UNIVERSITÀ DI PISA

BIOTECNOLOGIE DEI PROTISTI

GRAZIANO DI GIUSEPPE

Anno accademico	2016/17
CdS	BIOTECNOLOGIE
Codice	377EE
CFU	6

Moduli	Settore/i	Tipo	Ore	Docente/i
BIOTECNOLOGIE DEI 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 molecoalri 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 perchè 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.

Prerequisiti per studi successivi

Questo insegnamento costituisce un requisito consigliato per il Corso "I Protisti nei Processi Industriali" del Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Molecolari.

Indicazioni metodologiche

Saranno svolte lezioni frontali, con ausilio di slide. Saranno svolte attività pratiche in laboratorio (se necessario, si formeranno gruppi, si userano i PC delle aule informatiche). Strumenti di supporto saranno costitutiti 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*, *Erythropsis pavillardi*).
- Le alghe: caratteristiche generali, tipi di organizzazione cellulare (unicellulare, coloniale, cenocitica o sifonale, pluricellulare), ciclo vitale (aplonte o zigotico, diplonte o gametico, aplodiplonte 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 colturali, composizione dei substrati colturali, principali fattori da considerare nella scelta dei substrati colturali; 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 baso 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 regloazione) 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, meccansimo 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 colturale).
- 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 cosumo 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 multicamere, 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 boindicatori per l'ambiente suolo. Protozoi del suolo: principali 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*.
- Interazioni tra virus e protisti. I protozoi come "reservoir" di virus nell'ambiente. Storia della virologia ambientale. Virus umani. Virus patogeni per l'uomo. Virus animali patogeni per l'uomo a possibile diffusione ambientale. Epidemie virali di origine idrica. Epidemie attribuite ad Adenovirus a seguito della frequentazione di piscine pubbliche. Agenti virali più frequentemente ricercati in ambiente marino (Enterovirus, Norovirus, Reovirus, Adenovirus, HAV). Alcune epidemie dovute a virus negli alimenti. Evidenze epidemiologiche dell'esposizione ad agenti virali negli ambienti sanitari e nelle aree degli impianti di depurazione. Studio dell'interazione tra Human Adenovirus sierotipo 5 e *Acanthamoeba polyphaga* in ambiente acquatico e ruolo protettivo dalla disinfezione chimica dei virus internalizzati.
- 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.
- Idrogeno da microalghe: consumi mondiali di energia dal 1850; perché l'idrogeno?; l'idrogeno come vettore di energia; produzione di idrogeno per via biologica; fotolisi diretta; enzimi chiave coinvolti nella produzione biologica di idrogeno (nitrogenasi, idrogenasi); impiego di *Chlamydomonas reinhardtii* per la produzione di idrogeno (caratteristiche morfologiche e ciclo vitale); esempio di studio condotto utilizzando *C. reinhardtii*; bioreattori utilizzati per la produzione biologica di idrogeno da microalghe; fattori limitanti e criticità.

Laboratorio

- Tecniche di biologia molecolare applicate ai protisti: osservazione allo stereomicroscopio di esemplari appartenenti a diverse morfospecie 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 morfospecie 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 morfospecie di protozoi ciliati.
- Analisi di sequenze relative al gene per l'rRNA 18S di diverse morfospecie di protisti, allineamenti di sequenze, costruzione di alberi filogenetici, utilizzo di software per indagini molecolare (Chromas, Bioedit, Clustal, Mega), utilizzo delle banchedati 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.

UNIVERSITÀ DI PISA

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 piú 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.

Ultimo aggiornamento 21/12/2016 13:22