



UNIVERSITÀ DI PAVIA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA TERRA E DELL'AMBIENTE

Direttore: Prof. S. Seno

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CONSERVAZIONE DELLA BIODIVERSITÀ,
DIDATTICA E COMUNICAZIONE SCIENTIFICA – CURRICULUM METODOLOGIE
DIDATTICHE E COMUNICAZIONE DELLE SCIENZE

**OTTIMIZZAZIONE TECNICHE DI ESTRAZIONE E PROFILO PROTEICO DEL
COCCOLITOFORO *CHRYSOTILA ROSCOFFENSIS***

Relatore:

Prof.ssa Lupi Claudia

Co-relatori:

Dott.ssa Chiara Bonatelli

Dott. Marco Fumagalli

Tesi di Laurea di:

Casotto Viviana

Matricola Nr: 560593

Anno Accademico 2025/2026

"Corporibus caecis igitur natura gerit res"

Tito Lucrezio Caro, *De rerum natura* - Libro I, v. 328 (59 a. C.)

INDICE

INTRODUZIONE.....	2
1. COCCOLITOFORI: BIOLOGIA E FISIOLOGIA.....	4
1.1 Biologia cellulare.....	6
1.2 Ciclo vitale e biocalcificazione.....	9
1.3 Significato ecologico e nel ciclo del carbonio.....	14
1.4 Sistematica dei coccolitofori	19
1.4.1 <i>Chrysotila roscoffensis</i>	22
2. STATO DELL'ARTE: CARATTERIZZAZIONE MATERIA ORGANICA/INORGANICA DI COCCOLITOFORI E MICROALGHE IN GENERALE	24
2.1 Caratterizzazione materia organica/inorganica di coccolitofori	25
3. MATERIALI E METODI.....	31
3.1 Analisi con TGA.....	31
3.2 Estrazione e costruzione profilo proteico	32
3.2.1 Rottura della parete cellulare	32
3.2.2 Estrazione e dosaggio delle proteine.....	37
3.2.3 Caratterizzazione proteine	39
4. RISULTATI	44
4.1 Analisi con TGA.....	44
4.2 Estrazione e costruzione profilo proteico	46
4.2.1 Rottura della parete cellulare	46
4.2.2 Estrazione e dosaggio delle proteine.....	50
4.2.3 Caratterizzazione proteine	52
5. DISCUSSIONI.....	66
5.1 Comparazioni metodi analitici e caratterizzazione proteine.....	66
5.1.1 Analisi con TGA	67
5.1.2 Rottura della parete cellulare, estrazione e dosaggio delle proteine.....	67
5.1.3 Caratterizzazione proteine	68
5.2 Relazione profilo proteico e cambiamento climatico globale	71
RIASSUNTO E CONCLUSIONI.....	81
BIBLIOGRAFIA.....	84
APPENDICE	87
Unità di apprendimento	87
Consegna agli studenti.....	91
Piano di lavoro.....	91
Schema di autovalutazione cognitiva	93

INTRODUZIONE

“Lavorando sui sondaggi raccolti dal Capitano Dayman, fui sorpreso di scoprire che molti di quelli che ho chiamato i "granuli" di quel fango non erano, [...] la semplice polvere e gli scarti di *Globigerinae*, ma che avevano una forma e una dimensione definite. Ho chiamato questi corpi "coccoliti" e ho dubitato della loro natura organica. Il Dott. Wallich ha verificato la mia osservazione e ha aggiunto l'interessante scoperta che, non di rado, corpi simili a questi "coccoliti" si aggregavano in sferoidi, che ha chiamato "coccosfere". Per quanto ne sapevamo, questi corpi, la cui natura è estremamente enigmatica e problematica, erano peculiari dei sondaggi atlantici. [...] *Globigerine*, coccoliti e coccosfere si trovano come costituenti principali di entrambi e testimoniano la somiglianza generale delle condizioni in cui entrambi si sono formati.”

È con queste parole, tratte dal discorso “Su un pezzo di gesso”, che il naturalista Thomas Henry Huxley intervenne durante l’annuale riunione della British Association for the Advancement of Science, società scientifica inglese, tenutosi nella città di Norwich nel 1868.

Fa riferimento a dei piccolissimi granelli, che chiama coccoliti, in grado di aggregarsi in coccosfere, ma ancora non riesce a definirne la natura.

Studi successivi dimostrano che si tratta non di animali, ma di microalghe capaci di produrre una teca inorganica fatta da carbonato di calcio, sono i coccolitofori.

Essi svolgono un ruolo centrale nell’ecosistema in quanto produttori primari alla base della catena trofica e organismi capaci di sintetizzare all’interno della cellula carbonio inorganico per la formazione di placche esterne (Taylor et al., 2017).

Con questa duplice funzione regolano sia la pompa biologica che la pompa dei carbonati e di conseguenza assumono la funzione di regolatori del clima a livello globale agendo sull’albedo, con le loro fioriture, e sull’acidificazione delle acque oceaniche con la biocalcificazione (Balch, 2018).

Nonostante la fondamentale importanza dei coccolitofori, essi restano un gruppo a tratti sconosciuto nel campo della biologia e fisiologia. Sono presenti pochi studi a riguardo e molte dinamiche cellulari non sono ancora state comprese a fondo.

Le scarse ricerche tendono ad essere per lo più focalizzate solo sulla stessa specie, tra le più diffuse negli oceani, ovvero *Gephyrocapsa huxleyi*.

Il presente lavoro di tesi mi è stato assegnato dalla Prof.ssa Claudia Lupi nell’ambito delle sue ricerche sui coccolitoforidi sia viventi che estinti e l’ambito del progetto è di carattere bio-

geochimico. La tesi si prefigge di approfondire la caratterizzazione della componente organica dei coccolitoforidi e in particolare della specie *Chrysotila roscoffensis* (ceppo RCC1414).

Le analisi si sono svolte presso il Dipartimento di Scienze della Terra e dell'Ambiente dell'Università di Pavia in collaborazione con il Dott Marco Fumagalli, tecnico del laboratorio di proteine, e con la Dott.ssa Chiara Bonatelli.

Stante ai pochi studi pregressi, la specie *Chrysotila roscoffensis* mostra una buona resilienza (Chauhan et al., 2024) ed è facile da coltivare in ambienti controllati, caratteristiche che la rendono una specie ideale per analisi sulla risposta a stress ambientali.

Inoltre, è già stato ipotizzato un suo possibile impiego in campo industriale per diversi ambiti tra cui quello farmaceutico, cosmetico, alimentare, edilizio ed energetico (Bach and Chen, 2017a; Aveiro et al., 2020; Andreeva et al., 2021).

Per ottenere una caratterizzazione della materia organica e il profilo proteico sono state svolte diverse attività sperimentali mettendo a punto un protocollo ottimizzato rispetto a quelli presenti in letteratura. La fase sperimentale ha riguardato anche l'utilizzo della ben nota microalga verde di acqua dolce *Chlorella vulgaris* per calibrare e validare le procedure applicate a *Chrysotila roscoffensis*.

Le tecniche utilizzate sono state:

- Termogravimetria (TGA) per ottenere una prima stima quantitativa delle macromolecole presenti all'interno della cellula;
- *Bead milling* per l'omogeneizzazione dei campioni, ovvero per la lisi cellulare;
- Spettrofotometria: per determinare il quantitativo di proteine. Questa risulta essere strettamente legata all'efficienza dell'omogeneizzazione precedente;
- Elettroforesi su gel di acrilammide al fine di separare le proteine a seconda del loro peso molecolare;
- Cromatografia liquida combinata alla spettrometria di massa per ottenere le sequenze peptidiche costituenti e attribuire loro i nomi delle rispettive proteine.

La caratterizzazione del profilo proteico ottenuto potrebbe anche avere rilevanza negli studi climatologici poiché modifiche nei profili proteici sembrano essere indicatrici di particolari stress ambientali e potrebbero diventare buoni indicatori per il monitoraggio dell'impatto dei cambiamenti climatici su questo gruppo di organismi.

1. COCCOLITOFORI: BIOLOGIA E FISIOLOGIA

I coccolitofori sono microalghe marine che costituiscono uno dei gruppi più importanti del fitoplancton marino per abbondanza e distribuzione globale.

Si distinguono per la loro produzione di placche calcaree, i coccoliti, sintetizzati dalla cellula tramite un processo di calcificazione e poi uniti a formare una teca esterna detta coccosfera.

Oltre a questo processo, essendo alghe autotrofe, svolgono la fotosintesi clorofilliana il che li rende un gruppo chiave nei flussi di carbonio tra l'oceano e l'atmosfera sia nella sua componente organica, tramite la fotosintesi, che per quella inorganica, tramite la calcificazione, con effetti climatici a livello globale (Taylor et al., 2017).

I coccolitofori vivono nella colonna d'acqua, in particolare nella zona fotica, ovvero quella parte più superficiale fino a dove i raggi del sole riescono a penetrare (~ 200 m). Quest'ultima si divide in una zona superiore, più ricca in specie, e una zona inferiore dove solo alcune altamente specializzate riescono a sopravvivere come ad esempio *Florisphaera profunda*. La zona inferiore è popolata dai coccolitofori solo fino alle fasce temperate poiché in quelle subpolari e polari non arriva abbastanza luce da permetterne la sopravvivenza.

La loro distribuzione geografica non è uniforme in tutto il globo, varia infatti a seconda della latitudine e delle condizioni di temperatura e di nutrienti delle acque (Fig. 1a e Fig. 1b).

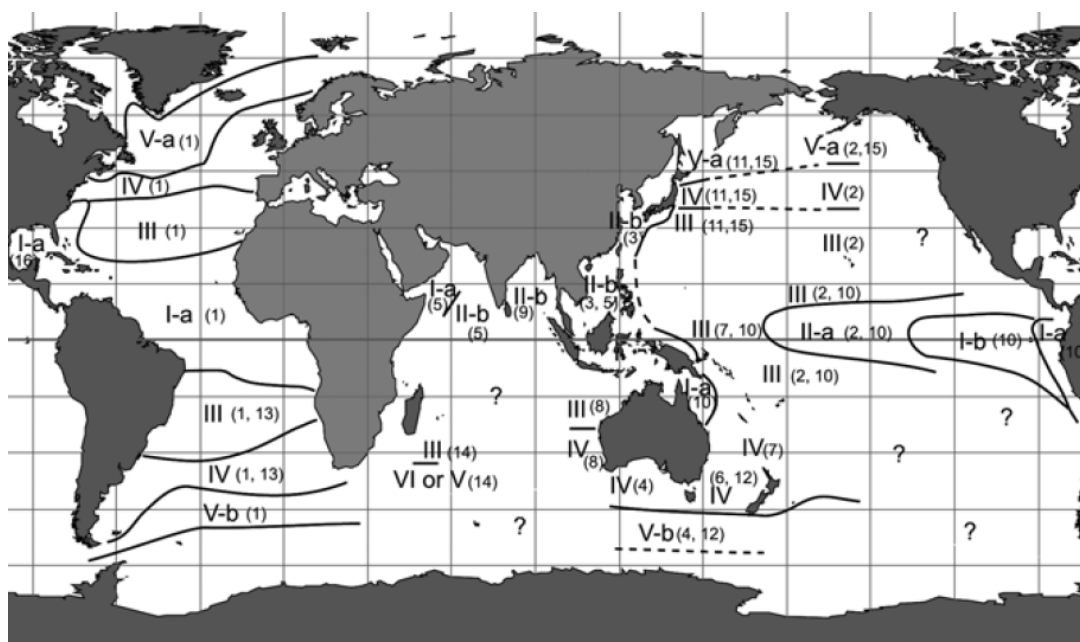


Fig. 1a: Distribuzione globale dei coccolitofori nelle acque superficiali (Hagino e Young, 2015)

Coccolithophore flora	Upper photic zone		Middle photic zone	Lower photic zone
	Dominant taxa	Accompanying taxa		
I-a	<i>E. huxleyi</i> (Type A)	<i>U. tenuis</i> <i>C. leptoporus</i> <i>G. ericsonii</i>	<i>E. huxleyi</i> (Type C) <i>G. oceanica</i>	<i>F. profunda</i> <i>Gladiolithus</i> spp.
I-b	<i>E. huxleyi</i> (Type A)	<i>R. parvula</i> <i>G. ericsonii</i> <i>G. oceanica</i> <i>C. leptoporus</i>	<i>A. oryza</i> <i>O. antillarum</i>	<i>E. huxleyi</i> (Type C)
II-a	<i>G. oceanica</i>	<i>O. antillarum</i> <i>C. leptoporus</i> <i>E. huxleyi</i> (Type A) <i>G. ericsonii</i> <i>U. hultburtiana</i>		
II-b	<i>G. oceanica</i>	<i>E. huxleyi</i> (Type A) <i>G. ericsonii</i> <i>Syracosphaera</i> spp.		
III	<i>U. irregularis</i>	<i>U. tenuis</i> <i>D. tubifera</i> <i>R. clavigera</i> <i>E. huxleyi</i> (Type A) <i>G. oceanica</i> <i>U. sibogae</i>		
IV	<i>E. huxleyi</i> (Types A and C)	<i>G. oceanica</i> <i>C. leptoporus</i> <i>Syracosphaera</i> spp.		
V-a	<i>E. huxleyi</i> (Types B, C, D, or O)	<i>G. mullerae</i> <i>C. pelagicus</i> <i>C. leptoporus</i>	Barren	
V-b	<i>E. huxleyi</i> (Types B, C, D, or O)	<i>C. leptoporus</i> <i>Papposphaera</i> spp. <i>Wigwamma</i> spp.		

Fig. 1b: Legenda della fig. 1a con annesso elenco delle specie di coccolitofori presenti suddivise nelle zone fotiche superiori, medie e inferiori e in specie dominanti e associative (Hagino e Young, 2015)

Nelle fasce equatoriale e subequatoriali, in condizioni di oligotrofia, cioè in acque povere di nutrienti e quindi anche maggiormente limpide, si riscontrano le maggiori diversità specifiche. Le associazioni presenti includono molte specie, ma vi è una differenza tra l'oceano Atlantico, l'oceano Pacifico e l'oceano Indiano: nel primo la specie dominante è *Emiliania huxleyi* (oggi denominata *Gephyrocapsa huxleyi*; Bendif et al., 2019) nel secondo e nel terzo la specie dominante è *Gephyrocapsa oceanica* (Hagino e Young, 2015).

Nelle fasce temperate e polari si riscontrano le maggiori abbondanze di coccolitofori nonostante la bassa diversità specifica, è in queste aree che si manifestano le maggiori fioriture chiamate *bloom* (Fig. 1c). La specie dominante in queste fasce è *Gephyrocapsa huxleyi*.

Nella fascia artica la dominanza è sempre rappresentata da *Gephyrocapsa huxleyi*, come anche nella fascia antartica con l'aggiunta però di abbondanze rilevanti di *Coccolithus pelagicus* e *Calcidiscus leptoporus*.

Le associazioni sono abbastanza stabili nel corso dell'anno nelle acque equatoriali perché non si verificano variazioni rilevanti nella colonna d'acqua, ma cambiano stagionalmente dalle subtropicali alle subpolari. Nell'oceano Atlantico *Gephyrocapsa huxleyi* è costante tranne durante l'estate subito dopo la massima fioritura di circa inizio estate (giugno) a causa dell'oligotrofizzazione delle acque provocata dalla fioritura delle diatomee. Nell'oceano Pacifico temperato, invece, si possono verificare fioriture di *Gephyrocapsa oceanica* (Hagino e Young, 2015).



Fig. 1c: Cerchiati in giallo sono i *bloom* di coccolitofori nella parte occidentale del Mar Nero ripresi da immagini satellitari il 10 Maggio 2002 (Vostokov et al., 2022)

1.1 Biologia cellulare

I coccolitofori sono organismi unicellulari eucarioti, ogni individuo è cioè composto da una sola cellula nucleata la cui dimensione varia dai 5 ai 40 μm (nannotax).

Questa è altamente specializzata permettendo un simultaneo svolgimento di fotosintesi e calcificazione. Le strutture che compongono i coccolitofori sono: il nucleo, i mitocondri, i cloroplasti, i vacuoli, l'apparato di Golgi, la vescicola coccolitica, il citoscheletro, una membrana nucleare e una cellulare e una parete. All'esterno della cellula generalmente vi è l'haptonema a volte accompagnato da due flagelli e un rivestimento di coccoliti (Fig. 1.1.1).

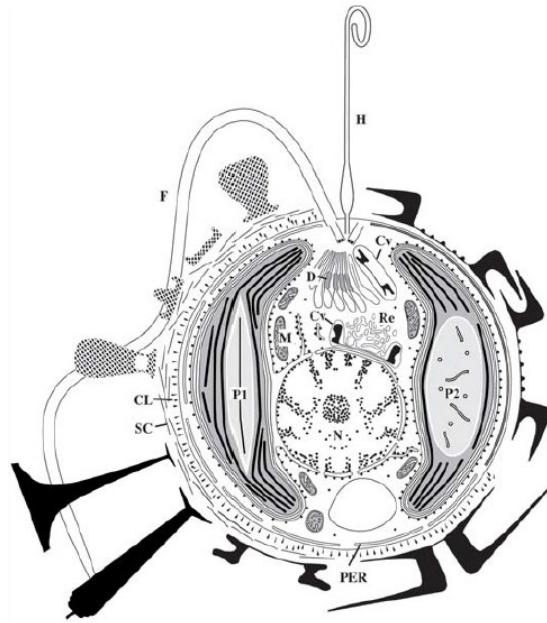


Fig. 1.1.1: Rappresentazione cellulare dei cocolitofori: esterni alla cellula in nero sono gli eterococcoliti e in motivo reticolato sono gli olococcoliti. – Cv: vescicola coccolitica; D: apparato di Golgi; F: flagello; H: haptonema; M: mitocondrio; N: nucleo; SC: scaglie organiche non mineralizzate; P1 e P2: parte interna dei cloroplasti (Baumann et al., 2004)

In sintesi il nucleo contiene il DNA e controlla la divisione cellulare e la sintesi proteica.

I mitocondri sono il luogo dove avviene la respirazione cellulare e producono ATP fornendo energia per i processi fisiologici.

I cloroplasti, organelli caratteristici di tutti gli individui autotrofi, contengono i pigmenti di clorofilla e sono la sede della fotosintesi.

I vacuoli regolano la pressione osmotica mantenendo l'equilibrio idrico per permettere all'organismo di adattarsi a variazioni di salinità dell'ambiente esterno, immagazzinano le sostanze di scarto e danno forma alla cellula.

L'apparato di Golgi produce la vescicola coccolitica e regola l'esocitosi dei coccoliti. Quest'ultima è considerata una struttura chiave in quanto è il sito di formazione dei coccoliti.

Il citoscheletro, composto da filamenti e microtuboli proteici, in generale regola la forma della cellula. In particolare nei cocolitofori risulta essere una struttura fondamentale per il modellamento e lo spostamento dei coccoliti all'interno della cellula.

Le due membrane sono entrambe composte da un doppio strato fosfolipidico, ma con una differenza strutturale: quella cellulare è costituita da un singolo *bilayer*, riveste l'intera superficie dell'organismo dividendo gli ambienti intra ed extra cellulari e regola gli scambi tra essi; mentre quella nucleare è una doppia membrana, formata da due *bilayer* concentrici collegati da pori attraverso i quali avvengono gli scambi tra nucleo e citoplasma.

I flagelli sono strutture filamentose proteiche che regolano i movimenti, non tutte le specie li presentano, ma laddove riscontrati, caratterizzano solo la fase mobile venendo successivamente persi.

L'haptonema, anch'esso struttura filamentosa non sempre presente, è esternamente simile ai flagelli e viene usata come rilevamento sensoriale dell'ambiente esterno. Nelle specie mixotrofiche, capaci di recuperare l'energia sia attraverso la fotosintesi che attraverso l'alimentazione, è utilizzata per predare piccole particelle di cibo, come per esempio i batteri, che poi vengono assimilate attraverso un processo di fagocitosi.

Anche le placche calcaree, chiamate coccoliti, possono essere presenti a seconda che la cellula sia calcificante-obbligata oppure no. Vengono prodotti internamente e, una volta espulsi, si incastrano tra di loro formando la coccosfera.

La loro funzione è ancora incerta, si pensa che possano avere un ruolo multifunzionale (Taylor et al., 2017) che comprende:

- Funzione di protezione biotica ovvero contro predatori quali i Copepodi, contro batteri e virus formando una vera e propria barriera fisica. Nonostante ciò è stato affermato che alcuni virus sono in grado di superare lo strato di calcite penetrando nella cellula e causando infezioni virali (Taylor et al., 2017);
- Funzione di protezione abiotica ovvero creano una barriera che preserva la cellula dagli urti meccanici causati dal moto ondoso e dalla circolazione marina;
- Funzione di supporto nel galleggiamento e nella spinta idrostatica ovvero l'aggiunta o la perdita di coccoliti può essere una strategia per aumentare o diminuire il peso della cellula regolandone la posizione nella colonna d'acqua a seconda delle disponibilità di nutrienti e di luce solare. Si parla infatti di "*ballasting*", cioè di funzione come zavorra (Ziveri et al., 2007; Balch, 2018);
- Funzione biochimica di regolazione del pH interno ovvero, attraverso la produzione di calcite per i coccoliti, avviene il controllo omeostatico compensando eventuali variazioni dell'ambiente esterno e regolando di conseguenza i valori di pH, idratazione e concentrazione di sali all'interno della cellula;
- Funzione ottica ovvero la regolazione della luce attraverso 2 diverse azioni.

Nella prima il ruolo sarebbe quello di riflettere i raggi proteggendo l'organismo da un'eccessiva esposizione alla luce, nella seconda invece il ruolo è quello di rifrazione interna per sfruttare al meglio la disponibilità luminosa e permettere la sopravvivenza della cellula anche nella zona fotica inferiore ottimizzando lo svolgimento della fotosintesi (Balch, 2018).

1.2 Ciclo vitale e biocalcificazione

I cocolitofori sono caratterizzati da un ciclo di vita che prende il nome di *aplodiplonte* per l'alternanza di una fase aploide e di una diploide (Hagino e Young, 2015). All'interno di ogni fase si riproducono per via asessuata mediante scissione binaria, un processo in cui dalla cellula madre si generano due cellule figlie.

Le due fasi si differenziano sia per aspetti genetici che per aspetti morfologici.

La prima, quella aploide, è caratterizzata da un corredo cromosomico n , i cromosomi sono cioè singoli, e corrisponde generalmente ad uno stadio mobile in cui all'esterno della cellula possono essere presenti due flagelli per il movimento.

La seconda, quella diploide, è caratterizzata da un corredo cromosomico $2n$, i cromosomi sono cioè doppi, e corrisponde ad uno stadio generalmente non mobile in cui i due flagelli vengono persi tramite caduta. In questa fase il movimento è consentito dal moto ondoso e dalle correnti oceaniche. Ci sono delle eccezioni come per esempio il genere *Chrysotila*, preso in considerazione in questo studio, che presenta la fase diploide flagellata così come la fase aploide.

La differenza morfologica, invece, consiste nella produzione di due diversi tipi di cocoliti: gli *olococcoliti* e gli *eterococcoliti* (Young et al., 1999; Geisen et al., 2002; Young et al., 2003; Hagino e Young, 2015).

Gli *olococcoliti* (Fig. 1.2.1) sono caratteristici della fase aploide e sono formati da cristalli di calcite (Fig. 1.2.2) di minuscole dimensioni e di forma romboedrica e non essendo ben strutturati sono maggiormente soggetti a dissoluzione durante la sedimentazione sul fondale oceanico.

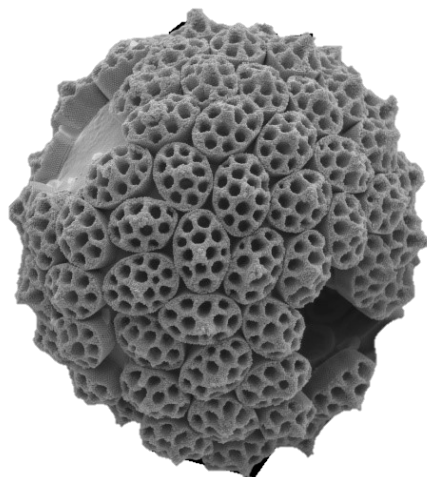
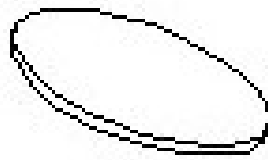


Fig. 1.2.1: Coccosfera composta da *olococcoliti* di *Scyphosphaera apsteinii* (Nannotax3, <https://www.mikrotax.org/Nannotax3/maindb/Holococcoliths>)



Crystallolith

Fig. 1.2.2: Disegno rappresentativo di un esempio di una struttura di un *olococcolite*, in particolare la tipologia *Crystallolitho*: forma di disco con uno o due strati, *olococcolite* di *Coccolithus pelagicus* (INA, <https://ina.tmsoc.org/terminology/holococcoliths.htm>)

Gli *eterococcoliti* (Fig. 1.2.3) sono caratteristici della fase diploide, vengono prodotti all'interno della cellula e poi secreti e sono formati da cristalli di calcite di dimensioni maggiori rispetto agli *olococcoliti* e di diverse morfologie, come placche ellittiche o circolari con un vuoto al centro e attraversate da altri elementi come placche, barre, spine e granuli dando origine ad una struttura rigida in cui sono ben distinguibili un disco prossimale, vicino alla membrana cellulare, e uno distale (Fig. 1.2.4) utili per la costruzione di una coccosfera in cui i singoli coccoliti sono incastrati gli uni gli altri.

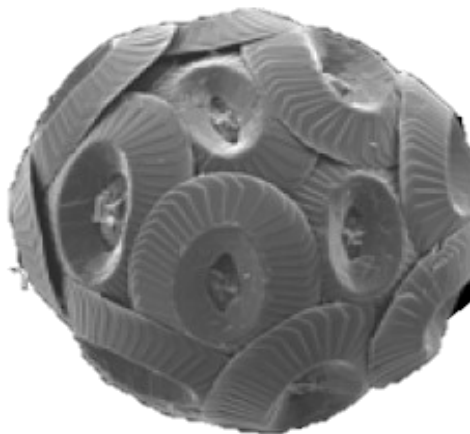


Fig. 1.2.3: Coccosfera composta da *eterococcoliti* di *Coccolithus pelagicus* (Hagino e Young, 2015)

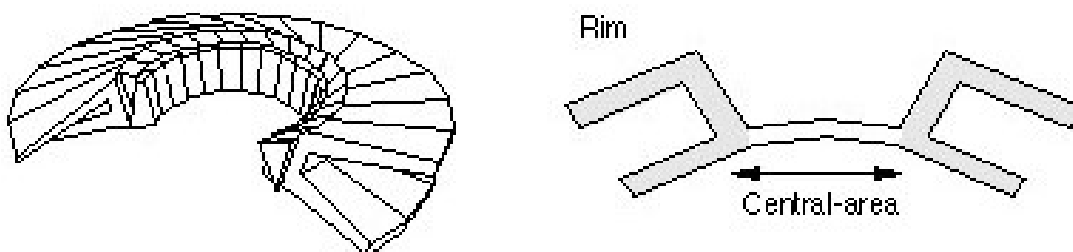


Fig. 1.2.4: Disegno rappresentativo della struttura degli *eterococcoliti* (INA, <https://ina.tmsoc.org/terminology/3coccoliths.htm>)

La presenza di due tipi diversi di coccoliti, trovati anche contemporaneamente (Fig. 1.2.5) sulla stessa cellula, ha portato gli studiosi a definirlo come un dimorfismo. Questo può essere un problema soprattutto nella classificazione di sedimenti passati o altamente disagregati in quanto i singoli coccoliti possono essere attribuiti a due specie differenti anziché alla stessa.

La presenza del dimorfismo è indice di un'elevata capacità di adattamento alle condizioni ambientali esterne. Alcuni studi affermano che vi siano diversi fattori che influenzano la produzione di un tipo rispetto all'altro di coccoliti (Taylor et al., 2017) (Fig. 1.2.6):

- La concentrazione di nutrienti: se le acque sono oligotrofiche vengono favoriti gli *olococcoliti*, se la concentrazione è elevata vengono favoriti gli *eterococcoliti*;
- La turbolenza: se è maggiore si verifica un'inibizione degli stadi aploidi favorendo quelli diploidi e quindi la formazione di *eterococcoliti*
- Le infezioni virali: tendono a colpire maggiormente gli organismi diploidi portando ad un aumento degli stadi aploidi con gli *olococcoliti*.



Fig. 1.2.5: Coccusfera composta sia *olococcoliti* che da *eterococcoliti* di *Coccolithus pelagicus* (Hagino e Young, 2015).

La biocalcificazione è uno dei processi caratteristici dei coccolitofori in cui vengono prodotti i coccoliti. Si può dividere in 3 fasi principali:

1. Nucleazione: all'interno della vescicola coccolitica vengono prodotti i cristalli di calcite grazie all'apporto di ioni calcio e carbonio inorganico (Fig. 1.2.7 in alto);
2. Maturazione: le membrane della vescicola modulano la morfologia dei cristalli fino alla completa formazione del coccolite (Fig. 1.2.7 al centro);
3. Secrezione: espulsione per esocitosi del coccolite che si dispone attorno alla membrana esterna (Fig. 1.2.7 in basso).

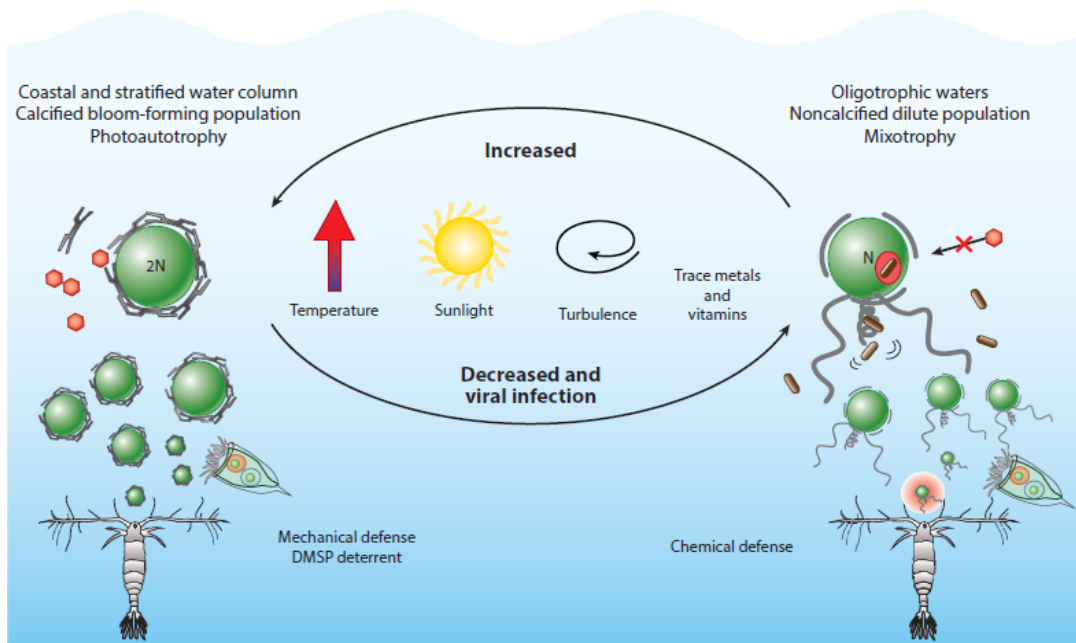


Fig. 1.2.6: Disegno schematico che rappresenta i principali fattori abiotici e biotici che sembrano influenzare le transizioni di fase del ciclo vitale nei coccolitofori (Taylor et al., 2017).

Come scritto precedentemente durante il processo di biocalcificazione (Fig. 1.2.8) lo ione calcio (Ca^{2+}) e il carbonio inorganico svolgono un ruolo centrale in quanto compongono i reagenti per l'avvenimento della reazione $\text{Ca}^{2+} + \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CaCO}_3 + \text{H}^+$

Lo ione calcio (Ca^{2+}) presente nell'acqua attraversa la membrana ed entra nella cellula. Un'eccessiva concentrazione di questo elemento, però, può risultare tossica per la cellula perciò viene stoccato in compartimenti appositi e successivamente può essere trasportato alla vescicola coccolitica da un sistema di pompe dove, per reazione, precipita in calcite (Sviben et al., 2016; Gal et al., 2018).

Il carbonio inorganico invece entra nella cellula sotto forma di ione bicarbonato e anidride carbonica (HCO_3^- e CO_2).

Come si può vedere dalla reazione scritta sopra i prodotti della stessa sono il carbonato di calcio (CaCO_3) e ioni idrogeno (H^+). Questi ultimi, aumentando in eccesso la loro concentrazione, possono acidificare troppo l'interno della cellula portando a gravi danni per la sua sopravvivenza, come ad esempio il blocco della precipitazione della calcite e la sua conseguente dissoluzione. Necessitano, quindi, di essere espulsi attraverso l'enzima V-ATPase.

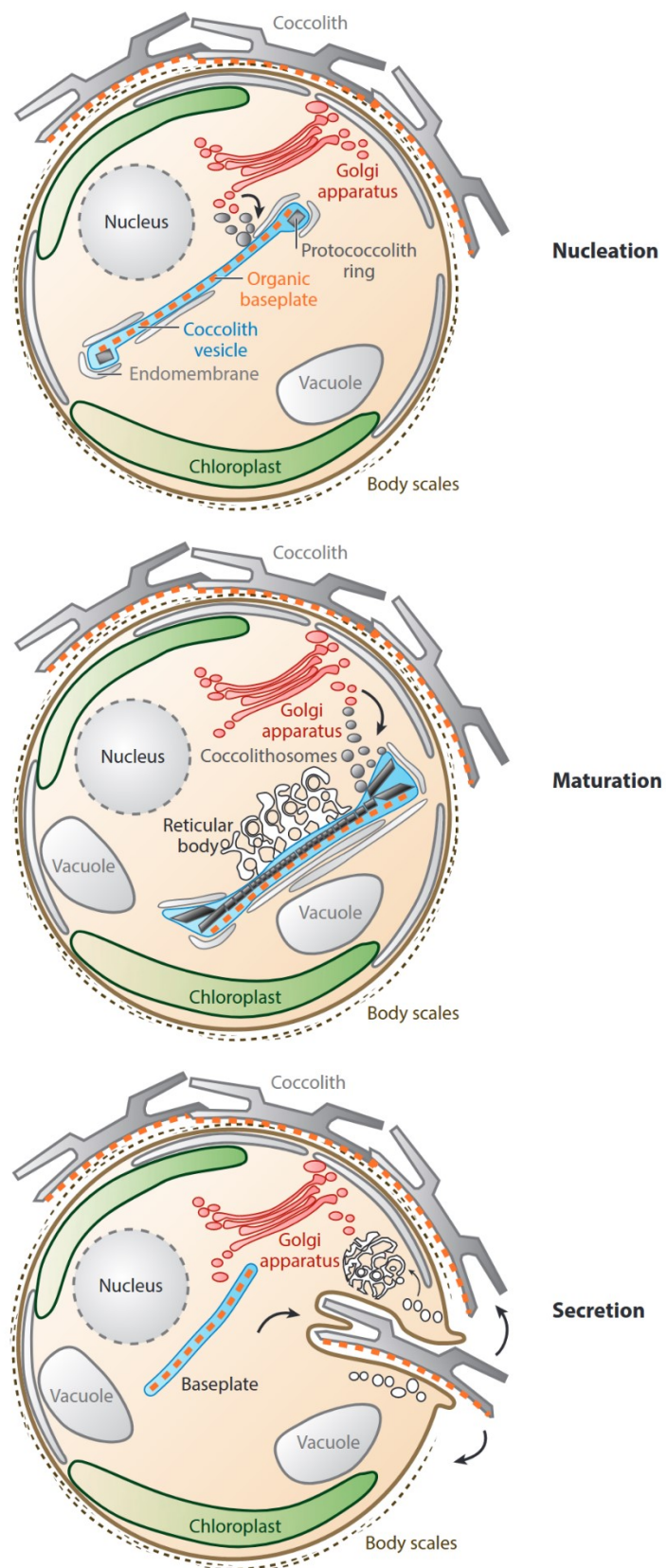


Fig. 1.2.7: Disegno schematico che rappresenta le 3 fasi della biocalcificazione (Taylor et al., 2017).

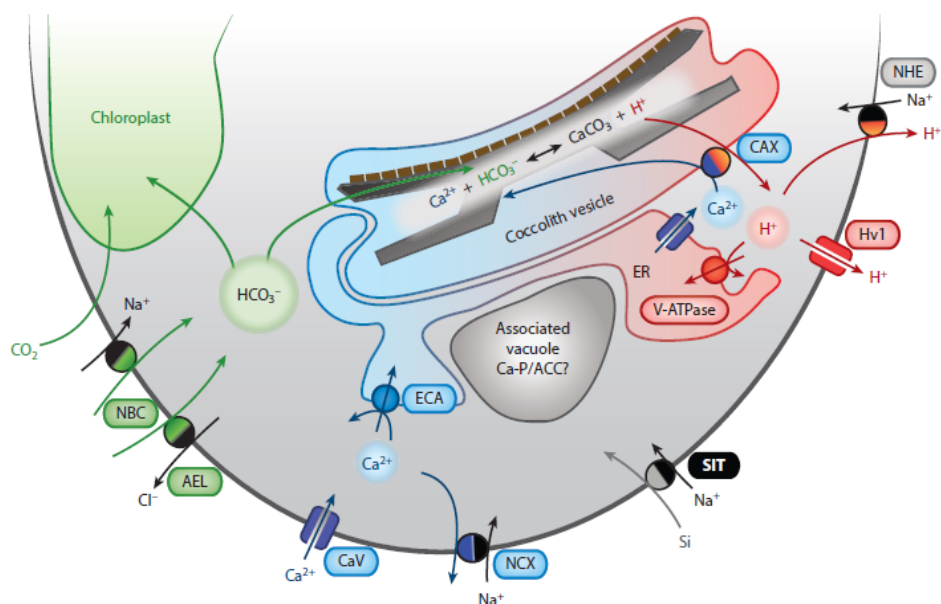


Fig. 1.2.8: Disegno schematico che rappresenta gli scambi e le reazioni che avvengono all'interno della cellula durante la biocalcificazione, si vede infatti un coccolite in formazione all'interno della vescicola (Taylor et al., 2017).

Con l'avvento delle prime fasi della calcificazione cominciano a formarsi piccoli cristalli romboedrici di calcite (CaCO_3) formando quello che viene denominato *anello di protococcoliti* (Fig. 1.2.7 in alto). Questi cristalli vengono successivamente plasmati nella loro morfologia dal sistema di membrane presenti nella vescicola. Al completamento della loro formazione la vescicola si sposta verso la membrana cellulare, fondendosi con essa e rilasciando per esocitosi il coccolite maturo che si posiziona esternamente e, legandosi ad altri coccoliti, forma la coccosfera.

In merito alla biocalcificazione, alle sue funzioni e ai suoi meccanismi, nonostante gli emergenti studi, molte domande non trovano ancora risposte certe ed esaurienti, per questo risulta fondamentale proseguire nella ricerca dei processi coinvolti nella biocalcificazione.

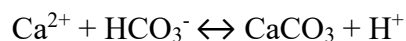
1.3 Significato ecologico e nel ciclo del carbonio

Dal punto di vista ecologico i coccolitofori svolgono un ruolo centrale: sono alla base della catena trofica marina e insieme ad altri organismi fitoplanctonici come le diatomee, sono tra i maggiori produttori primari sulla Terra. Essi regolano i flussi di carbonio tra oceano e atmosfera e sono tra i maggiori produttori di carbonato di calcio in ambienti pelagici (Balch, 2018).

Essendo organismi autotrofi svolgono la fotosintesi clorofilliana secondo la seguente reazione:



Essendo anche organismi calcificanti producono e stoccano carbonato di calcio secondo la seguente reazione:



Si può quindi notare come siano fortemente rilevanti sia nella pompa biologica, legata alla produzione di carbonio organico, sia nella pompa dei carbonati, legata alla produzione di carbonio inorganico.

Nel primo caso si parla di POC, Carbonio Organico Particolato, corrispondente dal punto di vista chimico alle molecole biologiche di cui sono composti i viventi come carboidrati, proteine e lipidi prodotti dalla fotosintesi e base del nutrimento di tutta la catena trofica.

Nel secondo caso invece si parla di PIC, Carbonio Inorganico Particolato, corrispondente al carbonato di calcio stoccato nei coccoliti durante la biocalcificazione.

Il rapporto tra questi due valori viene studiato continuamente per monitorare se le specie stanno investendo maggiormente in biomassa, accrescendo le dimensioni delle cellule, oppure in calcificazione, accrescendo la loro protezione dall'ambiente esterno.

Ciò che emerge maggiormente guardando le reazioni è il forte impatto di questi microrganismi sulle concentrazioni di anidride carbonica: assorbendola per svolgere la fotosintesi contribuiscono alla diminuzione degli effetti del cambiamento climatico globale. Tuttavia la calcificazione produce ioni H^+ , contribuendo localmente all'acidificazione. Il loro ruolo nel tamponare il pH oceanico si manifesta principalmente a lungo termine quando i coccoliti sedimentati si dissolvono consumando H^+ e aumentando l'alcalinità delle acque profonde.

Infatti un evento conseguente a tale fenomeno è l'acidificazione degli oceani: l'anidride carbonica emessa in atmosfera tende a disciogliersi nelle acque oceaniche per i continui scambi naturali tra il compartimento atmosferico e quello idrosferico liberando ioni H^+ che rendono le acque più acide. Questo porta ad alterazioni a tutto l'ecosistema acquatico, cambiamenti così forti di pH modificano drasticamente gli habitat di tutti gli esseri viventi con danni talvolta irreversibili alla catena trofica attraverso l'estinzione di intere specie sia animali che vegetali.

I coccolitofori svolgono il compito importante di attenuare tale effetto di acidificazione poiché, attraverso l'impiego dell'anidride carbonica per la fotosintesi, la sequestrano dalle acque e, una volta morti e sedimentati sul fondo oceanico, il loro guscio carbonatico funge da serbatoio che stocca il carbonio per migliaia di anni contribuendo alla regolazione del pH oceanico.

Ecco perché è di fondamentale importanza lo studio di questi microrganismi. Ad esempio, da analisi svolte su campioni fossili del periodo Eocene-Oligocene, circa 33.9 milioni di anni fa, cioè

con il passaggio da un pianeta senza calotte glaciali permanenti alla formazione della calotta Antartica, si notano evidenti variazioni morfologiche, morfometriche e di specie all'interno delle comunità marine in risposta alla variazione di temperatura e di nutrienti (Viganò, 2016). Emerge una forte sensibilità ai cambiamenti climatici, ogni piccola differenza nelle condizioni dell'ambiente circostante ha portato infatti a risposte rapide e differenziate nei microrganismi. La grande capacità adattativa che li contrassegna ha permesso loro di sopravvivere nel tempo diventando un emblema di viventi da studiare per monitorare e prevedere il cambiamento climatico su scala globale (Oviedo et al., 2015; Taylor et al., 2017).

Sempre guardando al ruolo ecologico i coccolitofori possono essere divisi in quattro categorie a seconda delle nicchie ecologiche che occupano e che si distribuiscono in funzione della luce, dei nutrienti e della stratificazione delle acque (Young et al., 1999):

- Specie soggette a fioriture massive (*bloom*)
- Specie umbelliformi
- Specie floriformi
- Specie rare

Le Specie da *bloom* sono tutte quelle caratterizzate dalla produzione di *placoliti* (Fig. 1.3.1), coccoliti con lo scudo superiore e quello inferiore uniti da un elemento tubolare centrale, che attribuiscono maggior robustezza alla cellula (Fig. 1.3.2). Un esempio può essere il genere *Gephyrocapsa* considerato opportunisto ovvero capace di adattarsi con maggior facilità riproducendosi molto rapidamente sopportando picchi improvvisi di nutrienti. Per questo motivo dominano le acque costiere e quelle di *upwelling* dove, attraverso la risalita di acque profonde, porta in superficie anche molti nutrienti. Si creano proprio i *bloom* (Fig. 1.3.3), fioriture massive, che si estendono per centinaia di migliaia di chilometri quadrati sulla superficie oceanica.

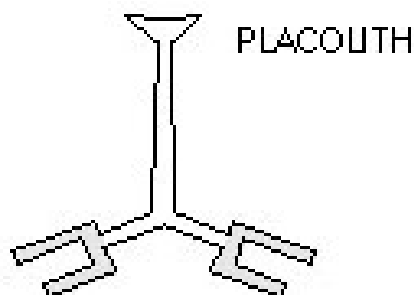


Fig. 1.3.1: Disegno rappresentativo della struttura di un *placolite*
(INA, <https://ina.tmsoc.org/terminology/3coccoliths.htm>)

Questo fenomeno ha impatti molto rilevanti sull'attenuazione del cambiamento climatico per tre motivi principali. Il primo riguarda l'aumento dell'albedo: l'oceano essendo molto profondo risulta di un colore molto scuro registrando valori di albedo molto bassi, cioè tende ad assorbire circa il 95% dei raggi solari riflettendone solo il 5%. Con queste fioriture la superficie assume una colorazione più chiara (Fig. 1c e Fig. 1.3.3) aumentando la capacità riflettente dei raggi, cioè l'albedo, con la conseguenza di un'attenuazione locale del trend di riscaldamento delle acque oceaniche superficiali. Il secondo riguarda la formazione di nubi atmosferiche: questi microrganismi producono dimetilsolfuro (DMS) che, una volta ossidato in atmosfera, forma aerosol e funge da nucleo di condensazione per le nuvole. In questo modo aumenta ancor di più l'albedo e scherma dal Sole la superficie oceanica potenziando il feedback di raffreddamento locale. L'ultimo riguarda lo stoccaggio del carbonio: una volta morti, tutti questi microrganismi finiscono sul fondo oceanico, sedimentano e creano veri e propri bacini che intrappolano il carbonato attenuando l'acidificazione delle acque.

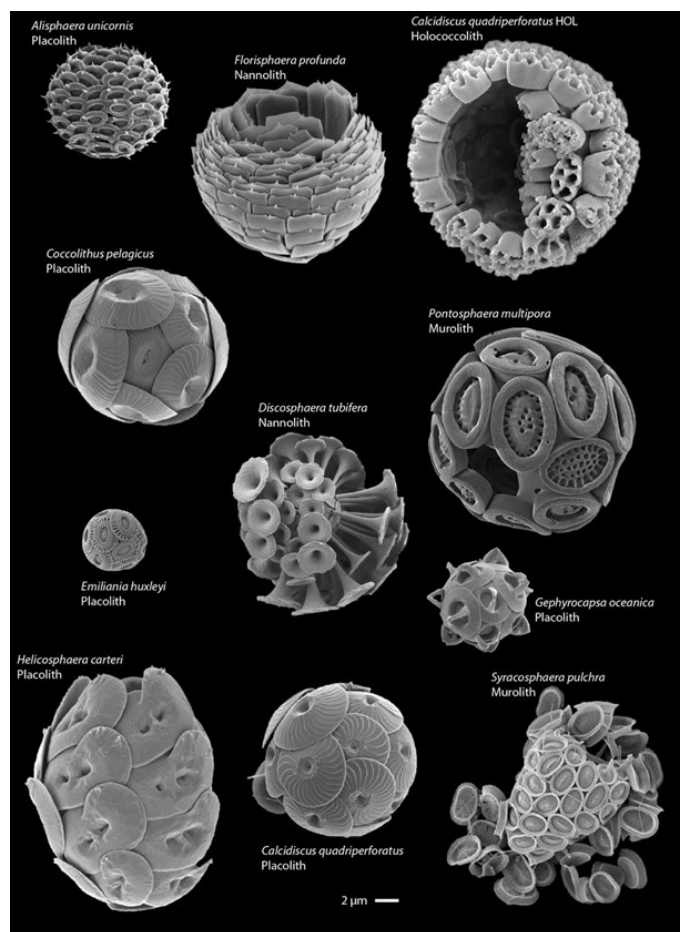


Fig. 1.3.2: Esempi di morfologie cellulari (Sheward, 2016)



Fig. 1.3.3: Immagine da satellite di un bloom algale nel Canale della Manica
(PML, <https://pml.ac.uk/news/huge-coccolithophore-bloom-spotted-from-space/>)

Le specie umbelliformi sono tutte quelle caratterizzate da coccoliti a forma di ombrello utile per aumentare la superficie della coccosfera, mantenendo uguale il volume, e quindi galleggiare con più facilità. Un esempio può essere il genere *Discosphaera* o *Umbellosphaera*, si trovano prevalentemente in acque calde e oligotrofiche, l'opposto di quelle precedenti.

Le specie floriformi sono tutte quelle caratterizzate da una morfologia complessa che ricorda la forma di un fiore, un esempio è il genere *Florisphaera*. Sono specie adattate a proliferare nella zona fotica inferiore (tra 100m e 200m) dove i raggi solari faticano ad arrivare e dove la stratificazione delle acque è maggiore. Lo strato superficiale è più caldo e oligotrofico, mentre quello più profondo, a cui sono meglio adattate, è freddo e più ricco in nutrienti. Il loro studio nei record fossili è di fondamentale importanza per il monitoraggio della profondità del termoclino e del nutriclino nel tempo (Poulton et al., 2017).

Le specie rare sono circa l'80% di quelle catalogate, ma rappresentano solo il 20% in abbondanza presente nelle acque. Sono di fondamentale importanza perché fungono da riserva della biodiversità di questo gruppo, raccolgono la maggior parte del patrimonio genetico del nannoplankton. Ciò significa che, se le condizioni oceaniche dovessero cambiare improvvisamente rendendo l'habitat non più idoneo per la sopravvivenza delle specie dominanti, queste saranno sostituite in abbondanza da specie oggi considerate rare. Sono quelle che potrebbero permettere la sopravvivenza del gruppo dei coccolitofori garantendo la sopravvivenza dell'intero ecosistema globale (Poulton et al., 2017).

Questa differenziazione permette di determinare lo stile di vita delle cellule, se sono cioè autotrofe, eterotrofe o mixotrofe e di comprendere quindi il ruolo ecologico svolto (Poulton et al., 2017; Balch, 2018).

Le specie autotrofe producono autonomamente il proprio nutrimento convertendo l'anidride carbonica e i raggi solari in energia e ossigeno, attraverso la fotosintesi. Sono quelle che vivono nella zona fotica superiore, fino a 50-100 m di profondità, e sono tipicamente le specie da bloom e umbelliformi.

Le specie mixotrofe sono quelle che presentano comportamenti sia autotrofi che eterotrofi il che le rende strategicamente adattabili ad ogni tipo di ambiente soprattutto quelli estremi o instabili. Hanno infatti la possibilità di scegliere quale meccanismo prediligere in base alle condizioni esterne, ad esempio, quando la luce abbonda attivano il meccanismo di autotrofia con lo svolgimento della fotosintesi, quando invece la luce scarseggia prediligono l'eterotrofia fagocitando i batteri. Esempio di specie mixotrofa è *Florisphaera profunda* che, vivendo al limite della zona fotica, sfrutta entrambi i meccanismi per integrare i nutrienti di cui necessita per sopravvivere (Taylor et al., 2017; Balch, 2018).

Le specie eterotrofe rappresentano solo poche eccezioni e necessitano di assorbire carbonio organico disciolto nell'acqua nutrendosi di batteri per fagocitosi. Sono quelle che vivono nella zona afotica, oltre i 200m, come le specie floriformi, e a volte non presentano cloroplasti al loro interno o non vengono raggiunte da luce sufficiente per poter svolgere la fotosintesi. Nelle forme attuali sono specie non calcificanti.

Un'altra caratteristica fondamentale per comprendere il ruolo ecologico dei coccolitofori è l'analisi del loro ciclo vitale di tipo aplodiplonte. Come detto precedentemente vi è un'alternanza tra una fase aploide con produzione di olococcoliti, ma a volte anche senza coccoliti, e una diploide con produzione di eterococcoliti (Geisen et al., 2002). Le forme olococcolitiche sono meglio adattate ad acque calde e oligotrofiche, mentre quelle eterococcolitiche sono meglio adattate ad acque più fredde, con meno luce e più nutrienti (Taylor et al., 2017).

1.4 Sistematica dei coccolitofori

Inizialmente i coccolitofori vennero inseriti all'interno del phylum Chrysophyta, nonché le alghe giallo-brune (o dorate), poiché all'interno della cellula sono presenti pigmenti giallo-bruni.

Successivamente, nel 1976, il botanico britannico David J. Hibberd, attraverso studi di microscopia elettronica, si rese conto che la struttura di queste microalghe differiva tanto da giustificare l'appartenenza ad un altro phylum: il phylum Haptophyta.

Il termine deriva dal greco *hapto* che significa “afferrare” e *phyton* che significa “pianta”, ad indicare la presenza di una struttura filiforme simile ad un flagello denominata haptonema e caratteristico della maggior parte delle haptophyte che originariamente si pensava servisse per captare le piccole particelle di cibo, funzione relegata poi solo alle specie mixotrofe.

La sistematica dei coccolitofori (Fig. 1.4a) si basa su una prima divisione in due classi principali: *Pavlovophyceae* e *Prymnesiophyceae* (Hagino e Young, 2015).

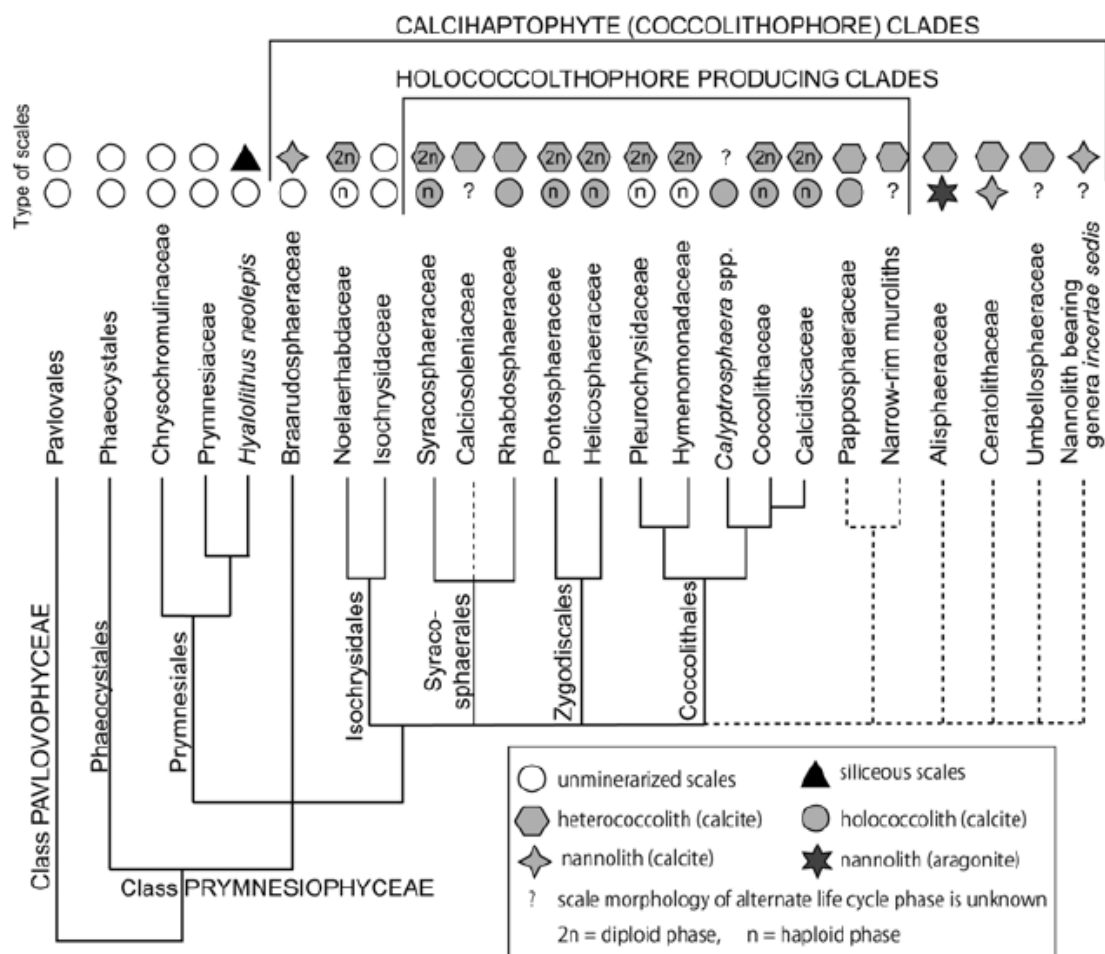


Fig. 1.4a: Schema della sistematica dei coccolitofori. Le linee continue indicano relazioni definite su studi di genetica molecolare, le linee tratteggiate indicano relazioni definite su studi morfologici (Hagino e Young, 2015).

La classe *Pavlovophyceae* comprende un solo ordine, *Pavlova*, caratterizzato da due flagelli di cui uno, quello più lungo, è rivestito da scaglie nodulari, da un haptonema non ancora ben sviluppato e da peli superficiali.

La classe delle *Prymnesiophyceae*, invece è caratterizzata da flagelli lisci di uguale lunghezza, un haptonema ben sviluppato e un rivestimento di scaglie.

Una seconda divisione tassonomica riguarda la differenziazione delle scaglie e dell'haptonema, interessa la classe *Prymnesiophyceae* e porta ad una distinzione in sei ordini: *Phaeocystales*, *Prymnesiales*, *Isochrysidales*, *Syracosphaerales*, *Zygodiscales* e *Coccolithales* (Hagino e Young, 2015).

Gli ordini *Phaeocystales* e *Prymnesiales* si distinguono per la produzione di scaglie non mineralizzate, tranne la specie *Hyalolithus neolepis* (Fig. 1.4b) che produce scaglie silicee.

Gli altri ordini, invece, comprendono specie con scaglie sia mineralizzate che organiche.

La sistematica dei coccolitofori è una disciplina in continua evoluzione, in passato si basava solo su differenze morfologiche, successivamente ha integrato le conoscenze con studi sulla genetica molecolare considerando anche il ciclo vitale della cellula.

L'utilità di queste analisi non è solo legata alla biostratigrafia, ma anche alla comprensione sempre più dettagliata delle risposte di tali organismi e dell'intero ambiente marino ai cambiamenti climatici.

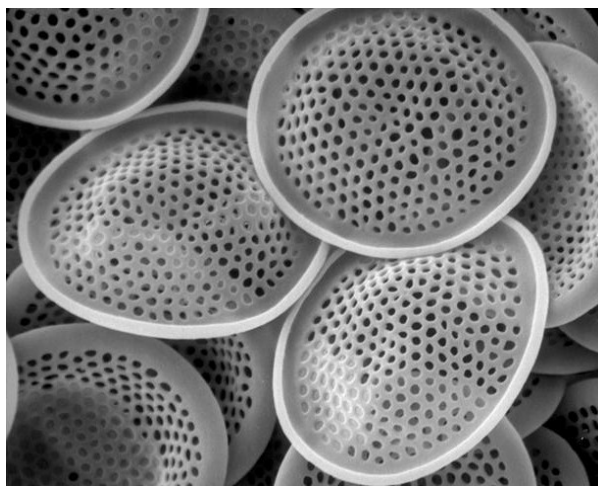


Fig. 1.4b: Specie *Hyalolithus neolepis* rivestita da scaglie silicee
(<https://www.mikrotax.org/Nannotax3/index.php?id=20194>)

1.4.1 *Chrysotila roscoffensis*

Chrysotila roscoffensis (Fig. 1.4.1a) è una specie di coccolitofori appartenente all'ordine *Coccolithales*, caratterizzata da una cellula di dimensioni tra i 6 e i 9 μm (Andersen et al., 2014) e da coccoliti con cristalli di calcite disposti ad anello (Webb, 2015).

Il primo a descrivere questo genere fu il biologo inglese Barry S. C. Leadbeater nel 1970 e successivamente si aprì un dibattito in merito alla collocazione sistematica della specie in oggetto. Inizialmente venne inserita nel genere *Pleurochrysis*, ma recenti studi sulle sequenze di RNA nucleare ne hanno decretato l'appartenenza al genere più antico *Chrysotila* (Andersen et al., 2014).

Gli studi a riguardo di *Chrysotila roscoffensis* sono pochi e per questo motivo viene presa in considerazione come esempio la specie *Chrysotila carterae*.

In precedenza è stato descritto un ciclo vitale divisibile in due fasi, una aploide e una diploide, ma nel caso di *Chrysotila* emergono successive distinzioni.

La fase diploide corrisponde ad uno stadio mobile con presenza di coccoliti e può essere distinta da uno stadio coloniale in cui 2 o 4 cellule si raggruppano; la fase aploide invece corrisponde ad uno stile di vita bentonico, cioè ancorato ad un substrato, e può presentarsi come uno stadio filamentoso in cui non vi è una coccosfera calcificata esterna, ma delle scaglie organiche, composte da una sostanza simile all'emicellulosa, rivestono la cellula come a formare una parete cellulare (Webb 2015; Horiguchi e Pienaar, 1994).

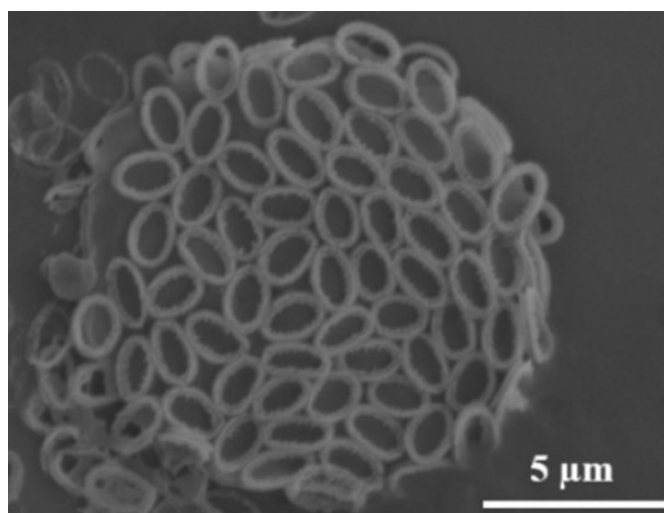


Fig. 1.4.1a: Immagine al microscopio a scansione (SEM) di *Chrysotila roscoffensis* (Meng et al., 2021)

Un'altra particolarità di *Chrysotila carterae* è quella di essere una specie mixotrofica capace, cioè, di alimentarsi tramite fotosintesi, in maniera autotrofa, oppure tramite l'assorbimento delle sostanze nutrienti direttamente dalla colonna d'acqua circostante, in maniera eterotrofa. Questo favorisce il posizionamento degli individui non più limitatamente nella zona fotica superiore, ma

anche in quella inferiore in condizioni di oscurità poiché non dipendono strettamente dalla luce per sopravvivere (Godrijan et al., 2020).

Inoltre recenti ricerche hanno evidenziato l'importanza dello studio di questa specie per svariati campi di interesse.

Primo tra tutti è sicuramente il suo forte impatto nel sequestro di anidride carbonica, grazie alle sue abbondanti fioriture, contrastando i cambiamenti climatici globali (Webb, 2015).

In secondo luogo, dai test effettuati, risulta essere una specie ricca in lipidi il che la rende un'ottima fonte di biocarburante. È di interesse industriale conoscere la sua composizione per poterla sfruttare nelle nuove avanguardie energetiche grazie anche alla sua facilità di coltivazione (Webb, 2015).

Inoltre la sua struttura intracellulare emerge come un modello per comprendere meglio il processo di biomineralizzazione: le vescicole coccolitiche si posizionano al limite interno della cellula e, tramite tomografia crioelettronica 3D, si possono vedere da vicino le diverse fasi di formazione del coccolite (Fig. 1.4.1b) (Chevrier et al., 2025)

L'obiettivo di questa tesi è quello di caratterizzare la componente organica di questa specie con particolare riguardo al profilo proteico.

Questo genere di studi può permettere di comprendere meglio i suoi processi vitali e verificare le possibili implicazioni con le variazioni di parametri ambientali in funzione dei cambiamenti climatici nonché possibili impieghi industriali in applicazioni di tipo biotecnologico.

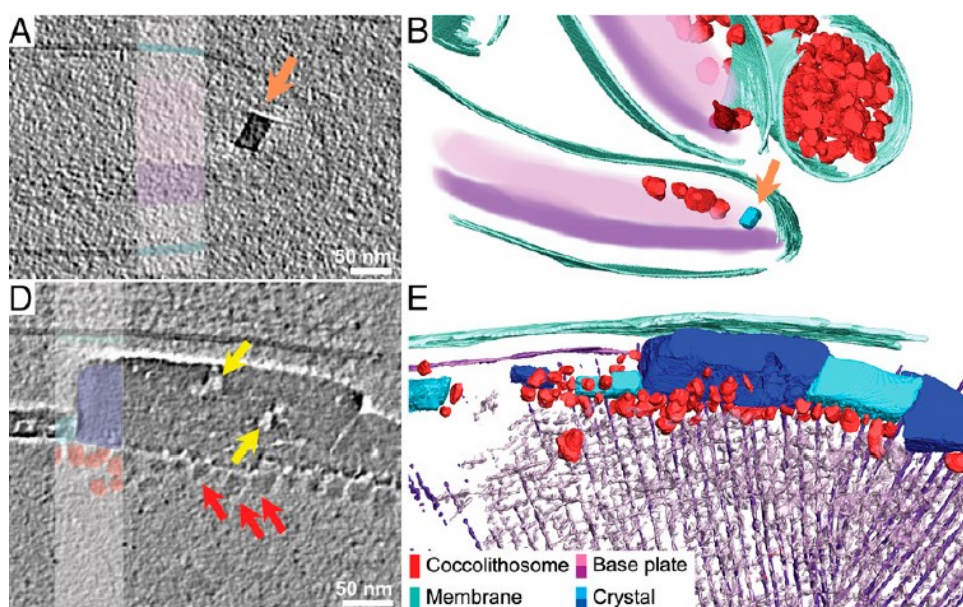


Fig. 1.4.1b: Immagini da tomografia 3D, in scala nanometrica, dell'interno della cellula con focus sulla vescicola coccolitica e annessa legenda dei colori. A-B: evidenzia un cristallo; D: evidenzia in rosso i coccolitosomi e in giallo i vuoti creatisi nel cristallo (Kadan et al., 2021)

2. STATO DELL'ARTE: CARATTERIZZAZIONE MATERIA ORGANICA/INORGANICA DI COCCOLITOFORI E MICROALGHE IN GENERALE

Una volta compresa la struttura e il suo conseguente funzionamento è importante analizzare il percorso di scoperta effettuato dagli studiosi in merito a queste microalghe.

È necessario sottolineare il grande impatto che i coccolitofori hanno sul clima e sulla salute globale e di conseguenza il loro studio è la chiave per comprendere i cambiamenti climatici passati e predire gli scenari futuri.

I primi scritti in merito risalgono al XIX secolo in cui il naturalista tedesco Christian Gottfried Ehrenberg e il biologo inglese Thomas Henry Huxley descrissero queste microalghe come dei piccolissimi frammenti la cui natura organica o inorganica era ancora oggetto di dibattito (Ehrenberg, 1854; Huxley, 1858).

È però con le prime spedizioni oceanografiche, in particolare la celebre *HMS Challenger*, che si arrivò a definire i resti trovati come appartenenti al plancton e più in particolare ai fanghi calcarei che ricoprono i fondali oceanici (Murray e Renard, 1891).

Successivamente, nel XX secolo, gli studi si concentrarono sulla tassonomia, sulla distribuzione globale e sul ruolo ecologico delle specie identificate. Il biologo tedesco Hans Lohmann coniò il termine “Nannoplankton” descrivendo le microscopiche dimensioni di questi organismi (Lohmann, 1902), mentre il botanico austriaco Josef Schiller catalogò sistematicamente tutte le specie conosciute tenendo in considerazione i cicli vitali e gli esemplari fossili (Schiller et al., 1930).

Con la scoperta della microscopia elettronica a scansione, SEM, e della microscopia elettronica a trasmissione (TEM) tra gli anni '50 e gli anni '70 fu possibile ridefinire la tassonomia di questo gruppo potendo ora osservare da vicino la struttura dei singoli individui e delle loro parti scheletriche.

Attualmente le ricerche in merito sono aumentate grazie al sempre maggiore interesse verso i cambiamenti climatici, vengono affrontati principalmente gli aspetti di micropaleontologia, analizzando la biostratigrafia passata e attuale (Hagino e Young, 2015), di distribuzione e fioritura connesse agli impatti sul ciclo del carbonio, studiando l'ecologia e i processi biochimici annessi alla cellula (Balch, 2018).

2.1 Caratterizzazione materia organica/inorganica di coccolitofori

I coccolitofori hanno dunque un ruolo significativo nello studio dell'oceano svolgendo le funzioni di pompa biologica e pompa dei carbonati. Il loro destino futuro è inoltre strettamente correlato con il ciclo del carbonio globale e il loro ruolo come meccanismi di feedback nell'attuale riscaldamento globale. Lo studio delle relazioni tra fisiologia e ambiente è quindi di grande rilievo ed interesse. In particolare, l'investigazione dei processi e dei meccanismi bio-geochimici coinvolti nella biocalcificazione apre nuovi scenari sia in termini di avanzamento di sapere sia in termini di possibili utilizzi industriali di questi organismi seguendo i principi della biomimetica e delle soluzioni basate sulla natura. A favorirne l'utilizzo sono sicuramente la possibilità di coltura in laboratorio e la brevità del ciclo vitale in coltura, che permette una crescita rapida e controllata.

Nonostante la necessità di conoscere nel dettaglio le macromolecole di questi microrganismi per fruire dei benefici, gli studi su questo aspetto sono scarsi.

I taxa maggiormente utilizzati negli studi pubblicati sono la specie *Gephyrocapsa huxleyi* e il genere *Chrysotila*.

Solo pochi lavori descrivono la caratterizzazione delle macromolecole e si trovano per lo più in merito a *Gephyrocapsa huxleyi*. Questo perché viene identificata come la più abbondante e maggiormente distribuita negli oceani del pianeta.

In particolare un solo studio focalizzato sul lipidoma, insieme dei lipidi, di *Gephyrocapsa huxleyi* per i suoi effetti antinfiammatori, antivirali e antitumorali (Aveiro et al., 2020) mostra un inquadramento generale delle proporzioni di macromolecole presenti.

Durante la ricerca sono stati coltivati campioni della microalga e successivamente analizzati per determinarne la composizione in termini di macromolecole (Fig. 2.1.1).

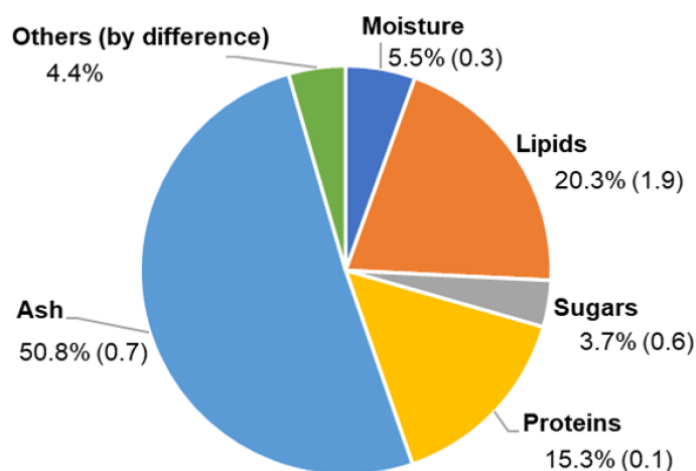


Fig. 2.1.1: Composizione di *Gephyrocapsa huxleyi*, le misure sono espresse in % sul peso del campione liofilizzato e sono state calcolate come media di 3 repliche ciascuna (Aveiro et al., 2020)

Per quantificare la parte inorganica, cioè la teca calcarea esterna, sono state svolte analisi termogravimetriche scaldando a 575° C per 6 ore. I risultati mostrano un valore di ceneri, cioè di residuo solido, pari al 50.8% del peso del campione liofilizzato (Aveiro et al., 2020). Questo valore rappresenta la quantità di teca presente nel campione totale.

Questa percentuale di parte inorganica si è scoperto essere utile anche in campo medico in quanto se ne potrebbe ricavare una ceramica impiegata per la ricostruzione dei denti o per la produzione di ossa sintetiche (Rezvani et al., 2019).

Per quantificare, invece, la parte organica sono state svolte diverse analisi a seconda delle macromolecole ricercate.

I carboidrati, più comunemente chiamati zuccheri, sono stati individuati mediante il metodo del fenolo-acido solforico in cui il campione è stato fatto interagire con l'acido solforico e il fenolo in ghiaccio per controllare la temperatura di una reazione che provoca calore. Con la ripetizione di tale procedimento si è ottenuta una curva, calibrata con i valori standard del glucosio, contenente i valori di assorbanza, quantità di luce che viene assorbita e quindi trattenuta da un campione quando viene attraversato da un fascio luminoso, misurati con uno spettrofotometro UV-Vis. I risultati mostrano un valore di carboidrati pari al 3.7% del peso del campione liofilizzato (Aveiro et al., 2020).

Le proteine sono state quantificate scaldando il campione a 1075° C e a 850° C, rilevando l'azoto, elemento distintivo delle proteine, e convertendolo in contenuto proteico. I risultati mostrano un valore di proteine pari al 15.3% del peso del campione liofilizzato (Aveiro et al., 2020).

I lipidi, fulcro dello studio, sono stati estratti mediante il metodo di Folch modificato che prevede l'unione del campione con diclorometano e metanolo in cui la fase organica è stata prelevata, fatta essiccare e pesata. I risultati mostrano un valore di lipidi pari al 20.3% del peso del campione liofilizzato (Aveiro et al., 2020).

All'interno di questo 20% sono state individuate 134 specie diverse di lipidi (Aveiro et al., 2020) a dimostrazione del ruolo della microalga come fonte naturale di biomolecole ad alto valore con potenziali benefici sulla salute umana correlati al loro utilizzo e assunzione.

Analisi simili sono state effettuate anche sulla specie *Chrysotila carterae* e su *Chlorella vulgaris*, alga unicellulare tipica di ambienti di acqua dolce e specie vivente tra le più antiche. Le estrazioni però sono state precedute da trattamenti ad ultrasuoni per rompere meglio la coccosfera, nel caso della prima specie, e la parete cellulare, nel caso della seconda specie.

I risultati ottenuti per quanto riguarda la componente proteica sono stati l'11.09% per *Chrysotila carterae* e il 12.30% per *Chlorella vulgaris* (Andreeva et al., 2021).

Inoltre le proteine estratte sono state analizzate per studiarne la distribuzione del peso molecolare tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide (Fig. 2.1.2) e indentificarne la composizione amminoacidica tramite spettrometria di massa. Con la prima tecnica infatti i campioni vengono fatti interagire con un campo elettrico, portando alla separazione delle proteine a seconda del loro peso molecolare (Andreeva et al., 2021).

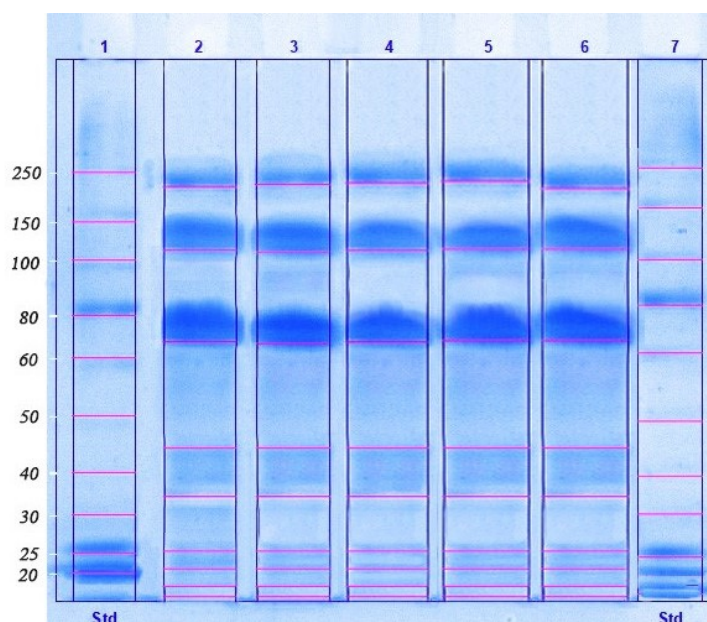


Fig. 2.1.2: Gel ottenuto con corsa elettroforetica: le colonne 1 e 7 sono gli standard di peso molecolare, la colonna 2 riguarda *Chlorella vulgaris* e la colonna 6 riguarda *Chrysotila carterae* (Andreeva et al., 2021)

I benefici delle microalghe possono anche essere legati al campo energetico, infatti alcuni studi dimostrano che l'utilizzo di biomassa come fonte di energia presenta un impatto neutro o addirittura favorevole di carbonio (Bach e Chen, 2017a).

In particolare, la comunità scientifica si sta concentrando sull'utilizzo delle microalghe per la produzione di *bio-oils*, un sostituto del petrolio, e di bio-char, un carbone vegetale (Bach e Chen, 2017a).

Per ottenere questi prodotti è necessario svolgere un processo di pirolisi, una decomposizione chimica indotta da un aumento di calore effettuata in ambiente anossico, privo cioè di ossigeno, al fine di decomporre termicamente la biomassa e, come conseguenza, di rimuovere la materia volatile (Chen et al., 2018). Com'è facile immaginare, per ottimizzare la resa serve conoscere al meglio la cinetica delle microalghe e i loro meccanismi di degradazione, fine degli studi presi in esame (Bach e Chen, 2017a, 2017b). L'ottimizzazione della pirolisi permette però anche di avere una caratterizzazione delle macromolecole presenti poiché la degradazione termica dipende dalla composizione. Così studi termogravimetrici su microalghe permettono di avere informazioni speditive sulla loro composizione.

Questo è il caso di *Chlorella vulgaris*, molto usata come integratore naturale a carattere depurativo grazie alla sua ricca composizione in proteine, vitamine, minerali e antiossidanti.

Durante lo studio campioni di *Chlorella vulgaris* sono stati analizzati tramite termogravimetria (TGA) riscaldando fino a 700° C e registrando perdita di peso, velocità di degradazione e conversione. L'andamento è visibile nella seguente tabella in cui si possono distinguere una prima fase, fino a circa 200° C, in cui la perdita di massa è più contenuta a causa del verificarsi dell'evaporazione dell'acqua presente all'interno delle cellule, una seconda fase, fino a circa 400° C, in cui avviene la maggior parte della perdita di massa che si converte in gas successivamente condensati e convertiti in *bio-oils* e una terza fase in cui la perdita di massa rallenta a causa della carbonizzazione dei residui solidi convertiti in *bio-char* (Fig. 2.1.3) (Bach e Chen, 2017a).

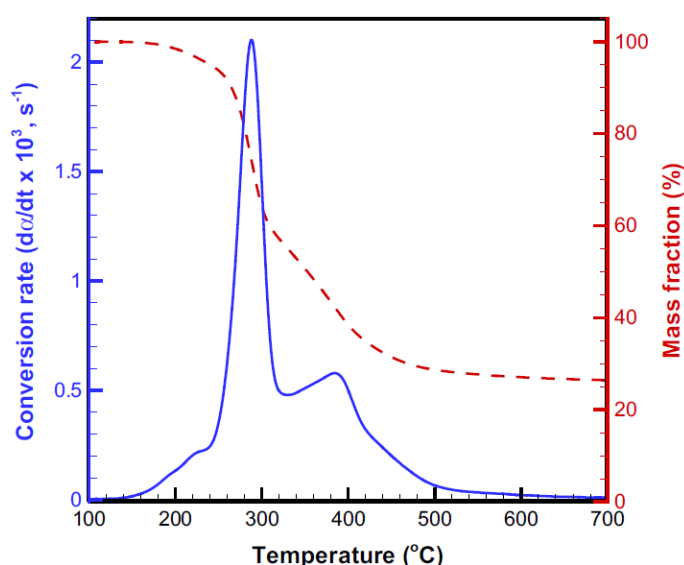


Fig. 2.1.3: Degradazione termica di *Chlorella vulgaris* durante la pirolisi (Bach e Chen, 2017b)

Il fattore determinante dell'andamento degradativo è la natura biochimica di questa alga composta da carboidrati per il 56.92%, proteine per il 22.5%, lipidi per il 14.83% e per un restante 5.75% da elementi minori (Bach e Chen, 2017b).

Attraverso questo approccio termogravimetrico, gli autori hanno cercato di individuare un modello matematico che rispecchiasse maggiormente l'andamento della curva sperimentale in cui le variazioni esprimono modi diversi di considerare le componenti biochimiche (Bach e Chen, 2017a, 2017b).

Il primo modello è stato costruito su una reazione singola, considerando cioè tutte le componenti biochimiche allo stesso modo. L'attribuzione di una stessa velocità di degradazione ha però portato alla perdita di accuratezza nella predizione dei picchi reali (Fig. 2.1.4).

Sono stati pensati così altri modelli aumentando il numero di variabili considerate fino al raggiungimento del modello a sette reazioni. In quest'ultimo le componenti biochimiche vengono divise in quattro gruppi principali (carboidrati, proteine, lipidi ed elementi minori) dividendo carboidrati e proteine in ulteriori due gruppi ciascuno, a seconda della resistenza termica, se bassa o alta, e aggiungendo un gruppo comprendente prodotti intermedi formatisi durante il riscaldamento. Si arriva ad attribuire quindi sette velocità di degradazione distinte raggiungendo così un'accuratezza del 99.37% (Fig. 2.1.5).

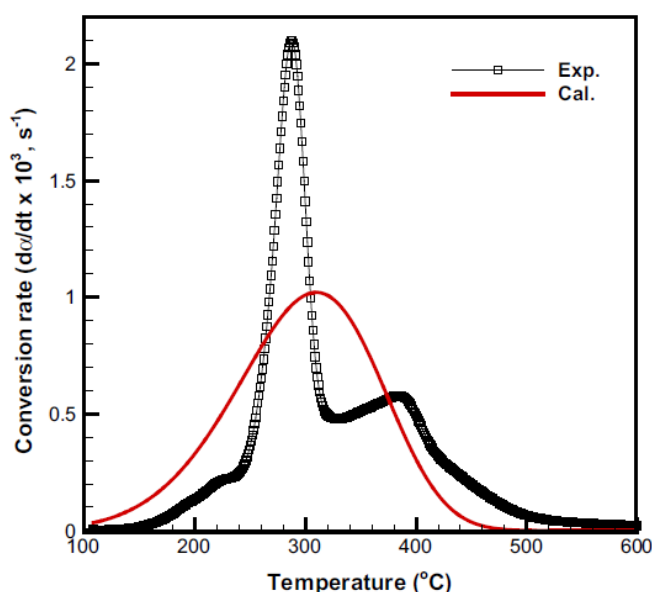


Fig. 2.1.4: Curva di velocità di degradazione secondo il modello a reazione singola (Bach e Chen, 2017b)

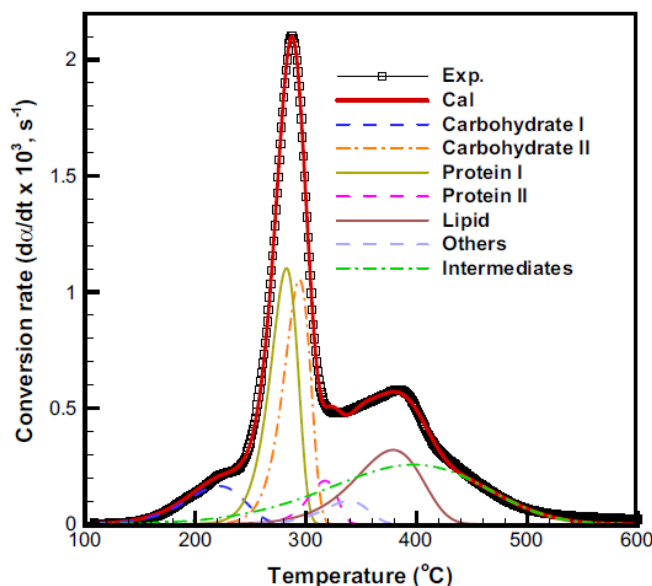


Fig. 2.1.5: Curva di velocità di degradazione secondo il modello a sette reazioni (Bach e Chen, 2017b)

Il modello a sette reazioni risulta essere quello migliore poiché proteine e carboidrati tendono a degradarsi a temperature inferiori rispetto ai lipidi e quindi le diverse macromolecole non possono

essere prese in considerazione in maniera unitaria (Chen et al., 2018). Inoltre risulta applicabile anche per altre specie di microalghe variando solo i rispettivi quantitativi di componenti biochimiche caratterizzanti.

Oltre ad un'analisi dei diversi modelli, vi è una distinzione di 4 tipologie di pirolisi possibili a seconda del prodotto che si vuole ottenere (Bach e Chen, 2017a).

Con una pirolisi lenta si ottimizza la bassa velocità di riscaldamento producendo molto più *bio-char*, con la pirolisi rapida invece si ottimizza l'alta velocità di riscaldamento producendo più *bio-oil*, con una pirolisi catalitica vengono introdotte delle sostanze catalizzatrici che rendono il *bio-oil* ottenuto di migliore qualità riducendone l'acidità e con una pirolisi a microonde si garantisce un riscaldamento omogeneo in tutto il campione senza necessità di agitazione meccanica durante il processo.

In conclusione, a fronte della scarsa letteratura in merito all'analisi delle componenti delle microalghe, in particolare dei cocolitofori, e a seguito di un evidente interesse crescente verso questi organismi così indispensabili per la salute umana e del Pianeta, è di fondamentale importanza aumentarne gli studi per conoscere sempre più questo micromondo vivente e poterlo sfruttare al meglio.

3. MATERIALI E METODI

Lo studio è stato svolto al fine di caratterizzare la parte organica di *Chrysotila roscoffensis*, per raggiungere questo obiettivo sono state effettuate un'analisi termogravimetrica (TGA) per avere una stima quantitativa grossolana delle macromolecole presenti ed un'analisi del profilo proteico sia tramite elettroforesi gel che spettrometria di massa.

Inoltre le stesse procedure sono state applicate anche su *Chlorella vulgaris*, microalga su cui è presente un maggior numero di studi, utilizzandola come fonte di calibrazione dei protocolli da attuare.

3.1 Analisi con TGA

La termogravimetria (TGA) consiste in un'analisi quantitativa a carattere chimico-fisico utile per ottenere informazioni riguardanti la composizione della parte organica di un campione.

Si basa sul rilevamento delle variazioni di massa in funzione della temperatura, infatti durante il riscaldamento avvengono reazioni di degradazione termica, come disidratazione o pirolisi, che riducono la massa campionata al solo residuo incombustibile (Aveiro et al., 2020).

In questa tesi 5 mg di campione di microalghe sono stati sottoposti ad un riscaldamento fino a 1000°C per oltre 45 minuti sia in aria che in ambiente privo di ossigeno e in presenza di azoto poiché quest'ultimo gas non reagendo con il campione permette il verificarsi della pirolisi, una decomposizione della materia dovuta solo al calore e non alla combustione (Bach and Chen, 2017b).

I risultati ottenibili da questo processo sono grafici con la temperatura o il tempo sull'asse delle ascisse e la massa residua sull'asse delle ordinate (Fig. 3.1.1). I picchi della curva corrispondono quindi al momento di maggior decomposizione, e quindi di perdita di massa, delle diverse macromolecole nel corso dell'analisi (Aveiro et al., 2020). Questa analisi permette di avere una stima grossolana delle componenti organiche presenti nel campione e la loro quantità oltre che a poter quantificare la quantità di carbonato di calcio, cioè di teca presente. Per questo lavoro la quantificazione del contenuto in proteine è stata la base di partenza per la verifica del procedimento di estrazione di seguito illustrato.

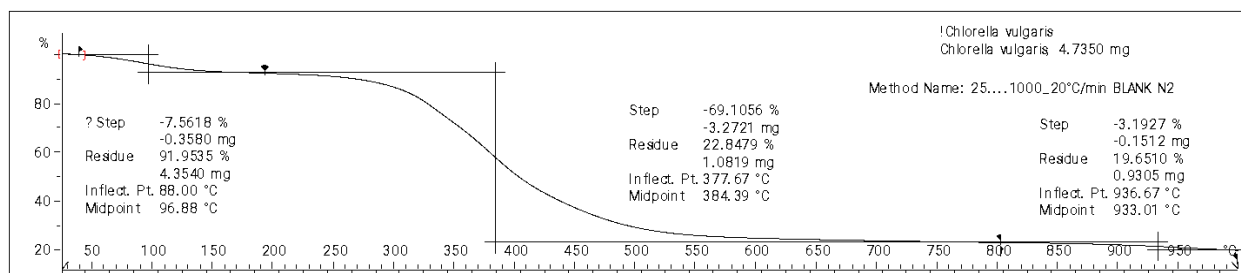


Fig. 3.1.1: Grafico ottenuto da analisi con TGA di *Chlorella vulgaris*

3.2 Estrazione e costruzione profilo proteico

3.2.1 Rottura della parete cellulare

Le microalghe, essendo caratterizzate da cellule vegetali, possiedono un rivestimento esterno chiamato parete cellulare e composto prevalentemente da cellulosa. Le cellule dei coccilofori invece sono rivestite solo da una membrana cellulare costituita per lo più da lipidi e in alcuni casi essa è avvolta da una coccosfera calcificata.

Quest'ultima crea una vera e propria barriera con l'ambiente esterno, impedendo la fuoriuscita della componente organica e pertanto necessita di essere rotta per poter estrarre e successivamente analizzare le singole componenti organiche.

In questa tesi è stata messa a punto una procedura di estrazione utilizzando la tecnica denominata *bead milling*, cioè omogeneizzazione, e seguendo il protocollo pubblicato da Bernaerts et al. (2026) per la specie *Chlorella vulgaris*. In particolare i campioni di microalghe si presentavano sotto forma di biomassa liofilizzata; per *Chlorella vulgaris* sono stati prelevati 5 mg di campione (Fig. 3.2.1a) mentre per *Chrysotila roscoffensis* 10 mg (Fig. 3.2.1b) per compensare l'eventuale peso della teca carbonatica.

I campioni di *Chlorella vulgaris* sono stati inizialmente sottoposti a due differenti trattamenti di idratazione:

- Aggiunta per un'ora di 500 μ L di acqua demineralizzata (Bernaerts et al., 2026);
- Aggiunta per un'ora di 500 μ L di una soluzione denominata buffer di lisi e composta da un tampone fosfato salino (PBS) e da sodio dodecil solfato (SDS) all'1%.

Il PBS corrisponde ad una soluzione salina tampone a base di fosfato che mantiene il pH di 7.4 stabile impedendo alle cellule di subire shock osmotici prima della lisi. L'SDS (1%) corrisponde

invece al detergente, simile al sapone, che scioglie le membrane cellulari lipidiche. Ciò serve per rendere più efficace la rottura delle cellule.



Fig. 3.2.1a: Eppendorf contenenti 5mg di *Chlorella vulgaris* ciascuna (foto scattata da Viviana Casotto durante il laboratorio)



Fig. 3.2.1b: Eppendorf contenenti 10mg di *Chrysotila roscoffensis* ciascuna (foto scattata da Viviana Casotto durante il laboratorio)

I campioni di *Chrysotila roscoffensis* sono stati idratati solo con 500 μ L di buffer di lisi.

In entrambi i casi l'idratazione è stata favorita dall'utilizzo di Argos Technologies R2000 RotoFlex 120V (Fig. 3.2.1c), uno strumento che mantiene in costante rotazione i campioni al fine di evitare la precipitazione sul fondo e garantire una completa solubilizzazione del campione. In particolare durante la sperimentazione la velocità è stata impostata a 20 giri al minuto.

Un'ulteriore differenza tra i protocolli usati per le due specie è stata quella dell'utilizzo dell'acido cloridrico (HCl).

Infatti un campione di *Chrysotila roscoffensis*, prima dell'idratazione, è stato fatto reagire per una decina di minuti con 500 μ L di HCl 0,2 M per sciogliere la teca esterna composta da coccoliti in quanto barriera che altrimenti avrebbe potuto alterare i risultati riguardanti la rottura della parete cellulare.



Fig. 3.2.1c: RotoFlex, strumento per agitazione costante (foto scattata da Viviana Casotto durante il laboratorio)

Una volta terminata l'idratazione i campioni sono stati trasferiti in provette contenente 2 mL di sfere di zirconio di 0.5 mm. Le provette sono poi state inserite all'interno di un agitatore (Fig. 3.2.1d) che, tramite vibrazione, permette la lisi delle cellule e la conseguente fuoriuscita della componente organica che si omogeneizza nella sostanza liquida all'interno della provetta.

Le sfere (Fig. 3.2.1e) sono il fulcro di questa tecnica poiché svolgono il ruolo di azione meccanica che rompe la parete cellulare o, nel caso dei coccolitofori, la coccosfera.



Fig. 3.2.1d: Omogeneizzatore (BioScientifica, https://www.bioscientifica.it/9903-large_default/omogeneizzatore-a-biglie-beadbug-3-x-2ml.jpg)



Fig. 3.2.1e: Provette con all'interno le sfere in zirconio (foto scattata da Viviana Casotto durante il laboratorio)

Anche in questo caso, seguendo il protocollo di Bernaerts et al. (2026), i campioni di *Chlorella vulgaris* sono stati sottoposti a cicli crescenti di omogeneizzazione. In particolare ciascun campione è stato suddiviso in aliquote di uguale quantità e ciascuna è stata sottoposta a cicli di 15, 30 e 45 minuti.

In realtà nel lavoro preso come riferimento di Bernaerts et al. le tempistiche considerate arrivano fino ai 90 minuti con prelievi per la comparazione ogni 10 minuti.

Osservando però i grafici riportati dallo studio (Fig. 3.2.1f) si evidenzia con la formazione di un plateau il raggiungimento di una rottura pressoché completa dopo 45 minuti senza alcuna variazione per tempistiche più lunghe (Bernaerts et al., 2026).

Queste considerazioni sono molto importanti poiché il dosaggio delle proteine e le conseguenti analisi dipendono strettamente dalla completa rottura delle cellule, bisogna quindi essere sicuri della totale lisi cellulare.

Inoltre nel caso di *Chrysotila roscoffensis* i campioni hanno subito una lisi di 30 minuti poiché dai risultati della specie precedente non sono emerse differenze sostanziali, attuando quindi una media.

Le tempistiche non corrispondono interamente al tempo di agitazione del campione bensì a diversi cicli in cui sono state alternate fasi da 20 secondi di agitazione a fasi da 80 secondi di raffreddamento (Fig. 3.2.1g).

Questo perché l'omogeneizzazione porta al verificarsi di una reazione in cui il campione agitato produce energia sotto forma di calore, ma il surriscaldamento potrebbe danneggiare irreversibilmente la componente organica denaturando per esempio le proteine. Ecco perché si

rende necessario un periodico raffreddamento, svolto inserendo le provette in un bagno di ghiaccio (Fig. 3.2.1g).

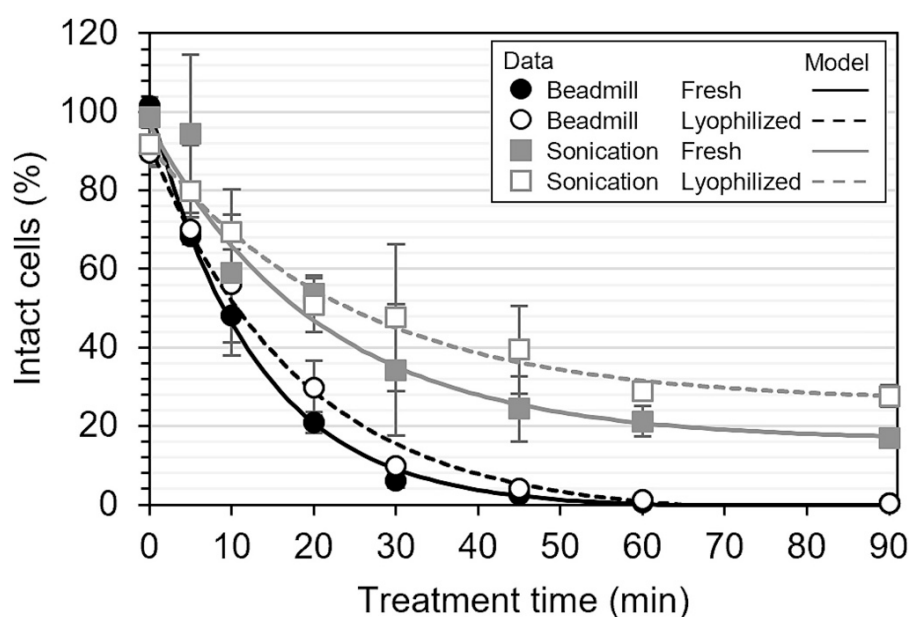


Fig. 3.2.1f: Grafico in cui sull'asse delle ascisse è fissato il tempo e sull'asse delle ordinate la percentuale di cellule intatte, è visibile il raggiungimento della rottura totale al quarantacinquesimo minuto e il successivo plateau (Bernaerts et al., 2026)



Fig. 3.2.1g: Provette inserite in bagno di ghiaccio per il raffreddamento (foto scattata da Viviana Casotto durante il laboratorio)

Allo scadere dei 15, 30 e 45 minuti le provette sono state inserite in una centrifuga per 5 minuti ad una velocità di 14.000 giri/min e il surnatante ottenuto è stato prelevato per le successive analisi.

3.2.2 Estrazione e dosaggio delle proteine

A seguito del processo di *bead milling* il surnatante di ogni campione, prelevato previa centrifuga, è stato sottoposto ad ulteriori analisi per l'estrazione e la caratterizzazione della componente organica, in particolare delle macromolecole proteiche.

Per fare ciò è stato usato un primo metodo di quantificazione della concentrazione proteica attraverso uno strumento apposito, uno spettrofotometro (Fig. 3.2.2a).



Fig. 3.2.2a: Spettrofotometro (foto scattata da Viviana Casotto durante il laboratorio)

La spettrofotometria si basa sul principio di assorbanza, cioè la quantità di luce assorbita da una soluzione se attraversata da un fascio luminoso con una specifica lunghezza d'onda. Misurando questo valore e applicando la legge di Lambert-Beer si ricava la concentrazione di proteine presenti nel campione.

La legge infatti stabilisce un rapporto di proporzionalità diretta tra il quantitativo di luce assorbito e la concentrazione di una soluzione, all'aumentare di uno, cioè, aumenta anche l'altra e viceversa (Grimsley and Pace, 2003).

Una nota importante è il quantitativo di campione da prelevare: è meglio non utilizzare un'aliquota troppo elevata per evitare la saturazione e la conseguente sottostima della concentrazione proteica.

Nel caso di *Chlorella vulgaris* sono state preparate diverse provette, alcune con i campioni della microalga e altre con i "bianchi", ovvero con acqua demineralizzata e con buffer di lisi, per calibrare lo strumento secondo la soluzione di fondo dei diversi campioni. Specificatamente le eppendorf per ciascuna tempistica di omogeneizzazione (15, 30 e 45 minuti) erano così composte:

- 25 μ L di campione idratati in acqua demineralizzata
- 10 μ L di campione idratati in buffer di lisi e 15 μ L di PBS e SDS 1%
- 2 con 25 μ L di acqua demineralizzata, usate come bianco per i campioni idratati con acqua demineralizzata

- 2 con 25 μL di buffer di lisi (PBS e SDS 1%), usate come bianco per i campioni idratati con buffer di lisi.

Nel caso di *Chrysotila roscoffensis*, invece, come bianco è stato considerato solo il buffer di lisi e le eppendorf (Fig. 3.2.2b) erano così composte:

- 2 con 25 μL di buffer di lisi (PBS e SDS 1%), usate come bianco
- 10 μL di campione tal quale e 15 μL di PBS e SDS 1%
- 10 μL di campione pretrattato con HCl e 15 μL di PBS e SDS 1%

In ogni provetta sono stati aggiunti 125 μL e 1000 μL rispettivamente di “DC Protein Assay Reagent A” e “DC Protein Assay Reagent B”, due specifici reagenti necessari per l’analisi spettrofotometrica e, a seguito di un’incubazione al buio per 15 minuti, i campioni sono stati trasferiti in una cuvetta per l’analisi allo spettrofotometro.



Fig. 3.2.2b: Campioni di *Chrysotila roscoffensis* pronti per l’analisi spettrofotometrica; a sinistra il campione pretrattato con HCl e a destra il campione tal quale (foto scattata da Viviana Casotto durante il laboratorio)

Lo strumento ha previsto una prima calibrazione con 2 soluzioni di bianco per azzerare il rumore di fondo e successivamente è stato posto all’interno un campione insieme ad un bianco per il confronto dell’assorbanza tra i due.

Per quanto riguarda i calcoli, invece, per passare dalla misura dell’assorbanza alla percentuale proteica bisogna considerare la lunghezza d’onda da impostare per lo spettrofotometro a 750 nm e un coefficiente di 0.018. Questi due valori sono stati ottenuti grazie alla costruzione di una retta di calibrazione standard utilizzando un campione con contenuto noto di proteine in accordo con i reagenti DC Protein Assay A e B.

Per ottenere i $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ si procede con il rapporto tra l'assorbanza e il coefficiente ϵ , rapportando il risultato ottenuto per la quantità di campione omogeneizzato, si ricava la percentuale di proteine.

3.2.3 Caratterizzazione proteine

Oltre alla determinazione percentuale appena descritta, un altro metodo utilizzato per la caratterizzazione della componente organica proteica è l'elettroforesi su gel in cui le proteine vengono sottoposte ad un campo elettrico separandosi in funzione del loro peso molecolare (Andreeva et al., 2021).

Per svolgere questa tecnica il protocollo richiede la preparazione di due gel: *stacking gel* e *running gel*.

Il primo è composto da: acqua, il solvente principale, Acrilammide 4-5%, Tris HCl, un tampone a pH 6.8 che crea una differenza di carica e permette la successiva corsa, Ammonio persolfato al 10%, un prodotto instabile che produce radicali solfato e permette la solidificazione del gel, e Tetrametiletilendiammina, un catalizzatore anch'esso usato per solidificare il gel.

Lo *stacking gel* è necessario per compattare tutte le proteine in una banda sottile prima della separazione, creando una specie di pettine (Fig. 3.2.3a) in cui poi vengono inseriti i campioni per la corsa.

Il secondo è uguale al primo, si differenzia solo nella percentuale di Acrilammide (10-15%) e nel pH che in questo caso sale a 8.8 e corrisponde alla matrice in cui avviene la separazione. Quest'ultima prevede una corsa più rapida per le proteine con peso inferiore che corrono verso il fondo e una corsa più lenta per le proteine con peso maggiore che migrano più lentamente creando delle bande dense lungo il percorso.

Per facilitare l'analisi dei pesi molecolari in un pozzetto viene inserita una soluzione contenente pesi noti in modo da avere un riferimento numerico lungo le bande (Fig. 3.2.3b e Fig. 3.2.3c).

Per quanto riguarda i campioni, prima dell'inserimento sono state prelevate aliquote da 5 μL e 10 μL a cui si sono aggiunti 10 μL di soluzione tampone, blu di bromofenolo come indicatore del fronte di corsa e glicerolo per addensare la soluzione.

Una volta inseriti tutti i campioni viene data corrente costante a 180 V con un amperaggio massimo di 30 mA per circa un'ora e un quarto.

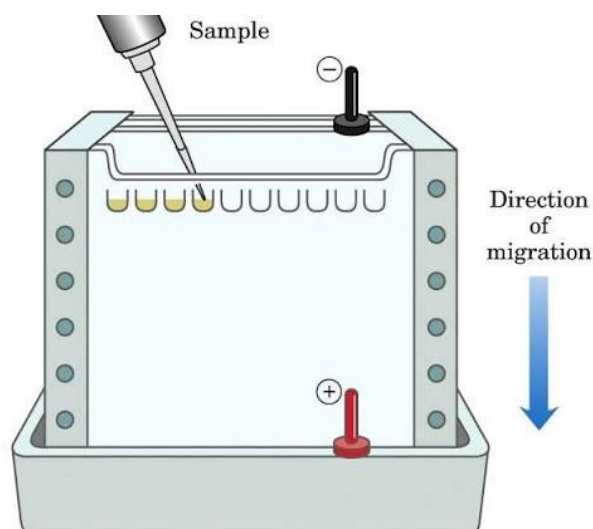


Fig. 3.2.3a: Immagine esplicativa dell'elettroforesi su gel, in alto la banda “a pettine” dove vengono inseriti i campioni per la corsa (<https://docente.unife.it/francesco.bernardi/materiale-didattico-biochimica/biochimica-applicata-2018/Elettroforesi-3.pdf>)

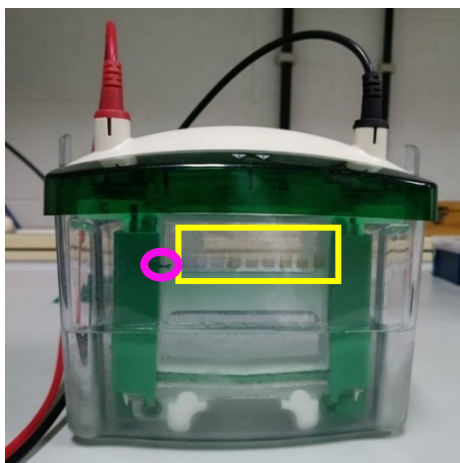


Fig. 3.2.3b: Campioni di *Chlorella vulgaris*, evidenziati in giallo; cerchiato in rosa è il campione con i pesi noti (foto scattata da Viviana Casotto durante il laboratorio)



Fig. 3.2.3c: Campioni di *Chrysotila roscoffensis*, evidenziati in giallo; cerchiato in rosa è il campione con i pesi noti (foto scattata da Viviana Casotto durante il laboratorio)

Successivamente il gel è stato estratto e inserito per un paio d'ore in una soluzione di etanolo, acido acetico e blu di Coomassie per fissare il bandeggio ottenuto dalla corsa (Fig. 3.2.3d). Allo scadere del tempo è stato lavato in acido acetico al 5% per rimuovere il colorante in eccesso presente sul fondo. Questa fase può richiedere anche alcune ore e, per favorire colorazione e lavaggio, il gel viene posto sopra uno strumento che ne mantiene costante l'agitazione per un assorbimento più efficace (Fig. 3.2.3e).



Fig. 3.2.3d: Gel in bagno di etanolo, acido acetico e blu di Coomassie per il trattamento di colorazione (foto scattata da Viviana Casotto durante il laboratorio)

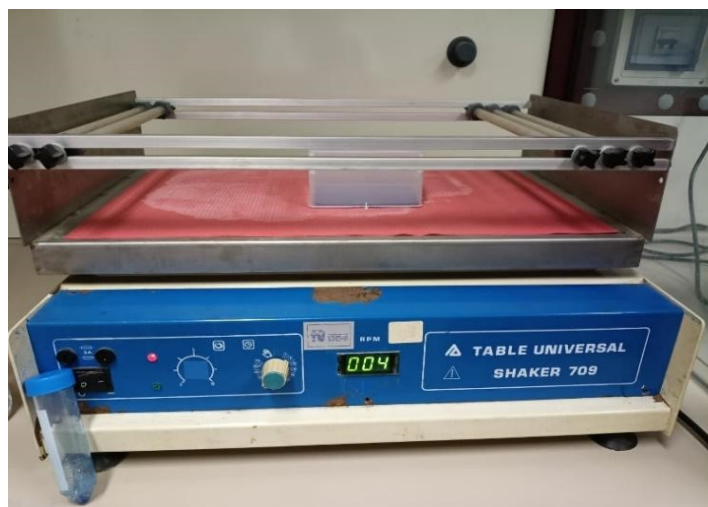


Fig. 3.2.3e: Strumento usato per la costante agitazione del gel nelle soluzioni di colorazione e lavaggio, in particolare viene raffigurato il secondo trattamento (foto scattata da Viviana Casotto durante il laboratorio)

Al termine di questi procedimenti si analizzano le bande formatesi, essendo separate a seconda del peso, con un'analisi visiva, si possono predisporre ipotesi poi confrontabili con gli elenchi delle proteine standard e con ulteriori studi qualitativi e quantitativi.

Se il bandeggio è ridotto si ripete la corsa elettroforetica ottenendo una concentrazione maggiore, sempre dividendo a seconda del peso, che migliora i risultati ottenibili con le analisi successive.

Un tipo di analisi che viene utilizzata maggiormente per la caratterizzazione delle proteine è la cromatografia liquida ad alta prestazione abbinata alla spettrometria di massa (HPLC-MS).

Un approccio classico per questa tecnica è la preparazione di un campione digerito attraverso un'incubazione a 37° C per circa 12 ore (tutta la notte) con l'enzima tripsina (Mangiacotti et al., 2023). Per corroborare i risultati dall'analisi dei campioni in gel è stata prelevata un'aliquota di surnatante derivato dall'omogeneizzazione e sottoposta a reazione con enzimi per la digestione della componente organica proteica per poi essere separata in peptidi più semplici tramite cromatografia liquida. Senza questo passaggio lo spettrometro riceverebbe campioni troppo complessi e non darebbe riscontri corretti.

I campioni digeriti e il gel sono stati analizzati presso il centro grandi strumenti di Pavia dove l'Università possiede strumentazioni avanzate per l'effettuazione di tecniche molto specifiche e precise.

Nel caso del presente studio sono stati utilizzati gli strumenti di cromatografia liquida e spettrometria di massa. Il primo, modello SCIEX ExionLC, è composto da diversi moduli per il passaggio di solventi e l'iniezione dei campioni, mentre il secondo, modello SCIEX X500R QTOF, è composto da un *detector* per l'identificazione delle molecole e si basa sull'analisi del tempo di volo.

In particolare per l'effettuazione delle analisi si inseriscono nello strumento (Fig. 3.2.3f) due fasi mobili, una composta da acqua demineralizzata e un'altra composta da Acetonitrile, che fungono da solventi interagendo con i campioni.



Fig. 3.2.3f: Strumento per l'analisi della massa; a sinistra la parte legata alla cromatografia liquida, a destra la parte legata alla spettrometria di massa (foto scattata da Viviana Casotto durante il laboratorio)

Oltre a queste due viene inserita una colonna con all'interno una fase stazionaria composta da una resina che trattiene e separa i peptidi in base ad affinità chimiche, motivo per cui si utilizzano due solventi con polarità diversa.

In un primo momento infatti, usando il circolo dell'acqua demineralizzata, reagiscono maggiormente i peptidi idrofili, mentre in un secondo momento, usando il circolo dell'Acetonitrile, reagiscono maggiormente i peptidi idrofobi.

Il tempo di ritenzione, cioè il tempo impiegato dal peptide per attraversare la colonna cromatografica, è quello che permette la costruzione di grafici in cui ogni picco rilevato si riferisce ad uno specifico peptide.

Una volta passato attraverso la colonna il campione arriva allo spettrometro dove viene nebulizzato e gli ioni, che compongono i peptidi e sono caricati positivamente, vengono sottoposti ad un ambiente sotto vuoto con carica negativa. Questi vengono richiamati verso un detector che li identifica confrontandoli anche con quelli già presenti nei registri.

L'analizzatore dello spettrometro viene definito TOF (Time-of-Flight) perché si basa sul tempo di volo per il riconoscimento del peptide. Maggior tempo infatti corrisponde a peptidi più pesanti che si muovono più lentamente e arrivano dopo al *detector*. I peptidi più leggeri impiegano meno tempo e di conseguenza rapportando la massa con la carica si può ottenere la proteina da cui provengono gli ioni.

Da questa combinazione di tecniche si ottengono poi grafici con una curva per la massa e una per il rapporto tra le masse poiché è possibile che si rinvenivano piccoli frammenti che altrimenti non verrebbero analizzati.

Successivamente l'elenco dei peptidi ottenuto viene confrontato, attraverso il sistema Peaks, con i registri presenti sulla piattaforma UniProt da cui si ricava l'elenco delle proteine presenti all'interno del campione. Per rendere più attendibile l'elenco finale solitamente si predilige la considerazione solo di quelle con una percentuale di *score*, cioè l'indice di lettura, uguale o superiore al 70%. Al di sotto di questa soglia infatti il tasso di errore potrebbe incrementarsi tanto da considerare in realtà dei falsi positivi e pertanto le proteine segnate al di sotto di questo livello critico potrebbero non corrispondere effettivamente a quelle contenute nel campione.

4. RISULTATI

4.1 Analisi con TGA

Come prima analisi è stata svolta la termogravimetria (TGA) in ambiente anossico al fine di ottenere risultati sulla composizione della frazione organica delle microalghe prese in esame.

In particolare sono stati prelevati 4.735 mg di *Chlorella vulgaris* e sottoposti a pirolisi ricavando due grafici (Fig. 4.1.1) con la temperatura e il tempo sull'asse delle ascisse e con la percentuale di massa residua e il quantitativo di massa persa sull'asse delle ordinate.

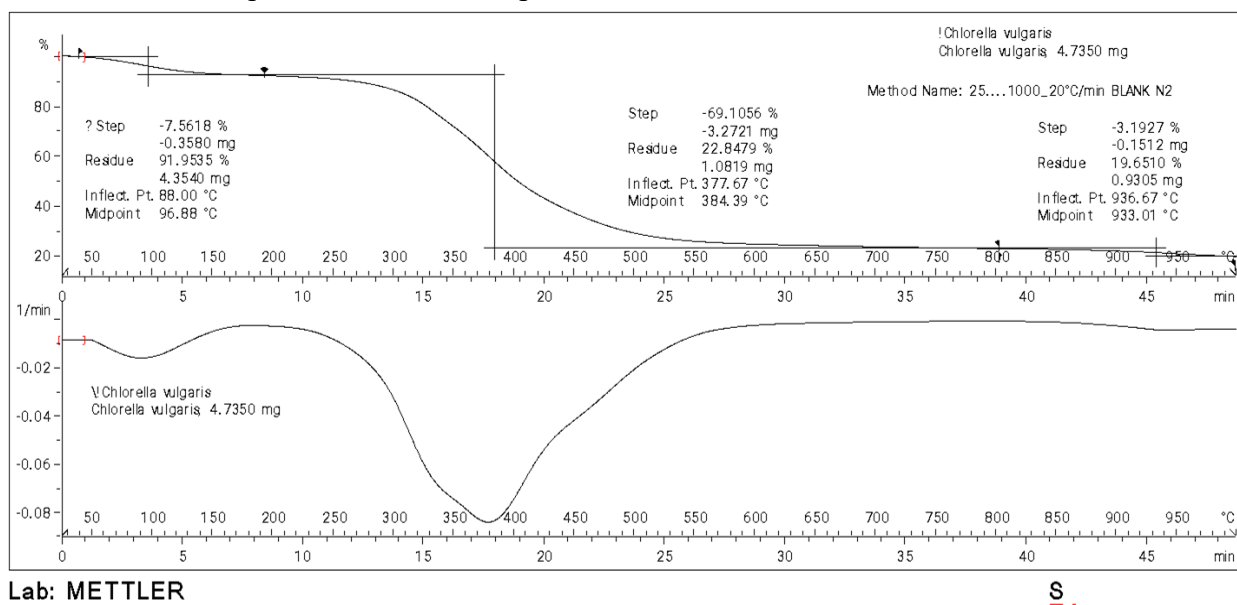


Fig. 4.1.1: Grafico ottenuto da analisi con TGA di *Chlorella vulgaris*; sopra il grafico riferito alla percentuale di massa residua e sotto il grafico legato al quantitativo perso di massa

Analizzando questi risultati con i modelli spiegati in precedenza è possibile ricavare la tipologia e la percentuale di macromolecole che vengono decomposte durante la pirolisi e che caratterizzano la componente organica.

Nel caso di *Chlorella vulgaris* le percentuali di peso risultanti sono state:

- 42.4% di alfa glucani decomposti per lo più tra i 200° C e i 400° C;
- 24.8% di proteine decomposte per lo più tra i 400° C e i 600° C;
- 1.7% di carbonati inorganici decomposti per lo più tra i 600° C e gli 800° C.

Il restante 31.1% corrisponde a materiale non decomposto e quindi non categorizzato.

I dati sono stati successivamente inseriti in tabelle per poter creare, tramite Word, un grafico a torta (Fig. 4.1.2) per meglio visualizzare la componente organica nella sua diversificazione.

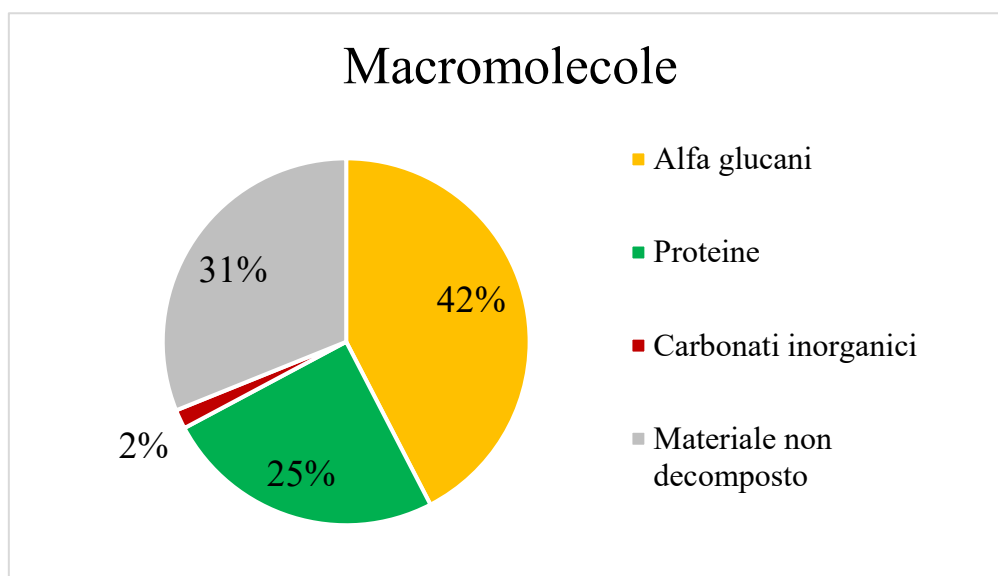


Fig. 4.1.2: Grafico del profilo della componente organica di *Chlorella vulgaris* (grafico prodotto con Word)

Lo stesso protocollo è stato poi applicato a *Chrysotila roscoffensis*, in particolare sul ceppo RCC1414, di cui sono stati prelevati 4.7185 mg.

Anche in questo caso sono stati ottenuti due grafici (Fig. 4.1.3) dall'analisi termogravimetrica da cui sono emerse le seguenti percentuali di peso:

- 24.8% di alfa glucani decomposti per lo più tra i 200° C e i 400° C;
- 9% di proteine decomposte per lo più tra i 400° C e i 600° C;
- 18.7% di carbonati inorganici decomposti per lo più tra i 600° C e gli 800° C.

Il restante 47.5% corrisponde a materiale non decomposto e quindi non categorizzato.

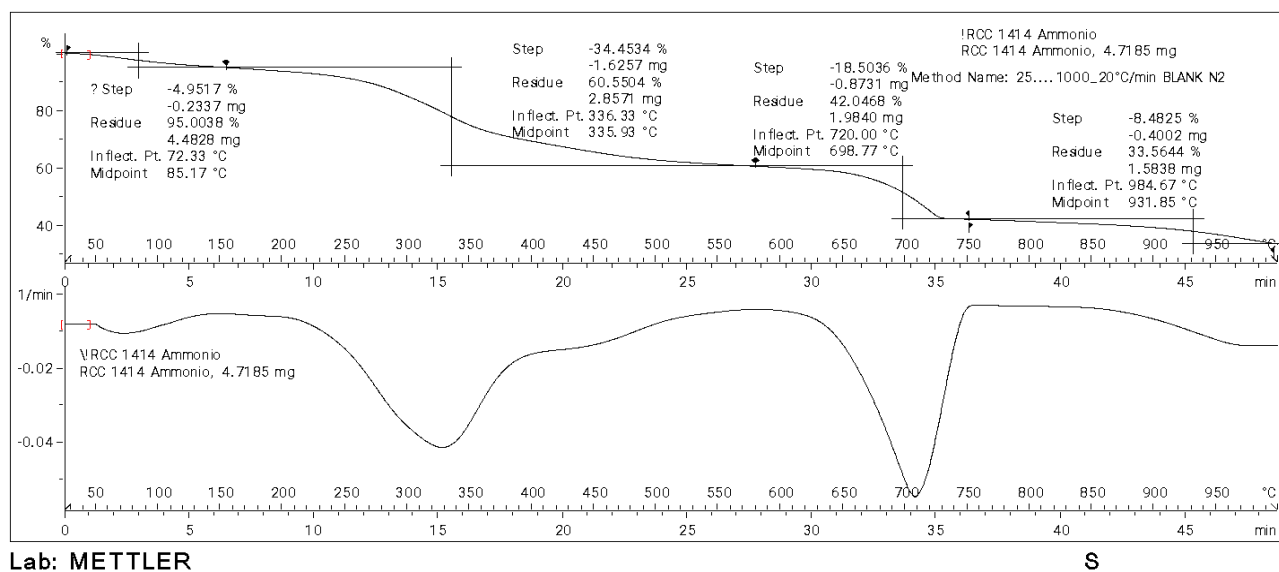


Fig. 4.1.3: Grafico ottenuto da analisi con TGA di *Chrysotila roscoffensis*; sopra il grafico riferito alla percentuale di massa residua e sotto il grafico legato al quantitativo perso di massa

Anche questi dati sono stati inseriti in tabelle per la creazione del grafico a torta (Fig. 4.1.4) per comprendere la composizione delle macromolecole organiche presenti in questa microalga cocolitoforica.

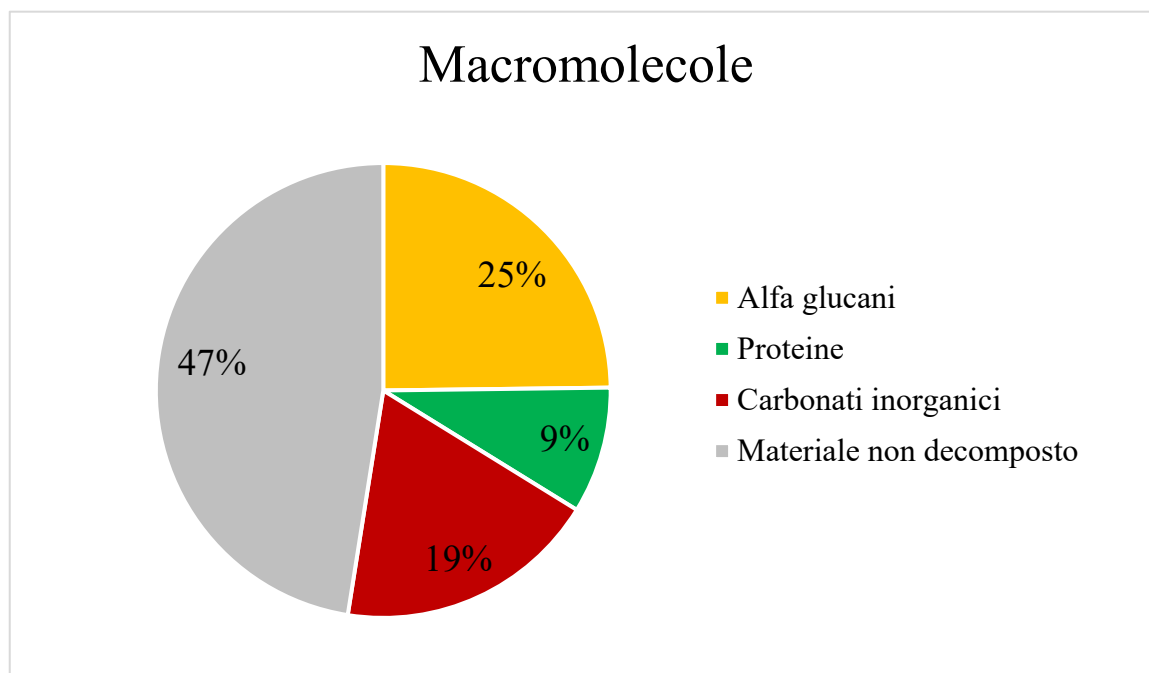


Fig. 4.1.4: Grafico del profilo della componente organica di *Chrysotila roscoffensis* (grafico prodotto con Word)

4.2 Estrazione e costruzione profilo proteico

4.2.1 Rottura della parete cellulare

Le quattro eppendorf con all'interno 5 mg e 10 mg di campioni liofilizzati rispettivamente di *Chlorella vulgaris* (Fig. 3.2.1a) e di *Chrysotila roscoffensis* (Fig. 3.2.1b) sono stati inizialmente trattati con 500 μ L di soluzioni di idratazione come ben descritto nel capitolo precedente.

Nel caso di *Chlorella vulgaris* sono state usate sia la soluzione di acqua demineralizzata, come riportato in studi precedenti (Bernaerts et al., 2026), che la soluzione di buffer di lisi per compararne l'efficacia.

Le analisi, come emergerà in seguito, hanno riportato risultati migliori usando il buffer di lisi.

Per questo motivo, nel caso di *Chrysotila roscoffensis* entrambi i campioni sono stati idratati con PBS e SDS 1%.

Inoltre un campione di quest'ultima specie è stato fatto reagire con 500 μ L di acido cloridrico per poter confrontare i risultati e vederne l'impatto sulla rottura cellulare finale. Nello specifico la tempistica dei dieci minuti circa è stata scelta basandosi sull'osservazione diretta ovvero fin quando è stato visibile il verificarsi della reazione attraverso la formazione di bolle di anidride carbonica (Fig. 4.2.1a).



Fig. 4.2.1a: Eppendorf contenente 5mg di *Chrysotila roscoffensis* in 500 μ L di HCl, indicate con la freccia rossa sono le bolle di reazione (foto scattata da Viviana Casotto durante il laboratorio)

Osservando al microscopio una piccola aliquota emerge la completa dissoluzione delle coccosfere, sono visibili solo cellule verdi prive di teca (Fig. 4.2.1b), sinonimo della maggior efficacia del protocollo comprendente il pretrattamento con acido cloridrico nel rimuovere la frazione inorganica.

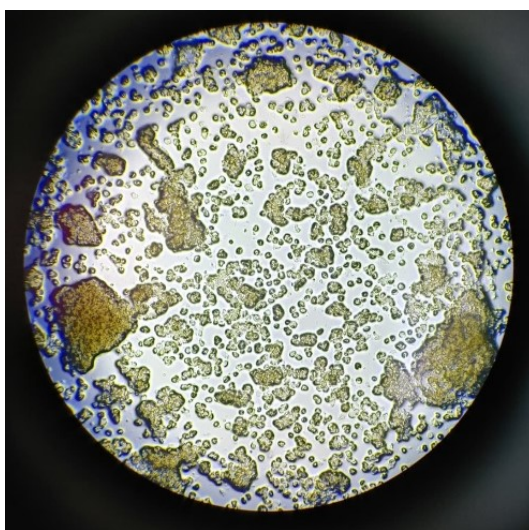


Fig. 4.2.1b: Visione al microscopio del campione pretrattato con HCl senza processo di lisi di *Chrysotila roscoffensis*, si evidenziano le cellule verdi prive di coccosfera (foto scattata da Viviana Casotto durante il laboratorio)

Nel caso di *Chlorella vulgaris* sono state usate tre repliche per i diversi tempi di azione. La prima provetta è stata infatti estratta e inserita nella centrifuga dopo 15 minuti, ovvero dopo 9 cicli, e il surnatante ottenuto (Fig. 4.2.1c) è stato prelevato per le successive analisi. La seconda provetta ha subito lo stesso procedimento dopo 30 minuti, ovvero dopo 18 cicli, e così anche la terza dopo 45 minuti, ovvero dopo 27 cicli (Fig. 4.2.1c e Fig. 4.2.1d).

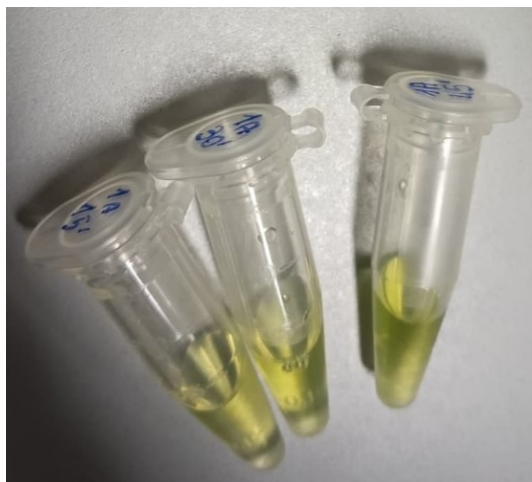


Fig. 4.2.1c: Surnatante ottenuto dalla lisi in acqua demineralizzata di *Chlorella vulgaris*; a sinistra il campione prelevato dopo 15 minuti di lisi, in centro quello dopo 30 minuti e a destra quello dopo 45 minuti (foto scattata da Viviana Casotto durante il laboratorio)

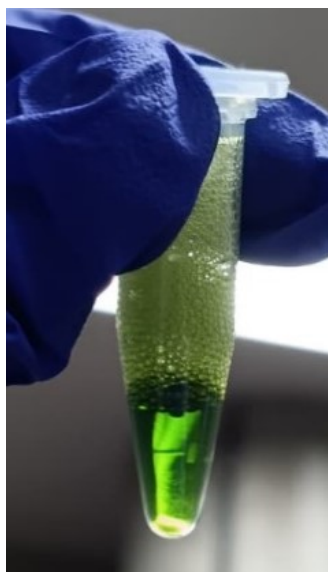


Fig. 4.2.1d: Surnatante ottenuto dall'omogeneizzazione in buffer di lisi di *Chlorella vulgaris* (foto scattata da Viviana Casotto durante il laboratorio)

Nel caso di *Chrysotila roscoffensis* i campioni hanno subito una lisi di 30 minuti, corrispondenti a 18 cicli, sono stati successivamente centrifugati e i surnatanti ottenuti (Fig. 4.2.1e) sono stati prelevati per le successive analisi.

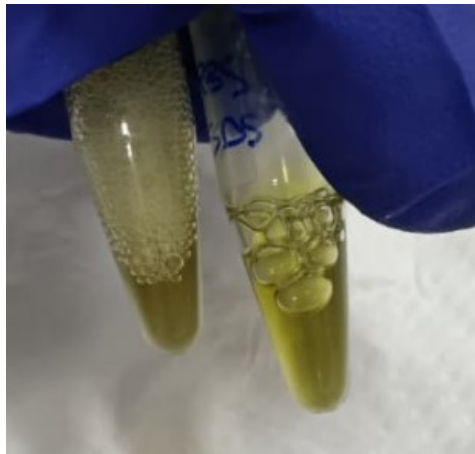


Fig. 4.2.1e: Surnatante ottenuto dalla lisi in buffer di lisi di *Chrysotila roscoffensis*, a sinistra il campione pretrattato con HCl e a destra il campione tal quale (foto scattata da Viviana Casotto durante il laboratorio)

Osservando al microscopio il surnatante ottenuto dalla lisi di *Chrysotila roscoffensis* si può notare una differenza tra il campione tal quale (Fig. 4.2.1f) e quello pretrattato con HCl (Fig. 4.2.1g): il primo mostra una maggior aggregazione della componente organica e, con lenti polarizzate, risaltano frammenti di coccoliti, mentre il secondo è caratterizzato da una disaggregazione tale da mostrare solo alcuni piccoli aggregati e una completa dissoluzione della componente inorganica della teca.

Anche questi risultati sono sinonimo della maggior efficacia del protocollo comprendente il pretrattamento con acido cloridrico per la rimozione dei coccoliti.

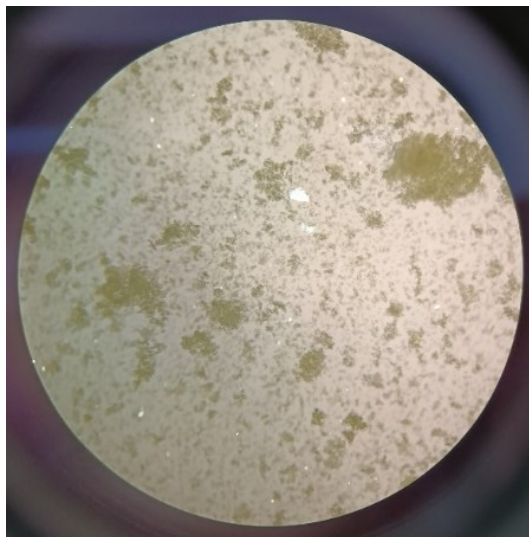


Fig. 4.2.1f: Visione al microscopio polarizzato del campione tal quale di *Chrysotila roscoffensis* con evidenti aggregati e alcune scaglie coccolitiche (foto scattata da Viviana Casotto durante il laboratorio)

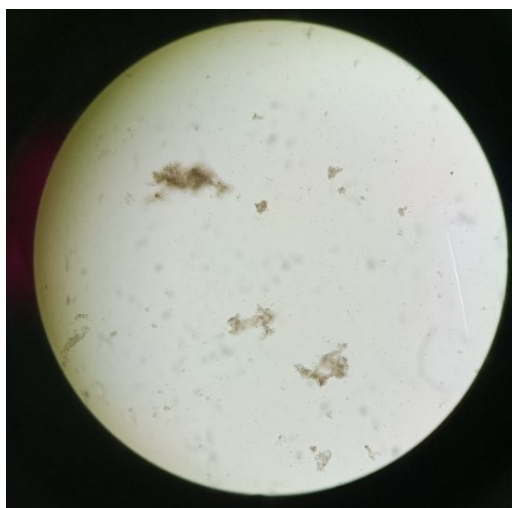


Fig. 4.2.1g: Visione al microscopio del campione pretrattato con HCl di *Chrysotila roscoffensis* (foto scattata da Viviana Casotto durante il laboratorio)

4.2.2 Estrazione e dosaggio delle proteine

Procedendo verso l'estrazione e la caratterizzazione delle proteine presenti i campioni sono stati analizzati tramite spettrofotometria.

Dopo aver lasciato in incubazione per 15 minuti al buio ogni campione (Fig. 4.2.2a e Fig. 4.2.2b) è stato inserito, con il rispettivo bianco, nello spettrofotometro per la misurazione dell'assorbanza. I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle a seguire (Tab. 4.2.2a, Tab. 4.2.2b e Tab. 4.2.2c).

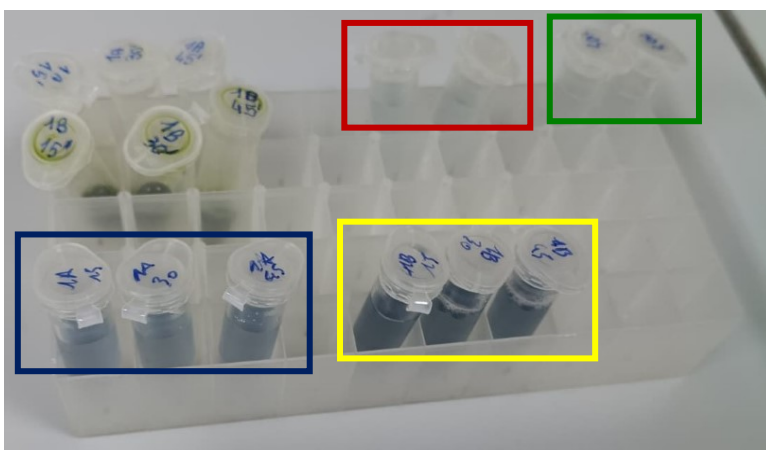


Fig. 4.2.2a: Campioni di *Chlorella vulgaris* pronti per l'analisi spettrofotometrica; cerchiati in rosso sono i bianchi di acqua demineralizzata, in verde i bianchi di buffer di lisi, in blu i campioni idratati in acqua demineralizzata e lisati per 15, 30 e 45 minuti procedendo verso destra e in giallo i campioni idratati in buffer di lisi e lisati per 15, 30 e 45 minuti procedendo verso destra. Da notare il colore tendente all'azzurro-blu dei campioni, indice di avvenuta reazione con i reagenti (foto scattata da Viviana Casotto durante il laboratorio)



Fig. 4.2.2b: Campioni di *Chrysotila roscoffensis* pronti per l'analisi spettrofotometrica; a sinistra il campione pretrattato con HCl e a destra il campione tal quale (foto scattata da Viviana Casotto durante il laboratorio)

Campione di <i>Chlorella vulgaris</i> in acqua demineralizzata	Peso di partenza	Assorbanza	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	% proteine
15 minuti	5 mg	0.206	0.46	4.6
30 minuti	5 mg	0.269	0.59	6
45 minuti	5 mg	0.312	0.69	7

Tab. 4.2.2a: Risultati dell'analisi spettrofotometrica di *Chlorella vulgaris* in acqua demineralizzata

Campione di <i>Chlorella vulgaris</i> in PBS e SDS 1%	Peso di partenza	Assorbanza	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	% proteine
15 minuti	5 mg	0.485	2.7	27
30 minuti	5 mg	0.411	2.28	22.8
45 minuti	5 mg	0.508	2.82	28.2

Tab. 4.2.2b: Risultati dell'analisi spettrofotometrica di *Chlorella vulgaris* in buffer di lisi (PBS e SDS 1%)

Campione di <i>Chrysotila roscoffensis</i>	Peso di partenza	Assorbanza	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	% proteine
Tal quale	10 mg	0.243	1.35	13.5

Pretrattamento con HCl	10 mg	0.194	1.07	10.7
------------------------	-------	-------	------	------

Tab. 4.2.2c: Risultati dell'analisi spettrofotometrica di *Chrysotila roscoffensis* in buffer di lisi (PBS e SDS 1%) con 30 minuti di omogeneizzazione

I valori ottenuti dai dosaggi sono stati quindi confrontati con i primi risultati dell'analisi con TGA facendo emergere una linearità tra gli esiti. Questo mette in luce la riproducibilità dei dati ottenuti attraverso l'utilizzo di due tecniche diverse e indipendenti e di conseguenza la veridicità dei risultati.

4.2.3 Caratterizzazione proteine

Oltre alla spettrofotometria i campioni sono stati studiati anche attraverso la tecnica dell'elettroforesi su gel per la separazione delle proteine a seconda del loro peso molecolare sfruttando un campo elettrico.

Una volta inseriti i campioni è stata data corrente fino alla completa discesa delle proteine lungo il gel. Come anticipato nel capitolo precedente oltre alle microalghe, è stata inserita una soluzione con pesi noti di proteine per avere un riferimento nell'osservare le bande prodotte dalla corsa.

Trascorsa circa un'ora e un quarto con corrente costante il gel è stato rimosso e inserito in una soluzione di etanolo e acido acetico per fissare il bandeggio prodotto dalla corsa (Fig. 4.2.3a).

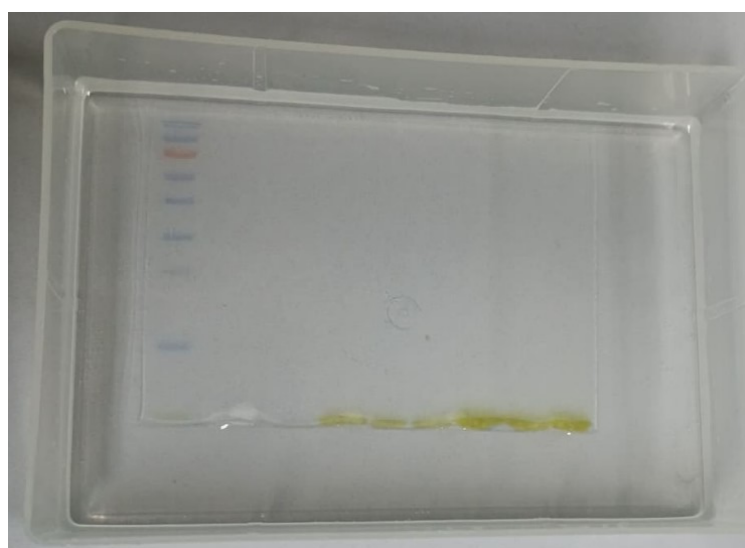


Fig. 4.2.3a: Gel rimosso subito dopo la corsa elettroforetica; da notare come si vedano al momento solo i pesi noti e i pigmenti di clorofilla nella parte bassa (foto scattata da Viviana Casotto durante il laboratorio)

Dopo la colorazione in blu di Coomassie e successivo lavaggio in acido acetico i risultati ottenuti sono i seguenti.

Per quanto riguarda *Chlorella vulgaris* il gel ottenuto (Fig. 4.2.3b) è in linea con i risultati di lavori precedenti (Andreeva et al., 2021), sono infatti visibili bande simili per i medesimi pesi rivelando una correttezza negli esiti riscontrati durante l'attività di laboratorio.

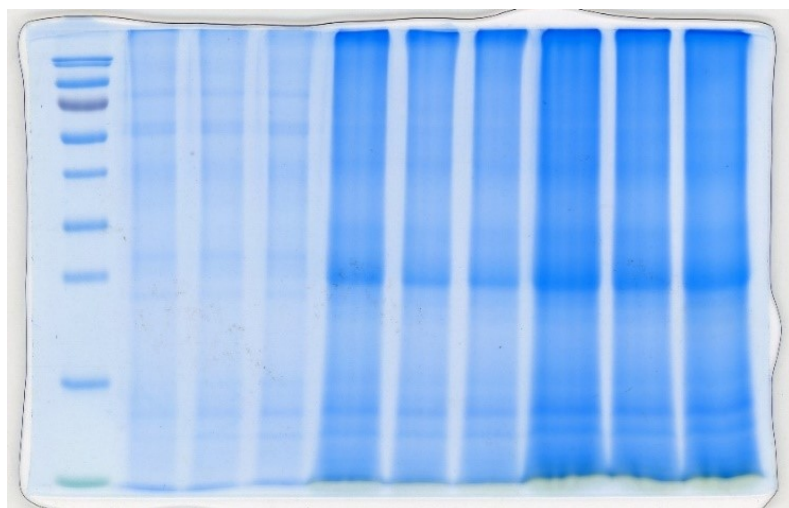


Fig. 4.2.3b: Risultati ottenuti dall'elettroforesi su gel di *Chlorella vulgaris*

Per quanto riguarda *Chrysotila roscoffensis* non sono presenti in letteratura studi precedenti che riportino risultati su gel, ma confrontando le bande di ricerche precedenti si può notare una linearità degli esiti ottenuti. In particolare si è preso di riferimento un gel di *Chrysotila carterae* (Andreeva et al., 2021), specie simile al campione in analisi, notando anche in questo caso una grande somiglianza nei risultati (Fig. 4.2.3c).

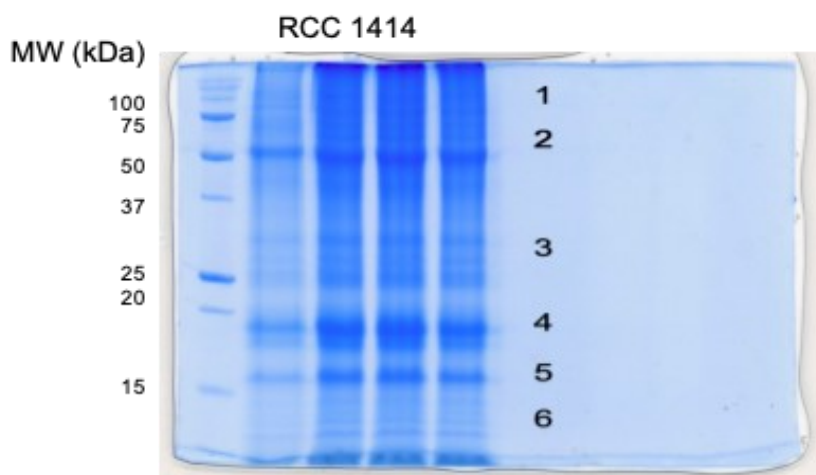
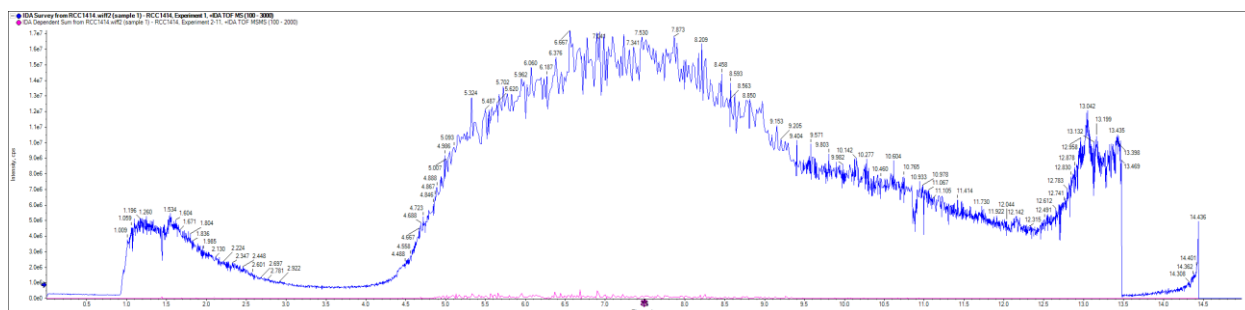
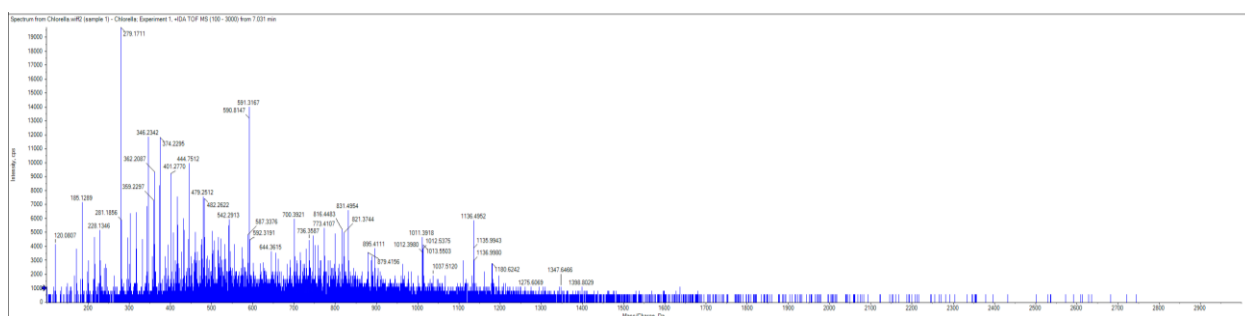
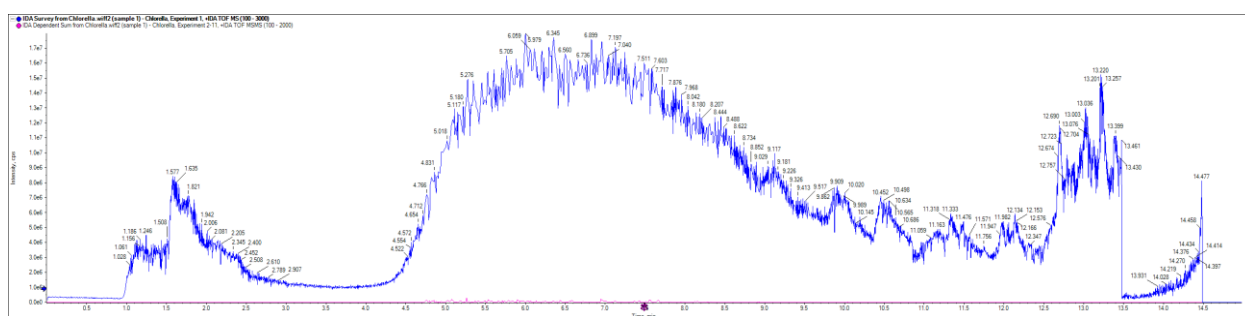


Fig. 4.2.3c: Risultati ottenuti dall'elettroforesi su gel di *Chrysotila roscoffensis*

Per caratterizzare in maniera più completa la componente organica proteica, infine, è stata applicata la tecnica della cromatografia liquida combinata con la spettrometria di massa.

Nel primo (Fig. 4.2.3.d e Fig. 4.2.3.f) viene rappresentato il rapporto tra il tempo, sull'asse delle ascisse, e l'intensità del segnale, sull'asse delle ordinate, mentre nel secondo (Fig. 4.2.3.e e Fig. 4.2.3.g) compaiono, sull'asse delle ascisse, il rapporto tra la massa e la carica dei rispettivi ioni e, sull'asse delle ordinate, l'intensità del segnale rilevato dallo strumento.



Con i termini “*Description*” e “*Function*” si intendono rispettivamente la descrizione e la funzione svolta della proteina identificata.

Codice	Massa	Score (%)	Coverage (%)	Descrizione	Funzione
tr A0ACF8Q747	79.178	99	6.78	Histone H3	Struttura DNA
tr A0A9D4TFY7	43.196	99	10.10	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Metabolismo
tr A0A9D4Z0Y1	41.377	99	10.36	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplastic	Fotosintesi/Ciclo di Calvin
tr A0ACF8Q6S1	24.92	99	13.03	Oxygen-evolving enhancer protein 1	Fotosintesi/Ciclo di Calvin
tr A0ACF8Q5F4	52.235	99	4.02	Histone H3	Struttura DNA
tr A0ACF8Q211	51.557	99	6.72	ATP synthase subunit alpha	Produzione energia
tr A0A172C0T8	42.704	95	4.94	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment)	Fotosintesi/Ciclo di Calvin
tr A0ACF8QK47	173.94	90	1.56	Uncharacterized protein	Non caratterizzata
tr A0A9D4TS18	17.676	90	9.15	Thioredoxin domain-containing protein	Omeostasi
tr A0A172JDC1	27.274	90	6.91	Translational elongation factor Tu (Fragment)	Sintesi proteica
tr A0A9D4TK53	29.402	90	6.57	Ribose-5-phosphate isomerase	Fotosintesi/Ciclo di Calvin
tr A0A9D4THD4	28.099	90	3.69	Maintenance of Photosystem II under High light 2 C-terminal domain-containing protein	Fotosintesi/Ciclo di Calvin

tr A0A650ANN3	39.429	90	2.56	Photosystem II D2 protein	Fotosintesi/Ciclo di Calvin
tr A0A9D4TED6	45.655	90	2.34	ATP synthase subunit alpha (Fragment)	Produzione energia
tr A0A9D4YU27	45.03	90	2.21	Phosphoribulokinase	Fotosintesi/Ciclo di Calvin
sp P32978	51.644	88	3.95	ATP synthase subunit beta, chloroplastic	Produzione energia
tr A0A650ANS6	8.818	88	9.88	Photosystem I iron-sulfur center	Fotosintesi/Ciclo di Calvin
tr A0A9D4TXZ2	73.002	78	1.16	Uncharacterized protein	Non caratterizzata
tr A0ACF8QSE9	145.6	78	2.16	ATP synthase subunit beta	Produzione energia
tr A0ACF8QCJ2	16.084	69	12.67	40S ribosomal protein S14	Sintesi proteica
tr A0A9D4TVY0	73.095	69	2.12	Acetyl-coenzyme A synthetase	Metabolismo

Tab. 4.2.3a: Elenco delle 21 proteine identificate di *Chlorella vulgaris*

Per quanto riguarda *Chrysotila roscoffensis*, seguendo questo parametro, sono state identificate 16 proteine inserite poi in un foglio Excel per visualizzarne “Accession”, “Mass”, “Score”, “Coverage”, “Description” e “Function” (Tab. 4.2.3b).

Codice	Massa	Score (%)	Coverage (%)	Descrizione	Funzione
tr Q0E9R7	44,391	99	55.64	Carbonic anhydrase (Fragment)	Anidrasi Carbonica
tr Q0E9S1	39,125	99	58.74	Carbonic anhydrase (Fragment)	Anidrasi Carbonica
tr Q1MWL3	22,016	99	30.92	Fucoxanthin chlorophyll a/c binding protein	Fotosintesi e Sistemi Antenna
tr A8CCQ0	37,719	99	46.22	ATP synthase subunit alpha (Fragment)	Produzione energia

tr B0M2B1	37,846	99	45.66	Elongation factor Tu (Fragment)	Sintesi Proteica / Traduzione
tr A8CCR5	30,21	99	53.79	ATP synthase subunit beta (Fragment)	Produzione energia
tr Q9SWP8	38,319	99	33.62	Type 4 actin (Fragment)	Citoscheletro
tr F1SWF0	64,425	97	22.81	Coccolith scale associated protein-2 (Fragment)	Calcificazione
tr A0A7S4BJL5	23,657	96	29.63	Light harvesting protein	Fotosintesi e Sistemi Antenna
sp Q08051	53,998	95	32.35	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	Fotosintesi e Ciclo di Calvin
tr Q6RX25	19,946	93	12.04	Putative mitochondrial division protein (Fragment)	Divisione cellulare
tr Q1MWL4	54,72	73	49.90	Uncharacterized protein st1	Non caratterizzata
tr A0AA48LAU6	63,855	73	22.30	1,6-beta- transglycosylase	Metabolismo dei Carboidrati
tr Q0E9S0	28,068	73	35.77	Carbonic anhydrase (Fragment)	Anidrasi Carbonica
tr Q0E9R8	26,781	70	23.05	Carbonic anhydrase (Fragment)	Anidrasi Carbonica
tr A8CCS7	34,096	70	22.51	Photosystem II P680 chlorophyll A apoprotein (Fragment)	Fotosintesi e Sistemi Antenna

Tab. 4.2.3b: Elenco delle 16 proteine identificate di *Chrysotila roscoffensis*

L'analisi spettrometrica di massa su *Chrysotila roscoffensis* è stata replicata per maggior sicurezza nei risultati portando all'identificazione di 120 proteine (Tab 4.2.3c) confrontando i segnali ionici captati con i registri presenti sul sito ufficiale UniProt della specie *Gephyrocapsa huxleyi*, facente sempre parte del gruppo dei coccolitofori.

Codice	Massa	Score (%)	Coverage (%)	Descrizione
tr A0A7S3X609	64,086	99	22,55	H(+)-transporting two-sector ATPase
tr Q4G3C5	56,336	99	22,00	Photosystem II CP47 reaction center protein
tr R1F431	36,286	99	29,50	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase NAD(P) binding domain-containing protein
tr Q4G396	51,765	99	19,32	Photosystem II CP43 reaction center protein
tr R1F8P6	71,823	99	17,05	Heat shock protein 70
tr A0A0D3KAU7	71,256	99	20,67	Heat shock protein 70
tr Q4G3D0	90,633	99	10,40	Clp protease ATP binding subunit
tr H9LSR7	50,767	99	25,00	ATP synthase subunit beta
tr R1FZ52	28,612	99	38,66	Phosphoglycerate kinase (Fragment)
tr R1ESF0	53,61	99	11,78	Vacuolar proton pump subunit B
tr H9LSD3	67,235	99	8,67	Chaperone protein DnaK
tr L7QI71	81,205	99	5,62	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 (Fragment)
tr A0A6S9XZE1	58,474	99	12,68	ATP synthase subunit alpha
sp Q4G397	53,427	99	12,83	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic
tr L7QI74	51,941	99	10,02	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment)
tr A0A0D3JX78	32,983	99	17,01	Actin
tr A0A7S3X021	57,926	99	7,38	Uncharacterized protein
tr R1BZN1	69,99	99	5,53	ATP-dependent metalloprotease FtsH
tr A0A7S3TBL8	16,01	99	18,92	Tubulin/FtsZ GTPase domain-containing protein (Fragment)
tr H9LTN5	39,085	99	11,97	Photosystem II D2 protein
tr H9LTM4	82,015	99	7,90	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2
tr A0A0D3IMZ1	49,668	99	12,84	Tubulin beta chain
tr A0A0D3IAM1	38,001	99	14,45	Tubulin alpha chain
tr A0A7S3X260	35,361	99	20,67	ADP/ATP translocase
tr A0A0D3KIN2	32,901	99	12,42	Uncharacterized protein
tr A0A0D3IM19	15,159	99	25,93	KH type-2 domain-containing protein
tr Q2WEF4	29,517	99	14,50	Photosystem II protein D1 (Fragment)

tr A0A0D3K0R4	21,887	99	18,32	60S ribosomal protein L13
tr A0A0D3IVV9	31,625	99	11,31	Small ribosomal subunit protein uS2
tr Q4G379	32,505	99	24,14	CbbX
tr A0A0D3IRL3	33,355	99	12,70	Uncharacterized protein
tr A0A7S3X2B6	23,111	99	12,14	ADP-ribosylation factor (Fragment)
tr A0A0D3JG14	20,008	99	7,94	Rieske domain-containing protein
tr H9LSQ7	23,875	99	8,37	Cytochrome b6
tr A0A0D3HY47	11,395	99	54,37	Histone H4
tr R1CD70	27,94	99	13,49	Histone H2A/H2B/H3 domain-containing protein
tr R1ECB0	13,139	99	37,50	Histone H2B
tr R1DMC9	13,063	99	16,39	Histone H2A
tr A0A0D3I6N4	9,69	99	26,51	Histone H2A/H2B/H3 domain-containing protein
tr H9LT60	9,431	99	17,86	Cytochrome b559 subunit alpha
tr R1F8A1	13,585	99	13,49	Histone H2A
tr A0A0D3I898	70,483	98	10,91	AAA+ ATPase domain-containing protein
tr A0A6V2T6B1	61,979	98	8,98	Tr-type G domain-containing protein (Fragment)
tr H9LTJ7	39,504	98	7,50	Photosystem II protein D1
tr A0A6V2T6A1	63,257	98	9,52	Tr-type G domain-containing protein (Fragment)
sp Q4G398	19,633	98	12,78	ATP synthase subunit delta, chloroplastic
tr A0A0D3K2W7	20,327	98	6,84	Light harvesting protein
tr A0A0D3IR82	24,397	98	13,60	Light harvesting protein
tr A0A0D3J6A2	19,852	98	32,76	60S ribosomal protein L11
tr R1FYC1	41,971	97	16,75	Ferredoxin--NADP(+) reductase
tr Q52W45	32,714	97	6,76	Photosystem II D2 protein (Fragment)
tr H9LSW1	24,601	97	21,76	Small ribosomal subunit protein uS3c
tr A0A0D3I993	25,821	97	14,05	Elongation factor Ts, mitochondrial
tr A0A7S3T6R8	26,02	97	9,52	14-3-3 domain-containing protein
tr A0A0D3KKF6	28,562	97	5,84	Actin
tr A0A7S3TX83	26,19	97	19,58	V-type proton ATPase subunit E (Fragment)
tr A0A0D3KI24	29,324	96	8,52	Prohibitin

tr A0A7S3RSQ6	50,272	96	13,79	S5 DRBM domain-containing protein (Fragment)
tr R1DKU4	38,977	96	5,57	F-ATPase gamma subunit
tr A0A7S3X1N0	17,853	96	11,54	Histone H2A/H2B/H3 domain-containing protein (Fragment)
tr A0A7S3STP0	19,235	95	11,86	AAA ATPase AAA+ lid domain-containing protein (Fragment)
tr A0A0D3I874	13,398	95	11,21	START domain-containing protein
tr A0A0D3IJA7	57,446	94	14,21	Heat shock protein 70
tr H9LTJ6	17,643	94	17,50	Cytochrome b6-f complex subunit 4
tr Q4G3B9	19,978	94	6,52	Photosystem I reaction center subunit III
tr Q4G3E5	14,65	94	29,13	Ribosomal protein L19
tr R1BRM2	78,931	93	10,90	Histidine kinase/HSP90-like ATPase domain-containing protein
tr A0A0D3IXK9	92,711	93	11,17	Uncharacterized protein
tr A0A0D3KQZ7	28,428	93	14,18	Large ribosomal subunit protein uL2 C-terminal domain-containing protein
tr A0A0D3KTU0	20,143	92	3,31	Light harvesting protein
tr A0A6T0FPI7	30,23	92	6,86	Inorganic diphosphatase
tr H9LS33	53,882	92	6,56	Ribulose biphosphate carboxylase large chain
tr A0A7S3S955	16,702	92	8,72	Uncharacterized protein (Fragment)
tr R1CRR8	78,584	91	6,45	Clp R domain-containing protein
tr R1FF37	13,857	91	23,66	Histone H2A
tr A0A0D3K2Z2	89,022	91	15,16	Histidine kinase/HSP90-like ATPase domain-containing protein
tr R1B7H9	20,035	91	21,88	Phosphoglycerate kinase
tr R1BJY8	69,29	91	7,67	Quinone oxidoreductase
tr A0A0D3K9I9	11,545	91	22,12	Histone H2A/H2B/H3 domain-containing protein
tr A0A0D3IQJ1	49,906	90	8,87	Tubulin alpha chain
tr A0A7S3WF49	53,685	90	7,86	Phosphopyruvate hydratase
tr A0A7S3SHU4	27,925	90	3,69	ATPase AAA-type core domain-containing protein (Fragment)
tr A0A0D3I556	19,888	90	3,28	Light harvesting protein

tr R1DXH8	93,748	90	1,11	H(+)-exporting diphosphatase
tr A0A7S3TWL3	56,459	90	3,66	Serine hydroxymethyltransferase (Fragment)
tr Q52W70	36,304	90	9,28	Photosystem II CP43 reaction center protein (Fragment)
tr A0A7S3TZ71	45,818	90	9,26	Adenosylhomocysteinase (Fragment)
sp Q4G364	22,296	90	19,32	Large ribosomal subunit protein uL3c
tr A0A6S9VZ09	17,114	90	10,26	Glutathione peroxidase
tr H9LTN1	15,48	90	6,21	Photosystem I reaction center subunit XI
tr R1EJ25	13,8	90	6,15	Histone H2A
sp Q4G3A4	22,9	90	4,95	Small ribosomal subunit protein uS4c
tr A0A0D3K400	33,49	90	2,96	Phosphoglycerate mutase
tr A0A0D3IMU9	37,147	90	1,94	Mitochondrial phosphate carrier protein
tr A0A0D3IP54	9,011	90	17,28	Histone H4
tr A0A0D3J3Y2	10,127	90	7,78	Beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase
tr A0A0D3JB33	10,091	90	6,59	EF-hand domain-containing protein
sp Q4G355	20,487	90	4,95	Large ribosomal subunit protein uL5c
tr A0A7S3TF06	14,535	90	16,67	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (Fragment)
tr Q4G369	15,88	90	5,63	Photosystem I reaction center subunit II
tr H9LTK2	7,366	90	19,70	Photosystem II reaction center protein H
tr A0A0D3IY61	8,843	90	9,09	40S ribosomal protein S15a
tr A0A0D3IFD9	73,729	89	4,61	Transketolase
tr A0A0D3KHK6	18,016	87	6,67	Light harvesting protein
tr R1F730	21,779	87	17,79	Ribosomal protein (Fragment)
tr A0A0D3K271	21,579	86	1,99	Light harvesting protein
tr Q4G3F3	16,118	85	5,04	Multifunctional fusion protein
tr R1DE40	31,931	85	4,76	Methionine adenosyltransferase
tr A0A0D3KI74	52,632	85	6,92	Tr-type G domain-containing protein
tr R1E8B1	44,843	85	2,91	Prolyl 4-hydroxylase alpha subunit domain-containing protein
tr A0A0D3IHJ4	30,524	84	8,21	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase NAD(P) binding domain-containing protein
tr A0A0D3IFU0	53,378	82	6,55	Uncharacterized protein
tr A0A0D3I8V5	27,664	82	14,56	Ribulose-phosphate 3-epimerase
tr R1EG52	62,484	81	1,22	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)

tr A0A6V2YZ68	77,415	80	5,08	GH16 domain-containing protein
tr A0A0D3IWP3	32,776	80	9,93	Photosystem II lipoprotein Psb27
sp Q4G368	17,709	75	14,63	Photosystem II extrinsic protein V
tr A0A7S3RFB6	12,713	72	11,02	CR-type domain-containing protein (Fragment)
tr H9LTD1	44,226	72	9,8	Elongation factor Tu

Tab. 4.2.3c: Elenco delle 120 proteine identificate di *Chrysotila roscoffensis*

Le proteine identificate sono poi state categorizzate e raggruppate secondo il processo biologico di appartenenza per analizzare statisticamente l'abbondanza relativa all'interno del campione omogeneizzato e digerito.

Selezionando infatti l'intera tabella sul programma Excel sono stati creati dei grafici a torta per meglio riassumere gli ambiti delle diverse funzioni svolte dalle proteine identificate.

Per quanto riguarda *Chlorella vulgaris* sono emersi 6 principali processi biologici (Fig. 4.2.3h): fotosintesi e Ciclo di Calvin, produzione di energia, struttura del DNA, metabolismo, sintesi proteica e traduzione ed omeostasi.

Ad ogni meccanismo è stata attribuita una percentuale in riferimento all'abbondanza relativa di proteine coinvolte, nello specifico i valori emersi sono rispettivamente di: 38%, 19%, 9%, 9%, 10% e 5%. Il restante 10% non è stato possibile attribuirlo ad un processo specifico in quanto comprendente proteine non caratterizzate.

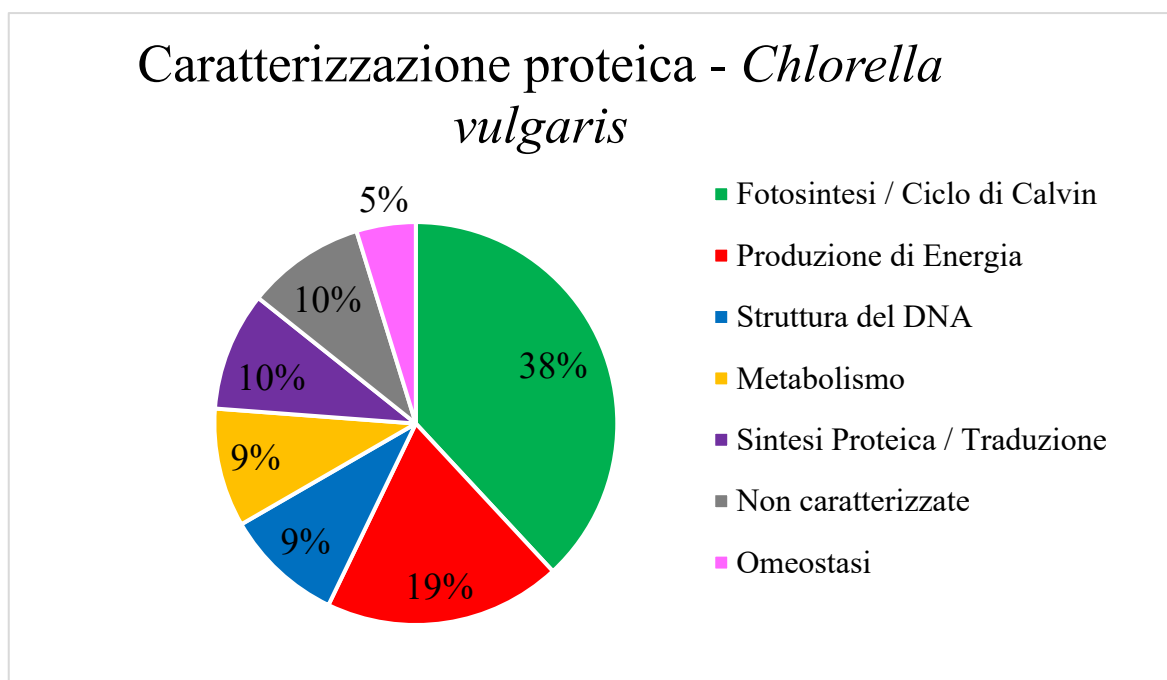


Fig. 4.2.3h: Grafico rappresentante la caratterizzazione proteica raggruppata a seconda dei processi biologici di *Chlorella vulgaris* (grafico prodotto con Excel)

Per quanto riguarda *Chrysotila roscoffensis* sono emersi 8 principali processi biologici (Fig. 4.2.3i): anidraasi carbonica, fotosintesi/Ciclo di Calvin e Sistemi Antenna, produzione di energia, sintesi proteica e traduzione, citoscheletro, calcificazione, divisione cellulare e metabolismo dei carboidrati.

Ad ogni meccanismo è stata attribuita una percentuale in riferimento all'abbondanza relativa di proteine coinvolte, nello specifico i valori emersi sono rispettivamente di: 25%, 25%, 13%, 7%, 6%, 6%, 6% e 6%. Il restante 6% non è stato possibile attribuirlo ad un processo specifico in quanto comprendente proteine non caratterizzate.

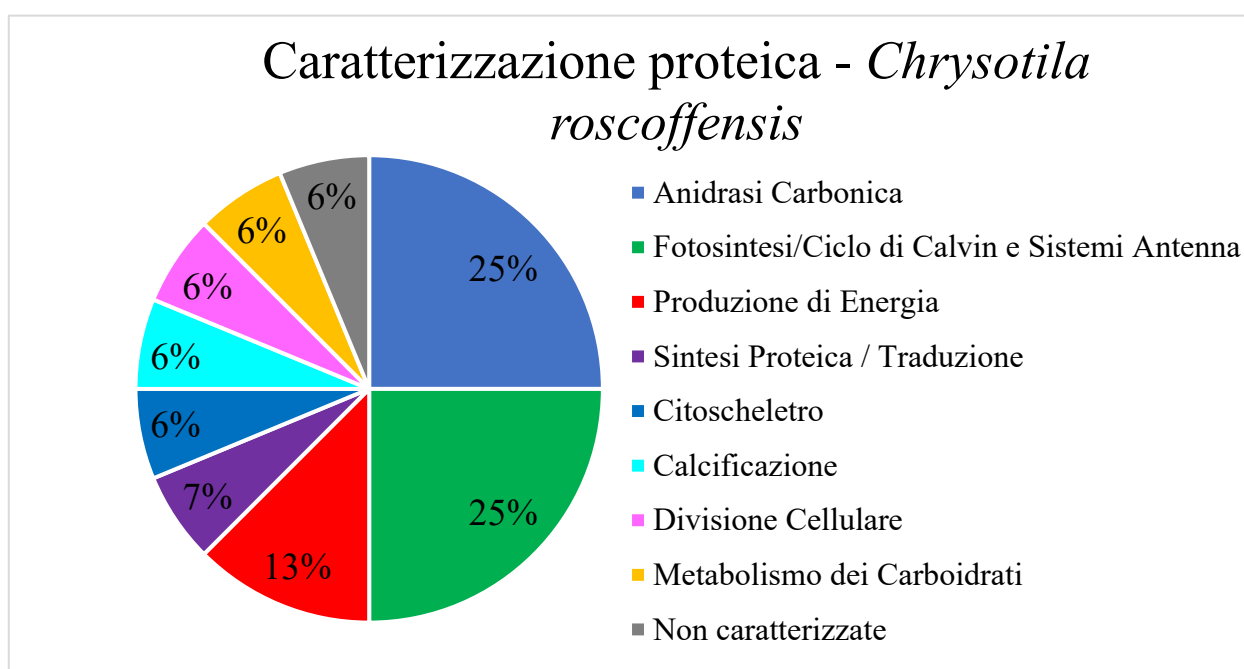


Fig. 4.2.3i: Grafico rappresentante la caratterizzazione proteica raggruppata a seconda dei processi biologici di *Chrysotila roscoffensis* (grafico prodotto con Excel)

Per quanto riguarda la seconda replica dell'analisi spettrometrica di massa su *Chrysotila roscoffensis* le 120 proteine identificate sono state raggruppate secondo due modalità.

Nel primo caso è stata scelta una categorizzazione secondo i processi biologici svolti (Fig.4.2.3i), ovvero gli obiettivi finali a cui ogni proteina partecipa come ad esempio la fotosintesi, la divisione cellulare o l'omeostasi.

Nel secondo caso la suddivisione è stata realizzata usando come parametri le funzioni molecolari (Fig. 4.2.3m), ovvero la singola attività svolta da ogni proteina come ad esempio l'attività catalitica di idrolisi dell'ATP, l'attività di legame o l'attività di trasporto.

Queste categorizzazioni sono state espresse tramite grafici a torta per rendere più chiari i risultati ottenuti. Per la creazione di questi è stata utilizzata la piattaforma PANTHER GO in cui viene effettuata l'analisi delle liste geniche.

Più precisamente, nel primo caso sono emersi 5 processi biologici: regolazione biologica, processo cellulare, processo di sviluppo, localizzazione e processo metabolico.

Nel secondo caso, invece, sono emerse 4 funzioni molecolari: attività di legame, attività catalitica, attività di regolazione della funzione molecolare e attività di regolazione della trascrizione.

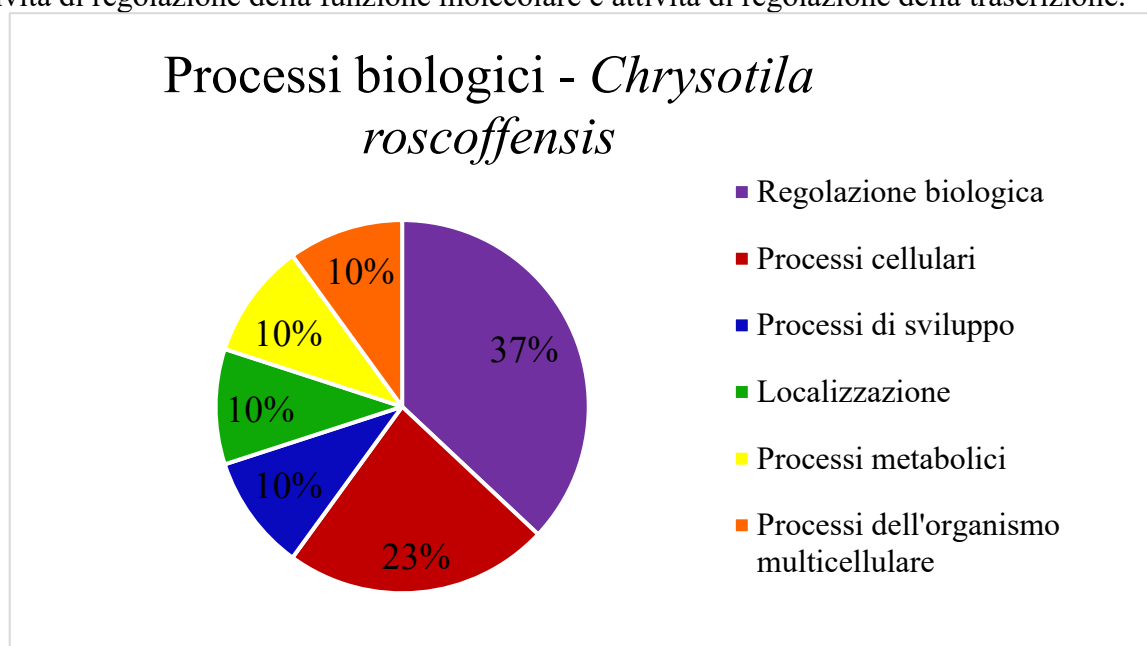


Fig. 4.2.3l: Grafico rappresentante la caratterizzazione proteica raggruppata a seconda dei processi biologici di *Chrysotila roscoffensis* (grafico prodotto con PANTHER GO ed Excel)

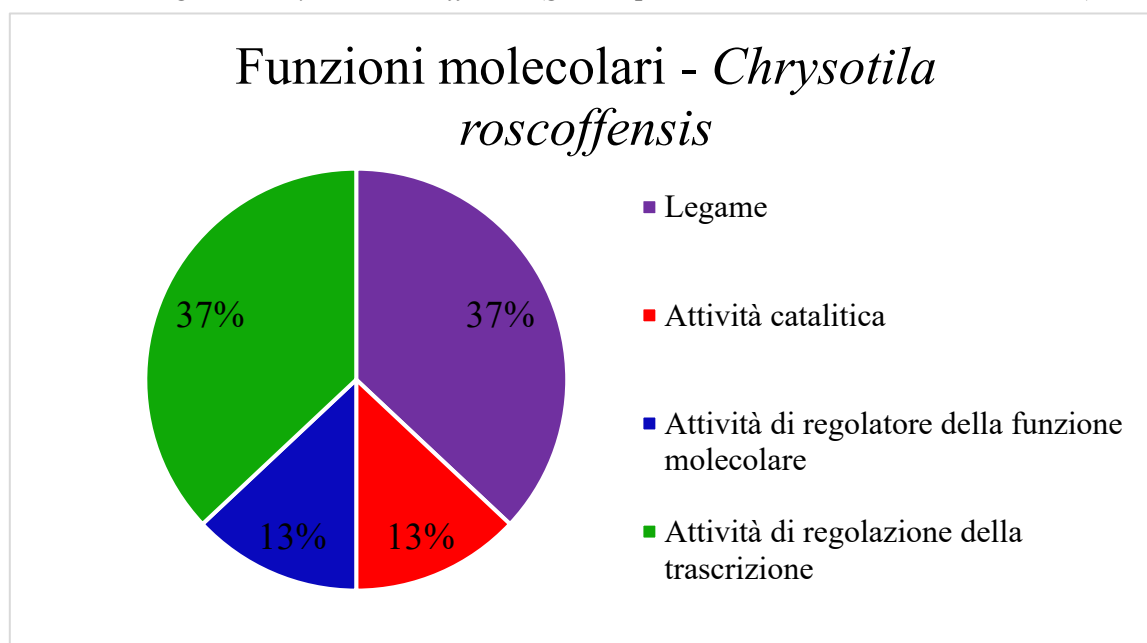


Fig. 4.2.3m: Grafico rappresentante la caratterizzazione proteica raggruppata a seconda delle funzioni molecolari di *Chrysotila roscoffensis* (grafico prodotto con PANTHER GO ed Excel)

5. DISCUSSIONI

5.1 Comparazioni metodi analitici e caratterizzazione proteine

Durante lo studio sperimentale in oggetto sono state svolte una serie di analisi sulle microalghe *Chlorella vulgaris* e *Chrysotila roscoffensis*. Particolare attenzione è stata posta ad un'analisi sistematica riguardante la componente organica, soprattutto il profilo proteico del ceppo RCC1414 del coccolitoforo *Chrysotila roscoffensis*, andando ad ottimizzare tecniche di estrazione citate in alcuni lavori precedenti come ad esempio Bernaerts et al. (2026).

La prima specie analizzata, *Chlorella vulgaris*, è risultata fondamentale per la calibrazione dei protocolli da seguire in quanto si tratta di una specie molto studiata in letteratura ed utilizzata in nutraceutica. Esistono, infatti, campioni commerciali costituiti al 100% di biomassa liofilizzata che sono stati utilizzati per eseguire analisi preliminari che hanno permesso di calibrare le tecniche di estrazione.

Per quanto riguarda, invece, la specie *Chrysotila roscoffensis*, di interesse per il presente studio, non vi sono molte informazioni nel panorama letterario, a tratti risulta ancora un organismo sconosciuto.

In generale dai risultati ottenuti e dagli studi pregressi emerge uno stretto legame tra il gruppo dei coccolitofori e le nuove prospettive biotecnologiche che sfruttano le risposte ecologiche di questi organismi come indice per il monitoraggio dei sempre più evidenti cambiamenti climatici.

Una nota importante da sottolineare prima di una valutazione specifica delle tecniche di analisi è il problema delle quantità. Sono state svolte infatti solo analisi preliminari poiché i quantitativi del ceppo di interesse erano molto bassi e provenienti da colture in laboratorio presso l'Istituto di Oceanografia e Geofisica Sperimentale (OGS) di Trieste. Poiché i coccolitoforidi sono al momento coltivati in laboratorio in beute o bioreattori di piccole dimensioni e molti dei ceppi noti hanno tempi di crescita piuttosto lunghi, sono state qui scelte tecniche che prevedono l'utilizzo di microquantitativi di campione, generalmente inferiori a 5 mg.

5.1.1 Analisi con TGA

Per quanto riguarda i dati ottenuti dalla tecnica di analisi con termogravimetria in ambiente anossico ricco in azoto si evidenzia una coerenza tra i modelli matematici proposti da precedenti studi di Bach e Chen (2017a,b) e le curve di degradazione termica risultanti dalla presente ricerca.

In *Chlorella vulgaris* si evince un dominante contenuto organico, specialmente carboidrati e proteine, e un basso e trascurabile quantitativo di materiale inorganico. Ciò riflette a pieno la sua appartenenza alle alghe verdi, phylum Chlorophyta, caratterizzate solo da una parete cellulare ricca in polisaccaridi che si degrada solo ad alte temperature.

In *Chrysotila roscoffensis*, invece, si riscontrano sia un picco riconducibile a materiale inorganico, specificamente a calcite, che un picco attribuibile alla componente organica, soprattutto a carboidrati e proteine.

Questi risultati testimoniano la peculiare caratteristica della microalga analizzata e più in generale dei coccolitofori, ovvero la presenza di una teca carbonatica. In aggiunta i dati qui raccolti mostrano un quantitativo minore di frazione inorganica rispetto agli studi su *Gephyrocapsa huxleyi* (Aveiro et al., 2020) e ciò dimostra la sottile, ma importante, differenza tra i due generi. Nel caso di *Chrysotila* si fa riferimento infatti a coccolitofori che nella fase diploide producono coccoliti più sottili alternati alla produzione di scaglie organiche che riducono ovviamente il contenuto inorganico rilevato.

5.1.2 Rottura della parete cellulare, estrazione e dosaggio delle proteine

Per quanto riguarda i risultati ottenuti con la tecnica di *bead milling* emerge, come già anticipato nei capitoli precedenti, che un'estrazione ottimale della componente organica si può ottenere solo riuscendo a rompere sia la teca che la parete cellulare.

Fondamentale è stata quindi la conduzione di test preliminari su *Chlorella vulgaris* per mettere a punto un protocollo che fosse ottimizzato al meglio delle conoscenze possedute a riguardo.

In particolare, per questa alga si è verificato che l'estrazione più efficiente avviene utilizzando un buffer di lisi in aggiunta all'azione meccanica delle microsfele. I risultati circa il quantitativo di proteine presenti sono infatti comparabili a quelli medi noti in letteratura dimostrando che il protocollo eseguito disgrega efficacemente la matrice della parete cellulare.

Leggermente diverso è il caso di *Chrysotila roscoffensis* dove la teca mineralizzata risulta essere una barriera aggiuntiva. Essa sembra bloccare l'energia cinetica delle microsfere durante l'omogeneizzazione, ecco perché i risultati migliori sono stati ottenuti con un blando pretrattamento con acido cloridrico.

In questo modo la coccosfera viene portata in dissoluzione senza però arrecare danni alle restanti parti della cellula e successivamente il buffer di lisi può agire con facilità sulla parete cellulare per una completa lisi.

Queste conclusioni si evincono anche dall'osservazione al microscopio poiché nel campione tal quale sono visibili ancora aggregati di cellule intere che evidentemente influenzano negativamente il dosaggio delle proteine presenti mentre nel campione pretrattato con HCl tutte le cellule appaiono prive di teca mineralizzata e rotte. I dosaggi di questi ultimi campioni presentano allo spettrofotometro percentuali più vicine di proteine e maggiormente in accordo con i risultati della termogravimetria.

5.1.3 Caratterizzazione proteine

Per quanto riguarda i risultati tramite elettroforesi su gel è bene notare la buona corrispondenza con quelli di lavori precedenti presenti in letteratura (Andreeva et al., 2021) a dimostrazione della bontà delle analisi qui condotte. In particolare appaiono efficaci le fasi di raffreddamento in bagno di ghiaccio, che hanno evitato ai campioni shock termici tali da provocare la denaturazione delle proteine.

Inoltre, per la specie scelta qui come riferimento, *Chlorella vulgaris*, il bandeggio ottenuto è pressoché sovrapponibile ai risultati riportati in letteratura (Fig. 5.1.3a) (Andreeva et al., 2021).

Per quanto concerne invece *Chrysotila roscoffensis*, non essendoci dati elettroforetici pregressi riguardanti lo specifico ceppo RCC1414, il confronto è avvenuto con i risultati emergenti dalla specie affine, precedentemente citata, *Chrysotila carterae* (Andreeva et al., 2021). La somiglianza tra i bandeggi di queste due specie è ben visibile (Fig. 5.1.3b), soprattutto nelle fasce di peso comprendenti le proteine legate alla fotosintesi e alla biocalcificazione.

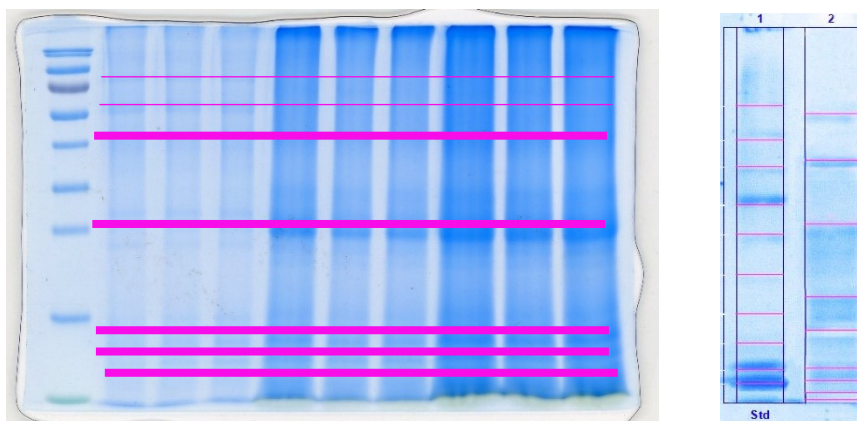


Fig. 5.1.3a: Risultati ottenuti dall'elettroforesi su gel di *Chlorella vulgaris*; a sinistra il gel ottenuto durante l'attività sperimentale descritta, a destra un esempio di gel ottenuto da lavori precedenti in cui la colonna 1 è quella dei pesi noti e la colonna 2 è quella di *Chlorella vulgaris* (Andreeva et al. 2021). Si evidenziano in rosa più spesse le bande in comune tra i due, sinonimo di correttezza dell'analisi

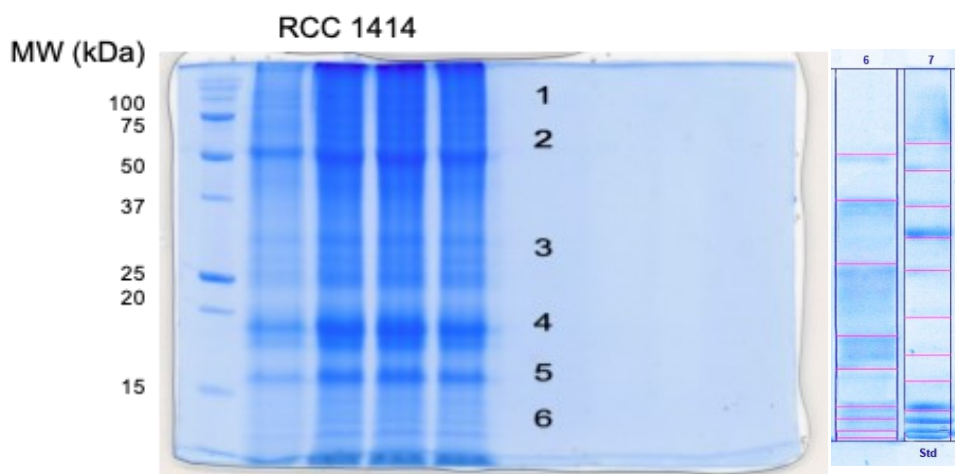


Fig. 5.1.3b: Risultati ottenuti dall'elettroforesi su gel di *Chrysotila roscoffensis*; a sinistra il gel ottenuto durante l'attività sperimentale descritta, a destra un esempio di gel ottenuto da lavori precedenti in cui la colonna 7 è quella dei pesi noti e la colonna 6 è quella di *Chrysotila carterae* (Andreeva et al., 2021).

Ulteriore conferma della correttezza delle analisi effettuate sono gli esiti ottenuti dalla combinazione delle tecniche di cromatografia liquida e spettrometria di massa. Coerentemente con quanto sopra infatti le proteine caratterizzate sono tutte presenti nei database della piattaforma UniProt e, per rendere più veritiera possibile l'identificazione, sono state prese in considerazione solo le sequenze con uno *score* uguale o superiore al 70% eliminando possibili falsi positivi e aumentando l'affidabilità della ricerca.

Le proteine identificate rispecchiano a pieno la natura di entrambe le specie.

In *Chlorella vulgaris* risultano maggioritarie le proteine riconducibili all'attività fotosintetica, come ad esempio *Ribulose biphosphate carboxylase large chain*, comunemente chiamata Rubisco, enzima fondamentale per la fissazione del carbonio.

In *Chrysotila roscoffensis* è in primo luogo rilevante la differenza numerica di proteine identificate tra la prima e la seconda analisi, inizialmente vengono caratterizzate 16 proteine per poi subire un'espansione fino a 120. Come anticipato precedentemente, i due campioni provengono da trattamenti diversi: il primo ha subito un processo di digestione, mentre il secondo è il risultato dell'assemblaggio di bande ritagliate dal gel in aree a medesimo peso molecolare.

Una preparativa diversa equivale ad un risultato finale differente e questo perché varia la sensibilità strumentale.

Nel caso del campione digerito si nota una sensibilità minore, vengono identificate solo le proteine più abbondanti che coprono il segnale di tutte le altre. Invece nel caso del campione proveniente dal gel la capacità di riconoscimento strumentale aumenta poiché le sequenze proteiche analizzate contemporaneamente possiedono un peso simile, vengono cioè selezionati gruppi ristretti di proteine, indipendentemente dalla loro abbondanza, e di conseguenza vengono rilevati anche i segnali (i peptidi) di minore abbondanza.

In generale per *Chrysotila roscoffensis* si delinea una natura complessa: le proteine maggiormente emergenti sono collegate all'anidrasi carbonica, enzima coinvolto nella conversione di anidride carbonica in bicarbonato, primo passaggio nel processo di biocalcificazione che porta alla formazione del carbonato di calcio. Altre proteine particolarmente abbondanti sono quelle deputate all'orientazione e alla regolazione morfologica dei cristalli di calcite usati per la costruzione dei coccoliti, alcune impiegate per l'assemblaggio e l'esocitosi di questi ultimi e altre ancora necessarie per il mantenimento dell'omeostasi del pH citoplasmatico e al contrasto dell'acidificazione interna della cellula in seguito alla precipitazione del carbonato di calcio.

Un'ulteriore categoria emergente è composta dalle proteine impiegate nella captazione della luce a conferma della teoria secondo cui questi organismi possiedono un'elevata capacità di adattamento anche in condizioni di bassa intensità radiativa, infatti il genere *Chrysotila* sembra prosperare sia nella zona fotica superiore che in quella inferiore.

5.2 Relazione profilo proteico e cambiamento climatico globale

Argomenti come i cambiamenti climatici, la transizione verso nuove risorse energetiche, la crisi della biodiversità, le emissioni di anidride carbonica e la conseguente acidificazione degli oceani sono ormai il fulcro del dibattito scientifico e politico globale in quanto fenomeni prevalentemente attribuibili alle attività antropiche.

È proprio in questo contesto che diventa necessario comprendere tutte le possibili risposte ecologiche e fisiologiche degli organismi, soprattutto quelli che si pongono alla base della catena trofica.

Ruolo centrale è sicuramente quello dei coccolitofori che rientrano nella categoria dei maggiori produttori primari gestendo sia la pompa biologica che la pompa dei carbonati grazie alla loro capacità di biocalcificazione, sebbene quest'ultima possa avere un effetto parzialmente contrario al sequestro del carbonio, rilasciando CO₂ durante la precipitazione di CaCO₃.

Gli studi fin qui citati evidenziano come queste microalghe siano sensibili anche ai più piccoli stress ambientali, le loro variazioni possono essere pertanto una chiave di lettura del sempre più allarmante cambiamento climatico globale.

Ma esiste una correlazione tra questo gruppo di viventi e il clima?

Un'iniziale risposta affermativa può giungere considerando il ruolo ecologico assunto dai coccolitofori nell'influenzare i flussi di carbonio a livello globale.

Nonostante le loro micrometriche dimensioni, essi controllano e condizionano il bilancio tra il carbonio organico (POC) e il carbonio inorganico (PIC) grazie alla loro duplice attività di fotosintesi e calcificazione. La fotosintesi contribuisce alla pompa biologica del carbonio, favorendo l'esportazione di POC verso gli strati profondi dell'oceano, mentre la calcificazione, producendo i coccoliti in CaCO₃, funge da zavorra che accelera la sedimentazione del materiale organico (Balch, 2018). Variazioni di temperatura, nutrienti, disponibilità di luce, concentrazione di CO₂ e acidificazione degli oceani possono alterare in modo differenziale la fotosintesi e la calcificazione, modificando il ruolo di questi organismi come sorgenti o pozzi di carbonio (Rost e Riebesell, 2004; Fiorini et al., 2011; Langer et al., 2012, 2013; Šupraha et al., 2015; Zhang et al., 2020; Bianco et al., 2025 a,b).

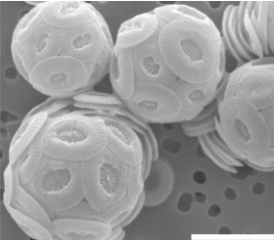
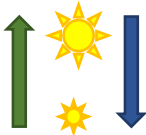
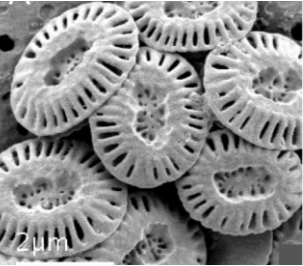
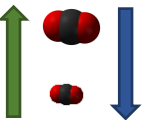
Studiare la componente organica cellulare che governa queste funzioni consentirebbe di conoscere meglio il complesso meccanismo di sequestro del carbonio e stimare le possibili variazioni di esso a seconda di determinate situazioni di stress ambientale.

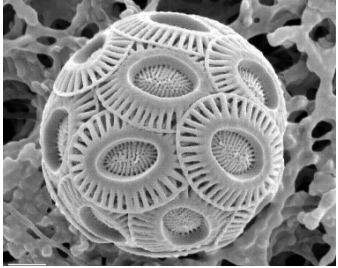
Ogni risposta alle condizioni esterne appare essere specie-specifica, ecco perché è importante esaminare il maggior numero possibile di specie. In questa tesi è stato preso come riferimento degli effetti del cambiamento climatico moderno su questo gruppo di organismi il recente lavoro di Chauhan et al. (2024). Gli autori esplorano il comportamento di due particolari specie: *Coccolithus braarudii* e *Chrysotila carterae*. La prima specie è altamente calcificante ed è risultata particolarmente sensibile all'acidificazione degli oceani, in natura oggi i suoi tassi di crescita sono diminuiti così come la sua nicchia ecologica. Al contrario *Chrysotila carterae* è apparsa più resiliente riuscendo a prosperare anche in condizioni di stress come la presenza di pH marino più acido.

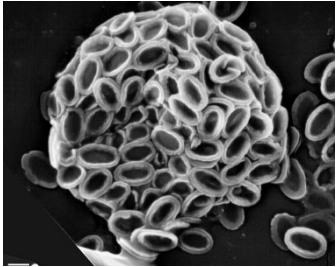
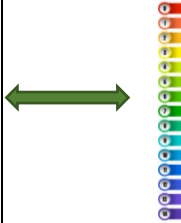
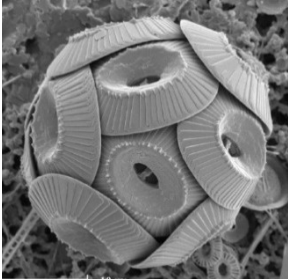
La differenza di comportamento di queste due specie evidenzia la necessità di avere indicatori diagnostici delle risposte delle diverse specie per poter prevedere le conseguenze in termini di perdita di biodiversità. Un'opzione potrebbe essere costruire degli indicatori delle risposte interne dei singoli organismi sulla base delle variazioni della componente organica, quali, come nel caso della presente ricerca, i profili proteici.

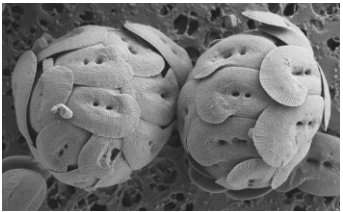
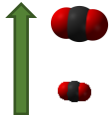
Alcuni studi sono già disponibili in letteratura e sono qui riassunti in una tabella (Tab. 5.2.1), si tratta di sperimentazioni in laboratorio sotto condizioni ambientali controllate.

Le variabili ambientali considerate sono: irradiazione, quantitativo di anidride carbonica disponibile, temperatura e pH. Le specie prese in oggetto sono: *Gephyrocapsa huxleyi*, *Chrysotila carterae*, *Coccolithus braarudii* ed *Helicosphaera carteri*. Le evidenze monitorate riguardano la produzione di biomassa, la calcificazione, il profilo proteico e la presenza di possibili malformazioni. Queste ultime possono essere un indice di grande valenza già utilizzato con successo per altri gruppi di microrganismi (Coccioni et al., 2009; Balachandar et al., 2023) poiché esprimono uno stress ambientale se presenti.

SPECIE	PARAMETRO	NOTE EVIDENZE				IN SINTESI
		Biomassa	Calcificazione	Profilo proteico	Malformazioni	
<i>G. huxleyi</i> ¹ - RCC1216 - RCC1217  (Heidenreich et al., 2019)	- Irradiazione a) 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ b) 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ - pCO ₂ c) attuale, 400 μatm d) elevata, 1000 μatm	Aumenta soprattutto in condizione “b”	Diminuisce	Aumento del contenuto di amminoacidi (legame con aumento di biomassa), ma non abbastanza significativo	Non evidenziate	
<i>G. huxleyi</i> ² (NZEH)  (Jones et al., 2013)	- CO ₂ a) 395 ppm b) 1340 ppm	Aumenta in condizione “b”, ma il tasso di crescita diminuisce	In condizione “b” i coccoliti aumentano di dimensione, ma diventano più sottili, diminuisce la densità	Diminuzione solo di poche proteine istoniche e ribosomiali (legame con tasso di crescita ridotto)	Non evidenziate	

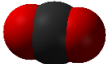
<i>G. huxleyi</i> ³ (RCC911)  (Nannotax3)	- Temperatura a) controllo, 17°C b) moderata, 23°C c) elevata, 28°C	Aumenta con l'aumento della temperatura, soprattutto in condizione "b"	X	Diminuzione proteine di sintesi dell'ATP, di Sistemi Antenna e ribosomiali e aumento proteine Chaperone (legame con stress da calore) in condizioni "b e c"	X	
<i>G. huxleyi</i> ⁴ (RCC1731)  (Nannotax3)	- pH a) 7.6 b) 8.2 c) 8.8	Diminuisce in condizione "c"	X	Variazioni soprattutto in condizione "c", aumento di proteine legate a omeostasi (legame con danno ossidativo e mutazioni al DNA)	X	

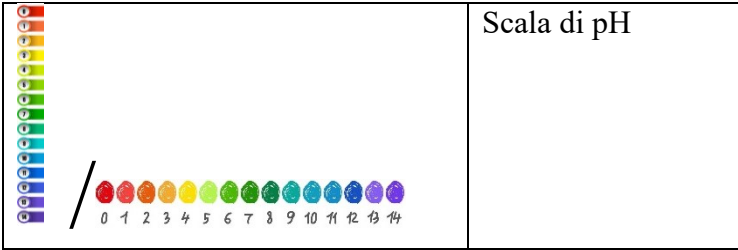
<i>C. carterae</i> ⁴ (PLY 406)  (Nannotax3)	- pH a) 7.6 b) 8.2 c) 8.8	Rimane invariata	X	Rimane invariato	X	
<i>Coccolithus braarudii</i> ⁴  (RCC1198) (Nannotax3)	- pH a) 7.6 b) 8.2 c) 8.8	Aumenta in condizione “b” e diminuisce in condizioni “a e c”	X	Variazioni soprattutto in condizione “c”, aumento di proteine legate a omeostasi (legame con danno ossidativo e mutazioni al DNA)	X	

<i>Helicosphaera carteri</i> ⁵  (RCC1323) (Bianco et al., 2025)	- CO ₂ a) 295 µatm b) 444 µatm c) 600 µatm	Aumenta con l'aumentare di CO ₂ , soprattutto in condizione "b"	Nessuna variazione registrata	X	Non evidenziate	
---	--	--	-------------------------------	---	-----------------	---

¹ (Heidenreich et al., 2019); ² (Jones et al., 2013); ³ (Dedman et al., 2023); ⁴ (Chauhan et al., 2024); ⁵ (Bianco et al., 2025)

LEGENDA

Simbolo	Significato
	Variazione biomassa
	Variazione calcificazione
	Irradiazione solare
	Anidride carbonica
	Aumento temperatura



Tab. 5.2.1: Tabella riassuntiva degli studi analizzati con relativa legenda

Facendo riferimento alla tabella si evince che *Gephyrocapsa huxleyi* ha come lavori di riferimento:

- Heidenreich et al. (2019) in cui i ceppi RCC1216 e RCC1217 sono stati sottoposti a variazioni dei parametri di irradiazione ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e anidride carbonica (dal valore attuale di $400 \mu\text{atm}$ ad uno di $1000 \mu\text{atm}$). La crescita della biomassa aumenta, soprattutto in condizioni di irradiazione superiore, e si collega ad un aumento registrato anche nel contenuto di amminoacidi nel profilo proteico. La calcificazione invece subisce una diminuzione senza evidenziare particolari malformazioni;
- Jones et al. (2013) in cui il ceppo NZEH è stato sottoposto a condizioni di anidride carbonica corrispondente al valore attuale di 395 ppm e ad un valore più che triplicato di 1340 ppm. La biomassa aumenta in condizioni di maggior concentrazione, ma il tasso di crescita subisce un rallentamento, ciò significa che gli organismi crescono, ma ad un ritmo più lento a cui è collegata anche una registrazione di diminuzione di alcune proteine ribosomiali. Anche la calcificazione aumenta, ma diminuisce di densità, infatti i coccoliti prodotti risultano essere più sottili senza però evidenziare malformazioni;
- Dedman et al. (2023) in cui il ceppo RCC911 è stato sottoposto a temperature diverse: una di controllo pari a 17°C , una moderata di 23°C e una elevata corrispondente a 28°C . La biomassa aumenta al crescere della temperatura, soprattutto nella condizione intermedia, ma nel profilo proteico si registra uno stress da calore attraverso l'aumento di proteine tipo Chaperon, cioè quelle con la funzione di aiutare le catene di amminoacidi appena formate a ripiegarsi correttamente per diventare molecole funzionali. Per quanto riguarda invece calcificazione e malformazioni, non sono state considerate;
- Chauhan et al. (2024) in cui il ceppo RCC1731 è stato sottoposto a valori di pH pari a 7.6, 8.2 e 8.8. Basandosi sui dati forniti dal sito della NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration), l'agenzia scientifica e normativa statunitense che si occupa del monitoraggio degli oceani, questi valori possono essere identificati rispettivamente come una previsione negativa di forte acidificazione, un valore medio e uno più basico. La biomassa diminuisce al pH basico e questo stress ossidativo viene rilevato anche nel profilo proteico con l'aumento di proteine attive nel mantenimento omeostatico. Anche in questo caso calcificazione e malformazioni non sono state monitorate.

Per quanto riguarda *Chrysotila carterae* il lavoro di riferimento è Chauhan et al. (2024) in cui il ceppo PLY406 è stato sottoposto a valori di pH pari a 7.6, 8.2 e 8.8. La biomassa risulta invariata così come il profilo proteico confermando la natura resiliente di questa specie. Calcificazione e malformazioni non sono invece state prese in considerazione.

Per quanto riguarda *Coccolithus braarudii* il lavoro di riferimento è Chauhan et al. (2024) in cui il ceppo RCC1198 è stato sottoposto a valori di pH pari a 7.6, 8.2 e 8.8. La biomassa a pH 8.2 aumenta, ma diminuisce quando il valore si discosta leggermente. Dal punto di vista del profilo proteico si registrano aumenti di proteine che regolano l'omeostasi, soprattutto in condizione di pH più basico, a testimoniare lo stress ossidativo subito. Calcificazione e malformazioni non sono invece state prese in considerazione.

Per quanto riguarda *Helicosphaera carteri* il lavoro di riferimento è Bianco et al. (2025) in cui il ceppo RCC1323 è stato sottoposto a valori di anidride carbonica pari a 295 ppm, 444 ppm e 600 ppm. La biomassa aumenta soprattutto nella condizione intermedia, non si evidenziano variazioni nella calcificazione e neanche malformazioni. Il profilo proteico invece non è stato analizzato.

Tenendo presente che le specie *Chrysotila carterae* e *Chrysotila roscoffensis* sono affini, si può dedurre che anche la seconda citata possa avere una buona resilienza tale da inserirla tra le specie in grado di adattarsi maggiormente ai cambiamenti climatici, soprattutto per i parametri che coinvolgono l'acidificazione, garantendo la sopravvivenza del gruppo dei coccolitofori.

Infatti l'abbassamento di valori di pH, provocato dall'assorbimento degli oceani della sempre maggiore anidride carbonica emessa a livello antropico, rappresenta uno dei parametri fondamentali che potrebbe mettere più a rischio questi piccoli organismi calcificanti.

Dopo aver visto le risposte dei diversi ceppi si deduce che gli stress ambientali portano a variazioni monospecifiche. Non esiste, cioè, una risposta universale: ogni specie e ogni ceppo reagisce in modo proprio e caratteristico alle medesime perturbazioni esterne, modulando in maniera selettiva l'espressione di specifiche categorie proteiche. Questa eterogeneità non è una limitazione, bensì una ricchezza biologica che testimonia l'alta plasticità adattativa del gruppo dei coccolitofori e che rende ancora più necessaria un'analisi sistematica di più specie. Di conseguenza lo studio del profilo proteico è promettente come indicatore premonitore di quelle che possono essere le risposte delle singole specie e ceppi ai cambiamenti climatici. In particolare, le proteine legate all'omeostasi del pH, all'attività dell'anidrasi carbonica e alla risposta allo stress ossidativo emergono come categorie di interesse prioritario: variazioni nella loro abbondanza relativa potrebbero fungere da segnali precoci di uno squilibrio fisiologico, rilevabile ancora prima che esso si manifesti in alterazioni morfologiche o di crescita misurabili macroscopicamente. Questo aspetto è di grande rilevanza applicativa, poiché consentirebbe di anticipare gli effetti dei cambiamenti climatici sulle comunità microalgali oceaniche prima che questi diventino irreversibili.

È quindi fondamentale nel continuo di questa ricerca valutare la risposta specie-specifica a livello di proteomica in relazione alla variazione dei parametri strettamente legati al cambiamento del clima, come la CO₂ e il pH, ma anche la temperatura e l'irradiazione, la cui combinazione produce effetti sinergici spesso più impattanti di quelli dei singoli fattori considerati isolatamente.

5.3 Dall'accademia alla società civile: un tentativo di divulgazione

Tutte queste informazioni però sarebbero vane se non condivise. Sicuramente uno degli strumenti divulgativi più efficace è la pubblicazione di articoli su riviste specialistiche. Nonostante ciò è fondamentale che non solo gli scienziati prendano coscienza di questi microrganismi capaci di fungere da “sentinelle” del cambiamento climatico, bensì anche tutto il resto della popolazione.

A ben vedere sono temi di interesse quotidiano e di conseguenza un mezzo potente e alla portata anche dei più piccoli sarebbe l'organizzazione di seminari tematici presso l'Università e svolti in collaborazione con le scuole.

Nei curricula scolastici è segnalata infatti, negli ultimi anni, la necessità di inserire ore di educazione civica e questo sarebbe un tema che rispecchia a pieno il senso dell'emergente materia.

Per questo motivo, e in considerazione della natura divulgativa della presente tesi, a conclusione dello studio si propone un'attività di sensibilizzazione.

L'iniziativa è stata pensata per le scuole secondarie di II grado, in particolare di indirizzi scientifici, ed è suddivisa in tre incontri in cui i ragazzi vengono stimolati nel ragionamento su quanto concerne la situazione climatica attuale e il possibile utilizzo dei coccolitofori come indicatori dei cambiamenti.

La prima lezione, da svolgersi a scuola, prevede una parte in cui agli alunni vengono mostrate immagini al microscopio di diversi coccolitofori e alcuni scatti satellitari di *bloom* algali negli oceani. Viene quindi aperto un breve dibattito sulla possibile natura di queste strutture e fenomeni da cui l'insegnante può partire per spiegare cosa sono i coccolitofori, quali sono le principali differenze tra *Chlorella vulgaris* e *Chrysotila roscoffensis* e i processi di fotosintesi e calcificazione.

La seconda parte della lezione è strutturata per un'attività in cui i ragazzi devono provare a leggere e interpretare la tabella citata precedentemente (Tab. 5.2.1), e partendo da un confronto in piccoli gruppi devono costruire un dibattito con l'intera classe su possibili relazioni tra le microalghe

biocalcificanti e i parametri ambientali. Proprio da questa discussione l'insegnante può prendere spunto per completare la spiegazione sul ruolo ecologico dei coccolitofori e sul fenomeno di acidificazione degli oceani.

Durante la seconda lezione, da svolgersi presso il laboratorio di proteine dell'Università, i ragazzi vengono messi di fronte ad un'attività pratica partecipando allo svolgimento della tecnica di elettroforesi su gel. I campioni usati comprendono i pesi noti, *Chrysotila roscoffensis* in condizioni standard, *Chrysotila roscoffensis* sotto stress da acidificazione e *Chlorella vulgaris*. In questo modo possono sentirsi maggiormente coinvolti e, ottenendo un riscontro concreto, potrebbe essere più facile per loro comprendere un argomento altrimenti difficilmente accessibile.

L'ultima lezione, sempre da svolgersi presso l'Università, prevede l'osservazione del gel ottenuto dall'attività laboratoriale e il successivo confronto con materiale scientifico, come articoli, e la tabella distribuita in precedenza, al fine di costruire una discussione sui possibili legami tra il profilo proteico dei coccolitofori e i cambiamenti climatici.

Anche in questo caso a concludere il dibattito è una breve spiegazione da parte del docente universitario in modo da riassumere e meglio specificare quanto detto confermando o correggendo le ipotesi degli studenti.

Si rimanda all'appendice per la lettura completa della scheda del docente.

RIASSUNTO E CONCLUSIONI

Il presente studio si inserisce in un contesto di ricerca sulle microalghe coccolitoforiche in grado di influenzare significativamente il ciclo del carbonio attraverso l'attuazione di fotosintesi e calcificazione.

Le finalità principali della presente tesi sono state la caratterizzazione della componente organica e l'identificazione del profilo proteico della specie *Chrysotila roscoffensis*, in particolare del ceppo RCC1414, combinate all'ottimizzazione di protocolli sperimentali per la lisi cellulare e l'estrazione proteica. Per calibrare al meglio le metodologie da applicare è stata utilizzata la microalga *Chlorella vulgaris*, ampiamente studiata, per un miglior confronto con i risultati ottenuti in questa tesi.

Il metodo analitico ha previsto l'attuazione di diverse tecniche sperimentali: analisi termogravimetrica, *bead milling*, spettrofotometria, elettroforesi su gel, cromatografia liquida e spettrometria di massa.

La termogravimetria ha permesso di ottenere una prima stima quantitativa delle macromolecole presenti nelle cellule (carboidrati, proteine e lipidi) e della frazione inorganica che costituisce la teca. Per quanto concerne il quantitativo proteico, un ulteriore riscontro è stato ottenuto attraverso la spettrofotometria, i cui dati sono risultati coerenti con quelli della TGA.

La tecnica di *bead milling* è stata necessaria per l'omogeneizzazione dei campioni grazie all'azione meccanica delle sfere. Le tempistiche sono state ottimizzate individuando in 30 minuti il valore più efficace e la scelta del buffer di lisi con PBS e SDS 1% si è rivelata determinante per massimizzare la resa estrattiva. Per sciogliere la coccosfera prima dell'omogeneizzazione, il campione è stato inoltre pretrattato con HCl, operazione rivelatasi fondamentale per superare i limiti sperimentali legati alla presenza della teca inorganica.

L'elettroforesi su gel di acrilammide ha permesso di valutare la distribuzione del peso molecolare delle proteine presenti nei campioni e ha fornito la base per le analisi successive. La cromatografia liquida combinata alla spettrometria di massa ha consentito di identificare le sequenze peptidiche costituenti, caratterizzando per la prima volta il profilo proteico di *Chrysotila roscoffensis*. Il collegamento tra le sequenze peptidiche e le rispettive proteine è stato effettuato tramite consultazione dell'archivio UniProt.

I risultati validano il protocollo proposto, confermandone l'efficacia in quanto in linea con la limitata letteratura disponibile sui coccolitofori e, in particolare, sulla specie target qui analizzata.

Per quanto riguarda i risultati proteici, sono state identificate complessivamente circa 120 proteine di *Chrysotila roscoffensis*, raggruppate in otto principali categorie funzionali: anidrase carbonica, fotosintesi e Ciclo di Calvin, produzione di energia, sintesi proteica e traduzione, citoscheletro, calcificazione, divisione cellulare e metabolismo dei carboidrati. Il restante comprende proteine non ancora caratterizzate. L'abbondanza relativa delle proteine legate all'anidrase carbonica e alla calcificazione riflette la natura peculiare di questa specie coccolitoforica e apre prospettive interessanti per la comprensione dei meccanismi di biocalcificazione a livello molecolare.

Guardando all'intero lavoro di tesi, è bene sottolineare la sua novità scientifica: esso risulta essere il primo esperimento di caratterizzazione del profilo proteico della specie *Chrysotila roscoffensis* ceppo RCC1414. Lo studio si inserisce in un panorama scientifico in cui emerge una forte carenza di letteratura legata ai coccolitofori, soprattutto per quanto concerne l'ambito biochimico e fisiologico, limitando così la comprensione del loro ruolo ecologico e delle loro risposte adattative. L'ottimizzazione di un protocollo per analisi proteomiche di queste microalghe rappresenta pertanto un avanzamento metodologico di rilevanza per la micropaleontologia.

È tuttavia necessario riconoscere i limiti del presente lavoro. Le analisi condotte hanno carattere preliminare, in quanto svolte su quantitativi molto ridotti di biomassa provenienti da colture di laboratorio. Lo studio si concentra su un singolo ceppo in condizioni standard di coltura, senza variazione dei parametri ambientali, e il confronto con il database proteico di *Gephyrocapsa huxleyi*, specie filogeneticamente affine ma distinta, introduce un margine di incertezza nell'identificazione di alcune proteine. Questi limiti non inficiano la validità del protocollo messo a punto, ma sottolineano la necessità di confermare i risultati con un numero maggiore di repliche e su campioni più abbondanti.

A conclusione dello studio, e in considerazione della sua natura anche divulgativa, è stata progettata un'attività di sensibilizzazione rivolta alle scuole secondarie di II grado. L'iniziativa si articola in tre incontri, tra aula e laboratorio universitario, e guida gli studenti a comprendere il ruolo dei coccolitofori come indicatori del cambiamento climatico attraverso osservazione al microscopio, lettura di dati scientifici e partecipazione diretta a una corsa elettroforetica.

Al fine di valorizzare questa ricerca è importante proseguire lungo questo percorso. Il primo passo potrebbe essere quello di effettuare un numero maggiore di repliche sperimentali per confermare la riproducibilità dei dati, ampliando l'analisi ad altri ceppi e specie di coccolitofori per aumentare

l'eterogeneità delle risposte agli stress ambientali note. Il secondo passo potrebbe essere quello di coltivare le specie in ambienti controllati, apportando variazioni ai parametri climatici (CO₂, pH, temperatura, irradiazione) al fine di acquisire la conoscenza necessaria per costruire indicatori proteici delle risposte adattative e individuare strategie di monitoraggio e mitigazione degli scenari climatici futuri.

Decodificare il profilo proteico e le modalità di risposta dei coccolitofori è sinonimo di tracciare il modo in cui gli oceani rispondono ai cambiamenti climatici globali. Essi non sono meri contenitori di acqua, bensì una tra le più antiche e preziose memorie della Terra. Al loro interno i coccolitofori svolgono il ruolo preciso e minuzioso dell'amanuense che registra, nella differenziazione della sua frazione organica, gli eventi accaduti permettendone la conservazione. Tradurre queste modifiche permetterebbe di interpretare eventi passati e attuali, ma soprattutto di predire quelli futuri.

Oltre a tutto ciò, l'arricchimento della conoscenza dei coccolitofori avrebbe benefici sull'avanzamento di settori biotecnologici emergenti che sfrutterebbero queste microalghe come fonti di nutrienti superconcentrati, farmaci, cosmetici, biomateriali e biocarburanti per una produzione sempre più sostenibile.

BIBLIOGRAFIA

- Allyson Viganò, 2016. Studio biostratigrafico e paleoecologico delle associazioni a nannofossili calcarei alla transizione Eocene-Oligocene al Site ODP 756 (Ninetyeast Ridge, Oceano Indiano).
- Andersen, R.A., Kim, J.I., Tittley, I., Yoon, H.S., 2014. A re-investigation of *Chrysotila* (Prymnesiophyceae) using material collected from the type locality. *Phycologia* 53, 463–473. <https://doi.org/10.2216/14-016.1>
- Andreeva, A., Budenkova, E., Babich, O., Sukhikh, S., Ulrikh, E., Ivanova, S., Prosekov, A., Dolganyuk, V., 2021. Production, Purification, and Study of the Amino Acid Composition of Microalgae Proteins. *Molecules* 26, 2767. <https://doi.org/10.3390/molecules26092767>
- Aveiro, S.S., Melo, T., Figueiredo, A., Domingues, P., Pereira, H., Maia, I.B., Silva, J., Domingues, M.R., Nunes, C., Moreira, A.S.P., 2020. The Polar Lipidome of Cultured *Emiliania huxleyi*: A Source of Bioactive Lipids with Relevance for Biotechnological Applications. *Biomolecules* 10, 1434. <https://doi.org/10.3390/biom10101434>
- Bach, Q.-V., Chen, W.-H., 2017a. A comprehensive study on pyrolysis kinetics of microalgal biomass. *Energy Convers. Manag.* 131, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.10.077>
- Bach, Q.-V., Chen, W.-H., 2017b. Pyrolysis characteristics and kinetics of microalgae via thermogravimetric analysis (TGA): A state-of-the-art review. *Bioresour. Technol.* 246, 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.087>
- Balachandar, K., Viswanathan, C., Robin, R.S., Abhilash, K.R., Sankar, R., Deepak Samuel, V., Purvaja, R., Ramesh, R., 2023. Benthic foraminifera as an environmental proxy for pollutants along the coast of Chennai, India. *Chemosphere* 310, 136824. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136824>
- Balch, W.M., 2018. The Ecology, Biogeochemistry, and Optical Properties of Coccolithophores. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 10, 71–98. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-121916-063319>
- Baumann, K.-H., Andrulleit, H., Böckel, B., Geisen, M., Kinkel, H., 2004. The significance of extant coccolithophores as indicators of ocean water masses, surface water temperature, and paleoproductivity: a review.
- Bendif, E.M., Nevado, B., Wong, E.L.Y., Hagino, K., Probert, I., Young, J.R., Rickaby, R.E.M., Filatov, D.A., 2019. Repeated species radiations in the recent evolution of the key marine phytoplankton lineage *Gephyrocapsa*. *Nat. Commun.* 10, 4234. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12169-7>
- Bernaerts, T., Goossens, S., Swinnen, E., De Cuyper, A., Schoeters, F., Van Miert, S., 2026. Bead milling and ultrasonication as scalable techniques for cell disruption of *Chlorella vulgaris*. *Algal Res.* 95, 104613. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2026.104613>
- Bianco, S., Bordiga, M., Langer, G., Ziveri, P., Cerino, F., Relitti, F., Laudicella, V.A., Di Giulio, A., Lupi, C., 2025. *Helicosphaera carteri* (Prymnesiophyceae) under high carbon dioxide: An experimental study. *J. Phycol.* 61, 1576–1590. <https://doi.org/10.1111/jpy.70103>
- Chauhan, N., Dedman, C.J., Baldreki, C., Dowle, A.A., Larson, T.R., Rickaby, R.E.M., 2024. Contrasting species-specific stress response to environmental pH determines the fate of coccolithophores in future oceans. *Mar. Pollut. Bull.* 209, 117136. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.117136>
- Chen, W.-H., Chu, Y.-S., Liu, J.-L., Chang, J.-S., 2018. Thermal degradation of carbohydrates, proteins and lipids in microalgae analyzed by evolutionary computation. *Energy Convers. Manag.* 160, 209–219. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.01.036>

- Chevrier, D.M., Gautam, S., Scheffel, A., 2025. Nanobeam-scanning X-ray fluorescence microscopy reveals the elemental composition of dense intracellular bodies in biomineralizing coccolithophores. *Faraday Discuss.* 261, 251–268. <https://doi.org/10.1039/D5FD00021A>
- Coccioni, R., Frontalini, F., Marsili, A., Mana, D., 2009. Benthic foraminifera and trace element distribution: A case-study from the heavily polluted lagoon of Venice (Italy). *Mar. Pollut. Bull.* 59, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.08.009>
- Dedman, C.J., Barton, S., Fournier, M., Rickaby, R.E.M., 2023. The cellular response to ocean warming in *Emiliana huxleyi*. *Front. Microbiol.* 14, 1177349. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1177349>
- Ehrenberg, C. G., 1854. *Mikrogeologie: Das Erden und Felsen schaffende Wirken des unsichtbar kleinen selbständigen Lebens auf der Erde* (Vol. 1). L. Voss.
- Fiorini, S., Middelburg, J., Gattuso, J., 2011. Effects of elevated CO₂ partial pressure and temperature on the coccolithophore *Syracosphaera pulchra*. *Aquat. Microb. Ecol.* 64, 221–232. <https://doi.org/10.3354/ame01520>
- Gal, A., Sorrentino, A., Kahil, K., Pereiro, E., Faivre, D., Scheffel, A., 2018. Native-state imaging of calcifying and noncalcifying microalgae reveals similarities in their calcium storage organelles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 11000–11005. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804139115>
- Godrijan, J., Drapeau, D., Balch, W.M., 2020. Mixotrophic uptake of organic compounds by coccolithophores. *Limnol. Oceanogr.* 65, 1410–1421. <https://doi.org/10.1002/lno.11396>
- Grimsley, G.R., Pace, C.N., 2003. Spectrophotometric Determination of Protein Concentration. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 33. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0301s33>
- Hagino, K., Young, J.R., 2015. Biology and Paleontology of Coccolithophores (Haptophytes), in: Ohtsuka, S., Suzuki, T., Horiguchi, T., Suzuki, N., Not, F. (Eds.), *Marine Protists*. Springer Japan, Tokyo, pp. 311–330. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55130-0_12
- Heidenreich, E., Wördenweber, R., Kirschhöfer, F., Nusser, M., Friedrich, F., Fahl, K., Kruse, O., Rost, B., Franzreb, M., Brenner-Weiß, G., Rokitta, S., 2019. Ocean acidification has little effect on the biochemical composition of the coccolithophore *Emiliana huxleyi*. *PLOS ONE* 14, e0218564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218564>
- Horiguchi, T., Pienaar, R.N., 1994. Ultrastructure of a new marine sand-dwelling dinoflagellate, *Gymnodinium quadrilobatum* sp. nov. (Dinophyceae) with special reference to its endosymbiotic alga. *Eur. J. Phycol.* 29, 237–245. <https://doi.org/10.1080/09670269400650691>
- Jones, B.M., Iglesias-Rodriguez, M.D., Skipp, P.J., Edwards, R.J., Greaves, M.J., Young, J.R., Elderfield, H., O'Connor, C.D., 2013. Responses of the *Emiliana huxleyi* Proteome to Ocean Acidification. *PLoS ONE* 8, e61868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061868>
- Kadan, Y., Tollervy, F., Varsano, N., Mahamid, J., Gal, A., 2021. Intracellular nanoscale architecture as a master regulator of calcium carbonate crystallization in marine microalgae. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 118, e2025670118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025670118>
- Langer, G., Oetjen, K., Brenneis, T., 2013. Coccolithophores do not increase particulate carbon production under nutrient limitation: A case study using *Emiliana huxleyi* (PML B92/11). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 443, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.02.040>
- Langer, G., Oetjen, K., Brenneis, T., 2012. Calcification of *Calcidiscus leptoporus* under nitrogen and phosphorus limitation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 413, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.11.028>

- Lohmann, H., 1902. Die Coccolithophoridae, eine monographie der Coccolithen bildenden flagellaten, zugleich ein Beitrag zur Kenntnis des Mittelmeerauftriebs. Arch. Protistenkde., 1, 89.
- Mangiacotti, M., Fumagalli, M., Casali, C., Biggiogera, M., Forneris, F., Sacchi, R., 2023. Carbonic anhydrase IV in lizard chemical signals. Sci. Rep. 13, 14164. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41012-9>
- Meng, R., Zhang, L., Zhou, C., Liao, K., Xiao, P., Luo, Q., Xu, J., Cui, Y., Hu, X., Yan, X., 2021. Genome Sequence of *Chrysotila roscoffensis*, a Coccolithophore Contributed to Global Biogeochemical Cycles. Genes 13, 40. <https://doi.org/10.3390/genes13010040>
- Murray, J., & Renard, AF, 1891. Rapporto sui depositi di acque profonde basato sui campioni raccolti durante il viaggio della HMS Challenger negli anni dal 1872 al 1876. HM Stationery Office.
- Poulton, A.J., Holligan, P.M., Charalampopoulou, A., Adey, T.R., 2017. Coccolithophore ecology in the tropical and subtropical Atlantic Ocean: New perspectives from the Atlantic meridional transect (AMT) programme. Prog. Oceanogr. 158, 150–170. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2017.01.003>
- Rezvani, S., Kennedy, C., Moheimani, N.R., 2019. Techno-economic study of multi-product resource scenarios for *Pleurochrysis carterae* grown in open ponds in Western Australia. Algal Res. 39, 101456. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101456>
- Rost, B., Riebesell, U., 2004. Coccolithophores and the biological pump: responses to environmental changes, in: Thierstein, H.R., Young, J.R. (Eds.), Coccolithophores: From Molecular Processes to Global Impact. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 99–125. https://doi.org/10.1007/978-3-662-06278-4_5
- Schiller, J., Grunow, A., Hauck, F., & Limpricht, K. G., 1930. Coccolithineae. Kummer.
- Stefania Bianco, 2025. La risposta dei coccolitofori alla CO₂ in esperimenti in coltura e nel record fossile: un focus su *Helicosphaera carteri*.
- Šupraha, L., Gerecht, A.C., Probert, I., Henderiks, J., 2015. Eco-physiological adaptation shapes the response of calcifying algae to nutrient limitation. Sci. Rep. 5, 16499. <https://doi.org/10.1038/srep16499>
- Sviben, S., Gal, A., Hood, M.A., Bertinetti, L., Politi, Y., Bennet, M., Krishnamoorthy, P., Schertel, A., Wirth, R., Sorrentino, A., Pereiro, E., Faivre, D., Scheffel, A., 2016. A vacuole-like compartment concentrates a disordered calcium phase in a key coccolithophorid alga. Nat. Commun. 7, 11228. <https://doi.org/10.1038/ncomms11228>
- Taylor, A.R., Brownlee, C., Wheeler, G., 2017. Coccolithophore Cell Biology: Chalking Up Progress. Annu. Rev. Mar. Sci. 9, 283–310. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-122414-034032>
- Thomas Huxley,, 1858. Su alcuni organismi che vivono una grande profondità nell'Oceano Atlantico settentrionale.
- Webb, J.P., 2015. I declare that this thesis is my own account of my research and contains work which has.
- Zhang, Y., Collins, S., Gao, K., 2020. Reduced growth with increased quotas of particulate organic and inorganic carbon in the coccolithophore *Emiliania huxleyi* under future ocean climate change conditions. Biogeosciences 17, 6357–6375. <https://doi.org/10.5194/bg-17-6357-2020>

APPENDICE

Unità di apprendimento

UNITÀ DI APPRENDIMENTO	
Denominazione	Piccoli gusci, grandi soluzioni
Prodotti	Presentazione Power Point sui Coccolitofori con annessa tabella ed esperimento di corsa elettroforetica.
Competenze chiave e relative competenze specifiche	Evidenze osservabili
COMUNICAZIONE NELLA MADRELINGUA	▪ Capacità di interpretare concetti in forma sia orale che scritta; ▪ Capacità di distinguere i diversi stili e registri del linguaggio a seconda del contesto di riferimento; ▪ Capacità di esprimere il proprio pensiero e le proprie conoscenze; ▪ Capacità di utilizzare un lessico scientifico specifico.
COMUNICAZIONE IN LINGUE STRANIERE	▪ Capacità di interpretare e tradurre testi scientifici in lingua inglese.
COMPETENZA MATEMATICA E COMPETENZE DI BASE IN CAMPO SCIENTIFICO E TECNOLOGICO	▪ Capacità di interpretare modelli matematici come formule, grafici e tabelle; ▪ Capacità di ragionamento secondo un pensiero logico, spaziale e critico; ▪ Capacità di comprendere l'importanza della scienza e della tecnologia per l'ambiente;

	▪ Capacità di discernere le informazioni scientifiche veritiere tra tutte quelle reperibili.
COMPETENZA DIGITALE	▪ Capacità di utilizzare servizi di ricerca online e usufruire solo di informazioni di cui si è accertata la pertinenza e la veridicità.
IMPARARE A IMPARARE	▪ Capacità di organizzare l'apprendimento gestendo tempo e informazioni; ▪ Capacità di apprendere sia a livello personale che in gruppo; ▪ Capacità di valutare in modo critico gli obiettivi e i risultati del proprio apprendimento; ▪ Capacità di ammettere eventuale esigenza di chiedere consigli e supporto ad altre persone.
COMPETENZE SOCIALI E CIVICHE	▪ Capacità di comunicare in modo costruttivo in ambienti diversi; ▪ Capacità di mostrare tolleranza comprendendo i diversi punti di vista; ▪ Comprendere il ruolo fondamentale dell'educazione al fine di essere un cittadino consapevole del proprio impatto.

SENSO DI INIZIATIVA E DI IMPRENDITORIALITÀ	▪ Capacità di pianificazione, gestione, e comunicazione; ▪ Capacità di assumersi la responsabilità dei propri agire e apprendere.
Abilità	Conoscenze
Riconoscimento delle funzioni e del ruolo dei Coccolitofori	Conoscenze su forma, struttura e funzione dei Coccolitofori
Riconoscimento di alcune specie maggiormente citate di Coccolitofori	Conoscenze delle immagini da microscopia delle specie più citate di Coccolitofori
Saper applicare il metodo scientifico	Conoscenza dei procedimenti alla base della corsa elettroforetica sul gel e del metodo scientifico
Saper lavorare in gruppo e in modo autonomo con un approccio costruttivo ed efficiente	Conoscere le dinamiche di gruppo e di apprendimento autonomo
Saper comunicare in modo chiaro ed efficace informazioni scientifiche sui cambiamenti climatici	Conoscenze di base e specifiche sui cambiamenti climatici
Saper riassumere in forma orale quanto studiato aggiungendo un proprio parere personale evidenziando le proprie considerazioni	Conoscenza di un lessico tecnico-specifico per comunicare in maniera riassuntiva la propria conoscenza e il proprio parere
Utenti destinatari	Classi quarte e quinte della Scuola Secondaria di Secondo Grado.
Prerequisiti	Proteomica, ecologia di base e pensiero critico sui cambiamenti climatici.
Tempi	Periodo complessivo di 6 ore, di cui 2 a scuola e 4 presso l'Università, così suddivise: ▪ 50 minuti: osservazione al microscopio delle microalghe e di immagini satellitari dei <i>bloom</i>, dibattito su cosa possono essere, spiegazione introduttiva dei Coccolitofori (differenza tra <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Chrysotila roscoffensis</i>, fotosintesi/calcifificazione);

	▪ 1 ora e 10: osservazione e analisi in gruppo di tabelle, conseguente dibattito sui contenuti e spiegazione del ruolo dei Coccolitofori e del fenomeno di acidificazione degli oceani; ▪ 2 ore: esperimento di corsa elettroforetica su gel; ▪ 2 ore: osservazione e discussione dei risultati dell'esperimento e spiegazione del legame tra profilo proteico dei Coccolitofori e cambiamenti climatici.
Esperienze attivate	Apprendimento mediante diverse esperienze: ▪ Lezioni frontali; ▪ Discussioni e dibattiti; ▪ Laboratorio per l'analisi di corsa elettroforetica su gel; ▪ Lettura di dati scientifici; ▪ Analisi critica
Metodologie	▪ Lezioni frontali ▪ Metodo IBSE (Inquiry Based Science Education) ▪ Learning by doing ▪ Cooperative learning ▪ Peer education
Risorse umane interne ed esterne	Docente di Scienze della scuola e docenti e studenti dell'Università.
Strumenti	PC e LIM, tabelle stampate, materiale per l'effettuazione della tecnica di elettroforesi su gel.
Valutazione	Personale attraverso il confronto con gli altri e autobiografia cognitiva.

Consegna agli studenti

Consegna agli studenti
Titolo UdA: “Piccoli gusci, grandi soluzioni” Cosa si chiede di fare: Raccontate, se ne sapete, dei cambiamenti climatici, analizzate e commentate le tabelle fornitevi, acquisite competenze sui Coccolitofori e imparate la tecnica di analisi elettroforetica. In che modo: Vi dividete in gruppi scelti dall’insegnante al fine di preparare un’esposizione orale sull’analisi dei dati scientifici e svolgete l’esperimento di corsa elettroforetica su gel. Quali prodotti: Presentazione orale della discussione critica svolta tra i gruppi. Che senso ha: Rendere tangibile il ruolo dei Coccolitofori, altrimenti invisibile, nelle risposte ai cambiamenti climatici e nel campo delle innovative biotecnologie. Tempi: Le lezioni si svolgono durante l’orario scolastico, presso la scuola e presso l’Università. Risorse: PC, tabelle stampate e materiale per la corsa elettroforetica su gel. Criteri di valutazione: Ognuno di noi valuterà personalmente le proprie conoscenze attraverso il dibattito e compilando un questionario di autovalutazione cognitiva.

Piano di lavoro

UNITÀ DI APPRENDIMENTO: Piccoli gusci, grandi soluzioni

Coordinatore: Docente di Scienze e Docenti dell’Università

Fasi	Cosa fanno gli alunni	Cosa fa il docente	Tempi
1	Ascolto attivo e partecipativo delle spiegazioni attivando ragionamenti trasversali tra scienze e attualità. In particolare osservazione di immagini e condivisione di conoscenze ed esperienze	Gestione del dibattito iniziale (Cosa sono?) mostrando immagini e successiva spiegazione di: Coccolitofori, differenza tra <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Chrysotila roscoffensis</i> , fotosintesi e calcificazione.	▪ 15 min: osservazione immagini e dibattito; ▪ 35 min: spiegazione

	personali legate ai temi dei cambiamenti climatici.		
2	Analisi critica in gruppo di una tabella di dati scientifici, condivisione partecipata con i compagni e ascolto delle nuove informazioni date sull'argomento.	Gestione dibattito tra gruppi e successiva implementazione delle informazioni con spiegazioni riguardanti il ruolo ecologico dei Coccolitofori e il fenomeno di acidificazione degli oceani.	▪ 30 min: lavoro di gruppo sulle tabelle ▪ 40 min: dibattito e annessa spiegazione
3	Ascolto attivo e partecipativo all'esperimento di corsa elettroforetica su gel.	Conduzione e gestione dei gruppi nello svolgimento dell'esperimento di elettroforesi (4 campioni usati: pesi noti, <i>Chrysotila roscoffensis</i> in condizioni standard, <i>Chrysotila roscoffensis</i> sotto stress da acidificazione e <i>Chlorella vulgaris</i>).	▪ 2 ore: esperimento di corsa elettroforetica e annessa colorazione del gel prodotto
4	Condivisione delle interpretazioni dei risultati dell'esperimento, confronto con materiale scientifico e ascolto attivo e partecipativo delle spiegazioni.	Gestione del dibattito sui risultati dell'esperimento e spiegazione del legame tra il profilo proteico dei Coccolitofori e i cambiamenti climatici.	▪ 1 ora e 30 min: dibattito sui risultati ottenuti e sulle informazioni scientifiche pregresse; ▪ 30 min: spiegazione

Schema di autovalutazione cognitiva

AUTOVALUTAZIONE COGNITIVA di

Cosa ne penso del lavoro che ho svolto?

.....

.....

.....

ARGOMENTI

- Di quali argomenti mi sono occupato? Li ho trovati facili o difficili?

Argomento	Facile	Difficile
1.	☐	☐
2.	☐	☐
3.	☐	☐
4.	☐	☐
5.	☐	☐

- Sapevo già qualcosa su questi argomenti? SÌ NO

Che cosa?

- Mi è servito per realizzare meglio il lavoro? SÌ NO
- 5 cose che ho imparato e che mi sono rimaste più impresse

.....

.....

.....

.....

.....

IL MIO GRUPPO DI LAVORO

	Moltissimo	Molto	Poco	Pochissimo
Abbiamo collaborato facilmente?	☐	☐	☐	☐
Mi è piaciuto lavorare con i miei compagni?	☐	☐	☐	☐

- In cosa si poteva migliorare?
 - ☐ Condividere informazioni
 - ☐ Poco tempo a casa

- ☐ Perdita di tempo
- ☐ Dimenticanze
- ☐ Divisione dei compiti
- ☐ Disordine
- ☐ Troppe discussioni
- ☐ Altro

.....

IL MIO LAVORO

- Che cos'ho fatto nel gruppo?
.....
- Cosa mi è piaciuto di quest'attività?
.....
Perché?
.....
.....
- Cosa non mi è piaciuto di quest'attività?
.....
Perché?
.....
.....

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento particolare alla Prof.ssa Claudia Lupi che con il suo entusiasmo è stata capace di trasmettermi la passione per la materia al punto di farne poi oggetto della mia tesi. Mi ha sostenuta fin dall'inizio coinvolgendomi sempre in maniera attiva nel suo gruppo di ricerca.

Un caloroso ringraziamento alla Dott.ssa Chiara Bonatelli che si è sempre resa disponibile non solo nel correggere il mio lavoro, ma soprattutto nello spiegarmi dettagliatamente le motivazioni delle rettifiche allo scopo di migliorare le mie conoscenze.

Un sincero ringraziamento al Dottor Marco Fumagalli che mi ha guidata alla scoperta dei segreti del laboratorio dove tra provette, reagenti e apparecchiature ho potuto mettere in pratica il sapere appreso durante gli anni di studio.

Uno speciale ringraziamento alla Prof.ssa Elena Savino che all'inizio del mio percorso di laurea magistrale, con la sua esperienza, è stata capace di indirizzarmi al meglio nella scelta delle materie da seguire. La sua profonda fiducia nel valore fondamentale che il ruolo dell'insegnante riveste nell'educare e avvicinare i giovani alle scienze ha reso più forte la mia convinzione nell'intraprendere questo cammino.

Un grande ringraziamento ai miei genitori che, anche se distanti, mi hanno sempre trasmesso il loro supporto gioendo delle mie vittorie e consolandomi nei momenti di sconforto. Vi voglio bene!

E infine un ringraziamento ai miei compagni di corso Adriano, Alessia, Federica e Giacomo con i quali ho condiviso i momenti di esultanza per i successi raggiunti, ma anche l'ansia e la fatica che ne hanno preceduto la preparazione. "Perché in fondo insieme siamo diventati una grande famiglia!"