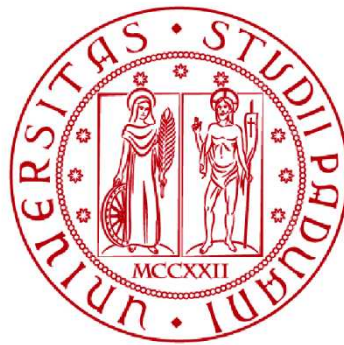


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Scienze Naturali



ELABORATO DI LAUREA

**ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE
DI MICROALGHE VERDI DA SUOLI
DESERTICI**

**Tutor: Prof. Francesco Dal Grande
Dipartimento di Biologia**

**Co-tutor: Prof.ssa Nicoletta La Rocca
Dipartimento di Biologia**

**Dott.ssa Veronica Malavasi
Centro di Ateneo Orto Botanico**

Laureando: Alberto Bortolato

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il Prof. Dal Grande Francesco del Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Padova, per la grande disponibilità e cortesia nell'avermi dato la possibilità di lavorare presso il Centro di Ateneo Orto Botanico.

Ci tengo inoltre a ringraziare sentitamente i miei correlatori Dott.ssa Malvasi Veronica e Prof.ssa La Rocca Nicoletta per l'enorme disponibilità e pazienza dimostratami nell'avermi seguito durante l'attività di tirocinio e nella stesura della tesi, e la collega Alejandra Lopez-Chicheri Yriarte per il costante aiuto nello sviluppo di questo progetto.

Infine, un doveroso ringraziamento va alla mia famiglia e alla mia ragazza, senza i quali questo percorso accademico non sarebbe stato possibile.

È con tutti loro che voglio e devo condividere il merito per la realizzazione di questa tesi di laurea.

RIASSUNTO

Il cambiamento climatico è la forza motrice che conduce all'inesorabile perdita di biodiversità, data dalla forte dipendenza tra quest'ultima e i principali processi ecosistemici. Più del 40% della terraferma è occupata dalle "drylands", zone desertiche con indice di aridità (AI) inferiore a 0.65, dove risulta fondamentale la presenza delle comunità microbiche per quel che riguarda i cicli di carbonio e azoto strettamente legati alla fertilità del suolo. Le alghe verdi unicellulari ricoprono un ruolo cruciale all'interno di tali comunità in termini di produzione primaria, ciclo dei nutrienti, formazione e modifiche alla struttura del suolo; nonostante ciò, la flora microalgale fototrofica è rimasta per anni una delle componenti meno studiate delle comunità microbiche. La mancanza di una vera ed abbondante letteratura a riguardo, unita al loro grande potenziale in ambito biotecnologico, rende le microalghe verdi un campo di ricerca tanto interessante quanto potenzialmente fondamentale nella limitazione e nel monitoraggio della perdita di biodiversità. L'obiettivo di questo studio è quello di investigare la biodiversità algale di campioni di suolo provenienti da numerose zone aride di tutto il mondo, raccolte nell'ambito del progetto BIODESERT, coltivando in vitro questi organismi fotosintetici e caratterizzandoli con osservazioni morfologiche e tecniche di biologia molecolare. Nello specifico, le varietà isolate vengono caratterizzate geneticamente mediante ITS2-DNA barcoding al fine di poterle identificare a livello di genere o specie. Tali analisi vanno considerate come un primo screening per la caratterizzazione della diversità microalgale, nel contesto di ricerca di una convergenza adattativa comune ai diversi ceppi di microalghe verdi di questi ambienti aridi.

Parole chiave: ambienti estremi, Chlorophyta, filogenesi

Sommario

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Comunità microbiche del suolo desertico	2
1.2 Microalghe	3
1.2.1 Microalghe desertiche	4
1.3 Sistematica delle alghe verdi oggetto di studio.....	4
2. SCOPO.....	7
3. MATERIALI E METODI.....	7
3.1 Campioni di suolo	7
3.2 Preparazione terreno di coltura.....	9
3.3 Preparazione colture con campioni di suolo	10
3.4 Microscopia	11
3.5 Analisi molecolari	11
3.5.1 Costruzione albero filogenetico	12
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	12
4.1 Colture algali	12
4.2 Osservazioni al microscopio ottico	14
4.3 Risultati delle analisi molecolari	15
6. BIBLIOGRAFIA	19

1. INTRODUZIONE

Sebbene non vi sia un accordo generale su come definire un ambiente estremo, il termine viene comunemente utilizzato per indicare qualsiasi ambiente che presenti condizioni di vita dannose o fatali per l'uomo e per gli organismi superiori. Si tratta infatti di ambienti in cui le condizioni fisico-chimiche differiscono significativamente da quelle che l'uomo considera normali, quali temperature comprese tra 20 e 35 gradi, pH neutro, pressioni di circa 1 atm, bassa salinità e adeguate concentrazioni di nutrienti (Madigan & Mairs, 1997).

Il deserto è sempre stato inteso dall'essere umano come un luogo inospitale, principalmente per le sue condizioni estreme di calore, aridità, irraggiamento solare, mancanza di risorse idriche e scarsità di nutrienti.

Nello specifico, si definiscono “drylands” zone aride o semi aride con un indice di aridità ($AI = \text{precipitazioni medie annue} / \text{evapotraspirazione media annua}$) inferiore a 0.65.

Gli ambienti che superano periodicamente o costantemente i 40°C vengono chiamati ambienti estremamente caldi (Stetter, 1998). Si chiamano termofili quegli organismi che mostrano una crescita ottimale tra i 45 e gli 80°C, ipertermofili quando la crescita ottimale si verifica al di sopra degli 80°C, mentre gli organismi che dipendono da temperature moderate tra 10°C e 50°C (ottimale 30-40°C) sono chiamati mesofili (Martinko & Madigan, 2006).

La mancanza di acqua “libera” classifica un habitat come estremamente arido; a tale categoria appartengono deserti caldi e freddi e alcuni ecosistemi endolitici terrestri. Gli organismi che dipendono da ambienti molto secchi sono definiti xerofili.

La crescente attenzione verso i temi ambientali non è altro che una delle conseguenze della profonda crisi che sta attraversando il rapporto uomo-ambiente. Il reiterato utilizzo di combustibili fossili, la deforestazione con fini agricolo-industriali e l'allevamento intensivo di bestiame, nati con l'obiettivo di migliorare la qualità della nostra vita, stanno pesantemente alterando il processo di cambiamento climatico, con conseguenze tanto catastrofiche quanto sempre più visibili. L'aumento della temperatura media, crescente oramai di anno in anno, ha accelerato il processo di desertificazione palesando al mondo la necessità di trovare una soluzione se non definitiva quantomeno palliativa (oppure quanto più risolutiva possibile).

Per riuscire ad elaborare una risposta pratica, si deve partire da un approfondito studio delle cause; ad esempio, l'allevamento di bestiame è il principale scopo/fine di utilizzo delle “drylands” di tutto il mondo, ed allo stesso tempo risulta essere uno dei fattori più influenti nel processo di desertificazione (Xu *et al.*, 2011).

Dopo una lenta e quantomai discussa presa di coscienza del critico stato di salute ambientale in cui versa il “nostro” pianeta, dovuto in buona parte ad una scellerata gestione ecologico-ambientale, ciò che fino a qualche decennio fa sembrava essere una landa desolata totalmente priva di un qualsiasi appeal, ora risulta essere un importante luogo di studio.

L'obiettivo della ricerca riportata in questa tesi è lo studio di una parte delle microalghe verdi del suolo che hanno adattato la propria fisiologia alla sopravvivenza nelle drylands. Queste aree sono protette dall'erosione da “comunità

microbiche del suolo” o “croste biologiche” formate da batteri (cianobatteri ed eterotrofi), alghe, muschi, epatiche, funghi e licheni (Maestre *et al.*, 2011). Tali strutture biologiche, che popolano i primi centimetri di suolo, sono fondamentali per stabilizzare il suolo sottostante, regolare i cicli dell’acqua e fornire nutrienti al resto delle comunità sotterranee.

In questo contesto, l’implementazione di tecnologie innovative basate sullo sviluppo di consorzi di cianobatteri con batteri o funghi o microalghe o loro biofilm per la produzione e l’estrazione di vari prodotti (ad esempio sostanze polimeriche extracellulari (EPS) da utilizzare nella produzione di biofertilizzanti/biostimolanti amplierebbe il loro campo di utilizzo.

È noto, infatti, come i composti EPS contribuiscano alla formazione di aggregati del suolo, migliorandone la stabilità superficiale e riducendone l’erosione.

In particolare, un’ampia gamma di microalghe e cianobatteri ha sviluppato capacità di autoprotezione per sostenere la propria sopravvivenza in questi ambienti difficili. I meccanismi specifici di autoprotezione delle alghe nelle zone aride e semiaride includono la biosintesi di antiossidanti, la secrezione di EPS e il riposo delle cisti in condizioni difficili.

Recentemente, si sta diffondendo l’idea di utilizzare la crosta biologica del suolo (BSC) a base di alghe per il controllo della desertificazione nelle zone aride e semi-aride (Lu *et al.*, 2022).

Inoltre, questo studio si inserisce all’interno di un’ampia indagine sul campo che mira a creare una rete di monitoraggio nelle aree aride del mondo per valutare come i cambiamenti simultanei del clima e della pressione di pascolo influenzino sia gli attributi biotici (comunità sopra e sotto il suolo) sia la multifunzionalità dell’ecosistema (cioè la fornitura di diversi processi ecosistemici) nelle zone aride globali.

1.1 Comunità microbiche del suolo desertico

Globalmente i deserti occupano più di un quarto della superficie terrestre, con un tasso di crescita decisamente accelerato a causa del surriscaldamento globale (Zhou and Wang, 2016). Si tratta di un bioma caratterizzato da condizioni estreme, quali alte temperature, bassa umidità, scarsa reperibilità di materia organica, in grado di condizionare la fisiologia di tutti gli esseri viventi presenti al suo interno influenzare la composizione delle comunità microbiche del suolo desertico e la loro attività (Belnap *et al.*, 2005; Saul-Tcherkas *et al.*, 2013).

Negli ultimi decenni, da quando Friedmann illustrò la natura delle comunità microbiche dei suoli desertici e la relativa fisiologia (Friedmann, 1980), numerose indagini sono state condotte per comprendere al meglio l’importanza di queste interazioni. La necessità di sfruttare anche queste zone aride del mondo per scopi agricoli, vista la forte riduzione di terre fertili disponibili causata da un vertiginoso tasso di urbanizzazione, oltre che dalla sempre crescente domanda di risorse alimentari, ha rappresentato un’ulteriore spinta per la ricerca scientifica in questa direzione (Perera *et al.*, 2018).

Negli ecosistemi aridi e semi-aridi, la disponibilità di acqua e di materia organica sono tra i maggiori fattori limitanti per la produzione primaria e per l’abilità delle comunità microbiche del suolo di adempiere alle proprie funzioni biologiche. Per questo motivo alcune piante ed il consorzio microbico del suolo hanno sviluppato

capacità adattative che permettono loro non solo di superare le condizioni estreme di questo tipo di ambiente (Saul-Tcherkas *et al.*, 2013), ma, uniti alle proprietà chimico fisiche del suolo, di essere considerati i principali fattori per il mantenimento di una biodiversità vegetale (Yang *et al.*, 2021) ancora in gran parte da scoprire.

Per fare un esempio tangibile, i batteri delle biocroste sono in grado di ridurre lo stress ambientale di molte piante aumentandone la resistenza radicale grazie a particolari secrezioni (Yang *et al.*, 2021).

Dal canto loro, alcuni funghi patogeni regolano il mantenimento della biodiversità vegetale riducendo il tasso di sopravvivenza di semi e piantine conspecifici in aree ad alta densità conspecifica (Packer & Clay, 2000).

In generale si può dire che la presenza di un consorzio di organismi, fotosintetici e non sulla superficie del deserto o all'interno del suolo, supporta la ritenzione idrica, riduce l'erosione, aumenta la stabilità del suolo, e la disponibilità di nutrienti per le piante (Subashchandraboze *et al.*, 2013).

1.2 Microalghe

Si definiscono “microalghe” organismi eucarioti, fotoautotrofi e microscopici unicellulari (tra 1 e 50 μm) che possono aggregarsi in colonie o vivere come singole cellule. Le microalghe sono molto diffuse non solo in habitat acquosi, come l'acqua dolce o l'ambiente marino, ma sono molto comuni e abbondanti anche in diversi habitat terrestri (Rindi *et al.*, 2010; Ettl & Gärtner, 2014).

Questi microorganismi autotrofi producono lipidi ed acidi grassi che fungono da componenti di membrana, prodotti di stoccaggio, metaboliti e fonti di energia. Questi organismi possiedono alcune caratteristiche che li rendono potenzialmente molto utili all'essere umano, come un'alta efficienza riproduttiva, crescita rapida e la possibilità di indurre la produzione di grandi concentrazioni di metaboliti commercialmente validi (Tan *et al.*, 2011).

Per questo motivo le microalghe vengono reputate “fabbriche cellulari” capaci di convertire l'anidride carbonica in potenziali biocarburanti, alimenti e mangimi ad alto valore energetico (Chisti, 2007).

Considerando che già dall'inizio del secolo scorso si è cominciato a guardare alle microalghe con un certo interesse, supponendo che potessero essere utilizzate per arricchire terreni impoveriti e foraggio per il bestiame (Maymone, 1952), la conoscenza di queste forme di vita risulta essere tutt'altro che completa. È negli ultimi decenni però che la scienza ha iniziato a svelare i grandi vantaggi di questi organismi: in ambito agricolo, ad esempio, è stato appurato che la loro coltivazione, pur avvenendo in un mezzo acquatico, necessita di meno acqua delle coltivazioni tradizionali, oltre a non richiedere l'utilizzo di pesticidi (Rodolfi *et al.*, 2009).

Da un punto di vista strettamente economico, i prodotti delle microalghe dal più alto valore commerciale, nonché i più futuribili, sono i pigmenti (Koller *et al.*, 2014). Le proprietà antiossidanti di alcuni carotenoidi possono infatti proteggere gli esseri umani da certi tipi di risposte immunitarie nocive, alcune categorie di cancro, invecchiamento precoce e persino diverse malattie di natura cardiovascolare (Malavasi *et al.*, 2020).

1.2.1 Microalghe desertiche

Sebbene siano generalmente note come organismi acquatici, molte microalghe sono in realtà adattate alla vita in ambienti terrestri, talvolta ostili ed estremamente aridi come i deserti. In questi luoghi, dove spesso sono i principali produttori primari, le microalghe proliferano sulla superficie del terreno, sulle rocce e persino nei primi centimetri di suolo, dove l'intensità luminosa può essere molto bassa (Hoffmann, 1989).

La loro popolazione segue un trend stagionale, con un incremento della biomassa e del numero delle specie che raggiunge il picco massimo durante la stagione di crescita, generalmente nel mese di luglio (Starks *et al.*, 1981).

Come già anticipato, insieme ad altri organismi, quali batteri e cianobatteri, le microalghe formano le biocroste, comunità microbiche in grado di sopportare le condizioni estreme offerte dai biomi aridi e semiaridi. Esse si sono adattate a proliferare in luoghi dove le temperature sono molto elevate, l'acqua manca per lunghi periodi di tempo, i nutrienti scarseggiano e il contenuto salino raggiunge livelli molto alti, così come il contenuto salino (Perera *et al.*, 2018).

Se è vero che le condizioni ambientali non possono essere modificate, queste alghe si sono adattate modificando la propria fisiologia. Le elevate temperature, unite alla poca disponibilità di acqua, aumentano la fluidità delle membrane cosicché le cellule, per mantenerle funzionali, devono regolarne la composizione chimica, incluso il contenuto lipidico. Il caldo estremo influisce anche su struttura e funzione delle proteine. I meccanismi sviluppati per proteggersi dai danni foto-ossidativi includono la produzione di antiossidanti ed enzimi detossificanti. Le risposte al disseccamento sono molto simili a quelle adottate per le condizioni di ipersalinità, e prevedono l'accumulo di alcuni soluti lontani in specifiche zone delle cellule, al fine di stabilizzare le condizioni idriche della cellula e delle sue pareti (Rothschild & Mancinelli, 2001).

I processi con cui le alghe che si sono adattate a vivere nel deserto contrastano le condizioni di aridità sono il motivo del loro successo commerciale, poiché le porta a produrre sostanze, come proteine, enzimi e lipidi, con caratteristiche uniche, molto attraenti per le moderne biotecnologie (Satyanaya *et al.*, 2005).

La necessità di proteggere la fertilità dei suoli minacciati dalla desertificazione e dalla pressione di pascolo, passa attraverso un'esaustiva conoscenza dei meccanismi delle biocroste. Da esse infatti dipendono genesi, ricchezza e stabilità del terreno. Di riflesso, ampliare la conoscenza riguardante la diversità delle microalghe, elette ad organismi modello per la comprensione della fisiologia delle comunità microbiche dei suoli desertici, rappresenta un passaggio cruciale. Nonostante ciò, la sistematica delle microalghe terrestri non è stata caratterizzata da una storia di continua e lineare espansione di conoscenza (Johansen *et al.*, 2001).

1.3 Sistematica delle alghe verdi oggetto di studio

Le microalghe verdi sono state classificate per lungo tempo in base alle caratteristiche morfologiche macroscopiche riguardanti lo stato vegetativo, come la forma e l'organizzazione del tallo (Proschold *et al.*, 2007).

Con il progresso scientifico si sono sviluppate tecnologie in grado di dare definizioni più precise, basate sui caratteri ultrastrutturali e sui risultati di analisi filogenetiche sempre più sofisticate. Da questi studi si sono distinte due principali

linee evolutive nelle alghe verdi, come rappresentato in Figura 1: le Chlorophyta, che comprendono gran parte delle alghe verdi, e le Streptophyta, che comprendono alcune alghe verdi e le piante terrestri (Adl *et al.*, 2012).

In questa indagine, ci concentreremo in particolare sulle classi delle Chlorophyceae e delle Trebouxiophyceae, in quanto contengono i generi e le specie di alghe verdi oggetto di questa tesi.

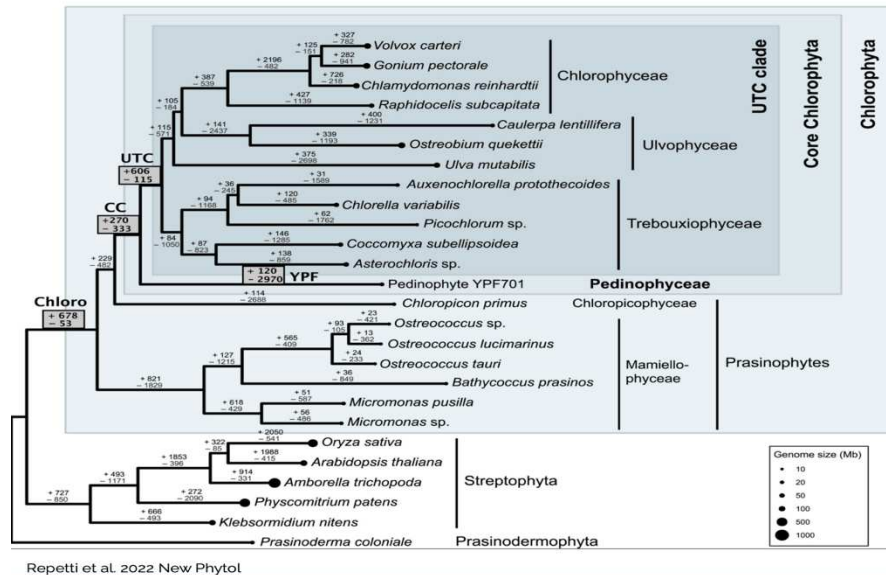


Figura 1. Albero filogenetico delle alghe verdi.

Chlorophyta

Le Clorofite sono un grande divisione che comprende la maggior parte delle alghe verdi (circa 8000 specie), distinte tra loro da un punto di vista ecologico, morfologico e citologico. All'interno di questa divisione si possono trovare forme unicellulari o pluricellulari (talvolta anche coloniali), con diversi tipi di organizzazione del tallo, differenti modalità riproduttive e adattabilità a tutti i tipi di ambiente.

Le tre classi principali delle Clorophyta sono le Chlorophyceae, le Ulvophyceae e le Trebouxiophyceae (Repetti *et al.*, 2022).

Chlorophyceae

Si tratta di una delle tre classi principali delle Chlorophyta, per numero e varietà di specie, nonché l'unica di cui è stata accertata la monofilia grazie a studi filogenomici dei cloroplasti e ad analisi sul DNA ribosomiale. Le Chlorophyceae hanno cinque principali ordini, il più ricco dei quali è rappresentato dalle Chlamydomonadales. Queste ultime comprendono un'ampia varietà di alghe unicellulari, coloniali e filamentose, flagellate e non. Alcuni membri di quest'ordine hanno una grande importanza scientifica in quanto utilizzati come organismi modello per comprendere l'evoluzione della multicellularità (Simpson, 2019).

Trebouxiophyceae

A questa classe appartengono alghe verdi molto diverse tra loro sia a livello morfologico (unicellulari, coloniali, laminari e filamentose). Le Trebouxiophyceae hanno colonizzato un ampio ventaglio di habitat, dall'acqua dolce alle acque salate, anche se sembrano comprendere alghe prevalentemente terrestri, in quanto la maggior parte dei suoi membri è stata descritta in habitat secchi esposti all'aria (alghe aeroterrestri), al suolo o in simbiosi con i licheni (Friedl & Rybalka, 2012; Leliaert *et al.*, 2012).

Le Trebouxiophyceae si riproducono esclusivamente asessualmente grazie alla produzione di autospore o zoospore (Lewis & McCourt, 2004).

La presunta monofilia di questa classe è stata smentita da dati genomici dei cloroplasti, i quali hanno permesso di individuare due cladi distinti: le Chlorellales (risolte vicino alle Pedinophyceae, un'altra classe delle Chlorophyta) e le restanti Trebouxiophyceae (dette "core Trebouxiophyceae") (Repetti *et al.*, 2022).

Tra tutte le classi appartenenti alla divisione Chlorophyta, le Trebouxiophyceae sono quella che possiede più specie adattate ad uno stile di vita aerofitico, oltre ad essere tra le più segnalate nei biomi desertici (Fucikova *et al.*, 2014).

2. SCOPO

Con il presente elaborato di laurea si vuole analizzare la comunità microalgale presente in campioni di suoli desertici congelati, al fine di contribuire al progetto BIODESERT che mira ad analizzare l'impatto del pascolo di bestiame (o allevamento intensivo) e del cambiamento climatico nel processo di desertificazione delle zone aridi globali. Nello specifico, lo scopo della tesi è quello di confermare l'effettiva possibilità di una crescita algale a partire da campioni di suoli desertici congelati, con conseguente caratterizzazione quanto più accurata possibile degli organismi presenti.

La ricerca ambisce ad essere un punto di partenza per lo sviluppo di una conoscenza sempre più completa riguardante la biodiversità microalgale che popola le zone aride e semiaride del mondo. Biodiversità che rischia di essere persa assieme a tutto il suo potenziale biotecnologico, ancor prima di poter essere conosciuta.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campioni di suolo

Si precisa che la selezione dei 4 campioni di suolo, congelati all'interno di bustine identificative (figura 2), è stata effettuata in maniera sostanzialmente arbitraria, all'interno di un gruppo di 14 campioni complessivi.

In tabella 1 sono riportati i campioni di suolo utilizzati con relativo codice identificativo, luogo di provenienza (figura 3) e data di raccolta.



Figura 2. Campioni di suolo crioconservati.

Suolo numero 114: Sayeret Shaked, clima arido, (Israele): situato nel deserto del Negev nord occidentale. La zona è caratterizzata da uno sviluppo collinare e un clima semi-arido. Il suolo da cui è stato prelevato il campione è classificato come Halpic Cambisols (WRB) un terreno immaturo, che deve ancora completare il proprio processo di formazione, prevalentemente derivato da depositi eolici o alluvionali di rocce evaporitiche (gesso) e solitamente ricoperto da uno strato di sabbia argillosa.

Suolo numero 197: Il suolo numero è stato campionato in Sud Africa. Il Lichtenburg, situato nella parte nordoccidentale dello Stato africano, a poco più di un centinaio di chilometri dal confine con il Botswana e a 230 km dalla città di Johannesburg, presenta un clima semi arido. L'area ha un'elevazione di circa 1400 m s.l.m. ed è caratterizzata da un clima steppico, o semi-arido secondo la classificazione Koppen. Da un punto di vista geologico la zona presenta un altipiano piatto. Il suolo è classificato come Halpic Lixosols (WRB), formato da sabbia argillosa con accumulo di argille ad alta saturazione nel sottosuolo. Sebbene non vi siano acque affioranti, questa zona presenta corsi d'acqua sotterranei.

Suolo numero 206: Ciempozuelos, clima semi arido, (Spagna): situato a circa 35 km da Madrid, nella zona centrale della Spagna, ad un'altitudine media di 500 m s.l.m. terreno argilloso. L'intera area, dove colline aspre e brulle separano pianure semi-aride. Il suolo è classificato come Petric Calcisols (WRB), composto da argilla ghiaiosa grigio-giallastro sovrastante uno strato di suolo argilloso indurito, a forte componente calcarea.

Suolo numero 237: Guelb Fguira, clima arido, (Tunisia): situato alle porte del Parco Nazionale di Jbil, in uno dei lobi più settentrionali del deserto del Sahara. Il campione è sabbioso, in linea con le caratteristiche litotipiche del suolo classificato come Halpic Lepsostol da World References Base for Soil Resources (suolo molto sottile e superficiale su roccia continua, alternato a un suolo ricco di elementi ghiaiosi/sassosi).

Nome	Colore	Luogo di provenienza	Sito	Data di raccolta	A.I.
FM114	Ocra chiaro	Israele	Sayeret Shaked	04/05/2016	0.1079
FM197	Marrone intenso	Sudafrica	Lichtenburg		0.2921
FM206	Grigiastro	Spagna	Ciempozuelos	09/06/2016	0.2504
FM237	Rossiccio	Tunisia	Guelb Fguira	18/05/2017	0.0638

Tabella 1. Campioni di suolo

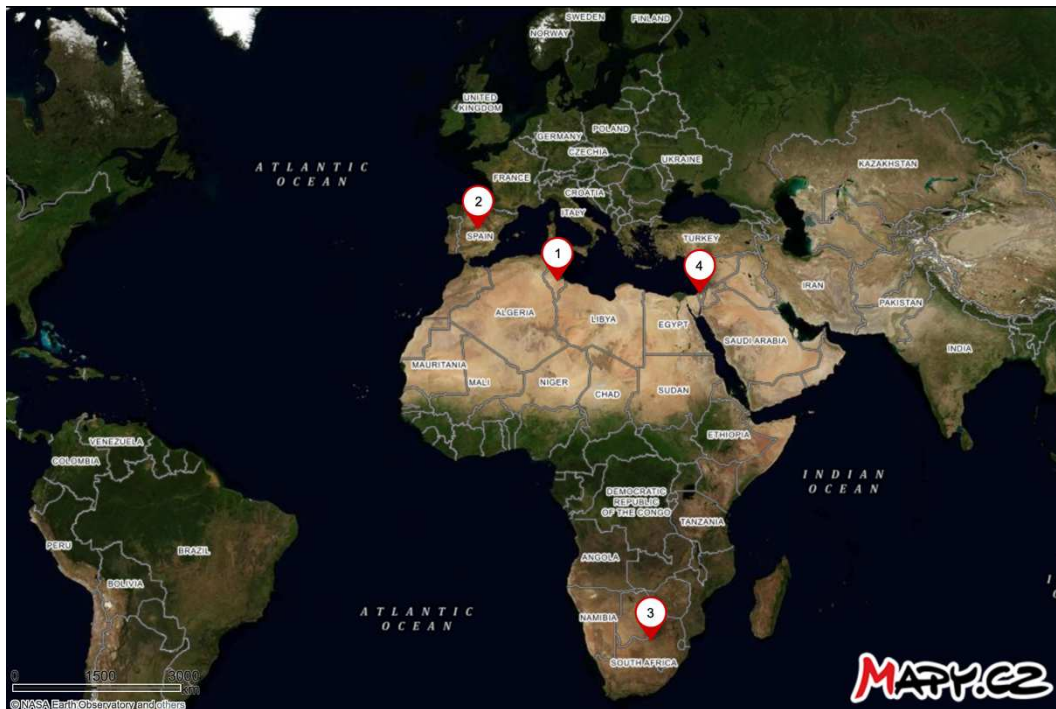


Figura 3. Distribuzione dei siti di raccolta dei campioni di suolo: 1= FM237; 2=FM206; 3=FM197; 4=FM114.

3.2 Preparazione terreno di coltura

Il terreno di coltura utilizzato è il BBM-Medium modificato (Bold's Basal Medium + estratto di suolo + vitamine) al quale è stato aggiunto il fungicida Carbendazim 97% Aldrich, e reso solido con l'aggiunta dell'agarosio (Agar Plantae). Durante tutte le attività in laboratorio si è cercato di lavorare in maniera sterile per evitare contaminazioni.

Il terreno di coltura si è preparato nel seguente modo: sono stati aggiunti 8.8 ml di BBM (Stein 1973) in una bottiglia da 500 ml, portando ad un volume di 200 ml con acqua bidistillata. Sono stati aggiunti 4.4 ml di estratto di suolo, precedentemente centrifugato per 5 minuti, e 8.8 g di Agar Plantae. Per quel che riguarda il fungicida, ne vanno fatti sciogliere per agitazione magnetica 100 mg in 200 ml di acqua bidistillata, prima di aggiungere 0.44 ml di tale soluzione nella bottiglia di terreno di coltura. Una volta portata al volume finale di 440 ml con acqua bidistillata, la bottiglia di terreno è stata autoclavata a 121 °C. Dopo aver autoclavato il terreno di coltura vengono aggiunti 0.44 ml di vitamine (Vitamix 1000) (tabella 2).

Sono state preparate le piastre Petri. Una volta preparate tutte le petri agar, sono state chiuse con il parafilm, e conservate in una cella frigorifera a 18 °C (figura 4).

Componente	Nome prodotto	Concentrazione su litro	Concentrazione per ogni bottiglia da 440 ml
Estratto di suolo		10 ml/L	4.4 ml
Soluzione madre	BBM (Bold's Basal Medium)	20 ml/L	8.8 ml
Agar	Agar Plantae	20 mg/L	8.8 g
Fungicida (sciolto)	Carbendazim (97% Aldrich) + H ₂ O	1 ml/L	0.44 ml
Vitamine	Vitamix 1000	1 ml/L	0.44 ml

Tabella 2. Componenti del terreno di coltura

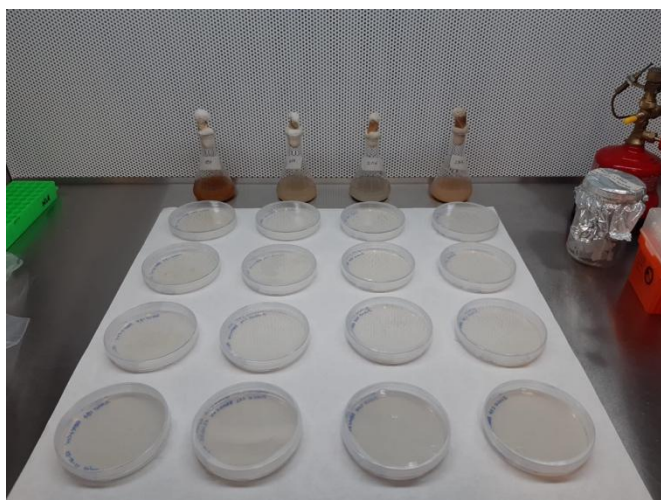


Figura 4. Capsule petri contenenti il terreno di coltura BBM-Medium, e beute contenenti i 4 campioni di suolo in soluzione.

3.3 Preparazione colture con campioni di suolo

500 ml di acqua bidistillata sono stati sterilizzati tramite autoclave, assieme a delle beute da 100 ml.

Sono state pesate con una bilancia di precisione delle Eppendorf da 2 mL per la taratura che saranno utilizzate per la pesa dei suoli. Ciascuna delle 4 Eppendorf è stata riempita con 1.5 g di suolo corrispondente; il contenuto è stato poi spostato all'interno delle beute, contenenti 50 ml di acqua bidistillata.

Il suolo è stato lasciato in agitazione (MST Magnetic Stirrer, Velp Scientifica) per 30 minuti. Successivamente si procede con l'inoculo dei campioni in soluzione

all'interno delle petri. I 4 piatti per ogni campione che sono stati preparati, contengono diverse quantità di suolo in soluzione, 20, 50, 100 e 200 μ l.

In seguito, le petri sono state sigillate con del parafilm, e trasportate in una cella a temperatura controllata a 21°C ed esposte ad illuminazioni costante.

Su ogni petri è stato appositamente riportato il numero identificativo del suolo corrispondente, la quantità di inoculo al suo interno, e la data.

3.4 Microscopia

Per l'osservazione morfologica dei campioni è stato utilizzato un microscopio ottico Leica Microsystem (Schweiz) DM 500, e per acquisire le immagini al computer ci si è avvalsi del programma LASV413. Tali analisi sono state indicative per avere un'idea della natura degli organismi presenti all'interno delle varie colture, pur non essendo sufficienti per una determinazione sistematica. Gli oggetti dell'osservazione al microscopio sono state diverse aliquote di biomassa algale, prelevate da alcune colonie presenti nelle capsule petri. Il prelievo dei campioni algali da osservare è stato effettuato tramite anse sterili. Ogni vetrino è stato osservato e fotografato a diversi ingrandimenti (4X, 40X E 100X), e ciascuna immagine è stata provvista della relativa barra di scala.

3.5 Analisi molecolari

Il DNA è stato estratto dalla biomassa algale delle colonie precedentemente congelata. La parete delle cellule è stata rotta mediante agitazione in un MiniBeadBeater in presenza di quantità equivalenti di microsferi.

Il DNA è stato estratto con Instagene Matrix (Bio-Rad Laboratories, USA).

Dopo l'estrazione il DNA è stato misurato con un nanospettrofotometro (Implen NanoPhotometer, Thermo Fisher Scientific).

L'amplificazione della regione genomica ITS è stata eseguita utilizzando i primers ITS-Cha5 e ITS-Cha4 (Chang *et al.*, 2016). Per l'amplificazione è stata utilizzata una quantità di 25 ng di DNA estratto per ciascun campione in un volume finale di 25 μ l (DreamTaq Green PCR Master Mix 2X; Thermo Scientific).

I campioni sono stati sottoposti a 34 cicli di amplificazione (94°C-30", 55°C-40", 72°C-1') con una denaturazione iniziale a 94°C-4' ed una estensione finale a 72°C-10'. La PCR è stata eseguita con un labcycler (Q-Cycler 96, Hain Lifescience UK Ltd).

I prodotti di PCR (3 μ l) sono stati sottoposti a elettroforesi su gel di agarosio (1%) e visualizzati sotto luce UV (figura 5).

Il prodotto della PCR è stato purificato con Exosap (ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent, Applied Biosystem™).

Il prodotto di PCR purificato è stato inviato per il sequenziamento ad Eurofins Genomics (Ebesberg, Germany). I risultati del sequenziamento sono stati confrontati con il database NCBI GenBank utilizzando il Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) per l'identificazione delle microalghe.

3.5.1 Costruzione albero filogenetico

Le sequenze sono state controllate utilizzando SeqAssem (Hepperle, 2004) e successivamente allineate con le sequenze omologhe utilizzando il software MEGA11 (Tamura *et al.* 2021). In seguito, gli allineamenti delle sequenze del gene ITS sono stati ulteriormente migliorati utilizzando il programma MAFFT (Katoh *et al.*, 2019).

Nel presente studio gli alberi evolutivi sono stati ottenuti mediante l'applicazione del metodo di ricostruzione filogenetica Maximum Likelihood (ML).

Le regioni spaziatrici ITS sono comprese tra unità trascrizionali conservate ovvero il 18S, 5.8S e il 28S. L' ITS1 è localizzato tra il gene 18S e il 5.8S, mentre l'ITS2 tra il gene 5.8S e il 28S (figura 5).



Figura 5. rDNA in cui sono evidenziati i geni 18S, 5.8S e 28S, gli spaziatori trascritti interni (ITS) e le zone extrageniche.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Colture algali

Durante le prime 3 settimane la crescita della biomassa algale si è dimostrata costante per i campioni FM197 e 206. Il campione FM237 non ha invece prodotto colonie significative in nessuna delle capsule Petri, motivo per cui non si è proceduto con il trasferimento delle colonie nelle multiwell da 6 pozzetti (Plate 6 Well Standard F, SARSTED) in agar. Il campione FM114 è stato caratterizzato da una crescita molto più lenta rispetto agli altri, motivo per cui è stato escluso dalle analisi della presente ricerca di tesi.

A distanza di circa un mese la maggior parte dei piatti di coltura dei campioni FM197 e FM206 ha dimostrato una buona quantità di biomassa. Le capsule del campione FM114 hanno dimostrato una crescita pressoché nulla, mentre in quelle di FM237 non si è intravisto alcun segno di vita algale. In alcuni dei campioni con maggior quantità di biomassa è stata osservata contaminazione fungina e batterica. Per questo motivo si è deciso di procedere con l'isolamento delle colonie contaminate tramite l'utilizzo di due multi-well da sei pozzetti ciascuna, una per le colonie del FM206 e una per le colonie del FM197, riempite con lo stesso terreno di coltura utilizzato in precedenza.

Il prelievo di un'aliquota delle colonie contaminate e il conseguente trasferimento all'interno dei pozzetti ha portato buoni risultati in termini di riprese della crescita. Nonostante ciò, il contaminante fungino si è trasferito in due dei sei pozzetti della multiwell, non compromettendo però, almeno in apparenza, lo sviluppo delle microalghe al suo interno.

Dopo alcune settimane, tutte le Petri di due campioni su quattro hanno sviluppato una buona quantità di crescita algale, con colonie macroscopicamente eterogenee anche all'interno dello stesso piatto di coltura. I piatti di coltura di FM114 hanno iniziato a sviluppare qualche colonia di dimensioni molto ridotte e con un tasso di crescita molto basso rispetto alle altre. La situazione è rimasta statica per quanto riguarda FM237.

Alcune colonie hanno mostrato, ad un'osservazione macroscopica, una colorazione rosso-arancione, solitamente collegata alla produzione di pigmenti secondari quali i carotenoidi.

Sulla base di osservazioni al microscopio ottico, dalle capsule Petri e dalle multiwell dei 2 campioni di suolo validi, un'aliquota della biomassa di 10 diverse colonie è stata isolata in altrettante provette contenenti lo stesso terreno di coltura solido. È bene sottolineare come le colonie siano state selezionate in maniera del tutto arbitraria dal sottoscritto.

Tali provette hanno lo scopo di contenere una singola colonia ciascuna, isolando così ogni specie dalle altre (tabella 3).

Tabella 3. Campioni isolati per le analisi molecolari.

Campione di suolo	Numero identificativo (ID) della colonia
FM206	1
FM206	2
FM206	3
FM197	4
FM206	5
FM206	6
FM197	7
FM197	8
FM206	9
FM197	10

4.2 Osservazioni al microscopio ottico

L'analisi morfologica di tutte le colonie è stata eseguita tramite microscopia ottica.

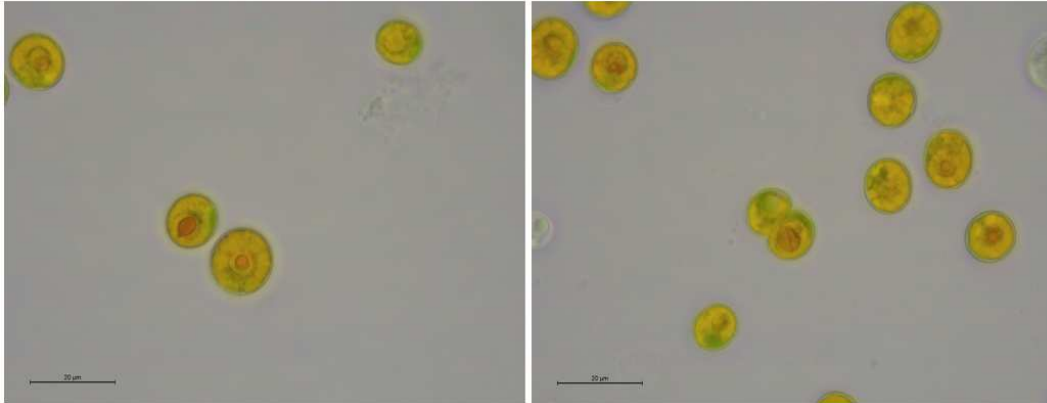


Figura 6. Coltura di *Heterochlamydomonas* sp. in terreno solido di diverse settimane; le cellule hanno perso i flagelli e si sono arricchite di metaboliti secondari (carotenoidi) che conferiscono loro un colore giallo/arancione

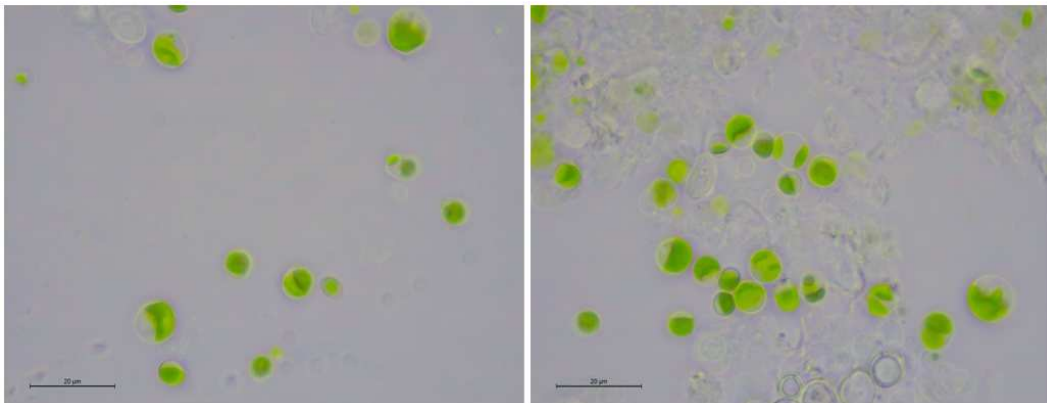


Figura 7. Coltura di *Pleurastrum insigne* in terreno solido di diverse settimane

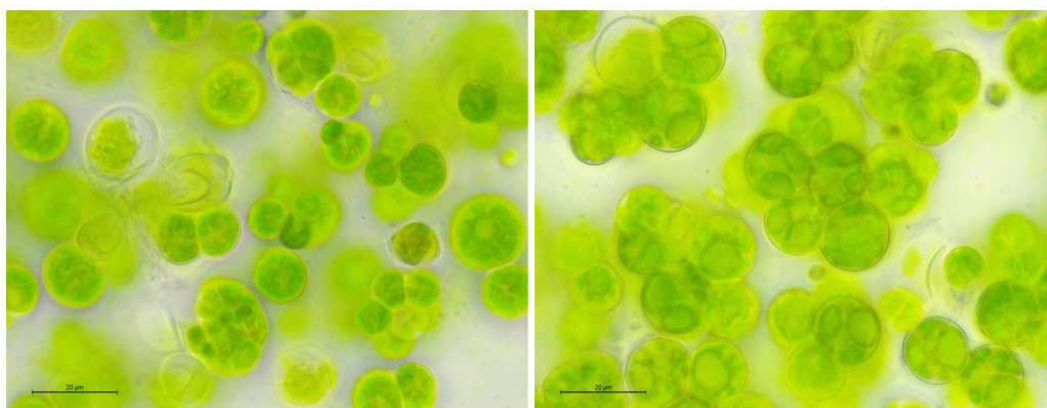


Figura 8. Coltura di *Myrmecia israelensis* in terreno solido di diverse settimane.

4.3 Risultati delle analisi molecolari

Il confronto delle regioni ITS e le seguenti analisi filogenetiche hanno portato all'individuazione di un genere e due specie.

Le sequenze di tutti i *taxa* sono state allineate utilizzando Mega11 (Tamura *et al.* 2021). Le relazioni evolutive sono state dedotte da questo allineamento multiplo di sequenze utilizzando il metodo maximum likelihood (ML) come implementato in IQTree v1.5.5 (Minh *et al.*, 2020) con selezione standard del modello e 1.000 repliche bootstrap. Gli alberi risultanti (figura 9, 10 e 11) risultanti sono stati visualizzati utilizzando FigTree 1.3.1 (Rambaut 2010).

- **ID 8** Suolo 197 South Africa: *Pleurastrum insigne*

Questa specie appartiene al genere *Pleurastrum* e alla classe delle Chlorophyceae (figura 10). Venne campionata e descritta per la prima volta dal francese Chodat, che la prelevò da un vaso di fiori in una cittadina svizzera nei pressi di Ginevra (Chodat, 1894).

Il genere *Pleurastrum* è stato al centro di numerosi dibattiti nel corso degli anni a causa della sua grande variabilità fenotipica tra le diverse specie al suo interno. Infatti, a questo taxon sono state attribuite cellule solitarie coccoidi, forme filamentose più complesse e anche aggregati cellulari pseudoparenchimatici. Al momento *Pleurastrum* risulta essere l'unico genere della famiglia delle Pleurastraceae, sotto l'ordine Chlamydomonadales, e *Pleurastrum insigne* rappresenta una delle quattro specie che ne fanno parte (Sciuto *et al.*, 2023).

Per quanto riguarda l'applicazione biotecnologica, uno studio innovativo condotto da Van Lal Chandama e Saytan ha evidenziato il grandissimo potenziale di *P. insigne*, per la produzione di biodiesel e per il trattamento delle acque reflue. Coltivando questa specie si è potuto osservare una riduzione sostanziale del contenuto di azoto e fosforo nelle acque reflue all'interno delle quali è stato coltivato. Inoltre, *Pleastrum insigne* ha mostrato un'alta percentuale di acidi grassi C16 e C18, sostanze molto adatte per la produzione di un carburante di alta qualità (Van Lal Chandama e Saytan, 2022).

Dalle analisi molecolari si è potuta osservare una percentuale di assomiglianza del 96% con il ceppo *Pleurastrum insigne* isolato in India (MG940908.1).

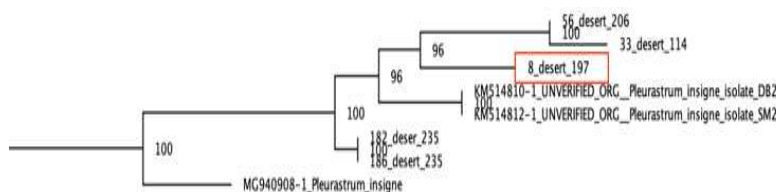


Figura 9. Albero filogenetico *Pleurastrum insigne*

- **ID 12** Suolo 114 Israel: *Myrmecia israelensis*

Myrmecia israelensis è stata descritta tradizionalmente come microalga verde coccoide, appartenente alla classe delle Trebouxiophyceae, campionata e descritta per la prima volta da Chantanachat & Bold (1962) all'interno di depositi di gesso del deserto del Negevev. È il principale ficobionte di alcune specie di licheni della famiglia delle Verrucariaceae. Il tallo è caratterizzato da un cloroplasto parietale tripartito, lobato, e senza pirenoide. (Moya *et al.* 2018). Specie appartenenti al genere *Myrmecia* sono state campionate in diverse aree a clima arido del mondo, come ad esempio nel deserto dell'Atacama, dove queste alghe unicellulari formano aggregati sciolti (Samolov *et al.* 2020).

La massima percentuale d'identità, ottenuta dal confronto ITS in GenBank è del 92% con il ceppo *Myrmecia israelensis* TUK_PD (KY981695.1) isolata in Turchia (Moya *et al.* 2018). Ulteriori analisi sono in corso al fine di valutare se il campione isolato possa essere nuova specie.

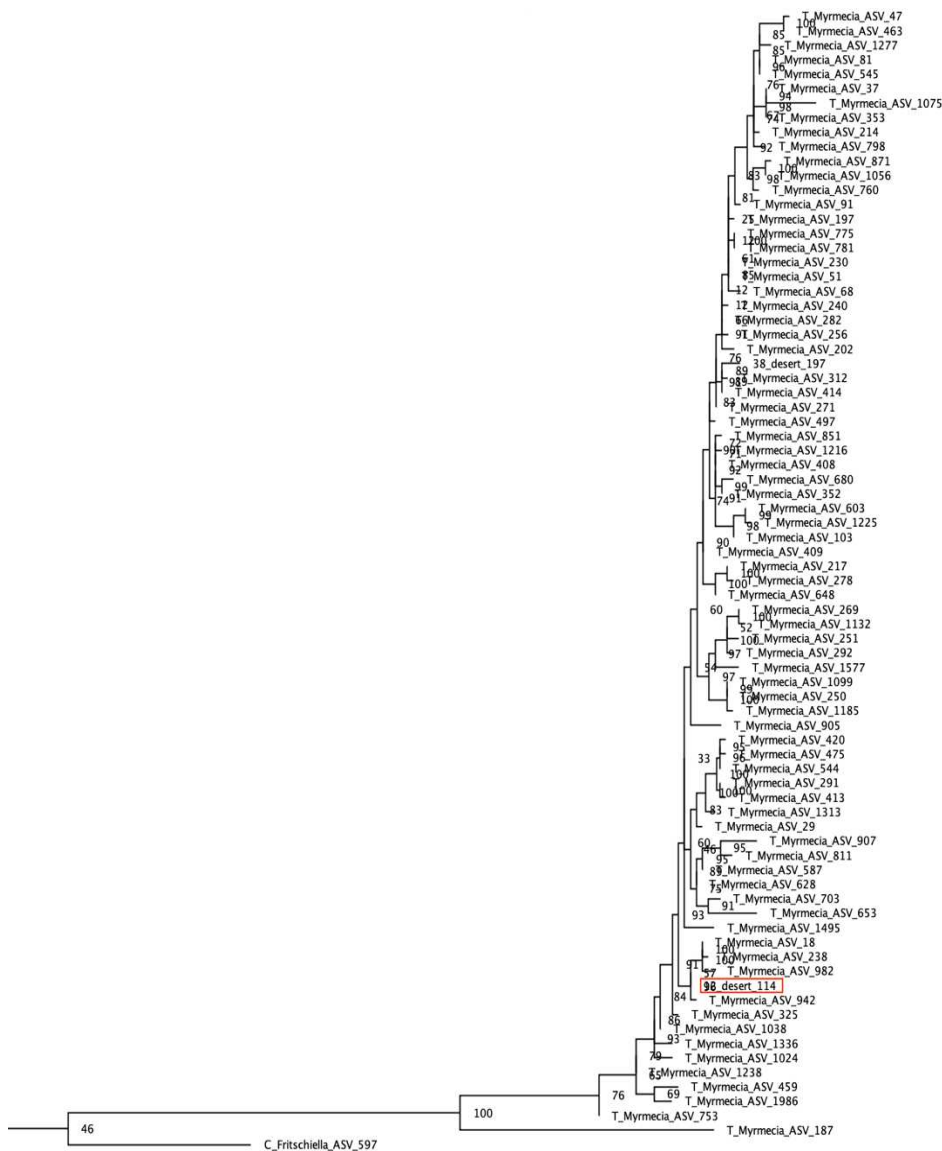


Figura 10. Albero filogenetico *Myrmecia israelensis*

- **ID 1 Suolo 206 Spain: *Heterochlamydomonas* sp.**

Il genere, appartenente alla classe delle Chlorophyceae, comprende un piccolo gruppo di alghe verdi unicellulari. *Heterochlamydomonas* è caratterizzato da talli unicellulari ellissoidali, con polo posteriore arrotondato e smussato, corpi basali paralleli, due vacuoli contrattili anteriori e un singolo nucleo posizionato vicino all'estremità anteriore (Cox and Deason, 1969). La somiglianza con il genere *Chlamydomonas* è evidente sia a livello di morfologia delle cellule vegetative, che a livello di analisi genetico-molecolare (Novakovskaya *et al.*, 2023). Entrambi i generi formano un clade separato (Reinhardtina), divergente da molte altre Chlamydomonades unicellulari, ed entrambi hanno cellule mobili dotate di due flagelli. Sia *Chlamydomonas* che *Heterochlamydomonas* sono provviste di cloroplasti dotati di pirenoidi (Watanabe, 2020). Nonostante ciò, il genere *Heterochlamydomonas*, campionato per la prima volta nel 1969 da Cox e Deason in Tennessee, si distingue per la presenza di corpi basali paralleli e pareti sottili nelle zoospore e nelle cellule vegetative, flagelli di diversa lunghezza e fibre distali non striate. Tutte le specie sinora caratterizzate di questo genere sono adattate alla vita nel suolo, e molte sono state segnalate in ambienti con condizioni estreme. Ad ogni modo, i recenti studi evidenziano come l'attuale conoscenza del genere sia ancora fortemente incompleta (Novakovskaya *et al.*, 2023). Specie appartenenti al genere *Heterochlamydomonas* sono state segnalate e campionate in zone aride e semiaride del Cile (Samolov *et al.*, 2020). La percentuale d'identità ottenuta dal confronto ITS in GenBank è del 100% con il ceppo *Heterochlamydomonas* sp. SG003-14 (MT735195.1) isolata in Cile (Samolov *et al.* 2019).

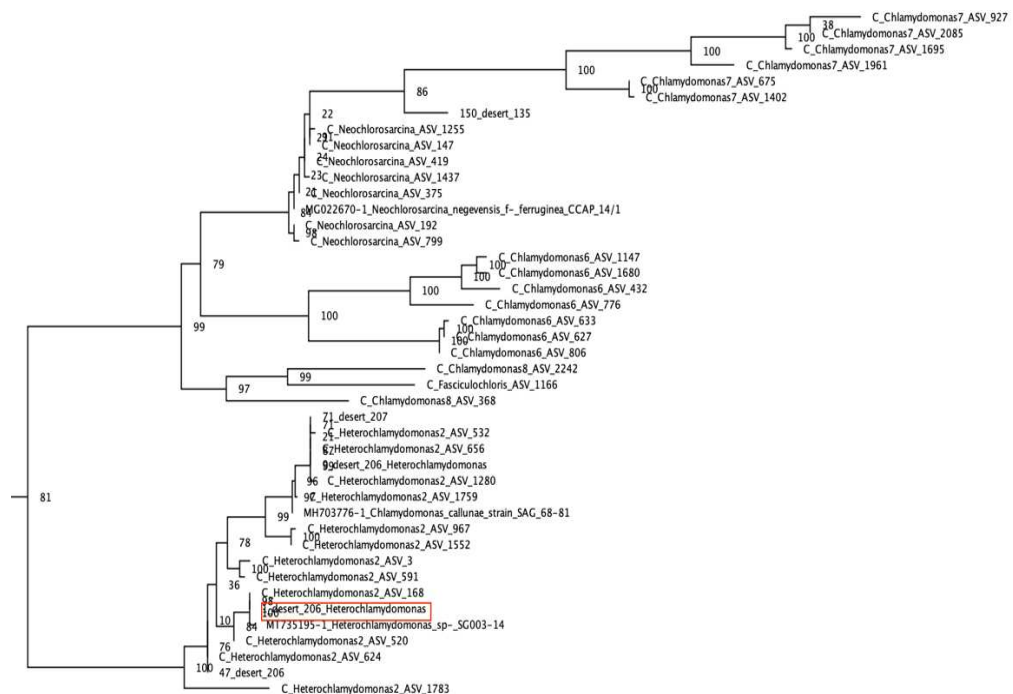


Figura 11. Albero filogenetico *Heterochlamydomonas* sp.

5. CONCLUSIONI

La modalità di conservazione dei campioni di suolo tramite congelamento si è dimostrata efficiente. D'altronde, sulla base di studi precedenti, non vi erano particolari ragioni per le quali le microalghe non potessero essere crioconservate con successo. Si può stimare che ulteriori ricerche sui meccanismi di danno da congelamento continueranno ad espandere il numero e la diversità di taxa algali che possono essere crioconservati con successo (Day, 2007).

L'isolamento e la caratterizzazione di nuovi ceppi, in particolare da ambienti aridi e semiaridi, sono operazioni fondamentali per migliorare l'efficienza complessiva dei processi algali commerciali. Le microalghe desertiche verranno valutate sulla base della produttività di biomassa a condizioni ambientali estreme, con lo scopo di identificare quante più specie possibili per l'applicazione commerciale, specialmente nelle regioni tropicali e subtropicali (Schipper *et al.*, 2019).

La loro capacità di sintetizzare metaboliti secondari con potenziale azione biopesticida, ossia di controllo rispetto alla proliferazione di organismi nocivi per la crescita di specie di interesse agroalimentare, rappresenta il futuro per un'agricoltura sostenibile, oltre che per un graduale ripristino delle caratteristiche del suolo compromesse da anni di utilizzo di prodotti agrochimici (Costa *et al.* 2019).

Inoltre, le specie isolate durante lo svolgimento di questa tesi sperimentale possiedono un valore tassonomico potenzialmente utile a successivi studi approfonditi sui loro adattamenti agli ambienti estremi nei quali sono state campionate. Esse potrebbero contribuire allo sviluppo di una ceppoteca presso il Centro di Ateneo Orto Botanico di Padova, proposta che si andrebbe ad aggiungere a diverse altre iniziative internazionali che mirano a generare genomi di riferimento in rappresentanza della biodiversità globale. Genomi di questo tipo contribuirebbero all'ottenimento di analisi più complete, fornendo informazioni uniche e precise sulla diversità della popolazione, rivoluzionando così l'attuale mondo della genomica della conservazione (Formenti *et al.*, 2022).

Il recente sviluppo di biotecnologie che prevedono l'inoculo di comunità microbiche all'interno di suoli aridi o impoveriti, è finalizzato all'inversione del processo di degradazione. Ampliare il ventaglio di conoscenze riguardo le specie di microalghe che fanno parte delle biocroste, risulta un passo fondamentale per l'avanzamento delle ricerche avanzate in questa direzione (Zhao *et al.*, 2019).

6. BIBLIOGRAFIA

Adl, S. M., *et al.* (2012), *The Revised Classification of Eukaryotes*. Journal of Eukaryotic Microbiology, vol. 59, fasc. 5, pp. 429-514.
<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x>

Belnap, J., Welter, J.R., Grimm, N.B., Barger, N., Ludwig, J.A., (2005). *Linkages between microbial and hydrologic processes in arid and semiarid watersheds*. Ecology 86(2):298–307.
<https://doi.org/10.1890/03-0567>

Chantanachat, S. & Bold, H.C. (1962): Phycological studies II. Some algae from arid soils. – 74 pp., Publications No. 6218, University of Texas

Chisti, Y. (2007). *Biodiesel from microalgae*. Biotechnology advances, 25(3), 294-306.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>

Chodat, R. (1894). *Materiaux pour servir a l'histoire des Protococcoidées*. Bulletin de l'Herbier Boissier 2: 585-616.

Costa, J. A. V., Freitas, B. C. B., Cruz, C. G., Silveira, J., & Morais, M. G. (2019). *Potential of microalgae as biopesticides to contribute to sustainable agriculture and environmental development*. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 54(5), 366-375.
<https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1571366>

Cox, E.R. & Deason, T.R, (1969). *Heterochlamydomonas, a new alga from Tennessee*. Journal of the Tennessee Academy of science 44: 105-107.

Day, J.G. (2007). *Cryopreservation of Microalgae and Cyanobacteria*. In: Day, J.G., Stacey, G.N. (eds) Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology™, vol 368. Humana Press.
<https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2>

Ettl, H., & Gärtner, G. (2014). *Syllabus der boden-, luft-und flechtenalgen*. Springer-Verlag.

Formenti, G., Theissing, K., Fernandes, C., Bista, I., Bombarely, A., Bleidorn, C., ... & Zammit, G. (2022). *The era of reference genomes in conservation genomics*. Trends in ecology & evolution.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2021.11.008>

Friedl, T., & Rybalka, N. (2012). *Systematics of the green algae: a brief introduction to the current status*. Progress in botany.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-22746-2_10

Friedmann EI (1980) Endolithic microbial life in hot and cold deserts. In: Ponnamperuma C, Margulis L (eds) Limits of life. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 33–45.

Fučíková, K., Lewis, P.O., and Lewis, L.A., (2014), *New trebouxiophyceans from deserts*. *Phycol Res*, 62:294-305.

<https://doi.org/10.1111/pre.12062>

Hepperle D. 2004. SeqAssem©. A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences.

<http://www.sequentix.de>

Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A., Minh B.Q., Vinh L.S. (2018) UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol. Biol. Evol.*, 35:518–522.

<https://doi.org/10.1093/molbev/msx281Rambaut>

Hoffmann, L., (1989). *Algae of terrestrial habitats*. *Bot. Rev* 55, 77–105.

<https://doi.org/10.1007/BF02858529>

Johansen, J. R., & Shubert, L. E., (2001). *Algae in soils*. *Nova Hedwigia Beiheft*, 123, 297-306.

Katoh, K., Rozewicki, J. and Yamada, K.D. (2019) *MAFFT Online Service: Multiple Sequence Alignment, Interactive Sequence Choice and Visualization*. *Briefings in Bioinformatics*, 20, 1160-1166.

<https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>

Koller, M., Muhr, A., & Brauneegg, G. (2014). *Microalgae as versatile cellular factories for valued products*. *Algal research*, 6, 52-63.

<https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.002>

Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F., & De Clerck, O. (2012). Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Critical reviews in plant sciences*, 31(1), 1-46.

Lewis, L.A., and McCourt, R.M., (2004). *Green Algae and the Origin of Land Plants*. *American Journal of Botany*, 91: 1535-1556.

<https://doi.org/10.3732/ajb.91.10.1535>

Lu, Q., Xiao, Y., & Lu, Y. (2022). *Employment of algae-based biological soil crust to control desertification for the sustainable development: A mini-review*. *Algal Research*, 65, 102747.

<https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102747>

Madigan, M. T., & Mairs, B. L. (1997). Extremophiles. *Scientific American*, 82-87 doi: 10.1038/scientificamerican0497-82. PMID: 11536798.

Madigan, M. T., & Martinko, J. M. (2006). Microorganisms and microbiology. *Brock biology of microorganisms. 11th ed. Upper Saddle River, New Jersey (NJ): Pearson Prentice Hall*, 1-20.

Maestre, F.T., Bowker, M.A., Cantón, Y., Castillo-Monroy, A.P., Cortina, J., Martínez, I. (2011). *Ecology and functional roles of biological soil crusts in semi-arid ecosystems of Spain*. Journal of arid environments, 75(12), 1282-1291.
<https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2010.12.008>

Malavasi, V., Soru, S., and Cao, G., (2020). *Extremophile microalgae: the potential for biotechnological application*. Journal of phycology, 56:559-573.
<https://doi.org/10.1111/jpy.12965>

Maymone, B., *Zootechnia algale*, Enciclopedia agraria italiana, 1952.

Minh B.Q., Schmidt H.A., Chernomor O., Schrempf D., Woodhams M.D., von Haeseler A., Lanfear R. (2020) IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. Mol. Biol. Evol., 37:1530-1534.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msaa01>

Moya, P., Chiva, S., Molins, A., Jadrná, I., Škalous, P., Peksa, O., and Barreno, E., (2018). *Myrmecia israeliensis as the primary symbiotic microalga in squamulose lichens growing in European and Canary Island terricolous communities*. Fottea, 18 (1), 72-85.
<https://doi.org/10.5507/fot.2017.022>

Novakovskaya, I.V., Boldina, O.N., Shadrin, D.M., Patova, E.N., (2023). *Heterochlamydomonas uralensis sp. nov. (Chlorophyta, Chlamydomonadaceae), New Species Described from the Mountain Tundra Community in the Subpolar Urals (Russia)*. Diversity, 15(5):673.
<https://doi.org/10.3390/d15050673>

Packer, A., Clay, K., (2000). *Soil pathogens and spatial patterns of seedling mortality in a temperate tree*. Nature 404, 278–281.
<https://doi.org/10.1038/35005072>

Perera, I., Subashchandrabose, S.R., Venkateswarlu, K. *et al.*, (2018). *Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria in desert soils: an underexplored microbiota*. Appl Microbiol Biotechnol **102**, 7351–7363.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9192-1>

Proschold, T. and Leliaert, F., (2007). *Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches*. Systematics Association Special Volume, 75, 123.

Rambaut, A. (2010) FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh.
<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

Repetti, S. I., Iha, C., Uthnumallian, K., Jackson, C. J., Chen, Y., Chan, C. X., & Verbruggen, H. (2022). *Nuclear genome of a pedinophyte pinpoints genomic innovation and streamlining in the green algae*. *New Phytologist*, 233(5), 2144-2154.

<https://doi.org/10.1111/nph.17926>

Rindi, F., Allali, H.A., Lam, D.W. and López-Bautista, J.M. (2010). *An overview of the biodiversity and biogeography of terrestrial green algae*. In Rescigno, V. and Maletta, S. (eds) *Biodiversity Hotspots*. Nova Science Publishers, Hauppauge, New York, pp. 105-122.

Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M. R., (2009). *Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor*. *Biotechnology and bioengineering*. 102 (1), 100-112.

<https://doi.org/10.1002/bit.22033>

Rotenberg, E., Yakir, D., (2010). Contribution of Semi-Arid Forests to the Climate System. *Science*, vol. 327, pp. 451-454.

<https://doi.org/10.1126/science.1179998>

Rothschild, L., Mancinelli, R. (2001). *Life in extreme environments*. *Nature* 409, 1092–1101

<https://doi.org/10.1038/35059215>

Samolov E, Baumann K, Büdel B, Jung P, Leinweber P, Mikhailyuk T, Karsten U, Glaser K. (2020). Biodiversity of Algae and Cyanobacteria in Biological Soil Crusts Collected Along a Climatic Gradient in Chile Using an Integrative Approach *Microorganisms*.; 8(7):1047.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms8071047>

Satyanarayana, T., Raghukumar, C., & Shivaji, S. (2005). *Extremophilic microbes: Diversity and perspectives*. *Current Science*, 89(1), 78–90.

<http://www.jstor.org/stable/24110434>

Saul-Tcherkas, V., Unc, A. & Steinberger, Y., (2013). *Soil Microbial Diversity in the Vicinity of Desert Shrubs*. *Microb Ecol* 65, 689–699.

<https://doi.org/10.1007/s00248-012-0141-8>

Schipper, K., Al Muraikhi, M., Alghasal, G.S.H.S. *et al.* (2019). *Potential of novel desert microalgae and cyanobacteria for commercial applications and CO₂ sequestration*. *J Appl Phycol* 31, 2231–2243.

<https://doi.org/10.1007/s10811-019-01763-3>

Sciuto, K., Wolf, M. A., Mistri, M., & Moro, I. (2023). *Appraisal of the Genus Pleurastrum (Chlorophyta) Based on Molecular and Climate Data*. *Diversity*, 15(5), 650.

<https://doi.org/10.3390/d15050650>

Simpson, M. G. (2019). *Plant systematics*. Academic press.

Starks, T. L., Shubert, L. E., & Trainor, F. R. (1981). *Ecology of soil algae: a review*. *Phycologia*, 20(1), 65-80.

<https://doi.org/10.2216/i0031-8884-20-1-65.1>

Stetter, K. O. (1998). *Hyperthermophiles: Isolation, classification, and properties, in Extremophiles*. *Microbial Life in Extreme Environments*, pp 1-24.

Subashchandrabose, S.R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Naidu, R., (2013). *Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation*. *Environ Internat* 51:59–72.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.10.007>

Tamura K., Stecher G., Kumar S., MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol Biol Evol.* 2021 Jun 25;38(7) :3022-3027

Tan, T. et al., (2011). *Engineering Fundamentals of Biotechnology*, in Moo-Young, M., *Comprehensive Biotechnology* (Second edition), 2011.

Van Lal Chhandama, M., & Satyan, K. B. (2023). *Sustainable approach for biodiesel production and wastewater treatment by cultivating Pleusrastrum insigne in wastewater*. *International Journal of Phytoremediation*, 25(5), 679-686.

<https://doi.org/10.1080/15226514.2022.2103092>

Watanabe, S., (2020). *Reclassification of Chlamydomonas monticola as Heterochlamydomonas (Volvocales, Chlorophyceae)*. *Phycological Research*, 68(4), 332-335.

<https://doi.org/10.1111/pre.12431>

Xu, D. et al. (2011). Assessment of the relative role of climate change and human activities in desertification: A review. *J. Geogr. Sci.* 21: 926–936.

<https://doi.org/10.1007/s11442-011-0890-1>

Yang, X., Long, Y., Sarkar, B. et al. (2021). *Influence of soil microorganisms and physicochemical properties on plant diversity in an arid desert of Western China*. *J. For. Res.* 32, 2645–2659.

<https://doi.org/10.1007/s11676-021-01292-1>

Zhao, Y., Jia, R. L., & Wang, J. (2019). *Towards stopping land degradation in drylands: Water-saving techniques for cultivating biocrusts in situ*. *Land Degradation & Development*, 30(18), 2336-2346.

<https://doi.org/10.1002/ldr.3423>

Zhou, C., Wang, K. (2016), *Land surface temperature over global deserts: Means, variability, and trends*. *J. Geophys. Res. Atmos.*, 121, 14,344–14,357.

<https://doi.org/10.1002/2016JD025410>

