



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA

XXI CICLO

**CIANOBATTERI E VARIAZIONI AMBIENTALI: EFFETTI
SUI LIPIDI DI MEMBRANA E SULLE DESATURASI**

Coordinatore: Ch.mo Prof. Giorgio Casadoro

Supervisore: Ch.mo Prof. Carlo Andreoli

Dottorando: Katia Sciuto

31 Dicembre 2008

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA
XXI CICLO**

Dottoranda: Katia Sciuto

RIASSUNTO

Titolo della Tesi:

**CIANOBATTERI E VARIAZIONI AMBIENTALI: EFFETTI SUI
LIPIDI DI MEMBRANA E SULLE DESATURASI**

I cianobatteri (*phylum* Cyanophyta) sono un gruppo di microrganismi procarioti, comprendente sia forme unicellulari sia specie filamentose pluricellulari, in grado di effettuare la fotosintesi ossigenica come alghe e piante.

I cianobatteri costituiscono il *phylum* Cyanophyta, che risulta suddiviso in quattro ordini: Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales e Stigonematales. La loro natura procariotica, la presenza di numerose specie criptiche e la coesistenza di diversi sistemi di classificazione rendono particolarmente complessa l'identificazione tassonomica di questi organismi. Attualmente, per caratterizzare i cianobatteri, la maggior parte degli autori utilizza un approccio di tipo polifasico.

I cianobatteri presentano specifiche caratteristiche morfologiche e fisiologiche che consentono loro di colonizzare vari tipi di substrato e di adattarsi ad ampi cambiamenti ambientali.

Uno dei meccanismi adottati dai cianobatteri per far fronte a condizioni ambientali estreme è il mantenimento della fluidità e, quindi dell'efficienza, delle membrane biologiche al variare di diversi parametri ambientali (adattamento omeoviscoso). Le membrane biologiche, infatti, hanno un ruolo centrale nelle cellule, essendo la sede di numerose attività metaboliche.

Fra le componenti fondamentali delle membrane dei cianobatteri ci sono quattro diversi glicerolipidi (MGDG, DGDG, SQDG, PG) e vari tipi di carotenoidi. La fluidità e l'efficienza delle membrane cianobatteriche sono strettamente connesse con il grado di insaturazione degli acidi grassi esterificati ai glicerolipidi e con il tipo di carotenoidi presenti.

Alcuni enzimi coinvolti nella regolazione del grado di insaturazione degli acidi grassi sono le desaturasi degli acidi grassi. Questi enzimi, infatti, inseriscono doppi legami nelle catene aciliche delle molecole lipidiche. Nei cianobatteri sono state finora ritrovate quattro tipi di desaturasi (Δ^6 desaturasi, Δ^9 desaturasi, Δ^{12}

desaturasi, $\omega 3$ desaturasi) che differiscono per la posizione in cui inseriscono il doppio legame nella catena acilica.

Il primo scopo di questo progetto di Dottorato è stata la caratterizzazione di un cianobatterio filamentoso isolato dai fanghi del Comprensorio termale Euganeo (PD). Durante il processo di maturazione, infatti, il fango delle vasche è colonizzato da numerosi microrganismi, ma principalmente da cianobatteri, considerati responsabili della maggior parte delle proprietà terapeutiche del fango. La caratterizzazione di questo ceppo filamentoso (ceppo ETS-02) è stata condotta utilizzando un approccio polifasico, comprendente indagini morfologiche, ultrastrutturali, biochimiche, fisiologiche e molecolari. Da tali analisi l'organismo è risultato appartenente all'ordine Oscillatoriales, alla famiglia Phormidiaceae e all'VIII gruppo del genere *Phormidium*. Esso è stato, quindi, denominato *Phormidium* sp. ETS-02.

Questo ceppo presenta alcune peculiarità, come la capacità di fissare l'azoto. È stata trovata, poi, la presenza di ficoeritrocianina, una ficobiliproteina limitata a un numero ristretto di cianobatteri, e di una particolare forma di C-ficocianina.

L'ambiente delle vasche del Comprensorio Euganeo è soggetto a considerevoli variazioni diurne e stagionali di temperatura e di luce. Un ulteriore scopo di questa tesi di Dottorato è stato, quindi, lo studio dell'adattamento a livello delle membrane di *Phormidium* sp. ETS-02, mantenendolo in diverse condizioni di temperatura e luce. L'attenzione è stata focalizzata, in particolare, sulla variazione nella composizione in acidi grassi e in carotenoidi. Sono state prese, anche, in considerazione eventuali variazioni nella morfologia e nell'ultrastruttura di ETS-02, alle diverse condizioni di mantenimento.

Le analisi condotte hanno messo in luce che gli acidi grassi e i carotenoidi contribuiscono in maniera sinergica e complementare al mantenimento e alla funzionalità delle membrane biologiche di *Phormidium* sp. ETS-02.

Inoltre, non solo la temperatura, come atteso, ma anche la luce influenza la composizione in acidi grassi delle membrane. In particolare, la temperatura agisce sul grado di insaturazione generale, mentre la luce sulla presenza di determinate specie aciliche (acido α -linolenico).

Per quanto riguarda i carotenoidi, il contenuto delle mixoxantofille presenta le maggiori variazioni fra le diverse condizioni di temperatura e di luce.

Un'ultima parte del progetto di ricerca ha avuto come scopo l'individuazione e la determinazione delle sequenze complete dei geni delle desaturasi degli acidi grassi di *Phormidium* sp. ETS-02.

Il genoma di tale organismo contiene tre geni di desaturasi: *desA*, *desB* e *desC*, codificanti per la $\Delta 12$, la $\omega 3$ e la $\Delta 9$ desaturasi rispettivamente. Le sequenze aminoacidiche ottenute sono state impiegate, assieme a quelle disponibili nel

database Genbank, per un'analisi dell'evoluzione molecolare di questi enzimi a livello del *phylum* Cyanophyta.

I cladi osservati nella ricostruzione filogenetica, ottenuta con il metodo del *maximum likelihood*, sembrano rispecchiare le relazioni filogenetiche fra i vari *taxa* e/o l'ambiente di provenienza dei cianobatteri a cui le sequenze appartengono.

CYANOBACTERIA AND ENVIRONMENTAL CHANGES: EFFECTS ON MEMBRANE LIPIDS AND DESATURASES

Cyanobacteria are a group of prokaryotic microorganisms, including both unicellular and multicellular filamentous species, are able to perform oxygenic photosynthesis as algae and plants.

Cyanobacteria constitute the *phylum* Cyanophyta, which is divided in four orders: Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales and Stigonematales. Their prokaryotic nature, the presence of many cryptic species and the coexistence of different classification systems make particularly difficult the taxonomic identification of these organisms. Currently, in order to characterize cyanobacteria, most authors use a polyphasic approach.

Cyanobacteria have specific morphological and physiological features that enable them to colonize different types of substrates and to adapt themselves to great environmental changes.

A mechanism by cyanobacteria to face extreme environmental conditions is the maintenance of the fluidity, and so of the efficiency, of biological membranes (homeoviscous adaptation) under variations of the environmental parameters. In fact, biological membranes are seats of several metabolic activities.

Among the basic components of cyanobacterial membranes there are four glycerolipids (MGDG, DGDG, SQDG, PG) and several types of carotenoids.

The fluidity and the efficiency of cyanobacterial membranes are strictly connected with the unsaturation degree of fatty acids esterified to glycerolipids and with the carotenoid types present.

Fatty acid desaturases are enzymes involved in the regulation of fatty acid unsaturation degree. In fact, they are able to insert double bonds in the fatty acid acyl chains. So far, in cyanobacteria four types of fatty acid desaturases have been found (Δ^6 desaturasi, Δ^9 desaturasi, Δ^{12} desaturasi, $\omega 3$ desaturasi), that differ for the position in which they insert the double bond.

This Ph.D. project had the aim to characterize a filamentous cyanobacterium isolated from the muds of the Euganean thermal District (PD). In fact, during the maturation process the mud is colonized by many microorganisms, but

especially by cyanobacteria, which are considered responsible for most of the therapeutic properties of the mud.

The characterization of this filamentous strain (strain ETS-02) was performed with a polyphasic approach, including morphological, ultrastructural, biochemical, physiological and molecular investigations. According to these analyses the organism results to belong to the Oscillatoriales order, to the Phormidiaceae family and to the *Phormidium* genus. So, it has been named *Phormidium* sp. ETS-02.

This strain shows some peculiarities, as the ability of nitrogen fixation. Besides, it has been found the presence of phycoerythrocyanin, a phycobiliprotein restricted to few cyanobacteria, and a particular form of C-phycoerythrin.

The Euganean thermal spring environment is subjected to large diurnal and seasonal variations of temperature and light. So, another aim of this Ph.D. project was the study of the adaptation of *Phormidium* sp. ETS-02 at membrane level, maintaining it to different temperature and light conditions. Particular attention has been paid to the variation in fatty acid and carotenoid composition. Possible variations in the morphology and ultrastructure of ETS-02 at the different maintaining conditions were be considered too.

The performed analyses showed that fatty acids and carotenoids contribute in a synergic and complementary way to the maintenance and functionality of *Phormidium* sp. ETS-02 biological membranes.

Moreover, not only the temperature, as expected, but also the light influences the membrane fatty acid composition. In particular, the temperature affects the general fatty acid unsaturation degree, while the light acts on the presence of certain acyclic species (α -linolenic acid).

Regarding to carotenoids, the myxoxanthophyll content shows the greater variations between the different temperature and light conditions.

The final part of this research project aimed to individualize and to determine the completed sequences of the fatty acid desaturase genes of *Phormidium* sp. ETS-02.

The genome of this organism contains three fatty acid desaturase genes: *desA*, *desB* and *desC*, coding the Δ^{12} , $\omega 3$ and Δ^9 desaturases, respectively. The obtained aminoacidic sequences have been employed, together with those found in the Genbank database, for a molecular evolution analysis of these enzymes in the *phylum* Cyanophyta.

Clades observed in the phylogenetic reconstruction, obtained using the *maximum likelihood* method, seem to reflect the phylogenetic relationships between the different *taxa* and the environment of origin of the cyanobacteria to which the sequences belong.

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 I CIANOBATTERI	1
1.1.1 I cianobatteri: generalità, distribuzione e struttura della cellula	1
1.1.2 Le comunità di cianobatteri in natura e in coltura	8
1.2 CLASSIFICAZIONE E TASSONOMIA DEI CIANOBATTERI	10
1.2.1 L'ordine Oscillatoriales	12
1.2.2 <i>Marker</i> molecolari utilizzati per identificare i cianobatteri	15
1.3 AMBIENTI ESTREMI	18
1.3.1 L'ambiente termale	20
1.3.2 L'ambiente del Comprensorio termale Euganeo (Padova, Italia)	22
1.4 ADATTAMENTI DEI CIANOBATTERI ALL'AMBIENTE	24
1.5 IL SISTEMA DI MEMBRANE DEI CIANOBATTERI: STRUTTURA E FUNZIONI	27
1.5.1 Gli acidi grassi componenti le membrane	34
1.5.2 I carotenoidi componenti le membrane	36
1.6 DESATURASI DEGLI ACIDI GRASSI	40
1.6.1 Le desaturasi degli acidi grassi nei cianobatteri	42
1.7 MODULAZIONE DEL GRADO DI INSATURAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI E DELL'ATTIVITÀ DELLE DESATURASI NEI CIANOBATTERI	47
2. SCOPO	51
3. MATERIALI E METODI	53
3.1 RACCOLTA E ALLESTIMENTO DELLE COLTURE CIANOBATTERICHE	53
3.2 ALLESTIMENTO DI COLTURE DEL CIANOBATTERIO A DIVERSE CONDIZIONI DI LUCE E TEMPERATURA	53
3.3 COSTRUZIONE DELLE CURVE DI CRESCITA ALLE DIVERSE CONDIZIONI DI COLTURA	54
3.4 CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA, ULTRASTRUTTURALE E FISIOLÓGICA	54
3.4.1 Crescita dell'organismo in terreno privo di azoto	54
3.4.2 Microscopia ottica	54
3.4.3 Microscopia elettronica a scansione (SEM)	54
3.4.4 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)	55
3.5 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE	55
3.5.1 Scelta dei <i>marker</i> molecolari e dei relativi <i>primer</i> per le reazioni di amplificazione	55
3.5.2. Altri ceppi di cianobatteri necessari a completare l'analisi	57
3.5.3 Progettazione dei <i>primer</i> per il gene <i>nifD</i>	58
3.5.4 Purificazione del DNA genomico	59
3.5.5 Amplificazione del DNA mediante PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	59
3.5.6 Analisi degli amplificati mediante elettroforesi su gel di agarosio	59
3.5.7 Purificazione degli amplificati	60
3.5.8 Sequenziamento del DNA	60
3.5.9 Analisi delle sequenze ottenute	60
3.5.10 Costruzione degli allineamenti multipli	60
3.5.10 Determinazione del segnale filogenetico	61
3.5.11 Costruzione degli alberi filogenetici	64
3.6 CARATTERIZZAZIONE DELL'ASSETTO PIGMENTARIO	64
3.6.1 Analisi dei pigmenti idrosolubili: le ficobiliproteine	64
3.6.2 Analisi dei carotenoidi mediante HPLC (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)	64
3.7 ESTRAZIONE E ANALISI DEGLI ACIDI GRASSI	65
3.8 INDIVIDUAZIONE DEI DIVERSI TIPI DI DESATURASI PRESENTI	66

3.9 DETERMINAZIONE DELLE SEQUENZE NUCLEOTIDICHE COMPLETE DEI GENI DI DESATURASI INDIVIDUATI.....	68
3.9.1 Purificazione del DNA genomico con il metodo del CTAB	68
3.9.2 Determinazione delle sequenze complete mediante <i>Genome Walking</i>	68
3.10 ANALISI MOLECOLARE DELLE SEQUENZE DI DESATURASI OTTENUTE	71
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	73
4.1 CARATTERIZZAZIONE DEL CIANOBATTERIO IN ESAME	73
4.1.1 Caratterizzazione morfologica, ultrastrutturale e fisiologica.....	73
4.1.2 Caratterizzazione molecolare	84
4.1.3 Caratterizzazione dell'assetto pigmentario.....	106
4.1.4 Determinazione degli acidi grassi presenti	109
4.2 ADATTAMENTO DEL CIANOBATTERIO A DIVERSE TEMPERATURE E INTENSITÀ LUMINOSE	111
4.3 ANALISI DELLE DESATURASI PRESENTI	125
5. CONCLUSIONI	137
BIBLIOGRAFIA	141
APPENDICE	165

1. INTRODUZIONE

1.1 I CIANOBATTERI

«Cyanobacteria are among the most widespread, morphologically distinct, and abundant prokaryotes known (Whitton, 1992).»

«Cyanobacteria represent one of the major bacteriophyla, being a large, diverse and widespread group inhabiting most of the Earth's environments. They play an important role as primary producers, but are also capable of extensive growth, resulting in bloom events that can cause a significant threat to human and animal health (Robertson et al., 2001).»

«Cyanobacteria are among the most versatile living beings on the earth. They occur abundantly in virtually all known extreme habitats, which markedly differ in levels of salinity, temperature, light, humidity, availability of oxygen or carbon dioxide, solar and gamma radiation, and other conditions. (Dvornyk & Nevo, 2003).»

«The cyanobacteria are a morphologically distinct group of oxygenic photosynthetic organisms that inhabit terrestrial and aquatic ecosystems. The versatility lies in their ability to grow in extreme environments, their significant role in the biogeochemical cycle, and the production of bioactive compounds (Premanandth et al., 2006).»

«Cyanobacteria are the oldest known oxygenic photosynthetic organisms, and they played a key role in terrestrial history (Takaichi & Mochimaru, 2007).»

Quelle sopra riportate sono solo alcune delle numerose definizioni riferite ai cianobatteri, che si possono trovare nell'abbondante letteratura che li riguarda. Dal loro insieme traspare l'interesse suscitato da questi microrganismi procarioti per la loro capacità di colonizzare i più svariati ambienti, per l'estrema versatilità, legata alla complessità morfologica e metabolica, che li caratterizza, per l'importanza che essi hanno avuto nell'evoluzione della vita sulla terra e che tuttora giocano negli equilibri ambientali e per i numerosi impieghi che possono trovare nelle attività antropiche o, all'opposto, per i problemi che possono creare all'uomo e agli altri organismi (ad es. capacità di produrre tossine e ruolo che spesso rivestono nel biodeterioramento di monumenti e edifici).

1.1.1 I cianobatteri: generalità, distribuzione e struttura della cellula

Ai cianobatteri (*phylum* Cyanophyta) appartengono sia specie unicellulari coccoidi sia forme filamentose. In quest'ultimo caso le cellule sono impilate l'una sull'altra a formare lunghi filamenti (detti tricoli), che possono essere ramificati o uniseriati. Ci sono, inoltre, alcune specie in cui le singole cellule sono tenute insieme da una guaina mucillaginosa a formare aggregazioni, chiamate colonie.

La cellula cianobatterica è delimitata da un rivestimento (*envelope*) composto da quattro strati: uno strato elettronegativo, a contatto con il plasmalemma (la cui composizione non è stata ancora del tutto chiarita); un'altro intermedio, più rigido, di mureina (un peptidoglicano), e due strati esterni lipopolisaccaridici, che complessivamente costituiscono la membrana esterna (Wolk, 1973).

Proprio per questo tipo di organizzazione della parete cellulare, i cianobatteri sono solitamente considerati batteri Gram-negativi. In realtà, lo spessore dello strato di peptidoglicano dei cianobatteri è maggiore (dai 10 ai 700 nm, a seconda delle specie) di quello dei batteri Gram-negativi (2-6 nm) e più simile a quello dei batteri Gram-positivi (20-40 nm), con il quale condivide altre caratteristiche, come ad esempio la presenza di un più elevato numero di legami tra le catene polisaccaridiche di peptidoglicano (fig. A). In aggiunta, anche la membrana esterna dei cianobatteri presenta una composizione unica e diversa da quella dei batteri Gram-negativi (Hoiczyk & Baumeister, 1995; Hoiczyk & Hansel, 2000).

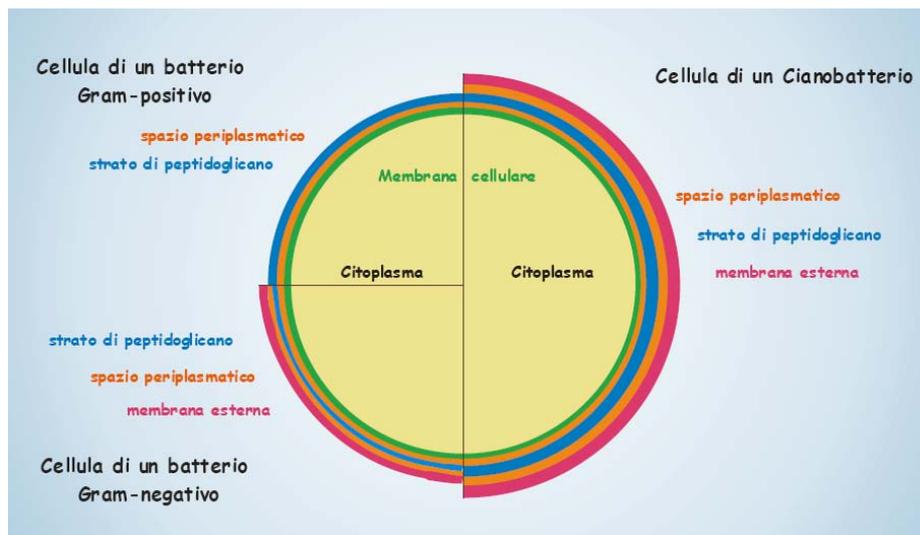


Fig. A: organizzazione degli strati delimitanti la cellula nei batteri Gram-positivi, nei batteri Gram-negativi e nei cianobatteri.

In numerose specie di cianobatteri, sia coccoidi che filamentose, è stato, poi, osservato un ulteriore strato attaccato alla membrana esterna (comune anche agli altri eubatteri e agli Archea, anche se con aspetto e posizione diversa a seconda dei *taxa*), detto strato-S (*S-layer*, ossia *Surface layer*) o glicocalice. Lo strato-S è costituito da glicoproteine, che si aggregano in omopolimeri formando un reticolo cristallino tetragonale con spazi ben definiti e con uno spessore di 11-20 nm (Hoiczyk & Baumeister, 1995; Adams *et al.*, 1998; Hoiczyk & Hansel, 2000). Esso è presente in tutti gli stadi di crescita e divisione cellulare (Mohamed *et al.*,

2005). Oltre che un ruolo strutturale, si ipotizza che lo strato-S possa adempiere a numerose funzioni come, ad esempio, il riconoscimento del substrato e l'adesione cellulare, la protezione contro agenti esterni e una funzione di riserva di ioni e molecole (Hoiczuk & Hansel, 2000; Mohamed *et al.*, 2005). Nelle stesse specie filamentose in cui è stato osservato l'*S-layer* si è notata anche la presenza, sopra tale strato, di ulteriori fibrille glicoproteiche disposte in maniera elicoidale e con una spaziatura regolare di circa 14 nm (Hoiczuk & Baumeister, 1995).

L'*envelope* dei cianobatteri presenta, poi, diversi tipi di perforazioni. Pori relativamente ampi (50-100 nm di diametro) si osservano sia sul lato interno che sul lato esterno dello strato di peptidoglicano, distribuiti su tutta la superficie della cellula, come in *Crinallium epipsammum*. In alcune specie, come *Oscillatoria limosa*, sono state inoltre individuate perforazioni che continuano con il plasmalemma sottostante, assimilabili a veri e propri plasmodesmi (Palinska & Krumbein, 2000). Infine, in numerosi cianobatteri filamentosi, si trovano perforazioni di diametro minore (13-16 nm), ai lati sia dei setti che separano una cellula dall'altra sia dei setti in neo-formazione delle cellule in divisione, che si dispongono generalmente in file ordinate a circondare l'intero perimetro cellulare (Palinska & Krumbein, 2000). Tali perforazioni sono la terminazione dei complessi dei pori giunzionali (JPCs), strutture formanti canali che attraversano lo strato di peptidoglicano con un angolo di 30-40° rispetto al piano dei setti, mettendo in comunicazione il citoplasma della cellula con l'esterno (Hoiczuk & Baumeister, 1998). Il numero, la dimensione e la disposizione di queste perforazioni sono considerati un carattere tassonomico rilevante (Palinska & Krumbein, 2000).

Pur condividendo caratteristiche sia con quello dei batteri Gram-negativi che con quello dei batteri Gram-positivi, si può quindi concludere come il rivestimento esterno dei cianobatteri sia una struttura distinta e propria di questi microrganismi.

Oltre a questo complesso *envelope* esterno che le delimita, nella maggior parte dei cianobatteri le cellule sono ulteriormente rivestite di materiale polisaccaridico, il quale sarebbe secreto dai complessi dei pori giunzionali (JPCs) (Hoiczuk & Baumeister, 1998; Wolgemuth & Oster, 2004). A seconda del loro spessore e della loro struttura si distinguono tre diversi tipi di polisaccaridi extracellulari (EPS) prodotti dai cianobatteri: guaina, capsula e mucillagine (De Philippis & Vincenzini, 1998). La guaina è un sottile strato elettrondenso, che circonda in modo più o meno aderente cellule o gruppi di cellule e che può essere osservato al microscopio elettronico, senza l'utilizzo di particolari colorazioni. La capsula generalmente consiste in uno strato più spesso e compatto della guaina, intimamente associato alla superficie cellulare. Con mucillagine, infine, si intende il materiale polisaccaridico disperso attorno alle cellule dei microrganismi, il quale,

a differenza delle due strutture appena descritte che si trovano più fermamente associate alle cellule, è rapidamente secreto all'esterno. Gli EPS risultano essere composti di almeno dieci diversi tipi di monosaccaridi, dei quali il più abbondante è generalmente il glucosio, seguito da galattosio, mannosio e ramnosio (De Philippis & Vincenzini, 1998). Tra i monosaccaridi che costituiscono gli EPS possono, talvolta, essere presenti anche particolari pigmenti, come la scitonemina, che sono caratteristici di determinate specie (Hoiczuk & Hansel, 2000). Sembra che gli EPS siano prodotti in risposta a vari fattori ambientali, fornendo alla cellula protezione contro situazioni di stress, come il disseccamento, e giocando un ruolo importante nell'ancoraggio al substrato e nel movimento (De Philippis & Vincenzini, 1998; Tamaru *et al.*, 2005).

Al suo interno, la cellula cianobatterica (fig. B) è, generalmente, occupata per la maggior parte dalle membrane tilacoidali (o tilacoidi), la cui organizzazione spaziale nel citoplasma sembra avere un valore tassonomico (Anagnostidis & Komàrek, 1990). A livello dei tilacoidi sono inseriti i componenti enzimatici sia della catena fotosintetica di trasporto degli elettroni, comprendente i fotosistemi fotosistemi I e II (PSI e PSII), che di quella respiratoria. Sul lato citoplasmatico di tali membrane, associati al PSII, si possono osservare poi i ficobilisomi, strutture tridimensionali che possono essere costituite da quattro tipi di ficobiliproteine (ficoeritrina, ficoeritrocianina, ficocianina e alloficocianina) e che permettono di assorbire la luce tra 550 e 650 nm.

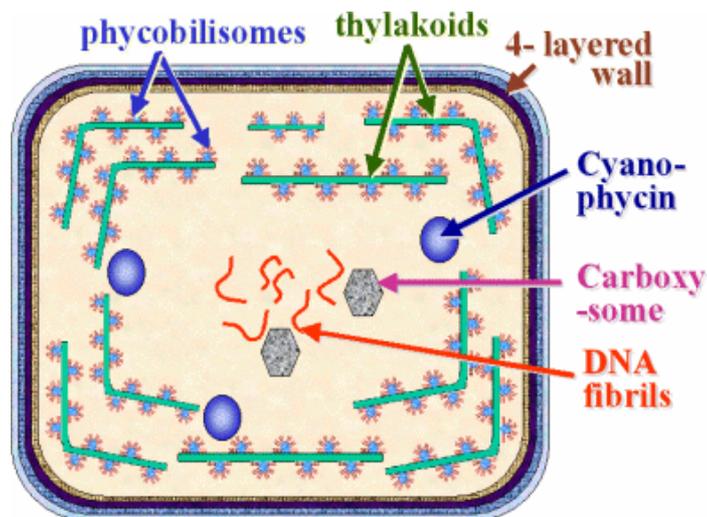


Fig. B: rappresentazione di una cellula cianobatterica (da <http://hypnea.botany.uwc.ac.za/phylogeny/classif/cyan2.htm>).

Essendo procarioti, i cianobatteri non presentano un vero e proprio nucleo, ma una regione, il nucleotide o nucleoplasma, in cui si trova il genoma dell'organismo sottoforma di un cromosoma circolare. Nel citoplasma sono localizzati, poi, diversi tipi di inclusi, tra cui: ribosomi 70S; carbossisomi (corpi poliedrici composti dalla Rubisco, l'enzima per la fissazione della CO₂); granuli di cianoficina, (che, essendo costituiti da arginina e asparagina, fungono da riserva di azoto); granuli di polifosfato; granuli di "amido delle Cyanophyceae" (un polisaccaride simile al glicogeno) e gocce lipidiche. Possono essere, inoltre, presenti vacuoli gassosi, circondati non da una membrana, ma da uno strato proteico impermeabile all'acqua (Wolk, 1973; Van den Hoek *et al.*, 1995; Pupillo *et al.*, 2003; Van de Meene *et al.*, 2006).

Come già accennato, i cianobatteri sono in grado di spostarsi nell'ambiente in cui vivono in risposta a diversi stimoli, in particolare la luce (Ramsing *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 1999; Bhaya, 2004), e ciò viene realizzato in diversi modi. Uno di questi è la capacità di spostarsi in una colonna d'acqua, o comunque in un mezzo liquido, per galleggiamento. Questo avviene modulando la produzione di vacuoli gassosi, che favoriscono il galleggiamento, con la produzione di granuli di amido delle Cyanophyceae e di cianoficina, che fungono invece da zavorra (Reynolds *et al.*, 1987; Sellner, 1997; Brookes *et al.*, 1999).

L'altra forma di movimento tipica dei cianobatteri è definita *gliding motility* e consiste nella capacità di spostarsi su un substrato per scivolamento o strisciamento. Il meccanismo della *gliding motility* deve essere ancora, in parte, chiarito, ma sembra differire tra le diverse specie di cianobatteri (Adams, 2001). Più dettagliatamente, numerose forme coccoidi, come alcune specie appartenenti al genere *Synechocystis*, realizzano ciò attraverso particolari strutture definite pili di tipo IV (Bardy *et al.*, 2003). Per quanto riguarda le forme filamentose, invece, alcune non presentano motilità permanente, ma producono tricomi motili solo durante brevi stadi dispersivi del loro ciclo vitale (è questo il caso del genere *Nostoc*); altre, come i membri della famiglia Oscillatoriaceae, presentano capacità di movimento permanente. Nei membri di tale famiglia, sono stati proposti due diversi meccanismi per tale movimento: una prima ipotesi è che fibrille proteiche (25-30 nm di diametro), poste tra lo strato di peptidoglicano e la membrana esterna, si contraggono ritmicamente generando delle onde le quali, propagandosi lungo il filamento, gli conferirebbero una spinta propulsoria in avanti, in direzione opposta al loro verso di propagazione. La seconda ipotesi è che il movimento di scivolamento sia strettamente connesso all'estrusione di mucillagine da parte dei complessi dei pori giunzionali e ad un secondo tipo di fibrille glicoproteiche (10-12 nm di diametro), che si trovano attaccate allo strato-S, sulla superficie esterna dell'organismo (Adams *et al.*, 1999; Adams, 2001; Read *et*

al., 2007). Tali fibrille sono costituite da una glicoproteina legante Ca^{2+} , chiamata oscillina, e fungerebbero da “binari” attraverso i quali può scorrere la mucillagine, determinando una spinta propulsoria direzionata. Studi condotti su alcuni membri dell’ordine Oscillatoriales hanno messo in luce, inoltre, come durante la *gliding motility* i movimenti translazionali siano accompagnati dalla rivoluzione dei tricomi attorno all’asse longitudinale del filamento (Hoiczky e Baumeister, 1995). Sembra che la disposizione superficiale delle fibrille di oscillina sia correlata al senso di rotazione del tricoma attorno al suo asse: le specie di cianobatteri che ruotano in senso orario, infatti, presentano una disposizione fibrillare destrogira, mentre in quelle con rivoluzione antioraria le fibrille sono disposte a spirale levogira. Nelle specie i cui filamenti non ruotano su se stessi durante lo spostamento, le fibrille di oscillina si dipartono radialmente dalla superficie del tricoma (Hoiczky e Baumeister, 1995; Hoiczky, 1998; Adams *et al.*, 1999; Hoiczky, 2000) (fig. C).

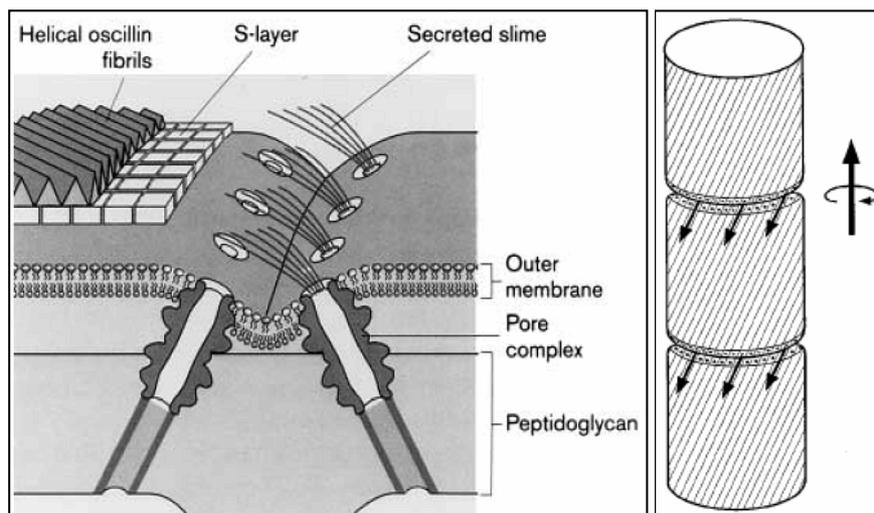


Fig. C: a sinistra, immagine raffigurante l’envelope di un cianobatterio filamentoso, con i particolari dei complessi dei pori giunzionali e delle fibrille di oscillina sulla superficie del tricoma. A destra, schema illustrante il meccanismo della *gliding motility* (da Hoiczky & Baumeinster, 1998).

Qualsiasi sia il meccanismo adottato, si è osservato che la velocità con cui i cianobatteri si spostano sul substrato varia da ceppo a ceppo, andando da 1-2 $\mu\text{m}/\text{min}$ (o anche meno) nelle specie coccoidi a più di 600 $\mu\text{m}/\text{min}$ in alcuni membri del genere *Oscillatoria* (Choi *et al.*, 1999).

Per quanto riguarda la riproduzione, nei cianobatteri è solo di tipo vegetativo: le specie coccoidi si moltiplicano per scissione binaria, quelle filamentose per frammentazione. In questo secondo caso alcune cellule, dette necridi, vanno

incontro a necrosi liberando corti frammenti di filamento, definiti ormogoni. Gli ormogoni successivamente si allungano per scissione cellulare (Meeks & Elhai, 2002; Pupillo *et al.*, 2003).

In alcune specie filamentose, infine, esistono forme cellulari specializzate nella fissazione dell'azoto atmosferico, dette eterocisti, caratterizzate da una parete più spessa e da un contenuto citoplasmatico meno denso (Meeks & Elhai, 2002; Pupillo *et al.*, 2003). Contrariamente a quanto si pensava fino a poco tempo fa, però, le specie eterocistiche non sono le uniche in grado di fissare l'azoto. Infatti, numerose forme coccoidi e specie filamentose non-eterocistiche riescono ad effettuare ciò, generalmente risolvendo l'incompatibilità della nitrogenasi per l'ossigeno attraverso una separazione temporale delle reazioni fotosintetiche e di quelle per la fissazione dell'azoto molecolare (Bergman *et al.*, 1997). Nei cianobatteri azotofissatori non-eterocistici del genere *Trichodesmium*, inoltre, sono state descritte particolari cellule preposte alla fissazione dell'azoto, diverse dalle eterocisti e chiamate diazociti (Bergman & Carpenter, 1991; Lin *et al.*, 1998; El-Shehawy *et al.*, 2003).

Altre forme di specializzazione sono, poi, gli acineti, cellule simili a spore che permettono all'organismo di sopravvivere in condizioni sfavorevoli (Wolk, 1973; Pupillo *et al.*, 2003) (fig. D).

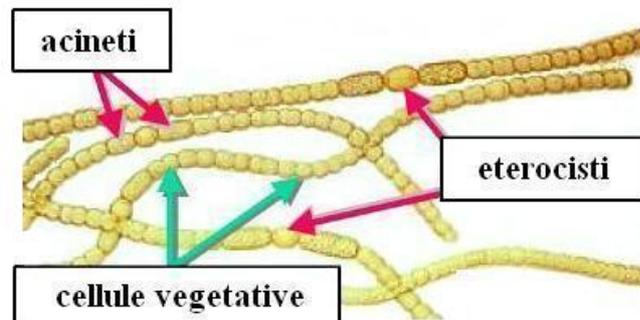


Fig. D: disegno raffigurante eterocisti, acineti e cellule vegetative in *Anabaena* sp. (modificato da <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/webb/BOT311/Cyanobacteria/Cyanobacteria.htm>).

Per le particolari caratteristiche morfologiche e fisiologiche che presentano, i cianobatteri sono in grado di colonizzare vari tipi di substrato, di adattarsi ad ampi cambiamenti ambientali e si ritrovano nei più disparati ambienti, potendo quindi essere considerati organismi ubiquitari. Alcune specie sono in grado di sopravvivere in condizioni estreme di temperatura, salinità, irraggiamento e

disponibilità di nutrienti e si possono ritrovare quindi in luoghi molto diversi come suoli desertici, sorgenti termali, laghi alcalini, pozze ipersaline e negli ambienti Artico e Antartico (Ward *et al.*, 1998; Coehen & Gurevitz, 1999; Paerl *et al.*, 2000; López-Cortés *et al.*, 2001; Jungblut *et al.*, 2005; Taton *et al.*, 2006).

Per quanto riguarda l'*habitus vivendi*, fra i cianobatteri si distinguono forme planctoniche (sia d'acqua dolce sia d'acqua marina), ossia specie che vivono fluttuando in una colonna d'acqua, e forme bentoniche, ossia specie che vivono aderendo, più o meno stabilmente, ad un substrato. Bisogna, poi, segnalare, oltre alla presenza di specie strettamente acquatiche, quella di numerose forme terrestri epilitiche ed endolitiche. Infine, un'ulteriore distinzione va fatta fra i cianobatteri a vita libera e quelli endosimbionti, che possono vivere in simbiosi con piante, alghe, animali, funghi e protisti (Rützler, 1988; Gàrcia-Pichel *et al.*, 2001; Brehm *et al.*, 2003; Nilsson *et al.*, 2006; Adams & Duggan, 2008).

1.1.2 Le comunità di cianobatteri in natura e in coltura

Come già accennato, i cianobatteri sono in grado di colonizzare diversi tipi di substrati e di adattarsi alle più svariate condizioni ambientali. In natura, le comunità di cianobatteri possono essere rappresentate da due principali tipi di aggregazioni: i "*blooms*" e "*mats* microbici".

I *blooms* sono costituiti da un elevato numero di cellule di microrganismi planctonici, dotati di vescicole gassose che ne permettono il galleggiamento, visibili a occhio nudo in mari e laghi (Skulberg *et al.*, 1984; Sellsner *et al.*, 2003; De Figueiredo *et al.*, 2006). Spesso i *blooms* sono visti come un problema ecologico, in quanto alcuni degli organismi che li possono costituire (non solo cianobatteri, ma anche altri tipi di microalghe e dinoflagellati) sono in grado di rilasciare tossine nocive per l'uomo e gli altri organismi (Carmichael, 1992; Sellsner *et al.*, 2003).

I *mats* microbici sono, invece, dense comunità bentoniche di microrganismi, in cui le differenti specie si trovano distribuite verticalmente a costituire strati distinti, spesso riconoscibili ad occhio nudo per i diversi colori dovuti ai pigmenti degli organismi che li compongono (Stal, 1995). Talvolta i *mats* microbici possono legare e intrappolare particelle di sedimento e precipitati minerali, come la calcite, fino a formare strutture rocciose laminate, detti stromatoliti, in cui gli strati minerali si alternano a quelli costituiti da materia organica (Cohen *et al.*, 1984). I *mats* più diffusi sono, però, quelli non stromatolitici, i quali si trovano soprattutto in ambienti estremi, come pozze ipersaline, sorgenti termali, suoli desertici e laghi antartici.

Lo spessore dei *mats* è generalmente limitato, in quanto la luce non riesce a penetrare troppo negli strati sottostanti, limitando notevolmente la capacità di effettuare la fotosintesi e quindi la crescita dei cianobatteri oltre una certa

profondità, anche se molte specie possono vivere chemotroficamente per dei periodi (Stal, 1995).

Sebbene diverse specie di cianobatteri siano stati ritrovati nei *mats* microbici, normalmente essi sono dominati da una sola specie, anche se i fattori che determinano questo fenomeno sono ancora poco compresi. In particolare, *mats* isolati da differenti aree geografiche e da ambienti molto diversi fra loro, sono spesso dominati dalla specie cosmopolita *Microcoleus chthonoplastes* (Garcia-Pichel *et al.*, 1996). Analisi di tipo molecolare hanno, tuttavia, messo in luce come in un determinato *mat* spesso siano presenti ceppi diversi di una stessa specie, apparentemente identici da un punto di vista morfologico, in grado di occupare nicchie ecologiche differenti. Un esempio di ciò è la specie *Synechococcus* cf. *lividus*, della quale sono stati identificati numerosi ceppi nell'*Octopus Spring* dello Yellowstone National Park (U.S.A.), distribuiti in base a parametri ambientali, come luce e temperatura, in un *range* spaziale inferiore ad 1-2 mm (Ward *et al.*, 1998; Kilian *et al.*, 2007).

I *mats* sono, infatti, caratterizzati dalla presenza di gradienti fisico-chimici, che presentano fluttuazioni diurne e stagionali, riguardanti diversi parametri ambientali, come la concentrazione di O₂, CO₂ e nutrienti, il pH, la temperatura e la luce. Le diverse specie di cianobatteri, e, all'interno di una stessa specie, i diversi ceppi, si distribuiscono verticalmente nel *mat* in base alle proprie esigenze (Paerl *et al.*, 2000; Kilian *et al.*, 2007). Inoltre, uno stesso ceppo è in grado di spostarsi verticalmente, seguendo le variazioni diurne e stagionali dei parametri ambientali, come è stato osservato per *Oscillatoria terebriformis* (Stal, 1995).

Quindi, all'interno delle comunità naturali di cianobatteri, i diversi ceppi possono distribuirsi diversamente sia da un punto di vista spaziale, che temporale, al variare dei parametri ambientali e, quindi, delle nicchie ecologiche.

Quando campioni di un *mat* vengono isolati dal loro ambiente e fatti crescere in laboratorio, generalmente, dopo un po' di tempo, si osserva un impoverimento della biodiversità presente nel campione originario. Questo è dovuto ad un fenomeno naturale, chiamato esclusione competitiva (Lange, 1974; Ward *et al.*, 1998; Garcia-Pichel *et al.*, 2001), per cui i ceppi più adatti alle nuove condizioni ambientali, che in coltura non riprodurranno mai perfettamente quelle dell'ambiente d'origine, soppiantano rapidamente gli altri. Tale fenomeno si manifesta anche nelle comunità naturali, in seguito a brusche variazioni dei parametri ambientali (Ward *et al.*, 1998) e, ovviamente, non avviene solo tra ceppi di cianobatteri, ma anche tra questi e altri organismi che condividono lo stesso *habitat* (Hyenstrand *et al.*, 2000).

L'arricchimento preferenzialmente spurio dei ceppi a crescita più rapida, durante la coltivazione in laboratorio di campioni di feltri composti da forme differenti di

cianobatteri, è il motivo per cui molti autori sono contrari a questo tipo di approccio per comprendere i meccanismi delle comunità cianobatteriche in natura (Ward *et al.*, 1998; Garcia-Pichel *et al.*, 2001), sebbene è indubbio il valore che ha avuto e ha tuttora la crescita di colture in laboratorio, per un'approfondita caratterizzazione dei singoli organismi. In particolare, Sumina (2006) è riuscito ad identificare e descrivere diverse strutture sovra-cellulari che i cianobatteri filamentosi sarebbero in grado di formare, disponendo in maniera particolare i propri tricomi, per far fronte a situazioni dell'ambiente circostante, come la carenza di luce o l'eccessiva perturbazione del mezzo acquoso, proprio grazie all'osservazione del comportamento di tali ceppi in coltura.

Proprio per la complessità di interazioni che i cianobatteri presentano nelle loro comunità naturali, l'allestimento di colture pure di questi organismi non si presenta sempre così semplice, dipendendo molto dal ceppo in questione e dall'ambiente d'origine in cui esso è stato isolato. Si è visto, ad esempio, che la piastratura in terreno solido BG11 di campioni di cianobatteri planctonici prelevati dal lago di Costanza (Svizzera) permetteva la crescita solamente di ceppi ricchi in ficocianina, mentre venivano persi quelli ricchi in ficoeritrina. Questi ultimi, pur non essendo azotofissatori, crescevano solamente in terreno solido BG11, ossia in un ambiente privo di azoto (Becker *et al.*, 2004). In uno studio successivo, Ernst e collaboratori (2005) hanno messo in luce come ceppi, apparentemente molto simili, di *Synechococcus*, campionati sempre da laghi prealpini, presentassero tolleranze alquanto diverse a nitrati e fosfati, tali da limitare la crescita dell'uno o dell'altro, a seconda del contenuto in tali nutrienti del mezzo di coltura.

Oltre ai nutrienti, altri fattori di cui tener conto quando si decide di allestire delle colture di cianobatteri, sono, senz'altro, temperatura, luce e pH, ma anche l'*habitus vivendi* dell'organismo in questione, ossia, ad esempio, la sua preferenza per l'adesione ad un substrato in cui il mezzo acquoso sovrastante è fermo, piuttosto che un ambiente di coltura, in cui il mezzo acquoso è in continua agitazione.

1.2 CLASSIFICAZIONE E TASSONOMIA DEI CIANOBATTERI

Per la loro capacità di effettuare la fotosintesi ossigenica, i cianobatteri furono a lungo classificati come “alghe azzurre”, o Cyanophyceae, e quindi come membri del regno Plantae. Per questo motivo l'assegnazione tassonomica di questi microrganismi si è a lungo basata solamente su caratteri morfologici e citologici (Ishida *et al.*, 1997; Premamandht *et al.*, 2006), secondo i codici botanici. Negli anni '60 si notò che i cianobatteri possedevano caratteristiche cellulari tipiche dei

procarioti. Per questo motivo, poco dopo Stanier *et al.* (1978) proposero di includere i cianobatteri nel codice batteriologico e, nel 1979, Rippka e collaboratori crearono un codice di classificazione batteriologico anche per la catalogazione di questi microrganismi. Solo successivamente, però, in seguito all'impiego da parte di Woese (1987) delle sequenze geniche del 16S rDNA per ricostruire i rapporti filogenetici tra organismi, i cianobatteri furono riconosciuti come una nuova divisione di procarioti e collocati, quindi, tra gli eubatteri.

La classificazione dei cianobatteri è stata, ed è tuttora, sottoposta a numerose revisioni e questo, assieme alla compresenza dei due diversi approcci di classificazione, quello batteriologico del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* e quello botanico adottato da Anagnostidis & Komárek (1985), rende difficoltosa la corretta assegnazione di questi organismi (Marquardt & Palinska, 2007). Si stima, ad esempio, che più del 50% dei cianobatteri in coltura nelle banche algali sia stato identificato in maniera scorretta, portando a ricostruzioni filogenetiche sbagliate (Komárek & Anagnostidis, 1989).

La principale differenza tra i due attuali sistemi di classificazione consiste nel fatto che l'approccio batteriologico si basa su informazioni genetiche e fenotipiche riguardanti cianobatteri mantenuti in colture pure (Castenholz 2001), mentre quello botanico enfatizza l'identificazione morfologica ed ecologica dei cianobatteri, così come vengono ritrovati in natura (Anagnostidis & Komárek, 1985). Entrambi questi approcci da soli, in realtà, sono limitanti per l'identificazione dei membri del *phylum* Cyanophyta. E' ormai noto, infatti, come la morfologia dei cianobatteri sia fortemente influenzata dalle condizioni ambientali (Ishida *et al.*, 1997) e, allo stesso tempo, è stato osservato che cianobatteri mantenuti a lungo in coltura possono perdere o alterare alcune loro caratteristiche morfologiche osservate in natura, come la guaina, la presenza di vescicole gassose e la forma della colonia (Garcia-Pichel *et al.*, 1996; Palinska *et al.*, 1996; Ishida *et al.*, 1997; Rajaniemi *et al.*, 2005). Tutto ciò fa sì che la morfologia da sola non sia attendibile per una corretta identificazione di questi microrganismi.

Inoltre, l'esistenza, da un lato, di numerose specie criptiche (Ward *et al.* 1990; Ward *et al.* 1990; Taton *et al.*, 2006; Marquardt & Palinska, 2007), ossia apparentemente identiche da un punto di vista morfologico, ma geneticamente distinte, e, dall'altro, di diversi morfotipi ed ecotipi di una stessa specie, con morfologie diverse, ma geneticamente vicini (Garcia-Pichel *et al.*, 1996; Palinska *et al.*, 1996; Palinska & Marquardt, 2008), rendono l'identificazione dei cianobatteri ancora più complicata.

Infine, la classificazione dei cianobatteri è ulteriormente confusa dall'esistenza di specie che sono state descritte solamente in base a caratteri morfologici, senza

alcuna informazione genetica, e, viceversa, dall'esistenza, nei *database* informatici, di sequenze geniche assegnate a specie, che però non sono state descritte morfologicamente (Komárek & Anagnostidis, 1989; Wilmotte & Herdman, 2001; Rajaniemi *et al.*, 2005).

Recentemente, l'approccio batteriologico e quello botanico stanno convergendo in un metodo di tipo polifasico, per creare una classificazione basata non solo su caratteristiche morfologiche, citologiche, ecologiche e biochimiche, ma anche genetiche (Garcia-Pichel *et al.*, 2001; Hoffmann, 2005; Hoffmann *et al.*, 2005; Komárek & Anagnostidis, 2005; Marquardt & Palinska 2007, Palinska & Marquardt, 2008).

Come riferimento, durante questa tesi di Dottorato è stato seguito il codice di classificazione recentemente proposto da Komárek & Anagnostidis (2005). Secondo tale sistema di classificazione, il *phylum* Cyanophyta risulta costituito dall'unica classe Cyanophyceae e suddiviso in quattro ordini: Chroococcales, Oscillatoriales, Stigonematales e Nostocales (Anagnostidis & Komárek, 1985; Komárek & Anagnostidis, 1986; Anagnostidis & Komárek, 1988; Komárek & Anagnostidis, 1989; Anagnostidis & Komárek, 1990). L'ordine Chroococcales comprende tutte le forme coccoidi, sia a vita solitaria sia tenute insieme da materiale polisaccaridico a formare aggregazioni, definite colonie. L'ordine Oscillatoriales è rappresentato da specie filamentose, con filamenti uniseriati e non in grado di formare eterocisti. Infine, i restanti due ordini sono costituiti da specie in grado di formare eterocisti, con la differenza che nei membri dell'ordine Nostocales i filamenti sono uniseriati; mentre in quelli dell'ordine Stigonematales i filamenti possono presentare ramificazioni.

1.2.1 L'ordine Oscillatoriales

L'ordine Oscillatoriales fu creato da Anagnostidis e Komárek nel 1988, riunendo sotto tale denominazione forme di cianobatteri filamentosi, prive di vere ramificazioni e della capacità di formare eterocisti e acineti.

Tuttavia, l'eterogeneità e la natura polifiletica della maggior parte delle famiglie e dei generi appartenenti a tale ordine, dovuta alla tradizionale classificazione basata solo su caratteri morfologici, è stata più volte messa in luce successivamente, anche grazie all'applicazione di nuovi metodi molecolari (Ishida *et al.*, 1997; Casamatta *et al.* 2005; Komárek & Anagnostidis, 2005; Teneva *et al.*, 2005; Premanandh *et al.*, 2006; Marquardt & Palinska, 2007; Palinska & Marquardt, 2008).

Un esempio di ciò, è rappresentato dall'originaria famiglia delle Oscillatoriaee. I criteri tradizionalmente seguiti per la classificazione di generi in tale gruppo consistevano, infatti, principalmente nell'aspetto delle guaine e nella formazione

di colonie, piuttosto che sulle caratteristiche cellulari e molecolari. Questo lasciava considerevole libertà ad interpretazioni ed errori e apriva la possibilità al fatto che alcune specie potessero essere state descritte separatamente come appartenenti a più di un genere.

Negli ultimi anni, Komárek & Anagnostidis (2005) hanno sottoposto a revisione l'ordine Oscillatoriales, utilizzando sia dati morfologici ed ecologici, che evidenze di tipo molecolare, e il lavoro è tuttora in corso d'opera. Da un punto di vista morfologico, il sistema di classificazione di Komárek & Anagnostidis (2005) utilizza nuovi criteri di discriminazione, come le proporzioni cellulari e i *pattern* di divisione, la presenza di vescicole gassose (aerotopi), l'arrangiamento dei tilacoidi nel citoplasma, la motilità e il meccanismo di frammentazione dei tricomi. Allo stesso tempo è, invece, sminuita l'enfasi sull'aspetto delle guaine, presente nei primi sistemi di classificazione. In base a ciò, le varie famiglie dell'ordine, come quella delle Oscillatoriaceae, sono state riesaminate, con la riassegnazione di numerose specie in gruppi diversi.

Restano, però, da sistemare e rivedere numerosi generi problematici, appartenenti al *taxon* in questione. Tra questi c'è senz'altro il genere *Microcoleus* (Desmazières, 1823), sotto la cui denominazione sono stati, in origine, compresi cianobatteri filamentosi, non-eterocistici, in grado di costituire matasse di filamenti uniti da una comune guaina gelatinosa (Castenholz *et al.*, 2001; Anagnostidis & Komárek, 1988; Komárek & Anagnostidis, 2005). Un problema per la classificazione dei membri appartenenti a questo genere, è il fatto che essi presentano tricomi la cui morfologia può corrispondere a quella di altri generi differenti dell'ordine Oscillatoriales. Inoltre, nelle condizioni di coltura in laboratorio, la capacità di formare guaine può essere alterata o persa, come dimostrato per *Microcoleus chthonoplastes* (Garcia-Pichel *et al.*, 1996), con l'impossibilità di identificare correttamente i membri di questo genere, basandosi solo sull'aspetto morfologico. Di recente, Siegesmund e collaboratori (2008) hanno sottoposto ad analisi morfologiche e genetiche numerosi membri del genere *Microcoleus*, proponendo di trasferire di molti di essi al nuovo genere *Coleofasciculus*.

Oscillatoria è un altro esempio di genere alquanto complesso, nel quale sono state incluse numerose forme costituite da tricomi cilindrici, dritti o leggermente curvati, generalmente privi di guaina, costituiti da cellule solitamente più corte che larghe. Attualmente, molte delle forme precedentemente incluse in questo *taxon* sono state riassegnate sotto altri generi e, allo stesso tempo, specie precedentemente ascritte ad altri generi (come *Lynghya* e *Phormidium*) sono state riattribuite al genere *Oscillatoria* (Ishida *et al.*, 1997; Komárek & Anagnostidis, 2005).

Un genere sottoposto a riesame è, pure, *Lyngbya*, sotto la cui denominazione sono stati raggruppati ceppi di cianobatteri costituiti da tricomi cilindrici, generalmente dritti, con cellule discoidali e guaine mucillaginose obbligatoriamente presenti, spesso protrudenti il tricoma. L'identificazione dei membri appartenenti al genere *Lyngbya* è spesso complicata dall'elevata variabilità delle specie al variare delle condizioni ambientali, con numerosi morfo- ed ecotipi di una stessa specie (Komárek & Anagnostidis, 2005).

Infine, il gruppo probabilmente più complesso da un punto di vista tassonomico è senz'altro il genere *Phormidium* (Kützinger, 1843). Originariamente, i membri attribuiti a tale *taxon* erano caratterizzati da guaine sottili, ialine, mucillaginose, obbligatorie o facoltative, determinanti, quando presenti, la stretta aggregazione dei filamenti a costituire fitti intrecci, detti "feltri". Tale genere risultò fin da subito eterogeneo, includendo un ampio numero di specie, d'acqua dolce e marine, che differivano per le dimensioni cellulari, le proporzioni dei tricomi, la morfologia della cellula apicale e il grado di costrizione, lungo i filamenti, a livello dei setti parietali.

Nella classificazione proposta da Komárek & Anagnostidis (2005) sotto il nome di *Phormidium* sono comprese forme costituite da filamenti cilindrici, variamente curvati, con guaine facoltative o obbligatorie. Le cellule che compongono i tricomi sono solitamente isodiametriche, ma alcune forme possono presentare cellule discoidali, mentre altre sono caratterizzate da cellule più lunghe che larghe. Inoltre, anche questo *taxon* può presentare numerosi morfotipi di una stessa specie.

Proprio a causa dell'elevata eterogeneità che lo contraddistingue, al fine di facilitarne l'identificazione, Komárek & Anagnostidis (2005) hanno ulteriormente suddiviso il genere *Phormidium* in otto sottogruppi, non-tassonomici, ma filogeneticamente distinti, basandosi principalmente sulla morfologia delle estremità apicali dei tricomi. L'intero *taxon* è, evidentemente, in discussione. Gli stessi autori ritengono che esso debba essere riesaminato e che tale denominazione dovrà essere mantenuta probabilmente solo per i membri del gruppo VIII, di cui fa parte l'attuale specie-tipo *Phormidium irriguum* (Komárek & Anagnostidis, 2005; Teneva *et al.*, 2005; Premanandh *et al.*, 2006; Marquardt & Palinska, 2007; Komárek, 2008-comunicazione personale).

Concludendo, pur essendo ancora in fase di revisione, il nuovo sistema di classificazione proposto da Komárek & Anagnostidis (2005), utilizzando un approccio di tipo polifasico, costituisce al presente il sistema di classificazione più completo e aggiornato dell'eterogeneo ordine Oscillatoriales. In base ad esso, tale ordine risulta suddiviso in sei famiglie (Oscillatoriaceae, Phormidiaceae,

Gomontelliaceae, Schizotricaceae, Pseudoanabaenaceae e Borziaceae), le cui principali caratteristiche fenotipiche sono riassunte in tabella 1.

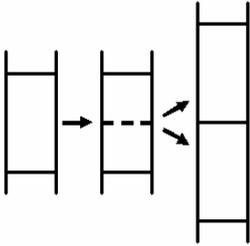
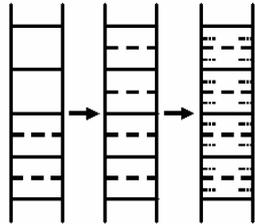
	Pse	Sch	Bor	Pho	Go	Osc
ampiezza dei tricomi (μm)	0,5-3(6)	0,8-3	(2)3-8(10)	(2)4-14(18)	(3)6-28	6-35(80)
posizione dei tilacoidi	parietale		\pm radiale		irregolare (o \pm radiale?)	
necridi	- o +	- o +(?)	-	+	+	+
<i>pattern</i> di divisione cellulare						
guaina (nr dei tricomi per guaina)	- o + (1)	+	+	- o + (1 o pochi)	-	- o + (1 o pochi)

Tabella 1: principali caratteristiche fenotipiche delle sei famiglie dell'ordine Oscillatoriales (modificata da Komárek & Anagnostidis, 2005).

Pse=Pseudoanabaenaceae, Sch=Schizotricaceae, Bor=Borziaceae, Pho=Phormidiaceae, Gom=Gomontelliaceae, Osc=Oscillatoriaceae, +=presente, -=assente.

1.2.2 *Marker* molecolari utilizzati per identificare i cianobatteri

Al di là del sistema di classificazione adottato per i cianobatteri, una problematica spesso riscontrata nell'identificazione di nuove forme è legata alla loro natura procariotica e alla congiunta difficoltà di stabilire un concetto univoco di specie, che comprenda anche i procarioti (Ward, 1998; Komárek, 2003; Castenholz & Norris, 2005).

E' stata proposta, fra le tante, una definizione di specie per i procarioti, basata sul grado di ibridazione DNA:DNA, che viene misurato come la percentuale relativa di legame (RBR, Relative Binding Ratio) tra le molecole di DNA di due organismi e/o la differenza nella temperatura a cui si ha la denaturazione del 50% tra DNA eteroduplex e DNA omoduplex di due organismi (ΔT_m) (Rosselló-Mora & Amann, 2001). I genomi di due ceppi devono condividere una RBR superiore a

70% o una ΔT_m inferiore a 5°C per essere considerati membri di una stessa specie (Wayne *et al.*, 1987).

Questo concetto di specie è stato criticato come arbitrario, sottostimante la biodiversità e non applicabile universalmente a tutti gli organismi. Inoltre, richiedendo le analisi molto tempo, tale approccio è stato finora applicato solo ad un limitato numero di cianobatteri (Rosselló-Mora & Amann, 2001).

Per questo motivo, allo scopo di ricostruire le relazioni evolutive fra determinati organismi e identificarne di nuovi, sta assumendo sempre più importanza a livello dei procarioti, cianobatteri compresi, l'amplificazione di determinate porzioni del genoma (Neilan *et al.*, 1995; Garcia-Pichel *et al.*, 1996; Orcutt *et al.*, 2002; Taton *et al.*, 2003; Premanandh *et al.*, 2006).

Tra i *marker* molecolari più ampiamente diffusi, in virtù della loro presenza universale fra i viventi (Premanandh *et al.*, 2006), ci sono senz'altro gli operoni per gli rRNA. In particolare, il primo e più comune *locus* utilizzato per la filogenesi e l'identificazione dei cianobatteri è il 16S rDNA (Neilan *et al.*, 1997; Crosbie *et al.*, 2003; Casamatta *et al.*, 2005; Marquardt & Palinska, 2007), con la conseguente elevata disponibilità di sequenze per tale gene nei *database* informatici. Comparando i valori di riassociazione DNA:DNA e le identità del gene 16S rDNA, Stackebrandt & Goebel (1994) hanno trovato che, pur con eccezioni, molto spesso ceppi batterici con un'identità inferiore al 97-97,5% tra le sequenze del gene 16S rDNA appartengono a specie diverse. La soglia del 97,5% di identità fra le sequenze del 16S rDNA è stata, quindi, adottata come valore discriminante per individuare specie diverse di cianobatteri, in numerosi lavori (Casamatta *et al.*, 2005, Rajaniemi *et al.*, 2005; Palinska & Marquardt, 2008). Altri autori individuano, inoltre, nel 95% di identità fra le sequenze del 16S rDNA la soglia per discriminare cianobatteri appartenenti allo stesso genere (Rosselló-Mora & Amann, 2001).

Tuttavia, l'elevata conservazione della sequenza del 16S rDNA lo rende un *marker* meno efficiente di altri per l'identificazione dei cianobatteri ai livelli subgenerici di specie e ceppo. Per ovviare a ciò, è stata spesso impiegata anche la sequenza più variabile del 16S-23S ITS, ossia dello spaziatore intergenico trascritto localizzato tra i geni 16S rDNA e 23S rDNA. Contenendo al suo interno geni che codificano per tRNA diversi per tipo, numero e lunghezza, esso è, infatti, considerato uno strumento utile a discriminare in maniera più sottile cianobatteri strettamente vicini da un punto di vista evolutivo (Iteaman *et al.*, 2000; Premanandh *et al.*, 2006). Un limite legato all'utilizzo dei due tipi di *marker* sopra riportati (16S rDNA e 16SS-23S ITS), di cui bisogna tener conto quando vengono utilizzati per ricostruzioni filogenetiche, è l'esistenza di operoni multipli per i geni dell'rRNA all'interno del genoma dei procarioti, cianobatteri compresi (Boyer *et al.*, 2001).

Recentemente, alcuni autori hanno proposto nuovi *marker* molecolari per l'identificazione e la filogenesi dei cianobatteri, scegliendoli fra sequenze geniche codificanti per proteine fondamentali alla funzionalità della cellula cianobatterica e, quindi, presenti in maniera ubiquitaria in questo gruppo di microrganismi. Fra le condizioni essenziali che i nuovi *loci* proposti soddisfano ci sono il fatto di essere presenti in copia singola nei genomi cianobatterici e di essere meno conservati rispetto ai geni per gli rRNA, risultando, quindi, potenzialmente più validi per discriminare i microrganismi a livello di genere, specie e ceppo.

Tra i nuovi *marker* molecolari proposti per la filogenesi dei cianobatteri, nell'ultimo decennio, è stata molto usata la sequenza di *rpoC1*, uno dei due geni codificanti per la subunità γ del *core* dell'RNA polimerasi. Infatti, a differenza degli altri eubatteri, il cui *core* dell'RNA polimerasi è costituito da due subunità α , una β e una β' , nei cianobatteri esso è un complesso $\alpha_2\beta\beta'\gamma$, dove la subunità γ corrisponde alla porzione amino-terminale della subunità β' degli eubatteri (Bergsland & Haselkorn, 1991; Seo & Yokota, 2003). Oltre ad essere presente in copia singola, si ritiene che il gene *rpoC1* permetta una maggior discriminazione rispetto al 16S rDNA a livello di genere e specie. In particolare, quando i nucleotidi in terza posizione nei codoni sono eliminati dal *dataset*, gli alberi filogenetici ottenuti con il gene *rpoC1* e quelli ottenuti con il 16S rDNA hanno una buona corrispondenza fra loro; quando, invece, i nucleotidi in terza posizione sono inclusi nel *dataset*, il gene *rpoC1* mostra una maggior divergenza tra ceppi di cianobatteri strettamente imparentati, ma distinti fra loro (Toledo & Palenik, 1997; Fergusson & Saint, 2000, Wilson *et al.*, 2000).

Un'altra sequenza nucleotidica sempre più utilizzata nell'identificazione dei procarioti è il *locus gyrB*. Tale gene codifica per la subunità B della DNA girasi, una topoisomerasi di tipo II trovata nei batteri, la cui funzione è quella di introdurre superavvolgimenti negativi in una molecola di DNA circolare, chiusa e rilassata. Per le sequenze sia nucleotidiche che aminoacidiche di questo *locus* è stata, di recente, costruita una banca dati disponibile *online* (ICB database, <http://www.mbio.co.jp/icb>), contenente le sequenze del gene *gyrB* di più di 850 ceppi di batteri (Watanabe *et al.*, 2001). La sua presenza ubiquitaria in tutti i ceppi batterici, il fatto di essere a copia singola e il limitato trasferimento genico orizzontale a cui è sottoposto questo *locus* lo rendono potenzialmente un ottimo strumento per le ricostruzioni filogenetiche (Yamamoto & Harayama, 1995; Seo & Yokota, 2003).

Altro *marker* recentemente proposto per la caratterizzazione dei cianobatteri è, poi, una porzione dell'operone per la ficocianina, *cpcB-IGS-cpcA*, che comprende l'ultimo tratto del gene che codifica per la subunità β della ficocianina, la prima porzione del gene codificante per la subunità α della ficocianina e lo spaziatore

intergenico tra i due (che contiene tre peptidi *linker*). Il fatto che il *cpcB-IGS-cpcA* sia un *marker* specifico dei cianobatteri e la percentuale di sostituzione nucleotidica più elevata di tale *locus* rispetto a quella della sequenza del 16S rDNA lo rendono uno strumento utile a discriminare tra organismi strettamente imparentati. In particolare, le porzioni codificanti, *cpcB* e *cpcA*, sono utili a discriminare a livello di genere; mentre l'*IGS*, altamente variabile sia per lunghezza che per sequenza, permette una discriminazione più sottile, a livello di specie e ceppo. Per questi motivi, *cpcB-IGS-cpcA*, pur avendo il limite di essere soggetto a fenomeni di ricombinazione genica (Young, 2001; Manen & Falquet, 2002), è un *marker* molecolare sempre più usato per condurre analisi filogenetiche sui cianobatteri (Crosbie *et al.*, 2003; Teneva *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Premanandh *et al.*, 2006; Ballot *et al.*, 2008).

Infine, Tomitani e collaboratori (2006) hanno recentemente impiegato per la filogenesi dei cianobatteri un *locus* già ampiamente utilizzato per le ricostruzioni filogenetiche di organismi fotosintetici eucarioti, ossia il gene *rbcL*. Tale gene codifica per la subunità grande dell'enzima RuBiSCO (Ribulosio 1-5' Bisfosfato Carbossilasi/Ossigenasi), la cui funzione è la fissazione organica dell'anidride carbonica durante il ciclo di Calvin.

1.3 AMBIENTI ESTREMI

La definizione di “ambiente estremo” è spesso legata ad una visione antropocentrica del mondo, considerando comunemente come estremi quegli ambienti in cui l'uomo non riuscirebbe a sopravvivere.

In realtà, ambienti ritenuti estremi per l'uomo ed altri organismi, possono costituire invece la normalità per alcuni e viceversa. Così, un organismo termofilo troverebbe estreme temperature vicine ai 20°C, mentre per un organismo piezofilo la pressione atmosferica rappresenta una condizione di vita estrema.

Rothschild & Mancinelli (2001) hanno provato a dare una definizione più oggettiva di ambiente estremo, partendo dalla considerazione che le condizioni chimico-fisiche di un determinato ambiente sono rappresentate da un *continuum* di valori. Tenendo conto di ciò, si può definire estremo un ambiente in cui determinate condizioni chimiche o fisiche si trovano alle estremità del *range* di valori possibili, consentendo la vita solo a determinati organismi.

Organismi che vivono in un ambiente estremo sono definiti “estremofili”, quelli che vivono in più di un ambiente estremo sono detti “poliestremofili”.

Un esempio di poliestremofilo è *Sulfolobus acidocaldarius*, un Archaea in grado di vivere a pH 3 e a temperature di 80°C.

Condizioni ambientali estreme possono comprendere parametri di tipo fisico (es. temperatura, irraggiamento, pressione) o di tipo geochimico (es. disseccamento, salinità, pH). A seconda del tipo di parametro considerato, gli organismi estremofili si possono definire: termofili e psicrofili (adattati alle alte e alle basse temperature, rispettivamente); acidofili e alcalofili (adattati a valori di pH bassi e alti, rispettivamente); piezofili (adattati ad estremi di pressione); xerofili (adattati a condizioni di disseccamento) e alofili (adattati ad elevate salinità) (Rothschild & Mancinelli, 2001). La tabella riportata in figura E, tratta dalla *review* di Rothschild & Mancinelli (2001), riporta la classificazione degli organismi estremofili, assieme ad alcuni esempi.

Table 1 Classification and examples of extremophiles			
Environmental parameter	Type	Definition	Examples
Temperature	Hyperthermophile	Growth >80 °C	<i>Pyrolobus fumarii</i> , 113 °C
	Thermophile	Growth 60–80 °C	<i>Synechococcus lividus</i>
	Mesophile	15–60 °C	<i>Homo sapiens</i>
	Psychrophile	<15 °C	<i>Psychrobacter</i> , some insects
Radiation			<i>Deinococcus radiodurans</i>
Pressure	Barophile	Weight-loving	Unknown
	Piezophile	Pressure-loving	For microbe, 130 MPa
Gravity	Hypergravity	>1g	None known
	Hypogravity	<1g	None known
Vacuum		Tolerates vacuum (space devoid of matter)	Tardigrades, insects, microbes, seeds
Desiccation	Xerophiles	Anhydrobiotic	<i>Artemia salina</i> ; nematodes, microbes, fungi, lichens
Salinity	Halophile	Salt-loving (2–5 M NaCl)	Halobacteriaceae, <i>Dunaliella salina</i>
pH	Alkaliphile	pH > 9	<i>Natronobacterium</i> , <i>Bacillus firmus</i> OF4, <i>Spirulina</i> spp. (all pH 10.5)
	Acidophile	low pH-loving	<i>Cyanidium caldarium</i> , <i>Ferroplasma</i> sp. (both pH 0)
Oxygen tension	Anaerobe	Cannot tolerate O ₂	<i>Methanococcus jannaschii</i>
	Microaerophile	Tolerates some O ₂	<i>Clostridium</i>
	Aerobe	Requires O ₂	<i>H. sapiens</i>
Chemical extremes	Gases		<i>C. caldarium</i> (pure CO ₂)
	Metals	Can tolerate high concentrations of metal (metalotolerant)	<i>Ferroplasma acidarmanus</i> (Cu, As, Cd, Zn); <i>Ralstonia</i> sp. CH34 (Zn, Co, Cd, Hg, Pb)

Fig. E: classificazione degli organismi estremofili (da Rothschild & Mancinelli, 2001).

I valori-soglia per considerare un organismo estremo rispetto ad un dato parametro ambientale sono spesso controversi. Inoltre, molto spesso, organismi trovati in ambienti estremi non sono veri estremofili (*extremus* (latino) + *philos* (greco)= “amanti dell’estremo”), ma riescono lo stesso a sopravvivere in determinate condizioni, presentando adattamenti che permettono loro di

tollerarle. Si parla allora di “termofili” e “termotolleranti”, “psicrofili” e “psicrotolleranti”, etc.

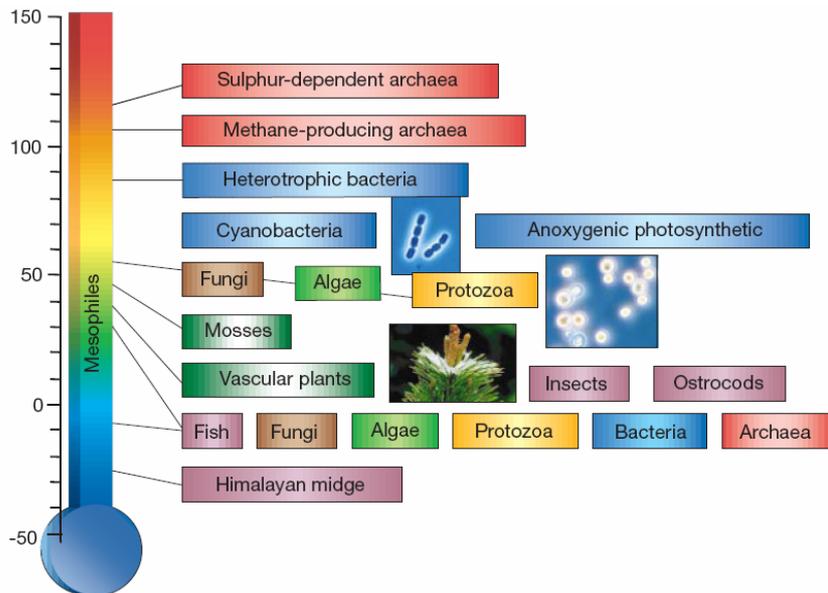


Fig. F: limiti di temperatura per le forme viventi. Per ogni *taxon* sono rappresentate le temperature massime e minime a cui gli organismi riescono a vivere. In rosso sono evidenziati gli Archea, in azzurro gli Eubacteria, in verde chiaro le alghe, in marrone i funghi, in arancio i protozoi, in verde scuro le piante e in violetto gli animali (da Rothschild & Mancinelli, 2001).

Mentre gli organismi psicrofili, acidofili, alcalofili, piezofili, xerofili e alofili sono distribuiti fra i tre domini dei viventi (Archaea, Eubacteria, Eukarya), per quanto riguarda gli organismi termofili, quelli finora isolati sembrano appartenere solo agli Archaea e agli Eubacteria (fig. F).

Per le loro caratteristiche metaboliche e fisiologiche, i cianobatteri sono organismi spesso presenti in diversi ambienti considerati estremi (Paerl *et al.*, 2000), tra cui l'ambiente termale.

1.3.1 L'ambiente termale

Con il nome di ambiente termale si intendono sia le sorgenti termali sia le pozze d'acqua fortemente irraggiate dal sole, che spesso presentano anche elevate salinità. Ambienti di questo tipo si trovano in tutti i continenti, eccetto l'Antartide, e sono particolarmente concentrati in alcune aree geografiche, come l'America settentrionale, la Nuova Zelanda, il Giappone, l'Islanda, l'Italia, la Grecia e la Turchia (Waring, 1965; Castenholz, 1969).

La maggior parte degli ambienti termali è caratterizzata dalla presenza di acqua, con temperature che possono superare i 45-50°C, e la fonte di calore ha solitamente origine da fenomeni di tipo geotermico. Molto spesso, inoltre, essi sono caratterizzati da un elevato irraggiamento solare che può innalzare ulteriormente le temperature e, in determinate condizioni, causare il surriscaldamento di materiale organico (termogenesi), portando in zone localizzate a temperature vicine al punto di fusione (Castenholz, 1969).

Ad ogni modo, mentre alcuni ambienti termali presentano una temperatura relativamente costante durante l'anno, altri mostrano variazioni anche notevoli delle temperature durante il corso dell'anno e a seconda dell'ora del giorno.

Sembra che la composizione chimica dell'acqua della maggior parte degli ambienti termali sia costante. Tuttavia, la concentrazione di ciascun soluto presenta notevoli variazioni fra i diversi ambienti, anche a livello locale, e può variare in base alle stagioni (ad esempio, a causa delle precipitazioni). In particolare, le pozze termali che si sono originate, di recente, ad opera di acque meteoriche e che presentano temperature relativamente più basse (<80°C) hanno concentrazioni saline più basse (200-400 mg/litro). Le sorgenti termali, che invece si sono originate per fenomeni geotermici e/o vulcanici mostrano salinità più elevate (>20'000 mg/litro). La concentrazione dei composti organici è generalmente sempre molto bassa (Castenholz, 1969).

Fra gli organismi di cui è stata segnalata la presenza negli ambienti termali ci sono numerosi tipi di batteri, microalghe (tra cui diatomee), funghi e animali (es. ciliati, rotiferi, ostracodi, etc.). Escludendo alcuni ceppi di batteri e di funghi, la maggior parte di questi organismi riesce a vivere solamente in ambienti termali le cui acque presentano pH maggiori o uguali a 6.

Non fanno eccezione a ciò i cianobatteri, organismi frequenti in ambienti termali di diversa collocazione geografica proprio per le già accennate capacità di adattarsi a condizioni estreme di temperatura, luce e salinità. Essi, generalmente, costituiscono cospicui *mats* (o feltri) sul substrato e sono interamente sommersi dall'acqua termale. Come già descritto, la formazione di gradienti fisico-chimici (luce, temperatura, salinità, nutrienti, O₂, etc.) determina la creazione di distinte zonazioni verticali dei diversi ceppi cianobatterici, all'interno del *mat*.

Nell'ambiente termale, inoltre, i cianobatteri si ritrovano in stretta associazione con batteri eterotrofi, contenenti carotenoidi, che costituiscono chiazze arancioni o rosate, di consistenza gelatinosa, talvolta di qualche centimetro di spessore (Castenholz, 1969).

Gli studi finora effettuati sui cianobatteri in alcuni ambienti termali hanno rilevato una biodiversità abbastanza contenuta e ridotta ad una decina di specie appartenenti più comunemente ai generi *Synechococcus*, *Mastigocladus* e *Phormidium*

(Castenholz, 1968; Castenholz, 1973; Anagnostidis & Komárek, 1988; Miller e Castenholz 2000; Hindák, 2001; Papke *et al.*, 2003). La maggior parte dei cianobatteri ritrovati sembra tollerare temperature di 50-60°C (Edwards *et al.*, 1997; Balme *et al.*, 2001), arrivando nel caso unico di *Synechococcus lividus* all'estremo di 73°C, la più alta temperatura sopportata da un organismo fotoautotrofo (Edwards *et al.*, 1997).

1.3.2 L'ambiente del Comprensorio termale Euganeo (Padova, Italia)

Il Comprensorio termale Euganeo è rappresentato da numerosi stabilimenti termali, dislocati nei comuni di Abano, Montegrotto, Galzignano e Battaglia Terme (Padova, Italia) (fig. G) e le proprietà benefiche e curative dei fanghi e delle acque termali di tale distretto, note sin dal tempo dei romani (Messina, 1981), sono ancor oggi ampiamente utilizzate (quasi 4 milioni di presenze annue, fonte APT Terme Euganee).

In passato si credeva che il termalismo del Comprensorio Euganeo fosse correlato alla natura vulcanica delle rocce che costituiscono i Colli Euganei, ma studi successivi (Piccoli *et al.*, 1981) hanno dimostrato che esso è dovuto ad un semplice fenomeno di riscaldamento (superiore ai 200°C) di natura geotermica di acque meteoriche che scorrono molto lentamente in profondità (3000-4000 metri).

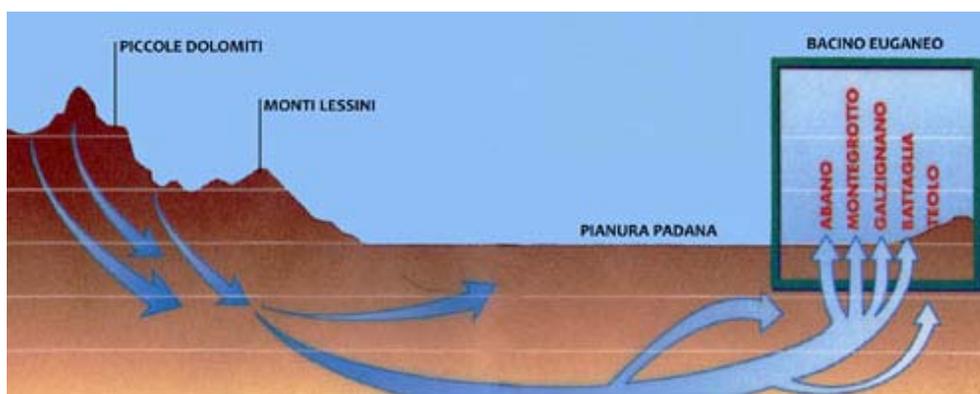


Fig. G: schema raffigurante il percorso dell'acqua termale dalle prealpi venete al distretto Euganeo (da <http://www.abanomontegrottositi.it/content.asp?L=3&IdMen=168>).

L'acqua termale, di tipo salso-bromo-iodico, viene utilizzata nella balneoterapia, nelle terapie inalatorie e nella “maturazione” del fango termale. Tale processo consiste nel lasciar “riposare” l'argilla blu (un silicato di alluminio), estratta dai

laghetti termali di Arquà e di Lospida, in apposite vasche per un periodo non inferiore a 60 giorni. Durante questo periodo, il fango viene costantemente irrorato con acqua termale a 40-50°C che ne modifica le caratteristiche chimico-fisiche (es. plasticità, viscosità, ecc.) e favorisce lo sviluppo di una complessa comunità di microrganismi autotrofi, mixotrofi ed eterotrofi (Galzigna *et al.*, 1998). Fra questi, quelli più rappresentativi, sia per ampiezza di colonizzazione sia per biomassa prodotta, sono cianobatteri (Andreoli & Rascio, 1975; Tolomio *et al.*, 2004), che colonizzano soprattutto la superficie dei fanghi formando caratteristici “feltri” di color verde-azzurro (fig. H).



Fig. H: vasca di maturazione del fango termale colonizzata da feltri di cianobatteri.

L'ambiente delle vasche degli stabilimenti termali è sottoposto a notevoli variazioni soprattutto per quanto riguarda due parametri ambientali: la temperatura e la luce. Infatti, come già accennato, nelle vasche in cui il fango è sottoposto a maturazione la temperatura raggiunge valori di 40-50°C, mentre nelle vasche in cui il fango è lasciato a riposo la temperatura può scendere anche sotto i 30°C. Per quanto riguarda la luce, invece, la fonte di illuminazione è rappresentata dalla luce solare. Per questo motivo l'irraggiamento della superficie dei fanghi è strettamente correlato alle condizioni meteorologiche. Inoltre, le vasche sono, spesso, fornite di tettoie e questo fa sì che la quantità di luce che arriva ad una determinata zona della superficie dei fanghi, vari durante il giorno al variare dell'inclinazione dei raggi solari che la raggiungono.

A proposito delle forme di cianobatteri che colonizzano i fanghi del Comprensorio termale Euganeo, un monitoraggio condotto nel nostro laboratorio, tra il 2005 e il 2006, su 83 Hotel ha messo in luce l'elevata

biodiversità di tale ambiente. Tale analisi ha riportato, infatti, la presenza di 12 *taxa*, dei quali 5 (*Cyanobacterium aponinum* ETS-03, *Leptolyngbya* sp. ETS-04, *Oscillatoria duplisecta* ETS-06, *Phormidium* sp. ETS-05, *Spirulina* spp.) sono stati caratterizzati a livello morfologico, ultrastrutturale e molecolare (Moro *et al.*, 2004, 2005, 2007); 3 sono stati rilevati mediante la tecnica DGGE (*Lyngbya* sp.; *Oscillatoria* sp. (cf. *Oscillatoria princeps*); *Spirulina* sp. (cf. *Spirulina labyrinthiformis*)) e 6 sono stati evidenziati al solo microscopio ottico (*Chroococcus* sp.; *Hormosilla* sp.; *Nostoc* sp., *Pseudoanabaena* sp., *Synechococcus* sp. e *Merismopedia* sp.) (Marcon, 2004-2005; Cara, 2005-2006; Gasparini, 2006-2007). Nuove indagini sono, tuttora in corso, al fine di isolare e caratterizzare altri ceppi di cianobatteri da tale ambiente, la cui biodiversità è ancora sottostimata.

Oltre all'identificazione e descrizione di nuove specie di cianobatteri campionati dal Comprensorio Euganeo, il nostro laboratorio sta attualmente conducendo indagini al fine di caratterizzare le sostanze prodotte da questi organismi. I cianobatteri finora isolati dai fanghi del distretto euganeo sono risultati, infatti, in grado di produrre diversi tipi di composti bioattivi che, come rilevato per *Phormidium* sp. ETS-05 (Oscillatoriales), un cianobatterio recentemente descritto da Ceschi Berrini *et al.* (2004), sembrano essere alla base delle caratteristiche capacità terapeutiche dei fanghi termali (Lalli *et al.*, 2004). In particolare, la frazione più importante dei principi attivi prodotti dal ceppo ETS-05 sarebbe rappresentata da sulfoglicolipidi contenenti acidi grassi polinsaturi, i quali vengono assorbiti dal paziente attraverso la pelle durante i trattamenti di fangoterapia (Galzigna *et al.*, 1995; Galzigna *et al.*, 1996; Galzigna *et al.*, 1998). Tali composti, presentando elevate proprietà antinfiammatorie, sono importanti nei trattamenti delle affezioni osteo-articolari e delle alterazioni della pelle.

1.4 ADATTAMENTI DEI CIANOBATTERI ALL'AMBIENTE

Per riuscire a vivere in diversi tipi di ambiente e per far fronte a variazioni di uno stesso habitat in cui si trovano, i cianobatteri hanno evoluto numerosi tipi di adattamenti morfologici, biochimici, fisiologici e, in un certo senso, etologici.

In quanto organismi fotoautotrofi, la maggior parte degli adattamenti da essi sviluppati sono volti a preservare l'integrità e la funzionalità degli enzimi della catena fotosintetica di trasporto degli elettroni, che risultano tra le strutture più sensibili alle variazioni ambientali. In particolare, il complesso evolvente ossigeno del PSII è fra le prime strutture a risentire di vari tipi di stress (Gombos *et al.*, 1994; Allakhverdiev *et al.*, 2001).

Vista la gran quantità di meccanismi e strategie adattative messe in atto dai cianobatteri, di seguito ne vengono riportati solo alcuni esempi.

Spesso una determinata struttura in un organismo presenta molteplici funzioni. Un esempio molto calzante di ciò è rappresentato senz'altro dalle guaine polisaccaridiche prodotte da numerosi ceppi cianobatterici in risposta a differenti fattori ambientali (De Philippis & Vincenzini, 1998) (fig. I).

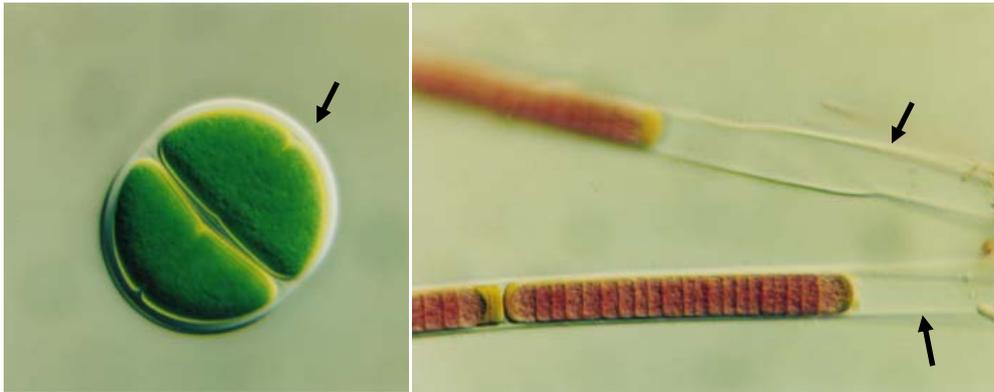


Fig. I: immagine di *Chroococcus* sp. (a sinistra) e *Phormidium* sp. (a destra), in cui sono ben evidenti le guaine polisaccaridiche (indicate dalle frecce) (da De Philippis e Vincenzini, 1998).

Queste guaine sono tipiche, ad esempio, dei cianobatteri che vivono in ambienti fortemente esposti al sole, come i suoli desertici e l'ambiente Antartico, dove tali microrganismi sono sottoposti a stress legati all'intenso irraggiamento e/o alla carenza d'acqua (disseccamento) (De Philippis & Vincenzini, 1998; Tamaru *et al.*, 2005). Esse, non solo fungono da barriera fisica contro gli agenti esterni (adattamento di tipo morfologico) e da serbatoio di varie molecole (adattamento biochimico e fisiologico), ma, per la loro struttura e composizione chimica, sono in grado di assorbire rapidamente l'acqua, quando questa torna ad essere presente dopo una condizione di disseccamento. In altri ceppi cianobatterici sembra, inoltre, che le guaine polisaccaridiche abbiano un importante ruolo nel preservare le cellule anche dai danni provocati dal congelamento (Tamaru *et al.*, 2005).

Oltre a ciò, le guaine costituiscono un adattamento di tipo biochimico anche in quanto, in molti cianobatteri esposti ad elevate intensità luminose, risultano contenere particolari tipi di pigmenti. Uno di questi è la scitonemina, un pigmento liposolubile di colore giallo-bruno, esclusivo solo di poche specie. Questa molecola ha un massimo di assorbimento a 386 nm e sembra fungere da filtro contro i raggi ultravioletti (UV) (Hoiczuk & Hansel, 2000; Singh *et al.*, 2002). Molecole spesso presenti nelle guaine di cianobatteri esposti a forte irraggiamento sono, poi, la micosporina e altri aminoacidi simili (*mycosporine-like*

aminoacids, MLAAs), con massimi di assorbimento tra 310 e 360 nm e sempre con funzione di filtro UV (Garcia-Pichel *et al.*, 1993; Garcia-Pichel *et al.*, 1996; Quesada & Vincet, 1997; Hoiczuk & Hansel, 2000).

Le guaine polisaccaridiche sono legate, poi, ad altri adattamenti di tipo fisiologico, come la capacità di fissare l'azoto e la dissipazione dell'energia in eccesso. Sembra, infatti, che esse, oltre a fungere da barriera contro l'ossigeno molecolare, siano dei chelanti per ferro e calcio, tutti fattori essenziali per la fissazione dell'azoto (Reddy *et al.*, 1996; De Philippis & Vincenzini, 1998). I polisaccaridi che compongono le guaine servono, poi, come magazzino per il carbonio organico fissato in eccesso, in caso di uno sbilanciamento nel metabolismo di carbonio e azoto (Otero & Vincenzini, 2003; Otero & Vincenzini, 2004).

Infine, gli EPS, in generale, sono molto importanti per una strategia comportamentale attuata da alcuni cianobatteri come difesa contro organismi predatori. In presenza di ciliati erbivori, infatti, diversi ceppi di cianobatteri producono maggiori quantità di EPS (capsule, guaine, mucillagine) ed è stata osservata la capacità dei tricomi di ritrarsi all'interno di tali strutture (Pajdak-Stós *et al.*, 2001).

Oltre a ciò, i cianobatteri sono noti per la produzione e il rilascio nell'ambiente circostante di tossine e altre sostanze allopatiche, come gli acidi grassi polinsaturi, per difendersi da predatori e competitori (Carmichael, 1992; Sellsner *et al.*, 2003; Ikawa, 2004).

Da quanto sopra accennato, è evidente che la capacità di spostarsi, verso fattori favorevoli e lontano da quelli ritenuti svantaggiosi, è un altro meccanismo comportamentale messo in atto dai cianobatteri in risposta all'ambiente e legato alla presenza di adattamenti morfologici e fisiologici particolari, come i complessi dei pori giunzionali coinvolti nella *gliding motility* (par. 1.1.1).

Un'altra strategia di tipo biochimico adottata da diversi organismi, inclusi i membri del *phylum* Cyanophyta, per far fronte a condizioni di disseccamento ed elevate salinità è la produzione e l'accumulo di diversi soluti compatibili. In particolare, in caso di carenza d'acqua questi microrganismi producono disaccaridi, come il trealosio e il saccarosio, che si ritiene servano a proteggere le membrane lipidiche, le proteine e gli acidi nucleici (Crowe *et al.*, 1992; Singh *et al.*, 2002). In condizioni di elevata salinità, invece, essi accumulano, oltre al saccarosio, molecole come il glucosilglicerolo e la glicinbetaina (Allakhverdiev *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2002).

Altri adattamenti biochimici e fisiologici tipici dei cianobatteri di ambienti termali, e che accomunano tutti gli organismi termofili, sono quelli che permettono il mantenimento della stabilità, flessibilità e funzionalità delle proteine alle alte temperature di crescita (Fields, 2001). Le strategie adottate a tale scopo possono

essere l'adattamento termico mediante la modificazione della composizione aminoacidica delle singole proteine (Haney *et al.*, 1999) oppure, nuovamente, la produzione di soluti compatibili termostabilizzanti (Martins *et al.*, 1997). Nei cianobatteri termofili, tali strategie investono anche i componenti della catena fotosintetica. Studi fisiologici a riguardo hanno, infatti, rivelato come la termostabilità del PSI sia maggiore nei cianobatteri termofili rispetto ai cianobatteri mesofili (Nechustay *et al.*, 1983; Balme *et al.*, 2001). Il PSII dei ceppi termofili mostra, pure, una particolare termostabilità (Nishiyama *et al.*, 1999), oltre ad alcune peculiarità dei pigmenti-antenna operanti nella raccolta della luce (Edwards *et al.*, 1996; Edwards *et al.*, 1997; Samsonoff & McColl, 2001).

A proposito di pigmenti-antenna, un'ulteriore strategia biochimica e fisiologica che si osserva in numerosi cianobatteri in risposta a variazioni nella qualità e quantità di luce dell'ambiente di crescita è il cosiddetto "adattamento cromatico". Molti di essi sono, infatti, in grado di regolare il contenuto di ficoeritrina e ficocianina dei loro ficobilisomi, al variare delle condizioni luminose (Tandeau de Marsac, 1977; Bryant, 1982; Wolf & Schüßler, 2005).

Infine, un adattamento molto importante del *phylum* Cyanophyta, che accomuna tutti gli organismi viventi, è l'adattamento omeoviscoso delle membrane al variare di diverse condizioni ambientali (temperatura, luce, salinità, dissecamento, etc.). Come descritto più approfonditamente nei paragrafi successivi, ciò viene realizzato modulando il contenuto di acidi grassi saturi e insaturi (Murata & Wada, 1995; Allakhverdiev *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2002; Maslova *et al.*, 2004; Rosales *et al.*, 2005) e di determinati tipi di carotenoidi presenti nelle membrane stesse (Gruszecki & Strzalka, 2005). Questi ultimi sono noti anche per altri ruoli, come quello di filtri contro i raggi UV (Lakatos *et al.*, 2001; Schagerl & Müller, 2006; Kilian *et al.*, 2007).

1.5 IL SISTEMA DI MEMBRANE DEI CIANOBATTERI: STRUTTURA E FUNZIONI

Le membrane biologiche rivestono un ruolo centrale nella cellula, essendo la sede di numerose attività metaboliche. I cianobatteri, in particolare, presentano tre diversi tipi di membrane: la membrana esterna, il plasmalemma e i tilacoidi (Murata & Wada, 1995; Hoiczyc & Hansel, 2000; Norling *et al.*, 1997; Liberton *et al.*, 2006).

La composizione lipidica delle membrane dei cianobatteri assomiglia a quella dei cloroplasti di piante e alghe. Sia la membrana esterna, che il plasmalemma, che i tilacoidi risultano, infatti, composti da quattro principali glicerolipidi: monogalattosildiacilglicerolo (MGDG), digalattosildiacilglicerolo (DGDG), sulfochinovosildiacilglicerolo (SQDG) e fosfatidilglicerolo (PG) (Murata *et al.*,

1992; Murata & Wada, 1995; Singh *et al.*, 2002; Maslova *et al.*, 2004) (fig. J). Le proporzioni relative di queste quattro componenti sono, però, diverse nei tre tipi di membrane (Selstam & Campbell, 1996), con il MGDG che generalmente costituisce circa la metà dei glicerolipidi totali e le altre specie lipidiche in proporzioni più variabili. E', poi, presente nelle membrane dei cianobatteri, anche se in quantità ridotte (meno dell'1% dei glicerolipidi totali), il monoglucosildiacilglicerolo (MgluDG), un precursore del MGDG (Lem & Stumpf, 1984; Murata & Wada, 1995; Selstam & Campbell, 1996).

Come descritto nel paragrafo successivo, alle posizioni sn-1 e sn-2 della molecola di glicerolo possono essere legati diversi tipi di acidi grassi e il loro grado di insaturazione influisce sulla struttura e la fluidità delle membrane.

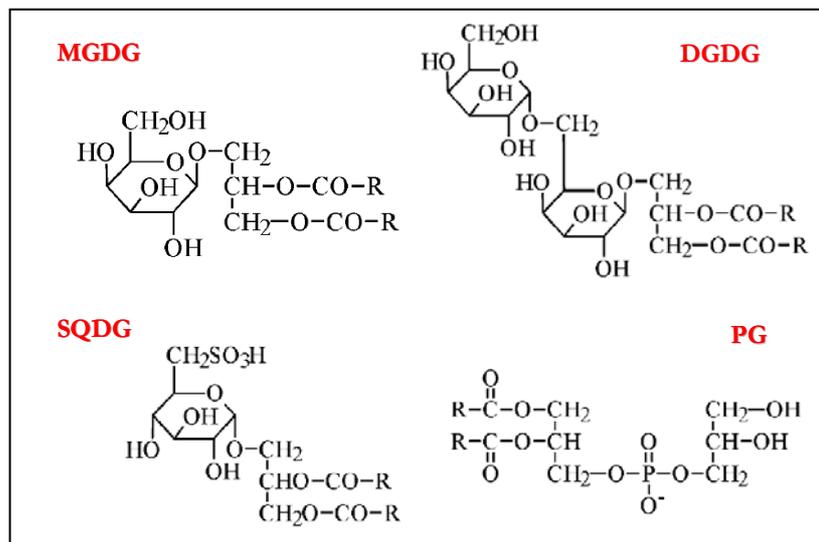


Fig. J: i quattro lipidi componenti le membrane dei cianobatteri (modificato da Singh *et al.*, 2002).

Tornando ai tre sistemi di membrane dei cianobatteri, la membrana esterna è una delle prime componenti cellulari ad entrare in contatto con l'ambiente circostante.

Essa presenta una struttura simile a quella riscontrata nei batteri Gram-negativi, essendo costituita principalmente da lipopolisaccaridi (Hoiczyc & Hansel, 2000). La frazione lipopolisaccaridica di tale membrana isolata da tre specie di *Phormidium*, ad esempio, è risultata composta da polisaccaridi, per circa il 60%; da lipidi, per circa l'1,5%, e da aminoacidi (Mikheyskaya *et al.*, 1976). In *Anacystis nidulans* la frazione lipidica era maggiore, costituendo il 30-40% del totale (Weise *et al.*, 1970).

Gli LPS della membrana esterna dei cianobatteri mostrano proprietà antigeniche e sierologiche simili a quelle delle endotossine batteriche, ma, a differenza di queste ultime, non sembrano tossici (Mikheyskaya *et al.*, 1976).

Oltre agli LPS, la membrana esterna dei cianobatteri contiene anche costituenti normalmente assenti nei batteri Gram-negativi. In particolare, sono state trovate piccole quantità di fosfato (legato ai lipolisaccaridi), carotenoidi, acidi grassi insoliti (come l'acido β -idrossipalmitico, ritrovato nella molecola del lipide A) e porine (ancorate al sottostante strato di peptidoglicano) (Mikheyskaya *et al.*, 1976; Hoiczky & Hansel, 2000).

Dei due restanti tipi di membrane, la membrana plasmatica costituisce una frazione alquanto ridotta delle componenti cellulari, mentre i tilacoidi occupano gran parte del citoplasma cianobatterico (Norling *et al.*, 1997).

Al microscopio elettronico a trasmissione, la membrana plasmatica si presenta, generalmente, come una singola linea elettrondensa, appressata allo strato di peptidoglicano, di circa 3-4 nm di spessore. In alcuni punti, però, essa risulta meno appressata alla parete cellulare, potendo così essere distinta in due strati, separati da un distanza di circa 6-9 nm (Hoiczky & Baumeister, 1995).

Studi condotti separando plasmalemma e tilacoidi, mediante gradiente di saccarosio, hanno evidenziato alcune differenze fra queste due componenti membranali. In particolare, mentre i tilacoidi contengono sia clorofille che carotenoidi, il plasmalemma sembra contenere solamente i secondi (e al massimo i precursori della clorofilla, clorofillide e protoclorofillide), ma in quantità superiori. In *Anacystis nidulans* e *Synechocystis* sp. PCC 8714, ad esempio, il contenuto in carotenoidi della membrana plasmatica era più di otto volte maggiore rispetto a quello dei tilacoidi (Norling *et al.*, 1997).

Questo conferma come effettivamente, nei cianobatteri, la fotosintesi abbia luogo solamente nei tilacoidi, che risultano pertanto un sistema di membrane ben distinto dal plasmalemma.

Un'eccezione di ciò è stata osservata nel cianobatterio *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, che, a differenza degli altri cianobatteri finora studiati, non presenta tilacoidi, ma solamente la membrana plasmatica (Rippka *et al.*, 1974; Selstam & Campbell, 1996). In questo microorganismo i componenti della catena fotosintetica di trasporto degli elettroni sono inseriti, quindi, nel plasmalemma. Questa tuttavia non è la sola peculiarità di *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, il quale, ad esempio, presenta ficobiliproteine non organizzate nei tipici ficobilisomi, ma aggregate a formare fasci di bastoncelli che si trovano adiacenti al plasmalemma (Guglielmi *et al.*, 1981). La sua membrana plasmatica ha, inoltre, una composizione lipidica leggermente diversa da quella delle membrane degli altri cianobatteri, mancando quantità rilevabili di SQDG (Selstam & Campbell, 1996).

Nel doppio strato lipidico del plasmalemma sono inseriti numerosi complessi proteici, come quelli adibiti al trasporto di nitrati e solfati, pompe antiporto Na^+/H^+ e pompe ioniche e protoniche di tipo ATPasico (H^+ -ATPasi, Ca^{2+} -ATPasi). Altri complessi presenti in questa struttura membranale sono, poi, quelli della catena respiratoria di trasporto degli elettroni, ossia la succinato-deidrogenasi, la NAD(P)H-deidrogenasi, la NADH:ubichinone ossidoreduttasi, il citocromo *b₆f*, la citocromo ossidasi e varie ossidasi terminali (Norling *et al.*, 1997).

L'ultimo tipo di membrane dei cianobatteri è rappresentato dai tilacoidi, che, come già accennato, rappresentano la porzione più cospicua delle membrane cellulari e sono stati oggetto di numerosi studi.

Essi si presentano come strutture a sacco, allungate, che si possono espandere lungo tutto il citoplasma. In *Synechocystis* sp. PCC 6803, ad esempio, le membrane tilacoidali costituiscono fasci, collocati principalmente nella regione periferica del citoplasma (a circa 300 nm dalla membrana plasmatica) (Van de Meene *et al.*, 2006). I tilacoidi di questo ceppo appaiono, poi, come strutture delimitate da una coppia di membrane, con un lume ampio 5-8 nm. Tra le membrane adiacenti di un tilacoide e l'altro ci sono circa 30-50 nm e si osservano dei ficobilisomi, di forma emisferica, adesi (Van de Meene *et al.*, 2006). Oltre ai ficobilisomi, che sporgono, attaccati ai tilacoidi si osservano anche ribosomi (Van de Meene *et al.*, 2006). In altri cianobatteri filamentosi, come *Anabaena cylindrica*, i tilacoidi appaiono sempre come delimitati da due membrane, ciascuna dello spessore di 7-8 nm, e con un lume ampio circa 5 nm (Kunkel, 1982).

Alcuni studi hanno messo in luce, inoltre, una particolare caratteristica delle membrane tilacoidali dei cianobatteri indagati, ossia il fatto che esse sembrano convergere, in alcuni punti, con il plasmalemma, senza però presentare continuità con esso. In *Synechocystis* sp. PCC 6803, tali siti di convergenza sono da 3 a 10, a seconda della cellula (Kunkel, 1982; Van de Meene *et al.*, 2006).

Vicino a questi siti di convergenza, nella regione periferica della cellula, si notano, poi, particolari strutture cilindriche, dette "centri tilacoidali" (Kunkel, 1982; Van de Meene *et al.*, 2006). I centri tilacoidali possono essere attaccati ai tilacoidi, o solo vicini ad essi, e si ritiene che siano importanti nella stabilizzazione e nell'organizzazione delle membrane tilacoidali, con un probabile ruolo nella loro biogenesi (Kunkel, 1982; Van de Meene *et al.*, 2006) (fig. K).

La biogenesi dei tilacoidi è, infatti, uno degli aspetti più oscuri e controversi riguardanti i cianobatteri, sul quale sono state avanzate differenti ipotesi.

Queste ipotesi si basano sulla contiguità o meno tra i tilacoidi e il plasmalemma, che non risulta così chiara per tutti gli autori (Liberton *et al.*, 2006). Mullineax (1999) ha proposto due diversi modelli riguardanti l'organizzazione della cellula

cianobatterica, partendo dalle ipotesi di continuità o meno tra tilacoidi e plasmalemma. Questi modelli hanno differenti implicazioni, ad esempio per quanto riguarda lo spostamento delle proteine da un compartimento cellulare all'altro e la biogenesi dei tilacoidi stessi.

In particolare, se i due tipi di membrane fossero contigui, le proteine potrebbero diffondere nel doppio strato lipidico e/o fra i compartimenti acquosi da esso delimitati, per raggiungere la loro esatta collocazione nella cellula. Secondo tale ipotesi, inoltre, i tilacoidi si originerebbero per invaginazione della membrana plasmatica, con il lume tilacoidale e il periplasma che costituiscono essenzialmente lo stesso compartimento. Ciò fa sorgere, tuttavia, alcuni interrogativi riguardanti, ad esempio, come venga mantenuto il *pool* protonico nel lume tilacoidale se questo è continuo con il periplasma (Liberton *et al.*, 2006).

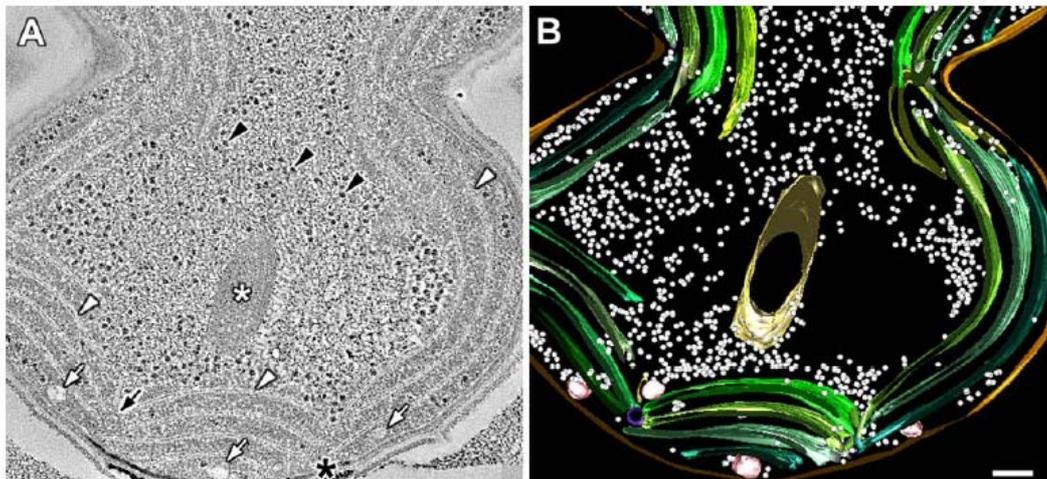


Fig. K: a sinistra, sezione longitudinale di *Synechocystis* sp. PCC 6803, in cui sono ben evidenti ribosomi (punte di freccia nere), un carbossisoma sezionato longitudinalmente (asterisco bianco), corpi lipidici (freccie bianche), tilacoidi (punte di freccia bianche), un centro tilacoidale (freccia nera) e punti di convergenza fra tilacoidi e citoplasma (asterisco nero). A destra, il corrispondente modello tridimensionale, in cui si possono nuovamente osservare i ribosomi (in bianco), il carbossisoma sezionato longitudinalmente (in giallo), i corpi lipidici (in rosa), il centro tilacoidale (in blu), i tilacoidi (in verde) e il plasmalemma (in marrone) (da Van de Meene *et al.*, 2006).

Altri autori sostengono che non esistono prove dirette della contiguità tra plasmalemma e tilacoidi, mentre sembra evidente il contrario, e ciò favorirebbe una seconda ipotesi secondo la quale i tilacoidi costituirebbero dei compartimenti distinti (Kunkel, 1982; Mullineaux, 1999; Spence *et al.*, 2003; Liberton *et al.*, 2006; Van de Meene *et al.*, 2006). In questo caso, il trasporto di proteine e lipidi tra le

membrane tilacoidali e il plasmalemma implicherebbe un trasporto vescicolare, che però deve essere ancora dimostrato.

Tentando di chiarire questi interrogativi, recentemente, Nevo e collaboratori (2007) hanno osservato la presenza di perforazioni nei tilacoidi di un cianobatterio coccoide, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, e di un cianobatterio filamentoso, *Microcoleus* sp. In entrambi questi organismi, i tilacoidi sono disposti in maniera concentrica nella cellula, assumendo l'aspetto di "gusci" di membrane e presentano perforazioni multiple, di diametro variabile, che consentirebbero il movimento di molecole e vari tipi di inclusi (ribosomi, granuli di polisaccaridi, corpi lipidici) tra una regione e l'altra del citoplasma. Sembra, inoltre, che ci siano delle connessioni tra un tilacoide e l'altro, il che potrebbe servire a facilitare lo spostamento di molecole, per diffusione, nel doppio strato lipidico. Un'altra osservazione interessante fatta per *Microcoleus* sp. è la presenza di vescicole, delimitate da una doppia membrana, sia nel citoplasma, sia fuse con i tilacoidi o all'interno delle perforazioni. Queste vescicole potrebbero permettere il traffico di lipidi e proteine sia tra i tilacoidi che tra questi e il plasmalemma (Nevo *et al.*, 2007).

Per quanto riguarda la componente proteica, nelle membrane tilacoidali sono co-presenti la catena fotosintetica e la catena respiratoria di trasporto degli elettroni, le quali condividono alcune componenti, come il *pool* dei plastochinoni e il complesso del citocromo *b₆f* (Norling *et al.*, 1997; Miskiewicz *et al.*, 2002).

La catena fotosintetica di trasporto degli elettroni è caratterizzata, poi, dalla presenza dei due fotosistemi, PSII e PSI, e del complesso enzimatico dell'ATP sintasi (Miskiewicz *et al.*, 2002; Pupillo *et al.*, 2003).

Il PSII è composto da un *core* centrale e da un'antenna esterna, il ficobilisoma. Associato al PSII, rivolto verso il lume tilacoidale, si trova, inoltre, il complesso evolvente ossigeno (OEC, *Oxygen Evolving Complex*). Il *core* comprende il centro di reazione e un'antenna interna, contenente clorofilla *a* (Chl*a*). Il centro di reazione è formato dalle proteine D1 e D2, che legano una coppia di Chl*a* P₆₈₀, 2-4 Chl*a* accessorie, 2 feofitine e i plastochinoni Q_A e Q_B. Associato al *core*, sul lato citoplasmatico della membrana tilacoidale, è presente il ficobilisoma, che funge da antenna esterna e convoglia l'energia luminosa verso l'antenna interna e il P₆₈₀ (Pupillo *et al.*, 2003).

I ficobilisomi sono strutture emidiscoidali costituite da ficobiliproteine (fig. L), le quali sono, a loro volta, composte da due catene polipeptidiche ($\alpha\beta$) che possono legare un numero variabile di cromofori (ficobiline).

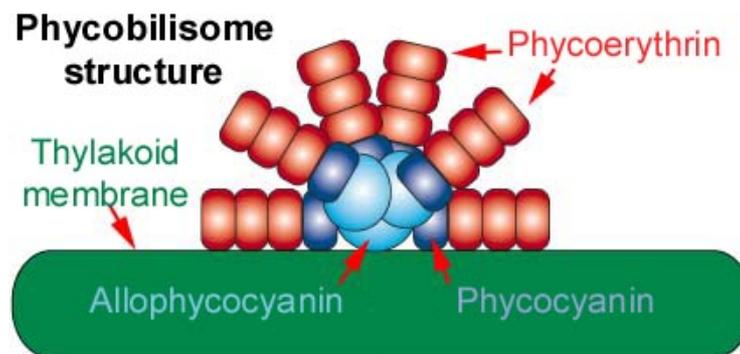


Fig. L: schema raffigurante la struttura di un ficobilisoma cianobatterico. In un numero limitato di specie la ficoeritrina è sostituita dalla ficoeritrocianina (da <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/webb/BOT311/Cyanobacteria/Cyanobacteria.htm>).

Nei cianobatteri si possono ritrovare quattro diverse ficobiliproteine: la ficoeritrina (PE), che lega il cromoforo ficoeritrobilina; la ficocianina (PC) e l'alloficcocianina (APC), entrambe leganti il cromoforo ficocianobilina, e la ficoeritrocianina (PEC), che lega i cromofori ficocianobilina e ficobiliviolina (Miskiewicz *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2003). Il ficobilisoma è formato da un nucleo di APC e da bracci bastoncellari, costituiti da PC, più interna, e da PE (o alternativamente PEC), più esterna. L'energia luminosa viene captata dalla PE (o PEC), convogliata verso la PC e da qui all'APC. Dal nucleo del ficobilisoma la luce arriva, quindi, alla Chl*a* dell'antenna interna e, infine, alla clorofilla P₆₈₀ del centro di reazione del PSII (Miskiewicz *et al.*, 2002; Pupillo *et al.*, 2003).

Associati al PSII ci sono, inoltre, i carotenoidi, i quali, oltre che fungere da pigmenti-antenna, svolgono un'azione antiossidante e protettiva in caso di esposizione dell'organismo ad una intensità luminosa eccessivamente elevata, che potrebbe portare ad una sovraeccitazione della Chl*a* con produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*).

Anche il PSI è costituito da un *core* composto da numerose proteine, delle quali le principali sono psaA e psaB. A tali proteine sono associate una coppia di Chl*a* P₇₀₀, 2 Chl*a* accessorie, un chinone A₁, un centro Fe-S (F_x) e i centri F_A e F_B. Si trova, poi, associata al *core* del PSI, un'antenna interna, contenente Chl*a*, ma non un'antenna esterna come nel PSII (Pupillo *et al.*, 2003).

Il numero e la disposizione dei tilacoidi sono differenti nei diversi gruppi tassonomici di cianobatteri (Komárek & Anagnostidis, 2005).

In alcune specie è stata, inoltre, osservata una particolare morfologia dei tilacoidi, che risultano dilatati a costituire una struttura reticolata. Questo *patter* tilacoidale è definito "keritomia" (*keritomy*) e sembra essere specie-specifico, ma distribuito fra

i diversi ordini dei cianobatteri, comprendendo sia le forme filamentose che quelle coccoidi. Nelle specie che presentano keritomia, sembra che tale *pattern* dei tilacoidi si manifesti solamente in determinate condizioni ambientali, spesso stressanti (es. eccesso o scarsità di luce). Pare, inoltre, che il contenuto delle dilatazioni tilacoidali sia costituito da polisaccaridi, anche se la funzione di questi è ancora ignota (Komárek & Anagnostidis, 2005).

1.5.1 Gli acidi grassi componenti le membrane

Gli acidi grassi sono acidi carbossilici, ossia molecole costituite da una catena idrocarburica (catena acilica), terminante ad un'estremità con un gruppo metilico (CH₃) e all'altra con un gruppo carbossilico (COOH) (Lehninger *et al.*, 1994).

Come sopra accennato, alle posizioni sn-1 e sn-2 della molecola di glicerolo dei glicerolipidi componenti le membrane dei cianobatteri possono essere legati diversi tipi di acidi grassi. Ciò avviene tramite la formazione di un legame estere tra il gruppo carbossilico dell'acido grasso e il gruppo ossidrilico (OH) della molecola di glicerolo (Murata, 1994; Murata & Wada, 1995; Chintalapati *et al.*, 2006).

La maggior parte degli acidi grassi che si trovano in natura contengono un numero pari di atomi di carbonio, anche se si possono ritrovare acidi grassi a catena dispari.

Gli acidi grassi che presentano solamente doppi legami tra gli atomi di carbonio della loro catena acilica sono detti “saturi”, quelli che presentano un doppio legame sono definiti “monoinsaturi” (o “monoenoici”) e quelli che presentano più di un doppio legame sono chiamati “polinsaturi” (o “polienoici”). Questi ultimi, poi, se possiedono due doppi legami si definiscono “di-insaturi” (o “dienoici”), se ne possiedono tre tri-insaturi (o “trienoici”), e così via.

Lungo la catena acilica i doppi legami possono essere in conformazione *cis* o *trans*, anche se quelli ritrovati in natura sono solitamente di tipo *cis* (fig. M).

La conformazione *cis* implica che i due atomi di carbonio coinvolti nel doppio legame si trovino sullo stesso lato della catena acilica e ciò riduce la capacità di movimento degli atomi intorno al doppio legame e determina una curvatura nella catena idrocarburica. Nella conformazione *trans*, invece, i due atomi di carbonio coinvolti nel doppio legame si trovano uno su un lato e uno sull'altro della catena acilica e ciò fa sì che questa risulti dritta, senza angolazioni (Lehninger *et al.*, 1994).

In un doppio strato lipidico gli acidi grassi saturi, presentando catene aciliche lineari, si possono impaccare strettamente l'uno con l'altro riducendo la fluidità di membrana. Gli acidi grassi con doppi legami di tipo *cis*, possedendo catene aciliche con angolazioni, possono impaccarsi meno strettamente fra loro,

aumentando la fluidità di membrana. Gli acidi grassi di tipo *trans*, infine, non presentando angolazioni nelle loro catene idrocarburiche, si comportano come acidi grassi saturi (Lehninger *et al.*, 1994).

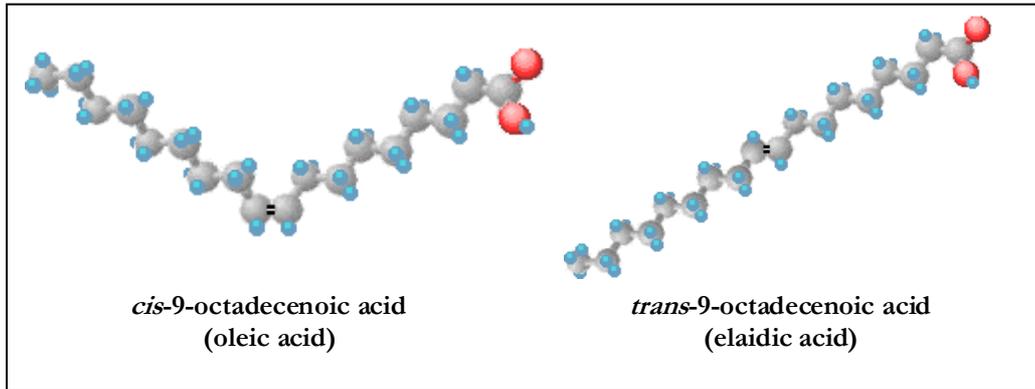


Fig. M: conformazione *cis* e *trans* degli acidi grassi (da <http://www.scientificpsychic.com/fitness/fattyacids.html>).

A ciascun acido grasso è stato attribuito sia un nome comune, sia una denominazione che sottolinea il numero e la posizione dei doppi legami. In particolare, il simbolo “ Δ ” indica la posizione del doppio legame contando gli atomi di carbonio a partire dall’estremità carbossilica, mentre il simbolo “ ω ” indica la posizione del doppio legame se si conta a partire dall’estremità metilica. Così, ad esempio, l’acido palmitoleico, costituito da 16 atomi di carbonio e con un doppio legame di tipo *cis* a livello del carbonio 9, può essere descritto dalla simbologia “*cis*- Δ^9 C16:1” oppure “ ω -7 C16:1”.

La sintesi degli acidi grassi nei cianobatteri è stata studiata estesamente in *Anabaena variabilis*, conducendo esperimenti sia *in vivo* che *in vitro* (Lem & Stumpf, 1984; Murata, 1992). Tali indagini hanno messo in luce la singolarità della biosintesi degli acidi grassi in questi microrganismi, che risultano gli unici in cui le reazioni di desaturazione (inserimento dei doppi legami) hanno luogo solamente su acidi grassi esterificati ai lipidi (Murata, 1994). Brevemente, con un meccanismo inizialmente simile a quello descritto per le piante, alcuni enzimi, chiamati sintasi degli acidi grassi, producono acidi C16:0 e C18:0, legati alla proteina trasportatrice di acili (*Acyl Carrier Protein*, ACP). Questi acidi grassi sono, poi, incorporati in glicerolipidi tramite l’esterificazione del glicerolo-3-fosfato, ad opera di aciltransferasi. Solo dopo essere stati assemblati nei glicerolipidi, gli acidi grassi saturi potranno essere resi insaturi ad opera di desaturasi degli acidi grassi,

enzimi in grado di inserire doppi legami nelle catene idrocarburiche (vedi par. 1.6) (Nishida & Murata, 1996).

Nei cianobatteri si possono ritrovare diversi tipi di acidi grassi, da quelli a catena più corta, come il miristico (C14:0), a quelli più lunghi, come l'arachidico (C20:0). Alcuni autori suggeriscono che ci sia una correlazione fra il grado di complessità morfologica dei cianobatteri e il numero di doppi legami negli acidi grassi che compongono le loro membrane. Infatti, pur con eccezioni (es. diversi ceppi di *Synechocystis* e *Synechococcus*), generalmente le forme coccoidi contengono solamente acidi grassi monoenoici. Inoltre, le forme filamentose e coloniali presentano acidi grassi polienoici più diversificati per numero di doppi legami, rispetto alle specie coccoidi che non costituiscono colonie (Maslova *et al.*, 2004).

Sembra che i vari tipi di acidi grassi siano distribuiti diversamente fra i tre sistemi di membrane di cianobatteri. Ad esempio, nella membrana esterna di diverse specie di *Phormidium* sono stati trovati solamente l'acido palmitico (16:0), l'acido stearico (18:0) e l'acido oleico (18:1) (Mikheyskaya *et al.*, 1976).

La maggior parte delle indagini sulla composizione in acidi grassi si è, però, concentrata sugli estratti degli altri due tipi di membrane cianobatteriche (Tasaka *et al.*, 1996; Várkonyi *et al.*, 2002, Zsíros *et al.*, 2002), che sembrano presentare una maggior variabilità di specie aciliche, oppure sugli estratti delle cellule *in toto* (Murata *et al.*, 1992; Gugger *et al.*, 2002; Maslova *et al.*, 2004).

Da molti degli studi effettuati è risultato che le specie aciliche più abbondanti, nei ceppi finora analizzati (in particolare quelli filamentosi), sono gli acidi grassi a sedici atomi di carbonio, palmitico (C16:0) e palmitoleico (C16:1), che possono arrivare a costituire anche il 50-60% degli acidi grassi totali (Murata *et al.*, 1992; Singh *et al.*, 2002; Maslova *et al.*, 2004).

Un altro aspetto importante della composizione acilica delle membrane cianobatteriche è il fatto che gli acidi grassi a 16 atomi di carbonio sono esterificati sempre in posizione sn-2 della molecola di glicerolo, mentre quelli a 18 atomi di carbonio si trovano in posizione sn-1 (Murata *et al.*, 1992; Murata, 1994; Murata & Wada, 1995; Chintalapati *et al.*, 2006).

Infine, è stato proposto che gli acidi grassi possano fungere da *marker* chemotassonomici, contribuendo all'identificazione e alla caratterizzazione dei cianobatteri (vedi anche par. 1.6.1) (Li *et al.*, 1998; Gugger *et al.*, 2002; Li & Watanabe, 2004).

1.5.2 I carotenoidi componenti le membrane

I carotenoidi si possono considerare i pigmenti più diffusi in natura, con più di 750 molecole attribuite a questo gruppo (Gruszecki & Strzalka, 2005; Schagerl &

Müller, 2006). Essi sono sintetizzati da tutti gli organismi fotosintetici e da alcuni organismi eterotrofi (batteri, Archea e funghi) (Mohamed *et al.*, 2005).

Questi pigmenti, di colore giallo-arancione, sono dei tetraterpeni, che possono presentare anelli a sei atomi di carbonio, ad una od entrambe le estremità della loro catena idrocarburica. Nel caso in cui le catene idrocarburiche di tali pigmenti siano modificate con gruppi funzionali contenenti ossigeno (gruppi ossidrilico, chetossilico e/o epossilico), i carotenoidi sono chiamati xantofille. Se, invece, non presentano tale tipo di modificazioni sono detti caroteni (Gruszecki & Strzalka, 2005).

I carotenoidi svolgono diverse funzioni, come quella di pigmenti antenna nel PSII, di filtro contro i raggi UV e di *scavenger* delle specie reattive dell'ossigeno (Schagerl & Müller, 2006; Gruszecki & Strzalka, 2005). Sembra, però, che questi non siano gli unici ruoli da essi svolti, in quanto, recentemente, è stata attribuita a questi pigmenti anche un'importante funzione strutturale nel mantenimento dell'integrità e della funzionalità delle membrane biologiche (Gruszecki & Strzalka, 2005).

Sebbene i tipi di carotenoidi predominanti rimangano pressochè gli stessi, la composizione in carotenoidi dei cianobatteri è fortemente influenzata da differenti fattori ambientali (Schagerl & Müller, 2006). Ad ogni modo, i principali carotenoidi ritrovati nei cianobatteri sono solitamente: il β -carotene, l'echinenone, la zeaxantina, la cantaxantina, la caloxantina, la nostoxantina e vari tipi di chetomixo- e mixoxantofille. Le chetomixo- e le mixoxantofille (chetomixo- o mixol-glicosidi) sono carotenoidi alla cui catena idrocarburica si trovano legati glicosidi e sono molecole specifiche dei cianobatteri (Schagerl & Müller, 2006). Eccetto il β -carotene che è neutro, tutti i suddetti carotenoidi sono polari.

Takaichi & Mochimaru (2007) hanno proposto la via di sintesi dei carotenoidi per diversi cianobatteri. Secondo il modello da essi suggerito, il fitoene è convertito in licopene in seguito a quattro reazioni di desaturazione. A partire dal licopene, per opera della licopene ciclasi, si forma, quindi, il γ -carotene. Dal γ -carotene si può formare β -carotene, da un lato, oppure mixol-2'-glicoside (una mixoxantofilla), dall'altro. Da quest'ultimo viene prodotto il 4'-chetomixol-2'-glicoside (una chetomixoxantofilla), ad opera di una β -carotene chetolasi. A sua volta dal β -carotene si originano, in successione, la zeaxantina, la caloxantina e la nostoxantina, per opera della β -carotene idrossilasi, oppure l'echinenone e la cantaxantina, ad opera di un'altra β -carotene chetolasi (fig. N).

Nelle membrane biologiche dei cianobatteri i carotenoidi si dispongono in maniera diversa a seconda della loro struttura chimica. In particolare, i carotenoidi neutri, come il β -carotene, sono immersi all'interno del doppio strato lipidico, dove possono assumere le più svariate posizioni. Gli altri carotenoidi di

tipo polare, invece, si dispongono in maniera tale da mantenere le loro “teste” polari in contatto con quelle del doppio strato lipidico (fig. O) (Gruszecki & Strzalka, 2005). La diversa struttura chimica e la conseguente disposizione dei carotenoidi all’interno delle membrane conferisce loro diverse funzioni nel mantenimento della funzionalità biologica delle membrane stesse.

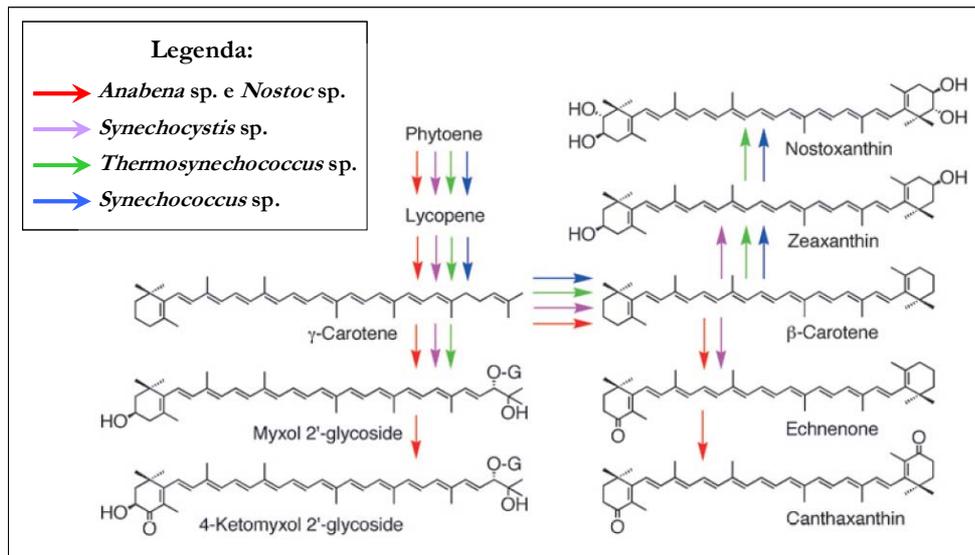


Fig. N: vie di sintesi dei carotenoidi proposte per diversi cianobatteri (modificato da Takaichi e Mochimaru, 2007).

Sono stati condotti numerosi studi riguardanti il ruolo dei carotenoidi nelle membrane dei cianobatteri, anche in relazione a fattori ambientali, e di seguito ne vengono riportati alcuni esempi.

Le mixoxantofille sono localizzate soprattutto a livello della membrana citoplasmatica e della membrana esterna e, in quest’ultima, sembrano servire da ancoraggio per l’S-layer (Mohamed *et al.*, 2005). E’ stato proposto da numerosi autori che esse abbiano un’importante ruolo protettivo contro un eccesso di luce (Lakatos *et al.*, 2001; Schagerl & Müller, 2006; Kilian *et al.*, 2007). Sembra, in particolare, che l’alta efficienza fotoprotettiva delle mixoxantofille sia legata all’elevato numero di legami insaturi che presentano e alla loro natura glicosidica (Steiger *et al.*, 1999).

Oltre a ciò le mixoxantofille sembrano svolgere un’importante funzione nel mantenimento della fluidità della membrana e nella stabilizzazione del doppio strato lipidico (Mohamed *et al.*, 2005). A questo proposito, alcuni autori riportano una riduzione dei livelli di questi pigmenti glicosidici nei cianobatteri, in seguito

all'abbassamento della temperatura (Ivanov *et al.*, 2000), mentre altri hanno osservato un *trend* opposto (Várkonyi *et al.*, 2001).

La zeaxantina si trova nella membrana citoplasmatica e, in *Synechococcus* sp. PCC 7942, sembra essere accumulata in condizioni d'elevata intensità luminosa (Masamoto *et al.*, 1999). Altri autori ritengono invece che i contenuti in zeaxantina nei cianobatteri siano relativamente costanti e che l'aumento del rapporto zeaxantina:clorofilla, osservato all'aumentare dell'intensità luminosa, sia essenzialmente dovuto alla diminuzione nel contenuto della clorofilla stessa (Schagerl & Müller, 2005).

Rilevanti contenuti di zeaxantina sono stati riportati anche per altri cianobatteri acquatici, ma non per quelli terrestri, in cui i livelli di questo pigmento sono molto bassi e sembrano, invece, compensati, in condizioni d'elevata intensità luminosa, da un alto contenuto di cantaxantina, un chetocarotenoide (Lakatos *et al.*, 2001). Anche negli organismi appartenenti all'ordine Nostocales ritrovati in suoli desertici, dove l'irraggiamento è elevato, il livello di chetocarotenoidi è particolarmente alto, così come quello delle mixoxantofille (Lakatos *et al.*, 2001).

Infine, nei *mats* di cianobatteri bentonici dell'Antartide, è stato osservato che gli organismi localizzati negli strati alti del *mat*, e quindi maggiormente esposti alla luce solare, presentano elevati contenuti di cantaxantina e mixoxantofille, mentre quelli che si trovano negli strati sottostanti, e quindi maggiormente riparati da un eccesso di luce, presentavano elevati livelli di β -carotene ed echinenone (Lakatos *et al.*, 2001).

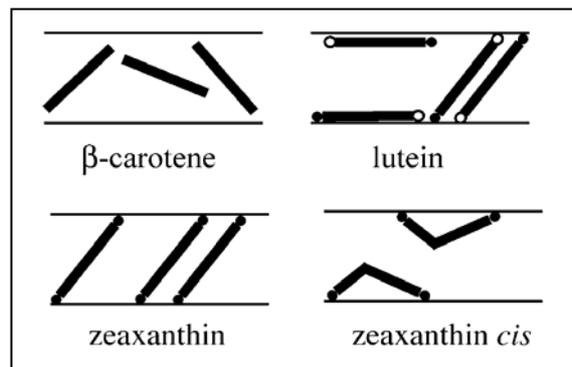


Fig. O: disposizione di alcuni carotenoidi nel doppio strato lipidico (modificato da Gruszecki & Strzalka, 2005).

1.6 DESATURASI DEGLI ACIDI GRASSI

Le desaturasi degli acidi grassi sono una superfamiglia di enzimi, diffusi in tutti i regni dei viventi, in grado di inserire doppi legami nelle catene aciliche degli acidi grassi, una reazione definita “desaturazione” (fig. P). Per svolgere la propria funzione, tutti i membri di tale famiglia sfruttano ossigeno molecolare ed equivalenti riducenti forniti da una catena di trasporto di elettroni. La reazione è catalizzata grazie ad un centro di-ferroso (Lindqvist *et al.*, 1996), trovato in tutte le desaturasi degli acidi grassi fino ad oggi studiate e legato a diversi residui aminoacidici a seconda del tipo di desaturasi considerata (Shanklin & Cahoon, 1998; Tocher *et al.*, 1998; Sperling *et al.*, 2003).

Nonostante il comune meccanismo della reazione di desaturazione, le desaturasi degli acidi grassi possono essere classificate in varie sottofamiglie, diverse per localizzazione, substrato sul quale agiscono e donatori di equivalenti riducenti utilizzati. In particolare, si distinguono le acil-ACP desaturasi, le acil-CoA desaturasi e le acil-lipide desaturasi (Los & Murata, 1998; Shanklin & Cahoon, 1998; Tocher *et al.*, 1998).

Le acil-ACP desaturasi sono localizzate nello stroma dei plastidi di alghe e piante, dove introducono doppi legami nelle catene aciliche degli acidi grassi esterificati alla proteina trasportatrice di acili, ACP (*Acyl Carrier Protein*).

Le acil-CoA desaturasi hanno come substrato gli acidi grassi esterificati al coenzima A (CoA) e si trovano nelle membrane del reticolo endoplasmatico di animali, funghi e protisti non fotosintetici.

Infine, le acil-lipide desaturasi agiscono sugli acidi grassi esterificati a glicerolipidi e sono presenti nel reticolo endoplasmatico di piante, animali e funghi, nelle membrane dei cloroplasti e nelle membrane tilacoidali dei cianobatteri.

Per quanto riguarda il resto degli eubatteri, nella maggior parte di questi organismi si trovano solamente acidi grassi saturi e monoinsaturi, sintetizzati attraverso reazioni ossigeno-indipendenti, catalizzate da enzimi diversi dalle desaturasi (β -cheto-ACP sintetasi I e II e β -deidrase) (Tocher *et al.*, 1998). Alcuni batteri Gram-negativi, principalmente marini, però, sono anch'essi in grado di produrre acidi grassi polinsaturi (Tocher *et al.*, 1998) e nel genoma di altri, come *Mycobacterium* e *Streptomyces*, sono state trovate sequenze che codificano per proteine simili ad acil-ACP desaturasi, anche se con funzione sconosciuta (Sperling *et al.*, 2003). Inoltre, è stata clonata una $\Delta 5$ desaturasi dal batterio *Bacillus subtilis*, che sembra appartenere alle desaturasi di membrana (Aguilar *et al.*, 1998) e che risulta filogeneticamente lontana da tutte le altre desaturasi note (Sperling *et al.*, 2003).

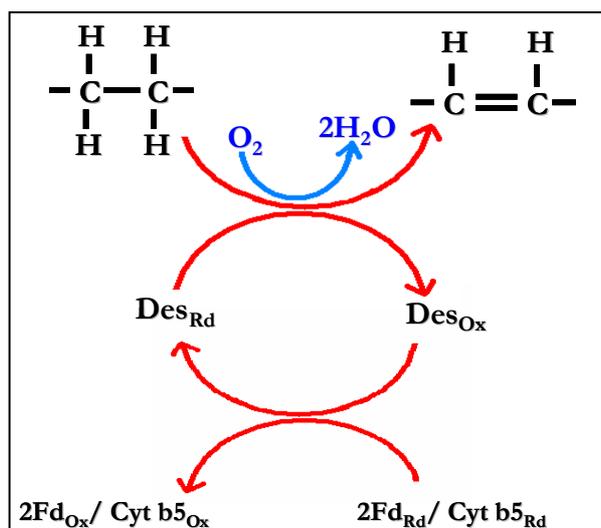


Fig. P: schema raffigurante la reazione di desaturazione.

Per quanto riguarda i componenti della catena di trasporto di elettroni, le acil-ACP desaturasi e le acil-lipide desaturasi sfruttano come donatore di equivalenti riducenti il NADPH, come flavoproteina la ferredossina-NADP⁺ ossidoreduttasi e come trasportatore finale di elettroni la ferredossina ridotta; mentre le acil-CoA desaturasi utilizzano il NADH, la citocromo b₅ riduttasi e il citocromo b₅ ridotto, rispettivamente (Los & Murata, 1998; Shanklin & Cahoon, 1998).

In base alla sequenza aminoacidica, poi, le desaturasi degli acidi grassi si possono dividere in due principali gruppi, filogeneticamente lontani: quelle solubili e quelle di membrana (Shanklin & Cahoon, 1998; Sperling *et al.*, 2003). Il gruppo delle desaturasi solubili è costituito dalle acil-ACP desaturasi, mentre quello delle desaturasi di membrana è, invece, più comprensivo, includendo tutte le rimanenti forme. Nelle desaturasi solubili i residui aminoacidici coinvolti nel legame del complesso di-ferroso formano due distinti motivi del tipo D/EXXH; mentre in quelle di membrana tali motivi sono sostituiti da altri tre, definiti *box* di istidine: H(X)₃₋₄H, H(X)₂₋₃HH e H/Q(X)₂₋₃HH (Los & Murata, 1998; Chi *et al.*, 2008). Grafici di idropatia, hanno messo in luce come circa il 30% della sequenza aminoacidica di questo secondo gruppo di enzimi costituisca domini transmembrana ad α -elica. Ad oggi, è stata ricostruita la struttura cristallografica solo delle acil-ACP desaturasi e, in particolare, della stearyl-ACP desaturasi isolata dal seme del ricino (Browse, 1996; Lindqvist *et al.*, 1996) (fig. Q).

Per quanto riguarda le desaturasi di membrana è stato finora solamente proposto un modello di struttura tridimensionale, basandosi sui diversi dati raccolti (Shanklin *et al.*, 1994), che prevede la presenza di almeno quattro domini transmembrana (fig. T).

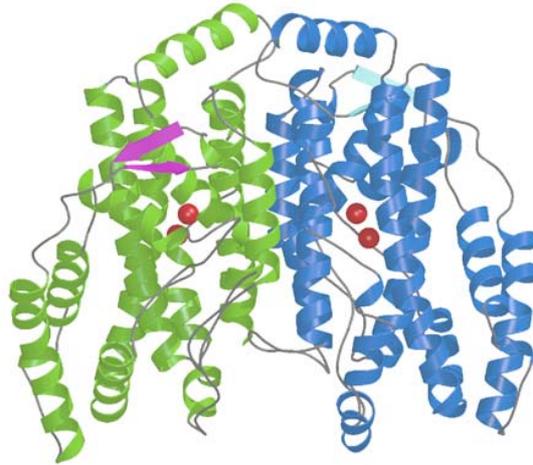


Fig. Q: modello tridimensionale della stearoil ACP-desaturasi isolata dal seme del ricino. Le due subunità della proteina sono distinte con i colori verde e azzurro, mentre gli atomi di ferro dei centri di-ferrosi sono rappresentati come sfere rosse (da Lindqvist *et al.*, 1996).

S'ipotizza che l'esistenza delle desaturasi degli acidi grassi solubili e di quelle di membrana rappresenti un fenomeno di convergenza evolutiva tra due famiglie di proteine filogeneticamente distanti, che avendo incorporato due atomi di ferro all'interno di strutture aminoacidiche diverse, riescono a svolgere la stessa attività catalitica.

Da un punto di vista evolutivo, inoltre, resta per ora aperto un'interessante interrogativo sulle acil-ACP desaturasi dei plastidi di piante e alghe. Questi organismi mostrano, infatti, il *pattern* più complesso di desaturasi fra gli eucarioti, presentando, oltre alle acil-ACP desaturasi, anche le acil-CoA e le acil-lipide desaturasi. Partendo dalla comune assunzione che le proteine dei procarioti sono gli antenati di quelle ritrovate negli eucarioti, ci si può chiedere allora quale sia l'antenato delle acil-ACP desaturasi, non essendo state trovate nei cianobatteri, i diretti progenitori dei cloroplasti secondo la teoria dell'endosimbiosi (Kutschera & Niklas, 2005), proteine ad esse omologhe (Sperling *et al.*, 2003).

1.6.1 Le desaturasi degli acidi grassi nei cianobatteri

Le desaturasi degli acidi grassi dei cianobatteri sono tutte proteine transmembrana che agiscono sulle catene aciliche degli acidi grassi esterificati a glicerolipidi (Tocher *et al.*, 1998).

Ne sono state identificate finora quattro principali forme che differiscono per la specificità della posizione in cui inseriscono il doppio legame all'interno della

catena acilica e per il tipo di acido grasso su cui agiscono. Queste diverse forme sono:

- $\Delta 6$ desaturasi (che, a partire dall'estremità carbossilica, inserisce il doppio legame a livello del carbonio 6);
- $\Delta 9$ desaturasi (che inserisce il doppio legame a livello del carbonio 9);
- $\Delta 12$ desaturasi (che inserisce il doppio legame a livello del carbonio 12);
- $\Delta 15$ (o $\omega 3$) desaturasi (che inserisce il doppio legame a livello del carbonio 15, partendo dall'estremità carbossilica, o del carbonio 3, se si conta a partire dall'estremità col gruppo metilico).

Non tutti i cianobatteri possiedono tutte le forme di desaturasi sopra riportate. A seconda del tipo di desaturasi che possiedono e, quindi, del tipo di specie aciliche che compongono le loro membrane, i cianobatteri sono stati suddivisi in quattro gruppi (fig. R) (Murata & Wada, 1995; Tocher *et al.*, 1998; Gugger *et al.*, 2002).

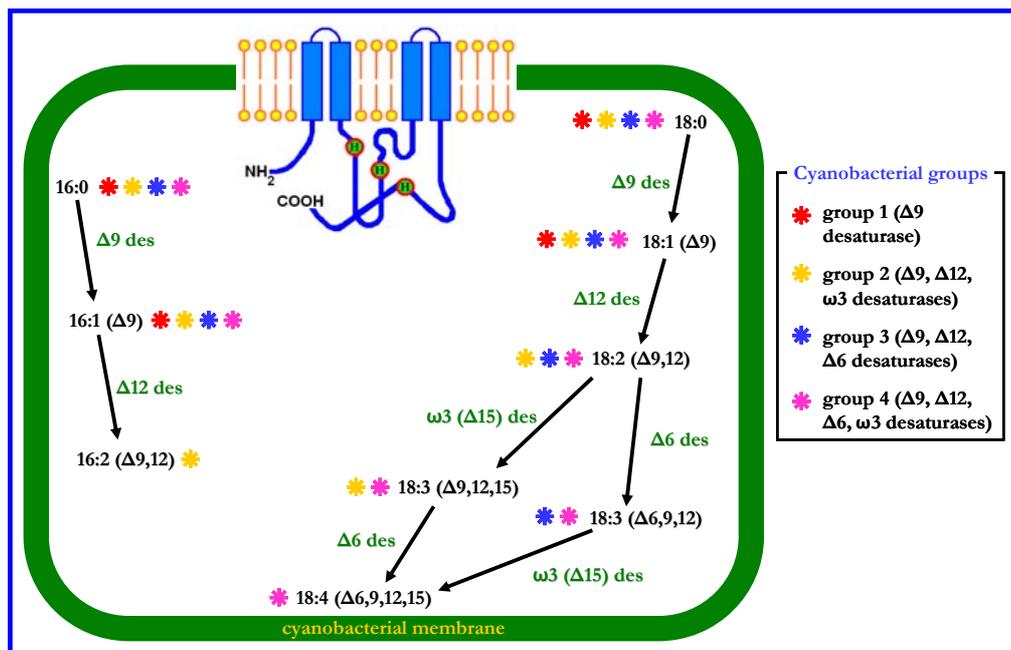


Fig. R: schema raffigurante le desaturasi degli acidi grassi e le conseguenti specie aciliche presenti nei quattro gruppi di cianobatteri. Nella membrana tilacoidale è inserita una desaturasi transmembrana, rappresentata secondo il modello proposto da Shanklin *et al.*, 1994.

Il gruppo 1, possedendo solamente la $\Delta 9$ desaturasi, presenta membrane costituite solamente da acidi grassi saturi e monoinsaturi. I cianobatteri appartenenti ai gruppi 2, 3 e 4, invece, contengono anche acidi grassi polinsaturi. In particolare, gli acidi grassi dei membri del gruppo 2 presentano tre doppi legami a livello delle posizioni $\Delta 9, \Delta 12$ e $\Delta 15(\omega 3)$ degli acidi grassi a 18 atomi di

carbonio (C18), esterificati in posizione sn-1 della molecola di glicerolo, e possono presentare fino a due doppi legami ($\Delta 9$ e $\Delta 12$) anche negli acidi grassi a 16 atomi di carbonio (C16), che si trovano in posizione sn-2 nella molecola di glicerolo. Pure i cianobatteri appartenenti al gruppo 3 mostrano acidi grassi con tre insaturazioni, ma queste si trovano nelle posizioni $\Delta 6$, $\Delta 9$ e $\Delta 12$ degli acidi grassi C18. Gli acidi grassi C16, in tale gruppo, possono presentare al massimo un solo doppio legame. Infine, i membri del gruppo 4 di cianobatteri, possedendo tutte quattro le forme note di desaturasi, presentano quattro doppi legami negli acidi grassi C18 (nelle posizioni $\Delta 6$, $\Delta 9$, $\Delta 12$ e $\Delta 15$), ma anch'essi al massimo una sola insaturazione negli acidi grassi C16 (Murata *et al.*, 1992; Murata & Wada, 1995; Tocher *et al.*, 1998; Gugger *et al.*, 2002).

Dagli studi finora condotti, sembra che membri di diversi ordini di cianobatteri possano appartenere a ciascuno dei quattro gruppi creati in base al tipo di specie aciliche e di desaturasi presenti (Murata *et al.*, 1992; Murata & Wada, 1995; Gugger *et al.*, 2002).

In tabella 2 sono riportati i cianobatteri attualmente assegnabili ai quattro gruppi. Nei diversi gruppi di cianobatteri, le reazioni di desaturazione avvengono con una sequenza precisa, legata alla specificità di ciascuna desaturasi per il proprio substrato. La prima desaturasi ad inserire il doppio legame è sempre la $\Delta 9$ e la seconda a catalizzare la reazione di desaturazione è la $\Delta 12$. Questa può, infatti, operare solo se è presente almeno un doppio legame nella catena acilica. La $\Delta 6$ e la $\Delta 15(\omega 3)$ desaturasi, invece, riconoscendo come substrato solo specie aciliche con almeno due doppi legami intervengono sempre per ultime nelle reazioni di desaturazione (Murata & Wada, 1995).

Sembra che le insaturazioni in posizione sn-2 (C18) nei gruppi 1 e 2 e l'insaturazione $\Delta 6$ in posizione sn-1 (C16) nei gruppi 3 e 4 siano confinate al MGDG, con esclusione del SQDG e del PG. E', inoltre, probabile che la desaturazione non avvenga negli acidi grassi legati al DGDG, il quale verrebbe prodotto in seguito a galattosilazione del MGDG.

Tra i quattro gruppi di cianobatteri, quelli del gruppo 2 sono i più simili ai cloroplasti di piante e alghe, per il tipo di insaturazioni presenti (Murata & Wada, 1995).

Essendo proteine transmembrana, la purificazione delle desaturasi dei cianobatteri è risultata alquanto complicata e non ha permesso finora di ottenere quantità di proteina sufficienti a condurre analisi appropriate. Per questo motivo, il clonaggio e quindi la determinazione delle sequenze delle desaturasi, è stato realizzato grazie all'impiego di mutanti che mancavano di una delle forme di tali enzimi (Murata & Wada, 1995).

Il primo gene *desA*, codificante per la $\Delta 12$ desaturasi, è stato individuato grazie a un mutante di *Synechocystis* sp. PCC 6803, chiamato *Fad12*, che risultava difettivo nell'inserimento del doppio legame in posizione $\Delta 12$ (Wada *et al.*, 1993; Nishida & Murata, 1996). Esso ha una lunghezza di 1053 pb, corrispondenti a 351 residui aminoacidici. Successivamente, utilizzando una sonda derivata dal gene *desA* di *Synechocystis* sp. PCC 6803, sono stati individuati, per ibridazione eterologa, i geni *desA* di altri cianobatteri. Il confronto tra le diverse sequenze di geni *desA* ottenute ha messo in evidenza quattro domini altamente conservati, contenenti in particolare residui di istidina ed essenziali per l'attività catalitica della proteina (Avelange-Macherel *et al.*, 1995).

Utilizzando una sonda derivata dal gene *desA* di *Synechocystis* sp. PCC 6803 per effettuare uno *screening* sulla libreria genomica ottenuta da tale organismo, è stato individuato il gene *desB*, che codifica per la $\Delta 15(\omega 3)$ desaturasi e che presenta una sequenza aminoacidica della stessa lunghezza del gene *desA* (Sakamoto *et al.*, 1994; Nishida & Murata, 1996).

Il gene *desC*, codificante per la $\Delta 9$ desaturasi, è stato individuato a monte dell'estremità 5' del gene *desA* nel genoma di *Anabaena variabilis* e, successivamente, per ibridazione eterologa, in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Le sequenze aminoacidiche di tale gene, in questi due organismi, sono risultate più corte di quelle di *desA* e *desB*, corrispondendo a 318 e 272 residui aminoacidici, rispettivamente (Wada *et al.*, 1993; Nishida & Murata, 1996).

Infine, sempre in *Synechocystis* sp. PCC 6803, è stato identificato anche il gene *desD*, codificante per la $\Delta 6$ desaturasi (359 residui aminoacidici) (Reddy *et al.*, 1993; Wada *et al.*, 1993). La sequenza di questo ceppo e quella di *Spirulina platensis* C1 (Murata *et al.*, 1996) sono, attualmente, le uniche depositate nei *database* informatici per il gene *desD*.

A partire da questi primi studi, sono stati identificati e sequenziati i geni delle desaturasi degli acidi grassi di numerosi cianobatteri, anche se il numero di sequenze disponibili nei *database* informatici è ancora limitato, soprattutto per alcuni *taxa*, come l'ordine Oscillatoriales. Spesso, inoltre, le sequenze dei geni delle desaturasi che si ritrovano nei *database* informatici sono state depositate con denominazioni diverse da *desA*, *desB*, *desC* e *desD*, generando confusione a riguardo.

Per quanto riguarda la $\Delta 9$ desaturasi sono state, recentemente, trovate nel ceppo *Nostoc* sp. SO-36 due distinti geni *desC*, denominati "*desC1*" e "*desC2*" e codificanti per altrettante forme di $\Delta 9$ desaturasi (Chintalapati *et al.*, 2006). La desaturasi codificata dal gene *desC1* agirebbe sugli acidi grassi C18 in posizione sn-1 della molecola di glicerolo, mentre quella codificata dal gene *desC2* ha come substrato gli acidi grassi C16 in posizione sn-2.

Gruppo	Acidi grassi	Organismo	Riferimento
gruppo 1	C16:0, C16:1, C18:0, C18:1	<i>Mastigocladus laminosum</i> <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 <i>Synechococcus</i> sp. PCC 6301 <i>Synechococcus lividus</i>	Murata <i>et al.</i> , 1992 Murata <i>et al.</i> , 1992 Murata <i>et al.</i> , 1992 Murata <i>et al.</i> , 1992
gruppo 2	C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, α -C18:3	<i>Plectonema boryanum</i> <i>Nostoc muscorum</i> <i>Anabaena variabilis</i> <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 <i>Anabaena</i> spp. <i>Aphanizomenon</i> spp. <i>Oscillatoria agardhii</i> <i>Anabaena</i> sp. <i>Nostoc</i> sp. <i>Anabaena</i> spp. <i>Aphanizomenon</i> spp. <i>Anabaena</i> spp.	Murata <i>et al.</i> , 1992 Murata <i>et al.</i> , 1992 Murata <i>et al.</i> , 1992 Murata <i>et al.</i> , 1992 Li <i>et al.</i> , 1998 Li <i>et al.</i> , 1998 Li <i>et al.</i> , 1998 Vargas <i>et al.</i> , 1998 Vargas <i>et al.</i> , 1998 Gugger <i>et al.</i> , 2002 Gugger <i>et al.</i> , 2002 Li & Watanabe, 2004
gruppo 3	C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, γ -C18:3	<i>Spirulina platensis</i> <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6714 <i>Spirulina subsalsa</i> <i>Nostoc</i> sp. <i>Gloeobacter violaceus</i> IPPAS B-470 <i>Spirulina platensis</i> IPPAS B-256 <i>Phormidium laminosum</i> IPPAS B-407	Murata <i>et al.</i> , 1992 Murata <i>et al.</i> , 1992 Li <i>et al.</i> , 1998 Vargas <i>et al.</i> , 1998 Maslova <i>et al.</i> , 2004 Maslova <i>et al.</i> , 2004 Maslova <i>et al.</i> , 2004
gruppo 4	C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, α -C18:3, γ -C18:3, C18:4	<i>Pseudanabaena</i> sp. M2 <i>Oscillatoria splendida</i> L3 <i>Tolythrix tenuis</i> <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 <i>Microcystis</i> spp. <i>Oscillatoria raciborskii</i> , NIES-207 <i>Anabaenopsis</i> sp. <i>Nostoc</i> sp. <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> <i>Synechococcus</i> sp. IPPAS B-266	Canto de Loura <i>et al.</i> , 1987 Canto de Loura <i>et al.</i> , 1987 Murata <i>et al.</i> , 1992 Murata <i>et al.</i> , 1992 Li <i>et al.</i> , 1998 Li <i>et al.</i> , 1998 Vargas <i>et al.</i> , 1998 Vargas <i>et al.</i> , 1998 Várkonyi <i>et al.</i> , 2002 Maslova <i>et al.</i> , 2004

Tabella 2. Distribuzione di alcuni cianobatteri nei quattro gruppi creati in base al contenuto in acidi grassi, secondo diverse fonti bibliografiche.

Studi condotti sulle desaturasi di membrana di cianobatteri, piante, animali e lieviti hanno messo in luce tre domini di istidine conservati in tutte le forme note. In particolare, ciascuna forma presenta motivi aminoacidici specifici per ogni

dominio e i corrispondenti domini delle desaturasi di cianobatteri e piante sono quasi sempre identici fra loro e diversi da quelli delle acil-CoA desaturasi di animali e lieviti (Los & Murata, 1998).

1.7 MODULAZIONE DEL GRADO DI INSATURAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI E DELL'ATTIVITÀ DELLE DESATURASI NEI CIANOBATTERI

L'adattamento omeoviscoso delle membrane biologiche al variare delle condizioni ambientali è indispensabile per il mantenimento della struttura e della funzionalità delle membrane stesse, e quindi per la vitalità delle cellule.

Come già accennato, un parametro fondamentale che influisce sull'adattamento omeoviscoso è il grado di insaturazione degli acidi grassi presenti nelle membrane. Le desaturasi degli acidi grassi svolgono un importante ruolo a tal fine e sono stati ormai condotti numerosi studi, sui cianobatteri, riguardanti l'influenza di diversi parametri ambientali sull'attività di questi enzimi (Los & Murata, 1998).

La temperatura è stata fra i primi parametri indagati (Los *et al.*, 1993; Murata, 1994; Murata & Wada, 1995; Nishida & Murata, 1996; Los & Murata, 1998; Sakamoto *et al.*, 1997; Sakamoto *et al.*, 1998; Deshniun *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2002; Hongsthong *et al.*, 2003; Maslova *et al.*, 2004). Tutti gli studi effettuati riportano un aumento del grado di insaturazione degli acidi grassi componenti le membrane in seguito alla diminuzione della temperatura e il ruolo fondamentale delle desaturasi a tale riguardo. E' stato, infatti, osservato che ceppi di cianobatteri mutanti per questi enzimi sono incapaci di far fronte ad un abbassamento della temperatura, soprattutto se contemporaneamente esposti alla luce, perdendo anche la capacità di effettuare la fotosintesi. Sembra, infatti, che gli acidi grassi polinsaturi siano importanti per proteggere l'apparato fotosintetico dalla fotoinibizione alle basse temperature (Wada *et al.*, 1994; Murata & Wada, 1995; Tasaka *et al.*, 1996; Sakamoto *et al.*, 1998).

Le ricerche svolte hanno, inoltre, evidenziato quali desaturasi sono effettivamente attivate dalla diminuzione della temperatura. Infatti, mentre la $\Delta 6$, la $\Delta 12$ e la $\Delta 15(\omega 3)$ desaturasi sono modulate in risposta a variazioni di temperatura, la $\Delta 9$ desaturasi è costitutivamente espressa (Los *et al.*, 1993; Murata & Wada, 1995; Wada *et al.*, 1993; Nishida & Murata, 1996; Los & Murata, 1998; Deshniun *et al.*, 2000; Hongsthong *et al.*, 2003), con alcune eccezioni, come nel caso dei cianobatteri *Synechococcus* sp. PCC 7002 e *Synechococcus vulcanus*, dove è anch'essa regolata dalla temperatura (Sakamoto *et al.*, 1997; Los, 2004).

Recentemente, si è visto che in *Nostoc* sp. SO-36, un cianobatterio psicrofilo, i geni *desA* e *desB* sono costitutivamente espressi (Chintalapati *et al.*, 2007).

La sovraespressione dei geni delle desaturasi al diminuire della temperatura sembra dovuta sia all'aumentata trascrizione degli stessi, nei corrispondenti Mrna, sia all'aumento della stabilità dei trascritti (Los & Murata, 1994; Los *et al.*, 1997; Sakamoto & Bryant, 1997).

Vigh e collaboratori (1993) hanno dimostrato che l'idrogenazione chimica dei lipidi di membrana del cianobatterio *Synechocystis* sp. PCC 6803 induce l'espressione del gene *desA*, suggerendo che la diminuzione della fluidità di membrana potrebbe essere il primo segnale in grado di attivare le desaturasi alle basse temperature. Studi successivi hanno individuato in un'istidina chinasi di membrana, Hik33, e in un'istidina chinasi solubile, Hik19, due degli elementi che potrebbero essere coinvolti nella percezione e trasduzione del segnale alle basse temperature, comportando la conseguente attivazione di determinati geni, tra cui quelli che codificano per le desaturasi (Suzuki *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001).

Se la diminuzione della temperatura determina un aumento del grado di insaturazione delle membrane, le indagini condotte sull'aumento della temperatura mostrano un quadro leggermente più complesso rispetto al semplice aumento degli acidi grassi saturi, come ci si attenderebbe. Uno studio condotto da Gombos e collaboratori (1994) su mutanti di *Synechocystis* sp. PCC 6803 ha, infatti, messo in luce come, mentre i mutanti privi di acidi grassi trienoici presentavano un grado di tolleranza allo stress da calore comparabile agli organismi *wild-type*, ciò non era vero per i mutanti privi di acidi dienoici, che risultavano molto più sensibili. Questo suggerisce che, pur aumentando il grado di saturazione generale delle membrane in risposta alle elevate temperature, anche la presenza di determinate specie aciliche insature (C18:2) è importante nel proteggere l'apparato fotosintetico dai danni dovuti allo stress da calore.

Un altro parametro ambientale considerato, seppur meno estesamente rispetto alla temperatura, per la sua possibile influenza sulla composizione in acidi grassi delle membrane, è la luce (Kis *et al.*, 1998; Zsiros *et al.*, 2002). Gli studi, effettuati mantenendo i cianobatteri al buio e poi sottoponendoli a determinate intensità luminose, hanno evidenziato il fatto che le desaturasi degli acidi grassi sembrano essere attivate dalla presenza di luce. In particolare, ad eccezione della $\Delta 9$ desaturasi che risulta costitutivamente espressa, sembra che la luce (o meglio la sua presenza/assenza) abbia un'importante ruolo nella modulazione delle desaturasi, inducendo l'espressione dei geni *desA*, *desB* e *desD*. Inoltre, secondo gli esperimenti effettuati da Kis e collaboratori (1998) l'intensità luminosa a cui vengono mantenute le colture di cianobatteri non influisce sull'attivazione delle desaturasi e quindi sulla composizione in acidi grassi delle membrane.

Sono stati condotti anche altri studi riguardanti l'effetto di salinità e nutrienti sulla composizione in acidi grassi delle membrane e sul ruolo delle desaturasi a

riguardo. Più dettagliatamente, sembra che l'aumento del grado d'insaturazione degli acidi grassi aumenti la tolleranza dei cianobatteri a stress dovuti ad elevate salinità, proteggendo soprattutto l'apparato fotosintetico e il sistema di trasportatori antiporto Na^+/H^+ (Allakhverdiev *et al.*, 2001; Rosales *et al.*, 2005). Infine, sono stati condotti altri studi concernenti l'effetto della carenza di azoto organico sulla composizione in acidi grassi delle membrane, con risultati diversi. Nel ceppo *Synechococcus* sp. PCC 6301, infatti, la mancanza di azoto organico è responsabile dell'aumento degli acidi grassi saturi e monoinsaturi, a discapito di quelli polinsaturi, diminuendo soprattutto il contenuto in acidi grassi $\omega 6$ (Ahlgren & Hyenstrand, 2003). In due ceppi di cianobatteri filamentosi, *Pseudoanabaena* sp. M2 e *Oscillatoria splendida* L3, invece, la carenza di azoto organico non sembra influire sulle percentuali dei diversi acidi grassi (Canto De Loura *et al.*, 1987).

2. SCOPO

I cianobatteri sono un gruppo di microrganismi procarioti, comprendente sia forme unicellulari coccoidi sia specie filamentose pluricellulari, in grado di effettuare la fotosintesi ossigenica e di vivere nei più svariati ambienti, tanto che alcune specie sono considerate cosmopolite. Essi sono, inoltre, in grado di colonizzare diversi tipi di substrato e di far fronte ad ampi e repentini cambiamenti ambientali, utilizzando diverse strategie adattative per il mantenimento dell'omeostasi cellulare (Coehen & Gurevitz, 1999).

Le membrane biologiche rivestono un ruolo centrale nella cellula, essendo la sede di numerose attività metaboliche. I cianobatteri, in particolare, presentano tre diversi tipi di membrane: la membrana esterna (che circonda la parete di peptidoglicano), il plasmalemma e i tilacoidi. Questi ultimi hanno origine da invaginazioni del plasmalemma e occupano gran parte del citoplasma.

In letteratura, numerosi studi rilevano come la regolazione del grado di insaturazione degli acidi grassi che compongono le membrane cellulari sia un'importante strategia adottata da diversi organismi, tra cui i cianobatteri, per adattarsi a condizioni estreme (soprattutto di temperatura) e per far fronte a variazioni della stessa nicchia in cui vivono (Gombos *et al.*, 1994; Wada *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 2002; Maslova *et al.*, 2004). Un ruolo chiave a tale proposito è svolto dalle desaturasi degli acidi grassi (Los & Murata, 1994; Murata, 1994; Sakamoto *et al.*, 1994; Sakamoto & Bryant, 1997), una superfamiglia di enzimi che catalizza l'inserimento di doppi legami nelle catene idrocarburiche degli acidi grassi. Nei cianobatteri ne sono stati finora identificati quattro tipi ($\Delta 6$, $\Delta 9$, $\Delta 12$, $\Delta 15(\omega 3)$): sono tutte proteine transmembrana che agiscono sulle catene aciliche di acidi grassi esterificati a glicerolipidi (Tocher *et al.*, 1998).

Il grado d'insaturazione degli acidi grassi non è, tuttavia, l'unico meccanismo con cui gli organismi fotosintetici sono in grado di modulare la fluidità delle loro membrane e di preservare l'integrità e la funzionalità degli enzimi presenti in esse in risposta a variazioni e stress ambientali. A questo proposito sembrano avere un ruolo importante i carotenoidi presenti nelle membrane stesse. Questi pigmenti, infatti, svolgono non solo il ruolo di pigmenti antenna e di *scavenger* delle specie reattive dell'ossigeno, ma sembrano dare un importante contributo al mantenimento delle proprietà fisiche delle membrane degli organismi fotosintetici (Gruszecki & Strzalka, 2005).

L'ambiente termale del Comprensorio Euganeo (PD) è rappresentato da stabilimenti, dove il fango termale usato per la fangoterapia viene sottoposto ad un processo di maturazione in apposite vasche, costantemente irrorate con acqua termale. Durante tale processo di maturazione, il fango è colonizzato da

numerosi microrganismi, soprattutto cianobatteri, che costituiscono i feltri verdi-azzurri visibili sulla sua superficie. L'ambiente delle vasche termali è caratterizzato da ampie variazioni sia di luce, dovuta all'irraggiamento solare, sia di temperatura. Per quanto riguarda quest'ultimo parametro, infatti, le temperature delle vasche in cui il fango è sottoposto a maturazione arrivano a 40-50°C, mentre quelle delle vasche in cui il fango è lasciato a riposo possono scendere anche sotto i 30°C.

Questo progetto di Dottorato si è proposto di studiare l'influenza di luce e temperatura sugli adattamenti, a livello di membrana, di un cianobatterio filamentoso isolato da una vasca di stoccaggio del fango termale di un hotel del Comprensorio Euganeo.

L'organismo isolato è stato caratterizzato utilizzando un approccio di tipo polifasico, comprendente indagini morfologiche e ultrastrutturali (MO, SEM, TEM), analisi biochimiche e fisiologiche e indagini molecolari. Queste ultime sono state condotte utilizzando diversi *marker* molecolari (16S rDNA, 16S-23S ITS, *rpoC1*, *gyrB*, *cpcAB*, *rbcL*) e confrontando le sequenze nucleotidiche del ceppo in esame con quelle di altri cianobatteri opportunamente acquistati da banche algali.

Sono state successivamente indagate le variazioni in crescita, morfologia, ultrastruttura, composizione in acidi grassi e composizione in carotenoidi dell'organismo posto a crescere a tre diverse temperature (20°C, 30°C e 40°C) e a tre differenti intensità luminose (5-7 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 14-16 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 43-47 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

L'analisi della composizione in acidi grassi, è stata infine completata dall'individuazione dei geni per le desaturasi presenti. Le sequenze complete ottenute per tali enzimi sono state impiegate, assieme alle altre disponibili nel *database* Genbank, per un'analisi dell'evoluzione molecolare di tali proteine a livello dei cianobatteri.

3. MATERIALI E METODI

3.1 RACCOLTA E ALLESTIMENTO DELLE COLTURE CIANOBATTERICHE

Nel maggio 2005, sono stati raccolti presso le vasche di stoccaggio del fango termale dell'hotel Garden di Montegrotto Terme (Padova) campioni di feltri cianobatterici, dal caratteristico colore verde-azzurro. Al momento del prelievo l'acqua delle vasche presentava una temperatura di circa 45 °C ed un Ph di 6.8. Successivamente, in laboratorio, sub-campioni di questi feltri sono stati messi in coltura in terreno solido BG11 (Rippka *et al.*, 1979) e posti in una cella climatica alla temperatura di 30°C ed all'intensità luminosa di 10 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con un fotoperiodo di 12 ore. Il materiale sviluppatosi è stato, poi, utilizzato per allestire colture pure che sono state mantenute in terreno liquido BG11, alle condizioni di luce e temperatura originarie (colture di mantenimento). Dalle colture così allestite sono stati isolati alcuni cianobatteri, uno dei quali è l'oggetto di questa tesi.

3.2 ALLESTIMENTO DI COLTURE DEL CIANOBATTERIO A DIVERSE CONDIZIONI DI LUCE E TEMPERATURA

A partire dalle colture inizialmente allestite sono stati effettuati dei nuovi inoculi, sempre in terreno liquido BG11, per ottenere colture “madri” da mantenere a diverse condizioni di temperatura e di luce.

Alcune colture sono state, quindi, poste a crescere a tre diverse intensità luminose, qui indicate come bassa (5-7 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), media (14-16 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e alta luce (43-47 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), con un fotoperiodo di 12 ore e ad una temperatura costante di 30°C. Altre colture del cianobatterio sono state, invece, mantenute a tre diverse temperature (20°C, 30°C e 40°C) e ad un'intensità luminosa di 14-16 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con un fotoperiodo di 12 ore. In tutte le condizioni testate la fonte di luce era rappresentata da lampade fluorescenti a luce bianca (L 30W/827, OSRAM), opportunamente regolate e la temperatura veniva mantenuta tramite appositi bagnetti termostatici.

Dalle colture “madri”, adattate alle diverse condizioni di luce e temperatura per almeno un mese, sono stati effettuati altri inoculi sempre in terreno liquido BG11, mantenendo, poi, ciascuno alle condizioni della rispettiva coltura “madre”. Le nuove colture così ottenute sono state utilizzate per i diversi esperimenti.

3.3 COSTRUZIONE DELLE CURVE DI CRESCITA ALLE DIVERSE CONDIZIONI DI COLTURA

E' stata seguita la crescita dell'organismo alle diverse condizioni sperimentali per 4 settimane, misurando l'aumento nel tempo delle concentrazioni di clorofilla e carotenoidi ($\mu\text{g/ml}$) con cadenza bisettimanale.

Dopo aver omogeneizzato tramite sonicatore (BRANSON 1200) un opportuno volume di coltura di ciascuna delle diverse condizioni allestite, sono stati effettuati degli inoculi corrispondenti a 1 unità di O.D. (750 nm) in terreno liquido BG11 (in provette sterili per microbiologia).

Per ogni condizione di crescita sono state allestite 10 provette, per un volume finale di coltura di 6 ml ciascuna, poste poi a crescere alle diverse condizioni di luce e temperatura.

Le concentrazioni di clorofilla *a* e di carotenoidi sono state determinate secondo quanto riportato in Porra *et al.* (1989) e Sakamoto & Bryant (1998), rispettivamente.

3.4 CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA, ULTRASTRUTTURALE E FISIOLÓGICA

3.4.1 Crescita dell'organismo in terreno privo di azoto

Per valutare la capacità dell'organismo di fissare l'azoto, sono state allestite delle colture, utilizzando come mezzo di crescita terreno BG11₀, in cui l' NaNO_3 è sostituito da una concentrazione equimolare di NaCl (Rippka *et al.*, 1979). L'organismo è stato quindi posto a crescere a 30°C e ad un'intensità luminosa di 10 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con un fotoperiodo di 12 ore.

3.4.2 Microscopia ottica

Le osservazioni al microscopio ottico sono state condotte utilizzando un microscopio *Leica DMR5000*, operante sia in luce visibile sia in fluorescenza e munito di analizzatore di immagine digitale. Per visualizzare la caratteristica fluorescenza rossa della clorofilla, i campioni sono stati osservati dopo eccitazione con luce UV (340-380 nm) (Fry, 1988).

Sono stati osservati campioni sia delle colture di mantenimento sia delle colture cresciute alle diverse condizioni di crescita.

3.4.3 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

Campioni, sia delle colture di mantenimento sia delle colture poste alle diverse condizioni di luce e temperatura, sono stati fissati in glutaraldeide al 6% in

tampone cacodilato 0.1 M (Ph 6.9), post-fissati in tetrossido di osmio (OsO₄) 1% in tampone cacodilato 0.1 M (Ph 6.9) e sottoposti a disidratazione mediante soluzioni di alcool etilico a concentrazioni crescenti (Moro *et al.*, 2007).

Si è, infine, proceduto al “*critical point drying*” e alla metallizzazione con oro.

Le osservazioni sono state condotte con un microscopio elettronico a scansione (Stereoscan 260-Cambridge) operante a 25 Kv.

3.4.4 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

Campioni, sia delle colture di mantenimento sia delle colture poste alle diverse condizioni di luce e temperatura, sono stati fissati in glutaraldeide al 6% % in tampone cacodilato 0.1 M (Ph 6.9), post-fissati in tetrossido di osmio 1% e disidratati mediante soluzioni acquose di alcool etilico a concentrazioni crescenti. A metà delle fasi di disidratazione, i campioni sono stati contrastati con una soluzione di acetato di uranile in alcool 75%.

Si è, infine, sostituito l'alcool con ossido di propilene e si è proceduto all'inclusione in Araldite (Durcupan® ACM Fluka), ponendo i campioni in miscele resina/ossido di propilene con proporzioni crescenti di resina (Moro *et al.*, 2007).

Mediante un ultramicrotomo (Ultracut Reichert-Jung), sono state ottenute sezioni ultrasottili (80-90 nm di spessore) dei vari campioni, successivamente contrastate con citrato di piombo.

L'osservazione delle sezioni è stata effettuata con un microscopio elettronico a trasmissione (Hitachi H300) operante a 75 Kv.

3.5 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

3.5.1 Scelta dei *marker* molecolari e dei relativi *primer* per le reazioni di amplificazione

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

I *primer* scelti per l'amplificazione del frammento genomico corrispondente al 16S rDNA, denominati 16S1 e 16S2, sono stati sviluppati da Kobayashi (dati non pubblicati) sulla sequenza genica del 16S rDNA di *Synechococcus elongatus* (*accession number* D83715). Per il sequenziamento sono stati, invece, utilizzati dei *primer* (16S3, 16S4, 16S5, 16S6) disegnati precedentemente nel laboratorio dove ho

svolto il mio Dottorato sull'allineamento delle sequenze geniche del 16S rDNA, presenti nella banca dati Genbank dell'NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (www.ncbi.nlm.nih.gov/), dei seguenti cianobatteri: *Phormidium ambiguum* AB003167; *Stanieria cyanosphaera* AF132931; *Anabaena cilindrica* AF091150; *Nodularia* sp. PCC9350 AY038034; *Trichodesmium erythraeum* AF013030; *Oscillatoria sancta* AF132933; *Synechococcus elongatus* D83715 (tab. 3).

Sigla	Sequenza dei <i>primer</i>	Orientamento
16S1	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	Senso
16S2	5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'	Antisenso
16S3	5'-CTACGGGAGGCAGCAGTG-3'	Senso
16S4	5'-CACTGCTGCCTCCCGTAG-3'	Antisenso
16S5	5'-ATACCCAGTAGTCCTAG-3'	Senso
16S6	5'-TAAACCACATACTCCACC-3'	Antisenso

Tabella 3: elenco dei *primer* utilizzati per amplificare e sequenziare il gene 16S rDNA.

Un altro *marker* molecolare utilizzato è stato il 16S-23S ITS. I *primer* utilizzati, sia per l'amplificazione che per il successivo sequenziamento di tale *locus*, sono quelli riportati in Papke *et al.*, 2003. Essi, denominati 1070F e 23R, permettono di amplificare un frammento nucleotidico che comprende l'ultimo terzo della sequenza del 16S rDNA, la regione ITS e l'inizio del gene 23S rDNA (tab. 2).

Il gene *rpoC1* è stato un ulteriore *marker* scelto per caratterizzare il cianobatterio oggetto di questa tesi. I *primer* usati, sia per l'amplificazione che per il sequenziamento del suddetto *locus*, sono quelli riportati in Seo & Yokota, 2003, con la denominazione di *rpc/MF* e *rpc/CR-1* (tab. 2).

Un'altra sequenza nucleotidica sempre più utilizzata nell'identificazione dei procarioti, e scelta anche in questa tesi, è stato il gene *gyrB*. Anche per questo *marker* molecolare i *primer* utilizzati, sia per l'amplificazione (*GB/3MF* e *GB/CR-2*) che per il sequenziamento (*GB/M240F* e *GB/M250F*, oltre a quelli già usati nell'amplificazione), sono stati tratti dal lavoro di Seo & Yokota, 2003.

Per l'identificazione dell'organismo in esame si è deciso di usare anche parte della sequenza nucleotidica dell'operone per la ficocianina, in particolare il *locus cpcB-IGS-cpcA*. I *primer* utilizzati, sia per l'amplificazione che per il sequenziamento del suddetto frammento, sono quelli contenuti in Ballot *et al.*, 2004 con il nome *cpc_arF* e *cpc_arR* (tab. 2).

Infine, l'ultimo *marker* scelto per la caratterizzazione molecolare dell'organismo in esame è stato il gene *rbcL*. Sia per l'amplificazione che per il sequenziamento del

locus rbcL, sono state utilizzate due coppie di *primer*, riportati in Tomitani *et al.*, 2006 con le seguenti denominazioni: GF-AB e GR-D, GF-C e GR-E (tab. 4).

Sigla	Sequenza del <i>primer</i>	Orientamento
1070F	5'- ATGGCTGTCGTCAGCT -3'	Senso
23R	5'- TGCCTAGGTATCCACC -3'	Antisenso
rpc/MF	5'- GGRGANGTNACNAARCCNGARAC -3'	Senso
rpc/CR-1	5'- CCNGARTARTCNACNCKYTTNCC -3'	Antisenso
GB/3MF	5'- AAGCGHCCNGSNATGTAYATHGG -3'	Senso
GB/CR-2	5'- CCNGCNGARTCNCCYTCNAC -3'	Antisenso
GB/M240F	5'- GTVTCVGGGBGGNYTNCANGG -3'	Senso
GB/M250F	5'- CAYGCNGGNGGNAARTTTGG -3'	Senso
cpc_arF	5'- TCGAAGATCGTTGCTTGAACG -3'	Senso
cpc_arR	5'- TTAGGTCCCTGCATTTGGGTG -3'	Antisenso
GF-AB	5'- GARTCTTTCIACYGGTACYTGGAC -3'	Senso
GR-D	5'- TGCCAACGTGGATAACCACC -3'	Antisenso
GF-C	5'- CTTYACYCAAGACTGGGCTTC -3'	Senso
GR-E	5'- AACTCRAACTTGATTTTCYTTCC -3'	Antisenso

Tabella 4: elenco dei *primer* utilizzati per amplificare e sequenziare la sequenza del 16S-23S ITS e dei geni *rpoC1*, *gyrB*, *cpcB-IGS-cpcA* e *rbcL*.

3.5.2. Altri ceppi di cianobatteri necessari a completare l'analisi

Poiché per i *marker* molecolari scelti, eccetto i *loci* 16S rDNA e 16S-23S ITS, erano disponibili nei *database* informatici pochissime sequenze per i membri dell'ordine Oscillatoriales, al quale il cianobatterio oggetto di questa tesi sembrava appartenere dall'indagine morfologica e ultrastrutturale condotta, sono stati ordinati da diverse banche algali alcuni ceppi cianobatterici appartenenti a tale ordine. Ciò allo scopo di amplificare e determinare, anche per questi organismi, le sequenze dei *marker* molecolari sopra descritti e di utilizzarle nella successiva analisi filogenetica.

Sono stati, quindi, acquistati i seguenti ceppi cianobatterici: *Lyngbya aestuarii* PCC 7419; *Oscillatoria sancta* PCC 7515; *Oscillatoria tenuis* PCC 9107; *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759 e *Phormidium autumnale* CCALA 143.

Tutti i suddetti ceppi sono stati messi in coltura in terreno liquido BG11 (Rippka *et al.*, 1979), tranne *Lyngbya aestuarii* PCC 7419 e *Lyngbya majuscula* CCAP 1446/4 che sono state messe a crescere in una coltura liquida composta da BG11 e ASN-

III (Rippka *et al.*, 1979) in rapporto 1:1 (vol/vol), e posti a temperatura ambiente, all'intensità luminosa di 5-10 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in luce bianca fluorescente continua (L 30W/827, OSRAM).

3.5.3 Progettazione dei *primer* per il gene *nifD*

Per avere una conferma a livello molecolare della capacità dell'organismo di fissare l'azoto atmosferico, si è voluto cercare la presenza nel genoma del gene *nifD*, il quale codifica per due subunità della dinitrogenasi, una componente del complesso multiproteico della nitrogenasi (Henson *et al.*, 2004).

Sono state, quindi, cercate le sequenze cianobatteriche disponibili per il gene *nifD* nel database Genbank, scegliendo le sequenze complete di alcuni cianobatteri filamentosi (tab. 5).

<i>NifD</i> accession nr	organismo
EF576872	<i>Symploca atlantica</i> PCC 8002
EF576870	<i>Oscillatoria sancta</i> PCC 7515
EF576869	<i>Lyngbya aestuarii</i> PCC 7419
EF576868	<i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 7409
EF576867	<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7375
EF576865	<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 73110
EF576864	<i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 7403
EF576859	<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7104
EF576858	<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7004
EF576857	<i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 6802
EF576854	<i>Leptolyngbya boryana</i> PCC 6306
AY196954	<i>Scytonema</i> sp. PCC 7814
AY196953	<i>Calothrix</i> sp. PCC 7101
V01482	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120
AY196952	<i>Cylindrospermum majus</i> PCC 7604
AF442509	<i>Nodularia spumigena</i> PCC 73104
AF442506	<i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122
AF442504	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120
AF442503	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7423

Tabella 5: elenco delle sequenze utilizzate nella costruzione dei *primer* per il gene *nifD*.

Le sequenze così ottenute sono state allineate tramite il programma *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994), disponibile sul sito dell'NPSA@ (*Network Protein Sequence @analysis*) (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html).

A livello delle regioni più conservate del multiallineamento, sono stati scelti il *primer* senso NifD1F (TYGGWGGHGACAARAARCT) e il *primer* antisenso NifD2R (TARTCCCARGAGTGCATYTG).

3.5.4 Purificazione del DNA genomico

Su una quantità sufficiente di materiale di coltura è stata eseguita l'estrazione del DNA genomico utilizzando il *Genomic DNA Purification Kit* (FERMENTAS®), risospendendo il DNA ottenuto sottoforma di pellet in un opportuno volume di tampone TE (10 Mm Tris/HCl, Ph 8; 1 Mm EDTA).

La stima della concentrazione e della qualità del DNA estratto è stata determinata mediante un'analisi allo spettrofotometro (Beckam DU-530).

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

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate, a partire dal DNA genomico estratto, mediante una *Taq* DNA polimerasi (FISHER) e un termociclatore in grado di lavorare in gradiente (Peltier Thermal Cycler PTC-200, MJ RESEARCH).

Le reazioni effettuate consistevano nella ripetizione ciclica di tre fasi:

- denaturazione del DNA genomico a 94-95°C;
- appaiamento (*annealing*) dei *primer* alle sequenze complementari, la cui temperatura veniva individuata in base ai *primer* utilizzati;
- estensione dei *primer* a 72°C.

I cicli erano preceduti da una prima fase di denaturazione a 94-95°C e succeduti da una fase finale di estensione a 72°C.

La durata delle varie fasi e il numero di cicli effettuati venivano determinati di volta in volta empiricamente in base al frammento da amplificare.

3.5.6 Analisi degli amplificati mediante elettroforesi su gel di agarosio

I prodotti delle reazioni di amplificazione venivano analizzati mediante elettroforesi in gel d'agarosio (*Agarose UltraPure*, GIBCO) 1% in tampone TE 1X (TRIS 10 Mm; EDTA 1 Mm Ph 8), a cui era stato aggiunto preventivamente dell'etidio bromuro (0,5 µg/ml, SIGMA).

Come *standard* per l'identificazione degli amplificati è stato utilizzato il *Low DNA Mass Ladder* (INVITROGEN).

Terminata la corsa elettroforetica, il gel veniva osservato ai raggi UV (250-320 nm), tramite un transilluminatore collegato ad una telecamera, e quindi fotografato utilizzando il programma *Gel Doc 1000* (Biorad).

3.5.7 Purificazione degli amplificati

Nei casi in cui, dopo l'analisi mediante corsa elettroforetica, gli amplificati risultavano privi di prodotti aspecifici, si procedeva alla purificazione enzimatica con esonucleasi I e fosfatasi alcalina (*ExoSAP-IT™ kit*, Amersham Biosciences). Se, invece, durante l'osservazione degli amplificati al transilluminatore si osservavano bande multiple, le bande d'interesse venivano estratte da gel e purificate utilizzando il *DNA Gel Extraction Kit* (MILLIPORE), dopo aver sottoposto gli amplificati a nuova corsa elettroforetica in gel d'agarosio (2% in tampone TAE 1X modificato, fornito dal suddetto *kit*).

3.5.8 Sequenziamento del DNA

La determinazione delle sequenze è automatica ed è stata effettuata presso *BMR Genomics* (<http://www.bmr-genomics.it>), secondo il metodo di Sanger, mediante l'uso del kit *ABI PRISM Dye Terminator Sequencing Core* (Perkin Elmer). L'elettroforesi delle reazioni di sequenza è stata eseguita con il sequenziatore automatico *ABI PRISM 377*, versione 2.1.1.

La quantità di campione da mandare a sequenziare veniva calcolata e preparata in base alla sua concentrazione e alla sua dimensione in paia di basi, secondo le indicazioni fornite da *BMR Genomics*.

3.5.9 Analisi delle sequenze ottenute

Le sequenze nucleotidiche risultanti dal sequenziamento sono state fornite dal *BMR Genomics* sotto forma di elettroferogrammi, poi visualizzati e analizzati tramite il programma *Chromas LITE 2.01* (disponibile presso il sito http://www.technelysium.co.au/chromas_lite.html).

Per ottenere la sequenza consenso dell'intero gene, i singoli elettroferogrammi ottenuti mediante il sequenziamento parziale dei prodotti di PCR sono stati assemblati tra loro e analizzati, utilizzando il pacchetto di programmi *DNASTAR®* (Madison, WI).

La sequenza nucleotidica consenso così ottenuta è stata confrontata con le altre disponibili nel *database* Genbank, mediante il programma *BLAST* (Altschul *et al.*, 1990).

3.5.10 Costruzione degli allineamenti multipli

Utilizzando le sequenze ottenute nelle reazioni d'amplificazione e sequenziamento e le altre sequenze disponibili nella banca dati Genbank, sono stati costruiti diversi *dataset* per ciascun *marker* molecolare scelto.

Le sequenze di ciascun *dataset* sono state allineate tramite il programma *ClustalW*.

L'allineamento delle sequenze del gene 16S rDNA è stato modificato tramite il programma *Gblocks* 0.91b (http://molevol.ibmb.csic.es/Gblocks_server/), mentre quelli delle altre sequenze *marker* codificanti sono stati modificati manualmente, dove necessario, dopo analisi con il programma *EMBOSS Transeq*, rinvenibile sul sito dell'EBI (*European Bioinformatics Institute*) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools>).

3.5.10 Determinazione del segnale filogenetico

Gli allineamenti multipli sono stati analizzati per stimare *a priori* la quantità di segnale filogenetico che presentavano.

Infatti, quando si decide di utilizzare determinate sequenze nucleotidiche per ricostruire i rapporti filogenetici fra un gruppo di organismi, bisogna valutare se esse siano adeguate allo scopo. In particolare, se le sequenze in questione si sono diversificate fra loro oltre un certo livello, non è più possibile costruire un albero filogenetico che ne riveli i reali rapporti di parentela; mentre è possibile farlo se il processo di diversificazione non è stato troppo spinto (Nei & Kumar, 2000).

Il segnale filogenetico presente in un *dataset* di sequenze allineate è un indice diretto del grado di risoluzione dell'albero filogenetico con esse ottenuto. Esistono vari metodi usati per definire il segnale filogenetico presente in un dato *dataset*. In questa tesi è stato utilizzato il metodo del *likelihood-mapping*, che consente di ottenere una visualizzazione grafica del segnale filogenetico presente nelle sequenze multiallineate di partenza, mediante un algoritmo chiamato *quartet puzzling* (Strimmer & von Haeseler, 1997).

Brevemente, date quattro sequenze (quartetto), è possibile ottenere solamente tre differenti alberi filogenetici completamente risolti (fig. S), cioè dicotomici.

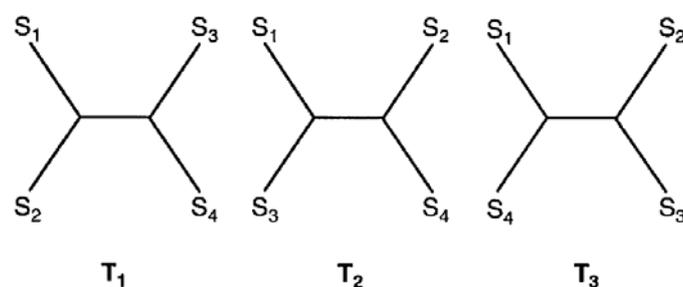


Fig. S: le tre topologie di albero completamente risolte, T_1 , T_2 , T_3 , che connettono le quattro sequenze (quartetto) S_1 , S_2 , S_3 , S_4 (da Strimmer & von Haeseler, 1997).

I tre alberi concorrenti possono essere equiprobabili oppure uno dei tre può essere nettamente favorito in confronto agli altri due, in base ai valori di *likelihood* L_1 , L_2 , L_3 , calcolati rispettivamente per ciascuna topologia (Strimmer & von Haeseler, 1997). Dati i tre alberi filogenetici T_1 , T_2 , T_3 , la probabilità p_i , definita a posteriori, che le quattro sequenze siano unite tra loro da una di queste tre topologie è, quindi, definita come:

$$p_i = L_i / (L_1 + L_2 + L_3)$$

Le probabilità p_1 , p_2 , p_3 possono essere considerate come le coordinate baricentriche di un punto \mathbf{P} (p_1, p_2, p_3) che, in un piano cartesiano, viene a cadere all'interno del triangolo equilatero di vertici corrispondenti alle coordinate baricentriche delle tre topologie completamente risolte: T_1 (1,0,0), T_2 (0,1,0), T_3 (0,0,1). Le probabilità p_1 , p_2 , p_3 corrispondono, quindi, alle lunghezze delle perpendicolari tracciate dal punto \mathbf{P} ai lati del triangolo equilatero (fig. T).

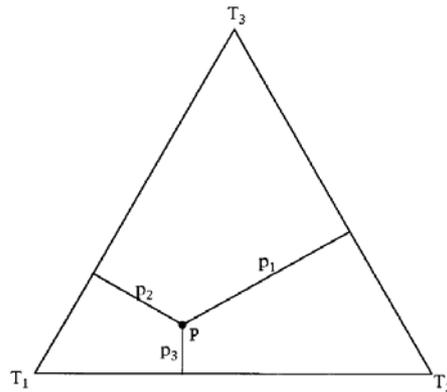


Fig. T: mappatura del vettore di probabilità \mathbf{P} (p_1, p_2, p_3), all'interno del triangolo equilatero. I tre angoli T_1, T_2, T_3 rappresentano le tre topologie completamente risolte, con coordinate (1,0,0), (0,1,0) e (0,0,1) (da Strimmer & von Haeseler, 1997).

Se i valori di *likelihood* favoriscono nettamente uno dei tre possibili alberi, T_1 , T_2 , T_3 , sugli altri, il punto \mathbf{P} coinciderà con il corrispondente vertice del triangolo. Se, invece, T_1, T_2, T_3 sono equiprobabili, e quindi le relazioni filogenetiche intercorrenti fra le quattro sequenze irrisolte, il punto \mathbf{P} coinciderà con il centro \mathbf{C} del triangolo: $\mathbf{P} \equiv \mathbf{C}$ (1,1,1). Tra questi due casi estremi ci sono, poi, tutte le altre possibili relazioni intercorrenti tra le topologie alternative, le quali sono rappresentate da punti localizzati in una delle tre regioni in cui risulta suddiviso il triangolo tracciando le perpendicolari dal centro \mathbf{C} ai lati (fig. U). Ognuna di

queste suddivisioni, o bacini d'attrazione, rappresenta la regione in cui la probabilità di ottenere l'albero T_i è massima.

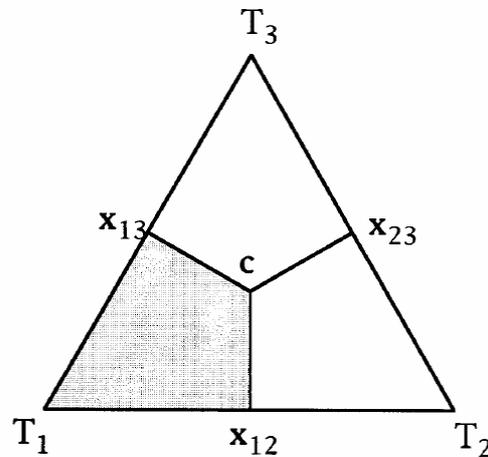


Fig. U: bacini d'attrazione per le tre topologie T_1 , T_2 e T_3 . L'area colorata in grigio rappresenta la regione in cui è massima la probabilità per l'albero T_1 . Nel centro C ($1/3, 1/3, 1/3$) i tre alberi sono equiprobabili, mentre nei punti x_{12} ($1/2, 1/2, 0$), x_{13} ($1/2, 0, 1/2$) e x_{23} ($0, 1/2, 1/2$) due topologie hanno la stessa probabilità, mentre la terza ha probabilità uguale a 0 (da Strimmer & von Haeseler, 1997).

Nel triangolo si possono ulteriormente identificare sette bacini di attrazione (fig. V), in cui ricadono i punti P calcolati per i diversi quartetti di sequenze. In base a dove si collocano tali punti, le relazioni tra i quartetti di sequenze risulteranno totalmente risolte (A_1, A_2, A_3); parzialmente risolte (A_{13}, A_{12}, A_{23}) o completamente irrisolte (A_{123}).

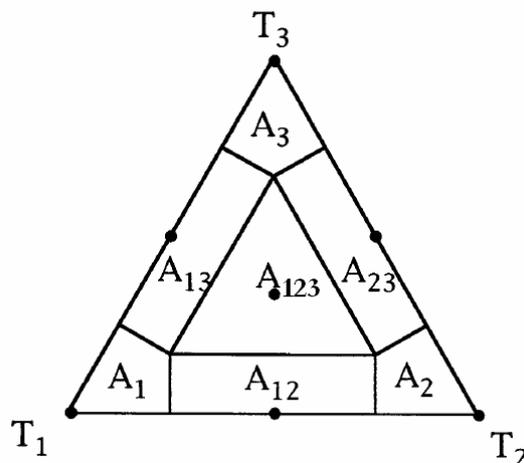


Fig. V: i sette bacini d'attrazione in cui può essere ulteriormente suddiviso l'albero, comprendenti le regioni in cui le relazioni filogenetiche fra le sequenze sono totalmente risolte (A_1, A_2, A_3), solo parzialmente risolte (A_{12}, A_{13}, A_{23}) o completamente irrisolte (A_{123}) (da Strimmer & von Haeseler, 1997).

A partire da ciascun multi-allineamento di sequenze, sono stati, quindi, calcolati e mappati nel triangolo equilatero sopra descritto i punti **P**, per tutti i possibili quartetti di sequenze del *dataset*, mediante il programma *TREEPUZZLE* 5.2 (Schmidt *et al.*, 2002), disponibile nel sito <http://www.tree-puzzle.de/>. Quanto maggiore è la percentuale di punti che ricadono nelle regioni A_1 , A_2 , A_3 del triangolo, tanto maggiore è il segnale filogenetico contenuto nel dataset di partenza.

3.5.11 Costruzione degli alberi filogenetici

A partire dai *dataset* costruiti, tramite il programma *PHYML* 2.4 (Guindon & Gascuel, 2003), sono state effettuate delle ricostruzioni filogenetiche secondo il metodo del *Maximum likelihood* (ML) e il modello GTR+I+G (Lanave *et al.*, 1984). La robustezza di ciascuna delle topologie ottenute è stata valutata applicando il test di *Bootstrap* (BT) (Felsenstein, 1985), con 1000 repliche.

Gli alberi filogenetici così generati sono stati visualizzati con il programma *Njplot* (Perrière & Gouy, 1996).

Infine, per alcune sequenze, scelte in base alle topologie ottenute, sono state calcolate le *p-distance* con il programma *MEGA4* (Tamura *et al.*, 2007).

3.6 CARATTERIZZAZIONE DELL'ASSETTO PIGMENTARIO

3.6.1 Analisi dei pigmenti idrosolubili: le ficobiliproteine

Le ficobiliproteine del cianobatterio in studio sono state estratte frantumando campioni di coltura con mortaio e pestello e aggiungendo un'opportuna quantità di tampone fosfato (NaH_2PO_4 0.01M, NaCl 0.15M, Ph 7).

Dopo centrifugazione a 18000xg per 4 minuti, i surnatanti, contenenti le ficobiliproteine in soluzione, sono stati analizzati mediante uno spettrofotometro (Beckam DU-530) in spettro continuo.

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

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

I pigmenti liposolubili, estratti in acetone 90%, sono stati sottoposti a corsa cromatografica in fase inversa, mediante un apparecchio per HPLC (Agilent 1100) costituito da una colonna in silice (Lichrospher® 100 RP-18, 5µm – Merck) e da un rilevatore UV-VIS e a diodi (*DAD: Diode-Array-Detector*), secondo il metodo riportato in Komárek *et al.* (1999).

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

3.7 ESTRAZIONE E ANALISI DEGLI ACIDI GRASSI

E' stata analizzata la composizione in acidi grassi dei campioni cresciuti alle diverse condizioni, secondo la seguente metodica.

Per ogni condizione di luce e temperatura testata, tre diversi campioni di coltura sono stati sottoposti a liofilizzazione, all'interno di provette da 15 ml.

Sono stati, quindi, aggiunti 3 ml di una soluzione di diclorometano:metanolo (2:1 v/v) e il tutto è stato omogeneizzato con un ULTRA-TURRAX (IKA-Labortechnik). Dopo una centrifugazione di 5 minuti a 18000xg, i surnatanti ottenuti sono stati messi in una nuova provetta da 15 ml e, ai *pellet* rimasti, sono stati aggiunti altri 3 ml di diclorometano:metanolo. I campioni sono stati, quindi, nuovamente sottoposti ad omogeneizzazione e ad un'ulteriore centrifugazione e i surnatanti così ottenuti sono stati uniti ai precedenti.

Ad ogni campione è stato aggiunto 1 ml di acqua milliQ, per eliminare le ultime tracce d'acqua presenti, ed è stata effettuata una nuova centrifugazione ottenendo due fasi: sopra quella acquosa e sotto quella contenente metanolo-diclorometano. La fase idrofobica è stata raccolta, posta in una provetta di vetro con tappo a vite e portata a secco con azoto gassoso.

Ai campioni portati a secco sono stati aggiunti 2 ml di una soluzione metanolo:acqua (9:1 v/v) e 2 ml di esano. Dopo aver vortexato e centrifugato i campioni, in ognuno di essi si sono formate due fasi: una superiore, costituita da esano con disciolti pigmenti e lipidi neutri, e una inferiore, rappresentata dal metanolo con disciolti i lipidi polari (i componenti principali delle membrane biologiche). Le due fasi sono state, quindi, separate e sono stati aggiunti 1 ml di esano nella provetta con la fase metanolica e 1 ml di metanolo 90% nella provetta con la fase in esano. Dopo aver vortexato e sottoposto a centrifugazione i campioni, sono state nuovamente divise le due fasi che si formavano. Tali lavaggi sono stati ripetuti fino a quando la fase costituita da metanolo e pigmenti polari non è diventata sufficientemente chiara.

A questo punto la fase contenente il metanolo è stata portata a secco con azoto gassoso.

Tutte le operazioni sono state effettuate nella quasi totale oscurità.

Dai campioni lipidici estratti sono stati liberati gli esteri metilici degli acidi grassi, secondo una procedura simile a quanto riportato in Christie (1982), usando una soluzione di acetato di metile seguita da una di sodio metossido 1M in metanolo, a temperatura ambiente. Come agente di terminazione della reazione è stato utilizzato acido ossalico in etere etilico. I metil-esteri di ciascun campione sono stati, infine, analizzati con la tecnica della gas-cromatografia, presso il Dipartimento di Scienze Animali di Legnaro (PD). Ogni singolo campione è stato sottoposto a due distinte corse cromatografiche.

La significatività dei dati ottenuti è stata saggiata applicando l'analisi della varianza (ANOVA) multivariata con il test *post hoc* di Duncan ($p=0,05$), mediante il *software* SPSS (<http://www.spss.it/>), e per ciascuna condizione testata è stato calcolato l'indice DBI (*Double Bond Index*). Tale indice si calcola moltiplicando la percentuale di ciascun tipo di acido grasso per il numero di doppi legami che contiene. La somma dei prodotti così ottenuti è poi divisa per 100 (Várkonyi *et al.*, 2002).

3.8 INDIVIDUAZIONE DEI DIVERSI TIPI DI DESATURASI PRESENTI

Per completare l'analisi sulla composizione in acidi grassi, sono stati individuati e sequenziati i geni per le desaturasi presenti nel genoma del cianobatterio in esame.

Sono state cercate, quindi, nel database Genbank le sequenze geniche disponibili per ciascun tipo di desaturasi degli acidi grassi presenti nei cianobatteri (*desA*, *desB*, *desC*, *desD*), costruendo così quattro diversi *dataset*.

Tramite il programma *ClustalW*, sono stati poi effettuati gli allineamenti di ciascun singolo *dataset*. Da questa prima analisi è risultato come, per ogni singolo gene in esame (*desA*, *desB*, *desC*, *desD*), le sequenze nucleotidiche dei cianobatteri coccoidi e dei cianobatteri filamentosi differivano molto fra di loro, non permettendo l'individuazione di regioni conservate. Per ciascuno dei quattro *dataset*, si è quindi proceduto ad eliminare le sequenze nucleotidiche appartenenti a cianobatteri coccoidi (eccetto la sequenza L11421 di *Synechocystis* sp. PCC 6803, che codifica per il gene *desD*), essendo l'organismo in studio di tipo filamentoso. Le sequenze effettivamente utilizzate nella costruzione dei *primer* "gene-specifici" sono elencate in tabella 6.

I *primer* così disegnati sono stati impiegati in reazioni di amplificazione e gli amplificati sono stati analizzati, secondo le procedure descritte ai paragrafi 3.4.5-3.4.8. Le sequenze ottenute sono state, quindi, visualizzate e confrontate con le altre disponibili nel *database* Genbank, come descritto al paragrafo 3.4.9.

In tabella 7 sono riportate solo le coppie di *primer* che hanno portato, infine, all'amplificazione di frammenti che mostravano un certo grado d'identità con altre sequenze di desaturasi di cianobatteri, ossia: DA1Fw e Da18Rv, per il gene *desA*; DB9Fw e DB10Rv, per il gene *desB*; DC1Fw e DC2Rv, per il gene *desC*. I *primer* scelti sono stati utilizzati anche per il sequenziamento degli amplificati. Si è voluto verificare, infine, la presenza del gene *desC2*, utilizzando i *primer* riportati in Chintalapati *et al.* (2006): *desC2F* (CGCCAGCATCATGCTCACACCGAAG), *primer* senso, e *desC2R* (5'-ATGGTTGTCTTGCTAAATCAGGCGC -3'), *primer* antisenso.

Gene	Codice d'accesso sequenza	Organismo
<i>desA</i>	D14581 (regione 1360..2412)	<i>Anabaena variabilis</i>
	AJ621245	<i>Nostoc</i> sp. S-36
<i>desB</i>	AJ621246	<i>Nostoc</i> sp. S-36
	NC_003272 (1876897..1877976)	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120
<i>desC</i>	D14581 (regione 311..1129)	<i>Anabaena variabilis</i>
	AJ621247	<i>Nostoc</i> sp. S-36
	NC_003272 (1879629..1880447)	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120
	NC_003272 (5963080..5963937)	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120
<i>desD</i>	L11421	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
	X87094	<i>Spirulina platensis</i> C1

Tabella 6: sequenze usate nella costruzione dei *primer* "gene-specifici" per i geni delle desaturasi. Nella seconda colonna sono riportati i codici di accesso delle sequenze. Tra parentesi è indicata l'esatta regione del cromosoma, nel caso in cui la sequenza sia stata presa dal genoma completo o, comunque, da un frammento più esteso di DNA dell'organismo in questione.

Sigla	Sequenza del <i>primer</i>	Orientamento	Posizione
DA1Fw	5'- AACCGTCGCAAAGC -3'	Senso	+109 → +122
DA18Rv	5'- TCCCCAGATACCAGTTGT -3'	Antisenso	+654 → +637
DB9Fw	5'- CGTATTAGTCACAGAACTCATCA -3'	Senso	+373 → +395
DB10Rv	5'- AATGTGGTGTGCTACATGAG -3'	Antisenso	+888 → +869
DC1Fw	5'- ATGACAATIGCTACTTCAAC -3'	Senso	+1 → +20
DC2Rv	5'- GTCATCCAAGTCAGATCAAC -3'	Antisenso	+755 → +736

Tabella 7: elenco dei *primer* utilizzati per amplificare e sequenziare i geni *desA*, *desB* e *desC* dell'organismo in esame. Le posizioni dei *primer* sono riferite alle sequenze *desA*, *desB* e *desC* di *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (*accession number* CP000117).

3.9 DETERMINAZIONE DELLE SEQUENZE NUCLEOTIDICHE COMPLETE DEI GENI DI DESATURASI INDIVIDUATI

Per completare le sequenze dei frammenti per i geni delle desaturasi trovati è stata utilizzata la tecnica del *Genome Walking*. Questa tecnica permette di amplificare e sequenziare regioni di DNA genomico non note, adiacenti ad una sequenza nota (Siebert *et al.*, 1995).

3.9.1 Purificazione del DNA genomico con il metodo del CTAB

Per poter effettuare la tecnica del *Genome Walking*, il DNA di partenza deve essere estremamente puro. Il DNA genomico del cianobatterio in esame è stato, perciò, estratto e purificato con il metodo del CTAB (Cetil-Trimetil-Ammonio-Bromuro). Quest'ultimo è un detergente cationico che, in soluzioni ad alta forza ionica, forma complessi con le proteine e la maggior parte dei polisaccaridi acidi, ma non precipita gli acidi nucleici che rimangono quindi in soluzione (Jones & Walker, 1963).

Per l'estrazione è stato seguito il protocollo di Doyle & Doyle (1987), dopo aver sminuzzato un'opportuna quantità di campione, con mortaio e pestello autoclavati e raffreddati con azoto liquido.

3.9.2 Determinazione delle sequenze complete mediante *Genome Walking*

Sui frammenti di sequenza di desaturasi trovati, è stata impiegata la tecnica del *Genome Walking* utilizzando il *GenomeWalkerTM Universal kit* (Clontech), che consente, a partire dal DNA genomico di interesse, di costruire quattro diversi *pool* di frammenti di DNA genomico con legata una sequenza-adattatrice contenente cinque siti di restrizione. Sono compresi nel *kit* quattro diversi enzimi di restrizione; DNA genomico umano di controllo; l'enzima T4 DNA ligasi e il suo relativo *buffer* di reazione; la sequenza adattatrice e i *primer* (primario e secondario) in grado di legarsi ad essa; una "libreria *GenomeWalker*" ottenuta da DNA genomico umano, come controllo positivo; i *primer* (primario e secondario) di controllo positivo, costruiti sull'esone I della sequenza dell'attivatore del plasminogeno *tissue-type* umano (Tpa).

Il DNA genomico estratto è stato sottoposto a digestione enzimatica mediante quattro diversi enzimi di restrizione, in grado di produrre frammenti con estremità *blunt* (*Dra* I, *EcoR* V, *Pvu* II e *Stu* I), generando così quattro diversi *pool* di frammenti genomici. Per ogni *pool* è stata, quindi, effettuata una reazione di ligazione con la sequenza-adattatrice fornita dal *kit*, catalizzata dall'enzima T4 DNA ligasi, ottenendo così quattro "librerie *GenomeWalker*" (DL1, DL2, DL3 e DL4).

A questo punto, per ogni frammento da estendere, sono state eseguite due reazioni di amplificazione per “libreria”: una reazione di PCR primaria, usando il *primer* adattatore 1 fornito dal *kit* (AP1) e un *primer* gene-specifico costruito sulla porzione di sequenza nota (GSP1), e una reazione di PCR secondaria (PCR *nested*), usando il *primer* adattatore *nested* fornito dal *kit* (AP2) e un *primer nested* gene-specifico, sempre costruito sulla sequenza nota del gene d’interesse (GSP2). Per ogni frammento da completare, il *primer* per la PCR secondaria (GSP2) era scelto a monte della regione in cui veniva disegnato il *primer* per la PCR primaria (GSP1), per “camminare” verso il 5’ della sequenza stessa; viceversa, il *primer* per la PCR secondaria (GSP2) era scelto a valle della regione in cui si attaccava il *primer* per la PCR primaria (GSP1), per “camminare” verso il 3’ della sequenza. I *primer* gene-specifici costruiti sono elencati in tabella 8.

Sigla	Tipo di <i>primer</i>	Sequenza del <i>primer</i>	Amplificato
GWA5P	GSP1/ Antisenso	5'-CGCAGATCGTTCACCCAACGACGGTTAGC-3'	5' del gene <i>desA</i>
GWA5N	GSP2/ Antisenso	5'-GCTGGCATAGCCTAAACCAACCAGCAACAC-3'	5' del gene <i>desA</i>
GWA3P	GSP1/ Senso	5'-GGCGGATTCTCCACAATTATCACCACACTC-3'	3' del gene <i>desA</i>
GWA3N	GSP2/ Senso	5'-GTTACGGGGTCGTTTTTGGTGGGTAGGA-3'	3' del gene <i>desA</i>
GWA3N2	GSP2/ Senso	5'-AGCAGAAGCAGAATGGAACGAAGCAATGG-3'	3' del gene <i>desA</i>
GWA3N3	GSP2/ Senso	5'-TTCCCCACCACGTTTGTACTGCTATTCTG-3'	3' del gene <i>desA</i>
GWB5P	GSP1/ Antisenso	5'-GAACCCCTCTTACCAGGAGAACGCTTAAACAG-3'	5' del gene <i>desB</i>
GWB5N	GSP2/ Antisenso	5'-CTTCTCAGACCAGTGCATTTGTTTCATACTTGG-3'	5' del gene <i>desB</i>
GWB3P	GSP1/ Senso	5'-GCGCCTTACATTGTGTTTGTGATTTGGTTGGA-3'	3' del gene <i>desB</i>
GWB3N	GSP2/ Senso	5'-GACCCTGATATTCCTTGGTATCGTGGTGATG-3'	3' del gene <i>desB</i>
GWC5P	GSP1/ Antisenso	5'-GTTCTGTGGGAATCTTTGTCCGCTTAGTT-3'	5' del gene <i>desC</i>
GWC5N	GSP2/ Antisenso	5'-GGCGAAGGTTGGCACAATAACCACCATACT-3'	5' del gene <i>desC</i>
GWC3P	GSP1/ Senso	5'-GTCTGAGTATAAATGATGGATGCGGTGCAGA-3'	3' del gene <i>desC</i>
GWC3N	GSP2/ Senso	5'-GATGGGTAACCTAAGCGATGGAACCCTAATGTG-3'	3' del gene <i>desC</i>

Tabella 8: *primer* gene-specifici utilizzati nelle reazioni di PCR primaria (GSP1) e di PCR secondaria (GSP2) del *Genome Walking*

Per ogni gene da completare, sia per l'estremità 5' che per l'estremità 3' della sequenza, sono state effettuate almeno otto reazioni di PCR primaria e otto di PCR secondaria: quelle delle quattro "librerie *GenomeWalker*"; due reazioni per i controlli positivi (uno usando la libreria genomica umana fornita dal *kit*, l'altro la libreria di controllo costruita a partire dal DNA genomico umano fornito dal *kit*) e due reazioni per i controlli negativi (senza templati). Per entrambi i controlli positivi sono stati usati i *primer* di controllo positivo forniti dal *kit* (PCP1 e PCP2) (tabella 9).

"Libreria" di DNA (DL)	Tubo nr	Primer PCR 1 ^a	Tubo nr	Primer PCR 2 ^a
DL1 ("libreria" ottenuta con <i>Dra</i> I)	1°	GSP1/AP1	1B	GSP2/AP2
DL2 ("libreria" ottenuta con <i>Eco</i> R V)	2°	GSP1/AP1	2B	GSP2/AP2
DL3 ("libreria" ottenuta con <i>Pvu</i> II)	3°	GSP1/AP1	3B	GSP2/AP2
DL4 ("libreria" ottenuta con <i>Stu</i> I)	4°	GSP1/AP1	4B	GSP2/AP2
Controllo negativo 1 (acqua milliQ)	5°	GSP1/AP1	5B	GSP2/AP2
Controllo positivo 1 ("libreria" con DNA genomico umano costruita dall'operatore)	6°	PCP1/AP1	6B	PCP2/AP2
Controllo negativo 2 (acqua milliQ)	7°	PCP1/AP1	7B	PCP2/AP2
Controllo positivo 2 ("libreria" con DNA genomico umano fornita pre-costruita nel <i>kit</i>)	8A	PCP1/AP1	8B	PCP2/AP2

Tabella 9: riassunto delle reazioni di PCR effettuate per il *Genome Walking*, sia del 5' che del 3' di ciascuna delle sequenze da completare

Le reazioni di amplificazione sono state condotte secondo il protocollo fornito dal *kit*, utilizzando come DNA-polimerasi l' *Advantage 2 Polymerase Mix* (Clontech) (Kellogg *et al.*, 1994).

I prodotti delle reazioni di amplificazione sono stati analizzati tramite corsa elettroforetica su gel d'agarosio 1.5%, utilizzando come marcatori di pesi molecolari il *Low DNA Mass Ladder* (INVITROGEN) e il *1 Kb DNA Extension Ladder* (INVITROGEN).

Quello che si osservava al transilluminatore era generalmente un singolo prodotto principale di PCR, in almeno 3 delle 4 "librerie", caratterizzato da un'elevata intensità luminosa, più altri prodotti secondari di minor intensità.

Le bande d'interesse sono state estratte dal gel, purificate, mandate a sequenziare e i frammenti nucleotidici ottenuti sono stati utilizzati per ricostruire le sequenze complete dei geni in esame, come descritto ai paragrafi 3.5.7-3.5.8.

3.10 ANALISI MOLECOLARE DELLE SEQUENZE DI DESATURASI OTTENUTE

Le sequenze nucleotidiche ottenute per le desaturasi degli acidi grassi dell'organismo in esame sono state tradotte in sequenze aminoacidiche, insieme alle altre disponibili nel *database GenBank* per i cianobatteri, utilizzando il programma *EMBOSS Transeq*. Il *dataset* così costruito è stato, poi, allineato mediante il programma *MUSCLE*, disponibile sul sito dell'EBI.

Per un'analisi dell'evoluzione molecolare di questi enzimi a livello dei cianobatteri, il multiallineamento ottenuto è stato analizzato con il *software ProfTest* (Abascal *et al.*, 2005), per trovare il modello di evoluzione molecolare più adatto a rappresentare i dati in esame.

Il modello trovato è stato, quindi, utilizzato per una ricostruzione dell'evoluzione delle desaturasi nei cianobatteri, secondo il metodo del *maximum likelihood* tramite il programma *PHYML44*.

L'albero filogenetico ottenuto è stato visualizzato con il *software Njplot*.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Nell'ambito di un progetto di ricerca sulla biodiversità del Comprensorio Euganeo (PD), dalla superficie del fango termale di una vasca di stoccaggio, sono stati raccolti campioni di feltri (*mats*) cianobatterici dal caratteristico colore verde-azzurro.

Sub-campioni di questi *mats* sono stati, quindi, messi a crescere in laboratorio, utilizzando come mezzo di coltura terreno BG11 (Rippka *et al.*, 1979), e dalle colture allestite sono stati isolati alcuni cianobatteri, tra cui un ceppo filamentoso di color verde brillante. Ad una prima analisi, condotta al microscopio ottico, il microrganismo isolato sembrava un cianobatterio già caratterizzato nel nostro laboratorio come *Phormidium* sp. ETS-05 (Ceschi-Berrini *et al.*, 2004).

L'amplificazione e il sequenziamento del gene 16S rDNA hanno, però, portato ad una sequenza filogeneticamente lontana (con un'identità pari all' 88,84%) da quella precedentemente ottenuta per *Phormidium* sp. ETS-05, rivelando come l'organismo in esame fosse diverso da quello precedentemente descritto.

Si è, quindi, proceduto alla caratterizzazione del nuovo organismo, denominato inizialmente "ceppo ETS-02" (dove l'acronimo "ETS" sta per "*Euganean Thermal Spring*"), mediante un approccio di tipo polifasico, tramite indagini morfologiche, ultrastrutturali, biochimiche, fisiologiche e molecolari.

4.1 CARATTERIZZAZIONE DEL CIANOBATTERIO IN ESAME

4.1.1 Caratterizzazione morfologica, ultrastrutturale e fisiologica

Per un'analisi più approfondita del cianobatterio isolato, sono state allestite colture di mantenimento ponendolo in terreno liquido BG11, a 30°C e ad un'intensità luminosa di 10 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (con un fotoperiodo di 12 ore). Altre colture sono state poste, invece, in terreno BG11₀ per valutare la capacità dell'organismo di vivere in un mezzo privo di azoto organico.

Sono state, quindi, effettuate osservazioni al microscopio ottico (in campo chiaro e in fluorescenza) e al microscopio elettronico (SEM e TEM).

Dall'indagine al microscopio ottico, il ceppo ETS-02 risulta costituito da filamenti lunghi e mobili, uniseriati, di colore verde-azzurro, fittamente intrecciati a formare feltri (*mats*) (fig. 1).

Ad un più elevato ingrandimento, i tricomi del cianobatterio, oltre a non possedere ramificazioni, risultano isopolari e terminano con cellule apicali arrotondate. Le cellule all'interno dei filamenti sono, invece, di forma discoidale, più larghe (3,5-5 μm) che lunghe (1-2 μm), e separate l'una dall'altra da una parete

ben distinta. Esse, inoltre, presentano costrizioni a livello delle pareti trasversali (figg. 2, 3). Si osserva, inoltre, come ciascun filamento sia avvolto da una guaina polisaccaridica, che talvolta protrude il tricoma stesso (fig. 3).

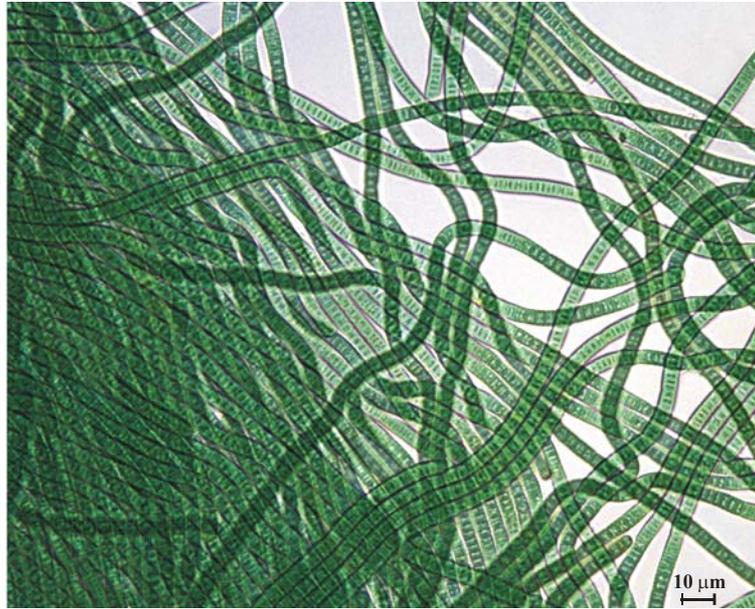
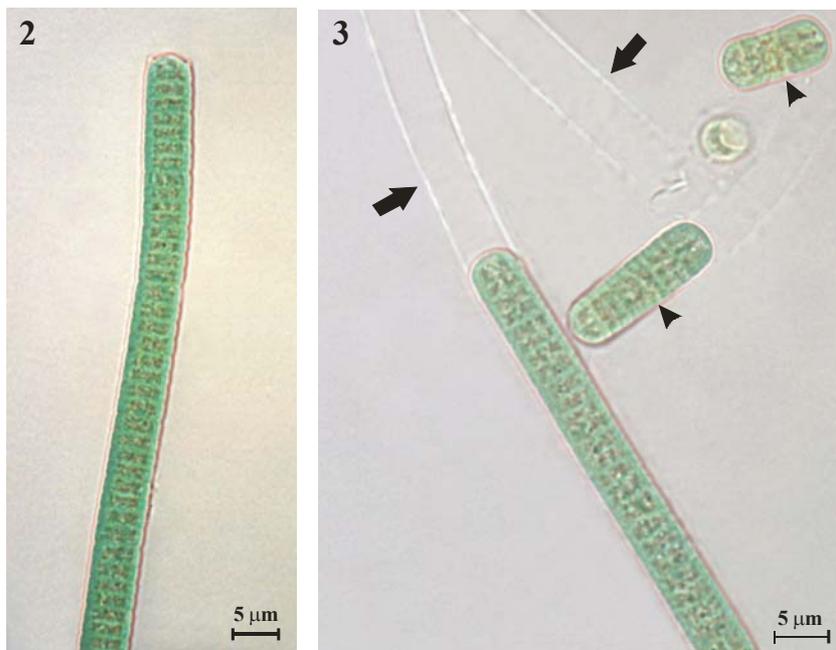


Fig. 1: particolare di un feltro che mostra il fitto intreccio dei filamenti dell'organismo in esame.



Figg. 2, 3: immagini al microscopio ottico di tricomi del cianobatterio in studio. In figura 3 sono evidenti le guaine (freccie) che circondano i singoli tricomi e alcuni ormogoni (punte di freccia).

Se posto in un mezzo di coltura privo di azoto organico, inoltre, il cianobatterio ETS-02 riesce a sopravvivere. In questo caso, però, si nota uno scolorimento generalizzato della coltura e un'abbondante produzione di materiale polisaccaridico, il quale costituisce una sorta di capsula che ingloba l'intero intreccio di filamenti (fig. 4). Al microscopio ottico non si osserva la produzione di eterocisti (fig. 5), ma risulta evidente come il tricoma perda il suo caratteristico colore verde brillante, assumendo una colorazione più chiara.

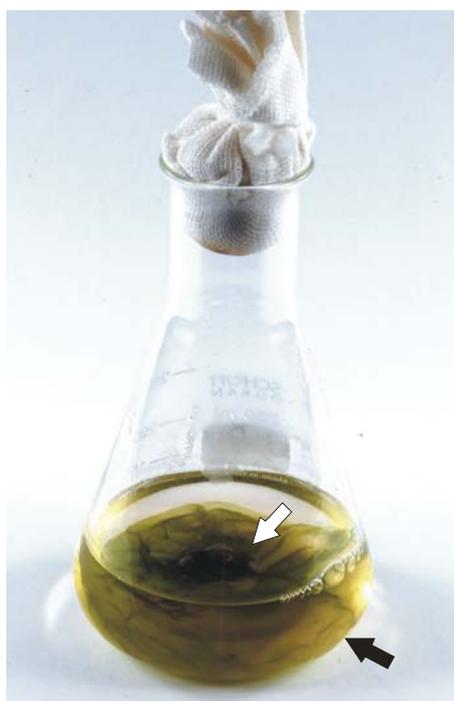


Fig. 4: beuta contenente una coltura mantenuta un mese in terreno liquido privo di azoto organico, in cui si nota l'abbondante produzione di capsula polisaccaridica (freccia nera) che circonda il fitto intreccio di filamenti (la zona verde più al centro, freccia bianca).

Queste osservazioni suggeriscono che il ceppo ETS-02 sia un cianobatterio azotofissatore non-eterocistico. La spessa capsula polisaccaridica prodotta potrebbe essere un importante adattamento dell'organismo alla condizione di assenza di azoto organico nel mezzo. Essa potrebbe, infatti, fungere da barriera contro l'ossigeno molecolare e da riserva per gli ioni ferro e calcio, favorendo, quindi, il processo di fissazione dell'azoto, come è stato proposto per altri cianobatteri azotofissatori (Reddy *et al.*, 1996; De Philippis & Vincenzini, 1998).

Le prime caratteristiche morfologiche osservate permettono di collocare, con sicurezza, il cianobatterio ETS-02 all'interno dell'attuale ordine Oscillatoriales, il quale comprende tutte le forme filamentose del *phylum* Cyanophyta, non in grado di formare eterocisti. Tale ordine è suddiviso in sei famiglie: Oscillatoriaceae,

Phormidiaceae, Gomontelliaceae, Schizotricaceae, Pseudoanabaenaceae e Borziaceae (Anagnostidis e Komárek nel 1988; Komárek & Anagnostidis, 2005).

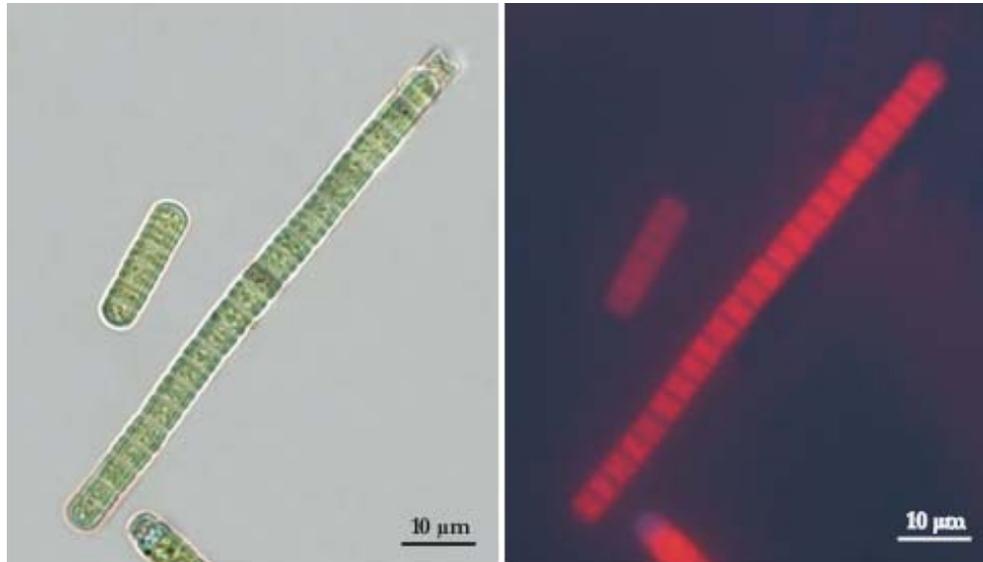


Fig. 5: a sinistra, immagine al microscopio ottico di alcuni tricomi di una coltura del cianobatterio ETS-02, mantenuta un mese in terreno privo d'azoto organico. A destra, la corrispondente immagine al microscopio ottico in fluorescenza conferma la vitalità dell'organismo in questa condizione di crescita.

Andando più in dettaglio, la presenza della guaina mucillaginosa porta ad escludere che il cianobatterio in esame possa appartenere alla famiglia delle Gomontelliaceae, i cui membri non mostrano mai tale struttura (Komárek & Anagnostidis, 2005).

Il diametro delle cellule tende, poi, ad allontanare il microorganismo anche dalle famiglie delle Schizotricaceae e delle Pseudoanabaenaceae, alle quali appartengono forme con cellule solitamente non superiori ai 3 µm di diametro. Pure la famiglia delle Oscillatoriaceae, costituita da ceppi che presentano le dimensioni maggiori dell'ordine (diametro delle cellule fra 6 e 35 µm), non sembra rappresentare il cianobatterio in esame per il carattere fenotipico considerato. Le dimensioni cellulari suggeriscono, invece, che esso possa appartenere più probabilmente alle rimanenti famiglie delle Borziaceae (3-8 µm di diametro) e delle Phormidiaceae (4-14 µm di diametro) (Komárek & Anagnostidis, 2005).

Le osservazioni condotte al MO hanno evidenziato, in aggiunta, come la riproduzione del ceppo ETS-02 avvenga per frammentazione dei filamenti a livello di cellule che vanno incontro a necrosi, dette necridi. Questi, dalla

caratteristica forma biconcava, sono ben visibili sia in luce normale (fig. 6) che in fluorescenza (fig. 7).

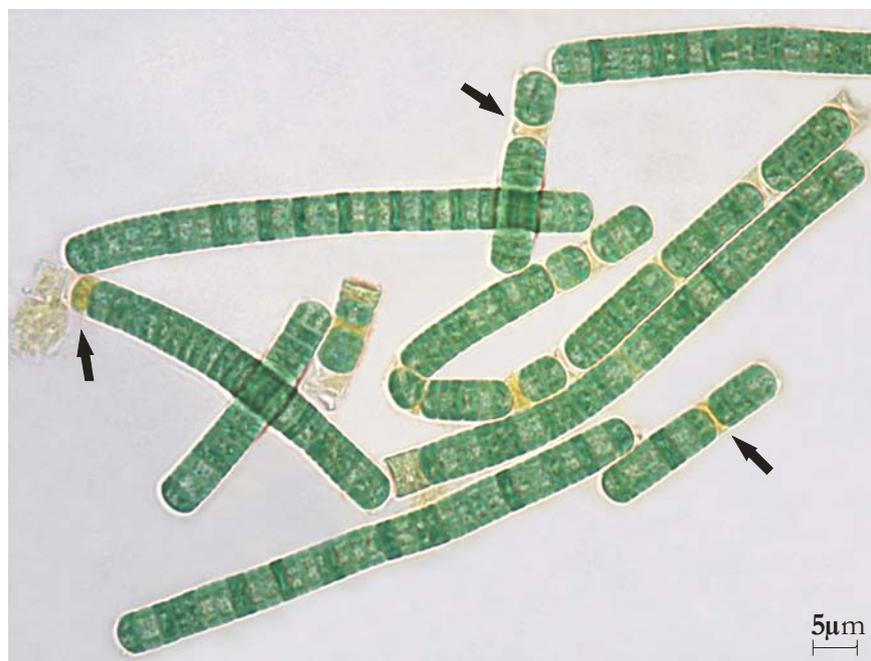


Fig. 6: tricomi in frammentazione, in cui è possibile notare le cellule biconcave che vanno incontro a necrosi (freccie).

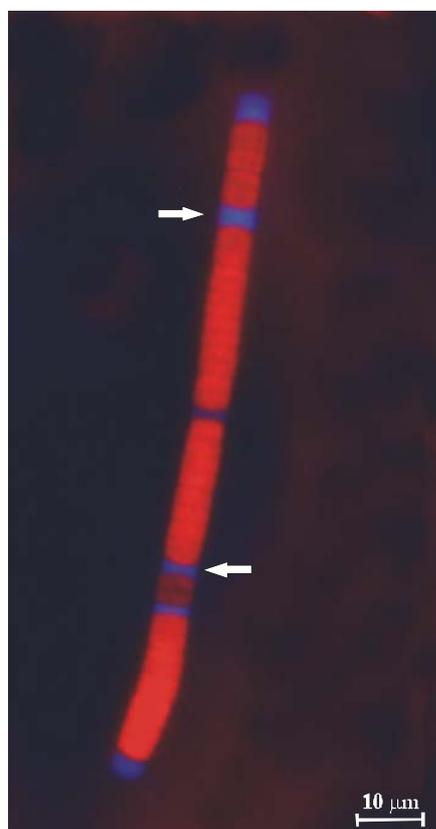


Fig. 7: tricoma osservato al microscopio ottico in fluorescenza, in cui si possono distinguere i necridi, privi della tipica autofluorescenza rossa (freccie), dalle altre cellule del filamento.

In seguito al processo di frammentazione, si formano corti ormogoni (figg. 3, 6), i quali poi si accrescono per scissione binaria delle singole cellule che li compongono, andando a ricostituire filamenti di lunghezza media (Komárek & Anagnostidis, 2005). Il tipo di frammentazione appena descritto fa scartare l'ipotesi che ETS-02 possa appartenere alla famiglia delle Borziaceae, nella quale la formazione di necridi non è mai stata osservata (Komárek & Anagnostidis, 2005).

Nel cianobatterio in esame, sembra, inoltre, che le cellule “figlie” vadano incontro ad una nuova divisione prima di essersi del tutto separate tra loro e di aver raggiunto le dimensioni della cellula “madre”. Questo fa sì che la frequenza delle divisioni cellulari e la formazione di nuovi setti trasversali proceda in rapida sequenza lungo il filamento ed è una caratteristica tipica della famiglia Oscillatoriaceae (oltre che delle già escluse Gomontelliaceae) (Komárek & Anagnostidis, 2005).

Sono state, successivamente, condotte delle indagini al microscopio elettronico sia a scansione (SEM) che a trasmissione (TEM).

Al SEM, come già osservato al microscopio ottico, i tricomi risultano uniseriati, isopolari (fig. 8) e formati da cellule discoidali. In figura 8, si possono osservare ormogoni derivati dal processo di frammentazione; mentre, in figura 9, sono particolarmente visibili dei solchi a livello equatoriale di numerose cellule lungo il filamento, indice di un'attiva scissione binaria.

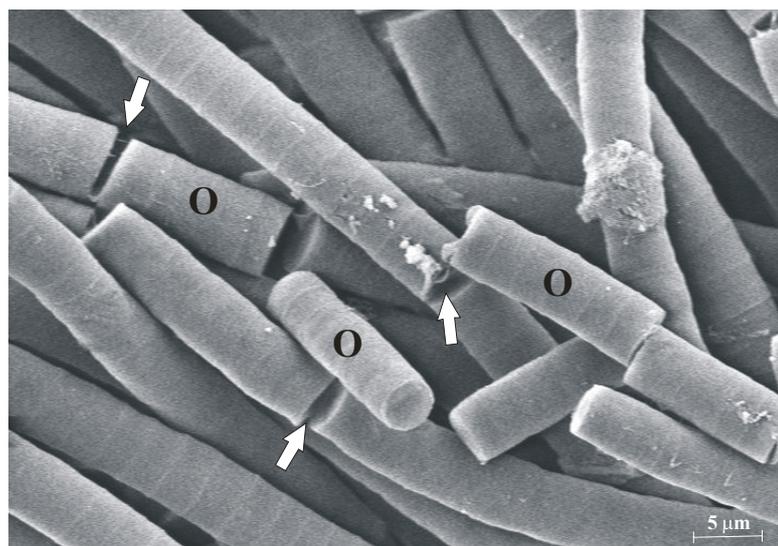


Fig. 8: immagine al microscopio elettronico a scansione di tricomi in frammentazione (freccie); si possono osservare in primo piano alcuni ormogoni (O) neoformati, tipicamente isopolari.

La stessa immagine di figura 9 mette in evidenza l'apparente presenza, sulla superficie dei filamenti, di strutture fibrillari ricoperte dai polisaccaridi extracellulari che compongono la guaina, i quali assumono lo stesso orientamento delle fibrille (fig. 10). L'effettiva presenza di queste strutture fibrillari dovrebbe essere, però, confermata da indagini più approfondite.

Ad ogni modo, secondo quanto riportato in letteratura, le fibrille osservate potrebbero essere costituite da una glicoproteina legante Ca^{2+} , chiamata oscillina (Hoiczky & Baumeister, 1995; Adams *et al.*, 1999; Adams, 2001; Read *et al.*, 2007). Tali strutture sono una delle componenti fondamentali per il movimento di scivolamento (*gliding motility*) tipico di numerosi cianobatteri filamentosi, tra cui molti membri dell'ordine Oscillatoriales (Hoiczky & Baumeister, 1995; Hoiczky, 2000; Mc Bride, 2001; Wolgemuth & Oster, 2004). Le fibrille di oscillina agirebbero, infatti, come "binari", attraverso i quali fluisce la mucillagine secreta dai complessi dei pori giunzionali, dando un movimento propulsorio in avanti al filamento (Hoiczky & Baumeister, 1998; Wolgemuth & Oster, 2004).

In molte specie, il movimento traslatorio di scivolamento è accompagnato dalla rotazione dell'intero tricoma attorno al suo asse. Il tipo di *gliding motility* e, quindi, la disposizione delle fibrille proteiche sembrano essere specie specifiche (Hoiczky e Baumeister, 1995; Hoiczky, 1998) (tab. 10).

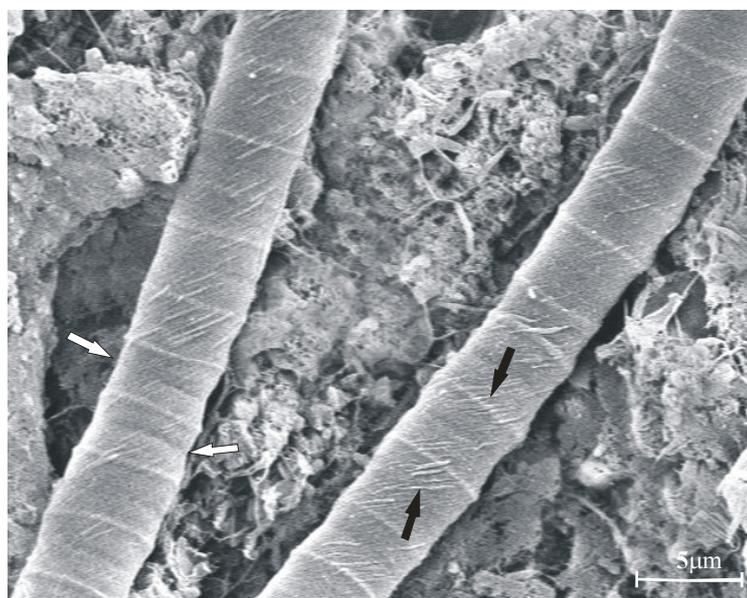


Fig. 9: tricomi che si stanno accrescendo per scissione binaria delle cellule (freccie bianche). Da notare, sulla superficie, le fibrille di oscillina disposte a spirale destrogira (freccie nere).

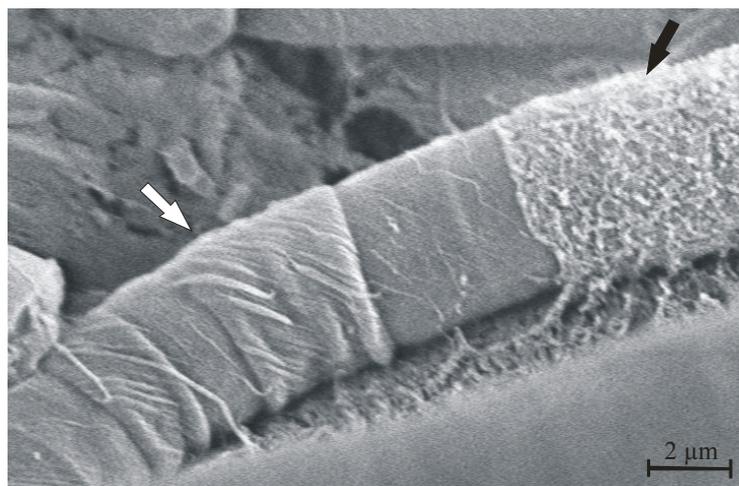


Fig. 10: particolare di un tricoma, lungo il quale si può distinguere una zona in cui i polisaccaridi della guaina seguono marcatamente l'andamento delle fibrille di oscillina (freccia bianca) e una in cui il filamento è rivestito da uno strato di mucillagine (freccia nera).

Le fibrille sulla superficie di ETS-02 sono disposte a spirale destrorsa lungo i tricomi (figg. 9,10) suggerendo un movimento rotatorio in senso orario durante lo spostamento. Per tale caratteristica, esso si colloca, quindi, nella prima colonna di tabella 10, in cui si trovano specie appartenenti ai generi *Oscillatoria*, *Lyngbya* e *Phormidium* (gruppo VII e gruppo VIII).

Rotazione destrorsa, arrangiamento destrorso	Rotazione levogira, arrangiamento levogiro	Nessuna rotazione, arrangiamento radiale
<i>Oscillatoria chalybea</i>	<i>Oscillatoria limosa</i>	<i>Oscillatoria rubescens</i>
<i>Oscillatoria tenuis</i>	<i>Oscillatoria princeps</i>	<i>Oscillatoria geminata</i>
<i>Oscillatoria sancta</i>	<i>Lyngbya aeruginosa</i>	<i>Phormidium foveolarum</i>
<i>Oscillatoria amoena</i>	-	<i>Anabaena variabilis</i>
<i>Phormidium uncinatum</i>	-	<i>Anabaena</i> sp. C12
<i>Phormidium autumnale</i>	-	-
<i>Phormidium ambiguum</i>	-	-
<i>Lyngbya</i> sp. C36	-	-
cianobatterio ETS-02	-	-

Tabella 10: correlazione tra l'arrangiamento delle fibrille di oscillina e della guaina e il tipo di rotazione di differenti cianobatteri filamentosi durante la *gliding motility* (modificata da Hoiczky, 1998).

L'indagine condotta al TEM, oltre a confermare le osservazioni effettuate al microscopio ottico e al SEM, ha fornito alcune informazioni riguardanti le caratteristiche ultrastrutturali del cianobatterio in studio.

Osservando la sezione trasversale di un filamento (fig. 11), si nota la presenza di numerosi corpi elettrondensi, tra i quali si riconoscono dei carbossisomi.

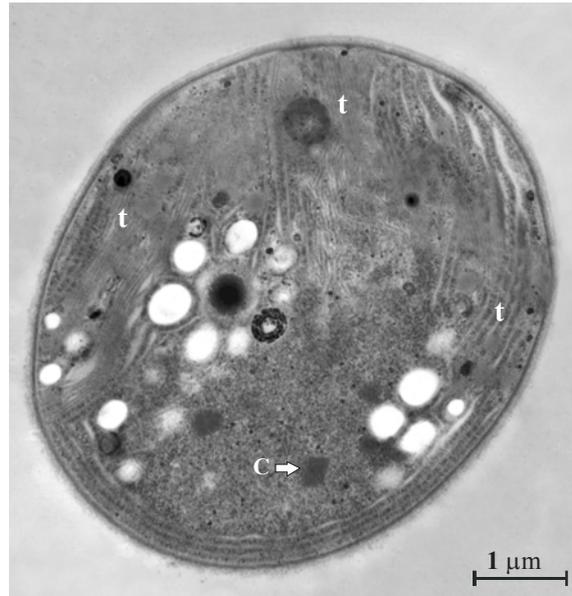


Fig. 11: immagine al microscopio elettronico a trasmissione di un tricoma in sezione trasversale, in cui si possono osservare i tilacoidi (t), privi di un orientamento preciso all'interno della cellula, e numerosi inclusi elettrondensi. c = carbossisomi.

Dalla stessa immagine si può, inoltre, constatare come le membrane tilacoidali non assumano un particolare orientamento all'interno della cellula. Questo è rafforzato dall'osservazione di differenti sezioni longitudinali dei tricomi (figg. 12-15), in cui i tilacoidi non presentano un arrangiamento specifico in tutte le cellule, ma risultano disposti talora parallelamente all'asse longitudinale della cellula, talora perpendicolari ad esso, talora senza una direzione precisa. Tale tipo di arrangiamento è tipico delle famiglie Oscillatoriaceae e Gomontelliaceae (Komárek & Anagnostidis, 2005), ma esistono numerose eccezioni comprendenti cianobatteri appartenenti alle rimanenti famiglie ed è stato osservato anche in alcuni membri del genere *Phormidium* (famiglia Phormidiaceae) (Marquardt & Palinska, 2007; Palinska & Marquardt, 2008).

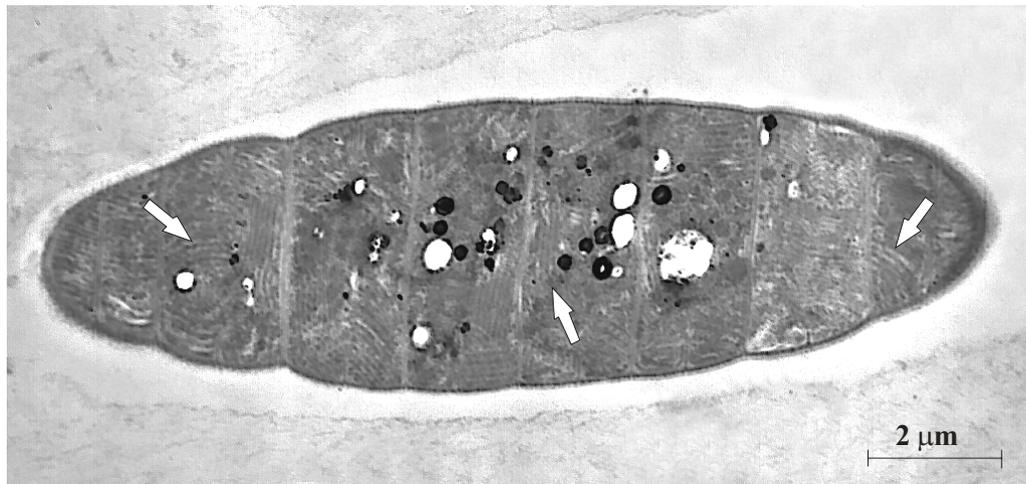


Fig. 12: sezione longitudinale di un tricoma. Da notare l'andamento irregolare dei tilacoidi (freccie bianche).

E', inoltre, confermato dal TEM come il processo di frammentazione avvenga per formazione di necridi, dal particolare aspetto di dischi biconcavi, pieni di materiale cellulare di natura sconosciuta (fig. 13) (Anagnostidis & Komárek, 1990).

Rispetto alla microscopia ottica, il TEM ha messo, poi, in evidenza la presenza della caliptra, un ispessimento della parete esterna della cellula apicale del filamento (fig. 14). Più esattamente, tale struttura è un residuo di guaina mucillaginosa o di una cellula necridica, che appare come uno spesso "cappuccio" sulla parete esterna delle cellule apicali. Essa è, quindi, molto probabilmente connessa alla capacità di formare necridi e può essere presente obbligatoriamente, facoltativamente o mancare nei diversi *taxa* del *phylum* Cyanophyta, essendo, perciò, considerata un carattere diagnostico. La caliptra è stata, spesso, osservata nelle specie appartenenti alle famiglie Phormidiaceae ed Oscillatoriaceae (Komárek & Anagnostidis, 2005).

Infine, ad un più elevato ingrandimento, si possono apprezzare i ficobilisomi attaccati ai tilacoidi e i canali del complesso dei pori giunzionali, da cui vengono secreti i polisaccaridi extracellulari (fig. 15) (Hoiczuk & Baumeister, 1998; Wolgemuth & Oster, 2004).

I dati morfologici ed ultrastrutturali ottenuti, presi nel loro complesso, suggeriscono che il cianobatterio isolato possa appartenere alla famiglia delle Oscillatoriaceae o a quella delle Phormidiaceae. In particolare, i filamenti uniseriati avvolti singolarmente da una guaina mucillaginosa, che spesso protrude il tricoma stesso, la frammentazione a livello di necridi e la forma delle cellule, sia

apicali che intermedie, avvicinano il ceppo ai generi *Oscillatoria* e *Lyngbya*, per la famiglia Oscillatoriaceae, e all'VIII gruppo del genere *Phormidium*, per la famiglia Phormidiaceae. L'VIII gruppo del genere *Phormidium* è, peraltro, considerato da Komárek & Anagnostidis (2005) più vicino alla famiglia Oscillatoriaceae.



Fig. 13: sezione longitudinale di un necridio (freccia bianca), t= tilacoidi.

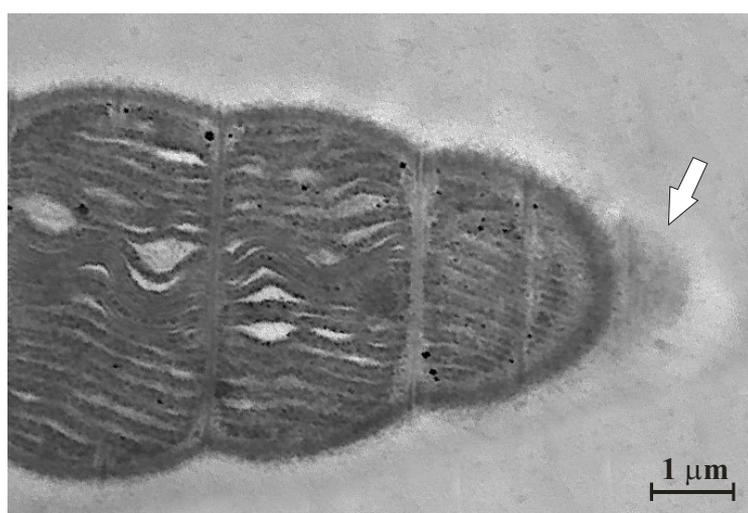


Fig. 14: sezione longitudinale dell'estremità di un tricoma, dove si distingue la caliptra (freccia bianca).

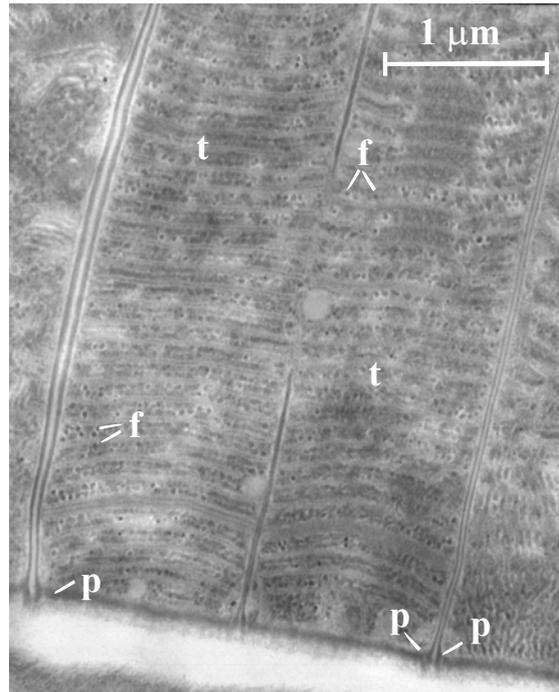


Fig. 15: particolare di una sezione longitudinale in cui si possono osservare i ficobilisomi (f) attaccati ai tilacoidi (t) e i canali del JPCs (p).

4.1.2 Caratterizzazione molecolare

Per completare la caratterizzazione morfologica ed ultrastrutturale condotta, si è proceduto ad un'analisi di tipo molecolare. A tal fine sono stati impiegati diversi *marker* molecolari: il gene 16S rDNA e lo spaziatore intergenico trascritto 16S-23S ITS; il locus *cpcB*-IGS-*cpcA* (o *cpcAB*); il gene *rpoC1*; il gene *gyrB* e il gene *rbcL* (Papke *et al.*, 2003; Seo & Yokota, 2003; Teneva *et al.*, 2005; Premanandh *et al.*, 2006; Tomitani *et al.*, 2006).

Nei *database* informatici erano, tuttavia, disponibili pochissime sequenze di molti dei suddetti *loci* per i membri dell'ordine Oscillatoriales, al quale il cianobatterio oggetto di questa tesi sembrava appartenere. In particolare, le caratteristiche morfologiche, ultrastrutturali e fisiologiche dell'organismo in esame lo avvicinavano a tre generi dell'ordine Oscillatoriales: *Oscillatoria*, *Lyngbya* e *Phormidium* (membri del gruppo VIII) (Komárek & Anagnostidis, 2005). Per tale motivo sono stati confrontati dei ceppi, ottenuti da banche algali internazionali, che fossero il più possibile rappresentativi di questi tre diversi *taxa*.

Sono stati, quindi, acquistati *Lyngbya aestuarii* PCC 7419 (fig. 16); *Oscillatoria sancta* PCC 7515 (fig. 17); *Oscillatoria tenuis* PCC 9107 (fig. 18); *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759 (fig. 19) e *Phormidium autumnale* CCALA 143 (fig. 20).

L'organismo *Oscillatoria sancta* PCC 7515 è, infatti, indicato da Komárek & Anagnostidis (2005) come il più rappresentativo del genere *Oscillatoria*, per le sue caratteristiche morfologiche e ultrastrutturali. Si è voluto, poi, scegliere un altro

cianobatterio appartenente a questo *taxon*, per arricchire il confronto, e la scelta è ricaduta su *Oscillatoria tenuis* PCC 9107, poiché degli organismi disponibili nelle banche algali era quello che presentava un numero maggiore di caratteri simili al cianobatterio in studio.

Per quanto riguarda il genere *Lyngbya*, è risultato più difficile rinvenire nelle banche algali organismi appartenenti, con buona attendibilità, a tale *taxon*. Nonostante ciò, è stato possibile reperire il ceppo *Lyngbya aestuarii* PCC 7419, anch'esso segnalato, sempre da Komárek & Anagnostidis (2005), come il più rappresentativo del suo genere.

Infine, l'organismo in esame presentava numerose somiglianze con i membri del gruppo VIII del genere *Phormidium*. E' stato quindi scelto *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759, che, oltre a far parte del gruppo VIII, è anche la proposta specie-tipo dell'intero genere *Phormidium*. E' stato poi utilizzato, per un confronto, anche *Phormidium autumnale* CCALA 143, il quale appartiene al gruppo VII del suddetto genere ed è considerata la specie di cianobatteri più diffusa (Palinska & Marquardt, 2008).

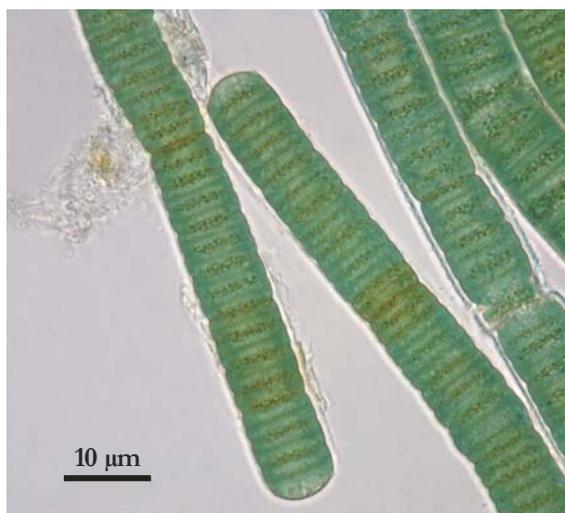


Fig. 16: foto al microscopio ottico di *Lyngbya aestuarii* PCC 7419.



Fig. 17: foto al microscopio ottico di *Oscillatoria sancta* PCC 9107.

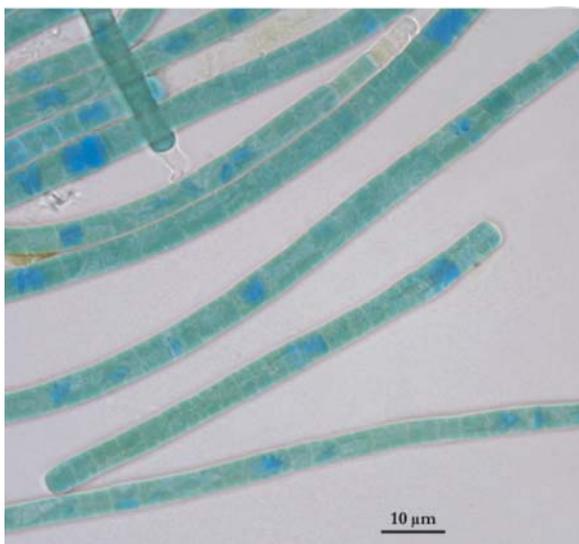


Fig. 18: foto al microscopio ottico di *Oscillatoria tenuis* PCC 7419.



Fig. 19: foto al microscopio ottico di *Phormidium cf. irriguum* CCALA 759.

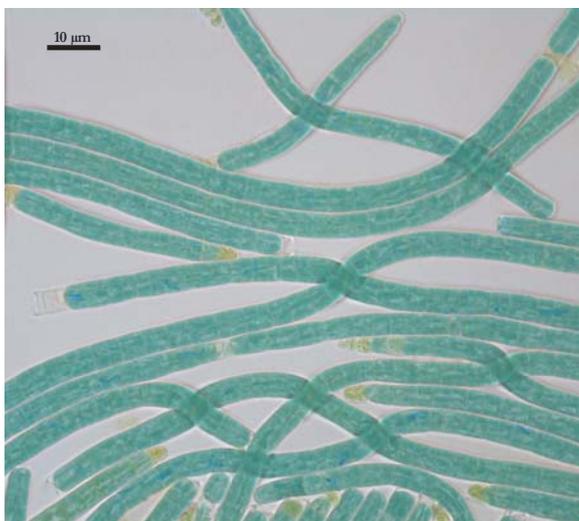


Fig. 20: foto al microscopio ottico di *Phormidium autumnale* CCALA 143.

In tabella 11 sono riportate le sequenze ottenute dalle reazioni di amplificazione e sequenziamento, sia per il cianobatterio in esame sia per i ceppi di confronto. Per le sequenze di ciascun *locus* già disponibili in Genbank sono riportati i codici d'accesso; per quelle, invece, ottenute nel presente lavoro di tesi è riportata la lunghezza in paia di basi (pb).

Organismo	16S rDNA	16S-23S ITS	<i>cpcAB</i>	<i>rpoC1</i>	<i>gyrB</i>	<i>rbcL</i>
cianobatterio ETS-02	1396 pb	479 pb	509 pb	856 pb	1035 pb	1200 pb
<i>L.aestuarii</i> PCC 7419	AJ000714	AY768375	AJ401187	859 pb	891 pb	AB075915
<i>O.sancta</i> PCC 7515	AF132933	EF178272	AJ401185	859 pb	-	1046 pb
<i>O.tenuis</i> PCC 9107	-	-	501 pb	863 pb	-	1187 pb
<i>P. cf. irriguum</i> CCALA 759	1353 pb	489 pb	505 pb	907 pb	1137 pb	1129 pb
<i>P.autumnale</i> CCALA 143	1393 pb	AM778716	514 pb	869 pb	1117 pb	1115 pb

Tabella 11: sequenze nucleotidiche dei diversi *loci*, del cianobatterio in esame e dei ceppi di confronto, utilizzate nell'analisi.

La costruzione dei *dataset* è stata vincolata dal limitato numero di sequenze disponibili per alcuni dei *marker* molecolari scelti, come i geni *rpoC1*, *gyrB* e *rbcL*. Oltre alle sequenze ottenute in questo lavoro di tesi, nelle ricostruzioni filogenetiche basate sui geni *rpoC1* e *gyrB* è stato utilizzato come riferimento l'articolo di Seo & Yokota (2003), in modo tale da ottenere dei *dataset* congruenti fra loro (tab. I-Appendice). Nello stesso articolo venivano utilizzate per l'analisi filogenetica anche le sequenze del 16S rDNA. Queste stesse sequenze sono state, quindi, impiegate, assieme alle altre riportate in tabella 11, per la costruzione del *dataset* del gene 16S rDNA. Sono state, inoltre, incluse, nell'analisi filogenetica basata su tale *marker*, altre sequenze quasi complete attribuite a membri del genere *Phormidium*: EF654086 di *Phormidium uncinatum* SAG 81.79; AB003167 di *Phormidium ambiguum* IAM M-71; DQ493873 di *Phormidium autumnale* Arct-Ph5; EF654084 di *Phormidium autumnale* SAG 78.79 e EF654083 di *Phormidium tergestinum* CCALA 155 (tab. II-Appendice). Infine, sono state aggiunte al *dataset* in questione anche le sequenze di *Leptolyngbya* sp. PCC 73110, *Phormidium*

persicinum CCMP 638 e *Trichodesmium erythraeum* IMS 101, in quanto membri dell'ordine Oscillatoriales per i quali è stato sequenziato anche il gene *rbcL* (Tomitani *et al.*, 2006).

Per la ricostruzione filogenetica con il locus *cpb*-IGS-*cpa* sono state utilizzate 28 delle sequenze elencate nel lavoro di Premanandh *et al.* (2006) (tab. III-Appendice), nel quale è riportata la caratterizzazione molecolare di alcuni ceppi di Oscillatoriales, impiegando sia il suddetto *marker* sia lo spaziatore intergenico trascritto 16S-23S ITS. Ciò ha permesso di usare lo stesso articolo come riferimento per costruire il *dataset* delle sequenze del 16S-23S ITS, aggiungendo alle suddette quelle ottenute durante questo lavoro di tesi, le sequenze di due organismi del genere *Leptolyngbya* prodotte nel laboratorio dove ho svolto il mio Dottorato e altre sequenze ritrovate in Genbank per l'ordine Oscillatoriales (tab. IV-Appendice).

Infine, per il gene *rbcL* sono state utilizzate nell'analisi filogenetica, oltre a quelle riportate in tabella 11, le poche sequenze disponibili in Genbank per i cianobatteri dell'ordine Oscillatoriales e alcune sequenze di cianobatteri appartenenti ad altri ordini, che presentassero una lunghezza pari o superiore alla sequenza più corta ottenuta in questo lavoro per il locus in questione (1046 pb) (tab. V-Appendice).

Di ogni *dataset* così costruito è stato calcolato il segnale filogenetico, per avere un'indicazione *a priori* della validità dei *marker* scelti nella caratterizzazione molecolare del cianobatterio in esame.

I risultati di tale analisi sono rappresentati come percentuali di punti che ricadono all'interno di diagrammi a triangolo equilatero, divisi in sette bacini d'attrazione (fig. 21).

Quasi tutti i *dataset* costruiti presentano un buon segnale filogenetico, in quanto la maggior parte dei quartetti di sequenze determinati ricade nei bacini di attrazione in cui le relazioni filogenetiche fra i quartetti sono totalmente risolte (A₁, A₂ e A₃). In particolare, le percentuali dei punti localizzati in ciascuno dei bacini A₁, A₂ e A₃ sono comprese tra 31,4 e 33,8% per il gene *rbcL*; tra 31,6 e 33,3% per il gene *rpoC1*; tra 32 e 32,2% per il gene *gyrB* e tra 31,8 e 33,4% per il gene 16S rDNA (fig. 21).

Un segnale filogenetico minore è stato trovato, invece, per il locus *cpb*-IGS-*cpa* in cui le percentuali dei punti che rappresentano i quartetti totalmente risolti sono comprese tra il 28 e il 29,4%; mentre l'1,5-1,7% dei quartetti è solo parzialmente risolto e l'8,5% di quartetti è completamente irrisolto. La stessa cosa si osserva per il *dataset* costruito con le sequenze dello spaziatore intergenico trascritto 16S-23S ITS, che, pur presentando percentuali comprese tra il 27,1 e il 33,3% di

quartetti completamente risolti, mostra anche uno 0,5-1,9% di quartetti solo parzialmente risolti e un 3,8% di quartetti completamente irrisolti (fig. 21).

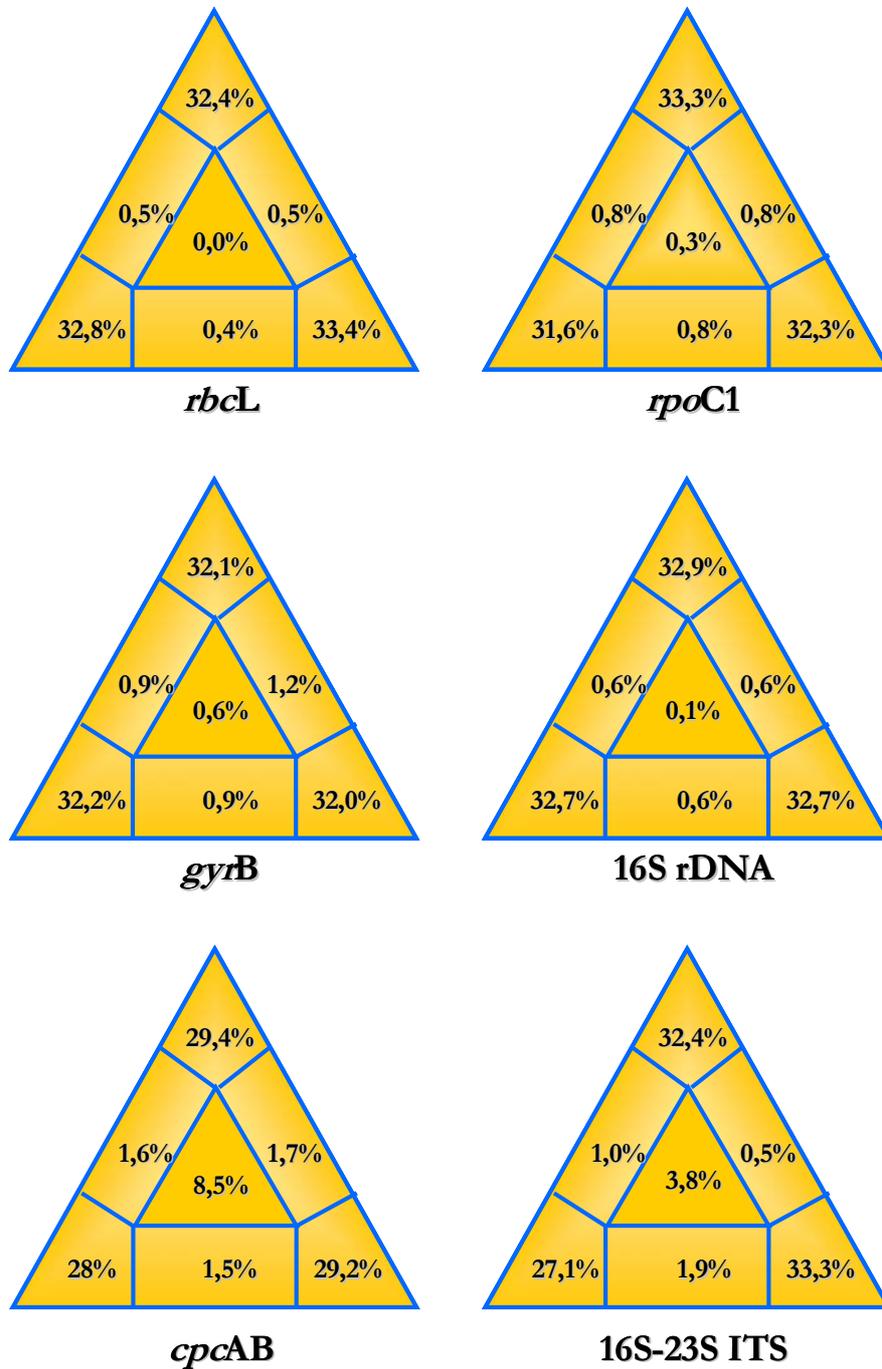


Fig. 21: segnale filogenetico dei dataset di sequenze di ciascun marker molecolare utilizzato nell'analisi.

Ciò indica che le sequenze scelte per i *marker cpcB-IGS-cpcA* e 16S-23S ITS hanno subito un processo di divergenza più spinto rispetto a quelle delle altre porzioni genomiche utilizzate in questo studio. Questo è legato, da un lato, agli stessi *loci cpcB-IGS-cpcA* (più esattamente all'IGS) e 16S-23S ITS, che, in quanto porzioni non codificanti del genoma, sono meno soggetti al processo di selezione naturale e quindi presentano un tasso di evoluzione più rapido rispetto agli altri *marker* considerati. E questo è anche il motivo per cui essi sono stati, spesso, proposti come strumenti utili nella discriminazione dei cianobatteri ai livelli più bassi della gerarchia tassonomica, come quelli di specie e ceppo, soprattutto laddove geni come il 16S rDNA non permettono una distinzione così fine (Robertson *et al.*, 2001; Papke *et al.*, 2003; Teneva *et al.*, 2005; Premanandh *et al.*, 2006; Marquardt & Palinska, 2007; Palinska & Marquardt, 2008). Dall'altra parte, il minor segnale filogenetico riscontrato nelle sequenze analizzate per i *marker cpcB-IGS-cpcA* e 16S-23S ITS può anche essere indicativo dell'eterogeneità e della natura polifiletica dell'ordine Oscillatoriales, ripetutamente messa in luce da diversi autori (Ishida *et al.*, 1997; Casamatta *et al.* 2005; Komárek & Anagnostidis, 2005; Teneva *et al.*, 2005; Premanandh *et al.*, 2006; Marquardt & Palinska, 2007; Palinska & Marquardt, 2008).

Si è perciò deciso di utilizzare comunque tutti i *marker* molecolari scelti, per le analisi filogenetiche.

Le ricostruzioni filogenetiche sono state condotte secondo il metodo del *maximum likelihood* (ML), applicando il modello GTR+I+G e saggiando la robustezza delle topologie ottenute mediante il *test* di *Bootstrap* (BT) (1000 repliche).

La topologia ottenuta con il gene *rbcL* (fig. 22) conferma l'analisi di Tomitani *et al.* (2006), secondo la quale i cianobatteri formanti eterocisti costituiscono un gruppo monofiletico (BT pari all'85%). Questo gruppo, tuttavia, a differenza di quanto riportato nel suddetto lavoro, risulta *sister taxon* del clade costituito da *Leptolyngbya* sp. PCC 73110, *Phormidium laminosum* OH-1-p Cl 1 e *Phormidium persicinum* CCMP 638. Le specie di questi ultimi due ceppi, riportate in Genbank come appartenenti al genere *Phormidium*, sono state recentemente riattribuite la prima al genere *Leptolyngbya*, la seconda al genere *Pseudanabaena* (Komárek & Anagnostidis, 2005).

Gli altri membri dell'ordine Oscillatoriales considerati nell'analisi sembrano costituire un clade a parte, anche se il nodo basale di tale gruppo non è supportato da elevati valori di BT.

All'interno di questo clade, ETS-02 si colloca come *sister taxon* del ceppo *Phormidium autumnale* CCALA 143, con un 100% di BT e un'identità nucleotidica del 94,33%, su un allineamento di 988 pb. L'identità tra le corrispondenti 988 pb

del gene *rbcL* del cianobatterio in esame e dell'altro ceppo di *Phormidium*, acquistato come confronto (*Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759), risulta invece inferiore (84,63%). Quest'ultimo si trova associato, con un valore di BT pari al 99%, al cianobatterio *Oscillatoria tenuis* PCC 9107.

L'altro ceppo del genere *Oscillatoria* (*Oscillatoria sancta* PCC 7515), scelto come confronto, è raggruppato con l'organismo *Thricodesmium erythraeum* IMS 101, con una confidenza di BT pari al 100%.

Infine, l'unico rappresentante del genere *Lyngbya* incluso nell'analisi (*Lyngbya aestuarii* PCC 7419) risulta *sister taxon* del gruppo costituito da *Phormidium autumnale* CCALA 143 e dal cianobatterio ETS-02, anche se il nodo che li unisce non è supportato da elevati valori di BT.

Il fatto che cianobatteri attribuiti a diversi generi dell'ordine Oscillatoriales si trovino mescolati fra loro nella topologia ricostruita col gene *rbcL*, da un lato, ribadisce l'eterogeneità di tale ordine (Ishida *et al.*, 1997; Casamatta *et al.* 2005; Komárek & Anagnostidis, 2005; Teneva *et al.*, 2005; Premanandh *et al.*, 2006; Marquardt & Palinska, 2007; Palinska & Marquardt, 2008), dall'altro, può essere legata al limitato numero di sequenze del *dataset*.

La ricostruzione filogenetica basata sul gene *rpoC1* (fig. 23) mette in luce un quadro più complesso, essendo stati compresi nell'analisi anche alcuni ceppi dell'ordine Chroococcales. In particolare, se i cianobatteri in grado di formare eterocisti sono nuovamente riuniti in uno stesso gruppo (BT del 75%), quelli degli ordini Chroococcales e Oscillatoriales sono, invece, mescolati fra loro. In questa topologia, inoltre, ETS-02 si colloca lontano da *Phormidium autumnale* CCALA 143 e risulta, invece, *sister taxon* del ceppo *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759, con un valore di BT pari al 100%. L'identità nucleotidica delle corrispondenti sequenze per il gene *rpoC1* di questi due organismi è del 91,19% su un confronto di 795 pb.

La vicinanza filogenetica, con un BT pari al 100%, tra *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759 e il cianobatterio oggetto di questa tesi è confermata dall'albero ottenuto con le sequenze del gene *gyrB* (fig. 24). L'identità tra le sequenze nucleotidiche del *locus gyrB* dei due organismi è dell'89,81% su un allineamento di 697 pb. In questo caso, inoltre, *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759 e ETS-02 si collocano in posizione basale rispetto al gruppo costituito dai cianobatteri azotofissatori eterocistici e dal ceppo coccoide *Chroococcidiopsis* PCC 7431.

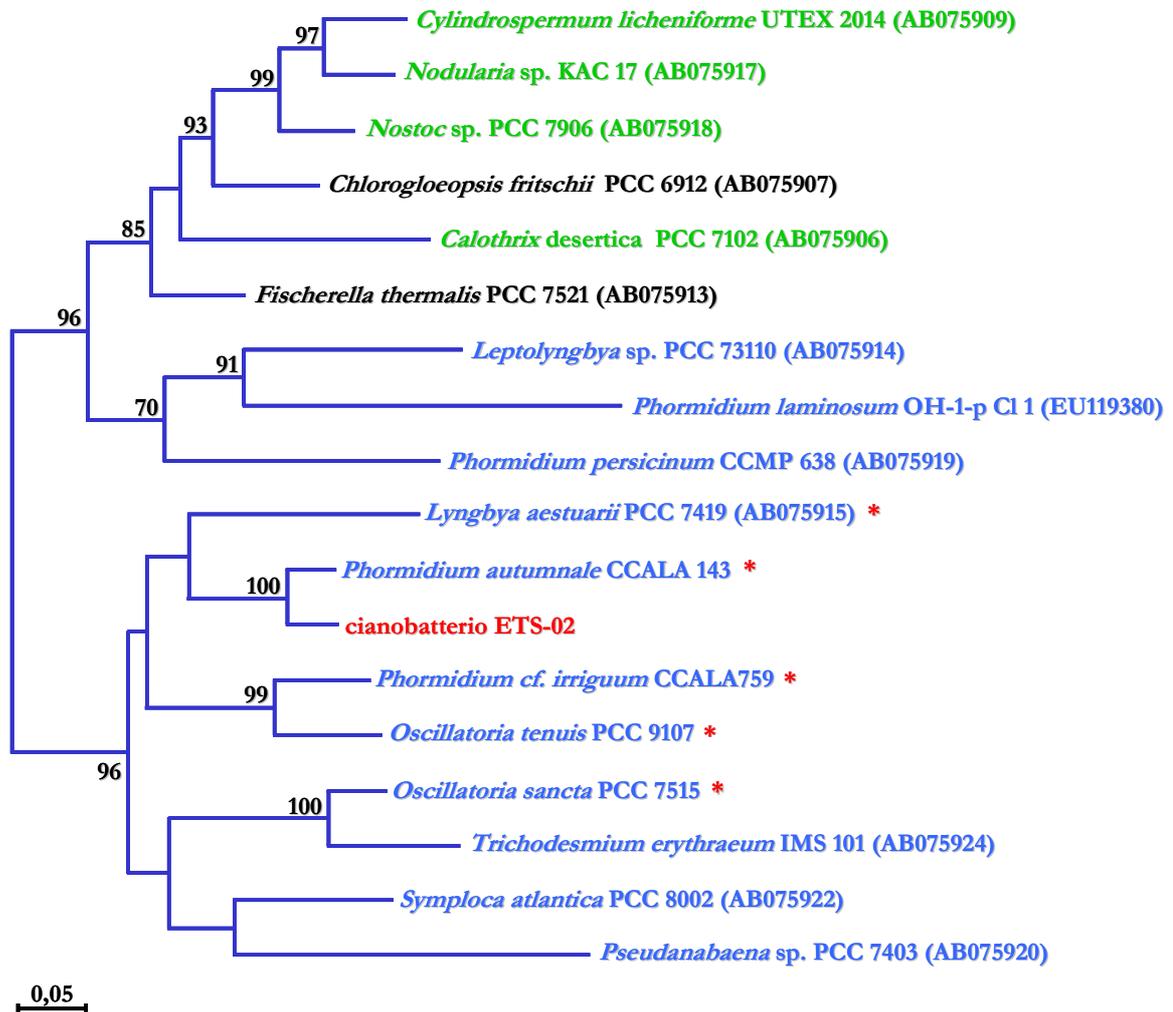


Fig. 22: ricostruzione filogenetica basata sul gene *rbcL*. L'organismo in esame è evidenziato in rosso, i cianobatteri appartenenti all'ordine Oscillatoriales sono colorati in azzurro, quelli dell'ordine Nostocales in verde e quelli dell'ordine Stigonematales in nero. Gli ordini Nostocales e Stigonematales sono costituiti da cianobatteri azotofissatori eterocistici. I ceppi acquistati come confronto sono indicati da un asterisco rosso. I valori di BT \geq 50% sono riportati vicino al corrispondente nodo. Barra=nr di sostituzioni nucleotidiche/sito.

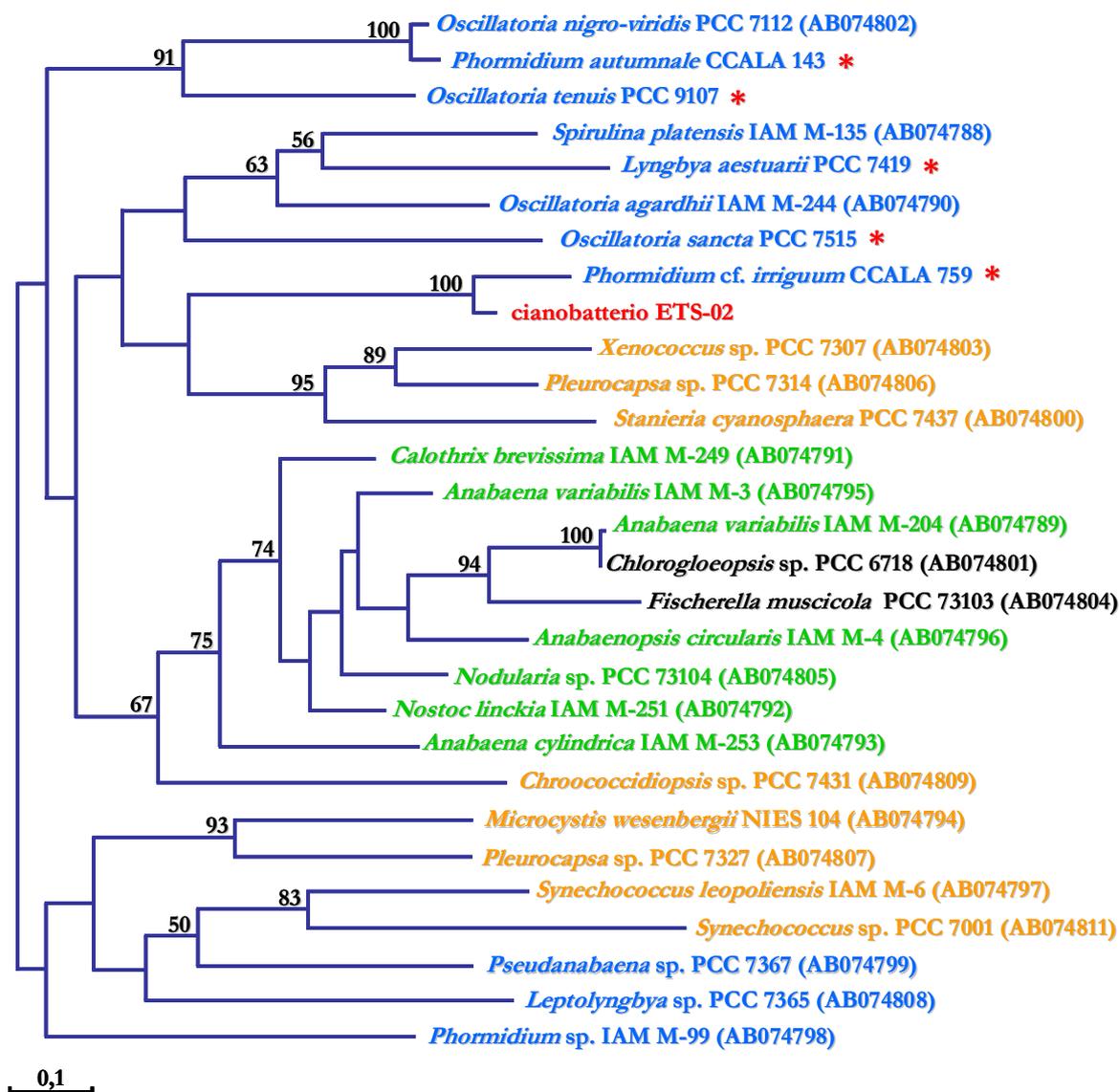


Fig. 23: ricostruzione filogenetica basata sul gene *rpoC1*. L'organismo in esame è evidenziato in rosso, i cianobatteri appartenenti all'ordine Oscillatoriales sono colorati in azzurro, quelli dell'ordine Nostocales in verde, quelli dell'ordine Stigonematales in nero e quelli dell'ordine Chroococcales in arancione. Gli ordini Nostocales e Stigonematales sono costituiti da cianobatteri azotofissatori eterocistici. I ceppi acquistati come confronto sono indicati da un asterisco rosso. I valori di BT $\geq 50\%$ sono riportati vicino al corrispondente nodo. Barra = nr di sostituzioni nucleotidiche/sito.

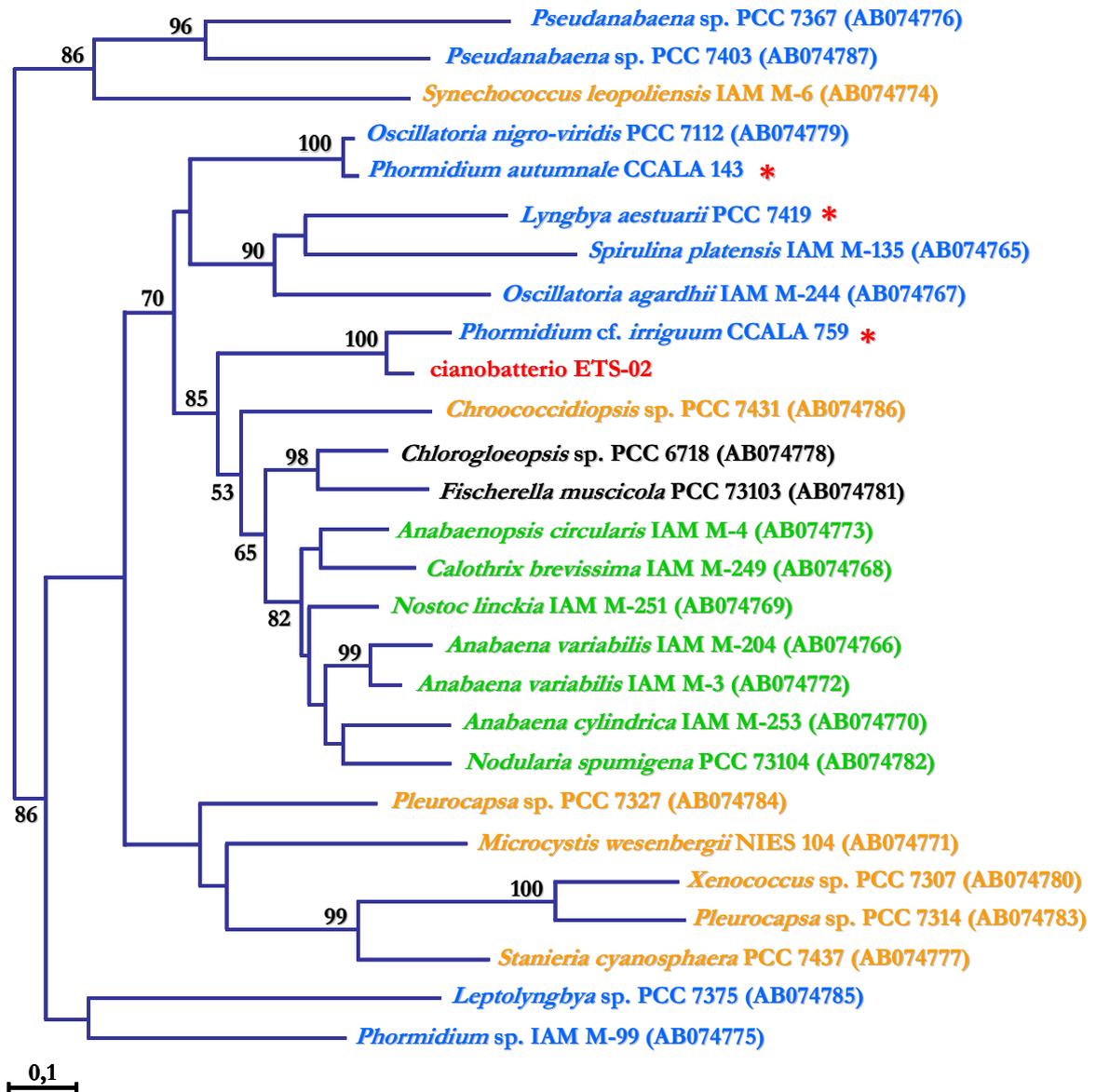


Fig. 24: ricostruzione filogenetica basata sul gene *gyrB*. L'organismo in esame è evidenziato in rosso, i cianobatteri appartenenti all'ordine Oscillatoriales sono colorati in azzurro, quelli dell'ordine Nostocales in verde, quelli dell'ordine Stigonematales in nero e quelli dell'ordine Chroococcales in arancione. Gli ordini Nostocales e Stigonematales sono costituiti da cianobatteri azotofissatori eterocistici. I ceppi acquistati come confronto sono indicati da un asterisco rosso. I valori di $BT \geq 50\%$ sono riportati vicino al corrispondente nodo. Barra=nr di sostituzioni nucleotidiche/sito.

Anche le topologie ottenute con i *loci* 16S-23S ITS (fig. 25) e *cpcB-IGS-cpcA* (fig. 26) confermano la parentela tra *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759 e il cianobatterio in esame, solo che la prima con un valore di BT del 100% (identità nucleotidica pari all'82,50% su un allineamento di 503 pb), mentre la seconda solamente con un valore dell'89% (identità nucleotidica pari all'81,05% su un allineamento di 380 pb). I suddetti alberi filogenetici (figg. 25, 26), inoltre, mettono un'altra volta in luce l'eterogeneità e la natura polifiletica che contraddistinguono l'attuale ordine Oscillatoriales (Ishida *et al.*, 1997; Casamatta *et al.* 2005; Komárek & Anagnostidis, 2005; Teneva *et al.*, 2005; Premanandh *et al.*, 2006; Marquardt & Palinska, 2007; Palinska & Marquardt, 2008), mentre l'ordine Nostocales risulta monofiletico (fig. 26).

Le sequenze ottenute per i *marker* 16S-23S ITS e *cpcB-IGS-cpcA* sono state, successivamente analizzate, più in dettaglio.

In particolare, la sequenza nucleotidica dello spaziatore intergenico trascritto 16S-23S ITS di ETS-02 e quella di *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759 sono state allineate fra loro, per avere un confronto più diretto (fig. 27). Nelle sequenze così allineate, sono stati, inoltre, individuati i domini conservati descritti da Iteaman e collaboratori (2000). Da questa analisi è risultato che i due organismi appartengono entrambi al vasto gruppo di cianobatteri che presentano, all'interno del 16S-23S ITS, sia la sequenza del tRNA^{Ile} che quella del tRNA^{Ala} (Iteaman *et al.*, 2000). A tale gruppo appartengono numerose specie di cianobatteri attribuiti al genere *Phormidium* (Marquardt & Palinska, 2007; Palinska & Marquardt, 2008).

In entrambe le sequenze sono stati, poi, determinati i domini D1, D2, D3 e D4, indispensabili per lo stabilirsi della struttura secondaria degli rRNA, e la regione anti-terminatrice *boxA*, a cui è stato attribuito un ruolo essenziale nel controllo della trascrizione (Iteaman *et al.*, 2000).

Sia le sequenze dei due tRNA, che i domini D1, D2, D3 e D4, che la regione *boxA* di *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759 e del cianobatterio ETS-02 presentano un'identità nucleotidica del 100% fra loro. Nelle restanti porzioni del *locus*, si osservano, invece, alcune differenze. Fra queste, *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759 presenta un *gap* lungo 7 pb nella regione localizzata tra le sequenze dei tRNA^{Ile} e tRNA^{Ala}, mentre il ceppo ETS-02 presenta due *gap* consecutivi, di 5 e 14 pb rispettivamente, appena dopo il tRNA^{Ala}.

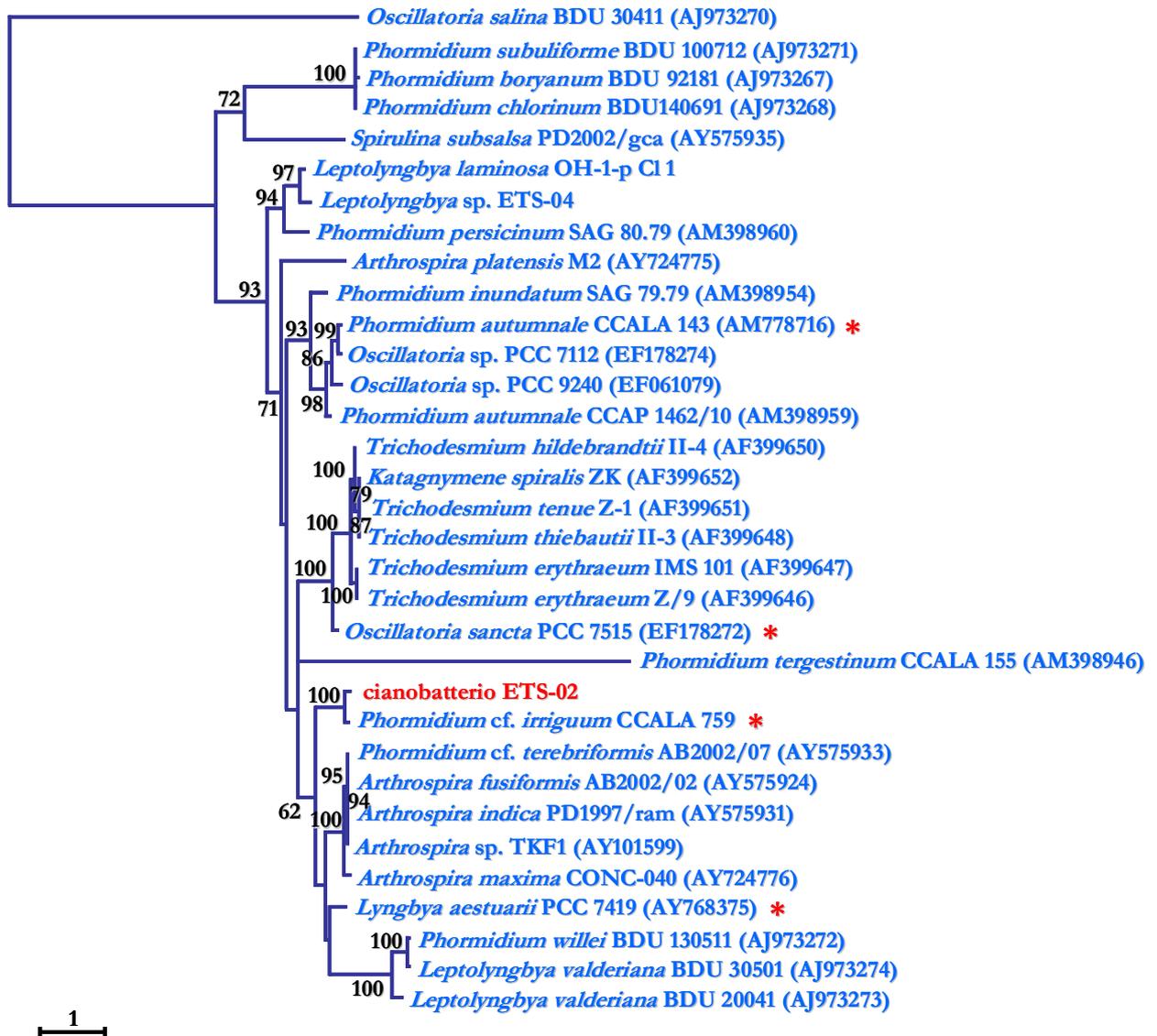


Fig. 25: ricostruzione filogenetica basata sul *locus* 16S-23S ITS. L'organismo in esame è evidenziato in rosso. Tutti i cianobatteri considerati nell'analisi appartengono all'ordine Oscillatoriales. I ceppi acquistati come confronto sono indicati da un asterisco rosso. I valori di BT \geq 50% sono riportati vicino al corrispondente nodo. Barra=nr di sostituzioni nucleotidiche/sito.

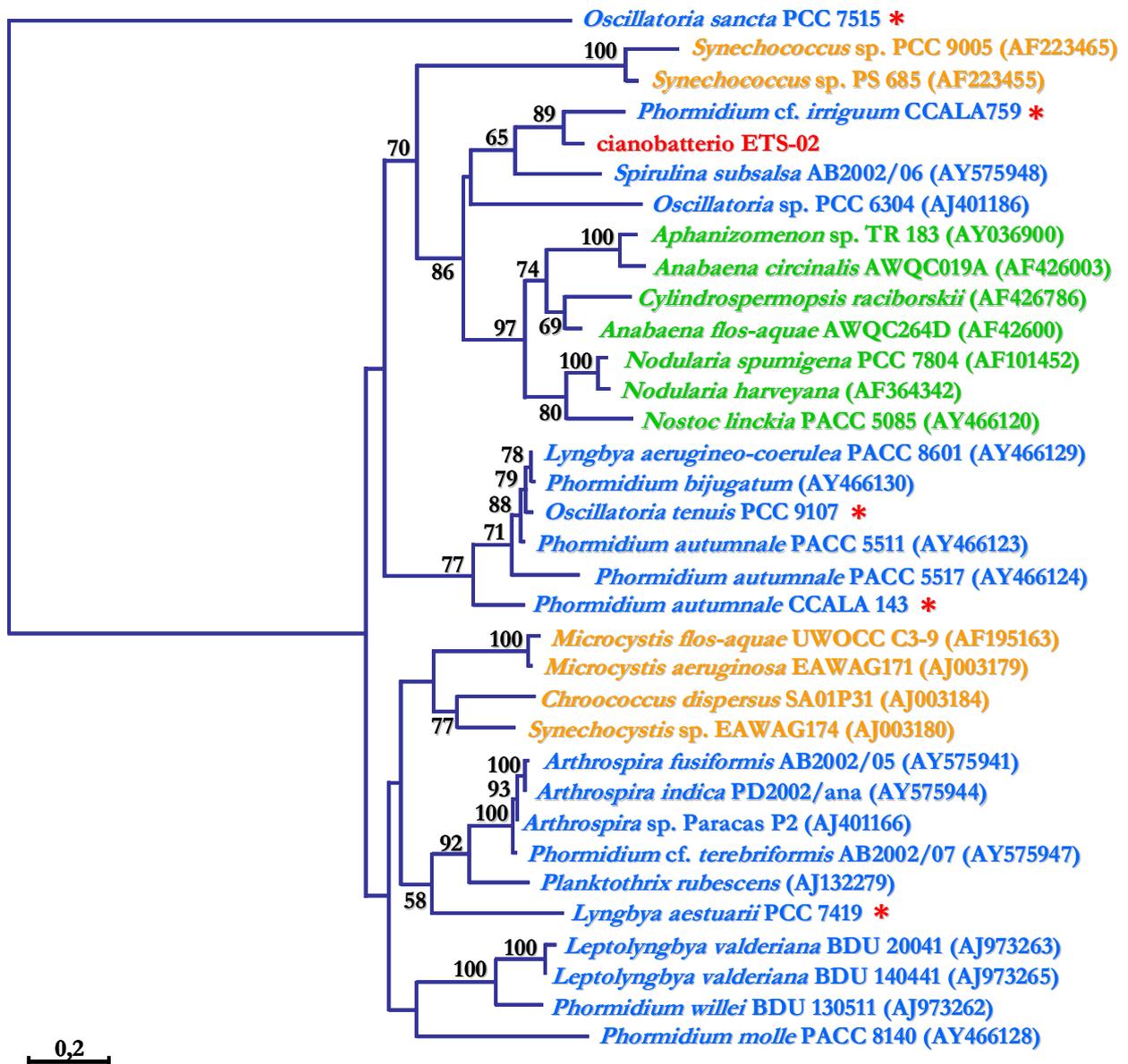


Fig. 26: ricostruzione filogenetica basata sul locus *cpcB-IGS-cpcA*. L'organismo in esame è evidenziato in rosso, i cianobatteri appartenenti all'ordine Oscillatoriales sono colorati in azzurro, quelli dell'ordine Nostocales in verde e quelli dell'ordine Chroococcales in arancione. L'ordine Nostocales è costituito da cianobatteri azotofissatori eterocistici. I valori di BT \geq 50% sono riportati vicino al corrispondente nodo. Barra=nr di sostituzioni nucleotidiche/sito.

Per quanto riguarda il *marker* *cpcB*-IGS-*cpcA*, è stata calcolata la lunghezza dell'IGS di tutte le sequenze del *dataset*, al fine di valutare l'eventuale correlazione tra la lunghezza di questa porzione del genoma e la ricostruzione filogenetica ottenuta (fig. 28).

L'IGS delle sequenze considerate in questo studio presenta lunghezze comprese tra 54 e 129 pb, confrontabili con quelle riportate da altri autori (Robertson *et al.*, 2001; Teneva *et al.*, 2005; Premanandh *et al.*, 2006). La lunghezza di tale porzione, invece, a differenza di quanto trovato in alcuni lavori (Premanandh *et al.*, 2006), sembra correlare solo in certi casi con i raggruppamenti individuati nella topologia ricostruita. Alcuni esempi, in cui si osserva un'evidente correlazione fra la lunghezza dell'IGS e la vicinanza filogenetica degli organismi, sono le due specie del genere *Microcystis* (BT del 100%), i due ceppi di *Leptolyngbya valderiana* (BT pari al 100%) e il gruppo costituito da *Lyngbya aerugineo-coerulea* PACC 8601, *Phormidium bijugatum* PACC 8602, *Oscillatoria tenuis* PCC 9107 e dai tre ceppi di *Phormidium autumnale*. Tale correlazione non è confermata, tuttavia, per altri raggruppamenti, come quello costituito dai due ceppi di *Synechococcus* (BT del 100%) e nel caso del gruppo costituito da *Phormidium cf. irriguum* CCALA 759 ed ETS-02.

Anche per il *locus* *cpcB*-IGS-*cpcA* sono state, poi, riallinate fra loro le sole sequenze nucleotidiche di *Phormidium cf. irriguum* CCALA 759 e del cianobatterio in esame (allineamento di 380 pb), allo scopo di analizzare più in dettaglio la regione corrispondente all'ultima porzione del gene *cpcB* (che codifica per la subunità β della C-ficocianina), quella dello spaziatore intergenico IGS e quella corrispondente alla prima parte del gene *cpcA* (che codifica per la subunità α della C-ficocianina) (Belknap & Haselkorn, 1987) (fig. 29).

Tale analisi ha messo in luce una differenza nucleotidica, tra le sequenze dei due organismi, pari al 15,2 % (25 sostituzioni su 164 nucleotidi), per quanto riguarda la porzione del gene *cpcB*; del 41,5% (con 16 delezioni e 23 sostituzioni su un allineamento di 94 posizioni), per lo spaziatore intergenico IGS, e solamente del 6,5% (8 sostituzioni su 122 nucleotidi), per la porzione del gene *cpcA*.

Pur confermando la maggior variabilità dello spaziatore intergenico rispetto alle regioni codificanti, questi dati differiscono da quanto trovato finora da altri autori, secondo i quali la porzione del gene *cpcB* presenta la variabilità minore dell'intero *locus* e le regioni più variabili risultano l'IGS e, a seguire, l'inizio del gene *cpcA* (Teneva *et al.*, 2005; Premanandh *et al.*, 2006). Un'eccezione di ciò, tuttavia, è stata trovata anche da Teneva e collaboratori (2005), che riportano una percentuale di differenze nucleotidiche dell'IGS, fra diversi ceppi di *Phormidium autumnale*, inferiore a quella della regione *cpcB*.

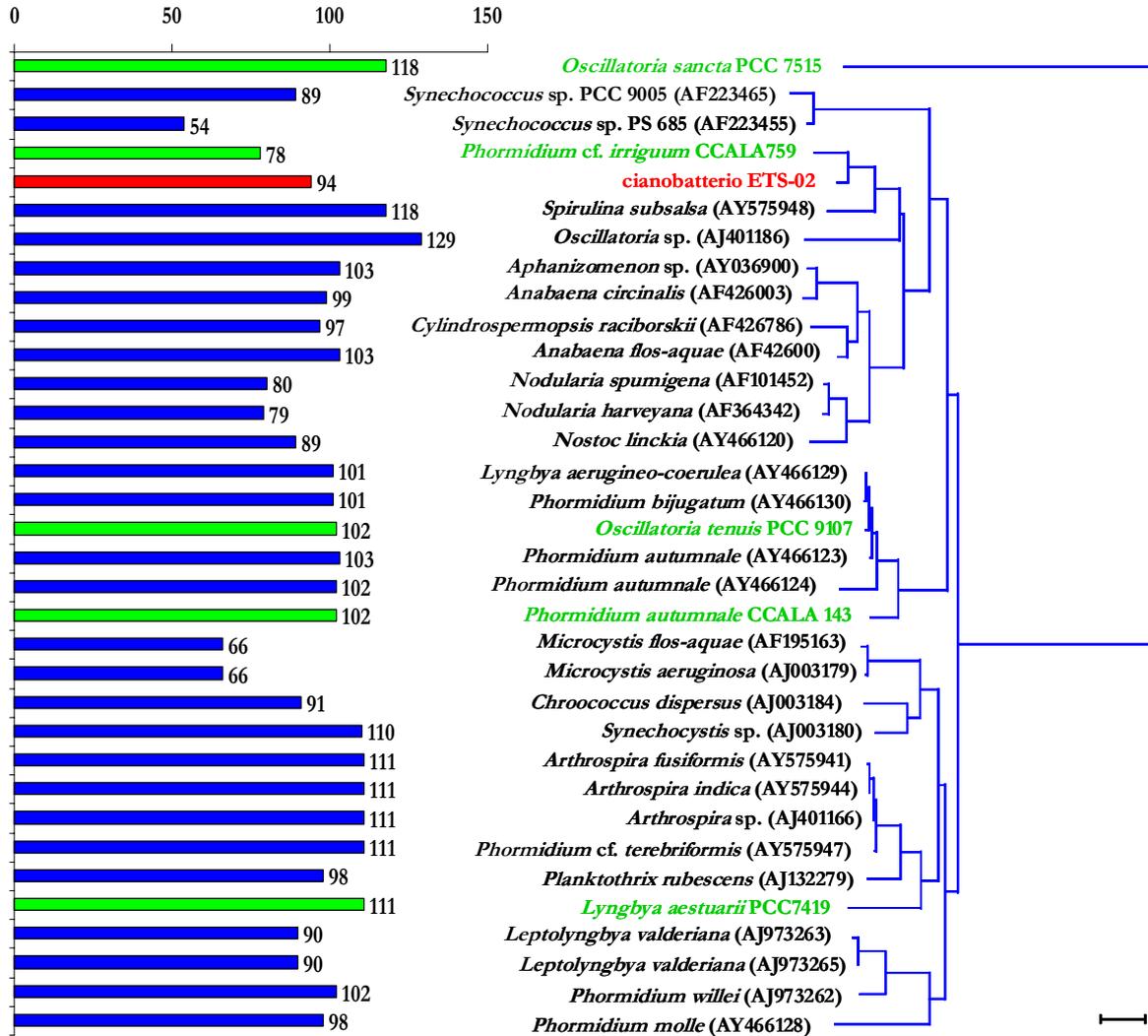


Fig. 28: confronto fra la lunghezza dell'IGS e la relazioni filogenetiche evidenziate dalla ricostruzione con il marker *cpcB-IGS-cpcA*. A destra, gli istogrammi mostrano la lunghezza in pb dell'IGS (in rosso quella di ETS-02, in verde quelle dei ceppi di confronto acquistati, in blu quelle dei rimanenti organismi). A sinistra, la topologia ottenuta col *cpcB-IGS-cpcA*, corrispondente a quella di figura 26 (in rosso la sequenza di ETS-02, in verde quelle dei ceppi di confronto acquistati, in nero quelle dei rimanenti organismi).

Confrontando, poi, singolarmente le percentuali calcolate con quelle finora determinate in altri lavori per le diverse regioni del locus *cpcB-IGS-cpcA*, la percentuale di differenze nucleotidiche della regione del *cpcA* (6,5%) si avvicina al 5% trovato, nella stessa porzione, tra i differenti ceppi di *Phormidium autumnale* sopra nominati (Teneva *et al.*, 2005). La percentuale di differenze della regione *cpcA*, , riportata nello stesso lavoro, per diverse specie di *Phormidium* è, invece, del 44%.

Questi dati suggeriscono che il cianobatterio ETS-02 e *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759 siano due distinti ceppi della stessa specie.

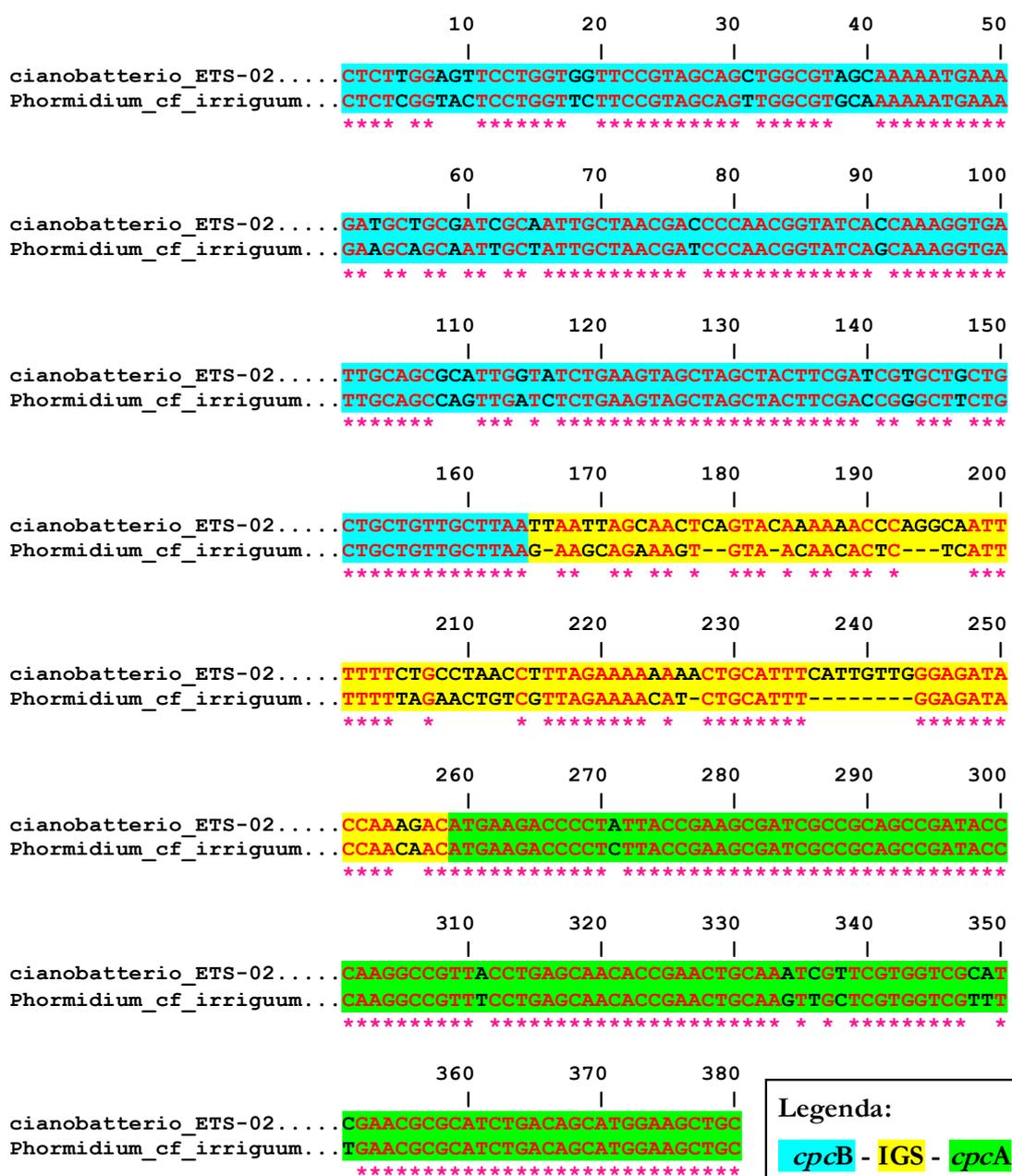


Fig. 29: confronto fra la sequenza nucleotidica del *cpcB*-IGS-*cpcA* del cianobatterio ETS-02 e di quella di *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759, con l'individuazione dell'ultima parte del gene *cpcB*, dello spaziatore intergenico IGS e della prima parte del gene *cpcA*.

Esaminando, infine, la ricostruzione filogenetica basata sul gene 16S rDNA (fig. 30), si osserva nuovamente l'associazione tra *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759 e il microrganismo oggetto di questa tesi, seppure con un valore di BT più basso, pari all'86%.

In questa topologia, inoltre, il cianobatterio ETS-02 e *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759 formano un clade con *Phormidium ambiguum* IAM M-71 e *Pseudanabaena* sp. PCC 7403, anche se tale gruppo non è tuttavia supportato da elevati valori di BT. Inoltre, un altro raggruppamento, costituito dalle specie *Phormidium uncinatum* SAG 81.79 e *Phormidium tergestinum* CCALA 155, risulta filogeneticamente vicino al suddetto clade (seppur sempre senza un elevato supporto di BT).

Come *Phormidium irriguum*, la proposta specie-tipo dell'intero genere, anche *Phormidium ambiguum* e *Phormidium uncinatum* appartengono al gruppo VIII del genere *Phormidium*. *Phormidium tergestinum* è, invece, un membro del V gruppo (Komárek & Anagnostidis, 2005).

Il suddetto clade fa parte, poi, di un raggruppamento più ampio, comprendente la maggior parte delle specie di Oscillatoriales considerate in questa ricostruzione filogenetica, tra cui i ceppi acquistati come confronto. Tra gli organismi presenti in questa regione dell'albero spicca un sottogruppo supportato dal 100% di BT, costituito da tre diversi ceppi di *Phormidium autumnale* e dall'organismo *Oscillatoria nigro-viridis* PCC 7212. Quest'ultimo è stato recentemente riattribuito al genere *Phormidium* (Komárek & Anagnostidis, 2005).

Sempre nella topologia ricostruita con il gene 16S rDNA, il gruppo delle Nostocales risulta, ancora una volta, monofiletico, con un 67% di BT, e *sister taxon* di altri due cianobatteri azotofissatori eterocistici, appartenenti però all'ordine delle Stigonematales, con un BT pari all'88%. Quindi, anche in questo caso, i cianobatteri azotofissatori eterocistici formano un unico clade.

In aggiunta, il raggruppamento dei cianobatteri azotofissatori eterocistici e quello dei membri dell'ordine Oscillatoriales sopra descritto sono strettamente imparentati fra loro.

In posizione basale rispetto ai due raggruppamenti appena citati si trova, poi, un clade costituito da membri dell'ordine Chroococcales (BT 86%) e, più basale ancora, l'insieme di altri cianobatteri coccoidi e di alcune specie dell'ordine Oscillatoriales. Di queste ultime, il ceppo *Leptolyngbya* sp. PCC 7375 è filogeneticamente vicino (con un 100% di BT) a *Phormidium persicinum* CCMP 638, recentemente riattribuito al genere *Pseudanabaena* (Komárek & Anagnostidis, 2005), mentre il ceppo *Leptolyngbya* sp. PCC 73110 risulta *sister taxon* dell'organismo *Phormidium* sp. IAM M-99 (100% di BT), da poco riconsiderato come appartenente al genere *Leptolyngbya* (Casamatta *et al.*, 2005).

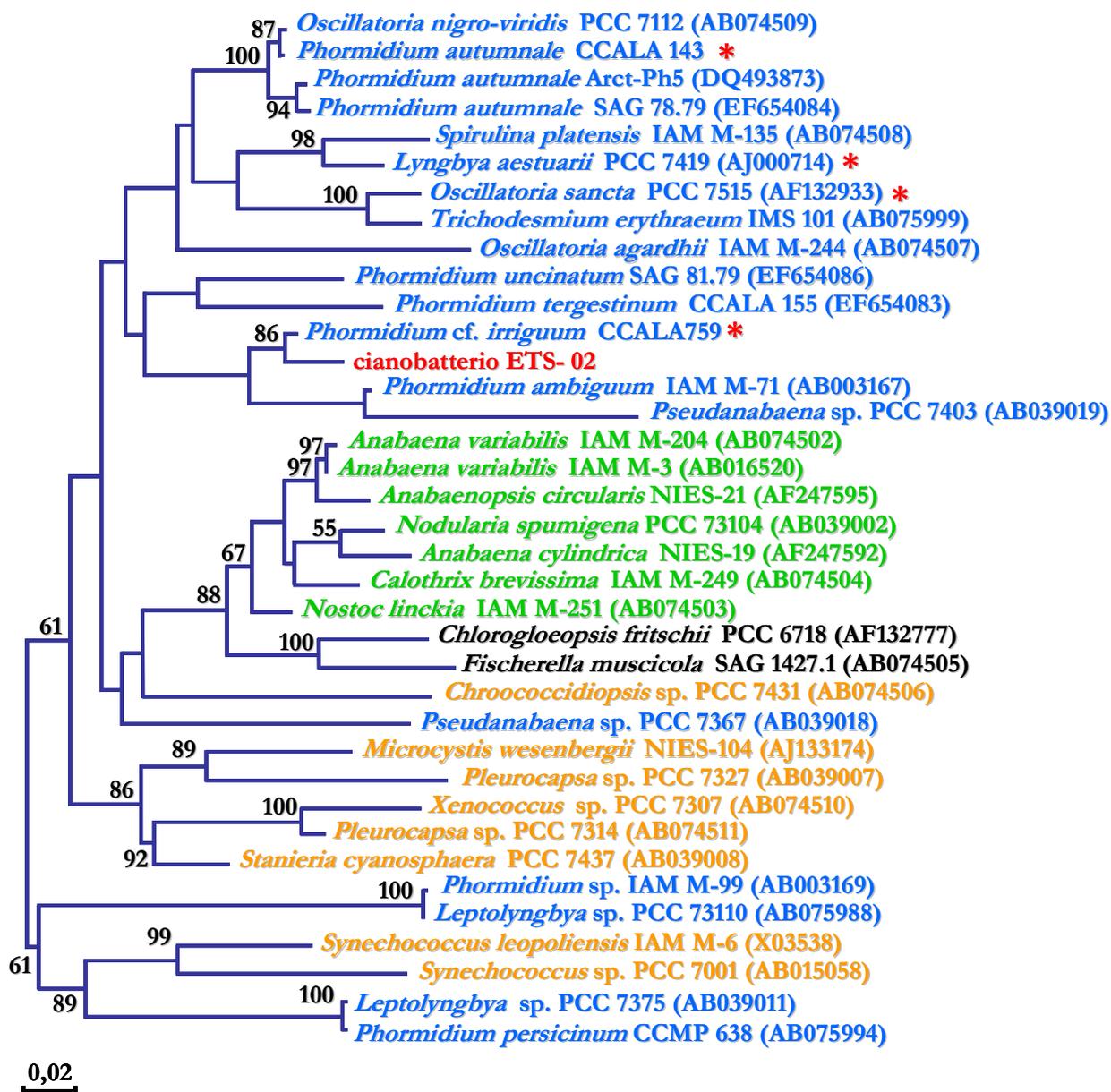


Fig. 30: ricostruzione filogenetica basata sul gene 16S rDNA. L'organismo in esame è evidenziato in rosso, i cianobatteri appartenenti all'ordine Oscillatoriales sono colorati in azzurro, quelli dell'ordine Nostocales in verde, quelli dell'ordine Stigonematales in nero e quelli dell'ordine Chroococcales in arancione. Gli ordini Nostocales e Stigonematales sono costituiti da cianobatteri azotofissatori eterocistici. I ceppi acquistati come confronto sono indicati da un asterisco rosso. I valori di $BT \geq 50\%$ sono riportati vicino al corrispondente nodo. Barra=nr di sostituzioni nucleotidiche/sito.

Sono state, successivamente, calcolate le *p-distance* e le corrispondenti identità nucleotidiche del gene 16S rDNA fra il cianobatterio in studio e gli altri membri del genere *Phormidium* ai quali esso risulta filogeneticamente vicino secondo la ricostruzione effettuata con tale *marker* (tab. 12).

Adottando la soglia del 97,5% di identità fra le sequenze del gene 16S rDNA per stabilire l'appartenenza di due cianobatteri alla stessa specie, come è stato già fatto da altri autori (Stackebrandt & Goebel, 1994; Casamatta *et al.*, 2005, Rajaniemi *et al.*, 2005; Palinska & Marquardt, 2008), da quanto riportato in tabella 12, sembra nuovamente che l'organismo in esame e *Phormidium cf. irriguum* CCALA 759 siano due ceppi della stessa specie.

Allo stesso modo, *Oscillatoria nigro-viridis* PCC 7112, *Phormidium autumnale* CCALA 143, *Phormidium autumnale* Arct-Ph5 e *Phormidium autumnale* SAG 78.79 apparterrebbero tutti alla stessa specie, che, vista la maggioranza, si può concludere sia *Phormidium autumnale*.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
1. cianobatterio ETS-02	-	2,2	5,6	7,4	7,4	7,7	7,6	7,9	8,3
2. <i>Phormidium cf. irriguum</i> CCALA 759	97,8	-	4,9	7,2	7,2	7,5	7,4	7,7	7,9
3. <i>Phormidium ambiguum</i> IAM M-71	94,4	95,1	-	8,3	8,0	8,3	7,9	8,7	8,5
4. <i>Oscillatoria nigro-viridis</i> PCC 7112	92,6	92,8	91,7	-	0,4	1,8	1,9	7,7	8,7
5. <i>Phormidium autumnale</i> CCALA 143	92,6	92,8	92,0	99,6	-	1,6	1,9	7,5	8,6
6. <i>Phormidium autumnale</i> Arct-Ph5	92,3	92,5	91,7	98,2	98,4	-	0,8	7,6	9,7
7. <i>Phormidium autumnale</i> SAG 78.79	92,4	92,6	92,1	98,1	98,1	99,2	-	7,5	9,5
8. <i>Phormidium uncinatum</i> SAG 81.79	92,1	92,3	91,3	92,3	92,5	92,4	92,5	-	7,8
9. <i>Phormidium tergestinum</i> CCALA 155	91,7	92,1	91,5	91,3	91,4	90,3	90,5	92,2	-

Tabella 12: percentuali di *p-distance* (evidenziate in grigio) e corrispondenti identità nucleotidiche (evidenziate in giallo) tra le sequenze del 16S rDNA di alcuni membri del genere *Phormidium* considerati nell'analisi e dell'organismo in esame. I diversi ceppi sono associati ad un numero (nella prima colonna), riportato nella prima riga d'intestazione della tabella. I valori si riferiscono ad un allineamento di 1102 pb.

Al contrario, la soglia del 95% di identità nucleotidica fra i geni del 16S rDNA, per stabilire l'appartenenza di due cianobatteri allo stesso genere (Rosselló-Mora & Amann, 2001; Rajaniemi *et al.*, 2005; Palinska & Marquardt, 2008), sembra troppo stringente. Andando più in dettaglio, se può essere plausibile che *Oscillatoria nigro-viridis* PCC 7112 e i tre ceppi di *Phormidium autumnale* appartengano allo stesso genere (98,1-99,6% d'identità nucleotidica), che *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759 e *Phormidium ambiguum* IAM M-71 costituiscano un altro genere distinto (95,1% di identità nucleotidica) e che i restanti cianobatteri di tabella 17 rappresentino altrettanti nuovi generi, non è ben chiara la situazione di ETS-02. Paradossalmente, infatti, il ceppo in esame appartenerrebbe allo stesso genere di *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759 (oltre che alla stessa specie), in base alla soglia del 95%, ma non sarebbe incluso nello stesso genere di *Phormidium ambiguum* IAM M-71 (94,4% di identità nucleotidica).

Evidentemente la percentuale di identità nucleotidica di parte del genoma, può contribuire, ma non bastare da sola, a determinare l'appartenenza degli organismi a determinati *taxa*, ribadendo ancora una volta la necessità di utilizzare un approccio polifasico per una corretta identificazione dei cianobatteri (Garcia-Pichel *et al.*, 2001; Hoffmann, 2005; Hoffmann *et al.*, 2005; Komárek & Anagnostidis, 2005; Marquardt & Palinska 2007, Palinska & Marquardt, 2008).

Infine, per supportare i dati riguardanti le abilità azotofissatrici del cianobatterio in studio, suggerite dalla sua capacità di crescere in terreno privo d'azoto (pur senza la formazione di eterocisti), si è, inoltre, cercata la presenza, nel genoma, del gene *nifD*, costruendo dei *primer* adatti allo scopo.

Il gene *nifD*, codifica infatti, per due subunità della dinitrogenasi, un complesso tetramerico che, assieme alla dinitrogenasi reductasi, costituisce l'enzima nitrogenasi. Tale enzima è responsabile della fissazione dell'azoto molecolare (Henson *et al.*, 2004). Inoltre, nei *database* informatici, per il gene *nifD* sono depositate le sequenze complete di numerosi cianobatteri azotofissatori, sia eterocistici sia non-eterocistici, facilitando così la costruzione dei *primer* e il successivo confronto. Tra le sequenze disponibili in Genbank sono state trovate, fra l'altro, quella di *Oscillatoria sancta* PCC 7515 e quella di *Lyngbya aestuarii* PCC 7419, due dei cianobatteri acquistati come confronto.

Le successive reazioni di amplificazione e sequenziamento hanno portato alla determinazione di una sequenza di 865 pb.

Il confronto della sequenza ottenuta con le altre disponibili nei *database* informatici, tramite il programma *BLAST*, ha evidenziato un'identità compresa tra il 74 e il 79% con le sequenze del gene *nifD* di altri cianobatteri.

In tabella 13 sono riportati alcuni dei risultati trovati da *BLAST*.

<i>nifD</i> accession nr	organismo	copertura	% d'identità
EF576856	<i>Chroococcidiopsis</i> sp. PCC 6712	99%	79%
EF576861	<i>Stanieria</i> sp. PCC 7301	100%	77%
CP000117	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	99%	75%
CP001037	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	98%	75%
EF576858	<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7004	100%	75%
AY196951	<i>Calothrix</i> sp. PCC 7507	98%	75%
DQ472017	<i>Nostoc</i> sp. 1189P	92%	76%
AF442509	<i>Nodularia spumigena</i> PCC 73104	91%	76%
CP000393	<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS 101	99%	74%
AF442508	<i>Cylindrospermum stagnale</i> PCC 7417	91%	76%
AY196953	<i>Calothrix</i> sp. PCC 7101	98%	75%
EF178283	<i>Nostoc</i> sp. 1190P	92%	75%
EF576872	<i>Symploca atlantica</i> PCC 8002	99%	74%
AF442505	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7108	98%	74%
AF442506	<i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122	98%	74%

Tabella 13: risultati trovati da **BLAST** per la sequenza amplificata dal genoma dell'organismo in esame con i primer NifD1F e NifD2R. I risultati sono riportati secondo l'ordine attribuito da **BLAST**, in base ai punteggi calcolati dal programma stesso.

4.1.3 Caratterizzazione dell'assetto pigmentario

E' stata, successivamente, condotta un'indagine sull'assetto pigmentario del cianobatterio isolato.

A tal fine sono state estratte le ficobiliproteine totali in tampone fosfato. L'estratto acquoso così ottenuto si presentava di un caratteristico colore tra l'azzurro e il lavanda.

La successiva analisi allo spettrofotometro ha rivelato uno spettro insolito, caratterizzato dalla presenza di due picchi massimi di assorbimento alle lunghezze d'onda di 576 nm e 608 nm (fig. 31).

Il picco a 576 nm è riconducibile al pigmento ficoeritrocianina (PEC), la quale normalmente può presentare dei picchi massimi di assorbimento tra 570 e 585 nm, a seconda dell'organismo e delle condizioni in cui è stata estratta (Bryant, 1982; Garcia-Pichel *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2003). Nei cianobatteri in cui è presente, tale pigmento costituisce la parte periferica dei bastoncelli dei ficobilisomi, al posto della ficoeritrina (PE). Questo è il motivo per cui, nel cianobatterio esaminato non si ritrova il tipico picco di assorbimento della PE, attorno a 563-565 nm (Sun *et al.*, 2003). L'assenza di PE è una caratteristica di numerosi ceppi appartenenti al genere *Phormidium* (Marquardt & Palinska, 2007; Palinska & Marquardt, 2008).

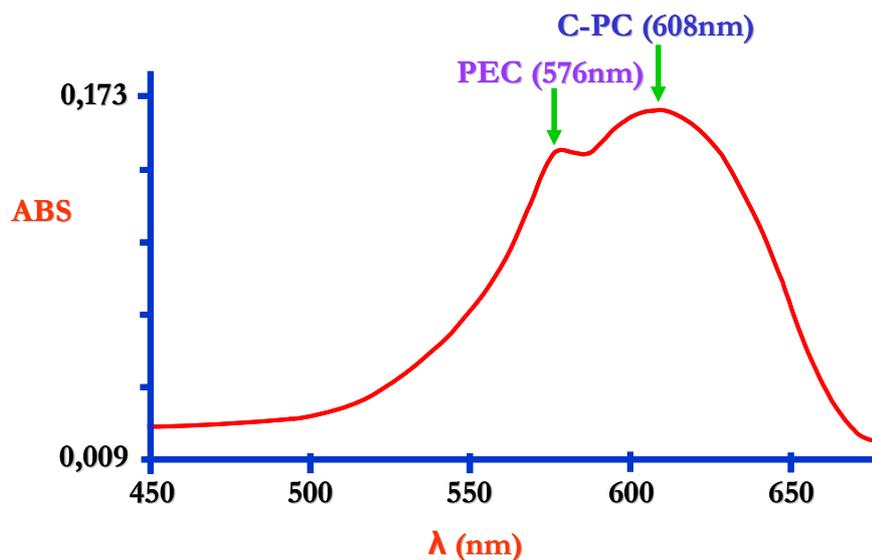


Fig. 31: spettro dell'estratto delle ficobiliproteine di ETS-02. Le frecce indicano i picchi corrispondenti alla ficoeritrocianina (PEC) e alla C-ficocianina (C-PC).

La PEC contiene due diversi cromofori: la ficocianobilina, presente anche nella C-ficocianina (C-PC) e nell'alloficocianina (APC), e la ficobiliviolina, presente esclusivamente in questo tipo di ficobiliproteina e responsabile del suo particolare color lavanda. Questa ficobiliproteina è stata, finora, ritrovata in un numero limitato di cianobatteri, tra cui *Mastigocladus laminosum*, *Anabaena variabilis* e *Microcoleus chthonoplastes* (Bryant, 1982; Zilinskas & Howell, 1987; Garcia-Pichel *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2003) ed è un pigmento ad alta energia, che serve ad assorbire la luce nella regione verde dello spettro visibile (Sun *et al.*, 2003).

Il picco a 608 nm è risultato alquanto singolare, essendo atteso un picco più traslato, tra i 615 e i 620 nm, corrispondente alla C-ficocianina (Sun *et al.*, 2003). Questa ficobiliproteina a media energia è, infatti, quella presente in maggior quantità nei cianobatteri di color verde azzurro, come l'organismo in esame.

Dalla ricerca effettuata in letteratura, è stato possibile attribuire, comunque, questo picco alla C-PC, sebbene probabilmente ad una particolare forma di questo pigmento. Una C-PC con un picco di assorbimento a 608-610 nm è stata, infatti, ritrovata finora solo in un ceppo di *Synechococcus lividus*, un cianobatterio termofilo isolato da una sorgente termale del Parco Nazionale dello Yellowstone (U.S.A.). Questo organismo è in grado di vivere a temperature di 68-73°C e, dagli esperimenti effettuati, sembra che il particolare tipo di C-PC che possiede abbia una termostabilità maggiore rispetto alla normale C-PC ritrovata nei cianobatteri (Edwards *et al.*, 1996). Saranno necessari ulteriori studi sulla C-PC del cianobatterio in esame, per capire se, effettivamente, rappresenti anch'essa una forma particolare di tale gruppo di pigmenti, più termostabile rispetto a quella

comunemente ritrovata, e quindi un adattamento dell'organismo all'ambiente termale del Comprensorio Euganeo.

Nel ceppo ETS-02, è presente, molto probabilmente, anche l'APC, che generalmente costituisce il *core* dei ficobilisomi dei cianobatteri (Sun *et al.*, 2003). Forse, essendo questa ficobiliproteina presente solitamente in quantità minori rispetto alla C-PC, il suo picco massimo di assorbimento (650 nm) è mascherato dallo spettro di quest'ultima.

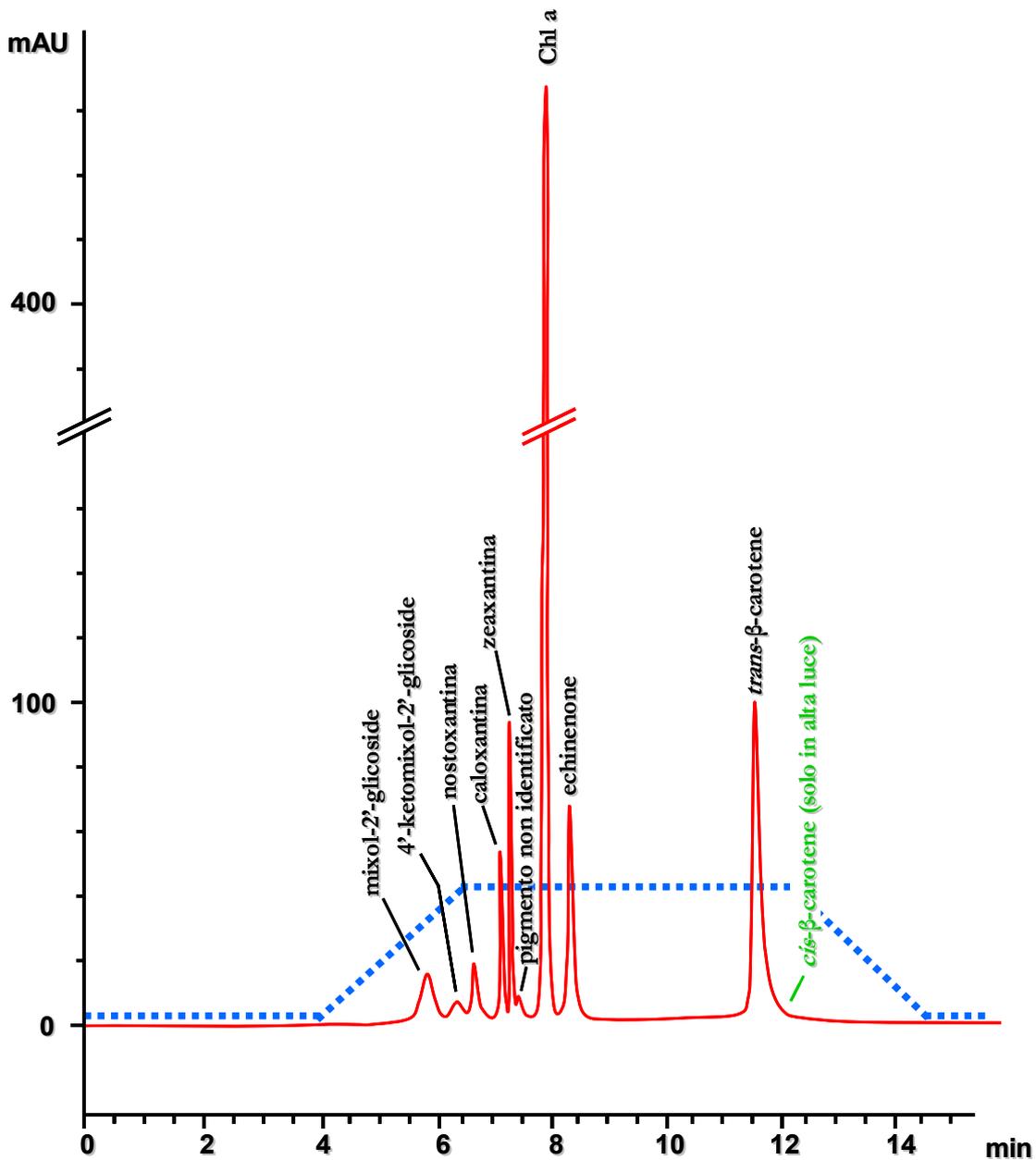


Fig. 32: spettro dei pigmenti liposolubili di ETS-02, mantenuto a 30°C e 14-16 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La freccia verde indica il punto in cui compare il *cis*- β -carotene (sempre in verde) solo nella condizione di alta luce (vedi par. 4.2).

E' stata, poi, condotta un'indagine sui pigmenti liposolubili dell'organismo mantenuto a diverse condizioni di luce e temperatura, mediante la tecnica dell'HPLC a fase inversa.

Il cianobatterio ETS-02 mostra un'ampia varietà di carotenoidi, alcuni dei quali costitutivamente presenti, mentre altri prodotti solo in determinate condizioni di crescita (vedi par. 4.2). In particolare, i carotenoidi individuati sono (fig. 32): due mixoxantofille (probabilmente un 2'-mixoglicoside e un 4'-chetomixo-2'-glicoside) (Lakatos *et al.*, 2001; Takaichi *et al.*, 2005), la nostoxantina, la caloxantina, la zeaxantina, l'echinenone, il *trans*- β -carotene e il *cis*- β -carotene. E' poi presente un carotenoide non identificato, simile, per ordine di eluizione e spettro, ad un altro già ritrovato in alcuni cianobatteri studiati nel nostro laboratorio e ad un pigmento riportato in letteratura per *Synechocystis pevalekii* (Müller *et al.*, 2003) e *Spirulina platensis* (Mendiola *et al.*, 2005).

Il *pattern* di carotenoidi osservato assomiglia a quello di altri cianobatteri filamentosi, come diversi ceppi di *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Nostoc* e *Anabaena* in cui è stata segnalata la presenza di mixoxantofille, nostoxantina, caloxantina, zeaxantina, echinenone e diverse forme di β -carotene (Aakermann *et al.*, 1992; Schlüter *et al.*, 2004; Schagerl & Müller, 2006; Takaichi & Mochimaru, 2007).

4.1.4 Determinazione degli acidi grassi presenti

E' stata condotta anche un'analisi sulla composizione in acidi grassi del ceppo ETS-02, utilizzando la tecnica della gas-cromatografia.

Da tale indagine è risultato che le membrane del cianobatterio sono costituite principalmente dalle seguenti molecole aciliche: acido palmitico (16:0); acido palmitoleico (16:1); acido stearico (18:0); acido oleico (C18:1, Δ 9), acido *cis*-vaccenico (C18:1, Δ 11), acido linoleico (18:2) e acido α -linolenico (α 18:3). In percentuale minore, sono stati, poi, ritrovati l'acido miristico (14:0), l'acido miristoleico (14:1) e l'acido arachidico (20:0).

L'acido *cis*-vaccenico è stato finora ritrovato in un numero limitato di cianobatteri, appartenenti ai gruppi 1 e 2 (Murata *et al.*, 1992; Kiseleva *et al.*, 1999; Vargas *et al.* 1998, Allakhverdiev *et al.*, 2001).

Il *pattern* lipidico osservato, nel suo complesso, permette di collocare l'organismo in esame nel gruppo 2 di cianobatteri (Murata *et al.*, 1992; Murata & Wada, 1995; Gugger *et al.*, 2002) ed è in accordo con la presenza di tre tipi di desaturasi: la Δ 9 desaturasi (*desC*), che produce gli acidi grassi monoinsaturi; la Δ 12 desaturasi (*desA*), responsabile del doppio legame a livello del carbonio 12 negli acidi linoleico e α -linolenico, e la ω 3 (o Δ 15) desaturasi (*desB*), che inserisce il terzo doppio legame nell'acido linoleico, generando l'acido α -linolenico (Tocher *et al.*, 1998; Murata & Wada, 1995).

Secondo quanto si può desumere da differenti fonti bibliografiche il gruppo 2 di cianobatteri comprende numerose forme filamentose azotofissatrici, tra cui membri dei generi *Anabaena* e *Nostoc*.

Dalle analisi morfologiche, ultrastrutturali, biochimiche, fisiologiche e molecolari effettuate il cianobatterio filamentoso isolato risulta appartenere all'ordine Oscillatoriales e alla famiglia Phormidiaceae. In particolare, esso sembra far parte del gruppo VIII del genere *Phormidium*. Tale genere, infatti, essendo alquanto eterogeneo, è stato suddiviso in otto gruppi principalmente sulla base delle estremità apicali dei tricomi (Komárek & Anagnostidis, 2005).

Numerosi lavori mettono in luce la natura polifiletica, non solo dell'ordine Oscillatoriales, ma anche del genere *Phormidium* (Ishida *et al.*, 1997; Teneva *et al.*, 2005; Premanandh *et al.*, 2006; Marquardt & Palinska, 2007; Palinska & Marquardt, 2008), e gli stessi Komárek & Anagnostidis (2005) ritengono che questo *taxon* debba essere rivisto e che tale denominazione debba essere mantenuta solo per i membri del gruppo VIII, per il quale è stata proposta come specie-tipo *Phormidium irriguum*.

La scarsità di lavori che utilizzano un approccio polifasico per caratterizzare le specie del genere *Phormidium* (molti studi riguardano la specie *Phormidium autumnale*, considerata la più diffusa del *phylum* Cyanophyta) e la limitata disponibilità, nei *database* informatici, di sequenze nucleotidiche per i membri di tale genere (eccetto che per il gene 16S rDNA) rendono impossibile, per ora, identificare con certezza l'organismo in esame a livello specifico. Quest'ultimo aspetto è complicato dall'esistenza, nelle banche dati informatiche, di sequenze nucleotidiche attribuite a specie di *Phormidium* di cui però non esiste una descrizione fenotipica o, viceversa, la descrizione di specie appartenenti a tale genere senza una caratterizzazione di tipo molecolare

Infatti, in base al *pattern* evidenziato nella maggior parte delle ricostruzioni filogenetiche effettuate (tutte a parte quella col gene *rbcL*), agli indizi derivati dall'analisi del *locus* *cpcB-IGS-cpcA* e alla percentuale di identità nucleotidica del gene 16S rDNA, adottata da alcuni autori per attribuire due cianobatteri alla stessa specie, il cianobatterio in esame sembra essere un ceppo distinto appartenente alla stessa specie di *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 759. Tuttavia, l'abbreviazione "cf." (*confer*) associata a quest'ultimo organismo e la mancanza, nelle banche algali, di altri ceppi attribuiti con certezza a *Phormidium irriguum* non permettono di assegnare il ceppo ETS-02 a tale specie.

Alla luce dei dati raccolti, il nuovo organismo isolato dalla superficie dei fanghi del Comprensorio termale Euganeo è stato, quindi, denominato, per ora, *Phormidium* sp. ETS-02.

Le indagini biochimiche e fisiologiche condotte hanno, inoltre, evidenziato alcune peculiarità di *Phormidium* sp. ETS-02, come il fatto di essere un organismo azotofissatore non-eterocistico. Questa caratteristica è stata osservata anche in altri membri del genere *Phormidium* (Bergman *et al.*, 1997).

Il cianobatterio in questione presenta, poi, dei ficobilisomi particolari contenenti PEC e una particolare forma di C-PC. La PEC è una ficobiliproteina ritrovata in un numero limitato di cianobatteri tra cui *Mastigocladus laminosum*, un ceppo termofilo (Bryant, 1982; Zilinskas & Howell, 1987), e la C-PC di *Phormidium* sp. ETS-02 presenta un massimo di assorbimento intorno a 608 nm, similmente ad una forma di C-ficocianina ritrovata in un ceppo termofilo di *Synechococcus vulcanus*, la quale mostra una termostabilità superiore a quella delle altre ficobiliproteine finora ritrovate (Edwards *et al.*, 1996).

Il ritrovamento, nel Comprensorio Euganeo, di una nuovo ceppo del genere *Phormidium*, ad una prima osservazione simile al ceppo precedentemente caratterizzato come *Phormidium* sp. ETS-05 (Ceschi-Berrini *et al.*, 2004), è in accordo con il fatto che numerosi cianobatteri, in particolare quelli appartenenti a questo *taxon*, presentano morfotipi molto simili fra loro, in grado di coesistere in uno stesso ambiente, sfruttando nicchie ecologiche differenti (Ward *et al.*, 1998; Paerl *et al.*, 2000; Taton *et al.*, 2003; Kilian *et al.*, 2007; Marquardt & Palinska, 2007).

4.2 ADATTAMENTO DEL CIANOBATTERIO A DIVERSE TEMPERATURE E INTENSITÀ LUMINOSE

L'ambiente delle vasche di maturazione del fango del Comprensorio termale Euganeo è caratterizzato da notevoli variazioni sia di luce che di temperatura.

La fonte di illuminazione è, infatti, la luce solare, la quale può variare a seconda delle condizioni meteorologiche e dell'ora del giorno (inclinazione dei raggi solari che raggiungono la superficie dei fanghi). Quest'ultimo fattore è accentuato dalla presenza di tettoie sulle vasche, con la conseguente alternanza di zone illuminate e zone d'ombra sulla superficie dei fanghi durante le ventiquattro ore.

La temperatura è un altro parametro che, essendo legato al processo di maturazione del fango, può variare considerevolmente da un giorno all'altro. Infatti, alternativamente, in alcune vasche la temperatura raggiunge i 40-50°C, mentre in altre tale parametro scende sotto i 30°C.

Essendo l'intensità luminosa e la temperatura molto importanti per la capacità di sopravvivere degli organismi fotosintetici, si è voluto studiare l'adattamento di *Phormidium* sp. ETS-02 a diversi valori di tali parametri, concentrando l'attenzione su alcuni aspetti delle membrane biologiche. Queste, infatti, sono la sede di numerose attività metaboliche e, quindi, indispensabili per l'omeostasi cellulare.

Sono state, quindi, allestite colture del cianobatterio a tre diverse intensità luminose, qui indicate come bassa (5-7 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), media (14-16 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e alta luce (43-47 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e ad una temperatura costante di 30°C. Altre colture sono state, invece, mantenute a tre diverse temperature (20°C, 30°C e 40°C) e ad un'intensità luminosa di 14-16 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (media luce).

La scelta sia delle intensità luminose che delle temperature utilizzate è risultata da un compromesso fra le ripetute misurazioni di questi due parametri, effettuate durante i campionamenti di monitoraggio presso il Comprensorio Euganeo.

E' stata, quindi, seguita la crescita dell'organismo alle diverse condizioni sperimentali, per 4 settimane, misurando l'aumento nel tempo delle concentrazioni di clorofilla e carotenoidi ($\mu\text{g}/\text{ml}$). A causa della sua natura filamentosa e della variabile quantità di acqua trattenuta dai polisaccaridi extracellulari a seconda delle condizioni in cui si trova, non è stato, infatti, possibile utilizzare altri metodi per valutare la crescita di *Phormidium* sp. ETS-02, come la conta diretta delle cellule o il peso.

Le curve ottenute (figg. 33, 34) presentano un andamento simile nelle diverse condizioni allestite, con una rapida fase di adattamento del cianobatterio dopo l'inoculo (2-3 giorni), seguita da una fase di crescita esponenziale. Questa fase dura generalmente, con alcuni assestamenti, fino circa al 24° giorno, dopo il quale la coltura entra in una fase di crescita stazionaria. Fanno eccezione a ciò le condizioni dei 20°C e della bassa luce, che risultano in fase di crescita esponenziale fino all'ultimo giorno misurato (28° giorno).

Infine, osservando le curve ottenute, è evidente il ridotto contenuto di clorofilla e carotenoidi della condizione di alta luce, peraltro intuibile dall'evidente clorosi delle colture che si osserva anche ad occhio nudo. Il basso contenuto, già in partenza, dei suddetti pigmenti, in tale condizione, è legato al fatto che gli inoculi per gli esperimenti sono stati effettuati da colture "matri", preadattate da almeno un mese alle condizioni allestite per poter valutare gli adattamenti a lungo termine dell'organismo.

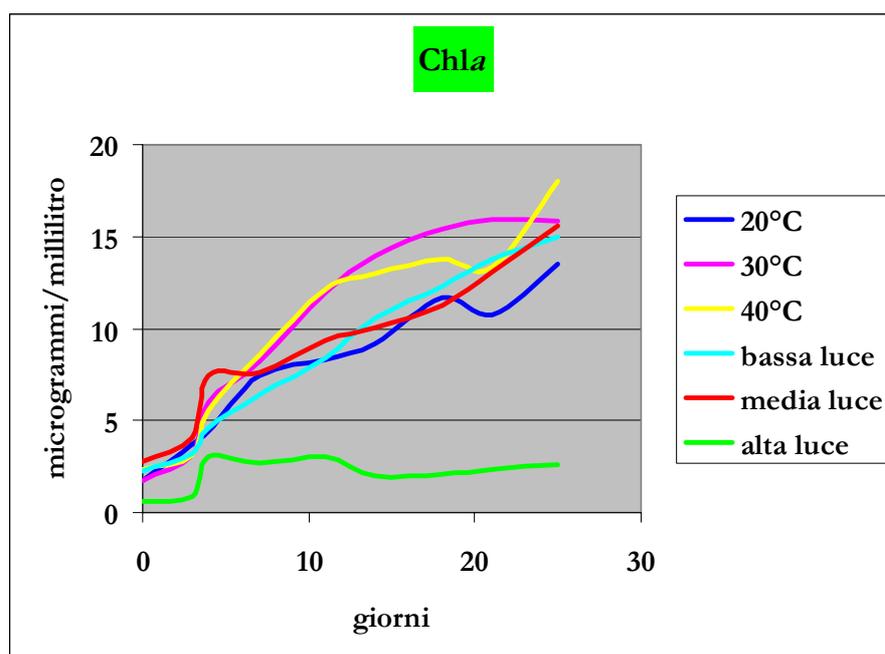


Fig. 33: curve di crescita dell'organismo alle diverse condizioni di temperatura ed intensità luminosa, basate sull'aumento nel tempo della concentrazione di clorofilla a ($\mu\text{g}/\text{ml}$).

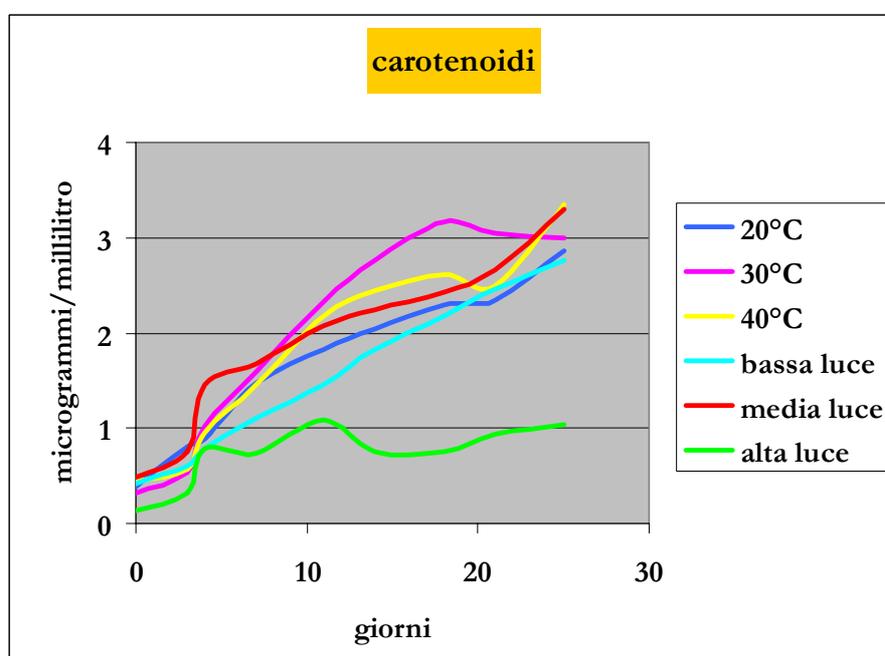


Fig. 34: curve di crescita dell'organismo alle diverse condizioni di temperatura ed intensità luminosa, basate sull'aumento nel tempo della concentrazione di carotenoidi ($\mu\text{g}/\text{ml}$).

Gli acidi grassi totali sono stati estratti dalle colture del cianobatterio poste alle diverse condizioni di mantenimento, e, successivamente, analizzati mediante gascromatografia.

Nelle tabelle 14 e 15 sono riportati i valori medi delle percentuali e le relative deviazioni standard di ciascun acido grasso, per le diverse condizioni di temperatura e luce, rispettivamente. Sotto la denominazione “altri acidi grassi” sono stati raggruppati l’acido miristico, l’acido miristoleico, l’acido arachidico e alcuni isomeri dei principali acidi grassi rilevati.

I valori percentuali dei principali acidi grassi a 16 atomi di carbonio (C16) e a 18 atomi di carbonio (C18) sono illustrati negli istogrammi delle figure 35 e 36, per temperatura e luce, rispettivamente. Le lettere riportate sopra ciascuna barra rappresentano il grado di significatività, valutato applicando l’analisi della varianza (ANOVA) multivariata e utilizzando il test *post hoc* di Duncan ($p < 0,05$).

Acido grasso	20°C	30°C	40°C
C16:0	29,71±0,18	31,10±1,54	35,73±1,11
C16:1 Δ9	26,62±0,76	32,17±1,41	32,15±0,25
C18:0	1,13±0,11	0,73±0,10	1,23±0,22
C18:1 Δ9	5,69±0,85	9,76±0,39	14,05±0,42
C18:1 Δ11	3,77±1,04	4,38±0,30	6,76±0,30
C18:2	4,85±0,79	6,48±0,17	4,77±0,62
C18:3	24,81±1,88	12,06±0,65	2,22±0,40
altri acidi grassi	3,41±0,35	3,33±0,56	3,08±1,31

Tabella 14: percentuali medie e relative deviazioni standard (sei repliche) degli acidi grassi presenti alle diverse condizioni di temperatura. Sono raggruppati sotto “altri acidi grassi” il C14:0, il C14:1, il C20:0 e alcuni isomeri dei principali acidi grassi.

Acido grasso	Bassa luce	Media luce	Alta luce
C16:0	31,27±2,40	30,76±1,76	30,64±0,70
C16:1 Δ9	31,99±1,61	31,94±1,01	23,84±0,45
C18:0	1,03±0,25	0,67±0,09	2,50±0,70
C18:1 Δ9	9,89±0,17	10,28±0,28	13,54±0,52
C18:1 Δ11	4,64±0,71	4,76±0,17	8,46±0,46
C18:2	6,80±0,15	6,64±0,29	12,04±0,47
C18:3	11,86±0,45	12,16±0,61	4,33±0,45
altri acidi grassi	2,52±0,23	2,79±0,29	4,65±0,90

Tabella 15: percentuali medie e relative deviazioni standard (sei repliche) degli acidi grassi presenti alle diverse condizioni di luce. Sono raggruppati sotto “altri acidi grassi” il C14:0, il C14:1, il C20:0 e alcuni isomeri dei principali acidi grassi.

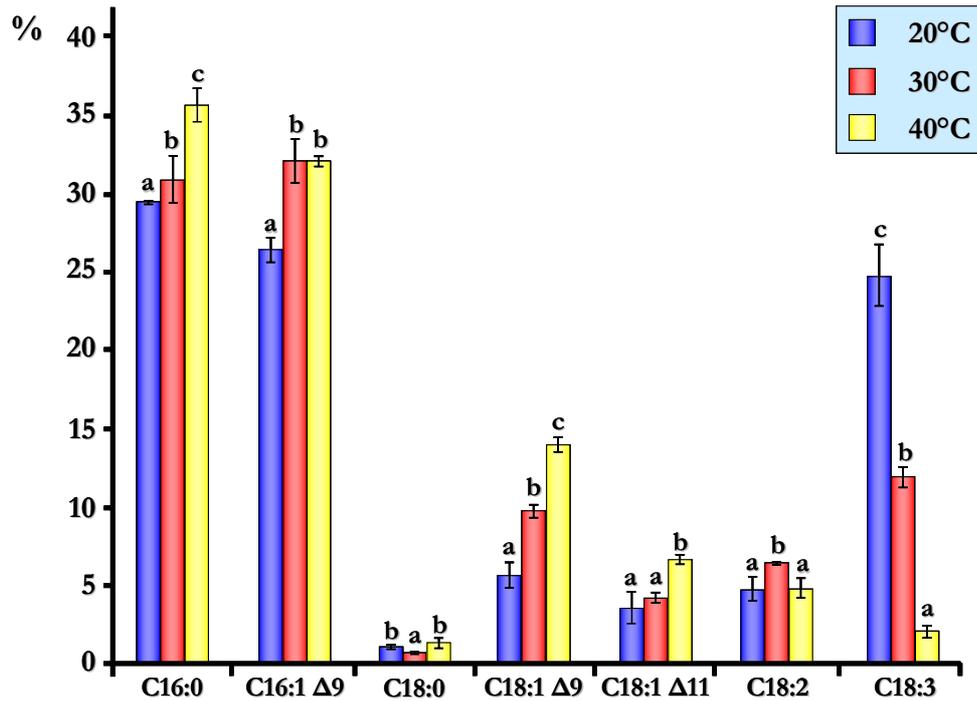


Fig. 35: percentuali degli acidi grassi presenti nelle colture di *Phormidium* sp. ETS-02 mantenute alle tre diverse temperature. Le lettere riportate sopra ciascuna barra rappresentano il grado di significatività, valutato applicando l'ANOVA multivariata secondo il test *post hoc* di Duncan ($p < 0,05$).

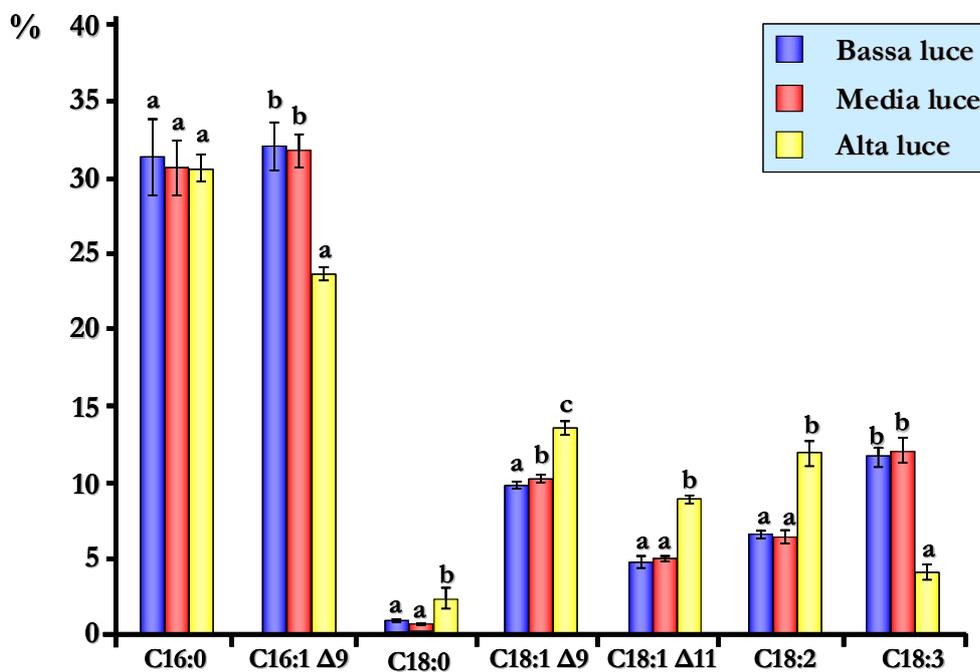


Fig. 35: percentuali degli acidi grassi presenti nelle colture di *Phormidium* sp. ETS-02 mantenute alle tre diverse temperature. Le lettere riportate sopra ciascuna barra rappresentano il grado di significatività, valutato applicando l'ANOVA multivariata secondo il test *post hoc* di Duncan ($p < 0,05$).

Dall'analisi del contenuto in percentuale degli acidi grassi del cianobatterio, mantenuto alle diverse condizioni di crescita, si può affermare che la modulazione del grado di insaturazione degli acidi grassi sia un meccanismo importante per il mantenimento della struttura e quindi dell'efficienza delle membrane non solo, come atteso, in risposta a differenti temperature di crescita, ma anche rispetto alla diversa intensità luminosa in cui l'organismo si trova a vivere. Il *pattern* di questo meccanismo varia, tuttavia, in risposta ai parametri considerati.

Più in dettaglio, il contenuto in C16 risulta alquanto elevato in tutte le condizioni testate, così com'è tipico dei cianobatteri filamentosi (Murata *et al.*, 1992; Singh *et al.*, 2002; Maslova *et al.*, 2004). In particolare, la somma degli acidi grassi C16 è compresa tra 54,48% e 67,88% a seconda delle condizioni di crescita.

Per quanto riguarda la temperatura, il C16:0 risulta significativamente maggiore a 40°C, dove è necessario contenere la già elevata fluidità di membrana dovuta all'alta temperatura, e diminuisce in maniera significativa a 30°C e, ancor più, a 20°C. Il C16:1 è significativamente minore a 20°C rispetto alle altre due condizioni, suggerendo che il grado di insaturazione degli acidi grassi C16 contribuisca in maniera minore al mantenimento della fluidità di membrana alle basse temperature, rispetto ai C18.

Per quanto riguarda l'intensità luminosa, solo il contenuto di C16:1 varia in maniera significativa, risultando minore nella condizione di alta luce.

I meccanismi adattativi si notano in maniera maggiore a livello degli acidi grassi C18, sul cui grado di insaturazione la temperatura di crescita sembra influire in maniera più "lineare", rispetto alla luce.

Il C18:0 risulta più basso a 30°C rispetto alle altre due condizioni di temperatura. Si osserva, poi, un progressivo aumento del grado di insaturazione degli acidi grassi ottadecanoici al diminuire di questo parametro: le percentuali dei C18:1 ($\Delta 9$ e $\Delta 11$) sono maggiori ai 40°C, per poi abbassarsi ai 30°C e ancor più ai 20°C. Alla condizione di temperatura intermedia il contenuto di C18:2 è più elevato che non a 20°C o 40°C, che tra loro non differiscono significativamente. Per quanto riguarda, infine, il C18:3 si ha un *pattern* completamente opposto a quello osservato per il C18:1. L'acido grasso trienoico, infatti, si trova in quantità considerevolmente maggiori alla condizione di 20°C e va via via diminuendo andando verso i 30°C e, soprattutto, verso i 40°C. In particolare la percentuale di C18:3 a 20°C è circa il doppio di quella riscontrata a 30°C e circa undici volte quella trovata a 40°C.

Il *pattern* osservato al variare della temperatura riflette la sequenza di attivazione proposta per le desaturasi, in base ai diversi substrati su cui ciascuna di esse opera (Murata & Wada, 1995; Kis *et al.*, 1998; Los & Murata, 1998; Tocher *et al.*, 1998).

La $\Delta 9$ desaturasi sembra espressa in maniera costitutiva a tutte le condizioni di temperatura, generando il C18:1 (elevato soprattutto a 40°C), ossia il substrato su cui può operare la $\Delta 12$ desaturasi. Questa pare più attiva a 20°C e 30°C, dove produce il C18:2. Tale acido grasso, però, è significativamente più basso non solo a 40°C, ma anche ai 20°C. A quest'ultima temperatura, infatti, sembra maggiormente espressa la $\Delta 15(\omega 3)$ desaturasi, la quale genera C18:3 a spese del C18:2.

Per quanto riguarda le condizioni di luce, sembra che solo l'alta luce testata sia una condizione stressante per l'organismo, comportando cambiamenti significativi a livello del *pattern* degli acidi grassi, mentre le condizioni di media e bassa luce non differiscono quasi mai in maniera significativa fra loro (eccetto che per il C18:1 $\Delta 9$, leggermente più abbondante alla media luce).

Il C16:0 è l'unico acido grasso che non differisce significativamente fra le tre condizioni di luce. Riguardo alle rimanenti specie aciliche, all'alta luce, rispetto alle altre due intensità luminose, risultano significativamente più elevati tutti i tipi di acidi grassi presenti, eccetto il C16:1 e il C18:3.

Sembra che la $\Delta 9$ desaturasi agisca maggiormente a livello dei C18 che dei C16 e che essa sia maggiormente attiva all'alta luce, rispetto alle altre due condizioni luminose, come si può intuire dal maggior contenuto in C18:1 delle colture in alta luce, che non in quelle mantenute a bassa e media luce. In queste ultime risulta, invece, più attiva la $\Delta 15(\omega 3)$ desaturasi, la quale produce C18:3 a spese del C18:2. La $\Delta 15(\omega 3)$ desaturasi sembra, invece, inibita dall'alta luce, con la conseguente scarsa presenza di C18:3 e un maggior contenuto di C18:2 in questa condizione rispetto alle altre due.

I rapporti acidi grassi saturi/acidi grassi insaturi, calcolati sugli acidi grassi C16 e C18, per ciascuna condizione testata, riflettono la differente composizione in specie aciliche delle colture, anche se in misura minore dell'indice DBI (Várkonyi *et al.*, 2002). Questo, infatti, essendo una misura più precisa del numero effettivo di doppi legami presenti negli acidi grassi, mostra variazioni più marcate fra le condizioni testate (tab. 16).

Ciò si nota, soprattutto, per le tre condizioni di luce, dove non sembra esserci un'evidente differenza nel rapporto fra acidi grassi saturi e acidi grassi insaturi. In particolare si osserva una differenza di 0,02 in tale rapporto fra bassa e media luce, di 0,03 fra bassa e alta luce e di 0,05 fra media e alta luce. Sembra, quindi, che il grado di insaturazione generale delle membrane non vari molto al variare dell'intensità luminosa, come riportato da alcuni autori (Kis *et al.*, 1998; Várkonyi *et al.*, 2002; Zsíros *et al.*, 2002).

Se si prende in considerazione l'indice DBI, però, si può constatare una differenza di 0,01 tra bassa e media luce, ma di 0,13 e 0,14 tra bassa e alta luce e

tra media e alta luce, rispettivamente. Questo è dovuto alle differenti specie aciliche implicate. In particolare, l'alto contenuto in acidi grassi monoenoici innalza il grado di insaturazione generale delle membrane nella condizione di alta luce, ma il numero di doppi legami effettivamente presenti è considerevolmente più basso che alle condizioni di bassa e media luce, per la carenza in C18:3.

condizione	acidi saturi/acidi insaturi	DBI
20°C	0,47	1,20
30°C	0,49	0,95
40°C	0,62	0,69
bassa luce	0,50	0,96
media luce	0,48	0,97
alta luce	0,53	0,83

Tabella 16: rapporti acidi grassi saturi/acidi grassi insaturi e indici DBI, calcolati per le diverse condizioni di luce e temperatura.

In conclusione, sembra, quindi, che non solo la temperatura, come atteso in base all'abbondante letteratura disponibile (Los *et al.*, 1993; Murata, 1994; Murata & Wada, 1995; Nishida & Murata, 1996; Los & Murata, 1998; Sakamoto *et al.*, 1997; Sakamoto *et al.*, 1998; Deshnum *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2002; Hongsthong *et al.*, 2003; Maslova *et al.*, 2004), influenzano il contenuto in acidi grassi delle membrane di *Phormidium* sp. ETS-02, ma abbia una certa importanza anche l'intensità luminosa in cui il cianobatterio viene fatto crescere. In particolare, se è vero che non varia molto il grado di insaturazione generale al variare dell'intensità luminosa, cambiano però le singole percentuali delle specie di acidi grassi che compongono le membrane. Questo dato si discosta da quanto finora trovato da altri autori, secondo i quali non è l'intensità luminosa il fattore determinante per la modulazione dell'attività delle desaturasi, ma la presenza/assenza di luce (Kis *et al.*, 1998; Zsiros *et al.*, 2002).

Sarà comunque interessante effettuare un'indagine sui *pattern* di espressione delle desaturasi dell'organismo in esame, mantenuto alle stesse differenti condizioni di crescita, per poter confermare il dato biochimico ottenuto.

Per capire il contributo dei carotenoidi al mantenimento della funzionalità delle membrane di *Phormidium* sp. ETS-02, sono stati, successivamente, estratti i pigmenti liposolubili dalle colture, mantenute alle differenti condizioni di luce e temperatura, e gli estratti sono stati analizzati mediante HPLC.

Le tabelle 17 e 18 riportano i valori percentuali dei diversi tipi di carotenoidi, per le differenti condizioni di temperatura e luce, rispettivamente. Questi stessi valori sono meglio illustrati negli istogrammi riportati nelle figure 37 e 38.

carotenoide	20°C	30°C	40°C
myxol-2-glicoside	14,16	6,38	-
4-ketomyxol-2-glicoside	5,95	5,89	-
nostoxantina	-	1,63	7,00
caloxantina	1,99	5,45	8,20
zeaxantina	21,49	24,34	23,97
pigmento non identificato	2,26	2,40	2,09
echinenone	10,43	16,87	17,12
trans β -carotene	43,72	37,03	41,63
cis- β -carotene	-	-	-

Tabella 17: percentuali dei carotenoidi alle diverse condizioni di temperatura.

carotenoide	bassa luce	media luce	alta luce
myxol-2-glicoside	5,08	6,49	14,86
4-ketomyxol-2-glicoside	3,72	5,79	12,84
nostoxantina	1,07	1,43	3,18
caloxantina	5,78	5,65	8,24
zeaxantina	24,24	24,12	18,24
pigmento non identificato	2,21	2,62	-
echinenone	14,72	16,64	21,18
trans β -carotene	43,18	37,26	11,09
cis- β -carotene	-	-	10,37

Tabella 18: percentuali dei carotenoidi alle diverse condizioni di luce.

Dalla preliminare indagine condotta, risultano presenti in maniera rilevante, in tutte le condizioni allestite, i seguenti carotenoidi: β -caroteni, echinenone e zeaxantina, come riportato per la maggior parte dei cianobatteri studiati (Aakermann *et al.*, 1992; Várkonyi *et al.*, 2002; Schlüter *et al.*, 2004; Schagerl & Müller, 2006; Takaichi & Mochimaru, 2007).

Il contenuto di zeaxantina non varia, quindi, molto tra le tre condizioni di temperatura testate, rappresentando in tutte una percentuale consistente dei carotenoidi estratti (tra il 21,49 e il 24,34%). Per quanto riguarda le colture mantenute alle diverse luci, la zeaxantina risulta sempre una componente fondamentale dei pigmenti analizzati, anche se nelle colture mantenute in alta luce è presente in minor quantità (18,24% contro i 24,12 e 24,24% delle condizioni di media e bassa luce, rispettivamente). Questa osservazione è diversa da quanto trovato da altri autori, che hanno riportato un aumento del contenuto

di zeaxantina nei cianobatteri esposti ad elevate intensità luminose, attribuendo a questa xantofilla un importante ruolo fotoprotettivo (Schagerl & Müller, 2006; Kilian *et al.*, 2007). Tuttavia, in alcuni studi condotti su cianobatteri terrestri la zeaxantina non sembra aumentare con l'intensità luminosa (Leisner *et al.*, 1994). La diminuzione del contenuto di tale pigmento in *Phormidium* sp. ETS-02 mantenuto in alta luce può essere, inoltre, legata alla possibile via di biosintesi dei carotenoidi di questo organismo. In tale condizione di crescita, si osserva, infatti, l'aumento di altri pigmenti liposolubili come la nostoxantina e l'echinenone.

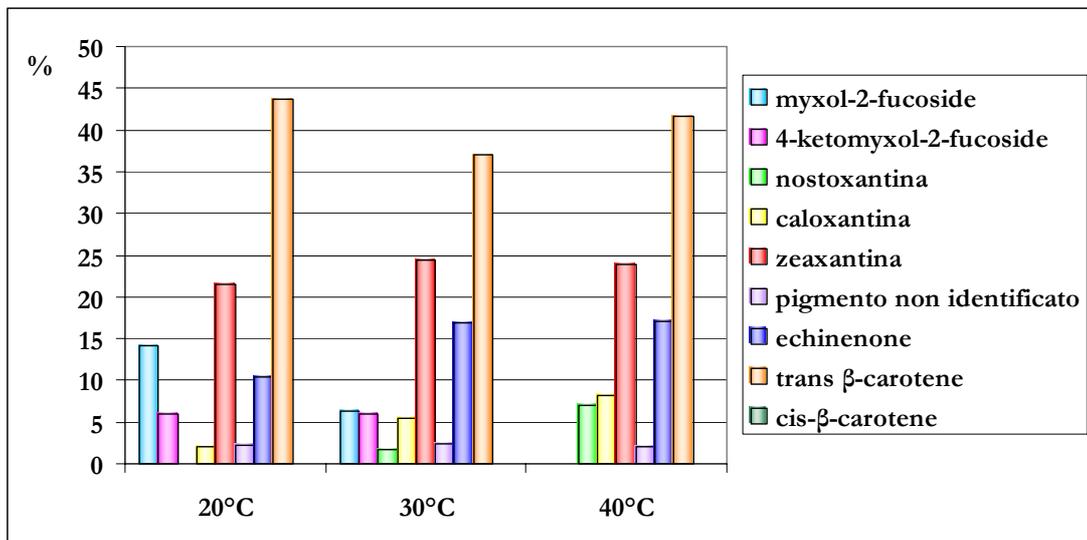


Fig. 37: percentuali dei pigmenti liposolubili presenti nelle colture di *Phormidium* sp. ETS-02 mantenute alle tre diverse temperature.

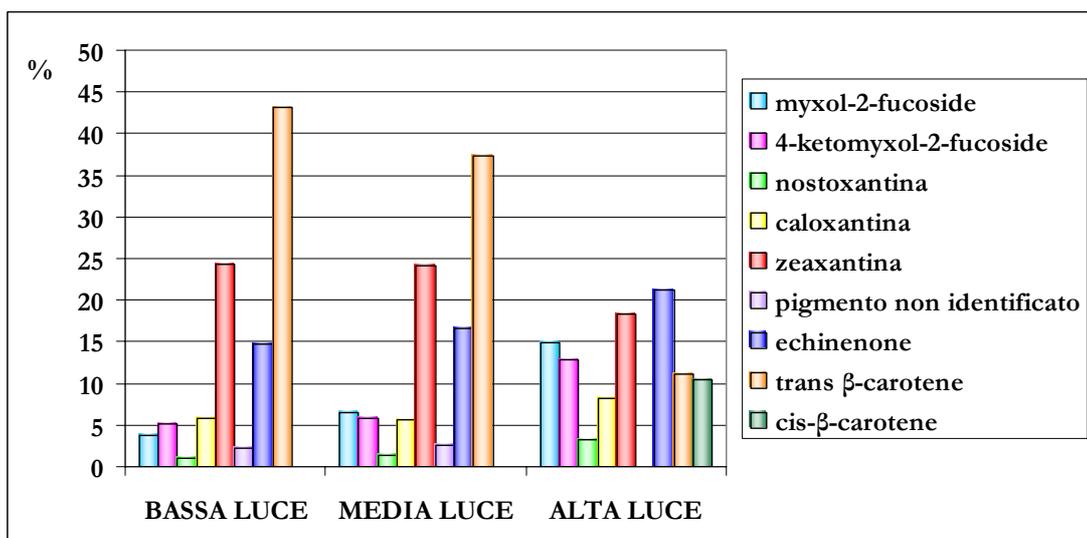


Fig. 38: percentuali dei pigmenti liposolubili presenti nelle colture di *Phormidium* sp. ETS-02 mantenute alle tre diverse intensità luminose.

L'echinenone è presente abbondantemente in tutte le condizioni sperimentate e, come appena accennato, sembra aumentare leggermente all'aumentare dell'intensità luminosa: dal 14,72% della bassa luce al 21,18% dell'alta luce. Ciò è in accordo con quanto trovato per altri cianobatteri (Ehling-Schulz *et al.*, 1997; Schagerl & Müller, 2006). Esso diminuisce, poi, all'abbassarsi della temperatura, presentandosi in percentuale minore (10,43%) nell'organismo cresciuto a 20°C, rispetto alle altre due temperature (16,87 a 30°C e 17,12% a 40°C).

Tra i caroteni presenti, il *trans*- β -carotene risulta leggermente più elevato a 20°C e a 40°C, che non a 30°C; mentre, per quanto riguarda le diverse luci testate, si osserva una diminuzione notevole del contenuto di tale pigmento all'aumentare dell'intensità luminosa. Alla condizione di alta luce, infatti, esso rappresenta solo l'11,09% dei carotenoidi totali, probabilmente perchè in parte sostituito dal suo isomero, il *cis*- β -carotene, che compare solo in questa condizione. La loro somma (21,46%), comunque, è inferiore al contenuto del solo *trans*- β -carotene nelle condizioni di bassa (43,18%) e media luce (37,26%). La diminuzione del β -carotene all'aumentare dell'intensità luminosa è stata già osservata per alcuni cianobatteri terrestri (Lakatos *et al.*, 2001). E' stato, inoltre, osservata una riduzione nel contenuto di tale carotenoide in *Synechocystis pevalekii* in seguito a uno *stress* da carenza di nutrienti (Müller *et al.*, 2003).

Per quanto riguarda il *cis*- β -carotene, gli studi che ne riportano la presenza nei cianobatteri sono piuttosto limitati (Bialek-Bylka *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 2003) e non si può escludere che la forma *cis* trovata in *Phormidium* sp. ETS-02 sia rappresentata da isomeri formati in seguito alla manipolazione durante le procedure sperimentali. D'altro canto il fatto che questo pigmento compaia solo nella condizione di alta luce potrebbe essere un dato effettivo, soprattutto in virtù di ricerche effettuate su microalghe, secondo le quali il *cis*- β -carotene, avendo proprietà antiossidanti superiori alla forma *trans* (Jimenez & Pick, 1993), viene prodotto in condizioni fotochimicamente stressanti (García-González *et al.*, 2005).

Riguardo ai carotenoidi presenti in minor quantità, il contenuto in caloxantina sembra aumentare considerevolmente all'aumentare della temperatura (dal 1,99% dei 20°C all'8,20% dei 40°C), così come la nostoxantina, che manca nelle colture mantenute a 20°C per comparire a 30°C e ancor più a 40°C. La caloxantina risulta, poi, leggermente più elevata nelle colture mantenute ad alta luce, rispetto a quelle tenute a media e bassa luce (dove il suo contenuto è comparabile). Anche la nostoxantina sembra aumentare all'aumentare dell'intensità luminosa.

Per quanto riguarda, poi, le due mixoxantofille presenti, in particolare il myxol-2-glicoside, esse diminuiscono all'aumentare della temperatura, per scomparire entrambe ai 40°C.

Una situazione simile è stata osservata in altri cianobatteri, in seguito all'abbassamento della temperatura (Várkonyi *et al.*, 2001), e sarebbe consistente con l'importante funzione attribuita a questi pigmenti nel mantenimento della fluidità della membrana e nella stabilizzazione del doppio strato lipidico (Mohamed *et al.*, 2005). In particolare, presentando due "teste "polari" all'estremità della loro catena idrocarburica, le mixoxantofille si disporrebbero nella membrana in maniera tale da attraversare interamente il doppio strato lipidico. Questo porterebbe alla formazione di rigide regioni "protettive", localizzate in determinati punti, probabilmente a protezione delle componenti enzimatiche, permettendo l'innalzamento della fluidità nel resto della membrana in seguito all'aumento della percentuale di acidi grassi insaturi (Takaichi *et al.*, 2001; Várkonyi *et al.*, 2002).

Un *pattern* opposto si osserva per l'intensità luminosa, dove le mixoxantofille aumentano all'aumentare di tale parametro, rappresentando l'8,8% dei carotenoidi totali nella condizione di bassa luce e il 27,7% in quella di alta luce. Questo dato conferma quanto osservato per altri cianobatteri in numerosi lavori, secondo i quali, in virtù dell'elevato numero di doppi legami che contengono e per la loro natura glicosidica (Steiger *et al.*, 1999), le mixoxantofille avrebbero un importante ruolo fotoprotettivo nei cianobatteri (Lakatos *et al.*, 2001; Schagerl & Müller, 2006; Kilian *et al.*, 2007). Questi carotenoidi glicosidici si trovano principalmente nel plasmalemma e nella membrana esterna (Mohamed *et al.*, 2005), fra le prime strutture ad entrare in contatto con l'ambiente esterno.

Il pigmento non identificato è presente in quantità simili in tutte le condizioni testate, a parte in alta luce dove viene a mancare.

Considerando i dati derivanti dall'analisi delle percentuali di acidi grassi e di carotenoidi, presenti alle diverse condizioni di luce e temperatura, nel loro insieme, si può comprendere come queste due componenti contribuiscano in maniera sinergica e complementare al mantenimento dell'integrità e dell'efficienza delle membrane biologiche di *Phormidium* sp. ETS-02. Ad esempio nella condizione di alta luce, in cui c'è una diminuzione nel contenuto in C18:3, si osserva però un aumento nella percentuale di mixoxantofille, le quali sembrano avere un ruolo importante nel mantenimento della fluidità e della stabilità membranale, oltre che nella protezione contro l'eccesso di luce (Lakatos *et al.*, 2001; Mohamed *et al.*, 2005; Schagerl & Müller, 2006; Kilian *et al.*, 2007).

E' stato, infine, indagata la morfologia e l'ultrastruttura di *Phormidium* sp. ETS-02, mediante microscopio ottico (in campo chiaro e in fluorescenza), SEM e TEM.

Per quanto riguarda l'aspetto generale e morfologico del cianobatterio alle differenti temperature non si notano particolari differenze alle diverse condizioni di temperatura testate. A 20°C e 30°C i filamenti costituiscono, però, un feltro meno compatto, nel mezzo di coltura, rispetto ai 40°C, anche se la quantità di EPS risulta alquanto abbondante in tutte le condizioni (fig. 39).

Alle differenti intensità luminose si osserva una maggior dispersione dei filamenti nelle condizioni di media luce e, ancor più, di bassa luce. Le colture mantenute in alta luce presentano, invece, un evidente stato di clorosi e i filamenti si trovano strettamente impaccati e avvolti da una spessa capsula di materiale polisaccaridico. Fra le varie funzioni attribuite a questa struttura, infatti, ci sarebbe anche quella di fungere da barriera protettiva contro un eccesso di luce (De Philippis & Vincenzini, 1998; Tamaru *et al.*, 2005).

Quanto osservato a livello macroscopico, sia per le diverse condizioni di temperatura che di luce, è stato confermato dalle indagini al microscopio ottico e al microscopio elettronico a scansione.

Le osservazioni condotte al microscopio elettronico a trasmissione, hanno rivelato, inoltre, un'ulteriore particolare caratteristica, riguardante i tilacoidi di *Phormidium* sp. ETS-02, presente nella condizione di bassa luce. In tale condizione, infatti, le membrane tilacoidali si presentano dilatate, assumendo un particolare aspetto, simile alle "maglie di una rete", definito keritomia (*keritomy*) (figg. 40a, 41a). Questa caratteristica sembra essere specie-specifica e, nei cianobatteri in cui è stata evidenziata, si presenta solo in particolari condizioni, percepite come stressanti dall'organismo (Anagnostidis & Komárek, 2005).

In alta luce, infine, non si osserva keritomia, ma le membrane tilacoidali risultano scarse e danneggiate (fig. 41b).

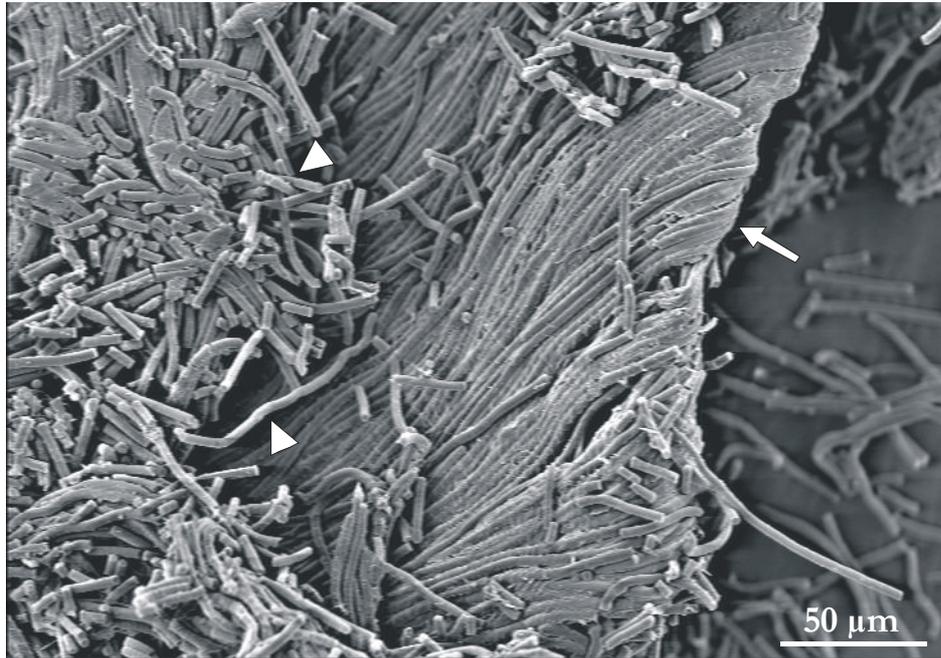


Fig. 39: immagine al SEM di una coltura di *Phormidium* sp. ETS-02 mantenuta a 20°C. Da notare l'abbondante quantità di EPS che determina lo stretto appressamento dei tricotomi fra loro, a costituire un feltro compatto (freccia bianca). In altre zone della coltura i filamenti risultano, invece, meno saldamente aggregati (punte di frecce bianche).

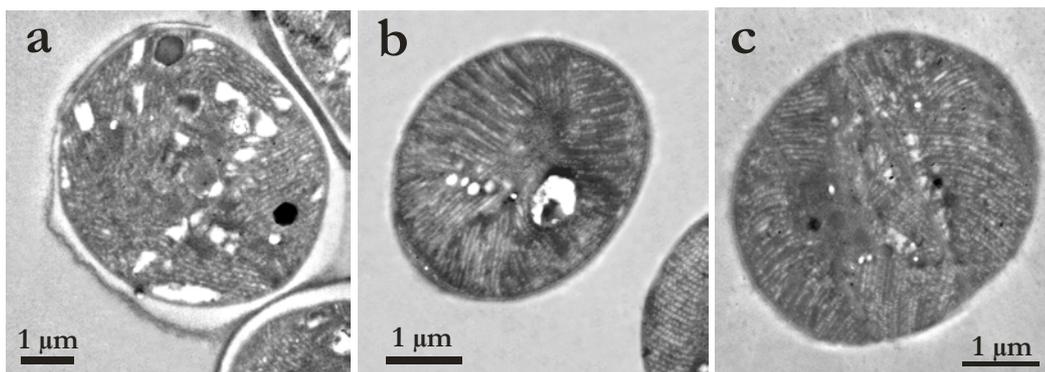


Fig. 40: immagine al TEM di alcune sezioni trasversali (a,b) e una sezione tangenziale (c) di *Phormidium* sp. ETS-02, mantenuto alle diverse condizioni di temperatura. In a, la condizione dei 20°C, in b quella dei 30°C e in c quella dei 40°C. In tutte le condizioni di temperatura testate le membrane presentano l'aspetto normalmente osservato in questo organismo.

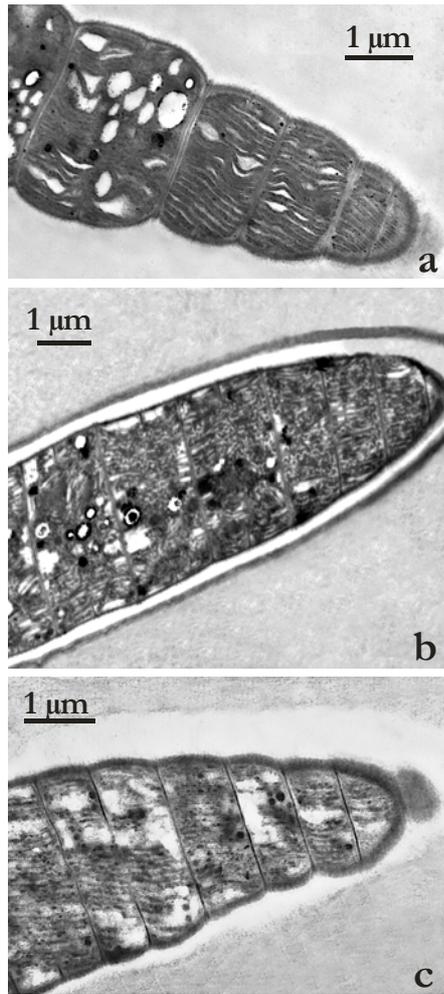


Fig. 41: immagine al TEM di alcune sezioni longitudinali di *Phormidium* sp. ETS-02, mantenuto alle diverse condizioni di luce. In a, la condizione di bassa luce, in cui i tilacoidi si presentano dilatati, una caratteristica definita keritomia. In b, la condizione di media luce, in cui le membrane presentano l'aspetto normalmente osservato in questo organismo. In c, la condizione di alta luce, in cui le membrane tilacoidali risultano qua e là danneggiate.

4.3 ANALISI DELLE DESATURASI PRESENTI

Al fine di confermare i dati riguardanti la composizione in acidi grassi di *Phormidium* sp. ETS-02, sono stati costruiti dei *primer* gene-specifici per determinare le forme di desaturasi presenti in questo microorganismo.

Fin da questa prima fase di progettazione dei *primer*, è risultato come i quattro principali tipi di desaturasi presentassero sequenze nucleotidiche alquanto diverse non solo fra loro, ma, all'interno di ciascuna tipologia, fra le diverse specie di cianobatteri, in particolare tra le forme filamentose e quelle coccoidi. Per la costruzione dei *primer* sono state, quindi, utilizzate le sequenze di un numero limitato di cianobatteri filamentosi, appartenenti ai generi *Nostoc* ed *Anabaena* (oltre alle sequenze del gene *desD* di *Synechocystis* sp. PCC 6803 e *Spirulina platensis* C1).

In seguito alle reazioni di amplificazione e sequenziamento, sono stati individuati tre distinti frammenti: un frammento di 515 pb, ottenuto con i *primer* disegnati

sulle sequenze del gene *desA*; uno di 468 pb, con i *primer* progettati per il gene *desB*, e uno di 656 pb, con i *primer* disegnati sulle sequenze del gene *desC*. Come atteso, in base ai dati precedentemente ottenuti sulla composizione in acidi grassi dell'organismo in esame, i *primer* progettati per il gene *desD* non hanno prodotto alcun amplificato.

Successivamente, i frammenti individuati sono stati confrontati con le sequenze disponibili nei *database* informatici tramite il *software* *BLAST*, rivelando la loro identità (in media tra l'84 e il 96%) con sequenze geniche codificanti per desaturasi cianobatteriche. E' stata, così, confermata la presenza di almeno tre geni per le desaturasi nel genoma di *Phormidium* sp. ETS-02: il gene *desA*, che codifica per la Δ^{12} desaturasi; il gene *desB*, codificante per la ω^3 desaturasi, e il gene *desC*, che codifica per la Δ^9 desaturasi.

Applicando la tecnica della PCR *Genome Walking*, a partire da questi frammenti sono state ricostruite le sequenze complete dei geni in esame: 1059 pb per il gene *desA*; 1068 pb per il gene *desB* e 813 pb per il gene *desC* (fig. 46). La ricostruzione mediante *Genome Walking* ha permesso anche di confermare quello che era già stato osservato durante la ricerca bioinformatica effettuata sui geni delle desaturasi, ossia la loro mancanza di contiguità all'interno dei genomi cianobatterici, e quindi il fatto che questi geni non facciano parte di un operone comune. Il gene *desC* individuato si trova, inoltre, sul filamento antisense del cromosoma di ETS-02.

Ad una prima osservazione delle sequenze nucleotidiche ottenute, risalta, poi, il particolare inizio di sequenza del gene *desB*, che è rappresentato dal codone GTG. Infatti, nei genomi batterici, un limitato numero di geni (meno del 10%) inizia con codoni diversi (TTG, GTG, CTG, etc.) dalla normale tripletta ATG (Gualerzi & Pon, 1990). Il codone d'inizio GTG del gene *desB* individuato si osserva anche in altre sequenze cianobatteriche dello stesso gene, disponibili in Genbank, ed è stato segnalato pure da Chintalapati e collaboratori (2007) nel ceppo *Nostoc* sp. SO-36.

E' stato ipotizzato che i codoni d'inizio usati alternativamente alla tripletta ATG, abbiano un importante ruolo nella regolazione dell'espressione genica (Gualerzi & Pon, 1990; Ohno *et al.*, 2001). In particolare, esperimenti condotti sui batteri hanno evidenziato come la sostituzione di questi codoni più rari con la comune tripletta ATG, nei geni che presentano questo particolare tipo di inizio, nella maggior parte dei casi portava ad un aumento dell'espressione dei geni stessi.

Alla luce di ciò, risulta interessante il fatto che il codone d'inizio GTG sia presente proprio nel gene *desB*, che codifica per l' ω^3 desaturasi, quella la cui attività sembra essere influenzata più di tutte le altre dai parametri ambientali e, quindi, maggiormente attivata solo in particolari condizioni (Los *et al.*, 1993;

Wada *et al.*, 1993; Murata & Wada, 1995; Nishida & Murata, 1996; Kis *et al.*, 1998; Los & Murata, 1998; Deshnum *et al.*, 2000; Hongsthong *et al.*, 2003).

>Phormidium sp_ETS-02_desA_1059pb

ATGACTCTATCATTTGTCAAACCTCAAGATTTAGAATCTACCCTTGAAGTTTCTCCT
AATCTCCGCCTCAGAGATATTTTGCAGACTTTACCAAAGAAGTTTTCCTGAAAAT
CGCCGCAAAGCTTGGACTTCGGTGATAATTAATGTGTTGCTGGTTGGTTTAGGCTAT
GCCAGCATTTGTGTTTTCTCCTTGGTTTTTGTACCATTTCGCCTGGATTTTTACGGGT
ACGGCGTGAATGTTTTCGTTATTTGGTATGACTGTGGACATCGTTCATTTGCT
AACCGTCGTTGGGTGAACGATCTGCTGGGTCATGTAATGATGTTGCCTTTGATTTAT
CCTTTTCATAGTTGGCGGATTCTCCACAATTATCAC CACACTCATACAAATAAGTTA
GATGTGGATAATGCTTGGCAACCTTTTAAAC CAGAGTATTACGATAGTTTGAGTCCC
TTGGGAAAATGGGGTTATCAAGCGTTACGGGGTCGTTTTTGGTGGGTAGGATCGATC
CGGCATGGGCAGTTTACACTTTAATTGGAATAGATTTGAAGGTAACAGCGGGAA
CAGGTCAGATTTTCGGTGTGTTGGTTTTGGGGTTTTGGGGC GATCGCTTTCCCACT
TTAATCGCTACAACCTGGGATTGGGGTTTTCGTCAAGTTTTGGTTAATGCCTGGTTG
GTTTACCATTTCTGGATGAGTACCTTTACTTTGGTACACCACACCTATTCGATATT
CCTTTCAAAGCAGAAGCAGAAATGGAA CGAAGCAATGGCGCAGTTAGCGGGAAGCGTT
CATGTGACTATCCCCGCTGGGTAGAAATTTCTCTGT CACGATATCAACGTTCATATT
CCCACCACGTTTGTACTGCTATTCTTGCTTATAATTTGCGTTTTAGCTCATCGCAGT
TTAAAGGAAAATGGGGAGAGTATGTCCGAGAATATCGTTTTTCTTGGTCATTAATG
AACAGATTACCGACAATGTCACTTGACGATCCTGAAAATGCTACGAACTTTT
CAGAAATCATCACGCTAAAGTCACAGGTTCTTAA

>Phormidium sp_ETS-02_desB_1068pb

GTGCCCTTCTAATATTGTCGAACTCAAAGAGCCTTCTGTAGCAGACCCGTCGCCCTCGT
CAAGGGAACTGCCTTTTACTTTACAAGACCTTAAGGCTGCTATCCCTGCATTATTGT
TTTGACTCTTCTGTTTGAAGTCACTTTTTTACTTCTTTCTGGATGTTTCCATTATT
GCTGGGCTTTATGCTTAGCTTATTTTTTGGATTCTTGGTGGTTTTTCCCTGTCTTT
TGTTGATGCAGGGAACTATGTTCTGGGCTTTATTCGTGGTAGGACATGACTGCGGT
CACGGTTCTTTTCTCAACATAAATGGTTAAATAATTTAATCGGACACCTCAGCCAT
ATTCCGATTTTGGTGCCTTATCACGGTTGGCGGATTAGTCAAGAACACACCACGCT
AATACGGGAAAATATTGATACTGATGAAAGTTGGTATCCGGTTACTCAGTCCAAGTAT
GAACAAATGCAC TGGTCTGAGAAGTTAATTCGCTTCAACTTGTTACTTTTTGGCTTAT
CCAAATTTATCTGTTTAAAGCGTCTCCTGGTAAGAAGGGTTCTCATTTTTCTTCCTAGT
AGTCCGCTGTTTCTGCTCTGCGGAAAATGGGGTGTGCTTACTAGTACGTTTCTGTGG
ACTTTGATGGTGGGTTTTTGGGTTTTCTTAACTTAC CAGTTTGGTCTGTTATTCCTG
GTTAAGTTTTACTTTGCGCCTTACATTTGTGTTTTGTGATTTGGTTGATTTAGTTACC
TATTTACACCATACTGACCCTGATATTCCTTGGTATCGTGGTGATGATTGGTATTTT
TTGAAAGTGCTCTTTCTACTATTGACCATGATTATGTTTTTATTAATCCGATTCAC
CACAAATTTGGAACCTCATGTGGCGCATCACATCTTTTTTAAATATGCCTCATTATCAT
TTGATAACTGCTACTGAGGCGATTAACCAATTTTGGGTGATTATTACCGGAAGTCCG
GATAGACCTATTTGGGAAAAGTTCTGCGGTTCTTATGTTAGTTGCTTTTTTTGTTCCCT
GATACTGGGGCGAAAAGTTTACTATCAATCTCCTGAAAAGTAG

>Phormidium sp_ETS-02_desC_813pb_reconstructed

ATGACGCTTGCCACTTCAACCAAACCTCGCCTAGATTGGCCCGTGATCCTGTTTCATG
TCTGCGATCCACATTTGTCGCTATCTTTGCCTTCTTCCCTGGCAATTTTAGCTGGGCA
GCAGTAGGCGTAGCCGTGTTTTCTCACTGGGTAACAGGGGTTTTAGGAATCACATTA
GGTTCCATCGCTTAGTTACC CATCGTAGTTTTCAGAGTCCCAAGTGGTTAGAATAC
TTCTTGGTTTTCTGCGGCTGTTAGCCTGCCAAGGTGGGCC TATAGATTGGGTCGGT
CTGCACCGCATCATCATTTA TACTCAGACCACGATGGCGATCCTCACGACTCCAAT
AAAGGATTTTGGTGGAGTCATTTGAACTGGATGGTTTACCAAATCCCCGAACGGGAA
GAAATTCGCGGTTTACCAAAGATATTGCCGAAGATCCAGTTTACCAATTTTTCCAA
AAGTATTTATTTCAAATCCAAGTGGGTTTTGGGTACTGTACTTTACTCGGCGGT
TGGCCTTTTGTCTGTGGGGAATCTTTGTCCGTTAGTTGCTGTTTACCCTGTACT
TGGTTGGTTAACAGTGTACCACAAATTTGGCTACCGTACTTATGAATCTAGCGAT
CGCTCTACTAACTGTTGGTGGGTCGCCCTACTAGTCTATGGCGAAGGTTGGCACAAT
AACCACCATACTTTTCAATATCTGCCCGTACGGTTTTACAGTGGTGGGAAATGAC
CTGACTTGGATGACCAATCAATTTGTTACAATTCCTTGGTCTAGCCACCAATGTCAA
CTCGTAGAAAAGTAG

Fig. 46: sequenze nucleotidiche complete dei geni delle desaturasi di *Phormidium* sp. ETS-02.

Le sequenze nucleotidiche ottenute per i geni delle desaturasi di *Phormidium* sp. ETS-02 sono state, successivamente, tradotte in sequenze proteiche ed analizzate per individuare i domini conservati (Los & Murata, 1998; Chi *et al.*, 2008) (fig. 47).

>*Phormidium*_sp_ETS-02_desA_352aa

MTLSFVKPQDLESTLEVSPNLRRLRDI LQTLPKVFLKNRRKAWTSVI INVLVGLGY
 ASIVFSPWFLLPFAWI FTGTALTGF **FVIGHDCCHRS**EANRRWVNDLLGHVMMPLIY
 PFHS **WRILHNYHHTHN**KLDVDNAWQPFKPEYDLSPLGKWGYQALRGFWVGS I
 AHWAVLHFNWNRFEKGQREQVRFVLLVLGFGAIAFP TLIATTGIWGFVKFWLMPWL
 VYHFWMS TFTLVHHTYSDIPFKAEEAWEAMAQLAGSVHCDYPRWVEFLCHDINV **HI**
PHHVCTAIPAYNLRLAHRSLKENWGEYVREYRFSWSLMKQITDKCHLYDPEKCYETF
 QNHAKVTGS

>*Phormidium*_sp_ETS-02_desB_355aa

MPSNIVELKEPSVADPSPRQGLPFTLQDLKAAIPAYCFVPSVWKSIFYFFLDVSI I
 AGLYALAYFLDSWWFFPVFWLMQGT **FWALEFVGHDCGHGS**FSQHKLNNLIGHLSH
 IPILVPY **HGWRI SHRTHHANTGN**IDTDESWPVTQSKYEQMHWSEKLIRFNLLLLAY
 PIYLFKRSPGKKGSHFLPSSPLFRPAEKWGVLTSTFLWTLMVGFGLGFLTYQFGLLFL
 VKFYLAPEYIVFVIWLDLVTYLHHTDPDI PWYRGDDWYFLKGALSTIDHDYGFINP **IH**
HNI GTHVAHIIFLNMPHYHLITATEAIKPI LGDYRKS DRP IWESFWRSYVSCFFVP
 DTGAKVYYQSPEK

>*Phormidium*_sp_ETS-02_desC_270aa

MTLATSTKLRDLWPVILFMSAIIHVAIFAFFPGNF SWAAGVAVFLHWVTGGL **GIITL**
GEHRLVTHRSFQSPKWLEYFLVFCGLACQGGPID **WVGLHR IHHL**YSDHDGDPHDSN
 KGFWWSHLNWMVYQIPEREEIPRFTKDIAEDPVYQFFQKYFIPIQVGLGIVLYLLGG
 WPFVLWGI FVRLVAVYHCTWLVNSATHKFGYRTYES SDRSTNCWWVALLVY **GEGWHN**
NHHTFQY SARHGLQWWEIDL TWMTIQLLQFLGLATNVKLVEK

Fig. 47: sequenze aminoacidiche delle desaturasi di *Phormidium* sp. ETS-02. Per ogni desaturasi sono evidenziati in colore i tre domini conservati (Los & Murata, 1998; Chi *et al.*, 2008), contenenti i *box* di istidine: dominio 1 in verde, dominio 2 in giallo, dominio 3 in azzurro. Per ciascun tipo di desaturasi, sono colorati in rosso gli aminoacidi strettamente conservati in tutte le forme finora trovate e, quindi, distintivi di quel dato tipo di desaturasi.

In base all'analisi effettuata, sembra che tale ceppo possieda una $\Delta 9$ desaturasi omologa al gruppo 2 di desaturasi desC, individuato nel lavoro di Chi *et al.* (2008). Il clade appena citato comprende desaturasi $\Delta 9$ di tipo a, ossia enzimi in grado di agire sugli acidi grassi esterificati sia in posizione sn-1 che in posizione sn-2 della molecola di glicerolo.

Per quanto riguarda, poi, la $\Delta 12$ desaturasi caratterizzata in *Phormidium* sp. ETS-02, i domini conservati determinati sono omologhi a quelli del clade $\Delta 12$ -a individuato da Chi *et al.* (2008).

Sono state, successivamente, ricercate, nei *database* informatici, altre sequenze aminoacidiche di desaturasi cianobatteriche, da utilizzare, assieme a quelle ottenute in questo lavoro di tesi, in un'analisi dell'evoluzione molecolare di queste proteine a livello del *phylum* Cyanophyta.

Le sequenze scelte ed utilizzate sono elencate in tabella VI dell'appendice. Per ogni sequenza aminoacidica vengono indicati il codice d'accesso in Genbank e l'organismo nel quale è stata determinata. Sono, inoltre, presenti alcune informazioni aggiuntive sui diversi ceppi di cianobatteri elencati e la denominazione "desA", "desB", "desC", "desC2" e "desD", laddove veniva indicata l'accertata o proposta funzione della proteina. Sono state denominate con desX le sequenze depositate come "desaturasi degli acidi grassi", ma non meglio specificate. Infine, sono state comprese nell'analisi due sequenze depositate con denominazioni particolari: la sequenza BAA03982 di *Synechocystis* sp. PCC 6803, riportata come "des9", e la sequenza AAF2144 di *Synechococcus* sp. 7002, denominata "desE".

Il *dataset*, costruito con le sequenze complete sia delle desaturasi degli acidi grassi prodotte in questo lavoro di tesi, sia di quelle elencate in tabella VI dell'appendice, è stato analizzato con il programma *ProfTest* per trovare il modello di evoluzione molecolare che meglio rispecchiasse il multiallineamento in esame. Il modello trovato da *ProfTest* è stato CpRev+I+G+F. Questo primo dato è risultato particolarmente significativo alla luce dell'importante ruolo attribuito ai cianobatteri nell'evoluzione dei cloroplasti di alghe e piante (Kutschera & Niklas, 2005). CpRev, infatti, è un modello di sostituzione aminoacidica ottenuto analizzando diverse proteine codificate dal genoma del cloroplasto (Adachi *et al.*, 2000).

E' stata, quindi, effettuata un'analisi molecolare secondo il metodo del *maximum likelihood* (ML), applicando il modello CpRev+I+G+F e valutando la robustezza della topologia ottenuta (fig. 48) con il test di *Bootstrap* (1000 repliche) (fig.).

Le sequenze analizzate sono distinte con diversi colori, a seconda della funzione ad esse attribuita. Più dettagliatamente, le desaturasi desA sono evidenziate in rosso, le desaturasi desB sono colorate in azzurro, le desaturasi desC sono evidenziate in verde, le desaturasi desD sono color fucsia e l'unica desaturasi desC2 nota è colorata in giallo. Le desaturasi degli acidi grassi non meglio identificate (desX) sono, invece, in nero.

Dalla topologia ricostruita (fig. 48) risultano subito evidenti alcuni gruppi, ben risolti, la maggior parte dei quali corrisponde alle diverse tipologie di desaturasi degli acidi grassi conosciute.

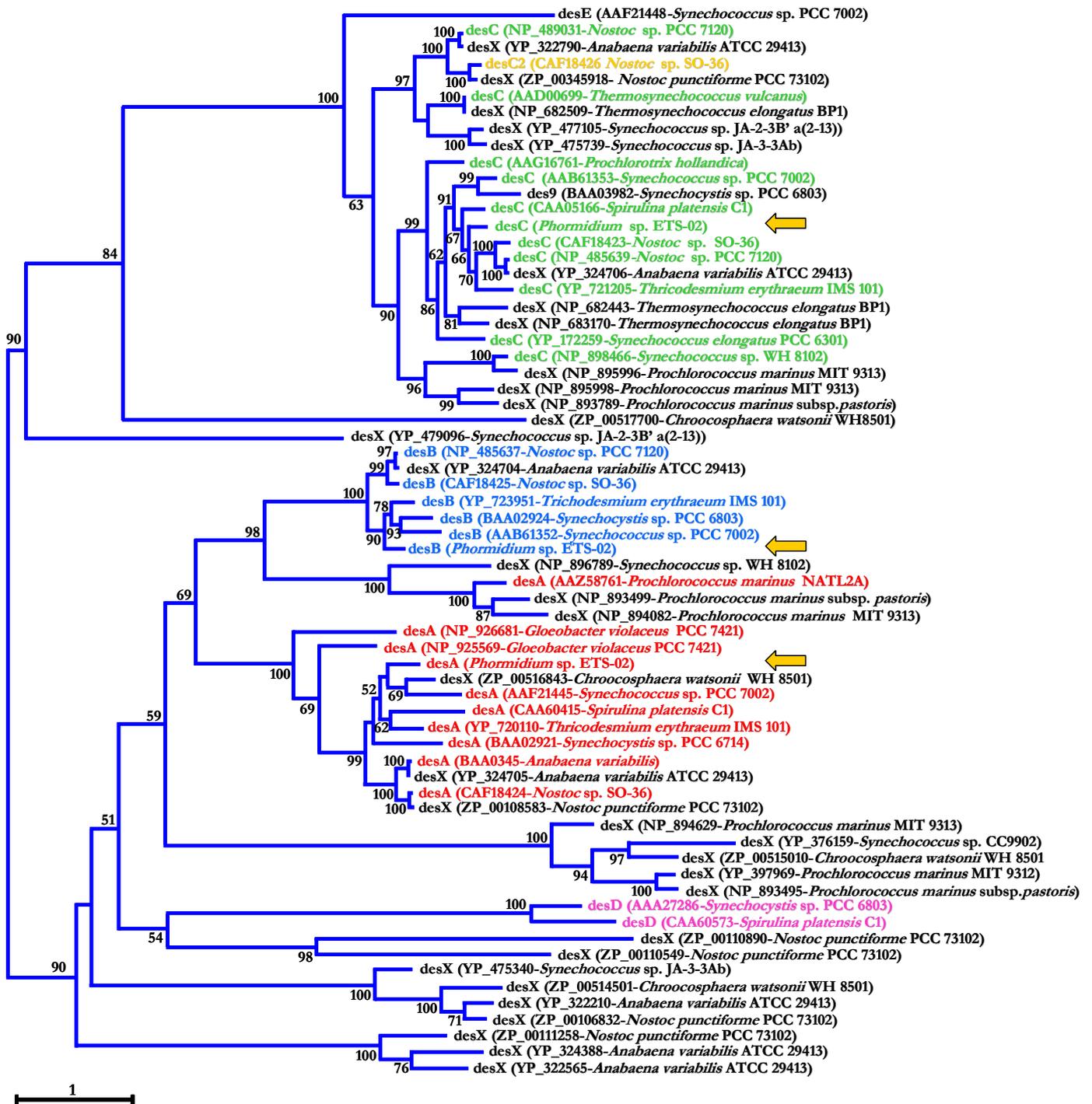


Fig. 48: ricostruzione delle relazioni evolutive tra le diverse forme di desaturasi degli acidi dei cianobatteri, ottenuta secondo il metodo del ML. Le desA sono in rosso, le desB in azzurro, le desC in verde, le desD in fucsia, la desC2 in giallo e le desX in nero. Le sequenze di *Phormidium* sp. ETS-02 sono indicate da frecce gialle. I valori di BT \geq 50% sono riportati vicino al corrispondente nodo. Barra=nr di sostituzioni aminoacidiche/sito.

In particolare, si osserva un raggruppamento costituito da 25 sequenze e supportato da un 100% di BT, che comprende tutte le forme depositate come desC ($\Delta 9$ desaturasi) in Genbank, oltre che l'unica desaturasi desC2 provata. In tale gruppo si ritrovano anche numerose sequenze desX, la sequenza desE di *Synechococcus* sp. PCC 7002 e la sequenza des9 di *Synechocystis* sp. PCC 6803. Evidentemente tutte queste forme, così depositate in Genbank, sono forme filogeneticamente vicine di $\Delta 9$ desaturasi. Fa parte di questo gruppo, inoltre, la sequenza desC di *Phormidium* sp. ETS-02.

In posizione basale rispetto a questo raggruppamento ci sono, poi, la sequenza ZP_00517700 di *Chroocosphaera watsonii* WH8501 e, più basale ancora, la sequenza YP_479096 di *Synechococcus* sp. JA-2-3B' a(2-13).

All'interno del suddetto gruppo si osservano, inoltre, quattro distinti sottogruppi. Il primo, supportato da un 100% di BT, comprende, da un lato, l'associazione della desaturasi desC2 di *Nostoc* sp. SO-36 e della sequenza ZP-00345918 di *Nostoc punctiforme* PCC 73102 (100% di BT); dall'altro, il raggruppamento di una sequenza depositata come desC (NP_489031), appartenente a *Nostoc* sp. PCC 7120, e di una sequenza desX (YP_322790), presente in *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (100% di BT).

La presenza dell'unica desaturasi nota depositata come desC2 (Chintalapati *et al.*, 2006) in questo gruppo, suggerisce che anche le altre forme che vi fanno parte siano $\Delta 9$ desaturasi in grado di inserire il doppio legame all'interno delle catene aciliche di acidi grassi esterificati in posizione sn-2 della molecola di glicerolo. Tale clade sembra, inoltre, corrispondere al gruppo 1 di $\Delta 9$ desaturasi individuato da Chi *et al.* (2008).

Un secondo clade di $\Delta 9$ desaturasi è costituito da quattro sequenze appartenenti a cianobatteri coccoidi termali (AAD00699 di *Thermosynechococcus vulcanus*, NP_682509 di *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, YP_477105 di *Synechococcus* sp. JA-2-3B' a(2-13) e YP_475739 di *Synechococcus* sp. JA-3-3 Ab). Di queste, quelle dei due ceppi di *Thermosynechococcus* sono associate fra loro con un BT pari al 100%, così come lo sono le sequenze dei due ceppi di *Synechococcus*, entrambi azotofissatori e provenienti dall'*Octopus Spring* del Parco Nazionale dello Yellowstone (U.S.A.).

Un terzo sottogruppo di $\Delta 9$ desaturasi (BT del 90%) comprende sequenze sia di cianobatteri coccoidi, che di cianobatteri filamentosi, ma si possono individuare alcune ulteriori associazioni significative al suo interno. In particolare, risultano filogeneticamente correlate fra loro, con l'81% di BT, due sequenze desX di *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, probabilmente prodotte da alleli diversi del gene *desC*. Si osserva, poi, un raggruppamento supportato dal 100% di BT di sequenze desC di membri dell'ordine Nostocales (*Nostoc* sp. SO-36, *Nostoc* sp. PCC 7120 e

Anabaena variabilis ATCC 29413), a cui fa da *sister taxon* (BT 70%) la sequenza desC di *Thricodesmium erythraeum* IMS101, un cianobatterio filamentoso, azotofissatore non-eterocistico. La sequenza desC di *Phormidium* sp. ETS-02 è in posizione basale (BT 66%) rispetto al clade appena descritto e, più basale ancora (BT 67%) si trova quella di *Spirulina platensis* C1. La sequenza desC di *Synechococcus* sp. PCC7002 e la sequenza des9 di *Synechocystis* sp. PCC 6803 costituiscono, poi, un gruppo supportato dal 99% di BT. Infine, la sequenza YP_172259 di *Synechococcus elongatus* PCC 6301 risulta *sister taxon* del raggruppamento di desC appena descritto con un BT dell'86% e quella di *Prochlorotrix hollandica* (AAG16761) si ritrova in posizione basale rispetto a tutte le restanti sequenze di questo terzo clade.

Il suddetto terzo clade sembra corrispondere al clade 2 di $\Delta 9$ desaturasi delle topologie ottenute da Chi *et al.* (2008).

Come *sister taxon* del terzo clade (BT del 90%) c'è un quarto sottogruppo di $\Delta 9$ desaturasi, supportato da un 96% di BT. Tale raggruppamento è costituito da sequenze desX del genere *Prochlorococcus* (NP_895996, NP_895998, NP_893789) e dalla sequenza desC di *Synechococcus* sp. WH8102 (NP_898466). Quest'ultimo, così come tutti i ceppi di *Prochlorococcus* in questione, è un cianobatterio coccoide marino.

Un altro raggruppamento ben distinto, supportato dal 100% di BT, è quello comprendente tutte le forme di desaturasi desB ($\omega 3$ desaturasi) note, utilizzate in quest'analisi. Vi fa, inoltre, parte la sequenza YP_324704 di *Anabaena variabilis* ATCC 29413, evidentemente anch'essa un $\omega 3$ desaturasi.

All'interno del gruppo appena menzionato si nota quello costituito dalle desaturasi desB dei cianobatteri dell'ordine Nostocales (generi *Nostoc* e *Anabaena*) (99% di BT) e, come suo *sister taxon*, quello comprendente le desB di *Thricodesmium erythraeum*, *Phormidium* sp. ETS-02, *Synechocystis* sp. PCC 6803 e *Synechococcus* sp. PCC 7002 (90% di BT). Le sequenze di questi ultimi due ceppi, appartenenti all'ordine Chroococcales, sono, a loro volta, associati con un BT pari al 93%.

Un nodo supportato da un valore di BT del 98%, unisce il gruppo delle $\omega 3$ desaturasi ad un altro, comprendente due sequenze desX e una sequenza desA del genere *Prochlorococcus* (NP_893499, NP_894082, AAZ58761) e la sequenza NP_896789 del cianobatterio marino *Synechococcus* sp. WH8102.

Un ulteriore clade (100% di BT) che spicca, nella topologia ottenuta, per il numero di sequenze comprese, dopo quello costituito dalle $\Delta 9$ desaturasi, è caratterizzato da tutte le rimanenti forme depositate in Genbank come desaturasi desA ($\Delta 12$ desaturasi), utilizzate in quest'analisi. Sono, inoltre, presenti anche alcune delle sequenze non meglio specificate, ossia la sequenza ZP_00516843 di

Chroocosphaera watsonii WH 8501, la sequenza YP_324705 di *Anabaena variabilis* ATCC 29413 e la sequenza ZP_00108583 di *Nostoc punctiforme* PCC 73102, che risultano quindi forme filogeneticamente vicine alle desaturasi desA.

Anche in questo caso, le $\Delta 12$ desaturasi dell'ordine Nostocales formano un unico gruppo, supportato da un BT pari al 100%; mentre quelle di Oscillatoriales e Chroococcales sono mescolate fra loro.

Si osserva, poi, come i prodotti degli alleli del gene *desA* di *Gloeobacter violaceus* (NP_925569 e NP_926681), un cianobatterio considerato fra i più primitivi del phylum Cyanophyta (Honda *et al.*, 1999), si trovino basalmente rispetto alle altre sequenze di questo clade.

In posizione basale rispetto al gruppo delle desA appena descritto se ne osserva un altro, il cui nodo presenta una 100% di BT. Tale raggruppamento comprende alcune sequenze desX di membri del genere *Prochlorococcus*, di *Synechococcus* sp. CC9902 e di *Chroocosphaera watsonii* WH 8501 (NP_894629, YP_376159, ZP_00515010, YP_397969, NP_893495), tutti ceppi coccoidi marini. Tutte le sequenze di questo raggruppamento sono assegnate da Chi *et al.* (2008) alla forma desA.

Le due desaturasi desD ($\Delta 6$ desaturasi) di *Synechocystis* sp. PCC 6803 e di *Spirulina platensis* C1 sono associate con un valore di BT del 100%. Esse risultano, inoltre, *sister taxon* di un gruppo costituito dalle sequenze ZP_00110890 e ZP_00110549 di *Nostoc punctiforme* PCC 73102, definite da Chi e collaboratori (2008) “proteine ipotetiche”. Il raggruppamento di queste sequenze con le desaturasi desD indica che presentano un certo grado di similarità fra loro e, quindi, indurrebbe a considerarle come appartenenti allo stesso tipo. L'allineamento tra le quattro sequenze (fig. 49) ha, in effetti, messo in luce l'esistenza dei motivi conservati di istidine tipici delle desD desaturasi anche nelle due sequenze di *Nostoc punctiforme* PCC 73102. Tuttavia, alcuni degli aminoacidi considerati distintivi di tale forma di desaturasi (Chi *et al.*, 2008), appartenenti ai tre domini individuati, differiscono fra le sequenze di tale ceppo e le sequenze di *Synechocystis* sp. PCC 6803 e di *Spirulina platensis* C1. Questo, però, non permette di escludere *a priori* che si tratti di sottoforme diverse di $\Delta 6$ desaturasi. Se ciò fosse vero, sarebbe concorde con l'insolita presenza degli acidi grassi γ C18:3 e C18:4 in alcuni membri del genere *Nostoc* riportata da Vargas *et al.* (1998).

In particolare, il primo è costituito dalle sequenze YP_475340 di *Synechococcus* sp. JA-3-3 Ab, ZP_00514501 di *Chroocosphaera watsonii* WH 8501 e YP_322210 di *Anabaena variabilis* ATCC 29413. Il secondo, invece, comprende le sequenze YP_00106832 e ZP_00111258 di *Nostoc punctiforme* PCC 73102 e le sequenze YP_324388 e YP_322565 di *Anabaena variabilis* ATCC 29413.

Essendo questi ultimi due gruppi così ben distinti da quelli delle desaturasi desA, desB e desC, si può ipotizzare che esse non rappresentino tipi di desaturasi degli acidi grassi noti, ma proteine ad esse correlate. Secondo quanto riportato da Chi *et al.* (2008), esse sarebbero, infatti, β -carotene idrossilasi e β -carotene chetolasi.

Concludendo le osservazioni su questa parte della topologia ottenuta, come trovato già in altri lavori (Alonso *et al.*, 2003; Sperling *et al.*, 2003; Chi *et al.*, 2008), le $\Delta 12$ e le $\omega 3$ desaturasi costituiscono cladi ben definiti e risultano maggiormente imparentate fra loro che non con le $\Delta 6$ e le $\Delta 9$ desaturasi. Le $\Delta 6$ desaturasi sembrano, tuttavia, evolutivamente più vicine al gruppo delle $\Delta 12/\omega 3$ desaturasi che non a quello delle $\Delta 9$ desaturasi. Queste ultime costituiscono, infatti, un gruppo monofiletico, ben distinto da tutte le altre forme.

I cladi di desaturasi osservati sembrano riflettere le relazioni filogenetiche già descritte per gli ordini del *phylum* Cyanophyta considerati, con le sequenze dei membri dei generi *Nostoc* e *Anabena* (cianobatteri filamentosi azotofissatori eterocistici) riunite in sottogruppi ben distinti dagli altri. In base a diverse ricostruzioni filogenetiche, infatti, i cianobatteri filamentosi eterocistici rappresentano un gruppo monofiletico (Seo & Yokota, 2003; Tomitani *et al.*, 2006).

Le sequenze di desaturasi dei membri degli ordini Oscillatoriales e Chroococcales sono, invece, spesso mescolate fra loro, rispecchiando l'eterogeneità attribuita da numerosi autori soprattutto all'ordine Oscillatoriales (Ishida *et al.*, 1997; Casamatta *et al.* 2005; Komárek & Anagnostidis, 2005; Teneva *et al.*, 2005; Premanandh *et al.*, 2006; Marquardt & Palinska, 2007; Palinska & Marquardt, 2008).

Per quanto riguarda l'ordine Chroococcales, si nota tuttavia una relazione tra alcuni *pattern* osservati e l'ambiente di provenienza dell'organismo a cui appartengono le sequenze. In particolare, risultano quasi sempre associate fra loro, da un lato, le sequenze dei cianobatteri coccoidi termali (generi *Synechococcus* e *Thermosynechococcus*) e, dall'altro, quelle dei ceppi coccoidi marini (generi *Synechococcus*, *Prochlorococcus* e *Chroocosphaera*).

Queste osservazioni confermano quanto trovato anche da Chi *et al.* (2008).

5. CONCLUSIONI

La prima parte di questa tesi di Dottorato è consistita nella caratterizzazione di un cianobatterio filamentoso isolato dai fanghi termali di una vasca del Comprensorio Euganeo (PD).

L'organismo in esame, denominato ETS-02, è stato, quindi, sottoposto ad indagini di tipo morfologico, ultrastrutturale, fisiologico, biochimico e molecolare. Le analisi effettuate hanno rivelato che:

- il cianobatterio ETS-02 appartiene all'ordine Oscillatoriales, alla famiglia Phormidiaceae e al genere *Phormidium*;
- tale ceppo rappresenta, effettivamente, una nuova entità segnalata nei fanghi del Comprensorio termale Euganeo, distinta da *Phormidium* sp. ETS-05, un cianobatterio precedentemente isolato da tale ambiente (Ceschi-Berrini *et al.*, 2004), con il quale inizialmente ETS-02 era stato confuso. Questo conferma l'esistenza di numerosi morfotipi del genere *Phormidium*, apparentemente molto simili fra loro ed in grado di coesistere in uno stesso ambiente (Komárek & Anagnostidis, 2005), e suggerisce come la biodiversità del Comprensorio Euganeo sia ancora sottostimata;
- il cianobatterio *Phormidium* sp. ETS-02 presenta alcune peculiarità, come la capacità di fissare l'azoto e la presenza della ficoeritrocianina, una ficobiliproteina segnalata in un numero limitato di cianobatteri, e di una forma singolare di C-ficocianina, simile a quella ritrovata in un ceppo di *Synechococcus* isolato da una sorgente termale del Parco Nazionale dello Yellowstone (U.S.A.).

Per la caratterizzazione molecolare di *Phormidium* sp. ETS-02 è stato utilizzato, inoltre, un approccio multigenico, con la produzione di numerose nuove sequenze dei *marker* molecolari scelti, per i ceppi di Oscillatoriales acquistati come confronto. Ciò ha consentito di aumentare il numero di sequenze nucleotidiche esistenti per i membri di tale ordine del *phylum* Cyanophyta, che risultava alquanto limitato soprattutto per quanto riguarda alcuni *loci*, come il gene *rbcL*, il gene *rpoC1* e il gene *gyrB*.

La seconda parte di questa tesi si è concentrata sull'analisi dell'adattamento di *Phormidium* sp. ETS-02 a diverse condizioni di temperatura (20°C, 30°C, 40°C) e di intensità luminosa (5-7 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 14-16 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 43-47 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), essendo questi due parametri particolarmente soggetti a variazioni diurne e stagionali nell'ambiente del Comprensorio termale Euganeo. In particolare, l'attenzione è stata rivolta agli adattamenti a livello di membrana dell'organismo in esame, analizzando le composizioni in acidi grassi e in

carotenoidi ed effettuando indagini morfologiche ed ultrastrutturali (MO, SEM, TEM), alle diverse condizioni testate. Tali analisi hanno messo in luce che:

- gli acidi grassi e i carotenoidi contribuiscono in maniera sinergica e complementare al mantenimento e alla funzionalità delle membrane biologiche di *Phormidium* sp. ETS-02;
- non solo la temperatura, come atteso, ma anche la luce influenza la composizione in acidi grassi delle membrane di *Phormidium* sp. ETS-02. Più specificatamente, la temperatura sembra influire in maniera “lineare” sul grado di insaturazione degli acidi grassi, aumentando il grado di insaturazione al diminuire di questo parametro. L’intensità luminosa, invece non sembra influire tanto sul grado di insaturazione generale delle membrane, ma sul tipo di specie aciliche presenti, con una diminuzione dell’acido α -linolenico all’aumentare di tale parametro;
- i carotenoidi che presentano le variazioni maggiori fra le diverse condizioni di mantenimento testate risultano le mixoxantofille, le quali aumentano all’aumentare dell’intensità luminosa e diminuiscono al diminuire della temperatura, confermando i ruoli fotoprotettivo e di mantenimento della fluidità di membrana precedentemente attribuiti a questi pigmenti. Inoltre, all’intensità luminosa maggiore, fra quelle testate, *Phormidium* sp. ETS-02 produce *cis*- β -carotene, un pigmento che sembra essere prodotto da alcune alghe in caso di stress ossidativo;
- nella condizione di bassa luce le membrane tilacoidali di *Phormidium* sp. ETS-02 risultano dilatate, assumendo un particolare aspetto definito keritomia, segnalata in un numero limitato di cianobatteri (Komárek & Anagnostidis, 2005).

La terza parte di questa tesi si è occupata dell’individuazione dei geni delle desaturasi degli acidi grassi presenti nel genoma di *Phormidium* sp. ETS-02 e della determinazione delle loro sequenze complete. Le sequenze ottenute:

- hanno permesso di incrementare il limitato numero di sequenze dei membri dell’ordine Oscillatoriales, disponibili per tali enzimi nei database informatici;
- sono state utilizzate, assieme alle altre disponibili in Genbank, per un’analisi dell’evoluzione molecolare delle desaturasi degli acidi grassi a livello dei cianobatteri. I cladi osservati nella topologia ottenuta sembrano rispecchiare le relazioni filogenetiche fra i vari taxa del phylum Cyanophyta e/o l’ambiente di provenienza dei cianobatteri a cui le sequenze appartengono (es. ambienti marino e termale).

Infine, i risultati ottenuti durante lo svolgimento di questo progetto di Dottorato offrono alcuni spunti per ulteriori approfondimenti ed indagini future.

Allo scopo di caratterizzare con maggior precisione *Phormidium* sp. ETS-02 si potrebbe, ad esempio, aumentare il numero di sequenze utilizzate per ciascun *marker* molecolare, amplificando e sequenziando i *loci* scelti da ulteriori ceppi cianobatterici dell'ordine Oscillatoriales. Ad esempio, potrebbe essere opportuno utilizzare come confronto anche *Phormidium ambiguum* IAM M-71. Questo organismo, infatti, è un membro del gruppo VIII del genere *Phormidium*, per il quale è già disponibile in Genbank la sequenza del gene 16S rDNA. Nella topologia costruita durante questa tesi di Dottorato proprio con tale gene *Phormidium ambiguum* IAM M-71 costituisce un clade con *Phormidium* cf. *irriguum* CCALA 159 e *Phormidium* sp. ETS-02. Sarebbe, quindi, utile chiarire le relazioni evolutive fra questi tre organismi utilizzando anche i restanti *marker* molecolari impiegati in questo lavoro di tesi.

Per quanto riguarda la variazione del contenuto in acidi grassi del cianobatterio mantenuto a diverse temperature ed intensità luminose, e le conseguenti deduzioni sull'attività delle desaturasi coinvolte, sarebbe interessante condurre un'indagine sui *pattern* di espressione di questi enzimi alle suddette condizioni, mediante tecniche come l'RT-PCR.

Un ulteriore sviluppo del progetto di ricerca potrebbe essere, inoltre, quello di indagare l'efficienza dell'apparato fotosintetico alle diverse condizioni testate, valutando sia possibili variazioni nei ficobilisomi di *Phormidium* sp. ETS-02 (dimensioni, rapporti fra le ficobiliproteine), sia l'efficienza della catena fotosintetica di trasporto degli elettroni attraverso un'analisi condotta con un fluorimetro ad impulsi di ampiezza modulata.

BIBLIOGRAFIA

- Aakermann T., Skulberg O.M. & Liaaen-Jensen S. (1992)** “A comparison of the carotenoids of strains of *Oscillatoria* and *Spirulina* (cyanobacteria).” *Biochem. Syst. Ecol.* **20**: 761-769.
- Adachi J., Waddell P.J., Martin W. & Hasegawa M. (2000)** “Plastid genome phylogeny and a model of amino acid substitution for proteins encoded by chloroplast DNA.” *J. Mol. Evol.* **50**: 348-358.
- Adams D.G., Ashworth D. & Nelmes B. (1999)** “Fibrillar Array in the Cell Wall of a Gliding Filamentous Cyanobacterium.” *J. Bacteriol.* **181**: 884-892.
- Adams D.G. (2001)** “How do cyanobacteria glide?” *Microbiology Today* **28**: 131-133.
- Adams D.G. & Duggan P.S. (2008)** “Cyanobacteria–bryophyte symbioses.” *J. Exp. Bot.* **59**: 1047-1058.
- Aguilar P.S., Cronan J.E Jr. & de Mendoza D. (1998)** “A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase.” *J. Bacteriol.* **180**: 2194-2200.
- Ahlgren G.I & Hyenstrand P. (2003)** “Nitrogen limitation effects of different nitrogen sources on nutritional quality of two freshwater organisms, *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) and *Synechococcus* sp. (Cyanophyceae)” *J. Phycol.* **39**: 906-917.
- Allakhverdiev S.I., Kinoshita M., Inaba M., Suzuki I. & Murata N. (2001)** “Unsaturated Fatty Acids in Membrane Lipids Protect the Photosynthetic Machinery against Salt-Induced Damage in *Synechococcus*.” *Plant Physiol.* **125**: 1842–1853.
- Alonso D.L., García-Maroto F., Rodríguez-Ruiz J., Garrido J.A., & Vilches M.A. (2003)** “Evolution of the membrane bound fatty acid desaturases.” *Biochem. Syst. Ecol.* **31**: 1111-1124.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. & Lipman D. J. (1990)** “Basic Local Alignment Search Tool.” *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Anagnostidis K. & Komárek J. (1985)** “Modern approach to the classification system of the cyanophytes. 1: Introduction.” *Arch. Hydrobiol., Algal. Stud.* **38-39**: 291-303.

Anagnostidis K. & Komárek J. (1988) “Modern approach to the classification system of the cyanophytes. 3: Oscillatoriales.” *Arch. Hydrobiol., Algal. Stud.* **50**: 327-472.

Anagnostidis K. & Komárek J. (1990) “Modern approach to the classification system of the cyanophytes. 5: Stigonematales.” *Arch. Hydrobiol., Algal. Stud.* **59**: 1-73.

Andreoli C. & Rascio N. (1975) “The algal flora in the thermal baths of Montegrotto Terme (Padua). Its distribution over one-year period.” *Int. Revue Ges. Hydrobiol.* **60**: 857-871.

Avelange-Macherel M., Macherel D., Wada H. & Murata N. (1995) “Site-directed mutagenesis of histidine residues in the $\Delta 12$ acyl-lipid desaturase of *Synechocystis*.” *FEBS Lett.* **361**: 111-114.

Ballot A., Dadheech P. & Krienitz L. (2004) “Phylogenetic relationship of *Arthrospira*, *Phormidium*, and *Spirulina* strains from Kenyan and Indian waterbodies.” *Arch. Hydrobiol. Suppl., Algal. Stud.* **113**: 37-56.

Ballot A., Dadheech P.K., Haande S. & Krienitz L. (2008) “Morphological and Phylogenetic Analysis of *Anabaenopsis abijatae* and *Anabaenopsis elenkinii* (Nostocales, Cyanobacteria) from Tropical Inland Water Bodies.” *Microb. Ecol.* **55**: 608-618.

Balme A., Hervas M., Campos L. A., Sancho J., De la Rosa M. e Navarro A. (2001) “A comparative study of the thermal stability of plastocyanin, cytochrome c(6) and photosystem I in thermophilic and mesophilic cyanobacteria.” *Photosynth. Res.* **70**: 281-289.

Bardy S.L., Ng S.Y.M. & Jarrell K.F. (2003) “Prokaryotic motility structures”. *Microbiol.* **149**: 295-304.

Becker S., Singh A. K., Postius C., Böger P. & Ernst A. (2004) “Genetic diversity and distribution of periphytic *Synechococcus* spp. in biofilms and picoplankton of Lake Constance.” *FEMS Microbiol. Ecol.* **49**: 181-190.

Bennet A. & Bogorad L.. (1973) “Complementary chromatic adaption in filamentous blue-green alga.” *J. Cell Biol.* **58**: 419-435.

Bergman B. & Carpenter E. J. (1991). “Nitrogenase confined to randomly distributed trichomes in the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*.” *J. Phycol.* **27**: 158-165.

Bergman B., Gallon J.R., Rai A.N. & Stal L.J. (1997) “N₂ Fixation by non-heterocystous cyanobacteria.” *FEMS Microbiol. Rev.* **19**: 139-185.

Bergsland K.J. & Haselkorn R. (1991) “Evolutionary Relationships among Eubacteria, Cyanobacteria and Chloroplasts: Evidence from the *rpoCl* Gene of *Anabaena* sp. Strain PCC 7120.” *J. Bacteriol.* **173**: 3446-3455.

Bhaya D. (2004) “Light matters: phototaxis and signal transduction in unicellular cyanobacteria.” *Mol. Microbiol.* **53**: 745-754.

Bialek-Bylka G.E., Fujii R., Chen C., Oh-oka H., Kamiesu A., Satoh K., Koike H. & Koyama Y. (1998) “15-*Cis*-carotenoids found in the reaction center of a green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* and in the Photosystem I reaction center of a cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*.” *Photosynth. Res.* **58**: 135-142.

Bryant D.A. (1982) “Phycoerythrocyanin and phycoerytrin: properties and occurrence in cyanobacteria.” *J.Gen. Microbiol.* **128**: 835-844.

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

Brehm U., Krumbein W.E. & Palinska K.A. (2003) “Microbial spheres: a novel cyanobacterial–diatom symbiosis.” *Naturwissenschaften* **90**: 136-140.

Brookes J.D., Ganf G.G., Green D. & Whittington J. (1999) “The influence of light and nutrients on buoyancy, filament aggregation and flotation of *Anabaena circinalis*.” *J. Plankton Res.* **21**: 327-341.

Browse J. (1996) “Towards rational engineering of plant oils: crystal structure of the 18:0-ACP desaturase.” *Trends Plant Sci.* **1**: 403-404.

Canto De Loura I., Dubacq J.P. & Thomas J.C. (1987) “The Effects of Nitrogen Deficiency on Pigments and Lipids of Cyanobacteria.” *Plant Physiol.* **83**: 838-843.

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

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

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

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

Castenholz R. W. (1969) “Thermophilic Blue-Green Algae and the Thermal Environment.” *Bacteriol. Rev.* **33**: 476-504.

Castenholz R.W. (1973) “Ecology of blue-green algae in hot springs.” In Carr N.G. e Whitton B.A. (eds.), “*The Biology of blue-green algae*”, Blackwell and Univ. Calif., 379-414.

Castenholz R. W. (2001) “General characteristics of the cyanobacteria.” In *Bergey’s manual of systematic bacteriology*. D. R. Boone & R. W. Castenholz (eds). 2nd edn. New York, U.S.A., Springer-Verlag, pp.474-487.

Castenholz R. W. & Norris T. B. (2005) “Revisionary concepts of species in the cyanobacteria and their applications.” *Algol. Stud.* **117**: 53-69.

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

Chi X., Yang Q., Zhao F., Qin S., Yang Y., Shen J. & Lin H. (2008) “Comparative Analysis of Fatty Acid Desaturases in Cyanobacterial Genomes.” *Comp. Funct. Genom.* volume 2008 (Article ID 284508): 1-25.

Chintalapati S., Prakash J.S.S., Gupta P., Ohtani S., Suzuki I., Sakamoto T., Murata N. & Shiva S. (2006) “A novel $\Delta 9$ acyl-lipid desaturase, DesC2, from cyanobacteria acts on fatty acids esterified to the sn-2 position of glycerolipids.” *Biochem. J.* **398**: 207-214.

Choi J., Chungl Y., Moon Y., Kimtl C., Watanabe M., Song P., Joe C., Bogorad L. & Park Y.M. (1999) “Photomovement of the Gliding Cyanobacterium *Synechocystis* sp.PCC 6803.” *Photochem. Photobiol.* **70**: 95-102.

Christie W.W. (1982) “A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesteryl esters.” *J. Lipid Res.* **23**: 1072-1075.

Coehen Y., Castenholz R.W. & Halvorson H.O. (1984) “Microbial mats: stromatolites.” *New York: Alan R. Liss. Inc.*

Coehen Y. & Gurevitz M (1999) “The Cyanobacteria-Ecology, Physiology, and Molecular Genetics.” In *Dworkin M. et al. (eds), “The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community”, 3rd edition, release 3.0, May 21, 1999, Springer-Verlag, New York* (<http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>)

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

Crowe J.H., Hoekstra F.A. & Crowe L.M. (1992) “Anhydrobiosis.” *Annu. Rev. Physiol.* **54**: 579-599.

De Figueiredo D.R., Reboleira A.S.S.P., Antunes S.C., Abrantes N., Azeiteiro U., Gonçalves F. & Pereira M.J. (2006) “The effect of environmental parameters and cyanobacterial blooms on phytoplankton dynamics of a Portuguese temperate lake.” *Hydrobiol.* **568**: 145-157.

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

Deshnium P., Paithoonrangarid K., Suphatrakul Amporn, Meesapyodsuk D., Tanticharoen M., Cheevadhanarak S. (2000) “Temperature-independent and -dependent expression of desaturase genes in filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* strain C1 (*Arthrospira* sp. PCC 9438).” *FEMS Microbiol. Lett.* **184**: 207-213.

Doyle J. J. & Doyle. J. L. (1987) “A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.” *Phytochem. Bull.* **19**: 11-15.

Dvornyk V. & Nevo E. (2003) “Genetic polymorphism of cyanobacteria under permanent natural stress: A lesson from the «Evolution Canyons».” *Res. Microbiol.* **154**: 79-84.

Edwards M.R., MacColl R. & Eisele L.E. (1996) “Some physical properties of an unusual C-phycoyanin isolated from a photosynthetic thermophile.” *Biochim. Biophys. Acta* **1276**: 64-70.

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

Ehling-Schulz M., Bilger W., & Scherer S. (1997) “UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*.” *J. Bacteriol.* **179**: 1940-1945.

El-Shehawy R., Lugomela C., Ernst A. & Bergman B. (2003) “Diurnal expression of *hetR* and diazocyte development in the filamentous non-heterocystous cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum*.” *Microbiol.* **149**: 1139-1146.

Ernst A., Deicher M., Herman P.M.J. & Wollenzien U.I.A. (2005) “Nitrate and Phosphate Affect Cultivability of Cyanobacteria from Environments with Low Nutrient Levels.” *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 3379-3383.

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

Fergusson K.M. & Saint C.P. (2000) “Molecular Phylogeny of *Anabaena circinalis* and Its Identification in Environmental Samples by PCR.” *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4145-4148.

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

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

Galzigna L., Lalli A., Moretto C. & Bettero A. (1995) “Maturation of thermal mud under controlled conditions and identification of an anti-inflammatory fraction.” *Phys. Rehab. Kud. Med.* **5**: 196-1999.

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

Galzigna L., Ceschi Berrini C., Moschin E. & Tolomio C. (1998) “Thermal mud-pack as an anti-inflammatory treatment.” *Biomed. Pharmacother.* **52**: 408-409.

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

García-González M., Moreno J., Manzano J.C., Florencio F.J., Guerrero M.G. (2005) “Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis-carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor.” *J. Biotechnol.* **115**: 81-90.

García-Pichel F., Wingard C.E. & Castenholz R.W. (1993). “Evidence regarding the UV sunscreen role of a mycosporine-like compound in the cyanobacterium *Gloeocapsa* sp.” *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 170-176.

García-Pichel F., Prufert-Bebout L. & Muyzer G. (1996) “Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium.” *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3284-3291.

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

- Genty B., Briantais J.M. & Baker N.R (1989)** "The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence." *Biochim. Biophys. Acta* **990**: 87-92.
- Gombos Z., Wada H., Hideg E. & Murata N. (1994)** "The Unsaturation of Membrane Lipids Stabilizes Photosynthesis against Heat Stress." *Plant Physiol.* **104**: 563-567.
- Gruszecki W.I. & Strzalka K. (2005)** "Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties." *Biochim. Biophys. Acta* **1740**: 108–115.
- Gualerzi C.O. & Pon C.L. (1990)** "Initiation of mRNA Translation in Prokaryotes." *Biochemistry* **29**: 5881-5889.
- Gugger M., Lyra C., Suominen I., Tsitko I., Humbert J-F., Salkinoja-Salonen M. S. & Sivonen K. (2002)** "Cellular fatty acids as chemotaxonomic markers of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nostoc* and *Planktobrix* (cyanobacteria)." *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **52**: 1007-1015.
- Guglielmi G., Cohen-Bazire G. & Bryant D.A. (1981)** "The structure of *Gloeobacter violaceus* and its phycobilisomes." *Arch. Microbiol.* **129**: 181–189.
- Guindon S. & Gascuel O. (2003)** "A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood." *Syst. Biol.* **52**: 696-704.
- Haney P.J., Badger J.H., Buldak G.L., Reich C.I., Woese C.R. & Olsen G.J. (1999)** "Thermal adaptation analyzed by comparison of protein sequences from mesophilic and extremely thermophilic *Methanococcus* species." *PNAS* **96**: 3578-3583.
- Henson B.J., Watson L.E. & Barnum S.R. (2004)** "The Evolutionary History of Nitrogen Fixation, as Assessed by *NifD*." *J. Mol. Evol.* **58**: 390-399.
- Hindák F. (2001)** "Thermal microorganisms from a hot spring on the coast of Lake Bogoria, Kenia." *Nova Hedwigia, Beiheft*, **123**: 77-93.
- Hoffmann L. (2005)** "Nomenclature of Cyanophyta/Cyanobacteria: roundtable on the unification of the nomenclature under the Botanical and Bacteriological Codes." *Algol. Stud.* **117**: 13-29.
- Hoffmann L., Komárek J., & Kaštovský J. (2005)** "System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) -state 2004." *Algol. Stud.* **117**: 95-115.
- Hoiczky E. & Baumeister W. (1995)** "Envelope Structure of Four Gliding Filamentous Cyanobacteria." *J. Bacteriol.* **177**: 2387-2395.

Hoiczuk E. & Baumeister W. (1998) “The junctional pore complex, a prokaryotic secretion organelle, is the molecular motor underlying gliding motility in cyanobacteria.” *Curr. Biol.* **8**: 1161-1168.

Hoiczuk E. (2000) “Gliding motility in cyanobacteria: observations and possible explanations.” *Arch. Microbiol.* **174**: 11-17.

Hoiczuk E. & Hansel A (2000) “Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope.” *J. Bacteriol.* **182**: 1191-1199.

Honda D., Yokota A. & Sugiyama J. (1999) “Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of five marine *Synechococcus* strains.” *J. Mol. Evol.* **48**: 723-739.

Hongsthong A., Deshniun P., Paithoonrangsarid K., Cheevadhanarak S. & Tanticharoen M. (2003) “Differential Responses of Three Acyl-Lipid Desaturases to Immediate Temperature Reduction Occurring in Two Lipid Membranes of *Spirulina platensis* Strain C1.” *J. Biosci. Bioeng.* **96**: 519-524.

Hyenstrand P., Burkert U., Pettersson A.& Blomqvist P. (2000) “Competition between the green alga *Scenedesmus* and the cyanobacterium *Synechococcus* under different modes of inorganic nitrogen supply.” *Hydrobiol.* **435**: 91-98.

Ikawa M. (2004) “Algal polyunsaturated fatty acids and effects on plankton ecology and other organisms.” *UNH Center for Freshwater Biology Research* **6**: 17-44.

Ishida T., Yokota A. & Sugiyama J. (1997) “Phylogenetic relationships of filamentous cyanobacterial taxa inferred from 16S rRNA sequence divergence.” *J. Gen. Appl. Microbiol.* **43**: 237-241.

Iteman I., Rippka R., Tandeau de Marsac N. & Herdman M (2000) “Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria.” *Microbiol.* **146**: 1275-1286.

Ivanov A.G., Miskiewicz E., Clarke A.K., Greenberg B.M. & Hunner N.P.A. (2000) “Protection of photosystem II against UV-A and UV-B radiation in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*: the role of growth temperature and growth irradiance.” *Photochem. Photobiol.* **72**: 772-779.

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

- Jimenez, C. & Pick U. (1993)** "Differential reactivity of β -carotene isomers from *Dunaliella bardawil* toward oxygen radicals." *Plant Physiol.* **101**: 385-390.
- Jones A.S. & Walker R.T. (1963)** "Isolation and Analysis of the Deoxyribonucleic Acid of *Mycoplasma mycoides* var. *capri*." *Nature* **198**: 588-589.
- Jungblut A., Hawes I., Mountfort D., Hitzfeld B., Dietrich D.R., Burns B.P. & Neilan B.A. (2005)** "Diversity within cyanobacterial mat communities in variable salinity meltwater ponds of McMurdo Ice Shelf, Antarctica." *Environ. Microbiol.* **7**: 519-529.
- Kellogg D.E., Rybalkin I., Chen S., Mukhamedova N., Vlasik T., Siebert P.D. & Chenchik A. (1994)** "TaqStart antibody: "Hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against *Taq* DNA polymerase." *BioTechniques* **16**: 1134-1137.
- Kilian O., Steunou A., Fazeli F., Bailey S., Bhaya D. & Grossman A.R. (2007)** "Responses of a Thermophilic *Synechococcus* Isolate from the Microbial Mat of Octopus Spring to Light." *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 4268-4278.
- Kim S., Rhee S., Ahn C., Ko S., Choi G., Bae J., Park Y. & Oh H. (2006)** "Determination of Cyanobacterial Diversity during Algal Blooms in Daechung Reservoir, Korea, on the Basis of *pcBA* Intergenic Spacer Region Analysis." *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3252-3258.
- Kis M., Zsiros O., Farkas T., Wada H., Nagy F. & Gombos Z. (1998)** "Light-induced expression of fatty acid desaturase genes." *PNAS* **95**: 4209-4214.
- Kiseleva L.L., Horva th I., Vigh L., Los D.A. (1999)** "Temperature-induced specific lipid desaturation in the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*." *FEMS Microbiol. Lett.* **175**: 179-183.
- Komárek J. & Anagnostidis K. (1986)** "Modern approach to the classification system of the cyanophytes. 2: Chroococcales." *Arch. Hydrobiol., Algal. Stud.* **43**: 157-226.
- Komárek J. & Anagnostidis K. (1989)** "Modern approach to the classification system of the cyanophytes. 4: Nostocales." *Arch. Hydrobiol., Algal. Stud.* **56**: 247-345.
- Komárek J., Kopeck y J. & Cep k V. (1999)** "Generic characters of the simplest cyanoprokaryotes *Cyanobium*, *Cyanobacterium* and *Synechococcus*." *Cryptogamie Algal.* **20**: 209-222.
- Komárek J. (2003)** "Problem of the taxonomic category "species" in cyanobacteria." *Algal. Stud.* **109**: 281-297.

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

Kunkel D.D. (1982) “Thylakoid centers: structures associated with the cyanobacterial photosynthetic membrane system.” *Arch. Microbiol.* **133**: 97-99.

Kutschera U. & Niklas K.J (2005) “Endosymbiosis, cell evolution, and speciation.” *Theor. Biosci.* **124**: 1-24.

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

Lalli A., Andreoli C., Ceschi Berrini C., De Appolonia F. & Marcolongo G. (2004) “Anti-inflammatory active principles in Euganean thermal MUD.” Brevetto n° 05100038.8.

Lanave C., Preparata G., Saccone C. & Serio G. (1984). “A new method for calculating evolutionary substitution rates.” *J. Mol. Evol.* **20**: 86-93.

Lange W. (1974) “Competitive exclusion among three planktonic blue-green algal species.” *J. Phycol.* **10**: 411-414.

Lehninger A.L., Nelson D.L. & Cox M.M. (1994) “Principi di biochimica.” Ed. Zanichelli, Bologna (Italia).

Leisner J.M.R., Bilger W., Czygan F.-C. & Lange O.L. (1994) “Light exposure and the composition of lipophilous carotenoids in cyanobacterial lichens.” *J. Plant Physiol.* **143**: 514-519.

Lem N.W. & Stumpf P.K. (1984) “*In Vitro* Fatty Acid Synthesis and Complex Lipid Metabolism in the Cyanobacterium *Anabaena variabilis*.” *Plant Physiol.* **74**: 134-138.

Li R., Yokota A., Sugiyama J., Watanabe M., Hiroki M. & Watanabe M.M. (1998) “Chemotaxonomy of planktonic cyanobacteria based on non-polar and 3-hydroxy fatty acid composition.” *Phycol. Res.* **46**: 21-28.

Li R. & Watanabe M.M. (2004) “Fatty Acid Composition of Planktonic Species of *Anabaena* (Cyanobacteria) with Coiled Trichomes Exhibited a Significant Taxonomic Value.” *Curr. Microbiol.* **49**: 376-380.

Liberton M., Berg R.H., Heuser J., Roth R. & Pakrasi H.B. (2006) “Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803.” *Protoplasma* **227**: 129-138.

- Lin S., Henze S., Lundgren P., Bergman B. & Carpenter E. J. (1998)** “Whole-cell immunolocalization of nitrogenase in marine diazotrophic cyanobacteria, *Trichodesmium* spp.” *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3052-3064.
- Lin Y., Hirai M., Kashino Y., Koike H., Tuzi S. & Satoh K. (2004)** “Tolerance to freezing stress in cyanobacteria, *Nostoc commune* and some cyanobacteria with various tolerances to drying stress.” *Polar Biosc.* **17**: 56-68.
- Lindqvist Y., Huang W., Schneider G. & Shanklin J. (1996)** “Crystal structure of $\Delta 9$ stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins.” *EMBO J.* **15**: 4081-4092.
- López-Cortés A., García-Pichel F., Nübel U. & Vázquez-Juárez R. (2001)** “Cyanobacterial diversity in extreme environments in Baja California, Mexico: a polyphasic study.” *Int. Microbiol.* **4**: 227-236.
- Los D.A., Horvath I., Vigh L. & Murata N. (1993)** “The temperature-dependent expression of the desaturase gene *desA* in *Synechocystis* PCC6803” *FEBS Lett.* **318**: 57-60.
- Los D.A. & Murata N. (1994)** “Low-temperature induced accumulation of the desaturase gene transcript in *Synechocystis* PCC 6803 results from both acceleration of transcription and increase in mRNA stability.” *Russ. J. Plant Physiol.* **41**: 147-151.
- Los D.A. & Murata N. (1998)** “Structure and expression of fatty acid desaturases.” *Biochim. Biophys. Acta* **1394**: 3-15.
- Los D.A., Ray M.K. & Murata N. (1997)** “Differences in the control of the temperature-dependent expression of four genes of desaturases in *Synechocystis* sp. PCC 6803.” *Mol. Microbiol.* **25**: 1167-1175.
- Los D.A. (2004)** “Low-Temperature and Substrate Induction of the Gene for $\Delta 9$ Fatty Acid Desaturase in the Thermophilic Cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*.” *Russ. J. Plant Physiol.* **51**: 164-168.
- Masamoto K., Zsiros O. & Gombos Z. (1999)** “Accumulation of zeaxanthin in cytoplasmic membranes of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 grown under high light condition.” *J. Plant Physiol.* **155**: 136-138.
- Manen J. & Falquet J. (2002)** “The *cpcB-cpcA* locus as a tool for the genetic characterization of the genus *Arthrospira* (Cyanobacteria): evidence for horizontal transfer.” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 861-867.

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

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

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

Maslova I.P., Mouradyan E.A.; Lapina S.S.; Klyachko-Gurvich G.L. & Los D.A. (2004) “Lipid Fatty Acid Composition and Thermophilicity of Cyanobacteria.” *Russ. J. Plant Physiol.* **51**: 353-360.

McBride M.J. (2001) “Bacterial Gliding Motility: Multiple Mechanisms for Cell Movement over Surfaces.” *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 49-75.

Meeks J.C. & Elhai J. (2002) “Regulation of Cellular Differentiation in Filamentous Cyanobacteria in Free-Living and Plant-Associated Symbiotic Growth States.” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 94-121.

Mendiola J A., Marín F.R., Hernández S.F., Arredondo B.O., Señoráns F. J., Ibañez E. & Reglero G. (2005) “Characterization via liquid chromatography coupled to diode array detector and tandem mass spectrometry of supercritical fluid antioxidant extracts of *Spirulina platensis* microalga.” *J. Sep. Sci.* **28**: 1031-1038.

Messina B. (1981) “Le cure ad Abano e Montegrotto Terme.” *Offset Invicta*, Padova, 187 pp.

Mikheyskaya L.V., Ovodova R.G. & Ovodov YU.S. (1977) “Isolation and Characterization of Lipopolysaccharides from Cell Walls of Blue-Green Algae of the Genus *Phormidium*.” *J. Bacteriol.* **130**: 1-3.

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

Miskiewicz E., Ivanov A.G. & Huner N.P.A. (2002) “Stoichiometry of the Photosynthetic Apparatus and Phycobilisome Structure of the Cyanobacterium *Plectonema boryanum* UTEX 485 Are Regulated by Both Light and Temperature.” *Plant Physiol.* **130**: 1414-1425.

- Mohamed H.E., van de Meene A.M.L., Roberson R.W. & Vermaas W.F.J. (2005)** "Myxoxanthophyll Is Required for Normal Cell Wall Structure and Thylakoid Organization in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803." *J. Bacteriol.* **187**: 6883-6892.
- Moro I., Rascio N., La Rocca N., Di Bella M. & Andreoli C. (2007).** "Cyanobacterium *aponinum*, a new Cyanoprokaryote from the microbial mat of Euganean thermal springs (Padua, Italy)." *Algol. Stud.* **123**: 1-15.
- Müller M.C., Rodriguez-Amaya D.B. & Lourenço S.O. (2003)** "Carotenóides da cianobactéria *Synechocystis pevalekii* produzida em condições normais e sob limitação de nutrientes." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **39**: 415-423.
- Mullineaux C.W. (1999)** "The thylakoid membranes of cyanobacteria: structure, dynamics and function." *Aust. J. Plant Physiol.* **26**: 671-677.
- Murata N., Wada H. & Gombos Z. (1992)** "Modes of Fatty-Acids Desaturation in Cyanobacteria." *Plant. Cell. Physiol.* **33**: 933-941.
- Murata N. (1994)** "Genetic and temperature-induced modulation of cyanobacterial membrane lipids." In "Temperature Adaptation of Biological Membranes" (A.R. Cossins, ed.), Portland Press, London, pp. 155-162.
- Murata N. & Wada H. (1995)** "Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria." *Biochem. J.* **308**: 1-8.
- Murata N., Deshniem P. & Tasaka Y. (1996)** "Biosynthesis of gamma-linoleic acid in the cyanobacterium *Spirulina platensis*." *Gamma-Linolenic Acid: Metabolism and Role in Nutrition and Medicine*. Champaign, IL: Am. Oil Chem. Soc.
- Nechustay R., Muster P., Binder A., Liveanu A. e Nelson N. (1983)** "Photosystem I reaction center from the thermophylic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*." *PNAS* **80**: 1179-1183.
- Nei M. & Kumar S. (2000)** "Molecular Evolution and Phylogenetics." Oxford University Press, New York, 333 pp.
- Neilan B.A., Jacobs D. & Goodman A.E. (1995)** "Genetic diversity and phylogeny on toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus." *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3875-3883.
- Neilan B.A., Jacobs D., Deldot T., Blackall L., Hawkins P.R., Cox P.T. e Goodmann A. (1997)** "rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and non-toxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*." *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 693-697.

- Nevo R., Charuvi D., Shimoni E., Schwarz R., Kaplan A., Ohad I. & Reich Z. (2007)** “Thylakoid membrane perforations and connectivity enable intracellular traffic in cyanobacteria.” *EMBO J.* **26**: 1467-1473.
- Nilsson M., Rasmussen U. & Bergman B. (2006)** “Cyanobacterial chemotaxis to extracts of host and non-host plants” *FEMS Microbiol. Ecol.* **55**: 382-390.
- Nishida I. & Murata N. (1996)** “Chilling Sensitivity in Plants and Cyanobacteria: the Crucial Contribution of Membrane Lipids.” *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 541–568.
- Nishiyama Y., Los D.A. & Murata N. (1999)** “PsbU, a protein associated with photosystem II is required for acquisition of cellular thermotolerance in *Synechococcus* species PCC 7002.” *Plant Physiol.* **120**: 301-308.
- Norling B., Zarka A. & Boussiba S. (1997)** “Isolation and characterization of plasma membranes from cyanobacteria.” *Physiol. Plantarum* **99**: 495-504.
- Ohno H., Sakai H., Washio T. & Tomita M. (2001)** “Preferential usage of some minor codons in bacteria.” *Gene* **276**: 107–115.
- Orcutt K.M., Rasmussen U., Webb E.A., Waterbury J.B., Gundersen K. & Bergman B. (2002)** “Characterization of *Trichodesmium* spp. by genetic techniques.” *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2236-2245.
- Otero A. & Vincenzini M. (2003)** “Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity.” *J. Biotechnol.* **102**: 143-152.
- Otero A. & Vincenzini M. (2004)** “*Nostoc* (Cyanophyceae) goes nude: extracellular polysaccharides serve as a sink for reducing power under unbalanced C/N metabolism.” *J. Phycol.* **40**: 74-81.
- Paerl H.W., Pinckney J.L. & Steppe T.F. (2000)** “Cyanobacterial-bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments.” *Environ. Microbiol.* **2**: 11-26.
- Pajdak-Stós A., Fialkowska E. & Fyda J. (2001)** “*Phormidium autumnale* (Cyanobacteria) defense against three ciliate grazer species.” *Aquat. Microb. Ecol.* **23**: 237–244.
- Palińska K.A., Liesack W., Rhiel E. & Krumbein W.E. (1996)** “Phenotype variability of identical genotypes: the need for a combined approach in cyanobacterial taxonomy demonstrated on *Merismopedia*-like isolates.” *Arch. Microbiol.* **166**: 224-233.

- Palińska K.A. & Krumbein W.E. (2000)** "Perforation patterns in the peptidoglycan wall of filamentous cyanobacteria." *J. Phycol.* **36**: 139-145.
- Palińska K. A. & Marquardt J. (2008)** "Genotypic and phenotypic analysis of strains assigned to the widespread cyanobacterial morphospecies *Phormidium autumnale* (Oscillatoriales)." *Arch. Microbiol.* **189**: 325-335.
- Papke R.T., Ramsing N. B., Bateson M. M. & Ward D. M. (2003)** "Geographical isolation in hot spring cyanobacteria." *Environ. Microbiol.* **5**: 650-659.
- Perrière G. & Gouy M. (1996)** "WWW-Query: An on-line retrieval system for biological sequence banks." *Biochimie* **78**: 364-369.
- Piccoli G., Sedeà R., Bellati R., Di Lallo E., Medizza F., Girardi A., De Pieri R., De Vecchi G., Gregnanin A., Piccirillo E.M., Norinelli A. & Dal Prà A. (1981)** "Note illustrative della carta geologica dei Colli Euganei." *Memorie di Scienze geologiche* **34**: 523-566.
- Porra R.J., Thompson W.A. & Kriedemann P.E. (1989)** "Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy." *Biochim. Biophys. Acta* **975**: 384-394.
- Premanandh J., Priya B., Teneva I., Dzhambazov B., Prabakaran D. e Uma L. (2006)** "Molecular Characterization of marine Cyanobacteria from the Indian Subcontinent Deduced from Sequence Analysis of the Phycocyanin Operon (*cpcB-IGS-cpcA*) and 16S-23S ITS Region." *J. Microbiol.* **44**: 607-616.
- Pupillo P., Cervone F., Cresti M. e Rascio N. (2003)** "Biologia Vegetale." *Ed. Zanichelli*, Bologna (Italia).
- Quesada A. & Vincent W.F. (1997)** "Strategies of adaptation by Antarctic cyanobacteria to ultraviolet radiation." *Eur. J. Phycol.* **32**: 335-342.
- Rajaniemi P., Hrouzek P., Kaštovská, Willame R., Rantala A., Hoffmann L., Komárek J. & Sivonen K. (2005)** "Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria)." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 11-26.
- Ramsing N.B., Ferris M.J. & Ward D.M. (1997)** "Light-Induced Motility of Thermophilic *Synechococcus* Isolates from Octopus Spring, Yellowstone National Park." *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2347-2354.

Read N., Connell S. & Adams D.G. (2007) “Nanoscale Visualization of a Fibrillar Array in the Cell Wall of Filamentous Cyanobacteria and Its Implications for Gliding Motility.” *J. Bacteriol.* **189**: 7361-7366.

Reddy A.S., Nuccio M.L., Gross L.M. & Thomas T.L. (1993) “Isolation of a $\Delta 6$ -desaturase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by gain-of-function expression in *Anabaena* sp. strain PCC 7120.” *Plant Mol. Biol.* **27**: 293-300.

Reddy K.J., Soper B.W., Tang J. & Bradley R.L. (1996) “Phenotypic variation in exopolysaccharide production in the marine, aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Cyanothece* sp.” *World J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 311-318.

Reynolds C.S., Oliver R.L. & Walsby A.E. (1987) “Cyanobacterial dominance : the role of buoyancy regulation in dynamic lake environments.” *New Zeal. J. Mar. Fresh.* **21**: 379-390.

Rippka R., Waterbury J. & Cohen-Bazire G. (1974) “A cyanobacterium which lacks thylakoids.” *Arch. Microbiol.* **100**: 419-436.

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

Robertson B. R., Tezuka N. & Watanabe M. M. (2001) “Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content.” *Int. J. System. Evol. Microbiol.* **51**: 861-871.

Rosales N., Ortega J., Mora R. & Morales E. (2005) “Influence of salinity on the growth and biochemical composition of the cyanobacterium *Synechococcus* sp.” *Cienc. Mar.* **31**: 349–355.

Rosselló-Mora R. & Amann R. (2001) “The species concept for prokaryotes.” *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 39-67.

Rothschild L.J. & Mancinelli R.L. (2001) “Life in extreme environments.” *Nature* **409**: 1092-1101.

Rützler K. (1988) “Mangrove sponge disease induced by cyanobacterial symbionts: failure of a primitive immune system?” *Dis. Aquat. Org.* **5**: 143-149.

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. & Erlich H.A. (1988) “Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.” *Science* **239**: 487-491.

- Sakamoto T., Los D.A., Higashi S., Wada H., Nishida I., Ohmori M. & Murata N. (1994)** “Cloning of ω 3 desaturase from cyanobacteria and its use in altering the degree of membrane-lipid unsaturation.” *Plant Mol. Biol.* **26**: 249-264.
- Sakamoto T. & Bryant D.A. (1997)** “Temperature-regulated mRNA accumulation and stabilization for fatty acid desaturase genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002.” *Mol. Microbiol.* **23**: 1281-1292.
- Sakamoto T., Higashi S., Wada H., Murata N. & Bryant D.A. (1997)** “Low-temperature-induced desaturation of fatty acids and expression of desaturase genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002.” *FEMS Microbiol. Lett.* **152**: 313-320.
- Sakamoto T. & Bryant D.A. (1998)** “Growth at low temperature causes nitrogen limitation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002.” *Arch. Microbiol.* **169**: 10-19.
- Sakamoto T., Shen G., Higashi S., Murata N. & Bryant D.A. (1998)** “Alteration of low-temperature susceptibility of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 by genetic manipulation of membrane lipid unsaturation.” *Arch. Microbiol.* **169**: 20–28.
- Samsonoff W.A. & McColl R. (2001).** “Biliproteins and phycobilisomes from cyanobacteria and red algae at the extremes of habitat.” *Arch. Microbiol.* **176**: 400-405.
- Schagerl M. & Müller B. (2006)** “Acclimation of chlorophyll a and carotenoid levels to different irradiances in four freshwater cyanobacteria.” *J. Plant Physiol.* **163**: 709-716.
- Schlüter L., Garde K. & Kaas H. (2004)** “Detection of the toxic cyanobacteria *Nodularia spumigena* by means of a 4-keto-myxoxanthophyll-like pigment in the Baltic Sea.” *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **275**: 69-78.
- Schmidt H.A., Strimmer K., Vingron M. & von Haeseler A. (2002)** “TREEPUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing.” *Bioinformatics* **18**: 502-504.
- Sellner K.G. (1997)** “Physiology, ecology, and toxic properties of marine cyanobacteria blooms.” *Limnol. Oceanogr.* **42**: 1089-1104.
- Sellner K.G., Doucette G.J. & Kirkpatrick G.J. (2003)** “Harmful algal blooms: causes, impacts and detection.” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 383-406.

Selstam E. & Campbell D. (1996) “Membrane lipid composition of the unusual cyanobacterium *Gloeobacter violaceus* sp. PCC 7421, which lacks sulfoquinovosyl diacylglycerol.” *Arch. Microbiol.* **166**: 132-135.

Seo P. e Yokota A. (2003) “The phylogenetic relationships of cyanobacteria inferred from 16S rRNA, *gyrB*, *rpoC1* and *rpoD1* gene sequences.” *J. Gen. Appl. Microbiol.* **49**: 191-203.

Shanklin J., Whittle E. & Fox B.G. (1994) “Eight Histidine Residues Are Catalytically Essential in a Membrane-Associated Iron Enzyme, Stearoyl-CoA Desaturase, and Are Conserved in Alkane Hydroxylase and Xylene Monooxygenase.” *Biochemistry* **33**: 12787-12794.

Shanklin J. & Cahoon E.B. (1998) “Desaturation and related modifications of fatty acids.” *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 611-641.

Siebert P.D., Chenchik A., Kellogg D.E., Lukyanov K.A. & Lukyanov S.A. (1995) “An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA.” *Nucleic Acids Res.* **23**: 1087-1088.

Siegesmund M.A., Johansen J.R., Karsten U. & Friedl T. (2008) “*Coleofasciculus* Gen. Nov. (Cyanobacteria): Morphological and Molecular Criteria for Revision of the Genus *Microcoleus* Gomont.” *J. Phycol.* **44**: 1572-1585.

Singh S.C., Sinha R.P. & Häder D. (2002) “Role of Lipids and Fatty Acids in Stress Tolerance in Cyanobacteria.” *Acta Protozool.* **41**: 297-308.

Skulberg O.M., Codd C.A. & Carmichael W.W. (1984) “Toxic blue-green algal blooms in Europe: a growing problem.” *Ambio* **13**: 244-247.

Spence E., Sarcina M., Ray N., Moller S.G., Mullineaux C.W., Robinson C. (2003) “Membrane-specific targeting of green fluorescent protein by the Tat pathway in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803.” *Mol. Microbiol.* **48**: 1481-1489.

Sperling P., Ternes P., Zank T.K. & Heinz E. (2003) “The evolution of desaturases.” *Prostag. Leukotr. Ess.* **68**: 73-95.

Stackebrandt E. & Goebel B. M. (1994) “Taxonomic note: a for place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology.” *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 846-849.

Stal L.J. (1995) “Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities.” *New Phytol.* **131**: 1-32.

- Stanier R. Y., Sistrom W. R., Hansen T. A., Whitton B. A., Castenholz R. W., Pfennig N., Gorlenko V. N., Kondratieva E. N., Eimhjellen K. E., Whittenbury R., Gherna R. L. & Truper H. G. (1978)** "Proposal to place nomenclature of cyanobacteria (blue-green algae) under rules of international code of nomenclature of bacteria." *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**: 335-336.
- Steiger S., Schäfer L. & Sandmann G. (1999)** "High-light-dependent upregulation of carotenoids and their antioxidative properties in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." *J. Photochem. Photobiol.* **52**: 14-18.
- Strimmer K. & von Haeseler A. (1997)** "Likelihood-mapping: A simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment." *PNAS* **94**: 6815-6819.
- Sumina E.L. (2006)** "Behavior of Filamentous Cyanobacteria in Laboratory Culture." *Microbiol.* **75**: 459-464.
- Sun L., Wang S., Chen L. & Gong X. (2003)** "Promising Fluorescent Probes From Phycobiliproteins." *IEEE J. Sel. Top. Quant.* **9**: 177-188.
- Suzuki I., Los D.A., Kanesaki Y., Mikami K. & Murata N. (2000)** "The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis*." *EMBO J.* **19**: 1327-1334.
- Suzuki I., Kanesaki Y., Mikami K., Kanehisa M. & Murata N. (2001)** "Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik33 in *Synechocystis*." *Mol. Microbiol.* **40**: 235-244.
- Takaichi S., Mochimaru M., Maoka T. & Katoh H. (2005)** "Myxol and 4-Ketomyxol 2'-Fucosides, not Rhamnosides, from *Anabaena* sp. PCC 7120 and *Nostoc punctiforme* PCC 73102, and Proposal for the Biosynthetic Pathway of Carotenoids." *Plant Cell. Physiol.* **46**: 497-504.
- Takaichi S. & Mochimaru M. (2007)** "Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides." *Cell. Mol. Life Sci.* **64**: 2607-2619.
- Tandeau de Marsac N. (1977)** "Occurrence and Nature of Chromatic Adaptation in Cyanobacteria." *J. Bacteriol.* **130**: 82-91.
- Tamaru Y., Takani Y., Yoshida T. & Sakamoto T. (2005)** "Crucial Role of Extracellular Polysaccharides in Desiccation and Freezing Tolerance in the Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc commune*." *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7327-7333.

Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. (2007) “*MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0”. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 1596-1599.

Taton A., Grubisic S., Brambilla E., De Wit R. & Wilmotte A. (2003) “Cyanobacterial Diversity in Natural and Artificial Microbial Mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a Morphological and Molecular Approach.” *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5157-5169.

Taton A., Grubisic S., Balthasart P., Hodgson D.A., Laybourn-Parry J. & Wilmotte A. (2006) “Biogeographical distribution and ecological ranges of benthic cyanobacteria in East Antarctic lakes.” *FEMS Microbiol. Ecol.* **20**: 1-18.

Tasaka Yasushi, Gombos Z., Nishiyama Y., Mohanty P., Ohba T., Ohki K. & Murata N. (1996) “Targeted mutagenesis of acyl-lipid desaturases in *Synechocystis*: evidence for the important roles of polyunsaturated membrane lipids in growth, respiration and photosynthesis.” *EMBO J.* **15**: 6416-6425.

Teneva I., Dzhambazov B., Mladenov R. e Schirmer K. (2005) “Molecular and Phylogenetic Characterization of *Phormidium* Species (*Cyanoprokaryota*) Using the *cpcB-IGS-cpcA Locus*.” *J. Phycol.* **41**: 188-194.

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

Tocher D.R., Leaver M.J. & Hodgson P.A. (1998) “Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases.” *Prog. Lipid Res.* **37**: 73-117.

Toledo G. & Palenik B. (1997) “*Synechococcus* Diversity in the California Current as Seen by RNA Polymerase (*rpoC1*) Gene Sequences of Isolated Strains.” *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4298-4303.

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

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

- Van de Meene A.M.L., Hohmann-Marriott M.F., Vermaas W.F.J. & Roberson R.W. (2006)** "The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." *Arch. Microbiol.* **184**: 259-270.
- Van den Hoek C., Mann D. G. e Jahns H. M. (1995)** "Algae. An introduction to phycology." Cambridge University Press, Cambridge. 627 pp.
- Vargas M. A., Rodríguez H., Moreno J., Olivares H., Del Campo J. A., Rivas J. & Guerrero M. G. (1998)** "Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria." *J. Phycol.* **34**: 812–817.
- Várkonyi Z., Msamoto K., Debreczeny M., Zsiros O., Ughy B., Gombos Z., Domonkos I., Farkas T., Wada H. & Szalontai B. (2002)** "Low-temperature-induced accumulation of xanthophylls and its structural consequences in the photosynthetic membranes of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*: an FTIR spectroscopic study." *PNAS* **99**: 2410-2415.
- Vigh L., Los D.A., Horvath I. & Murata N. (1993)** "The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the *desA* gene in *Synechocystis* PCC 6803." *PNAS* **90**: 9090-9094.
- Wada H., Avelange-Macherel M. & Murata N. (1993)** "The *desA* Gene of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803 Is the Structural Gene for $\Delta 12$ Desaturase." *J. Bacteriol.* **175**: 6056-6058.
- Wada H., Gombos Z. & Murata N. (1994)** "Contribution of membrane lipids to the ability of the photosynthetic machinery to tolerate temperature stress." *PNAS* **91**: 4273-4277.
- Ward D. M., Weller R. & Bateson M. M. (1990)** "16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community." *Nature* **345**: 63-65.
- Ward D. M. (1998)** "A natural species concept for prokaryotes." *Curr. Opin. Microbiol.* **1**: 271-277.
- Ward D., Ferris M., Nold S., & Bateson M. (1998)** "A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1353-1370.
- Waring G. A. (1965)** "Thermal springs of the United States and other countries of the world-a summary." *U.S. Geological Survey Professional Paper* 492.

Watanabe K., Nelson J.S., Harayama S. & Kasai H. (2001) “ICB database: the *gyrB* database for identification and classification of bacteria.” *Nucleic Acids Res.* **29**: 344-345.

Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M.I., Moore L.H., Moore W.E.C., Murray R.G.E., Stackebrandt E., Starr M.P. & Trüper H.G. (1987) “Report of the Ad Hoc Committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics.” *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 463-464.

Weise G., Drews G., Jann B. & Jann K. (1970) “Identification and analysis of a lipopolysaccharide in cell walls of the blue-green alga *Anacystis nidulans*.” *Arch. Mikrobiol.* **71**: 89-98.

Whitton B.A. (1992) “Diversity, ecology, and taxonomy of the cyanobacteria.” In: *Mann, N.H., Carr, N.G. (Eds.), Photosynthetic Prokaryotes. Plenum Press, New York*, pp. 1-51.

Wilmotte A. & Herdman M. (2001) “Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences.” In *Bergey’s manual of systematic bacteriology*. D. R. Boone & R. W. Castenholz (eds). 2nd edn. New York, U.S.A., Springer-Verlag, pp. 487-493.

Wilson K. M., Schembri M. A., Baker P. D & Saint C. P. (2000) “Molecular Characterization of the Toxic Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and Design of a Species-Specific PCR.” *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 332-338.

Woese C.R. (1987) “Bacterial evolution.” *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271.

Wolf E. & Schüßler A. (2005) “Phycobiliprotein fluorescence of *Nostoc punctiforme* changes during the life cycle and chromatic adaptation: characterization by spectral confocal laser scanning microscopy and spectral unmixing.” *Plant Cell Environ.* **28**: 480-491.

Wolgemuth C.W. & Oster G. (2004) “The Junctional Pore Complex and the Propulsion of Bacterial Cells.” *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 72-77.

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

Yamamoto S. & Harayama S. (1995) “PCR Amplification and Direct Sequencing of *gyrB* Genes with Universal Primers and Their Application to the Detection and Taxonomic Analysis of *Pseudomonas putida* Strains.” *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1104-1109.

Young J.M. (2001) “Implications of alternative classifications and horizontal gene transfer for bacterial taxonomy.” *Int. J. System. Evol. Microbiol.* **51**: 945-953.

Zilinskas B.A. & Howell D.A. (1987) “Immunological Conservation of Phycobilisome Rod Linker Polypeptides.” *Plant Physiol.* **85**: 322-326.

Zsíros O., Kis M., Mustárty L., Farkas T., Várkonyi Z., Gombos Z. & Szalontai B. (2002) “Light-driven structural changes in thylakoid and cytoplasmic membranes of a cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803.” *J. Plant Physiol.* **159**: 403-414.

APPENDICE

<i>rpoC1</i> accession nr	<i>gyrB</i> accession nr	organismo
AB074797	AB074774	<i>Synechococcus leopoliensis</i> IAM M-6
AB074794	AB074771	<i>Microcystis wesenbergii</i> NIES 104
AB074811	-	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7001
AB074809	AB074786	<i>Chroococcidiopsis</i> sp. PCC 7431
AB074800	AB074777	<i>Stanieria cyanosphaera</i> PCC 7437
AB074803	AB074780	<i>Xenococcus</i> sp. PCC 7307
-	AB074783	<i>Pleurocapsa</i> sp. PCC 7314
AB074807	AB074784	<i>Pleurocapsa</i> sp. PCC 7327
AB074788	AB074765	<i>Spirulina platensis</i> IAM M-135
AB074790	AB074767	<i>Oscillatoria agardhii</i> IAM M-244
AB074810	AB074787	<i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 7403
AB074799	AB074776	<i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 7367
AB074808	AB074785	<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7375
AB074802	AB074779	<i>Oscillatoria nigro viridis</i> PCC 7112
AB074798	AB074775	<i>Pbormidium</i> sp. IAM M-99
AB074793	AB074770	<i>Anabaena cylindrica</i> IAM M-253
AB074789	AB074766	<i>Anabaena variabilis</i> IAM M-204
AB074805	AB074782	<i>Nodularia</i> sp. PCC 73104
AB074792	AB074769	<i>Nostoc linckia</i> IAM M-251
AB074791	AB074768	<i>Calothrix brevisima</i> IAM M-249
AB074796	AB074773	<i>Anabaenopsis circularis</i> IAM M-4
AB074795	AB074772	<i>Anabaena variabilis</i> IAM M-3
AB074801	AB074778	<i>Chlorogloeopsis</i> sp. PCC 6718
AB074804	AB074781	<i>Fischerella muscicola</i> PCC 73103

Tabella I: sequenze nucleotidiche utilizzate nelle ricostruzioni filogenetiche con i geni *rpoC1* e *gyrB*, oltre a quelle elencate in tabella 11.

16S rDNA accession nr	organismo
X03538	<i>Synechococcus leopoliensis</i> IAM M-6
AJ133174	<i>Microcystis wesenbergii</i> NIES 104
AB015058	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7001
AB074506	<i>Chroococciopsis</i> sp. PCC 7431
AB039008	<i>Stanieria cyanosphaera</i> PCC 7437
AB074510	<i>Xenococcus</i> sp. PCC 7307
AB074511	<i>Pleurocapsa</i> sp. PCC 7314
AB039007	<i>Pleurocapsa</i> sp. PCC 7327
AB074508	<i>Spirulina platensis</i> IAM M-135
AB074507	<i>Oscillatoria agardhii</i> IAM M-244
AB039019	<i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 7403
AB039018	<i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 7367
AB039011	<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7375
AB074509	<i>Oscillatoria nigro viridis</i> PCC 7112
AB003169	<i>Phormidium</i> sp. IAM M-99
AF247592	<i>Anabaena cylindrica</i> IAM M-253
AB074502	<i>Anabaena variabilis</i> IAM M-204
AB039002	<i>Nodularia</i> sp. PCC 73104
AB074503	<i>Nostoc linckia</i> IAM M-251
AB074504	<i>Calothrix brevissima</i> IAM M-249
AF247595	<i>Anabaenopsis circularis</i> IAM M-4
AB016520	<i>Anabaena variabilis</i> IAM M-3
AF132777	<i>Chlorogloeopsis</i> sp. PCC 6718
AB074505	<i>Fischerella muscicola</i> PCC 73103
EF654086	<i>Phormidium uncinatum</i> SAG 81.79
AB003167	<i>Phormidium ambiguum</i> IAM M-71
DQ493873	<i>Phormidium autumnale</i> Arct-Ph5
EF654084	<i>Phormidium autumnale</i> SAG 78.79
EF654083	<i>Phormidium tergestinum</i> CCALA 155
AB075988	<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 73110
AB075994	<i>Phormidium persicinum</i> CCMP 638
AB075999	<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS 101

Tab. II: sequenze nucleotidiche utilizzate nella ricostruzione filogenetica con il gene 16S rDNA, oltre a quelle elencate in tabella 11.

<i>cpcAB</i> accession nr	organismo
AY575941	<i>Arthrospira fusiformis</i> AB2002/05
AY575944	<i>Arthrospira indica</i> PD2002/ana
AY575947	<i>Phormidium</i> cf. <i>terebriformis</i> AB2002/07
AY575948	<i>Spirulina subsalsa</i> AB2002/06
AJ973262	<i>Phormidium willei</i> BDU 130511
AJ973263	<i>Leptolyngbya valderiana</i> BDU 20041
AJ973265	<i>Leptolyngbya valderiana</i> BDU 140441
AY466129	<i>Lyngbya aerugineo-coerulea</i> PACC 8601
AY466123	<i>Phormidium autumnale</i> PACC 5511
AY466130	<i>Phormidium bijugatum</i> PACC 8602
AY466124	<i>Phormidium autumnale</i> PACC 5517
AY466128	<i>Phormidium molle</i> PACC 8140
AJ132279	<i>Planktobrix rubescens</i>
AJ401166	<i>Arthrospira</i> sp. Paracas P2
AJ401186	<i>Oscillatoria</i> sp. PCC 6304
AY036900	<i>Aphanizomenon</i> sp. TR183
AF101452	<i>Nodularia spumigena</i> PCC 7804
AF223465	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 9005
AF223455	<i>Synechococcus</i> sp. PS685
AF426786	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>
AF426003	<i>Anabaena circinalis</i> AWQC019A
AF426008	<i>Anabaena flos-aquae</i> AWQC264D
AF364342	<i>Nodularia harveyana</i>
AY466120	<i>Nostoc linckia</i> PACC 5085
AF195163	<i>Microcystis flos-aquae</i> UWOC C3-9
AJ003184	<i>Chroococcus dispersus</i> SA01P31
AJ003179	<i>Microcystis aeruginosa</i> EAWAG171
AJ003180	<i>Synechocystis</i> sp. EAWAG174

Tabella III: sequenze nucleotidiche utilizzate nella ricostruzione filogenetica con il locus *cpcB*-IGS-*cpcA*, oltre a quelle elencate in tabella 11.

16S-23S ITS accession nr	organismo
EF178274	<i>Oscillatoria</i> sp. PCC 7112
EF061079	<i>Oscillatoria</i> sp. PCC 9240
AJ973272	<i>Phormidium willei</i> BDU 130511
AF399651	<i>Trichodesmium tenue</i> Z-1
AF399650	<i>Trichodesmium hildebrandtii</i> II-4
AF399648	<i>Trichodesmium thiebautii</i> II-3
AF399652	<i>Katagnymene spiralis</i> ZK
AY101599	<i>Arthrospira</i> sp. TKF1
AY724776	<i>Arthrospira maxima</i> CONC-040
AY724775	<i>Arthrospira platensis</i> M2
AJ973274	<i>Leptolyngbya valderiana</i> BDU 30501
AJ973273	<i>Leptolyngbya valderiana</i> BDU 20041
AF399647	<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS 101
AF399646	<i>Trichodesmium erythraeum</i> Z/9
AY575933	<i>Phormidium</i> cf. <i>terebriformis</i> AB2002/07
AY575931	<i>Arthrospira indica</i> PD1997/ram
AY575924	<i>Arthrospira fusiformis</i> AB2002/02
AJ973268	<i>Phormidium chlorinum</i> BDU 140691
AJ973267	<i>Phormidium boryanum</i> BDU 92181
AJ973271	<i>Phormidium subuliforme</i> BDU 100712
AY575935	<i>Spirulina subsalsa</i> PD2002/gca
AJ973270	<i>Oscillatoria salina</i> BDU 30411
AM398954	<i>Phormidium inundatum</i> SAG 79.79
AM398959	<i>Phormidium autumnale</i> CCAP 1462/10
AM398960	<i>Phormidium persicinum</i> SAG 80.79
AM398946	<i>Phormidium tergestinum</i> CCALA 155
682 pb	<i>Leptolyngbya</i> sp. ETS-04
581 pb	<i>Leptolyngbya laminosa</i> OH-1-p Cl 1

Tabella IV: sequenze nucleotidiche utilizzate nella ricostruzione filogenetica con il locus 16S-23S ITS, oltre a quelle elencate in tabella 11. Le sequenze di *Leptolyngbya* sp. ETS-04 e *Leptolyngbya laminosa* OH-1-p Cl 1 sono state prodotte nel laboratorio dove ho svolto il mio Dottorato.

<i>rbcl</i> accession nr	organismo
AB075914	<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 73110
EU119380	<i>Phormidium laminosum</i> OH-1-p Cl 1
AB075922	<i>Symploca atlantica</i> PCC 8002
AB075920	<i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 7403
AB075919	<i>Phormidium persicinum</i> CCMP 638
AB075924	<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS 101
AB075913	<i>Fischerella thermalis</i> PCC 7521
AB075909	<i>Cylindrospermum licheniforme</i> UTEX 2014
AB075918	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7906
AB075917	<i>Nodularia</i> sp. KAC 17
AB075907	<i>Chlorogloeopsis fritschii</i> PCC 6912
AB075906	<i>Calothrix desertica</i> PCC 7102

Tabella V: sequenze nucleotidiche utilizzate nella ricostruzione filogenetica con il gene *rbcl*, oltre a quelle elencate in tabella 11.

Funzione proposta per la proteina	Accession number della sequenza proteica	Organismo	Caratteristiche organismo
desA	AAZ58761	<i>Prochlorococcus marinus</i> NATL2A	coccoide, marino
desA	NP_926681	<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	coccoide, epilitico, privo di tilacoidi
desA	NP_925569	<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	coccoide, epilitico, privo di tilacoidi
desA	AAF21445	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	coccoide, da campioni di fango
desA	CAA60415	<i>Spirulina platensis</i> C1	filamentoso, d'acqua dolce o di pozze ipersaline
desA	YP_720110	<i>Thricodesmium erythraeum</i> IMS101	filamentoso, marino, azotofissatore non-eterocistico
desA	BAA02921	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6714	coccoide, d'acqua dolce
desA	BAA03435	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	filamentoso, d'acqua dolce o terrestre, azotofissatore eterocistico
desA	CAF18424	<i>Nostoc</i> sp. SO-36	filamentoso, antartico, azotofissatore eterocistico
desB	NP_485637	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	filamentoso, terrestre, azotofissatore eterocistico
desB	YP_723951	<i>Thricodesmium erythraeum</i> IMS101	filamentoso, marino, azotofissatore non-eterocistico
desB	BAA02924	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	coccoide, d'acqua dolce
desB	AAB61352	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	coccoide, da campioni di fango
desB	CAF18425	<i>Nostoc</i> sp. SO-36	filamentoso, antartico, azotofissatore eterocistico
desC	NP_489031	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	filamentoso, terrestre, azotofissatore eterocistico
desC	AAD00699	<i>Thermosynechococcus vulcanus</i>	coccoide, di sorgenti termali, termofilo
desC	AAG16761	<i>Prochlorothrix hollandica</i> PCC 9006	filamentoso, d'acqua dolce
desC	AAB61353	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	coccoide, da campioni di fango
desC	CAA05166	<i>Spirulina platensis</i> C1	filamentoso, d'acqua

			dolce o di pozze ipersaline
desC	NP_485639	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	filamentoso, terrestre, azotofissatore eterocistico
desC	YP_721205	<i>Thricodesmium erythraeum</i> IMS101	filamentoso, marino, azotofissatore non-eterocistico
desC	YP_172259	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301	coccoide, d'acqua dolce
desC	NP_898466	<i>Synechococcus</i> sp. WH 8102	coccoide, marino
desC	CAF18423	<i>Nostoc</i> sp. SO-36	filamentoso, antartico, azotofissatore eterocistico
desC2	CAF18426	<i>Nostoc</i> sp. SO-36	filamentoso, antartico, azotofissatore eterocistico
desD	AAA27286	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	coccoide, d'acqua dolce
desD	CAA60573	<i>Spirulina platensis</i> C1	filamentoso, d'acqua dolce o di pozze ipersaline
des9	BAA03982	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	coccoide, d'acqua dolce
desE	AAF21448	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	coccoide, da campioni di fango
desX	YP_322790	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	filamentoso, d'acqua dolce o terrestre, azotofissatore eterocistico
desX	ZP_00345918	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	filamentoso, simbiote, azotofissatore eterocistico
desX	NP_682509	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	coccoide, di sorgenti termali, termofilo
desX	YP_477105	<i>Synechococcus</i> sp. JA-2-3B' a(2-13)	coccoide, di sorgenti termali, termofilo, azotofissatore non-eterocistico
desX	YP_475739	<i>Synechococcus</i> sp. JA-3-3Ab	coccoide, di sorgenti termali, termofilo, azotofissatore non-eterocistico
desX	YP_324706	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	filamentoso, d'acqua dolce o terrestre, azotofissatore eterocistico
desX	NP_682443	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	coccoide, di sorgenti termali, termofilo

desX	NP_683170	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	coccoide, di sorgenti termali, termofilo
desX	NP_895996	<i>Prochlorococcus marinus</i> MIT 9313	coccoide, marino
desX	NP_895998	<i>Prochlorococcus marinus</i> MIT 9313	coccoide, marino
desX	NP_893789	<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>pastoris</i> CCMP 1986	coccoide, marino
desX	ZP_00517700	<i>Chroocosphaera watsonii</i> WH 8501	coccoide, marino, azotofissatore non-eterocistico
desX	YP_479096	<i>Synechococcus</i> sp. JA-2-3B' a(2-13)	coccoide, di sorgenti termali, termofilo, azotofissatore non-eterocistico
desX	YP_324704	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	filamentoso, d'acqua dolce o terrestre, azotofissatore eterocistico
desX	NP_896789	<i>Synechococcus</i> sp. WH 8102	coccoide, marino
desX	NP_893499	<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>pastoris</i> CCMP 1986	coccoide, marino
desX	NP_894082	<i>Prochlorococcus marinus</i> MIT 9313	coccoide, marino
desX	ZP_00516843	<i>Chroocosphaera watsonii</i> WH 8501	coccoide, marino, azotofissatore non-eterocistico
desX	YP_324705	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	filamentoso, d'acqua dolce o terrestre, azotofissatore eterocistico
desX	ZP_00108583	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	filamentoso, simbiote, azotofissatore eterocistico
desX	NP_894629	<i>Prochlorococcus marinus</i> MIT 9313	coccoide, marino
desX	YP_376159	<i>Synechococcus</i> sp. CC9902	coccoide, marino
desX	ZP_00515010	<i>Chroocosphaera watsonii</i> WH 8501	coccoide, marino, azotofissatore non-eterocistico
desX	YP_397969	<i>Prochlorococcus marinus</i> MIT 9312	coccoide, marino
desX	NP_893495	<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>pastoris</i> CCMP 1986	coccoide, marino
desX	ZP_00110890	<i>Nostoc punctiforme</i>	filamentoso, simbiote,

		PCC 73102	azotofissatore eterocistico
desX	ZP_00110549	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	filamentoso, simbiote, azotofissatore eterocistico
desX	YP_475340	<i>Synechococcus</i> sp. JA-3-3Ab	coccoide, di sorgenti termali, termofilo, azotofissatore non-eterocistico
desX	ZP_00514501	<i>Chroocosphaera watsonii</i> WH 8501	coccoide, marino, azotofissatore non-eterocistico
desX	YP_322210	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	filamentoso, d'acqua dolce o terrestre, azotofissatore eterocistico
desX	ZP_00106832	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	filamentoso, simbiote, azotofissatore eterocistico
desX	ZP_00111258	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	filamentoso, simbiote, azotofissatore eterocistico
desX	YP_324388	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	filamentoso, d'acqua dolce o terrestre, azotofissatore eterocistico
desX	YP_322565	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	filamentoso, d'acqua dolce o terrestre, azotofissatore eterocistico

Tabella VI: sequenze aminoacidiche di desaturasi degli acidi grassi utilizzate nell'analisi e riportate così come sono state trovate in Genbank.