-E	5'- AACTCRAACTTGATTTTCYTTCC -3'	
<i>nifD</i>	NifD1F	5'-TYGGWGGHGACAARAARCT-3'	Già a disposizione presso il laboratorio
	NifD2R	5'-TARTCCARGAGTGCATYTG-3'	
<i>nifH</i>	nifHF	5'-GVAAAGGCGGTATCGBAA-3'	Da me disegnati
	nifHR1	5'-ACGGGGTACGAAGTRATCA-3'	
	nifHR2	5'-CGCGGGGATGARTGCAGCA-3'	

Tabella D. Elenco dei *primer* utilizzati per amplificare e sequenziare le sequenze dei geni 16S rDNA, *rbcL*, *nifD* e *nifH*.

3.7.4 Analisi dei prodotti di PCR, purificazione e successivo sequenziamento

Per verificare il successo della reazione di amplificazione, i prodotti di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi in gel d'agarosio (*Agarose UltraPure*, GIBCO) 1% in tampone TE 1X (TRIS 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8), a cui è stato aggiunto preventivamente Gel Red (Società Italiana Chimici). Come *standard* per l'identificazione degli amplificati è stato utilizzato il *Low DNA Mass Ladder* (INVITROGEN). Una volta terminata la corsa elettroforetica e osservato il gel ai raggi UV (250-320 nm), tramite un transilluminatore collegato ad una telecamera, si

è proceduto alla purificazione degli amplificati. Nei casi in cui, dopo l'analisi mediante corsa elettroforetica, gli amplificati risultavano privi di prodotti aspecifici, si procedeva alla purificazione enzimatica con esonucleasi I e fosfatasi alcalina (*ExoSAP-ITTM kit*, Amersham Biosciences).

Se, invece, durante l'osservazione degli amplificati al transilluminatore si osservavano bande multiple, le bande d'interesse venivano estratte da gel e purificate utilizzando il *DNA Gel Extraction Kit* (MILLIPORE), dopo aver sottoposto gli amplificati a nuova corsa elettroforetica in gel d'agarosio (2% in tampone TAE 1X modificato, fornito dal suddetto *kit*). I prodotti amplificati mediante PCR e purificati sono stati inviati al centro di sequenziamento *BMR Genomics* (<http://www.bmr-genomics.it>) per il sequenziamento automatico secondo il metodo di Sanger, mediante l'uso del kit *ABI PRISM Dye Terminator Sequencing Core* (Perkin Elmer). Gli elettroferogrammi delle sequenze determinate presso il *BMR Genomics* sono stati successivamente controllati utilizzando il programma *Chromas Lite* che consente la visualizzazione degli elettroferogrammi stessi. Per ottenere la sequenza consenso di ogni amplificato, i singoli cromatogrammi ottenuti durante i successivi cicli di sequenziamento, sono stati combinati tra loro utilizzando il programma SeqMan II disponibile nel pacchetto di software Lasergene (DNASTar[®], Madison, WI). Per verificare infine l'identità di tutte le sequenze consenso è stato impiegato il programma *BLAST* (Altschul *et al.*, 1990) che ha consentito di confrontare le sequenze determinate da me con quelle disponibili nella banca dati NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.7.5 Selezione dei dati e allineamento delle sequenze

Quando possibile i ceppi cianobatterici utilizzati per determinare le nuove sequenze sono stati quelli rappresentanti il materiale tipico depositato direttamente dal descrittore/i delle specie. Questo approccio è stato attuato per minimizzare i possibili errori di identificazione dei *taxa* sempre possibili con i cianobatteri.

I confronti (*pairwise comparison*) tra sequenze ortologhe sono stati effettuati con il programma *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994) e *MUSCLE* (Edgard, 2004)

Gli allineamenti delle sequenze sono stati prodotti impiegando i programmi sopra citati. Nel caso del *data set* 16SrDNA l'allineamento multiplo ottenuto con *MUSCLE* è stato successivamente analizzato con il programma Gblock 0.91b (http://molevol.ibmb.csic.es/Gblocks_server/), per selezionare blocchi conservati di nucleotidi (Castresana, 2000). Questo approccio garantisce che le porzioni scelte soddisfino la condizione di omologia di posizione.

3.7.6 Analisi filogenetiche

Le analisi filogenetiche sono state condotte applicando il metodo di *maximum likelihood* (ML) che risulta statisticamente robusto e più efficace di altri approcci (Felsenstein, 2003).

La scelta del modello migliore da utilizzare per i *data set* in esame è stata effettuata usando il programma Modeltest 3.7 e secondo il criterio di Akaike (Posada and Crandall, 1998).

Per valutare la robustezza delle topologie dei diversi alberi ottenuti è stato applicato il test statistico di *bootstrap* (Felsenstein, 1985), effettuando 1000 repliche.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Nei campioni cianobatterici prelevati dalla superficie del fango delle vasche idrotermali di Abano Terme erano presenti tre diversi tipi di cianobatteri coccoidi che hanno prodotto, in terreno liquido, una coltura mista con microrganismi diversi per dimensione, forma e colore delle cellule (Fig. 1).

Dei tre cianobatteri sono stati utilizzati nel presente studio i ceppi indicati con le frecce in figura 1 e presentati, nelle figure 2 e 3 nelle colture pure ottenute in laboratorio tramite la tecnica della diluizione su piastra. I due ceppi sono stati denominati rispettivamente ETS-09 ed ETS-10.

I risultati ottenuti e la discussione dei dati sperimentali saranno riportati di seguito separatamente per i due diversi organismi.

4.1 ETS-09

4.1.1 Crescita del cianobatterio ETS-09 a 30°C

La crescita delle colture cianobatteriche a 30°C in terreno di coltura BG11, ricavata dall'aumento della densità ottica a 750 nm, mostrava un incremento continuo nelle prime 5-6 settimane per poi entrare in fase stazionaria (Fig. 4). Tutte le indagini morfologiche, ultrastrutturali e fisiologiche del microorganismo in esame, pertanto, sono state condotte utilizzando colture al 28° giorno dall'inoculo iniziale.

4.1.2 Morfologia delle cellule cianobatteriche al microscopio ottico

Al microscopio ottico le cellule cianobatteriche, in fase di crescita esponenziale (Fig. 5a), si presentavano di forma ovoidale, con l'asse trasversale di circa 5 µm e quello longitudinale più variabile (6-10 µm). Le cellule erano singole o a coppie, qualora in fase di divisione. La divisione avveniva per scissione simmetrica lungo il piano equatoriale della cellula iniziale e dava origine a due cellule figlie delle stesse dimensioni.

Dopo eccitazione con luce UV le cellule mostravano una forte autofluorescenza rossa (Fig. 5b) che indicava un alto contenuto in clorofilla *a*.

4.1.3 Ultrastruttura delle cellule cianobatteriche al microscopio elettronico a scansione e a trasmissione

Al microscopio elettronico a scansione (SEM) le cellule cianobatteriche si presentavano distinte, singole o in divisione per scissione equatoriale (Figg. 6a, b). A queste caratteristiche, già riscontrate al microscopio ottico, si aggiungeva l'osservazione della superficie cellulare rivestita da uno strato individuale di materiale mucillaginoso che poteva formare sottili briglie colleganti più cellule tra loro.

Informazioni sull'organizzazione interna delle cellule sono derivate dall'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione (TEM). Al TEM (Figg. 7a, b) le cellule cianobatteriche in esame mostravano:

- numerosi tilacoidi che si prolungavano perpendicolarmente alla superficie cellulare distribuendosi in tutto il citoplasma, spesso raggruppati in fasci;
- carbosomi di forma poliedrica;
- numerose inclusioni rotondegianti di materiali di riserva scarsamente elettrondensi.

All'esterno delle cellule, inoltre, si distingueva il materiale mucillaginoso rilevato più chiaramente al SEM.

Tutte queste caratteristiche ultrastrutturali erano simili a quelle descritte per le specie appartenenti ai generi *Cyanothece*, *Halothece* e *Euhalothece* (Komárek and Cepák, 1998; Margheri *et al.*, 2008; Porta *et al.*, 2000). Inoltre, come per i generi sopraelencati, le cellule di ETS-09 non presentavano, all'esterno della sottile parete cellulare, la guaina, che viene considerata un fattore tassonomico di distinzione rispetto a forme di generi affini (Ohki *et al.*, 2008).

Secondo Porta *et al.* (2000) inclusioni chiare, simili a quelle osservate nel microrganismo in esame, possono trovarsi in diversi cianobatteri. In alcune specie esse sono delimitate da una membrana unitaria, poiché corrispondono ad aree intratilacoidali ampiamente dilatate. In *Cyanothece*, invece, questi grossi granuli poco elettrondensi sono localizzati nel citoplasma e sono racchiusi da uno o più tilacoidi.

Ciò era quello che si osservava anche nel cianobatterio ETS-09, in cui le voluminose inclusioni chiare risultavano bordate da un profilo tilacoidale (Fig. 7a). Le inclusioni poco elettrondense erano molto numerose sia nelle cellule singole che in quelle in divisione (Fig. 7b) e questo sembrava essere un'ulteriore carattere distintivo dei ceppi di *Cyanothece*. Secondo Porta *et al.* (2000), infatti, in *Cyanothece* questi inclusi verrebbero prodotti costitutivamente, a differenza di altri cianobatteri in cui la produzione è indotta o incrementata da condizioni di stress nutrizionali (Ariño *et al.*, 1995; Miyake *et al.*, 1996;).

Generalmente queste inclusioni scarsamente elettrondense si considerano costituite da polioidrossibutirrato (Stal, 1992; Ariño *et al.*, 1995; Miyake *et al.*, 1996; Porta *et*

al., 2000). Secondo alcuni autori (Schneegurt *et al.*, 1997; Falcón *et al.*, 2004), invece, le inclusioni in *Cyanothece* sono formate da polisaccaridi di riserva. Questi autori hanno ricavato tale ipotesi dalla risposta positiva dei materiali inclusi al test citochimico PATAg, specifico per l'identificazione al TEM di polisaccaridi (Thiéry, 1967).

Allo scopo di verificare la possibile natura polisaccaridica di questi ammassi nel cianobatterio ETS-09 è stato effettuato sulle cellule lo stesso test citochimico PATAg.

Il test (Figg. 8a, b) non ha evidenziato una risposta positiva delle inclusioni cellulari chiare che, quindi, almeno nel ceppo in studio, non hanno composizione polisaccaridica, o, perlomeno, non contengono polisaccaridi positivi al test in questione, che è specifico per polisaccaridi composti da zuccheri con gruppi vic-glicolici liberi (Thiéry, 1967). Sono, invece, risultate positive al test citochimico la componente polisaccaridica della sottile parete cellulare e i granuli citoplasmatici di "amido delle cianoficee". Questo è un polisaccaride simile al glicogeno, che costituisce una riserva di fotosintati nelle cellule cianobatteriche. L'amido delle cianoficee è un omopolimero del α -D-glucosio ed è costituito da catene lineari con legami $\alpha(1-4)$ su cui si inseriscono catene laterali attraverso un legame $\alpha(1-6)$. Quindi i gruppi vic-glicolici del glucosio non sono impegnati nei legami e rispondono positivamente al test PATAg. Questo test ha anche rivelato l'abbondanza nelle cellule cianobatteriche delle riserve amilacee, distribuite in forma di piccoli granuli, regolarmente allineati tra le membrane tilacoidali (Figg. 8a, b).

Cepák e collaboratori nel 2010 hanno utilizzato come ulteriore carattere tassonomico per la caratterizzazione di sei specie appartenenti al genere *Euhalothece* la distribuzione del DNA all'interno della cellula. Quest'ultima è stata quindi analizzata citomorfologicamente anche nel cianobatterio in esame, utilizzando come colorante fluorescente il DAPI. In ETS-09 il nucleoplasma era distribuito in tutta la cellula, con il DNA concentrato in piccole masserelle di forma variabile collegate fra di loro (Figg. 9a, b). Questo tipo di distribuzione era molto simile sia a quella descritta recentemente nelle sei specie di *Euhalothece* (Cepák and Komárek, 2010) sia a quella segnalata precedentemente in *Cyanothece aeruginosa* (Cepák, 1993).

Le caratteristiche ultrastrutturali rilevate al SEM e al TEM e la distribuzione del DNA all'interno delle cellule suggerivano che il cianobatterio ETS-09 potesse appartenere ai generi *Cyanothece*, *Halothece* o *Euhalothece*. A ciò si aggiungeva l'indicazione di Komárek (Komárek and Anagnostidis, 1999), che nella descrizione di questi generi sottolineava il peculiare colore verde-oliva delle colture. È da notare che lo stesso colore caratterizzava anche le colture del cianobatterio in esame (vedi Fig.12).

4.1.4 Contenuti in pigmenti fotosintetici delle cellule cianobatteriche

Sulla coltura in fase di crescita esponenziale è stata effettuata un'analisi dei pigmenti fotosintetici delle cellule cianobatteriche.

L'analisi con HPLC dei pigmenti liposolubili (clorofilla *a* e carotenoidi) ha evidenziato il picco molto elevato della clorofilla *a* oltre ai picchi delle diverse forme di carotenoidi (Fig. 10). Tra questi prevalevano due carotenoidi comuni anche alle piante superiori, il β -carotene e la zeaxantina, che nei cianobatteri è la forma più abbondante di xantofilla (Hirschberg and Chamovitz, 1994). Oltre a questi erano presenti particolari forme di pigmenti, proprie dei cianobatteri, che, in base ai tempi di ritenzione e agli spettri di assorbimento, ottenuti con il Diode-Array-Detector, sono stati riconosciuti come il chetocarotenoide echineone, il carotenoide glicoside mixoxantofilla e un pigmento non ascrivibile ad alcun carotenoide noto, ma segnalato anche in altri cianobatteri (Hirschberg and Chamovitz, 1994).

Particolarmente interessante è risultata l'analisi spettrofotometrica delle ficobiliproteine, idrosolubili, che, nei cianobatteri, costituiscono l'antenna principale dell'apparato fotosintetico. L'analisi ha rilevato che nel microrganismo in esame le tre forme di pigmento, ficoeritrina, ficocianina e alloficocianina erano presenti in percentuali molto vicine (Fig. 11).

Generalmente, nei cianobatteri predominano le ficobiliproteine con cromofori blu, come la ficocianina e l'alloficocianina e ciò è responsabile del colore verde-azzurro assunto dalle cellule di questi microrganismi (Van den Hoek *et al.*, 1995). Inoltre, mentre queste due forme di pigmento sono sempre presenti, la ficoeritrina può addirittura mancare in alcune specie cianobatteriche (Moreno *et al.*, 1995). Quindi la presenza di una percentuale così elevata di ficoeritrina, come quella riscontrata nel cianobatterio in studio, risultava essere un carattere non comune e poteva render conto del colore verde-oliva assunto dalle colture (Fig.12).

Come detto in precedenza, questa particolare pigmentazione è stata segnalata anche per colture di *Cyanothece* e generi affini (Komárek and Anagnostidis, 1999).

4.1.5 Capacità di azoto-fissazione del cianobatterio ETS-09

Dal momento che numerosi ceppi di *Cyanothece* sono in grado di fissare l'azoto atmosferico (Rippka and Waterbury, 1977; Falcon *et al.*, 2004) si è ritenuto interessante verificare se anche il cianobatterio ETS-09 possedesse questa capacità diazotrofa. A tale scopo è stata effettuata un'analisi molecolare per ricercare la presenza di due geni *nif* (*nifH* e *NifD*) nel DNA del cianobatterio in studio. Le sequenze ottenute dopo l'amplificazione e il sequenziamento risultavano di 544 pb per il gene *nifH* e di 867 pb per il gene *NifD* e corrispondevano a quelle dei geni *nifH* e *nifD* di altri cianobatteri diazotrofi, con un'identità di circa l'80%.

La capacità di azoto-fissazione è stata verificata ponendo il cianobatterio in coltura in terreno privo di nutrienti azotati (BG11₀). Dopo due settimane dall'inoculo in terreno BG11₀ si erano sviluppate colture del cianobatterio (Fig. 12).

4.1.6 Crescita delle colture in terreno privo di nutrienti azotati e caratteristiche delle cellule cianobatteriche

Colture allestite in terreno privo di nutrienti azotati (BG11₀) sono state sottoposte alle stesse condizioni di luce e temperatura di quelle cresciute in terreno rifornito di NaNO₃ (BG11). Come già fatto per queste ultime, anche per la coltura del cianobatterio mantenuto in terreno privo di nutrienti azotati è stata valutata la crescita per un periodo di 7 settimane.

Dal confronto delle due curve di crescita è risultato che la crescita del cianobatterio nel terreno BG11₀ differiva poco da quella nel terreno BG11, mantenendosi su valori confrontabili sia come quantità che come andamento nel tempo (Fig. 13).

La mancanza di azoto inorganico nel terreno di coltura non interferiva, quindi, con la capacità di crescita del microorganismo, che riusciva a supplire a questa carenza nutrizionale con la fissazione e l'organizzazione dell'N₂.

Anche sui cianobatteri cresciuti in mancanza di nutrienti azotati sono state condotte indagini morfologiche, ultrastrutturali e fisiologiche.

Al microscopio ottico le cellule apparivano di aspetto normale (Fig. 14a) e dopo eccitazione con luce UV l'autofluorescenza rossa dimostrava che erano vitali e ricche di clorofilla *a* (Fig. 14b).

Nelle micrografie al microscopio elettronico a scansione non si rilevavano differenze di forma e dimensione tra le cellule del cianobatterio cresciuto in assenza di nutrienti azotati (Fig. 15), rispetto a quelle del microorganismo rifornito di NaNO₃ (vedi Figg. 6a, b).

Le stesse caratteristiche ultrastrutturali, precedentemente rilevate al microscopio elettronico a trasmissione nelle cellule cresciute in terreno BG11 completo (vedi Figg. 7a, b), si ritrovavano nelle cellule cresciute in assenza di NaNO₃ che, come unica differenza, mostravano una maggiore quantità di materiale mucillaginoso (Figg. 16a, b).

La mancanza di nutrienti azotati nel terreno di coltura, quindi, non ha avuto conseguenze evidenti sulla morfologia e sull'organizzazione ultrastrutturale delle cellule del cianobatterio in esame.

Allo scopo di verificare se la crescita sul terreno privo di nutrienti azotati avesse influenzato la produzione di pigmenti fotosintetici, è stata condotta una analisi spettrofotometrica dei contenuti di ficobiliproteine, clorofilla e carotenoidi delle colture cresciute in assenza di NaNO₃.

L'analisi delle ficobiliproteine mostrava una lieve diminuzione della concentrazione di alloficocianina nelle cellule cresciute in assenza di nutrienti azotati, rispetto a quelle cresciute in normale terreno BG11, mentre nelle cellule cresciute in terreno BG11₀ era possibile osservare un aumento piuttosto rilevante della quantità di ficocianina e ficoeritrina (Fig. 17). Ciò portava a supporre che nelle cellule cresciute in assenza di nutrienti azotati, piuttosto che il numero dei ficobilisomi fosse

umentata la dimensione di queste antenne. Questo perchè la quantità di alloficocianina, che costituisce il core dei ficobilisomi, restava più o meno costante mentre si verificava un aumento dei due pigmenti che costituiscono i bracci bastoncellari del ficobilisoma. Questo aumento della dimensione delle antenne permetterebbe all'apparato fotosintetico di captare più energia luminosa per incrementare la fotosintesi diurna e far fronte alla forte richiesta energetica della fissazione notturna di azoto.

I contenuti in clorofilla *a* (Fig. 18a) e in carotenoidi totali (Fig. 18b) erano invece del tutto simili nei due tipi di cellule cianobatteriche, il che significava che anche i rapporti quantitativi clorofilla *a* / carotenoidi non avevano subito variazioni.

Per verificare se vi fossero differenze tra le forme di carotenoidi presenti nelle cellule cresciute con o senza NaNO₃, è stata infine condotta un'indagine con HPLC. Dall'analisi dei cromatogrammi è risultato che nelle cellule cresciute in assenza di nutrienti azotati erano presenti le stesse forme di pigmenti già rilevate nella cellule cresciute in terreno BG11. Nelle due diverse condizioni di crescita venivano inoltre mantenuti pressoché invariati anche i rapporti percentuali tra i diversi carotenoidi (Figg. 19a, b). Quindi, la crescita delle cellule cianobatteriche in assenza di nutrienti azotati non ha avuto conseguenze né sulla quantità dei pigmenti fotosintetici liposolubili esaminati né sui loro rapporti reciproci nelle membrane tilacoidali.

4.1.7 Crescita delle colture di ETS-09 a 40°C

Allo scopo di indagare gli eventuali effetti sulle cellule cianobatteriche dell'aumento della temperatura di crescita, in questa parte dell'elaborato sono stati confrontati gli stessi parametri strutturali e fisiologici considerati nella prima parte, in cellule di colture mantenute a 40°C.

Dal confronto della curva di crescita della coltura cianobatterica a 40°C, con quella a 30°C (Fig.20) risultava, innanzitutto, che la crescita del cianobatterio alle due temperature era simile nel primo periodo, per differenziarsi poi verso la quinta settimana. Nella coltura mantenuta a 40°C, dopo la fase esponenziale, che terminava a circa 4-5 settimane dall'inoculo, iniziava una breve fase stazionaria seguita poi da un graduale decremento della densità ottica, plausibilmente da attribuire all'entrata in senescenza. L'aumento della temperatura, quindi, non aveva conseguenze immediate o a breve termine sulla crescita del cianobatterio, ma si dimostrava stressante se mantenuta per lunghi periodi, accelerando la senescenza della coltura e anche la perdita di un certo numero di cellule, come poteva dedursi dalla diminuzione della densità ottica della coltura.

L'analisi della crescita a 40°C è stata condotta anche su colture allestite in terreno BG11₀, privo di nutrienti azotati. Anche a 40°C, come già rilevato a 30°C, sia i valori che l'andamento nel tempo delle curve di crescita delle colture rifornite o meno di nutrienti azotati erano del tutto sovrapponibili, con una crescita, addirittura

maggiore, anche se di poco, di quelle prive di azoto inorganico (Fig. 20). Ciò confermava l'effetto inibitorio a lungo termine della più alta temperatura sulla crescita delle colture cianobatteriche e forniva un'ulteriore dimostrazione del fatto che in mancanza di nutrienti azotati l'attività diazotrofa di ETS-09 era sufficiente a soddisfare pienamente le richieste nutrizionali delle cellule cianobatteriche.

Le indagini sulle colture di ETS-09 mantenute a 40°C in terreno BG11₀ si sono limitate alla valutazione della crescita del microrganismo. Ciò aveva lo scopo di rilevare la capacità del cianobatterio di supplire con l'attività diazotrofa alle carenze nutrizionali anche in una condizione di crescita che poteva non essere ottimale.

Le successive analisi strutturali e fisiologiche sono poi proseguite su cellule cianobatteriche cresciute a 40°C in terreno di coltura completo (BG11).

4.1.8 Caratteristiche delle cellule cianobatteriche cresciute a 40°C

Un risultato interessante e inatteso è derivato dall'osservazione al microscopio ottico delle cellule cianobatteriche cresciute a 40°C. Tale osservazione ha infatti dimostrato che l'aumento della temperatura di crescita aveva causato un cambiamento sorprendente della forma delle cellule. Queste si presentavano ora non più tutte ovoidali, ma di forma variabile, con la prevalenza di individui allungati, che potevano raggiungere singolarmente le dimensioni anche di 100 µm (Fig. 21a). Questi microrganismi, comunque, erano vitali, come dimostrato dalla forte autofluorescenza rossa della clorofilla dopo eccitazione con luce UV (Fig. 21b).

Una conferma di questa peculiare forma delle cellule del cianobatterio in esame cresciuto a 40°C è derivata dalle osservazioni al microscopio elettronico a scansione (Fig. 22).

Al microscopio elettronico a trasmissione le lunghe cellule cianobatteriche non mostravano particolari anomalie interne (Fig. 23a). A maggiore ingrandimento, in sezioni più vicine al piano trasversale, si riconoscevano le inclusioni di sostanze di riserva e numerosi tilacoidi distribuiti nella massa citoplasmatica (Fig. 23b).

Dall'analisi spettrofotometrica dei pigmenti fotosintetici è risultato che, nelle colture in fase esponenziale, i contenuti di clorofilla *a* (Fig. 24a) e carotenoidi totali (Fig. 24b) non erano significativamente differenti da quelli rilevati nelle colture cresciute a 30°C. Anche le forme di carotenoidi e i loro rapporti percentuali, ricavati dalle analisi con HPLC, non mostravano differenze rilevanti tra le colture mantenute a 40°C (Fig. 25b) e le colture cresciute a 30°C (Fig. 25a).

Quindi, l'aumento della temperatura di crescita da 30°C a 40°C, non modificava sostanzialmente la composizione in pigmenti fotosintetici liposolubili delle colture cianobatteriche, perlomeno nella fase di crescita esponenziale.

Anche i contenuti totali di ficobiliproteine, d'altro canto, si sono rivelati simili nelle colture cresciute alle due diverse temperature (Fig. 24c), così come simili si sono mantenuti i rapporti percentuali tra le tre diverse forme di questi pigmenti (non mostrato).

4.1.9 Il limite di termo-tolleranza di ETS-09

Per ETS-09 è stato, infine, definito il limite massimo di termo-tolleranza, analizzandone la capacità di crescita e sopravvivenza a temperature superiori ai 40°C. Le curve di crescita (Fig. 26) hanno evidenziato che l'aumento della temperatura da 40°C a 45°C riduceva fin dall'inizio la velocità di crescita del cianobatterio. La temperatura di 45°C, comunque, permetteva ancora una certa crescita della colonia, anche se per un periodo limitato (7-10 giorni), dopo il quale la caduta della densità ottica, utilizzata come misura di crescita, anche al di sotto dei valori rilevati al momento dell'inoculo, indicava la morte e la degradazione di un numero via via maggiore di cellule.

A 47°C la colonia di ETS-09 manteneva una seppur minima crescita nei primi giorni dall'inoculo per poi degradarsi rapidamente.

A 50°C, infine, il decremento della densità ottica riscontrato già al primo giorno dopo l'inoculo indicava che questa temperatura portava rapidamente alla morte delle cellule.

Le temperature di 45°C e 47°C, quindi, mostravano una certa permissività, per la crescita o perlomeno per la sopravvivenza delle cellule cianobatteriche, seppure molto limitata nel tempo. Ciò può avere un significato nell'ambiente naturale di crescita di questi microorganismi, dove possono avvenire cambi repentini di temperatura dell'acqua termale che copre i fanghi nelle vasche di maturazione. Dai nostri dati sperimentali risulta che le cellule di ETS-09 sono in grado di sopravvivere se la temperatura dell'acqua sale fino a quasi 50°C per alcuni giorni, ma muoiono se queste temperature si mantengono troppo a lungo, prima di scendere ai valori ottimali di 30°C, o anche di 40°C.

La termo-tolleranza di questo cianobatterio coccoide si dimostra così più limitata di quella delle forme filamentose del Comprensorio Euganeo, che tollerano invece temperature fino a 60°C.

Ciò potrebbe essere correlato al fatto che ETS-09 è stato ritrovato in una popolazione cianobatterica che si era sviluppata sulla superficie del fango di una vasca in cui la temperatura dell'acqua termale non superava i 40°C.

4.1.10 La morte di ETS-09 a 50°C

La temperatura di 50°C portava alla morte delle colonie di ETS-09 in pochi giorni. Sulle cellule dei cianobatteri tenuti a questa temperatura sono state condotte giornalmente analisi morfologiche, ultrastrutturali e di contenuti in pigmenti fotosintetici, allo scopo di seguire gli eventi di morte cellulare.

Partendo dalle situazioni delle cellule cianobatteriche cresciute a 30°C (indicate come T0 = tempo 0), sono state indicate come T1, T2, T3 e T4 le situazioni riscontrate, rispettivamente, a 1, 2, 3 e 4 giorni dal trasferimento delle colture a 50°C. Il trasferimento a 50°C portava alla deformazione delle cellule che si allungavano e mostravano setti di divisione in posizioni anomale. Ciò era particolarmente evidente

dopo quattro giorni di permanenza a questa temperatura (Fig. 27a). Le osservazioni al microscopio a fluorescenza rivelavano una caduta nel tempo della fluorescenza della clorofilla *a* (Fig. 27b), così come della fluorescenza delle ficobiliproteine (Fig. 27c), che costituiscono l'antenna esterna del PSII in questi microrganismi. La diminuzione nel tempo del contenuto in clorofilla *a* delle cellule mantenute a 50°C era confermata dall'analisi quantitativa condotta allo spettrofotometro (Fig. 28a). La stessa analisi mostrava la caduta nel tempo della quantità dei carotenoidi totali (Fig. 28b). Al microscopio elettronico a trasmissione già nelle cellule trasferite da un solo giorno a 50°C (Fig. 29a) si osservava un diradamento dei tilacoidi che poteva essere messo in relazione con la diminuzione dei pigmenti fotosintetici. Nel citoplasma, inoltre, era scomparsa la maggior parte delle riserve cellulari ed erano invece comparse masserelle di materiale fortemente elettrodenso. La demolizione delle membrane tilacoidali e le altre modificazioni cellulari erano ancora più accentuate dopo tre giorni dalla permanenza a 50°C (Fig. 29b). Dopo quattro giorni a questa temperatura la maggior parte delle cellule cianobatteriche avevano citoplasmici parzialmente svuotati (Fig. 29c), ampie aree chiare e masse più consistenti di materiale elettrodenso. Il volume citoplasmatico però non era diminuito e il protoplasto era ancora strettamente aderente alla sottile parete cellulare.

4.1.11 Indagine molecolare della posizione filogenetica di ETS-09

Descrizione dei Data set

Per determinare la posizione filogenetica di ETS-09 sono stati creati tre distinti *data set* di seguito descritti.

I primi due *set* erano costituiti rispettivamente dalle sequenze del 16S rDNA e *rbcL*. Il *data set* relativo al primo gene includeva 80 sequenze. La scelta delle sequenze da includere nel *data set* è stata condotta basandosi su una preliminare analisi filogenetica (dati non mostrati), ottenuta utilizzando un dataset includente quasi tutte le sequenze di 16S rDNA disponibili in GenBank. Basandosi su questo risultato preliminare, il *data set* del 16S rDNA conteneva sequenze di cianobatteri appartenenti ai generi risultati più vicini filogeneticamente all'organismo in esame. Inoltre sono state inserite tutte le sequenze disponibili in GenBank dei rappresentanti dei generi *Cyanothece*, *Euhalothece* e *Halothece*, poiché molto simili morfologicamente ed ultrastrutturalmente al ceppo in studio. Le sequenze geniche di *Clostridium perfringens* ed *Escherichia coli* sono state utilizzate come *outgroup*.

Il *data set* dell'*rbcL* rappresentava un *sub set* del precedente, poiché in GenBank il numero di sequenze disponibili di cianobatteri per questo *marker* è limitato.

Ad entrambi i *data set* sono state aggiunte le sequenze ottenute da ceppi distinti della specie tipo del genere *Cyanothece*, *Cyanothece aeruginosa* (Nägeli) Komárek, acquistati presso la banca algale tedesca (SAG) e quella spagnola (ACOI). Ciò si è reso necessario dal momento che il materiale tipo non era più disponibile. In questo modo si è potuta verificare la variabilità genetica di questi due *taxa*.

Un terzo *data set* chiamato 16S rDNA+rbcL è stato ottenuto combinando le sequenze in comune dei due *set* sopra citati, corrispondenti a 31 *taxa*.

L'allineamento multiplo per il 16S rDNA è rappresentato da 1407 nucleotidi mentre gli allineamenti multipli *rbcL* e 16S rDNA+rbcL sono formati rispettivamente da 1077 e 2592 basi.

Il miglior modello di evoluzione per tutti i *data set* è risultato GTR+I+G, selezionato con Modeltest (vedi par.3.7.6).

Filogenesi condotta sul data set 16S rDNA

La topologia ottenuta è presentata in Fig.30.

Il ceppo ETS-09 si posizionava come *sister taxon* di un gruppo includente quasi tutti i rappresentanti del genere *Microcystis* più *Synechocystis*, senza ottenere però un buon valore di *bootstrap*.

Dalla ricostruzione filogenetica si deduceva che il ceppo ETS-09 risultava lontano dai rappresentanti dei generi *Cyanothece*, *Euhalothece* e *Halothece*, non supportando le ipotesi di identificazione basate sui dati morfologici ed ultrastrutturali. Il genere stesso *Cyanothece*, così come attualmente definito, è polifiletico. Infatti le sequenze da me determinate di *Cyanothece aeruginosa* si collocavano lontano dalle altre rappresentanti di questo *taxon*.

Filogenesi condotta sul data set rbcL

La ricostruzione filogenetica ottenuta per il gene *rbcL* è presentata in fig.31.

In questa topologia il ceppo ETS-09 assumeva una posizione isolata confermata da un buon valore di BT (90%). Questa analisi confermava quanto evidenziato dalla precedente topologia e cioè la distanza filogenetica tra il ceppo aponense e i rappresentanti del genere *Cyanothece*. Ancora una volta il genere *Cyanothece* risultava polifiletico con i due *taxa* di *Cyanothece aeruginosa* formanti un *clade* ben supportato (100% BT) e nettamente lontani dagli altri *taxa* di questo genere. Inoltre le due specie di *Cyanothece aeruginosa* ordinate presso due distinte banche algali, mostravano 67 nucleotidi di differenza a cui però corrispondevano solo 4 amminoacidi diversi nella sequenza proteica.

Filogenesi condotta sul data set combinato 16Sr DNA-rbcL

La topologia ottenuta combinando i due precedenti *data set* è mostrata in Fig. 32.

Da questa analisi ETS-09 risultava *sister taxon* di *Cyanothece* sp. PCC 7424 con un buon supporto di BT (90%); le due sequenze mostravano un'identità nucleotidica del 86,2%. Anche in questa ricostruzione il genere *Cyanothece* risultava polifiletico.

In passato gli studiosi di cianobatteri hanno classificato questi organismi basandosi esclusivamente sulle informazioni derivanti dalle analisi morfologiche ed ultrastrutturali. Negli ultimi due decenni, attraverso l'utilizzo delle tecniche molecolari ad integrazione delle precedenti informazioni, si è visto come diversi

gruppi siano in realtà polifiletici. La difficoltà nel classificare questi organismi, in particolare quelli coccoidi, derivava dalla notevole uniformità morfologica e dalla scarsità di caratteri peculiari. Uno di questi è rappresentato dalla distribuzione delle membrane tilacoidali all'interno del citoplasma (Hoffmann *et al.*, 2005). Questo tuttavia non costituisce un buon carattere per definire gruppi monofiletici. Infatti si è visto che specie filogeneticamente imparentate condividono questa caratteristica, ma la stessa è presente anche in *taxa* geneticamente molto distinti.

Inoltre, le stesse caratteristiche fisiologiche, come ad esempio la capacità di fissare l'azoto, sono state spesso utilizzate per attribuire un organismo ad un determinato genere. In realtà recenti lavori (Falcón *et al.*, 2004), così come i risultati ottenuti nel presente elaborato, evidenziano come questo carattere non sia un buon sistema per individuare gruppi monofiletici. Probabilmente questa prerogativa è la conseguenza di un adattamento degli organismi per fronteggiare determinate condizioni ambientali, quali la carenza di nutrienti azotati. Lo stesso genere *Cyanothece*, a cui tradizionalmente venivano attribuite le specie coccoidi azotofissatrici, in realtà include *taxa* geneticamente molto distinti. Questo ha comportato una difficoltà nell'identificazione e attribuzione di nuovi ceppi a questo genere particolarmente eterogeneo.

Da qui la necessità di aumentare la conoscenza di questi organismi a livello genetico in modo da avere un quadro il più ampio possibile della diversità che li caratterizza.

I dati ottenuti dalle indagini condotte nel presente elaborato suggeriscono che il ceppo ETS-09 rappresenta un genere nuovo, dotato di capacità di azotofissazione e morfologicamente e ultrastrutturalmente simile ai generi coccoidi appartenenti alla sottoclasse delle Oscillatoriothycidae (vedi par. 1.2).

4.1.12 Conclusioni ETS-09

I risultati delle indagini sperimentali hanno permesso di ottenere interessanti informazioni sul microrganismo coccoide ETS-09.

- Il cianobatterio ETS-09 ha cellule di forma ovoidale, prive di guaina, che producono quantità particolarmente elevate di ficoeritrina oltre che di ficocianina e alloficocianina. La divisione avviene per scissione in due cellule della stessa dimensione. All'interno del citoplasma della cellula sono presenti numerosi tilacoidi che si prolungano perpendicolarmente alla superficie cellulare distribuendosi in tutto il citoplasma, spesso raggruppati in fasci;
- ETS-09 è in grado di fissare l'azoto atmosferico come evidenziato dal ritrovamento nel suo genoma dei geni *nifH* e *nifD* e dalla capacità di crescere in terreno privo di nutrienti azotati;

- Le analisi condotte sull'organismo cresciuto a 30°C in mancanza di NaNO₃, non evidenziano particolari variazioni morfologiche, ultrastrutturali e fisiologiche rispetto alle cellule cresciute in presenza di nutrienti azotati. Questo microorganismo quindi, almeno per i periodi utilizzati nella presente ricerca, non risente della mancanza di minerali di azoto nell'ambiente di crescita.
La sua capacità di azotofissazione è quindi sufficiente a rifornirlo dell'azoto organico necessario a sostenere la crescita e la produzione di una quantità di biomassa confrontabile con quella prodotta dalle cellule che erano, invece, rifornite della più economica forma di azoto inorganico (NaNO₃);

- L' aumento della temperatura da 30°C a 40°C non rallenta la crescita di ETS-09, per un periodo di 4-5 settimane. La successiva entrata della coltura in fase stazionaria e poi in senescenza dimostra, però, che questa più elevata temperatura a lungo termine crea condizioni di stress.
Un effetto inatteso e sorprendente è la variazione della forma delle cellule all'aumentare della temperatura di crescita. Da ovoidali a 30°C le cellule a 40°C diventano allungate, raggiungendo una lunghezza anche 10 volte superiore a quella che avevano alla più bassa temperatura. A parte questa variazione morfologica, le cellule a 40°C, non hanno alterazioni ultrastrutturali, mantengono i contenuti in clorofilla e carotenoidi e i rapporti percentuali tra i vari pigmenti. L'alta fluorescenza della clorofilla, inoltre, dimostra la vitalità di queste cellule:

- La termotolleranza di ETS-09 risulta essere non molto elevata portando l'organismo a sopravvivere solo per un tempo limitato a 45-47°C.
A 50 °C i cianobatteri muoiono nel giro di pochi giorni e la morte delle cellule in ETS-09 è associata alla demolizione e alla scomparsa pressoché totale delle membrane tilacoidali in tutta la massa citoplasmatica, che subisce anche un parziale svuotamento;

- Anche se le indagini morfologiche, fisiologiche ed ultrastrutturali suggeriscono l'appartenenza di ETS-09 ad uno tra i generi *Cyanothece*, *Halothece* o *Euhalothece*, le analisi molecolari non confermano questa ipotesi.
Queste ultime permettono di classificare ETS-09 come facente parte di un nuovo genere della classe Cyanophyceae, sottoclasse Oscillatoriothycidae.

DOCUMENTAZIONE

DEI DATI SPERIMENTALI ETS-09

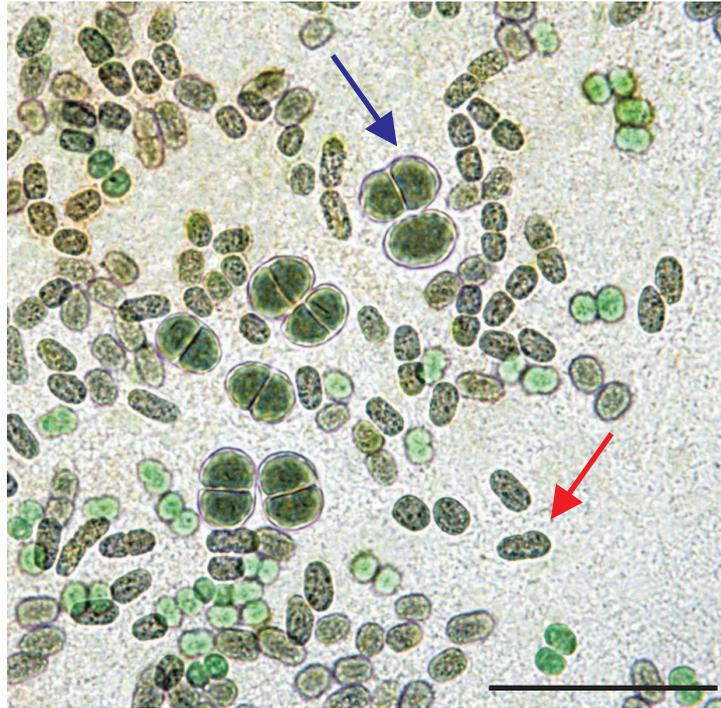


Figura 1. Iniziale coltura mista ottenuta dal campione di cianobatteri prelevato dalla superficie del fango di una vasca idrotermale di Abano Terme. Notare la presenza di tre diverse forme di cianobatteri coccoidi. Le frecce indicano i ceppi oggetto della presente tesi. Barra=50 μ m



Figura 2. Coltura pura del cianobatterio ETS-09. Barra=50 μ m



Figura 3. Coltura pura del cianobatterio ETS-10. Barra=50 μ m

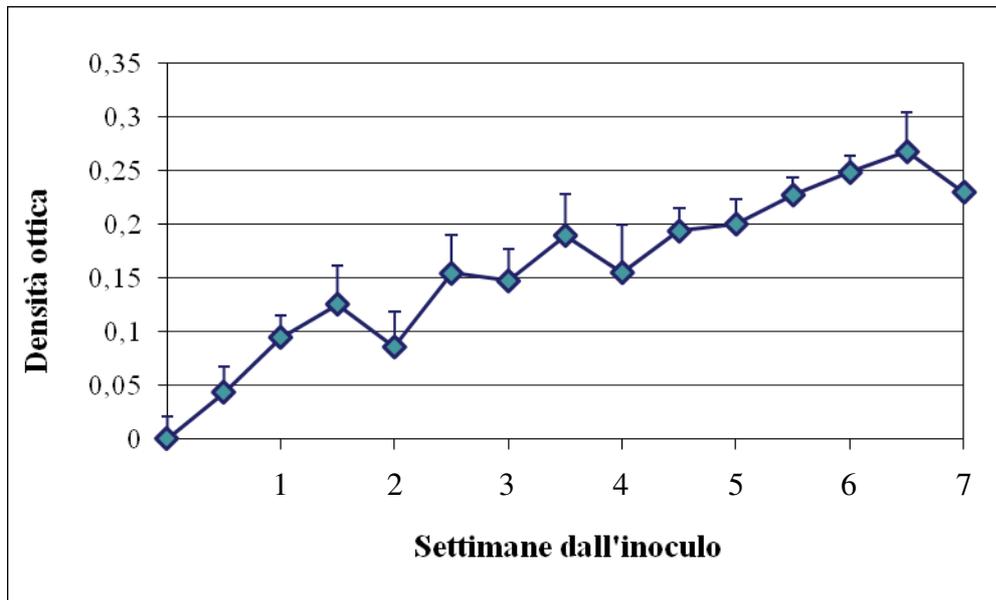


Figura 4. Curva di crescita del cianobatterio misurata come incremento nel tempo della densità ottica (D.O.) della coltura. Come Punto 0 è stata considerata la densità ottica della coltura subito dopo l'inoculo iniziale.

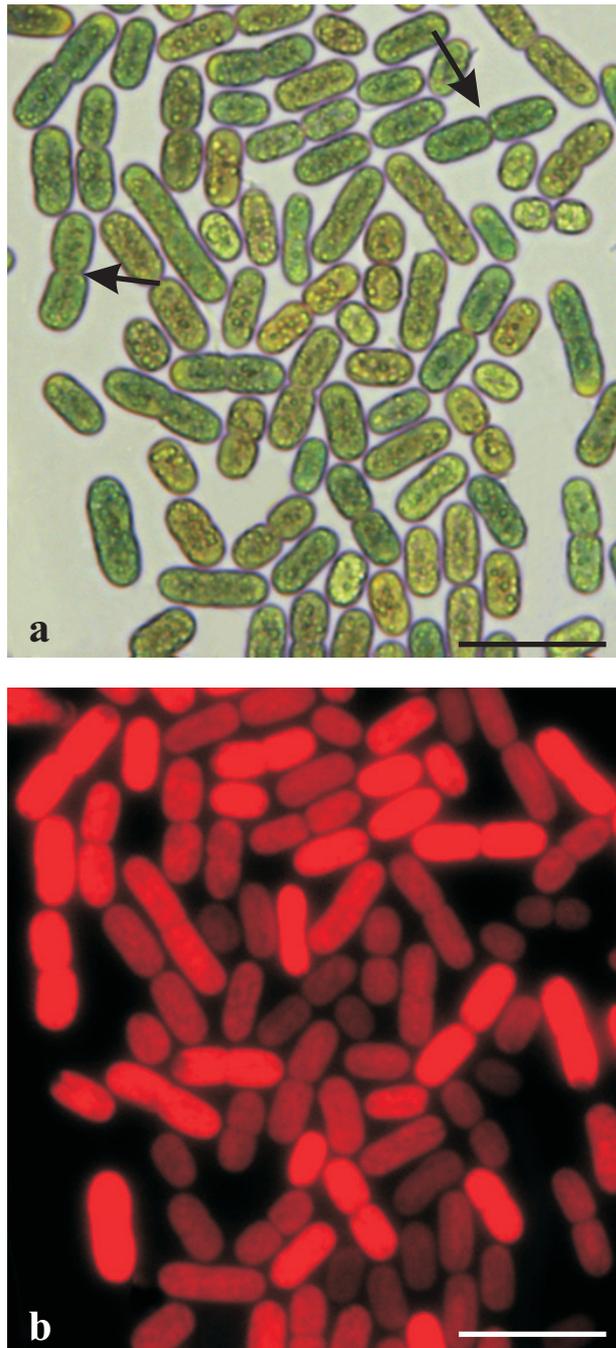


Figure 5 a, b. Immagini al microscopio ottico delle cellule cianobatteriche di ETS-09.
a. Cellule singole o in divisione del cianobatterio, visualizzate al microscopio ottico in luce visibile. Le cellule singole hanno forma ovoidale più o meno allungata. La divisione (freccie) avviene per scissione simmetrica lungo il piano equatoriale.
b. Le cellule, osservate al microscopio a fluorescenza, dopo eccitazione con luce UV, mostrano una intensa autofluorescenza rossa della clorofilla *a*.
Barre=20 μm .

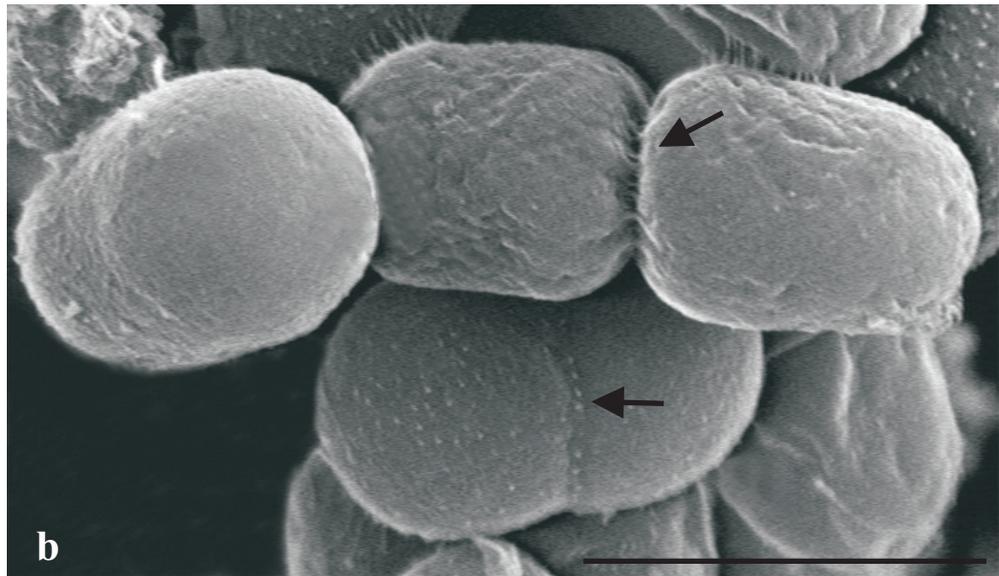
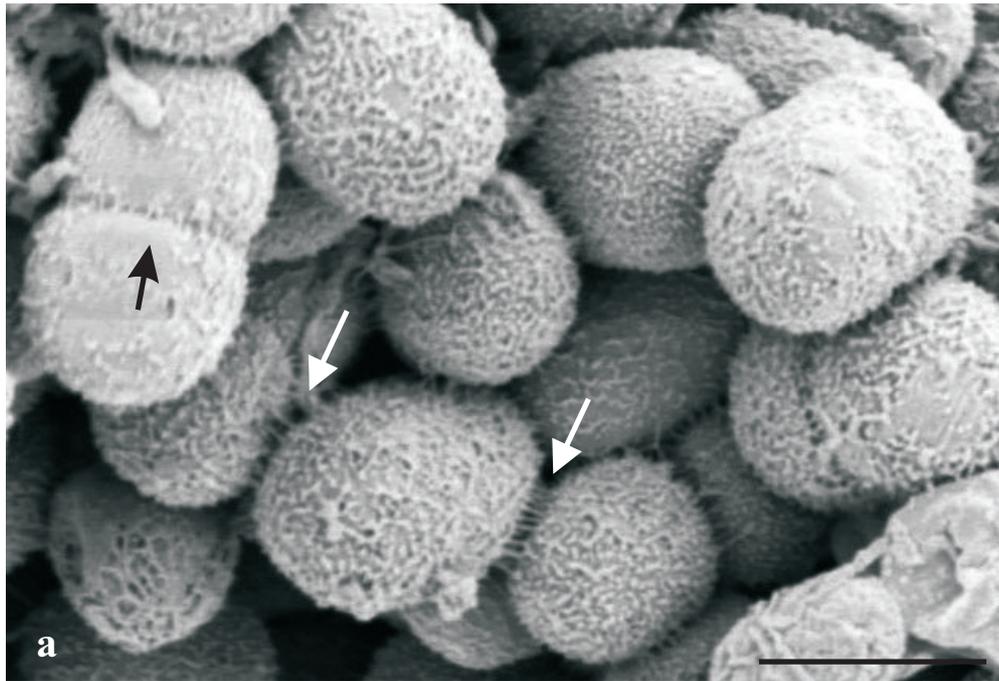


Figure 6a, b. Micrografie al microscopio elettronico a scansione delle cellule cianobatteriche. Notare attorno alle singole cellule del materiale mucillaginoso che forma briglie tra cellule vicine (frecche bianche). Alcune cellule sono in divisione per scissione equatoriale simmetrica (frecche nere).
Barre = 5 μ m

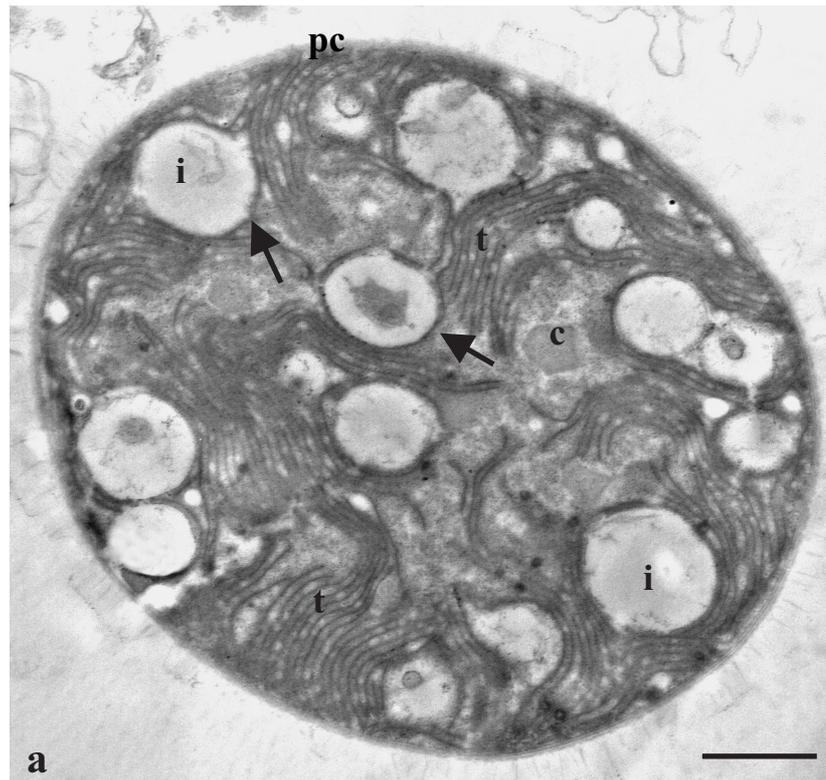


Figure 7a, b. Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione di cellule cianobatteriche.

a. Si possono riconoscere: una sottile parete cellulare (**pc**); numerosi tilacoidi (**t**) perpendicolari alla superficie cellulare, e riuniti a fascetti; carbossisomi (**c**) poliedrici; inclusioni rotondeggianti poco elettrondense (**i**) bordate da un profilo tilacoidale (freccie).

b. Micrografia di una cellula in divisione. Oltre alle caratteristiche ultrastrutturali descritte nella fig. a, si intravede all'esterno della cellula il materiale mucillaginoso (**m**) osservato anche al SEM.

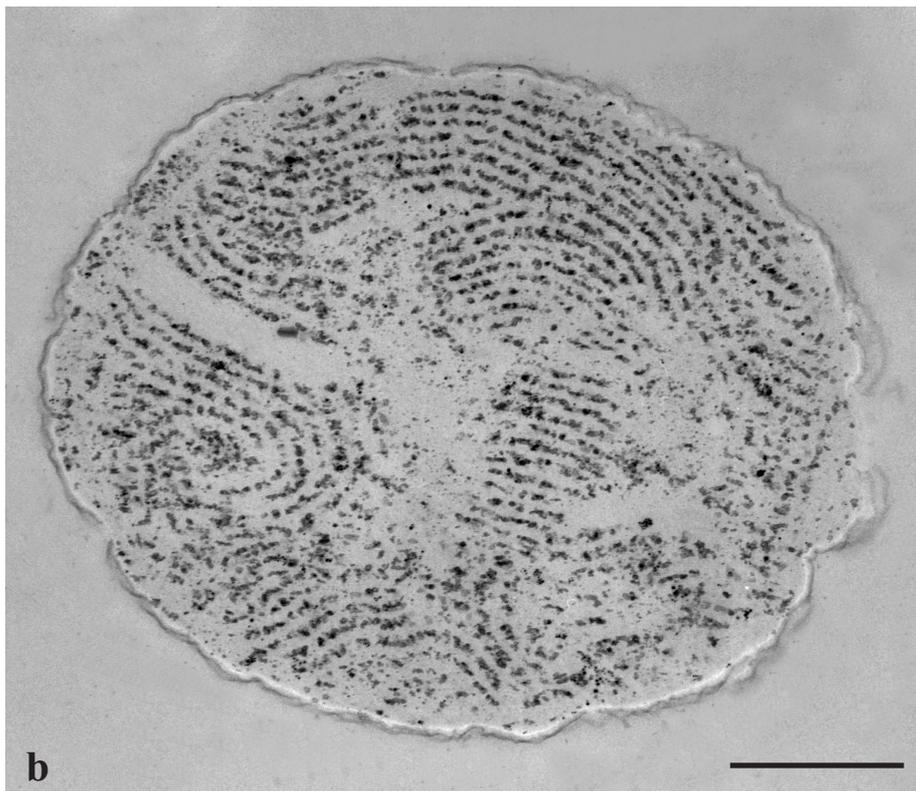
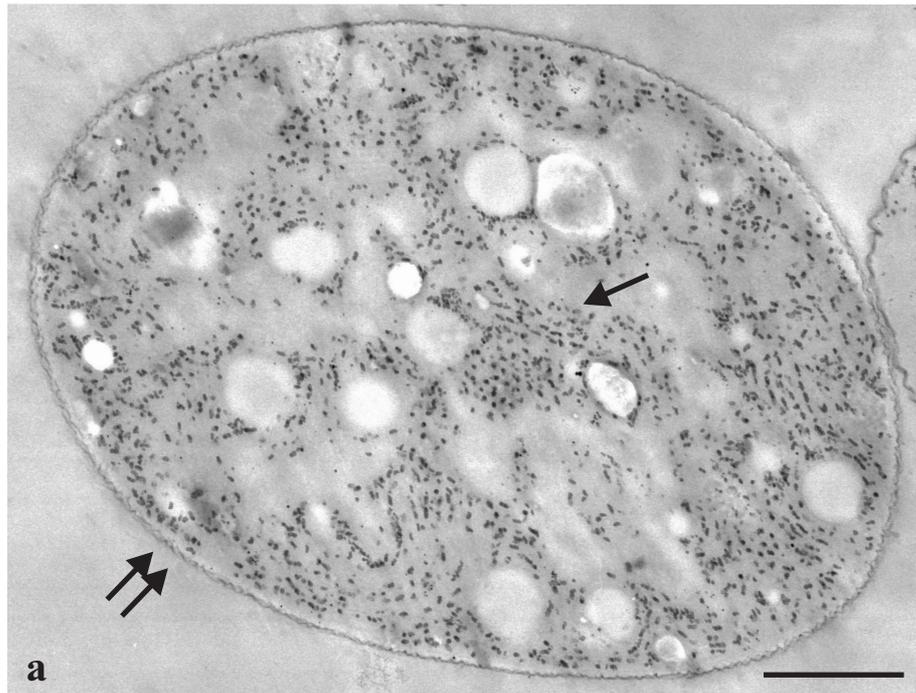


Figure 8a, b. Micrografia al TEM di una cellula cianobatterica sottoposta al test citochimico PATAg per la visualizzazione dei polisaccaridi.

a. La reazione positiva è visibile in numerosi piccoli globuli intracellulari di glicogeno (freccia) e nella componente polisaccaridica della parete (doppia freccia). Non risultano positive le inclusioni globulari poco elettrondense.

b. È molto evidente la quantità di granuli di glicogeno e la loro regolare distribuzione tra le membrane tilacoidali.

Barre = 1 μ m

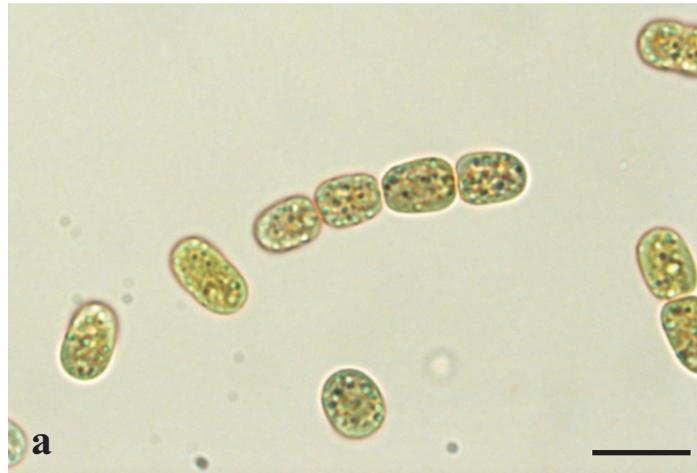


Figure 9a, b. Risposta alla colorazione con DAPI del DNA delle cellule di ETS-09.
a. Cellule visualizzate al microscopio ottico in luce visibile.
b. Cellule osservate al microscopio a fluorescenza dopo eccitazione con luce UV.
Barre =10 μ m

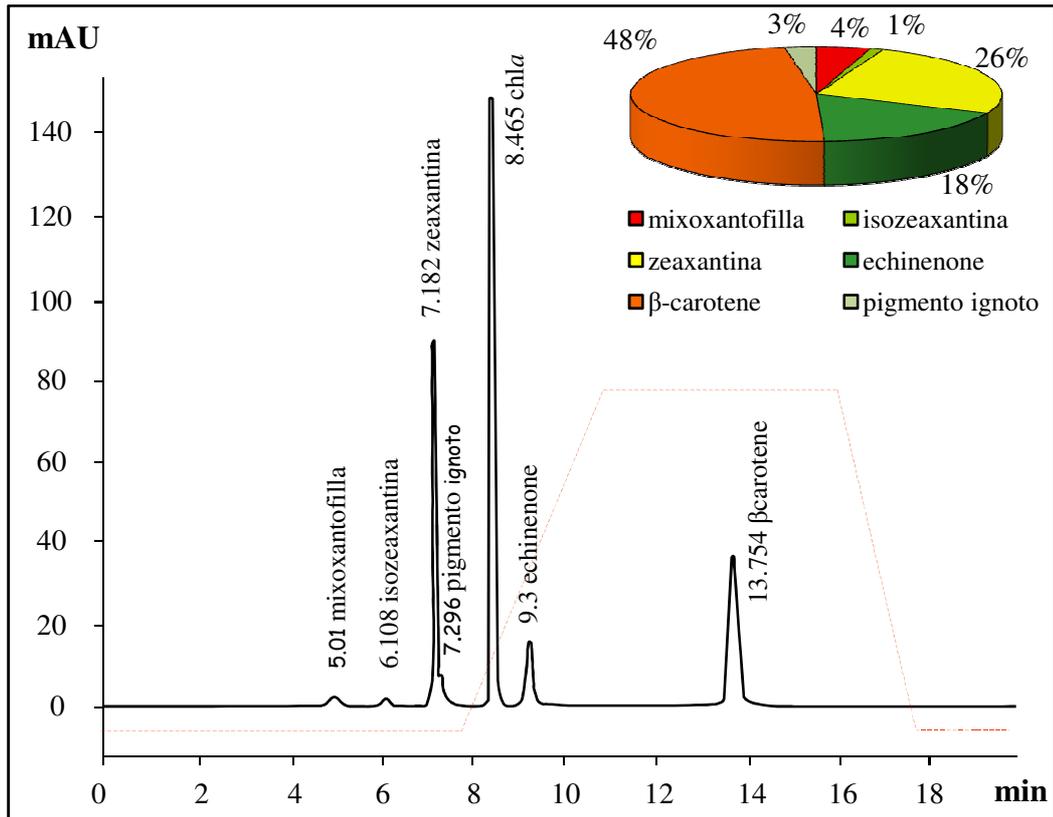


Figura 10. Cromatogramma ottenuto con HPLC dei pigmenti fotosintetici liposolubili del cianobatterio ETS-09. Notare il picco molto elevato della clorofilla *a* (Chl *a*) e, tra i carotenoidi, i picchi predominanti del β -carotene e della zeaxantina. Per ogni pigmento accanto al nome viene riportato il tempo di ritenzione. Nel riquadro sono presentati i rapporti percentuali delle diverse forme dei carotenoidi.

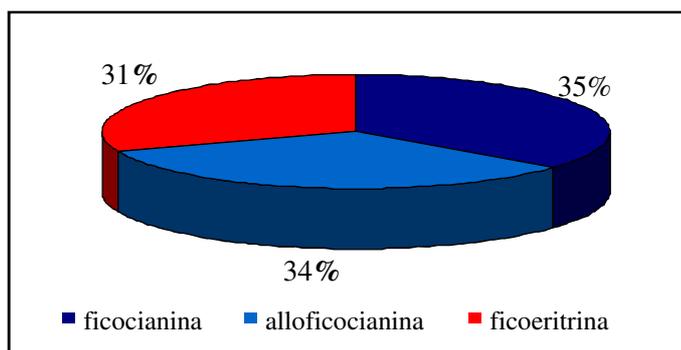


Figura 11. Rapporti percentuali delle ficobiliproteine presenti nei ficobilisomi del cianobatterio ETS-09.

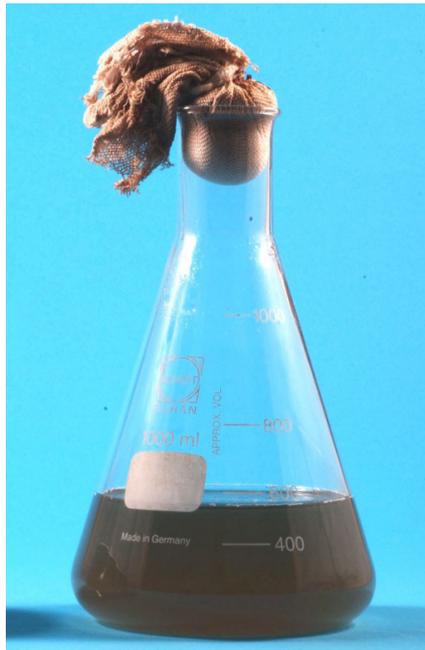


Figura 12. Beuta contenente la coltura ETS-09 cresciuta per due settimane in terreno BG11.

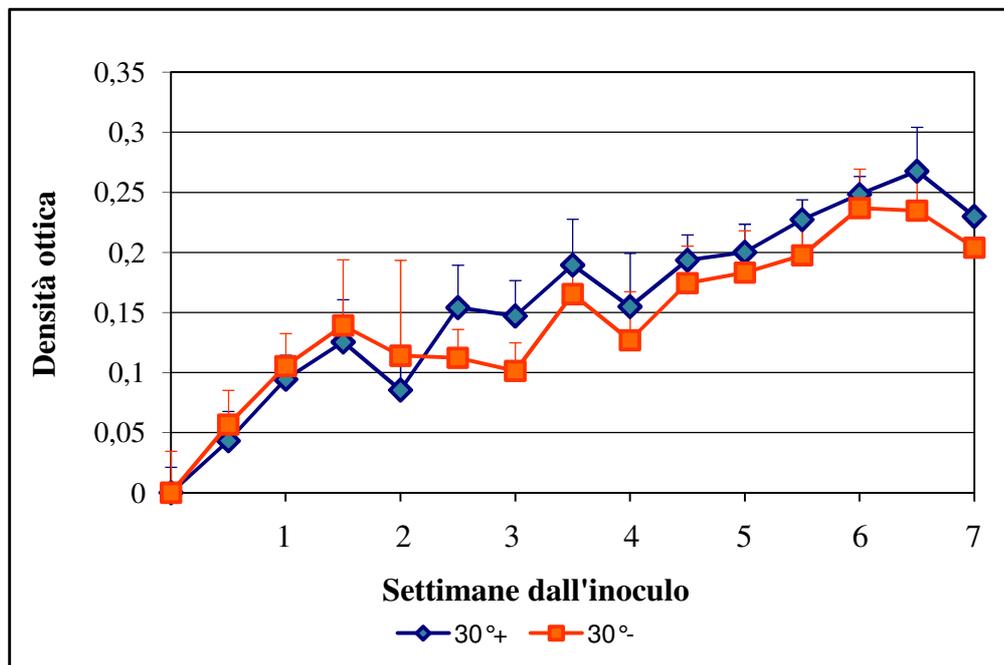


Figura 13. Curve di crescita delle colonie cianobatteriche di ETS-09 a 30°C in presenza (30°C+) o in assenza (30°C-) di NaNO₃.

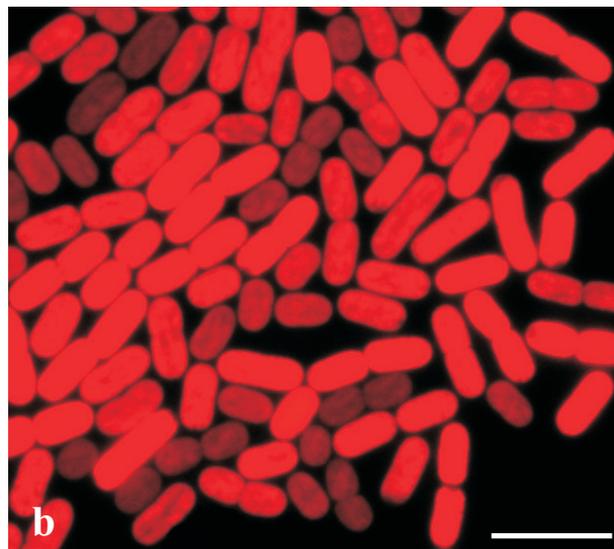
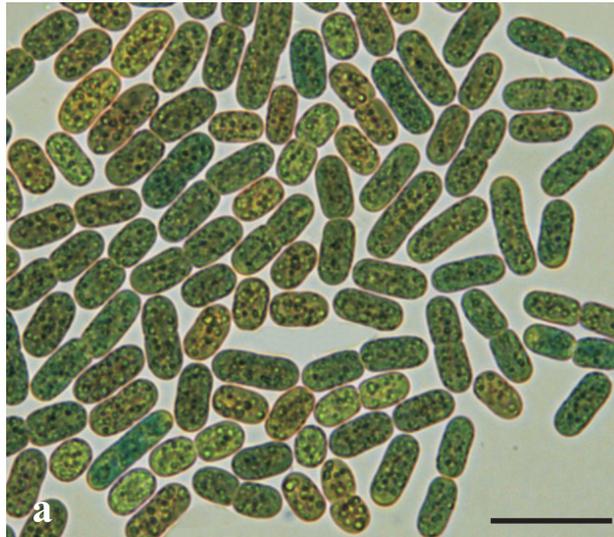


Figure 14 a, b. Immagini al microscopio ottico delle cellule di ETS-09 cresciute in assenza di nutrienti azotati.

a. Cellule singole o in divisione del cianobatterio, visualizzate al microscopio ottico in luce visibile.

b. Le cellule, osservate al microscopio a fluorescenza, dopo eccitazione con luce UV, mostrano una intensa autofluorescenza rossa della clorofilla *a*.

Barre=20 μm .

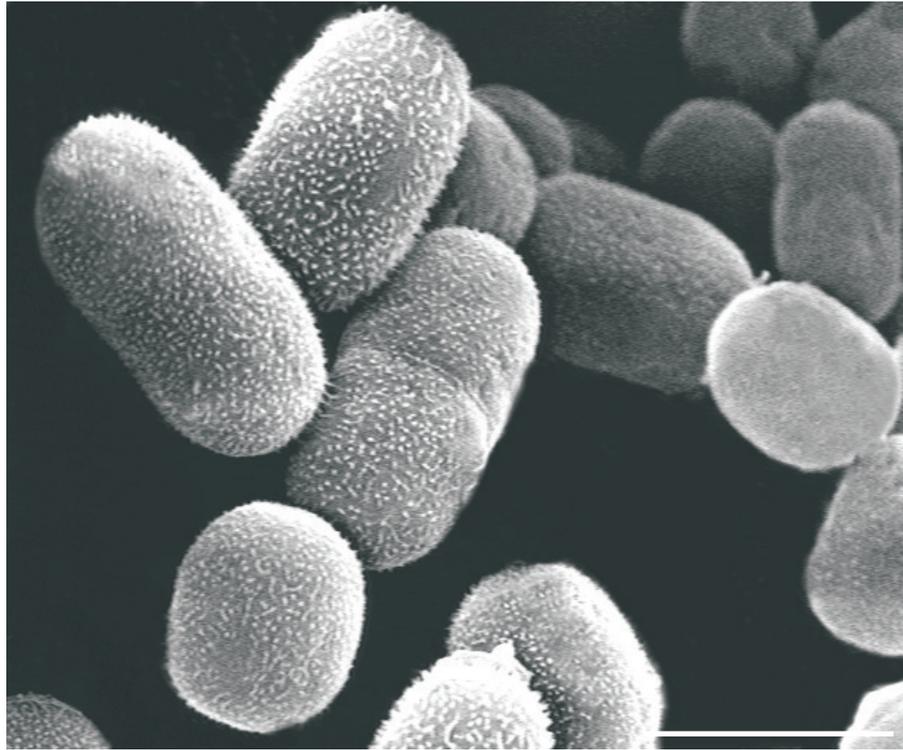


Figura 15. Micrografie al microscopio elettronico a scansione di cellule di ETS-09 cresciute in terreno privo di nutrienti azotati.
Barre = 5 μ m

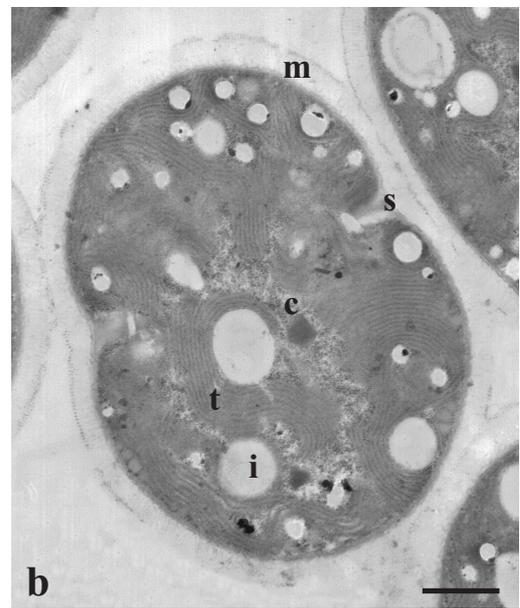
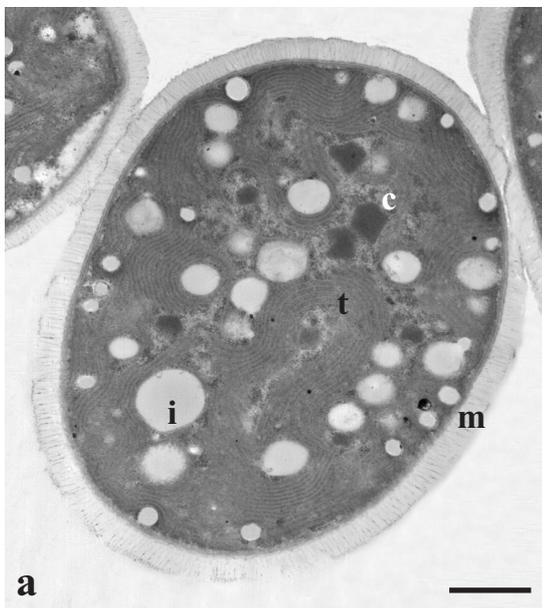


Figura 16a, b. Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione di cellule di ETS-09 cresciute in assenza di nutrienti azotati.
(m = mucillagine extracellulare, c = carbossisomi, i = inclusioni di materiali di riserva, t = tilacoidi, s = setto di divisione).
Barre = 1 μ m

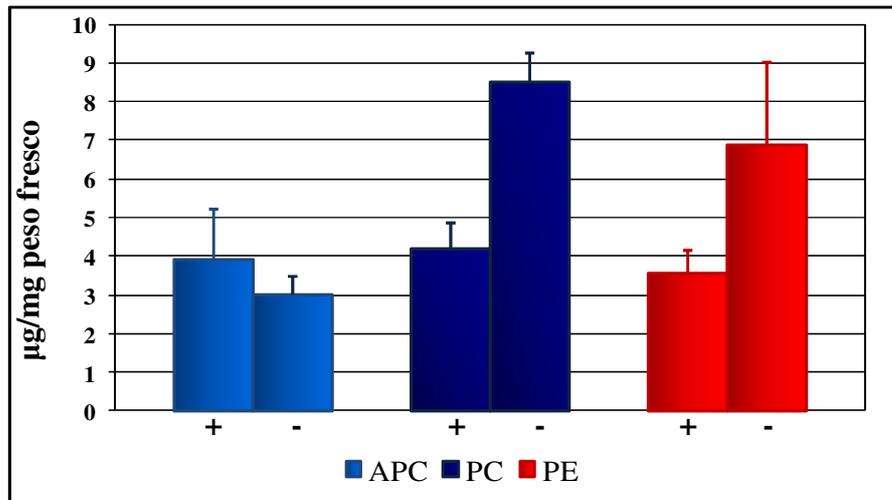


Figura 17. Contnuti di alloficocianina (APC), ficocianina (PC) e ficoeritrina (PE) in colture cianobatteriche in fase esponenziale, cresciute a 30°C su terreno contenente nitrato (+) o privo del nutriente azotato (-).

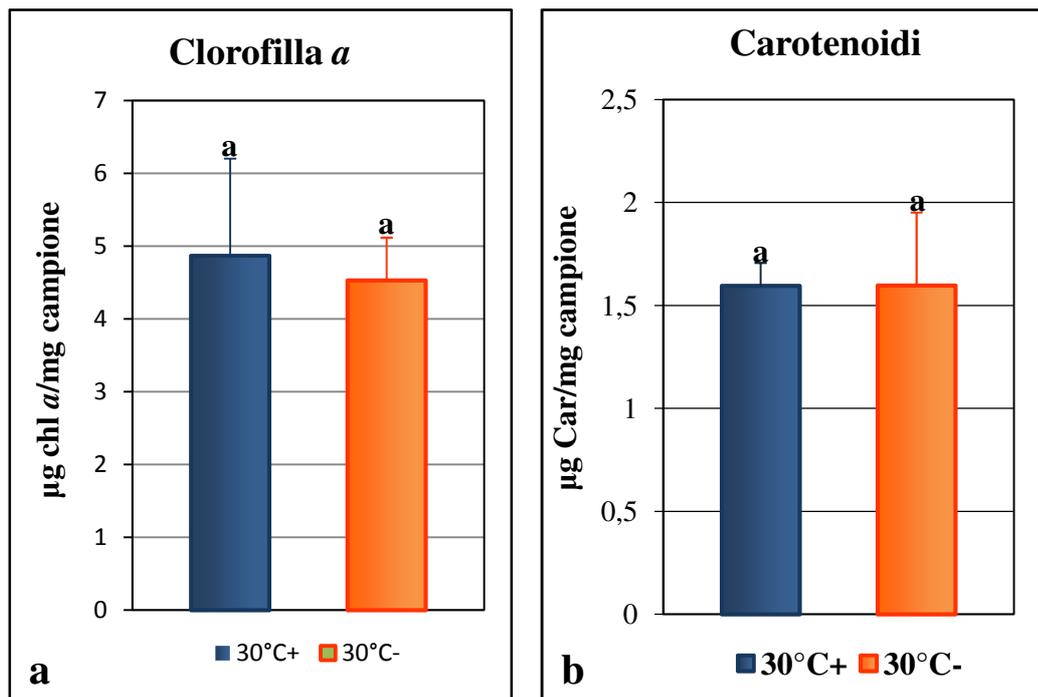
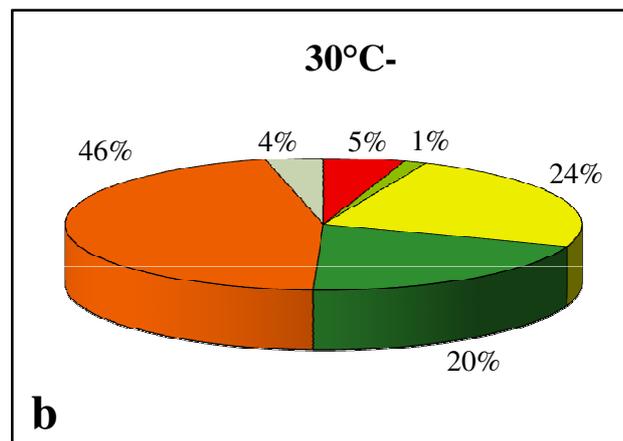
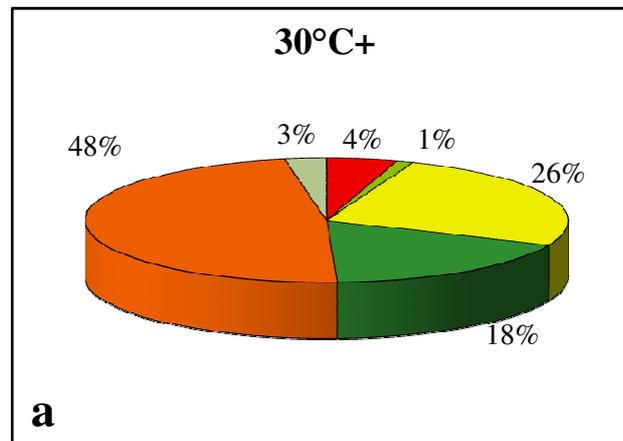


Figure 18a, b. Contenuti in pigmenti fotosintetici di colture cianobatteriche di ETS-09 in fase di crescita esponenziale cresciute a 30°C su terreno contenente nitrato (30°C+) o privo del nutriente azotato (30°C-).

a. Contenuti in clorofilla *a*.

b. Contenuti in carotenoidi totali.



- | | |
|---|---|
| ■ mixoxantofilla | ■ isozeaxantina |
| ■ zeaxantina | ■ echinenone |
| ■ β-carotene | ■ pigmento ignoto |

Figure 19a, b. Percentuali dei diversi carotenoidi presenti in colture cianobatteriche di ETS-09 in fase di crescita esponenziale cresciute a 30°C su terreno contenente nitrato (30°C+) o privo del nutriente azotato (30°C-).

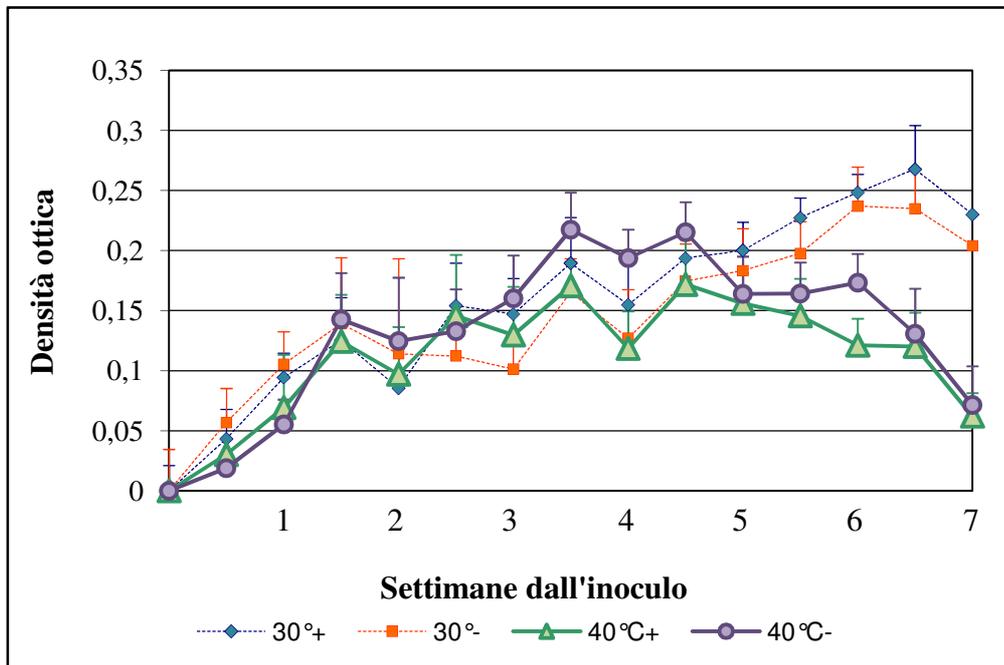


Figura 20. Curve di crescita delle colonie cianobatteriche di ETS-09 a 40°C in presenza (40°C+) o in assenza (40°C-) di NaNO₃, confrontate con quelle di colonie a 30°C.

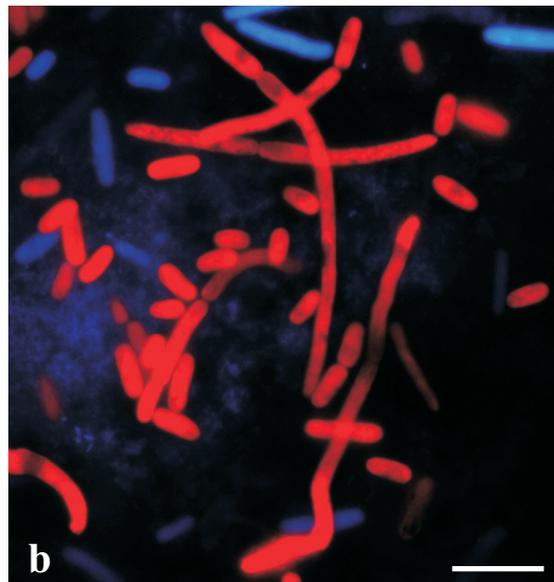
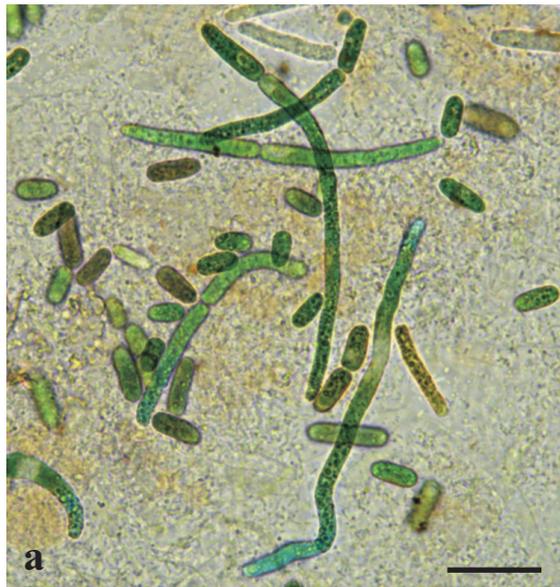


Figure 21 a, b. Immagini al microscopio ottico delle cellule del cianobatterio ETS-09 cresciuto a 40°C.

a. Cellule singole o in divisione del cianobatterio visualizzate in luce visibile.

b. Le stesse cellule della figura a osservate in fluorescenza, dopo eccitazione con luce UV, per evidenziare l'autofluorescenza rossa della clorofilla.

Notare in ciascuna micrografia la presenza di microorganismi di forma molto allungata.

Barre = 20 µm.

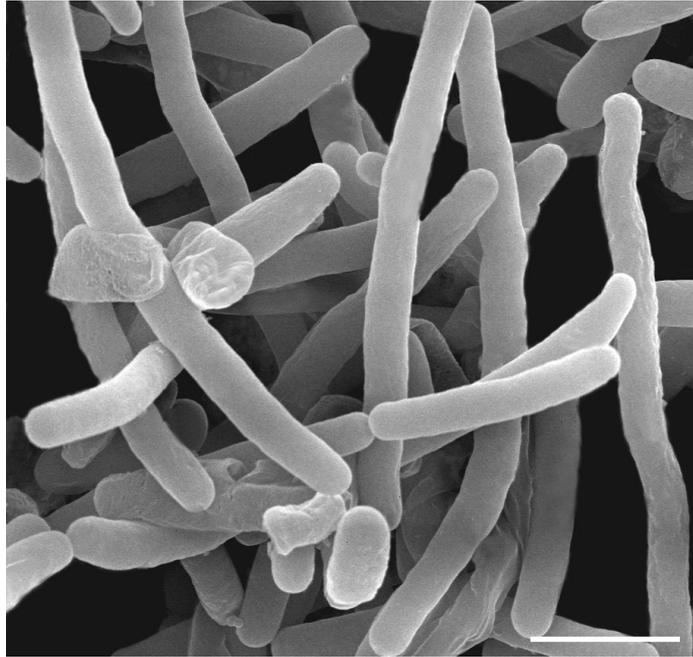


Figura 22. Micrografie al microscopio elettronico a scansione di cellule del cianobatterio ETS-09 cresciute a 40°C.
 Notare la presenza di microrganismi di forma molto allungata.
 Barra = 10µm

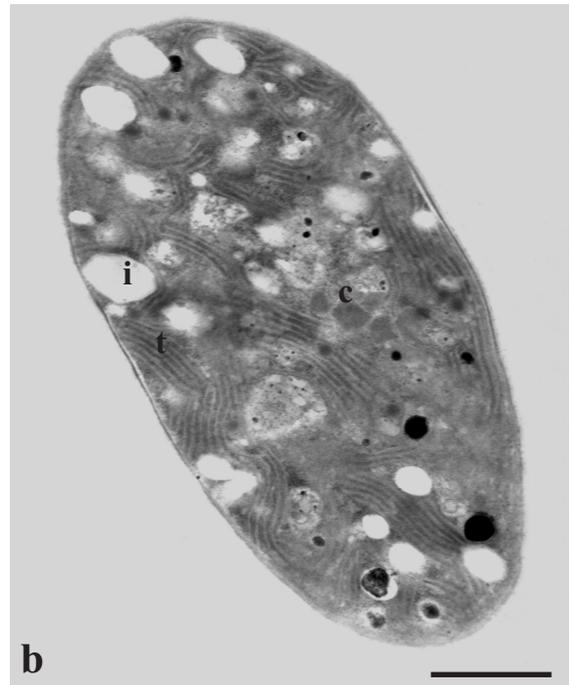


Figure 23 a, b. Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione di cellule di ETS-09 cresciute a 40°C.
a. Cellule di forma molto allungata.
b. Sezione a più alto ingrandimento; si possono riconoscere nel citoplasma tilacoidi raggruppati (t), carbossisomi (c) e inclusioni di materiali di riserva (i).
 Barre = 1µm

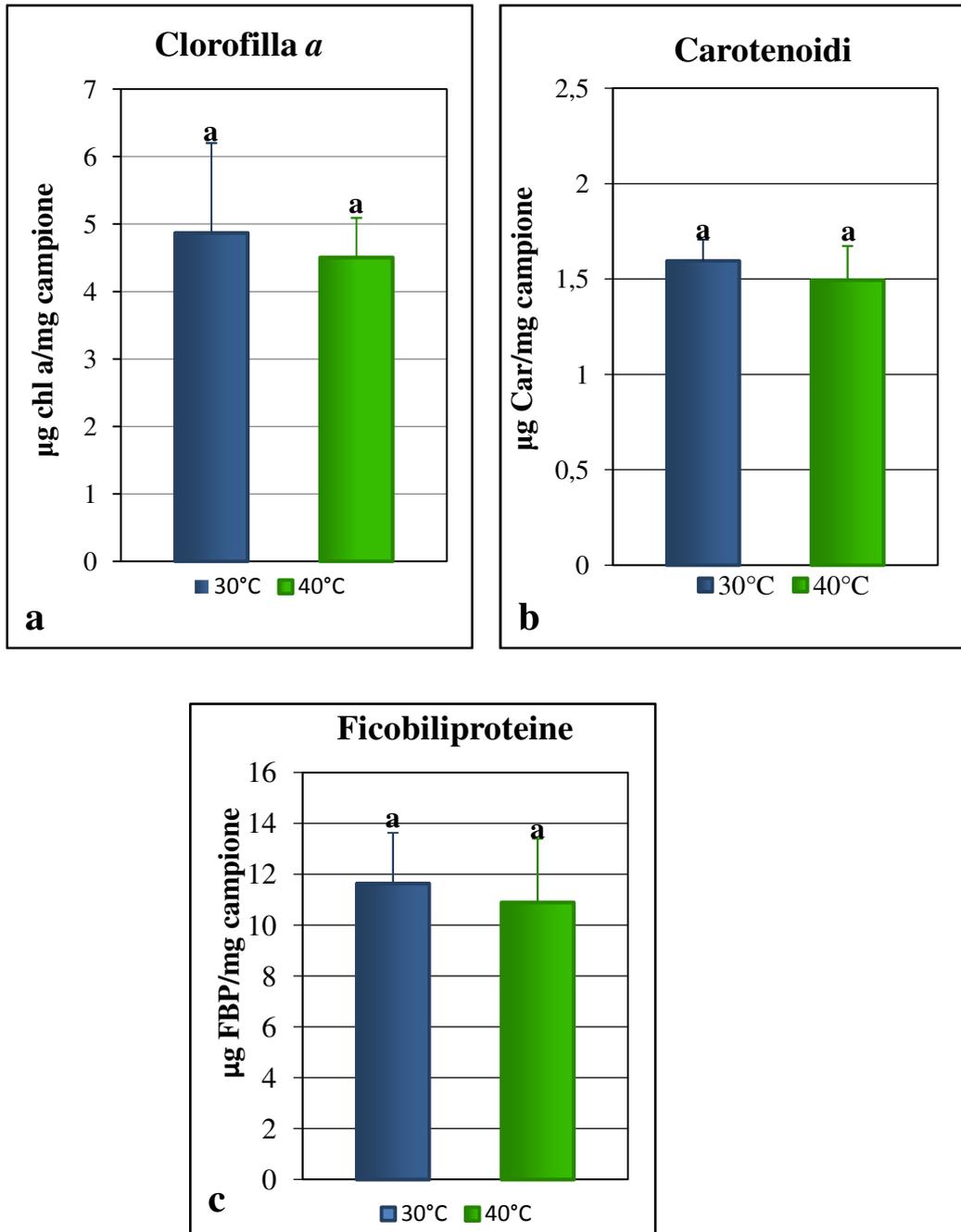
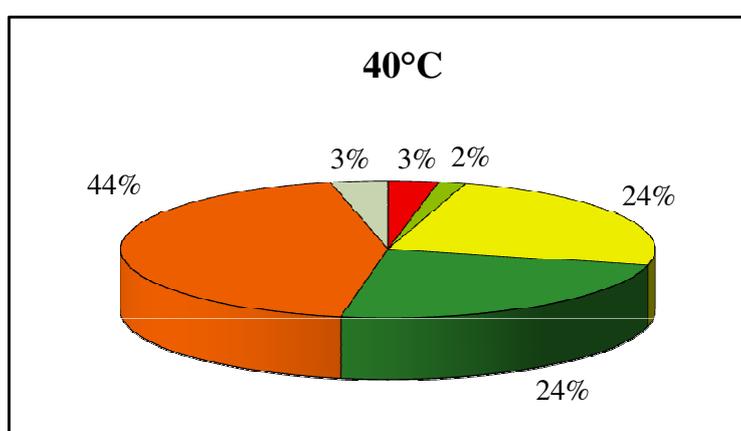
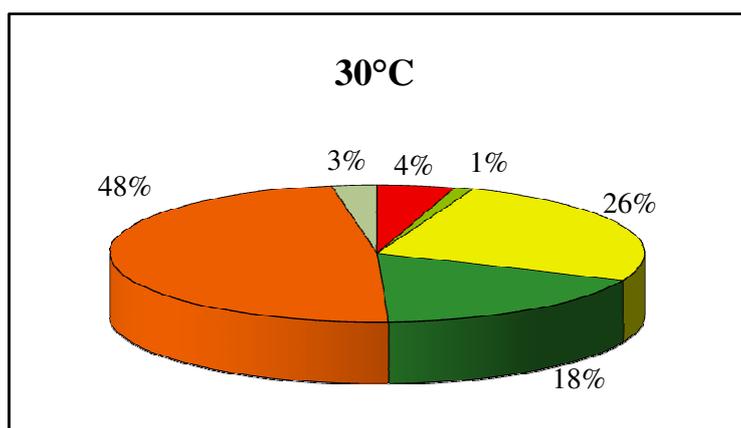


Figure 24a-c. Contenuti in pigmenti fotosintetici di colture cianobatteriche di ETS-09 in fase di crescita esponenziale cresciute a 30°C e a 40°C.

a. Contenuti in clorofilla *a*.

b. Contenuti in carotenoidi totali.

c. Contenuto in ficobiliproteine totali



- | | |
|---|---|
| ■ mixoxantofilla | ■ isozeaxantina |
| ■ zeaxantina | ■ echinenone |
| ■ β-carotene | ■ pigmento ignoto |

Figure 25a, b. Percentuali dei diversi carotenoidi presenti in colture cianobatteriche di ETS-09 in fase di crescita esponenziale cresciute a 30°C su terreno contenente nitrato (30°C+) o privo del nutriente azotato (30°C-).

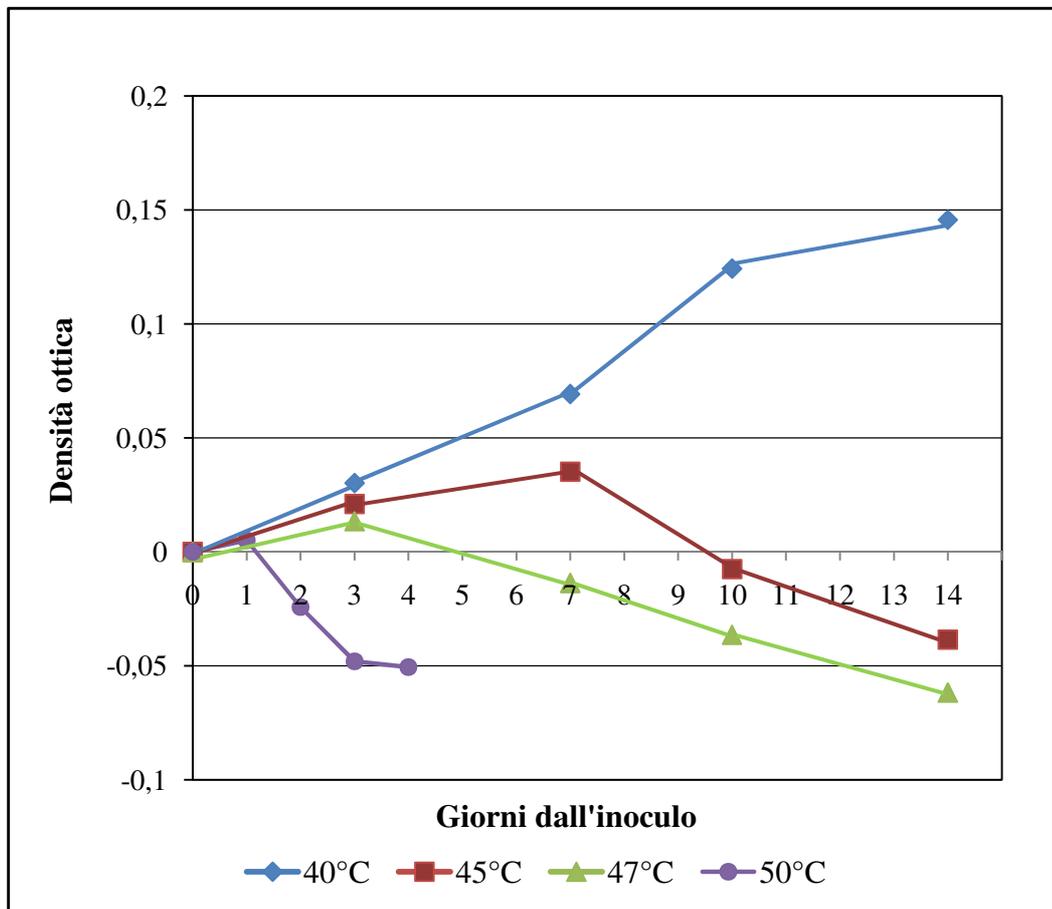


Figura 26. Curve di crescita delle colture di ETS-09 a diverse temperature.

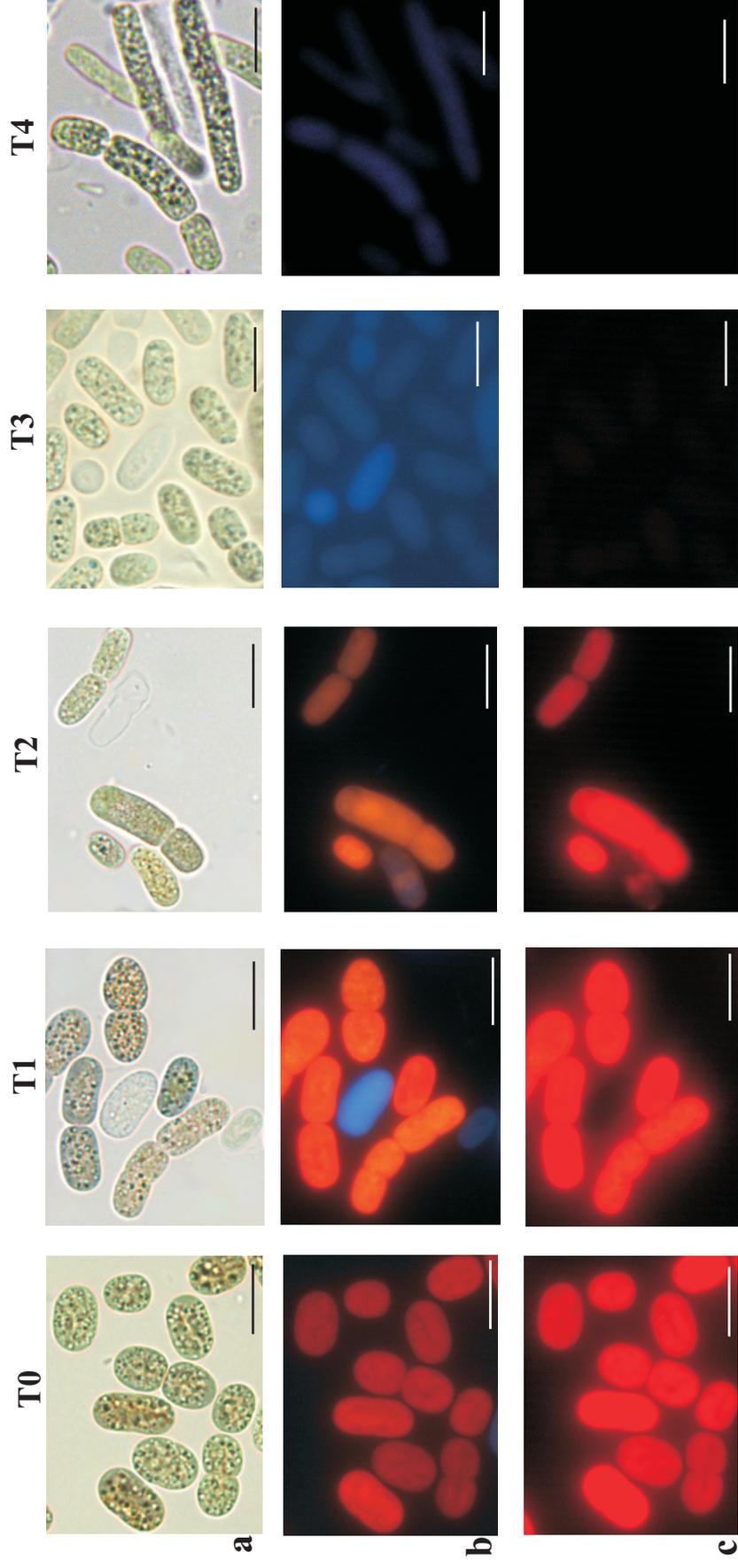


Figure 27a-c. Immagini al microscopio ottico di cellule di *Synechococcus* cresciute a 30°C (T0) o esposte per giorni diversi (1=T1, 2=T2, 3=T3 e 4=T4) alla temperatura di 50°C.
 a. micrografie in luce visibile.

b. micrografie che mostrano l'autofluorescenza rossa della clorofilla (dopo eccitazione con luce UV).

c. micrografie che mostrano l'autofluorescenza rossa delle ficobiliproteine (dopo eccitazione con luce verde).

Barre = 10 µm

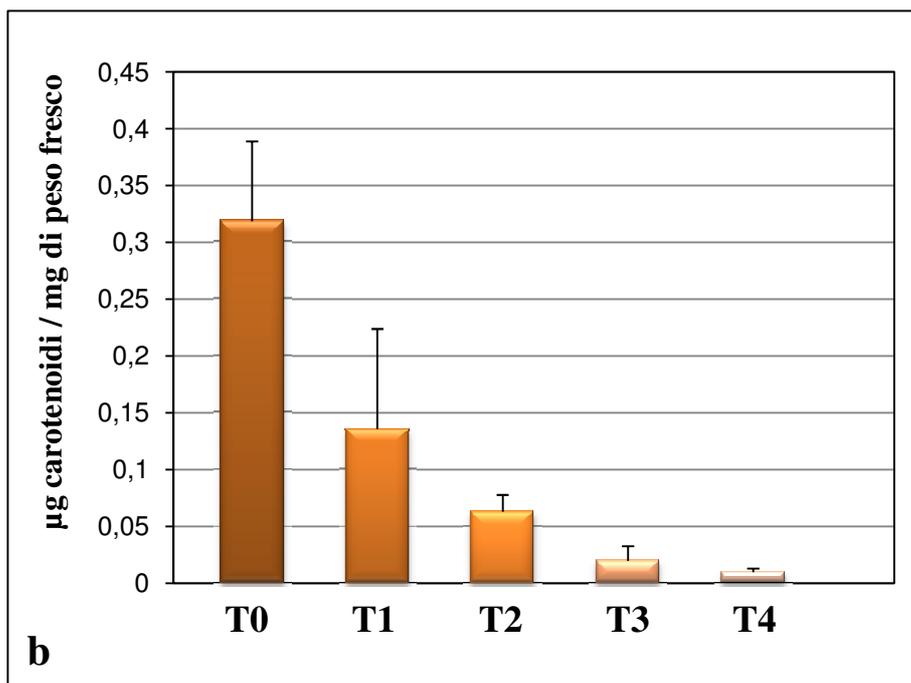
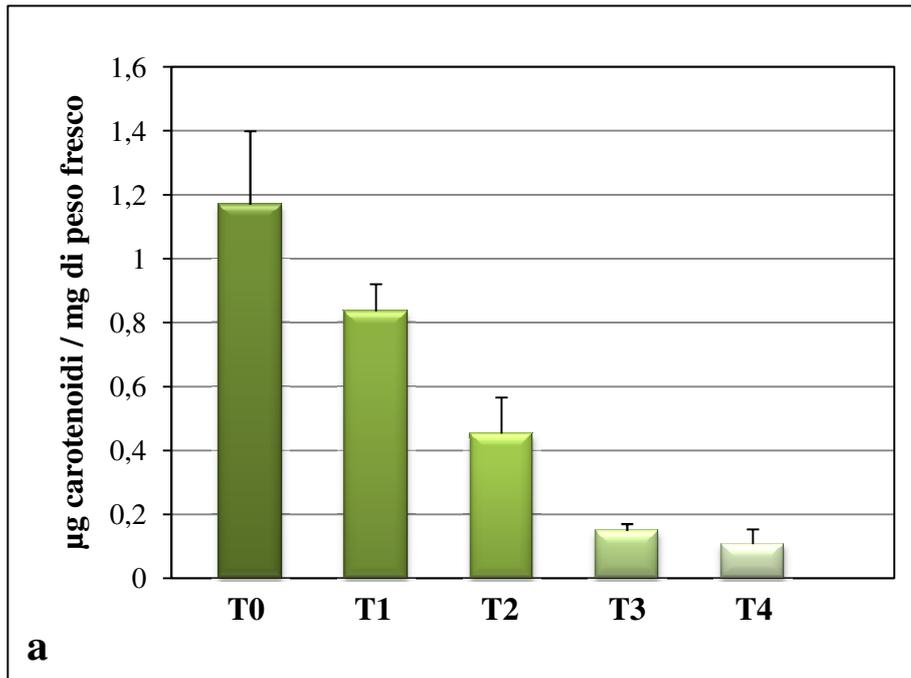


Figure 28a, b. Contenuti in pigmenti fotosintetici di colture di ETS-09 cresciute a 30°C (T0) o esposte per giorni diversi (T1-T4) alla temperatura di 50°C. La quantità dei pigmenti è espressa in µg/mg di peso fresco.

a. Contenuti in Clorofilla *a*.

b. Contenuti in carotenoidi totali.

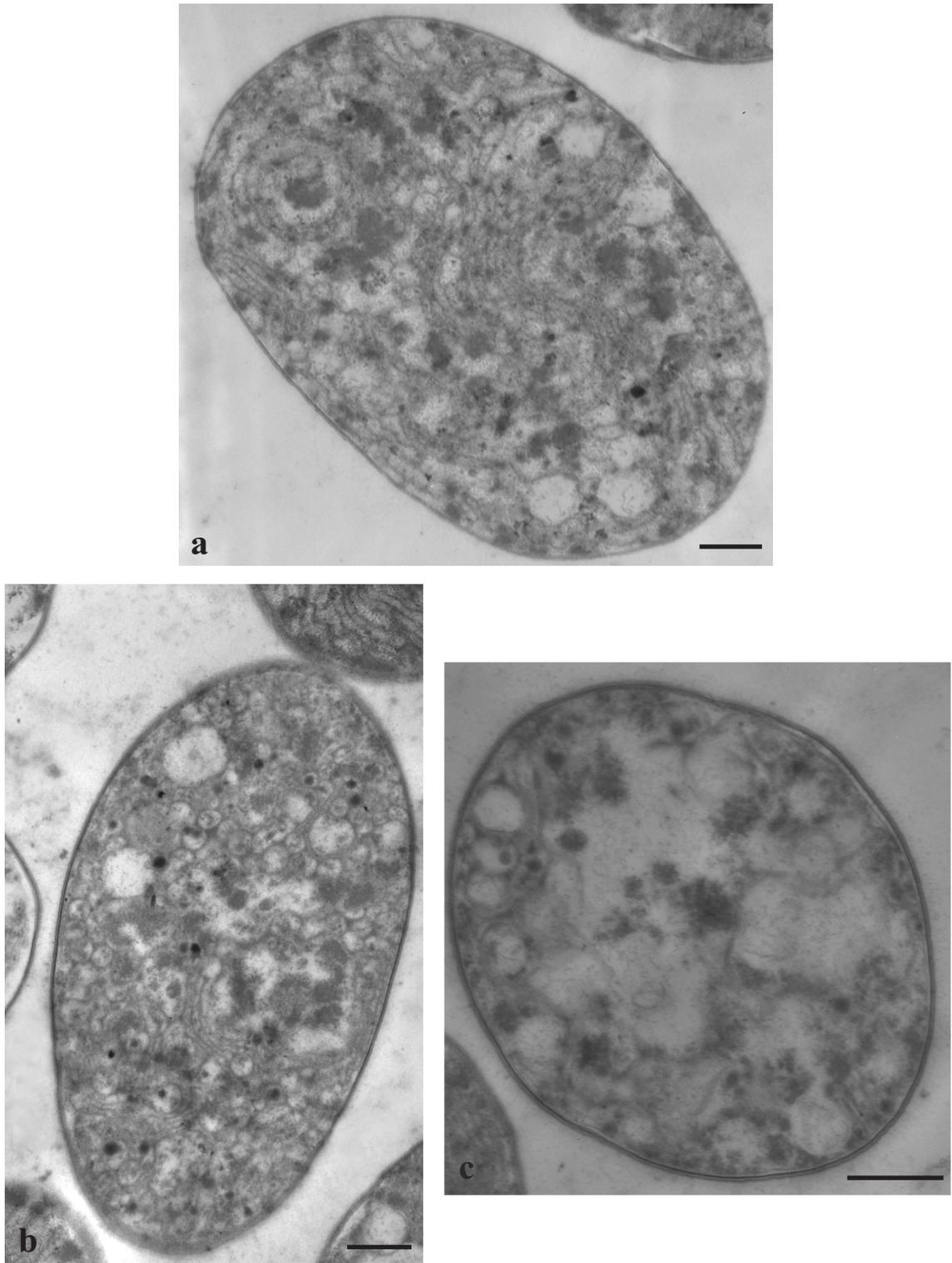


Figure 29a-c. Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione di cellule cianobatteriche di ETS-09.

a. Micrografia di cellula di ETS-09 esposta per un giorno alla temperatura di 50°C.

b. Micrografia di cellula di ETS-09 esposta per 3 giorni alla temperatura di 50°C.

c. Micrografia di cellula di ETS-09 esposta per 4 giorni alla temperatura di 50°C.

Barre=1 µm.

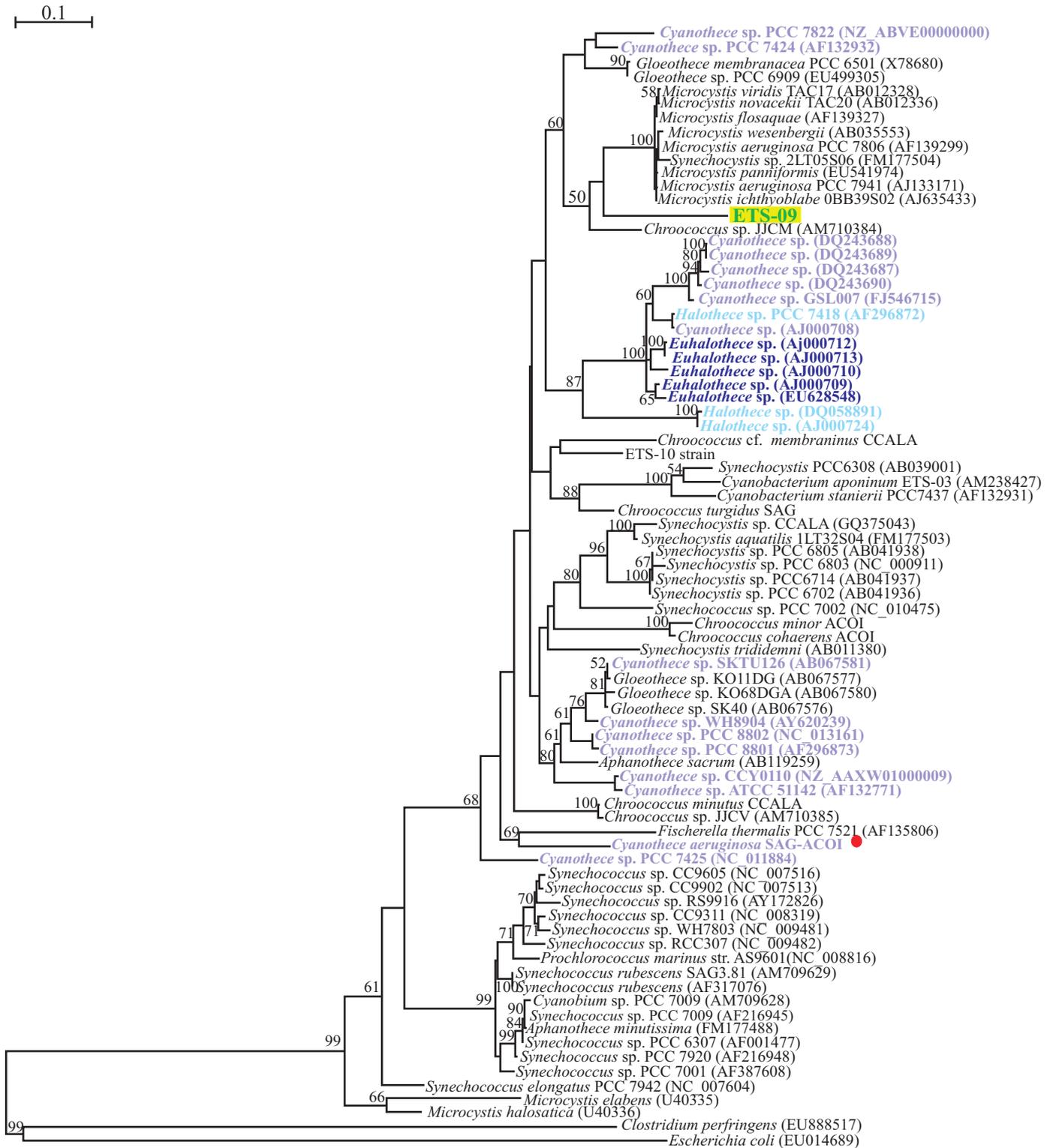


Fig. 30. Ricostruzione filogenetica basata sul gene 16S rDNA. L'organismo in esame è evidenziato in verde. I ceppi acquistati come confronto sono indicati da un puntino rosso. I valori di BT maggiori o uguali al 50% sono riportati vicino al corrispondente nodo. Barra=nr di sostituzioni nucleotidiche/sito.

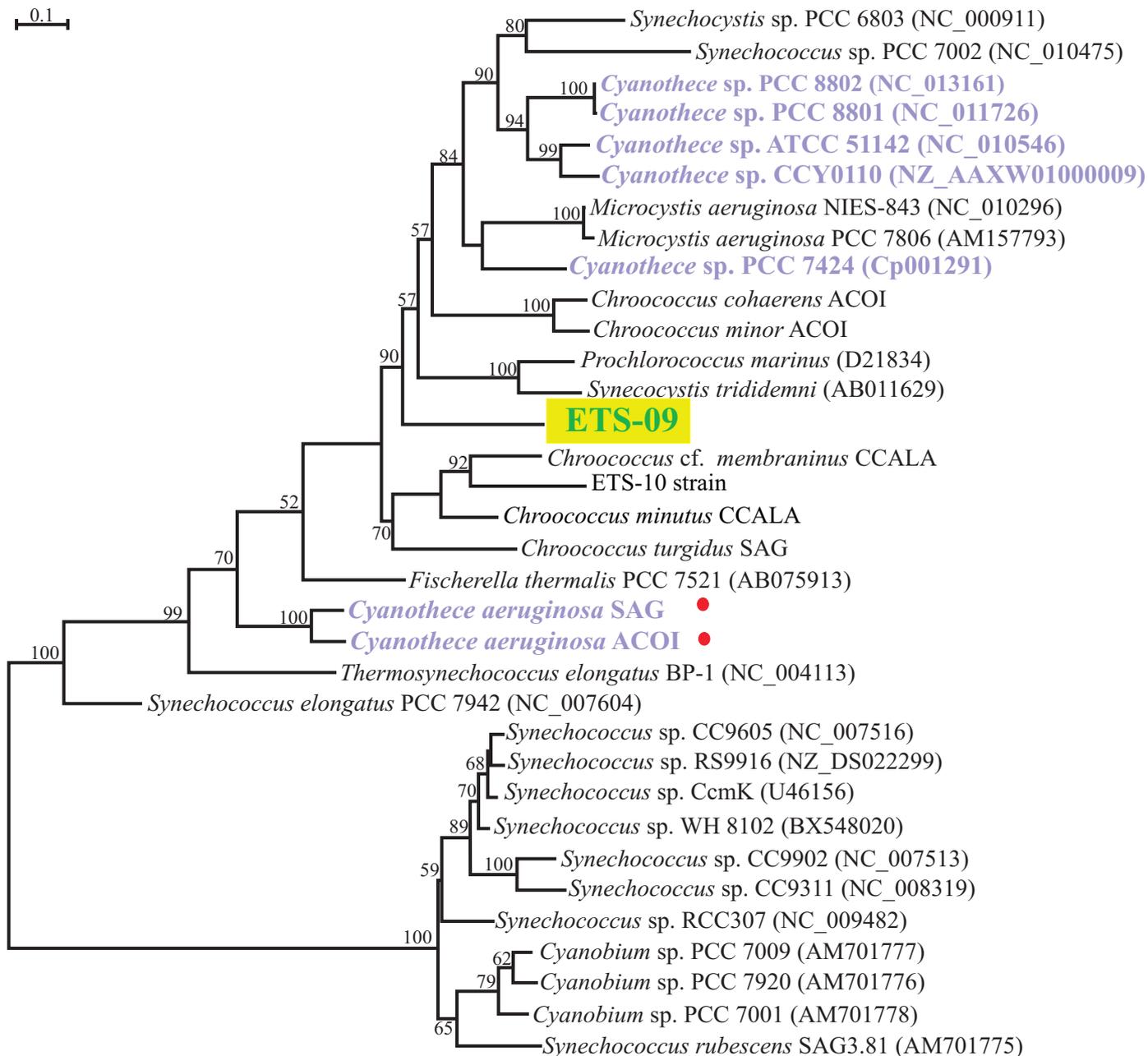


Fig. 31. Ricostruzione filogenetica basata sul gene *rbcL*. L'organismo in esame è evidenziato in verde. I ceppi acquistati come confronto sono indicati da un puntino rosso. I valori di BT maggiori o uguali al 50% sono riportati vicino al corrispondente nodo. Barra=nr di sostituzioni nucleotidiche/sito.

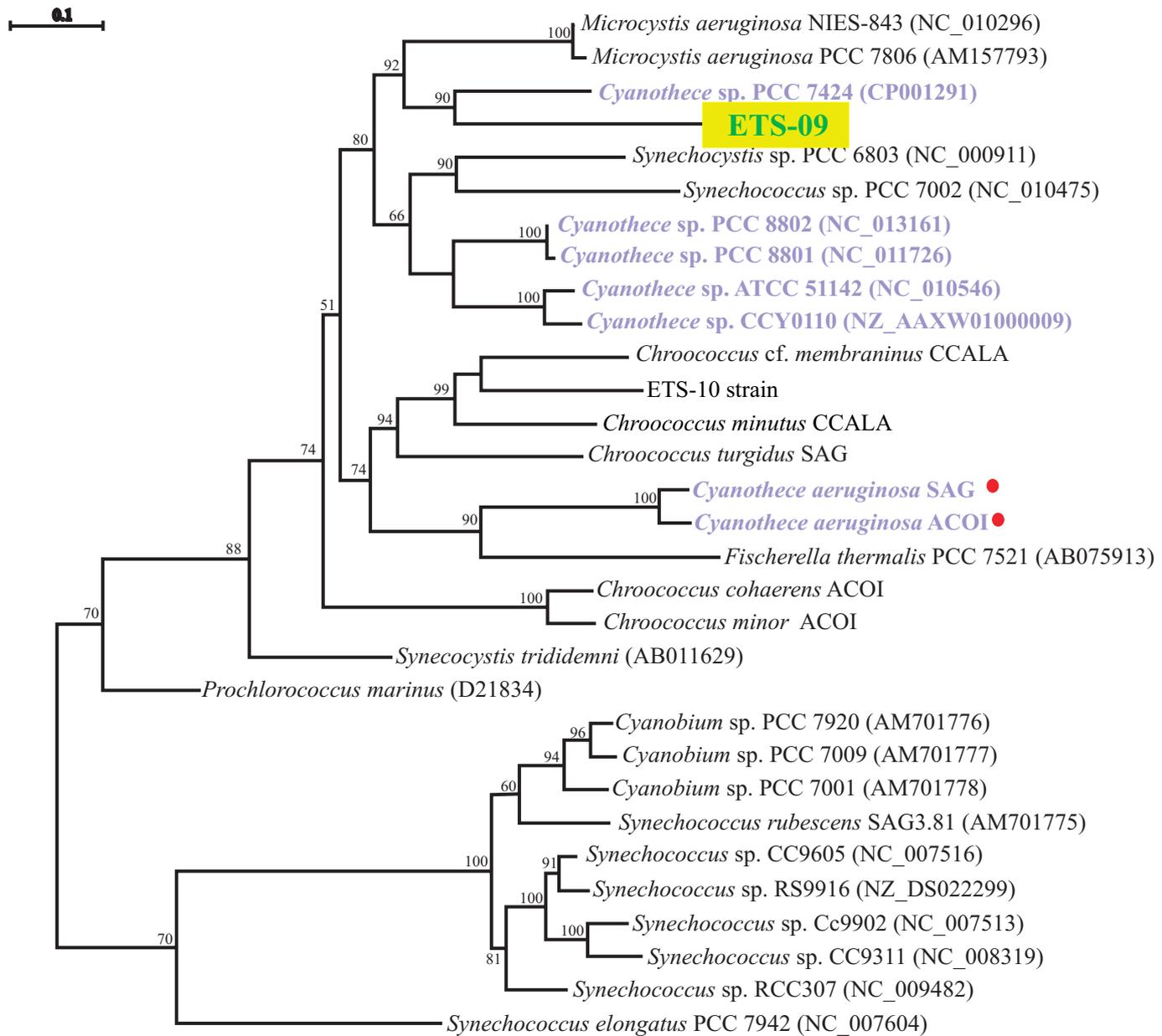


Fig. 32. Ricostruzione filogenetica basata sul *data set* 16S rDNA+rbcL. L'organismo in esame è evidenziato in verde.

I ceppi acquistati come confronto sono indicati da un puntino rosso. I valori di BT maggiori o uguali al 50%

4.2 ETS-10

4.2.1 Crescita del cianobatterio ETS-10 a 30°C

La crescita delle colture del cianobatterio coccoide ETS-10 a 30°C in terreno di coltura BG11 mostrava un incremento continuo nelle prime 4-5 settimane per poi entrare in fase stazionaria attorno alla sesta settimana dall'inoculo (Fig. 33). Tutte le indagini morfologiche, ultrastrutturali e fisiologiche condotte alle diverse condizioni di crescita sono state pertanto condotte al 28° giorno dall'inoculo iniziale.

4.2.2 Morfologia delle cellule cianobatteriche al microscopio ottico

Al microscopio ottico le cellule cianobatteriche di una coltura in fase esponenziale mantenuta a 30°C si presentavano rotondeggianti, con un diametro intorno ai 10-15 µm (Fig. 34a). Le cellule erano solitarie e ogni singola cellula era circondata da una spessa guaina. La maggior parte delle cellule era in divisione. Questa portava alla formazione di gruppi di 2-4 individui formati da una o due successive divisioni della cellula madre.

Le caratteristiche di forma, dimensione e modo di divisione suggerivano che il microorganismo in esame potesse appartenere al genere *Chroococcus* (Komárek *et al.*, 1999).

L'autofluorescenza rossa della clorofilla, che mostrava la vitalità delle cellule, era omogenea e distribuita su tutta l'area cellulare (Fig. 34b).

4.2.3 Ultrastruttura delle cellule cianobatteriche al microscopio elettronico a scansione e a trasmissione

L'indagine effettuata al microscopio elettronico a scansione (Figg. 35a, b) confermava le dimensioni e la forma delle cellule. Inoltre evidenziava la superficie leggermente corrugata delle cellule e ne rivelava i piani di divisione che portavano alla formazione dei gruppi a 2 e a 4 individui.

Al microscopio elettronico a trasmissione (Figg. 36a, b) era possibile osservare la presenza nei cianobatteri di numerose inclusioni elettrondense, costituite da ammassi di sostanze di riserva, e di un numero molto elevato di tilacoidi. Questi ultimi formavano fasci compatti ad andamento irregolare e si distribuivano in tutto il volume citoplasmatico. Sulla superficie delle membrane tilacoidali erano riconoscibili ficobilisomi regolarmente distribuiti (Fig. 36b). Le cellule, per la maggior parte riunite in gruppi di 2 o 4, erano delimitate singolarmente dalla guaina regolare e compatta, più o meno spessa, a seconda di quando era avvenuta la divisione (Figg. 36a, b).

Per definire le caratteristiche chimiche della consistente guaina che circondava le cellule cianobatteriche sono stati condotti diversi test citochimici applicati sia alla microscopia ottica che alla microscopia elettronica a trasmissione.

Un risultato interessante e piuttosto inatteso è derivato dall'osservazione al microscopio ottico di sezioni semifine del cianobatterio colorate con toluidina basica, un colorante generale delle strutture cellulari. Le cellule cianobatteriche (Fig. 37a) mostravano una normale colorazione blu delle strutture interne, ma una imprevista metacromasia purpurea della guaina extracellulare. Un simile viraggio del colore è indotto dalla presenza di gruppi acidi e viene utilizzato come indice della anionicità della struttura in cui si realizza (Mc Cully, 1970; Novotny and Forman, 1975). Generalmente però la metacromasia richiede, per manifestarsi, la colorazione del campione in esame con toluidina acida (Mc Cully, 1970; Novotny and Forman, 1975). La verifica della presenza di gruppi acidi nella guaina del cianobatterio in esame si otteneva, in effetti, mediante l'utilizzo di questo tipo di colorazione (Fig. 37b).

E' noto che le guaine esopolisaccaridiche dei cianobatteri hanno caratteristiche anioniche per la presenza di componenti acidi, principalmente acidi uronici e/o gruppi solfato (De Philippis R. and Vicenzini M., 1998); per cui la reazione positiva della guaina del cianobatterio alla colorazione con toluidina acida era attesa. Il fatto che la metacromasia purpurea si fosse manifestata già nella colorazione con toluidina basica, suggeriva che la componente acida della guaina fosse particolarmente abbondante.

Allo scopo di indagare sulla natura dei gruppi responsabili della forte acidità della guaina, sono state effettuate colorazioni a fresco delle cellule cianobatteriche con diverse soluzioni di alcian blu. Più precisamente: alcian blu in acido acetico a pH 2.5 che evidenzia i gruppi carbossilici degli esopolisaccaridi e alcian blu in HCl a pH 0.5 che rivela, invece, i gruppi solfato legati agli esopolisaccaridi (Crayton, 1982). Dalle analisi effettuate risultava la forte positività all'alcian blu a pH 2.5 delle guaine che si presentavano intensamente colorate (Fig. 38a). Al contrario, il trattamento con alcian blu a pH 0.5 causava una reazione molto blanda. Le guaine rimanevano incolori o solo debolmente azzurre, a parte, in alcuni casi, un sottile strato più intensamente colorato, a diretto contatto con le cellule (Fig. 38b).

Quindi nel cianobatterio ETS-10, la forte acidità della spessa guaina extracellulare era dovuta prevalentemente alla presenza di gruppi carbossilici nelle molecole degli esopolisaccaridi. Per un'ulteriore caratterizzazione di questi componenti polisaccaridici, è stato condotto il test PATAg applicato alla microscopia elettronica a trasmissione. Come è visibile nelle figure 39a, b non si riscontrava alcuna reazione positiva della guaina nelle sezioni osservate al microscopio elettronico. Ciò dimostrava che le molecole dei polisaccaridi che la compongono sono costituite da catene di zuccheri complesse e molto ramificate, carenti quindi dei gruppi vic-glicolici necessari per la risposta al test citochimico (Thièry, 1967). Una reazione al

test PATAg si aveva invece all'interno delle cellule, dove la deposizione dei granuli d'argento evidenziava, tra le membrane tilacoidali, numerose masserelle corrispondenti a granuli di amido delle cianoficee, il polisaccaride di riserva dei cianobatteri che, per la sua composizione e organizzazione molecolare risponde positivamente al test citochimico. (Figg. 39a, b).

Infine, come ulteriore test citochimico applicato alla microscopia elettronica a trasmissione, è stata condotta una "colorazione" con acido fosfotungstico, specifica per le proteine (Silverman and Glick nel 1969). Ciò allo scopo di analizzare l'eventuale presenza di una componente proteica della guaina extracellulare del cianobatterio. Il test ha portato ad una risposta positiva. Nelle micrografie era infatti possibile rilevare all'esterno delle cellule la presenza di una fitta trama di fibrille proteiche con un prevalente orientamento parallelo alla superficie cellulare (Figg. 40a, b).

Dai dati ottenuti con le indagini citochimiche, quindi, risultava che la spessa e compatta guaina del cianobatterio ETS-10 era costituita da un complesso glicoproteico con un'abbondante componente acida ricca in gruppi carbossilici liberi.

4.2.4 Contenuti in pigmenti fotosintetici delle cellule cianobatteriche

Sulla coltura in fase di crescita esponenziale è stata effettuata un'analisi dei pigmenti fotosintetici liposolubili (clorofilla *a* e carotenoidi) tramite HPLC.

In Fig. 41, è rappresentato il cromatogramma ottenuto dall'analisi, in cui sono distinguibili i picchi dei caroteni idrocarburici β -carotene e echinenone e quelli delle xantofille ossigenate mixoxantofilla e zeaxantina. E' anche osservabile un picco molto basso della forma *cis* del β carotene. Nel cromatogramma è anche visibile il picco predominante della clorofilla *a*.

L'analisi dei pigmenti fotosintetici ha riguardato anche le ficobiliproteine che costituiscono i principali pigmenti antenna dei cianobatteri.

Nelle cellule di ETS-10 la cromoproteina più abbondante era la ficocianina, che costituiva da sola il 50% circa di questi pigmenti, seguita dalla ficoeritrina (attorno al 30%) e dalla alloficocianina (attorno al 20%) (Fig. 42).

Il fatto che la ficocianina fosse il pigmento prevalente era un dato atteso poiché la prevalenza di ficocianina sulle altre ficobiliproteine è una caratteristica comune dei cianobatteri. E' risultata invece particolare la presenza di una quantità di ficoeritrina superiore alla alloficocianina. Nei cianobatteri, infatti, la ficoeritrina, con cromoforo rosso, e generalmente scarsa o può anche mancare, mentre predominano le due ficobiliproteine con cromofori blu (ficocianina e alloficocianina), che sono responsabili del tipico colore verde-azzurro delle cellule (Van den Hoek *et al.* 1995; Moro *et al.* 2007).

4.2.5 Capacità di azoto-fissazione del cianobatterio ETS-10

Poiché il cianobatterio ETS-09 studiato in precedenza era risultato azotofissatore, abbiamo ritenuto interessante verificare se anche il ceppo ETS-10 avesse questa capacità diazotrofa. A tale scopo è stata indagata la presenza nel suo genoma dei geni *nifH* e *nifD*. Dopo l'amplificazione sono state ottenute due sequenze una di 586 pb e l'altra di 959. L'analisi delle sequenze ottenute, tramite il programma BLAST, ha dimostrato che esse corrispondevano, con una identità di circa il 79%, ai geni *nifH* e *nifD* di altri cianobatteri diazotrofi. Il ritrovamento nel suo genoma dei geni codificanti per due componenti dell'enzima nitrogenasi suggeriva che anche ETS-010 fosse un cianobatterio coccoide azotofissatore. Per verificare la sua capacità di fissare N_2 è stata allestita a 30°C una coltura in terreno BG11 privo di nutrienti azotati (BG11₀), in cui l' $NaNO_3$ era stato sostituito con NaCl (Rippka, 1988). Dopo tre settimane dall'inoculo nel terreno privo di nutrienti azotati si era sviluppata una coltura del cianobatterio con una buona pigmentazione (Fig. 43).

4.2.6 Crescita delle colture in terreno privo di nutrienti azotati e caratteristiche delle cellule cianobatteriche

Vista la capacità dell'organismo di sopravvivere in terreno privo di nutrienti azotati, su colture cresciute in BG11₀, e sottoposte alle stesse condizioni di luce e temperatura delle colonie rifornite di $NaNO_3$, è stata valutata la crescita per un periodo di 7 settimane. Sulle cellule in fase di crescita esponenziale sono state anche condotte indagini morfologiche e fisiologiche allo scopo di verificare gli eventuali effetti della mancanza di nutrienti azotati.

L'andamento della curva di crescita del cianobatterio in terreno BG11₀ differiva poco da quella rilevata in terreno BG11, e anche i valori di densità ottica raggiunti erano confrontabili con quelli delle colture cresciute in presenza di nutrienti azotati (Fig. 44). La mancanza di azoto inorganico nel terreno di coltura, quindi, non interferiva con la capacità di crescita del microorganismo, che riusciva a supplire a questa carenza nutrizionale con la fissazione dell' N_2 .

Al microscopio ottico le cellule di ETS-10 cresciute in assenza di azoto (Fig. 45a) apparivano di forma e aspetto normale. L'emissione di fluorescenza era meno intensa rispetto alle cellule cresciute a 30°C in terreno con nutrienti azotati (Fig. 45b), ma come in queste era omogenea e distribuita regolarmente su tutta l'area cellulare.

La regolare struttura esterna delle cellule nella coltura sviluppatasi in assenza di $NaNO_3$ era confermata dalle indagini condotte al microscopio elettronico a scansione (Figg. 46a, b). Dalle misure degli ingrandimenti, però, risultava che le dimensioni di queste cellule erano inferiori a quelle delle cellule rifornite di nutrienti azotati (vedi Figg. 35a, b).

Anche le osservazioni al microscopio elettronico a trasmissione (Figg. 47a, b) non rivelavano alterazioni all'interno delle cellule cianobatteriche cresciute in assenza di minerali di azoto.

Le analisi dei pigmenti fotosintetici mostravano una diminuzione dei contenuti in clorofilla nelle colture cresciute in mancanza di nutrienti azotati (Fig. 48a). La stessa diminuzione si riscontrava nei contenuti in carotenoidi totali (Fig. 48b) per cui il rapporto carotenoidi/clorofilla *a* risultava del tutto simile a quello della coltura rifornita di NaNO₃ (Fig. 48c).

L'assenza di nutrienti azotati quindi non veniva percepita come una condizione di stress che richiedesse l'incremento dei carotenoidi come pigmenti protettivi. Inoltre dalle analisi all'HPLC risultava che nelle cellule cresciute in BG11₀ erano presenti, con gli stessi rapporti percentuali, le stesse forme di carotenoidi ritrovati nelle cellule rifornite di nutrienti azotati (Figg. 49a, b).

A differenza della clorofilla e dei carotenoidi, le ficobiliproteine aumentavano notevolmente (Fig. 50a) nella coltura privata di nutrienti azotati, mantenendo gli stessi rapporti percentuali che avevamo nella coltura rifornita di NaNO₃ (Figg. 50b, c).

L'aumento delle ficobiliproteine determinava nelle colture private di NaNO₃ un incremento molto consistente nel rapporto ficobiliproteine/clorofilla *a* (Fig. 50d).

Le variazioni delle quantità relative di pigmenti fotosintetici in questa coltura rispetto alla coltura rifornita di nutrienti azotati potrebbe essere spiegato, almeno in parte, con un riassetto dell'apparato fotosintetico per far fronte alle esigenze energetiche della azotofissazione.

L'aumento consistente delle ficobiliproteine, in particolare, potrebbe avere la funzione di potenziare la raccolta della luce da inviare ai fotosistemi. Questi, anche se in numero minore (come suggerito dalla minore quantità di clorofilla e carotenoidi), potrebbero condurre con più efficienza le reazioni luminose da cui dipende la produzione delle risorse energetiche delle cellule.

Queste ipotesi, naturalmente, necessitano una verifica che richiederà delle analisi di funzionalità dei fotosistemi, che verranno effettuate in futuro.

4.2.7 Crescita delle colture di ETS-10 a 40°C

Gli stessi parametri strutturali e fisiologici considerati per ETS-10 cresciuto a 30°C sono stati analizzati in colture fatte crescere a 40°C, allo scopo di valutare gli eventuali effetti dell'aumento della temperatura sulle cellule del cianobatterio.

A 40°C la velocità di crescita del microrganismo nel primo mese di coltura si riduceva a circa la metà rispetto a quella misurata a 30°C. La densità ottica della coltura però, continuava a salire per tempi più lunghi (7settimane), riducendo così la distanza dai valori registrati alla temperatura più bassa (Fig. 51).

Delle due temperature, quindi, la più adatta alla crescita del cianobatterio risultava essere quella di 30°C. L'aumento della T° a 40°C era comunque tollerato dal cianobatterio termale, che però ne risentiva in termini di velocità di crescita.

La graduale e continua salita della densità ottica della coltura mantenuta a 40°C indicava che questa temperatura, pur rallentandola, non impediva la crescita del cianobatterio e che il suo limite di termotolleranza andava quindi collocato oltre i 40°C.

Il fatto che la coltura cresciuta a 30°C raggiungesse prima di quella a 40°C la fase stazionaria può trovare una plausibile spiegazione nella più rapida deplezione di nutrienti del terreno di crescita dovuta proprio alla più rapida crescita.

Come per ETS-09 così pure per ETS-10, l'analisi della crescita a 40°C è stata condotta anche su colture allestite in terreno BG11₀, privo di nutrienti azotati. A 40°C sia i valori che l'andamento nel tempo delle curve di crescita delle colture rifornite o meno di nutrienti azotati erano del tutto sovrapponibili (Fig. 51). Ciò confermava l'effetto rallentante svolto dalla più alta temperatura sulla velocità di crescita delle colture cianobatteriche e dimostrava ulteriormente che in mancanza di nutrienti azotati le richieste nutrizionali delle cellule erano soddisfatte dall'attività diazotrofa di ETS-10.

4.2.8 Caratteristiche delle cellule cianobatteriche cresciute a 40°C

Le indagini sulle colture di ETS-10 mantenute a 40°C in terreno privo di NaNO₃, hanno riguardato esclusivamente la crescita del microrganismo. Lo scopo era quello di valutare se la carenza nutrizionale aggravasse ulteriormente il rallentamento della crescita riscontrato alla più alta temperatura o se l'attività diazotrofa del microrganismo compensasse del tutto lo stress nutrizionale, cosa che i dati sperimentali hanno dimostrato avvenire.

Le successive analisi strutturali e fisiologiche sono poi proseguite su cellule cianobatteriche cresciute a 40°C in terreno di coltura completo (BG11).

Al microscopio ottico in una coltura in fase esponenziale mantenuta a 40°C, la forma e la dimensione delle cellule non mostravano differenze di rilievo (Fig. 52a) rispetto a quelle cresciute alla più bassa temperatura. Era però più frequente trovare cellule singole, tra le cellule in divisione a 2 o 4 individui. Era inoltre evidente una particolare abbondanza di materiali extracellulari, che nei cianobatteri sono generalmente esopolisaccaridici (Kromkamp, 1987), estrusi dalle cellule nel terreno di coltura.

L'osservazione delle stesse cellule dopo eccitazione con luce UV (Fig. 52b) rilevava in tutte l'autofluorescenza rossa della clorofilla *a*. A differenza di quanto riscontrato nelle cellule cresciute a 30°C, in quelle mantenute a 40°C la fluorescenza era però disomogenea, suggerendo una distribuzione meno regolare della clorofilla *a* all'interno delle cellule cianobatteriche.

Le osservazioni al microscopio elettronico a scansione non rilevavano differenze sostanziali tra le cellule cresciute a 40°C (Figg. 53a, b), rispetto a quelle cresciute a 30°C (vedi Figg. 35a, b)

Le micrografie relative alle cellule cresciute a 40°C, però, evidenziavano una certa accentuazione della rugosità superficiale e mostravano la presenza, tra le cellule, delle masse di materiali extracellulari.

Le cellule del cianobatterio cresciuto a 40°C al microscopio elettronico a trasmissione (Figg. 54a, b) avevano un citoplasma particolarmente elettrondenso in cui però erano ancora riconoscibili numerosi tilacoidi. L'irregolarità con cui questi erano distribuiti nel citoplasma già nelle cellule cresciute a 30°C, non permetteva di stabilire, dalle osservazioni al microscopio elettronico, se l'aumento della temperatura avesse alterato la distribuzione cellulare di queste membrane. L'emissione di fluorescenza della clorofilla rilevata al microscopio ottico, suggeriva, però, un maggiore disordine nella loro collocazione citoplasmatica o, perlomeno, una più disomogenea distribuzione in esse dei pigmenti fotosintetici.

Rispetto alle cellule cianobatteriche cresciute a 30°C, inoltre, quelle mantenute a 40°C avevano profili più irregolari e corrugati (Figg. 54a,b), che si correlavano con le osservazioni delle superfici al microscopio elettronico a scansione. Anche i setti di divisione delle cellule avevano spesso un andamento irregolare (Fig. 54b).

Dall'analisi spettrofotometrica dei pigmenti fotosintetici è risultato che l'aumento della temperatura di crescita da 30°C a 40°C portava ad una diminuzione contenuta, anche se significativa, dei livelli di clorofilla *a* della coltura (Fig. 55a), mentre causava un incremento consistente della quantità dei carotenoidi (Fig. 55b). Ciò comportava, come conseguenza, un significativo aumento del valore del rapporto carotenoidi/clorofilla *a* (Fig. 55c).

Quest'ultimo dato è di particolare interesse, perché dimostra che l'aumento della temperatura viene percepito dal cianobatterio come una condizione di stress, inducendolo a produrre più carotenoidi. I carotenoidi, oltre ad operare come pigmenti antenna per la raccolta della luce, svolgono una funzione protettiva della clorofilla e dell'intero apparato fotosintetico in condizioni di stress. Ciò avviene principalmente in condizioni di eccesso di luce, che espone le membrane fotosintetiche a danni fotossidativi provocati dalla produzione di ossigeno singoletto (Biswal, 1996). L'aumento dei carotenoidi e del rapporto tra questi pigmenti e la clorofilla si può riscontrare però anche in altre condizioni di stress e viene generalmente interpretato come un segnale di disagio dell'organismo fotosintetico.

Allo scopo di verificare se l'aumento della temperatura di crescita oltre alla quantità totale di carotenoidi modificasse lo spettro dei pigmenti sintetizzati, o i loro rapporti percentuali, è stata condotta, anche sulle cellule cresciute a 40°C una analisi mediante HPLC.

Da questa analisi è risultato che l'aumento della temperatura non aveva conseguenze sullo spettro dei pigmenti sintetizzati, mentre influenzava i contenuti percentuali dei diversi carotenoidi (Fig. 56a, b). In particolare veniva rilevata una diminuzione delle percentuali di echinenone e zeaxantina e un aumento invece della percentuale di

β carotene. Ciò dimostrava che l'incremento dei carotenoidi totali nelle cellule in coltura a 40°C era sostenuto prevalentemente dalla aumentata sintesi di β -carotene.

Ciò si correlava bene con la reazione delle cellule cianobatteriche ad una condizione percepita come stressante. Delle tre forme predominanti di carotenoidi, infatti, l'echinenone e la zeaxantina hanno funzione di pigmenti antenna, ma non sono coinvolti, nei cianobatteri, in meccanismi di protezione da danni ossidativi (Raven and Geider, 2003). Questa funzione protettiva del β -carotene è invece riconosciuta in tutti gli organismi fotosintetici (Hideg, 1996).

L'analisi dei pigmenti fotosintetici è stata condotta anche sulle ficobiliproteine. Riguardo a questi pigmenti, l'aumento da 30°C a 40°C della temperatura di crescita della colonia cianobatterica non causava cambiamenti significativi sia nel contenuto totale (Fig. 57a) che nei rapporti percentuali delle diverse forme di ficobiliproteine (Fig. 57b, c).

4.2.9 Il limite di termo-tolleranza di ETS-10

Per ETS-10 è stato, infine, definito il limite massimo di termotolleranza, analizzandone la capacità di crescita alle temperature di 45, 47 e 50°C (Fig. 58).

Alla temperatura di 45°C si poteva osservare fin dall'inizio una riduzione della velocità di crescita. Gli organismi mantenuti a questa temperatura riuscivano a crescere anche se per un periodo limitato (7-10 giorni), dopo il quale la caduta della densità ottica, utilizzata come misura di crescita, anche al di sotto dei valori rilevati al momento dell'inoculo, indicava la morte e la degradazione di un numero via via maggiore di cellule. A 47°C dopo alcuni giorni in cui la densità ottica si manteneva costante, iniziava una lenta ma graduale degradazione delle cellule.

A 50°C, infine, il decremento della densità ottica riscontrato già al primo giorno dopo l'inoculo indicava che questa temperatura portava rapidamente alla morte delle cellule.

Come per il cianobatterio ETS-09, anche per ETS-10, le temperature di 45°C e 47°C, mostravano una certa permissività, per la crescita o perlomeno per la sopravvivenza delle cellule cianobatteriche, seppure molto limitata nel tempo. Quindi anche le cellule di ETS-10 sono in grado di sopravvivere per alcuni giorni se la temperatura dell'acqua termale, al di sopra della superficie del fango su cui si sono sviluppate le popolazioni cianobatteriche, sale fino a quasi 50°C. Esse però muoiono se queste temperature si mantengono troppo a lungo, prima di scendere ai valori ottimali di 30°C, o anche a quelli tollerati, anche se alquanto stressanti, di 40°C.

Questi risultati portano ad una ulteriore conferma del fatto che il limite di termotolleranza dei cianobatteri coccoidi del Comprensorio Termale Euganeo sia più basso rispetto a quello dei cianobatteri filamentosi che popolano la superficie dei fanghi anche a temperature di 60°C.

Una limitata termotolleranza, che si collocava su un valore di temperatura di circa 45°C, era stata segnalata in precedenza per un altro cianobatterio coccoide

(*Cyanobacterium aponinum*) del Comprensorio Termale Euganeo (Moro *et al.* 2007b). Quindi una termotolleranza nel range di 45-47°C sembra essere una caratteristica condivisa dai cianobatteri coccoidi di questo ambiente termale.

4.2.10 La morte di ETS-10 a 50°C

Su cellule cianobatteriche esposte alla temperatura di 50°C sono state condotte analisi morfologiche, ultrastrutturali e di contenuti in pigmenti fotosintetici per quattro giorni consecutivi (indicati come T1-T4), utilizzando come cellule di riferimento quelle cresciute a 30°C, prima del trasferimento alla più alta temperatura (T0).

Nelle cellule mantenute alla temperatura di 50°C, le osservazioni al microscopio ottico in luce visibile non evidenziavano alterazioni morfologiche di rilievo durante tutto il periodo di indagine (Fig. 59a). La visione delle cellule in fluorescenza mostrava invece la diminuzione nel tempo della fluorescenza della clorofilla *a* (Fig. 59b) e di quella delle ficobiliproteine (Fig. 59c), di cui rimanevano solo tracce al quarto giorno di permanenza a 50°C.

La diminuzione dei contenuti cellulari di clorofilla (Fig. 60a) e anche dei carotenoidi totali (Fig. 60b) era confermata dalle analisi quantitative dei pigmenti allo spettrofotometro.

Al microscopio elettronico a trasmissione l'aumento della temperatura a 50°C portava, dopo un giorno, alla diminuzione nelle cellule delle sostanze di riserva e ad alcune alterazioni dei tilacoidi. Questi erano aggregati in modo meno compatto e presentavano profili dilatati (Fig. 61a). Nei giorni successivi si osservava una diminuzione dell'elettrodensità delle membrane tilacoidali. Le cellule dopo quattro giorni a 50°C avevano citoplasmi in cui erano inserite masse di membrane tilacoidali fortemente alterate (Fig. 61b). Erano anche presenti numerose vescicolazioni.

Nella cellula del cianobatterio ETS-10 il citoplasma si manteneva elettrondenso mentre le membrane tilacoidali sembravano dissolversi, perdendo consistenza e colorazione. Tutto ciò, alla fine, creava un'immagine della cellula "in negativo".

4.2.11 Analisi molecolari

Descrizione dei Data set

Analogamente a quanto descritto per ETS-09, anche per ETS-10 sono stati creati tre diversi *data set* di seguito presentati, allo scopo di determinarne la posizione filogenetica.

I primi due *set* sono stati creati impiegando rispettivamente le sequenze del 16S rDNA e dell'*rbcL*. Il *data set* relativo al primo *marker* molecolare includeva 72 sequenze di cianobatteri coccoidi più le due sequenze di *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli*. Anche per determinare la collocazione sistematica di ETS-10 ci si è

basati su una preliminare ricostruzione filogenetica (dati non mostrati), ottenuta utilizzando un *data set* includente quasi tutte le sequenze di 16S rDNA disponibili in GenBank. Inoltre si è ritenuto necessario ordinare presso le diverse banche algali mondiali tutti i ceppi disponibili di *Chroococcus* al fine di supportare l'informazione morfologica e ultrastrutturale con dati genetici.

Superate le difficoltà iniziali nell'ottenere il materiale per condurre le indagini molecolari, a causa della cattiva qualità di alcuni dei suddetti ceppi, sono state determinate le sequenze geniche relative ad entrambi i *marker*.

Il *data set* dell'*rbcL* conteneva 31 sequenze, numero inferiore rispetto al precedente a causa della scarsità di dati molecolari per questo *marker* presenti in GenBank.

Un terzo *data set* chiamato 16Sr DNA+*rbcL* è stato ottenuto combinando 62 sequenze dei 31 *taxa* in comune dei due *set* sopra citati.

L'allineamento multiplo per il 16S rDNA è rappresentato da 1424 nucleotidi, mentre gli allineamenti multipli per l'*rbcL* e 16S rDNA+*rbcL* sono formati rispettivamente da 1077 e 2552 basi.

Il miglior modello di evoluzione per tutti i *data set* è risultato GTR+I+G, selezionato con Modeltest (vedi par. 3.7.6).

Filogenesi condotta sul data set 16S rDNA

La topologia ottenuta è presentata in Fig.62.

Da questa ricostruzione si intuiva come i vari rappresentanti del genere *Chroococcus* fossero interspersi con membri di altri generi, indicando come questo *taxon* nella sua attuale definizione fosse polifiletico.

In particolare, il ceppo ETS-10 si posizionava all'interno di un *clade* contenente due rappresentanti di *Chroococcus* cf. *membraninus* isolati da sorgenti termali. Il confronto delle sequenze relative a questo *marker* per i due ceppi, che provenivano dalla stessa banca algale, evidenziava un'identità nucleotidica del 99,86%. Una di queste sequenze è stata da me determinata e poi confrontata in un secondo momento con quella presente in GenBank.

Filogenesi condotta sul data set rbcL

La topologia ottenuta per il gene *rbcL* è presentata in fig. 63.

Il ceppo ETS-10 si collocava come *sister taxon* di *Chroococcus* cf. *membraninus* con un buon valore di bootstrap e all'interno di un *clade* (70% BT) rappresentato da altri ceppi dello stesso genere da me sequenziati. Gli altri *taxa* inclusi in questo genere, *Chroococcus minor* e *Chroococcus cohaerens* risultavano nettamente separati dalle altre specie di *Chroococcus*. Pertanto nella sua attuale definizione questo gruppo risulta polifiletico.

Filogenesi condotta sul data set combinato 16Sr DNA-rbcL

La ricostruzione filogenetica per il *data set* combinato è mostrata in Fig. 64. Secondo questa topologia, il ceppo ETS-10 si collocava all'interno di un gruppo comprendente diverse specie appartenenti al genere *Chroococcus*. Tale dato riceveva un buon supporto di BT (94%) confermando quanto ottenuto dalla precedente analisi. Nuovamente *Chroococcus minor* e *Chroococcus cohaerens* si collocavano lontano filogeneticamente dal suddetto gruppo.

I risultati ottenuti dai tre distinti *data set* sono pressochè congruenti nel definire la posizione filogenetica di ETS-10. L'organismo in studio si posizionava in tutte le topologie come *sister taxon* di *Chroococcus* cf. *membraninus* e, nelle analisi con il gene *rbcL* e da quelle ottenute combinando i dati, all'interno di un clade contenente altre due specie appartenenti a *Chroococcus*. Inoltre il confronto tra le sequenze nucleotidiche del 16S rDNA di ETS-10 e del ceppo da me sequenziato di *Chroococcus* cf. *membraninus* mostrava un'identità del 91,60%, in termini di diversità, corrispondente a 114 differenti nucleotidi. Attualmente la soglia di identità tra sequenze del 16S rDNA per attribuire due organismi alla stessa specie è del 97,5% (Stackebrandt and Goebel, 1994; Casamatta *et al.*, 2005). Basandosi su quest'ultima evidenza e sulle topologie ottenute si poteva concludere che l'organismo da me isolato, non solo appartenesse al genere *Chroococcus*, ma potesse trattarsi di una nuova specie di questo gruppo.

La classificazione originale del genere *Chroococcus* è stata formulata da Nageli nel 1849 e successivamente rivista da Komárek e Anagnostidis nel 1999.

Secondo tale classificazione questo gruppo includeva 35 specie di cianobatteri cosmopoliti il cui habitus era caratterizzato da cellule di forma generalmente rotondeggiante, ma talvolta irregolare, raramente solitarie.

Una peculiarità di questo genere era la grossa guaina mucillaginosa che circondava gruppi formati da 2-16 cellule e la modalità di riproduzione attuata attraverso una divisione simmetrica. Altri criteri adottati dagli studiosi per distinguere le diverse specie attribuite a questo gruppo erano la dimensione e il numero di cellule a cui la divisione dava origine, l'habitat e il colore delle cellule che variava dal verde oliva al blu verde.

In un recente lavoro (Komárková *et al.*, 2010), basato su un approccio molecolare, sono stati rivisti i confini del genere *Chroococcus*. In particolare gli autori propongono di elevare allo stato di genere l'attuale sottogenere *Limnococcus*, al fine di includere alcune forme precedentemente attribuite a *Chroococcus*. Pertanto i confini di quest'ultimo verrebbero limitati a poche specie. Tuttavia questa classificazione, suppur formalizzata, si basa su un'analisi condotta con un metodo filogenetico molto semplificato e basata unicamente sul 16S rDNA. I geni codificanti per le subunità ribosomali, pur essendo ampiamente utilizzati nella filogenesi dei cianobatteri (Neilan *et al.*, 1997; Crosbie *et al.*, 2003; Casamatta *et al.*, 2005), si sono

rivelati problematici per la presenza di operoni multipli nei genomi procariotici (Boyer *et al.*, 2001), che vengono amplificati con diversa efficienza a seconda dei primer utilizzati (Reysenbach *et al.*, 1992; Suzuki and Giovannoni 1996; Nübel *et al.*, 1997). Ciò può spiegare la discrepanza osservata nelle diverse filogenesi ottenute con il 16S rDNA e la necessità di adottare un approccio multigenico, includendo anche marker a copia singola (es. *rbcL* nel presente studio).

Inoltre, come in questo elaborato, la mancanza della specie tipo del genere, *Chroococcus rufescens*, rende maggiormente problematica la definizione dei confini di tale *taxon*.

Allo stato attuale, le informazioni fin qui acquisite, portano a supporre che ETS-10 sia una specie appartenente al genere *Chroococcus*. Ulteriori analisi filogenetiche, impiegando altri marker molecolari a copia singola (es. *rpoC1*) saranno necessarie per avvalorare lo status di questo organismo come nuova specie per la quale si potrebbe suggerire il nome di *Chroococcus aponinus*.

4.2.12 Conclusioni ETS-10

I risultati sperimentali ottenuti per ETS-10 permettono di trarre alcune conclusioni che vengono sintetizzate qui di seguito.

- ETS-10 ha cellule solitarie e ogni singola cellula è circondata da una spessa guaina. Le cellule sono spesso in divisione. Questa porta alla formazione di gruppi di 2-4 individui formati da una o due successive divisioni della cellula madre. Le caratteristiche morfologiche, le dimensioni e il modo di divisione delle cellule suggeriscono la sua appartenenza al genere *Chroococcus*;
- La spessa e compatta guaina di ETS-10 è costituita da un complesso glicoproteico con un'abbondante componente acida ricca in gruppi carbossilici liberi;
- ETS10 è una forma di azotofissatore. Ciò è suggerito dal ritrovamento nel suo genoma dei geni *nifH nifD* e dalla sua capacità di sopravvivere e crescere in terreni di coltura completamente privi di nutrienti azotati;
- Le cellule dell'organismo cresciuto a 30°C in assenza di nutrienti azotati non mostrano particolari variazioni morfologiche, ultrastrutturali e fisiologiche rispetto alle cellule dell'organismo cresciuto in normale terreno BG11. Inoltre la mancanza di azoto inorganico nel terreno di coltura, non interferisce con la capacità di crescita del microorganismo, che riesce a supplire a questa carenza nutrizionale con la fissazione dell' N_2 ;

- L'aumento della temperatura a 40°C è tollerato dal cianobatterio termale ETS-10 anche se porta ad una diminuzione della velocità di crescita. Le caratteristiche morfologiche ed ultrastrutturali rilevate nelle cellule cresciute a 30°C si ritrovano anche nell'organismo cresciuto alla più alta temperatura, mentre la quantità e i rapporti percentuali dei diversi pigmenti fotosintetici subiscono alcune variazioni. In particolare l'aumento della temperatura viene percepito dal cianobatterio come una condizione di stress, inducendolo a produrre più carotenoidi;
- ETS-10 è in grado di sopravvivere alle temperature più elevate di 45-47°C solo per alcuni giorni, dimostrando di essere un microrganismo con una relativamente bassa termotolleranza. Durante il processo di morte (nell'organismo esposto a 50°C) le membrane fotosintetiche vengono degradate ma non scompaiono e rimangono come masse scarsamente elettrondense in un citoplasma che mantiene la densità;
- Le analisi filogenetiche confermano l'iniziale ipotesi di appartenenza del ceppo euganeo al genere *Chroococcus* e portano inoltre a suggerire che ETS-10 appartenga ad una nuova specie di questo genere a cui potrebbe essere dato il nome di *Chroococcus aponinus*.

DOCUMENTAZIONE

DEI DATI SPERIMENTALI ETS-10

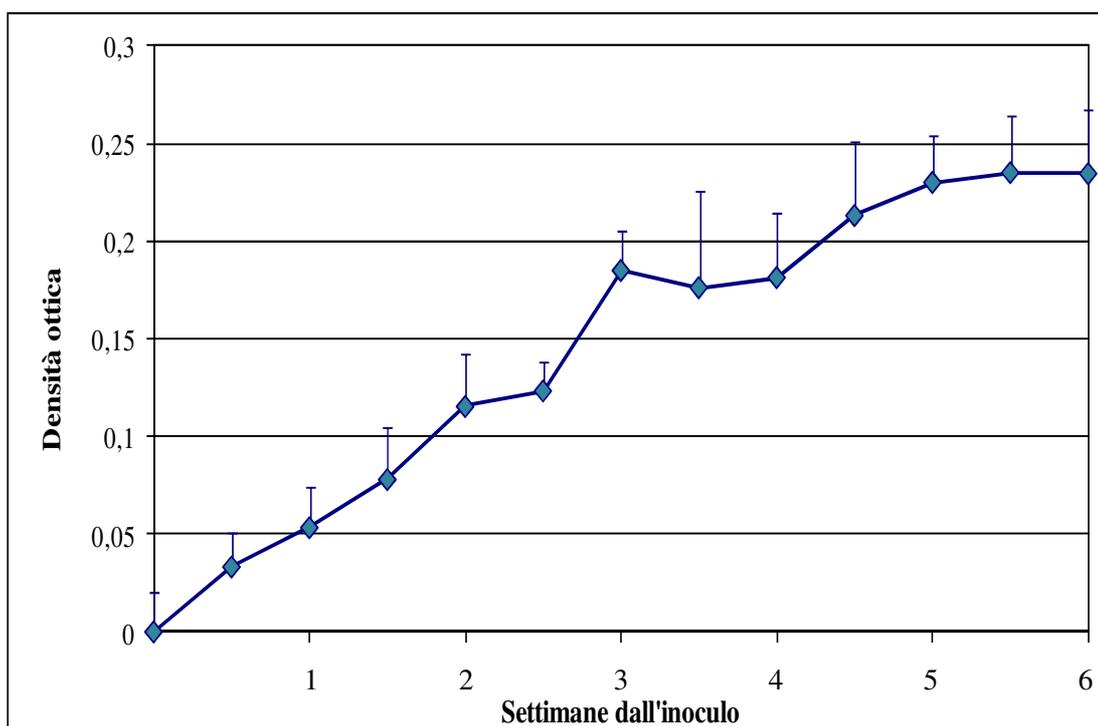


Figura 33. Curva di crescita del cianobatterio ETS-10 misurata come incremento nel tempo della densità ottica (D.O.) della coltura. Come Punto 0 è stata considerata la densità ottica della coltura subito dopo l'inoculo iniziale.

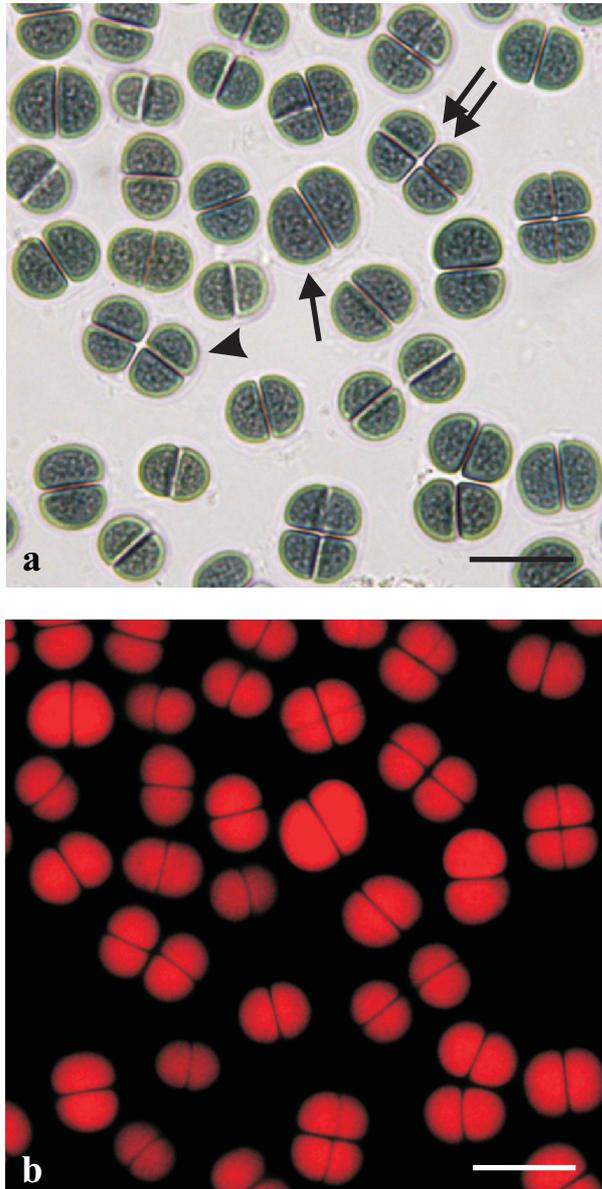


Figure 34 a, b. Immagini al microscopio ottico delle cellule cianobatteriche di ETS-10.
a. Cellule visualizzate in luce visibile. Notare le numerose divisioni a 2 (freccia) e 4 (doppia freccia) individui. E' evidente la guaina extracellulare (punta di freccia)
b. Le cellule, osservate al microscopio a fluorescenza, dopo eccitazione con luce UV, mostrano una intensa autofluorescenza rossa della clorofilla *a*.
 Barre=20 µm.

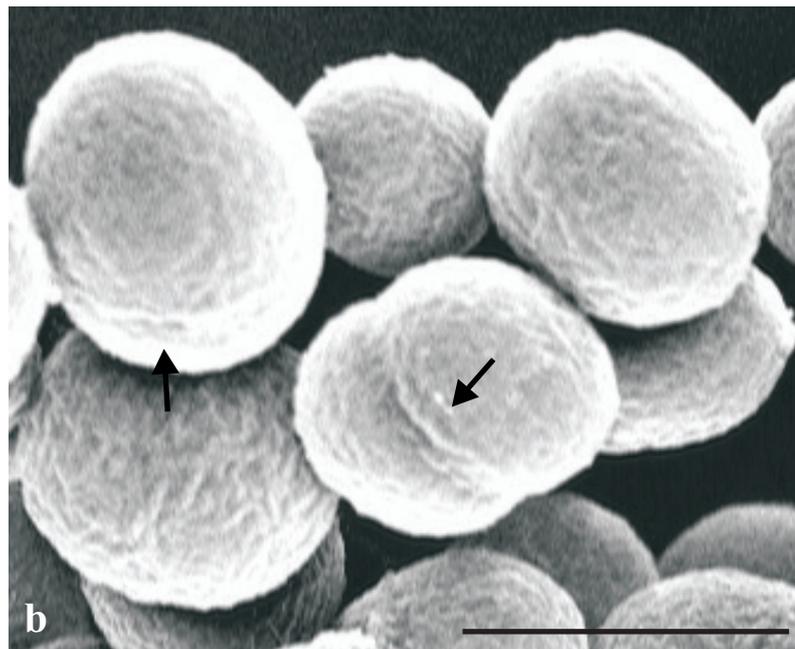
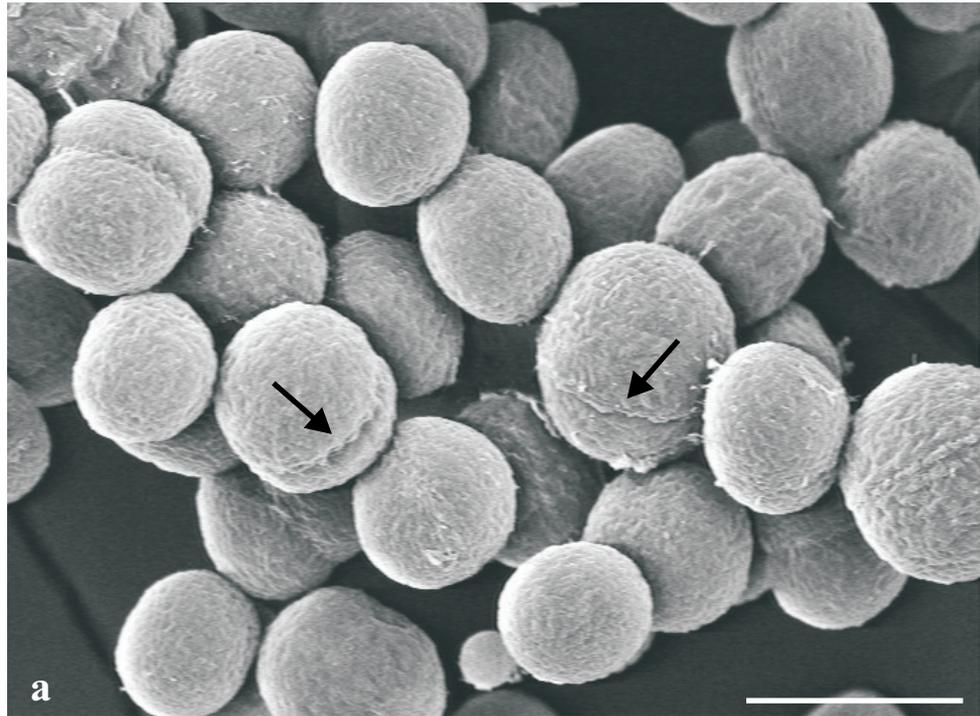


Figure 35a, b. Micrografie al microscopio elettronico a scansione delle cellule cianobatteriche di ETS-10. Si riconoscono la superficie leggermente corrugata e i piani di divisione delle cellule (freccie).
Barre = 10 μ m

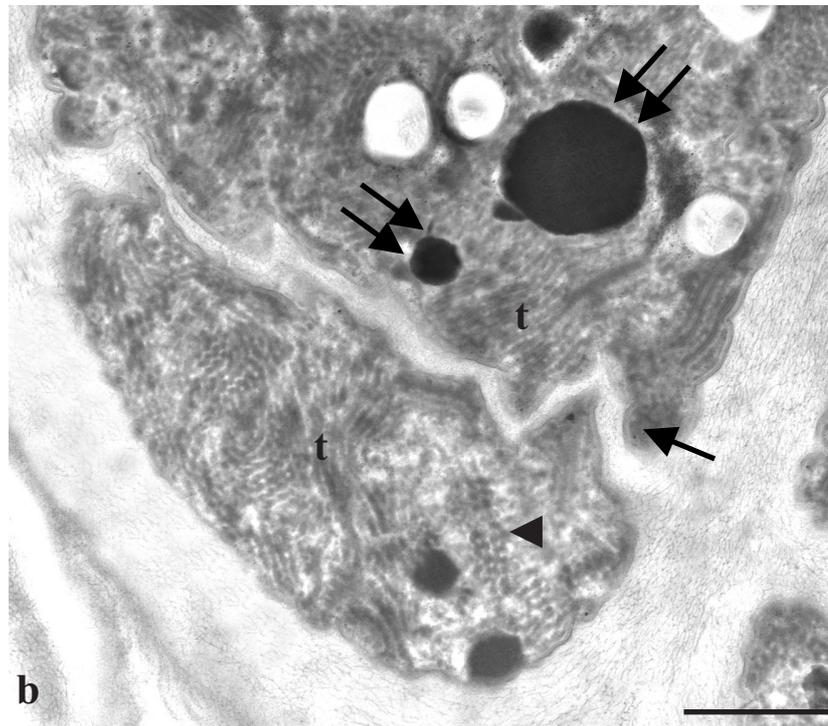
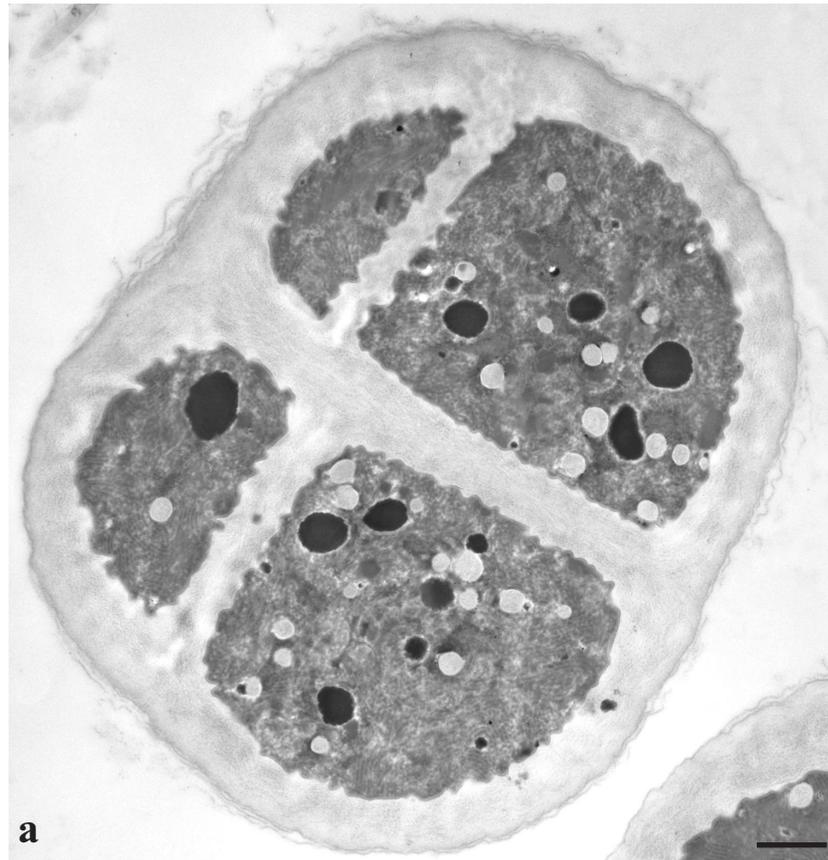


Figure 36a, b. Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione delle cellule cianobatteriche.

a. Gruppo di quattro cellule con spessa guaina esterna.

b. Particolare di due cellule con un setto di separazione ancora sottile (freccia). Nelle cellule sono visibili i numerosi tilacoidi (t) e i ficobilisomi allineati alla superficie (punta di freccia). Notare nelle cellule le inclusioni elettrondense di materiali di riserva (doppia freccia).

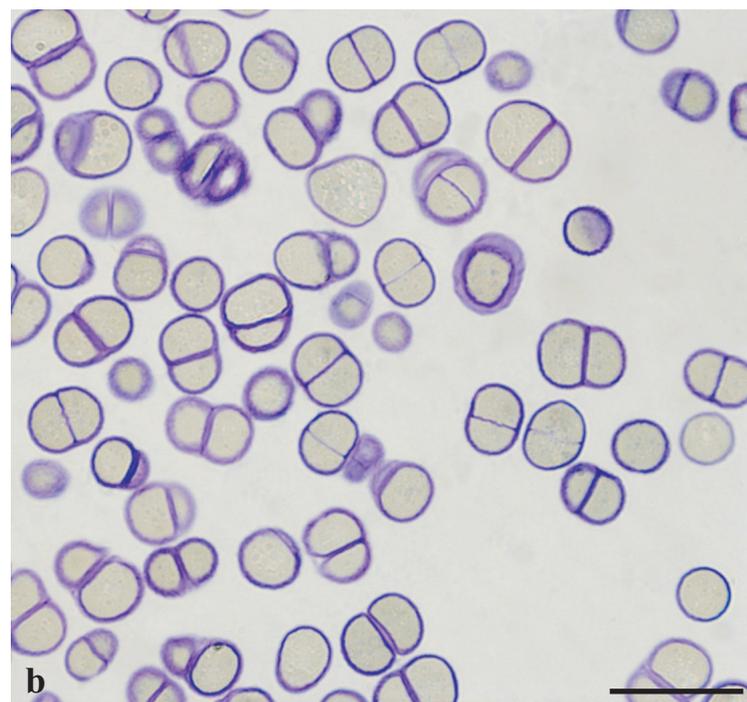
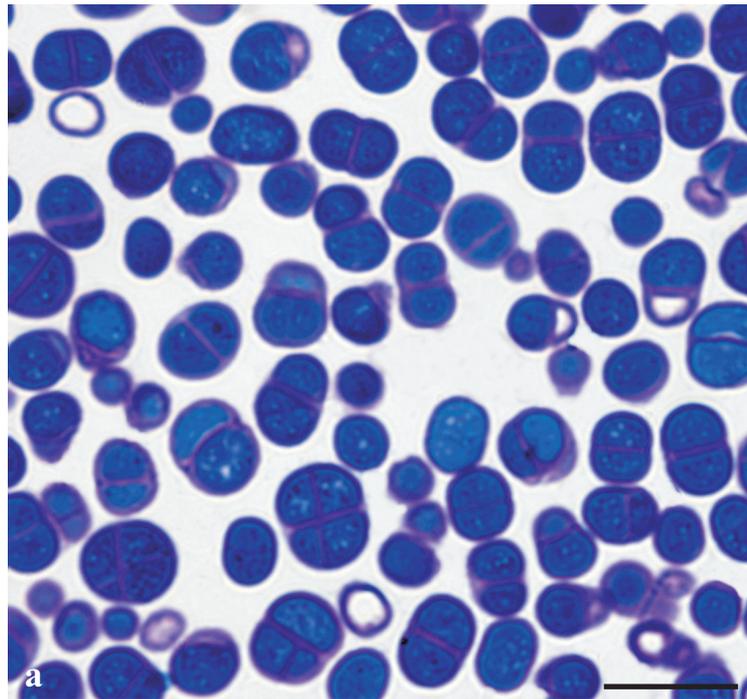


Figure 37a, b. Micrografie di sezioni semifine delle cellule del cianobatterio ETS-10 colorate con blu di toluidina.

a. Cellule colorate con blu di toluidina basica. È visibile la metacromasia purpurea delle guaine extracellulari.

b. Cellule colorate con blu di toluidina acida. Le uniche colorate sono le guaine extracellulari che mostrano metacromasia purpurea..

Barre = 20µm

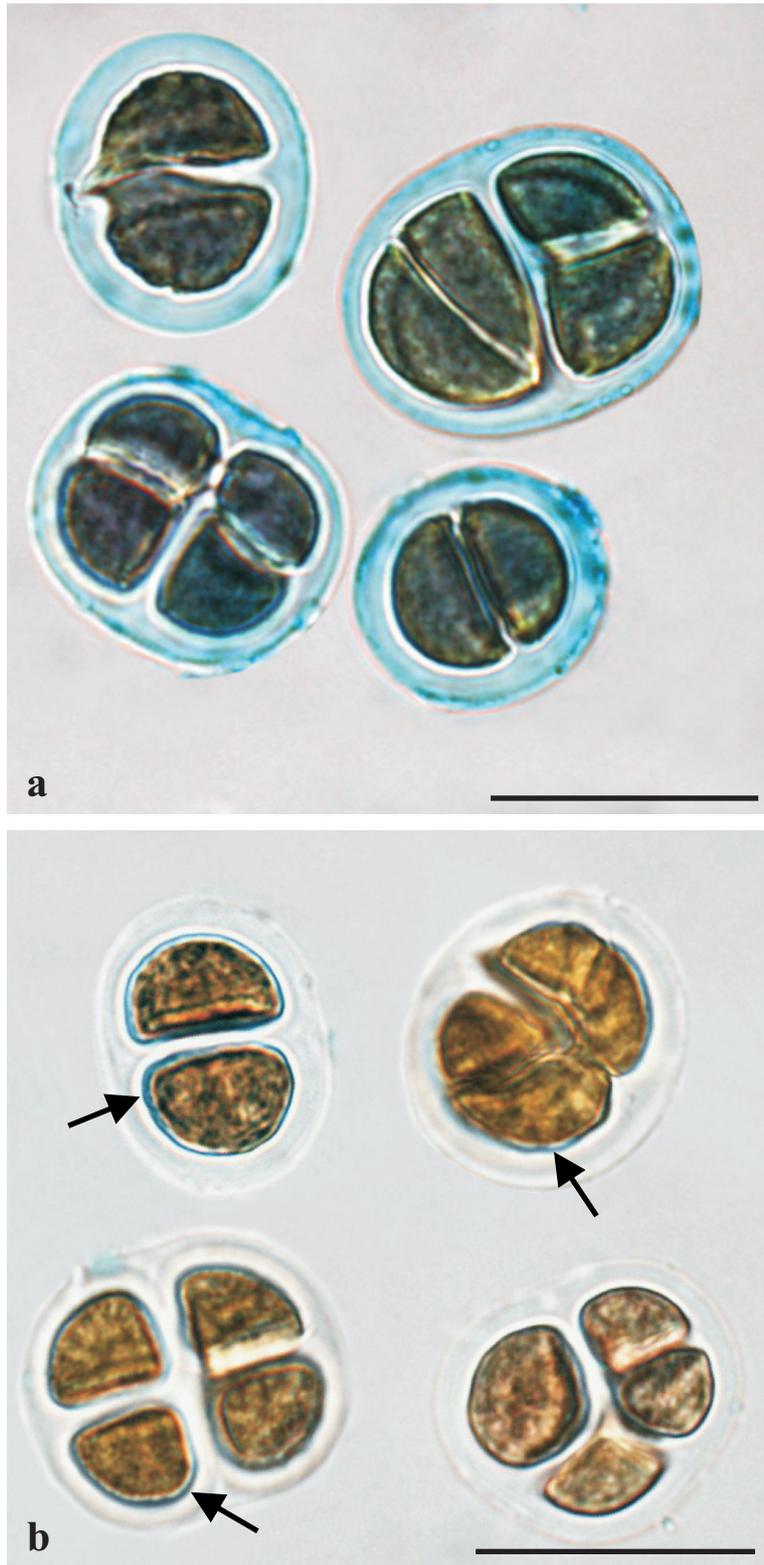


Figure. 38a, b. Micrografie di cellule del cianobatterio ETS -10 colorate a fresco con alcian blu.

a. Colorazione con alcian blu a pH 2,5. Le guaine extracellulari sono fortemente positive.

b. Colorazione con alcian blu a pH 0,5. Le guaine hanno una reazione molto blanda, a parte un sottile strato interno (frecce).

Barre = 20 μ m

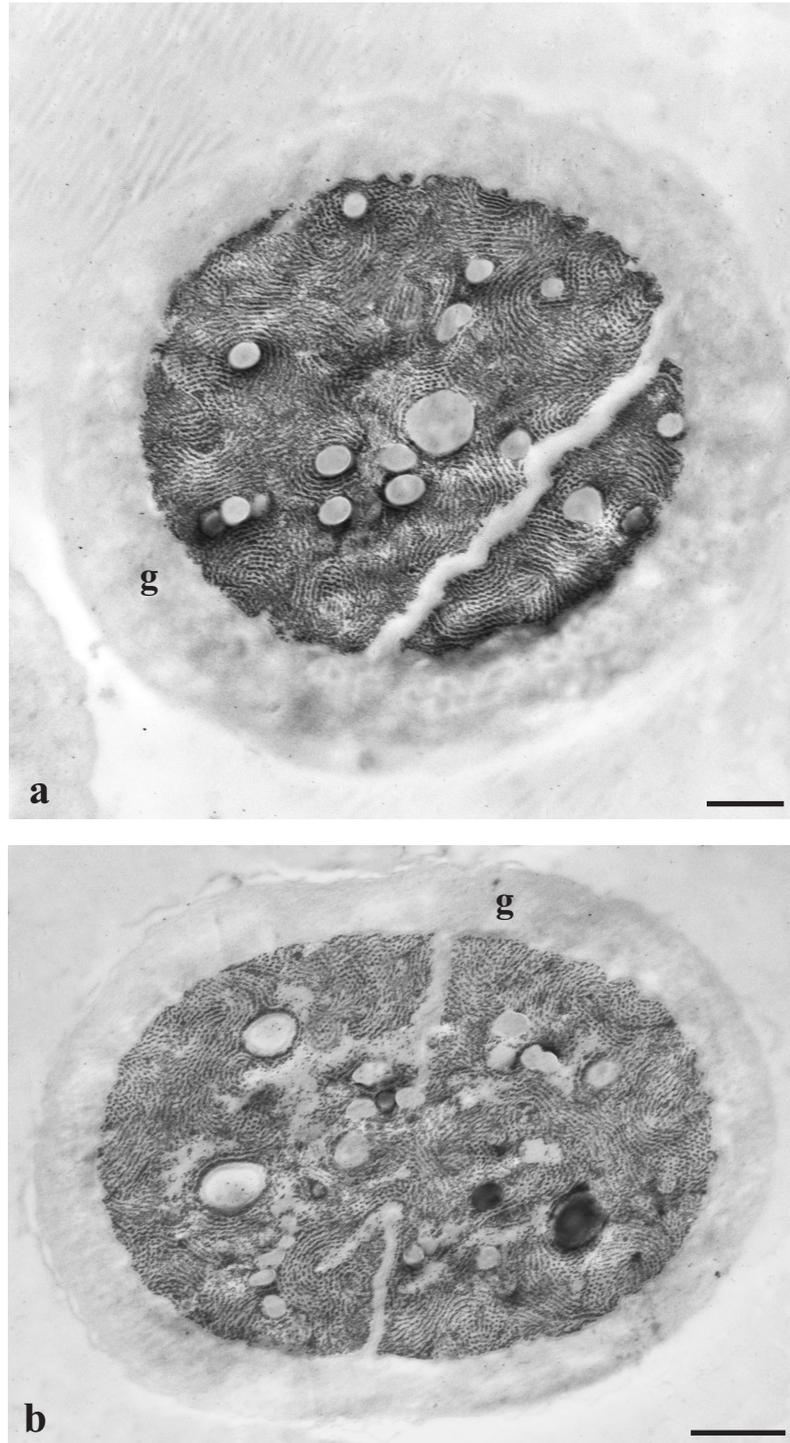


Figure 39a, b. Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione di cellule del cianobatterio ETS-10 sottoposte al test PATAg. È evidente la risposta negativa delle guaine extracellulari (g) e la presenza nel citoplasma di numerosi piccoli granuli di amido delle cianofitce positive al test. Barre = 1 μ m

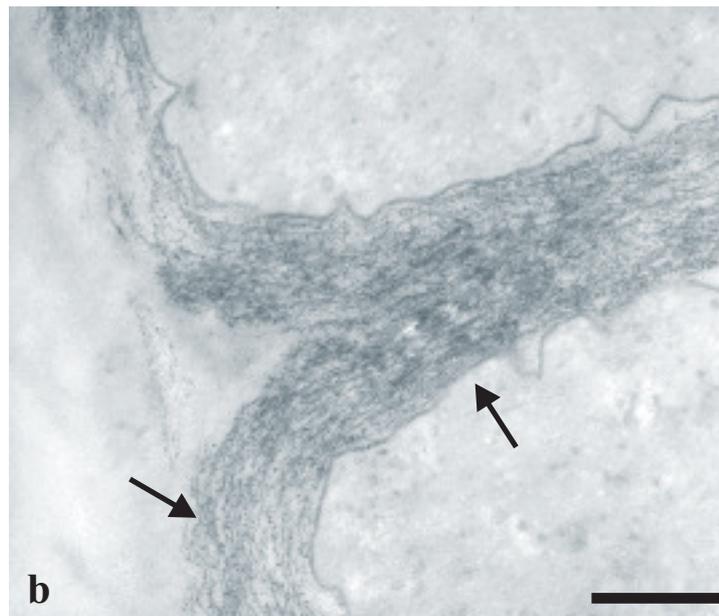


Figure 40a, b. Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione di cellule del cianobatterio ETS 10 sottoposte alla colorazione con acido fosfotungstico. È evidente la risposta positiva della guaina extracellulare.
b. Micrografia ad alto ingrandimento in cui si possono distinguere le sottili fibrille proteiche ad andamento parallelo (freccia).
Barre = 1 μ m

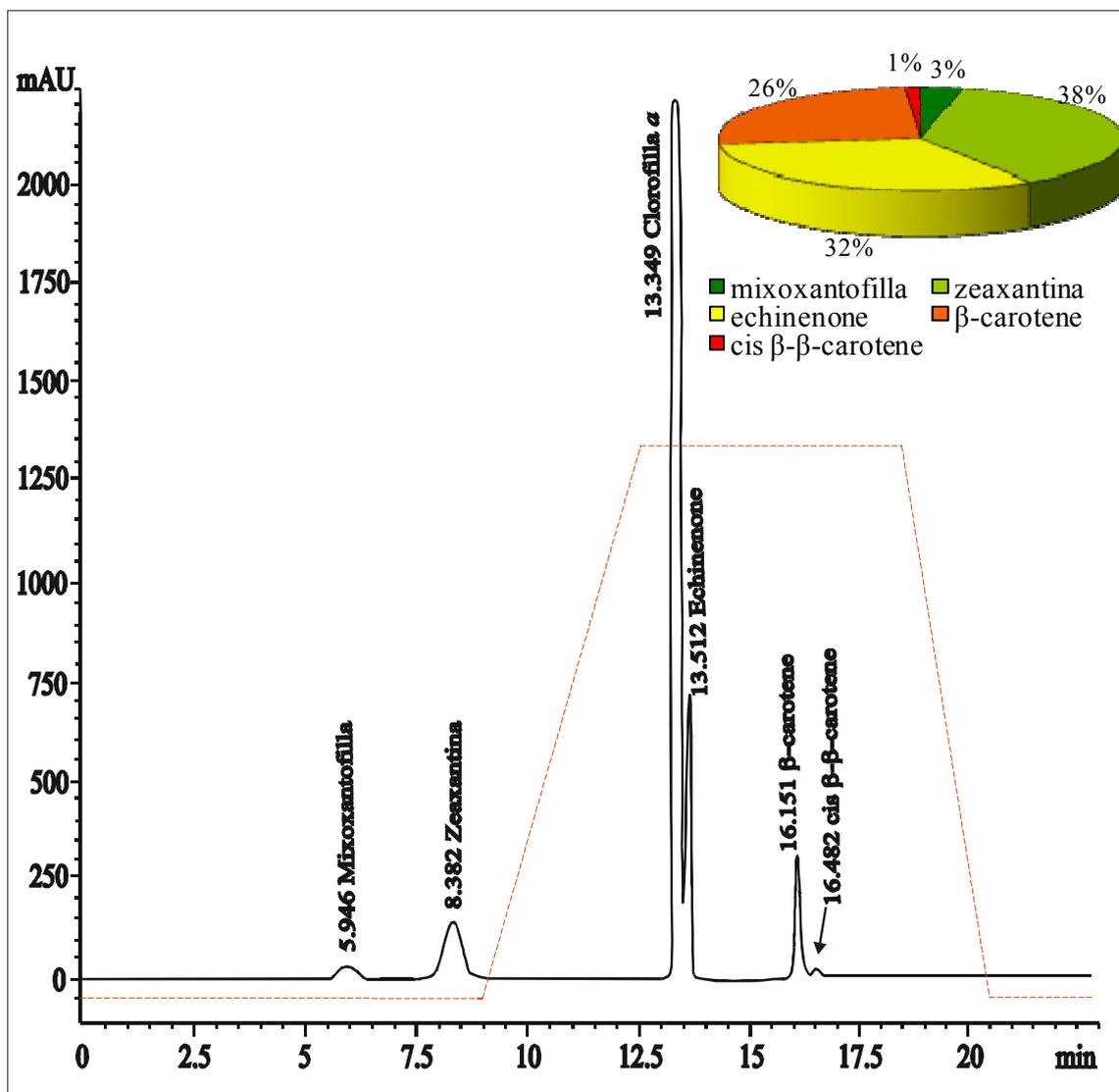


Figura 41. Cromatogramma ottenuto con HPLC dei pigmenti fotosintetici liposolubili del cianobatterio ETS-10. Notare il picco molto elevato della clorofilla *a* e, tra i carotenoidi, i picchi predominanti del β -carotene e della zeaxantina. Per ogni pigmento accanto al nome viene riportato il tempo di ritenzione. Nel riquadro sono presentati i rapporti percentuali delle diverse forme dei carotenoidi.

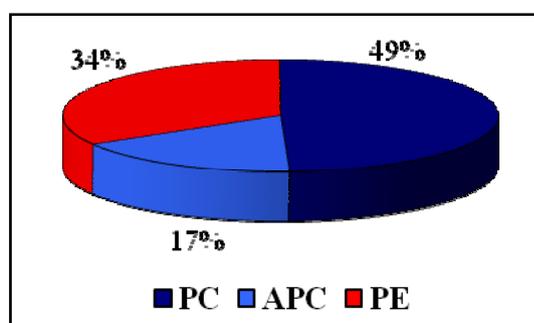


Figura 42. Rapporti percentuali delle ficobiliproteine presenti nei ficobilisomi del cianobatterio ETS-10.

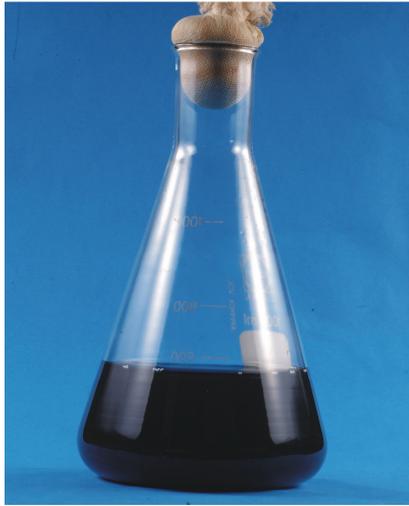


Figura 43. Beuta contenente la coltura ETS-10 cresciuta per due settimane in terreno BG11.

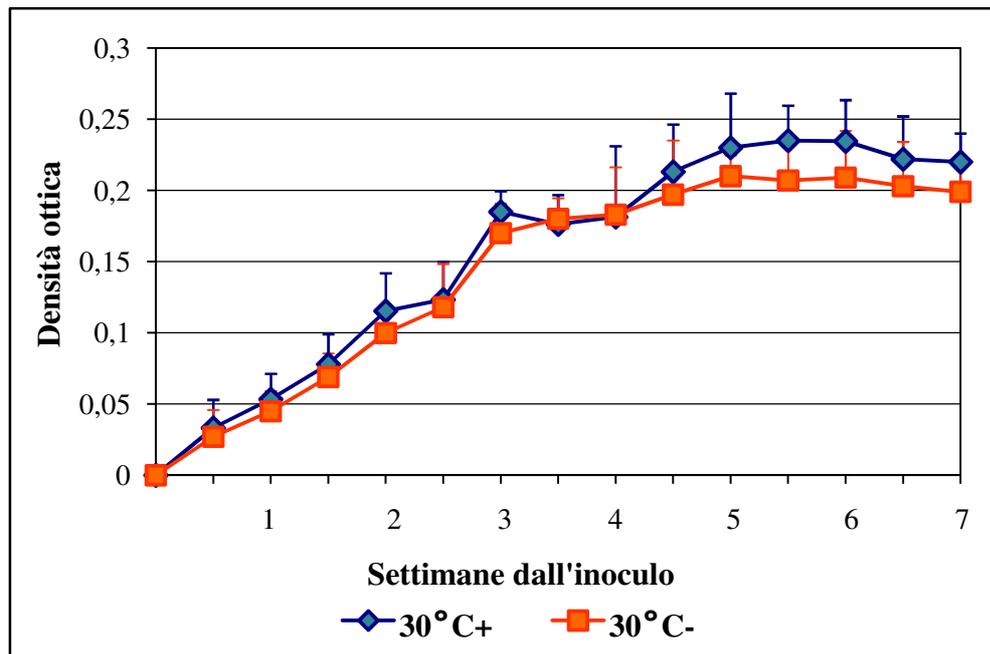


Figura 44. Curve di crescita delle colonie cianobatteriche di ETS-10 a 30°C in presenza (30°C+) o in assenza (30°C-) di NaNO₃.

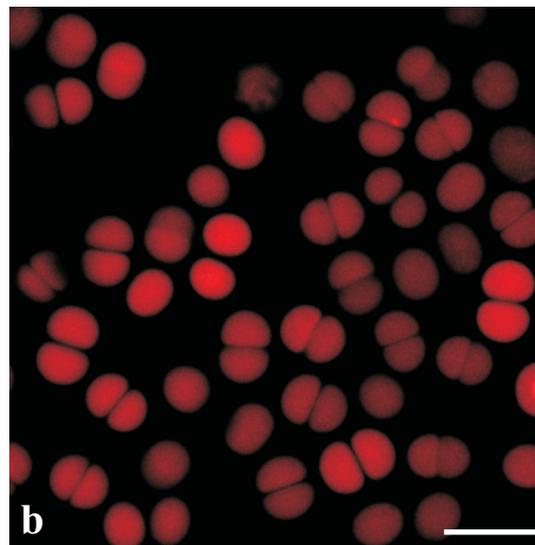


Figure 45 a, b. Immagini al microscopio ottico delle cellule di ETS-10 cresciute in assenza di nutrienti azotati.

A. Cellule del cianobatterio, visualizzate al microscopio ottico in luce visibile.

b. Cellule, osservate al microscopio a fluorescenza, dopo eccitazione con luce UV. L'autofluorescenza della clorofilla è omogeneamente distribuita.

Barre=20 μ m.

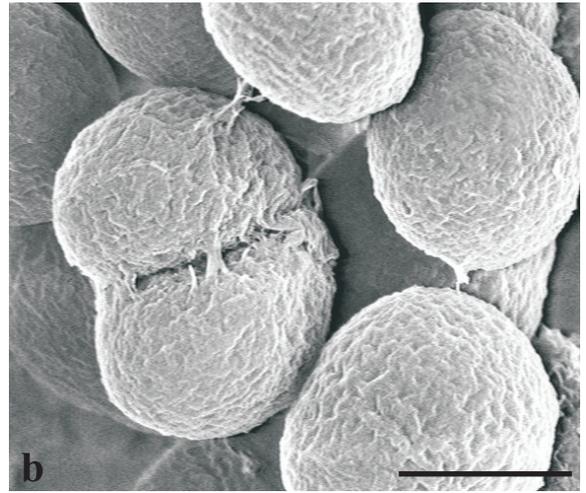
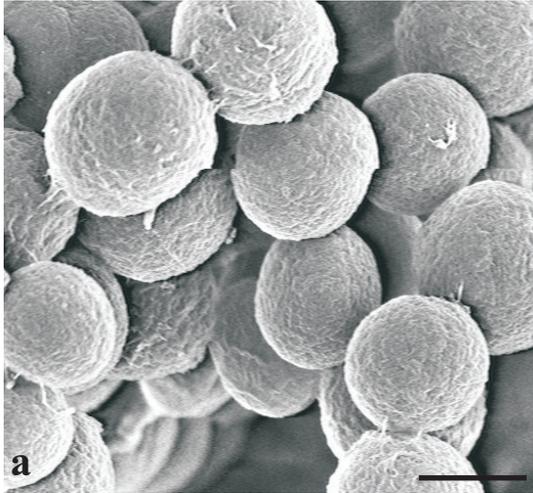


Figura 46a, b. Micrografie al microscopio elettronico a scansione di cellule di ETS-10 cresciute in terreno privo di nutrienti azotati. Le cellule hanno aspetto normale, ma dimensioni ridotte rispetto a quelle rifornite di NaNO_3 .
Barre = $5\mu\text{m}$

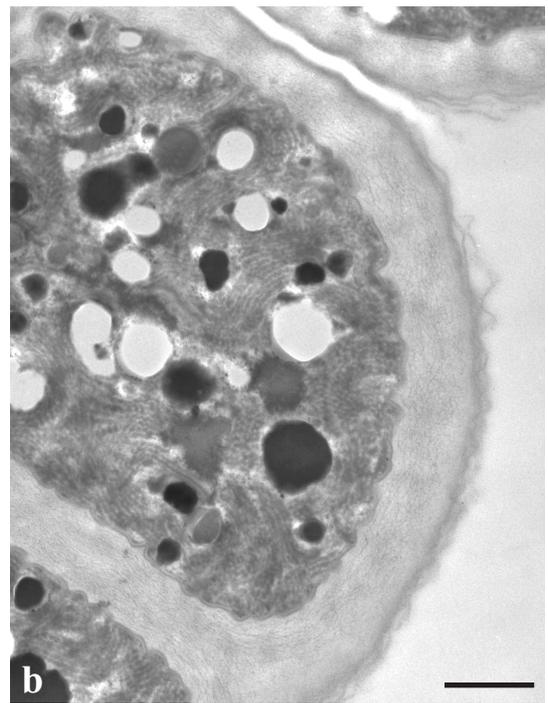
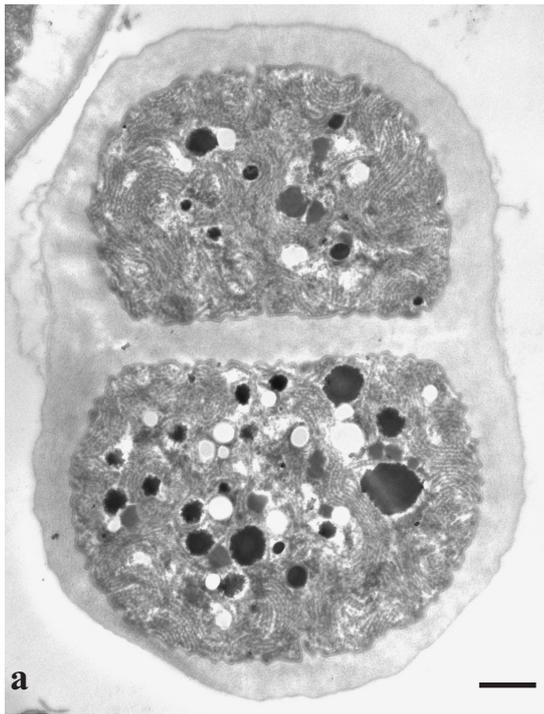


Figura 47a, b. Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione di cellule di ETS-10 cresciute in assenza di nutrienti azotati. Le immagini mostrano una regolare organizzazione cellulare.
Barre = $1\mu\text{m}$

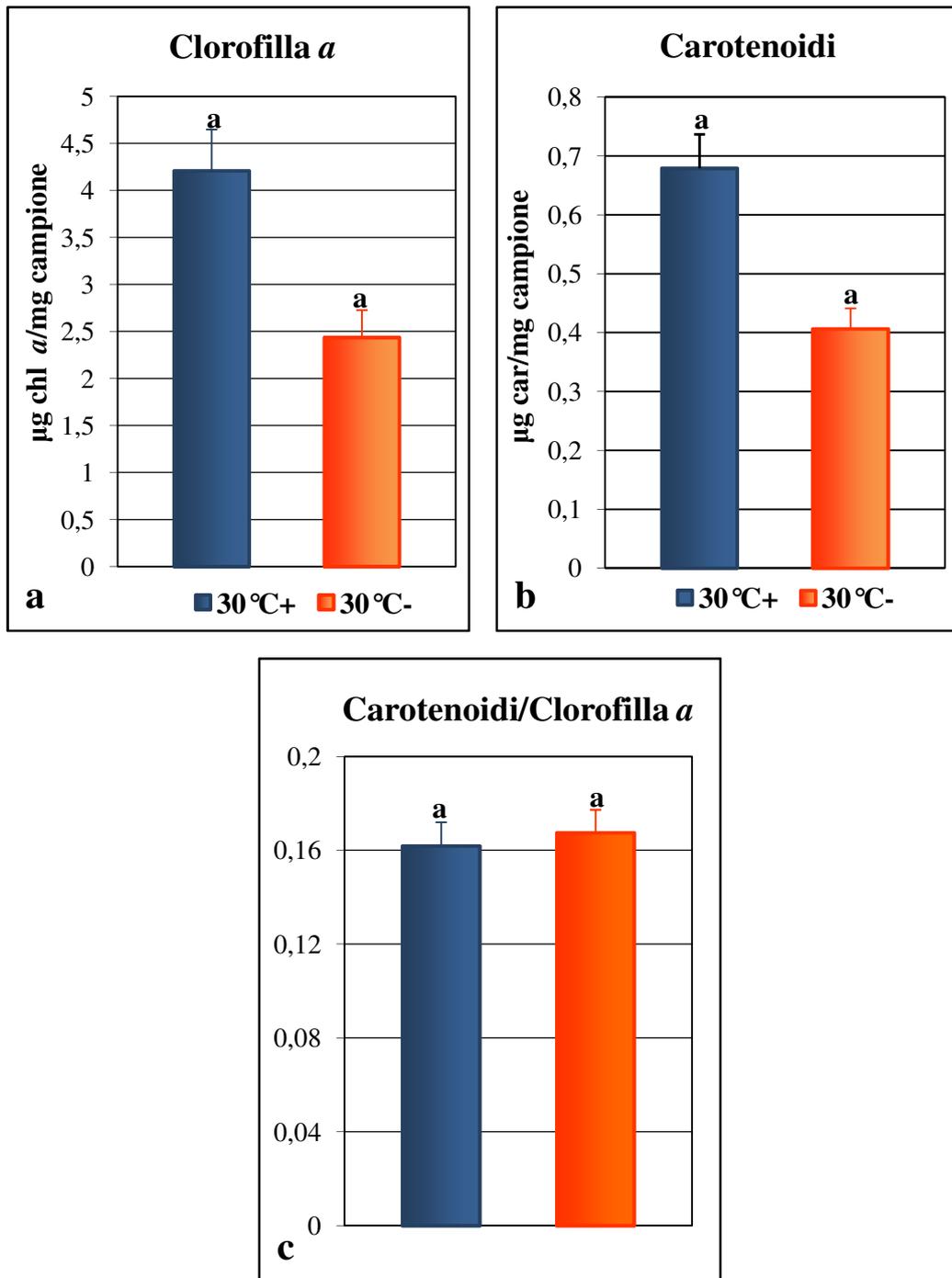
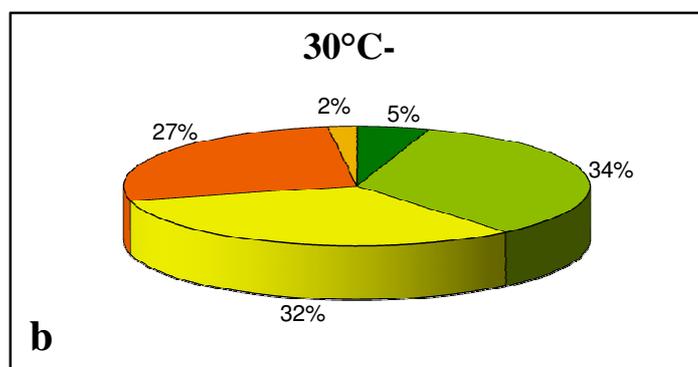
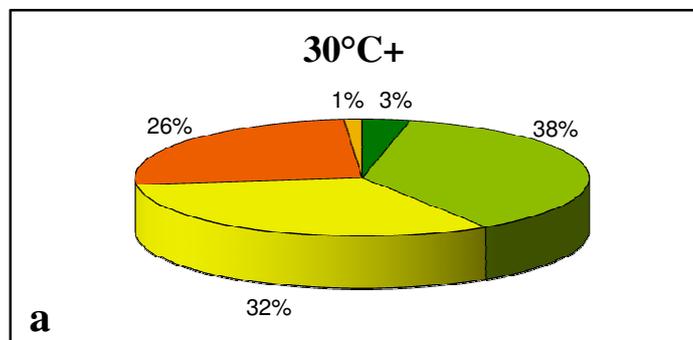


Figure 48a-c. Contenuti in pigmenti fotosintetici di colture cianobatteriche di ETS-10 in fase di crescita esponenziale cresciute a 30°C su terreno contenente nitrato (30°C+) o privo del nutriente azotato (30°C-).

a. Contenuti in clorofilla *a*.

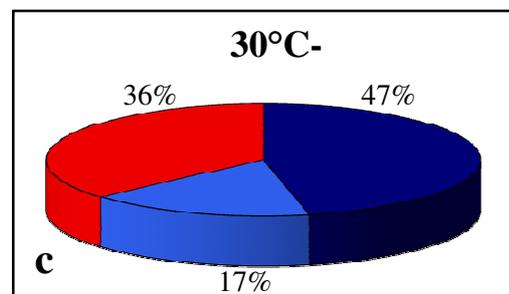
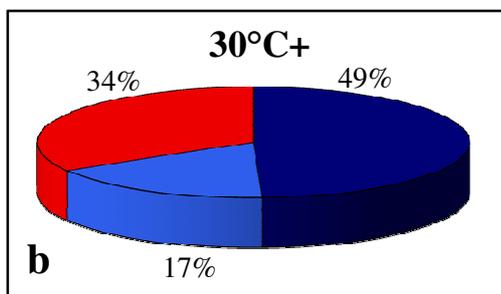
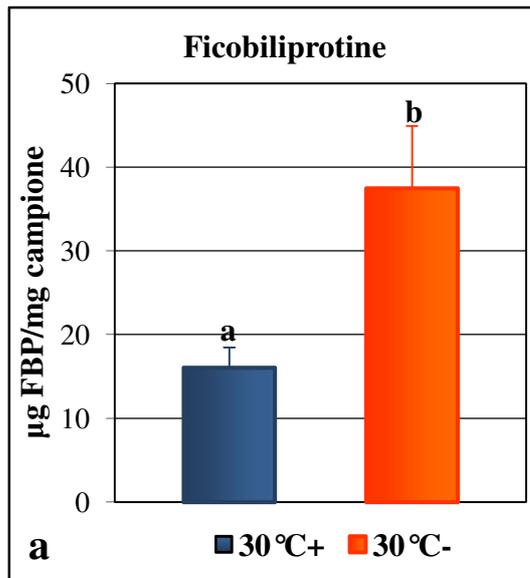
b. Contenuti in carotenoidi totali.

c. Rapporto carotenoidi/clorofilla *a*



■ mixoxantofilla ■ zeaxantina ■ echinenone
■ β -carotene ■ cis β - β -carotene

Figure 49a, b. Percentuali dei diversi carotenoidi presenti in colture cianobatteriche di ETS-10 in fase di crescita esponenziale cresciute a 30°C su terreno contenente nitrato (30°C+) o privo del nutriente azotato (30°C-).



■ PC ■ APC ■ PE

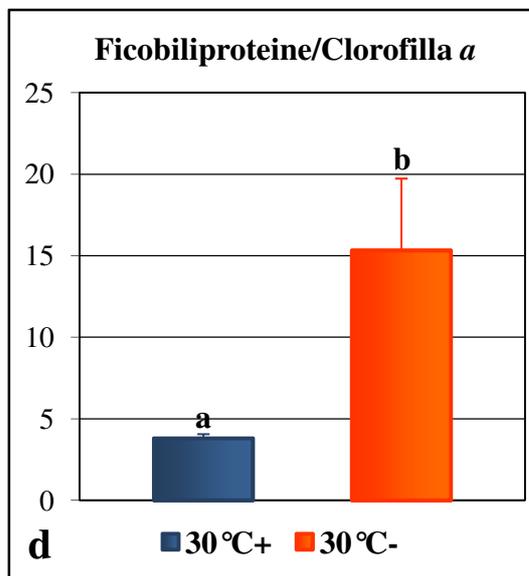


Figure 50 a-d. Contenuti in pigmenti fotosintetici di colture cianobatteriche di ETS-10 cresciute a 30°C in terreno rifornito (30°C+) o privo (30°C-) di nutrienti azotati. I valori sono in µg/mg di coltura.
 a. Contenuti in ficobiliproteine
 b,c. Rapporti percentuali delle ficobiliproteine
 d. Rapporto ficobiliproteine/clorofilla a

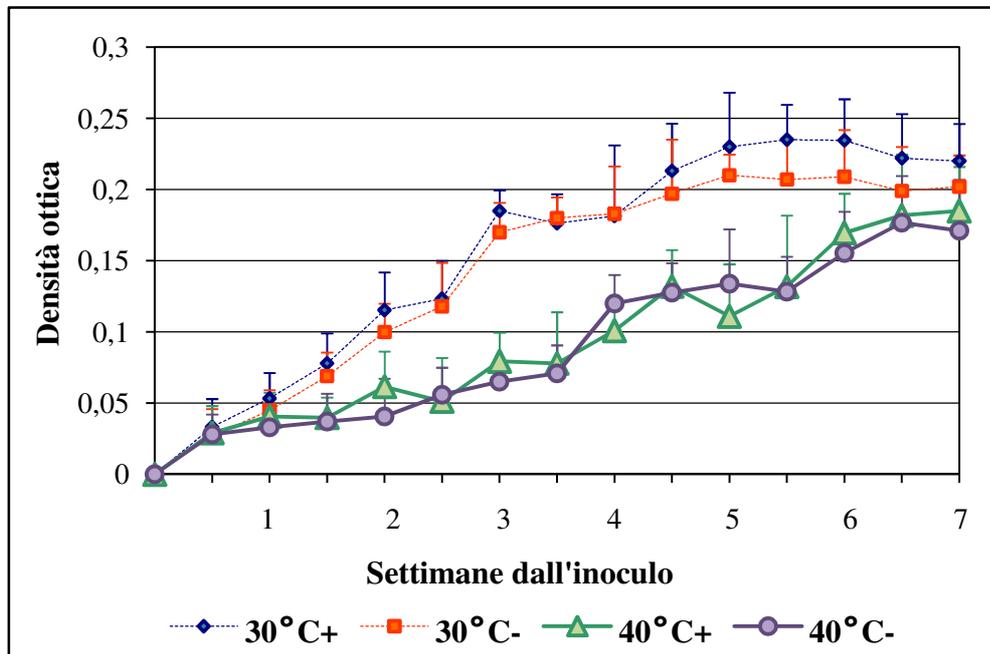


Figura 51. Curve di crescita delle colonie cianobatteriche di ETS-10 a 40°C in presenza o in assenza di NaNO₃, confrontate con quelle di colonie a 30°C.

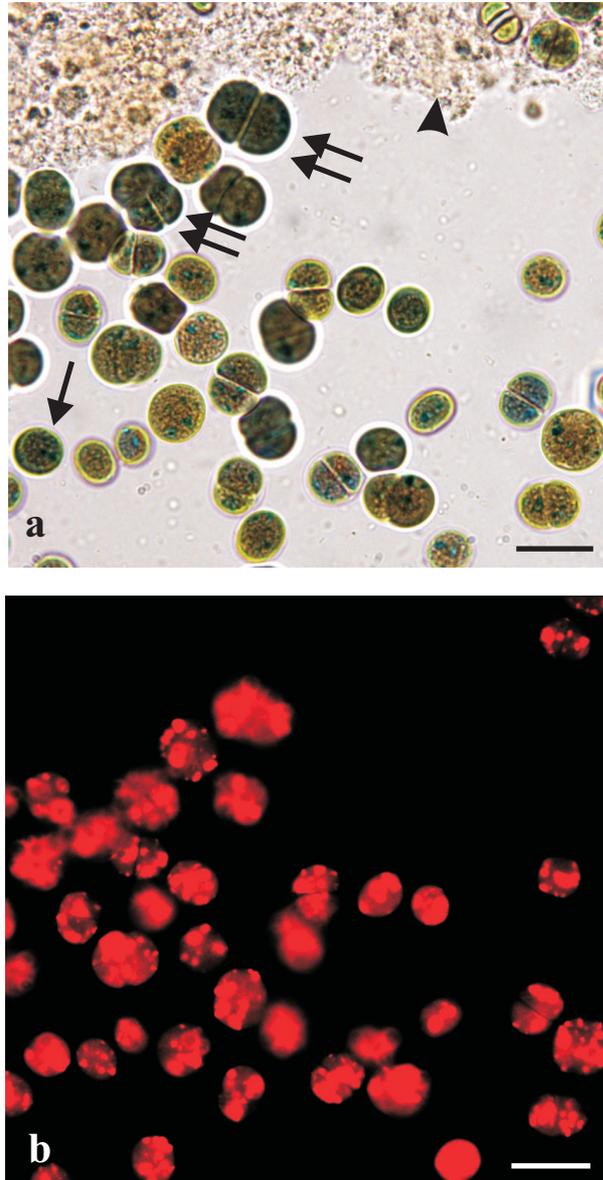


Figure 52 a, b. Immagini al microscopio ottico delle cellule del cianobatterio ETS-10 cresciuto a 40°C.

a. Cellule singole (freccia) o in divisione (doppia freccia) del cianobatterio visualizzate in luce visibile. Notare l'abbondante materiale extracellulare (punta di freccia).

B. Nelle cellule eccitate con luce UV l'autofluorescenza rossa della clorofilla è distribuita in modo meno regolare che a 30°C

Barre = 20 µm.

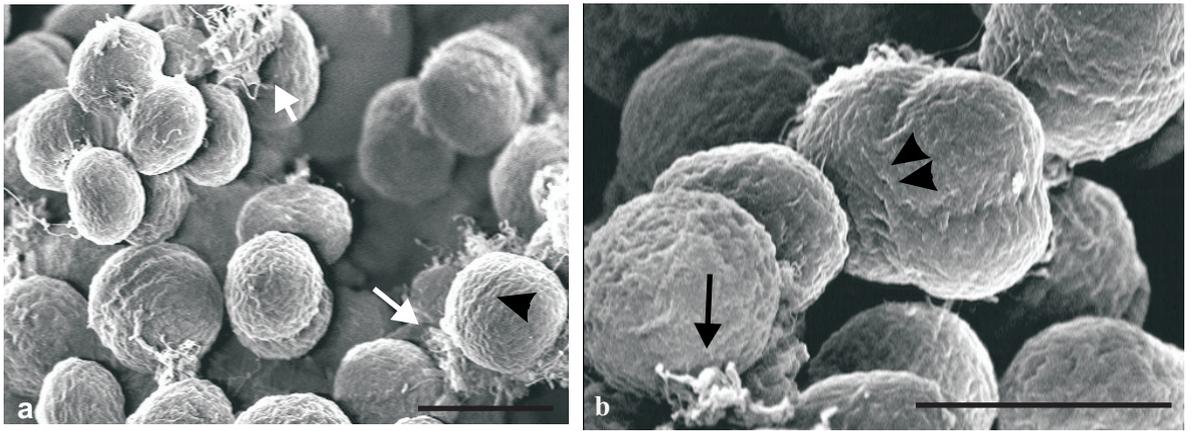


Figura 53a, b. Micrografie al microscopio elettronico a scansione di cellule del cianobatterio ETS-10 cresciute a 40°C.

Notare la superficie cellulare più corrugata e le masse di materiali extracellulari (freccie). Si distinguono piani di divisione a 2 (punta di freccia) o a 4 (doppia punta di freccia) cellule.

Barre = 10µm

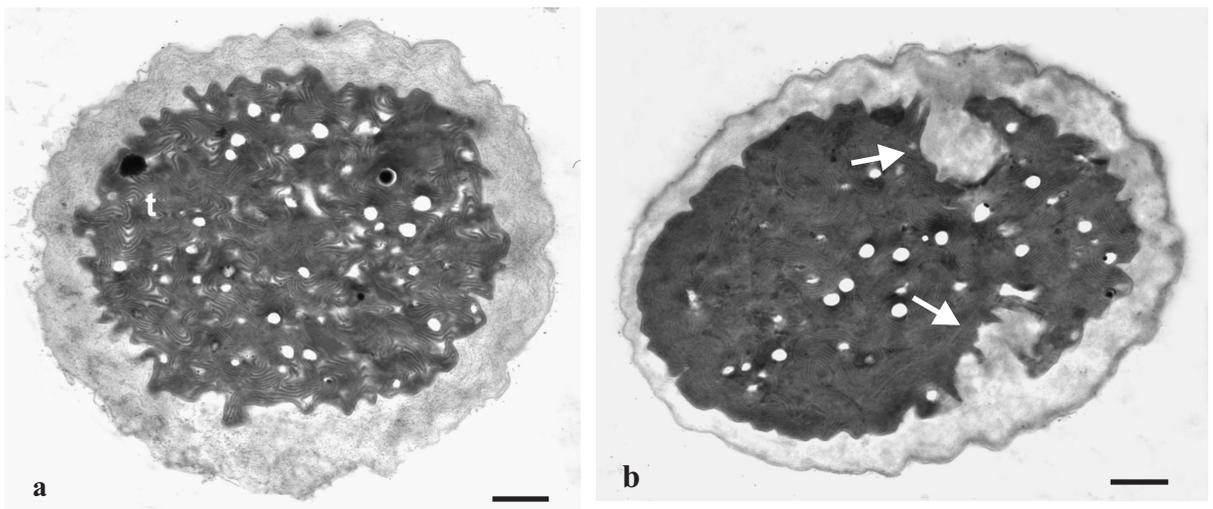


Figure 54 a, b. Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione di cellule di ETS-10 cresciute a 40°C.

a. Nel citoplasma molto elettrondenso si riconoscono i tilacoidi (t). Notare il profilo corrugato della cellula.

b. Nella cellula in divisione il setto divisorio (freccie) è molto irregolare.

Barre = 1µm

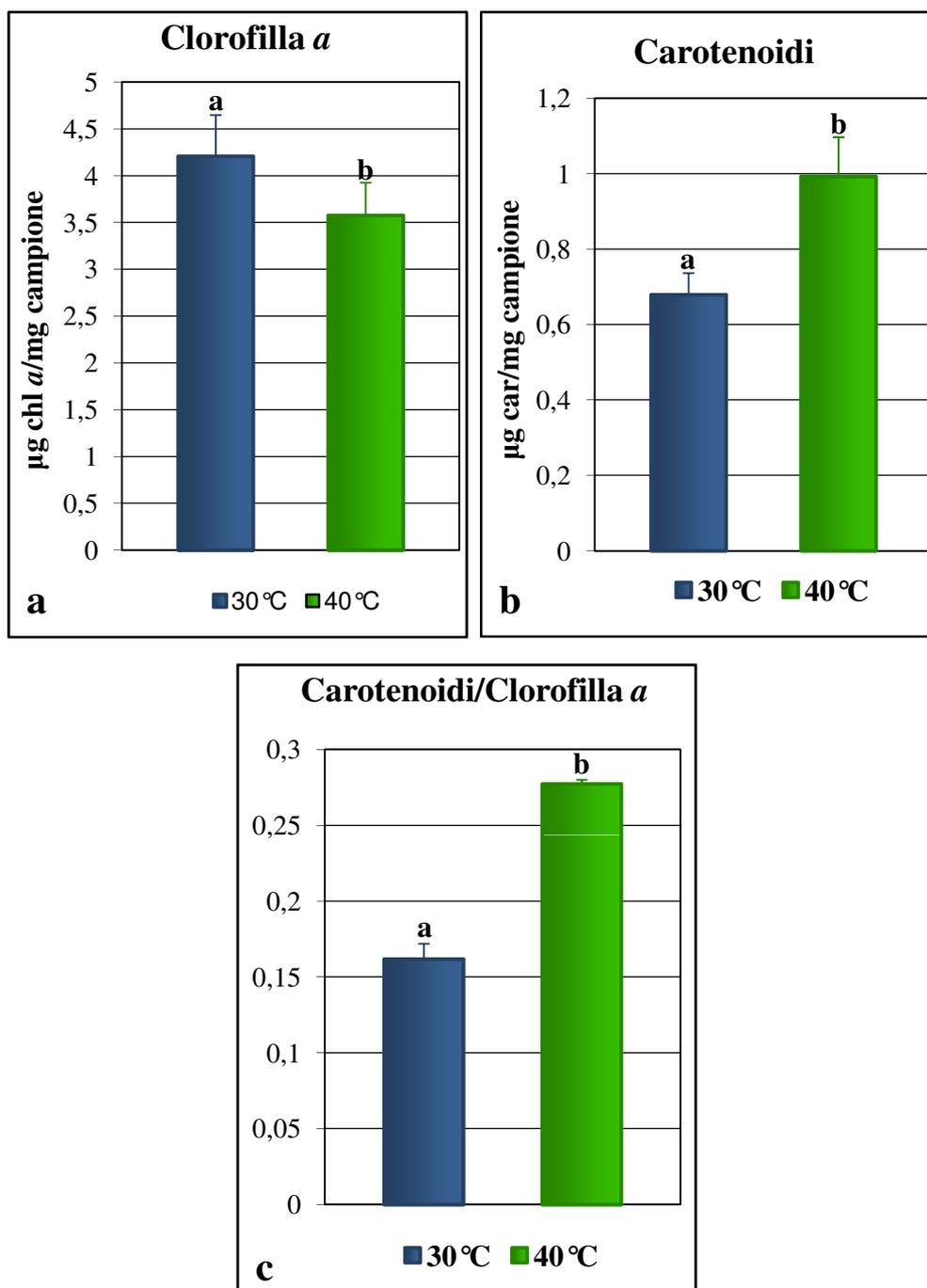
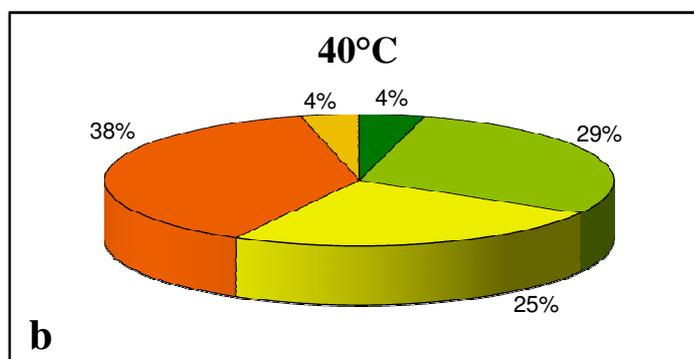
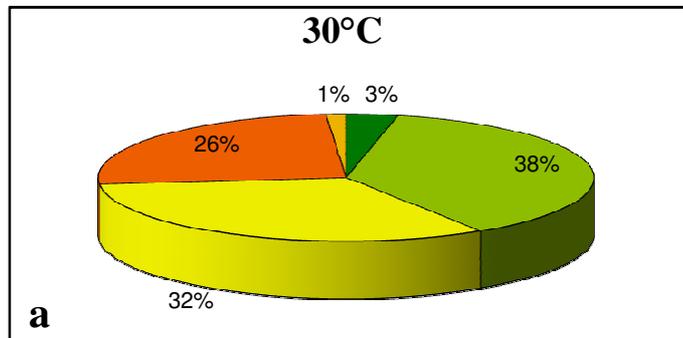


Figure 55a-c. Contenuti in pigmenti fotosintetici di colture cianobatteriche di ETS-10 in fase di crescita esponenziale cresciute a 30°C e a 40°C
a. Contenuti in clorofilla *a*.
b. Contenuti in carotenoidi totali.
c. Rapporto carotenoidi/clorofilla *a*



mixoxantofilla
 zeaxantina
 echinenone
 β-carotene
 cis β-β-carotene

Figure 56a, b. Percentuali dei diversi carotenoidi presenti in colture cianobatteriche di ETS-10 in fase di crescita esponenziale cresciute a 30°C e a 40°C.

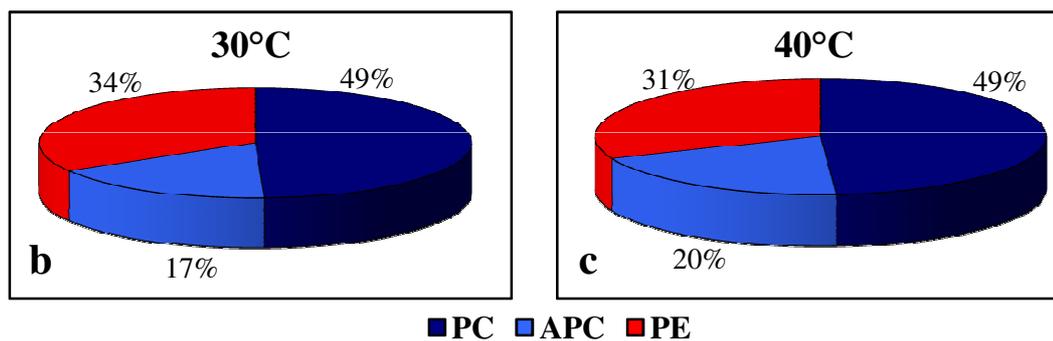
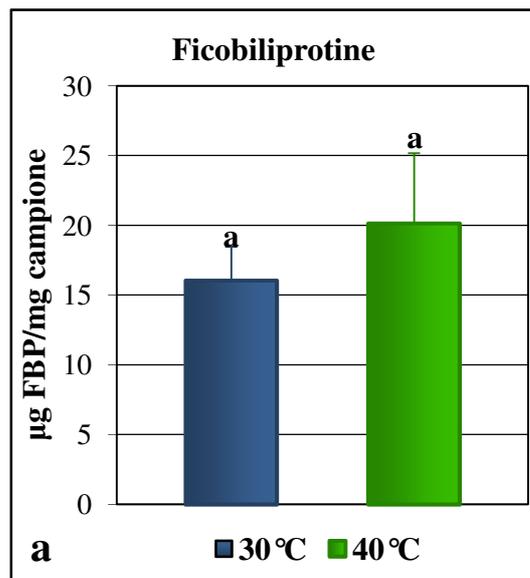


Figure 57 a-c. Contenuti in pigmenti fotosintetici di colture cianobatteriche di ETS-10 cresciute a 30°C e a 40°C. I valori sono in µg/mg di coltura.
 a. Contenuti in ficobiliproteine
 b,c. Rapporti percentuali delle ficobiliproteine

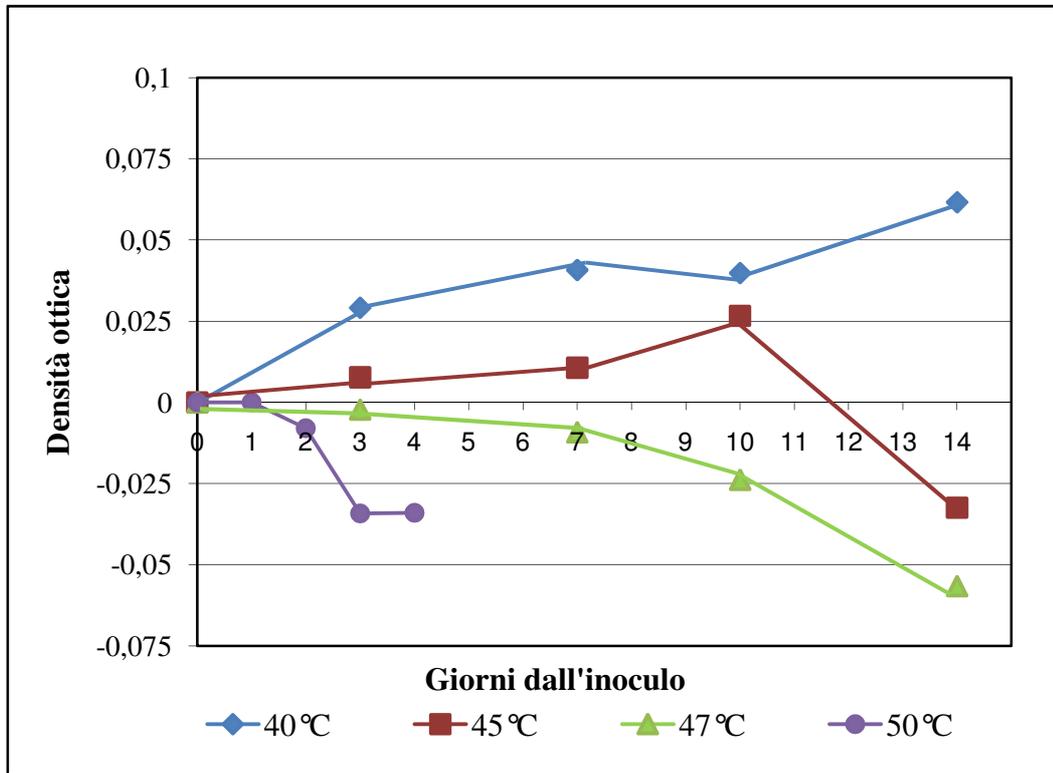


Figura 58. Curve di crescita delle colture di ETS-10 a diverse temperature.

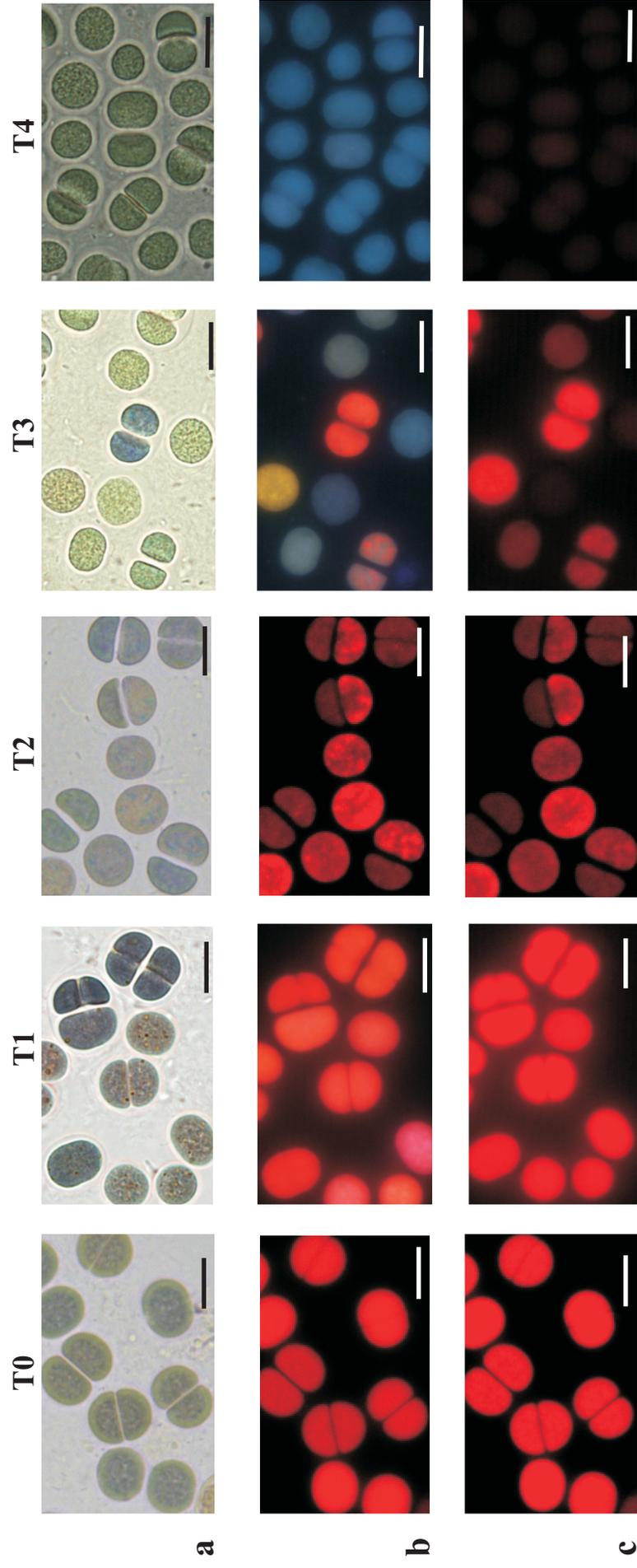


Figura 59. Immagini al microscopio ottico di cellule di ETS-10 cresciute a 30°C (T0) o esposte per giorni diversi (1=T1, 2=T2, 3=T3 e 4=T4) alla temperatura di 50°C.

a. micrografie in luce visibile.

b. micrografie che mostrano l'autofluorescenza rossa della clorofilla (dopo eccitazione con luce UV).

c. micrografie che mostrano l'autofluorescenza rossa delle ficobiliproteine (dopo eccitazione con luce verde).

Barre = 10 µm

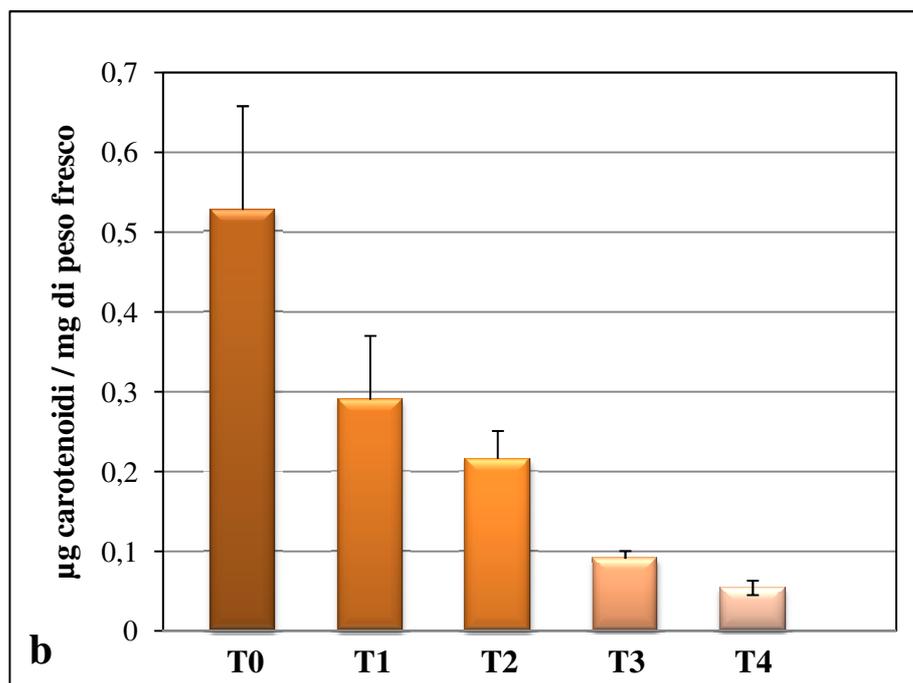
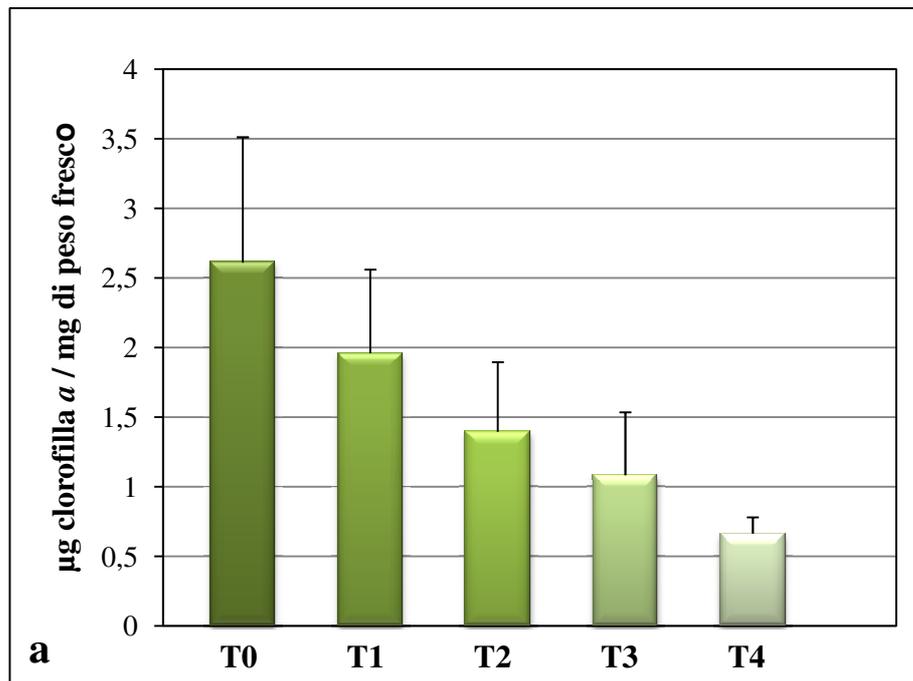


Fig. 60a, b. Contenuti in pigmenti fotosintetici di colture di ETS-10 cresciute a 30°C (T0) o esposte per giorni diversi (T1-T4) alla temperatura di 50°C. la quantità dei pigmenti è espressa in µg/mg di peso fresco.

a. Contenuti in Clorofilla *a*.

b. Contenuti in carotenoidi totali.

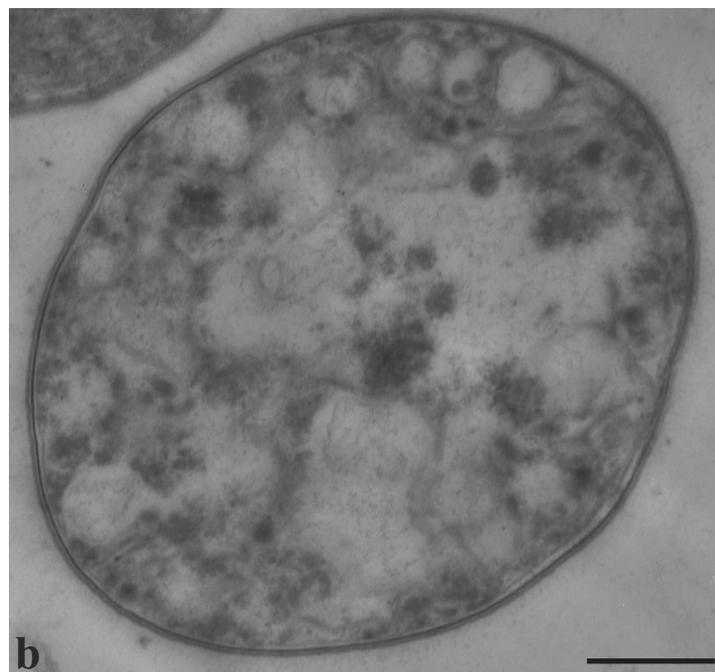
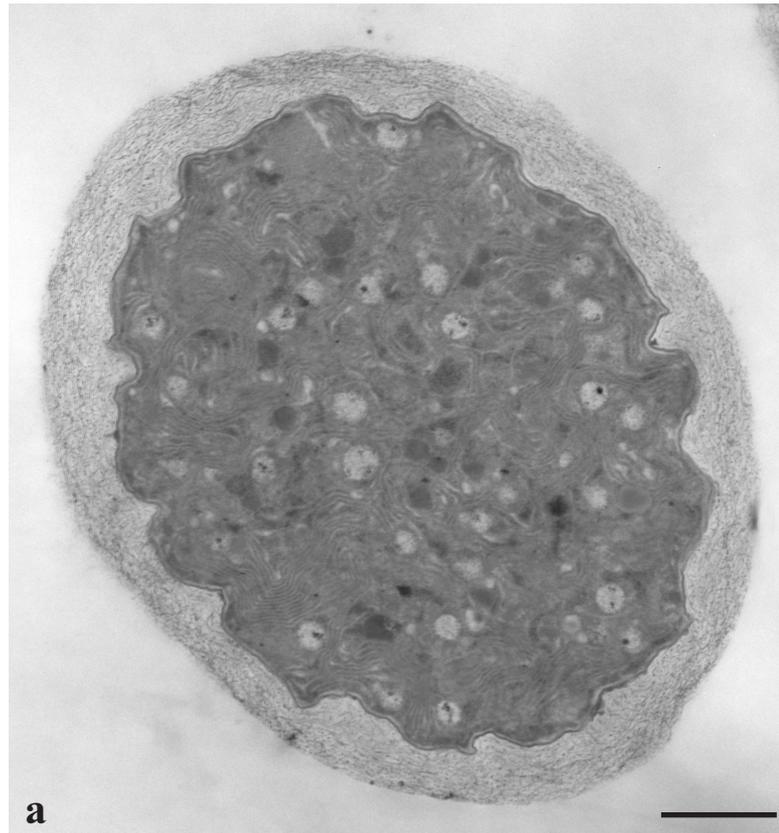


Figure 61a, b. Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione di cellule cianobatteriche di ETS-10.

a. Micrografia di cellula di ETS-10 esposta per un giorno alla temperatura di 50°C.

b. Micrografia di cellula di ETS-10 esposta per 4 giorni alla temperatura di 50°C.

Barre=1 μ m.



Fig. 62. Ricostruzione filogenetica basata sul gene 16S rDNA. L'organismo in esame è evidenziato in rosso. I ceppi acquistati come confronto sono indicati da un puntino rosso. I valori di BT maggiori o uguali al 50% sono riportati vicino al corrispondente nodo. Barra=nr di sostituzioni nucleotidiche/sito.

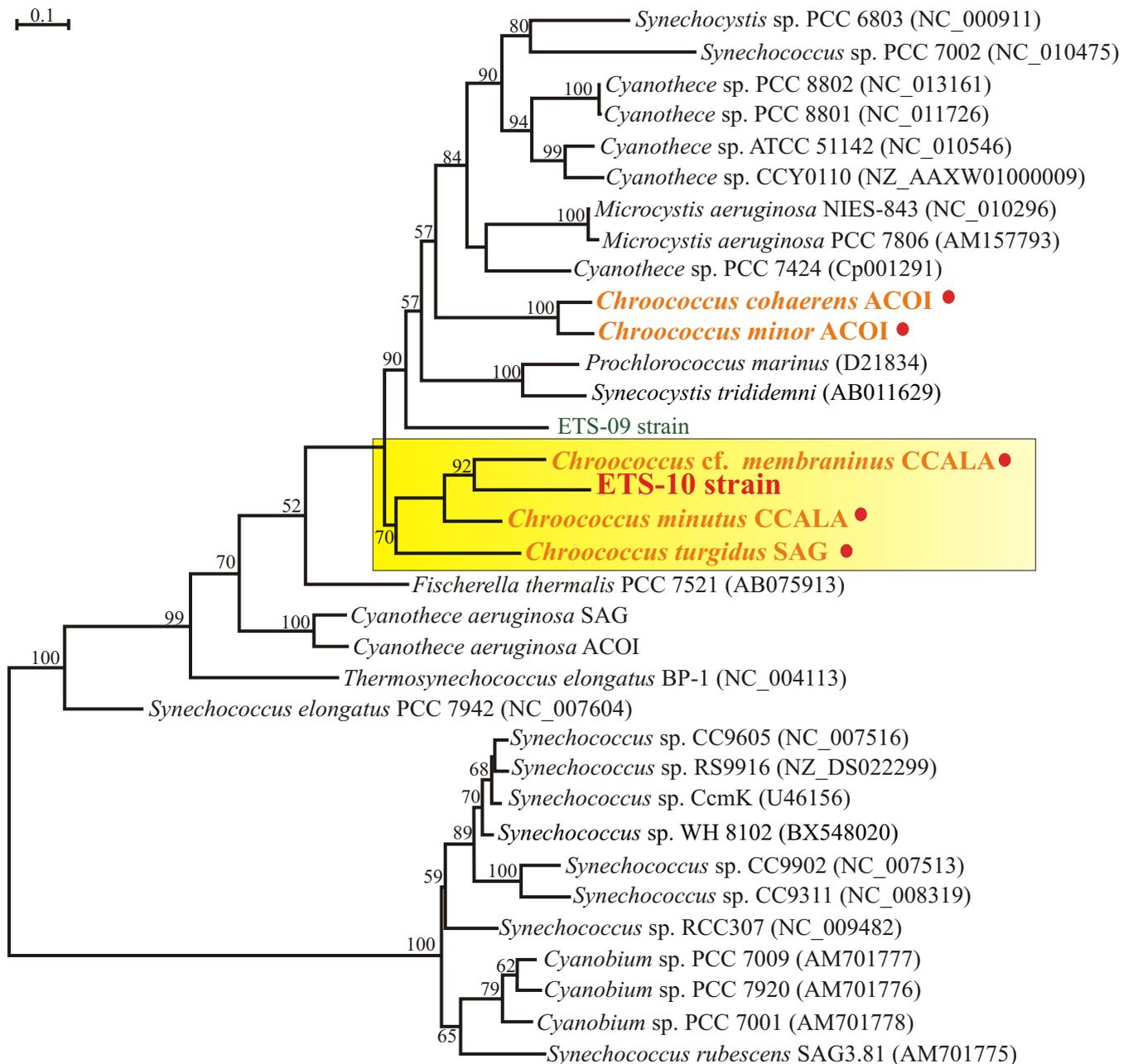


Fig. 63. Ricostruzione filogenetica basata sul gene *rbcL*. L'organismo in esame è evidenziato in rosso. I ceppi acquistati come confronto sono indicati da un puntino rosso. I valori di BT maggiori o uguali al 50% sono riportati vicino al corrispondente nodo. Barra=nr di sostituzioni nucleotidiche/sito.

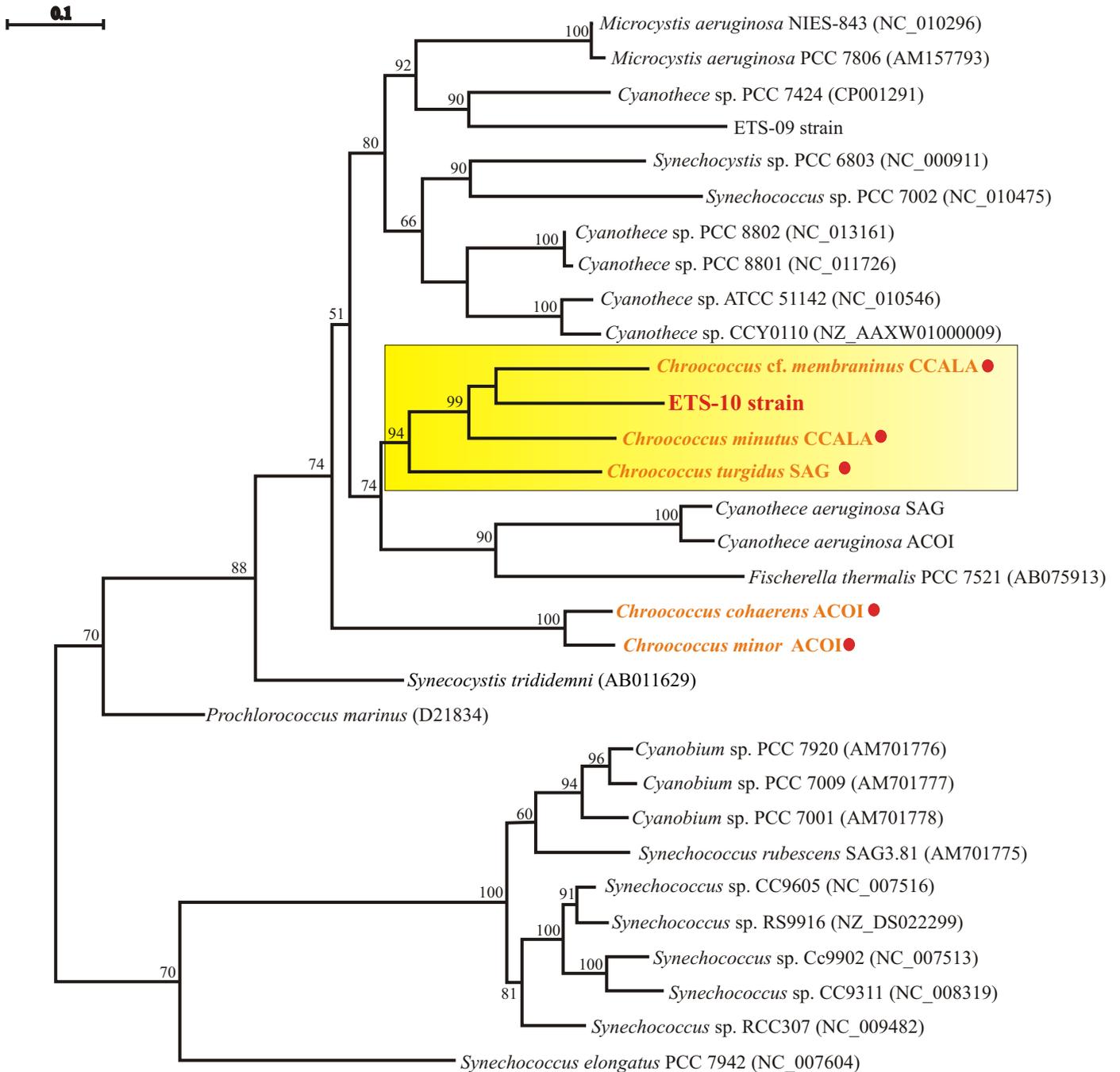


Fig. 64. Ricostruzione filogenetica basata sul *data set* 16S rDNA+rbcL. L'organismo in esame è evidenziato in rosso. I ceppi acquistati come confronto sono indicati da un puntino rosso. I valori di BT maggiori o uguali al 50% sono riportati vicino al corrispondente nodo. Barra=nr di sostituzioni nucleotidiche/sito.

BIBLIOGRAFIA

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. (1990).** “Basic Local Alignment Search Tool.” *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Anagnostidis K. and Komárek J. (1988).** “Modern approach to the classification system of *Cyanophytes. 3-Oscillatoriales.*” *Arch. Hydrobiol., Algol. Studies.* **50**: 327-472 .
- Andreoli C. and 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.
- Arieli B., Scheegurt M. A. and Sherman L. A. (1996).** “Potential contribution of the diazotrophic cyanobacterium, *Cyanothece* sp. strain 51142, to a bioregenerative life support system.” *Life Support Biosphere Sci.* **2**: 145-160.
- Ariño X., Ortega-Calvo J-J., Hernández-Mariné M. and Saiz-Jiménez C. (1995).** “Effect of sulphur starvation on the morphology and ultrastructure of the cyanobacterium *Gloethece* sp. PCC 6909.” *Arch. Microbiol.* **163**: 447-453.
- Balme A., Hervas M., Campos L.A., Sancho J., De la Rosa M. and Navarro A., (2001).** “A comparative study of the thermal stability of plastocyanin, cytochrome c(6) and photosystem I in the thermophilic and mesophilic cyanobacteria.” *Phytosynt. Res.* **70**: 281-289.
- Bennet A. and Bogorad L. (1973).** “Complementary chromatic adaptation in filamentous blue-green alga.” *J. Cell Biol.* **58**: 419-435.
- Bergman B., Gallon J. R., Rai A. N. and Stal L. J. (1997).** “N₂ fixation by non-heterocystous cyanobacteria.” *FEMS Microbiol. Rev.* **19**: 139-185.
- Biswal B. (1996).** “Chloroplasts, Pigments, and Molecular Responses of Photosynthesis under stress.” In: Handbook of Photosynthesis (Pessarakli M.ed.), *Marcel Dekker, Inc.*, New York, pp.877-885.
- Borowitzka M. A. (1988).** “Fats, oils and hydrocarbons.” In: Borowitzka M. A., Borowitzka L. J., (eds.), *Micro-Algal Biotechnology*, Cambridge University Press pp. 257-287.

Boyer S.L., Flechtner V.R. and Johansen J.R. (2001). “Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria.” *Mol. Biol. Evol.* **18**: 1057-1069.

Brayant D. A. (1995). “The molecular biology of cyanobacteria.” *Kluwer Academic Publishers* **1**: 559-579.

Buchanan B. B., Gruissem W. and Jones R. L. (2003). “Biochimica e biologia molecolare delle piante.” *Zanichelli ed., Bologna*, pp.522-575.

Cara C. (2005-2006). “Indagini morfologiche e molecolari su cianobatteri che colonizzano i fanghi termali del Comprensorio Euganeo.” Tesi di Laurea specialistica in Biotecnologie Industriali. Università di Padova, pp. 66.

Carmichael W.W. (1992). “Cyanobacteria secondary metabolites.” *J. Appl. Bacteriol.* **72**: 445-459.

Casamatta D.A., Johansen J.R., Vis M.L. and Broadwater S.T. (2005). “Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria).” *J. Phycol.* **41**: 421-438.

Castenholz R.W. (1968). “The behavior of *Oscillatoria terebriformis* in hot spring.” *J. Phycol.* **4**: 132-139.

Castresana J. (2000). “Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis”. *Mol. Biol. Evol.* **17**: 540-552

Cepák V. (1993). “Morphology of DNA containing structures (nucleoids) as a prospective character in Cyanophyte taxonomy.” *J. Phycol.* **29**: 844-852.

Cepák V. and Komárek J. (2010). “Cytomorphology of six halotolerant coccoid cyanobacteria using DAPI fluorescent and transmission electron microscopy, compared with molecular data.” *Fottea* **10**: 229-234.

Ceschi-Berrini, C., De Appolonia, F., Dalla Valle, L., Komárek, J. and Andreoli, C. (2004). “Morphological and molecular characterization of a thermophilic cyanobacterium (Oscillatoriales) from Euganean Thermal Springs (Padua, Italy).” *Arch. Hydrobiol., Algol. Stud.* **113**: 73-85.

Chorus I. (2001). “Cyanotoxins – Occurrence, causes, consequences.” Springer – Verlag Berlin Heidelberg New York, pp. 357.

Crayton M. A. (1982). “A comparative cytochemical study of Volvocacean matrix polysaccharides.” *J. Phycol.* **18**: 336-344.

Crosbie N.D., Pöckl M. and Weisse T. (2003). “Dispersal and Phylogenetic Diversity of Nonmarine Picocyanobacteria Inferred from 16S rRNA Gene and *cpcBA*-IntergenicSpacer Sequence Analyses.” *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5716-5721.

De Philippis R. and Vincenzini M. (1998). “Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications.” *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 151-175.

de Pinto M.C., Tommasi F. and 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.

Edgard R.C. (2004). “MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput.” *Nucleic Acids Res.* **32**: 1792-1797.

Edwards M.R., Hauer C., Stack R.F., Eisele L. E. and Maccoll R. (1997). “Thermophilic C-phycocyanin: Effect of temperature, monomer stability, and structure.” *Biochem.Biophys. Acta* **1321**: 157-164.

Falcón L. I., Lindvall S., Bauer K., Bergman B. and Carpenter E. J. (2004). “Ultrastructure of unicellular N₂ fixing Cyanobacteria from the tropical north Atlantic and subtropical north Pacific Oceans.” *J. Phycol.* **40**: 1074-1078.

Felsenstein J. (1985). “Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap.” *Evol.* **39**: 783-791.

Felsenstein J. (2003). “Inferring phylogenies. Sinauer, Sunderland, MA, USA 664 pp.”

Fields P.A. (2001). “Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility.” *Comp. Biochem. Physiol.* **129**: 417-431.

Flores E. and Herrero A. (1994). “Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation.” In: Bryant, D.A. *The molecular biology of cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp. 487-517.

Fry S.C. (1988). “The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis.” *Longman Scientific and Technical, Harlow.*

García-Pichel F., López-Cortés A. and Nübel U. (2001). “Phylogenetic and Morphological Diversity of Cyanobacteria in Soil Desert Crusts from the Colorado Plateau.” *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1902-1910.

Galzigna, L., Moretto, C. and Lalli, A. (1996). “Physical and biochemical change of thermal mud after maturation.” *Biomed. Pharmacother.* **50**: 306-308.

Galzigna L. and Bellometti S. (1999). “La maturation de la boue termale et sa mesure.” *Première partie. Presse termale et climatique* **1**: 23-26.

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. and Zilinskas B. (1976). “Further evidence for a phycobilisome model from selective dissociation, fluorescence emission, immunoprecipitation, and electron microscopy.” *Biochim. Biophys. Acta* **430**: 375-388.

Gasparini C. (2006-2007). “Risultati di uno studio sui cianobatteri colonizzanti i fanghi termali di alcuni hotel del Comprensorio Euganeo.” Tesi di Laurea di primo livello in Biologia. Università di Padova, pp. 16.

Gherardi F., Panichi C., Caliro S., Magro G. and Pennini M. (1999). “Water and gas geochemistry of the Euganean and Berician thermal district (Italy).” In: *Armannson H. (ed.), Applied Geochemistry* **15**: 455-474.

Gleason F.K. and Baxa C.A. (1986). “Activity of the natural algicide, cyanobacterin, on eukaryotic microorganisms.” *FEMS Microbiol. Lett.* **33**: 85-88.

Golden S. S., Ishiura M., Johnson C. H. and Kondo T. (1997). “Cyanobacteria circadian rhythms.” *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 327-354.

Gross E.M., Wolk C.P. and Jüttner F. (1991). “Fischerellin, a new allelochemical from freshwater cyanobacterium *Fischerella muscicola*.” *J. Phycol.* **27**: 686-692.

- Hagmann L. and 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.
- Haney P. J., Badger J. H., Buldak G. L., Reich C. I., Woese C. R. and Olsen G. J. (1999).** “Thermal adaptation analyzed by comparison of protein sequences from mesophilic and extremely thermophilic *Methanococcus* species.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 3578- 3583.
- Henson B.J., Watson L.E. and Barnum S.R. (2004).** “The Evolutionary History of Nitrogen Fixation, as Assessed by *NifD*.” *J. Mol. Evol.* **58**: 390-399.
- Hideg E. (1996).** Free Radical Production in Photosynthesis under stress Conditions. In: *Handbook of Photosynthesis* (Pessarakli M.ed.), *Marcel Dekker, Inc.*, New York, pp. 911 – 930.
- Hirano M., Satoh K. and Katoh S. (1980).** “Plastoquinone as a common link between photosynthesis and respiration in a blue-green alga.” *Photosynth. Res.* **1**: 149-162.
- Hirschberg J. and Clamovic D. (1994).** “Carotenoids in Cyanobacteria.” In: Bryant D. (ed.), *Advances in Photosynthesis: the Molecular Biology of Cyanobacteria*, *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, pp. 559-579.
- Hoffmann L. (2005).** “Nomenclature of Cyanophyta/Cyanobacteria: roundtable on the unification of the nomenclature under the Botanical and Bacteriological Codes.” *Algol. Stud.* **117**: 13-29.
- Hoffmann L., Komárek J. and Kaštovský J. (2005).** “System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) -state 2004.” *Algol. Stud.* **117**: 95-115.
- Inoue N., Emi T., Yamane Y., Kashino Y., Koike H. and Satoh K. (2000).** “Effects of high-temperature treatments on a thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus vulcanus*.” *Plant Cell Physiol.* **41**: 515-522.
- Ishida T., Yokota A. and Sugiyama J. (1997).** “Phylogenetic relationships of filamentous cyanobacterial taxa inferred from 16S rRNA sequence divergence.” *J. Gen. Appl. Microbiol.* **43**: 237-241.

Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C. and Wright S.W. (1997). "Data for the identification of 47 key phytoplankton pigments." In *Phytoplankton pigments in oceanography*. UNESCO Publishing (Eds.), Paris, pp. 449-553.

Komárek J. and Anagnostidis K. (1999). "Süßwasserflora von Mitteleuropa. Cyanoprokaryota." 1 Teil: Chroococcales. *Gustav Fischer Verlag Jena, Stoccarda*, 548 pp.

Komárek J. and Anagnostidis K. (2005). "Cyanoprokaryota. 2. Oscillatoriales." In: Süßwasserflora von Mitteleuropa (Büdel *et al.* Eds), Elsevier, 759 pp.

Komárek J. and Cepák V. (1998). "Cytomorphological characters supporting the taxonomic validity of *Cyanothece* (Cyanoprokaryota)." *Plants Syst. Evol.*, **210**: 25-39.

Komárek J., Kopecký J. and Cepák V. (1999). "Generic characters of the simplest cyanoprokaryotes *Cyanobium*, *Cyanobacterium* and *Synechococcus*." *Cryptogamie: Algol.* **20**: 209-222.

Komárková J., Jezberová J., Komárek O. and Zapomělová E. (2010). "Variability of *Chroococcus* (Cyanobacteria) morphospecies with regard to phylogenetic relationship." *Hydrobiologia* **639**: 69-83

Kromkamp J. (1987). "Formation and functional significance of storage products in Cyanobacteria." *N.Z. J. Mar. Freshwat. Res* **21**: 457-465.

Lakatos M., Bilger W. and Büdel B. (2001). "Carotenoid composition of terrestrial Cyanobacteria: response to natural light conditions in open rock habitats in Venezuela." *Eur. J. Phycol.* **36**: 367-375.

Leòn C., Kumazama S. and Mitsui A. (1986). "Cyclic appearance of aerobic nitrogenase activity during synchronous growth of unicellular cyanobacteria." *Curr. Microbiol.* **13**: 149-153.

Liberton M., Berg R. H., Henser J., Roth R. and Pakrasi H. B. (2006). "Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803." *Protoplasma* **227**: 129-138.

MacColl R. 1998. "Cyanobacterial phycobilisomes." *J. Struct. Biol.* **124**: 311-334.

Marcon A. (2004-2005). “Indagini morfologiche e molecolari su cianobatteri dei fanghi termali del Comprensorio Euganeo.” Tesi di Laurea di primo livello in Biologia. Università di Padova, pp.16.

Margheri M. C., Ventura S., Kaštosky J. and Komárek J. (2008). “The taxonomic validation of the cyanobacterial genus *Halothece*.” *Phycologia* **47**: 477-486.

Marquardt J. and Palinska K.A. (2007). “Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria assigned to the genus *Phormidium* (Oscillatoriales) from different habitats and geographical sites.” *Arch. Microbiol.* **187**: 397-413.

Martins L. O., Huber R., Huber H., Stetter K. O., Da Costa M. S. and Santos H. (1997). “Organic solutes in hyperthermophilic Archea.” *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 896- 902.

Mauseth J.D. (2006). “Botanica e Biodiversità” II edizione, Idelson-Gnocchi pp.126-135

Mc Cully M. E. (1970). “The histological localization of the structural polysaccharides of Seaweeds.” *Ann. N. Y. Academy Sci.* **175**: 702-711.

Miller S.R. and Castenholz R.W. (2000). “Evolution of thermotolerance in hot spring Cyanobacteria of the genus *Synechococcus*.” *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4222-4229.

Mitsui A., Kumazama S., Takahashi A., Ikemoto H., Cao S. and Arai T. (1986). “Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically.” *Nature* **323**: 720-722.

Miyake M., Erata M. and Asada Y. (1996). “A thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19, capable of accumulating poly- β -hydroxybutyrate.” *J. Ferment Bioeng.* **82**: 512-514.

Moran R. and Porath D. (1980). “Chlorophyll determination in intact tissue using N,N'-dimethylformamide.” *Plant Physiol.* **77**: 483-485.

Moreno J., Rodriguez H., Vargas M. A., Rivas J. and Guerrero M. G. (1995). “Nitrogen-fixing cyanobacteria as source of phycobiliprotein pigments. Composition and growth performance of the filamentous heterocystous strains.” *J. Appl. Phycol.* **7**: 17-23.

Moro, I., Di Bella, M., Rascio, N., La Rocca, N., Andreoli, C. (2007a). “*Conferva duplisecta* Pollini: rediscovery in Euganean Thermal Springs (Italy) and new assignment to the *Oscillatoria* genus.” *Caryologia* **60**: 133-136.

Moro I., Rascio N., La Rocca N., Di Bella M. and Andreoli C. (2007b). “*Cyanobacterium aponinum*, a new Cyanoprokaryote from the microbial mat of Euganean thermal springs (Padua, Italy).” *Algol. Stud.* **123**: 1-15.

Moro, I., Rascio, N., La Rocca, N., Sciuto, K., Albertano, P., Bruno, L., Andreoli, C. (2010). Polyphasic characterization of a thermo-tolerant filamentous cyanobacterium isolated from the Euganean thermal muds (Padova, Italy). *Eur. J. Phycol.* **45**: 143-154.

Mynderse J.S., Moore R.E., Kashiwagi M. and Morton T.R. (1977). “Antileukemic activity in the Oscillatoriaceae: isolation of debromoaplisiatoxin from *Lyngbya*.” *Science* **196**: 538-540.

Neilan B.A., Jacobs D., Deldot T., Blackall L., Hawkins P.R., Cox P.T. and Goodmann A. (1997). “rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and non-toxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*.” *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 693-697.

Nishiyama Y., Los D.A. and 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.

Nübel U., Garcia-Pichel F. and Muyzer G. (1997). “PCR Primers To Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria.” *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3327-3332.

Novotny A. M. and Forman N. (1975). “The composition and development of cell walls of fucus embryos.” *Planta* **122**: 67-78.

Nozaki H. (2005). “A new scenario of plastid evolution: plastid primary endosymbiosis before the divergence of “Plantae”.” *J. Plant Res.* **118**(4): 247-255.

Ohki K., Kamiya M., Honda D., Kumazawa S. and Ki Ho K. (2008). “Morphological and phylogenetic studies on unicellular cyanobacteria (cyanophytes) isolated from the coastal waters around Singapore.” *J. Phycol.*, **44**: 142-151.

Pasqua G., Abbate G. and Forini C. (2008). “Botanica generale e Diversità Vegetale.” Piccin, Padova pp.319-329.

Piccoli G., Bellati R., Binotti C., Di Lallo E., Sedeo 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. and 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.

Porta D., Rippka R. and Hernandez-Mariné M. (2000). “Unusual ultrastructural features in three strains of *Cyanothece* (cyanobacteria).” *Arch. Microbiol.*, **173**: 154-163.

Posada D. and Crandall K.A. (1998). “Modeltest: testing the model of DNA substitution.” *Bioinformatics* **14**: 817-818.

Pupillo P., Cervone F., Cresti M. and Rascio N. (2003). “Biologia Vegetale.” Zanichelli, Bologna. pp. 20-22.

Rascio N. and La Rocca N. (2008). “Biological Nitrogen Fixation.” *In: Encyclopedia of Ecology, (ed.), Jorgensen S. E., Elsevier B. V.*

Raven S.A. and Geider R.J. (2003). Adaptation, Acclimation and Regulation in Algal photosynthesis. *In: Advances in Photosynthesis and Respiration. Photosynthesis in Algae. (Larkum. A.W.D., Douglas S.E.and Raven J.A.eds.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 385- 412.*

Reddy K. J., Haskell J. B., Sherman D. M. and Sherman L. A. (1993). “Unicellular, aerobic nitrogen-fixing cyanobacteria of the genus *Cyanothece*.” *J. Bacteriol.* **175**: 1284-1292.

Reysenbach, A.-L., Giver, L.J., Wickham, G.S. and Pace, N.R. (1992). “Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction.” *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3417-3418.

Rippka R. (1988). "Isolation and Purification of Cyanobacteria." *Methods Enzymol.* **167**: 3-27.

Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M. and Stanier R.Y. (1979). "Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria." *J. Gen. Microbiol.* **111**: 1-61.

Rippka R. and Waterbury J. B. (1977). "The synthesis of nitrogenase by non-heterocystous cyanobacteria." *FEMS Microbiol. Lett.* **2**: 83-86.

Sakamoto T. and Brayant D.A. (1998). "Growth at low temperature causes nitrogen limitation in cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002." *Arch. Microbiol.* **169**: 10-19.

Samsonoff W.A. and MacColl R. (2001). "Biliproteins and phycobilisomes from cyanobacteria and red algae at the extremes of habitat." *Arch. Microbiol.* **176**: 400-405.

Sato N. (2002). "Comparative analysis of the genomes of cyanobacteria and plants." *Genome Informatics* **13**: 173-182.

Schneegurt M. A., Sherman D. M., Nayar S. and Sherman L. A. (1994). "Oscillating behaviour of carbohydrate granule formation and dinitrogen fixation in the cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142." *J. Bacteriol.* **176**: 586-597.

Schneegurt M. A., Sherman D. M. and Sherman L. A. (1997). "Composition of the carbohydrate granules of the cyanobacterium, *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142." *Arch. Microbiol.* **167**: 89-98

Scott W.E. (1991). "Occurrence and significance of toxic cyanobacteria in southern Africa." *Water Sci. Technol.* **23**: 175-180.

Silverman L. and Glick D. (1969). "The reactivity and staining of tissue proteins with phosphotungstic acid." *J. Cell Biol.* **40**: 761-767.

Spiller H. and Shanmugan K. T. (1987). "Physiological conditions for nitrogen fixation in a unicellular marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. strain SF1." *J. Bacteriol.* **169**: 379-384.

Stal L. J. (1992). "Poly(hydroxyalkanoate) in cyanobacteria: an overview." *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 169-180.

Stal L. J., Albertano P., Bergman B., von Brockel K., Gallone J.R., Hayes P.K., Sivonen K. and 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.

Stamatakis C. and Papageorgiou G. C. (1993). “Stabilization of photosystem II particles isolated from the thermophilic cyanobacterium *Phormidium laminosus*.” *Biocim. Biophys ACTA* **1183**: 333-338.

Takaichi S., Mochimaru M., Maoka T. and Katoh H. (2005). “Myxol and 4-Ketomyxol 2'-Fucosides, not Rhamnosides, from *Anabaena* sp. PCC 7120 and *Nostoc punctiforme* PCC 73102, and Proposal for the Biosynthetic Pathway of Carotenoids.” *Plant Cell. Physiol.* **46**: 497-504.

Suzuki, M.T. and Giovannoni, S.J. (1996). “Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR.” *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 625-630.

Tamagnini P., Axelsson R., Lindberg P., Oxelfelt F., Wünschiers R. and Lindblad P. (2002). „Hydrogenases and Hydrogen Metabolism of Cyanobacteria.” *Microb. Mol. Biol. Rev.* **66**: 1-20.

Tamaru Y., Takani Y., Yoshida T. and Sakamoto T. (2005). “Crucial Role of Extracellular Polysaccharides in Desiccation and Freezing Tolerance in the Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc commune*.” *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7327-7333.

Tandeau de Marsac N. and Cohen-Bazire G. (1977). “Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 1635-1639.

Thièry J. P. (1967). “Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique.” *J. Microsc.* **6**: 987-1018.

Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J. (1994). “Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.” *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.

Tolomio C., Ceschi Berrini C., De Appollonia F., Galzigna L., Masiero L., Moro I. and 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. and Ceschi Berrini C. (2004). “Thermophilic microalgae growth on different substrates and at different temperatures in experimental tanks in Abano Terme (Italy).” *Arch. Hydrobiol./Suppl. Algol. Stud.* **111**: 145-157.

Tomitani A., Knoll A.H., Cavanaugh C.M. and Ohno T. (2006). “The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular–phylogenetic and paleontological perspectives.” *PNAS* **103**: 5442-5447.

Tornabene T. G., Holzer G., Lien S. and Burris N. (1983). “Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*.” *Enzym. Microbiol. Technol.* **5**: 435-440.

Trevisan V. (1870). “Catalogo delle alghe viventi nelle Terme Euganee.” *Atti Ist. Ven. Sc. Lett. Arti*, **16**: 2062-2087.

Van den Hoek C., Mann D.G. and Jahns H.M. (1995). “Algae. An introduction to phycology.” Cambridge University Press, Cambridge. 627 pp.

Waterbury J. B. and Willey J. M. (1988). “Isolation and growth of marine planktonic cyanobacteria.” *Methods Enzymol.* **167**: 100-105.

Whitmarsh J. and Govindjee J.A. (1995). The photosynthetic process *Encyclopedia of Applied Physics* **13**: 513-532.

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.

Wolk C.P. (1973). “Physiology and Cytological Chemistry of Blue-Green Algae.” *Bacteriol. Rev.* **37**: 32-101.

Woese C.R. (1987). “Bacterial evolution.” *Microbiol. Rev.* **51**: 232-245.

Young A.J., Orset S. and Tsavolas A. J. (1997). “Carotenoids in higher plant photosynthesis.” In: *Handbook of Photosynthesis*. (Pessaraki Ed.), Martin Dekker, Inc, New York, pp. 575-596.