



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

**DIPARTIMENTO SCIENZE
DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

Corso di Laurea Magistrale

Biologia Marina

**Risposte fisiologiche di microalghe marine a fattori
abiotici**

**Physiological responses of marine microalgae to
abiotic factors**

Tesi di Laurea Magistrale

di:

Simone Spinelli

Relatore:

Dott.ssa

Caterina Gerotto

Correlatore:

Prof.ssa

Alessandra Norici

Sessione Estiva

Anno Accademico 2021/2022

Indice	3
Abstract	5
1.Introduzione	7
1.1 Le microalghe	7
1.2 Le specie prese in esame	10
1.2.1 <i>Dunaliella salina</i>	10
1.2.2 <i>Tetraselmis suecica</i>	10
1.3 La luce e il processo fotosintetico	11
1.3.1 I pigmenti fotosintetici	12
1.3.2 PSII e PSI	13
1.3.3 Trasporto elettronico fotosintetico	14
1.3.4 Impatto delle condizioni ambientali sull'attività fotosintetica	16
1.3.5 Meccanismi di regolazione della fase luminosa della fotosintesi	17
1.3.6 La fotoinibizione	20
1.3.7 Ciclo di Calvin-Benson e metabolismo del C	21
1.4 Lo zolfo	21
1.4.1 Evoluzione della concentrazione dello zolfo negli oceani	21
1.4.2 Ciclo biogeochimico, acquisizione e metabolismo dello zolfo nelle alghe	22
1.5 Scopo della tesi	24
2. Materiali e Metodi	25
2.1 Mezzi di coltura e condizioni di crescita	25
2.2 Quantificazione di Carbonio e Azoto cellulare	28
2.3 Quantificazione del contenuto proteico per cellula	30
2.4 Analisi <i>Fourier Transform infrared spectroscopy</i> (FTIR)	33
2.5 Quantificazione dei pigmenti	35
2.6 Analisi <i>in vivo</i> dell'efficienza fotosintetica: Dual Pam 100	37

3. Risultati	43
3.1 Curve di crescita	43
3.2 Peso secco cellulare	48
3.3 Quantificazione di Carbonio e Azoto cellulare	49
3.4 Quantificazione del contenuto proteico delle cellule	52
3.5 FTIR	54
3.6 Quantificazione del contenuto cellulare in pigmenti fotosintetici	58
3.7 Analisi <i>in vivo</i> dell'efficienza fotosintetica PAM	63
4. Discussione	73
5. Bibliografia	79
Ringraziamenti	87

ABSTRACT

Le microalghe marine planctoniche, note come fitoplancton, popolano la colonna d'acqua nella zona fotica. Sono specie autotrofe capaci di convertire l'energia luminosa in energia chimica e sfruttarla per il loro metabolismo, liberando ossigeno in oceano e in atmosfera, attraverso quel processo che tutti conosciamo come fotosintesi ossigenica.

In questo lavoro di tesi ci si è concentrati sullo studio di due microalghe verdi, appartenenti a due classi differenti ma che condividono un antenato comune, la Cloroficea *Dunaliella salina* e la Prasinoficea *Tetraselmis suecica*, focalizzando il lavoro sulla caratterizzazione della loro risposta a stress abiotici, in particolare una bassa disponibilità di solfato e un'elevata intensità luminosa. Entrambe queste condizioni sono potenzialmente dannose per la fotosintesi: lo zolfo è un elemento essenziale, ad esempio, per il trasporto elettronico; un'elevata intensità luminosa è ben nota condizione di stress che, causando la formazione di specie reattive dell'ossigeno, può indurre danni all'apparato fotosintetico. Ne consegue che anche la crescita e la composizione cellulare possano essere influenzate.

In generale entrambe le alghe verdi sono state in grado di acclimatarsi alle condizioni di crescita non ottimali in modo specie specifico e stress specifico.

Un'alterazione nella crescita non ha comportato una ridotta efficienza fotosintetica in seguito alla bassa disponibilità di S nelle due specie algali. Cambiamenti nel contenuto in pigmenti suggeriscono comunque che l'acclimatazione alla bassa

disponibilità di solfato sia avvenuta grazie ad una modifica nell'apparato fotosintetico. La composizione cellulare nei principali pool di macromolecole (proteine, carboidrati e lipidi) invece ha evidenziato un differente rapporto tra le macromolecole analizzate, con un maggiore accumulo di lipidi nei campioni di *T. suecica* rispetto alla condizione controllo, e di carboidrati in *D. salina*.

La crescita ad alta luce, al contrario, ha comportato un lieve calo nell'efficienza fotosintetica di entrambe le specie, in linea con una crescita minore rispetto alla condizione controllo. La caratterizzazione della composizione cellulare in pigmenti e macromolecole ha mostrato in *T. suecica* modifiche prevalentemente riconducibili all'apparato fotosintetico, con un calo del contenuto in pigmenti, mentre i diversi pool di macromolecole mostrano una proporzione relativa simile al controllo. Al contrario, in *D. salina* è stato evidenziato un cambiamento nella composizione cellulare, con un aumento del rapporto tra lipidi/proteine e carboidrati/proteine, mentre il contenuto in pigmenti risulta più simile al controllo ad eccezione della *clorofilla b*.

Caratterizzare la capacità delle microalghe di rispondere a condizioni ambientali sfavorevoli, quali due stress sopraccitati, può contribuire a spiegare la biodiversità del fitoplancton e come possa eventualmente cambiare a seguito di cambiamenti nel loro habitat, oltre ad avere potenziali risvolti applicativi nell'utilizzo di microalghe come fonte di molecole ad alto valore aggiunto.

1 INTRODUZIONE

1.1 Le microalghe

Le alghe includono un gruppo eterogeneo di organismi che ha avuto un'origine filogenetica diversa (Lane and Archibald, 2008). A partire dalle linee che si sono originate per endosimbiosi primaria, le alghe verdi, le alghe rosse e le glaucofite, si sono ulteriormente diversificati i gruppi algali grazie ad eventi successivi di endosimbiosi secondaria (Bhattacharya et al, 2007). La classificazione odierna è il frutto di numerosi studi di filogenetica che hanno portato ad una nuova divisione per quanto riguarda gli organismi eucarioti odierni (Burki et al, 2020). In questa tesi il lavoro sarà focalizzato su alghe verdi la cui classificazione filogenetica è esemplificata in figura 1.1 (Keeling e Burki, 2019).

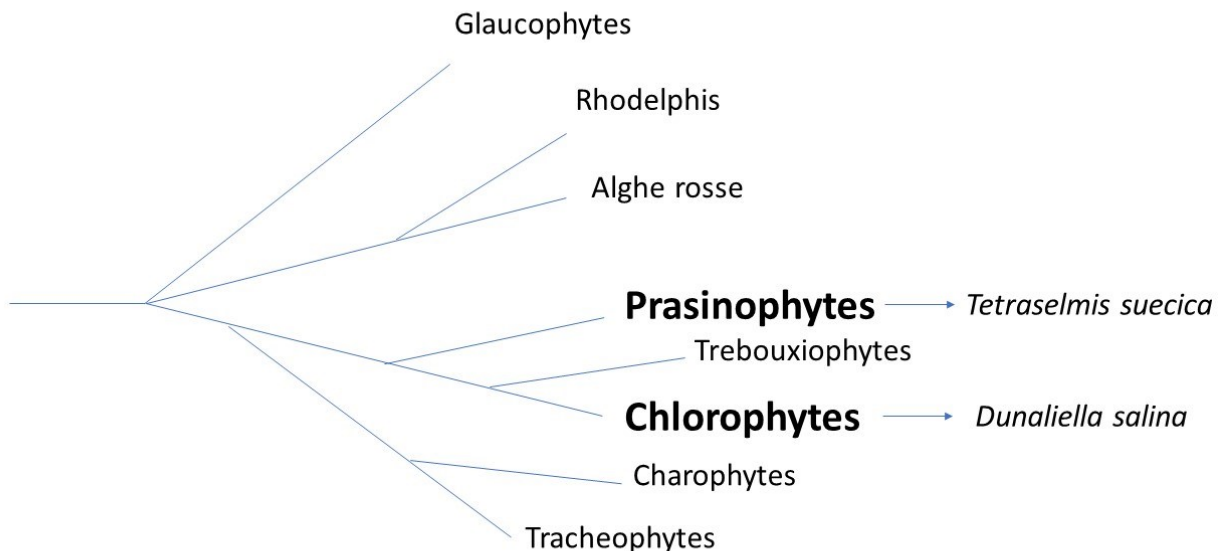


Figura 1.1: Albero filogenetico schematico focalizzato sull'Archeoplastidia (Keeling and Burki, 2019). In grassetto i due phyla a cui appartengono le due specie analizzate.

Le microalghe sono prevalentemente organismi eucarioti autotrofi acquatici, ma esistono anche specie terrestri. Occupano una moltitudine di ambienti, tra cui maggiormente i bacini idrici salati, quelli dolci e anche le acque salmastre. In tutti gli ambienti in cui vivono si differiscono le microalghe planctoniche e bentoniche.

Le microalghe planctoniche vivono nella colonna d'acqua e costituiscono quello che viene definito il fitoplancton, ovvero la componente autotrofa della comunità planctonica e fattore chiave per l'ecosistema marino. Sono generalmente unicellulari o coloniali e presentano adattamenti al galleggiamento che permettono loro di rimanere a livello della zona eufotica, la parte della colonna d'acqua illuminata, condizione necessaria per la fotosintesi.

Le microalghe bentoniche vivono sul fondo o in associazione a substrati come rocce, sabbia o altri organismi come animali o altre alghe macroscopiche.

Tra le caratteristiche che differenziano i diversi gruppi di alghe vi è il set di pigmenti fotosintetici che contengono. La variabilità di queste molecole in questi organismi è notevole: ogni gruppo, infatti, presenta un diverso corredo pigmentario. Ad esempio, le alghe verdi sono caratterizzate dalla presenza di *clorofilla a* e *b*; le diatomee, appartenenti al gruppo degli Stramenofili, sono invece caratterizzate dalla presenza della *clorofilla c* invece della *clorofilla b* come pigmenti accessori (Sukenik et al, 2000; Koziol et al, 2007; Engelken et al, 2010; Neilson and Durnford 2010; Buchel 2020).

Il differente corredo pigmentario appartenente ad ogni gruppo algale è frutto non solo dell'evoluzione (endosimbiosi primaria o secondaria), ma anche dell'habitat in cui vive la specie. Ad esempio, a seconda della profondità lo spettro di radiazione percepito è diverso, e questo correla con un diverso corredo pigmentario sia in termini di qualità che quantità dei singoli pigmenti. (Stomp et al., 2004).

In questa tesi il lavoro si è focalizzato sullo studio di due alghe verdi, *Dunaliella salina* e *Tetraselmis suecica*.

1.2 Le specie prese in esame.

1.2.1 *Dunaliella salina*

Dunaliella salina è una microalga unicellulare, appartenente alla classe delle Chlorophyceae, caratterizzata da due flagelli e dalla mancanza di parete cellulare,. I pigmenti principali di quest'alga sono la *clorofilla a* e *b*, che conferiscono un tipico colore verde; assieme alle clorofille troviamo i carotenoidi. È capace di tollerare grandi stress come alte temperature e alti valori di salinità (Hejazi et al, 2004). Ciò avviene grazie alla sua capacità di accumulare grandi quantità di un carotenoide in particolare e cioè il beta carotene. Il beta-carotene viene poi ampiamente utilizzato a livello industriale come cibo, in ambito farmaceutico e cosmetico come antiossidante e anche come colorante naturale (Hejazi et al, 2004).

1.2.2 *Tetraselmis suecica*

Tetraselmis suecica è una microalga unicellulare appartenente alla classe delle Prasinophyceae. È caratterizzata da quattro flagelli e una copertura cellulare fatta di scaglie. Come *D. salina*, anche *T. suecica* è nota per le sue molteplici applicazioni, che vanno dall'acquacoltura, dove viene utilizzata come alimento per molluschi e crostacei e probiotico negli allevamenti ittici, a possibili applicazioni in ambito nutraceutico. *T. suecica*, infatti, ha grandi capacità di accumulo di antiossidanti quali carotenoidi e tocoferolo, che la rendono appetibile come un'alternativa alimentare nella dieta dell'uomo o per l'utilizzo dei suoi estratti di pigmenti per la protezione

contro gli stress ossidativi anche in cellule umane, con potenziali benefici per la salute (Sansone et al, 2017; Chini Zitelli et al, 2006; Irianto et al, 2002; Perez-Lopez et al, 2014; Carballo-Càrdenas et al, 2003).

1.3 La luce e il processo fotosintetico

Come detto nel paragrafo 1.1, le microalghe sono tra i principali organismi fotoautotrofi, capaci quindi di utilizzare la luce come fonte di energia per produrre materia organica a partire da materia inorganica. Il processo attraverso il quale avviene questa trasformazione prende il nome di fotosintesi ossigenica, e nelle cellule eucariotiche avviene in particolari organelli chiamati plastidi.

Nella sua definizione più semplice la fotosintesi è il processo di trasformazione dell'energia luminosa in energia chimica (Rascio et al, 2021). L'intero processo fotosintetico consiste di due fasi dipendenti tra loro:

- Una prima fase, detta fase luminosa, permette la raccolta e l'utilizzo della luce in reazioni che portano alla formazione di ATP e NADPH.
- Una seconda fase di organizzazione di precursori inorganici (CO₂) in composti organici, utilizzando i prodotti ricavati dalle reazioni luminose.

1.3.1 I pigmenti fotosintetici

La capacità di assorbire i quanti di luce da parte delle alghe è data dalla presenza dei pigmenti fotosintetici, ovvero classi di molecole caratterizzate dalla presenza di doppi legami chimici che conferiscono loro la capacità di assorbire la luce a determinate lunghezze d'onda. La regione in cui assorbono queste molecole è quella che va dai 400 ai 700 nm, ed è indicata come *Photochemical Active Radiation (PAR)*.

I pigmenti fotosintetici degli organismi capaci di fotosintesi ossigenica si dividono in tre classi:

1. Clorofille:

Sono delle molecole appartenenti alla classe dei tetrapirroli caratterizzate da una testa che vede un anello pirrolico con al centro un atomo di magnesio, ed una coda di fitolo. Sono la classe di pigmenti più importante perché fanno parte dei centri di reazione dei due fotosistemi e sono coinvolti in interazioni pigmenti-proteina per la raccolta e il successivo trasferimento dell'energia fino al centro di reazione. La *clorofilla a* è l'unica presente in tutti gli organismi fotosintetici ma esistono anche differenti tipi di clorofille, come la *clorofilla b* presente in tutte le clorofite o la *clorofilla c* presente nelle diatomee.

2. Carotenoidi:

Sono composti isoprenoidi a 40 atomi di carbonio divisi in caroteni e xantofille, che sono le forme ossigenate di quest'ultimi. Molti carotenoidi sono localizzati sulle membrane tilacoidali, legati ai complessi antenna e hanno sia ruolo di raccolta dell'energia luminosa che ruolo fotoprotettivo (Gong and Bassi, 2016)

3- Oltre alle clorofille e ai carotenoidi, vi sono anche le Ficobiline, tipiche dei Cianobatteri e di alcune classi di alghe rosse, motivo per cui non verranno ulteriormente approfondite in questo elaborato.

1.3.2 PSII e PSI

Il fotosistema II (PSII) e il fotosistema I (PSI), localizzati sulle membrane tilacoidali, sono complessi multiproteici che comprendono un *core*, che include i centri di reazione, il sito dove avviene la trasformazione dell'energia luminosa in elettroni ed è formato dai polipeptidi che coordinano il dimero speciale e i trasportatori di elettroni, e delle antenne accessorie, appartenenti alla classe delle *Light Harvesting Complexes* (LHC), che hanno la funzione di raccogliere l'energia luminosa e convogliarla al centro di reazione dove avviene la separazione di carica (Cafarri et al, 2014).

Nonostante questa struttura comune, i due fotosistemi si differenziano sia rispetto ai loro trasportatori di elettroni, in quanto il PSII è di tipo chinonico, mentre il PSI include diversi centri Fe-S, sia per il loro picco di assorbimento, come

esemplificato dai loro dimeri speciali, P680 e P700 per PSII e PSI, rispettivamente (Caffari et al, 2014)

Core e antenne accessorie si differenziano, oltre che per la funzione, anche per i pigmenti che coordinano. La *clorofilla a* è localizzata nei centri di reazione e nelle antenne accessorie, mentre la *clorofilla b* è tipica delle antenne accessorie (Caffari et al, 2014).

1.3.3 Trasporto elettronico fotosintetico

L'accumulo dei prodotti della fase luminosa della fotosintesi, NADPH e ATP, è garantito da quello che viene chiamato flusso lineare di elettroni tra i due fotosistemi (Cardol et al, 2010). Quando un fotone viene assorbito da uno dei fotosistemi, i pigmenti che costituiscono il centro di reazione passano ad uno stato di energia maggiore (definito eccitato) in cui sono capaci di trasferire un elettrone (e^-) ad una molecola accettrice.

Più nel dettaglio, come schematizzato in Figura 1.2, il PSII cede un elettrone del suo dimero speciale P680, attraverso una serie di passaggi, ad una molecola di plastochinone, e recupera l'elettrone perso dalla fotolisi dell'acqua, reazione che ha come prodotto finale anche la liberazione di una molecola di ossigeno (Norici et al, 2022). In seguito, il plastochinolo diffonde nella membrana tilacoidale e dona elettroni al complesso del Citocromo b_6f (Cyt b_6f), il quale a sua volta lo cede ad una proteina mobile nel lumen tilacoidale, la plastocianina, che lo

trasferisce al PSI, ripristinando lo stato fondamentale del suo dimero speciale P700 che, a seguito dell'assorbimento di un fotone, aveva ceduto un elettrone alla ferrodossina grazie all'ausilio di diversi trasportatori, tra cui 3 centri Fe-S (Norici et al, 2022).

Dalla ferrodossina, gli elettroni passano al NADP^+ che viene ridotto a NAD(P)H grazie all'azione della Ferrodossina - NADP^+ riduttasi (FNR).

Il flusso lineare di elettroni è accoppiato alla traslocazione di protoni dallo stroma al lume tilacoidale, necessario alla sintesi di ATP.

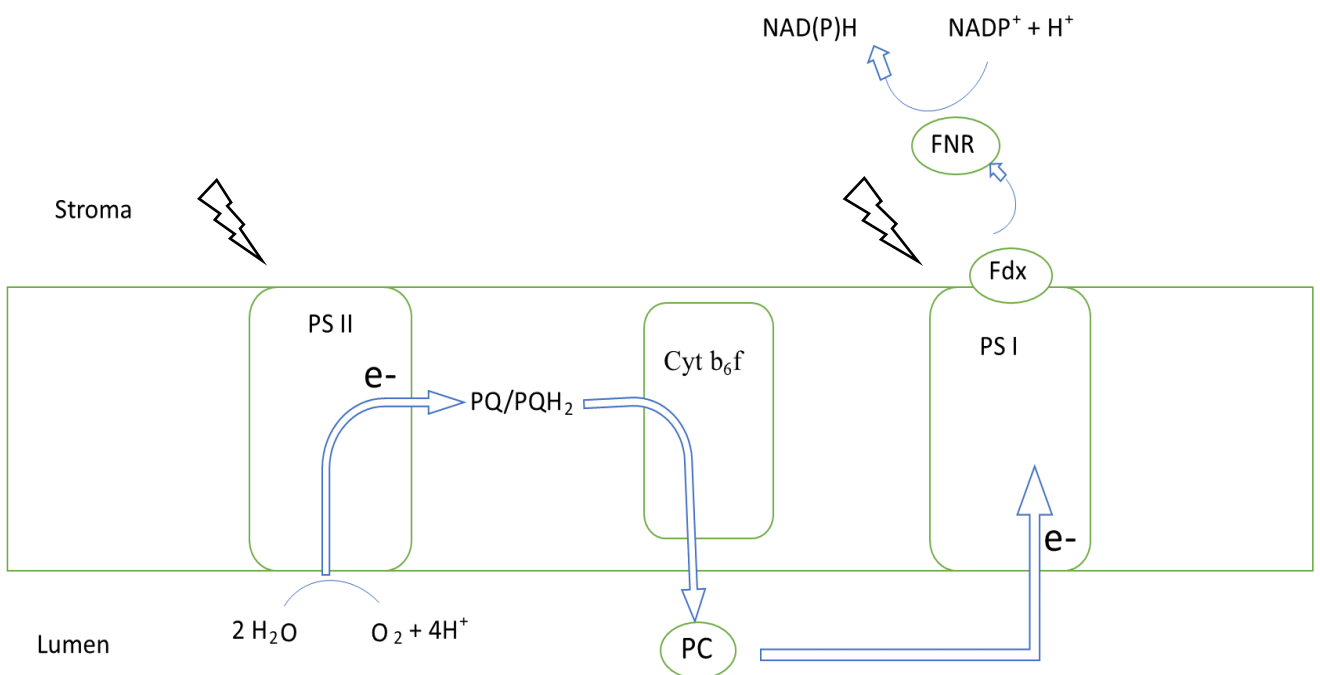


Figura 1.2: Rappresentazione schematica del trasporto elettronico.

1.3.4 Impatto delle condizioni ambientali sull'attività fotosintetica

Come abbiamo visto nei paragrafi precedenti, le microalghe planctoniche vivono nella colonna d'acqua, e sono sottoposte a continue variazioni nei parametri dell'ambiente circostante che possono avvenire su scale temporali più lunghe (giorni o mesi) come periodi di temperature estreme o di mancanza di nutrienti essenziali, o di (i) breve durata, come continui movimenti nella zona dell'*upper mixed layer* (zona superficiale interessata da continui rimescolamenti dovuti, ad esempio, al moto ondoso) che alternano periodi di forte illuminazione a periodi di luce minore anche nell'arco di ore.

La necessità di rispondere a tali cambiamenti, tramite processi attivati con scale temporali differenti, comporta una rapida regolazione di diverse funzioni cellulari per fronteggiare cambiamenti repentini, oppure un'acclimatazione, quindi un cambiamento nell'espressione genica e conseguentemente nel proteoma della cellula, per fronteggiare variazioni ambientali che perdurano nel tempo, con conseguente cambiamento nel metabolismo e nella crescita (Norici et al, 2022).

In riferimento alla fotosintesi, le variazioni naturali nell'illuminazione possono provocare danni agli apparati fotosintetici a seguito di illuminazione troppo intensa. Altri fattori abiotici possono ulteriormente favorire l'insorgenza di danni all'apparato fotosintetico. Le cellule vegetali hanno quindi evoluto numerosi meccanismi per proteggere l'apparato fotosintetico da danni indotti da fattori abiotici.

1.3.5. Meccanismi di regolazione della fase luminosa della fotosintesi

Alcuni meccanismi di regolazione della fase luminosa della fotosintesi sono di rapida attivazione e permettono di rispondere su una scala temporale di secondi o minuti a cambiamenti nell'ambiente circostante per evitare danni ai fotosistemi.

L'insieme dei processi con cui l'apparato fotosintetico modula la sua attività in risposta a variazioni nei fattori abiotici viene definito fotoprotezione. PSII e PSI hanno meccanismi caratteristici e diversi tra loro, come brevemente descritto nei paragrafi successivi. L'insieme di questi processi permette di evitare la sovrariduzione della catena fotosintetica di elettroni ed i conseguenti danni ossidativi all'apparato fotosintetico e a componenti cellulari in generale.

Dissipazione dell'energia assorbita in eccesso come calore

Uno dei meccanismi di fotoprotezione più rapidi consiste nella dissipazione, sotto forma di calore, dell'energia luminosa assorbita in eccesso dal PSII rispetto a quella che la cellula è in grado di utilizzare per il trasporto elettronico fotosintetico (Niyogi e truong 2013; Goss e Lepetit, 2015). La dissipazione come calore è spesso indicata con l'acronimo NPQ (*Non Photochemical quenching*), e presenta diverse componenti, studiate principalmente in specie modello quali, per le microalghe, l'alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* o la diatomea *Phaeodactylum tricorutum*. Una delle componenti del NPQ viene definita energy quenching (qE), e in *C. reinhardtii* è

opera principalmente dall'azione di proteine intrinseche della membrana tilacoidale chiamate *Light Harvesting Complex Stress Related* (LHCSR), appartenenti alla famiglia delle LHC; queste proteine hanno la capacità di percepire bassi valori di pH nel lumen (Peers et al., 2009; Bonente et al., 2011). Nelle diatomee, la proteina omologa LHCX mostra importanti differenze nella sua attività rispetto a LHCSR (Bailleul et al., 2010)

Un altro meccanismo di protezione è dato dall'accumulo di carotenoidi, quali zeaxantina in alghe verdi e diatoxantina in diatomee, accumulata a seguito del ciclo delle xantofille (Lacour et al., 2020).

Lo studio di diverse specie algali ha inoltre messo in luce differenze nel contributo relativo alla dissipazione come calore dipendente dall'accumulo di specifiche proteine LHC-like e carotenoidi (Goss e lepetit 2015; Gerotto e Morosinotto 2013).

Transizioni di stato

Altro meccanismo di regolazione coinvolge entrambi i fotosistemi ed è noto come transizioni di stato (Depege et al., 2003). Un'illuminazione non bilanciata tra i due fotosistemi non permette di utilizzare la luce assorbita in modo ottimale per il trasporto degli elettroni. Ad esempio, una quantità maggiore di luce assorbita dal PSII rispetto al PSI provoca un accumulo di elettroni nella catena di trasporto che si realizza in una maggiore riduzione dei plastochinoni. La transizione di stato prevede quindi lo spostamento di proteine antenna da un fotosistema all'altro, in

particolare di LHCII da PSII a PSI (Huang et al., 2021). Questo processo può essere particolarmente pronunciato in alcune specie algali. Ad esempio, in *Chlamydomonas reinhardtii* si è visto come circa l'80% delle LHCII si possa dissociare dal PSII, anche se è ancora oggetto di studio la frazione di esse che si associa poi al PSI (Nagy et al., 2014, Ulnu et al., 2014)

Trasporto elettronico ciclico

Il trasporto ciclico di elettroni al PSI può avere diverse funzioni fisiologiche, tra cui la protezione del PSI stesso; infatti, questo flusso, a differenza di quello lineare che collega i due fotosistemi, è tipico del PSI e permette il trasporto di e⁻ in eccesso dal lato riducente del PSI al pool di plastochinoni (Cardol et al., 2016). La natura di questo ciclo a livello fisiologico è quella di contribuire alla sintesi di ATP, ma in condizioni di sovraccarico di elettroni nella catena di trasporto il ciclo può fungere da meccanismo di fotoprotezione dal momento che (i) ossida il lato accettore e riduce il lato donatore del PSI, (ii) contribuisce all'attivazione dei meccanismi di regolazione di NPQ nel PSII, poiché produce un gradiente protonico che abbassa il pH nel lumen tilacoidale.

Trasporti elettronici alternativi

Oltre al flusso ciclico di elettroni del PSI, un importante ruolo di protezione nell'accumulo degli elettroni è quello svolto dal cosiddetto ciclo acqua-acqua, che, come da nome, prevede l'uso di elettroni in eccesso accumulati nei trasportatori

tilacoidali e derivanti dalla fotolisi dell'acqua, per ridurre O_2 a H_2O (Cardol et al, 2010).

Un esempio di trasporto alternativo di elettroni è quello dato dalla cloro-respirazione, un processo che prevede la donazione degli elettroni al pool di plastochinoni da parte della ferredossina ridotta; questi elettroni vengono utilizzati per ridurre l'ossigeno presente nello stroma ad acqua attraverso una proteina inserita nella membrana tilacoidale (*plastid terminal oxidase*, PTOX) (Curien et al. 2016).

1.3.6 La fotoinibizione

L'insieme dei meccanismi di fotoprotezione non è in grado di evitare completamente danni all'apparato fotosintetico. Vi è però un meccanismo che permette il recupero della funzionalità di PSII danneggiati, che prevede la sostituzione del suo polipeptide D1, componente il dimerico del centro di reazione del PSII (Mulo et al, 2012). Un calo evidente dell'efficienza fotosintetica è quindi visibile solo quando la quantità di PSII danneggiati supera la capacità della cellula di ripararli.

Non vi è, invece, un equivalente meccanismo per riparare PSI danneggiati, che vanno completamente disassemblati e risintetizzati.

In generale, la presenza di fotoinibizione comporta un calo di produzione dei prodotti della fase luminosa, con conseguente calo di energia metabolica a disposizione della cellula.

1.3.7 Ciclo di Calvin-Benson e metabolismo del C

La seconda fase della fotosintesi prende il nome di ciclo di Calvin-Benson, ed è la parte fondamentale del metabolismo del carbonio negli organismi capaci di fotosintesi ossigenica. Un ruolo fondamentale in questo processo lo gioca la Ribuloso 1,5 bifosfato Carbossilasi/Ossigenasi (Rubisco), un enzima chiave nella fotosintesi, che è capace di fissare carbonio inorganico su uno scheletro carbonioso, producendo due molecole di 3-fosfo-glicerato (3PG) (Erb and Zarzycki, 2018). I carboidrati prodotti dal ciclo Calvin-Benson seguiranno poi diverse vie nel metabolismo della cellula, rappresentando scheletri carboniosi che possono essere utilizzati per la sintesi di carboidrati più complessi, lipidi, proteine e acidi nucleici (Erb and Zarzycki, 2018).

1.4 Lo zolfo

Lo zolfo assieme al carbonio, all'azoto e al fosforo rappresenta un macronutriente per le cellule fotosintetiche, e questi elementi sono presenti in un rapporto minimo definito come rapporto Redfield dove C:N:P:S è pari a 106:16:1:0.7 per garantire alla cellula una crescita fisiologica ottimale (Giordano et al, 2005).

1.4.1 Evoluzione della concentrazione dello zolfo negli oceani

La quantità di zolfo disponibile negli oceani non è stata sempre la stessa; quando comparvero i cianobatteri, primi organismi fotosintetici, la concentrazione di solfato

negli oceani non superava le 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Giordano et al., 2016). Con l'aumento degli organismi capaci di fotosintesi ossigenica e quindi l'aumento dell'ossigenazione in atmosfera, la concentrazione di solfato diventò molto più abbondante, intorno a 1-5 mmol L^{-1} (Giordano et al., 2016); tra il Paleozoico e il Mesozoico la concentrazione di zolfo negli oceani arrivò a livelli compresi tra i 13-27 mmol L^{-1} . Proprio in concomitanza con questa abbondanza, si ebbe una netta transizione dei produttori primari da alghe verdi, a specie appartenenti alla “linea rossa” del plastidio, come le diatomee (Ratti et al., 2011; Giordano et al., 2016).

1.4.2 Ciclo biogeochimico, acquisizione e metabolismo dello zolfo nelle alghe

Lo zolfo è presente in atmosfera in forma gassosa come acido solfidrico (H_2S) e come dimetilsolfato (DMS) e nelle rocce componenti la litosfera terrestre. Negli oceani arriva tramite *weathering* dalle rocce oppure viene liberato dalle profondità degli oceani. Lo zolfo disponibile per le alghe si trova sotto forma di solfato; quindi, nella sua forma più ossidata (S^{+6}), e per essere utilizzato deve essere ridotto a solfuro (S^{-2}) e poi incorporato in molecole organiche ed utilizzato nel metabolismo (Takahashi et al., 2011).

Per l'acquisizione di solfato sono presenti due tipologie di trasportatori sul plasmalemma, una tipologia ad alta affinità appartenente alla classe dei SULTR, espressa quando vi è carenza di zolfo, e una a bassa affinità che invece è presente sempre (Gigolashvili and Kopriva, 2014).

Il solfato, una volta entrato nella cellula e, successivamente, trasportato all'interno del cloroplasto, viene ridotto a solfuro. Una volta ridotto, il solfuro viene impiegato per la sintesi di cisteina (Takahashi et al., 2011).

Sottoforma di cisteina lo zolfo organico può essere utilizzato per la sintesi di molte altre molecole contenenti S, tra cui l'altro aminoacido contenente S, la metionina, o per la costituzione di centri Fe-S, fondamentali per vari complessi proteici, tra cui il PSI (paragrafo 1.3.2). La disponibilità di zolfo inorganico e poi organico è quindi essenziale per molteplici funzioni cellulari, tra cui la fotosintesi, sia nella sua fase luminosa (centri Fe-S) che nel metabolismo del carbonio (attraverso il controllo redox di enzimi, ad esempio).

1.5. Scopo della tesi

Come abbiamo visto nei paragrafi precedenti, fattori abiotici come elevate intensità luminose o la privazione di un nutriente come lo zolfo, possono danneggiare direttamente l'apparato fotosintetico o limitare la sintesi di alcune delle sue componenti.

In questo lavoro di tesi due alghe verdi unicellulari, *D. salina* e *T. suecica*, già note per la loro capacità di rispondere efficacemente a variazioni ambientali e relativamente vicine filogeneticamente, sono state cresciute in condizioni di alta luce o limitazione nella disponibilità di solfato. È stata quindi studiata la funzionalità dell'apparato fotosintetico, la capacità delle due microalghe di modulare la loro attività fotosintetica in risposta agli stress, e quanto tale capacità permetta o meno una efficace acclimatazione in termini di crescita e composizione cellulare.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Mezzi di coltura e condizioni di crescita

Le specie su cui sono stati condotti gli esperimenti sono *Dunaliella salina* (CCAP 19/25), un'alga verde appartenente alla classe delle *Chlorophyceae*, e *Tetraselmis suecica* (CCAP 66/4), un'alga verde appartenente alla classe delle *Prasinophyceae*.

Le colture sono state mantenute in terreno AMCONA, ottimizzato per emulare l'acqua di mare (Fanesi et al., 2014; Figura 2.1), in camere di crescita ad una temperatura di 20 °C e luce continua, ma a diversa densità di flusso fotonico a seconda della specie. *Tetraselmis suecica* è stata mantenuta ad un flusso di 50 micromol fotoni $m^{-2} s^{-1}$, mentre *Dunaliella salina* a 100 micromol fotoni $m^{-2} s^{-1}$. In aggiunta alla condizione di crescita controllo (CTR) appena descritta, le alghe sono anche state coltivate in limitazione da solfato (S-lim) o ad alta luce (HL).

Per la condizione ad HL è stata utilizzata una lampada a LED (lampada Combo 300W, C-LED) con una intensità luminosa pari a 250 micromol fotoni $m^{-2} s^{-1}$. Il terreno di crescita era il medesimo del CTR.

Per la condizione S-lim le condizioni di illuminazione sono le stesso del CTR, ma è stato utilizzato un terreno AMCONA modificato, in cui sali solfati sono stati sostituiti da sali cloruri. Al mezzo “senza zolfo” veniva successivamente aggiunta la quantità di Na_2SO_4 1M necessaria per avere una molarità finale di solfato nel mezzo di 50 μ M.

Per ottenere la condizione sperimentale di limitazione da solfato, le colture di *T.*

suecica e *D. salina* sono state acclimatate a concentrazioni via via decrescenti di solfato. Dalle condizioni CTR si è passati a una molarità di 500 μ M di solfato, e portate a 50 μ M dopo una settimana per *D. salina*; per *T. suecica* c'è stato un passaggio intermedio a 100 μ M.

AMCONA (1L)

	Stock []	Final []	Volume for 1 L
NaCl		363 mM	21.21 g
Na ₂ SO ₄	1 M	25 mM	25 mL
KCl	1.6 M	8.04 mM	5 mL
NaHCO ₃	0.41 M	2.07 mM	5 mL
KBr	3.63 M	725 μM	0.2 mL
H ₃ BO ₃	0.37 M	372 μM	1 mL
NaF	0.33 M	65.7 μM	0.2 mL
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1.65 M	41.2 mM	25 mL
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.83 M	9.14 mM	5 mL
SrCl ₂ · 6H ₂ O	0.41 M	82 μM	0.2 mL
NaNO ₃	2.74 M	549 μM	0.2 mL
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	100 mM	21 μM	210 μL
*Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	205 mM	205 μM	1 mL
*CuSO ₄ · 5H ₂ O	40 μM	40 nM	1 mL

- METALS SOLUTION I – Iron

1 mL of 6.5 mM stock final concentration 6.56 μM

- METALS SOLUTION II- Trace Metal

1 mL of the stock solution

- VITAMINS SOLUTION

1 mL of the stock solution

- TRIS-HCl, pH 8.1, 1 M

final concentration 10 mM (10 ml stock)

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

	g L ⁻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]

	g L ⁻¹ stock solution	Final concentration
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.073	254 nM
CoSO ₄ · 7H ₂ O	0.016	5.69 nM
MnSO ₄ · 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	1.49 x 10 ⁻³	6.3 nM
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	2.44	8.29 μM

First dissolve EDTA, then the other reagents.

VITAMIN STOCK [1 mL L⁻¹]

	g L ⁻¹ stock solution	Final concentration
Thiamine-HCl	0.1	297 nM
Biotin	0.002	4.09 nM
B ₁₂	0.001	1.47 nM

Figura 2.1: Ricetta dal mezzo AMCONA.

Prima degli esperimenti le colture sono state acclimatate almeno 2 settimane alle diverse condizioni di crescita (CTR, HL, S-lim) e per ciascuna condizione una coltura è stata mantenuta in fase esponenziale grazie a subculture settimanali ed utilizzata come pre-coltura per i vari esperimenti.

La concentrazione cellulare è stata monitorata grazie al contacellule CasyTT.

Per le colture sperimentali è stato utilizzato un numero di cellule/mL iniziale di $2,5 \times 10^5$. Per ogni condizione sperimentale è stata dapprima monitorata la crescita per due settimane, al fine di valutare la cinetica di crescita. Tutte le analisi successive sono invece state condotte su cellule campionate durante la fase medio-tarda esponenziale di crescita.

2.2 Quantificazione di Carbonio e Azoto cellulare

Lo strumento CHN (Elemental Combustion System ECS 4010, Costech) permette di analizzare la quantità di carbonio (C) e azoto (N) di un determinato campione attraverso la sua combustione; infatti, il campione, a seguito della sua combustione, produce composti gassosi uniformi costituiti dagli elementi C, N che vengono determinati attraverso la gascromatografia. Di conseguenza è possibile quantificare il contenuto di C ed N nel campione.

Per tutte le condizioni di crescita i campioni per la quantificazione del contenuto in C ed N tramite analisi elementale CHN sono stati prelevati dalle colture in fase esponenziale, circa 50mL, e centrifugati a 3300g per 10 minuti a temperatura ambiente per separare il surnatante dal pellet algale.

Al fine di eliminare tracce dei sali del terreno, il pellet veniva successivamente lavato con una soluzione di AMMONIO FORMATO 0.5M (una soluzione isotonica al mezzo di crescita), recuperando ogni lavaggio il pellet con una centrifuga a 3300g per 10 minuti. Infine, il pellet veniva risospeso in 2mL di AMMONIO FORMATO per esser trasferito in tubi da 2 ml, e centrifugato in una centrifuga termostata a 20°C a 7704g per 5 minuti. Eliminato nuovamente il surnatante, il pellet veniva seccato in una stufa a 80°C.

Una volta completamente seccato, il pellet, oltre a fornire il peso secco cellulare di ogni specie/condizione di crescita, poteva esser usato per l'analisi della composizione elementale di C ed N. Una quantità pari a circa 1mg di pellet algale seccato, opportunamente pesate, venivano inserite in capsule di argento cilindriche. Assieme al pellet dei campioni veniva aggiunta anche una piccola quantità, non pesata, di Vanadio che aiutava la combustione del campione. Oltre ai campioni algali, venivano preparati anche dei campioni di Urea, i quali venivano analizzati come standard al fine di calibrare lo strumento.

2.3 Quantificazione del contenuto proteico per cellula

Il pellet algale di una piccola aliquota di coltura in fase esponenziale (0.5, 1 o 2 ml, a seconda della specie e condizione di crescita) veniva recuperato tramite centrifugazione (20°C, 16000g, 10'); una volta rimosso il surnatante, il pellet veniva lavato con una soluzione di AMMONIO FORMATO 0.5M e nuovamente centrifugato a 16000gx10'. Successivamente si procedeva a rimuovere il surnatante.

Il protocollo per la quantificazione proteica è quello di Lowry in cui i campioni venivano trattati con 500µL di soluzione SDS e poi con due reagenti chiamati Reagente A e Reagente B (Tabella 1).

Reagente A	Volume
H₂O	1/4
CTC	1/4
10 % SDS	1/4
NaOH 0.8 M	1/4

Reagente B	Volume
Folin	1/5
H₂O	4/5

Soluzione SDS	Concentrazione finale
----------------------	------------------------------

SDS 10%	SDS 1%
NaOH 0.8 M	NaOH 0.1 M
H₂O	a volume

Tabella 2.1: Reagenti necessari alla quantificazione delle proteine

Il protocollo di Lowry prevede anche una retta di taratura che permetta di determinare il quantitativo di proteine nel campione; la preparazione della retta di taratura consisteva in 13 campioni a concentrazione nota di BSA (Albumina di Siero Bovino) preparata in uno stock di 1mg/mL a cui venivano aggiunti dei μL di soluzione SDS per un volume finale pari a 500 μL (Tabella 2.2)

BSA(μL)	Soluzione SDS(μL)
0	500
5	495
10	490
15	485
20	480
30	470
40	460
50	450
60	440
70	430
80	420

90	410
100	400
115	385

Tabella 2.2: Concentrazioni di BSA e soluzione SDS per i campioni della retta di taratura.

Una volta preparata la retta di taratura, tutti i campioni venivano trattati allo stesso modo; i campioni venivano risospesi in 500 μ L di soluzione SDS e vortexati (al fine di aiutare la rottura cellulare); successivamente si aggiungevano 500 μ L di Reagente A e si attendevano 10', prima di aggiungere 250 μ L di Reagente B e lasciare 30' i campioni prima di procedere con l'analisi.

Quest'ultimo passaggio permetteva il viraggio dei campioni da un colore biancastro ad un colore blu acceso in base al quantitativo di proteine presente nel campione stesso; la retta di taratura invece aveva una scala di colorazione da bianco a blu in quanto la quantità di proteine era sempre crescente (Figura 2.2).



Figura 2.2: Campioni usati per la retta di taratura. *Esempio di retta di taratura con concentrazione crescente di BSA che dava la colorazione da bianco a blu*

Terminata la reazione, si procedeva alla lettura del campione attraverso lo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda pari a 750nm. Il “bianco” era costituito da acqua Milli-Q. Le assorbanze dei campioni di BSA a concentrazione nota sono state utilizzate per generare una retta,

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

dove la y corrisponde al valore dell'assorbanza del campione, la x ai μg di proteine contenute nella cuvetta del campione, k è la pendenza della retta e m è l'ordinata del punto di intersezione tra la retta e l'asse y , la cui equazione permetteva di calcolare il contenuto di picogrammi di proteine per cellula dei campioni algali.

2.4 Analisi *Fourier Transform infrared spectroscopy* (FTIR)

L'analisi all'FTIR permette di determinare la concentrazione relativa di macromolecole presenti nella cellula, come acidi nucleici, proteine, lipidi e carboidrati attraverso la vibrazione dei rispettivi legami chimici che li compongono (Giordano et al, 2001).

I campioni venivano prelevati in fase esponenziale, in un diverso volume a seconda della specie e condizione: per *Dunaliella salina* in condizione CTR venivano prelevati 5mL di coltura mentre in condizione HL e S-Lim 10mL; per *Tetraselmis suecica* in condizione CTR e S-lim 5mL, nel trattamento HL 10mL.

Il volume prelevato veniva centrifugato a 3300g per 10 minuti; una volta rimosso il surnatante, il pellet veniva lavato con una soluzione di AMMONIO FORMATO 0.5M e nuovamente centrifugato a 3300g per 10 minuti.

Il pellet risultante infine veniva risospeso in 110 μ L di ammonio formato 0.5M; successivamente sono stati messi 50 μ L sull'apposito dischetto portacampioni di alluminio, poi stivati in stufa a 80°C per seccare il campione.

Insieme ai campioni è stato fatto anche un dischetto con 50 μ L di AMMONIO FORMATO 0.5M che serviva da bianco per la lettura allo strumento.

Per l'analisi è stato utilizzato uno spettrometro FTIR (Tensor 27, BRUKER) accoppiato ad un software OPUS 6.0. Una volta seccati i campioni venivano messi all'interno di una ruota porta campioni per l'acquisizione. Il Bianco veniva acquisito per primo, seguito dai campioni algali.

L'intervallo di assorbimento con il quale sono stati acquisiti gli spettri andava da 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} . Il range di analisi degli spettri invece è stato limitato alla regione 1800 cm^{-1} a 810 cm^{-1} , lunghezze d'onda in cui vi sono le assorbanze dei legami vibrazionali delle molecole di interesse, ovvero lipidi, proteine e carboidrati (Tabella 2.3).

Lunghezza d'onda (cm^{-1})	Pool macromolecolare
1730 \pm 5	Trigliceridi (C=O)
1650 \pm 10	Proteine (C=O dell'amide associato alle proteine)
1200-900	Carboidrati (C-O-C)

Tabella 2.3: La lunghezza d'onda e le relative molecole interessate.

Successivamente, dai rapporti delle macromolecole e dai dati delle quantificazioni proteiche è possibile ottenere una semi quantificazione del contenuto cellulare in lipidi e carboidrati.

2.5 Quantificazione dei pigmenti

I campioni venivano prelevati in fase di crescita esponenziale; per *Dunaliella salina* in condizione controllo e alta luce è stato utilizzato per l'analisi dei pigmenti 1mL di coltura mentre per la condizione in limitazione da solfato 2mL. Per *Tetraselmis suecica* 0.5mL di coltura in tutte le condizioni sperimentali.

In seguito, i campioni venivano centrifugati in una centrifuga termostata a 20°C a 16000g per 10 minuti; il surnatante veniva rimosso e il pellet lavato con una soluzione di AMMONIO FORMATO 0.5M.

Successivamente, al pellet è stato aggiunto 1mL di Acetone 80% per l'estrazione dei pigmenti; i campioni sono stati poi congelati in freezer a -20°C per permettere al solvente di estrarre completamente i pigmenti.

Dopo 2 giorni per *Dunaliella salina* e 4-5 giorni per *Tetraselmis suecica*, i campioni venivano centrifugati a 16000g per 10 minuti. Questo passaggio permetteva di separare il pellet dal surnatante contenente i pigmenti. Inoltre, permetteva di accertarsi che il pellet fosse completamente bianco e quindi che l'estrazione dei pigmenti fosse completa.

Per l'analisi dei pigmenti è stato usato uno spettrofotometro (UV-1900i; SHIMADZU) ed acquisito uno spettro di assorbimento nel visibile (350-750 nm) (Figura 2.3). Dallo spettro sono state ricavati i valori di assorbanza per il calcolo della concentrazione di *clorofilla a*, *clorofilla b* e carotenoidi totali secondo le formule

disponibili in letteratura (Porra et al, 1989 per la quantificazione delle clorofille, Wellburn, 1994 per quella dei carotenoidi totali) riportate in seguito.

$$\text{Chl } a \text{ } (\mu\text{g/cell}) = 12.25 A^{663.6} - 2.55 A^{646.6}$$

$$\text{Chl } b \text{ } (\mu\text{g/cell}) = 20.31 A^{646.6} - 4.91 A^{663.6}$$

$$\text{Chl } a+b = 17.76 A^{646.6} + 7.34 A^{663.6}$$

$$\text{Carotenoidi tot } (\mu\text{g/cell}) = (1000 A^{470} - 1.82C_a - 85.02C_b)/198$$

Per ogni spettro, a tutti i valori di assorbanza utilizzati è stato sottratto il valore di assorbanza registrato a 720nm, lunghezza d'onda a cui non c'è assorbimento dei pigmenti fotosintetici.

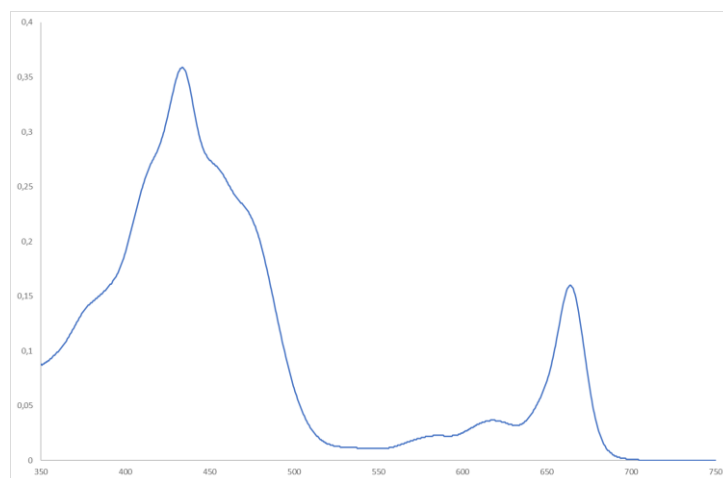


Figura 2.3: Spettro di assorbimento. *Esempio di spettro di assorbimento di Dunaliella salina in condizione controllo*

2.6 Analisi *in vivo* dell'efficienza fotosintetica: Dual-Pam 100

Cenni teorici sull'analisi della fluorescenza della clorofilla in vivo, cinetiche sperimentali e parametri analizzati

I pigmenti fotosintetici hanno la capacità di passare da uno stato a più bassa energia (definito fondamentale) ad uno stato ad alta energia (eccitato) grazie all'assorbimento della luce. Lo stesso pigmento può poi tornare allo stadio fondamentale rilasciando energia in diversi modi:

- 1- Fluorescenza: quando il rilascio di energia avviene per emissione di luce
- 2- Calore: l'energia di eccitazione viene dissipata sotto forma di calore
- 3- Fotochimica: l'energia viene utilizzata per il processo fotosintetico

L'analisi *in vivo* con lo strumento Dual Pam-100 (Walz) permette, misurando la fluorescenza del campione, di ottenere informazioni su alcuni parametri fotosintetici e l'attivazione di meccanismi che regolano la stessa fotosintesi analizzando la fluorescenza emessa dal campione. L'emissione di fluorescenza, infatti, compete con l'utilizzo dell'energia per via fotochimica o la sua dissipazione come calore.

Lo strumento utilizza diverse luci per l'analisi del PSII e PSI:

1. **FML (luce di misura)**: è la luce che serve per analizzare la fluorescenza del PSII
2. **PML (luce di misura)**: è la luce che serve per analizzare l'assorbanza del PSI
3. **AL (luce attinica)**: è la luce che induce la fotosintesi nel campione
4. **SP (Saturation Pulse)**: flash saturante, ovvero un flash di brevissima durata ad intensità molto alta; è un artificio sperimentale per poter calcolare i vari parametri descritti in seguito.

Prima dell'analisi il campione deve essere acclimatato al buio per avere tutti i centri di reazione aperti, cioè capaci quindi di assorbire un fotone. Il SP ha lo scopo di ottenere la situazione opposta (centri di reazione chiusi) per far in modo che rimangano attive solo la via di dissipazione come calore e la fluorescenza; infatti, senza SP non si saprebbe se la fluorescenza cala per opera della fotosintesi o della fotoprotezione.

Tipologia di analisi

Le analisi effettuate sui campioni prevedevano due tipologie di cinetica, un'analisi definita *Induction Curve* in cui i campioni venivano analizzati ad una luce PAR prestabilita (ad un'intensità pari alla luce di crescita e una a luce saturante) seguita da un periodo di buio. Questa tipologia di analisi permette di vedere le risposte dei campioni data l'alternanza del periodo luce-buio, soprattutto nel caso dell'analisi a luce saturante, dove l'interesse era rivolto ai principali meccanismi di fotoprotezione. Nel nostro caso il parametro più importante è quello dell'NPQ, un parametro complesso dal punto di vista fisiologico che, nella sua componente di più rapida attivazione, è generalmente legato all'attivazione della dissipazione come calore, ma che può racchiudere molti altri processi, brevemente descritti nel paragrafo 1.3.5, che hanno indirettamente un impatto sul valore del parametro NPQ registrato.

Una seconda analisi invece prende il nome di *Light Curve* e permette di valutare alcuni parametri all'aumentare dell'intensità della luce analizzando la Fluorescenza della clorofilla emessa dal campione nel PSII. Durante l'analisi la luce viene aumentata ogni 60 sec di intensità (da 0 a 2000 PAR). Ogni minuto di illuminazione si conclude con un flash saturante (6000 $\mu\text{moli di fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ per 600 millisecondi).

Oltre alla tipologia di cinetica, lo strumento Dual-PAM-100 permette anche di analizzare il campione solo per la fluorescenza della clorofilla, oppure nella modalità in cui vengono analizzate sia la fluorescenza che il segnale di assorbimento del PSI.

Parametri analizzati

Parametri considerati relativi al PSII:

Fv/Fm: resa quantica massima del PSII (da campione acclimatato al buio)

$$Fv/Fm = (Fm - Fo) / Fm$$

Dove Fo è la fluorescenza del campione acclimatato al buio ed esposto alla sola luce di misura; Fm è la fluorescenza massima del campione acclimatato al buio a seguito di un flash saturante

Y (II) = la resa quantica del PSII; questo parametro ha valori tra lo 0 e 1 e ci permette di stimare quanti fotoni che arrivano al campione vengono utilizzati per la fotosintesi.

Se ad esempio il valore è 0.5, ciò significa che la metà dei quanti assorbiti dal campione viene utilizzata per la fotosintesi.

$$Y(II) = (Fm' - F) / Fm'$$

NPQ = *non photochemical quenching*; questo parametro comprende un insieme di processi che regolano la fotosintesi. Il contributo principale, spesso, viene dai meccanismi che portano alla dissipazione dell'energia in eccesso sotto forma di calore.

$$NPQ = (Fm - Fm') / Fm'$$

Parametri considerati relativi al PSI:

$Y(I)$ = stima la resa del PSI; è definito dalla frazione del PSI ridotti (quindi capaci di fare separazione di carica) e non limitato dal lato accettore.

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

Preparazione dei campioni algali e cinetiche utilizzate

Per le analisi al PAM sono state utilizzate cellule da colture in fase esponenziale. La concentrazione di ogni campione analizzato veniva dapprima aggiustata in base a quella ottimale per l'analisi al PAM scelta da prove precedentemente condotte nel laboratorio (se necessario, il campione veniva concentrato o diluito), e quindi il campione veniva acclimatato al buio prima dell'analisi. Concentrazione del campione ed acclimatazione al buio erano diversificate a seconda della tipologia di analisi/specie come elencato in seguito:

- *D. salina* e *T. suecica* solo Fluo: 40 minuti al buio; 3×10^6 cell/mL
- *D. salina* Fluo+P700: 40 minuti al buio; 6×10^6 cell/mL
- *T. suecica* Fluo+P700 = 40 minuti al buio; 6×10^6 cell/mL

In questo lavoro di tesi sono state condotte cinetiche diversificate a seconda delle condizioni di crescita, come elencato in seguito:

- i campioni S-lim sono stati analizzati con *light curves* analizzando sia la fluorescenza che il segnale di assorbimento del PSI
- i campioni HL sono stati analizzati sia con *light curves* che con *induction curves*, analizzando la sola fluorescenza.
- i campioni CTR sono stati analizzati con tutte le tipologie di cinetiche descritte sopra, come confronto.

CAPITOLO 3: RISULTATI

3.1 Curve di crescita

Per entrambe le specie in analisi, sono state scelte condizioni di luce ottimali per la crescita, qui di seguito utilizzate come “condizioni controllo” grazie ad esperimenti preliminari che qui non sono riportati. Le colture mantenute quindi nella condizione di controllo (CTR) sono state esposte a 100 micromol fotoni $m^{-2} s^{-1}$ nel caso di *Dunaliella salina* e 50 micromol fotoni $m^{-2} s^{-1}$ per *Tetraselmis suecica*, entrambe cresciute in terreno AMCONA; successivamente sono state acclimatate a condizioni di limitazione da solfato (S-lim) pari a 50 microM o ad intensità luminosa maggiore della ottimale di controllo, pari a 250 micromol fotoni $m^{-2} s^{-1}$. Le colture controllo e quelle cresciute a diversa disponibilità di solfato o luce sono poi state confrontate, innanzitutto, per quanto riguarda la crescita (Fig. 3.1 e 3.3).

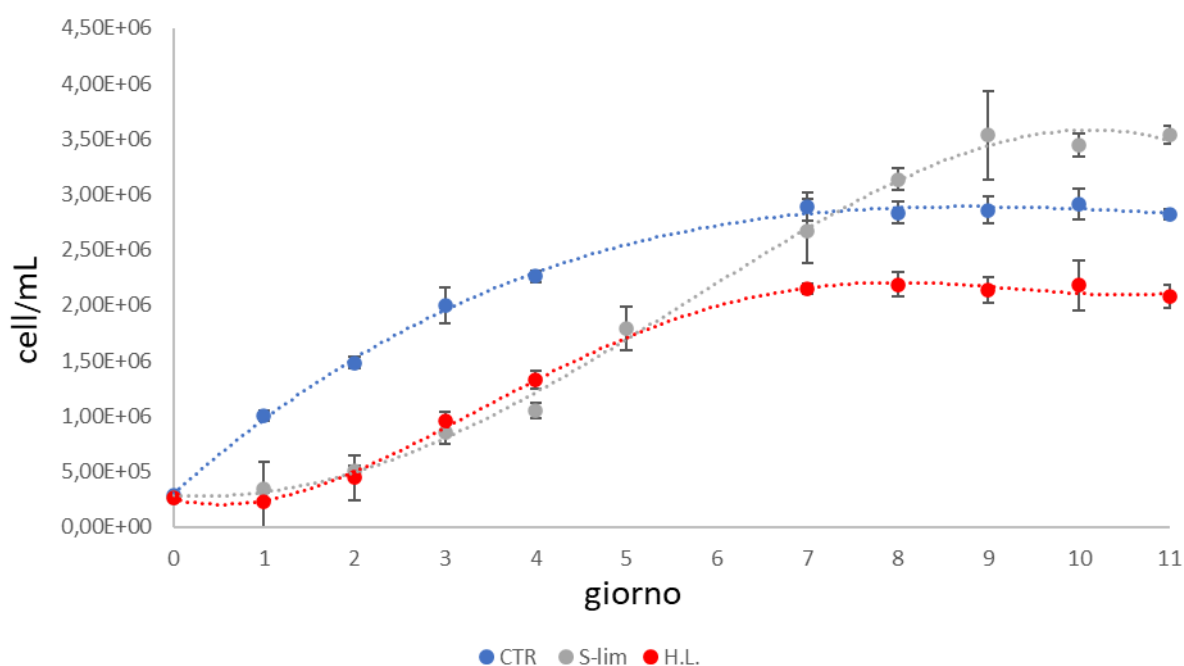


Figura 3.1: Curve di crescita di *Dunaliella salina*. Il grafico mostra la crescita di *Dunaliella salina* nelle tre condizioni sperimentali utilizzate ($t_0 = 2,5 \times 10^5$ cell/mL). In

blu la condizione CTR, colture cresciute ad una intensità luminosa di 100 micromol fotoni $m^{-2} s^{-1}$ e mezzo di crescita AMCONA, in grigio la coltura in limitazione da solfato (S-lim, 50 μM solfato, 100 micromol fotoni $m^{-2} s^{-1}$), in rosso la condizione ad alta luce 250 micromol fotoni $m^{-2} s^{-1}$ (HL). Il grafico rappresenta una crescita media \pm deviazione standard risultante da 3 campioni biologicamente indipendenti per condizione.

Per quanto riguarda *D. salina*, le colture CTR non hanno mostrato una fase lag iniziale ma le cellule sono in continua crescita in quella che viene definita fase esponenziale.

Dopo una settimana, le colture hanno raggiunto la fase stazionaria in cui il numero di cellule rimane stabile fino alla fine della curva.

Cellule cresciute in limitazione da solfato (S-lim), invece, hanno mostrato una fase lag iniziale, raggiungendo però lo stesso numero di cellule di CTR dopo una settimana di crescita, come visibile anche dall'osservazione delle colture (Figure 3.2).

Colture nella condizione ad alta luce (HL) sono anch'esse caratterizzate da una fase lag iniziale, simile al campione S-lim. Nella fase stazionaria, inoltre, la concentrazione cellulare in coltura è inferiore rispetto a quella delle altre due condizioni di crescita.



Figura 3.2: Confronto tra *Dunaliella salina* cresciuta in condizioni controllo (destra) e condizione in limitazione da solfato (sinistra); Foto scattate alla fine delle due settimane della curva di crescita di *Dunaliella salina* in condizione CTR e S-lim. Dalla foto si vede come non vi sia differenza tra le due condizioni

La analisi successive, volte a caratterizzare la composizione cellulare e l'efficienza fotosintetica dei campioni di *Dunaliella salina* cresciuti nelle diverse condizioni, sono state svolte su cellule campionate in fase medio-esponenziale (giorno 3 del CTR). Il giorno di campionamento stabilito per ognuna delle condizioni di crescita è stato diverso a seconda della curva di crescita (vedi materiali e metodi), in particolare per il campione S-lim, che ha mostrato una crescita più lenta ma prolungata rispetto alle altre due condizioni. Per alcune analisi della condizione S-lim sono state analizzate cellule campionate sia il quarto che il quinto giorno, per verificare se eventuali differenze fossero dovute alla crescita lenta iniziale.

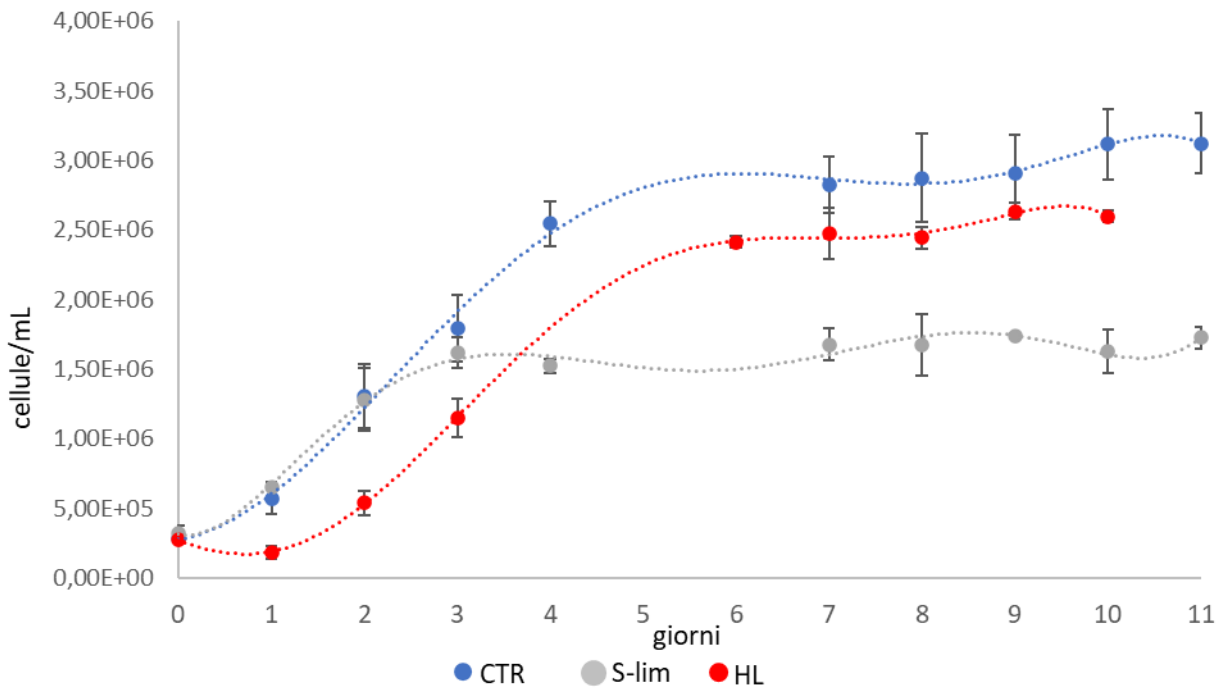


Figura 3.3: Curva di crescita di *Tetraselmis suecica*. Il grafico mostra la curva di crescita di *Tetraselmis suecica* nelle tre condizioni di crescita ($t_0 = 2,5 \times 10^5$ cell/mL). Il controllo in blu (CTR), colture cresciute ad un'intensità luminosa di 50 micromol fotoni $m^{-2} s^{-1}$ in mezzo AMCONA; in grigio il la coltura a limitazione da solfato (S-lim) (50 micromol di solfato, 50 micromol $m^{-2} s^{-1}$); in rosso la coltura cresciuta ad alta luce, 250 micromol di fotoni $m^{-2} s^{-1}$ (HL). La curva è stata fatta sulla base di una media \pm deviazione standard di 3 repliche per condizione.

La curva di crescita in figura 3.3 mostra la crescita esponenziale di *T. suecica* CTR fino al giorno 4, successivamente la densità cellulare è restata pressoché invariata (fase stazionaria).

La condizione a limitazione da solfato (S-lim) ha avuto un andamento pressoché uguale al CTR fino al giorno 3. In tutti i campionamenti successivi la concentrazione cellulare della coltura è restata stabile, con un numero massimo di cell/ml che è risultato quindi inferiore al dato del CTR. Anche la coltura in S-lim, comunque, appariva alla vista con una forte pigmentazione e poco distinguibile dalla beuta CTR (Figura 3.4)

La condizione ad alta luce (HL) invece ha una fase lag iniziale in cui la crescita è stata più lenta rispetto alla crescita delle altre due condizioni. Nella seconda settimana il numero di cellule è stato più alto rispetto al dato della limitazione da solfato ma inferiore a quello del CTR.



Figura 3.4: Confronto di *Tetraselmis suecica* tra la condizione controllo (sinistra) e la condizione a limitazione da solfato (destra). *La foto è stata scattata alla fine della curva di crescita di due settimane sulle colture di Tetraselmis suecica;*

Le analisi successive sono state svolte su cellule campionate in fase medio-esponenziale (giorno 3 per tutte le condizioni di crescita)

3.2 Peso secco cellulare

Al fine di caratterizzare le cellule cresciute nelle diverse condizioni di crescita, è stato quantificato il peso secco cellulare espresso in picogrammi per cellula, come mostrato nelle Figure 3.5 e 3.6.

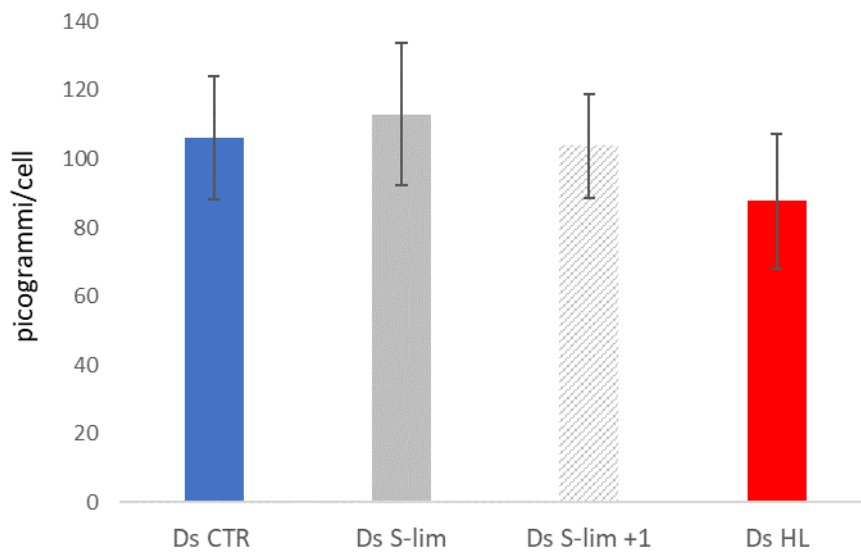


Figura 3.5: Peso secco a confronto in *Dunaliella salina*. *Peso secco cellulare nelle varie condizioni di crescita di *Dunaliella salina* espresso in picogrammi per cellula. In blu la condizione controllo, in grigio la condizione a limitazione da solfato mentre in rosso la condizione ad alta luce. I dati presentati sono una media \pm deviazione standard di 5 repliche per la condizione CTR, 2 repliche per la condizione S-Lim, 4 repliche per la condizione S-lim + 1 e 5 repliche per la condizione ad HL.*

Dunaliella salina in condizione controllo (CTR) ha avuto un peso secco medio pari a 106 pg/cell. Sia nei campioni a limitazione da solfato (S-lim), in entrambi i giorni di campionamento, sia nelle cellule cresciute in condizioni ad alta luce (HL) non si sono riscontrate differenze significative nel peso secco cellulare.

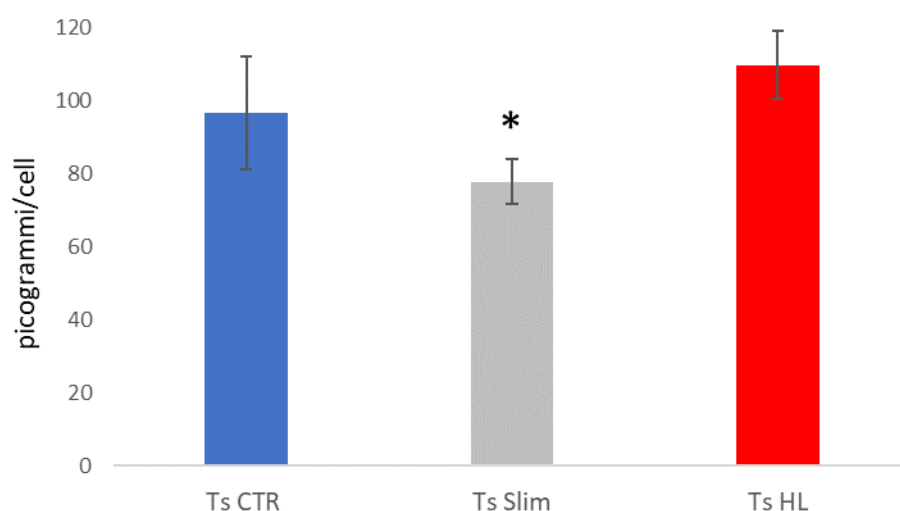


Figure 3.6: Peso secco di *Tetraselmis suecica*. *Peso secco a confronto espresso in picogrammi per cellula di *Tetraselmis suecica* nelle tre condizioni di crescita. In blu la condizione controllo, in grigio la condizione a limitazione da solfato mentre in rosso la condizione ad alta luce. I dati sono mostrati come media \pm deviazione standard di 4 repliche per la condizione CTR, 3 repliche per la condizione S-lim e 6 repliche per la condizione HL. L'asterisco indica una differenza significativa rispetto al campione CTR (*, $p < 0.05$).*

La condizione controllo (CTR) di *Tetraselmis suecica* presenta valori di peso secco pari a 96 (\pm 15) pg/cell. Il peso secco cellulare è più basso in cellule acclimatate a limitazione da solfato (S-lim). All'opposto nella condizione ad alta luce (HL) i valori sono simili a quelli nella condizione CTR.

3.3 Quantificazione di carbonio e azoto cellulari

In aggiunta al peso secco cellulare, è stato anche quantificato il contenuto in percentuale di C ed N per cellula.

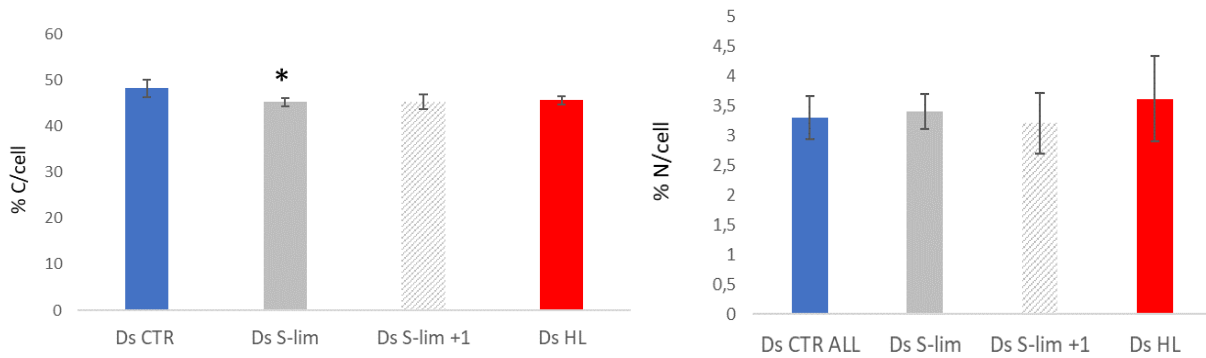
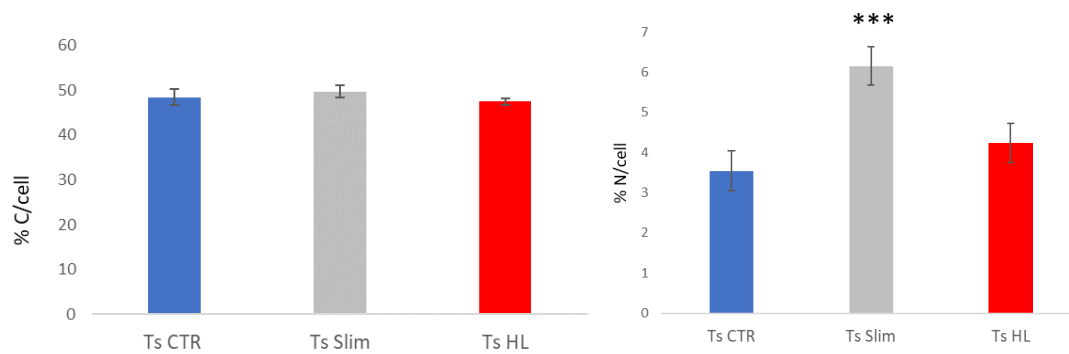


Figura 3.7: Percentuale di carbonio e azoto in cellule di *Dunaliella salina*. Nel grafico la quantificazione del carbonio e dell'azoto espressa come percentuale per cellula di *Dunaliella salina* nelle diverse condizioni di crescita. I dati presentati sono una media \pm deviazione standard di 6 repliche per la condizione CTR, 4 repliche per la condizione S-lim, 3 repliche per la condizione S-lim +1 e 5 repliche per la condizione ah HL. In blu la condizione controllo, la condizione a limitazione da solfato in grigio pieno per il campionamento al giorno 4 mentre a motivo quella campionata il giorno 5; in rosso la condizione ad alta luce (* $p < 0,05$).

Nella condizione controllo (CTR) *D. salina* ha presentato un contenuto di carbonio per cellula pari a circa il 50% e di azoto pari al 3%; nella condizione a limitazione da solfato (S-lim), in entrambi i giorni di campionamento, le cellule erano caratterizzate da valori simili al CTR. La condizione ad alta luce (HL) ha mostrato valori simili per quanto riguarda la percentuale di carbonio e valori leggermente più alti nella quantificazione dell'azoto rispetto a CTR, ma nessun valore mostra differenze significative.



Figura

3.8: Percentuale di carbonio e azoto in cellule di *Tetraselmis suecica*.

*Quantificazione di carbonio e azoto espressa come percentuale per cellula di Tetraselmis suecica alle varie condizioni di crescita. In blu la condizione controllo, in grigio la condizione a limitazione da solfato mentre in rosso la condizione ad alta luce. I dati rappresentati sono la media \pm deviazione standard di 7 repliche per la condizione CTR, 6 repliche per la condizione S-lim e 6 repliche per la condizione ad HL (***) $p < 0,001$.*

In *T. suecica*, le cellule cresciute in condizione controllo (CTR) hanno presentato una percentuale di carbonio e di azoto rispettivamente del 48% e del 4%. A differenza del caso di *D. salina*, *T. suecica* cresciuta in limitazione da solfato (S-lim) ha presentato una percentuale di azoto superiore a quella del CTR mentre la percentuale di carbonio è rimasta simile a quella del CTR.

La condizione ad alta luce (HL) invece ha mostrato valori pressoché pari a quelli del CTR, per quanto riguarda la percentuale di carbonio e valori più alti per quanto riguarda l'azoto (Figura 3.8).

3.4 Quantificazione del contenuto proteico delle cellule

Successivamente alla quantificazione della composizione elementare di C ed N delle cellule, gli esperimenti si sono concentrati sulla caratterizzazione della composizione cellulare nei principali pool macromolecolari. In figure 3.9 e 3.10 è mostrata la quantificazione del contenuto in proteine.

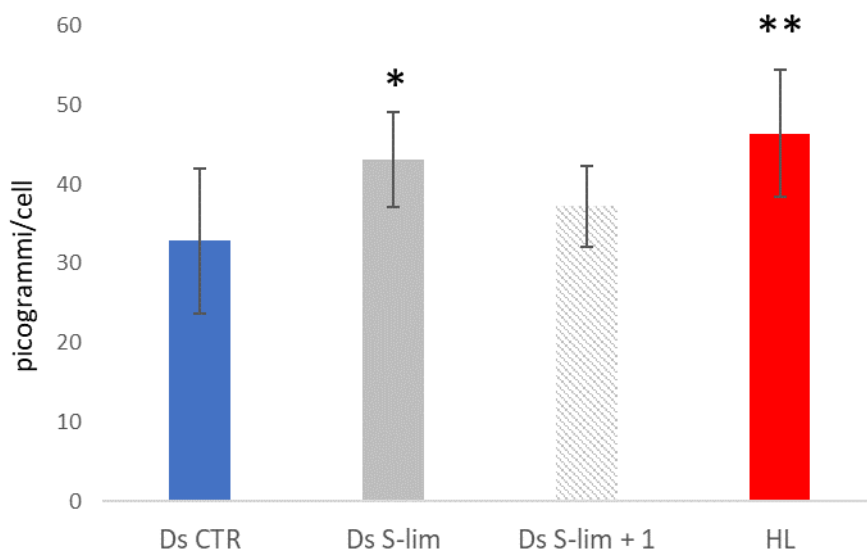


Figura 3.9: Quantificazione proteica per cellula di *Dunaliella salina*. In blu la condizione controllo, in grigio la condizione a limitazione da solfato mentre in rosso la condizione ad alta luce. I dati rappresentano una media \pm deviazione standard di 12 repliche per la condizione CTR, 9 repliche per la condizione S-lim, 9 repliche per la condizione S-lim + 1 e 14 repliche per la condizione HL. Gli asterischi rappresentano una differenza significativa rispetto alla condizione CTR ($*p < 0.008$) ($**p < 0.05$).

Le cellule di *Dunaliella salina* cresciute in condizioni controllo (CTR) sono state caratterizzate da un contenuto medio di proteine pari a 35 (± 10) pg di proteine per cellula mentre in uno dei campionamenti di cellule cresciute in limitazione da solfato

(S-lim) e in quello di cellule cresciute ad alta luce (HL) le proteine hanno mostrato abbondanze maggiori, particolarmente in HL. Il confronto tra i due giorni di campionamento del campione S-lim mostra un calo del contenuto proteico per cellula nel corso della fase esponenziale.

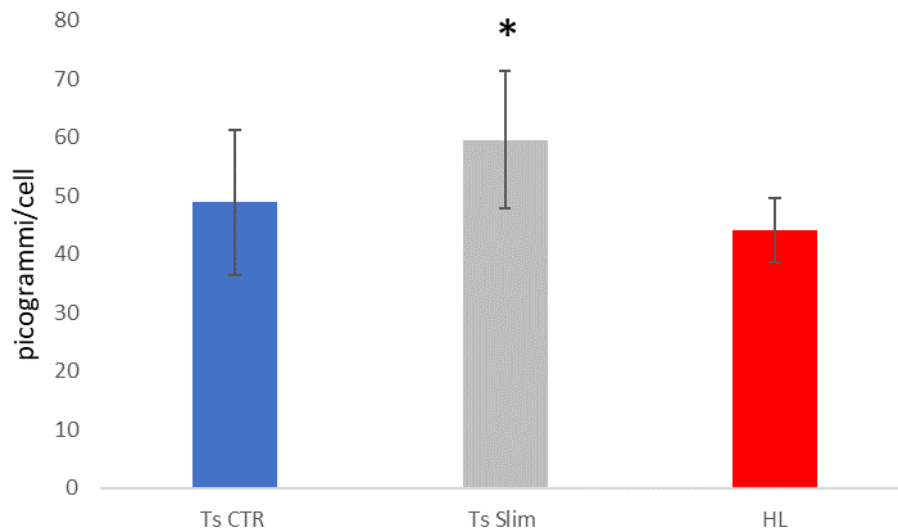


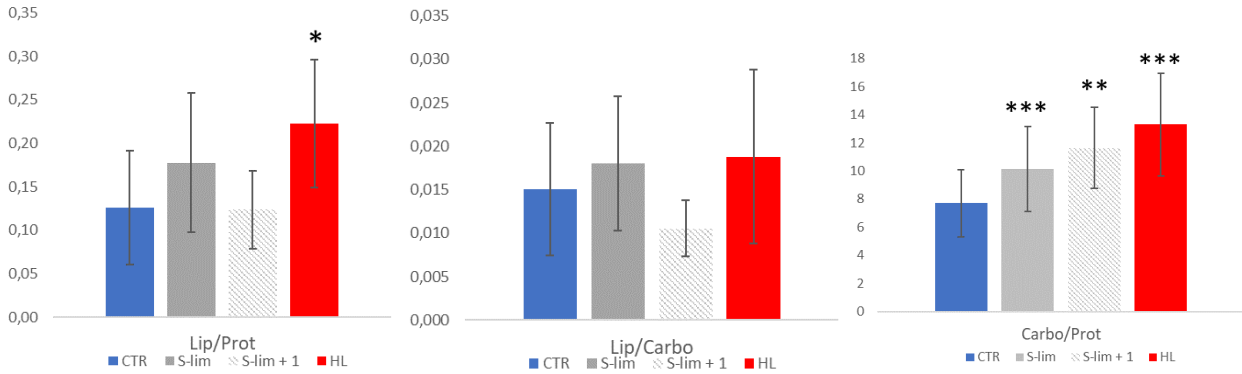
Figura 3.10: Quantificazione proteica per cellula di *Tetraselmis suecica*. La figura 3.10 mostra la media dei picogrammi di proteine per cellula delle tre condizioni di *Tetraselmis suecica*. In blu la condizione controllo, in grigio la condizione a limitazione da solfato mentre in rosso la condizione ad alta luce. I dati rappresentano una media \pm deviazione standard di 22 repliche per la condizione CTR, 23 repliche per la condizione S-lim e 12 repliche per la condizione HL. L'asterisco rappresenta una differenza significativa con la condizione CTR ($* < p 0.004$).

In *Tetraselmis suecica*, il controllo (CTR) ha avuto 48 (± 12) pg di proteine per cellula; il trattato in limitazione da solfato (S-lim) ha avuto valori significativamente più alti del CTR, in linea con l'aumentato contenuto di N visto in precedenza, mentre la condizione ad alta luce (HL) valori medi più bassi tra le tre condizioni anche se non statisticamente diversi da quelli del controllo.

3.5 FT-IR

L'analisi FTIR ha permesso di ottenere i rapporti tra le abbondanze delle principali macromolecole cellulari, proteine, lipidi e carboidrati. I valori ottenuti sono stati quindi espressi come rapporti lipidi/proteine, lipidi/carboidrati e carboidrati/proteine per le cellule di *D. salina* cresciute nelle diverse condizioni e sono mostrati in figura 3.11.

Rapporti macromolecolari



Semiquantificazioni

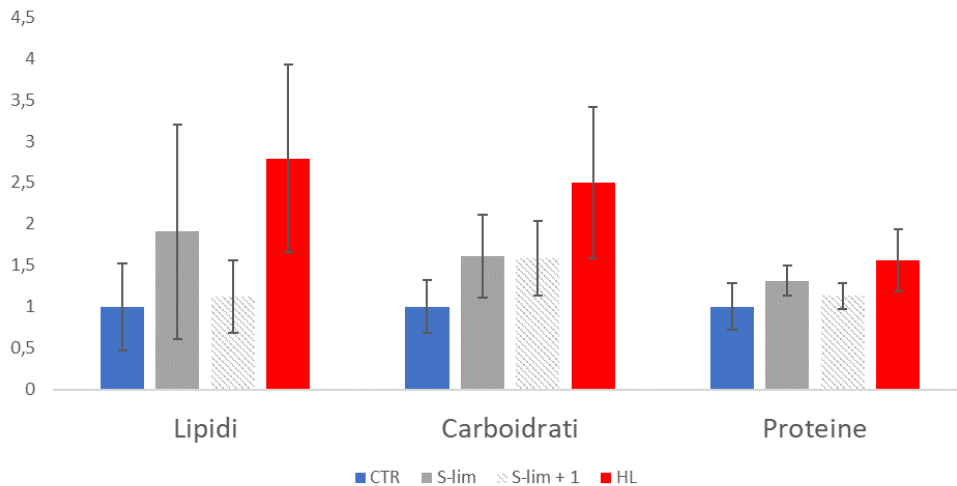


Figura 3.11

Rapporto delle macromolecole e analisi semiquantitative delle macromolecole analizzate in *Dunaliella salina*. In blu la condizione controllo, in grigio la condizione a limitazione da solfato mentre in rosso la condizione ad alta luce. I dati rappresentano la media \pm deviazione standard di 12 repliche per la condizione CTR, 8 repliche per la condizione S-lim, 6 repliche per la condizione S-lim + 1 e 10 repliche per la condizione HL. Gli asterischi rappresentano delle differenze significative con la condizione CTR (* $p < 0,005$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Il campione HL differiva dal CTR significativamente per il rapporto lipidi/proteine e per quello carboidrati/proteine, entrambi più alti in HL. Il campione S-lim differiva per il rapporto carboidrati/proteine e solo in uno dei due campionamenti.

Dai soli rapporti non è possibile definire quale dei pool macromolecolari sia responsabile della variazione di un rapporto. Si è quindi usata la quantificazione delle proteine mostrata in precedenza (Figura 3.9) per ricavare attraverso i rapporti tra le macromolecole (Figure 3.11 A) i valori di semiquantità dei lipidi e dei carboidrati normalizzandoli ai valori della condizione controllo (CTR) (Fig. 3.11, B).

La condizione a limitazione da solfato (S-lim) ha avuto un contenuto lipidico maggiore rispetto al CTR per uno solo dei giorni selezionati per il campionamento (ma il dato mostra un'alta variabilità tra le repliche), mentre nell'altro caso i valori di CTR e S-lim+1 sono stati simili, suggerendo di nuovo che la crescita lenta iniziale abbia un contributo in alcune delle differenze registrate per il campione "S-lim", che quindi non sono più presenti nel campione "S-lim+1", campionato in una fase di crescita più simile al CTR; i carboidrati sono stati più abbondanti rispetto alla condizione CTR; tra i due giorni di campionamento della condizione S-lim non ci sono state differenze, suggerendo invece come la differenza nel contenuto in carboidrati sia effetto della limitazione da solfato ed indipendente dal giorno di campionamento.

La condizione ad alta luce (HL) ha presentato un contenuto sia di lipidi che di carboidrati superiore ai rispettivi del CTR.

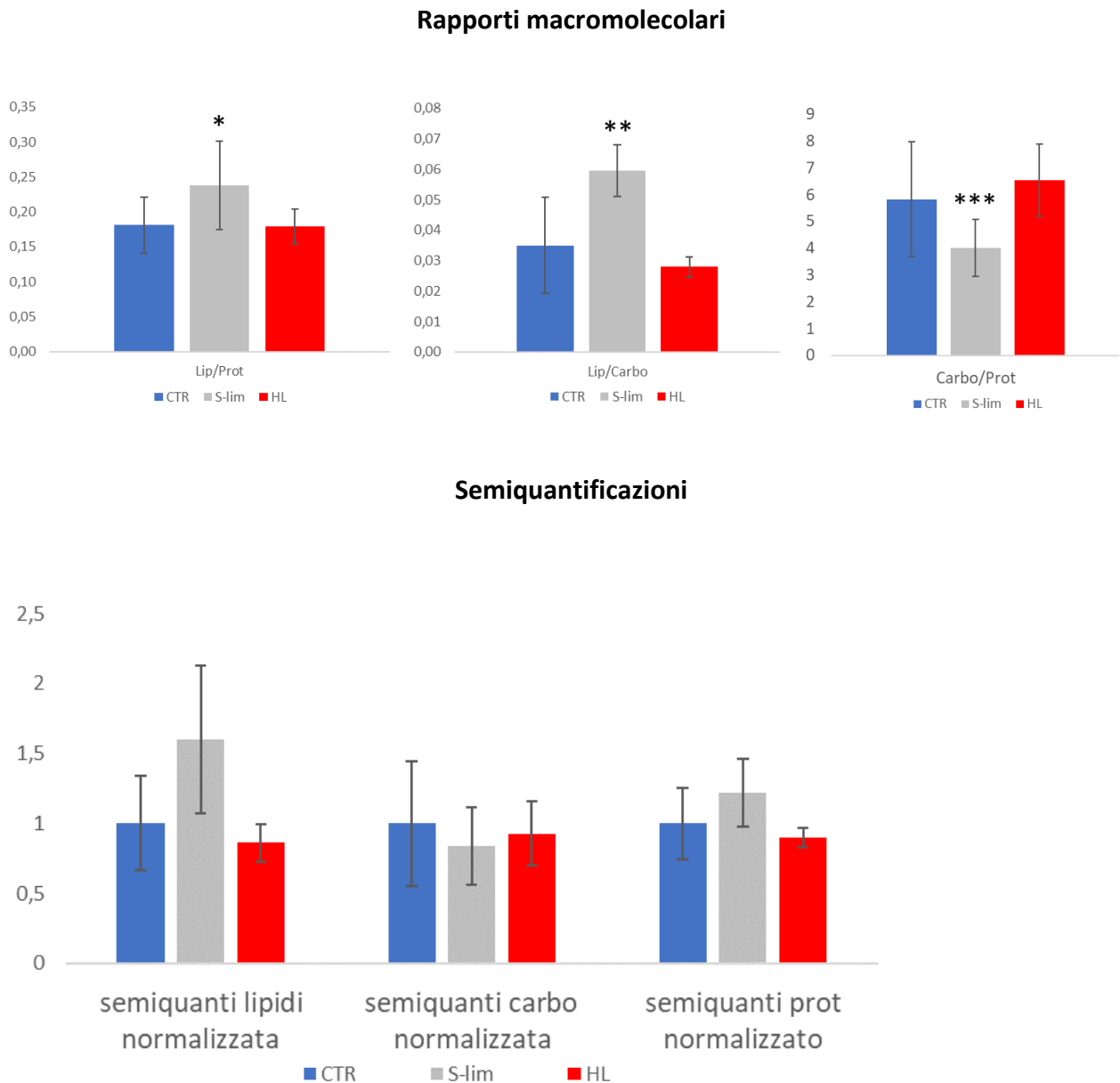


Figura 3.12: Rapporto tra lipidi, proteine e carboidrati in *Tetraselmis suecica* e analisi semiquantitative dei lipidi e dei carboidrati. In blu la condizione controllo, in grigio la condizione a limitazione da solfato mentre in rosso la condizione ad alta luce. I dati rappresentano la media \pm deviazione standard di 19 repliche per la condizione CTR, 11 repliche per la condizione S-lim e 10 repliche per la condizione HL. Gli asterischi mostrano una differenza significativa con la condizione CTR (* $p < 0.005$)(** $p < 0.00005$)(*** $p < 0.01$).

La figura 3.12 mostra la composizione macromolecolare analizzata sulle colture di *T. suecica*. In modo analogo, sono stati calcolati i rapporti tra le principali macromolecole dagli spettri FTIR e quindi l'abbondanza dei vari pool rispetto al controllo sfruttando i dati FTIR e la quantificazione assoluta delle proteine.

La condizione a limitazione da solfato di *Tetraselmis suecica* (S-lim) ha mostrato valori più alti per quanto riguarda i lipidi e i carboidrati rispetto ai contenuti rispettivi in CTR; la statistica ha mostrato come queste differenze nei valori dei rapporti siano significative tra le due condizioni.

La condizione HL invece non ha mostrato differenze con la condizione CTR.

3.6 Quantificazione del contenuto cellulare in pigmenti fotosintetici

Oltre ai principali pool macromolecolari è stato quantificato il contenuto in pigmenti fotosintetici.

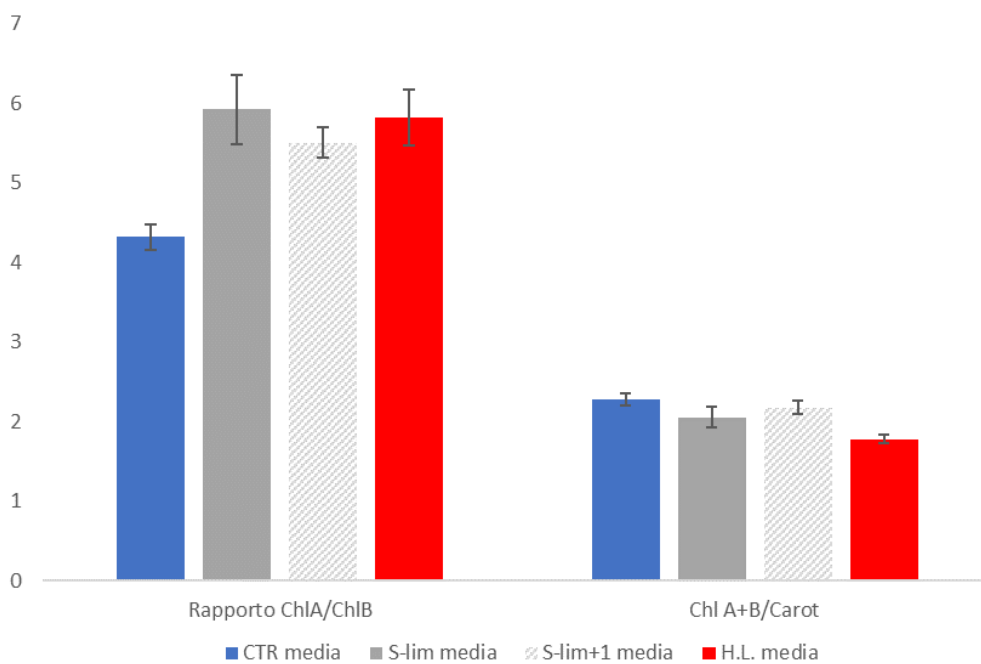
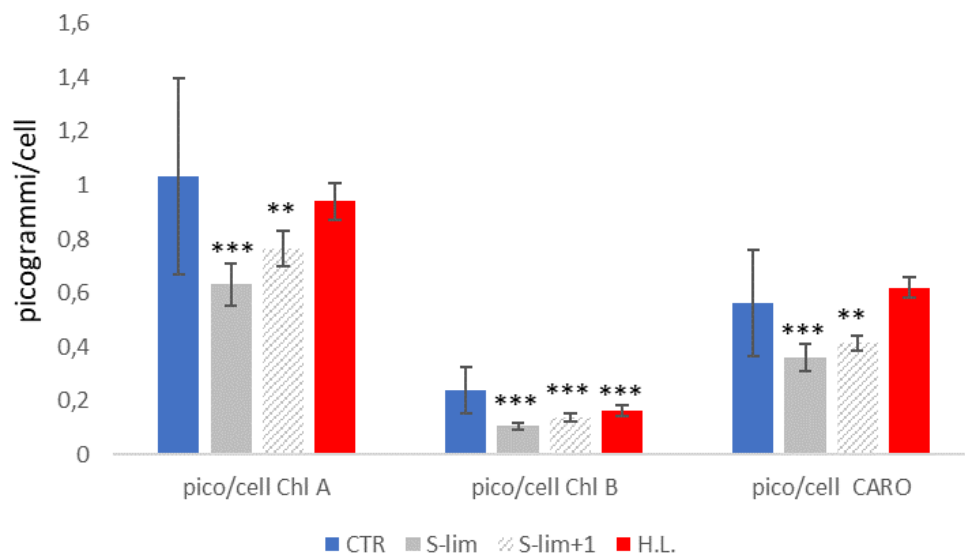


Figura 3.13: Quantificazione di clorofilla *a*, clorofilla *b* e Carotenoidi di *Dunaliella salina* e relativi rapporti. . Gli istogrammi in blu rappresentano la condizione controllo, in grigio la condizione a limitazione da solfato mentre in rosso la condizione ad alta luce. I dati rappresentano una media \pm deviazione standard di 6 repliche per condizione (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Cellule di *D. salina* cresciute in condizione controllo (CTR) hanno avuto un contenuto cellulare sia di clorofilla *a* che di clorofilla *b* pari a circa $1(\pm 0,3)$ pg/cell e $0.2(\pm 0.08)$ pg/cell, rispettivamente; la limitazione da solfato (S-lim) ha mostrato valori medi più bassi che nel CTR. I campioni ad alta luce (HL) hanno mostrato un calo principalmente nella *clorofilla b*. Il contenuto di carotenoidi totali per cellula è stato invece simile in CTR e HL e più basso in S-lim.

Il rapporto Chl *a/b* ha un valore medio di $4,3(\pm 0,15)$ nel CTR, mentre mostra valori più alti sia nella limitazione da solfato (S-lim) che nei campioni HL.

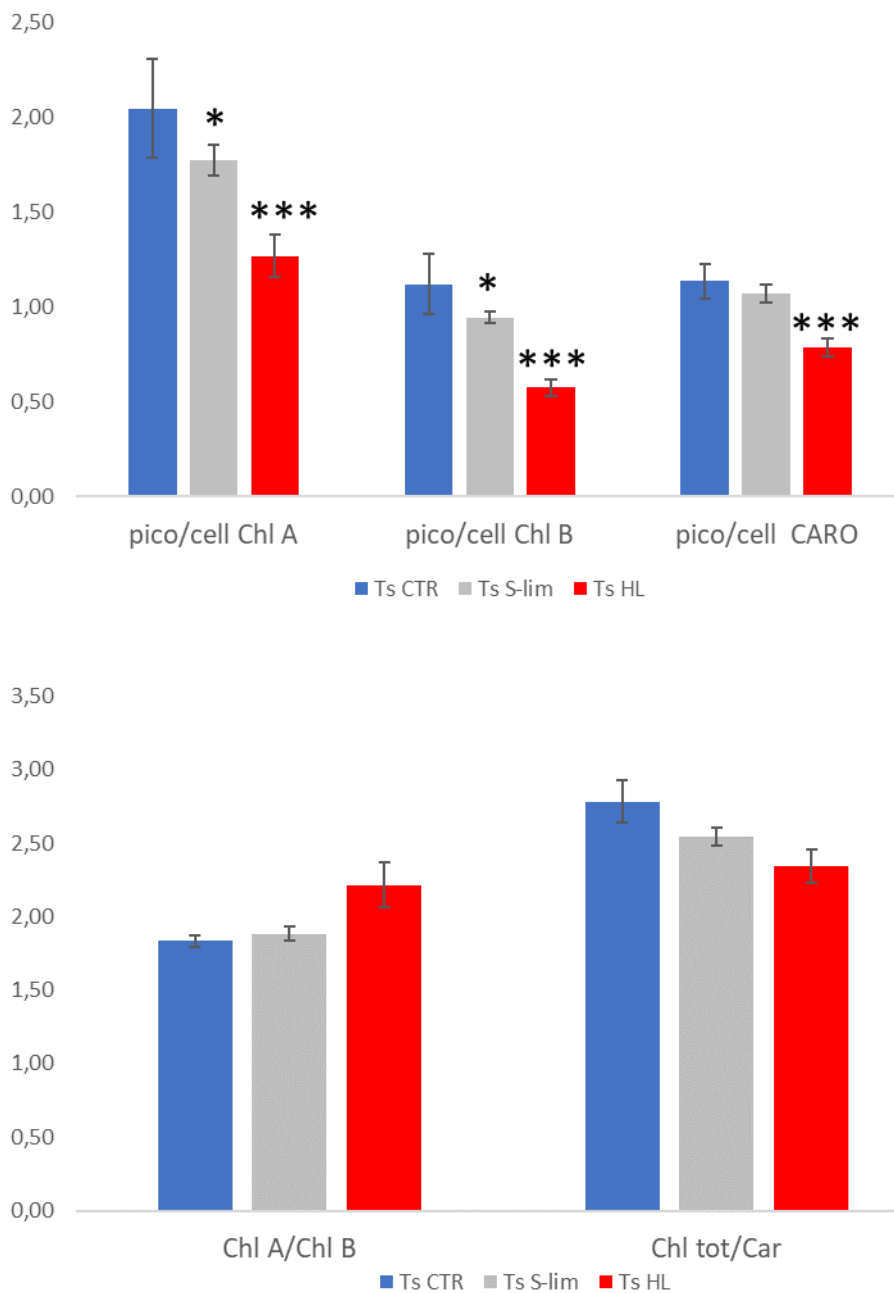


Figura 3.14: Quantificazione di clorofilla *a*, clorofilla *b* e Carotenoidi di *Tetraselmis suecica* e relativi rapporti. I grafici comparano la quantificazione a livello cellulare dei pigmenti (con i loro relativi rapporti) nelle tre condizioni di *Tetraselmis suecica*. In blu la condizione controllo, in grigio la condizione a limitazione da solfato mentre in rosso la condizione ad alta luce. I dati rappresentano una media \pm deviazione standard di 9 repliche per la condizione CTR, 12 repliche per la condizione S-lim e 12 repliche per la condizione HL. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

T. suecica in condizione controllo (CTR) ha presentato valori pari a circa $2(\pm 0,26)$ pg/cell di *clorofilla a*, valore medio che è inferiore nei campioni S-lim. Un andamento simile si è riscontrato per il contenuto in *clorofilla b*. Il contenuto in carotenoidi totali è stato pressoché uguale nei campioni CTR e S-lim; il rapporto tra Chl *a*/Chl *b* tra le due condizioni rimane costante mentre il Chl/Car cala da circa $2.78(\pm 0,15)$ nel CTR a $2.54(0,06)$ nella limitazione da solfato.

Nella condizione HL c'è stato un calo nelle quantità assolute di tutti i pigmenti analizzati (Chl *a*, Chl *b* e carotenoidi) rispetto alla condizione CTR, anche se non omogeneo per le tre tipologie di pigmenti. Infatti, il rapporto *clorofilla a/clorofilla b*, più alto in HL che in CTR, ha mostrato che la Chl *b* diminuisce in maniera maggiore della *clorofilla a*. L'aumento del rapporto *clorofilla tot/Carotenoidi* nel controllo mostra come i carotenoidi siano la tipologia di pigmenti che è diminuita in maniera meno pronunciata.

3.7 Analisi *in vivo* dell'efficienza fotosintetica PAM

L'analisi *in vivo* della fluorescenza della clorofilla ha permesso di ricavare varie informazioni sulla fase luminosa della fotosintesi e sulla sua regolazione.

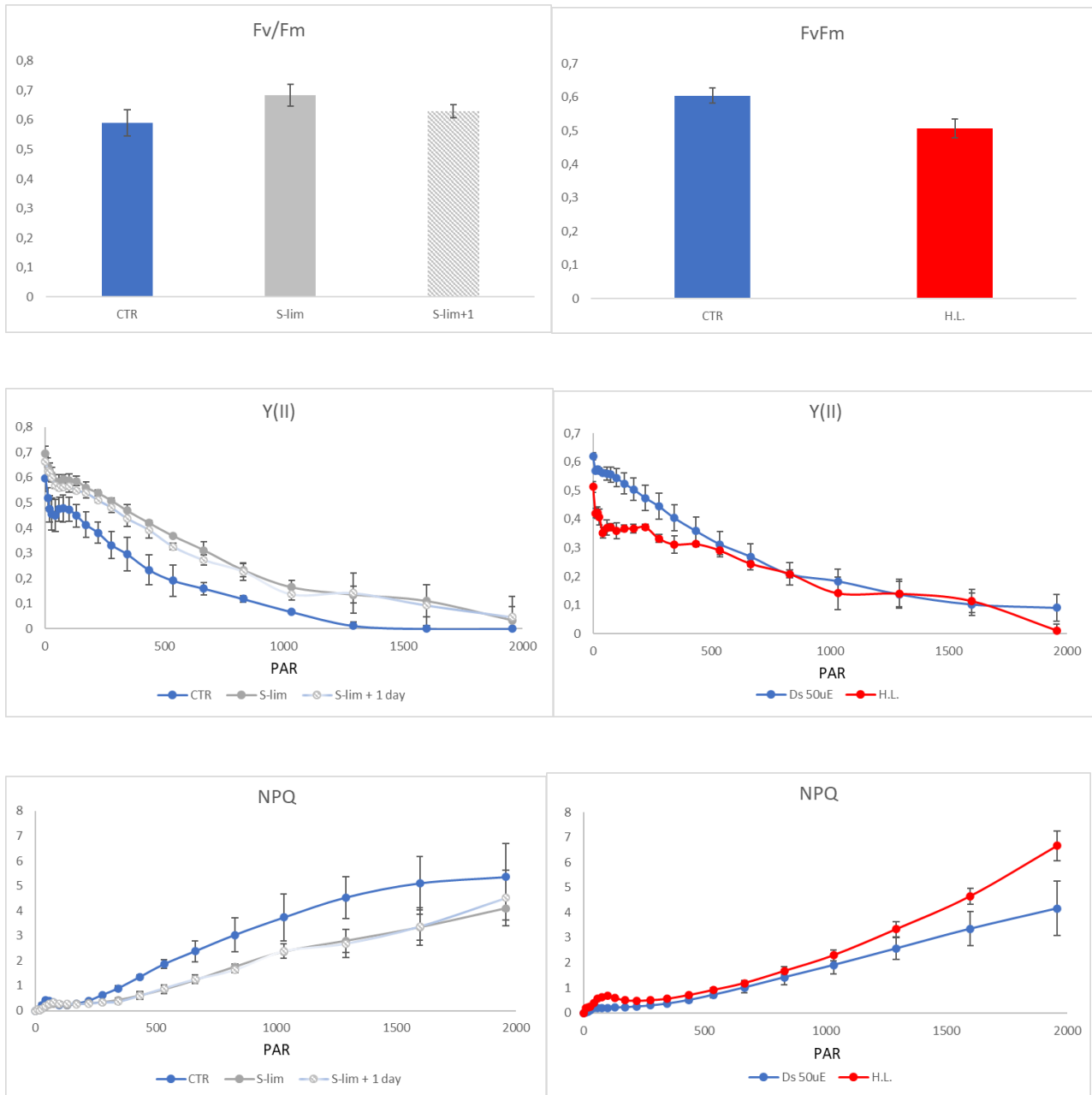


Figura 3.15: Grafici dei parametri di *Dunaliella salina*. I grafici nelle figure mostrano rispettivamente i valori della massima efficienza fotosintetica (F_v/F_m) e l'andamento della curva, all'aumentare della luce, dei parametri di efficienza fotosintetica $Y(II)$ e NPQ (non photochemical quenching). In blu la condizione controllo, in grigio la condizione a limitazione da solfato mentre in rosso la condizione ad alta luce. I dati rappresentano una media \pm deviazione standard di 3

repliche per la condizione CTR 100micromol m⁻² s⁻¹ e 5 repliche per la condizione CTR 50 micromol m⁻² s⁻¹, 4 repliche per la condizione S-lim, 3 repliche per la condizione S-lim + 1 e 4 per la condizione HL

Il parametro Fv/Fm, ottenuto da cellule acclimatate al buio, esprime la massima resa quantica del PSII nel campione in analisi. In *Dunaliella salina*, il controllo (CTR) è caratterizzato da un valore di circa 0.6; il trattato a limitazione da solfato (S-lim) sembra avere una resa fotosintetica maggiore del CTR, che però cala a valori prossimi a quelli del CTR campionando il giorno successivo. Da notare che i campioni CTR e S-lim+1 si trovano quindi in una fase della curva di crescita più simile tra loro. Una dipendenza del valore di Fv/Fm registrato dalla fase di crescita è in linea con altri test precedentemente condotti in laboratorio durante l'ottimizzazione delle condizioni di crescita per le microalghe oggetto di studio. Il trattato ad alta luce invece (HL) ha il valore più basso tra tutte le condizioni sperimentali testate.

Molti altri parametri invece permettono di caratterizzare la risposta delle cellule alla luce. In figura 3.15 sono riportati i valori dei parametri Y(II) e NPQ in cellule cresciute nelle varie condizioni (CTR, S-lim, HL) esposte ad una “curva di luce”, quindi ad illuminazione via via crescente.

L'efficienza fotosintetica del PSII analizzata con il parametro Y(II) cala con l'aumentare della luce espressa in PAR (*photosynthetic active radiation*); l'andamento delle curve è simile nei campioni dalle diverse condizioni, sebbene i trattati a limitazione da solfato abbiano valori iniziali più alti.

L'NPQ (non photochemical quenching) è un parametro, come spiegato nel paragrafo **1.3.5**, che racchiude diversi meccanismi che regolano l'attività fotosintetica. In molte specie dipende principalmente dall'attivazione di meccanismi che portano alla dissipazione di energia assorbita in eccesso sotto forma di calore, anche se in specie algali spesso altri meccanismi di regolazione possono contribuire al valore registrato per il parametro NPQ, ed analisi più approfondite sono necessarie per identificare più nel dettaglio i meccanismi coinvolti ed eventuali differenze tra le specie. Nei grafici mostrati in figure 3.15 si vede come il CTR abbia valori di NPQ che aumentano all'aumentare dell'intensità di luce cui è esposto il campione. A partire da un'intensità di luce pari a circa $400 \text{ micromol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ il CTR mostra valori più alti rispetto alla limitazione da solfato; nella condizione ad alta luce i valori non si discostano molto da quelli del CTR, ma ad intensità di luce successive ($1200 \text{ micromol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) la curva dell' HL mostra valori più alti.

Al fine di valutare eventuali differenze nell'attività del PSI, contenente i centri Fe-S, nelle cellule trattate in limitazione da solfato, per i campioni S-lim è stato analizzato anche il segnale di assorbanza del P700+ al fluorimetro PAM e calcolato il parametro Y(I). I valori del campione S-lim sono stati confrontati con lo stesso esperimento condotto su campioni da colture CTR, ma non si riscontrano differenze evidenti tra il CTR stesso e le cellule da coltura S-lim, indipendentemente dal giorno di campionamento delle stesse.

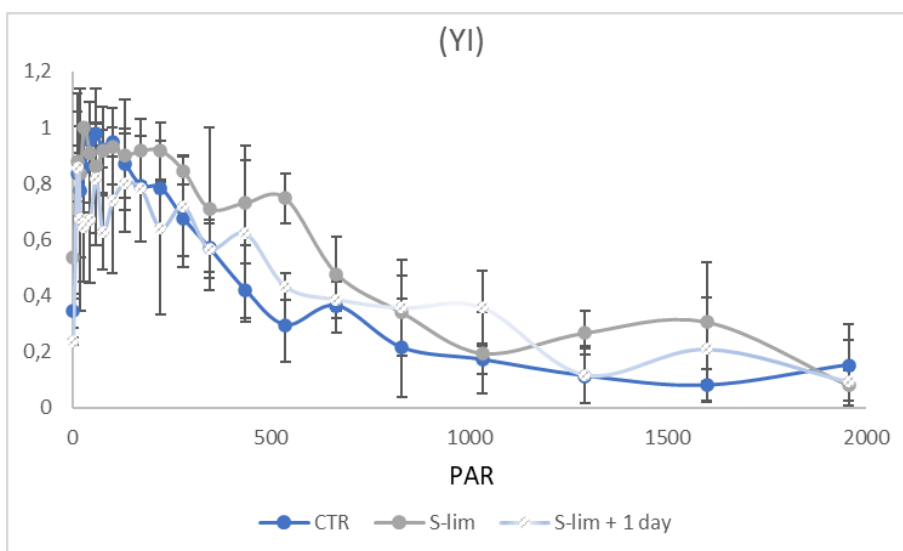


Figura 3.16: Grafico dell'efficienza del PSI nella condizione controllo e limitazione da solfato in *Dunaliella salina*. Andamento della curva di crescita dell'efficienza del PSI con l'aumentare della luce PAR in *Dunaliella salina*. I dati rappresentano una media \pm deviazione standard di 3 repliche per la condizione CTR, 4 repliche per la condizione S-lim e 3 repliche per la condizione S-lim + 1.

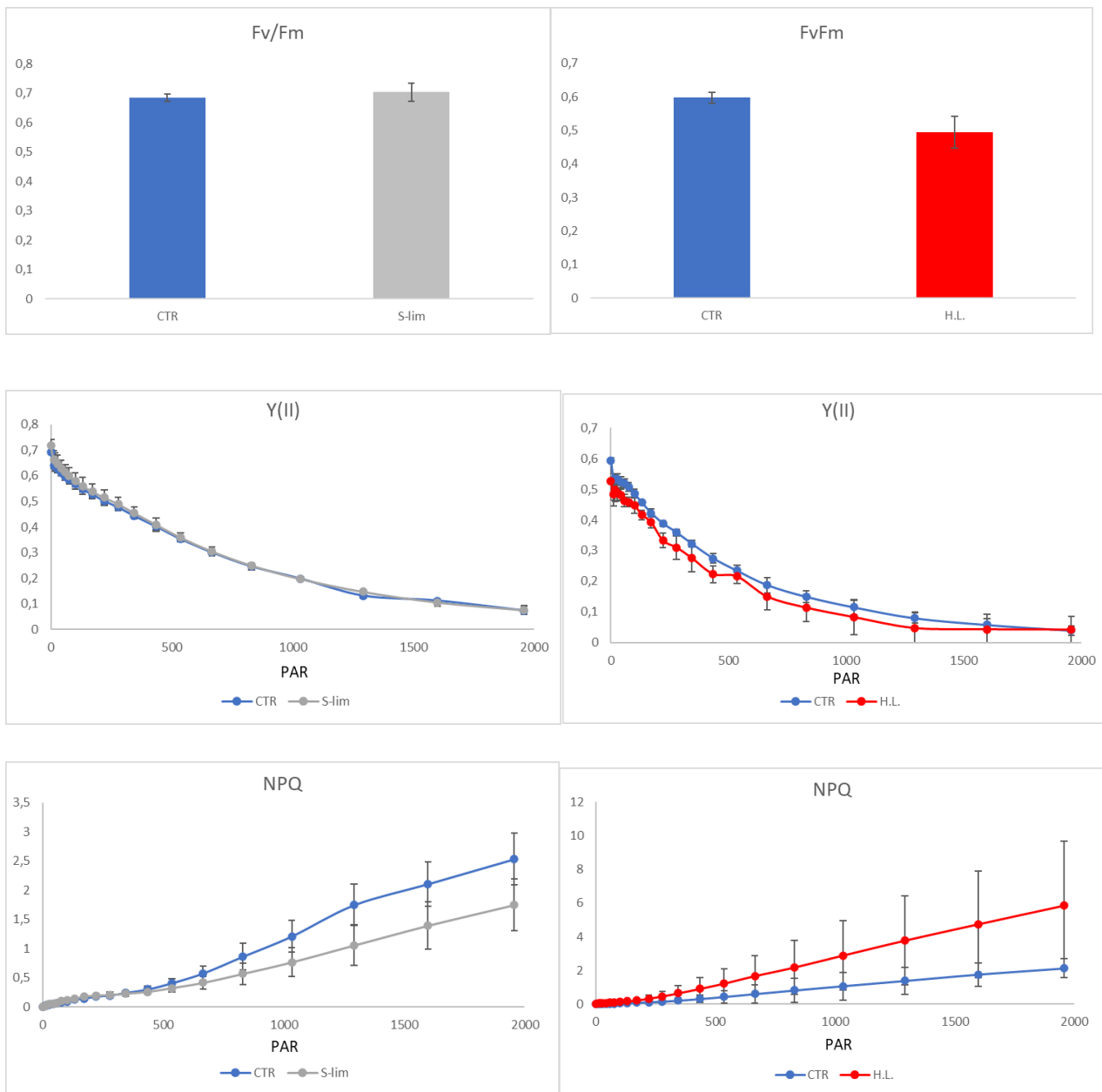


Figure 3.17: Grafici di Fv/Fm, Y(II) e NPQ di *Tetraselmis suecica*. I grafici nelle figure mostrano rispettivamente i valori della massima efficienza fotosintetica (Fv/Fm) e l'andamento della curva, all'aumentare della luce, dei parametri di efficienza fotosintetica Y(II) e NPQ (non photochemical quenching) alle diverse condizioni di crescita per *Tetraselmis suecica*. In blu la condizione controllo, in grigio la condizione a limitazione da solfato mentre in rosso la condizione ad alta luce. I dati rappresentano una media \pm deviazione standard di 3 repliche per la condizione CTR confrontata con la condizione S-lim e 4 repliche per la condizione CTR confrontata con la condizione HL; 3 repliche per la condizione S-lim e 4 repliche per la condizione HL

I valori di F_v/F_m delle cellule di *T. suecica* campionate dalle diverse condizioni non mostrano differenze nel valore medio tra CTR e S-lim, mentre i campioni HL mostrano un lieve calo. Nei due grafici, i valori del CTR si discostano uno dall'altro a causa del diverso tempo di acclimatazione al buio usato nei due esperimenti. I campioni HL sono stati analizzati solo in fluorescenza e con 40 min di acclimatazione al buio prima della misura. Al contrario, prove preliminari precedentemente condotte nel laboratorio avevano mostrato la necessità di acclimatare al buio per 24h i campioni di *T. suecica* prima di analisi al “doppio canale” al PAM, quindi sia analisi di fluorescenza che assorbanza del P700, protocollo usato per i campioni S-lim. I campioni CTR sono quindi stati analizzati con entrambi i protocolli per un confronto ottimale con ognuno dei trattamenti e a seguito delle 24h al buio mostrano un F_v/F_m più alto che con solo 40 min di acclimazione al buio prima dell'analisi.

L'efficienza del PSII non mostra differenze tra S-lim e CTR. Come visto nel caso dei campioni di *D. salina*, i valori di $Y(II)$ diminuiscono all'aumentare dell'intensità luminosa usata nell'analisi.

L'andamento della curva nei valori di NPQ del CTR mostra un andamento crescente all'aumentare della luce; l'S-lim ha una cinetica simile ma mostra valori inferiori per i valori di NPQ per PAR al di sopra di 500 micromol fotoni $m^{-2} s^{-1}$).

Nel campione HL, a partire da intensità di luce pari a circa 500 micromol fotoni $m^{-2} s^{-1}$), i valori di NPQ risultano più alti del CTR.

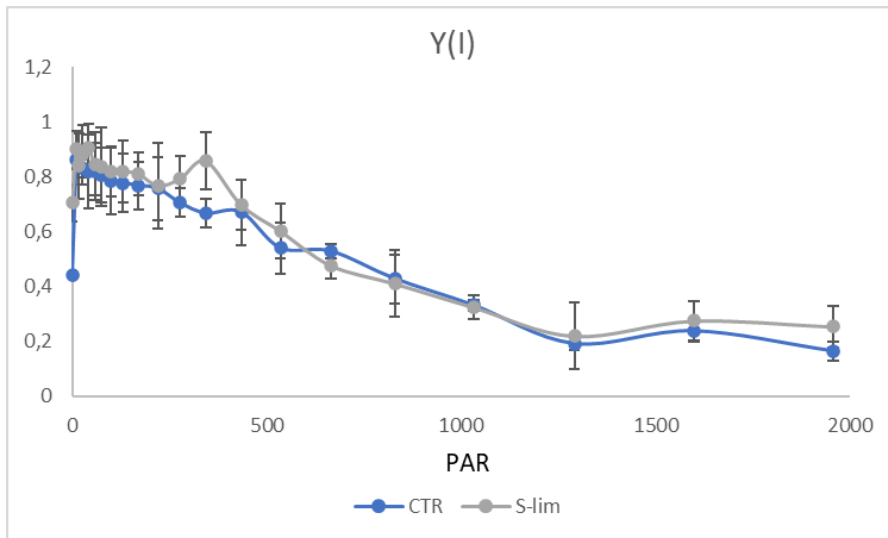


Figura 3.18: Efficienza fotosintetica del PSI. Efficienza del PSI tra la condizione CTR e la condizione S-lim di *Tetraselmis suecica*; il grafico rappresenta una media \pm deviazione standard di 3 repliche per la condizione CTR e 3 repliche per la condizione S-lim.

Anche nel caso dei campioni di *T. suecica*, è stata analizzata anche l'efficienza del PSI con particolare interesse ai campioni cresciuti in limitazione da solfato. Come visto in precedenza per *D. salina*, anche nel caso di *T. suecica*, il CTR e l'S-lim non mostrano differenze significative nell'andamento della curva durante tutta l'analisi, con valori di $Y(I)$ che calano all'aumentare dell'intensità luminosa cui sono esposte le cellule, come atteso.

I campioni CTR ed HL di entrambe le specie sono anche stati analizzati con a induction curves, cinetiche che permettono di valutare meglio attivazione e disattivazione dei vari processi legati alla regolazione della fase luminosa della fotosintesi. Le figure 3.19 e 3.20 mostrano le cinetiche del parametro NPQ, collegato, come detto nel paragrafo 1.3.5, ai meccanismi di fotoprotezione. Per ogni campione

sono state testate due diverse intensità di luce attinica, al fine di valutare anche la risposta a diverse intensità luminose.

Per i campioni controllo le luci attiniche testate sono una pari alla luce di crescita, quindi circa 100 micromol fotoni $m^{-2} s^{-1}$ per *D. salina* e circa 50 per *T. suecica*; la seconda intensità di luce attinica (435 micromol fotoni $m^{-2} s^{-1}$ per entrambe le specie), invece, è stata scelta in modo da esser pressoché “saturante” per la capacità fotochimica del campione, condizione che dovrebbe massimizzare anche l’attivazione dei meccanismi di fotoprotezione. I campioni ad HL sono stati analizzati a 435 micromol fotoni $m^{-2} s^{-1}$ per avere un confronto nelle medesime condizioni di misura del CTR, e ad una luce attinica più elevata 830 micromol fotoni $m^{-2} s^{-1}$, come luce “saturante”.

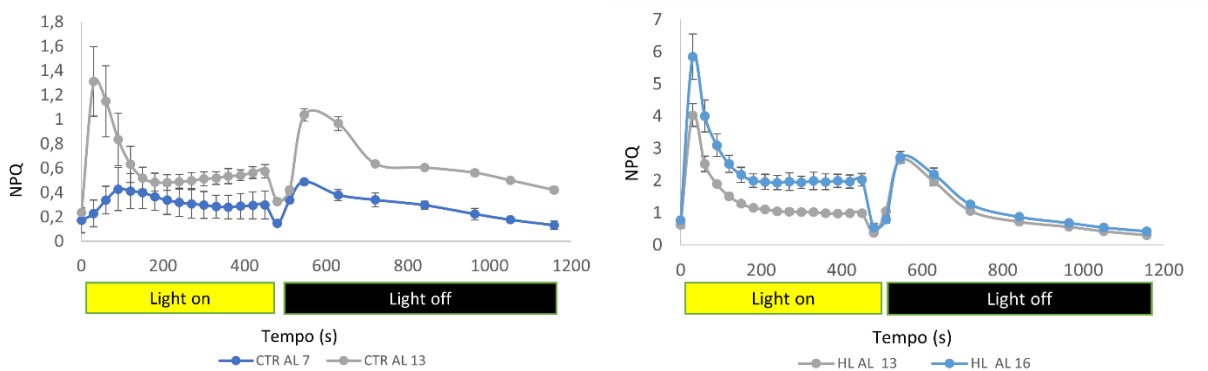


Figura 3.19: Parametro NPQ nelle analisi induction curves di *D. salina*. I grafici ripartano l’andamento del parametro NPQ in *D. salina* CTR (a sinistra) e HL (a destra). L’analisi è stata ripetuta in ciascun caso con due diverse intensità di luce attinica: 100 e 435 micromol fotoni $m^{-2} s^{-1}$ per CTR, 435 e 830 micromol fotoni $m^{-2} s^{-1}$ per HL (indicate rispettivamente con AL100, AL435 e AL830). La barra superiore mostra quando la luce attinica era accesa (giallo) o spenta (nero). I dati rappresentano una media \pm deviazione standard di 3 repliche.

La figura 3.19 mostra l'andamento del parametro NPQ in *D. salina* CTR. Le analisi condotte con una luce attinica pari alle condizioni di crescita mostrano un'attivazione minima del NPQ. Aumentando l'intensità della luce attinica, si vede un picco iniziale nei valori di NPQ, che decrescono nei primi due minuti di illuminazione per restare pressoché costanti nei successivi minuti di illuminazione. Allo spegnimento della luce attinica, si assiste ad un secondo incremento dei valori di NPQ, in maniera particolarmente pronunciata nel campione illuminato con luce attinica maggiore, che poi cala nuovamente. Nelle cellule cresciute ad HL l'andamento della cinetica è il medesimo, ma con valori assoluti più alti. Anche nei campioni HL si vede una dipendenza dell'ampiezza dell'attivazione del NPQ dall'intensità di luce attinica usata.

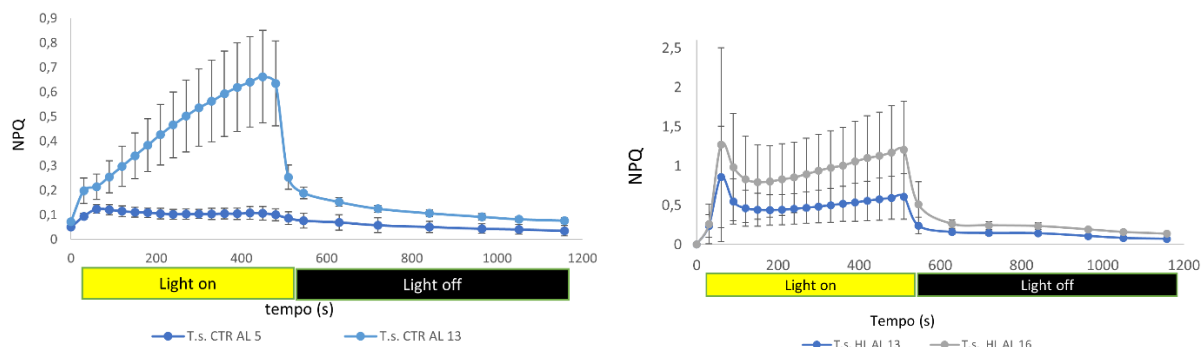


Figura 3.20: Parametro NPQ nelle analisi induction curves di *T. suecica*. I grafici ripartano l'andamento del parametro NPQ in *T. suecica* CTR (a sinistra) e HL (a destra). L'analisi è stata ripetuta in ciascun caso con due diverse intensità di luce attinica: 50 e 435 micromol fotoni $m^{-2} s^{-1}$ per CTR, 435 e 830 micromol fotoni $m^{-2} s^{-1}$ per HL (indicate rispettivamente con AL50, AL435 e AL830). La barra superiore mostra quando la luce attinica era accesa (giallo) o spenta (nero). I dati rappresentano una media \pm deviazione standard di 3repliche.

T. suecica cresciuta in condizioni controllo (Figura 3.20) mostra anch'essa un'induzione di NPQ praticamente nulla con luce attinica pari alle condizioni di crescita. Con l'utilizzo di una luce attinica saturante, invece, il parametro NPQ mostra un continuo aumento nel corso dell'illuminazione, pur mantenendo valori massimi esigui. Allo spegnimento della luce attinica, il calore di NPQ ha un brusco calo e valori che si mantengono prossimi allo zero per tutta la fase di buio.

Cellule di *T. suecica* acclimatate ad HL mostrano, con entrambe le intensità di luce attinica utilizzate, un iniziale picco di NPQ. I valori di NPQ poi calano parzialmente nel successivo minuti di illuminazioni per poi assestarsi a valori di circa 0.5 con l'intensità di luce attinica più bassa, a valori di circa 1, con una lieve e continua crescita, per i campioni illuminati con luce saturante. Come nei campioni CTR, anche nei campioni HL allo spegnimento della luce i valori di NPQ calano velocemente tornando prossimi allo zero.

CAPITOLO 4: DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi ci si è focalizzati su due specie di microalghe verdi, *Dunaliella salina*, appartenente alla classe delle *Chlorophyceae*, e *Tetraselmis suecica*, appartenente alla classe delle *Prasinophyceae*. Queste due microalghe condividono una filogenesi comune (Figura 1.1), dal momento che i diversi gruppi di alghe verdi si sono evoluti da un ancestore comune frutto di endosimbiosi primaria (Burki et al., 2019).

Lo studio si è concentrato sulla caratterizzazione di colture delle due microalghe acclimatate ad alta luce o cresciute con limitata disponibilità di solfato. Le condizioni sperimentali sono state scelte in quanto entrambe possono avere ripercussioni sull'attività fotosintetica, la fonte primaria di energia per le cellule fotosintetiche: lo zolfo è un elemento essenziale, ad esempio, per il trasporto elettronico, in quanto presente sotto forma di centri Fe-S di vari trasportatori, come il PSI (Caffarri et al., 2014); una elevata intensità luminosa è ben nota condizione di stress dal momento che l'energia assorbita in eccesso rispetto alla capacità della cellula fotosintetica di utilizzarle può causare la formazione di specie reattive dell'ossigeno, con conseguenti danni all'apparato fotosintetico (Jahns e Holzwardt, 2011).

Dati disponibili in letteratura hanno mostrato come sia *Dunaliella salina* che *Tetraselmis suecica* abbiano, in generale, buone capacità di acclimatarsi a situazioni di stress, grazie all'accumulo di molecole con il ruolo di fotoprotezione come il beta carotene o all'accumulo di antiossidanti come il tocoferolo che svolgono un ruolo

chiave nella difesa contro la formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Hejazi et al, 2004; Sansone et al, 2015). Oltre al ruolo che queste molecole svolgono all'interno della cellula, il loro accumulo rende le microalghe particolarmente interessanti per scopi applicativi e commerciali. Ad esempio, il beta carotene viene impiegato nell'industria farmaceutica (Ambati et al, 2018); inoltre, *Tetraselmis suecica* ha il potenziale per sostituire la farina di pesce come unico sostentamento all'acquacoltura, in quanto è fonte di amminoacidi essenziali, lipidi e vitamine (Ashfaq et al, 2022).

Non meno importante, a livello ecologico, la diversa capacità di rispondere alle condizioni sfavorevoli come i due stress sopracitati può spiegare la biodiversità del fitoplancton e come possa eventualmente cambiare a seguito di cambiamenti ambientali nel loro habitat.

Durante questa tesi ci si è concentrati sulla caratterizzazione delle cellule microalgali in termini di crescita, attività fotosintetica e composizione della cellula. Le condizioni di coltura S-lim e HL utilizzate in questa tesi sono state selezionate, per ciascuna specie, in quanto mostravano un impatto nella crescita rispetto al controllo, in termini di rallentamento del tasso e/o di abbassamento della concentrazione cellulare massima rispetto ai valori nel controllo, pur mantenendo la capacità di crescere della coltura in una scala temporale di due settimane. Erano stati condotti test preliminari anche in condizioni più severe rispetto a quelle selezionate (raddoppiando l'intensità luminosa per HL e diminuendo di 5-10 volte ulteriormente la disponibilità di solfato per S-lim) che sono state scartate perché è stata riscontrata una riduzione della

crescita particolarmente drastica. Questo suggerisce, comunque, che le condizioni scelte per le successive analisi siano comunque prossime al limite nella capacità delle specie di fronteggiare la situazione ambientale avversa, almeno con il protocollo di acclimatazione utilizzato in questo elaborato.

Una volta identificate le condizioni di crescita (CTR, S-lim e HL) e nota la crescita, è stato approfondito l'effetto degli stress sulla fotosintesi.

Non si è riscontrato, ad esempio, un calo dell'efficienza fotosintetica, né per PSII né per PSI, in entrambe le specie cresciute in limitazione da solfato (Figure 3.15 e 3.17)), nonostante il ruolo essenziale dello zolfo nell'apparato fotosintetico, ad esempio nei centri Fe-S del PSI (Cafarri et al, 2014). L'analisi del contenuto in pigmenti fotosintetici suggerisce però che sia *D. salina* che *T. suecica* abbiano modificato l'apparato fotosintetico in risposta alla limitazione da solfato: entrambe le specie hanno infatti il contenuto in clorofille più basso rispetto al contenuto in cellule cresciute alle condizioni controllo (Figure 3.13 e 3.14). Al contrario i carotenoidi, i pigmenti che hanno un ruolo chiave nella fotoprotezione, sono rimasti pressoché invariati (Figure 3.13 e 3.14). Inoltre, in *D. salina*, ma non in *T. suecica*, cambia il rapporto *clorofilla a/b* tra la condizione CTR e quella S-lim condizioni. Questo suggerisce che la strategia di acclimatazione dell'apparato fotosintetico adottata dalle due specie possa esser diversa, in linea con dati disponibili in letteratura che mostrano come specie diverse abbiano una diversa risposta di acclimatazione, modificando il numero di fotosistemi e/o la loro "antenna size", il numero di antenne collegate ad ogni core (Falkowski ed Owen, 1980; Erikson et al., 2015; Meneghesso

et al., 2016). Anche a fronte dell'acclimatazione ad HL le due specie mostrano delle differenze nella variazione nel contenuto in pigmenti fotosintetici per cellula, che è particolarmente pronunciata in *T. suecica*, con un calo in tutte le tipologie di pigmento analizzate rispetto al controllo. In entrambe le specie, comunque, il rapporto *clorofilla a/b* in HL è più alto rispetto al CTR e il rapporto clorofilla/carotenoidi è più basso, in linea, rispettivamente, con la minore necessità di cattura dell'energia luminosa (non limitante per la crescita in HL) e il ruolo fotoprotettivo dei carotenoidi (Jahns e Holzwardt, 2011). Nonostante ciò, l'analisi dell'attività fotosintetica in vivo di cellule cresciute ad HL mostra, in entrambe le specie, un lieve calo dell'efficienza massima (Figure 3.15 e 3.17), in linea con la riduzione nella crescita che suggerisce si sia comunque verificato un parziale danneggiamento dell'apparato fotosintetico. Al fine di valutare più nel dettaglio come le cellule cresciute ad HL abbiano modificato la loro capacità di fotoprotezione, sono state condotte diverse analisi *in vivo* della fluorescenza della clorofilla (Figure NN), che hanno mostrato, nei campioni HL di entrambe le specie, un aumento dei valori di NPQ, il parametro riconducibile all'attivazione di meccanismi di dissipazione dell'energia, rispetto ai loro CTR, come visto in altre specie (Gerotto e Morosinotto, 2013). Come noto da letteratura, il parametro NPQ racchiude molte componenti che possono esser discriminate sulla base delle loro cinetiche di attivazione e disattivazione in esperimenti del tipo *induction curves*. Queste analisi, condotte sui campioni CTR ed acclimatati ad HL, suggeriscono che si tratti di un effettivo potenziamento dei meccanismi rapidi di regolazione e fotoprotezione in HL, dal

momento che, in entrambe le specie, la fase al buio della cinetica mostra come i valori del parametro NPQ tornino in pochi minuti prossimi allo zero. I meccanismi di regolazione della fotosintesi sono però molteplici, dalla dissipazione dell'energia in eccesso come calore a vie elettroniche alternative (Niyogi and Truong, 2013; Cardol et al, 2010; Curien et al, 2016).

La differente cinetica, sia alla luce che al buio, registrata per le due microalghe suggerisce importanti differenze nei meccanismi attivati. In particolare, in *T. suecica*, il drastico calo del valore di NPQ allo spegnimento della luce suggerisce che la componente principale sia dovuta a meccanismi di dissipazione come calore pH-dipendenti, in maniera simile a quello che accade in altre specie, sia alghe che piante (Li et al., 2000; Peers et al., 2009; Alboresi et al., 2010; Gerotto e Morosinotto, 2013). La cinetica di *D. salina* è invece molto peculiare, soprattutto nella fase al buio, e necessita di ulteriori studi per definirne le componenti.

L'analisi della composizione cellulare nelle principali macromolecole suggerisce che, in aggiunta all'acclimatazione a carico della "fase luminosa" della fotosintesi, anche l'allocazione del carbonio venga modificata, ma in modo diverso tra le due specie a seconda delle condizioni di crescita. Con l'eccezione di *T. suecica* HL, in cui la composizione cellulare resta pressoché invariata rispetto al controllo, gli altri campioni mostrano una differenza nei rapporti tra le principali macromolecole (Figura 3.12).

L'insieme delle analisi effettuate ha quindi mostrato come entrambe le alghe verdi sono state in grado di acclimatarsi alle condizioni di crescita non ottimali cui sono state sottoposte. In generale, in tutte le condizioni testate le alghe sono state in grado di mantenere un'efficienza fotosintetica simile a quella delle condizioni controllo, a fronte di modifiche all'apparato fotosintetico, diverse a seconda del campione analizzato (Figure 3.13, 3.14, 3.15 e 3.17) e NPQ). La disponibilità di energia metabolica derivante dalla fotosintesi è stata probabilmente un elemento chiave per un'acclimatazione efficace, nonostante si sia riscontrato in tutti i casi un'alterazione nella curva di crescita (Figure 3.1 e 3.3). I cambiamenti nella composizione cellulare (Figure 3.9, 3.10, 3.11 e 3,12) possono anch'essi esser riconducibili ad una riorganizzazione dell'uso dell'energia metabolica e delle risorse a disposizione. I meccanismi molecolari alla base di queste risposte andranno approfonditi nel futuro, con una caratterizzazione più specifica dei cambiamenti a carico dei vari pool cellulari.

5 BIBLIOGRAFIA

- Alboresi A., Gerotto C., Giacometti G. M., Bassi R, Morosinotto T. 2010;
Physcomitrella patens mutants affected on heat dissipation clarify the evolution of
photoprotection mechanisms upon land colonization ; Proc Natl Acad Sci U S A, Jun
15;107(24):11128-33
- Ambati R. R., Deepika Gogisetty, Ravishankar Gokare Aswathanarayana ,Sarada
Ravi Panduranga Narasimharao Bikkina, Lei Bo , Su Yuepeng 2018;Industrial
potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future
prospects. Crit Rev Food Sci Nutr 2019;59(12):1880-1902.
- Bhattacharya D.,Archibald J. M., Weber A. P. M., Reyes-Prieto A, 2007; “How do
endosymbionts become organelles? Understanding early events in plastid evolution”.
Bioessays. 2007 Dec;29(12):1239-46
- Bonente, G., Ballottari, M., Truong, T. B., Morosinotto T., Ahn, T. K., Fleming, G.
R., Niyogi, K.K., Bassi, R. (2011). Analysis of LhcSR3, a protein essential for
feedback de-excitation in the green alga Chlamydomonas reinhardtii. P Los Biology,
9, e1000577.
- Buchel, C., (2020). Light harvesting complexes in chlorophyll c-containing algae.
Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics, 1861, 148027.
- Burki F., Andrew J. Roger M W. Brown and Alastair G.B. Simpson; 2019;
Review;The New Tree of Eukaryotes Trends Ecol Evol 2020 Jan;35(1):43-55

Caffari; S., Tibiletti; T., Jennings R., C., Santabarbara, S, (2014) “A comparison between plant photosystem I and photosystem II architecture and functioning”.

Current protein & Peptide Scienze, 15, 296-331

Carballo-Cárdenas, E. C., Tuan, P. M., Janssen, M. & Wijffels, R. H. Vitamin E (alpha-tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomol. Eng.* 20(4–6), 139–147 (2003)

Cardol P., Forti G., Finazzi G., 2010; “Regulation of electron transport in microalgae”; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Bioenergetics*, 912-918

Chini Zittelli, G., Rodolfi, L., Biondi, N. & Tredici, M. R. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture*. 261, 932–943 (2006).

Curien G., Flori S., Villanova V., Magneschi L., Giustini C., Forti G., Matringe M., Petroutsos D., Kuntz M., Finazzi G., 2016; “The Water to Water cycles in Microalgae”; *Plant and cell physiology*, Volume 57, Pages 1354-1363.

Engelken, J., Brinkmann, H., Adamska, I., (2010). Taxonomic distribution and origins of the extended LHC (light harvesting complex) antenna protein superfamily. *BMC Evolution Biology*, 10, 233.

Erb J. T., Zarzycki J., 2018; “A short history of RubisCO: the rise and the fall (?) of Nature’s predominant CO₂ fixing enzyme”; *Current opinion in Biotechnology*; Volume 49, Pages 100-107.

- Gerotto C., Morosinotto T., 2013; “Evolution of photoprotection mechanisms upon land colonization: evidence of PSBS-dependent NPQ in late Streptophyte algae”.
- Gigolashvili T., Kopriva S. 2014; Transporters in plant sulfur metabolism; *Front Plant Sci*, 2014 Sep 9;5:442.
- Giordano M., Norici A., Hell R., 2004; “Sulfur and phytoplankton: acquisition, metabolism and impact on the environment”; *New Phytol* 2005 May;166(2):371-82.
- Giordano M., Prioretti L, 2016; “Sulphur and Algae: Metabolism, Ecology and Evolution”; *Plant Physiology*, pages 185-209.
- Gong M., Bassi A., 2016; Carotenoids from microalgae: A review of recent developments.
- González M. A., Gómez P.I., Jürgen E. W. Polle, 2009; Taxonomy and Phylogeny of the Genus *Dunaliella*; *The Alga Dunaliella*
- Goss , R., Lepetit, B., (2015). Biodiversity of NPQ. *Journal of Plant Physiology*, 172, 13-32.
- Irianto, A. & Austin, B. Probiotics in aquaculture. *J. Fish Dis.* 25(11), 633–642 (2002).
- Jahns P, and Holzwarth A. R. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II *BBA* 2011
- Keeling J.P., Burki F., 2019. Progress towards the Tree of Eukaryotes. *Cell Press*.

Koziol, A. G., Borza, T., Ishida, K.-I, Keeling, P., Lee, R.W., Durnfords, D.

G.(2007). Tracing the evolution of light-harvesting antennae in chlorophyll a/b-containing organisms. *Plant physiology*,143, 1802-1816.

Lacour, T., Babin, M., Lavaud, J.(2020). Diversity in xanthophyll cycle pigments content and related nonphotochemical quenching (NPQ) among microalgae:

Implications for growth strategy and ecology. *Journal of Phycology*, 56, 245-263.

Lane C. E. ,Archibald J. M, 2008, “The eukaryotic tree of life: endosymbiosis takes its TOL”, *Trends in Ecology & Evolution*, Volume 23, Issue 5, Pages 268-275.

Lehmuskero A., Chauton M. S., Boström T.; 2018; Light and photosynthetic microalgae: A review of cellular- and molecular scale optical processes. Review;

Li X P , O Björkman, C Shih, A R Grossman, M Rosenquist, S Jansson, K K Niyogi, 2000; A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature*, 2000 Jan 27;403(6768):391-5. doi: 10.1038/35000131.

López-Hernández; Alamilla P. G, D. Palma-Ramírez, C. A. Álvarez-González, J. C. Paredes-Rojas and F. J. Márquez-Rocha, 2020; Continuous Microalgal Cultivation for Antioxidants Production; *Molecules*

M.A. Hejazi, E. Holwerda, R.H. Wijffels, 2004; “Milking Microalga *Dunaliella salina* for B-Carotene Production in Two-Phase Bioreactors”;

Mulo, P., Sakurai, I., Aro, E.-M., (2012). Strategies for psbA gene expression in cyanobacteria, green algae and higher plants: From transcription to PSII repair.

Biochimica et biophysica acta- Bioenergetics, 1817, 247-257.

Mulo, P., Sakurai, I., Aro, E.-M., (2012). Strategies for psbA gene expression in cyanobacteria, green algae and higher plants: From transcription to PSII repair.

Biochimica et biophysica acta- Bioenergetics, 1817, 247-257.

N.Rascio, 2012, “Elementi di fisiologia vegetale”, Capitolo 4, 111-180.

Nagy, G., Unnep, R., Zsiros, O., Tokutsu, R., Takizawa, K., Porcar, L., Moyet, L., Petroutsos, D., Garab, G., Finazzi, G., Minagawa, J. (2014). Chloroplast remodeling during state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii* as revealed by noninvasive techniques *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 5042-5047.

Neilson, J. A. D. and Durnford, D. G. (2010). Structural and functional diversification of the light-harvesting complexes in photosynthetic eukaryotes.

Photosynthesis Research, 106, 57-71.

Niyogi K K, Truong T. B Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 2013 Jun;16(3):307-14.

Norici A., Gerotto C., Beardall J., Raven A. J., 2022; “Environmental Variability and its Control of Productivity”; *Blue Planet. Red and Green Photosynthesis*, Cap. 8; pages 1-32.

Peers G., Truong, T.B., Ostendorf, E. Busch, A., Elrad, D., Grossman, A.R., Hippler, M., Niyogi, K.K. (2009). An ancient light harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis. *Nature*, 462, 518-521.

Pérez-López, P. et al. Life cycle assessment of the production of bioactive compounds from *Tetraselmis suecica* at pilot scale. *J. Clean, Prod.* 64, 323–331 (2014)

Sansone C., Galasso C., Orefice I., Nuzzo G., Luongo E., Cutignano A., Romano G., Brunet C., Fontana A., Esposito F., Ianora A., 2017. The green microalga *Tetraselmis suecica* reduces oxidative stress and induces repairing mechanisms in human cells.

Nature

Stomp M., Huisman, J., De Jongh, F., Veraart, A. J., Gerla, D., Rijkeboer, M., Ibelings, B. W., Wollenzien, U.I.A., Stal, L.J. (2004). Adaptive divergence in pigment composition promotes phytoplankton biodiversity. *Nature*, 432, 104-107

Sukenik, A., Livne, A., Apt, K.E., Grossman, A.R. (2000); Characterization of a gene encoding the light-harvesting violaxanthin-chlorophyll protein of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Journal of phycology*, 26, 563-570.

Takahashi, H., Kopriva, S., Giordano, M., Saito, K., Hell, R., (2011). Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: Molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 157-184.

Ulnu, C., Drop, B., Croce, R., van Amerongen, H., (2014). State transition in *Chlamydomonas reinhardtii* strongly modulate the functional size of photosystem II but not size of photosystem I. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 3460-3465.

RINGRAZIAMENTI:

Grazie a Cate, a cui personalmente devo molto, alla professoressa Norici, ad Ale, Lollo, Pippo e Stefano, fantastiche persone e gruppo di laboratorio con cui ho condiviso questi mesi in laboratorio.

Grazie alla mia famiglia, a mia madre, a mio padre, a mio fratello e a mia sorella, agli zii, ai cugini e a tutti quelli che fanno parte di questo meraviglioso nucleo familiare senza il quale non avrei mai raggiunto quest'obbiettivo.

Grazie a Sanso, Tama, Patri, Otty, Fra e Giulio, amici di una vita che ancora dopo tanti anni sono sempre capaci di supportarmi (e sopportarmi) a 360 gradi senza chiedere mai.

Grazie anche a Marina, Pamela, Lucrezia, Anna, Nicola, Agnese e Gigi, meravigliose persone che ho conosciuto qui ad Ancona nonostante la sfortuna di due anni frastagliati. La fortuna però di conoscere persone così è che basta poco per stringere un'amicizia che resterà indelebile.