



# UNIVERSITÀ DI PISA

---

## BIOTECNOLOGIE DEI PROTISTI

### GRAZIANO DI GIUSEPPE

|                 |               |
|-----------------|---------------|
| Anno accademico | 2018/19       |
| CdS             | BIOTECNOLOGIE |
| Codice          | 377EE         |
| CFU             | 6             |

|                               |           |         |     |                      |
|-------------------------------|-----------|---------|-----|----------------------|
| Moduli                        | Settore/i | Tipo    | Ore | Docente/i            |
| BIOTECNOLOGIE DEI<br>PROTISTI | BIO/05    | LEZIONI | 56  | GRAZIANO DI GIUSEPPE |

#### Obiettivi di apprendimento

##### *Conoscenze*

Al termine del corso lo studente avrà acquisito le conoscenze di base in merito alle logiche di vita e alle caratteristiche biologiche dei rappresentanti del primo grande salto evolutivo nella storia degli esseri viventi, i protisti, e sarà in grado di fornire una panoramica delle principali biotecnologie applicate ad uno degli strumenti di indagine più sofisticati e complessi nella loro duplice natura di cellula eucariotica e di individuo.

##### *Modalità di verifica delle conoscenze*

Per l'accertamento delle conoscenze saranno svolti incontri tra il docente e il gruppo di studenti che sviluppa il progetto.

##### *Capacità*

Al termine del corso lo studente saprà distinguere, sulla base delle principali differenze distintive, i diversi taxa di protisti. Lo studente inoltre sarà in grado di saper applicare le principali metodologie utilizzate per identificare le specie di protisti e di descrivere le diverse fasi procedurali necessarie per allestire un processo microbiologico a livello industriale e basato sull'utilizzo di specie di protisti.

##### *Modalità di verifica delle capacità*

Durante le lezioni saranno affrontati argomenti riguardanti le caratteristiche distintive dei diversi taxa di protisti e alcuni aspetti fondamentali delle biotecnologie microbiche, concentrandosi sull'impiego dei protisti nella produzione di sostanze definite e sulle basi molecolari dei processi produttivi e gli approcci metodologici dei processi industriali, dalla scoperta, allo sviluppo, alla produzione. Durante le sessioni di laboratorio saranno svolte attività pratiche volte all'identificazione di diversi taxa di protisti mediante l'utilizzo delle più moderne tecnologie applicabili al DNA genomico.

##### *Comportamenti*

Lo studente potrà acquisire e sviluppare sensibilità alle problematiche inerenti le biotecnologie microbiche. Lo studente potrà saper comprendere perché alcuni microrganismi siano più validi di altri per specifiche applicazioni biotecnologiche. Lo studente avrà una conoscenza di base di alcuni aspetti salienti dei processi industriali, delle attività principali necessarie per poter lanciare un prodotto sul mercato e degli elementi che contribuiscono al successo di nuove iniziative, quali il mercato potenziale, i costi per lo sviluppo, la produzione vera e propria e lo stato della concorrenza. Saranno acquisite opportune accuratezza e precisione nello svolgere attività di laboratorio volte all'identificazione di taxa di protisti.

##### *Modalità di verifica dei comportamenti*

Durante le lezioni saranno richieste agli studenti delle verifiche concernenti gli argomenti trattati. Durante le sessioni di laboratorio saranno valutati il grado di accuratezza e precisione delle attività svolte.

##### *Prerequisiti (conoscenze iniziali)*

Per seguire il corso in modo proficuo, lo studente dovrebbe possedere le conoscenze di base della biologia, quali la biologia cellulare e la genetica, e abilità/capacità informatiche e di laboratorio.



## UNIVERSITÀ DI PISA

### Indicazioni metodologiche

Saranno svolte lezioni frontali, con ausilio di slide. Saranno svolte attività pratiche in laboratorio (se necessario, si formeranno gruppi, si useranno i PC delle aule informatiche). Strumenti di supporto saranno costituiti da siti web, seminari. Ausilio e completamento sarà fornito da personale di supporto o da codocenti. Il sito di elearning del corso sarà utilizzato per scaricamento materiali didattici, comunicazioni docente-studenti, formazione di gruppi di lavoro. L'interazione tra studente e docente avverrà tramite uso di ricevimenti, uso della posta elettronica o di altri strumenti di comunicazione.

### Programma (contenuti dell'insegnamento)

Generalità sui protisti: introduzione, caratteristiche generali, i protisti e gli altri taxa degli esseri viventi, habitat, locomozione, metabolismo, riproduzione, esempio di simbiosi tra protisti (protozoi ciliati e microsporidi). Esempi e caratteristiche generali di alcuni taxa di protisti (opaline, *Volvox*, radiolari, foraminiferi, *Stentor*, criptomonadine). Ruolo dei protisti nel corso dell'evoluzione della vita sulla terra, peculiarità della duplice natura dei protisti (cellula eucariotica e individuo completo), esempi di complessità strutturale e funzionale nei protisti (*Loxodes striatus*, *Erythrospira pavillardii*).

Le alghe: caratteristiche generali, tipi di organizzazione cellulare (unicellulare, coloniale, cenocitica o sifonale, pluricellulare), ciclo vitale (aplonte o zigotico, diplonte o gametico, aplo-diplonte o sporico), dimensione e gamia (isogamia, anisogamia, eterogamia, oogamia). Classificazione delle alghe. Chlorophyta o alghe verdi. Esempi di alghe verdi unicellulari. Esempi di protisti di natura algale. Aspetti ecologici ed applicativi dei protisti di natura algale.

I mixomiceti: caratteristiche generali, struttura dello sporangio, esempio di ciclo vitale con formazione di un plasmodio, ciclo vitale di *Dictyostelium discoideum* (con formazione di uno pseudoplasmodio), esempi di mixomiceti. Gli oomiceti: caratteristiche generali, ciclo vitale di *Plasmopara viticola*, esempi di oomiceti.

I protozoi: generalità, strutture esterne di rivestimento (membrana plasmatica, glicocalice, pellicola, tunica, cisti di resistenza), tipi di endoscheletro (microfilamentoso, microtubulare, alveolare), organuli citoplasmatici (reticolo endoplasmatico, dittiosomi, mitocondri, plastidi, nucleo), complesso vacuolare contrattile, nutrizione (saprozoica, olozoica), movimento (ciclosi, locomozione).

La riproduzione nei protozoi. La riproduzione asessuale: generalità, tipi di riproduzione asessuale nei principali gruppi di protozoi (mastigofori, sarcodini, opaline, labirintomorfi, ciliati). La riproduzione sessuale nei protozoi: generalità, gamonte, isogametia, anisogametia, oogametia, principali tipi di fecondazione (gametogamia, autogamia, gamontogamia), principali tipi di alternanza di generazioni (aplo-omofasica, diplo-omofasica, eterofasica). La coniugazione in *Paramecium*. Descrizione di un'esperienza di ricerca applicativa nei protozoi ciliati, legata al problema di verificare l'isolamento riproduttivo tra gruppi morfologicamente simili e filogeneticamente affini. Discussione dei risultati ottenuti. I processi microbiologici: definizioni, fasi, equazione semplificata; diversi tipi di microrganismi, microrganismi definiti come GRAS, collezioni ufficiali di microrganismi. La biogeografia dei protisti. Substrati culturali, composizione dei substrati culturali, principali fattori da considerare nella scelta dei substrati culturali; prodotti, scelta del prodotto in relazione al valore del prodotto ed all'economicità del processo, classificazione dei prodotti in base a criteri soggettivi (biomassa, prodotti a basso peso molecolare, prodotti ad alto peso molecolare), e su base metabolica (biomasse microbiche, metaboliti primari, metaboliti secondari, enzimi, prodotti complessi, prodotti ottenuti per biotrasformazione). I prodotti ottenibili da microrganismi: biomasse microbiche, metaboliti primari, metaboliti secondari, enzimi, prodotti complessi, prodotti ottenuti per biotrasformazione.

Il bioreattore: caratteristiche generali e struttura; controllo (misurazione e regolazione) delle diverse variabili che compaiono nel corso di un processo microbiologico; strumenti per la misurazione dei parametri e loro funzionamento (biosensori); sistema di agitazione: generalità, funzione, tipi di agitatori (veloci e lenti), frangiflutto; sistema di aerazione: generalità, funzione, linea dell'aria, tipi di aeratori (sparger), resistenza globale di trasferimento dell'ossigeno.

Immobilizzazione di cellule microbiche: generalità, vantaggi e svantaggi, procedure passive (meccanismo dell'aggregazione, meccanismo della colonizzazione, meccanismo dell'adsorbimento) e attive (meccanismo del legame covalente con matrice insolubile, meccanismo dell'intrappolamento, meccanismo del cross-linking), sistemi di confinamento cellulare a membrana, bioreattori per sistemi immobilizzati (di superficie, a letto fisso o fluido, a membrana).

Cinetica dei processi microbiologici: curva di crescita e fasi; diauxia; classificazione dei processi microbiologici su base cinetica secondo Gaden (tipo I, II, III); classificazione dei bioreattori su base cinetica (sistemi discontinui e continui, sistemi omogenei ed eterogenei, sistemi monostadio e multistadio).

Meccanismi coinvolti nella produzione di metaboliti microbici: metabolismo microbico anaerobico e aerobico e loro differenze relativamente ai prodotti ottenibili, ai livelli di energia generata (ATP) e alle modalità di riossidazione del NADH a NAD; enzimi coinvolti nei processi metabolici (costitutivi, inducibili, reprimibili); vie metaboliche lineari e ramificate; inibizione e repressione da feedback in vie metaboliche lineari; repressione da feedback in vie metaboliche ramificate (feedback concertato o multivalente, feedback cooperativo, feedback cumulativo, feedback sequenziale); inibizione da feedback in vie metaboliche ramificate.

Procedure per l'ottenimento di metaboliti microbici: strategie per l'ottenimento di metaboliti primari (modificazione della permeabilità cellulare, rimozione del blocco metabolico, rimozione dei fenomeni di inibizione o repressione); processi che portano all'accumulo di metaboliti secondari (trofofase e idiofase); strategie per l'ottenimento di metaboliti secondari (induzione, regolazione da prodotto finale, regolazione da cataboliti, sbilanciamento del terreno culturale).

Procedure per l'ottenimento di nuovi metaboliti microbici (screening primario): raccolta di campioni; isolamento dei ceppi; allestimento di colture; identificazione e caratterizzazione dei ceppi su basi morfologiche (tecnica QPS); identificazione e caratterizzazione dei ceppi su basi molecolari (tecniche di PCR utilizzando marcatori genetici specie-specifici); saggi di valutazione di attività.

Valutazione dello sviluppo microbico. Meccanismi coinvolti nello sviluppo microbico (crescita e moltiplicazione cellulare). Metodi diretti e indiretti. Metodi diretti: determinazioni del numero di cellule (tecniche microscopica ed elettronica), del volume cellulare e della massa cellulare (Valutazioni del peso umido e secco). Metodi indiretti: determinazioni della torbidità, della concentrazione dei componenti cellulari, del consumo di substrato e formazione di prodotto, della viscosità, dello sviluppo di calore.

Procedure di recupero dei prodotti di bioreazione: fattori che condizionano la scelta della procedura, fase di separazione delle cellule (sedimentazione spontanea, flocculazione, flottazione, centrifugazione, filtrazione), dispositivi impiegati nella centrifugazione (decanter, centrifughe multicamera, a piatti e tubolari o cilindriche), fase di recupero del prodotto (estrazione, concentrazione, frazionamento), fase di purificazione del prodotto, fase di rottura delle cellule (metodi fisici/meccanici, biologici, chimici).

I protisti come bioindicatori. Vantaggi dell'uso dei protisti come bioindicatori. Fenomeni di bloom algali. Fenomeno dell'arrossamento del Lago di Tovel. Bloom algale nel Lago di Garda. Lago di Hillier. Uso dei protisti come bioindicatori per l'ambiente suolo. Protozoi del suolo: principali



## UNIVERSITÀ DI PISA

fattori che influenzano la vita e l'adattamento dei protozoi del suolo (disponibilità di acqua, variazioni di temperatura, livelli di anidride carbonica nell'acqua e nell'aria), suddivisione dei protozoi del suolo in base alle diverse strategie riproduttive attuate (organismi r-selezionati e organismi k-selezionati), principali caratteristiche che distinguono i protozoi del suolo da quelli acquatici (modificazioni morfologiche, tigmotattismo, formazione di cisti di resistenza); esempio applicativo dell'utilizzo dei protozoi ciliati del muschio come bioindicatori.

Processo a fanghi attivi: generalità, componenti abiotiche e biotiche, fattori abiotici e biotici, protozoi ciliati carnivori e batteriofagi (natanti, mobili di fondo, sessili), successione delle popolazioni della microfauna (fasi di colonizzazione, innesco e stabilizzazione), specie pioniere, caratteristiche di efficienza, indice biotico del fango (SBI), modalità di identificazione delle specie, stima della densità della microfauna, stima della densità dei piccoli flagellati (camera di Fuchs-Rosenthal), calcolo del SBI ed esempi pratici.

Prodotti naturali da *Dunaliella salina*: caratteristiche generali della microalga, motivi che hanno permesso la commercializzazione della microalga su scala industriale; glicerolo: produzione di glicerolo per fermentazione alcolica, produzione alternativa di glicerolo mediante l'utilizzo di *D. salina*, condizioni necessarie e fasi del processo, diversi tipi di tecniche per il recupero di glicerolo; b-carotene: proprietà e suo utilizzo per fini industriali, interesse per i carotenoidi di origine naturale, processo di separazione dei diversi tipi di carotenoidi estratti da *D. salina*.

Sistemi di colture di protisti. Introduzione. Campionamento ed isolamento: sedimenti marini o d'acqua dolce, colonna d'acqua, suolo.

Stabilizzazione e colture: parametri fondamentali (temperatura, terreno, luce, disponibilità di cibo). Identificazione: microscopia ottica, procedure di colorazione, microscopia elettronica a trasmissione e a scansione, indagini di natura genetica e chimico-bioorganica. Mantenimento in coltura.

Strutture, attività biologiche e significato filogenetico di prodotti naturali isolati da protisti marini: generalità, pigmenti isolati da ciliati marini e dulcoacquicoli, esempi di metaboliti secondari isolati dal protista ciliato *Euplotes*.

Farmacologia marina e proprietà del metabolita secondario euplotina C estratto dal protista ciliato *Euplotes crassus*: Introduzione sulla Farmacologia Marina. Farmaci di origine naturale e di origine marina approvati dall'FDA (Cytarabine, Vidarabine, Ziconotide, estratti etilici di diversi acidi grassi omega-3, Trabectedin, Eribulin mesylate, Brentuximab vedotin, polisaccaridi solfati lineari). azione citotossica dell'euplotina C in diversi microrganismi. Metodologie utilizzate per testare l'attività biologica dell'euplotina C (test del rosso neutro, Western blotting). Risultati ottenuti e interpretazione degli stessi.

### Laboratorio

Tecniche di biologia molecolare applicate ai protisti: osservazione allo stereomicroscopio di esemplari appartenenti a diverse morfospesie di protisti; isolamento tramite pipetta di singole cellule di protisti; estrazione di DNA da cellule di protisti mediante un kit commerciale, basato sulle proprietà di legame selettivo di una particolare membrana di gel di silice contenuta in una colonnina.

Amplificazione genica, tramite PCR, di un marcatore genetico specie-specifico (gene per l'rRNA 18S) in diverse morfospesie di protozoi ciliati.

Elettroforesi su gel di agarosio, purificazione e reazioni di sequenza di prodotti di PCR relativi ad un marcatore genetico specie-specifico (gene per l'rRNA 18S) in diverse morfospesie di protozoi ciliati.

Analisi di sequenze relative al gene per l'rRNA 18S di diverse morfospesie di protisti, allineamenti di sequenze, costruzione di alberi filogenetici, utilizzo di software per indagini molecolari (Chromas, Bioedit, Clustal, Mega), utilizzo delle banche dati di natura molecolare (GenBank/EMBL databases).

### Bibliografia e materiale didattico

MICROBIOLOGIA VOLUME 1 (2004) - JEROME J. PERRY, JAMES T. STALEY, STEPHEN LORY. EDIZIONE ZANICHELLI .

MICROBIOLOGIA VOLUME 2 (2004) - JEROME J. PERRY, JAMES T. STALEY, STEPHEN LORY. EDIZIONE ZANICHELLI .

MICROBIOLOGIA INDUSTRIALE (2006) – MATILDE MANZONI. CASA EDITRICE AMBROSIANA.

MICROBIOLOGIA SISTEMATICA, AMBIENTALE, INDUSTRIALE (2009) - M. WILLEY, M. SHERWOOD, J. WOOLVERTON. EDIZIONE MCGRAW-HILL.

BIOLOGIA DEI MICRORGANISMI – MICROBIOLOGIA AMBIENTALE E INDUSTRIALE (VOLUME 2A) (2007). MICHAEL T. MADIGAN, JOHN M. MARTINKO. CASA EDITRICE AMBROSIANA.

BIOTECNOLOGIE MICROBICHE (2008). S. DONADIO, G. MARINO. CASA EDITRICE AMBROSIANA.

IL TRATTAMENTO DELLE ACQUE REFLUE IN ENOLOGIA (2003). P. BERTA, M. MINETTI, R. STECCHI. EDIZIONI TECNICHE NUOVE.

### Indicazioni per non frequentanti

Gli studenti non frequentanti il corso devono aver seguito almeno le attività di laboratorio previste per potersi presentare all'esame.

### Modalità d'esame

L'esame è composto da una prova orale. La prova orale consiste in un colloquio tra il candidato e il docente, o anche tra il candidato e altri collaboratori del docente titolare. La prova orale sarà suddivisa in più parti, corrispondenti a varie sezioni del programma svolto. La prova orale è non superata se il candidato mostra di non essere in grado di esprimersi in modo chiaro e di usare la terminologia corretta e se il candidato mostrerà ripetutamente l'incapacità di mettere in relazione parti del programma e nozioni che deve usare in modo congiunto per rispondere in modo corretto ad una domanda. Per presentarsi all'esame è necessario aver seguito le attività di laboratorio previste.