



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in
Biologia Marina

Risposta fisiologica di microalghe marine alla limitazione da
zolfo

Physiological response of marine microalgae to sulfur limitation

Tesi di Laurea Magistrale di:

Relatore: Chiar.mo Prof. Alessandra Norici

Maria Bruno

Correlatore: Dott. Caterina Gerotto

Sessione: Maggio

Anno Accademico: 2019/2020

Ai miei genitori.

Sommario

1	Introduzione	10
1.1	Passato e presente:	10
	il ruolo della disponibilità di Zolfo nell'evoluzione delle microalghe.....	10
1.2	Il metabolismo dello zolfo	13
1.3	Descrizione delle specie sperimentali	17
1.3.1	<i>Tetraselmis suecica</i>	17
1.3.2	<i>Dunaliella salina</i>	18
1.3.3	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	19
1.3.4	Criterio di scelta delle specie sperimentali.....	20
1.4	Fotosintesi.....	20
1.5	Fotoprotezione e fotoinibizione.....	25
2	Materiali e metodi	27
2.1	Colture microalgali	27
2.1.1	<i>Mezzo di coltura</i>	27
2.1.2	<i>Condizioni di crescita</i>	29
2.2	Quantificazione di carbonio e azoto	31
2.3	Fluorescenza a raggi X a riflessione totale (TXRF).....	32
2.4	Quantificazione dei pigmenti	33

2.5	Quantificazione delle proteine.....	34
2.6	FTIR (<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>).....	38
2.7	Analisi <i>in vivo</i> dell'efficienza fotosintetica: Dual-PAM-100 (Parametri fotosintetici da fluorescenza variabile modulata).....	39
2.8	Estratti di proteine totali e elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE)	43
3	Risultati	48
3.1	Crescita algale	48
3.2	Tasso massimo di crescita	51
3.3	Biomassa e quantificazione di carbonio e azoto cellulare	53
3.4	Quantificazione dello zolfo.....	56
3.5	Analisi dei pigmenti	58
3.6	Quantificazione delle proteine.....	59
3.7	Spettroscopia FTIR, rapporti delle macromolecole.....	61
3.8	Efficienza fotosintetica	65
3.9	Estratti proteici totali	70
4	Discussione e conclusione	73

Indice delle figure

Figura 1-1: Concentrazione di solfato durante le diverse ere geologiche	12
Figura 1-2: Pathway enzimatico per la produzione di cisteina a partire dal solfuro	15
Figura 1-3: <i>Tetraselmis suecica</i>	17
Figura 1-4: <i>Dunaliella salina</i>	19
Figura 1-5: <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	19
Figura 1-6: Trasferimento di energia luminosa in un PS	22
Figura 1-7: Catena fotosintetica di trasporto di elettroni e successivo utilizzo dei prodotti delle reazioni alla luce e al buio (Ciclo di Calvin).....	24
Figura 3-1: Immagine delle colture e curve di crescita della microalga <i>Tetraselmis suecica</i> i.....	49
Figura 3-2: Immagine delle colture e curve di crescita della microalga <i>Dunaliella salina</i>	49
Figura 3-3: Immagine delle colture e delle curve di crescita di <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	51
Figura 3-4: Tasso di crescita massimo (μ_{max}) di <i>Tetraselmis suecica</i> , <i>Dunaliella salina</i> e <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	52
Figura 3-5: Peso secco cellulare (pg/cell) di <i>Tetraselmis suecica</i> , <i>Dunaliella salina</i> e <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	53
Figura 3-6: Composizione cellulare di <i>Tetraselmis suecica</i> del quantitativo di azoto, carbonio e del loro rapporto.....	54
Figura 3-7: Composizione cellulare di <i>Dunaliella salina</i> del quantitativo di azoto, carbonio e del loro rapporto.....	54
Figura 3-8: Composizione cellulare di <i>Phaeodactylum tricornutum</i> del quantitativo di azoto, carbonio e del loro rapporto	55
Figura 3-9: Quantificazione dello zolfo (pg/cell) in <i>Tetraselmis suecica</i> , <i>Dunaliella salina</i> e <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	56
Figura 3-10: Quantificazione delle proteine espresse come pg/cell in <i>Tetraselmis suecica</i> , <i>Dunaliella salina</i> e <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	60

Figura 3-11: Rapporti tra le macromolecole in <i>Tetraselmis suecica</i> , <i>Dunaliella salina</i> e <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	62
Figura 3-12: Semiquantificazione di carboidrati e lipidi e normalizzazione dei dati di proteine in <i>Tetraselmis suecica</i> , <i>Dunaliella salina</i> e <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	64
Figura 3-13: Valori di Fv/Fm in <i>Tetraselmis suecica</i> , <i>Dunaliella salina</i> e <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	66
Figura 3-14: Valori dei parametri Y(II), NPQ e Y(I) in <i>Tetraselmis suecica</i>	67
Figura 3-15: Valori dei parametri Y(II), NPQ e Y(I) in <i>Dunaliella salina</i>	68
Figura 3-16: Valori dei parametri Y(II), NPQ in <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	69
Figura 3-17: Estratti proteici di <i>Tetraselmis suecica</i> , <i>Dunaliella salina</i> e <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	71

Indice delle tabelle

Tabella 2-1: Ricetta del mezzo Artificial Multipurpose COmplement for the Nutrition of Algae (AMCONA), derivante dal protocollo interno al laboratorio.....	27
Tabella 2-2: Metal stock II per il mezzo AMCONA Ø ZOLFO.....	29
Tabella 2-3: Soluzioni necessarie alla quantificazione delle proteine (Waterborg & Matthews, 1994)	36
Tabella 2-4: Retta standard.	36
Tabella 2-5: Tabella che mostra lo spettro di assorbimento FTIR per il pool di macromolecole di interesse (Giordano et al., 2001).	40
Tabella 2-6: Parametri necessari alla comprensione complessiva della cinetica luminosa.....	41
Tabella 2-7: Soluzioni utilizzate per la preparazione del gel di poliacrilammide	44
Tabella 2-8: Risultato dell'estrazione di proteine totali espresso in µg/µL	45
Tabella 3-1: Valori derivanti dal rapporto carbonio/zolfo in condizione di controllo (CTR) e in limitazione di solfato (LS) per tutte le specie.....	57
Tabella 3-2:Contenuto di clorofilla in <i>Tetraselmis suecica</i> , <i>Dunaliella salina</i> e <i>Phaeodactylum tricornutum</i> in condizioni di controllo e nelle varie concentrazioni limitanti di zolfo.....	58

Riassunto

Lo zolfo è uno dei macronutrienti essenziali per gli organismi fitoplanctonici, poiché è alla base di molte delle molecole che li costituiscono. Proprio per tale ragione, la “Sulfate Facilitation Hypothesis” (SHF) ipotizza che l’incremento dello zolfo sottoforma di solfato in oceano abbia avuto un ruolo importante nella radiazione fitoplanctonica. Sulla base di ciò, sono state selezionate tre microalghe comparse in diversi momenti della storia evolutiva, quali *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina* e *Phaeodactylum tricornerutum*, e sono state acclimatate in presenza e carenza di solfato. Il tasso massimo di crescita è maggiore a concentrazioni di solfato tipiche degli oceani attuali (condizione di controllo, CTR) rispetto al tasso mostrato a concentrazioni basse di solfato (condizione di limitazione, LS). L’analisi degli elementi e del contenuto in macromolecole per cellula mostra differenze specie specifiche nell’acclimatazione di fotosintesi e metabolismo. Ad esempio, *Phaeodactylum tricornerutum* acclimatata a basso solfato mostra una maggiore quota cellulare di C, N e S, accompagnato però da un notevole aumento della biomassa e da un rapporto C/S alterato rispetto al controllo, mentre in *Dunaliella salina* C ed N aumentano mentre S diminuisce. In tutte e tre le specie, a basse concentrazioni di solfato, si osserva un incremento delle proteine; i rapporti carboidrati/proteine, lipidi/carboidrati e lipidi/proteine invece variano in maniera diversa tra le diverse specie, suggerendo un diverso processo di rimodellamento del metabolismo in risposta alla carenza di solfato. L’analisi del contenuto cellulare di clorofille e il confronto di estratti proteici totali mediante SDS-PAGE mostrano una differenza relativa nell’intensità di bande riconducibili a Rubisco e LHC tipica di ogni specie, permettendo di ipotizzare che anche l’acclimatazione della fotosintesi si basi su diverse strategie nelle tre specie in analisi. L’efficienza fotosintetica, per le tre specie, non sembra essere invece particolarmente influenzata dalla disponibilità di solfato.

In conclusione, per quanto la radiazione fitoplanctonica sia il risultato della pressione evolutiva di più fattori, biotici e abiotici, i dati qui descritti confermano l'ipotesi SHF da cui prende le mosse il lavoro sperimentale e la microalga *Phaeodactylum tricornutum* che si è evoluta solo successivamente alle alghe verdi studiate e cioè quando la concentrazione di solfato in mare si è notevolmente alzata, è l'alga che maggiormente deve rimodellare il pool degli elementi e delle macromolecole per fronteggiare una limitazione di zolfo e che mostra le differenze più marcate nella crescita in presenza di una bassa disponibilità di solfato.

1 Introduzione

1.1 Passato e presente:

il ruolo della disponibilità di Zolfo nell'evoluzione delle microalghe.

Lo zolfo è un elemento fondamentale per gli organismi viventi, così come per le cellule fitoplanctoniche, poichè essenziale per tante delle molecole biologiche ad esse necessarie. Gli amminoacidi solforilati cisteina e metionina sono la via attraverso la quale lo zolfo entra nei pool organici e attraverso la quale può essere donato ad altre molecole contenenti gruppi tiolici. La metionina, inoltre, è l'amminoacido che permette l'inizio della sintesi proteica. Nelle proteine, inoltre, la presenza di questi due amminoacidi permette la formazione di ponti disolfuro che hanno ruolo strutturale o di regolazione (Adams & Capecchi, 1966; Webster, Engelhardt, and Zinder 1966). Un'altra molecola derivante dal metabolismo dello zolfo è il glutatione che è utile al sequestro di metalli pesanti e atto alla detossificazione da tali composti. E ancora, le membrane lipidiche possono contenere zolfo, come nel caso delle membrane fotosintetiche in cui sono presenti sulfolipidi (Goss & Wilhelm, 2009; Van Mooy *et al.*, 2006). Lo zolfo è presente in vitamine e cofattori, per via della sua capacità nucleofila, che consente il trasferimento di composti mono o bicarboniosi attivando le vitamine. Infine, bisogna considerare anche molecole derivanti dal metabolismo dello zolfo come il dimetil-sulfonio-propionato (DMSP) (Keller *et al.*, 1989; Ratti & Giordano, 2008) con attività osmoprotettiva (Van Bergeijk *et al.*, 2003; Stefels 2000), crioprotettiva (Van Rijssel and Gieskes 2002; Childers *et al.* 1997), antiossidante (Sunda, Kieber, and Kiene 2002; Bucciarelli and Sunda 2003) e antipredatoria (antigrazing) (Wolfe *et al.*, 1997; Wolfe, 2000).

Nell'oceano attuale si ha una concentrazione di SO_4^{2-} pari a 28-30 mM (considerata storicamente, la massima concentrazione) (Giordano *et al.*, 2008) a differenza della concentrazione negli ambienti d'acqua dolce in cui è circa 0.01-1 mM (Holmer & Storkholm, 2001). La concentrazione di solfato negli oceani ha subito, però, un'oscillazione in tempi geologici, aumentando e diminuendo a seconda dell'attività vulcanica e degli agenti atmosferici che hanno più o meno permesso il rilascio di zolfo da depositi evaporitici (Holser, 1966).

Grazie a diverse tipologie di analisi, oggi, siamo in grado di conoscere la variazione della concentrazione di solfato durante le diverse ere geologiche (Figura 1 – 1). Durante l'Archeano, negli oceani, l'abbondanza di solfato era molto probabilmente inferiore a 200 μM (Habicht *et al.*, 2002) concentrazione che ha permesso la proliferazione di cianobatteri, per poi aumentare a non più di 1–5 mM nelle acque oceaniche del Proterozoico, favorendo la crescita delle alghe verdi, ai tempi le più diffuse (Shen *et al.*, 2002; Canfield 2004; Kah *et al.*, 2004). Nel tardo Ercadiano la concentrazione oceanica di solfato era pari a 15 mM per poi diminuire durante il Cambriano. (Horita *et al.*, 2002; Petrychenko *et al.*, 2005). La concentrazione di solfato del Carbonifero aumentò nuovamente (>15 Mm) (Gill *et al.*, 2007) in modo provvisorio, subendo un successivo declino (Luo *et al.*, 2010; Newton *et al.*, 2011). Dal tardo Paleozoico all'inizio del Mesozoico la concentrazione di solfato raggiunse valori di 13–27 mM, contribuendo all'ascesa in termini evolutivi, delle diatomee, dei coccolitoforidi e delle dinoflagellate fotosintetiche. Le concentrazioni attuali di zolfo sono molto simili a quelle del Paleozoico – Mesozoico e i taxa menzionati sono anche oggi quelli che dominano la fotosintesi oceanica.

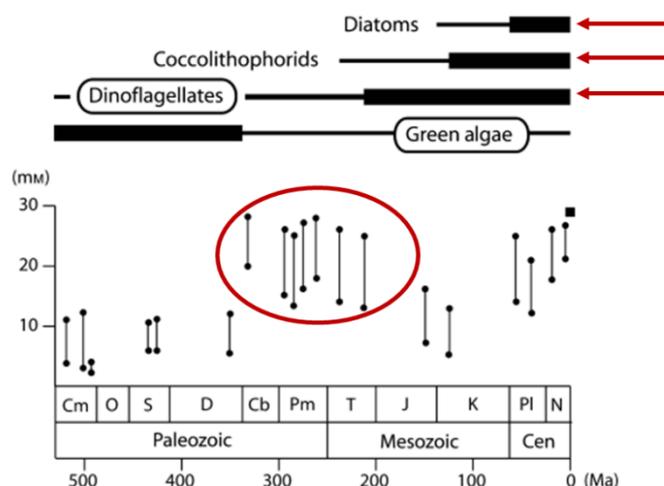


Figura 1-1: Concentrazione di solfato durante le diverse ere geologiche, correlata all'evoluzione delle linee fitoplanctoniche. Immagine modificata da Ratti *et al.*, 2011.

L'evidenza di una correlazione esistente tra i cambiamenti della chimica degli oceani e la composizione fitoplanctonica, durante la successione delle ere geologiche, ha condotto ad un'ipotesi definita "Ipotesi di facilitazione del solfato" ("Sulfate Facilitation Hypothesis") (Ratti, Knoll, and Giordano 2011). In particolare, secondo tale ipotesi, l'incremento della concentrazione di solfato oceanico, che non ha influenzato la crescita e la diffusione delle alghe verdi e dei cianobatteri, sembrerebbe correlato ad una maggiore diffusione in mare delle microalghe caratterizzate da un rapporto C:S per cellula relativamente basso (Ratti, Knoll, and Giordano 2011; Norici, Hell, and Giordano 2005). Generalmente il basso rapporto C:S è comune in microalghe che presentano clorofilla *a + c* tra cui diatomee, coccolitoforidi e dinoflagellate fotosintetiche, che si sono evolute a partire da eventi endosimbiontici secondari e terziari e appartengono perciò alla linea rossa del plastidio.

Ci sono però altre ipotesi che tentano di spiegare la predominanza evolutiva delle microalghe con clorofilla *a + c*, come quella sull'incremento della pressione predatoria. Proprio a seguito dell'incremento di solfato oceanico si è avuta una variazione, durante il Mesozoico, della qualità

della biomassa fitoplanctonica avente una riduzione del rapporto C:N. Gli erbivori, infatti, necessitano di proteine con un elevato quantitativo di azoto per crescere e riprodursi. La variazione stechiometrica della biomassa fitoplanctonica, e l'energia da essa acquisita, avrebbe condotto ad un incremento della mobilità degli erbivori, un'aumentata complessità delle strutture buccali e dell'aggressività di pascolo. (Hawlena & Schmitz, 2010; Giordano, 2013; Fanesi, Raven, and Giordano 2014). Per cui, sarebbe stata l'attività predatoria dei protisti e dei metazoi ad aver influenzato l'evoluzione del fitoplancton marino (Ratti, Knoll, and Giordano 2013) applicando una pressione predatoria selettiva. Una risposta del fitoplancton nella difesa contro i predatori sarebbe stata la sintesi di sostanze tossiche (DMSP (Falkowski *et al.* 2004; Knoll *et al.* 2007)). Il DMSP viene prodotto in quantità elevate proprio dalle microalghe contenenti clorofilla *a + c* e si dimostra essere utile alla cellula come molecola antipredatoria, attraverso la sua degradazione con produzione di acido acrilico, tossico per i predatori. (Wolfe *et al.*, 1997; Wolfe, 2000).

Queste ipotesi, sicuramente, devono essere considerate in un contesto multifattoriale dove una sola variante non può aver determinato l'evoluzione fitoplanctonica. Fattori biotici e abiotici hanno condotto alla radiazione evolutiva del fitoplancton e molto probabilmente l'aumento di solfato oceanico è tra questi.

1.2 Il metabolismo dello zolfo

Lo zolfo è il quarto nutriente più importante nelle cellule algali come si evince dall'aggiornato rapporto Redfield (Redfield *et al.*, 1963; Ho *et al.* 2003):

$$C : N : P : S = 106 : 16 : 1 : 0,7$$

Lo zolfo viene assimilato come solfuro ma acquisito quasi esclusivamente come solfato, molto abbondante in ambiente oceanico. Il metabolismo dello zolfo è ben conosciuto nelle piante come nell'organismo modello *Arabidopsis thaliana*, e nell'alga d'acqua dolce *Chlamydomonas*

reinhardtii. Questi studi fungono da punto di partenza per comprendere la via metabolica di assimilazione dello zolfo nelle microalghe.

Il primo passaggio della via metabolica di acquisizione del solfato prevede la sua attivazione che avviene mediante l'enzima ATP solforilasi (ATPS), indotto in carenza di zolfo (come osservato in *Dunaliella salina* da Giordano, Pezzoni, and Hell 2000), per produrre 5'adenosinfosfosolfato (APS). Questo passaggio è fondamentale per far sì che il solfato abbia un potenziale redox che gli permetta di essere "aggredito" dai donatori di elettroni (NADPH).

A seconda dell'alga e della sua storia evolutiva si distinguono varie isoforme di ATPS come quelle delle alghe verdi (8 – 10 cisteine) e quelle delle diatomee (che possono presentare 2 isoforme di questo enzima, una con 4 e l'altra con 8 – 10 cisteine) (Kopriva, Wiedemann, and Reski 2007; Patron, Durnford, and Kopriva 2008). L'ATPS necessaria alla riduzione del solfato è presente solo a livello plastidico (costituita da 2 – 6 subunità), ma, esistono anche forme citoplasmatiche coinvolte invece nel processo di solfatazione (Prioretti *et al.* 2014; Lunn *et al.* 1990; Renosto 1993 ATPS in plants.pdf n.d.; Rotte and Leustek 2000).

La successiva riduzione del solfato, prevede due reazioni che avvengono nel cloroplasto:

1. la riduzione del solfato attivato (APS) a solfito



2. la riduzione del solfito a solfuro



La prima di queste due reazioni usa 2 molecole di glutathione per ridurre il solfato in solfito. APR può essere distinta in APR – A (forma ancestrale), tipica delle alghe verdi, caratterizzata dalla presenza, all'estremità C terminale, di un dominio glutaredoxina / tireodoxina e da un dominio centrale che utilizza come cofattore un centro Fe₄S₄ (Bick *et al.* 1998; Gutierrez-Marcos *et al.*

1996; Kopriva and Koprivova 2004; Setya, Murillo, and Leustek 1996). Per le alghe della linea rossa è stata individuata l'APR – B che non presenta il centro Fe-S per cui considerata la forma adattata alla carenza di Fe (Kopriva *et al.* 2007; Patron, Durnford, and Kopriva 2008).

La seconda reazione, ad opera della solfito reduttasi, usa 6 elettroni per la riduzione del solfito a solfuro che sono veicolati dalla ferridossina ridotta. La solfito reduttasi (SiR) è un omodimero o omotetramero plastidiale. È un enzima costitutivo che serve a mantenere bassi i livelli intracellulari di solfito per via della tossicità che esso esprime (Yarmolinsky *et al.*, 2013). Proprio per questa ragione la sua trascrizione e attivazione non dipendono dalla disponibilità di zolfo, a differenza dell'ATP solforilasi e l'APS reduttasi, come osservato in *Arabidopsis thaliana* (Khan *et al.*, 2010).

Il solfuro prodotto, grazie a 2 enzimi che insieme formano un unico complesso enzimatico, può essere assimilato come cisteina (Figura 1 – 2).

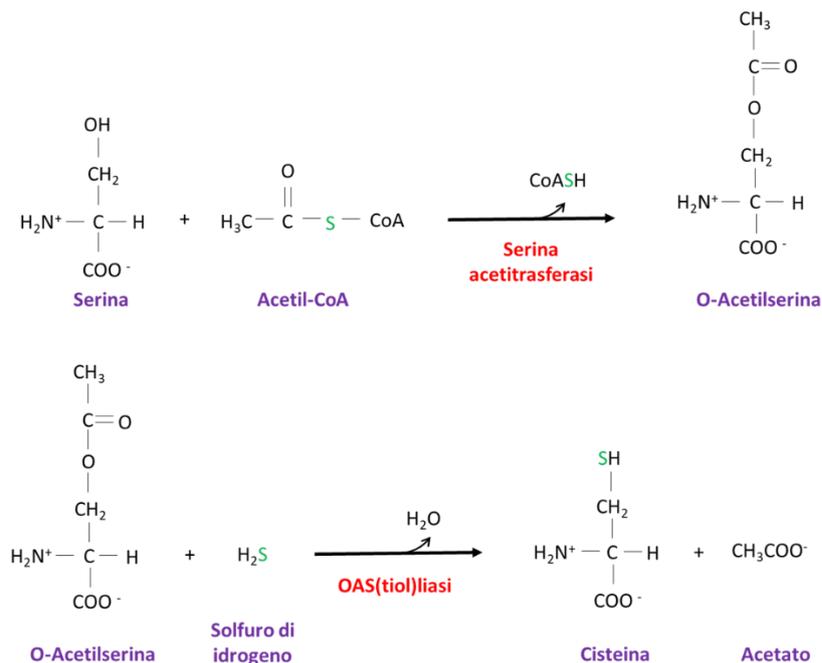


Figura 1-2: Pathway enzimatico per la produzione di cisteina a partire dal solfuro. Grazie all'attività della serina acetiltrasferasi (SAT) si ha produzione di O – acetilserina. Questa insieme al solfuro con l'enzima O – acetilserina tioliasi produce cisteina.

Gli enzimi in questione sono la serina acetiltrasferasi (SAT) e l'O – acetilserina tioliasi (OAS-TL) che insieme costituiscono il complesso enzimatico della cisteina sintasi (CSC) (Hell & Wirtz, 2008; Saito 2004). In *Arabidopsis thaliana*, esistono più isoforme di entrambi gli enzimi localizzati nel cloroplasto, nel citosol e nel mitocondrio. La riduzione del solfato a solfuro, quindi, è esclusivamente plastidiale mentre l'assimilazione può avvenire in più compartimenti cellulari (Haas *et al.*, 2008; Watanabe *et al.* 2008). L'efficienza di questa via assimilatoria è molto elevata, poiché la produzione di cisteina viene modulata dalla formazione e dall'assemblaggio del complesso CSC.

Quando il complesso si forma, solo l'enzima SAT è attivo, producendo O – acetilserina, mentre, quando il complesso è disassemblato solo OAS-TL viene attivato, producendo cisteina. La produzione di O- acetilserina regola la sintesi degli enzimi necessari alla riduzione del solfato e all'assemblaggio del complesso enzimatico. Quando si produce cisteina, invece, si ha la repressione della trascrizione dei pathway enzimatici legati all'assimilazione dello zolfo (noto da studi in *Arabidopsis thaliana* da Droux *et al.*, 1998). Valutando l'attività enzimatica di questi due enzimi e la loro abbondanza, è stato ipotizzato che lo stato del complesso enzimatico potrebbe mostrare delle differenze tra le alghe della linea verde e quelle della linea rossa. Quest'ultime, con maggiore frequenza, presenterebbero il complesso disassemblato, rispetto alle prime (Prioretti & Giordano, 2016).

Una volta prodotta, la cisteina potrà essere utilizzata dalla cellula, ad esempio per la produzione di glutatione e metionina.

1.3 Descrizione delle specie sperimentali

1.3.1 *Tetraselmis suecica*

Tetraselmis suecica (Figura 1 – 3), descritta per la prima volta da Butcher nel 1959 (Lund & Butcher, 1960), è un'alga unicellulare flagellata piatta, di forma ellittica / sferica (phylum Chlorophyta, classe Chlorodendrophyceae, ordine *Chlorodendrales*). Evolutivamente, si tratta di un genere vicino alle classi Ulvophyceae, Trebouxiophyceae e Chlorophyceae, costituenti il gruppo UTC (Leliaert *et al.*, 2012). Questa vicinanza evolutiva è evidente se si considerano alcune caratteristiche con esse condivise: la mitosi chiusa e la presenza di un ficoplasto (Stewart & Mattox, 1984). All'estremità anteriore, presenta un'invaginazione caratteristica, da cui si dipartono 4 flagelli uguali. L'apparato di Golgi conferisce una particolarità a questa microalga verde. Infatti, è in grado di secerne delle scaglie, che si dispongono a formare una teca (parete extracellulare rigida), esternamente alla cellula, che copre la superficie del protoplasto (Domozych *et al.*, 1981). Come il corpo cellulare, anche i flagelli sono dotati di scaglie.

Molteplici possono essere gli usi applicativi di questa microalga, che esulano dal suo semplice studio in ambito fisiologico. Ha un'importante valenza commerciale in più ambiti come in acquacoltura e in ambito cosmetico, per citarne alcuni (Fábregas *et al.*, 2001; Fanesi *et al.*, 2014).



Figura 1-3: *Tetraselmis suecica* immagine da Phycokey.

1.3.2 *Dunaliella salina*

Dunaliella salina è stata originariamente descritta da Dunal nel 1838 con il nome di *Haematococcus salinus*, ma nel 1905, E.C. Teodoresco ha dimostrato che la nuova specie differiva da *Hematococcus*. In onore di Dunal gli diede un nuovo nome di genere, *Dunaliella*. *Dunaliella salina* (phylum Chlorophyta, classe Chlorophyceae, ordine *Chlamydomonadales*) (Figura 1 – 3) (Ramos *et al.*, 2011) è una microalga unicellulare marina verde, con 2 flagelli uguali (“*deux longs flagellums dépassant en longueur le corps tout entier*” Teodoresco E.C., 1905), e avente una taglia cellulare tra 6,3 – 13,3 µm (Teodoresco E.C., 1905; Oren, 2005).

Per via dell'assenza di una parete rigida e della presenza di un glicocalice, *Dunaliella salina*, è in grado di adattarsi rapidamente ad ampie variazioni di salinità. Per cui, *Dunaliella salina*, è una microalga modello per studi di tolleranza alla salinità. Inoltre in condizioni di stress abiotico, le cellule di alcune specie appartenenti al genere *Dunaliella*, possono diventare arancioni, per via di un accumulo di beta carotene in globuli plastidici (Polle *et al.*, 2017; Lamers *et al.*, 2010; Lamers *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2019).

Ha un solo cloroplasto a forma di coppa, un nucleo anteriore, una macchia oculare e un pirenoide circondato da granuli di amido nell'estremità posteriore della cellula. (Ginzburg, 1988). Con un approccio di annotazione conservativo che non tiene conto delle sequenze ripetute, è stata presentata una bozza del genoma contenente 16.697 loci che forniscono 18.801 trascritti codificanti proteine. Un approccio di annotazione meno conservativo ha invece svelato la presenza di 36.851 geni codificanti proteine (Polle *et al.*, 2017).

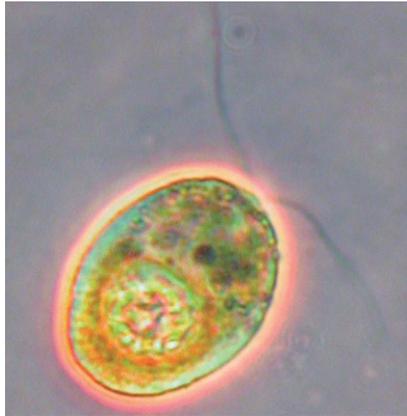


Figura 1-4: *Dunaliella salina*. Immagine da Ramos et al., 2011.

1.3.3 *Phaeodactylum tricornutum*

Phaeodactylum tricornutum è stata inizialmente descritta come un nuovo genere con una singola specie da Bohlin nel 1897 (phylum Heterokonta, classe Bacillariophyceae, ordine Naviculales) (Lewin, 1958). Egli descrisse solo il morfotipo a tre punte (Figura 1 – 5) (Tesson *et al.*, 2009), con un cloroplasto marrone – giallo, ed un frustulo debolmente silicizzato. Oggi, si distinguono 4 morfotipi: ovale, fusiforme, a tre punte, cruciforme (raramente osservato). *Phaeodactylum tricornutum* è una diatomea marina pennata, appartenente alla linea rossa. Per via dei diversi morfotipi, è impossibile determinare un'unica taglia cellulare. Per *Phaeodactylum tricornutum* è stato sequenziato l'intero genoma (Bowler *et al.*, 2008).

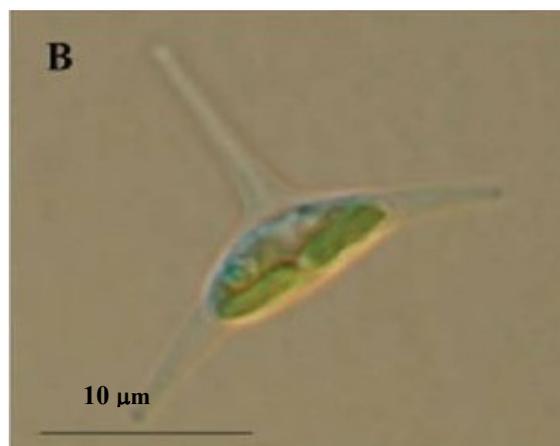


Figura 1-5: *Phaeodactylum tricornutum*. Immagine da Tesson et al., 2009.

1.3.4 Criterio di scelta delle specie sperimentali

Tetraselmis suecica, appartenente all'ordine delle *Chlorodendrales* caratterizzato da una precoce divergenza dalle “core Chlorophytes”, si è evoluta nelle acque oceaniche del tardo Proterozoico (~ 1200 mya) (Tappan, 1980; Knoll, 2003) con concentrazione di solfato pari a 1–5 mM (Shen *et al.*, 2002) (Canfield, 2004) (Kah *et al.*, 2004). Nelle stesse acque, poco dopo le *Chlorodendrales*, si sono evolute e affermate anche le *Chlamydomonadales* come *Dunaliella salina*. *Phaeodactylum tricorutum*, appartenente all'ordine *Naviculales*, ha invece subito un'ascesa evolutiva nel tardo Paleozoico – inizio Mesozoico a concentrazioni di solfato oceanico simili a quelle attuali tra 13 – 27 mM. Per cui le risposte fisiologiche delle tre specie alla limitazione da solfato possono mostrare sostanziali differenze riconducibili al tempo evolutivo e quindi alla concentrazione di solfato oceanico che ne ha favorito la diffusione.

1.4 Fotosintesi

La fotosintesi, negli organismi eucarioti, come nel caso delle microalghe analizzate in questa tesi, avviene in organelli denominati cloroplasti che derivano da un processo endosimbiotico primario di un cianobatterio ancestrale in un ospite eucariotico. Gli eventi endosimbiotici possono essere anche di natura secondaria o terziaria, ad esempio quando un organismo eucariotico incorpora un organismo derivante da un processo endosimbiotico primario o secondario, rispettivamente. In questo modo le membrane che circondano il cloroplasto possono essere 2, in seguito ad un processo di endosimbiosi primaria (*Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina*), 3 (euglenoidi e dinoflagellate), o 4 (*Phaeodactylum tricorutum*) (McFadden, 2001; Howe *et al.*, 2008) a seguito di un processo di endosimbiosi secondaria o terziaria.

I cloroplasti sono la sede dei pigmenti attivi nella fotosintesi in grado di utilizzare una porzione della luce dello spettro elettromagnetico, quella definita radiazione fotosintetica attiva (PAR). Tra i

principali, le clorofille (Björn *et al.*, 2009) sono costituite da un anello tetrapirrolico con al centro un atomo di magnesio. Le clorofille assorbono fortemente nelle regioni del blu e del rosso e possiamo distinguerle in clorofille *a* e *b* presenti nelle specie sperimentali *Tetraselmis suecica* e *Dunaliella salina*, mentre la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*, avente plastidi di origine secondaria, contiene le clorofille *a* e *c* (Dougherty *et al.*, 1970). La clorofilla *a* ha un ruolo centrale nell'apparato fotosintetico costituendo il dimero speciale dei centri di reazione dei fotosistemi, dando il via alla catena di trasporto elettronica.

I carotenoidi sono definiti pigmenti accessori per via del fatto che sono caratterizzati da uno spettro di assorbimento diverso da quello delle clorofille e possono trasferire l'energia luminosa da loro assorbita alle clorofille per l'evento fotochimico. Sono molecole lineari con doppi legami congiunti multipli, in grado di assorbire nella regione tra i 400 e 500 nm (arancio). I carotenoidi sono fondamentali anche nella fotoprotezione, ad esempio nel ciclo delle xantofille, in quanto possono dissipare l'energia assorbita in eccesso sotto forma di calore.

I pigmenti fotosintetici sono presenti come complessi pigmento-proteina detti fotosistemi, composti da proteine antenna (o LHC, *light harvesting complex*) e core dei fotosistemi (PS core) e localizzati, all'interno dei cloroplasti, nelle membrane tilacoidali. L'energia assorbita dai pigmenti dei fotosistemi può quindi:

- Essere utilizzata per la fotochimica: l'energia elettromagnetica assorbita viene convertita in energia chimica e trasferita sotto forma di elettroni agli accettori primari determinando il processo fotosintetico (catena di trasporto degli elettroni);
- Essere dissipata come calore, un processo che viene caratterizzato grazie al parametro "NPQ" (Non Photochemical Quenching, Materiali e Metodi 2.7 per maggiori dettagli);
- Portare all'emissione di un fotone (Fluorescenza): l'energia è dissipata sotto forma di luce.

Questi tre eventi sono in competizione tra loro e l'incremento dell'efficienza di uno, risulta nel decremento dell'efficienza degli altri due (Maxwell and Johnson 2000). Lo studio della fluorescenza della clorofilla rappresenta un'importante metodologia per la caratterizzazione del processo fotosintetico *in vivo* (vedi Materiali e Metodi 2.7).

L'energia luminosa raggiunge i centri di reazione (CR) all'interno dei fotosistemi (PS) sia per assorbimento diretto, che attraverso dei complessi pigmento-proteina denominati antenne la cui funzione è quella allargare la superficie di contatto per i fotoni, per catturarne il maggior numero possibile. (Figura 1 – 6).

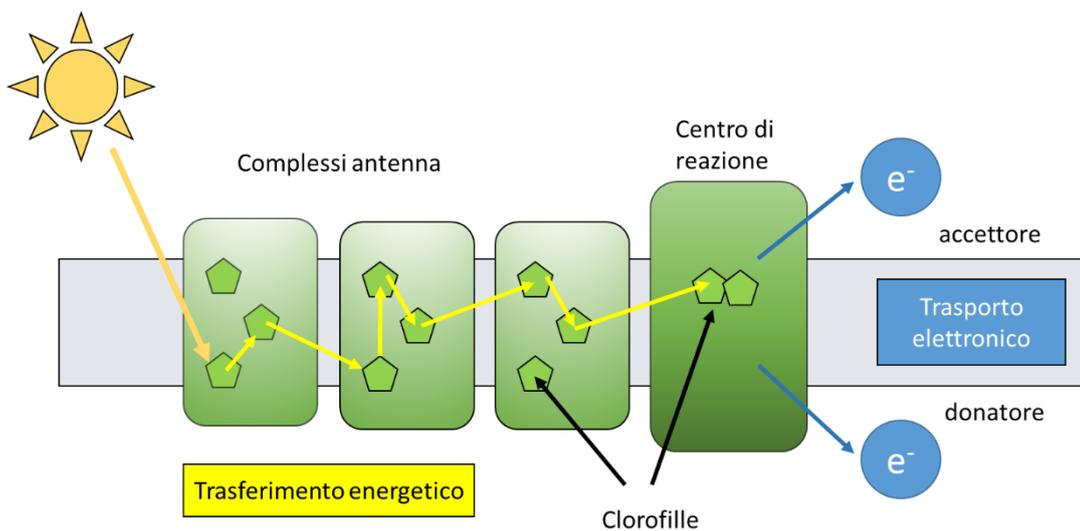


Figura 1-6: trasferimento di energia luminosa in un PS in cui l'energia luminosa viene prima catturata dalle antenne e poi trasferita ai centri di reazione (adattata da Johnson, 2016).

Proprio in seguito all'eccitazione subita dai complessi pigmento-proteina, si genera una reazione che comunemente viene chiamata "catena di trasporto degli elettroni" (Figura 1 – 7), che coinvolge due fotosistemi, rispettivamente:

- PSII: PS di tipo chinonico, in cui i chinoni sono gli accettori primari di elettroni; contiene il complesso evolvente ossigeno (OEC), in grado di catalizzare la reazione di fotolisi dell'acqua, generando ossigeno molecolare, protoni ed elettroni.

- PSI: PS di tipo Fe-S in cui la separazione di carica viene stabilizzata per cessione degli elettroni ai centri Fe-S,

L'eccitazione data dalla luce, attraverso il passaggio di energia tra i pigmenti delle antenne, raggiunge il dimero di clorofilla del PSII (P680). Da questo l'elettrone viene ceduto all'accettore primario, la feofitina, e da qui al plastochinone PQ_A e quindi al PQ_B . In questo meccanismo, già prima che l'elettrone venga ceduto a quest'ultimo accettore, il dimero di clorofilla iniziale viene rigenerato attraverso un processo detto di fotolisi ad opera di un complesso Oxigen Evolving Complex (OEC) che da due molecole di acqua produce O_2 e $4H^+$. Gli elettroni dal PSII, grazie ai plastochinoni, al citocromo *b6f* e alla plastocianina, passano al PSI, riducendo il suo dimero speciale quando quest'ultimo si trova nella forma $P700^+$, quindi ossidato dopo aver assorbito di un fotone e donato un elettrone ai successivi trasportatori. A seguito di assorbimento di un fotone al $P700$, infatti, gli elettroni vengono ceduti ad una prima molecola di clorofilla (A_0) che riducendosi stabilizza la separazione di carica nel $P700$, originando $P700^+$. In questo trasporto sono coinvolte anche tre centri ferro zolfo fino al raggiungimento della Ferredossina, sulla faccia stromale del PSI. La ferredossina, a sua volta, donerà l'elettrone al fine di generare potere riducente sotto forma di NADPH. Questo tipo di trasporto elettronico viene definito non ciclico e si distingue dal trasporto elettronico ciclico che vede il coinvolgimento solo di un fotosistema, il PSI, e la produzione di ATP.

Oltre all'ossigeno e al NADPH, la fotosintesi genera la forma di energia cellulare denominata ATP in un processo noto come fotofosforilazione (Arnon *et al.* 1954). Infatti, durante il trasporto degli elettroni si genera un gradiente di carica protonica tra i due lati della membrana per via dell'immissione di protoni nel lumen che ne provoca l'acidificazione (pH 5) (Lee & Kugrens, 2000). Questo gradiente genera una forza proton motrice che sposta i protoni dal lumen allo stroma, con la conseguente produzione di ATP grazie all'enzima ATP sintasi. Per la produzione di 3 molecole di ATP sono necessari 14 protoni, pari al numero delle subunità c del complesso ATP

sintasi. L'ATP e il NADPH prodotti, saranno poi utilizzati dal ciclo di Calvin-Benson e per la successiva produzione di lipidi, carboidrati, proteine nonché per l'assimilazione di nutrienti quali zolfo e azoto.

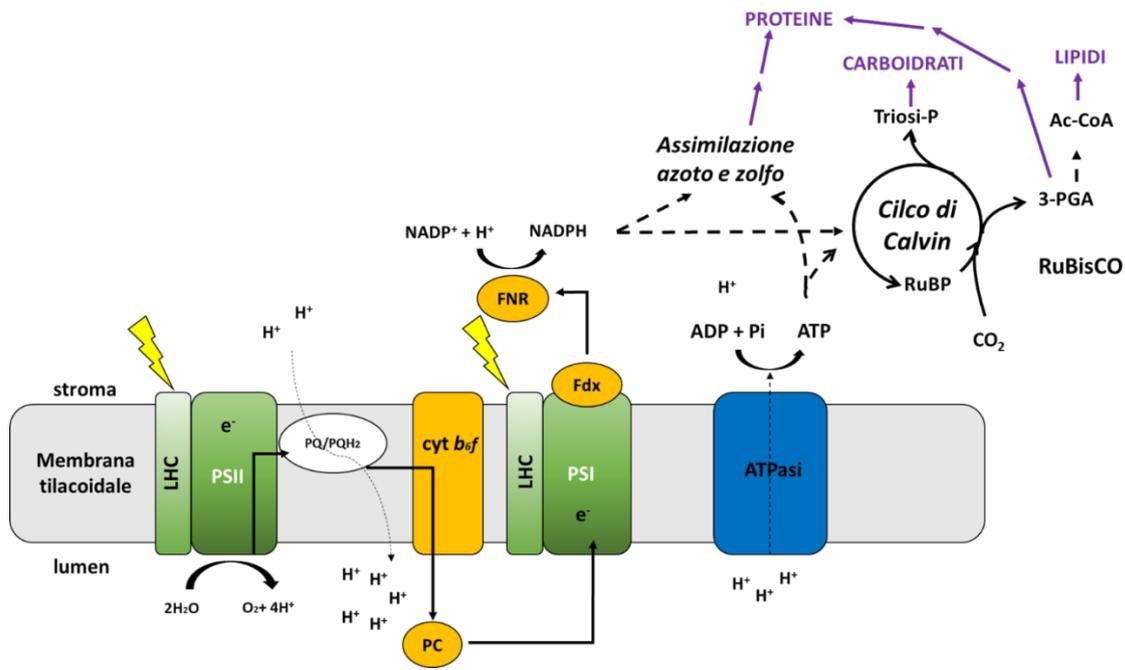


Figura 1-7: Catena fotosintetica di trasporto di elettroni e successivo utilizzo dei prodotti delle reazioni alla luce e al buio (Ciclo di Calvin) per gli altri processi metabolici (adattata da Johnson, 2016).

Le reazioni appena descritte sono comunemente chiamate reazioni alla luce e sono susseguite dalle reazioni al buio, in cui i prodotti delle prime (ATP e NADPH) vengono utilizzati per ridurre la CO₂ atmosferica attraverso il ciclo di Calvin-Benson o *ciclo riduttivo dei pentosi fosfati* (Benson 1951).

Il ciclo di Calvin-Benson avviene nello stroma del cloroplasto e si compie in tre fasi successive:

- Carbossilazione, in cui la CO₂ e acqua con una molecola accettore a 5 atomi di carbonio (ribulosio 1,5-bisfosfato) generano due molecole di 3-fosfoglicerato (a tre atomi di carbonio). Questa reazione avviene ad opera dell'enzima Ribulosio 1,5-bisfosfato carbossilasi/ossigenasi denominato Rubisco (Cleland *et al.*, 1998) che è uno dei più abbondanti negli organismi vegetali.

- Riduzione del 3-fosfoglicerato a carboidrati a 3 atomi di carbonio (gliceraldeide 3-fosfato) attraverso due reazioni enzimatiche che necessitano di ATP e NADPH prodotto durante la fase luminosa.
- Rigenerazione del ribulosio 1,5-bisfosfato, primo accettore della CO₂, attraverso 10 reazioni, una delle quali richiede l'utilizzo di ATP. La rigenerazione è fondamentale per continuare ad assimilare CO₂ ed evitare l'esaurimento degli intermedi di reazione del ciclo di Calvin-Benson (Sharkey, 2019).

In conclusione, tre molecole di CO₂ vengono ridotte in una molecola di gliceraldeide 3-fosfato con un consumo di nove molecole di ATP e sei di NADPH. La gliceraldeide 3-fosfato verrà poi utilizzata per la sintesi del glucosio necessario alla domanda energetica delle microalghe, alla sintesi di polisaccaridi e come molecola segnale sia a livello dell'espressione genica che della sintesi proteica (Roth *et al.*, 2019). La fotosintesi è quindi il processo alla base degli organismi vegetali i cui prodotti sono utilizzati per l'assimilazione di nutrienti e la produzione di carboidrati, lipidi e proteine.

1.5 Fotoprotezione e fotoinibizione

Gli organismi fotosintetici vivono in un ambiente dinamico e si trovano a fronteggiare condizioni di luce variabile, in cui l'energia luminosa può essere assorbita in eccesso rispetto alla capacità di utilizzarla del metabolismo cellulare. L'eccesso di luce può portare alla formazione di clorofille in uno stato di tripletto eccitato che, a sua volta, interagendo con una molecola di ossigeno genera ossigeno singoletto e quindi una specie reattiva dell'ossigeno (ROS) (Gerotto *et al.*, 2012). Gli organismi fotosintetici hanno sviluppato varie strategie di fotoprotezione per evitare gli effetti deleteri dati dall'eccesso di energia luminosa. Uno dei meccanismi più rapidi di fotoprotezione consiste nella dissipazione sotto forma di calore dell'energia di eccitazione in eccesso rispetto a quella che la cellula è in grado di utilizzare nel metabolismo. Questo tipo di meccanismi di

fotoprotezione viene attivato grazie alla presenza dei carotenoidi, per lo più legati alle antenne, in grado di disperdere l'eccitazione delle clorofille (che può condurre alla formazione di ossigeno singoletto come detto precedentemente) in calore (Krause e Weiss 1991) aggiungi a mano (Baker, 2008). Il ciclo delle xantofille, che nelle specie della linea verde include i carotenoidi violaxantina, anteraxantina e zeaxantina, è uno dei processi chiave per la dissipazione dell'energia in eccesso come calore. Ad alta luce la violaxantina, passando per l'intermedio anteraxantina, viene convertita in zeaxantina. La reazione viene attivata in seguito al decremento del pH nel lume tilacoidale per via della forte irradianza. Le diatomee (*P. tricornutum*) presentano un diverso ciclo delle xantofille che coinvolgono due diversi carotenoidi: diadinoxantina che viene convertita in diatoxantina. In determinate condizioni queste alghe possono utilizzare sia il ciclo della violaxantina che quello della diadinoxantina (Lohr & Wilhelm, 2001).

Nonostante esistano questo ed altri meccanismi fotoprotettivi atti alla dissipazione di energia luminosa in eccesso, l'elevata irradianza può comunque danneggiare irreversibilmente alcune delle proteine dell'apparato fotosintetico inibendo la fotosintesi. Questa inattivazione viene definita fotoinibizione ed indica l'eccesso di energia luminosa che giungendo al PSII lo danneggia, inattivandolo (Melis, 1999). L'unica componente del PSII che non può essere riciclata in seguito al danneggiamento è la proteina D1 (che fa parte del CR del PSII). Tale proteina, per cui, deve essere rimpiazzata con una sua copia neosintetizzata.

2 Materiali e metodi

2.1 Colture microalgali

2.1.1 Mezzo di coltura

Le colture microalgali, in condizioni di controllo, sono state coltivate in un mezzo ottimizzato per emulare l'acqua marina, chiamato Artificial Multipurpose Complement for the Nutrition of Algae (AMCONA) (Tabella 2 – 1) (Fanesi *et al.*, 2014). Per le colture in condizioni limitanti di solfato è stato ottimizzato, a partire dal mezzo AMCONA di cui sopra, un mezzo denominato AMCONA Ø ZOLFO, che appunto, come indica la sua denominazione non contiene zolfo (Tabella 2 – 2).

Tabella 2-1: Ricetta del mezzo Artificial Multipurpose Complement for the Nutrition of Algae (AMCONA), derivante dal protocollo interno al laboratorio.

<i>Sostanza chimica</i>	<i>Stock []</i>	<i>Finale []</i>	<i>Volume per 1 L</i>
NaCl		363 mM	21.21 g
Na ₂ SO ₄	1 M	25 mM	25 mL
KCl	2 M	8.04 mM	4.02 mL
NaHCO ₃	1 M	2.07 mM	2.07 mL
KBr	1 M	725 µM	725 µL
H ₃ BO ₃	0.5 M	372 µM	744 µL
NaF	0.5 M	65.7 µM	131.4 mL
MgCl ₂ · 6H ₂ O	2 M	41.2 mM	20.6 mL
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1 M	9.14 mM	9.14 mL
SrCl ₂ · 6H ₂ O	0.5 M	82 µM	164 µL
NaNO ₃	1 M	549 µM	549 µL
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	100 mM	21 µM	210 µL
*Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	105 mM	205 µM	2 mL
*CuSO ₄ · 5H ₂ O	40 µM	40 nM	1 mL

METALS SOLUTION

I – Iron	6.5 mM	6.56 μ M	1 mL
II – Trace metal			1 mL
TRIS-HCl, pH 8.1	1 M	10 mM	10 mL
VITAMINS SOLUTION			1mL

SOLUZIONI

METALS STOCK I – iron [1 mL L⁻¹] 6.56 mM

	gL ⁻¹ stock solution
FeCl ₃ · 6H ₂ O	1,77
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	3.09

METALS STOCK II – trace metals [1 mL L⁻¹]

	gL ⁻¹ stock solution	Final concentration
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.073	254 nM
CoCl ₂ · 7H ₂ O	0.016 x 10 ⁻²	5.69 nM
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.54	2.42 μ M
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1.48 x 10 ⁻³	6.1 nM
Na ₂ SeO ₃	1.73 x 10 ⁻⁴	1 nM
NiCl ₂ · 6H ₂ O	8,16 x 10 ⁻⁴	6.3 nM
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	2.44	8.29 μ M

VITAMIN STOCK [1 mL L⁻¹]

	gL ⁻¹ stock solution	Final concentration
Thiamine-HCL	0.1	297 nM
Biotin	0.002	4.09 nM
B ₁₂	0.001	1.47 nM

Il mezzo AMCONA \emptyset ZOLFO differisce dallo standard poiché:

- la concentrazione di Na₂SO₄ è fortemente diminuita
- CuSO₄ · 5H₂O è sostituito da CuCl₂ · 2H₂O (C_i = 0,2 mM; C_f = 40 nM)
- il metal stock II non contiene zolfo (Tabella 2 – 2).

Tabella 2-2: Metal stock II per il mezzo AMCONA Ø ZOLFO.

METALS STOCK II AMCONA Ø S – trace metals [1 mL L⁻¹]		
	gL ⁻¹ stock solution	Final concentration
ZnCl ₂ · 7H ₂ O	0.034	254 nM
CoCl ₂ · 7H ₂ O	0.013 x 10 ⁻²	5.69 nM
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.54	2.42 µM
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1.48 x 10 ⁻³	6.1 nM
Na ₂ SeO ₃	1.73 x 10 ⁻⁴	1 nM
NiCl ₂ · 6H ₂ O	8,16 x 10 ⁻⁴	6.3 nM
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	2.44	8.29 µM

Le concentrazioni limitanti di solfato (LS) risultano quindi essere 70 µM per *Tetraselmis suecica* (indicata come LS), *Dunaliella salina* (indicata come LS) e *Phaeodactylum tricorutum* (indicata come LS1) e 80 µM per quest'ultima specie indicata con LS2.

2.1.2 Condizioni di crescita

Le colture sono state sottoposte ad una crescita controllata a luce continua con densità del flusso fotonico pari a 100 µmol·m²·s⁻¹ e alla temperatura di 20°C. Le colture di *Tetraselmis suecica* (CCAP 66/4), *Dunaliella salina* (CCAP 19/25) e *Phaeodactylum tricorutum* (UTEX 646) sono state inoculate partendo da colture in fase esponenziale sia per la condizione di controllo che in solfato limitazione. Queste ultime sono state preventivamente acclimatate per almeno 3 settimane in terreno AMCONA Ø S.

100 µL della precoltura acclimatata e in fase esponenziale sono stati usati per la conta cellulare e mescolati con 10 mL di soluzione CASYTon. Lo strumento CASY® cell counter fornisce il numero di cellule presente in ogni mL di coltura.

Grazie alla formula:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

è possibile determinare il volume di coltura da inoculare in un volume finale pari a 100 mL (V_f) tale per cui si avrà una concentrazione cellulare pari a $2,5 \cdot 10^5$ cellule \cdot mL⁻¹ (C_f). In effetti, attraverso il CASY ® cell counter conosciamo il numero di cellule \cdot mL⁻¹ (C_i) di ogni preinoculo, e con un semplice calcolo è possibile determinare il volume iniziale da prelevare da ogni coltura:

$$V_i = \frac{\left(2,5 \cdot 10^5 \frac{\text{cell}}{\text{ml}}\right) \cdot (100 \text{ ml})}{C_i}$$

Tale volume di coltura è stato prelevato in condizioni di sterilità, sotto cappa biologica, e centrifugato, in falcon, a 3500xg per 10 minuti.

Per le colture in condizioni di controllo sono state preparate beute (Erlenmeyer) da 250 mL, contenenti 100 ml di terreno AMCONA STD. Per le colture sperimentali, invece, sono stati aggiunti, ad ogni beuta (Erlenmeyer) da 250 mL, 100 ml di terreno AMCONA Ø ZOLFO. Da questi, è stato sottratto un volume pari a quello da aggiungere in quantità di zolfo (Na_2SO_4).

Centrifugate le cellule microalgali, è stato rimosso il surnatante, in condizioni di sterilità, con un pipettatore automatico. Le cellule sono state poi risospese nei rispettivi mezzi preparati.

Inoculate le colture microalgali, sono stati prelevati 100 μ L, usati per una nuova conta cellulare al CASY ® cell counter. Questa nuova conta è determinante per conoscere l'effettivo numero di cellule \cdot ml⁻¹ per ogni coltura. Le colture sono state monitorate attraverso la conta cellulare, dal giorno 0 (quello dell'inoculo) fino al giorno 10. I campionamenti per determinare gli effetti fisiologici dati dall'esposizione a concentrazioni di zolfo differenti, sono stati eseguiti in fase medio esponenziale, che varia a seconda della specie e della condizione di coltivazione, per questo

motivo i giorni effettivi del campionamento sono stati ottimizzati in modo da essere specie – specifici e condizione – specifici. Per *Tetraselmis suecica* (CTR, LS) e *Dunaliella salina* CTR il giorno di campionamento scelto in fase esponenziale è il giorno 3 dall’inizio della crescita, mentre la condizione di solfato-limitazione di *Dunaliella salina* è stata campionata il 4 giorno insieme a *Phaeodactylum tricornutum* (CTR, LS1, LS2).

2.2 Quantificazione di carbonio e azoto

Dalle colture di *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina* e *Phaeodactylum tricornutum* in fase esponenziale, sono stati raccolti campioni per determinare il contenuto di carbonio e azoto cellulare e il loro rapporto. Le colture microalgali sono state centrifugate in Falcon a 3500xg per 10 minuti e una volta rimosso il surnatante, sono stati effettuati tre lavaggi in ammonio formato 0,5 M. Il pellet ottenuto è stato risospeso in 1 mL di ammonio formato 0,5 M e trasferito in tubi da microcentrifuga precedentemente pesati. Dopo l’ultima centrifuga (16000xg, 10 minuti), rimosso il surnatante, il pellet è stato seccato in stufa a 80°C, finché il suo peso non si è stabilizzato. Ottenuto il peso secco effettivo, i campioni sono stati preparati in piccole capsule di alluminio per l’analisi allo strumento. I primi campioni ad esser preparati ed analizzati sono stati quelli di una retta standard, con un quantitativo specifico di sulfanilamide da 0,1 a 1,2 mg, per la calibrazione dello strumento, addizionati di vanadio (0,5 mg) che aiuta la combustione. Successivamente sono stati preparati i campioni, contenenti pellet in un peso compreso tra 0,3 e 0,8 mg, e una piccola quantità di vanadio. Per ogni replica biologica sono state preparati due campioni da analizzare. A questo punto, il quantitativo di carbonio e azoto è stato determinato grazie all’analizzatore elementare CHN (Elemental Combustion System ECS4010, Costech Analytical Technologies Inc., Milano, Italy). Questo strumento permette di effettuare l’analisi elementare di un dato un campione. Quest’ultimo dopo essere stato bruciato produce composti gassosi uniformi costituiti dagli elementi C, H, N che

vengono determinati utilizzando la gascromatografia, e, il rapporto tra gli elementi presenti nel campione originale viene determinato di conseguenza.

2.3 Fluorescenza a raggi X a riflessione totale (TXRF)

La spettroscopia a raggi X permette di quantificare gli elementi in traccia all'interno di un dato campione opportunamente preparato. Le cellule microalgali di *Testraselmis suecica*, *Dunaliella salina* e *Phaeodactylum tricornutum* in condizione di controllo e a concentrazione limitante di solfato, raccolte in fase esponenziale, dopo essere state contate, sono state centrifugate a 3500xg per 10 minuti. Una volta rimosso il surnatante, si sono succeduti tre lavaggi in ammonio formato 0,5 M, per poi risospendere il campione finale in 1 mL di acqua MQ. Il volume iniziale di campione centrifugato è stato scelto sulla base del numero di cellule nella coltura campionata:

- 5 mL *T. suecica* CTR e LS; 5 ml *D. salina* CTR, 5 mL *P. tricornutum* CTR
- 10 mL *D. salina* LS; 10 mL *P. tricornutum* LS1 e LS2.

Al campione in acqua MQ è stato poi aggiunto il gallio in concentrazione pari a 5 mg/L come standard interno al fine di calibrare lo strumento PICOFOX S2 (Bruker, Berlin, Germany). Il campione (10 µl) è stato posto su un dischetto in quarzo e fatto seccare per circa 6 minuti alla temperatura di 60°C con l'aiuto di una piastra riscaldante. Il campione seccato crea una sottile patina al centro del dischetto che una volta colpita dai raggi X in base all'intensità della fluorescenza di un dato elemento sarà direttamente proporzionale alla sua concentrazione nel campione. Lo strumento PICOFOX S2 utilizza radiazioni monocromatiche e ottiche a riflessione totale. Illuminando il campione con un fascio totalmente riflesso, si riduce l'assorbimento e la dispersione del fascio nella matrice del campione. La resa ottimale della fluorescenza permette di individuare con estrema sensibilità gli elementi in tracce del campione.

2.4 Quantificazione dei pigmenti

Dalle colture in fase esponenziale sono stati prelevati i campioni utilizzati per la quantificazione dei pigmenti fotosintetici. Il volume di campione raccolto differisce a seconda della specie. Per *Dunaliella salina* 1 mL di coltura è quello più indicato per ottenere una buona risoluzione dello spettro di assorbanza. *Phaeodactylum tricornutum* e *Tetraselmis suecica* necessitano di un volume maggiore, di 2 mL, per ottenere una quantificazione il più precisa possibile. I campioni sono stati centrifugati a 16000xg per 10 minuti (20°C) per poi rimuovere il surnatante. È stato aggiunto, al pellet, 1 mL di ammonio formato 0,5 M per risospendere le cellule microalgali. Una nuova centrifuga a 16000xg per 10 minuti è stata necessaria per separare nuovamente le cellule dalla fase liquida. Rimosso il surnatante, il pellet è stato trattato diversamente a seconda delle specie. Per risospendere le cellule di *Tetraselmis suecica* e di *Dunaliella salina* è stato aggiunto 1 mL di acetone 90%. I campioni di *Tetraselmis suecica* sono stati conservati per 4 giorni a 4°C, pestellati, per poi essere congelati (-20°C). Questo trattamento favorisce la rottura della parete cellulare di questa microalga e il rilascio dei pigmenti in acetone 90%. *Dunaliella salina*, essendo priva di parete cellulare, non necessita di questo passaggio, ma i suoi campioni sono stati direttamente congelati (-20°C) per una notte. I campioni di *Phaeodactylum tricornutum* sono stati risospesi in 1 mL di metanolo e poi congelati (-20°C) per tutta la notte.

Dopo il trattamento, i campioni sono stati centrifugati a 16000xg per 10 minuti. Questo passaggio, oltre ad essere necessario per raccogliere il surnatante utile alla quantificazione, ci permette di vedere se effettivamente l'estrazione dei pigmenti è avvenuta con successo. Infatti, il pellet dopo centrifugazione, ed una corretta estrazione, deve risultare bianco. Il surnatante viene trasferito in un nuovo tubo da microcentrifuga e tenuto al buio (per evitare la degradazione dei pigmenti) per essere quantificato allo spettrofotometro ONDA UV-31.

Per il bianco (800µL), è stata usata la soluzione necessaria all'estrazione dei pigmenti (acetone 90% o metanolo a seconda della specie), in una cuvetta in quarzo (Quartz SUPRASIL by Hellma®, light path 10 mm), sul quale è stato acquisito lo spettro di assorbanza tra 750 e 350 nm.

Le assorbanze a 720 nm (*Tetraselmis suecica* e *Dunaliella salina*) e a 730 nm (*Phaeodactylum tricorutum*) sono state sottratte a quelle indicate nelle formule a seguire (Ritchie, 2006) per la quantificazione delle clorofille.

Tetraselmis suecica, *Dunaliella salina* (in soluzione di acetone 90%)

$$\text{Chl } a \text{ } (\mu\text{g/ml}) \approx (-1,7858 \times A_{647}) + (11,8668 \times A_{664})$$

$$\text{Chl } b \text{ } (\mu\text{g/ml}) \approx (18,9775 \times A_{647}) - (4,895 \times A_{664})$$

Phaeodactylum tricorutum (in soluzione di metanolo)

$$\text{Chl } a \text{ } (\mu\text{g/ml}) \approx (-2,6839 \times A_{632}) + (13,2654 \times A_{665})$$

$$\text{Chl } c_1 + c_2 \text{ } (\mu\text{g/ml}) \approx (28,8191 \times A_{632}) - (6,0138 \times A_{665})$$

Queste formule sono in grado di stabilire il quantitativo di clorofilla (*a*, *b*, *c*) in un volume. Per ricavare il quantitativo di clorofilla in ogni cellula del nostro campione, il valore ottenuto da ogni equazione è stato suddiviso per il numero di cellule presenti nel volume di coltura campionato.

2.5 Quantificazione delle proteine

I campioni per la quantificazione delle proteine, come quelli per i pigmenti, sono stati raccolti in fase esponenziale. Il volume necessario alla quantificazione è di 1 mL per le 2 microalghe verdi e di 2 mL per la diatomea *Phaeodactylum tricorutum*. I campioni sono stati trattati tutti in acetone (poi rimosso dopo centrifugazione 16000xg per 10 minuti) per favorire lo sbiancamento del pellet ed evitare che i pigmenti interferiscano con la lettura dell'assorbanza a 750 nm.

Il protocollo utilizzato segue il metodo di Lowry per la quantificazione delle proteine (Waterborg & Matthews, 1994). Questo protocollo richiede una retta standard che ci permetta di determinare, in base ad essa, il quantitativo di proteine del campione, e tre soluzioni chiamate Reagente A, B e soluzione SDS (Tabella 2 – 3).

Tabella 2-3: soluzioni necessarie alla quantificazione delle proteine (Waterborg & Matthews, 1994)

Reagente A	Volume
H ₂ O	1/4
CTC	1/4
NaOH 0,8M	1/4
10% SDS	1/4

Reagente B	Volume
Folin	1/5
H ₂ O	4/5

Soluzione SDS	Concentrazione finale
SDS 10%	SDS 1%
NaOH 0,8M	NaOH 0,1 M
H ₂ O	a volume

La retta standard è stata ottenuta analizzando 13 campioni con una nota concentrazione di Albumina di Siero Bovino (BSA), in quantità crescente da 0 µg fino a 125 µg. Lo stock di BSA ha una concentrazione di 1 mg/ml. Alla BSA viene aggiunto un volume di soluzione SDS, tale per cui, il volume finale sia 500 µL (Tabella 2 – 4).

Tabella 2-4: retta standard.

BSA (μg)	Soluzione SDS (μL)	Stock BSA (μL)
0	500	0
5	495	5
10	490	10
15	485	15
20	480	20
30	470	30
40	460	40
50	450	50
60	440	60
70	430	70
80	420	80
90	410	90
115	385	115
125	375	125

Una volta preparata la retta di taratura, sono stati aggiunti 500 μL di soluzione SDS (Tabella 2 – 3) anche ai campioni microalgali che da questo momento sono stati trattati in egual modo ai campioni della retta standard. Successivamente, sono stati aggiunti 500 μL di Reagente A (Tabella 2 – 3) a tutti i campioni, che sono stati vortexati e incubati per 10 minuti.

In fine, è stato aggiunto il Reagente B che necessita, con estrema velocità, che i campioni vengano vortexati e incubati, in attesa della lettura, per 30 minuti. Il reattivo Folin-Ciocalteu, interagendo con le proteine in ambiente alcalino, porta al viraggio del colore del campione che in base al quantitativo di proteine appare più o meno blu.

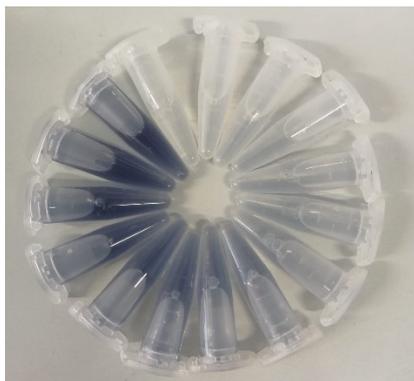


Figure 2-1: retta di taratura che mostra come, la quantità crescente di proteine e quindi l'alcalinità del mezzo, porti al viraggio del colore del campione.

Dopo 30 minuti i campioni sono stati acquisiti allo spettrofotometro ONDA UV-31, ad una sola lunghezza d'onda, 750 nm (Waterborg & Matthews, 1994).

Per l'acquisizione è stata usata una cuvetta in quarzo (Quartz SUPRASIL by Hellma ®, light path 10 mm). L'acqua Milli-Q è stata utilizzata come bianco del saggio in un volume pari a 800 µL.

Le assorbanze relative alla retta standard sono state usate per generare una retta con la relativa equazione:

$$y = (k \cdot x) + m$$

In questa equazione la x corrisponde all'incognita e quindi ad i µg di proteine nel campione. La y corrisponde all'assorbanza acquisita; k è il coefficiente angolare (pendenza) della retta; m è l'ordinata del punto di intersezione tra la retta e l'asse y .

Grazie a questa semplice equazione, e alle assorbanze acquisite, è stato possibile calcolare prima il contenuto in µg di proteine nella cuvetta per poi determinare tale contenuto in ogni cellula.

2.6 FTIR (*Fourier-transform infrared spectroscopy*)

L'analisi FTIR (Spettroscopia IR a trasformata di Fourier) è una tecnica basata sull'assorbimento, da parte di un solido, liquido o gas, della radiazione infrarossa, attraverso l'analisi delle vibrazioni dei legami chimici. In questo modo, con l'operazione matematica chiamata trasformata di Fourier, è possibile determinare sia le lunghezze d'onda assorbite che l'intensità di assorbimento.

Nel caso delle microalghe sperimentali, l'analisi FTIR ha permesso di determinare la composizione organica della cellula in carboidrati, lipidi e proteine attraverso la vibrazione dei legami chimici dei gruppi funzionali che li riguardano (Giordano *et al.*, 2001; Hirschmugl *et al.*, 2006; Ferro *et al.*, 2019; Ratti *et al.*, 2013; Hirschmugl *et al.*, 2006; Jebsen *et al.*, 2012).

I campioni, costituiti da un volume pari a 6 mL di coltura, utili a quest'analisi sono stati raccolti in fase esponenziale. Una volta centrifugati a 3500xg, e quindi separate le cellule dalla fase liquida, sono stati effettuati 3 successivi lavaggi in ammonio formato 0,5 M (Domenighini & Giordano, 2009). La soluzione di ammonio formato ha la medesima concentrazione di sali del mezzo AMCONA, ma è volatile, per cui una volta esposto il campione ad elevate temperature, la biomassa microalgale può essere analizzata senza subire interferenza da possibili precipitati di sali. Alla fine dei lavaggi, il pellet è stato risospeso in 110 µL di ammonio formato 0,5 M. In volume pari a 50 µL per replica, è stato posto su dischetti, che fungono da superficie trasparente alla radiazione infrarossa, e seccati ad una temperatura di 80°C per almeno 4 ore. Insieme ai campioni, è stato preparato anche il bianco, 50 µL di ammonio formato 0,5 M.

È stato utilizzato lo spettrofotometro Bruker Tensor 27 IR ©, accoppiato al Software OPUS 6.0. Per cui, una volta seccati i campioni, sono stati inseriti nel portacampione dello strumento e acquisiti. Il bianco è stato acquisito sempre per primo, per poi essere seguito dai campioni. I campioni sono stati acquisiti nell'intervallo di assorbimento che va da 4000 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹ con

una risoluzione dello spettro pari a 4 cm^{-1} . Quest'intervallo è stato necessario alla quantificazione dei pool di macromolecole di interesse.

Una volta acquisiti i dati, gli spettri sono stati analizzati nel range di assorbimento tra 1800 cm^{-1} e 700 cm^{-1} in cui ricade l'assorbanza dei legami vibrazionali di lipidi, proteine e carboidrati come mostra la Tabella 2 – 5.

Macromolecole	Spettro di assorbimento (cm^{-1})	Legami coinvolti
Lipidi	~1740	C = O di gruppi funzionali esteri, per lo più provenienti da lipidi e acidi grassi.
Proteine	~1650	C = O di amidi associati alle proteine.
Carboidrati	~1200–900	C – O – C dei polisaccaridi.

Tabella 2-5: Tabella che mostra lo spettro di assorbimento FTIR per il pool di macromolecole di interesse (Mario Giordano et al., 2001).

2.7 Analisi *in vivo* dell'efficienza fotosintetica: Dual-PAM-100 (Parametri fotosintetici da fluorescenza variabile modulata)

Come detto al paragrafo 1.4, l'energia assorbita dalle clorofille può seguire tre diverse vie, fotochimica, dissipazione come calore o emissione di fluorescenza. Questa caratteristica permette, attraverso particolari protocolli e strumenti ottimizzati per analizzare campioni vegetali, di ottenere informazioni riguardo l'utilizzo della luce in fotochimica o la sua dissipazione analizzando la fluorescenza di campioni vegetali *in vivo*.

L'analisi della fluorescenza delle clorofille ha permesso di caratterizzare l'attività del PSII nelle tre specie oggetto di studio. Nel caso di *T. suecica* e *D. salina* è stato possibile valutare simultaneamente anche lo stato del PSI (assorbanza del P700+), dato di una certa rilevanza nel presente lavoro di tesi per via del fatto che in esso sono contenuti centri Fe-S. Lo strumento Dual-PAM-100 permette infatti l'analisi in "doppio canale" (Fluo + P700), caratterizzando quindi in simultanea PSII e PSI attraverso l'uso di diverse tipologie di luci.

- Luce "di misura": F ML ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (ON Int – 10) è la luce in grado di valutare ed acquisire la fluorescenza a livello del PSII;
- luce attinica (Actinic Light), è la luce in grado di indurre il processo fotosintetico nel campione, saturando o meno la sua capacità fotosintetica a seconda dell'intensità della luce;
- impulso di saturazione (Saturation Pulse), di elevata intensità ($6000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) ma breve durata (600 ms), che saturando temporaneamente tutti i fotosistemi, permette di stimare la quantità di energia utilizzata per la fotochimica o dissipata attraverso il calcolo di numerosi parametri (vedi Tabella 2 – 8).
- P ML (ON Int – 15) (Measuring Light) che permette di monitorare continuamente l'attività del PSI;
- luce nel rosso lontano (Int – 10) (Far Red Light) (720 nm) può facilmente eccitare il dimero speciale del PSI poiché assorbita dai pigmenti che lo compongono e ci consente di determinare la variazione massima del P700 nel passaggio dallo stato completamente ridotto a quello completamente ossidato (Pm).

In questa tesi sono stati utilizzati dei protocolli di "Light curves", in cui il campione è esposto a 20 step di illuminazione successivi da 0 a circa 2000 PAR, ognuno della durata di 60 secondi e che si conclude con un saturation pulse per il calcolo dei vari parametri (Tabella 2-6).

Parametri	Descrizione
Pm	Variazione massima del P700 nel passaggio allo stato completamente ridotto a quello completamente ossidato.
Y(I)	Resa quantica fotochimica del PSI che è definito dalla frazione di P700 complessiva che in un dato stato è ridotta e non limitata dal sito accettore.
Y(ND)	Resa quantica non fotochimica di PSI e rappresenta la frazione di P700 complessiva che viene ossidata in un dato stato (Christof & Ulrich, 1994).
Y(NA)	Resa quantica non fotochimica di PSI e rappresenta la frazione di P700 complessiva che non può essere ossidata da un impulso di saturazione in un dato stato a causa della mancanza di accettori (Christof & Ulrich, 1994).
ETR(I)	Trasferimento di elettroni attraverso il PSI (Miyake <i>et al.</i> , 2005).
ETR(II)	Trasferimento di elettroni attraverso il PSII (Miyake <i>et al.</i> , 2005).
Y(II)	Resa quantica del PSII (Genty <i>et al.</i> , 1989).
qP	È una misura complessiva di ricettività “apertura” dei centri di reazione del PSII e può variare da 1 (definito per stato adattato al buio) a 0 (tutti i centri PS II chiusi).
qL	Frazione dei centri di reazione del PSII aperti e può variare da 0 ad 1.
NPQ	Dissipazione di fluorescenza non fotochimica.
Fv/Fm	Massima efficienza quantistica della fotochimica del PSII.

Tabella 2-6: parametri, e relativa descrizione, ottenuti a seguito di una Light Curve necessari alla comprensione complessiva della cinetica luminosa.

Considereremo solo 3 di questi parametri che serviranno alla comprensione dei risultati:

Y(II) che indica la resa quantica del PSII e può essere calcolata con la formula (Genty *et al.*, 1989):

$$Y(II) = \frac{Fm' - F}{Fm'}$$

I valori di questo parametro variano tra 0 e 1, Un campione può avere nel tempo valori differenti di Y(II) a seconda dello stato di illuminazione dello stesso. Un valore pari a 0,5 indica che la metà dei quanti assorbiti è utilizzata per l'evento fotosintetico e la conversione dell'energia luminosa in chimica, mentre l'altra metà viene dissipata come calore o sotto forma di fluorescenza.

NPQ (non-photochemical quenching) è un parametro che indica la dissipazione di fluorescenza non fotochimica, cioè non riconducibile all'attivazione per la fotosintesi. Generalmente, la gran parte del NPQ è riconducibile alla dissipazione di energia assorbita sotto forma di calore, in presenza di eccesso di energia luminosa con la regolazione negativa del PSII come meccanismo protettivo dell'apparato fotosintetico e può essere calcolato attraverso l'equazione:

$$NPQ = \left(\frac{Fm}{Fm'} \right) - 1$$

Infine, l'ultimo parametro considerato è Y(I) che indica la resa quantica fotochimica del PSI che è definito dalla frazione di P700 complessiva che in un dato stato è ridotta e non limitata dal sito accettore. Y(I) viene calcolato dalla resa quantica complementare del PSI attraverso i parametri Y(ND) ed Y(NA).

$$Y(I) = 1 - Y(ND) - Y(NA)$$

in cui Y(ND) è la frazione complessiva del P700 ossidata in un dato stato, e Y(NA) corrisponde alla frazione complessiva del P700 che non può essere ossidata (e effettuare l'evento fotochimico).

Preparazione delle colture per l'analisi al Dual-PAM-100:

Le cellule microalgali di *T. suecica*, *D. salina* e *P. tricorutum* in condizione di controllo e a concentrazione limitante di zolfo sono state contate e poi raccolte attraverso centrifugazione 3500xg per 10 minuti al fine di ottenere:

- 6 milioni di cellule/ml per *Tetraselmis suecica*
- 6 milioni di cellule/ml per *Dunaliella salina*

- 20 milioni di cellule/ml per *Phaeodactylum tricorutum*

Le cellule di *T. suecica* sono state campionate il secondo giorno dall'inoculo, in fase esponenziale e tenute per una notte al buio per poi valutarne l'efficienza fotosintetica. Le cellule di *D. salina* e *P. tricorutum* sono state campionate il terzo giorno dall'inoculo, esposte per 40 minuti al buio in modo che la catena di trasporto degli elettroni sia completamente ossidata e i centri di reazione del PSII siano aperti e pronti ricevere l'impulso della cinetica luminosa (Baker, 2008).

2.8 Estratti di proteine totali e elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE)

Per ottenere degli estratti proteici totali, per prima cosa, sono stati raccolti campioni delle tre specie *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina* e *Phaeodactylum tricorutum*, a tutte le condizioni, in fase esponenziale, in un range che va da 60 a 100 mL. Dopo averli pellettati, e rimosso il surnatante, sono stati eseguiti tre successivi lavaggi in ammonio formato 0,5 M. Rimosso il surnatante, a seguito dell'ultimo lavaggio, i campioni sono stati congelati fino all'utilizzo. Il pellet è stato risospeso in 500 μ L di mezzo di estrazione così composto: 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8), 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 (Giordano et al., 2000). Per i campioni di *Tetraselmis suecica* e *Phaeodactylum tricorutum* la sospensione ottenuta è stata inserita nel portacampione della Nitrogen Bomb (4639 Cell Disruption Vessel; Parr Instrument Company, Molin, IL, USA) al fine di ottenere la lisi del campione attraverso la pressione esercitata dall'azoto che entrando nelle cellule ad una pressione di 2000 psi (\sim 137 bar) per 10 minuti, favorisce la rottura della parete cellulare. Nel caso di *Dunaliella salina*, data l'assenza di una parete rigida, l'estrazione è invece avvenuta manualmente per lisi meccanica utilizzando un omogenizzatore Potter in sostituzione della bomba ad azoto.

Al volume di estratto ottenuto (da entrambe le tipologie di rottura delle cellule), è stato aggiunto del Triton X-100 (0,1 % w/v) e glicerolo (10 % w/v) su un volume finale di 600 μ L, vortexato e tenuto per 15 minuti in ghiaccio. Il campione è stato poi centrifugato a 1500xg per 10 minuti, il cui surnatante è l'effettivo estratto proteico totale. L'estratto proteico ottenuto è stato quantificato con il metodo Lowry (Materiali e Metodi 2.4) per ottenerne il quantitativo μ g/ μ L per ogni campione da utilizzare per la visualizzazione delle proteine in SDS-PAGE (SDS: Sodio Dodecil Solfato; PAGE: Polyacrilamide Gel Electrophoresis). Il Sodio Dodecil Solfato è un detergente anionico, con carica negativa, che annulla la carica propria delle proteine e le carica negativamente. Il gel di poliacrilammide è stato utilizzato ad una concentrazione del 12,5%, così costituito (Tabella 2 – 7):

Soluzioni	Running (mL)	Stacking (mL)
Acrylamide bis-solution % ^{a)}	4,17	0,835
Tris-HCl pH 8,8 1,5 M	2,5	-
Tris-HCl pH 8,8 0,5 M	-	1,25
H ₂ O	3,29	2,895
SDS 10%	0,1	0,05
Temed	0,015	0,0075
APS 10%	0,03	0,015
Volume finale	10 mL	5 mL

Tabella 2-7: Soluzioni utilizzate per la preparazione del gel di poliacrilammide: al centro il quantitativo in mL delle soluzioni per la preparazione del Running gel (che divide le proteine in base al loro peso molecolare) e a destra il quantitativo in mL delle soluzioni per la preparazione dello Stacking gel (che aiuta l'impacchettamento delle proteine che in questo modo potranno iniziare a migrare dallo stesso punto di partenza).

I campioni sono stati preparati aggiungendo ad una quantità fissata di estratto proteico (25, 40 o 50 μ g proteine), acqua MQ, Sample Buffer 4X (Tris HCl pH 6,8 0,25 M; SDS 4%; glicerolo 40%;

10% β mercaptoetanolo; 2% μ L blu di bromofenolo stock [0,1g/ml]) a volume con MQ) tenuti a temperatura ambiente per 30 minuti per favorire la solubilizzazione e poi centrifugati a 16000xg per 5 minuti. Una volta polimerizzato il gel, è stato caricato il surnatante di ogni campione di estratti proteici in quantità pari a 25 e 50 μ g per *Dunaliella salina* e *Tetraselmis suecica*, e in quantità pari a 25 e 40 μ g per *Phaeodactylum tricornutum* (Tabella 2 – 8).

Organismo	μg/μL	25 μg (μL)	50 μg (μL)
<i>D.s.</i> CTR	6	4,1	8,2
<i>D.s.</i> LS	2,8	8,6	17,3
<i>T.s.</i> CTR	7,8	3,1	6,3
<i>T.s.</i> LS	6,7	3,7	7,4

Organismo	μg/μL	25 μg (μL)	40 μg (μL)
<i>P.t.</i> CTR	1,7	14,6	23,4
<i>P.t.</i> LS1	1,4	17,3	27,7
<i>P.t.</i> LS2	1,2	19,3	30,9

Tabella 2-8: In Tabella, lungo la seconda colonna, è riportato il risultato dell'estrazione di proteine totali espresso in μ g/ μ L; sulla terza colonna è indicato il quantitativo in μ L dell'estratto proteico da utilizzare per caricare in elettroforesi 25 μ g di estratto; mentre nella colonna a destra per *T. suecica* e *D. salina* il quantitativo in μ L dell'estratto proteico da utilizzare per caricare in elettroforesi 50 μ g di estratto e per *P. tricornutum* quello per caricarne 40 μ g.

Il marker utilizzato durante la corsa elettroforetica è il Protein Marker IV (pre-stained), PeqGOLD 10-170 KDa (VWR) (Figura 2 – 2).

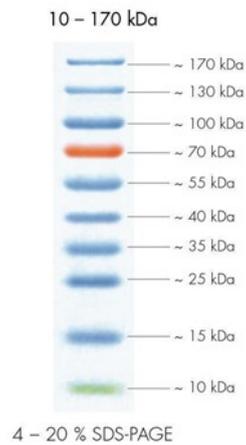


Figure 2-2: Protein Marker IV (pre-stained), PeqGOLD 10-170 KDa.

Alla fine della corsa elettroforetica, i gel sono stati colorati in Blue di Coomassie (V_f 1 L: 50% metanolo; 0,1% Coomassie; 10% acido acetico), che si lega alle proteine attraverso interazioni ioniche tra i gruppi acidi solfonici e i gruppi amminici delle proteine, oltre che tramite legami di Van der Waals. Alla colorazione, segue la decolorazione con soluzione Destaining: 30% metanolo e 10% acido acetico in H₂O mQ. L'immagine dei gel è stata acquisita con Chemidoc XRS + Image (BIO-RAD Laboratories Inc.) che permette di visualizzare il segnale fluorescente dato dal Coomassie e catturare l'immagine.

3 Risultati

3.1 Crescita algale

La crescita algale delle specie sperimentali, *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina* e *Phaeodactylum tricornutum*, in condizioni di controllo e a concentrazioni limitanti di solfato nel mezzo di coltura, è stata seguita per 10 giorni. Le concentrazioni sono state scelte dopo alcuni esperimenti preliminari con diverse concentrazioni di solfato nel mezzo di coltura. Per la caratterizzazione fisiologica è stata scelta una sola condizione (LS) per le due microalghe verdi *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina*, e due condizioni limitanti per la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* (indicate come LS1 e LS2). Queste condizioni in limitazione da solfato sono state scelte sulla base del fatto che si dimostrano limitanti per la crescita microalgale senza inficiarne la sopravvivenza.

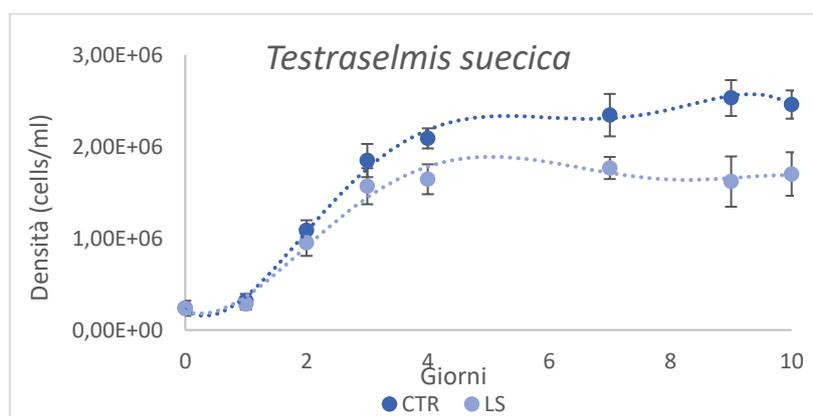


Figura 3-1: Immagine delle colture (in alto) e curve di crescita della microalga *Tetraselmis suecica* in condizione di controllo (blu) e in condizione limitante da solfato (azzurro). I dati sono presentati come media \pm deviazione standard (n = 3)

Come si osserva dalle curve di crescita (Figura 3 – 1), *Tetraselmis suecica* ha una fase lag di 1 giorno per poi avere crescita esponenziale fino al terzo giorno con una densità cellulare di circa 1,8 milioni di cellule/ml per la condizione di controllo e di circa 1,6 milioni di cellule/ml per la condizione in limitazione da solfato. Dopo il terzo giorno la crescita rallenta raggiungendo lo stato stazionario. Il numero di cellule al decimo ed ultimo giorno, dall'inizio dell'esperimento, è pari a circa 2,5 milioni di cellule/ml per il controllo, e 1,7 milioni di cellule/ml per la condizione in solfato limitazione, quindi si assiste ad un lieve aumento della concentrazione cellulare in coltura nel controllo ma non in condizioni di limitazione da solfato.

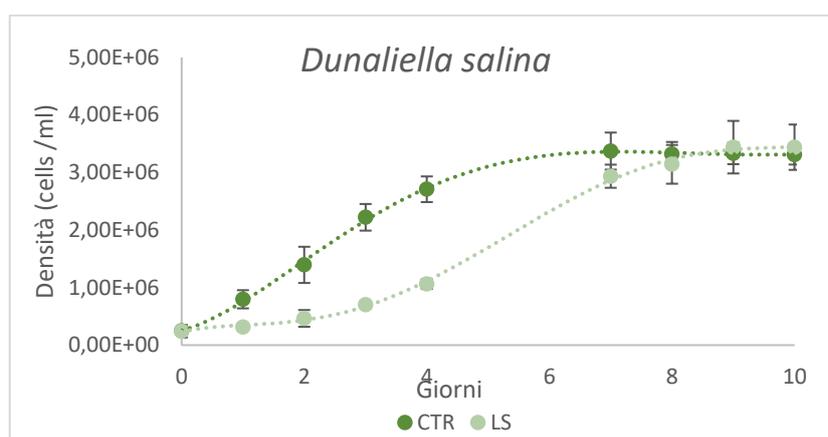


Figura 3-2: Immagine delle colture (in alto) curve di crescita della microalga *Dunaliella salina* in condizione di controllo (verde) e in condizione limitante di solfato (verde chiaro). I dati sono presentati come media \pm deviazione standard (n = 3).

Nel caso di *Dunaliella salina* in condizioni controllo, la crescita microalgale non mostra una chiara fase lag, crescendo esponenzialmente sin dal giorno 0 per poi raggiungere il culmine della crescita esponenziale intorno al 3° – 4° giorno. Al contrario, la condizione in limitazione da solfato ha una crescita evidentemente rallentata e la fase stazionaria si raggiunge solo nei giorni 9 e 10. Ciò nonostante, *Dunaliella salina*, come si può notare dalla (Figura 3 – 2), alla fine della fase stazionaria raggiunge pressoché il medesimo numero di cellule nei due campioni (circa 3,4 milioni di cellule/ml).

Phaeodactylum tricornutum, invece, è la microalga, tra le tre, più sensibile alla carenza di zolfo. Per questa specie, a causa dell'esigua crescita, le analisi sono state condotte su due concentrazioni di limitazione da S, di cui LS2 è analoga alle altre specie mentre LS1 è lievemente più alta ma comporta comunque una differenza nel colore della coltura. Saranno indicate LS1 e LS2 in cui la prima ha una concentrazione di solfato 10 μ M in più rispetto alla seconda.

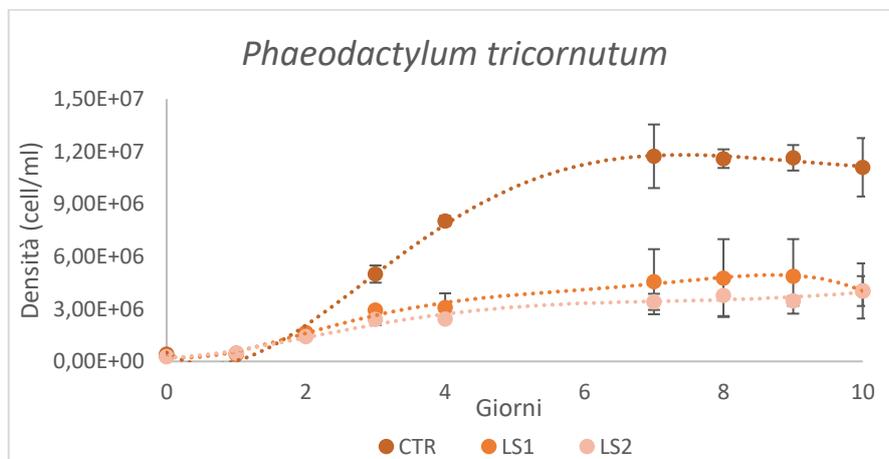


Figura 3-3: Immagine delle colture (in alto) e delle curve di crescita di *Phaeodactylum tricoratum* in condizione di controllo (marrone) e nelle due condizioni in limitazione da solfato LS1 (arancio) e LS2 (rosa). I dati sono presentati come media \pm deviazione standard (n = 3).

Come si osserva nella (Figura 3 – 3) la fase lag di questa specie perdura per 1 solo giorno per poi iniziare a crescere esponenzialmente. La coltura controllo mostra crescita esponenziale per più giorni e raggiunge una concentrazione finale di cellule/ml pari a 8 milioni, circa 2,6 volte più alta che in condizioni di limitazione da solfato. In entrambe le colture sottoposte a limitazione da solfato già al 4 giorno le cellule sembrano entrare in fase stazionaria, dal momento che il numero di cellule/ml (~3 milioni) resta pressochè costante nei giorni successivi.

La crescita nelle condizioni scelte è stata ripetuta in diverse repliche sperimentali al fine di campionare in fase medio-esponenziale per le varie analisi per la caratterizzazione fisiologica delle colture di seguito presentate.

3.2 Tasso massimo di crescita

Il tasso massimo di crescita è stato determinato considerando la fase esponenziale delle curve di crescita mostrate in (Figura 3 – 1, 2, 3). L'intervallo temporale utilizzato per il calcolo è quindi sia specie – che condizione – specifico.

Tetraselmis suecica ha un tasso massimo di crescita per la condizione di controllo pari ad una media di $\mu_{\max} = 0,88 \pm 0,10$. Non dissimile è la media dei valori per la condizione in limitazione da solfato, per cui si ha un valore $\mu_{\max} = 0,86 \pm 0,11$.

Dunaliella salina, tra le tre specie, è quella con il più basso tasso di crescita che in questo caso ha valori $\mu_{\max} = 0,41 \pm 0,06$ per la condizione di controllo, e $\mu_{\max} = 0,35 \pm 0,02$ per la condizione in limitazione da solfato. Da notare che l'intervallo temporale utilizzato per il calcolo del tasso massimo di crescita per la condizione di controllo (giorni 1 – 4) differisce da quello esaminato per

la condizione in solfato limitazione (giorni 3 – 7) a causa di un evidente prolungamento della fase lag in questi ultimi.

Infine, la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*, mostra il più alto tasso massimo di crescita in condizione di controllo ($\mu_{\max} = 1,24 \pm 0,11$), con valori decrescenti per le due condizioni in limitazione da solfato LS1 ($\mu_{\max} = 0,92 \pm 0,02$) e LS2 ($\mu_{\max} = 0,84 \pm 0,10$). Nonostante il tasso di crescita sia comunque alto in condizioni di limitazione da solfato, va sottolineato che in questi campioni la crescita si arresta molto repentinamente rispetto al controllo (Figura 3 – 4).

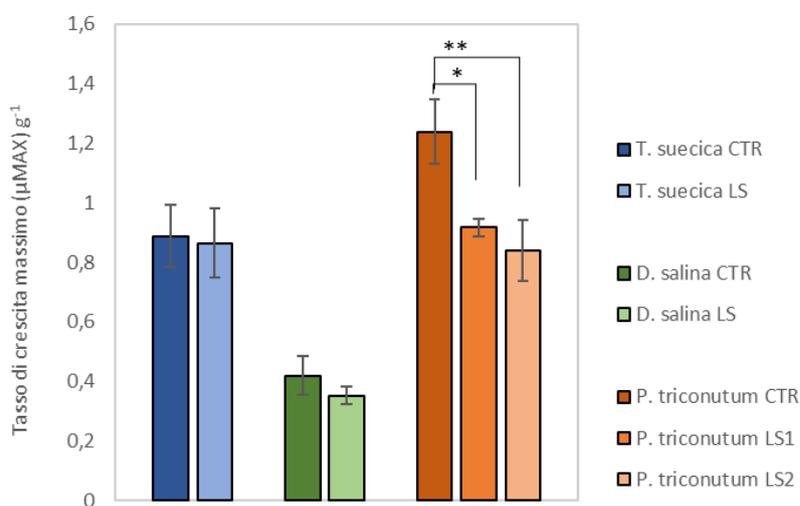


Figura 3-4: Tasso di crescita massimo (μ_{\max}) g⁻¹, di *Tetraselmis suecica* (blu), *Dunaliella salina* (verde) e *Phaeodactylum tricornutum* (arancio) mostrato sia per la condizione di controllo che per le condizioni in solfato-limitazione.

L'istogramma a sinistra rappresenta la condizione di controllo per ogni specie. A seguire le condizioni sperimentali, 2 per *P. tricornutum* (istogramma centrale LS1, istogramma a destra LS2), ed 1 per *T. suecica* e *D. salina* (a destra LS). I dati sono presentati come media \pm deviazione standard (n = 3). La significatività statistica è stata determinata attraverso l'analisi statistica T-Test. Per *Phaeodactylum tricornutum* è stata eseguita l'analisi statistica ANOVA ed il Turkey-Kramer post-hoc test di cui si mostra la significatività, tra le tre condizioni (significatività statistica indicata dagli asterischi relativi ai raggruppamenti). Gli asterischi rappresentano la significatività statistica della variazione del quantitativo di proteine rispetto alla condizione di controllo (* = p < 0.05; ** = p < 0.005; *** = p < 0.0005).

3.3 Biomassa e quantificazione di carbonio e azoto cellulare

Come tutte le precedenti analisi, anche la biomassa cellulare, espressa in pg/cell, è stata valutata in *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina* e *Phaeodactylum tricornerutum* in condizione di controllo e nelle rispettive condizioni di limitazione da solfato da campioni in fase esponenziale (Figura 3 – 5).

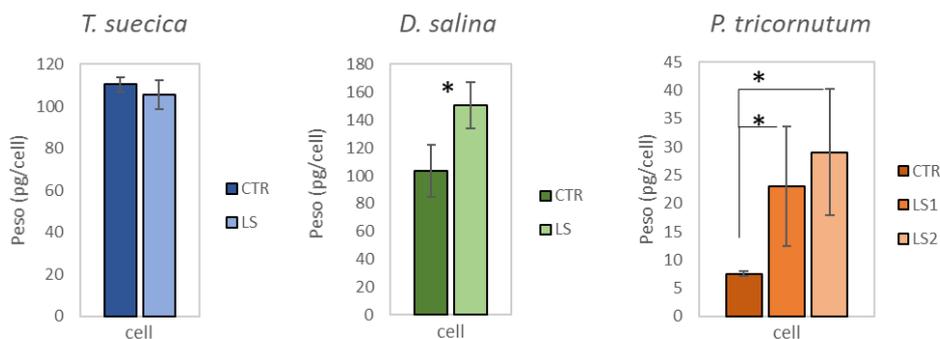


Figura 3-5: Peso secco cellulare (pg/cell) di: *Tetraselmis suecica* in condizione di controllo (blu) e in limitazione da solfato pari a LS (azzurro); *Dunaliella salina* in condizione di controllo (verde scuro) e in limitazione da solfato LS (verde chiaro); *Phaeodactylum tricornerutum* in condizione di controllo (marrone), in limitazione da solfato LS1 (arancio) e LS2 (rosa). Gli asterischi rappresentano la significatività statistica della variazione del quantitativo di proteine rispetto alla condizione di controllo (t test; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.005$; *** = $p < 0.0005$). Per *Phaeodactylum tricornerutum* è stata eseguita l'analisi statistica ANOVA ed il Turkey-Kramer post-hoc (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.005$; *** = $p < 0.0005$) test di cui si mostra la significatività, tra le tre condizioni (significatività statistica indicata dagli asterischi relativi ai raggruppamenti).

I dati di biomassa di *Tetraselmis suecica* in condizione di controllo e in limitazione da solfato mostrano un peso cellulare secco sostanzialmente invariato.

Dunaliella salina, all'opposto di *Tetraselmis suecica*, mostra un incremento del peso secco in condizione limitante da solfato del 30% rispetto alla condizione di controllo.

In *Phaeodactylum tricornerutum* il peso cellulare secco mostra un andamento crescente a partire dalla condizione di controllo ($7 \pm 0,5$ pg/cell), passando per la prima condizione in limitazione da

solcato LS1 (23 ± 10 pg/cell), fino ad arrivare al peso massimo di 29 ± 11 pg/cell in condizione di limitazione di solfato pari a LS2.

Il pellet cellulare seccato è anche stato utilizzato per l'analisi del quantitativo di carbonio e azoto nei diversi campioni in analisi.

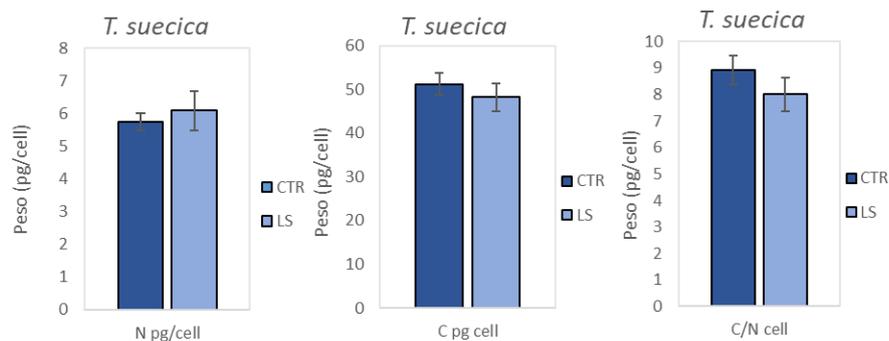


Figura 3-6: Composizione cellulare di *Tetraselmis suecica* del quantitativo di azoto (pg/cell) (a sinistra), di carbonio (pg/cell) (al centro) e del loro rapporto (a destra) in condizione di controllo (blu) e in limitazione da solfato LS (azzurro). a seguito dell'analisi statistica T-Test non sono emerse differenze significative.

Tetraselmis suecica non mostra differenze significative nei due campioni né per quanto riguarda il contenuto cellulare di C ed N né per il rapporto tra questi due elementi. (Figura 3 – 6).

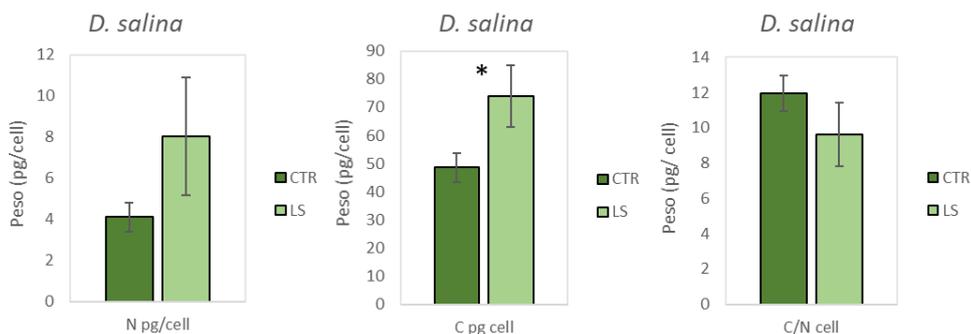


Figura 3-7: Composizione cellulare di *Dunaliella salina* del quantitativo di azoto (pg/cell) (a sinistra), di carbonio (pg/cell) (al centro) e del loro rapporto (a destra) in condizione di controllo (verde scuro) e in limitazione da solfato (verde chiaro). Gli asterischi rappresentano la significatività statistica della variabilità del contenuto in pg/cell di carbonio e azoto, e del loro rapporto, tra la condizione di controllo e quella in limitazione di solfato (t test; * = $p < 0.05$).

In *Dunaliella salina* la differenza nel quantitativo in pg/cell di azoto e carbonio tra la condizione di controllo e quella in limitazione da solfato LS è più marcata rispetto a quella esistente in *Tetraselmis suecica*. Il quantitativo di azoto in condizione di solfato-limitazione tende all'aumento, rispetto alla condizione di controllo, mostrando una differenza che però non risulta statisticamente significativa, mentre, il quantitativo di carbonio è 1,5 volte superiore in condizione limitante da solfato ($73,9 \pm 10$ pg/cell) rispetto alla condizione di controllo in cui si ha un valore espresso in pg/cell pari a $48,7 \pm 5$. Infine, il rapporto tra i due elementi ha valore di $11,9 \pm 1$ in condizione di controllo, e $9,6 \pm 1,8$ in limitazione da solfato LS (Figura 3 – 7).

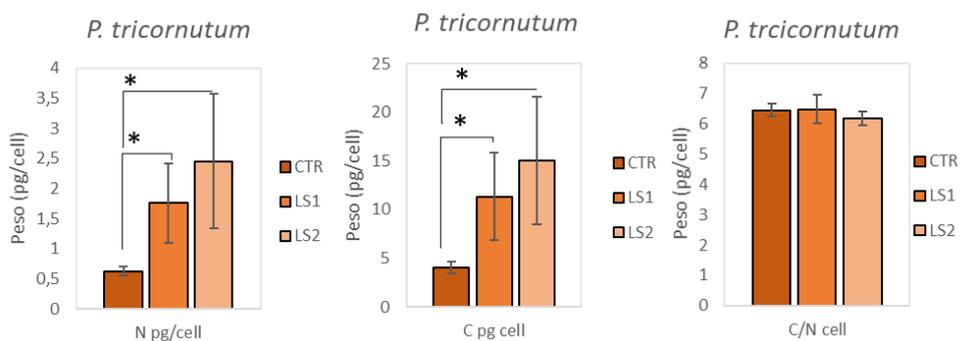


Figura 3-8: Composizione cellulare di *Phaeodactylum tricornutum* del quantitativo di azoto (pg/cell) (a sinistra), di carbonio (pg/cell) (al centro) e del loro rapporto (a destra) in condizione di controllo (marrone) e limitante di solfato LS1 (arancio) e LS2 (rosa). La significatività statistica è stata determinata attraverso l'analisi statistica ANOVA con il Turkey-Kramer post-hoc test di cui si mostra la significatività, tra le tre condizioni (significatività statistica indicata dagli asterischi relativi ai raggruppamenti). Gli asterischi rappresentano la significatività statistica della variabilità del contenuto in pg/cell di carbonio e azoto, e del loro rapporto, tra la condizione di controllo e quelle in limitazione di solfato (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.005$; *** = $p < 0.0005$).

Phaeodactylum tricornutum mostra un andamento crescente nel quantitativo di azoto e carbonio al diminuire del quantitativo di solfato nel mezzo. Il quantitativo di azoto in condizione di controllo pari a $0,6 \pm 0,06$ pg/cell, è 2,8 volte inferiore rispetto alla condizione in limitazione di solfato LS1 ($1,75 \pm 0,6$ pg/cell) e 4 volte inferiore rispetto alla condizione limitante da solfato LS2 ($2,45 \pm 1,1$ pg/cell). Il valore del quantitativo di carbonio per la condizione di controllo è $4 \pm 0,6$ pg/cell, 2,8

volte inferiore del quantitativo presente in condizione di limitazione da solfato LS1 ($11,33 \pm 4,4$ pg/cell) e 3,75 volte inferiore al quantitativo di carbonio della condizione limitante di solfato LS2 ($15 \pm 6,5$ pg/cell). Mostrando il medesimo andamento crescente, il rapporto tra i due elementi resta pressochè costante, con valore $6,43 \pm 0,2$ in condizione di controllo, $6,47 \pm 0,5$ in condizione di limitazione da solfato LS1 e $6,2 \pm 0,2$ in solfato-limitazione LS2 (Figura 3 – 8).

3.4 Quantificazione dello zolfo

La quantificazione degli elementi in traccia, attraverso l'analisi della fluorescenza a raggi X a riflessione totale, ha permesso di quantificare l'elemento zolfo per i campioni delle tre specie in condizione di controllo e limitante di solfato.

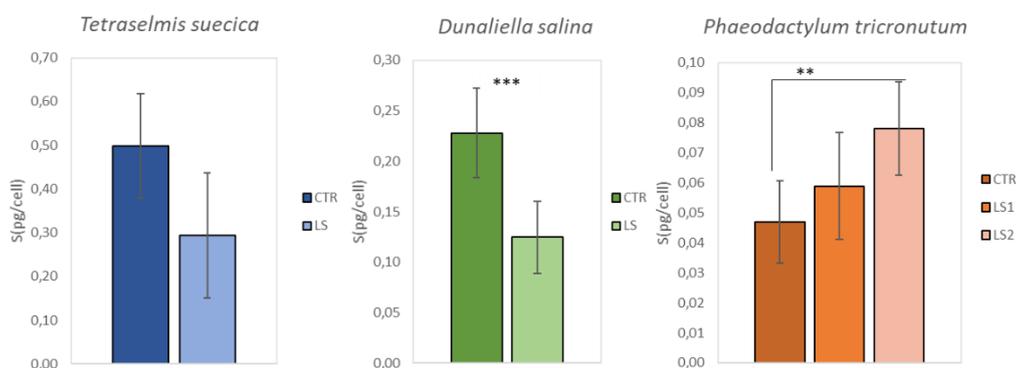


Figura 3-9: quantificazione dello zolfo (pg/cell) in *Tetraselmis suecica* (a sinistra) in condizione di controllo n = 3 (blu) e in limitazione da solfato n = 3 (azzurro); *Dunaliella salina* (al centro) in condizione di controllo n = 7 (verde scuro) e in limitazione da solfato n = 8 (verde chiaro); *Phaeodactylum tricorutum* (a destra) in condizione di controllo n = 8 (marrone) e in limitazione da solfato LS1 n = 7 (arancio) e LS2 n = 6 (rosa). Gli asterischi rappresentano la significatività statistica della variazione del quantitativo di proteine rispetto alla condizione di controllo (t test; * = p < 0.05; ** = p < 0.005; *** = p < 0.0005). Per *Phaeodactylum tricorutum* è stata eseguita l'analisi statistica ANOVA ed il Turkey-Kramer post-hoc (* = p < 0.05; ** = p < 0.005; *** = p < 0.0005) test di cui si mostra la significatività, tra le tre condizioni (significatività statistica indicata dagli asterischi relativi ai raggruppamenti).

La quantificazione dell'elemento zolfo di *Tetraselmis suecica* mostra un decremento della quantità di zolfo in condizione di crescita con meno solfato. In *Dunaliella salina* questa diminuzione è statisticamente significativa come visibile dalla Figura 3 – 9. In *Phaeodactylum tricornerutum* si ha invece più zolfo cellulare nelle cellule che crescono in limitazione da solfato (LS1, LS2), con un incremento statisticamente significativo tra la condizione di controllo e quella limitante da solfato LS2, rispetto al contenuto di cellule nella coltura controllo.

Organismo	C/S
<i>T.s.</i> CTR	102,8
<i>T.s.</i> LS	164,6
<i>D.s.</i> CTR	213,7
<i>D.s.</i> LS	592,9
<i>P.t.</i> CTR	85,8
<i>P.t.</i> LS1	192,4
<i>P.t.</i> LS2	192,6

Tabella 3-1: in tabella vengono mostrati i valori derivanti dal rapporto carbonio/zolfo in condizione di controllo (CTR) e in limitazione di solfato (LS) per tutte le specie.

Dalla quantificazione di carbonio e zolfo è stato possibile ottenere il rapporto tra i due elementi che come visibile dalla Tabella 3 – 1 subisce un incremento in carenza di solfato in tutte e tre le specie. Nello specifico, in *Tetraselmis suecica* si ha un decremento di tale rapporto di 1,6 volte in condizione di controllo rispetto a quella in limitazione da solfato. In *Dunaliella salina* tale rapporto subisce un incremento di 2,7 volte in condizione LS rispetto a quella di CTR. Infine, in *Phaeodactylum tricornerutum* le condizioni in carenza di solfato hanno mostrato il valore di tale rapporto incrementato di 2,2 volte rispetto alla condizione di controllo.

3.5 Analisi dei pigmenti

Attraverso le analisi dei pigmenti è stato possibile determinare il contenuto in clorofille delle tre specie *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina* e *Phaeodactylum tricorutum* sia in condizioni di controllo che in condizioni di limitazione da solfato.

Specie	Chl <i>a</i> (pg/cell)	Chl <i>b</i> (<i>T. s.</i> e <i>D. s.</i>) Chl <i>c</i> ₁ + <i>c</i> ₂ (<i>P. t.</i>) (pg/cell)	Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i> (<i>T. s.</i> e <i>D. s.</i>) Chl <i>a</i> /Chl <i>c</i> ₁ + <i>c</i> ₂ (<i>P. t.</i>)
<i>T. suecica</i> CTR	1,61 (± 0,26)	0,84 (± 0,16)	1,92 (± 0,1)
<i>T. suecica</i> LS	2,53 (±0,57)***	1,31 (± 0,33)***	1,96 (± 0,1)
<i>D. salina</i> CTR	1,56 (± 0,26)	0,32 (± 0,05)	4,93 (± 0,12)
<i>D. salina</i> LS	1,09 (± 0,13)***	0,19 (± 0,02)***	5,58 (± 0,15)***
<i>P. tricorutum</i> CTR	0,13 (± 0,01)	0,01 (± 0,001)	6,85 (± 0,55)
<i>P. tricorutum</i> LS1	0,15 (± 0,02) *	0,02 (± 0,003)	7,33 (± 0,7)
<i>P. tricorutum</i> LS2	0,17 (± 0,02) * (##)	0,02 (± 0,003)	8,36 (± 1,18) (#)

Tabella 3-2: Contenuto di clorofilla *a* e *b* in *Tetraselmis suecica* e *Dunaliella salina*; contenuto di clorofilla *a* e *c* in *Phaeodactylum tricorutum* in condizioni di controllo e nelle varie concentrazioni limitanti di zolfo. I dati sono presentati come media ± deviazione standard (*T. suecica* n = 13; *D. salina* n = 11; *P. tricorutum* CTR n = 8, LS1 n = 7, 1 LS2 n = 6). La significatività statistica è stata determinata attraverso l'analisi statistica T-Test. Gli asterischi rappresentano la significatività statistica della variazione del quantitativo di proteine rispetto alla condizione di controllo (* = p < 0.05; ** = p < 0.005; *** = p < 0.0005). Per *Phaeodactylum tricorutum* è stata eseguita l'analisi statistica ANOVA ed il Turkey-

Kramer post-hoc test di cui si mostra la significatività, tra le tre condizioni (significatività statistica indicata dagli asterischi rispetto alla condizione di controllo e dal cancelletto tra le condizioni in limitazione da solfato).

Dalla Tabella 3 – 1 si evince che il contenuto in clorofilla *a* di *Tetraselmis suecica* in condizione limitante da zolfo è più elevato (2,53 ± 0,57 pg/cell) di quella in condizione di controllo (1,61 ± 0,26 pg/cell). Lo stesso vale per il contenuto in clorofilla *b* che è pari a 1,3 ± 0,33 pg/cell in condizione limitante di zolfo, più alto di 0,84 ± 0,16 pg/cell che è il dato ottenuto in condizione di controllo. Il rapporto clorofilla *a/b* invece si dimostra essere costante tra le due condizioni.

In *Dunaliella salina* il contenuto di clorofilla *a* è pari a $1,56 \pm 0,26$ pg/cell in condizione di controllo mentre cala a $1,09 \pm 0,13$ pg/cell per la condizione di crescita in limitazione da zolfo.

Anche il contenuto di *b* diminuisce in condizioni di limitazione da solfato. Nonostante il decremento di entrambi i tipi di clorofilla, il loro rapporto varia ed è pari a circa 5,6 in condizione limitante da zolfo e 4,9 nel controllo.

Phaeodactylum tricornutum mostra un andamento crescente nel contenuto di clorofilla *a*, c_1+c_2 , e nel loro rapporto, dalla condizione di controllo alla condizione più limitante in contenuto di solfato nel mezzo (LS2). Nello specifico in condizione di controllo mostra un contenuto in clorofilla *a* pari a $0,13 \pm 0,01$ pg/cell; per LS1 e LS2 si ha un contenuto di clorofilla *a* rispettivamente di $0,15 \pm 0,02$ e $0,17 \pm 0,02$ pg/cell. I dati di clorofilla c_1+c_2 non mostrano differenze statisticamente significative, mentre i rapporti tra le clorofille sono pari a $6,85 \pm 0,55$ (CTR), $7,33 \pm 0,7$ (LS1), $8,36 \pm 1,18$ (LS2) mostrando una differenza significativa solo tra le due condizioni di solfato-limitazione.

3.6 Quantificazione delle proteine

Attraverso il protocollo Lowry sono state quantificate le proteine in tutte le specie e a tutte le condizioni di crescita. I dati acquisiti dall'analisi spettrofotometrica hanno permesso di esprimere il contenuto di proteine in peso (pg/cell).

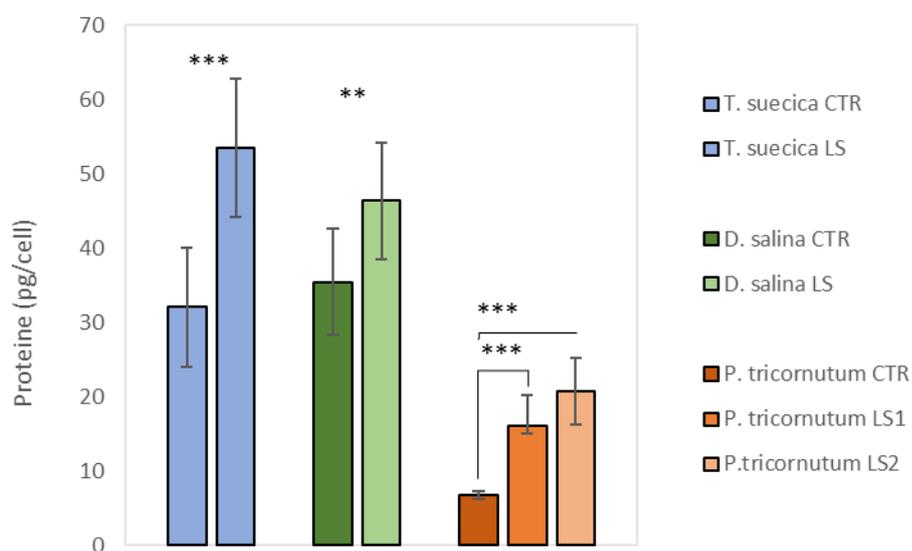


Figura 3-10: Quantificazione delle proteine espresse come pg/cell, in *Tetraselmis suecica* (blu), *Dunaliella salina* (verde) e *Phaeodactylum tricorutum* (marrone) sia per la condizione di controllo (istogrammi a sinistra) che per le condizioni in limitazione da zolfo (istogrammi a destra). I dati sono presentati come media \pm deviazione standard (*T. suecica* CTR n = 9, LS n = 8; *D. salina* n = 11; *P. tricorutum* CTR n = 8, 10 LS1 n = 6, LS2 n = 6). La significatività statistica è stata determinata attraverso l'analisi statistica T-Test. Gli asterischi rappresentano la significatività statistica della variazione del quantitativo di proteine (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.005$; *** = $p < 0.0005$). Per *Phaeodactylum tricorutum* è stata eseguita l'analisi statistica ANOVA ed il Turkey-Kramer post-hoc test di cui si mostra la significatività, tra le tre condizioni (significatività statistica indicata dagli asterischi relativi ai raggruppamenti).

È interessante notare, dalla Figura 3 – 10, come in condizioni di limitazione di zolfo, il contenuto proteico cellulare aumenti, a prescindere dalla specie considerata. Il contenuto di proteine in *Tetraselmis suecica* varia notevolmente tra la condizione di controllo (32 ± 8 pg/cell) e quella in limitazione da zolfo ($54,5 \pm 9,2$ pg/cell). Questa differenza è visibile anche in *Dunaliella salina* che in condizione di controllo ha un contenuto proteico cellulare espresso in pg/cell pari a $35,4 \pm 7,1$, mentre in limitazione da solfato LS ha un contenuto proteico di $46,3 \pm 7,9$ pg/cell. Infine, anche per *Phaeodactylum tricorutum*, si ha questo incremento nel contenuto proteico passando dalla condizione di controllo ($6,8 \pm 0,5$ pg/cell), alla prima condizione limitante LS1 ($16 \pm 4,2$ pg/cell) per poi giungere alla condizione in limitazione da zolfo LS2 ($20,8 \pm 4,4$ pg/cell).

3.7 Spettroscopia FTIR, rapporti delle macromolecole.

Grazie alla spettroscopia infrarossa, sono stati acquisiti dati sui rapporti macromolecolari delle specie *T. suecica*, *D. salina* e *P. tricornutum* per valutare come essi cambiano tra la condizione di controllo e la condizione in limitazione da zolfo.

Attraverso i rapporti FTIR e la quantificazione delle proteine con metodo Lowry (Materiali e Metodi 2.5; Risultati 3.6), è stato, inoltre, possibile risalire alla quantificazione stimata di lipidi e carboidrati, i cui risultati sono stati normalizzati sul controllo, che ha valore 1.

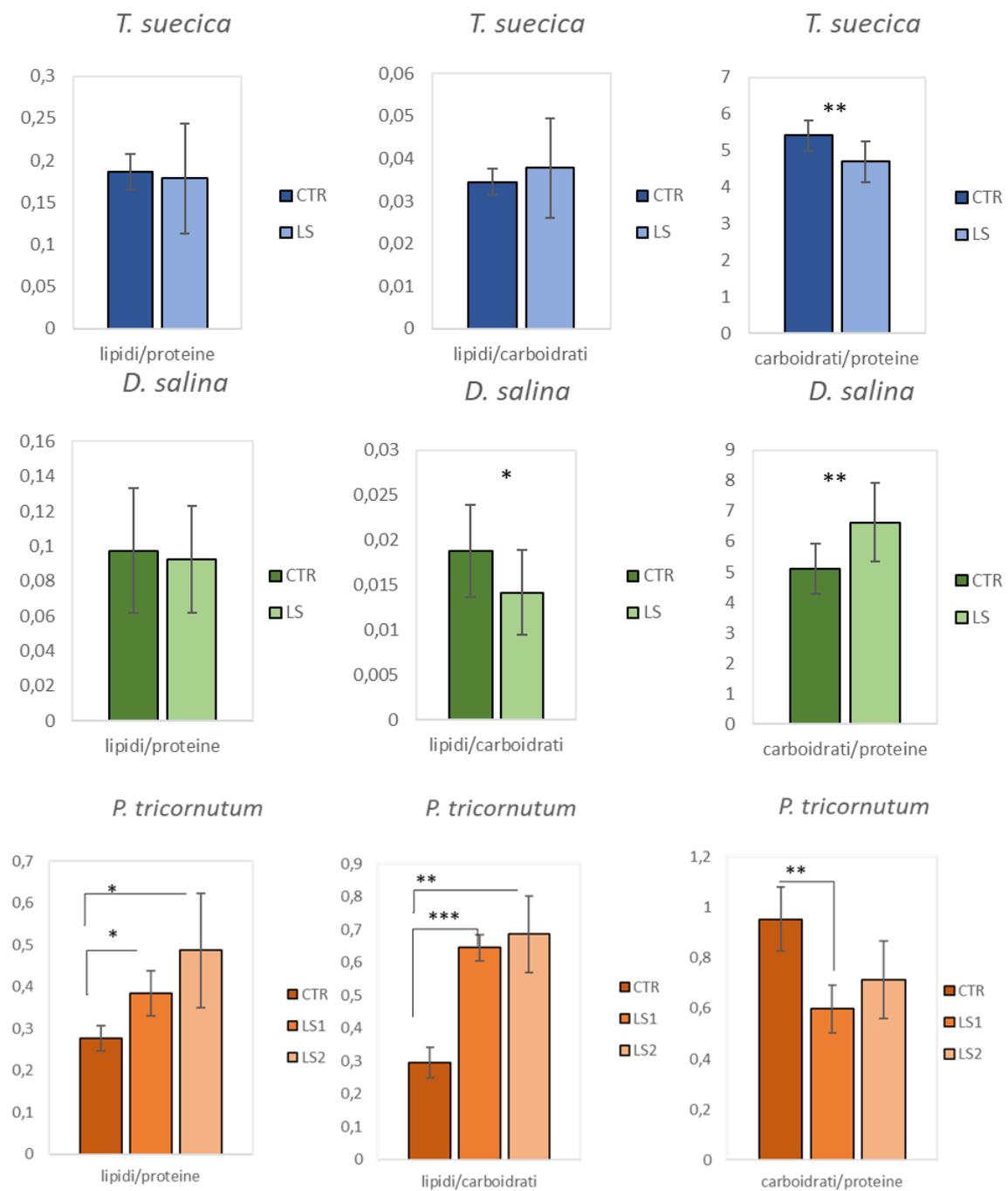


Figura 3-11: in figura sono mostrati i rapporti tra le macromolecole in: *Tetraselmis suecica* (in alto) in condizione di controllo (blu) e in condizione di limitazione dal solfato (LS) (azzurro); in *Dunaliella salina* (al centro) in condizione di controllo (verde scuro) e in condizione di limitazione dal solfato (LS) (verde chiaro); in *Phaeodactylum tricornutum* in condizione di controllo (marrone) e in condizione di limitazione dal solfato (LS1, arancio; LS2 rosa). Nella figura a sinistra viene mostrato il rapporto lipidi-proteine, in quella centrale il rapporto lipidi-carboidrati, mentre a destra il

rapporto carboidrati proteine. I dati sono presentati come media \pm deviazione standard: *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina* n = 12 campioni provenienti da 6 repliche biologiche indipendenti per tutte e due le condizioni; *Phaeodactylum tricorutum* n = 4 campioni provenienti da 2 repliche biologiche indipendenti per tutte le tre condizioni. La significatività statistica è stata determinata attraverso l'analisi statistica T-Test mentre per *Phaeodactylum tricorutum* è stata eseguita l'ANOVA ed il Turkey-Kramer post-hoc test di cui si mostra la significatività, tra le tre condizioni (significatività statistica indicata dagli asterischi relativi ai raggruppamenti). Gli asterischi rappresentano la significatività statistica dei rapporti FTIR tra le macromolecole (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.005$; *** = $p < 0.0005$).

Come si può notare dalla Figura 3 – 11 (in alto), nel caso di *Tetraselmis suecica*, solo il rapporto carboidrati/proteine mostra una differenza statisticamente significativa, con un calo in limitazione da solfato rispetto al controllo. I rapporti tra lipidi/proteine e quello tra lipidi/carboidrati restano invece pressochè invariati.

In *Dunaliella salina*, il rapporto lipidi/proteine resta pressochè invariato nelle due condizioni di crescita, mentre il rapporto lipidi carboidrati mostra un calo in limitazione da solfato ed il rapporto carboidrati/proteine, al contrario, un aumento.

Phaeodactylum tricorutum è la specie che mostra le differenze più marcate in limitazione da solfato. Sia il rapporto lipidi/proteine che, in misura maggiore, il rapporto lipidi/carboidrati aumentano a seguito della limitazione da solfato. Il rapporto carboidrati /proteine, al contrario, cala. (Figura 3 – 11, in basso).

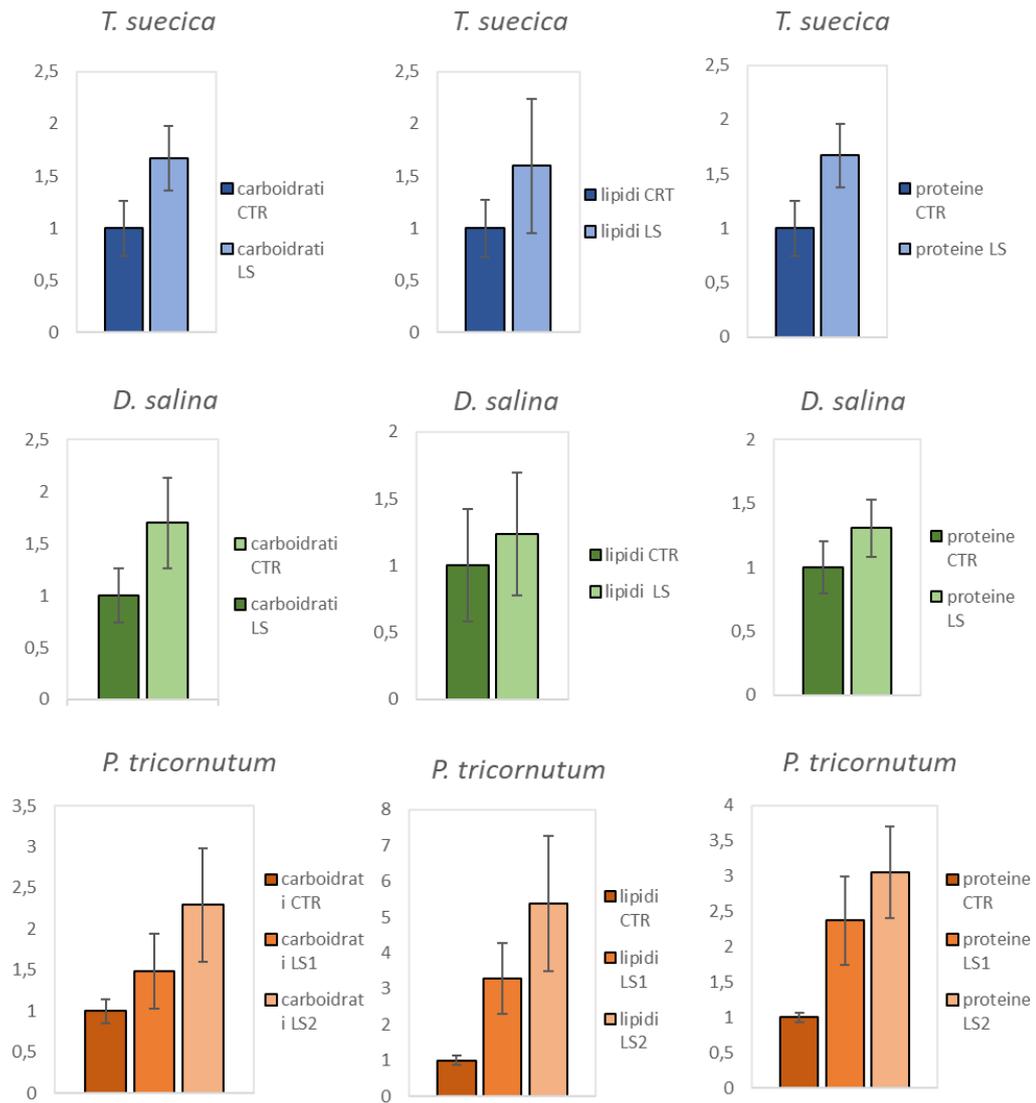


Figura 3-12: semiquantificazione di carboidrati (a sinistra) e lipidi (al centro) e dati normalizzati della quantificazione delle proteine (a destra) (*T.s.* CTR n = 9, LS n = 8n; *D.s.* n = 11; *P.t.* CTR n = 8, LS1 n = 6, LS2 n = 6) in: *Tetraselmis suecica* (in alto) in condizione di controllo (blu) e in condizione di limitazione dal solfato (LS) (azzurro); in *Dunaliella salina* (al centro) in condizione di controllo (verde scuro) e in condizione di limitazione dal solfato (LS) (verde chiaro); in *Phaeodactylum tricornutum* in condizione di controllo (marrone) e in condizione di limitazione dal solfato (LS1, arancio; LS2 rosa). I dati sono presentati come media \pm deviazione standard: *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina* n = 12 campioni provenienti da 6 repliche biologiche indipendenti per tutte e due le condizioni; *Phaeodactylum tricornutum* n = 4 campioni provenienti da 2 repliche biologiche indipendenti per tutte le tre condizioni.

La Figura 3-12 mostra la semiquantificazione di carboidrati e lipidi ottenuta dai dati del contenuto in proteine per cellula e dati rapporti macromolecolari del FTIR. Per ogni pool macromolecolare e specie in analisi, i valori sono normalizzati al valore nella condizione controllo, che risulta quindi pari a 1 in tutti i pannelli. Il trend generale, più accentuato nel caso di *Phaeodactylum*, è l'amento del contenuto di tutte le macromolecole nelle cellule in limitazione da solfato.

3.8 Efficienza fotosintetica

L'efficienza fotosintetica dei campioni è stata misurata PSI che per PSII in *Tetraselmis suecica* e *Dunaliella salina*, mentre nel caso di *Phaeodactylum tricornutum* sono state condotte analisi solo di fluorescenza *in vivo*, caratterizzando quindi solamente l'attività del PSII. I campioni sono stati esposti ad intensità luminosa crescente da 0 a circa 2000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, al fine di valutare l'efficienza dei fotosistemi e l'attivazione dei meccanismi di fotoprotezione al crescere dell'intensità luminosa. La massima efficienza quantica della resa fotochimica del PSII è indicata dal parametro Fv/Fm ed è presentata in Figura 3 – 13 per tutte le specie. In *Tetraselmis suecica* e in *Phaeodactylum tricornutum* i valori di Fv/Fm sono simili nelle diverse condizioni di crescita. In *Dunaliella salina* invece il parametro Fv/Fm in condizione di controllo ha valori pari a $0,6 \pm 0,02$, mentre il solfato limitazione ha valori pari a $0,69 \pm 0,018$.

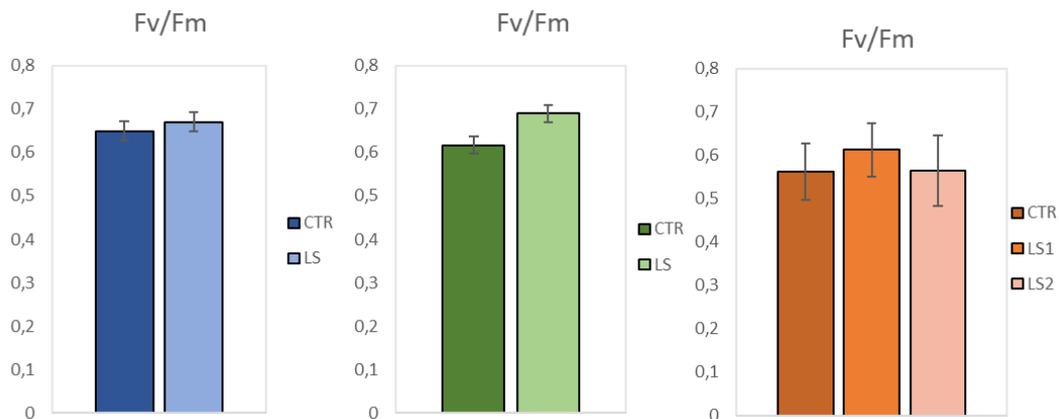


Figura 3-13: valori di F_v/F_m di: *Tetraselmis suecica* (a sinistra) in condizione di controllo n = 10 (blu) e in limitazione da solfato n = 11 (azzurro); *Dunaliella salina* (al centro) in condizione di controllo n = 7 (verde scuro) e in limitazione da solfato n = 7 (verde chiaro); *Phaeodactylum tricornutum* (a destra) in condizione di controllo n = 11 (marrone) e in limitazione da solfato LS1 n = 13 (arancio) e LS2 n = 11 (rosa).

In *Tetraselmis suecica* $Y(II)$, parametro che indica la resa quantica del PSII e quindi stima la frazione di energia luminosa fornita che viene utilizzata per la fotosintesi, diminuisce in risposta ad un aumento di intensità luminosa in maniera simile in cellule in condizione di controllo e in quelle sottoposte a limitazione da solfato. Si tratta di una risposta comunemente registrata in cellule vegetali, dal momento che aumentando l'intensità luminosa una frazione minore di essa viene utilizzata per la fotochimica. In parallelo, il parametro NPQ, che stima la dissipazione dell'energia assorbita sotto forma di calore, aumenta al crescere dell'intensità luminosa. Anche in questo caso, le differenze tra i campioni sono praticamente nulle. La resa quantica del PSI, $Y(I)$, mostra un andamento in risposta alla light curve simile al corrispondente parametro del PSII, diminuendo al crescere della luce. Cellule in limitazione da solfato mostrano valori pari o lievemente superiori rispetto al controllo (Figura 3 – 14).

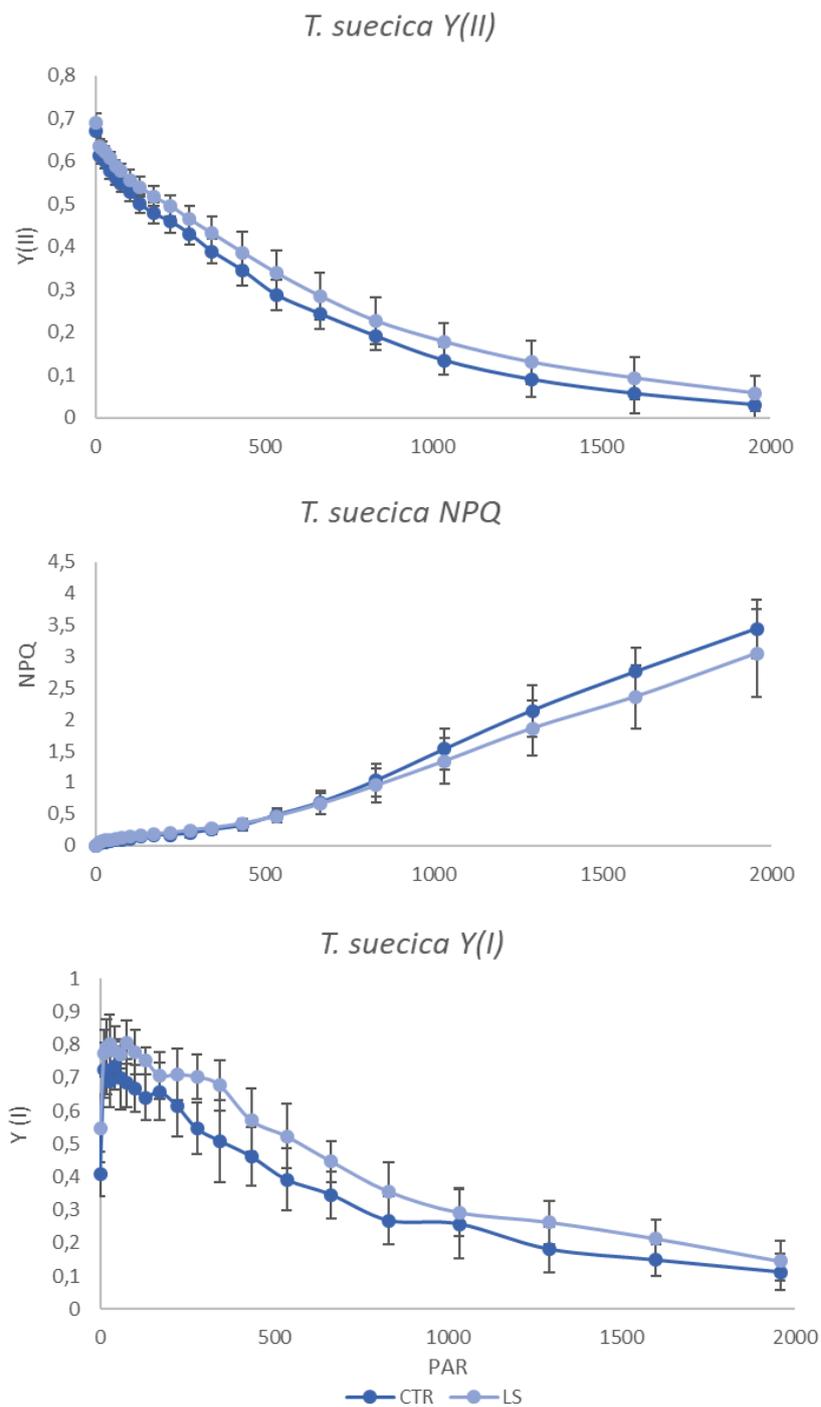


Figura 3-14: valori dei parametri $Y(II)$, NPQ e $Y(I)$ nella microalga *Tetraselmis suecica* in condizione di controllo n = 10 (blu) e in condizione limitante di solfato n = 11 (azzurro).

In *Dunaliella salina* l'andamento dei parametri è simile a quanto visto per *Tetraselmis suecica* con $Y(II)$ e $Y(I)$ che calano all'aumentare della luce attinica mentre l'NPQ aumenta all'aumentare della

luce. Nel caso del Y(II), il campione in limitazione da solfato mostra una resa lievemente maggiore rispetto al controllo fino ad intensità luminosa tra 1300 per poi esser simili. (Figura 3 – 15).

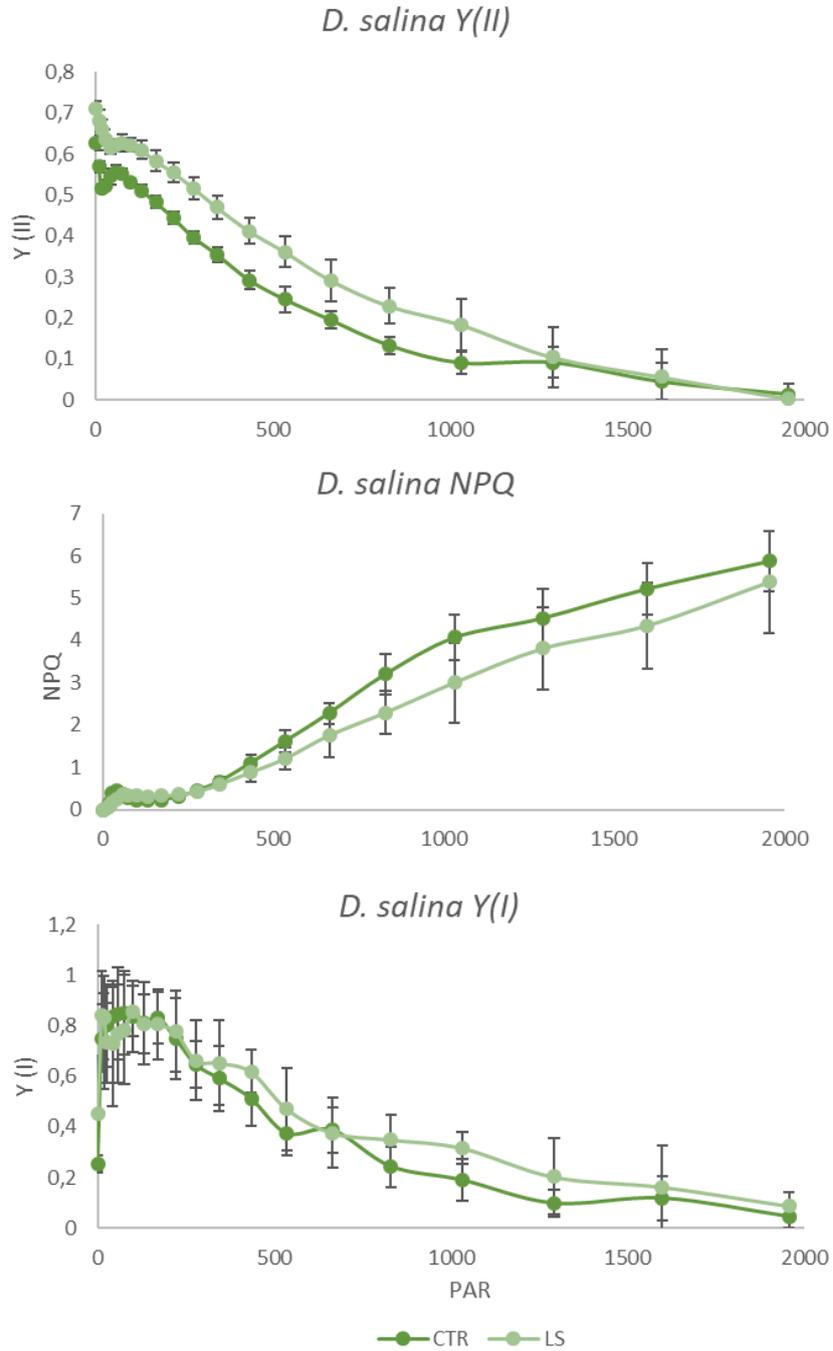


Figura 3-15: valori dei parametri Y(II), NPQ e Y(I) nella microalga *Dunaliella salina* in condizione di controllo n = 7 (verde scuro) e in condizione limitante di solfato n = 7 (verde chiaro).

In *Phaeodactylum tricornutum* la resa quantica del PSII ha valori molto simili tra la condizione di controllo e quelle in limitazione da solfato, così come i valori di NPQ che si attiva a partire dai 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. In questo caso sono mostrati i dati fino a circa 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ dal momento che per intensità di luce superiori la cinetica risulta particolarmente rumorosa. Questo è dovuto in parte al fatto che l'ottimizzazione del protocollo di misura per *Phaeodactylum tricornutum* è ancora in fase di perfezionamento (Figura 3 – 16).

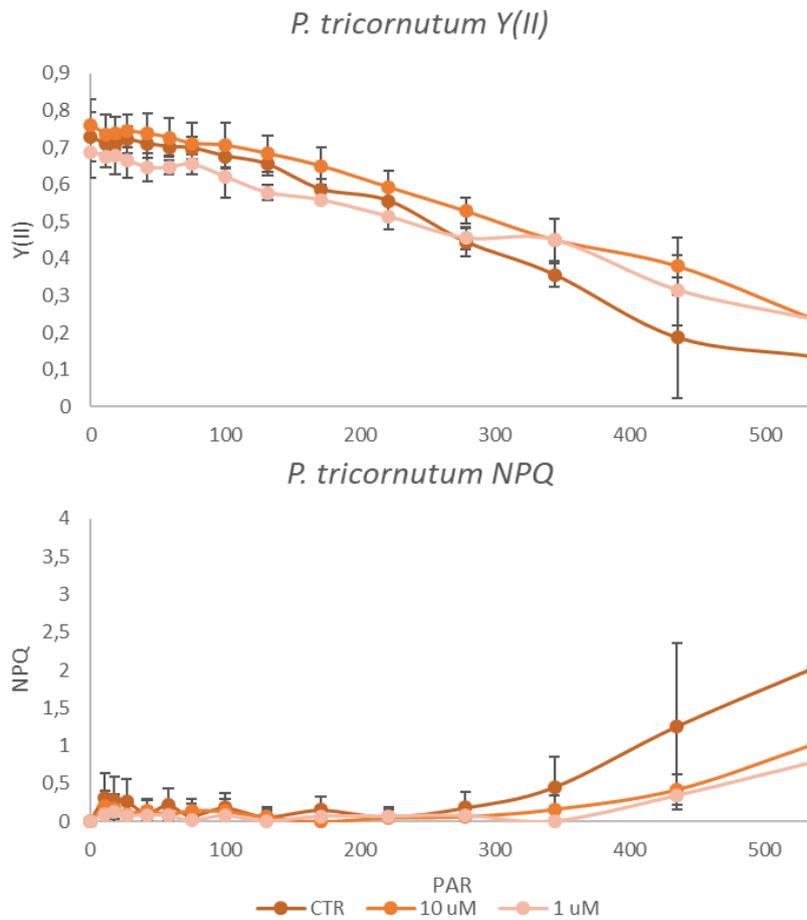


Figura 3-16: valori dei parametri Y(II), NPQ e nella microalga *Phaeodactylum tricornutum* in condizione di controllo n = 4 (marrone) e in condizione limitante di solfato LS1, LS2 n = 6 (arancione) n = 3 (rosa).

3.9 Estratti proteici totali

Estratti proteici totali delle diverse specie coltivate in condizione controllo o limitazione di solfato sono state confrontate tramite elettroforesi SDS-PAGE e colorazione con Coomassie. Si tratta al momento di analisi preliminari, in quanto è tuttora in corso l'ottimizzazione delle quantità di estratti da caricare su gel, ma che comunque forniscono alcune indicazioni su possibili differenze tra i campioni. Pur utilizzando la colorazione con Coomassie, quindi una colorazione per proteine totali, è possibile in estratti vegetali individuare, con buona probabilità di successiva conferma con altre tecniche, le bande relative alla subunità maggiore della proteina rubisco (Rbc LSU) e alle proteine antenna (LHC). Si tratta di proteine che hanno, rispettivamente, un peso di circa 50-55 kDa (Rbc LSU) e 17-30 kDa (LHC, presenti in diverse isoforme) e sono frequentemente tra le proteine più espresse nelle cellule vegetali, e quindi tra le bande più intense visibili in estratti totali dopo corsa elettroforetica. Inoltre, nel caso di *D. salina* e *P. tricornutum*, dati di letteratura possono aiutare ad individuare le bande di interesse (Giordano et al., 2000; Grouneva *et al.*, 2011), come indicato in Figura 3 – 17.

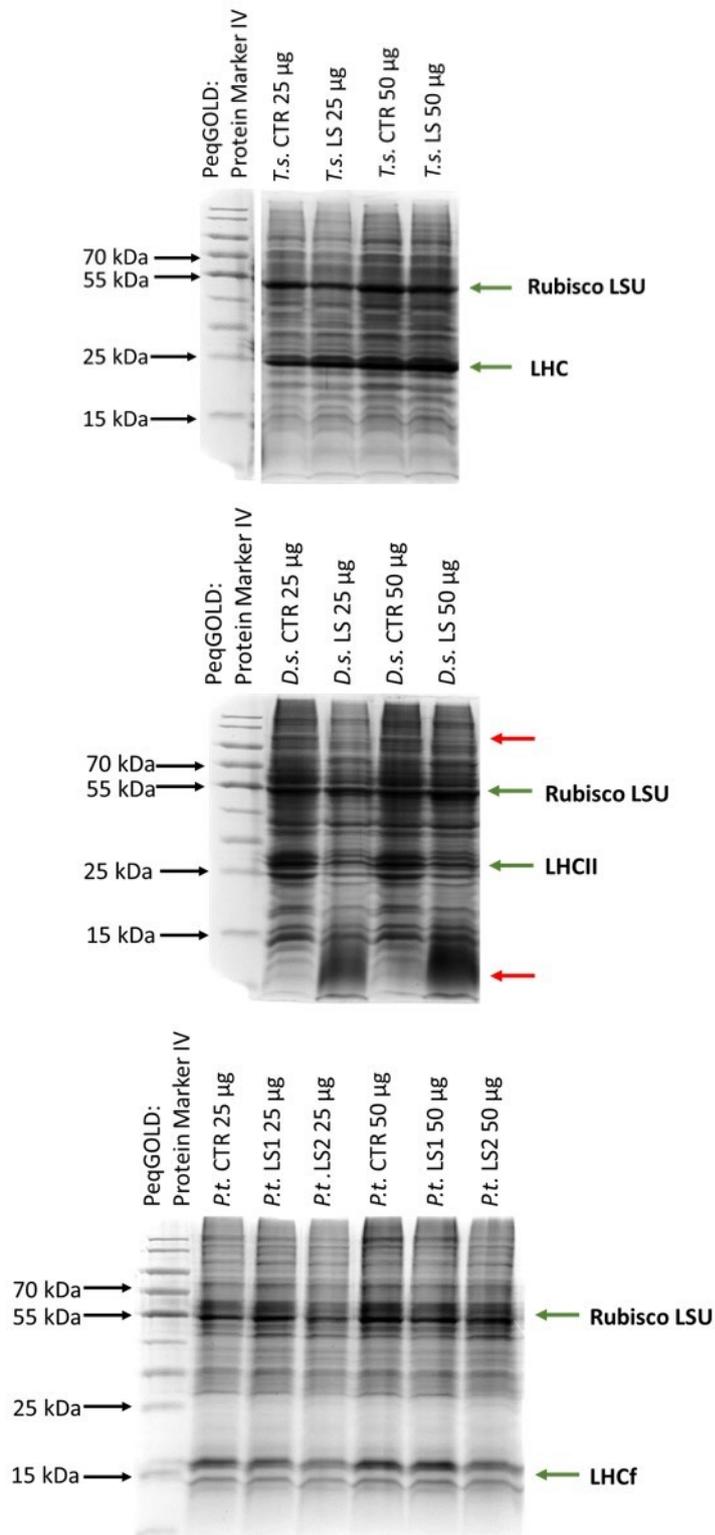


Figura 3-17: estratti proteici di *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina* e *Phaeodactylum tricoratum* visualizzati in un gel di poliacrilammide. I nomi in alto riportano la condizione di coltivazione delle alghe da cui sono stati ottenuti gli

estratti e la quantità di estratto proteico utilizzato (μg). A sinistra le frecce e il peso molecolare riportati sono quelli del Protein Marker PeqGOLD (VWR), mentre a destra, le frecce in verde riportano in alto la posizione della Rubisco LSU e in basso probabilmente dei complessi antenna e quelle in rosso riportano eventuali differenze tra la condizione di controllo e quella in limitazione da solfato in una data specie.

In tutte le specie, la banda con peso molecolare di circa 54 kDa, che quindi probabilmente corrisponde alla Rbc LSU, nei campioni in deprivazione di zolfo, subisce un decremento, visibile dalla diminuzione di intensità della banda. Questa diminuzione è soprattutto visibile sui campioni da 25 μg di tutte le specie, poiché, probabilmente 50 μg è un quantitativo troppo elevato per permettere una netta distinzione tra le diverse condizioni.

Conclusione simile si può trarre per le bande probabilmente riconducibili a LHC in *Dunaliella salina* (LHCII) (bande a 29 kDa, identificata come LHC da Giordano *et al.*, 2000 tramite MS e *Phaeodactylum tricornutum* (LHCf) (bande a circa 20 kDa, identificate per confronto con il lavoro di Grouneva *et al.*, 2011, mentre nel caso di *Tetraselmis suecica* questa diminuzione è meno evidente così come risulta più difficile l'identificazione della banda di interesse (Figura 3 – 17). Probabilmente la banda intorno a 25 kDa, potrebbe essere ricondotta ai complessi antenna per analogia della banda riportata in Smith & Alberte, 1991 per *Tetraselmis* spp.

Altre bande, indicate con frecce rosse in figura in *Dunaliella salina*, mostrano intensità differenziale tra controllo e condizioni di limitazione da zolfo. Sembrano quindi esserci nelle differenze nel proteoma nelle due condizioni, che andranno dapprima confermate tramite repliche sperimentali e l'identità delle proteine differenzialmente espresse confermata con metodologie più adatte allo scopo, quali immunoblotting e spettrometria di massa.

4 Discussione e conclusione

Nell'oceano attuale il solfato è uno dei nutrienti più abbondanti in concentrazione, pari 28 – 30 mM (Giordano *et al.*, 2008), ma non è stato sempre così. La sua concentrazione è stata caratterizzata da una forte variabilità, nel corso delle ere geologiche, e questo ci permette di capire l'andamento della crescita delle microalghe, prese in esame, in carenza di solfato. Come visibile dalle curve di crescita (Figure 3 – 1, 2, 3), la bassa concentrazione di solfato nel mezzo non ha un effetto drastico sulla crescita della specie *Tetraselmis suecica*, appartenente all'ordine delle *Chlorodendrales* caratterizzata da una precoce divergenza dalle “core Chlorophytes”, evolutasi nelle acque oceaniche del tardo Proterozoico (~1200 mya) (Tappan, 1980; Knoll, 2003) a concentrazione di solfato pari a 1–5 mM (Shen *et al.*, 2002) (Canfield, 2004; Kah *et al.*, 2004). Nelle stesse acque, poco dopo le *Chlorodendrales*, si sono evolute e affermate anche le *Chlamydomonadales*, come *Dunaliella salina*, per cui anche in questo caso, basse concentrazioni di solfato non hanno un grave effetto su di essa. L'effetto più evidente sulla crescita a concentrazioni limitanti di solfato è visibile nelle colture di *Phaeodactylum tricornerutum*, appartenente all'ordine *Naviculales*, che ha subito un'ascesa evolutiva a concentrazioni di solfato oceanico simili a quelle attuali tra 13 – 27 mM (tardo Paleozoico – inizio Mesozoico). In conclusione la crescita in carenza di solfato, delle microalghe sperimentali, appare sì rallentata, ma con un andamento che è tipico della specie in relazione al periodo geologico in cui essa si è evoluta. Questo è in accordo con la “Sulfate Facilitation Hypothesis” (Ratti *et al.*, 2011), secondo la quale la concentrazione del solfato oceanico ha favorito l'ascesa delle microalghe con basso rapporto C:S, quali le diatomee.

In aggiunta alla crescita, altre analisi fisiologiche dimostrano la presenza di differenze specie-specifiche alla carenza di zolfo. Ad esempio, a differenza di *Tetraselmis suecica*, sia le cellule di *Dunaliella salina* che di *Phaeodactylum tricornerutum* in carenza di solfato sono caratterizzate da una maggiore biomassa, come dimostrato dal più alto peso secco / cellula (Figura 3 – 5).

La capacità di accumulare biomassa pur in condizioni di stress, quale può essere la limitazione in un macronutriente, è spiegabile nei campioni in analisi grazie alla caratterizzazione della fotosintesi in vivo. La resa quantica dei fotosistemi, infatti, non risulta affatto compromessa dalla carenza di solfato (Figure 3 – 12, 13, 14, 15). Questo è probabilmente il risultato della capacità delle specie in analisi di acclimatare il proprio apparato fotosintetico alle diverse condizioni ambientali, che tipicamente consistono in una variazione del contenuto di antenne e/o PSII core (centri di reazione), come già visto in letteratura (Gundermann *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 1990) e nelle stesse specie oggetto di studio in altri progetti attivi nel laboratorio. Nel particolare, in condizioni di carenza da solfato *Tetraselmis suecica* aumenta il suo contenuto di clorofille per cellula, pur non variando il loro rapporto qualitativo, suggerendo l'accumulo di una maggiore quantità di proteine antenna e di fotosistemi senza variare il rapporto relativo tra queste due componenti. Al contrario, in *Dunaliella salina* cala il contenuto di clorofille per cellula, e varia anche il rapporto chl *a/b*, suggerendo un calo delle proteine antenna, che tipicamente legano anche clorofilla *b*, in relazione alla quantità di centri di reazione, sede questi ultimi del processo fotochimico. Questa ipotesi è supportata dal calo della banda identificabile come LHC nel campione in carenza di solfato. *Phaeodactylum tricornerutum* mostra un comportamento ancora diverso, in cui il contenuto chl *a*/cellula aumenta in condizioni di carenza da solfato così come varia il rapporto chl *a/c* in favore di un accumulo di PS core. Sebbene siano necessari ulteriori esperimenti per la caratterizzazione biochimica dell'apparato fotosintetico, l'analisi del contenuto cellulare di clorofille e la caratterizzazione mediante SDS-PAGE delle proteine totali permettono di ipotizzare la presenza di strategie diverse di acclimatazione della fotosintesi nelle diverse specie in risposta alla medesima condizione ambientale.

La capacità di utilizzare l'energia prodotta dalla fase luminosa della fotosintesi per fissare il carbonio inorganico in pool organici è altrettanto rilevante. Nonostante, come già evidenziato in passato (Giordano *et al.*, 2000), i gel in Figura 3 –17 mostrino un probabile calo della quantità di rubisco LSU, enzima chiave per il ciclo di Calvin e noto per essere particolarmente abbondante in

cellule vegetali e quindi un notevole “sink” di C, N ed S, va considerato che le cellule in carenza di solfato, in tutte le specie, mostrano un aumento del contenuto in proteine. L’analisi degli estratti totali, confrontando una medesima quantità di proteine, evidenzia quindi differenze relative nel proteoma ma non una differenza assoluta per cellula. È quindi possibile che cellule in carenza da solfato mostrino un contenuto simile o di poco inferiore di rubisco rispetto al controllo, ma accumulino in maniera maggiore altre proteine, necessarie per acclimatare il metabolismo alle nuove condizioni, o aminoacidi, come visto in (Giordano *et al.*, 2000).

La capacità di mantenere una buona efficienza fotosintetica permette quindi alle cellule di assimilare carbonio e nutrienti seppur in condizioni di crescita in cui il solfato è carente. Questo si ripercuote, comunque, in un calo del contenuto di S cellulare nelle alghe verdi. *Phaeodactylum tricornutum* sembra avere un comportamento opposto, ma va tenuto presente l’aumento molto significativo della biomassa per cellula, che fa sì che il rapporto C/S in *Phaeodactylum tricornutum* coltivato in carenza di solfato sia più che duplicato rispetto al controllo. La quantificazione di carbonio e azoto e zolfo, inoltre, aiuta a comprendere come ogni microalga risponda alla limitazione da solfato modificando la stechiometria cellulare e, di conseguenza, il contenuto in macromolecole. Anche in questo caso le specie che mostrano le maggiori differenze relative nel contenuto nelle principali macromolecole, proteine, carboidrati e lipidi, e quindi una generale riorganizzazione dell’allocazione delle risorse, sono *Dunaliella salina* e in maniera ancora maggiore *Phaeodactylum tricornutum*.

Osservando il rapporto lipidi/carboidrati è anche possibile individuare una risposta specie-specifica all’aumento dell’una o dell’altra macromolecola. In *Dunaliella salina* si evince un maggiore quantitativo di carboidrati rispetto ai lipidi in condizione solfato-limitante. Per *Phaeodactylum tricornutum* è stato osservato un incremento dei lipidi più elevato di quello dei carboidrati in solfato-limitazione. Questa diversa risposta è probabilmente dovuta alla propensione della specie in esame. È noto che *Phaeodactylum tricornutum* in condizioni limitanti di macronutrienti accumula

lipidi (Valenzuela *et al.*, 2013) e che *Dunaliella salina*, in deprivazione da solfato, accumula amido (Giordano *et al.*, 2000; Giordano *et al.*, 2008). Inoltre l'aumento del quantitativo di carboidrati in alghe in limitazione da solfato è stato già osservato (Brányiková *et al.*, 2011).

In conclusione, possiamo osservare come la risposta alla diminuzione di solfato nel mezzo di crescita sia diversificata in base alla specie considerata. In generale, le alghe acclimatate a basse concentrazioni di solfato mostrano un rallentamento della crescita strettamente relazionato ad una riorganizzazione degli elementi e delle macromolecole all'interno della cellula. In accordo con la "Sulfate Facilitation Hypothesis", *Phaeodactylum tricorutum*, rappresentante delle alghe della linea rossa del plastidio, che ha acquisito predominanza evolutiva solo quando la concentrazione di solfato oceanico è aumentata, è la specie che risente in modo più accentuato la carenza di solfato.

Ringraziamenti

Ringrazio i miei genitori che mi hanno sempre supportato in ogni scelta della vita, credendo profondamente nelle mie capacità e nei miei sogni. Ogni mio passo è stato dedicato a voi. All'altra parte della mia anima, Angela che con la sua voce, anche se lontana, ha saputo darmi la sicurezza che solo una sorella sa dare. Ad Antonello, suo compagno di vita, in cui ho sempre visto un fratello maggiore. A Piero che è entrato a far parte della mia vita nel bel mezzo del mio percorso universitario, dandomi qualcosa che nessuno aveva saputo darmi: la felicità.

Ringrazio la mia correlatrice, Caterina Gerotto, che mi ha permesso di entrare nel mondo della ricerca, quella guidata dalla sola curiosità, alla quale spero di non rinunciare nella vita. Alla mia relatrice Alessandra Norici che si è fidata delle mie capacità. A Mario Giordano, un uomo che non dimenticherò. Una volta mi disse: "Una buona tesi è utile per qualunque cosa. Una cattiva tesi è inutile per qualunque cosa". Dico che non so dove mi porterà il mio percorso di tesi, ma è stato utile, perché mi ha permesso di appassionarmi a questo mondo.

Ringrazio Aja, mia amica, compagna di studio e di laboratorio che mi ha regalato, con dei semplici gesti, quella spensieratezza che tante volte è venuta meno. Ringrazio i miei colleghi di laboratorio Alessandra, Daniel, Stefano e Mattia che in questo percorso sono diventati amici. Da oggi porterò con me parte di voi, spero voi possiate dire lo stesso di me.

- Adams, J. M., & Capecchi, M. R. (1966). N-formylmethionyl-sRNA as the initiator of protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 55(1), 147–155. <https://doi.org/10.1073/pnas.55.1.147>
- Baker, N. R. (2008). Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 89–113. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>
- Bick, J. A., Åslund, F., Chen, Y., & Leustek, T. (1998). Glutaredoxin function for the carboxyl-terminal domain of the plant-type 5'-adenylylsulfate reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14), 8404–8409. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8404>
- Björn, L. O., Papageorgiou, G. C., Blankenship, R. E., & Govindjee. (2009). A viewpoint: Why chlorophyll a? *Photosynthesis Research*, 99(2), 85–98. <https://doi.org/10.1007/s11120-008-9395-x>
- Bowler, C., Allen, A. E., Badger, J. H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Otiillar, R. P., Rayko, E., Salamov, A., Vandepoele, K., Beszteri, B., Gruber, A., Heijde, M., Katinka, M., Mock, T., Valentin, K., ... Grigoriev, I. V. (2008). The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*, 456(7219), 239–244. <https://doi.org/10.1038/nature07410>
- Brányiková, I., Maršálková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V., & Vítová, M. (2011). Microalgae-novel highly efficient starch producers. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4), 766–776. <https://doi.org/10.1002/bit.23016>
- Bucciarelli, E., & Sunda, W. G. (2003). Influence of CO₂, nitrate, phosphate, and silicate limitation on intracellular dimethylsulfoniopropionate in batch cultures of the coastal diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Limnology and Oceanography*, 48(6), 2256–2265. <https://doi.org/10.4319/lo.2003.48.6.2256>

- Canfield, D. E. (2004). The evolution of the Earth surface sulfur reservoir. *American Journal of Science*, 304(10), 839–861. <https://doi.org/10.2475/ajs.304.10.839>
- Childers, D. L., Kiene, R. P., Visscher, P. T., Keller, M. D., & Kirst, G. O. (1997). Biological and Environmental Chemistry of DMSP and Related Sulfonium Compounds. In *Estuaries* (Vol. 20, Issue 2). <https://doi.org/10.2307/1352358>
- Christof, K., & Ulrich, S. (1994). An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700⁺-absorbance changes at 830 nm. *Planta*, 192, 261–268.
- Cleland, W. W., Andrews, T. J., Gutteridge, S., Hartman, F. C., & Lorimer, G. H. (1998). Mechanism of rubisco: The carbamate as general base. *Chemical Reviews*, 98(2), 549–561. <https://doi.org/10.1021/cr970010r>
- Domenighini, A., & Giordano, M. (2009). Fourier transform infrared spectroscopy of microalgae as a novel tool for biodiversity studies, species identification, and the assessment of water quality. *Journal of Phycology*, 45(2), 522–531. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00662.x>
- Domozych, D. S., Stewart, K. D., & Mattox, K. R. (1981). Development of the cell wall in tetraselmis: role of the Golgi apparatus and extracellular wall assembly. *Journal of Cell Science*, Vol. 52, 351–371.
- Dougherty, R. C., Strain, H. H., Svec, W. A., Uphaus, R. A., & Katz, J. J. (1970). The Structure, Properties, and Distribution of Chlorophyll c. *Journal of the American Chemical Society*, 92(9), 2826–2833. <https://doi.org/10.1021/ja00712a037>
- Droux, M., Ruffet, M. L., Douce, R., & Job, D. (1998). Interactions between serine acetyltransferase and O-acetylserine (thiol) lyase in higher plants. Structural and kinetic properties of the free and bound enzymes. *European Journal of Biochemistry*, 255(1), 235–

245. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2550235.x>

- Fábregas, J., Otero, A., Domínguez, A., & Patiño, M. (2001). Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species. *Marine Biotechnology*, 3(3), 256–263. <https://doi.org/10.1007/s101260000074>
- Falkowski, P. G., Katz, M. E., Knoll, A. H., Quigg, A., Raven, J. A., Schofield, O., & Taylor, F. J. R. (2004). The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science*, 305(5682), 354–360. <https://doi.org/10.1126/science.1095964>
- Fanesi, A., Raven, J. A., & Giordano, M. (2014). Growth rate affects the responses of the green alga *Tetraselmis suecica* to external perturbations. *Plant, Cell and Environment*, 37(2), 512–519. <https://doi.org/10.1111/pce.12176>
- Ferro, L., Gojkovic, Z., & Funk, C. (2019). Statistical Methods for Rapid Quantification of Proteins , Lipids , and Carbohydrates in Nordic. *Molecules*, 2019(24).
- Genty, B., Briantais, J. M., & Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 990(1), 87–92. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9)
- Gerotto, C., Alboresi, A., Giacometti, G. M., Bassi, R., & Morosinotto, T. (2012). Coexistence of plant and algal energy dissipation mechanisms in the moss *Physcomitrella patens*. *New Phytologist*, 196(3), 763–773. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04345.x>
- Gill, B. C., Lyons, T. W., & Saltzman, M. R. (2007). Parallel, high-resolution carbon and sulfur isotope records of the evolving Paleozoic marine sulfur reservoir. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 256(3–4), 156–173. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2007.02.030>

- Ginzburg, M. (1988). Dunaliella: A Green Alga Adapted to Salt. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 14, Issue C). [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)60271-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)60271-2)
- Giordano, M., Pezzoni, V., & Hell, R. (2000). Strategies for the allocation of resources under sulfur limitation in the green alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiology*, *124*(2), 857–864. <https://doi.org/10.1104/pp.124.2.857>
- Giordano, Mario. (2013). Homeostasis: An underestimated focal point of ecology and evolution. *Plant Science*, *211*, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.07.008>
- Giordano, Mario, Heraud, P., Beardall, J., Giordano, M., & Al, E. T. (2001). *FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY AS A NOVEL TOOL TO INVESTIGATE CHANGES IN INTRACELLULAR MACROMOLECULAR POOLS IN THE MARINE MICROALGA CHAETOCEROS MUELLERII (BACILLARIOPHYCEAE)* 1 *Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy was used to study . 279, 271–279.*
- Giordano, Mario, Norici, A., Ratti, S., & Raven, J. A. (2008). *Role of Sulfur for Algae: Acquisition, Metabolism, Ecology and Evolution.* 397–415. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6863-8_20
- Goss, R., & Wilhelm, C. (2009). *Lipids in Algae, Lichens and Mosses.* 117–137. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2863-1_6
- Grouneva, I., Rokka, A., & Aro, E. M. (2011). The thylakoid membrane proteome of two marine diatoms outlines both diatom-specific and species-specific features of the photosynthetic machinery. *Journal of Proteome Research*, *10*(12), 5338–5353. <https://doi.org/10.1021/pr200600f>
- Gundermann, K., Schmidt, M., Weisheit, W., Mittag, M., & Büchel, C. (2013). Identification of several sub-populations in the pool of light harvesting proteins in the pennate diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1827*(3), 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.10.017>

- Gutierrez-Marcos, J. F., Roberts, M. A., Campbell, E. I., & Wray, J. L. (1996). Three members of a novel small gene-family from *Arabidopsis thaliana* able to complement functionally an *Escherichia coli* mutant defective in PAPS reductase activity encode proteins with a thioredoxin-like domain and “APS reductase” activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(23), 13377–13382.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.13377>
- Haas, F. H., Heeg, C., Queiroz, R., Bauer, A., Wirtz, M., & Hell, R. (2008). Mitochondrial serine acetyltransferase functions as a pacemaker of cysteine synthesis in plant cells. *Plant Physiology*, *148*(2), 1055–1067. <https://doi.org/10.1104/pp.108.125237>
- Habicht, K. S., Gade, M., Thamdrup, B., Berg, P., & Canfield, D. E. (2002). Calibration of sulfate levels in the Archean ocean. *Science*, *298*(5602), 2372–2374.
<https://doi.org/10.1126/science.1078265>
- Han, S. Il, Kim, S., Lee, C., & Choi, Y. E. (2019). Blue-Red LED wavelength shifting strategy for enhancing beta-carotene production from halotolerant microalga, *Dunaliella salina*. *Journal of Microbiology*, *57*(2), 101–106. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-8420-4>
- Hawlana, D., & Schmitz, O. J. (2010). Herbivore physiological response to predation risk and implications for ecosystem nutrient dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(35), 15503–15507.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1009300107>
- Hell, R., & Wirtz, M. (2008). *Metabolism of Cysteine in Plants and Phototrophic Bacteria*. 59–91.
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6863-8_4
- Hirschmugl, C. J., Bayarri, Z. El, Bunta, M., Holt, J. B., & Giordano, M. (2006). Analysis of the nutritional status of algae by Fourier transform infrared chemical imaging. *Infrared Physics and Technology*, *49*(1–2), 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2006.01.032>

- Ho, T. Y., Quigg, A., Finkel, Z. V., Milligan, A. J., Wyman, K., Falkowski, P. G., & Morel, F. M. M. (2003). The elemental composition of some marine phytoplankton. *Journal of Phycology*, 39(6), 1145–1159. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.2003.03-090.x>
- Holmer, M., & Storkholm, P. (2001). Sulphate reduction and sulphur cycling in lake sediments: A review. *Freshwater Biology*, 46(4), 431–451. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2001.00687.x>
- Horita, J., Zimmermann, H., & Holland, H. D. (2002). Chemical evolution of seawater during the Phanerozoic: Implications from the record of marine evaporites. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66(21), 3733–3756. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(01\)00884-5](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(01)00884-5)
- Howe, C. J., Barbrook, A. C., Nisbet, R. E. R., Lockhart, P. J., & Larkum, A. W. D. (2008). The origin of plastids. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1504), 2675–2685. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0050>
- Jebsen, C., Norici, A., Wagner, H., Palmucci, M., Giordano, M., & Wilhelm, C. (2012). FTIR spectra of algal species can be used as physiological fingerprints to assess their actual growth potential. *Physiologia Plantarum*, 146(4), 427–438. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01636.x>
- Johnson, M. P. (2016). Photosynthesis. *Essays in Biochemistry*, 60(3), 255–273. <https://doi.org/10.1042/EBC20160016>
- Kah, L. C., Lyons, T. W., & Frank, T. D. (2004). Low marine sulphate and protracted oxygenation of the Proterozoic biosphere. *Nature*, 431(7010), 834–838. <https://doi.org/10.1038/nature02974>
- Keller, M. D., Bellows, W. K., & Guillard, R. R. L. (1989). *Dimethyl Sulfide Production in Marine Phytoplankton*. 167–182. <https://doi.org/10.1021/bk-1989-0393.ch011>

- Khan, M. S., Haas, F. H., Samami, A. A., Gholami, A. M., Bauer, A., Fellenberg, K., Reichelt, M., Hänsch, R., Mendel, R. R., Meyer, A. J., Wirtz, M., & Hell, R. (2010). Sulfite reductase defines a newly discovered bottleneck for assimilatory sulfate reduction and is essential for growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, *22*(4), 1216–1231. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.074088>
- Knoll, A. H., Summons, R. E., Waldbauer, J. R., & Zumberge, J. E. (2007). The Geological Succession of Primary Producers in the Oceans. *Evolution of Primary Producers in the Sea*, 133–163. <https://doi.org/10.1016/B978-012370518-1/50009-6>
- Kopriva, S., Wiedemann, G., & Reski, R. (2007). Sulfate assimilation in basal land plants - What does genomic sequencing tell us? *Plant Biology*, *9*(5), 556–564. <https://doi.org/10.1055/s-2007-965430>
- Kopriva, Stanislav, Fritzemeier, K., Wiedemann, G., & Reski, R. (2007). The putative moss 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate reductase is a novel form of adenosine-5'-phosphosulfate reductase without an iron-sulfur cluster. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(31), 22930–22938. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702522200>
- Kopriva, Stanislav, & Koprivova, A. (2004). Plant adenosine 5'-phosphosulphate reductase: The past, the present, and the future. *Journal of Experimental Botany*, *55*(404), 1775–1783. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh185>
- Lamers, P. P., Janssen, M., De Vos, R. C. H., Bino, R. J., & Wijffels, R. H. (2012). Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *Journal of Biotechnology*, *162*(1), 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.04.018>
- Lamers, P. P., Van De Laak, C. C. W., Kaasenbrood, P. S., Lorier, J., Janssen, M., De Vos, R. C. H., Bino, R. J., & Wijffels, R. H. (2010). Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. *Biotechnology and Bioengineering*, *106*(4), 638–648.

<https://doi.org/10.1002/bit.22725>

Lee, R. E., & Kugrens, P. (2000). Acidity of the thylakoid lumen in plastids makes sense from an evolutionary perspective. In *Photosynthetica* (Vol. 37, Issue 4, pp. 609–614).

<https://doi.org/10.1023/A:1007179710277>

Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F., & De Clerck, O. (2012). Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1), 1–46. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.615705>

LEWIN, J. C. (1958). The taxonomic position of *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of General Microbiology*, 18(2), 427–432. <https://doi.org/10.1099/00221287-18-2-427>

Lohr, M., & Wilhelm, C. (2001). Xanthophyll synthesis in diatoms: Quantification of putative intermediates and comparison of pigment conversion kinetics with rate constants derived from a model. *Planta*, 212(3), 382–391. <https://doi.org/10.1007/s004250000403>

Lund, J. W. G., & Butcher, R. W. (1960). Marine Nannoplankton An Introductory Account of the Smaller Algae of British Coastal Waters. Part 1, Introduction and Chlorophyceae. In *The Journal of Animal Ecology* (Vol. 29, Issue 1, p. 192). <https://doi.org/10.2307/2279>

Lunn, J. E., Droux, M., Martin, J., & Douce, R. (1990). Localization of ATP sulfurylase and O-acetylserine(thiol)lyase in spinach leaves. *Plant Physiology*, 94(3), 1345–1352.

<https://doi.org/10.1104/pp.94.3.1345>

Luo, G., Kump, L. R., Wang, Y., Tong, J., Arthur, M. A., Yang, H., Huang, J., Yin, H., & Xie, S. (2010). Isotopic evidence for an anomalously low oceanic sulfate concentration following end-Permian mass extinction. *Earth and Planetary Science Letters*, 300(1–2), 101–111.

<https://doi.org/10.1016/j.epsl.2010.09.041>

McFadden, G. I. (2001). Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *Journal*

of Phycology, 37(6), 951–959. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.01126.x>

Mellis, A. (1999). Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: What modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends in Plant Science*, 4(4), 130–135.

[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01387-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01387-4)

Miyake, C., Horiguchi, S., Makino, A., Shinzaki, Y., Yamamoto, H., & Tomizawa, K. I. (2005).

Effects of light intensity on cyclic electron flow around PSI and its relationship to non-photochemical quenching of Chl fluorescence in tobacco leaves. *Plant and Cell Physiology*, 46(11), 1819–1830. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci197>

Newton, R. J., Reeves, E. P., Kafousia, N., Wignall, P. B., Bottrell, S. H., & Sha, J. G. (2011). Low marine sulfate concentrations and the isolation of the European epicontinental sea during the Early Jurassic. *Geology*, 39(1), 7–10. <https://doi.org/10.1130/G31326.1>

Norici, A., Hell, R., & Giordano, M. (2005). Sulfur and primary production in aquatic

environments: An ecological perspective. *Photosynthesis Research*, 86(3), 409–417.

<https://doi.org/10.1007/s11120-005-3250-0>

Oren, A. (2005). A hundred years of Dunaliella research: 1905-2005. *Saline Systems*, 1(1), 2–2.

<https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-2>

Patron, N. J., Durnford, D. G., & Kopriva, S. (2008). Sulfate assimilation in eukaryotes: Fusions, relocations and lateral transfers. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 1–14.

<https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-39>

Petrychenko, O. Y., Peryt, T. M., & Chechel, E. I. (2005). Early Cambrian seawater chemistry

from fluid inclusions in halite from Siberian evaporites. *Chemical Geology*, 219(1–4), 149–161. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2005.02.003>

Polle, J. E. W., Barry, K., Cushman, J., Schmutz, J., Tran, D., Hathwaik, L. T., Yim, W. C.,

- Jenkins, J., Mckie-krisberg, Z., Prochnik, S., Lindquist, E., Dockter, R. B., Adam, C., Molina, H., Bunkenborg, J., & Jin, E. (2017). *crossm Draft Nuclear Genome Sequence of the*. 5(43), 17–19.
- Prioretti, L., & Giordano, M. (2016). Direct and indirect influence of sulfur availability on phytoplankton evolutionary trajectories. *Journal of Phycology*, 52(6), 1094–1102.
<https://doi.org/10.1111/jpy.12468>
- Prioretti, L., Gontero, B., Hell, R., & Giordano, M. (2014). Diversity and regulation of ATP sulfurylase in photosynthetic organisms. *Frontiers in Plant Science*, 5(November), 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00597>
- Ramos, A. A., Polle, J., Tran, D., Cushman, J. C., Jin, E.-S., & Varela, J. C. (2011). The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod. as a model for abiotic stress tolerance: genetic advances and future perspectives. *Algae*, 26(1), 3–20. <https://doi.org/10.4490/algae.2011.26.1.003>
- Ratti, S., Knoll, A. H., & Giordano, M. (2011). Did sulfate availability facilitate the evolutionary expansion of chlorophyll a+c phytoplankton in the oceans? *Geobiology*, 9(4), 301–312.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2011.00284.x>
- Ratti, Simona, & Giordano, M. (2008). Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants. *Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants, May 2014*. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-76326-0>
- Ratti, Simona, Knoll, A. H., & Giordano, M. (2013). Grazers and Phytoplankton Growth in the Oceans: An Experimental and Evolutionary Perspective. *PLoS ONE*, 8(10), 1–16.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077349>
- Renosto 1993 ATPS in plants.pdf*. (n.d.).
- Ritchie, R. J. (2006). Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone,

- methanol and ethanol solvents. *Photosynthesis Research*, 89(1), 27–41.
<https://doi.org/10.1007/s11120-006-9065-9>
- Roth, M. S., Westcott, D. J., Iwai, M., & Niyogi, K. K. (2019). Hexokinase is necessary for glucose-mediated photosynthesis repression and lipid accumulation in a green alga. *Communications Biology*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0577-1>
- Rotte, C., & Leustek, T. (2000). Differential subcellular localization and expression of ATP sulfurylase and 5'-adenylylsulfate reductase during ontogenesis of Arabidopsis leaves indicates that cytosolic and plastid forms of ATP sulfurylase may have specialized functions. *Plant Physiology*, 124(2), 715–724. <https://doi.org/10.1104/pp.124.2.715>
- Saito, K. (2004). Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant Physiology*, 136(1), 2443–2450. <https://doi.org/10.1104/pp.104.046755>
- Setya, A., Murillo, M., & Leustek, T. (1996). Sulfate reduction in higher plants: Molecular evidence for a novel 5'-adenylylsulfate reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(23), 13383–13388.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.13383>
- Sharkey, T. D. (2019). Discovery of the canonical Calvin–Benson cycle. *Photosynthesis Research*, 140(2), 235–252. <https://doi.org/10.1007/s11120-018-0600-2>
- Shen, Y., Canfield, D. E., & Knoll, A. H. (2002). Middle proterozoic ocean chemistry: Evidence from the McArthur Basin, Northern Australia. *American Journal of Science*, 302(2), 81–109.
<https://doi.org/10.2475/ajs.302.2.81>
- Smith, B. M., Morrissey, P. J., Guenther, J. E., Nemson, J. A., Harrison, M. A., Allen, J. F., & Melis, A. (1990). Response of the photosynthetic apparatus in *Dunaliella salina* (green algae) to irradiance stress. *Plant Physiology*, 93(4), 1433–1440. <https://doi.org/10.1104/pp.93.4.1433>

- Stefels, J. (2000). Physiological aspects of the production and conversion of DMSP in marine algae and higher plants. *Journal of Sea Research*, 43(3–4), 183–197. [https://doi.org/10.1016/S1385-1101\(00\)00030-7](https://doi.org/10.1016/S1385-1101(00)00030-7)
- Stewart, K. D., & Mattox, K. R. (1984). The case for a polyphyletic origin of mitochondria: Morphological and molecular comparisons. *Journal of Molecular Evolution*, 21(1), 54–57. <https://doi.org/10.1007/BF02100627>
- Sunda, W. G., Kieber, D., & Kiene, R. P. (2002). An antioxidant function of DMSP and DMS in marine algae oceanic dimethylsulfide (DMS) photolysis. *Nature*, 418, 317–320. www.nature.com/nature
- Teodoresco E.C. (1905). Un nouveau genre? *Positif*, 559, 61–69.
- Tesson, B., Gaillard, C., & Martin-Jézéquel, V. (2009). Insights into the polymorphism of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Botanica Marina*, 52(2), 104–116. <https://doi.org/10.1515/BOT.2009.012>
- Valenzuela, J., Carlson, R. P., Gerlach, R., Cooksey, K., Peyton, B. M., Bothner, B., & Fields, M. W. (2013). Nutrient resupplementation arrests bio-oil accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(15), 7049–7059. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5010-y>
- Van Bergeijk, S. A., Van Der Zee, C., & Stal, L. J. (2003). Uptake and excretion of dimethylsulphoniopropionate is driven by salinity changes in the marine benthic diatom *Cylindrotheca closterium*. *European Journal of Phycology*, 38(4), 341–349. <https://doi.org/10.1080/09670260310001612600>
- Van Mooy, B. A. S., Rocap, G., Fredricks, H. F., Evans, C. T., & Devol, A. H. (2006). Sulfolipids dramatically decrease phosphorus demand by picocyanobacteria in oligotrophic marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America, 103(23), 8607–8612. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600540103>

- Van Rijssel, M., & Gieskes, W. W. C. (2002). Temperature, light, and the dimethylsulfoniopropionate (DMSP) content of *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae). *Journal of Sea Research*, 48(1), 17–27. [https://doi.org/10.1016/S1385-1101\(02\)00134-X](https://doi.org/10.1016/S1385-1101(02)00134-X)
- Watanabe, M., Mochida, K., Kato, T., Tabata, S., Yoshimoto, N., Noji, M., & Saito, K. (2008). Comparative genomics and reverse genetics analysis reveal indispensable functions of the serine acetyltransferase gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20(9), 2484–2496. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060335>
- Waterborg, J. H., & Matthews, H. R. (1994). The Lowry method for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 32, 1–4. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-x:1>
- Webster, R. E., Engelhardt, D. L., & Zinder, N. D. (1966). In vitro protein synthesis: chain initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 55(1), 155–161. <https://doi.org/10.1073/pnas.55.1.155>
- Wolfe, G. V. (2000). The chemical defense ecology of marine unicellular plankton: Constraints, mechanisms, and impacts. *Biological Bulletin*, 198(2), 225–244. <https://doi.org/10.2307/1542526>
- Wolfe, G. V., Steinke, M., & Kirst, G. O. (1997). Grazing-activated chemical defence in a unicellular marine alga. *Nature*, 387(6636), 894–897. <https://doi.org/10.1038/43168>
- Yarmolinsky, D., Brychkova, G., Fluhr, R., & Sagi, M. (2013). Sulfite reductase protects plants against sulfite toxicity. *Plant Physiology*, 161(2), 725–743. <https://doi.org/10.1104/pp.112.207712>