

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”

**DOTTORATO DI RICERCA IN ACQUACOLTURA
INDIRIZZO IN PRODUZIONI MARINE E DULCIACQUICOLE
XVII CICLO**

TESI DI DOTTORATO

**STUDIO DELLE CARATTERISTICHE DI CRESCITA DI
MICROALGHE IN IMPIANTI INDOOR ED OUTDOOR PER LA
PRODUZIONE DI BIOMASSA ALGALE PREGIATA.**

Candidata

Dott.ssa Marianna Caiazzo

Relatore

Ch.mo Prof.

Carmelo Rigano

Coordinatore

Ch.mo Prof.

Aldo Bordi

INDICE

CAPITOLO PRIMO: INTRODUZIONE	Pg.	4
1.1 Le microalghe.		5
1.2 Tecniche di coltivazione delle microalghe.		9
1.3 Produzione di microalghe ed utilizzo della biomassa algale in vari settori industriali.		15
1.4 L'intensità luminosa.		17
1.5 Temperatura.		20
CAPITOLO SECONDO: SCOPO DELLA TESI		22
CAPITOLO TERZO: MATERIALI E METODI		25
3.1 Organismi algali e condizione di coltura indoor ed outdoor.		26
3.2 Caratteristiche morfologiche dei ceppi algali studiati.		26
3.3 Crescita indoor.		29
3.4 Colture outdoor.		32
3.5 Misure di crescita.		33
3.6 Velocità di fotosintesi in funzione della temperatura e dell'intensità luminosa e velocità di respirazione in funzione della temperatura.		34
3.7 Misura di clorofilla totale.		36
3.8 Analisi statistica.		36

CAPITOLO QUARTO: RISULTATI	37
4.1 Crescita di <i>Koliella antarctica</i> e <i>Chlorella sorokiniana</i> in colture indoor. Effetti della temperatura.	38
4.2 Crescita di <i>Tetraselmis suecica</i>	38
4.3 Velocità di fotosintesi. Effetto dell'intensità luminosa e della temperatura.	40
4.4 Velocità di fotosintesi normalizzata sulla biomassa (P^B) in funzione della densità di flusso fotonico (I)	44
4.5 Correlazione fra velocità di fotosintesi e velocità di crescita.	54
4.6 Effetto della temperatura sulla velocità di respirazione.	56
4.7 Comparazione fra velocità di fotosintesi massima e respirazione alle diverse temperature.	59
4.8 Caratteristiche di crescita di <i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>koliella antarctica</i> , e <i>Tetraselmis suecica</i> in colture "outdoor"	63
4.9 Misura in laboratorio dell' effetto della temperatura sulla velocità di fotosintesi di <i>C. sorokiniana</i> coltivata " outdoor"	68
4.10 Effetto della temperatura sulla velocità di respirazione di <i>C. sorokiniana</i> cresciuta " outdoor"	70
CAPITOLO QUINTO: DISCUSSIONE	73
BIBLIOGRAFIA	88

CAPITOLO 1

Introduzione

1.1 Le microalghe

Le microalghe, insieme ai cianobatteri, sono organismi unicellulari fotoautotrofi, che a partire da CO₂ ed energia radiante del sole, producono zuccheri per il proprio metabolismo energetico e biosintetico, ed ossigeno che in parte usano con la respirazione ed in parte rilasciano nel mezzo esterno. Negli ambienti acquatici, esse sono i produttori primari e costituiscono un importante anello della catena trofica degli ecosistemi marini, garantendo il flusso di materia ed energia necessario per il mantenimento degli organismi eterotrofi. L'energia utilizzata per la fotosintesi proveniente dalle radiazioni solari, attraversa gli strati d'acqua più superficiali permettendo tale processo nei primi 40 metri di profondità.

Le alghe hanno cellule di tipo eucariotico, presentano un diverso corredo di pigmenti fotosintetici (soprattutto clorofilla e carotenoidi), e possiedono sostanze di riserva e componenti parietali del tutto specifici, utilizzati come elementi utili per stabilire la loro posizione sistematica.

Nel mare e nei mezzi acquatici, tutti gli organismi fitoplanctonici, a seconda della profondità alla quale crescono, hanno una certa quantità e tipologia di pigmenti fotosintetici, la cui presenza permette di distinguere i cianobatteri (*Cyanophyta*) per la presenza di ficocianina, le alghe rosse (*Rhodophyta*) per la ficoeritrina, le verdi (*Chlorophyta*) per la presenza di clorofille a e b, le brune (*Bacillariophyta o diatomee*) per le xantofille e caroteni.

Carenze nutrizionali, in particolare di substrato azotato, determinano la degradazione dei pigmenti ficobiliproteici e clorofilliani con conseguente maggior risalto degli altri pigmenti e colorazione verde-giallastro- arancione delle colture algali .

La coltivazione di alghe in ambiente controllato (applicando diverse tecnologie) è diventata un'attività di grande importanza economica per la produzione di biomassa che viene impiegata per una molteplicità di scopi che vanno da quello alimentare, a quello medico e cosmetico. I principali parametri che vengono monitorati per controllare e migliorare la crescita algale sono luce e temperatura.

L'intensità e la qualità delle radiazioni luminose influenzano la crescita e la riproduzione degli organismi algali, i quali possono fotoacclimatarsi a varie intensità di energia luminosa ed avere un'efficienza fotosintetica più elevata a bassi o alti regimi di luce (Johan U. Grobbelaar, 2003; F.L.Figueroa, 2003).

La temperatura regola la crescita delle microalghe, la maggior parte delle quali, definiti organismi mesofili, presenta un optimum di crescita in un intervallo compreso tra 20°C e 30°C. Esistono anche microalghe adattate alle basse temperature, con un metabolismo attivo e crescita fra 0°C e 12°C, detti psicrofili; al contrario quelli adattati a svilupparsi ad elevati valori di temperatura, fra i 35°C ed i 60°C sono detti termofili, fra cui troviamo *Cyanidium caldarium*, degli ambienti vulcanici, e le diatomee delle acque termali (Tolomio *et al.*,2000).

In condizioni di basse temperature mai superiori ai 5°C, soltanto gli organismi definiti psicrofili, sono capaci di colonizzare le immense masse oceaniche delle zone polari Artiche ed Antartiche, definite ecosistemi freddi, e garantire in tali acque la produzione primaria.

Alghe psicrofile popolano anche i ghiacciai e le nevi perenni degli ambienti alpini (Andreoli *et al.*; 1998).

Tali alghe, nella stagione favorevole, sono in grado di moltiplicarsi e di raggiungere una densità cellulare elevata (milioni di cellule per ml) in grado di colorare interi campi innevati di rosso, arancione, verde o grigio. Furono Schmidt e Nielsen nel 1902 a dare, per la prima volta, la definizione di organismi criofili a quei microrganismi capaci di sopravvivere a temperature prossime a 0°C. Un'ulteriore definizione di psicrofili è stata adottata per gli organismi capaci di crescere a temperature basse ma mai superiori a 15°C (Morita, 1975).

Tra gli psicrofili sono ascrivibili sia procarioti, quali batteri *Pseudoalteromonas*, *Moraxella*, *Psychrobacter*, *Bacillus* e *Micrococcus*, che eucarioti, come il fungo *Penicillium*, ed animali vertebrati ed invertebrati, sia marini che di terra ferma, dell'Artico e dell'Antartico (Feller and Gerday, 2003).

Tra le specie vegetali, soprattutto fra le microalghe, ritroviamo numerosi microrganismi psicrofili sia in termini di diversità che di numero di specie (Ling, 2001). Oltre a tollerare temperature basse, alcuni degli organismi psicrofili, riescono anche a sopravvivere ad estreme condizioni ambientali caratterizzate da elevate radiazioni ultraviolette, alte concentrazioni saline (alo-tolleranti), completa oscurità, anche per periodi di tempo molto lunghi (Carpenter *et al.*, 2000).

Nonostante la comune caratteristica di tollerare le basse temperature, gli organismi psicrofili possono differenziarsi l'uno dall'altro per quanto riguarda la temperatura ottimale di crescita.

I batteri dei generi *Alteromonas*, *Bacillus* e *Vibrio*, isolati nei sedimenti dei fondali marini per esempio, ma anche l'alga

Pyraminomos tychotreta sp., isolata nel mare di Weddell, Antartide, hanno una temperatura ottimale di crescita intorno a 0°C, ma non crescono a temperature superiori a 12°C (Feller *et al.*, 1996; Daugbjerg, 2000); alcune alghe, *Chloromonas*, isolata nei mari antartici (Loppes *et al.*, 1996), *Desmotetra antarctica* e *D. aureospora*, isolate dai ghiacciai delle regioni polari, ed alghe isolate da ghiacciai e nevai delle zone alpine, riescono a svilupparsi anche a temperature prossime a 15°C (Ling, 2001). La possibilità, da parte di queste alghe, di vivere a temperature basse deriva da particolari adattamenti fisiologici e biochimici, che assicurano il normale svolgimento dei loro processi metabolici permettendo una crescita cellulare adeguata.

Tra gli adattamenti si possono includere le variazioni della composizione dei lipidi di membrana, tali da aumentarne la fluidità e quindi la funzionalità alle basse temperature (cosa che favorisce la permeabilità selettiva delle membrane e la mobilità delle proteine al loro interno), nonché una modificazione della composizione amminoacidica delle proteine tale da conferire agli enzimi una più alta efficienza alle basse temperature. Tra gli adattamenti rientra anche la capacità di produrre quantità più elevate di enzima, almeno per quanto riguarda alcuni degli enzimi studiati (Devos *et al.*, 1998; Russel, 1992; Feller and Gerday, 2003).

Grazie ai suoi molteplici effetti, si può affermare che la temperatura rappresenta il fattore più importante nel determinare la distribuzione degli organismi viventi sulla superficie terrestre e negli ambienti acquatici (Field and Somer, 1998).

1.2 Tecniche di coltivazione delle microalghe

La coltivazione di massa di alghe unicellulari in ambiente controllato rientra nelle attività di allevamento di organismi vegetali acquatici.

I protocolli per la produzione di biomassa vegetale sono numerosi e si diversificano tra di loro per i sistemi impiegati e per le loro dimensioni, per i parametri chimico fisici e per la composizione dei terreni di coltura.

La coltivazione di biomassa algale per la produzione commerciale può essere di tipo “indoor”, ossia effettuata all’interno di un edificio, che però risulta particolarmente costosa, o di tipo “outdoor”, cioè all’esterno, più economica in quanto utilizza per la crescita delle alghe energia solare. I sistemi di coltura delle alghe, in base alle caratteristiche dell’impianto di produzione, vengono generalmente classificati come sistemi aperti quali grandi vasche, stagni, canali, unità a circolazione di acqua bassa (Fig. 1.1, 1.2 e 1.3), e come sistemi chiusi. Questi ultimi possono essere di tipo “indoor”, quali bustoni di polietilene o fotobioreattori, (Fig 1.4 e 1.5) o di tipo “outdoor” (fotobioreattori cilindrici, elicoidali anulari ed a pannello) (Fig.1.6 a e b).

La scelta del “sistema di coltura” dipende da una serie di fattori quali il volume della coltura, la temperatura, il consumo energetico, l’impegno continuo di manutenzione accurata, e il prodotto finale che si vuole ottenere. Nella scelta del sistema di coltura si tiene conto, quindi, delle esigenze di coltivazione dell’alga e della qualità del prodotto, e nello stesso tempo della sua convenienza economica.

Oggi la produzione viene effettuata, soprattutto, con sistemi di coltura all'aperto "outdoor" dove è possibile abbattere i costi utilizzando la luce solare come sorgente di energia. Spesso per la produzione di alghe su larga scala vengono utilizzati vasche a rimescolamento poco profonde. In molte regioni gli impianti di colture algali all'aperto, però, hanno spesso lo svantaggio di trovarsi in condizioni climatiche avverse, tali da non permettere cicli di produzioni annuali, obbligando quindi di massimizzare produzione, raccolta e conservazione dell'alga in ristretti periodi dell'anno. Inoltre, tali sistemi di coltivazione in vasche aperte non protette, anche se apparentemente economici, non assicurano produzioni monoalgali prive di contaminanti, e sono utili soltanto per un limitato numero di ceppi come *Spirulina platensis*, *Dunaliella salina* che crescono in condizioni selettive estreme rispettivamente di elevato pH (intorno a 8), e di elevate salinità (uguale o maggiore al 36 per mille) e temperatura.

Nonostante i buoni risultati ottenuti con i sistemi aperti, il futuro, tuttavia, è orientato verso i sistemi di coltivazione delle alghe in sistemi chiusi, che costituiscono ambienti altamente selettivi e protetti da potenziali inquinanti. Il concetto di "sistema chiuso" è stato, però, per lungo tempo associato all'alto costo di produzione, quando il suo funzionamento era totalmente dipendente da illuminazione e termostatazione artificiali. Recentemente è stata avviata la produzione su larga scala di una vasta gamma di specie algali quali *Spirulina*, *Chlorella* ed *Haematococcus* in sistemi chiusi detti "fotobioreattori", posti all'aperto (Fig.1.3 e Fig. 1.6 a e b). Con tali sistemi è possibile ottenere un prodotto algale incontaminato, e nello stesso tempo economico.

Quindi, là dove le condizioni climatiche sono favorevoli, in questi reattori si possono coltivare alghe di qualità pregiata, in un sistema a ciclo continuo economicamente competitivo.

Intensa è la produzione di *Nannochloropsis sp.* un'alga molto utilizzata in acquacoltura, che può raggiungere elevate densità cellulari in funzione dell'intensità luminosa e della sezione del fotobioreattore utilizzato (Amos Richmond and Ning Zou, 2000).



Figura. 1.1 Coltivazione “outdoor” di *Dunaliella salina*, Australia



Figura 1.2 Coltivazione “outdoor” in vasche aperte di *Spirulina platensis*, California.



Figura 1.3 Coltivazione “outdoor” in fotobioreattori chiusi di *Haematococcus pluvialis*, Israele.

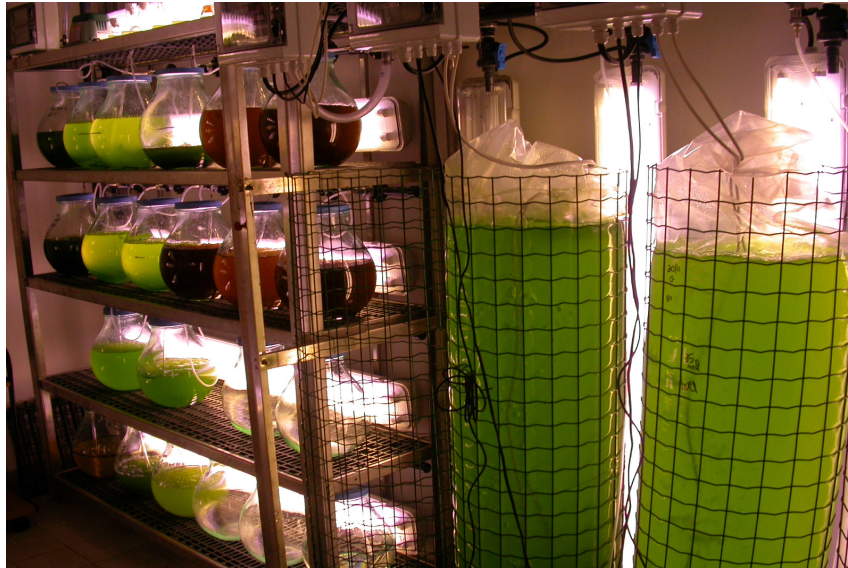


Figura. 1.4 Allevamento “indoor” con luce artificiale di *Tetraselmis suecica* in buste di polietilene da 120 litri.. CRIAcq, Università degli Studi di Napoli “Federico II”.

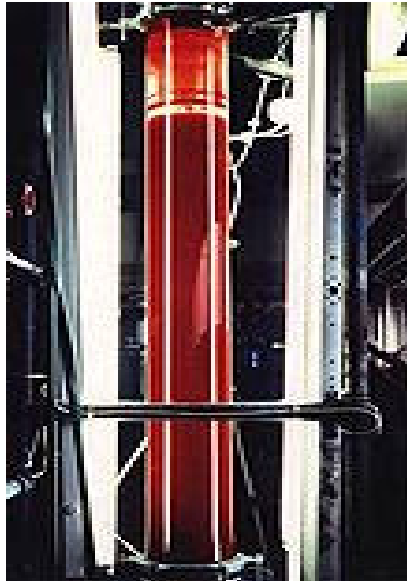


Figura 1.5 Fotobioreattore tubolare per la coltivazione indoor di *Haematococcus pluvialis* con luce artificiale.



(a)



(b)

Figura 1.6 Fotobioreattore di tipo anulare (a) Fotobioreattore a pannelli (b), utilizzato per la coltivazione di microalghe in sistemi chiusi “outdoor”, allestito presso la Facoltà di Agraria Università di Firenze.

1.3 Produzione di microalghe ed utilizzo della biomassa algale in vari settori industriali

La coltivazione di microalghe è diventata un'attività di grande importanza economica per la produzione di biomassa che viene impiegata per una molteplicità di scopi che vanno da quello alimentare, a quello medico, farmaceutico e cosmetico.

Le microalghe, presentano un contenuto proteico fino a 25 volte superiore a quello del latte, e possiedono elevate quantità di acidi grassi poliinsaturi (HUFA) della serie $\Omega 3$. Inoltre contengono quantità elevate di vitamine tipo A, B, C, D, E, K, oltre che di B12.

Tali proprietà ne fanno un pregevole materiale come integratore alimentare nella dieta umana ed animale. Notevoli sono anche le proprietà antiossidanti.

Nel mondo vi sono molti produttori commerciali importanti di microalghe operanti soprattutto nelle regioni asiatiche del Pacifico, la cui capacità di produzione annua può raggiungere singolarmente fino a 500 tonnellate (Lee, 1997). L'interesse per l'impiego delle microalghe in attività produttive è in rapida crescita.

Le microalghe oggi largamente coltivate ai fini commerciali comprendono: *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella*, *Nannochloropsis*, *Nitzschia*, *Cryptocodinium*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis*, *Skeletonema*, *Haemotococcus*, *Isochrysis* e *Chaetoceros*.

Gran parte della biomassa algale prodotta viene commercializzata per l'acquacoltura, o come integratore alimentare in forma di tavolette e capsule per l'elevato valore nutritivo.

Le modalità di coltivazione di tali micro-organismi risultano importanti per la loro composizione chimica, e quindi il loro valore nutritivo, varia in rapporto alle condizioni di crescita (temperatura, illuminazione, apporto di CO₂ ecc.; Ben-Amotz *et al.*, 1987); all'età della coltura, ed alla composizione del terreno di coltura (Lourenço *et al.* 1997).

In acquacoltura le microalghe vengono utilizzate, oltre che nelle avannotterie come alimento per lo zooplancton, soprattutto negli schiudatoi di molluschi, combinate in miscele più o meno diversificate, data la loro diversa composizione in proteine e acidi grassi essenziali, soprattutto quelli altamente polinsaturi (HUFA) della serie ω3, allo scopo di fornire un alimento il più completo possibile (Kanazawa *et al.*, 1979; Langdon and Waldock, 1981; Watanabe *et al.*, 1983; Kanazawa, 1985; Sargent *et al.*, 1989).

In campo cosmetico, l'elevata quantità e varietà di sostanze organiche contenute nelle cellule algali hanno un effetto depurativo e drenante per il corpo.

Inoltre il contenuto in alginati e fibre insolubili, riescono a limitare l'assorbimento intestinale di zuccheri e grassi, risultando efficaci per la dieta. L'abbondanza di minerali (quali potassio, iodio e magnesio) nelle microalghe risulta particolarmente benefica per la salute.

In campo medico le microalghe vengono saggiate come promettenti fonti di sostanze dotate di proprietà antibatteriche, antivirali, antitumorali. E' stato osservato, infatti, che le alghe marine si difendono da specifici agenti patogeni mediante la produzione di sostanze antibiotiche. L'uso delle alghe mescolate con argilla e acqua di mare calda hanno proprietà curative orientate in particolare verso

le patologie del sistema osseo. Una straordinaria fonte di produzione di biomassa sono i cianobatteri. Questi organismi si riproducono con un ritmo di crescita esponenziale elevatissimo, sono ricchissimi di acidi grassi $\Omega 3$ e $\Omega 6$ (la più alta fonte di GLA, acido γ -linolenico), di quantità di vitamine B e B₁₂, di oligominerali nella forma organica maggiormente assimilabile e di sostanze antiossidanti.

I fattori che contribuiscono ad aumentare l'interesse nei confronti della coltivazione delle microalghe quali potenziali fonti di metaboliti ad elevato valore aggiunto sono:

- l'elevata attività fotosintetica e l'adattabilità ai fattori ambientali, che determinano versatili condizioni di crescita;
- la composizione chimica delle microalghe, condizionata dal mezzo di crescita e dall'ambiente;
- la possibilità di manipolare le condizioni di coltura e modificare i prodotti algali secondo le specifiche esigenze.

Numerosi sono i fattori che possono condizionare la crescita delle alghe. Per il nostro studio ne analizzeremo sostanzialmente due: l'intensità e la qualità della luce; la temperatura.

1.4 L'intensità luminosa

La luce rappresenta la fonte primaria di energia per la crescita di tutti gli organismi fotoautotrofi. Essa è costituita dall'insieme delle radiazioni visibili dello spettro elettromagnetico con lunghezza d'onda comprese tra 380 e 750 nm, che l'occhio umano percepisce

nella gamma cromatica compresa fra il violetto ed il rosso. Essa è quindi una piccola parte dell'ampio spettro di radiazioni provenienti dal sole e costituisce la luce utile per la fotosintesi (PAR, photosynthetic Active Radiation).

L'insieme di reazioni che avvengono nella fotosintesi, richiedono la presenza di specifici *pigmenti fotosintetici*, cioè molecole in grado di assorbire la luce in una certa banda del visibile; queste sono clorofille, caroteni, xantofille, ficoeritrine, ficocianine ecc.

I pigmenti accessori e in particolare le ficoeritrine e le ficocianine, presenti nei cianobatteri e nelle alghe rosse, svolgono un ruolo di protezione dalle reazioni di foto-ossidazione, ma soprattutto di ampliamento dello spettro di assorbimento della clorofilla, captando la luce nelle bande complementari. La fotosintesi microalgale è influenzata dalla quantità e qualità della luce incidente e dalla densità cellulare delle colture (Amos Richmond *et al.*, 2000; Morita *et al.* 2001; You-Chul Jeon *et al.*, 2005).

Ad esempio colture algali di *Haematococcus pluvialis*, illuminate con luce a diverse lunghezze d'onda, utilizzano in maniera più efficiente la luce rossa e blu rispetto a quella verde (You.Chul Jeon, *et al.*, 2005). Quindi per ottimizzare la crescita delle microalghe è necessario progettare impianti efficienti che permettano di controllare le condizioni di coltura e soprattutto, di sfruttare al meglio la fonte di luce incidente. Colture con densità cellulare elevata richiedono un'intensità luminosa maggiore per ottenere il massimo dell'attività fotosintetica (P_{\max}^B), che, in ogni caso, risulta inferiore a quella che può essere raggiunta in una coltura con bassa densità cellulare, in quanto la luce è attenuata dall'elevata concentrazione dei

microorganismi che si schermano fra di loro (You-Chul Jeon *et al.*, 2005).

Le colture con un'alta densità cellulare che comporta ombreggiamento, quindi, possono essere inibite nella crescita (Amos Richmond and Ning Zou, 1999); le alghe, tuttavia, si possono foto-acclimatare sia agli alti livelli di intensità luminosa (HL, High light), che a quelli più bassi (LL, Low Light).

Le microalghe che si acclimatano ad alte intensità di luce (Grobbelaar *et al.*, 2003). tipicamente hanno:

- un alto tasso fotosintetico (P^B)
- un basso contenuto di clorofilla per unità di biomassa
- alti livelli di pigmenti ausiliari come i carotenoidi
- bassa efficienza fotosintetica
- alto valore di I_K (transizione tra fotosintesi luce dipendente e luce saturante)

D'altra parte, le microalghe che si acclimatano a basse intensità luminose (Grobbelaar *et al.*, 2003)., hanno:

- basso tasso fotosintetico (P^B)
- alto contenuto di clorofilla per unità di biomassa
- bassi livelli di pigmenti ausiliari come i carotenoidi
- alta efficienza fotosintetica
- basso valore di I_K (transizione tra fotosintesi luce dipendente e luce saturante)

1.5 La temperatura.

Formalmente, la temperatura è la proprietà che regola il trasferimento di energia termica, o calore, da un sistema ad un altro. Quando due sistemi sono alla stessa temperatura, si dice che si trovano in equilibrio termico e non avviene nessun trasferimento di calore. Quando esiste una differenza di temperatura, il calore tenderà a muoversi dal sistema a temperatura più alta verso il sistema a temperatura più bassa, fino al raggiungimento dell'equilibrio termico. Il trasferimento di calore può avvenire per conduzione, convezione o irraggiamento. La temperatura gioca una parte importante in quasi tutti i campi di cui si occupa la scienza, ivi inclusi, fisica, chimica e biologia. La temperatura è correlata alla quantità di energia termica o calore di un sistema. Se viene aggiunto calore la temperatura sale, similmente un decremento di temperatura corrisponde a una perdita di calore del sistema. Su piccola scala, questo calore corrisponde al movimento casuale degli atomi e delle molecole del sistema. Quindi un incremento di temperatura corrisponde a un incremento del movimento degli atomi del sistema. Molte proprietà fisiche dei materiali, inclusi lo stato (gassoso, liquido, solido), la densità, la solubilità, la pressione del vapore e la conduttività elettrica dipendono dalla temperatura. La temperatura gioca inoltre un ruolo importante nel determinare la velocità e l'estensione con cui avvengono le reazioni chimiche.

La dipendenza della velocità di una reazione chimica dalla temperatura è descritta dalla seguente equazione (1):

$$K = k(K_B/h) e^{-\Delta G^*/RT}$$

dove: K è la costante di velocità; k è il coefficiente di trasmissione, K_B è la costante di Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ kJ}^{-1}$), h è la costante di Plank ($6,63 \cdot 10^{-34} \text{ Js}^{-1}$); ΔG° è l'energia libera di attivazione; R è la costante dei gas ($8,31 \text{ kJ}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) e T è la temperatura assoluta ($^{\circ}\text{K}$).

In base a tale equazione, quindi, diminuendo la temperatura, diminuisce esponenzialmente anche la velocità di reazione.

Da un punto di vista ecologico essa rappresenta uno dei principali fattori climatici che esercita un'azione incisiva sulle caratteristiche degli ecosistemi e condiziona sensibilmente l'attività metabolica e lo sviluppo degli organismi viventi.

L'influenza della temperatura sui fenomeni vitali è dovuta in primo luogo ai suoi effetti sulle proprietà chimico-fisiche dell'acqua, che è il principale componente dei sistemi biologici. Al di sotto di 0°C , la cristallizzazione dell'acqua in ghiaccio comporta un aumento di volume che determina la rottura delle membrane biologiche e quindi la morte cellulare. La temperatura influenza la cinetica delle reazioni chimiche, poiché ad ogni incremento di 10°C di temperatura si ha un aumento di circa il doppio della velocità di reazione.

CAPITOLO SECONDO

Scopo della tesi

La coltivazione di massa di microalghe in ambienti controllati rientra nelle attività di produzione di biomassa vegetale acquatica utile per scopi industriali, e per l'estrazione di molecole utili in campo medico, farmaceutico e cosmetico.

I protocolli per la coltivazione di alghe unicellulari sono numerosi e si diversificano tra di loro per il volume degli impianti di produzione (piccoli o grandi volumi) e per la loro tipologia, per i parametri chimico fisici quali luce, temperatura e pH, a seconda dell'alga coltivata, e per la composizione dei terreni di coltura. L'obiettivo della gestione di una coltura è quello di ottenere la massima resa con il migliore rapporto costi/benefici.

La nostra ricerca è perciò mirata ad individuare ed ottimizzare le tecniche di coltivazione di alghe unicellulari dei generi *Chlorella sorokiniana* e *Tetraselmis suecica*, già note per il loro impiego in acquacoltura, individuandone i parametri ottimali di crescita in colture di laboratorio, per poi procedere, in base ai risultati ottenuti, al loro allevamento con tecniche di coltivazione outdoor, con la possibilità di utilizzare la luce solare come fonte di energia, e quindi di ridurre i costi di produzione.

Oltre ai ceppi algali su indicati già noti per il loro impiego in acquacoltura ed in altri settori produttivi, è stato anche studiato in colture di laboratorio un nuovo ceppo algale, l'alga psicrofila *Koliella antarctica*, isolata nel mar di Ross in Antartide, per individuare le sue esigenze di crescita e per stabilire le caratteristiche di fotosintesi e respirazione che tale alga presenta. L'impiego di quest'alga che vive in Antartide potrebbe essere importante ai fini industriali, date le caratteristiche degli organismi psicrofili di possedere speciali sostanze utili per il loro adattamento

alle condizioni di basse temperature, quali presenza di acidi grassi insaturi, che potrebbero rivelarsi utili nel campo delle biotecnologie. Il loro impiego, inoltre, potrebbe consentire la produzione di biomassa algale anche nei periodi invernali con tecniche di coltivazione outdoor, inadatti per le microalghe mesofile.

Nello stesso tempo, le nostre ricerche potrebbero fornire anche informazioni utili sui processi fisiologici delle alghe unicellulari psicrofile, che hanno consentito loro di adattarsi a crescere e svilupparsi alle basse temperature nelle aree polari, dove costituiscono la principale, se non l'unica, biomassa vegetale responsabile della produttività primaria, e quindi del mantenimento della vita nelle sue varie forme, in tali ambienti. Nello stesso tempo abbiamo effettuato osservazioni sull'alga *C. sorokiniana* per sottolineare meglio le differenze, fra l'alga psicrofila e quest'alga mesofila, che permettono alle alghe psicrofile di adattarsi alle condizioni di basse temperatura.

L'alga mesofila *C. sorokiniana* e l'alga psicrofila *K. antarctica*, sono state coltivate in laboratorio per valutare come la loro velocità di crescita, fotosintesi e respirazione variava in funzione dell'intensità luminosa e della temperatura, e per stabilire il significato fisiologico del fatto che in *K. antarctica* la fotosintesi presenta una temperatura massima superiore a quella della crescita, mentre in *C. sorokiniana* la crescita e la fotosintesi hanno lo stesso optimum di temperatura. Scopo della ricerca è stato anche di valutare la crescita di *C. sorokiniana* e *T. suecica* in colture outdoor, e di analizzare la dipendenza dalla temperatura delle attività fotosintetica e respiratoria di questo tipo di alghe per confrontarle con quelle delle alghe allevate con tecniche indoor.

CAPITOLO TERZO

Materiali e metodi

3.1 Organismi algali e condizioni di coltura indoor ed outdoor.

Gli organismi algali utilizzati per gli esperimenti condotti erano:

1) la microalga psicrofila *Koliella antarctica*, (SAG, Sammlung Von Algenkulturen, Università di Göttingen 2030), ceppo isolato da campioni di acqua marina prelevati nel Mare di Ross (Baia di Terra Nova, Antartide) a 3 metri di profondità ed alla temperatura di -1.5 °C (Andreoli *et al.*, 1998) durante l'estate australiana 1989-1990;

2) l'alga verde unicellulare *Chlorella sorokiniana* (Shihira and Krauss, ceppo 211/8K, appartenente all'ordine delle Chlorophyta e alla famiglia delle Chlorophyceae, proveniente da Culture Collection of Algae and Protozoa, Università di Cambridge.

3) l'alga verde *Tetraselmis suecica* proveniente dalla collezione di microalghe della Stazione Zoologica Anthon Dohrn, Napoli, cod. rif. FE 205.

3.2 Caratteristiche morfologiche dei ceppi algali studiati.

Le cellule di *K. antarctica* (Fig. 3.1) di forma cilindrica (circa 5 µm di lunghezza) si trovano singole o assemblate in corte catene facilmente dissociabili. Esse si riproducono vegetativamente tramite frammentazione con produzione di pseudofilamenti composti da due o quattro cellule. *K. antarctica* è caratterizzata da una parete non mucillaginosa e da un cloroplasto mancante di pirenoide.

La presenza delle clorofille *a* e *b* conferma che essa è una *Chlorophyta* (Andreoli *et al.*, 1998).

L'alga mesofila *C. sorokiniana* (Fig. 3.2) possiede un unico cloroplasto a forma di coppa, con o senza pirenoidi, un mitocondrio ed un piccolo nucleo. I pigmenti contenuti nei cloroplasti sono le clorofille *a* e *b*, gli α - e β -caroteni e le xantofille. Ogni cellula di tale alga mesofila si divide due o tre volte tramite mitosi, producendo da quattro a otto cellule immobili che per rottura della parete cellulare, fuoriescono e danno vita ad un nuovo ciclo.

L'alga mesofila *T. suecica* (Fig. 3.3) è un'alga di dimensioni di 10-15 micron, caratterizzata da quattro flagelli e corpo ricoperto da teca costituita da strutture simili a scaglie. Sono caratterizzate da un colore verde e hanno un unico cloroplasto contenente clorofilla *a* e *b* e carotenoidi; le riserve sono costituite da amido.

4

C. ANDREOLI *et al.*

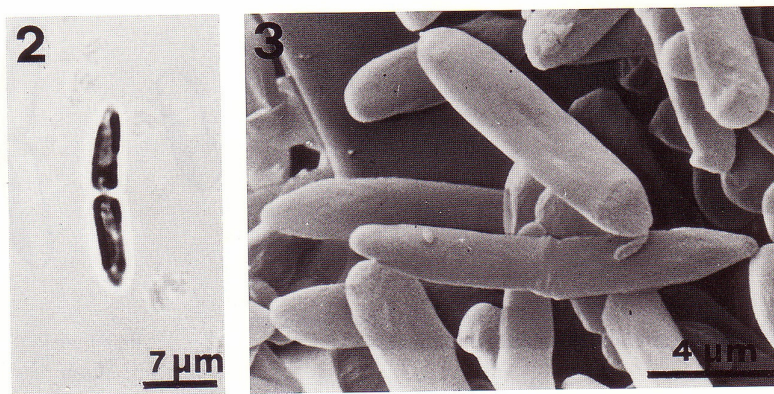


Figura 3.1 L'immagine di *K. antarctica* al microscopio ottico ed al microscopio elettronico a scansione (Andreoli *et al.*, 1998).

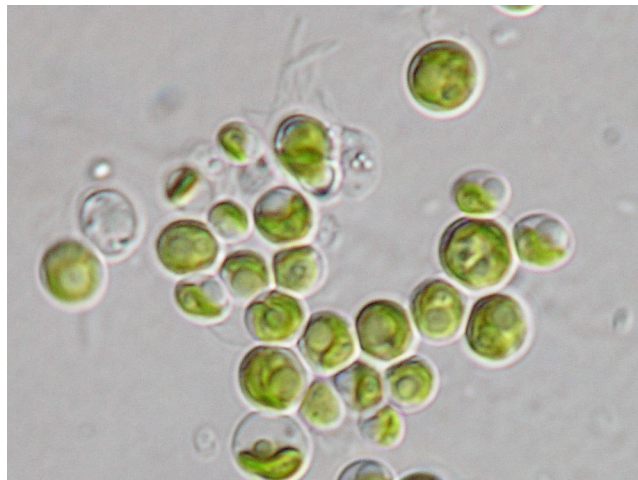


Figura 3.2 Immagine di *Chlorella sorokiniana* al microscopio ottico.



Figura 3.3 Immagine di *Tetraselmis suecica* al microscopio ottico.

3.3 Crescita indoor

Koliella antarctica, l'alga psicrofila, veniva coltivata in batch (Fig. 3.4) alla temperatura di 6 ± 0.1 °C. La coltura veniva continuamente illuminata con lampada fluorescente (Philips TLD 30W/55), ad una intensità luminosa di $120 \mu\text{mol}$ di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ed era costantemente insufflata con aria contenente il 5 % di CO_2 .



Figura 3.4 Coltura di *K. antarctica* in fotobioreattore “indoor”.
Temperatura 6°C, intensità luminosa $120 \mu\text{mol}$ fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

C. sorokiniana veniva cresciuta in batch a 35 °C (Fig 3.5) (Rigano *et al.*, 1993). Nella coltura, sottoposta ad un'illuminazione continua ($250 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$), veniva insufflata aria contenente il 5 % di CO₂ con una velocità di flusso pari a 80-100 l h⁻¹.

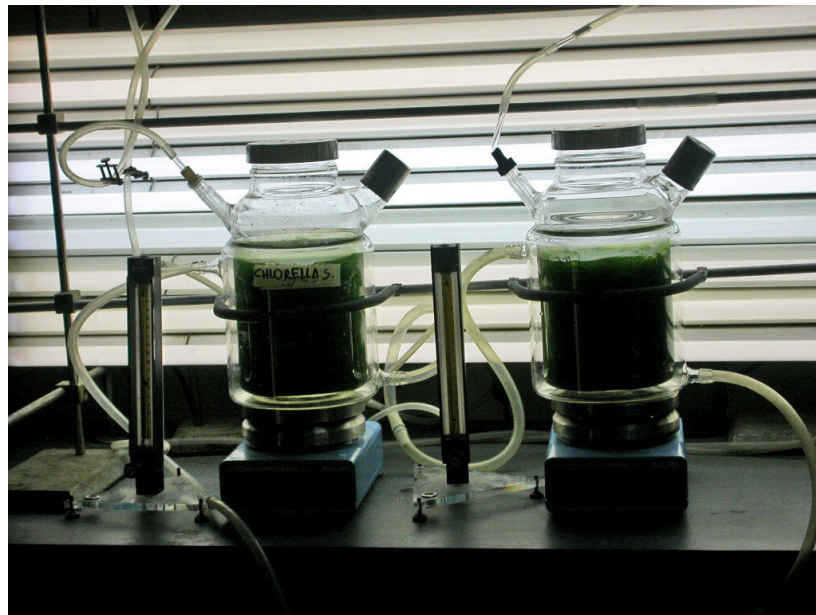


Figura 3.5 Coltura *in batch* di *C. sorokiniana*.

Le colture algali venivano termostatate mediante l'impiego di un Frigomix (U plus Thermomix UB, Braun).

Il terreno base (pH 6,5) utilizzato per la crescita dei due ceppi algali aveva la seguente composizione:

0.30 gr KH_2PO_4 ,

0.18 gr K_2HPO_4 ,

0.10 gr NaCl,

0.02 gr CaCl_2 ,

0.30 gr MgSO_4 ,

0.003 gr FeSO_4 ,

1 L di H_2O distillata e tracce di oligoelementi quali Mn, B, Zn, Cu e Mo. La sorgente di azoto in tutte e due le colture era fornita come KNO_3 alla concentrazione finale di 5 mM.

T. suecica veniva cresciuta in batch a 25 °C con un'illuminazione continua di 250 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nella coltura veniva insufflata aria contenente il 5 % di CO_2 con una velocità di flusso pari a 80-100 l h^{-1} . Il terreno di base (Artificial seawater medium), utilizzato per la crescita del ceppo algale aveva la seguente composizione:

10 ml di una soluzione di MgSO_4 24.4 gr/100ml

10 ml di una soluzione di KCl 6 gr/100 ml

10 ml di una soluzione di NaNO_3 10 gr /100 ml

10 ml di una soluzione $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3 gr/100 ml

10 ml di una soluzione di KH_2PO_4 , 0.5 gr/100 ml

10 ml di una soluzione Tris Buffer (Sigma Co.)

3 ml di una soluzione chelante di FeSO_4 ,

10 ml di una soluzione di oligoelementi quali Mn, B, Zn, Cu e Mo.

Da aggiungere a 926 ml di acqua distillata e portare a volume per aggiustare il pH intorno a 8,1. La sorgente di azoto nella coltura era fornita come KNO_3 alla concentrazione finale di 5 mM.

3.4 Colture “outdoor”

C. sorokiniana, *T. suecica* e *K. antarctica* venivano cresciute outdoor in cilindri di coltura del volume di 4 litri.

Le colture, non erano sottoposte a luce artificiale continua, ma al ciclo giornaliero di luce, che poteva variare come durata, a seconda del mese, o come intensità da un massimo di oltre 2000 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nei periodi di pieno sole, a meno di 100 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nei periodi di copertura nuvolosa, nell’arco della stessa giornata. *K. antarctica* veniva coltivata all’esterno nel mese di marzo 2006. *C. sorokiniana* e *T. suecica* venivano coltivate nei mesi da aprile a luglio 2006. Per evitare fenomeni di “bleaching”, le colture di *C. sorokiniana*, nei periodi di maggiore insolazione venivano schermate con teli ombreggianti fino ad ottenere l’abbattimento dell’intensità della luce incidente a non più di 200-400 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Le colture venivano insufflate con aria contenente il 5 % di CO_2 con una velocità di flusso pari a 80-100 l h^{-1} .

Le colture algali erano soggette alle fluttuazioni giornaliere della temperatura, che misurate all’interno della coltura nelle ore diurne, variavano nel mese di marzo ed aprile fra 8 e 27 °C, e nel mese di luglio tra 30 e 42 °C.

I terreni base utilizzati per la crescita di *C. sorokiniana* e *K. antarctica*, e quello utilizzato per *T. suecica*, erano gli stessi di quelli impiegati per le colture indoor (terreno Bristol a pH 6,5 e terreno di base , Artificial seawater medium, a pH 8,1, rispettivamente).

3.5 Misure di crescita.

Lo sviluppo cellulare dell'alga psicrofila *K. antarctica* coltivata indoor veniva misurato a 5, 10, 15 e 20 °C; quello di *C. sorokiniana* coltivata indoor a 20, 25, 30 e 35 °C, e quello di *T. suecica* indoor a 25°C. Nelle colture outdoor veniva valutato lo sviluppo cellulare in funzione delle temperature caratteristiche del mese indicato, e delle variazioni che esse subivano nell'arco della stessa giornata. La crescita delle tre alghe in funzione del tempo, veniva misurata leggendo la variazione di densità ottica (OD) a 530 nm. L'equazione per determinare la velocità di crescita (μ), espressa su base giornaliera, day^{-1} (d^{-1}), era la seguente:

$$\frac{\log (OD_t/OD_0)}{\Delta t}$$

dove OD_0 rappresentava la densità ottica iniziale, OD_t la densità ottica finale e Δt l'intervallo di tempo trascorso tra le misure sperimentali.

3.6 Velocità di fotosintesi in funzione della temperatura e dell'intensità luminosa, e velocità di respirazione in funzione della temperatura.

Per le misure di velocità di fotosintesi e di respirazione venivano utilizzate cellule di *K. antarctica* e di *C. sorokiniana* raccolte, tramite centrifugazione (4 000 g * 5 minuti), durante la fase esponenziale di crescita.

Le cellule venivano risospese nel terreno nutritivo alla concentrazione finale di 10 µg Chl ml⁻¹ e dunque poste in bottiglie BOD (Biochemical Oxygen Demand).

Le parti per milione di ossigeno venivano misurate tramite un elettrodo per Ossigeno (Orion 97-08) connesso ad uno ionalizzatore EA 920. Le cellule, coltivate indoor, dell'alga psicrofila *K antarctica* utilizzate per gli esperimenti venivano coltivate a 10 °C, quelle di *C. sorokiniana* a 35 °C.

Per prevenire la limitazione di carbonio, durante le misure sperimentali di fotosintesi, veniva aggiunto NaHCO₃ alla concentrazione finale di 10 mM. Le misure di fotosintesi iniziavano con l'accensione di una lampada ad incandescenza (Philips Comptalux 300W 13736 E/44), a varie intensità luminose comprese fra 30 e 1900 µmol di fotoni m⁻² s⁻¹; le misure delle velocità di respirazione avvenivano oscurando la bottiglia BOD con un foglio di carta d'alluminio; se necessario, la sospensione algale veniva

insufflata con N₂ in modo da ridurre la concentrazione di ossigeno disciolto se troppo elevata.

Le velocità di fotosintesi e di respirazione erano espresse come $\mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl h}^{-1}$; la velocità di fotosintesi lorda era ottenuta sommando la velocità di fotosintesi netta e la velocità di respirazione. I valori apparenti di Energia di Attivazione (E_a) e di Q_{10} (fattore che indica il cambiamento di velocità di un processo per variazione di temperatura di 10 °C) venivano stimati riportando i log delle velocità in funzione del reciproco della temperatura assoluta, secondo plot d'Arrhenius.

L'attività fotosintetica veniva valutata per *C.sorokiniana* nel range di temperatura tra i 15-40 °C e per *K. antarctica* nel range 5-25° C.

La relazione tra luce e fotosintesi veniva descritta da una curva di saturazione (Geiger and Osborne, 1992).

I parametri funzionali analizzati che descrivevano la curva luce-fotosintesi (curva P^B-I) erano:

- **P^B** la velocità di fotosintesi per unità di clorofilla totale ($\mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl h}^{-1}$).
- **P^B_{max}** la massima velocità di fotosintesi;
- **I_{opt}** il flusso di densità fotonica ottimale per ottenere la massima velocità di fotosintesi;
- **α** pendenza della curva nella porzione lineare che precede l'inizio della saturazione luminosa. Essa è definita dal rapporto tra **P^B_{max}** e **I_k** ;
- **I_k** la densità del flusso di fotoni che indica l'inizio della fotosintesi saturata dalla luce.

In seguito a tali definizioni la P_{\max}^B veniva considerata il limite fotosintetico delle reazioni indipendenti dalla luce, α il limite delle reazioni dipendenti dalla luce e I_k un indice dell'acclimatazione della specie a differenti livelli di luce.

3.7 Misura di clorofilla totale

Il contenuto di clorofilla totale nelle due alghe era determinato centrifugando a 4 000 g * 5 minuti una piccola aliquota di sospensione algale e risospendendo il precipitato in *N-N* dimetilformamide a 4 °C per 24 ore. Le letture di assorbanza venivano effettuate a 664 nm e a 647 nm (Inskeep and Bloom, 1985).

3.8 Analisi statistica

I valori mostrati sono la media di tre determinazioni \pm l'errore standard. Per alcune rette di regressione si sono riportati i valori r^2 e P ($<0,001$), determinati con il programma Sigmaplot versione n° 8.

CAPITOLO QUARTO

Risultati

4.1 Crescita di Koliella antarctica e Chlorella sorokiniana in colture indoor. Effetti della temperatura.

Koliella antarctica

L'alga psicrofila *Koliella antarctica* esibiva una velocità di crescita (μ) espressa in d^{-1} , di $0,12 d^{-1}$ a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, e di $0,30 d^{-1}$ sia a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ che a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, mentre non mostrava alcuno sviluppo cellulare a temperature superiori a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Tab. 4.1). Con i dati ottenuti non era possibile calcolare il Q_{10} della velocità di crescita dell' alga psicrofila.

Chlorella sorokiniana

L'alga mesofila *C. sorokiniana* non era capace di svilupparsi a temperature inferiori a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, e presentava a tale temperatura una velocità di crescita (μ) pari a $1,04 d^{-1}$. La velocità di crescita di *C. sorokiniana* aumentava notevolmente con l'aumentare della temperatura, raggiungendo il valore di μ di $2,45 d^{-1}$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, di $2,88 d^{-1}$ a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, e di $3,18 d^{-1}$ a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Tab. 4.1). Con i dati ottenuti era possibile calcolare che il valore di Q_{10} della velocità di crescita di *C. sorokiniana* nell'intervallo $25\text{-}35\text{ }^{\circ}\text{C}$ era pari a $1,3$ ($r^2 = 0,99$, $P < 0,001$).

4.2 Crescita di Tetraselmis suecica

La crescita di *Tetraselmis suecica* coltivata indoor alla temperatura di $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, mostrava un andamento esponenziale al variare del tempo, presentando una velocità di crescita (μ) pari a $0,39 d^{-1}$.

La velocità di crescita non veniva saggiata ad altra temperatura.

Tabella 4.1

Velocità di crescita (μ) dell' alga psicrofila *K. antarctica* e dell'alga mesofila *C. sorokiniana* a diverse temperature. La crescita veniva misurata come variazione di densità ottica (530 nm).

T(° C)	μ (d ⁻¹)	
	<i>K. antarctica</i>	<i>C. sorokiniana</i>
5	0,12	n.d
10	0,30	n.d
15	0,30	∞
20	∞	1,04
25	n.d	2,45
30	n.d	2,88
35	n.d	3,18

n.d. = non determinato

4.3 Velocità di fotosintesi. Effetto dell'intensità luminosa e della temperatura.

Le velocità di fotosintesi (P^B) delle due alghe, *C. sorokiniana* e *K. antarctica*, espresse come $\mu\text{mol O}_2$ liberato mg^{-1} Chl h^{-1} , venivano determinate alle temperature di 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C per la prima alga, e di 5, 10, 15, 20 e 25 °C per la seconda, a diverse intensità luminose comprese fra 30 e 1900 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Per le misure venivano utilizzate cellule di *K. antarctica* coltivate a 10°C e cellule di *C. sorokiniana* coltivate a 35 °C, prelevate durante la fase esponenziale di crescita.

Sia in *C. sorokiniana* (Tab. 4.2 e Fig. 4.1) che in *K. antarctica* (Tab. 4.2 e Fig. 4.2) si notava un generale incremento della velocità di fotosintesi in funzione della temperatura e della densità del flusso fotonico. Il massimo della velocità di fotosintesi veniva raggiunto all'intensità luminosa di 1900 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ed alla temperatura di 35°C nella prima alga, ed all'intensità luminosa di 840 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ed alla temperatura di 25°C nella seconda (Tab. 4.2).

Tabella 4.2

Attività fotosintetiche di *K. antarctica* e di *C. sorokiniana* misurate a diverse intensità luminose a diverse temperature comprese nell'intervallo 5-40°C.

Attività fotosintetica (P ^B)**									
Specie	Intensità luminosa*	Temperatura							
		5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
<i>K. antarctica</i>	30	38,30	41,20	54,70	44,10	57,20			
	50	51,90	58,20	68,70	63,10	71,80			
	110	56,90	75,20	88,30	92,10	122,80			
	420	55,90	80,70	108,70	142,70	173,30			
	840	45,90	72,70	103,10	157,30	187,05			
	1200	45,90	63,70	102,50	153,30	153,40			
	1900	48,50	54,20	95,70	137,70	120,80			
<i>C. sorokiniana</i>	30			29,27	25,69	33,46	31,67	23,49	13,58
	50			36,22	39,30	51,09	42,09	43,30	29,55
	110			44,55	59,76	66,09	83,76	88,09	63,23
	420			35,18	58,05	88,83	188,52	193,30	163,92
	840			29,45	61,15	98,39	189,77	234,97	255,96
	1200			14,69	65,13	107,90	187,18	231,45	214,26
	1900				58,19	116,79	210,70	259,27	215,14

* intensità luminosa espressa come $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

** attività fotosintetica espressa come $\mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl h}^{-1}$

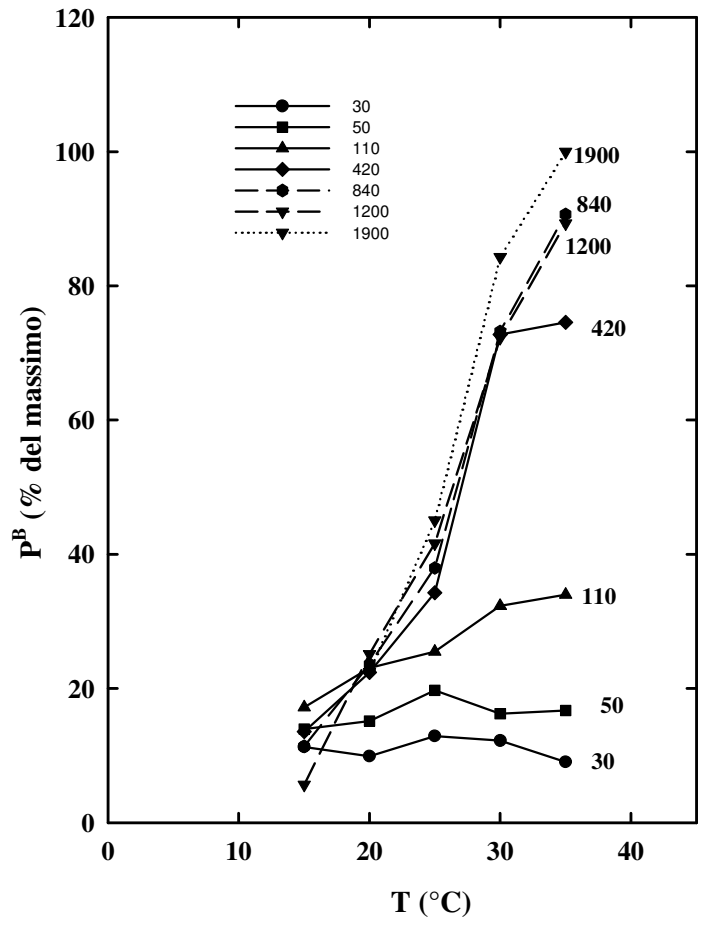


Figura 4.1 Velocità di fotosintesi (P^B) di *C. sorokiniana*, espressa come % del valore massimo, in funzione della temperatura valutata a diverse intensità luminose comprese fra 30 e 1900 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$. I numeri rappresentati accanto alle linee indicano le varie intensità luminose.

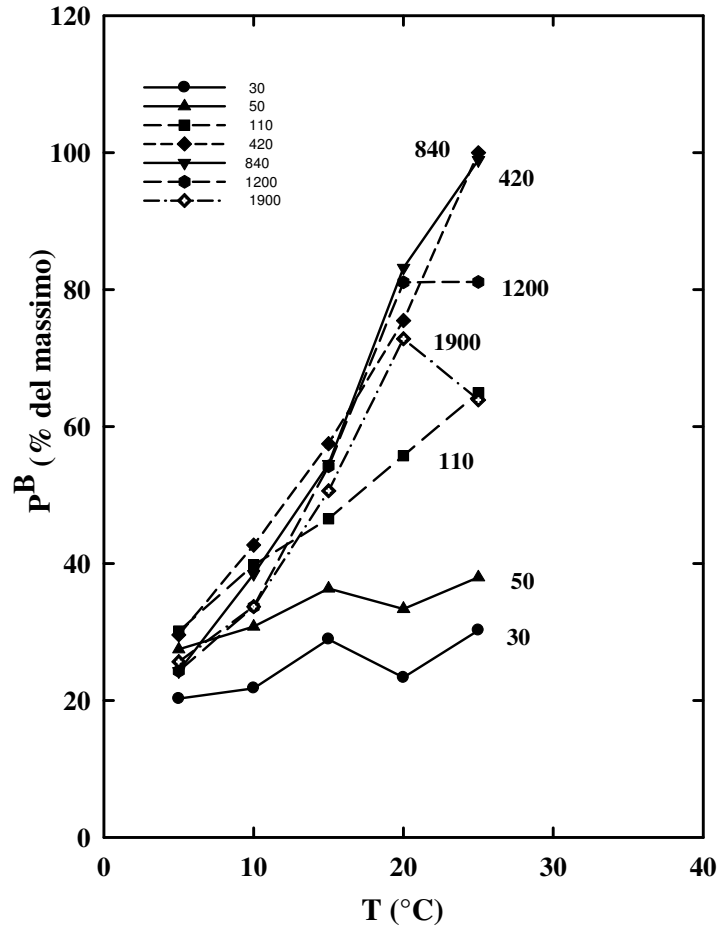


Figura 4.2 Velocità di fotosintesi (P^B) di *K. antarctica.*, espressa come % del valore massimo, in funzione della temperatura valutata a diverse intensità luminose comprese fra 30 e 1900 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$. I numeri rappresentati accanto alle linee indicano le varie intensità luminose .

4.4 Velocità di fotosintesi normalizzata sulla biomassa (P^B) in funzione della densità di flusso fotonico (I).

La velocità di fotosintesi normalizzata sulla biomassa (P^B) in funzione della densità di flusso fotonico (I) è descritta dai seguenti parametri funzionali: P^B_{\max} , la massima velocità di fotosintesi normalizzata sulla biomassa; I_{opt} , flusso di densità fotonica ottimale alla quale si ottiene la massima velocità di fotosintesi; α , “slope” della porzione lineare della curva definita dal rapporto tra P^B_{\max} e I_k ; I_k , densità del flusso di fotoni prossima all’inizio della fotosintesi saturata da luce. La P^B_{\max} viene considerata, in genere, il limite fotosintetico delle reazioni indipendenti dalla luce, α il limite delle reazioni dipendenti dalla luce, e I_k un indice dell’acclimatazione della specie a differenti livelli di luce.

Le curve P^B - I sviluppate per *K. antarctica* alle temperature di 5, 10, 15, 20 e 25°C sono rappresentate nella figura 4.3., e quelle sviluppate per *C. sorokiniana* alle temperature di 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C nella figura 4.4. In ambedue i casi le rispettive curve P^B - I possono essere descritte da funzioni iperboliche per tutte le temperature considerate, tranne che alla temperatura di 40°C in *C. sorokiniana*, e di 25°C in *K. antarctica* alle quali si verificavano fenomeni di fotoinibizione. Tale fenomeno di fotoinibizione si osservava in *C. sorokiniana* anche alla temperatura di 15°C.

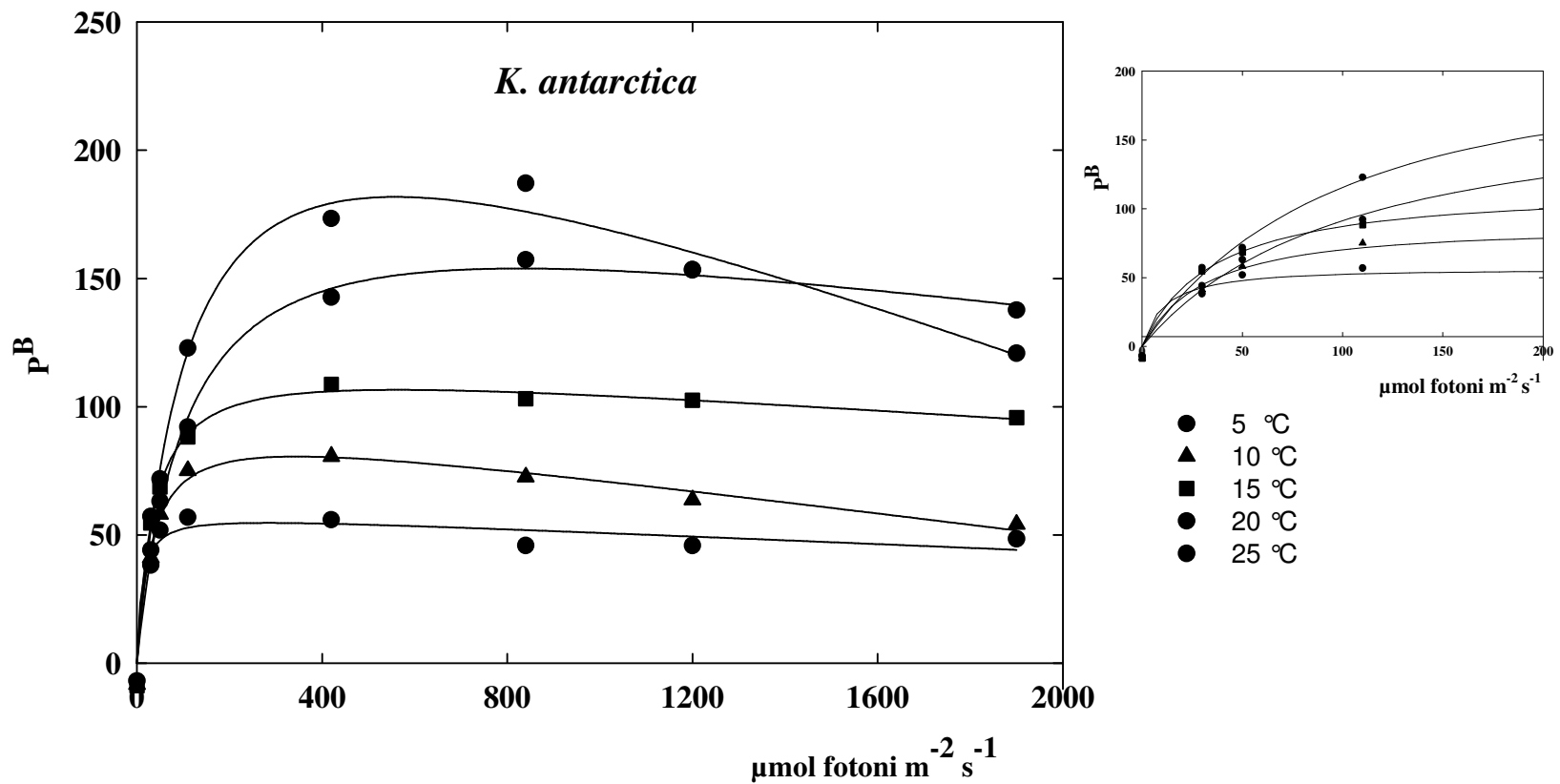


Figura 4.3 Curve P^B - I. Effetto dell'intensità luminosa sulla velocità di fotosintesi di *K. antarctica* a 5 differenti temperature. Le cellule utilizzate per le analisi erano allevate a 10°C e 120 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

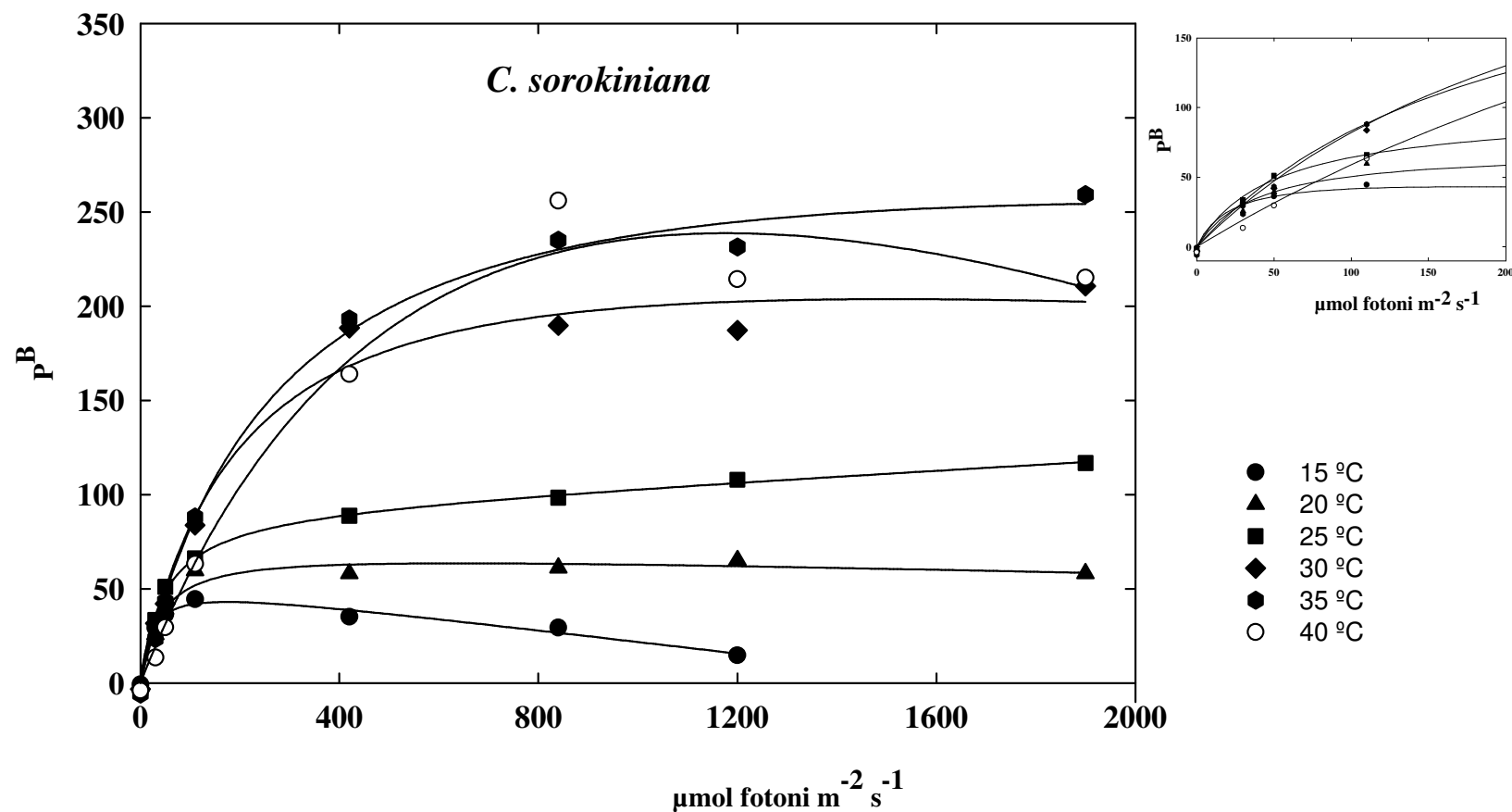


Figura 4.4 Curve P^B - I. Effetto dell'intensità luminosa sulla velocità di fotosintesi di *C. sorokiniana* a 5 differenti temperature. Le cellule utilizzate per le analisi erano cresciute a 35°C e 250 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

P_{\max}^B

Dai dati ottenuti nei nostri esperimenti risultava che i valori apparenti di P_{\max}^B aumentavano in entrambe le alghe in modo significativo con l'aumentare della temperatura (Fig. 4.5a). In particolare, il valore più elevato di P_{\max}^B si aveva a 35°C nell'alga mesofila *C. sorokiniana* ed alla temperatura di 25°C nell'alga psicrofila *K. antarctica* (Tab. 4.3). Da notare, però, come tale valore fosse nella seconda alga più basso del 22% rispetto alla prima. Alla temperatura di 15°C, tuttavia, che risultava adatta per la crescita di *K. antarctica* ma troppo bassa per consentire la crescita di *C. sorokiniana*, il valore della P_{\max}^B era nella prima alga, psicrofila, del 40% più elevata rispetto alla seconda alga mesofila.

Dai valori di P_{\max}^B calcolati ad ogni temperatura nell'intervallo 5-25 °C per *K. antarctica*, e nell'intervallo 15-35°C per *C. sorokiniana*, venivano costruiti i due plot di Arrhenius rappresentati nella Fig 4.5b. Dalla regressione lineare si poteva calcolare che il valore apparente di Q_{10} per la velocità di fotosintesi era di 2,8 ($r^2=0,98$) per *C. sorokiniana*, e di 1,85 ($r^2=0,99$) per *K. antarctica* (Tab. 4.4), più basso quindi del 34%.

Tabella 4.3.

Parametri funzionali delle curve P^B-I di *C. sorokiniana* e di *K. antarctica* valutati per ogni temperatura.

<i>Chlorella sorokiniana</i>						<i>Koliella antarctica</i>					
T(°C)	μ(day-1)	¹ P _B ^{max}	³ I _{opt}	³ I _K	² α	T(°C)	μ(day-1)	¹ P _B ^{max}	³ I _{opt}	³ I _K	² α
5	-	-	-	-	-	5	0,12	55	200	9,46	1,61
10	-	-	-	-	-	10	0,3	82,43	256,7	23,07	0,99
15	-	41,67	109,5	23,8	0,48	15	0.30	106,67	388,56	34,78	0,85
20	1,04	63,33	350	34,6	0,51	20	-	155,17	772,97	81,82	0,53
25	2,45	118,18	850	85,7	0,38	25	-	181,48	481,82	66,7	0,76
30	2,88	201,78	1226	133,3	0,42	30	-	-	-	-	-
35	3,18	252,17	1860	190	0,37	35	-	-	-	-	-
40	n.d.	241,3	1090,9	245,45	0,27	40	-	-	-	-	-

1 - P_B^{max} è espressa come μmol O₂ liberato mg⁻¹Chl h⁻¹

2 - α è espressa come [P_B^{max} (μmol O₂ liberato mg⁻¹Chl s⁻¹) * I_K⁻¹ (μmol fotoni m⁻² s⁻¹)] * 10³

3- I_{opt} e I_K è espressa come μmol fotoni m⁻² s⁻¹

(-) non determinato

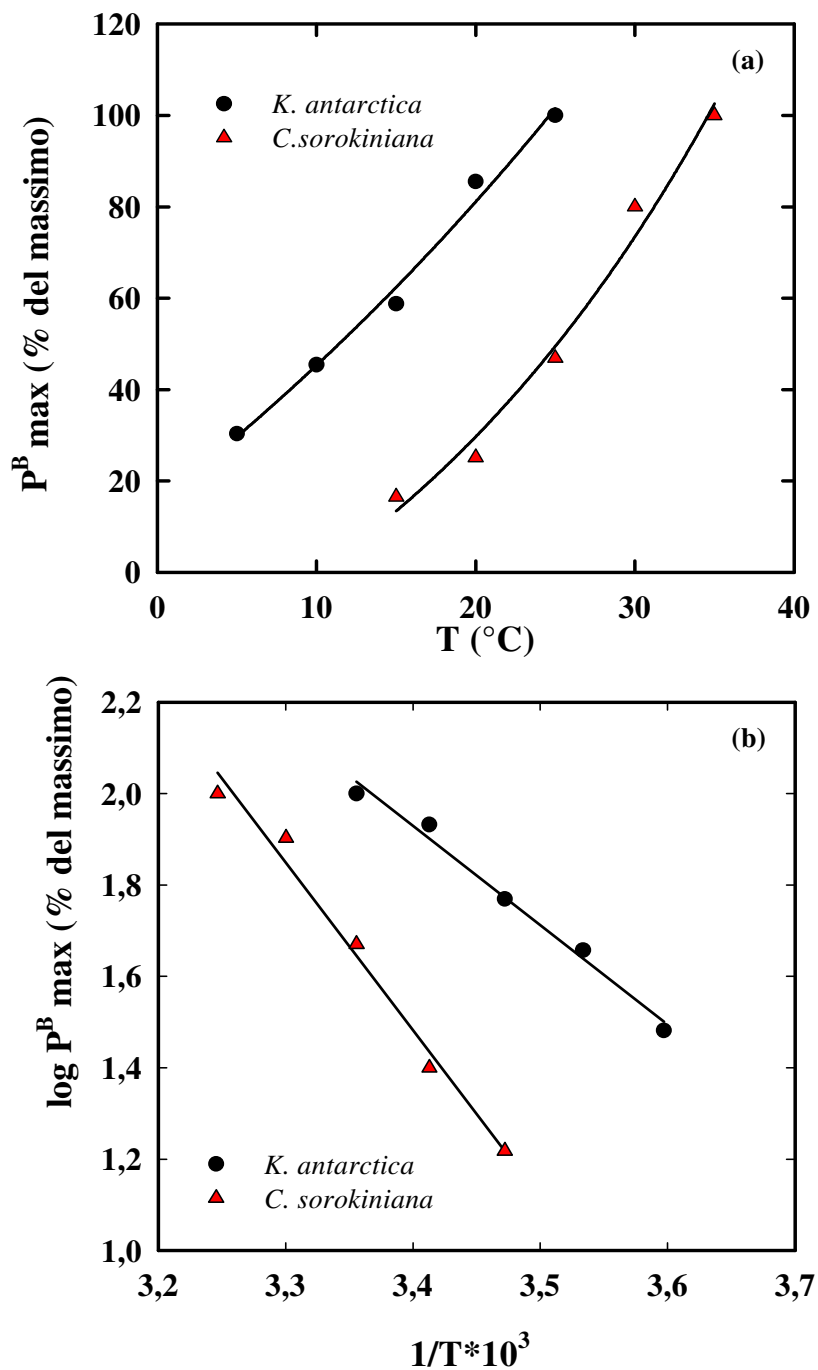


Figura 4.5 Velocità di P^B_{max} (% del massimo) di *K. antarctica* determinata nell'intervallo 5-25 °C e di *C. sorokiniana* nell'intervallo 15-40 °C (a). Plot d'Arrhenius costruito con i log dei valori di velocità P^B_{max} in funzione del reciproco della temperatura assoluta dell'alga *K. antarctica* e di *C. sorokiniana* (b). La velocità di P^B_{max} riportata è la somma tra la velocità di evoluzione di ossigeno e la velocità di consumo di ossigeno.

I_{opt}

I_{opt} aumentava con l'incremento della temperatura in ambedue le alghe (Tab. 4.3), ed era pari a 1860 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in *C. sorokiniana* a 35°C e pari a 772,97 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in *K. antarctica* a 20°C.

I_k

I valori di I_k in ambedue le specie mostravano la caratteristica comune di aumentare con l'incremento della temperatura (Tab. 4.3, Fig. 4.6a). Il maggiore incremento di I_k avveniva fra 30 e 35° C, in *C. sorokiniana*, ed avveniva fra 15 e 20 °C nella psicrofila *K. antarctica*. Da notare che 35°C era la temperatura ottimale per la crescita della prima alga, mentre 15°C era la temperatura ottimale per la crescita di *K. antarctica*. Anche per quanto riguarda il parametro I_k , quindi, in *C. sorokiniana* il valore massimo si trovava alla temperatura ottimale di crescita, 35°C, mentre in *K. antarctica* si trovava alla temperatura più elevata rispetto a quella ottimale per la crescita. Da notare, tuttavia, che il valore massimo di I_k calcolato in *K. antarctica* a 20°C, 81,82 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, corrispondeva al 33% del valore massimo calcolato a 40°C in *C. sorokiniana*, che risultava pari a 245,45 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. I valori di I_k calcolati ad ogni temperatura nell'intervallo di temperatura 15-40 °C per *C. sorokiniana* e 5-20°C per *K. antarctica* venivano rappresentati secondo il modo di Arrhenius (Fig 4.6b).

Dalle rette ottenute si poteva calcolare che il valore apparente di Q_{10} era di 4.16 per *K. antarctica* ($r^2=0,98$) ed era di 2.9 ($r^2=0,97$) per *C. sorokiniana* (Tab. 4.4). Questo parametro funzionale, quindi, cresceva con la temperatura più rapidamente in *K. antarctica* rispetto a *C. sorokiniana*, contrariamente a tutti gli altri processi studiati, che presentano valori di Q_{10} più bassi nell'alga psicrofila rispetto alla mesofila.

α

I valori di α alle varie temperature per le due alghe studiate sono riportate nella Tabella 4.3. In ambedue le specie si notava un generale decremento dei valori di α all'aumentare della temperatura, ma con andamenti diversi. In *C. sorokiniana*, infatti, la diminuzione era meno evidente ed avveniva principalmente nel passaggio della temperatura da 20°C, al disotto della quale i valori oscillavano fra 0,48 e 0,51, a 25°C, oltre la quale i valori oscillavano fra 0,37 e 0,42. In *K. antarctica*, invece, il decremento dei valori di α era progressivo in tutto l'intervallo di temperatura considerato, passando da 1,61 a 5°C a 0,53 a 20°C. Comparando i valori di α fra le due specie ad ogni temperatura, si osserva come in *C. sorokiniana* tali valori fossero sempre significativamente ($P < 0.001$) più bassi che in *K. antarctica*.

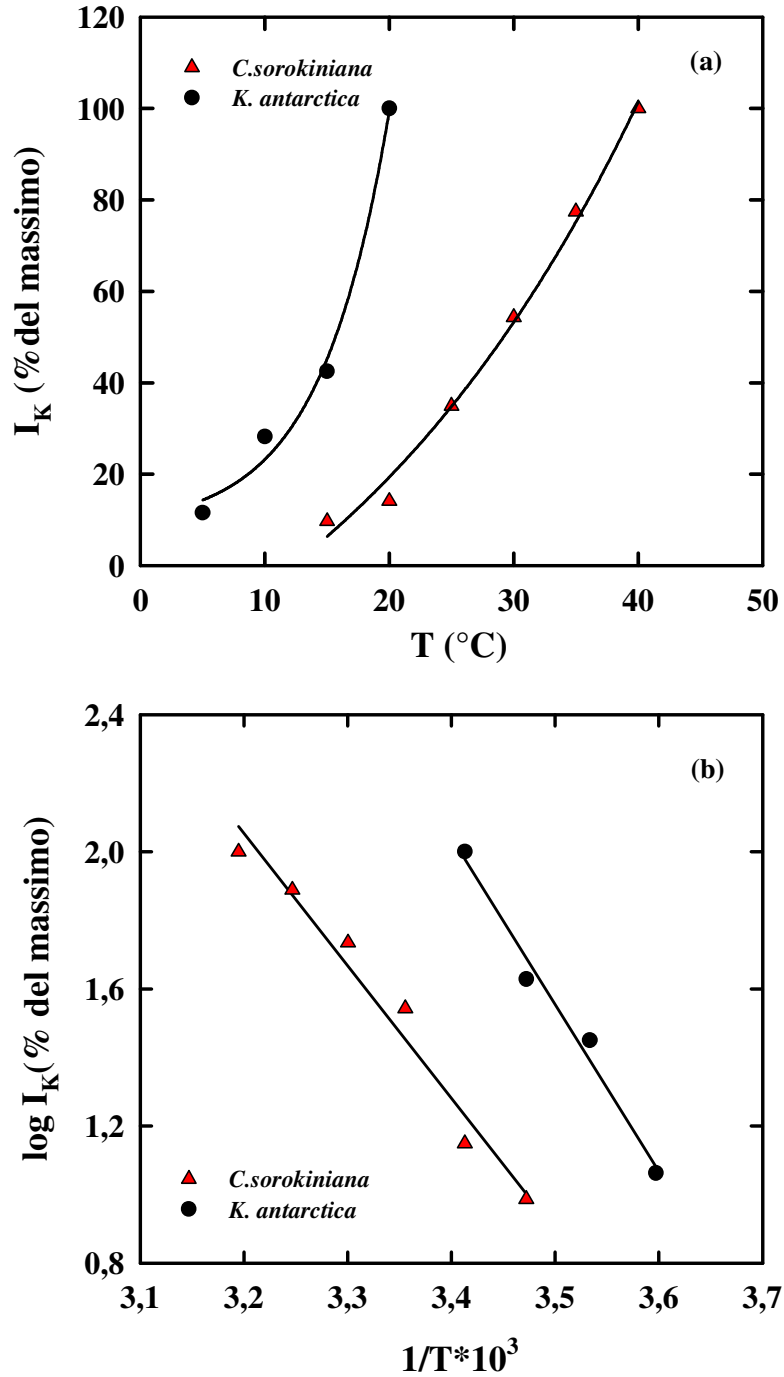


Figura 4.6 Velocità di I_K (% del massimo) di *K. antarctica* determinata nell'intervallo 5-25 °C e di *C. sorokiniana* nell'intervallo 15-40 °C (a). Plot d'Arrhenius costruito con i valori dei log delle I_K in funzione del reciproco della temperatura assoluta dell'alga *K. antarctica* e di *C. sorokiniana* (b).

Tabella 4.4.

Valori apparenti di Ea e di Q_{10} della velocità di fotosintesi massima P^B_{\max} e dell'indice I_K dell' alga psicrofila *K. antarctica* e dell' alga mesofila *C. sorokiniana*.

Organismo	P^B_{\max}		I_K	
	Q_{10}	Ea	Q_{10}	Ea
<i>K. antarctica</i>	1.83	43.2	4.16	82.61
<i>C. sorokiniana</i>	2.57	70.67	2.9	77.46

Ea è espressa come kJ mol^{-1}

P^B_{\max} è espressa come $\mu\text{moli di O}_2 \text{ liberato mg}^{-1} \text{ Chl h}^{-1}$

I_k è espressa come $\mu\text{moli fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

4.5 Correlazione fra velocità di fotosintesi e velocità di crescita.

Da un confronto fra i dati ottenuti per la capacità di fotosintesi e la velocità di crescita, si poteva stabilire che vi era in *C. sorokiniana* una possibile correlazione fra questi due processi. Infatti, la crescita risultava nulla alle basse temperature, dove la velocità di fotosintesi era ridottissima, e veniva stimolata alle temperature superiori a 20 °C, dove tale velocità mostrava un consistente aumento. Tale stretta relazione fra i due fenomeni era dimostrata anche dal fatto che nell'intervallo di temperatura compreso fra 25 e 35 °C veniva trovata una relazione lineare fra l'incremento della velocità di fotosintesi in diretta proporzione con l'incremento della velocità di crescita in funzione della temperatura, con un coefficiente di regressione (r^2) di 0,98 ($P < 0,001$) (Fig. 4.7).

L'esistenza di tale correlazione era impossibile, però, da quantificare nell'alga psicrofila in base ai dati ottenuti. Tuttavia, è da notare che, comunque, nell'alga psicrofila a bassa temperatura si possono riscontrare elevate velocità di fotosintesi capaci di favorirne la crescita.

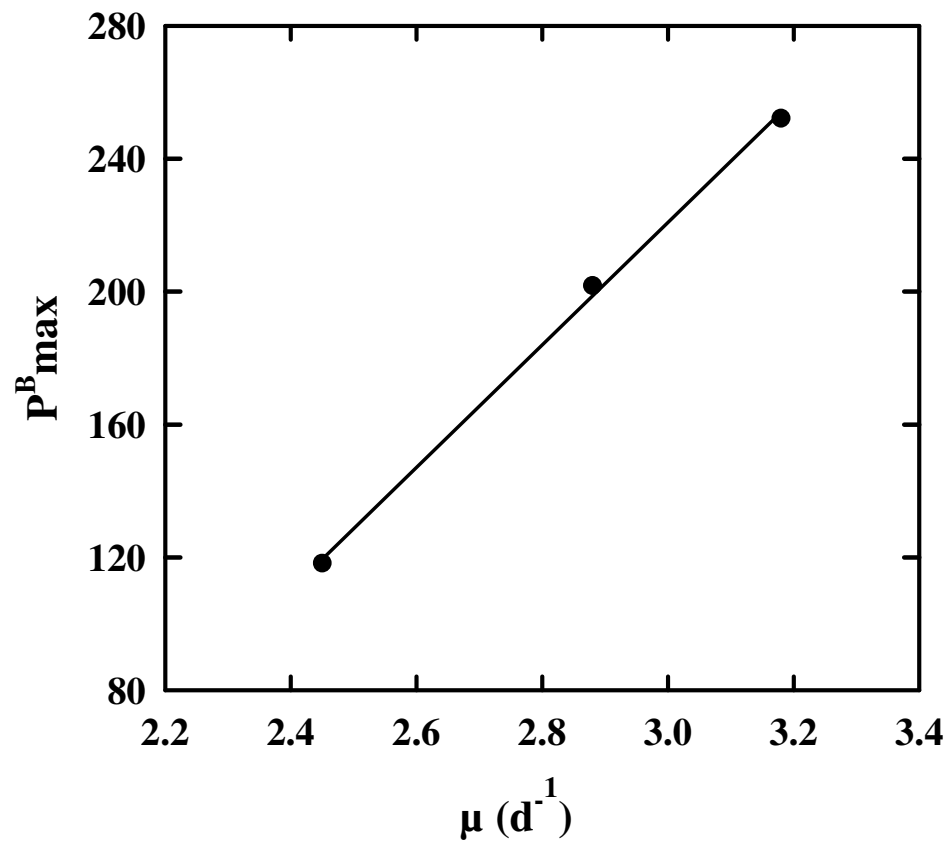


Figura 4.7 Correlazione fra la velocità di fotosintesi (P^B_{max}) e velocità di crescita nell'alga mesofila *C. sorokiniana* misurata a 25, 30, 35 °C, rispettivamente.

4.6 Effetto della temperatura sulla velocità di respirazione.

I valori della velocità di respirazione di *K. antarctica* e di *C. sorokiniana*, determinati a differenti temperature, sono riportati nella tab. 4.5.

La velocità di respirazione di *K. antarctica* a 5 °C era pari a 6,9 $\mu\text{mol O}_2$ consumato mg^{-1} Chl h^{-1} ossia il 33 % di quella massima ottenuta a 30 °C pari a 18,5 $\mu\text{mol O}_2$ consumato mg^{-1} Chl h^{-1} (Figura.4.8a); a 35 °C essa diminuiva drasticamente. Il plot d'Arrhenius (Figura 4.8b) era lineare nell'intervallo di temperatura 5-30 °C. L'energia di attivazione ed il valore di Q_{10} erano pari rispettivamente a 34,6 kJ mol^{-1} e 1,6 ($r^2=0,93$) (Tab. 4.6).

La velocità del consumo respiratorio di ossigeno nell'alga mesofila *C. sorokiniana*, (Tab. 4.5 e Fig. 4.8) non era misurabile a 5 °C, ed era a 10 °C di appena 0,4 $\mu\text{mol O}_2$ mg^{-1} Chl h^{-1} , ossia pari al 7 % di quella massima misurata a 35 °C (5,8 $\mu\text{mol O}_2$ mg^{-1} Chl h^{-1}). Dal rispettivo plot d'Arrhenius, che mostrava un andamento lineare, si calcolavano i valori di E_a e di Q_{10} che risultavano di 67,03 kJ mol^{-1} e di 2,4 ($r^2=0,95$) rispettivamente (Tab.. 4.6).

Comparando le velocità di respirazione misurate nelle due alghe, si notava come alle rispettive temperature ottimali, quella misurata in *K. antarctica* fosse di 3,2 volte più elevate di quella misurata in *C. sorokiniana*, mentre alla temperatura di 10 °C essa era addirittura di 20 volte più elevata.

Tabella 4.5

Velocità di respirazione di *K. antarctica*, e di *C. sorokiniana* a differenti temperature. I valori riportati sono la media di tre determinazioni \pm e.s.

T (°C)	Respirazione ($\mu\text{molO}_2 \text{ mg}^{-1}\text{Chl h}^{-1}$)	
	<i>K. antarctica</i>	<i>C. sorokiniana</i>
5	6,9 \pm 0,0	n.d.
10	8,2 \pm 0,5	0,4 \pm 0,1
15	8,7 \pm 0,4	0,8 \pm 0,0
20	13, \pm 1,9	1,8 \pm 0,2
25	15, \pm 1,7	2,9 \pm 0,0
30	18,5 \pm 1,8	3,2 \pm 0,3
35	16,6 \pm 0,6	5,8 \pm 0,3
40	n.d.	4,0 \pm 0,2

n.d. non determinato

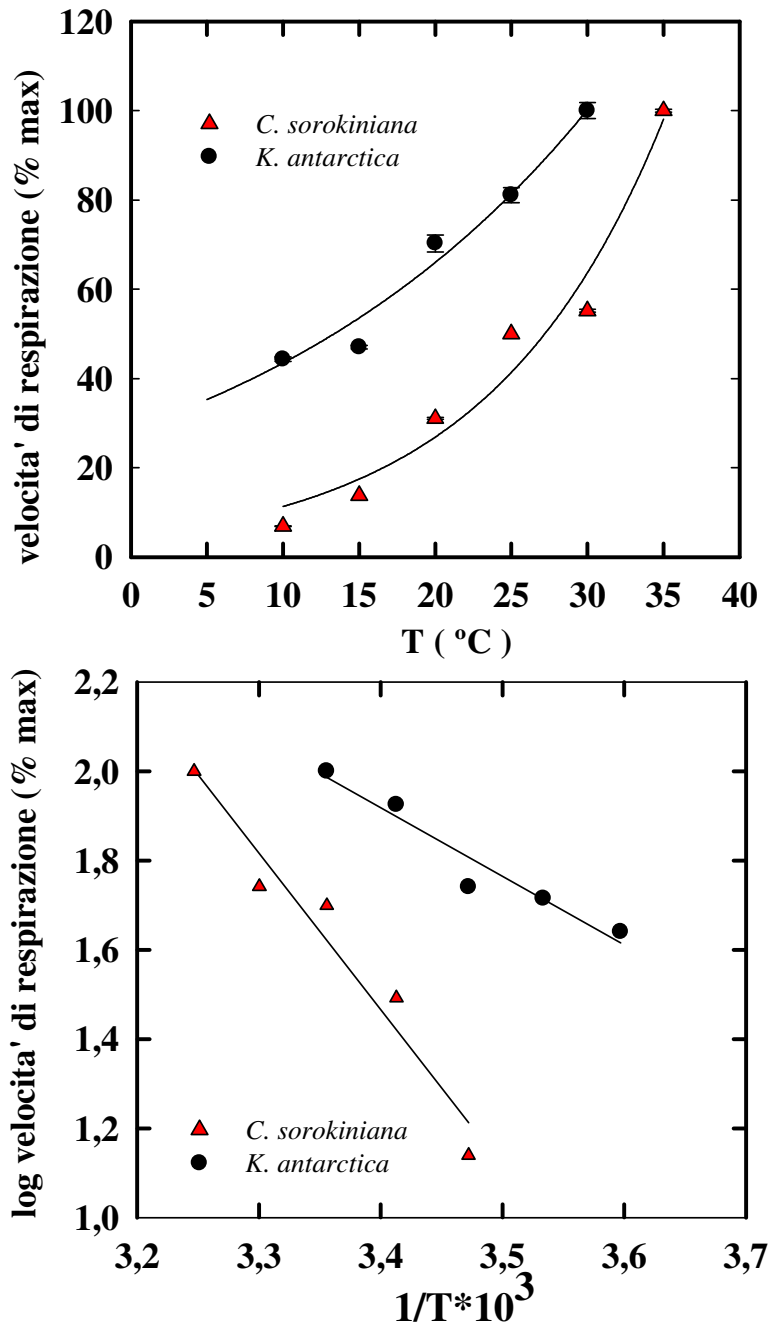


Figura 4.8 Velocità di respirazione (% del massimo) di *K. antarctica* e di *C. sorokiniana* nell'intervallo 15-40 $^{\circ}\text{C}$ (a). Plot d'Arrhenius costruito con i valori dei log delle velocità in funzione del reciproco della temperatura assoluta dell'alga *K. antarctica* e di *C. sorokiniana* (b).

4.7 Comparazione fra velocità di fotosintesi massima e velocità di respirazione alle diverse temperature.

Dai dati ottenuti risulta, quindi, che in tutte e due le alghe considerate, sia la velocità di fotosintesi massima che quella di respirazione presentavano in funzione della temperatura un incremento esponenziale. Da un confronto fra i dati si evince che in *C. sorokiniana* tale incremento per i due processi era maggiore che in *K. antarctica*, e che sia nella prima alga (Figura 4.9) che nella seconda alga (Figura 4.10) l'incremento della fotosintesi era leggermente più elevato di quello della respirazione. Infatti i valori di Q_{10} , calcolati sui rispettivi plot di Arrhenius, erano per la fotosintesi 2,9, in *C. sorokiniana* e 1,75 in *K. antarctica*, ed erano per la respirazione 2,4 nella prima alga e 1,58 nella seconda (Tab. 4.6).

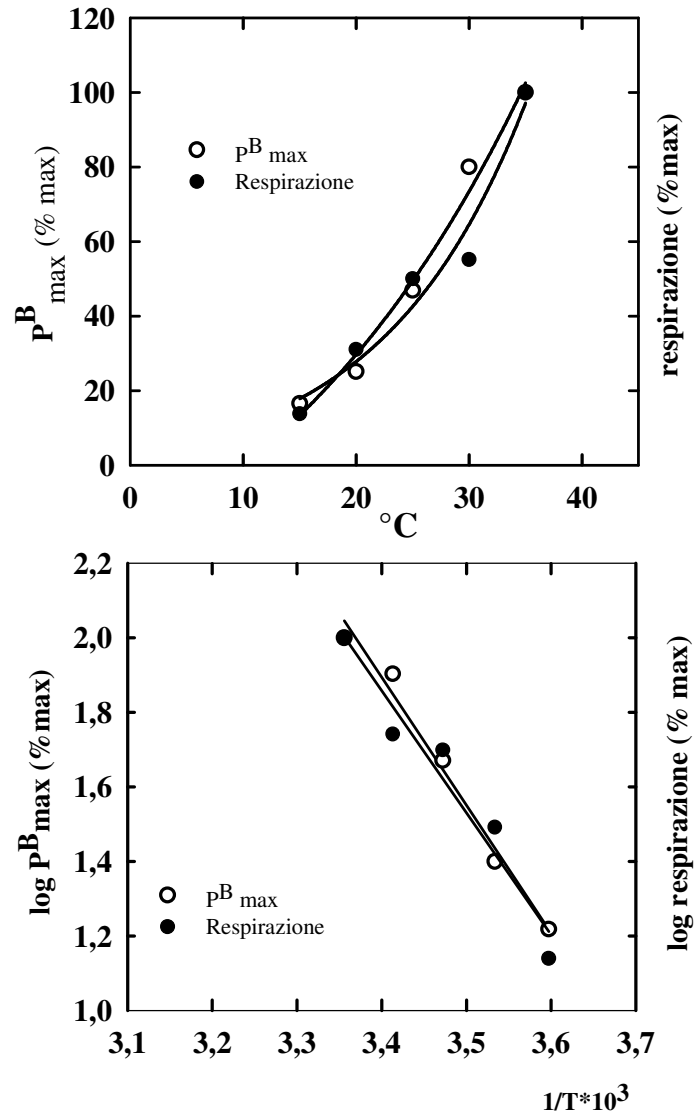


Figura 4. 9

Confronto tra la velocità di fotosintesi (P^B_{max}) e velocità di respirazione dell' alga mesofila *C. sorokiniana* (a). Confronto fra i log delle velocità di fotosintesi e respirazione di *C. sorokiniana*.(b)

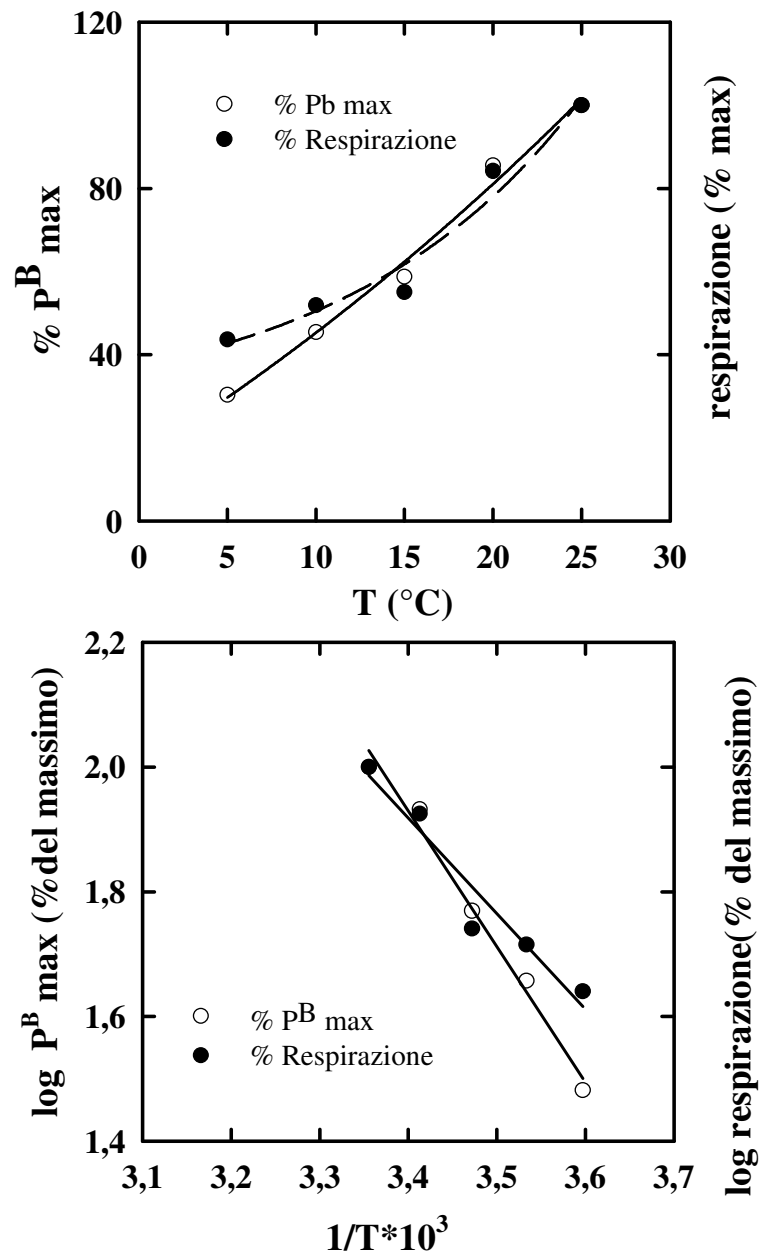


Figura 4. 10 Confronto tra la velocità di fotosintesi (P^B max) e velocità di respirazione dell' alga psicrofila *K. antarctica*. Confronto fra i log delle velocità di fotosintesi e respirazione di *K. antarctica*.(b)

Tabella 4.6

Valori di E_a e Q_{10} della velocità di fotosintesi (P^B_{max}) e respiratoria dell' alga mesofila *C. sorokiniana* e dell'alga psicrofila *K. antarctica*.

Organismo	P^B_{max}		Respirazione	
	Q_{10}	E_a	Q_{10}	E_a
<i>K. antarctica</i>	1.83	43.2	1.58	34.64
<i>C. sorokiniana</i>	2.57	70.67	2.4	67.03

E_a è espressa come $Kj\ mol^{-1}$

P^B_{max} è espressa come $\mu\text{moli di } O_2 \text{ liberato } mg^{-1} \text{ Chl } h^{-1}$

Respirazione è espressa come $\mu\text{moli di } O_2 \text{ consumato } mg^{-1} \text{ Chl } h^{-1}$

La velocità di fotosintesi riportata e il risultato della somma tra la velocità di evoluzione di ossigeno e la velocità di consumo di ossigeno.

4.8 Caratteristiche di crescita di Chlorella sorokiniana, Koliella antarctica, e Tetraselmis suecica in colture “outdoor”.

Le microalghe *C. sorokiniana* e *K. antarctica* allevate in colture “indoor”, venivano coltivate in sistemi “outdoor” per verificare la loro capacità di crescita all’esterno e controllare se le loro caratteristiche fisiologiche presentavano differenze rispetto a quelle coltivate indoor, tali da potersi considerare come fenomeni di adattamento.

Tali alghe venivano coltivate in outdoor negli stessi cilindri di vetro utilizzati per le colture indoor, posti all’esterno completamente esposti all’aria, e con gli stessi terreni di coltura, ed erano privi di qualsiasi sistema di illuminazione o termostatazione artificiali. Durante le varie ore della giornata venivano effettuati prelievi per misurare la crescita delle alghe, e venivano eseguite misure di intensità luminosa e di temperatura. Le coltivazioni outdoor venivano effettuate durante i mesi di Marzo, per *K antarctica*, Aprile *Tetraselmis suecica* e Luglio *C. sorokiniana*.

Per quanto riguarda le temperature interne alle colture misurate durante le ore diurne nel mese di Marzo, queste variavano fra 8°C e 20°C, e l’intensità luminosa fra 75 e 1400 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 4.11 a).

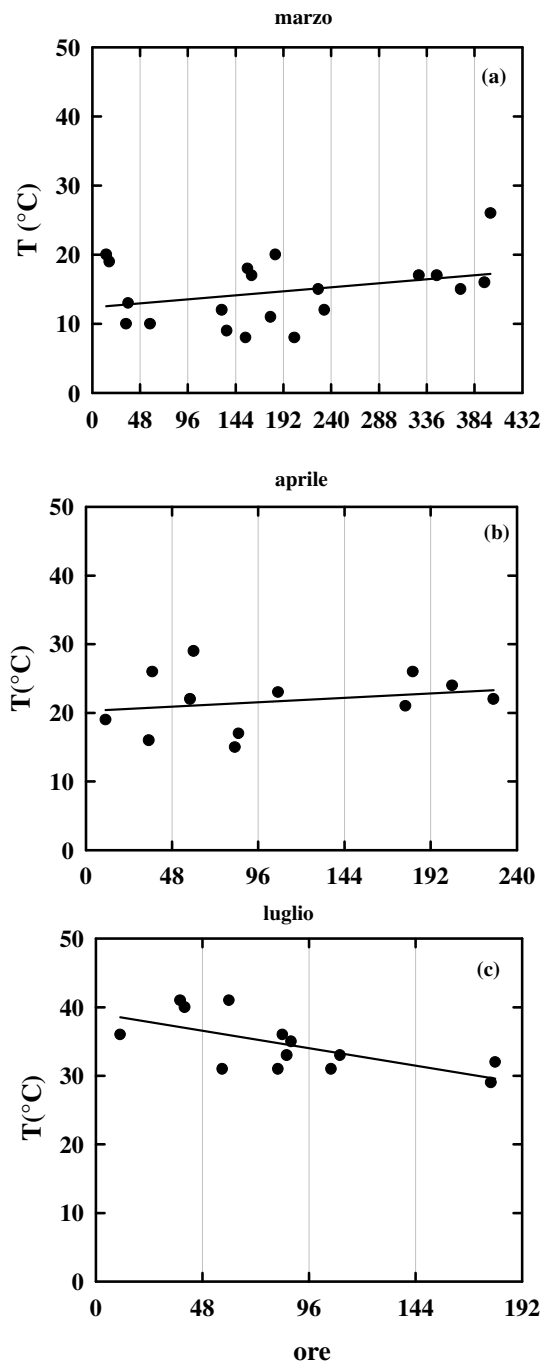


Figura 4.11 Temperatura interna alla coltura con schermatura della luce a $300 - 400 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ misurata dal 1 al 18 marzo (a), dal 3 al 12 aprile (b) e dal 10 al 17 luglio (c). Temperatura interna alla coltura con schermatura della luce a $300 - 400 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (c).

Malgrado queste condizioni fossero favorevoli per la crescita di *K. antarctica*, tuttavia l'alga non presentava sviluppo alcuno. Il sopraggiungere di temperature più elevate non ci ha consentito di continuare lo studio della crescita di quest'alga psicrofila.

T. suecica, veniva coltivata nel mese di aprile quando le variazioni di temperatura erano comprese fra un minimo di 15°C ed un massimo di 27 °C (figura 4.11 b). In queste condizioni, l'alga presentava una velocità di crescita pari a 0.37 d⁻¹ (Fig 4.12).

La crescita di *C. sorokiniana* veniva effettuata nel mese di luglio, quando la temperatura giornaliera variava fra un minimo di 30 ed un massimo di 35°C, con punte di 42°C (figura 4.11 c), e la densità luminosa si manteneva per quasi tutto il periodo su valori di 1900 μmol fotoni m⁻² s⁻¹.

In tali condizioni di luminosità *C. sorokiniana* perdeva i pigmenti fotosintetici diventando in poche ore completamente sbiancata. Utilizzando schermi di abbattimento che riducevano l'intensità luminosa a 400 μmol fotoni m⁻² s⁻¹, l'alga, non sbiancava, e si sviluppava con una costante di crescita (μ) pari a 0,59 d⁻¹.

Tutto questo dimostrava come *C. sorokiniana* fosse capace di adattarsi alle condizioni meteorologiche caratteristiche del nostro clima estivo, pur tuttavia con dovuti accorgimenti nelle tecniche di coltura.

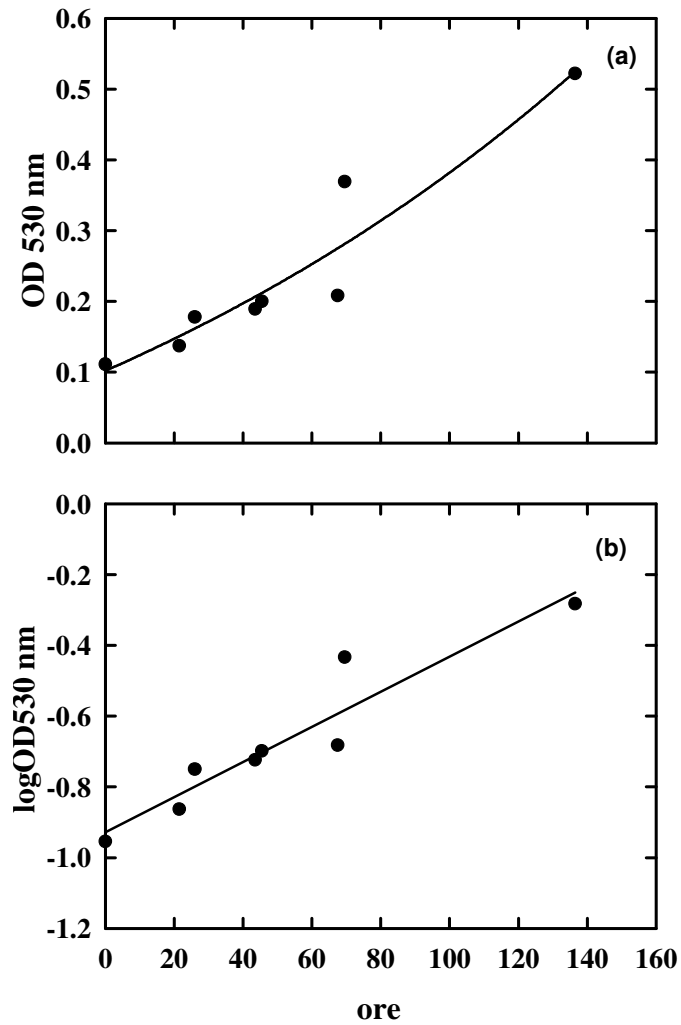


Figura 4.12 Velocità di crescita di *T.suecica* misurata come variazione di densità ottica a 530 nm nel mese di aprile(a). Log della velocità di crescita misurata (b).

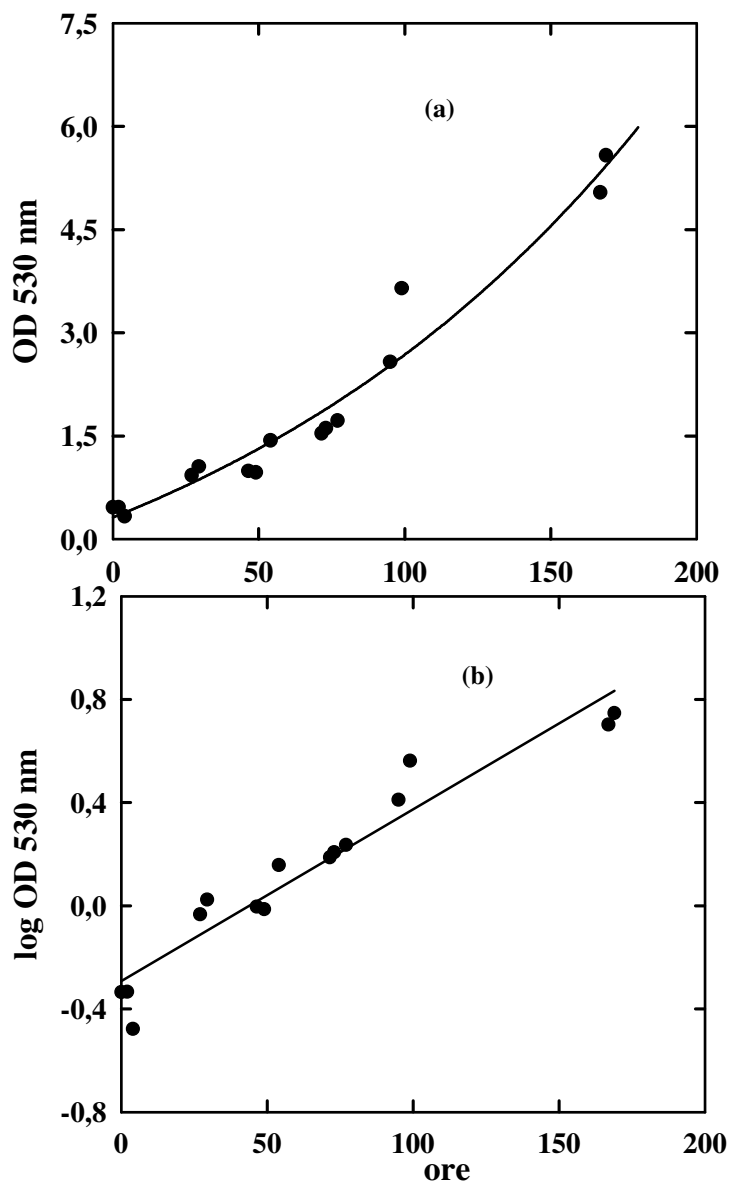


Figura 4.13 Velocità di crescita di *C. sorokiniana* misurata come variazione di densità ottica a 530 nm nel mese di luglio(a). Log della velocità di crescita misurata (b).

4.9 Misure in laboratorio dell'effetto della temperatura sulla velocità di fotosintesi di C. sorokiniana coltivata "outdoor"

La velocità di fotosintesi dell'alga mesofila *C. sorokiniana* coltivata in condizioni "outdoor" veniva determinata a 15, 20, 25, 30, 35 °C, per potere effettuare un confronto con i risultati ottenuti con le colture indoor (Tab. 4.6).

La velocità di fotosintesi di *C. sorokiniana* cresciuta outdoor presentava un valore massimo alla temperatura di 30°C, con 98,99 $\mu\text{mol O}_2$ liberato $\text{mg}^{-1}\text{Chl h}^{-1}$, che era pari al 50% del valore della velocità di fotosintesi misurata alla stessa temperatura per l'alga cresciuta indoor (188,52 $\mu\text{mol O}_2$ $\text{mg}^{-1}\text{Chl h}^{-1}$). A 15°C, però la velocità di fotosintesi dell'alga outdoor mostrava un valore di 33,42 $\mu\text{mol O}_2$ $\text{mg}^{-1}\text{Chl h}^{-1}$, che era pari al valore ottenuto alla stessa temperatura di 15°C per l'alga indoor (Fig. 4.14).

Il plot d'Arrhenius, costruito con il logaritmo delle costanti di velocità di fotosintesi in funzione del reciproco della temperatura assoluta, mostrava in tutto l'intervallo di temperatura 15-35 °C un andamento lineare (Fig. 4.14 b), con valori di E_a e di Q_{10} pari a 38,10 kJ mol^{-1} ed a 1,73, rispettivamente.

Tali valori risultavano del 50% più bassi di quelli trovati per l'alga cresciuti nel sistema indoor.

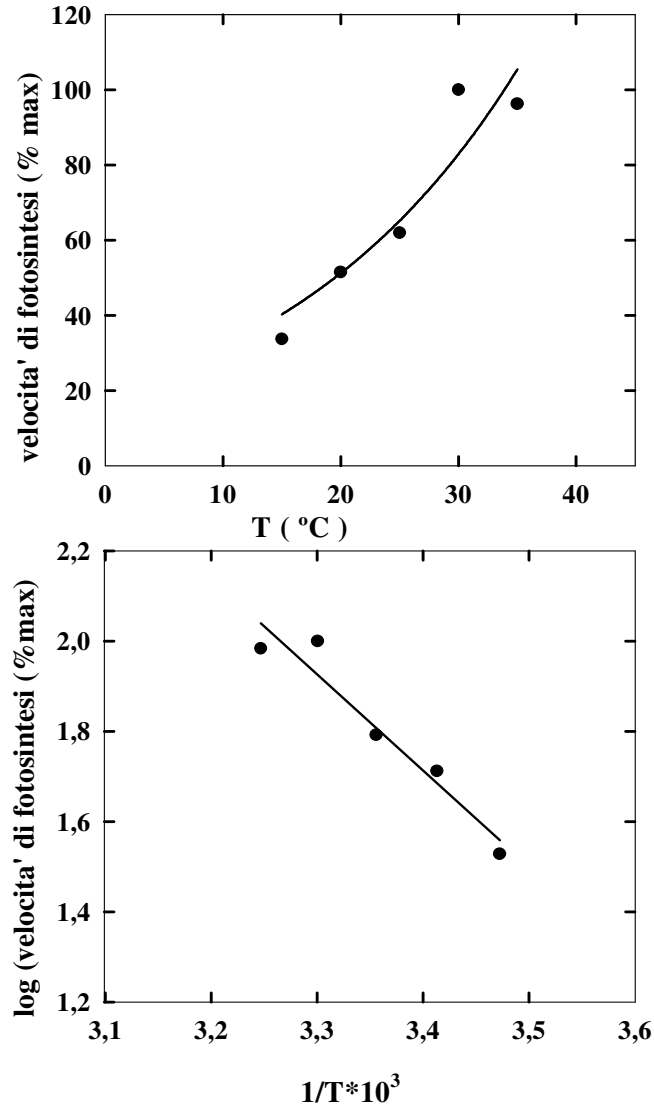


Figura 4.14 Velocità di fotosintesi (% del massimo) di *C. sorokiniana* determinata nell'intervallo 15-35 °C . La velocità di fotosintesi riportata è il risultato della somma tra la velocità di evoluzione di ossigeno e la velocità di consumo di ossigeno (a). Plot d'Arrhenius costruito con i log dell' attività fotosintetica in funzione del reciproco della temperatura assoluta nell' alga *C. sorokiniana*.(b)

4.10 Effetto della temperatura sulla velocità di respirazione di C. sorokiniana cresciuta outdoor .

I valori della velocità di respirazione di *C. sorokiniana* cresciuta in outdoor determinati a differenti temperature, sono riportati nella figura 4.15 e mostrati nella tabella 4.6.

La respirazione dell'alga mesofila *C. sorokiniana*, mostrava la massima velocità a 35°C, con un valore pari a $7.34 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl h}^{-1}$, che era del 126% più alta di quella misurata per le cellule indoor. A 15 °C la velocità di respirazione delle cellule outdoor era pari a $1.65 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl h}^{-1}$ e cioè del 100% più elevata di quella misurata con cellule indoor. Calcolando i valori di Q_{10} e delle energie di attivazione (E_a) nel rispettivo plot d'Arrhenius, che presentava un andamento lineare in tutto l'intervallo di temperatura considerato (15-35°C), si ottenevano i valori di E_a e di Q_{10} che erano pari a $55,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ e 2,23, rispettivamente.

Da notare che le velocità di respirazione delle cellule outdoor, sia alle temperature prossime a quella ottimale di crescita che alla temperatura di 15°C, sono sempre prossime al doppio di quelle misurate nelle cellule cresciute nei sistemi indoor; per le velocità di fotosintesi, invece, alla temperatura di 15°C i valori erano pressoché uguali nei due tipi di cellule, mentre alla temperatura di 30°C la velocità di fotosintesi nelle cellule cresciute outdoor era pari solo al 50% di quelle cresciute indoor. L'andamento di questi processi è perfettamente rappresentato dai valori di Q_{10} calcolati, che sono pressoché uguali per la respirazione (2,23 per le cellule outdoor e 2,4 per le indoor) e diversi per la fotosintesi (1,73 per le cellule outdoor, e 2,9 per le indoor). Può darsi che queste differenze siano l'indice di diverse forme di adattamento.

Tabella 4.7

Velocità di fotosintesi di *C. sorokiniana* a differenti temperature.

T(°C)	OUTDOOR		INDOOR	
	¹ fotosintesi	² respirazione	¹ fotosintesi	² respirazione
15	33,42	1,65	35,18	0,8
20	51,01	2,28	58,05	1,8
25	61,39	3,54	88,83	2,9
30	98,99	6,71	188,52	3,2
35	95,32	7,34	193,3	5,8

¹la velocità di fotosintesi è espressa come μmolO_2 evoluto mg^{-1} Chl h^{-1}

² la velocità di respirazione è espressa come μmolO_2 consumato mg^{-1} Chl h^{-1}

La velocità di fotosintesi riportata è il risultato della somma algebrica fra la velocità di evoluzione di ossigeno e la velocità di consumo di ossigeno (fotosintesi lorda).

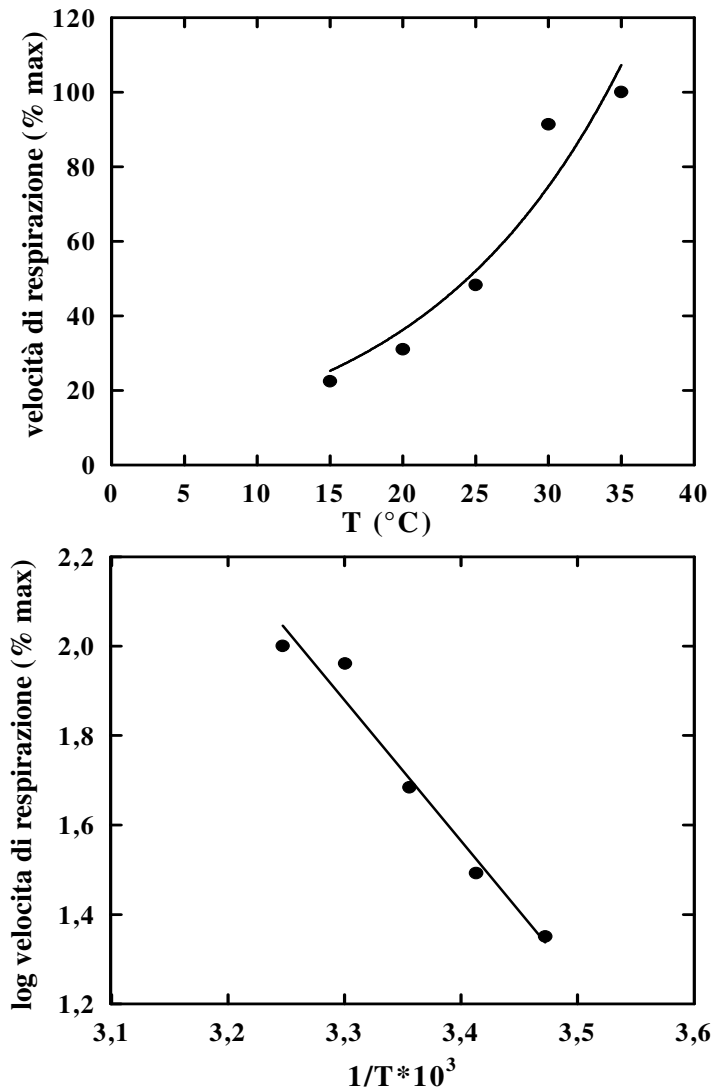


Figura 4.15 Velocità di fotosintesi (% del massimo) di *C. sorokiniana* determinata nell'intervallo 15-35 °C . La velocità di fotosintesi riportata è il risultato della somma tra la velocità di evoluzione di ossigeno e la velocità di consumo di ossigeno (a). Plot d'Arrhenius costruito con i log dell' attività respiratoria in funzione del reciproco della temperatura assoluta dell' alga *C. sorokiniana*.(b)

CAPITOLO QUINTO

Discussione

Per uno sviluppo ottimale, gli organismi vegetali hanno bisogno di una buona capacità fotosintetica, fortemente influenzata dalla luce e dalla temperatura, e di un'adeguata capacità respiratoria, influenzata dalla temperatura, così come lo sono tutti i processi cellulari.

La dipendenza della velocità di una reazione chimica dalla temperatura è descritta dalla seguente equazione:

$$K = k(K_B/h) e^{-\Delta G^\circ/RT}$$

dove:

K è la costante di velocità;

k è il coefficiente di trasmissione,

K_B è la costante di Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ kJ}^{-1}$),

h è la costante di Plank ($6,63 \cdot 10^{-34} \text{ Js}^{-1}$)

ΔG° è l'energia libera di attivazione ,

R è la costante dei gas ($8,31 \text{ kJ}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

T è la temperatura assoluta (°K).

In base a tale equazione quindi, diminuendo la temperatura, diminuisce esponenzialmente anche la velocità di reazione.

Nel caso della fotosintesi, è stato visto che valori troppo bassi di temperatura provocano un rallentamento della velocità di diffusione del plastochinone nella membrana tilacoidale e con esso, un

abbassamento del trasporto degli elettroni ed una diminuzione della velocità di fotosintesi; le temperature basse determinano, inoltre, una diminuzione della capacità di fissare l'anidride carbonica (Davison,1991).

Studi condotti sia su piante superiori che su alghe, hanno evidenziato che un rallentamento nel trasporto degli elettroni, avendo come effetto un accumulo di energia al livello del fotosistema II (PSII), causa fotoinibizione (Moll and Steinback, 1986).

L'effetto della temperatura sulla velocità di una reazione chimica, enzimatica o di un qualsiasi processo biologico complesso come la fotosintesi o la respirazione, è frequentemente espresso in termini di coefficiente di temperatura, Q_{10} , il cui valore indica l'incremento della velocità in seguito ad un aumento di temperatura di 10°C. Tale coefficiente viene utilizzato per determinare il valore di Energia di attivazione (E_a) secondo la seguente equazione:

$$E_a = \frac{2,3 R T_2 T_1 \log Q_{10}}{10}$$

Per quanto riguarda la fotosintesi e la respirazione, i due processi qui studiati, in genere si registra un aumento della velocità con l'aumentare della temperatura fino ad un valore massimo oltre il quale vi è una diminuzione della produzione fotosintetica o consumo respiratorio di ossigeno. Per alcuni organismi si è constatata l'esistenza di un intervallo abbastanza ampio di temperatura ottimale, piuttosto che una temperatura ristretta ad un unico valore specifico (Madsen and Mabnerly, 1990). Per alcuni organismi mesofili, quali

la diatomea *Aulacoseira granulata* ed i cianobatteri *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria sp.*, *Merismopedia tenuissima*, la temperatura alla quale corrisponde la massima attività fotosintetica è quella alla quale si riscontra la massima velocità di crescita (Drew, 1997, Coles and Jones, 2000, Vona *et al.*, 2004), anche se ciò non si riscontra negli organismi psicrofili, dove la temperatura ottimale per la fotosintesi è notevolmente più alta di quella per la crescita. Per quanto riguarda le alghe artiche e antartiche, è stato trovato che la fotosintesi è già notevolmente attiva a -2°C (Palmisano *et al.*, 1987), o, addirittura, a -7°C (Davey, 1989), temperature queste alle quali le alghe mesofile non presentano fotosintesi apprezzabile.

Oltre che per la temperatura, per tutte le alghe è stato riscontrato anche un aumento dell'attività fotosintetica con l'incremento dell'intensità luminosa, fino al raggiungimento di un valore massimo, definito come $P^{\text{B}}_{\text{max}}$. Nelle alghe sottoposte ad elevate intensità luminose, può essere riscontrato il fenomeno di fotoinibizione come nei cianobatteri *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria granulata* e *Merismopedia tenuissima* (Coles and Jones, 2000). Un altro fenomeno che normalmente viene riscontrato è quello della fotoacclimatazione. Acclimatazione a differenti regimi di luce veniva osservata nel cianobatterio unicellulare termofilo *Synechocystis aquatilis*, consistente in rapide variazioni dei parametri fotosintetici, quali efficienza fotosintetica (α), contenuto di pigmenti e tasso massimo fotosintetico $P^{\text{B}}_{\text{max}}$ (J. Grobbelaar *et al.*, 2003).

Anche la qualità della luce può influenzare la velocità di fotosintesi ed il tasso di crescita, come osservato anche per *Gracilaria sp.* (Beer *et al.* 1983), *Palmaria Palmata* (Luning 1992), e *Gelidium sesquipedale* (Carmona *et al.*, 1996). Tipicamente le alghe cresciute

alla luce blu rispetto a quelle cresciute con luce bianca, richiedono una intensità luminosa saturante per la fotosintesi, Iopt, più elevata, mostrando nel contempo una più bassa efficienza fotosintetica (Figueroa *et al.* 1994 e 1995). Come suggerito da Gantt (1990), la qualità della luce può indurre cambiamenti nell'efficienza fotosintetica delle alghe rosse dovute ad una alterazione dei fotosistemi, oppure a differenze nel flusso elettronico tra PS I e PS II e/o al tasso di fissazione del carbonio.

Oltre i processi complessi quali fotosintesi e respirazione, anche l'attività dei singoli enzimi sono influenzate dalla temperatura, che a tal proposito possono essere distinti in criofili, mesofili e termofili, a seconda dell'adattamento termico dell'organismo dal quale derivano. Mentre nelle alghe mesofile le conoscenze riguardanti le caratteristiche biochimiche e di regolazione dei loro enzimi sono molto avanzate, nelle alghe psicrofile, malgrado la loro importanza ecologica ed evolutiva, tali conoscenze sono comparativamente molto scarse. Una ricerca di Kobori del 1984, su una fosfatasi alcalina isolata da un batterio dell'Antartide, ha evidenziato per la prima volta le caratteristiche principali degli enzimi criofili, quali un'elevata attività specifica alle basse temperature ed una rapida denaturazione termica a temperature moderatamente elevate. Secondo Feller e Gerday (1997), l'elevata attività catalitica degli enzimi criofili alle basse temperature potrebbe essere la conseguenza di cambiamenti strutturali della proteina, che portano anche ad una riduzione della sua termostabilità. In particolare, sono stati ipotizzati due tipi di adattamento: un tipo basato sulla formazione di una struttura interamente flessibile (Feller *et al.*, 1999) ed un altro, come per la fosfogliceratochinasi di *Pseudomonas* sp., basato sulla

formazione di una struttura con flessibilità locale (Benthair *et al.*, 2000). L'elevata flessibilità degli enzimi criofili è confermata dai loro valori di K_M , più bassi rispetto agli omologhi mesofili, indicando la presenza di legami deboli tra il sito attivo della proteina ed il substrato (Xu *et al.*, 2003). A tal riguardo, notevole è il fatto che gli enzimi Nitrato riduttasi (NR) e arginina-succinato liasi (ASL), nelle alghe criofile mostravano una temperatura ottimale di 20 °C più bassa rispetto agli enzimi omologhi mesofili, ed erano più sensibili al calore (Loppes *et al.*, 1996), e che la NADH: NR di *Koliella antarctica*, l'alga psicrofila qui studiata, mostrava tutte le caratteristiche tipiche degli enzimi criofili a struttura interamente flessibile (Di Martino Rigano *et al.*, 2006). La NADH:NR criofila di *K. antarctica* mostrava anche un optimum di temperatura più basso di 10 °C rispetto alla NADH:NR della specie mesofila *C. sorokiniana* (Di Martino Rigano *et al.*, 2006). La natura di enzima criofilo della NR di *K. antarctica* era inoltre avvalorata dal fatto che i valori di E_a e di Q_{10} erano notevolmente più bassi di quelli misurati per la NR dell'alga mesofila *C. sorokiniana*, quale indice di adattamento alle basse temperature (Di Martino Rigano *et al.*, 2006). Questo dimostra che *Koliella antarctica*, per quanto riguarda la sua dipendenza dalla temperatura, possiede proteine con caratteristiche strutturali tipiche degli organismi psicrofili.

Dunque gli enzimi criofili sono particolarmente attivi alle basse temperature (Fig. 5), alle quali possono presentare attività specifiche fino a 10 volte più elevate rispetto agli omologhi enzimi mesofili (Feller *et al.*, 1996).

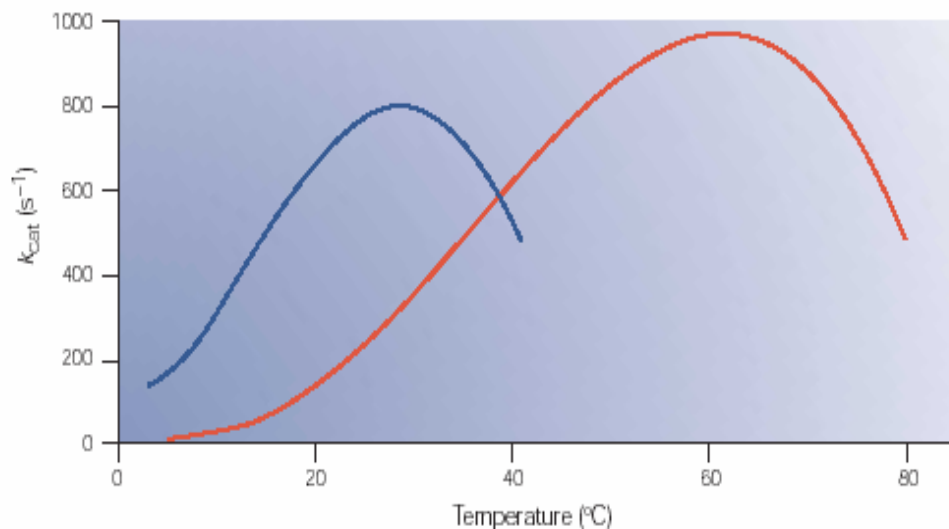


Figura 5

Dipendenza termica dell'attività enzimatica. Gli enzimi criofili (curva blu) sono più attivi alle basse temperature rispetto agli omologhi mesofili (curva rossa). Essi, inoltre, presentano un'attività più termolabile, come evidenziato da una più bassa temperatura ottimale (Feller and Gerday, 2003).

I dati ottenuti dalle nostre ricerche riguardavano lo studio comparato dell'effetto della temperatura sulla crescita e sulla respirazione, e l'influenza della temperatura e dell'intensità luminosa sui fondamentali parametri della fotosintesi espressi in termini di P^B_{max} (massima velocità di fotosintesi), I_{opt} (il flusso di densità fotonica per ottenere la P^B_{max}), I_k (la densità del flusso di fotoni che indica l'inizio della fotosintesi saturata dalla luce), e α (slope della porzione lineare della curva), descritti

sopra nei risultati, di *K. antarctica* criofila e *C. sorokiniana*, mesofila.

Per quanto riguarda la crescita, la microalga *Koliella antarctica*, che ha il suo habitat nelle acque del mare di Ross in Antartide, mostrava in condizioni di laboratorio sviluppo cellulare a 5, 10 e 15 °C, anche se a tali temperature la velocità di crescita (μ) risultava molto lenta se comparata con quella delle alghe mesofile, ed in particolare mai superiore a 0,12 ed a 0,48 d⁻¹ rispettivamente. Quella di 15 °C rappresentava, in effetti, la temperatura massima di crescita dell'alga psicrofila, che non si sviluppava alla temperatura di 20 °C. La capacità di crescere, anche se lentamente, a basse temperature, e soprattutto l'incapacità di crescere ad una temperatura superiore ai 15 °C, confermavano l'appartenenza della microalga al gruppo degli organismi psicrofili.

Per l'alga verde mesofila *C. sorokiniana*, invece, la temperatura minima alla quale si poteva osservare crescita apprezzabile era di 20 °C, mentre la temperatura ottimale di crescita era pari a 35 °C. La velocità di crescita (μ) di *C. sorokiniana* a quest'ultima temperatura era pari a 3,12 d⁻¹, un valore di ben 10 volte più elevato di quello della massima velocità di crescita di *K. antarctica* a 10 °C.

Per quanto riguarda le relazioni fra velocità di fotosintesi ed intensità luminosa (P^B-I) trovate in *K. antarctica* e di *C. sorokiniana*, le curve di saturazione relative a P^B-I mostrano che entrambe le alghe possono presentare fenomeni di fotoinibizione, ma alla temperature di 25°C l'alga psicrofila, e di

40°C l'alga mesofila. Tali differenze nella temperatura massima alla quale si manifestano i fenomeni di fotoinibizione potrebbero rispecchiare differenze nella struttura dei rispettivi apparati fotosintetici. In altri organismi dove è stata osservata fotoinibizione, tale fenomeno si verifica invece a tutte le temperature saggiate, come nei cianobatteri *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria granulata* e *Merismopedia tenuissima* (Coles and Johnes 2000).

Come puntualizzato da questi ultimi autori, poiché la densità di flusso fotonico usata per la coltivazione dei cianobatteri era pari a $120 \mu\text{mol fotoni}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, e dunque molto al disotto di quella necessaria per saturare la fotosintesi, era possibile che le colture fossero acclimatate alle basse intensità luminose. Alghe, infatti, cresciute a basse intensità luminose potrebbero avere una ridotta abilità di usare livelli saturanti di luce (Falkowski and LaRoche 1991).

Per quanto riguarda il parametro, I_{opt} , esso aumenta significativamente con la temperatura in entrambe le alghe, similmente a quanto osservato in altri microrganismi fotosintetici, quali cianobatteri e alghe eucariotiche (Talbot *et al.* 1991, Collins and Boylen 1982 Morgan and Kalff 1979, Megard *et al.* 1984).

Alle rispettive temperature ottimali per la fotosintesi, 25°C per *K. antarctica* e 35°C per *C. sorokiniana*, i valori di I_{opt} per la prima alga erano minori che per la seconda, mentre alla più bassa temperatura di 15°C la prima alga mostrava un I_{opt} più elevato. Tali differenze potrebbero anche essere il risultato di un

diverso tipo di adattamento dell'apparato fotosintetico che consente all'alga psicrofila di utilizzare in maniera più efficiente la luce alle basse temperature alle quali è confinata a svilupparsi.

Una comparazione fra i valori di P_{\max}^B misurati nelle due specie, indicano che *C. sorokiniana* è più produttiva alle alte temperature mentre *K. antarctica* lo è alle temperature più basse. P_{\max}^B per *C. sorokiniana* mostrava, infatti, una maggiore dipendenza dalla temperatura in quanto aumentava significativamente nell'intervallo compreso fra 15 e 35°C con un valore di Q_{10} , pari a 2,57, rispetto a quella di *K. antarctica* che aumentava nell'intervallo di temperatura fra 5 e 25°C, con un valore di Q_{10} pari a 1,83. Tale andamento era in accordo col fatto che uno dei mezzi evolutivi di adattamento dei criofili agli ecosistemi freddi, è quello di abbassare il valore di Q_{10} dei sui vari processi cellulari. Queste caratteristiche sono consistenti con la osservata dominanza di *K. antarctica* in ambienti freddi e *C. sorokiniana* in ambienti miti. I valori di I_K erano sostanzialmente più elevati in *K. antarctica* rispetto a *C. sorokiniana*, e mostravano una stretta correlazione con la temperatura.

In entrambe le alghe i cambiamenti di I_k erano dovuti all'incremento della P_{\max}^B in funzione della temperatura. Come già osservato per altri parametri, anche in questo caso il maggiore incremento di I_k avveniva fra 30 e 35° C, in *C. sorokiniana*, ed avveniva fra 15 e 20°C nella psicrofila *K. antarctica*, dimostrando che anche per questo parametro si

notavano le caratteristiche psicrofile, e quindi di adattamento al freddo, di *K. antarctica*.

In *C. sorokiniana* il valore massimo di P^B_{\max} corrispondeva al valore di temperatura ottimale per la crescita, 35°C, mentre in *K. antarctica* si trovava ad una temperatura più elevata rispetto a quella ottimale per la crescita. Da notare, però, che il valore massimo di I_k calcolato in *K. antarctica* a 20°C, 81,82 $\mu\text{moli fotoni m}^2 \text{ s}^{-1}$, corrispondeva al 33% del valore massimo, 245,45 $\mu\text{moli fotoni m}^2 \text{ s}^{-1}$, calcolato a 40°C in *C. sorokiniana*. I_k è stata considerata come una possibile misura della “shade-acclimation”, anche se da alcuni autori viene suggerito di usare notevole precauzione nell’uso di tale parametro come una misura classica in tal senso. Il parametro I_k presentava un valore apparente di Q_{10} pari a 4.16 per *K. antarctica* e pari a 2.96 per *C. sorokiniana*. I valori di Q_{10} misurati per tale parametro funzionale, quindi, si distinguevano da tutti gli altri parametri funzionali della fotosintesi e dei processi metabolici della cellula, nel presentare una maggiore dipendenza dalla temperatura nell’alga psicrofila rispetto alla mesofila. Il significato resta da indagare.

Per quanto riguarda i valori di α alle varie temperature, in ambedue le specie si notava un decremento all’aumentare della temperatura, tuttavia con andamenti diversi. In *C. sorokiniana*, infatti, la diminuzione avveniva nel passaggio della temperatura da 20°C a 25°C, mentre in *K. antarctica*, il decremento avveniva in modo progressivo in tutto l’intervallo di temperature compreso fra 5°C e 20°C. Anche questo parametro funzionale

quindi, dimostra la maggiore efficienza del processo di fotosintesi dell'alga psicrofila alle basse temperature di crescita rispetto all'alga mesofila. Questo potrebbe rappresentare un sistema adatto ad impedire che i valori di fotosintesi possano raggiungere livelli troppo elevati all'aumentare della temperatura.

I risultati ottenuti dimostrano che la fotosintesi e la crescita sono strettamente correlate in *C. sorokiniana* ma non in *K. antarctica*. C'è da sottolineare a tal proposito che nella prima alga fotosintesi e crescita presentano lo stesso massimo di temperatura, mentre nell'alga psicrofila la crescita ha un massimo di temperatura più basso di quello della fotosintesi, e sarebbe opportuno chiarire questo aspetto, che potrebbe stabilire in quali casi si può assumere che conoscendo l'optimum di fotosintesi si può desumere quello della crescita. Inoltre, alle rispettive temperature ottimali, le P_{\max}^B delle due alghe sono pressoché uguali, mentre alle temperature ottimali di crescita quelle della mesofila *C. sorokiniana* sono più alte di quelle della psicrofila *K. antarctica*; ciò potrebbe essere alla base della maggiore velocità di crescita di *C. sorokiniana* rispetto a *K. antarctica*.

Il profilo della dipendenza della velocità di respirazione dalla temperatura nelle due alghe considerate, risultava simile a quello ottenuto per il processo fotosintetico.

L'alga psicrofila, già alle basse temperature mostrava una elevata velocità di consumo di O_2 , che a 10 °C risultava di 20 (o più) volte maggiore di quello riscontrato in *C. sorokiniana*. Tali

risultati suggeriscono che *K. antarctica* attraverso un'elevata respirazione, è capace di procurarsi una elevata quantità di energia metabolica tale da potenziare le reazioni cellulari, e di favorire in tal modo la loro crescita a bassa temperatura. Ciò sembra indicare che la crescita a bassa temperatura è fortemente dipendente dalla respirazione. Circa la possibile relazione fra respirazione e crescita, è notevole che, mentre *C. sorokiniana* alla temperatura ottimale di crescita (35 °C) mostrava una velocità di respirazione pari solo al 5 % della velocità di fotosintesi, *K. antarctica*, mostrava a 10 °C, una temperatura prossima a quella ottimale per la crescita, una velocità di respirazione pari al 17 % di quella fotosintetica.

Tale elevato rapporto respirazione/fotosintesi indica che nell'alga psicrofila una notevole quantità di fotosintato viene utilizzato come substrato respiratorio, e che questo, se da un lato favorisce lo sviluppo cellulare a bassa temperatura mediante la produzione di energia, dall'altro lato causa una riduzione della disponibilità di carbonio per le attività biosintetiche e, quindi, per la crescita. Anche in *Skeletonema costatum* l'elevata velocità di respirazione è stata vista come una delle possibili cause della bassa efficienza di crescita di tale organismo (Cosper, 1982; Miller and Kamykowski, 1986).

Per quanto riguarda le coltivazioni "outdoor", un confronto con quelle "indoor", si è potuto fare soltanto per l'alga mesofila *C. sorokiniana*. Le condizioni climatiche outdoor non hanno consentito la crescita di *K. antarctica* durante il periodo della

ricerca, e per quanto riguarda *T. suecica* è stato soltanto valutata la sua capacità di essere coltivata in impianti outdoor.

C. sorokiniana, coltivata con tecniche di allevamento “outdoor” presentava una crescita inferiore a quella ottenuta con tecniche di coltivazione indoor, con un tasso di crescita μ pari a 0.59 d^{-1} nel mese di luglio. Questo valore più basso di crescita era dovuto al fatto che le condizioni di temperatura ed intensità luminosa all'esterno non erano ottimali per la crescita e che bisogna apportare dei miglioramenti nel sistema al fine di un migliore rendimento della coltura. D'altra parte, l'alga mesofila *C. sorokiniana*, coltivata all'esterno, presentava drammatici fenomeni di bleaching (sbiancamento), indicando che le cellule coltivate indoor, prima di essere poste all'esterno hanno bisogno di adattarsi (fotoacclimatarsi) lentamente all'intensità luminosa dell'energia solare fotosinteticamente attiva (PAR). Anche altri autori hanno dimostrato che i fattori che limitano la produttività delle microalghe coltivate in impianti outdoor sono fondamentalmente due: l'effetto della saturazione della luce e la fotoinibizione (J.Weissmann *et al.*, *AQUA* 2006; Tredici *et al.*, *AQUA* 2006, Chini Zittelli *et al.*, *AQUA* 2006.).

L'efficienza fotosintetica (capacità di convertire energia solare in biomassa) delle alghe coltivate outdoor è inferiore da 1/10 a 1/5 di quella delle alghe allevate indoor a bassi regimi di intensità luminosa. (Tredici *et al.*, 2006).

Inoltre le cellule di *C. sorokiniana* coltivate all'esterno presentavano bassa velocità di fotosintesi e più elevati valori di respirazione, che indicavano come questi processi fossero

diversamente funzionanti nell'alga mesofila cresciuta indoor ed outdoor. Notevole era il fatto che, mentre il valore di Q_{10} della respirazione era uguale nelle cellule indoor e outdoor, il Q_{10} della fotosintesi delle cellule outdoor era notevolmente più elevato di quello delle cellule indoor. Questo significa che nelle alghe coltivate all'esterno la fotosintesi ha una minore dipendenza dalla temperatura, che potrebbe rientrare nei fenomeni di adattamento dell'apparato fotosintetico. Di tutto questo bisognerà tenere conto nell'allestimento di colture all'aperto e nell'ideare e progettare un fotobioreattore "outdoor".

BIBLIOGRAFIA

Amos Richmond & Ning Zou (1999). Efficient utilisation of high photon irradiance for mass production of photoautotrophic micro-organism. *Journal of Applied Phycology*. 11: 123-127.

Andreoli C., Lokhrost G.M., Mani A.M., Scarabel L., Moro I., La Rocca N. and Tognetto L. (1998). *Koliella antarctica* sp. nov. (Klebsormidiales) a new marine green microalga from the Ross Sea (Antarctica). *Archiv fur Hydrobiol. /Algological Studies*. 90: 1-8.

Ben-Amotz A., Fishler R. and Schneller A (1987). Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifers with emphasis on fatty acids. *Mar. Biol.* 95:31-36.

Benthair M., Feller G., Aittaleb M., Lamotte-Brasseur J., Himri T., Chessa J. and Gerday C. (2000). Structural, kinetic, and calorimetric characterization of the cold-active phosphoglycerate kinase from the antarctic *Pseudomonas* sp. *J. Biol. Chem.* 275: 11147-11153.

Carpenter E., Lin J. and Cappone D.G. (2000). Bacterial activity in South Pole snow. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4514-4517.

Coles J.F. and Jones R.C. (2000). Effect of temperature on photosynthesis-light response and growth of four phytoplankton species isolated from a tidal freshwater river. *J. Phycol.* 36: 7-16.

Collins C.D. and Boylen C.W. (1982). Physiological responses of *Anabaena variabilis* (Cyanophyceae) to instantaneous exposure to various combinations of light intensity and temperature. *J. Phycology.* 18:206-211.

Cosper E. (1982). Effect of variation in light intensity on the efficiency of growth of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) in a cyclostat. *J. Phycol.* 18: 360-368.

Daugbjerg N. (2000). *Pyramimonas tychoireta*, sp. nov. (Prasinophyceae), a new marine species from Antarctica: light and electron microscopy of the motile stage and notes on growth rates. *J. Phycol.* 36: 160-171.

Davey M.C. (1989). The effect of freezing and desiccation on photosynthesis and survival of terrestrial Antarctic algae and cyanobacteria. *Polar. Bio.* 10: 29-36.

Davison I.R. (1991). Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. *J. Phycol.* 27: 2-8.

Devos N., Ingouff M., Loppes R., and Matagne R.F. (1998). Rubisco adaptation to low temperatures: a comparative study in psychrophilic and mesophilic unicellular algae. *J. Phycol.* 34: 655-660.

Di Martino Rigano., Vona V., Lobosco O., Carillo P., Lunn J.E., Carfagna S., Esposito S., Caiazza M. and Rigano C. (2006). Temperature dependence of nitrate reductase in the psychrophilic unicellular alga *Koliella antarctica* and mesophilic alga *Chlorella sorokiniana*. *Plant, Cell and Environment* **29**, 1400–1409.

Drew E. (1977). The physiology of photosynthesis and respiration in some Antarctic marine algae. *Br. Antarct. Surv. Bull.* 45: 59-76.

Falkowski P.G. and La Roche J. (1991). Acclimation to spectral irradiance in algae. *J. Phycology* .27:8-14.

Feller G., and Gerday C. (1997). Psychrophilic enzymes; molecular basis of cold adaptation. *Cell. Mol. Life sci.* 53, 830-841.

Feller G., and Gerday C. (2003). Psychrophilic enzymes; hot topics in cold adaptation. *Reviews* 1: 200-208.

Feller G., d'Amico D. and Gerday C. (1999). Thermodynamic stability of a cold-active α -amilase from the Antarctic bacterium *Alteromonas haloplanctis*. *Biochem.* 38:4613-4619.

Feller G., Narinx E., Arpigny J.L., Aittaleb M., Baise E., Genicot S. and Gerday C. (1996). Enzymes from psychrophilic organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 18: 189-202.

Fields P.A. and Somero G.N. (1998). Hot spots in cold adaptation: localised increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A₄ orthologs of Antarctic notothenioid fishes. *Proc. Natural. Acad. Sci.* 95: 11476-11481.

Figueroa Felix L., Nygard Charlotta, Ekelund, Gòmez Ivàn. (2003). Photobiological characteristics and photosynthetic UV responses in two *Ulva* species (*Chlorophyta*) from southern Spain. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*

Geider R. J. and Osborne B. A., (1992). Algal Photo-synthesis. Chapman and Hall Eds.Pp.156-204. New York.ISBN 0-412-02351-2.

Grobbelaar Johan U. and Kurano N. (2003). Use of photoacclimation in the design of novel photobioreactor to achieve high yields in algal mass cultivation. *Journal of Applied Phycology* 15: 121-126.

Inskeep W.P. and Bloom P.R. (1985). Extinction coefficients of chlorophyll *a* and *b* in N,N-dimethylformamide and 80 % acetone. *Plant Physiol.* 77: 483-485.

Kanazawa A., Cowey C.B., Mackie A.M. and Bell J.G (1985). Essential fatty acid requirement. In: (eds.) *Nutrition and Feeding in Fish*, Academic Press, Inc. London, pp. 281-298.

Kobori H., Sullivan C. W., and Shizuya H. (1984). Heat-labile alkaline phosphatase from Antarctic bacteria: rapid 5' end-labelling of nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6691-6695.

Rodolfi L., Chini Zittelli G. Biondi N. and Tredici M. (2006). High surface – To-Volume ratio photobioreactor used at the university Florence for the cultivation of microalgae. *Aqua 2006, Florence*. Pg 795.

Lee Y.K. (1997). Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. *J. Appl. Phycol.* 9 403-411.

Ling H.U. (2001). Snow algae of the windmill islands, continental antarctica: *Desmotetra aureospora*, sp. nov. and *D. antarctica*, Comb. Nov. (*Chlorophyta*). *J. Phycol.* 37: 160-174.

Loppes R., Devos N., Willem S., Barthelemy P. and Matagne R.F. (1996). Effect of temperature on two enzymes from a psychrophilic *Chloromonas* (*Chlorophyta*). *J. Phycol.* 32: 276-278.

Lourenço S. O., Lanfer Marquez U. M., Mancini- Filho J., Barbarino, E. Aidar (1997). Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. *Aquaculture* 148, 153-168.

M. Morita, Y. Watanabe, H. Saiki.(2001). Photosynthetic Productivity of Conical Helical Tubular Photobioreactor Incorporating *Chlorella Sorokiniana* under Field Conditions. *John Wiley & Sons, Inc.*

Madsen T.V. and Mabnerly S. C. (1990). A comparison of air and water as environments for photosynthesis by the intertidal alga *Fucus spiralis*. *J. Phicol.* 26: 24-30.

Megard R.O.,Tonkyn D.W. and Senft W.H.,II (1984). Kinetics of oxygen photosynthesis in planktonic algae. *J. Plankton Res.* 6:325-337.

Miller R.L. and Kamykowski D.L. (1986). Effects of temperature, salinity, irradiance and diurnal periodicity on growth and photosynthesis in the diatom *Nitzschia americana*: light-saturated growth. *J. Phicol.* 22: 339-348.

Moll B.A. and Steinback K. E. (1986). Chilling sensitivity in *Oryza sativa*: the role of protein phosphorylation in protection against photoinhibition. *Plant Physiol.* 80: 420-423.

Morita R.Y. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 39:144-167.

Ning Zou & Amos Richmond (2000). Light-path length and population density in photoacclimation of *Nannochloropsis*. *Journal of Applied Phycology*. 12: 349-354.

Palmisano A.C., SooHoo S.B., and Sullivan C.W. (1987). Effects of four environmental variables on photosynthesis-irradiance relationships in Antarctic sea-ice microalgae. *Mar. Biol. (Berl.)*: 94: 299-306.

Rigano C., Di Martino Rigano V., Vona V., Esposito S., and Di Martino C. (1993). Effect of inhibitors on ammonium assimilation in *Chlorella sorokiniana* in light and darkness. *Physiol. Plant.* 89: 602-606.

Russell N.J. (1992). Physiology and molecular biology of psychrophilic microorganisms. In Herbert, R.A. & Sharp, R.J. [Eds.] *Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles*. Chapman and Hall, New York, pp. 203-204.

Sargent J., Henderson R.J. and Tocher D.R. (1989). The lipids: In: Halver J.E: (ed). *Fish Nutrition* 2th ed. Academic press, Inc. London, pp 798.

Talbot P.,Thebault J.M.,Dauta A. and de la Noue J. (1991).A comparative study and mathematical modelling of temperature,light and growth of three microalgae potentially useful for wastewater treatment. *Water Res.*25:465-472.

Tolomio C., Moschin E., Ceschi Berrini C., Moro I., and De Appolonia (2000). Guida alla conoscenza dei micro-organismi vegetali nelle terme euganee. Centro Studi Termali “Pietro d’Abano” eds. Pp. 3-11. Abano Terme.

Tredici M. R. and Chini Zittelli G. (1998). Efficiency of Sunlight Utilization: Tubular Versus Flat Photobioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 57.2 .187-197.

Tredici M. R. (2006). Photobioreactors : Designs and strategies to achieve 10 % solar energy conversion efficiency trough microalgae cultivation. *AQUA 2006*, Florence, Italy. pg 948.

Vona V., Di Martino Rigano V., Lo bosco O., Carfagna S., Esposito S. and rigano C. (2004). Temperature responses of growth, photosynthesis, respiration and NADH: nitrate reductase in cryophilic and mesophilic algae. *New Phytologist* 163: 325-331.

Watanabe T., Kitajuna C. and Fujita S. (1983). Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*, 34:115-143.

Weissman J.(2006). Microalgae cultivation technologies. Photosynthesis and productivity. Aqua 2006, Florence, Italy.Pg.1007.

Xu Y., Feller G., Gerday C., and Glansdorff N. (2003). Metabolic enzymes from psychrophilic bacteria: challenge of adaptation to low temperatures in ornithine carbamoyltransferase from *Mortella abyssii*. *J. Bacteriol.* 184 : 2161-2168.

You-Chul Jeon, Chul-Woong Cho, Yeoung-Sang Yun (2005). Measurement of microalgal photosynthetic activity depending on light intensity and quality. *Biochemical Engineering Journal* 27: 127-131.