

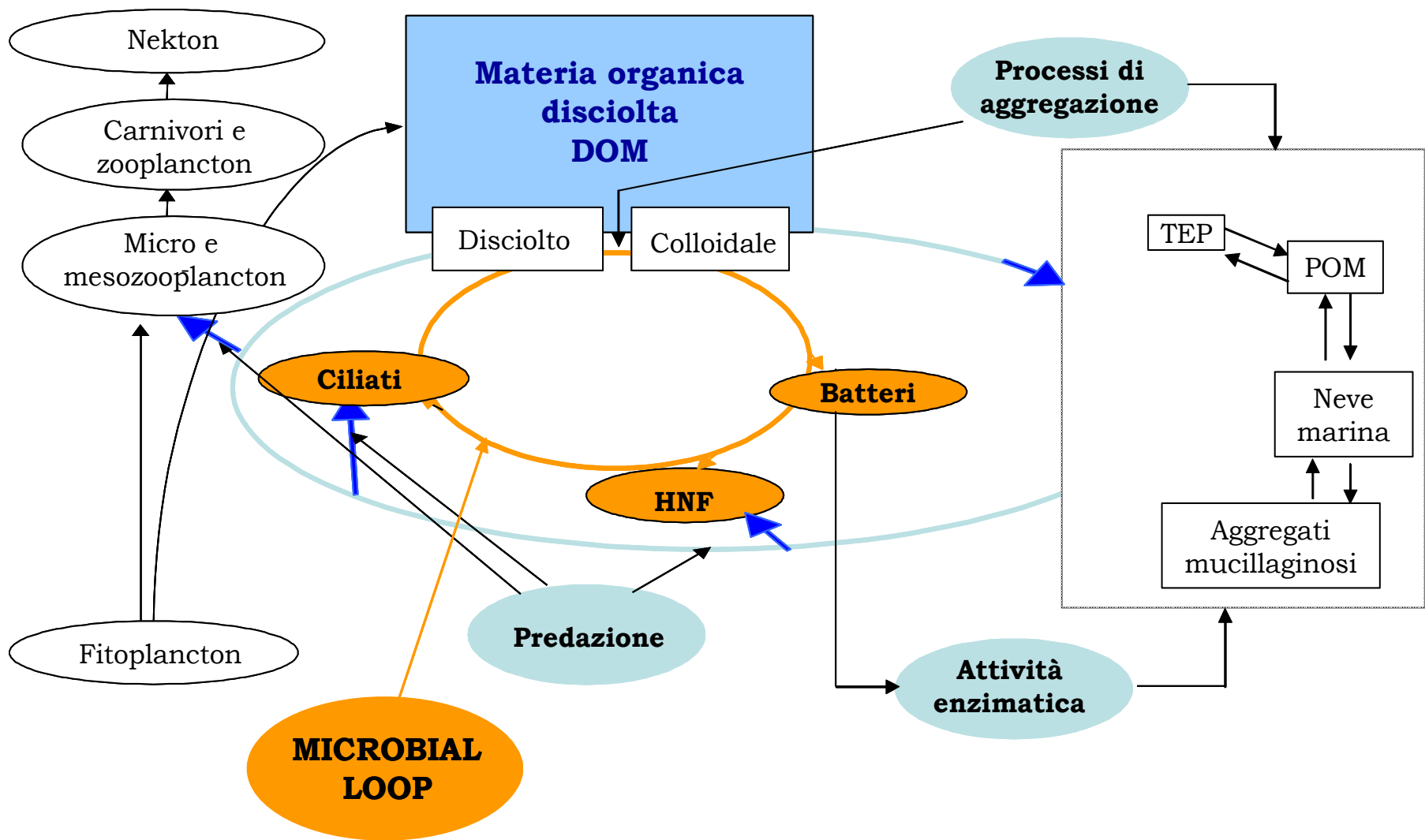
La sostanza organica marina di natura macromolecolare: ruolo ecologico e metodologie di indagine

CASO STUDIO 1:
Ricerche svolte nel periodo 2000-2015

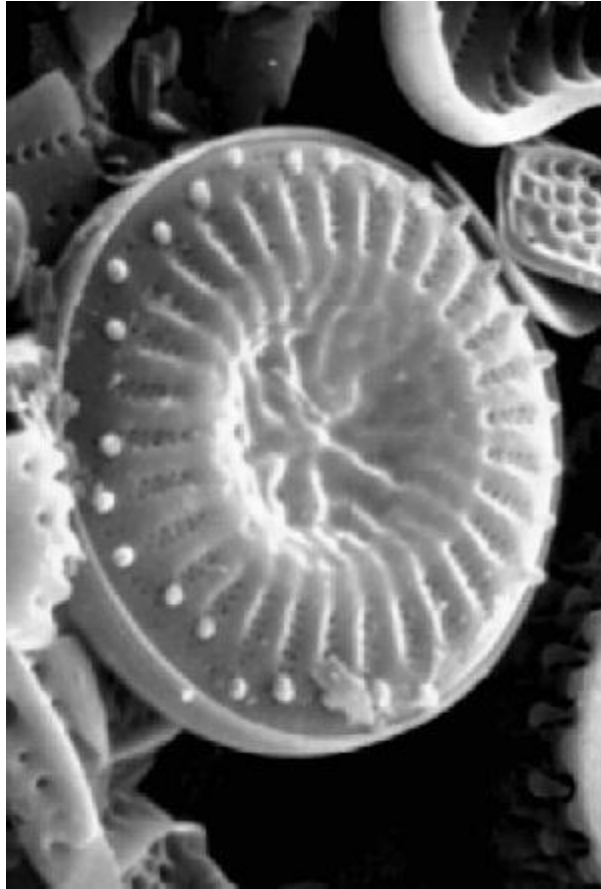
Corso di
Proprietà di Biopolimeri
a.a. 2022-2023

Prof. R. Urbani

Catena trofica pelagica

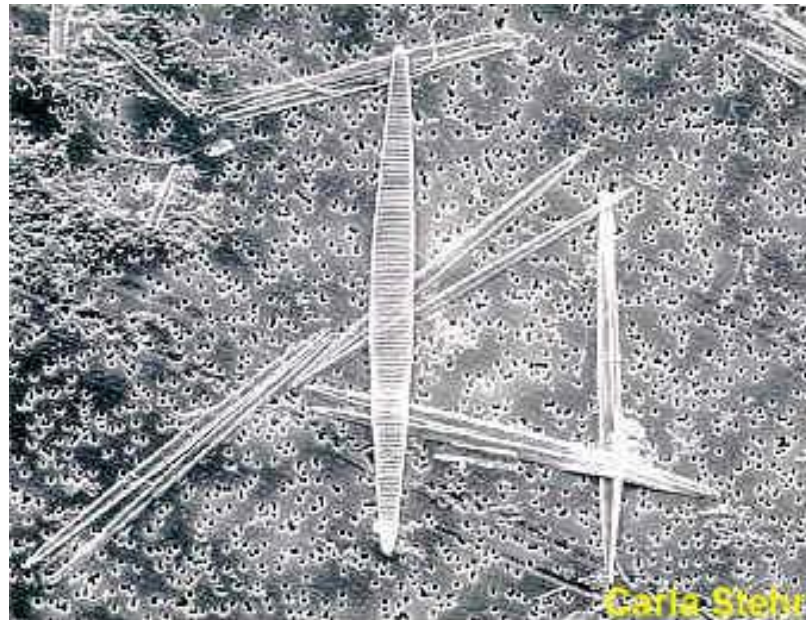
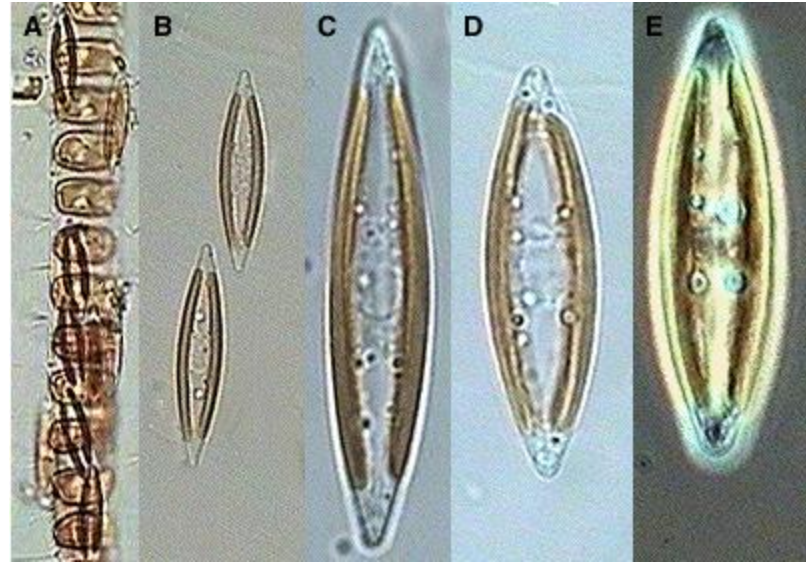


Diatomee



Coscinodiscus

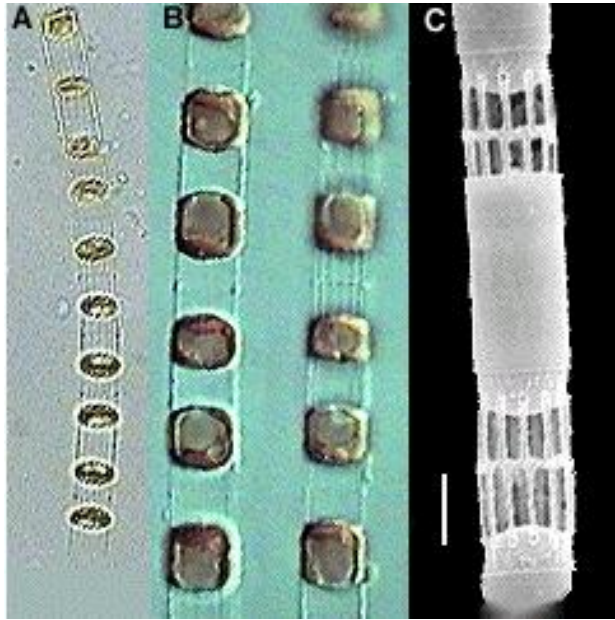
Navicula



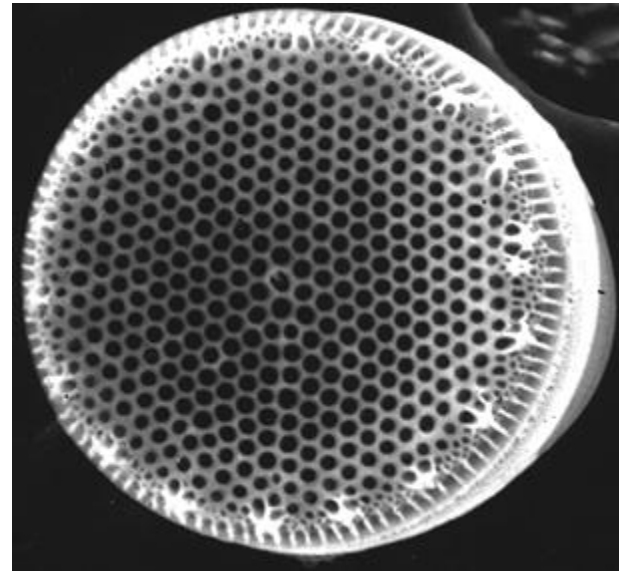
Pseudo-Nitzschia

Carla Stehr

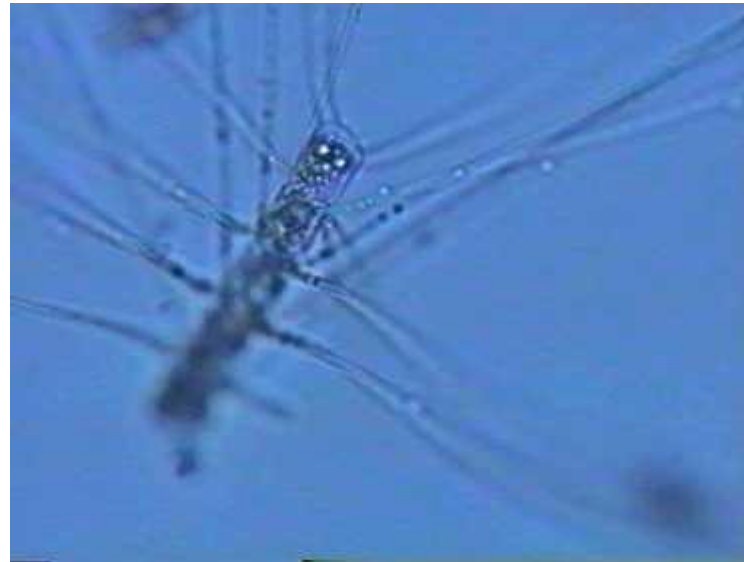
Skeletonema costatum

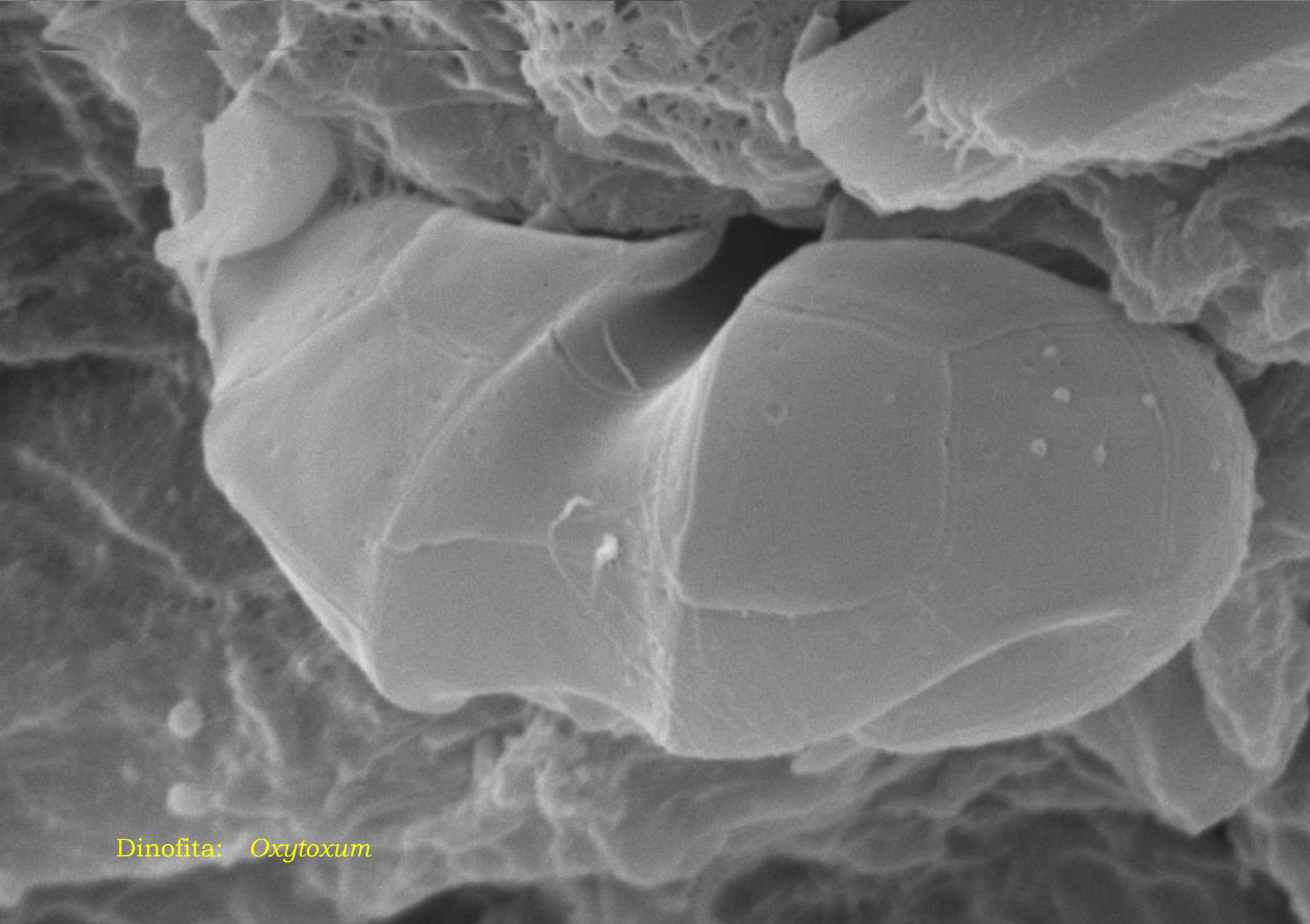


Thalassiosira



Chaetoceros





Dinofita: *Oxytoxum*

EHT=13.31 kV WD= 16 mm

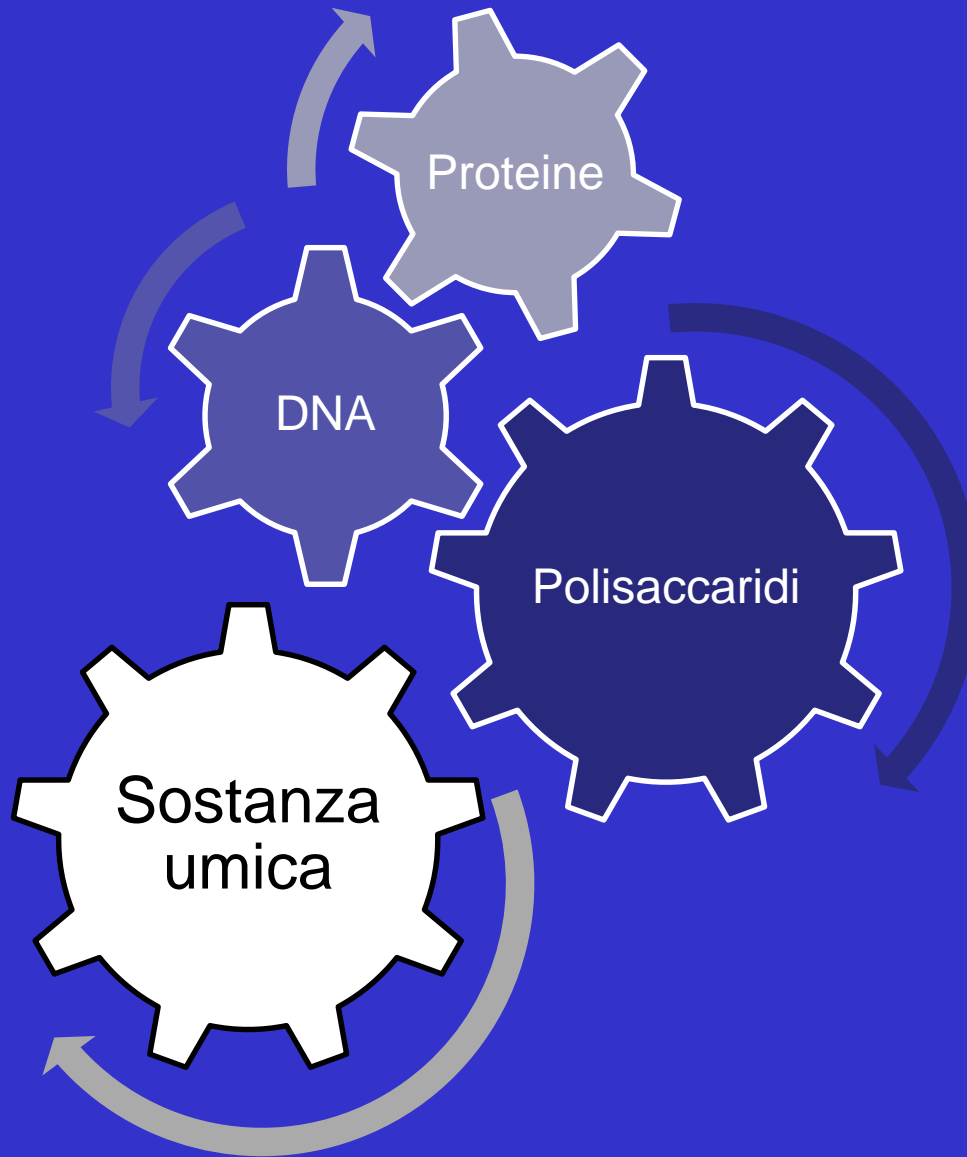
Mag= 9.98 K X Detector= SE1

1µm



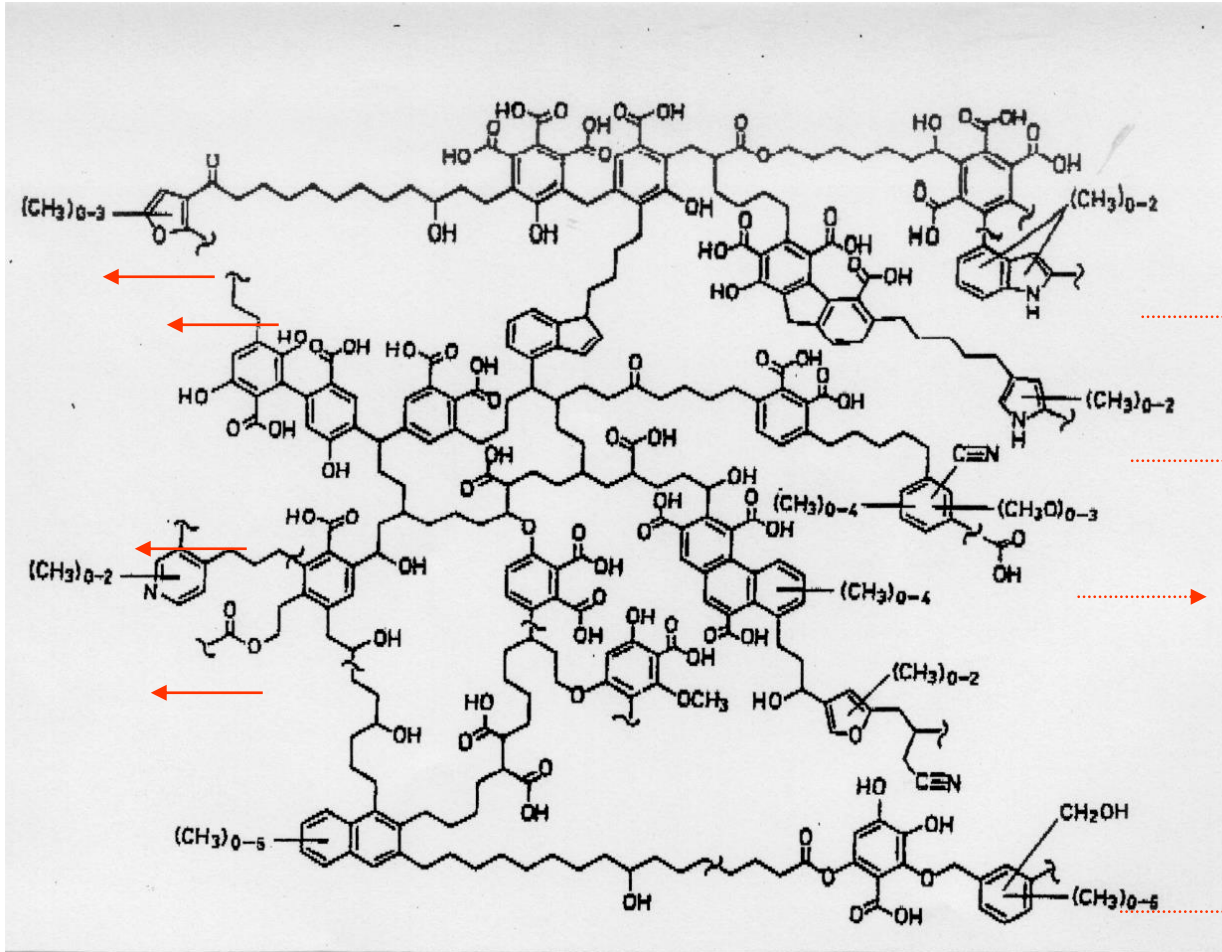
Photo No -1490

BIOPOLIMERI MARINI



Sostanza umica

- acidi fulvici: basso P.M., pochi gruppi aromatici
- acidi umici: alto P.M., più gruppi aromatici
- umina: alto PM, alto grado di reticolazione



Obiettivi della ricerca sui biopolimeri marini

1. Isolare e purificare i singoli biopolimeri;
2. determinarne la struttura primaria (composizione e concatenamento);
3. determinare le proprietà delle catene (grado di polimerizzazione \leftrightarrow PM, dimensione media \leftrightarrow raggio di girazione);
4. determinare le proprietà aggreganti/gelificanti;
5. studiare la stabilità dei biopolimeri rispetto alla degradazione enzimatica (biodegradazione);
6. individuare la relazione tra proprietà chimiche e funzione biologica (fisiologica, biochimica, ecologica, etc.);
7. individuare i marcatori biologici (biomarkers) relativi alle singole specie produttrici.
8. studiare la variazione stagionale mediante monitoraggio mensile dei composti macromolacolari su scala di bacino.

Funzione *biologica* degli EPS

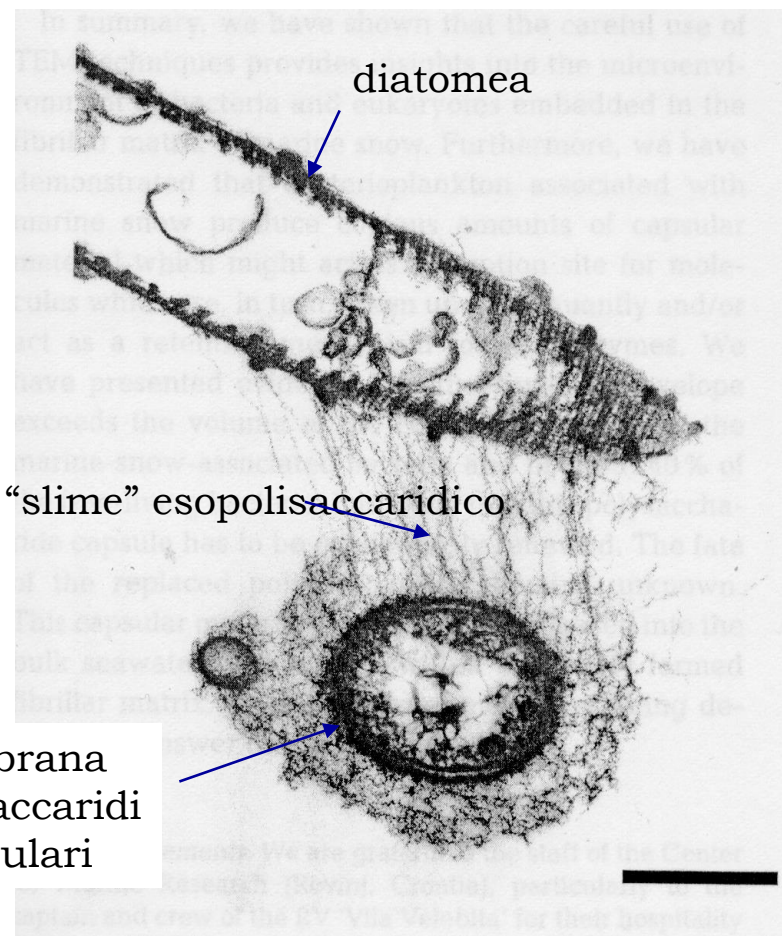
1. sistema tampone contro le variazioni chimiche e biologiche del microambiente (tossine, agenti virali e batterici, inquinamento da metalli pesanti, ecc.);

2. azione sequestrante e di concentrazione dei nutrienti;

3. azione adesiva alle superfici;

4. movimento e mantenimento delle relazioni simbiotiche;

5. protezione contro la predazione e l'azione di enzimi digestivi;



Funzione *ecologica* degli EPS

1. La maggior parte del carbonio organico nei mari e negli oceani è presente come materia organica in forma disciolta (DOM), in forma colloidale (COC) o come particolato organico (POM).

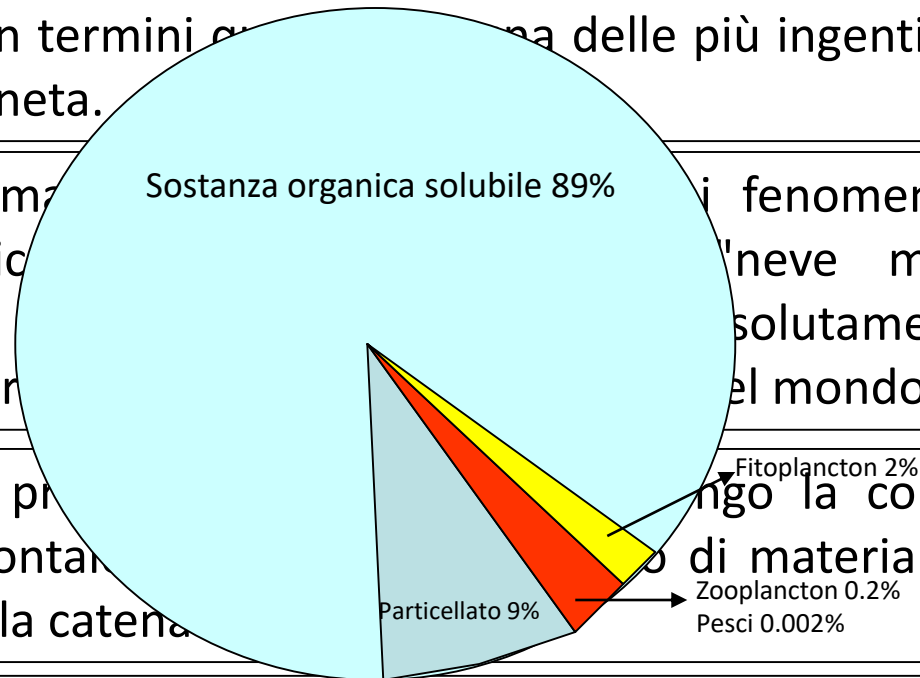
2. Il COC contenuto in particelle sospese di dimensioni comprese tra 1 e 1000 nm costituisce in termini quantitativi una delle più ingenti riserve di carbonio organico del pianeta.

3. Il prodotto maggiore dei fenomeni aggregativi della materia organica è la "neve marina" di origine fitoplanctonica, assolutamente naturale ed indispensabile per la vita nel mondo.

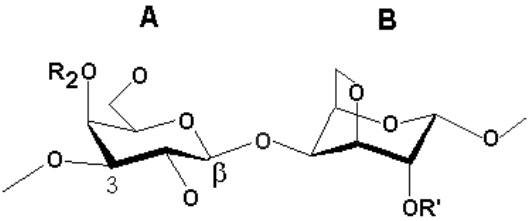
4. Attraverso i processi di diffusione orizzontale e verticale, la disponibilità nella catena alimentare è influenzata dal movimento di materia verso il fondo e la risalita.

5. Nella forma macroscopica, costituiscono la riserva alimentare per molti animali.

6. Fungono da adsorbenti della materia organica disciolta (DOM) e come tali da veicolo del DOM fino ai più alti livelli trofici.



Struttura primaria



(Carrageenans)

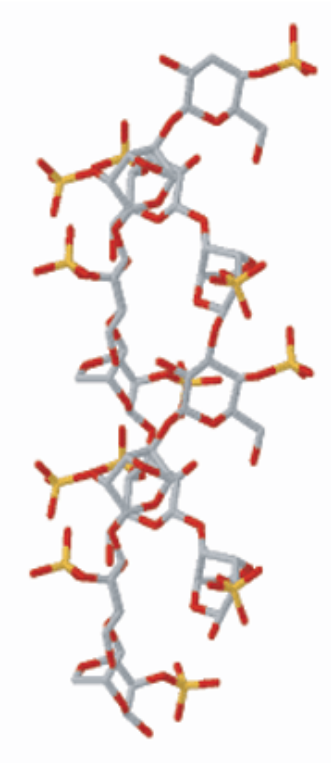
- λ R' = R₂ = SO₃⁻
- κ R' = H R₂ = SO₃⁻
- β R' = R₂ = H

In λ, the A unit is D-Gal (---- 2-sulphate), the B unit is D-Gal-2,6-bisulphate.

Degradazione batterica

Relazione struttura/ "destino"

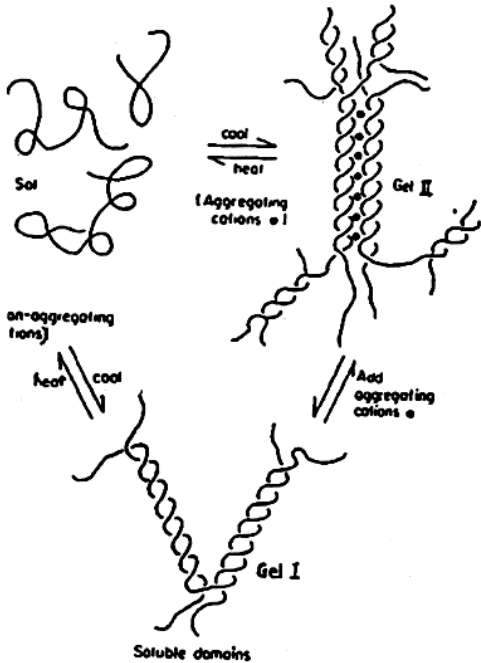
Struttura secondaria



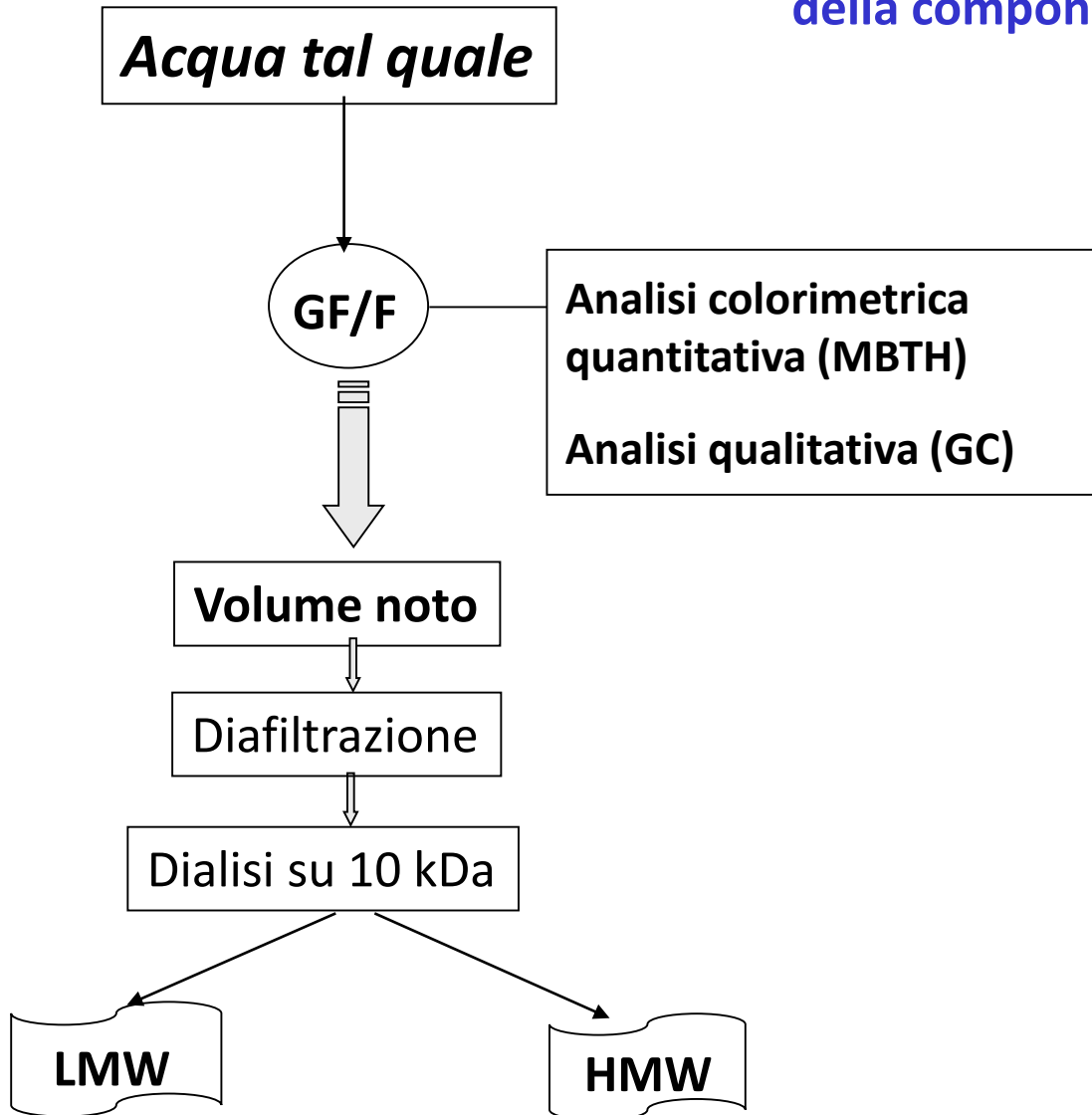
Polisaccaridi

Polisaccaridi amorfi e GEL

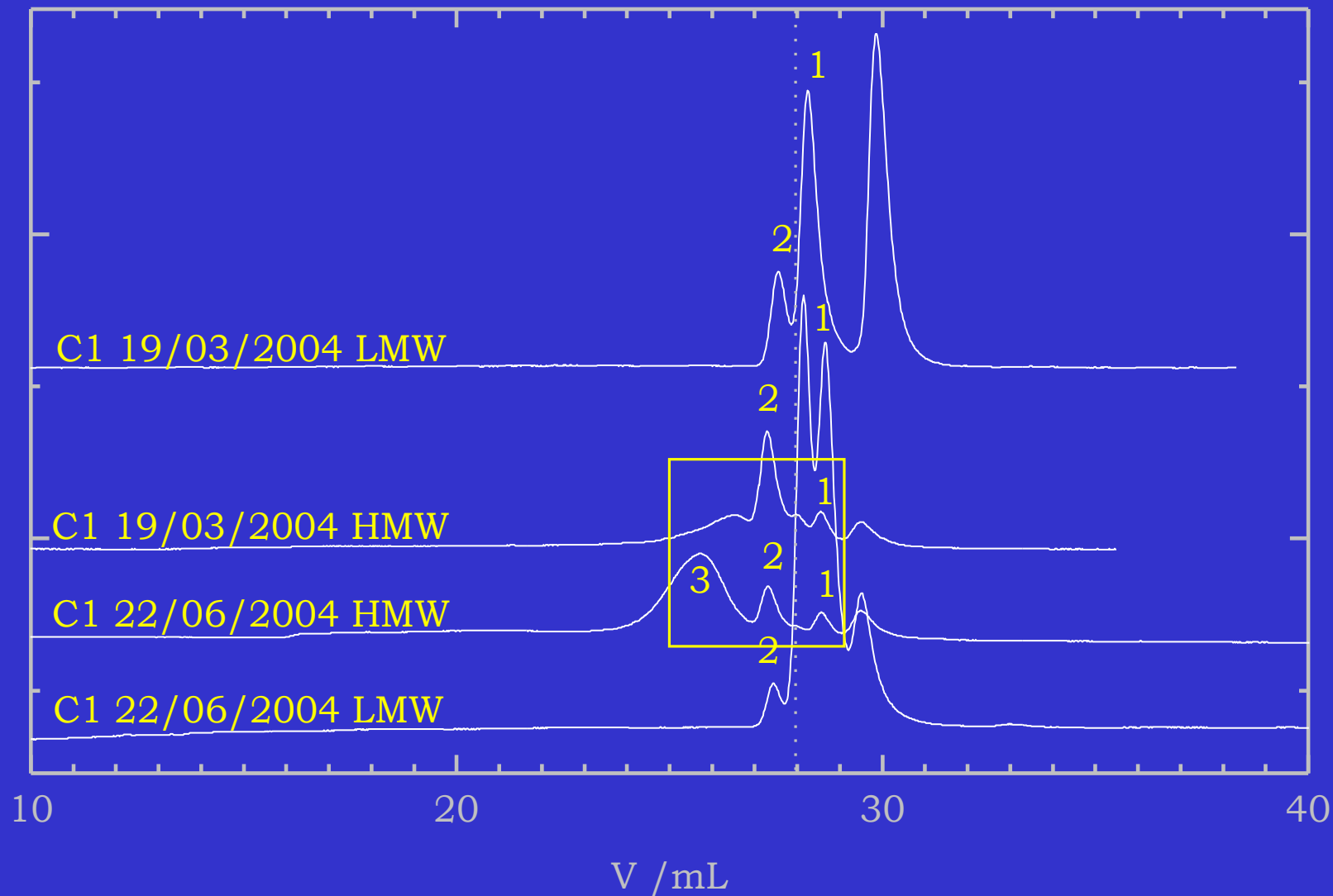
Aggregazione



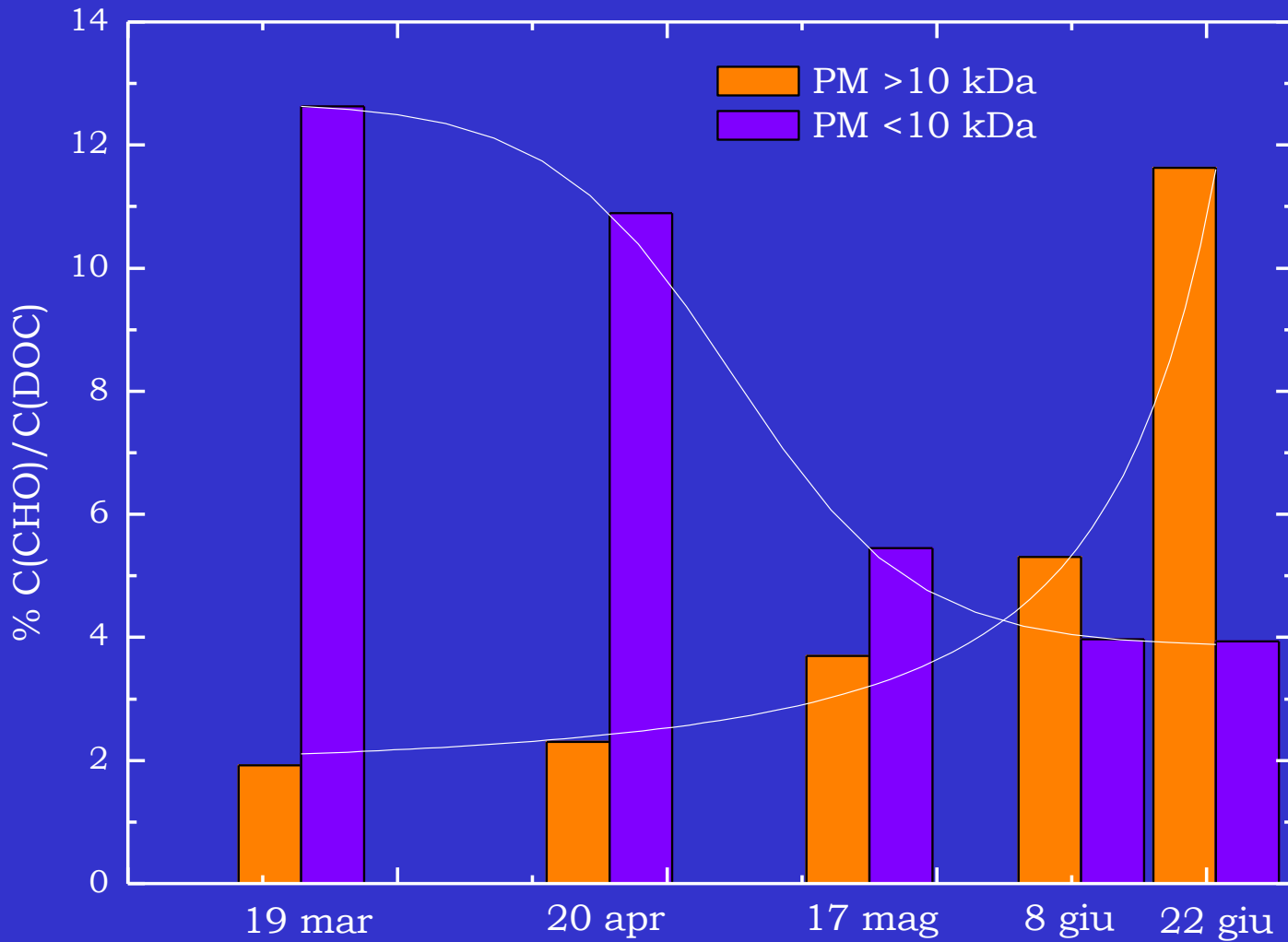
Partizione ed analisi della componente saccaridica del DOC



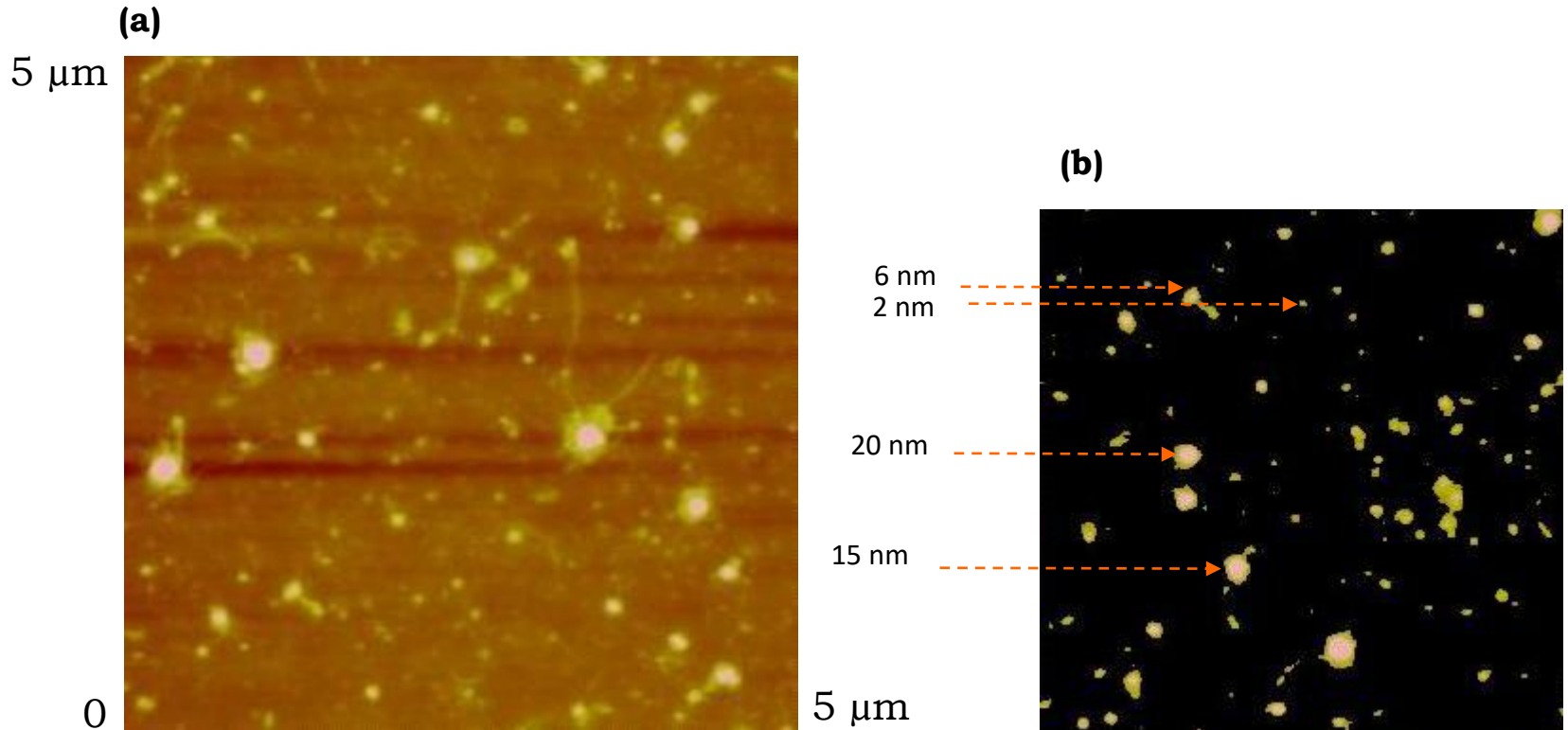
Distribuzione dei pesi molecolari dei campioni HMW e LMW ottenuti per cromatografia HPSEC.



Concentrazioni percentuali di HMW-DCHO e LMW-DCHO nel DOC in funzione del tempo di campionamento.

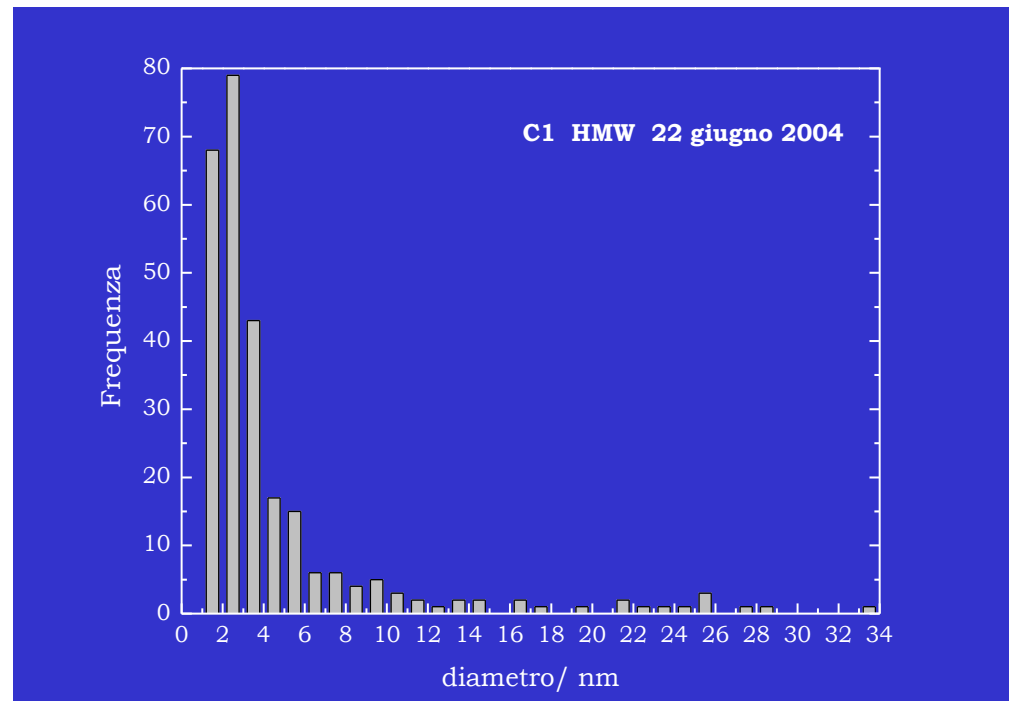
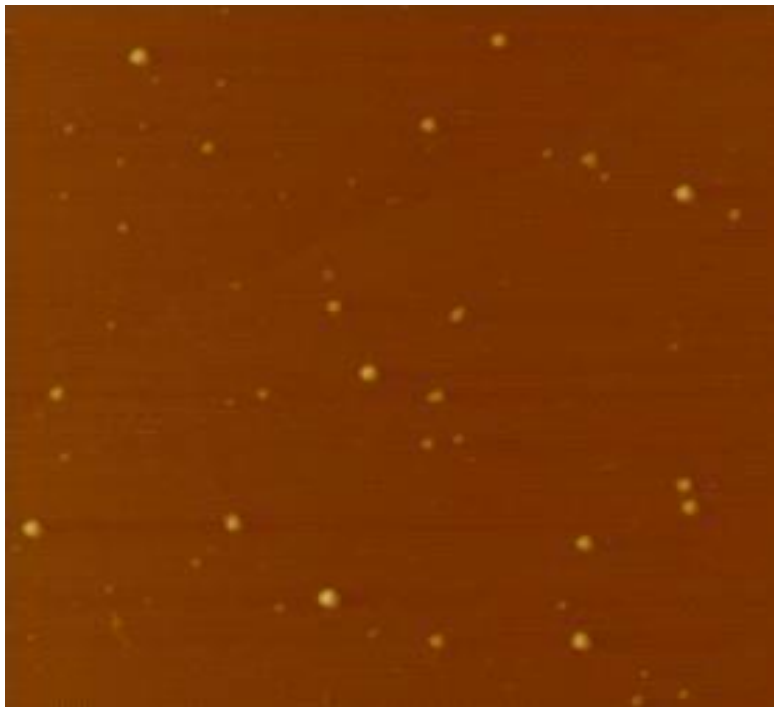


AFM



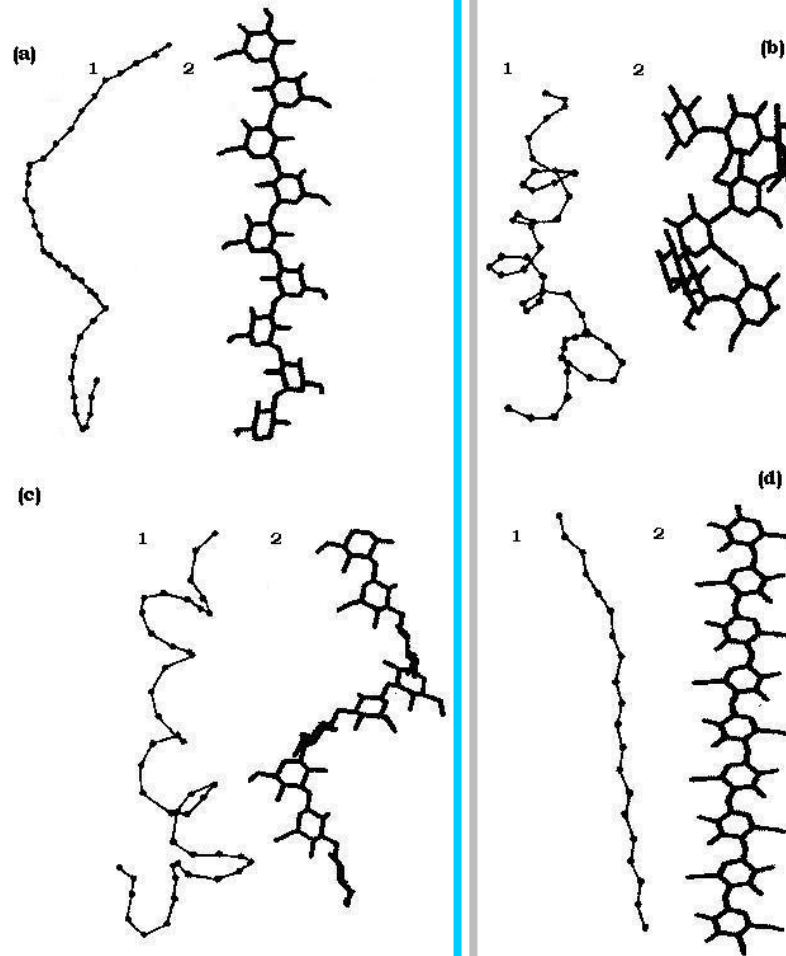
(a) Immagine AFM di una soluzione del campione HMW-DOC del 22 giugno 2004 in DMSO.

(b) Ingrandimento di un'area e rielaborazione dell'immagine per la valutazione delle dimensioni del particellato.



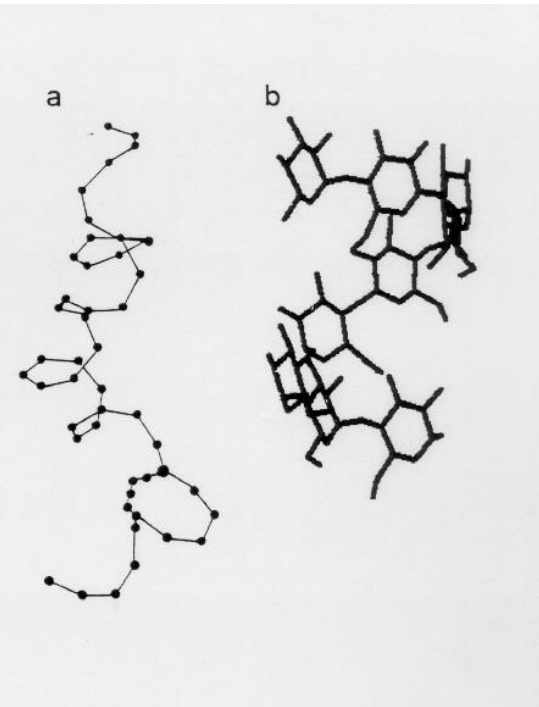
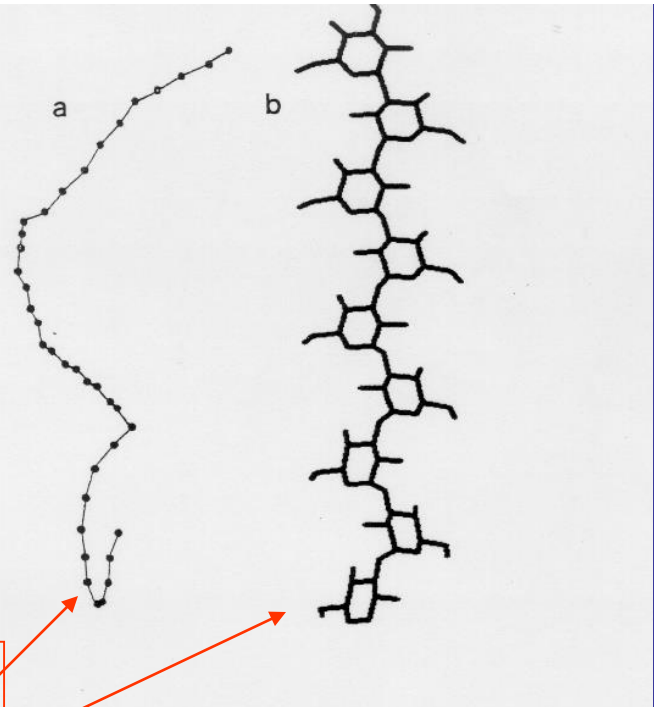
Distribuzione dei diametri delle particelle per il campione HMW-DOC del 22 giugno 2004.

Immagine AFM di una soluzione del campione LMW-DOC del 22 giugno 2004 in DMSO.



Conformazioni di catene polisaccaridiche del glucosio (glucani) con diversa concatenazione e configurazione del carbonio anomerico (1) in soluzione ed (2) allo stato solido. (a) α -D-(1,3)-glucano (b) α -D-(1,4)-glucano (c) β -D-(1,3)-glucano (d) β -D-(1,4)-glucano (Urbani et al., 2001).

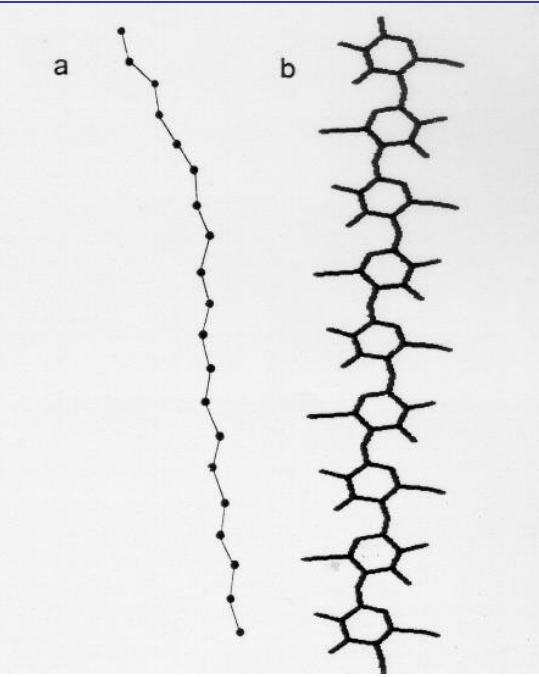
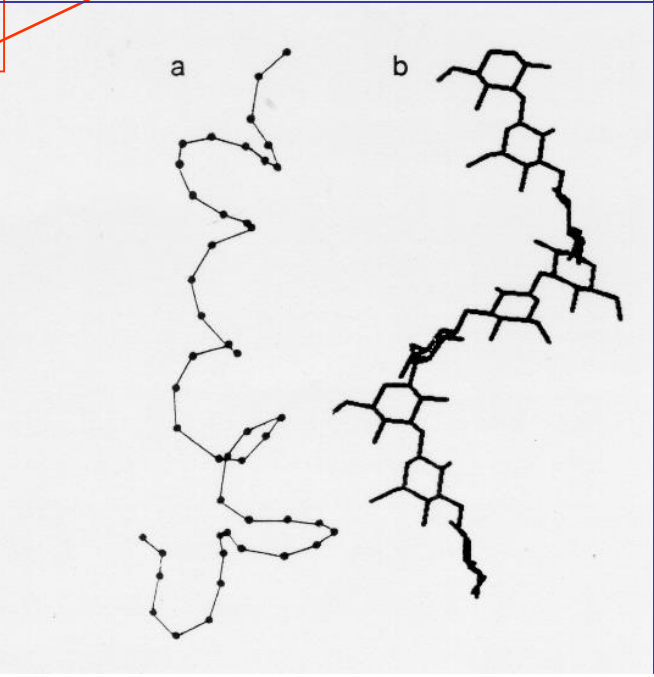
poli[β -(1-4)-glc]



poli[α -(1-4)-glc]

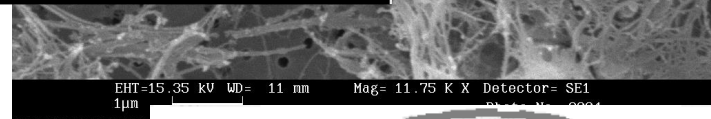
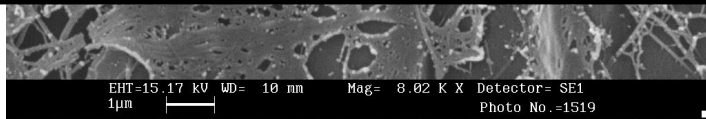
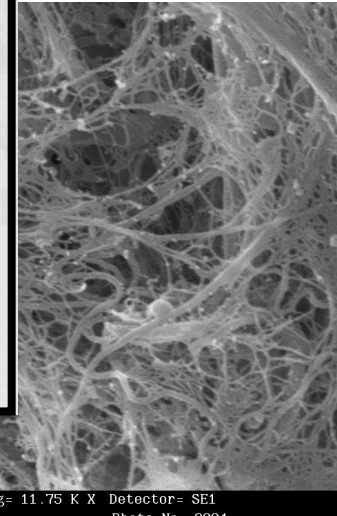
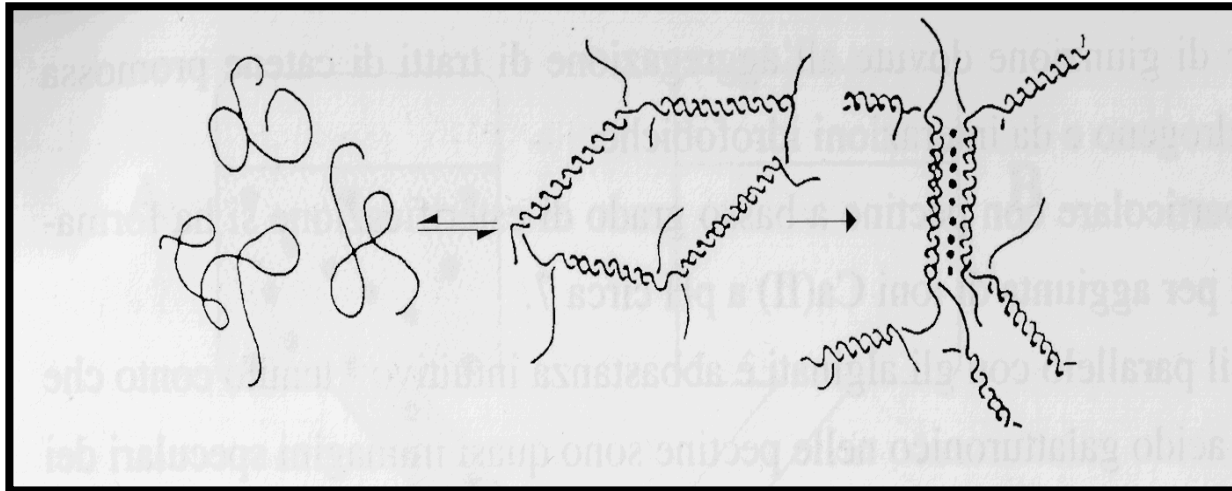
a: *soluzione*
b: *stato solido*

poli[β (1-3)-glc]

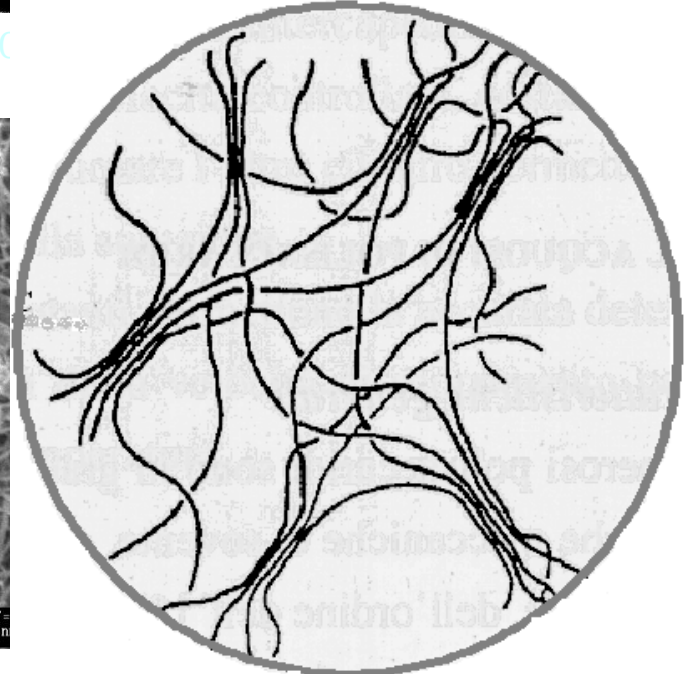
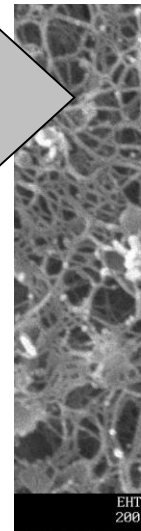
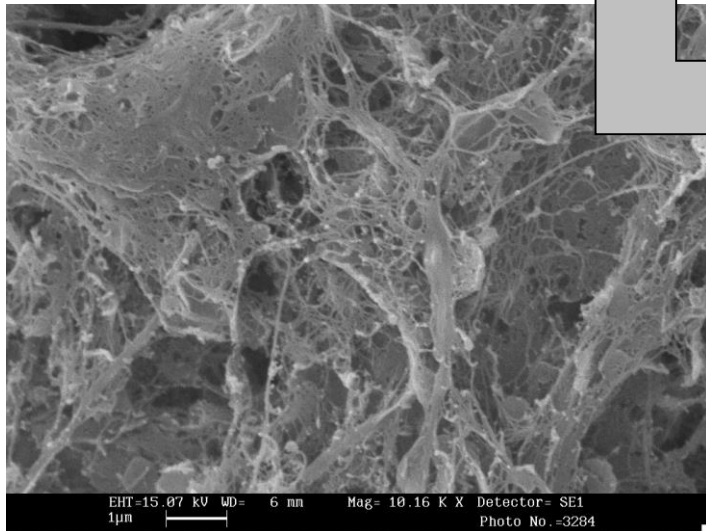


poli[α -(1-3)-glc]

Microscopia elettronica a scansione



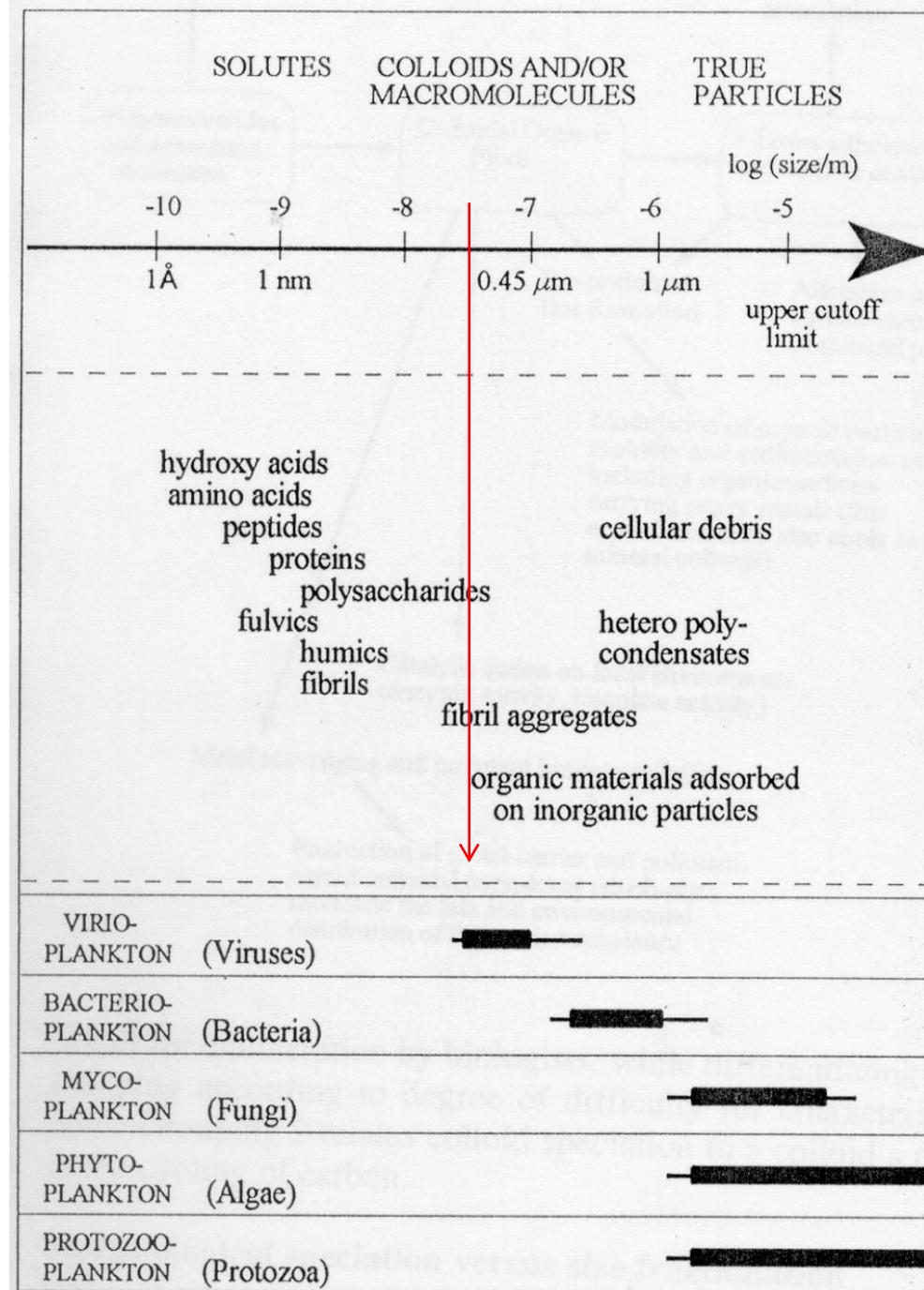
Campioni di mucillagine nativa (Urbani e Sist, 2003)



Soluzioni concentrate di polisaccaridi purificati da mucillagine (Urbani e Sist, 2003)

Sostanza organica macromolecolare nel mare e classi dimensionali

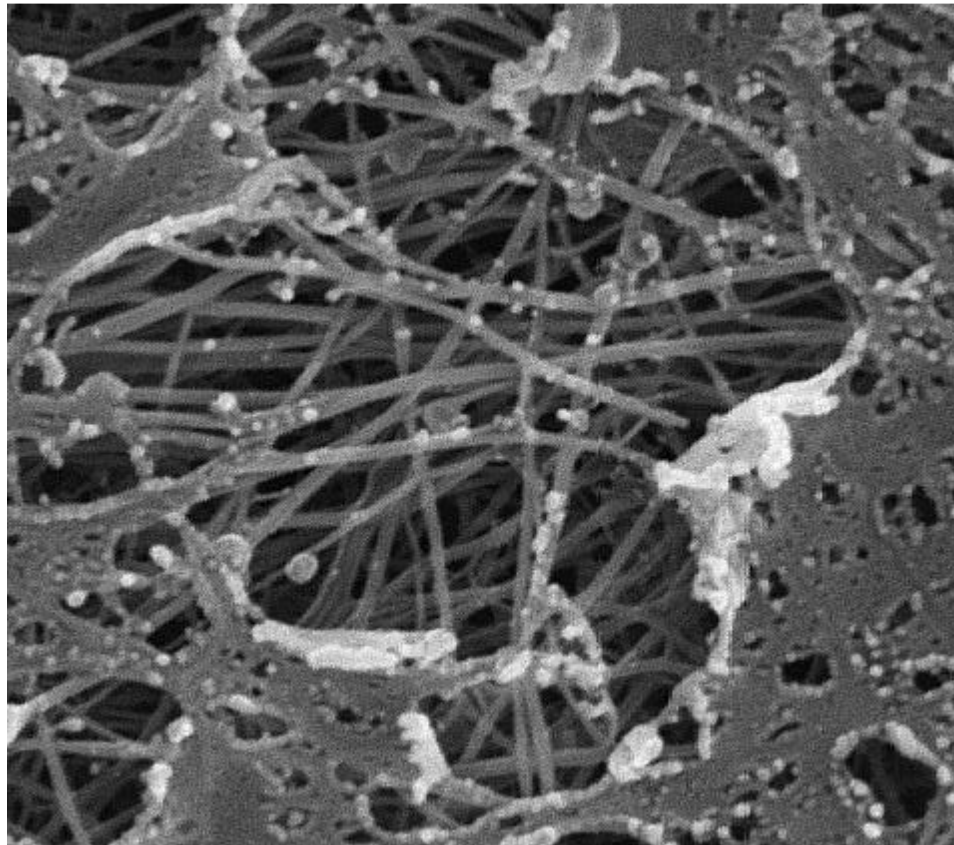
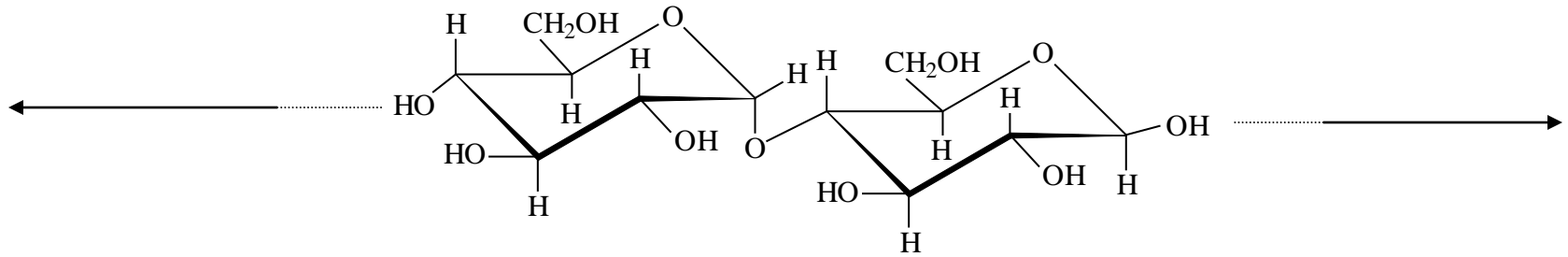
- Polisaccaridi ed oligosaccaridi
- Sostanza umica
- Proteine e peptidi
- Acidi nucleici



Suddivisione dei biopolimeri marini in base alle loro caratteristiche macromolecolari

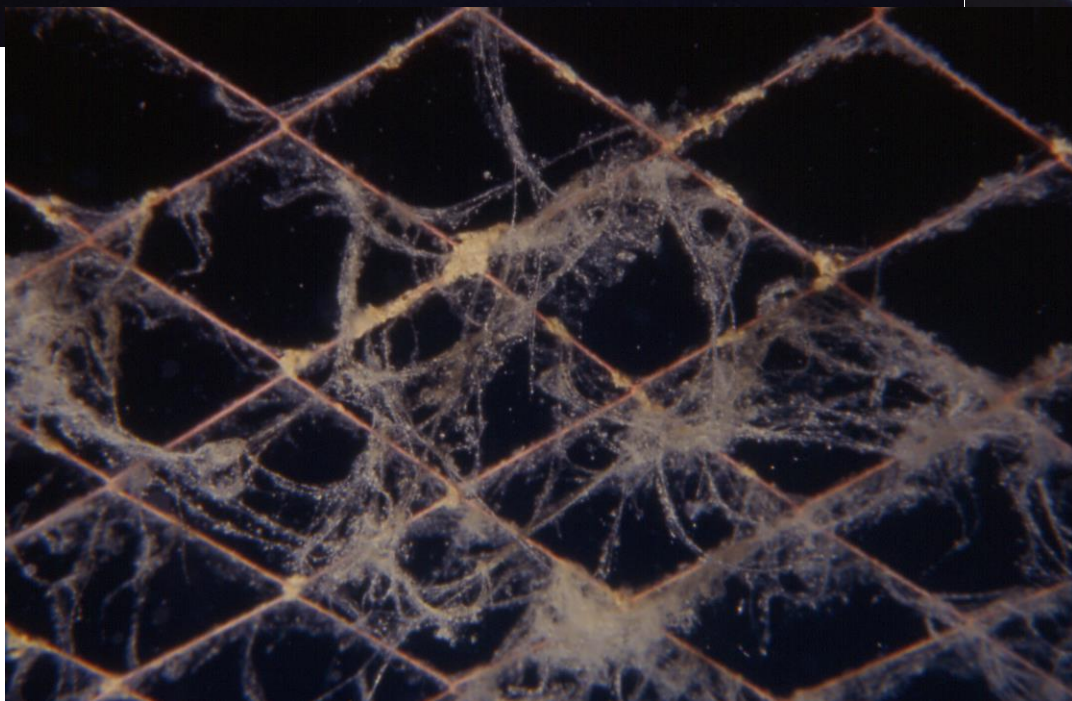
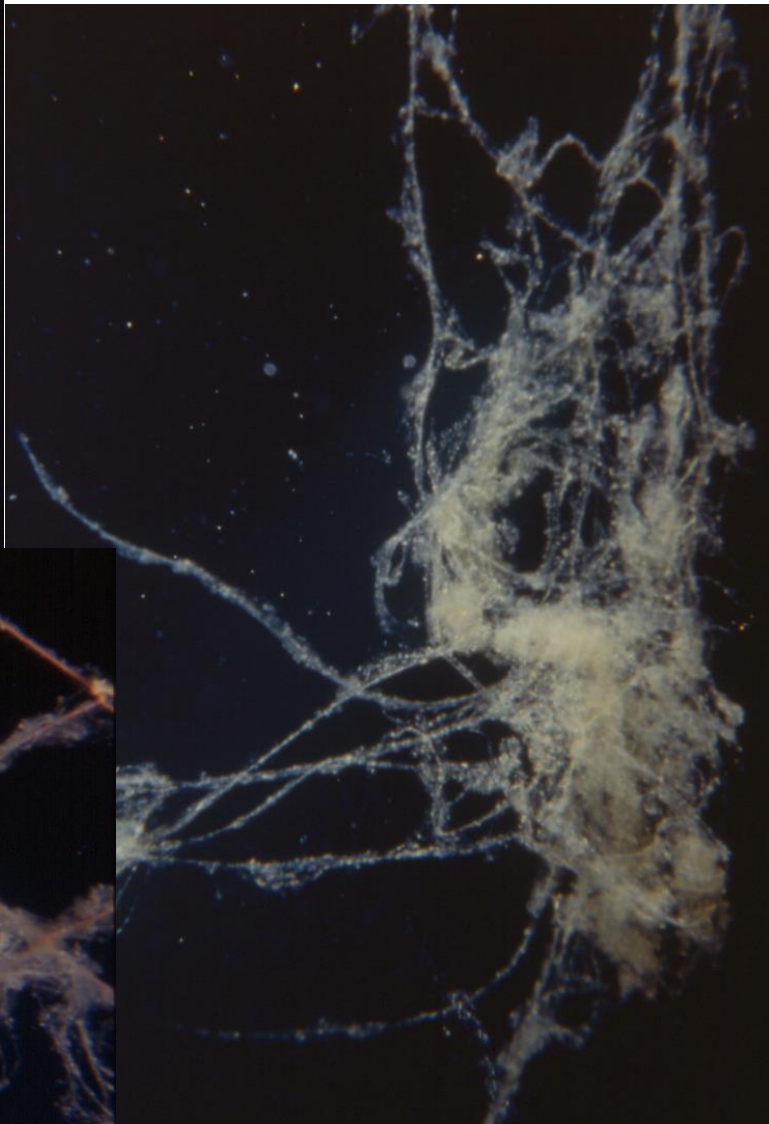
	Natura Origine	Massa molec. (dalton)	Dimensioni (nm)	Struttura supramolecolare	Tempo di vita medio	% della sostanza organica
Biopolimeri RIGIDI	<ul style="list-style-type: none"> - mucopolisaccaridi - peptidoglicani - cellulose - composti pectici (parete cellulare microbica e prodotti extracellulari) - Acidi nucleici 	$10^4 - 10^6$	100 – 1000	<ul style="list-style-type: none"> - struttura fibrillare basata su doppie o triple eliche - struttura a rete tridimensionale (gel) 	<ul style="list-style-type: none"> - sulla superficie: mesi - in profondità: 100 anni-secoli ore - giorni 	10-30
Biopolimeri FLESSIBILI	materiale refrattario (prodotti di ricombinazione di amminoacidi, zuccheri rilasciati dal plancton)	$500 - 10^5$	----	<ul style="list-style-type: none"> - struttura flessibile, disordinata, più o meno estesa 	10 – 7000 anni	fino a 90
	<ul style="list-style-type: none"> - polisaccaridi di riserva (endocellulari) - composti proteici (endocellulari) 			<ul style="list-style-type: none"> - struttura flessibile - struttura globulare 	ore - giorni	
Sostanze umiche	(di derivazione terrestre-fluviale)	500 - 5000	0.5 - 2	<ul style="list-style-type: none"> - struttura globulare 	ca. 500 anni nel suolo	<ul style="list-style-type: none"> - 40-80 laghi - tracce in mare aperto

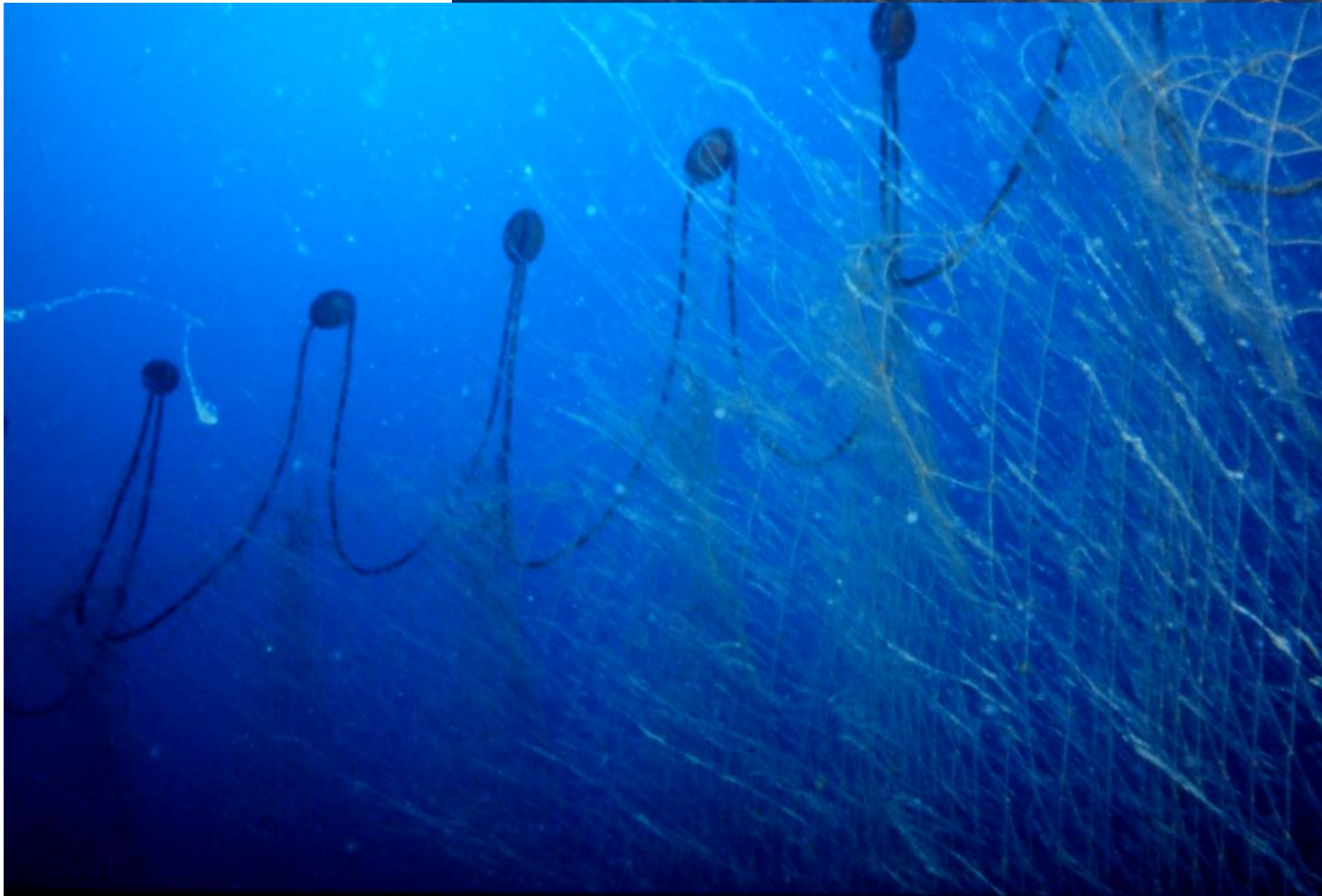
Catene saccaridiche



Neve marina







Ragnatele

Golfo di Trieste - mucillagini in sospensione



Nastri



An underwater photograph showing a diver in silhouette on the left, holding a large, billowing white cloud of mucus. The water is a deep blue-green color, and the scene is dimly lit. The diver is wearing a full scuba suit and fins. The white cloud is the central focus, appearing as a thick, suspended mass. The overall atmosphere is somber and highlights environmental pollution.

Nubi

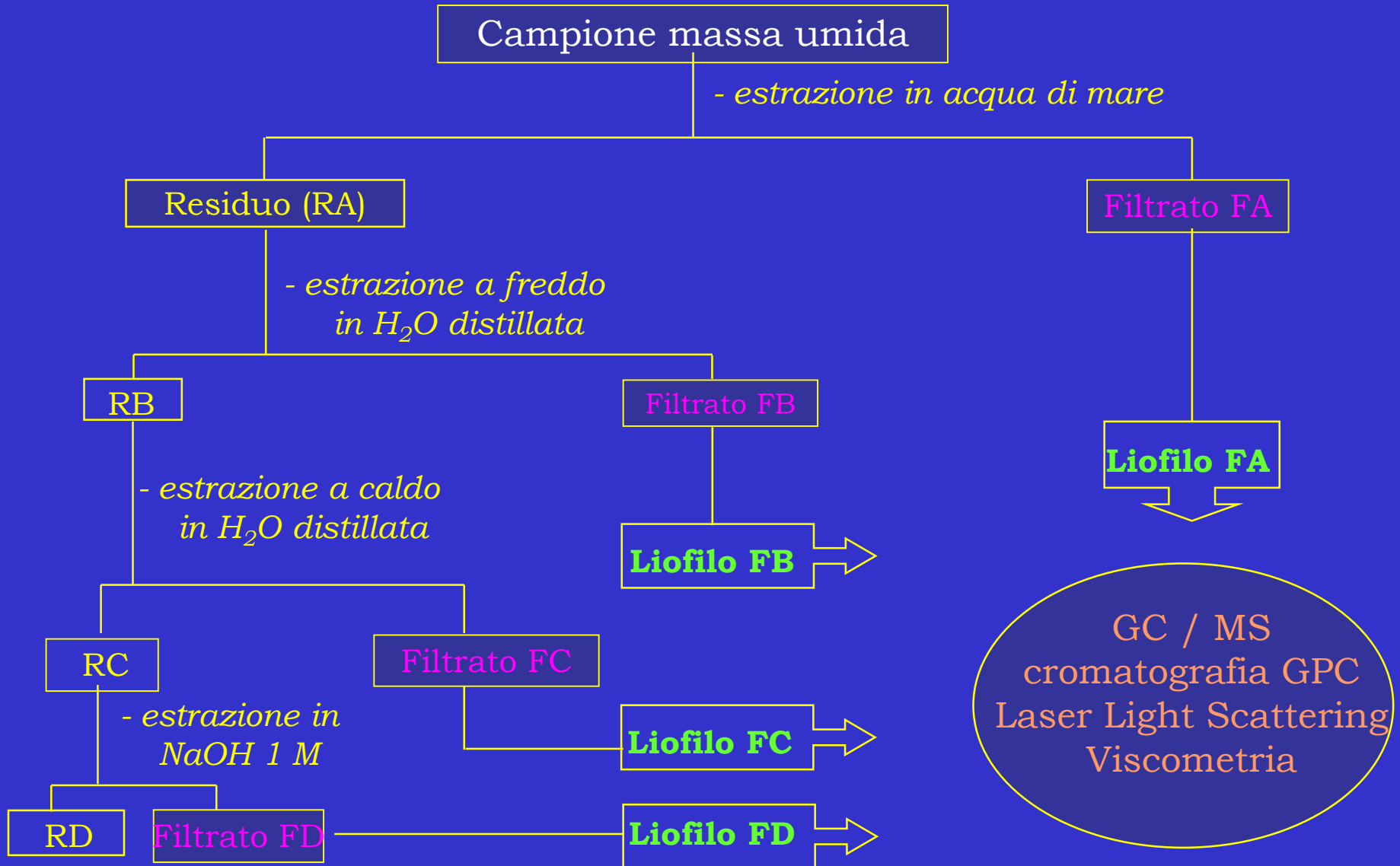
Golfo di Trieste - mucillagini in sospensione



Strati cremosi superficiali



Isolamento e purificazione dei polisaccaridi da mucillagini

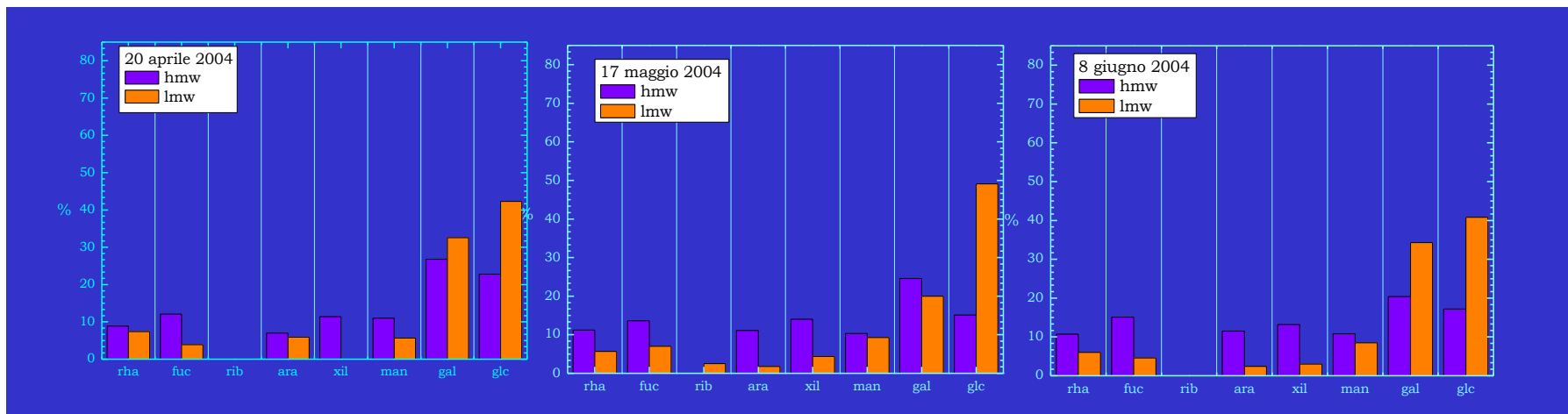


Determinazione della struttura primaria (composizione e concatenamento)

Analisi gascromatografica degli idrolizzati acidi dei polisaccaridi per determinare la composizione relativa dei vari monosaccaridi;

Analisi di metilazione per determinare i carboni implicati nel concatenamento

Analisi NMR per la definizione della chiralità nel legame anomeroico



Composizione monosaccaridica (GC-FID)

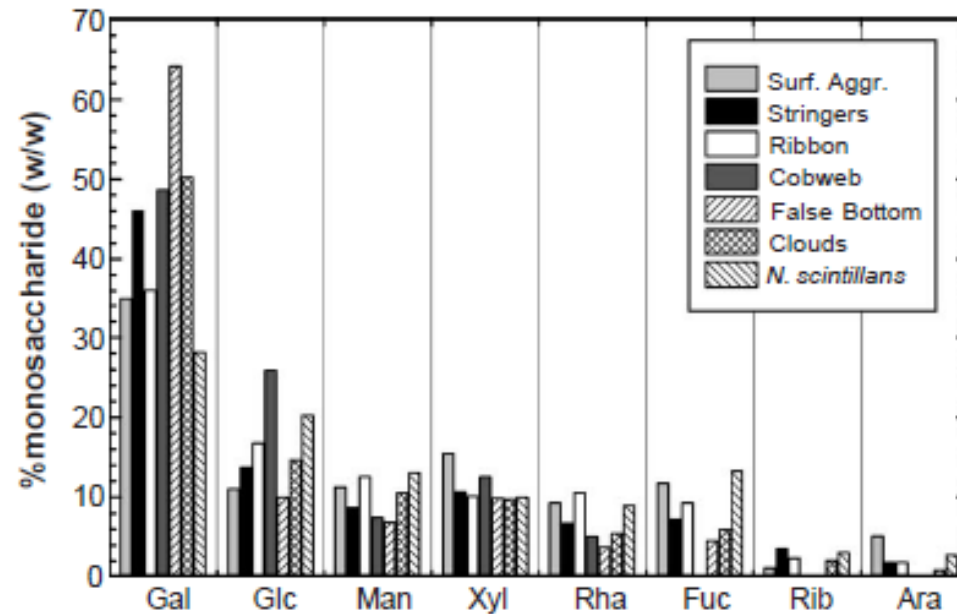


Fig. 8. Average monosaccharide composition (% w/w) of the sugar fraction of different aggregate typologies. Abbreviations: Gal, galactose; Glc, glucose; Man, mannose; Rha, rhamnose; Fuc, fucose; Rib, ribose; Ara, arabinose.

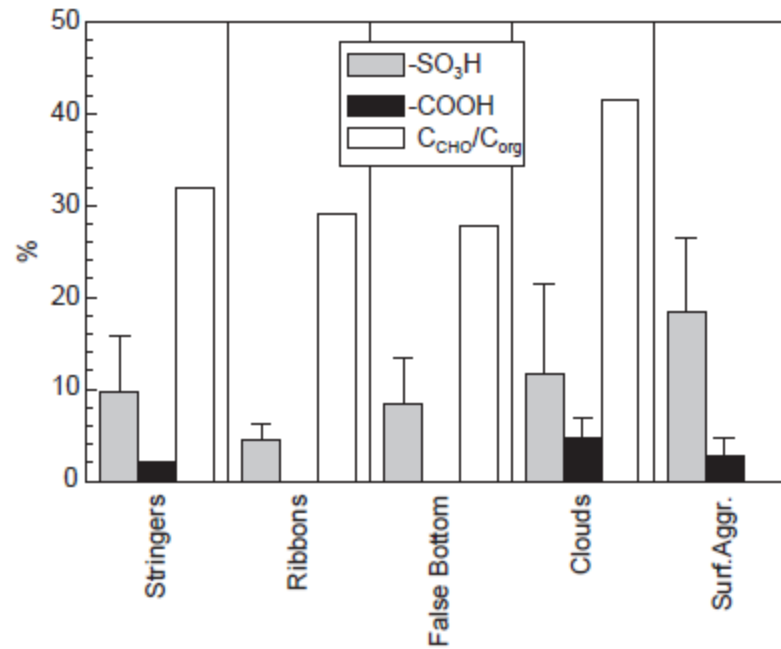
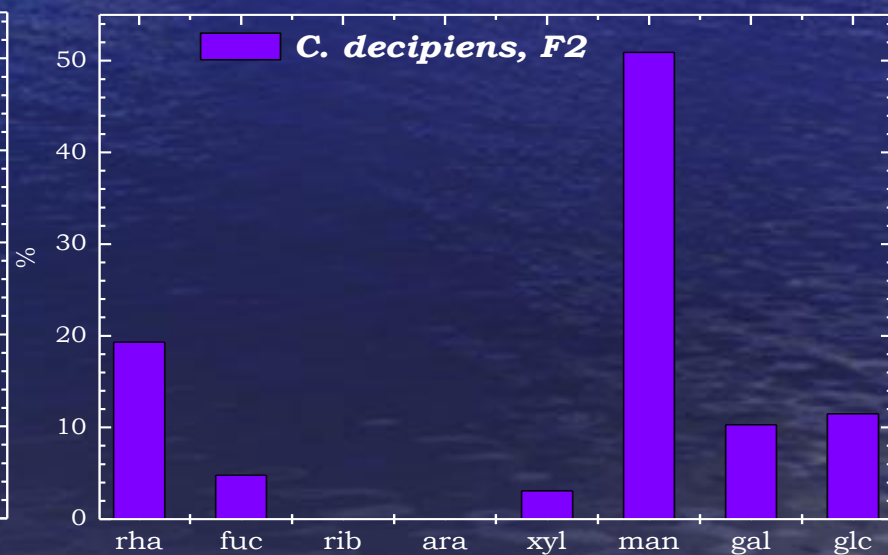
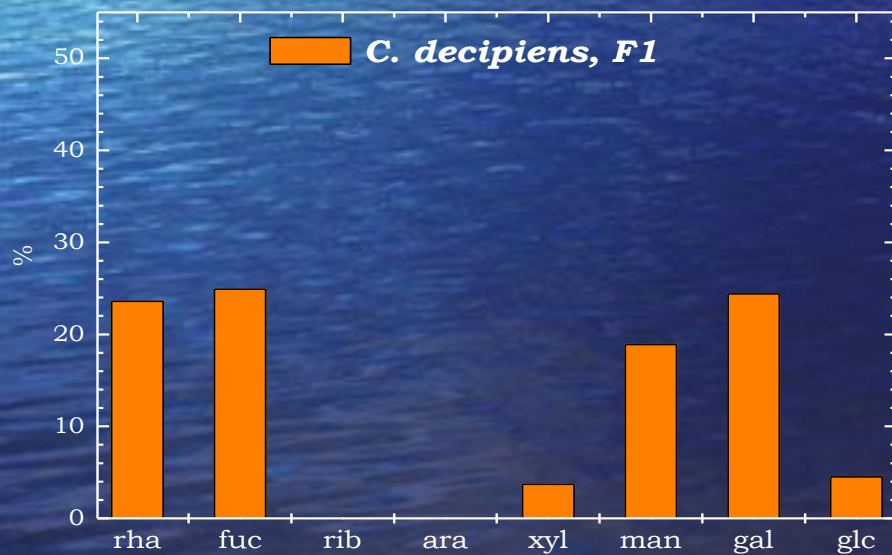
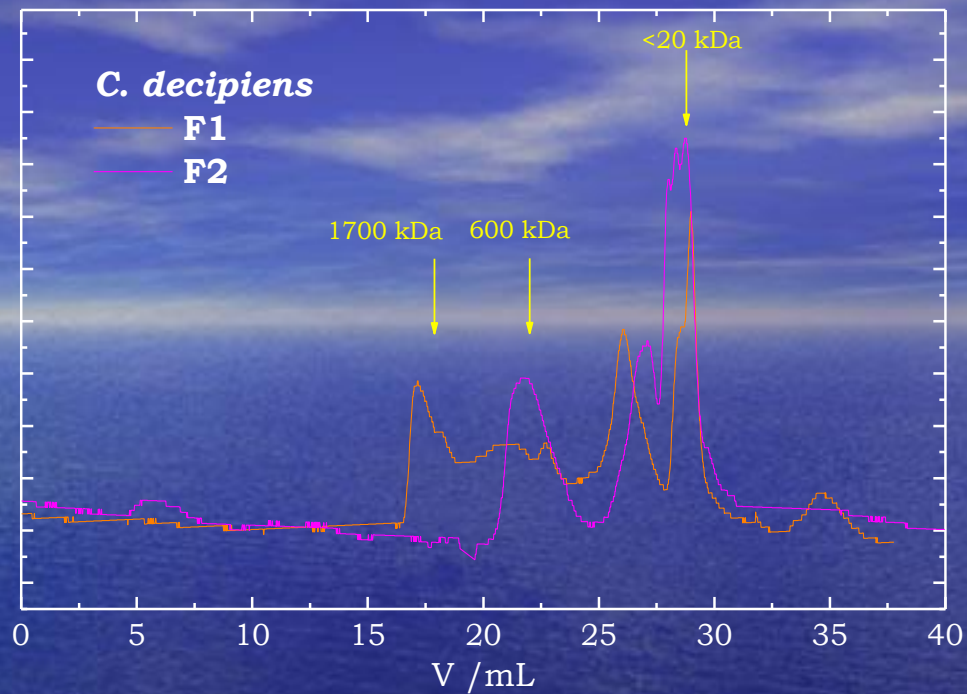


Fig. 7. The C_{CHO}/C_{org} ratio (% w/w), the sulphate ($-SO_3H$) and uronic acid ($-COOH$) contents (% mol/mol of monosaccharide residues) for different mucilage typologies.



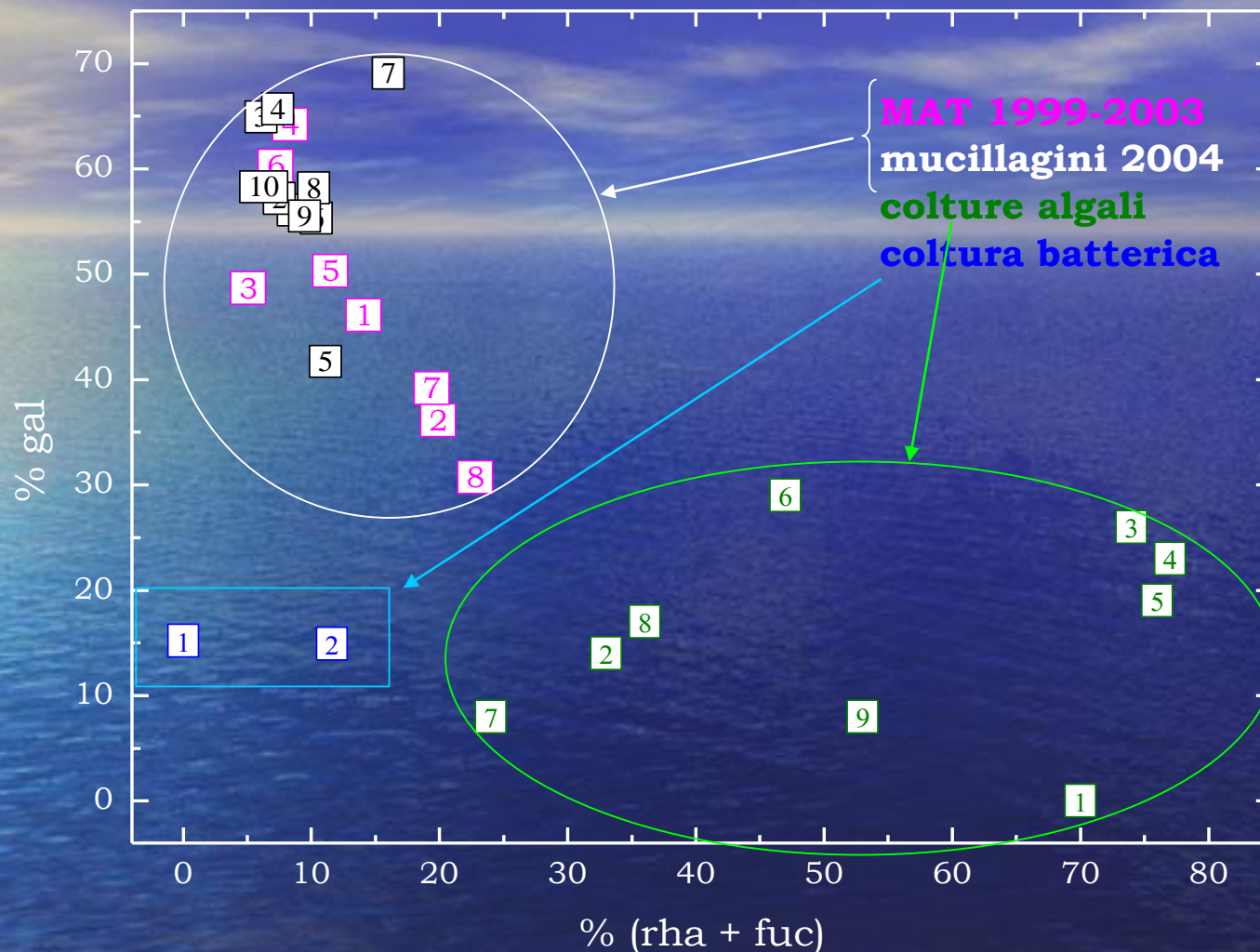
Catene polielettrolitiche !

Frazionamento
dell'esopolisaccaride
disciolto
da coltura axenica



Rapporti molari dei monosaccaridi componenti F1 ed F2

	Rha	Fuc	Xil	Man	Gal	Glc
<i>Chaetoceros decipiens</i> F1	7	7	1	4	5	1
<i>Chaetoceros decipiens</i> F2	7	2	1	14	3	3
<i>Chaetoceros decipiens</i> (Myklestad, 1995)	7	7	0.5	1	3	0.5



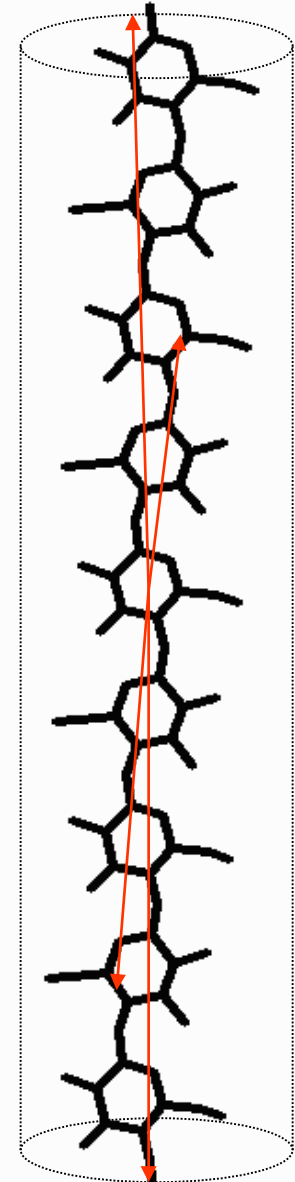
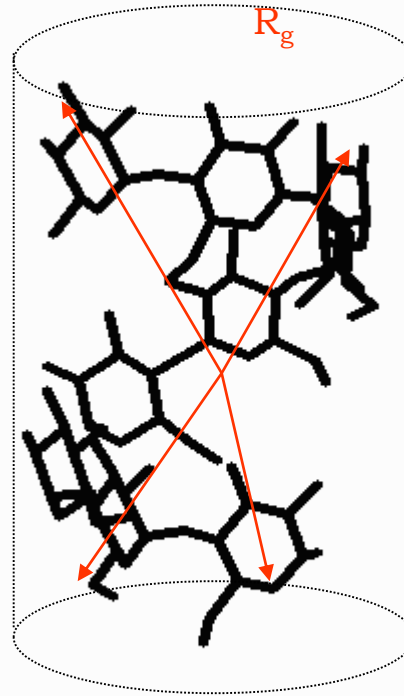
Correlazione tra le percentuali di **galattosio** e la somma (**fuc+rha**) in campioni mucillaginosi adriatici ed in esopolisaccaridi prodotti da colture axeniche algali e batteriche (dati da letteratura).

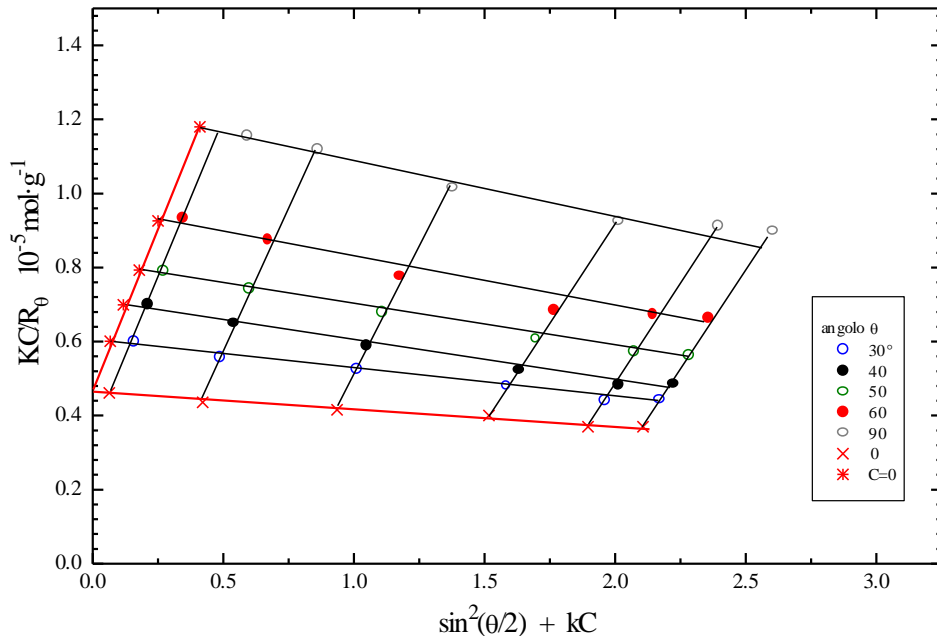
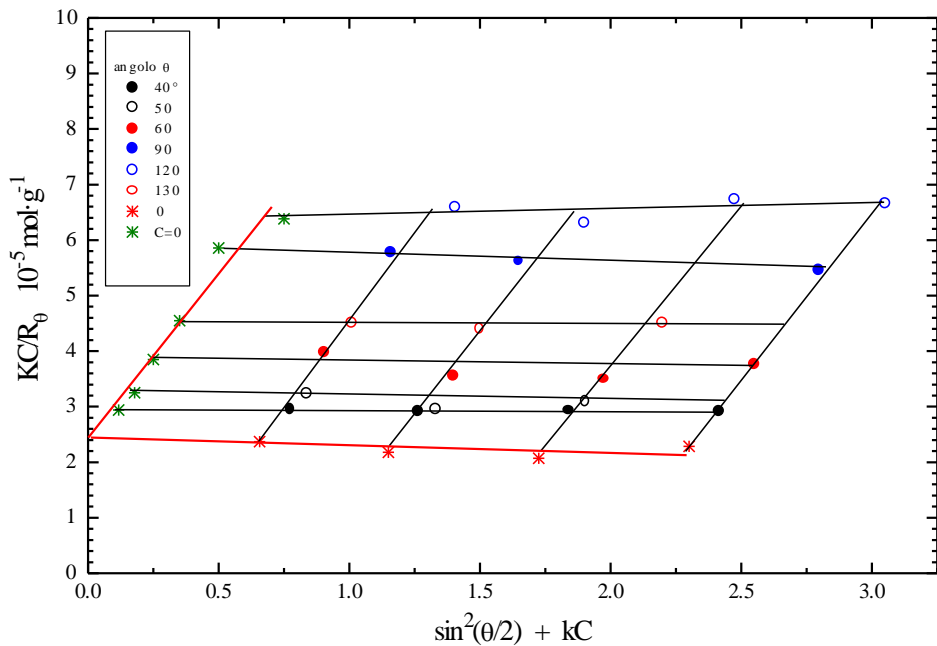
Analisi di metilazione

Derivato	Legame	%
2,3,4-Me₃ Rha	t-Rha	21.4
2,3,4-Me₃ Fuc	t-Fuc	10.7
2,3,4,6-Me₄ Man	t-Man_p	3.2
3,4-Me₂ Rha	2-Rha	8.3
2,3,4,6-Me₄ Glc	t-Glcp	4.0
2,3,4,6-Me₄ Gal	t-Galp	3.2
3,4-Me₂ Fuc	2-Fuc	2.7
3,4,6-Me₃ Man	2-Man_p	2.3
2,3,4-Me₃ Man	6-Man_p	3.3
3,5-Me₂ Xyl	2-Xyl_f	1.0
Fuc	2,3,4-Fuc	5.4
3,4,6-Me₃ Gal	2-Galp	13.4
2,3,6-Me₃ Gal	4-Galp	10.5
2,3,6-Me₃ Glc	4-Glcp	2.4
3-Me Xyl	2,4-Xyl_p	1.8
3,6-Me₂ Man	2,4-Man_p	1.9
4,6-Me₂ Man	2,3-Man_p	1.0

Determinazione delle proprietà delle catene (PM, raggio di girazione)

- Esperimenti di Diffusione della luce (R_g , PM, coefficiente del viriale) - **Laser Light Scattering**
- Esperimenti di Cromatografia di Permeazione su Gel (PM) - **GPC**
- Esperimenti di **Viscometria** (volume e raggio idrodinamico, conformazione)





sample	$M_{NaCl} = I$	M_w /dalton	$A_2 \cdot 10^6$ / $cm^3 \cdot mol \cdot g^{-1}$	R_G /nm
TH14B13 (2000)	0.10	264,000	-0.41	77
	0.30	145,000	-0.81	83
	0.50	218,000	-1.3	99
	0.70	234,000	-4.8	94
Rovinj, A7 (2001)	0.30	222,000	-0.43	155
	0.70	217,000	-0.20	131
			-0.45	
			-0.56	

	R_G /nm
Pullulan	24
Welan	68
Alginate	73
TH14B13 (2000)	77
A7 (2001)	155

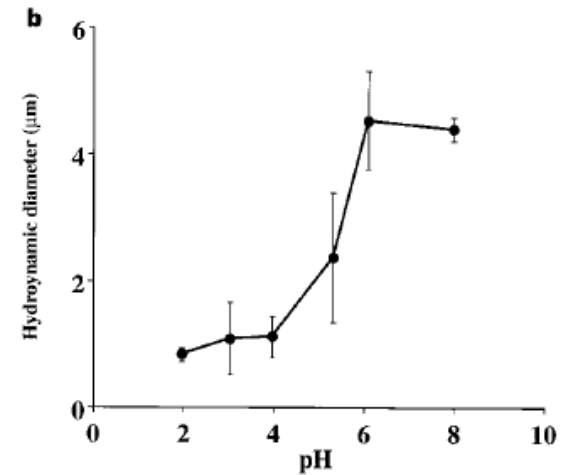
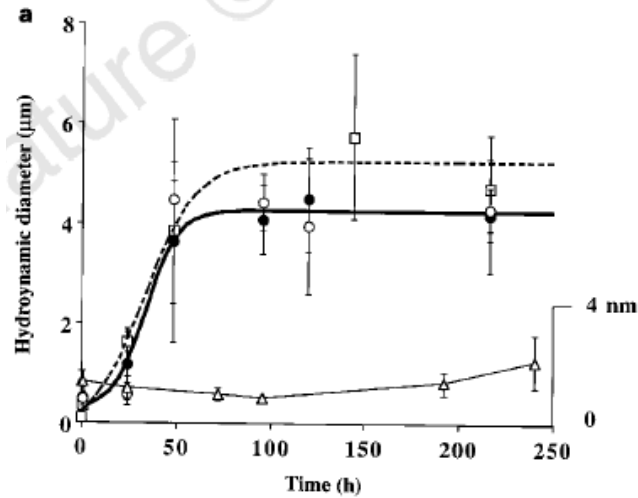
DLS

«Dynamic Laser Light Scattering»

Spontaneous assembly of marine dissolved organic matter into polymer gels

Wei-Chun Chin, Mónica V. Orellana & Pedro Verdugo

Department of Bioengineering, University of Washington, Box 357962, Seattle, Washington 98195, USA



Urbani & Sist, 2004

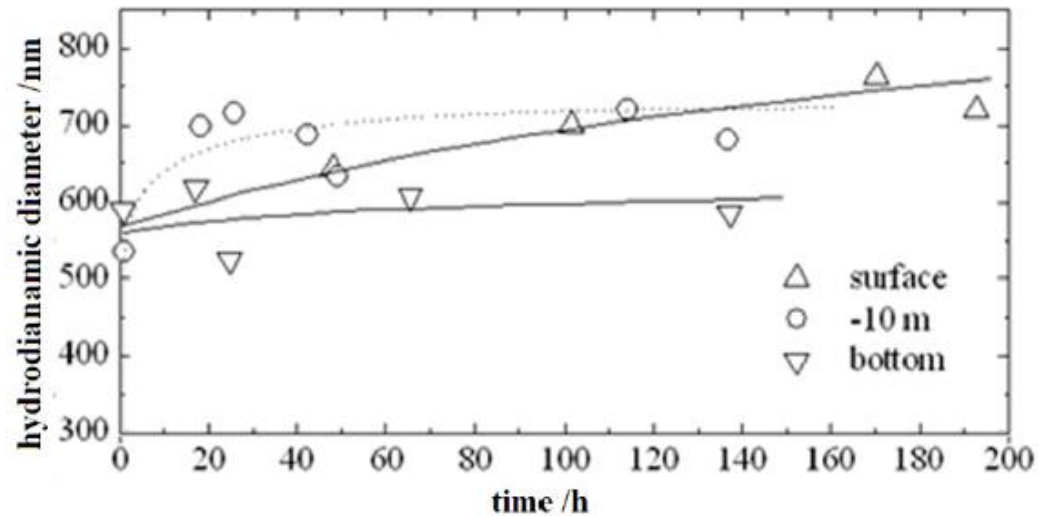
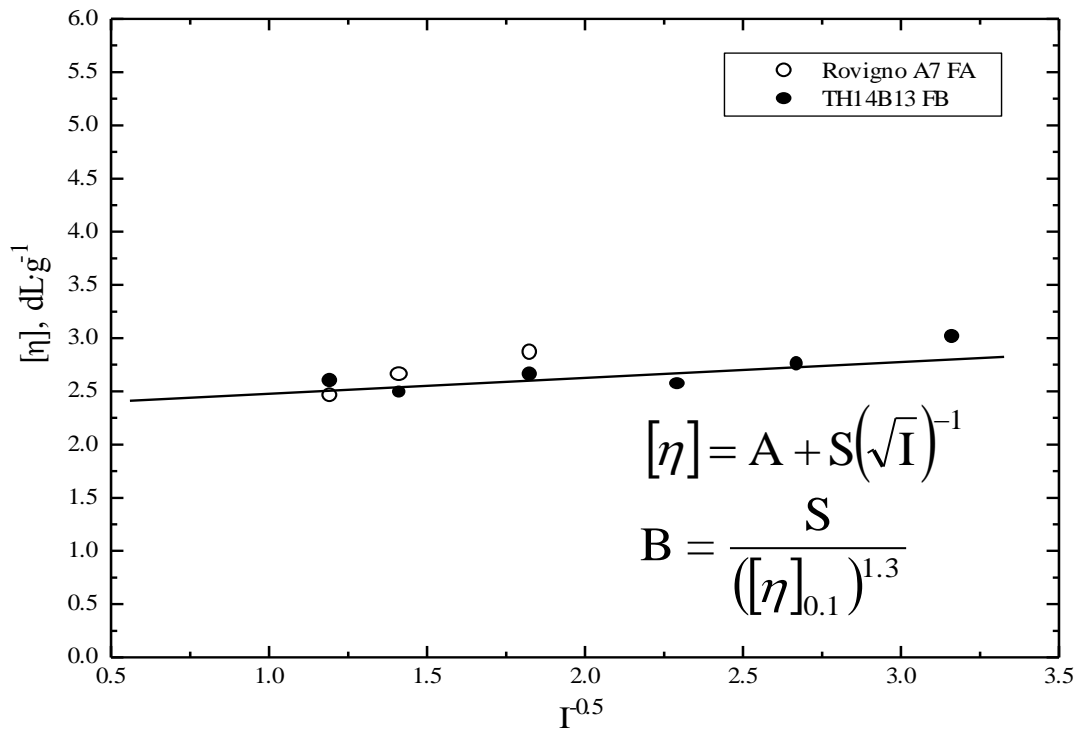


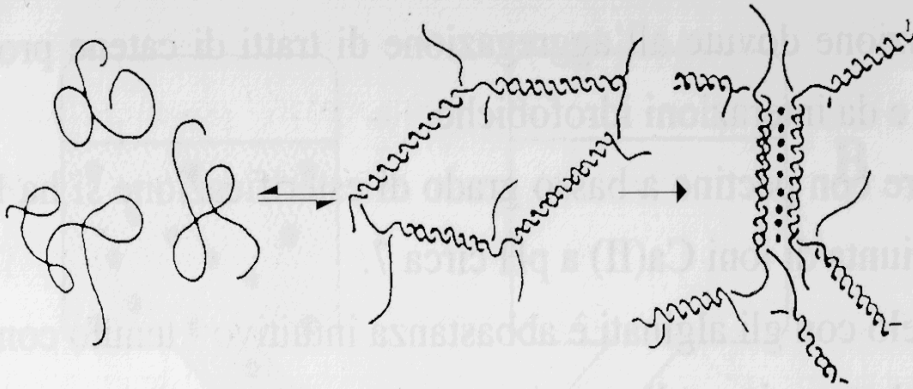
Figure 7. Hydrodynamic diameter in dependence on time for Adriatic seawater samples.



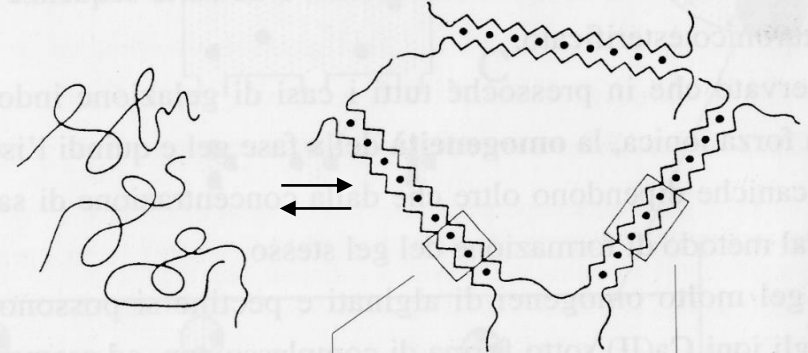
Polymer	B
<i>Polyphosphate</i>	0.44
<i>Poliacrylate</i>	0.23
<i>Dextran sulphate</i>	0.23
<i>Carboxymethyl-amylose</i>	0.20
<i>Carboxymethyl-cellulose</i>	0.065
<i>Hyaluronic Acid</i>	0.065
<i>Mannuronic-rich alginate</i>	0.040
TH14B13 (2000)	0.036
<i>Guluronic-rich alginate</i>	0.031
<i>DNA</i>	0.0055
<i>Xanthan</i>	0.0053

Determinazione delle proprietà aggreganti/gelificanti

Processo di aggregazione 1

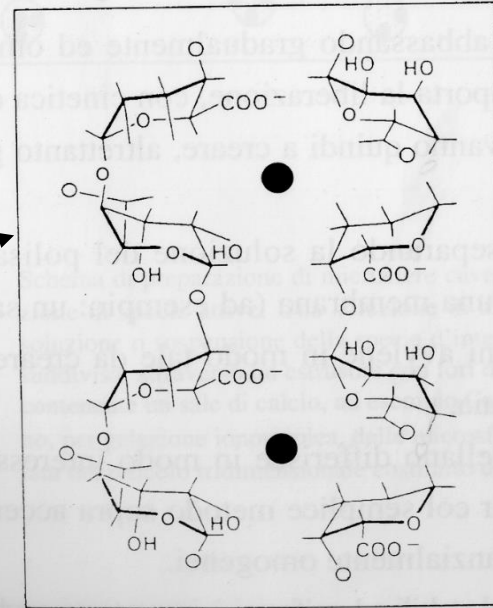


Processo di aggregazione 2



K-carragenano

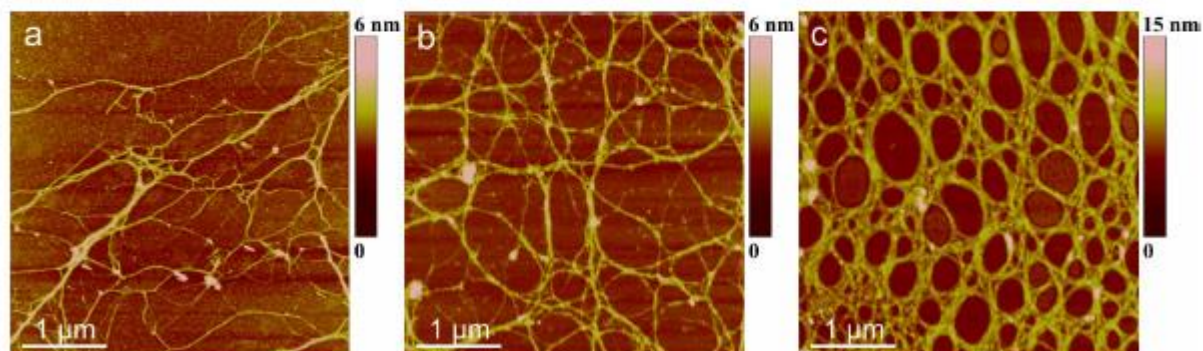
alginate



GEL



Figure 4. Evolution of polymer networks in the macroscopic gel phase from (a) to (c): early stage of gel phase formation (a) to condensed gel network of older macroaggregate (c). AFM images are acquired in contact mode and presented as height data, scan size $4\ \mu\text{m} \times 4\ \mu\text{m}$.



AFM

OPEN ACCESS

Marine Drugs

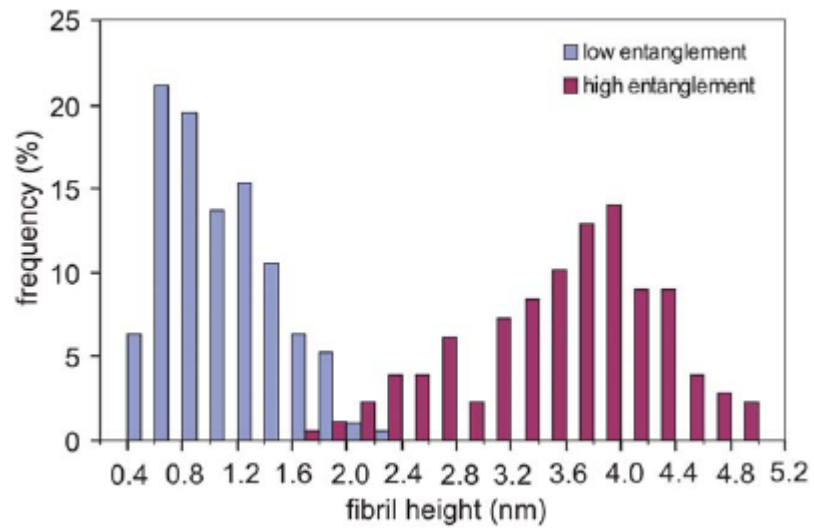
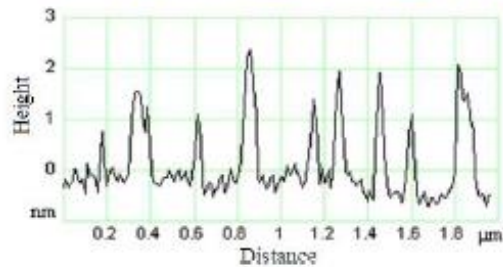
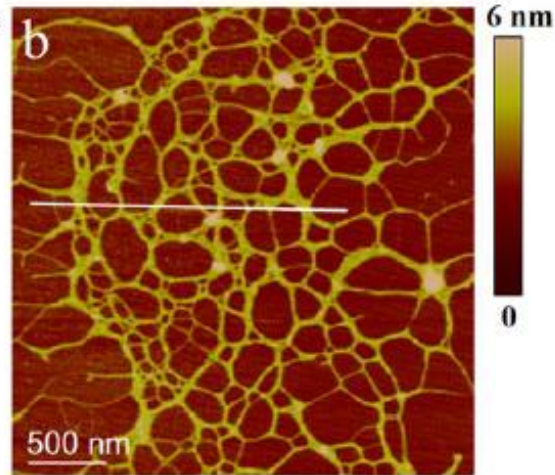
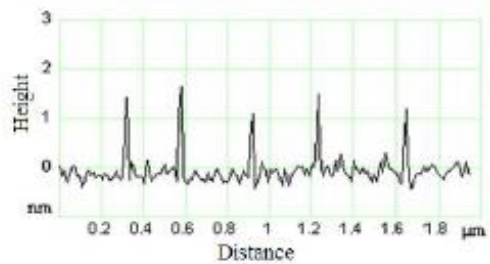
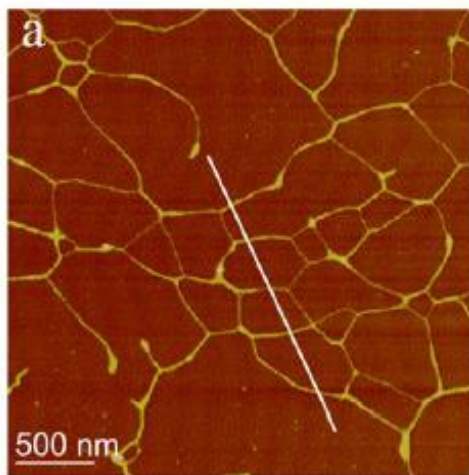
ISSN 1660-3397

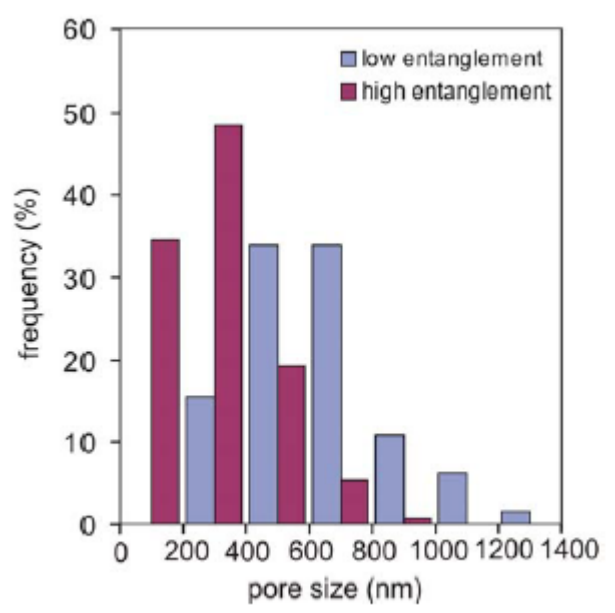
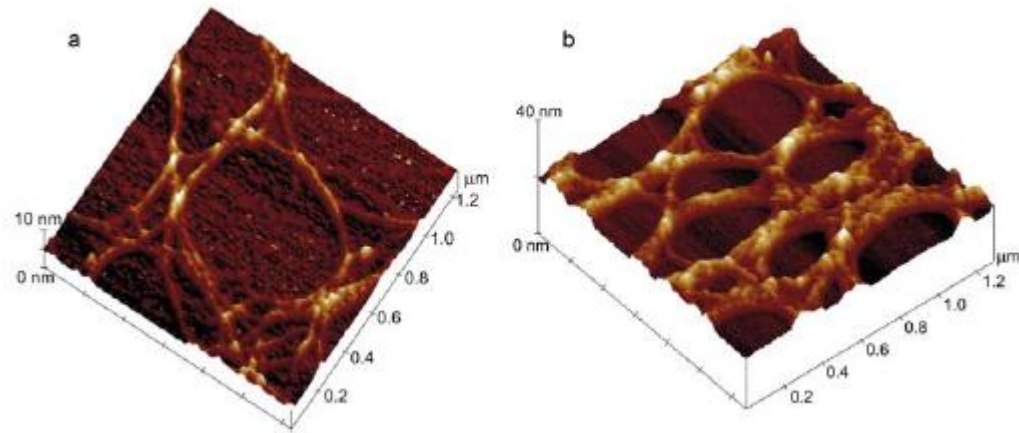
www.mdpi.com/journal/marinedrugs

Article

Polymer Networks Produced by Marine Diatoms in the Northern Adriatic Sea

Vesna Svetličić ^{1,*}, Vera Žutić ¹, Tea Mišić Radić ¹, Galja Pletikapić ¹,
Amela Hozić Zimmermann ¹ and Ranieri Urbani ²





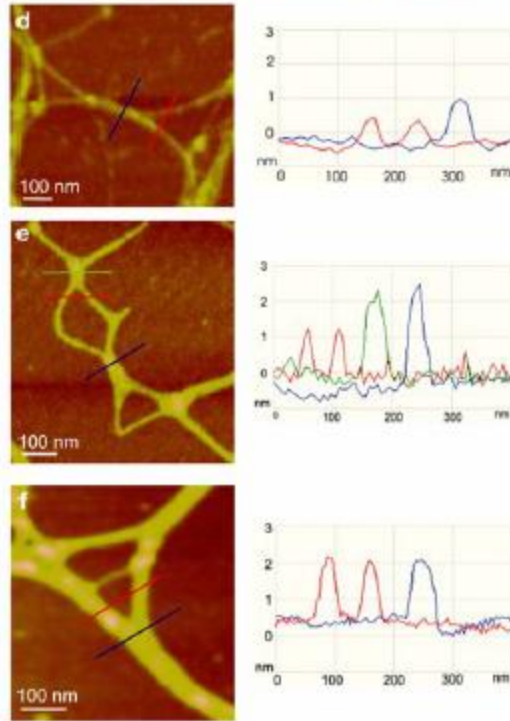
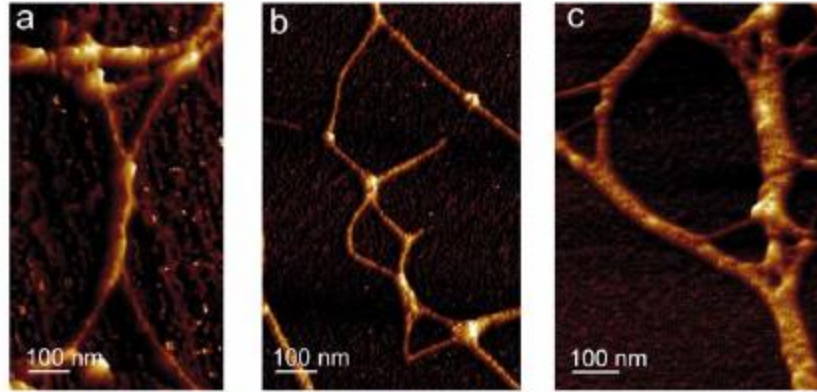
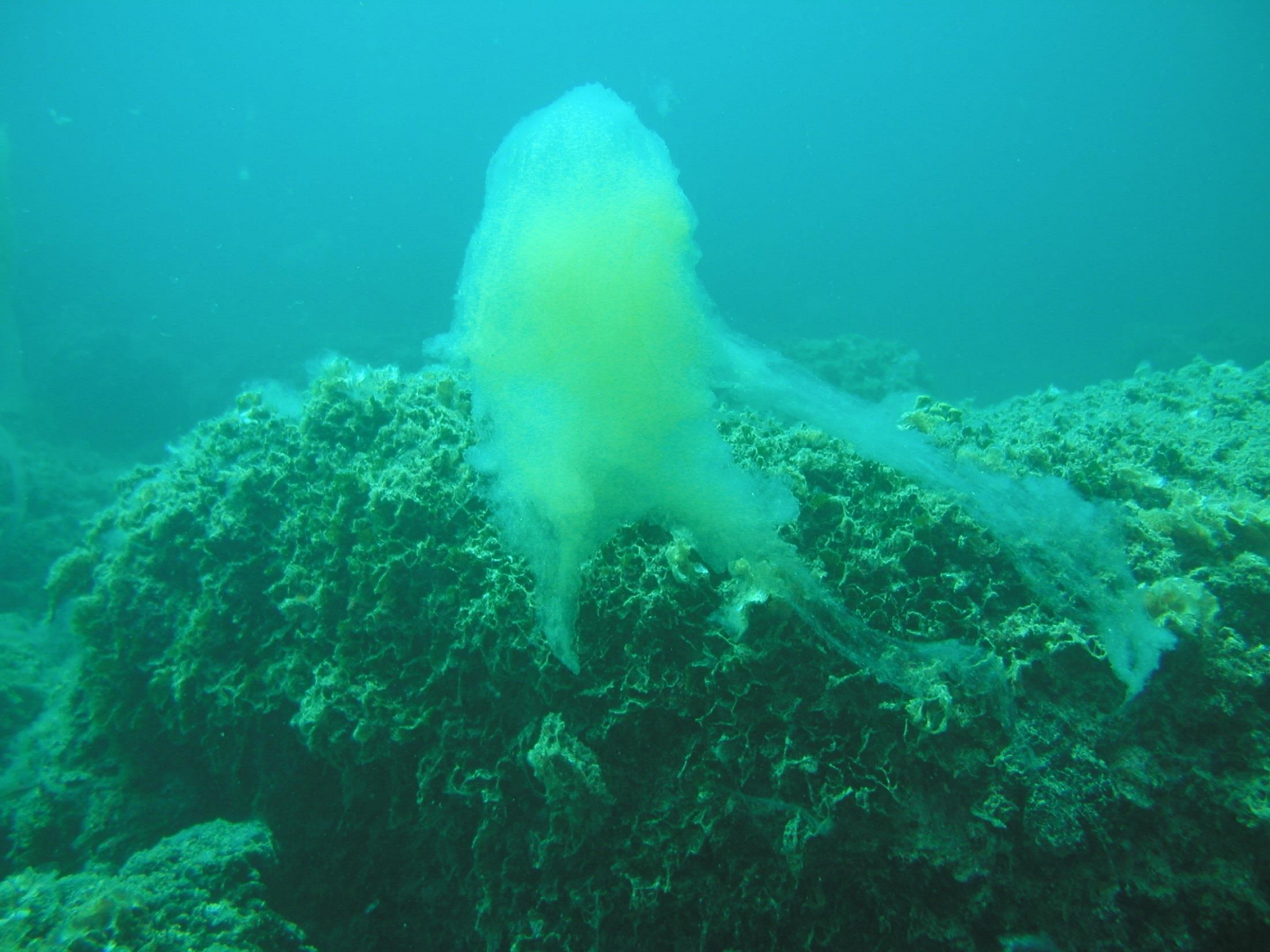
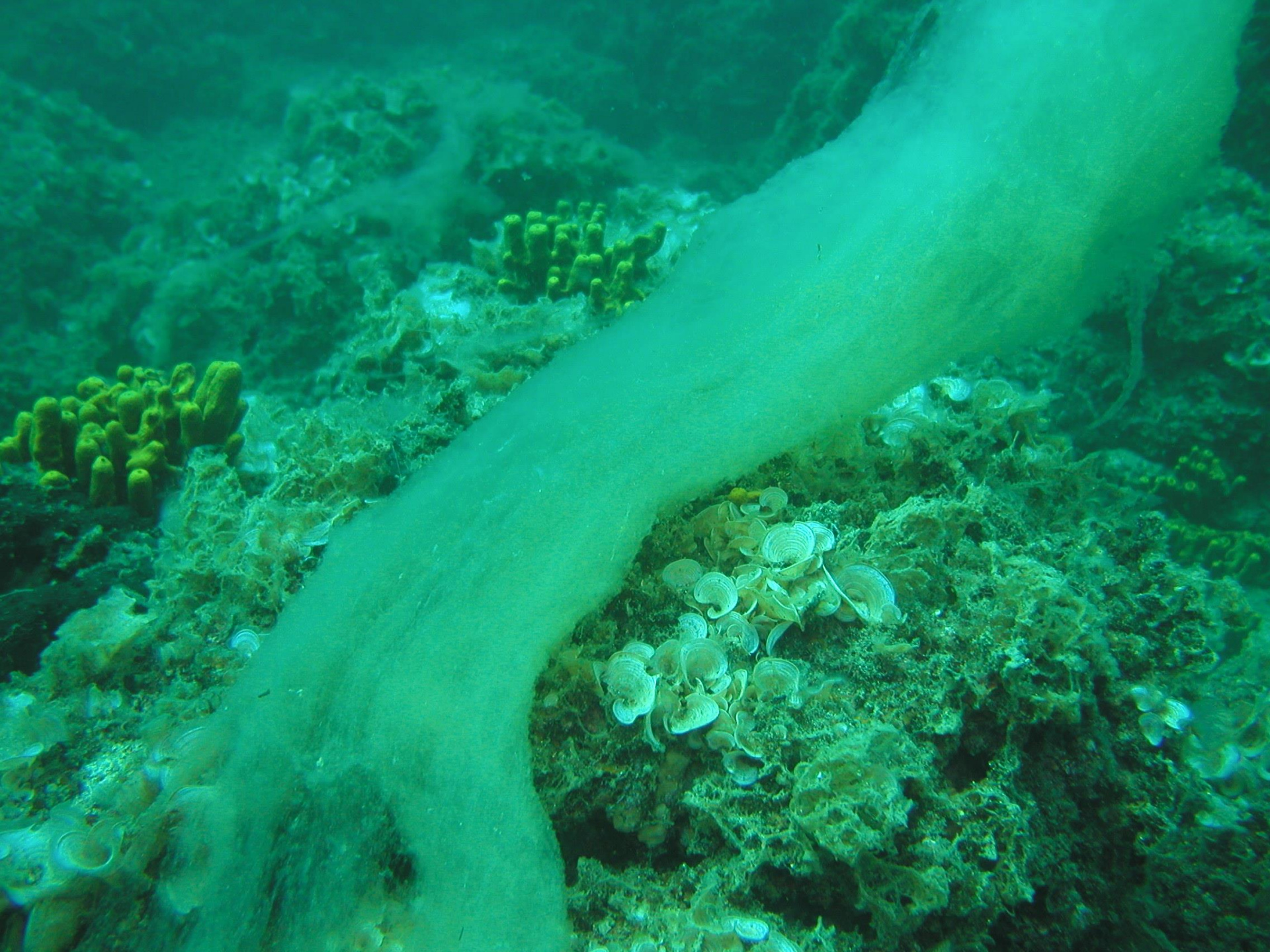


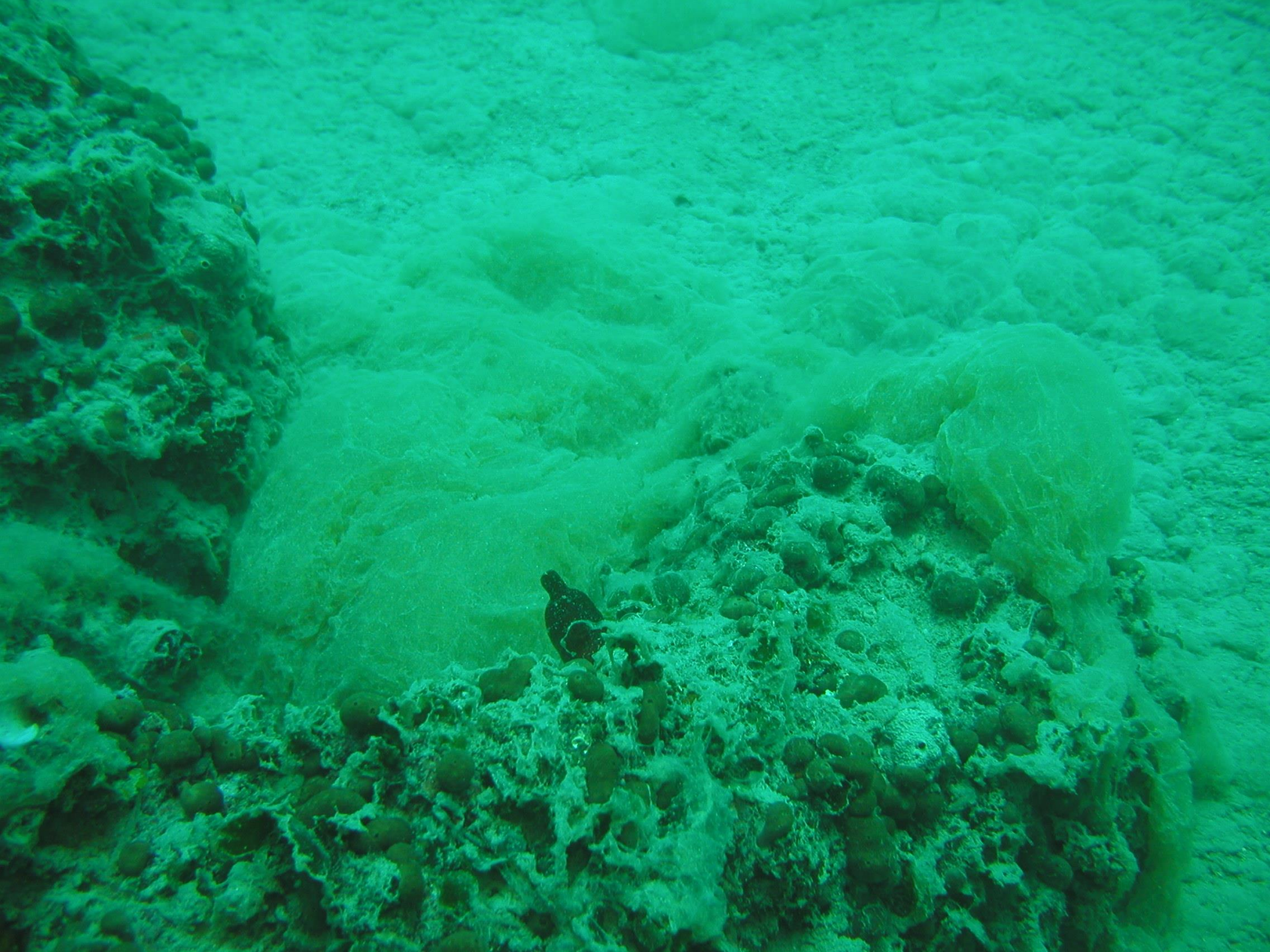
Foto di mucillagini adriatiche

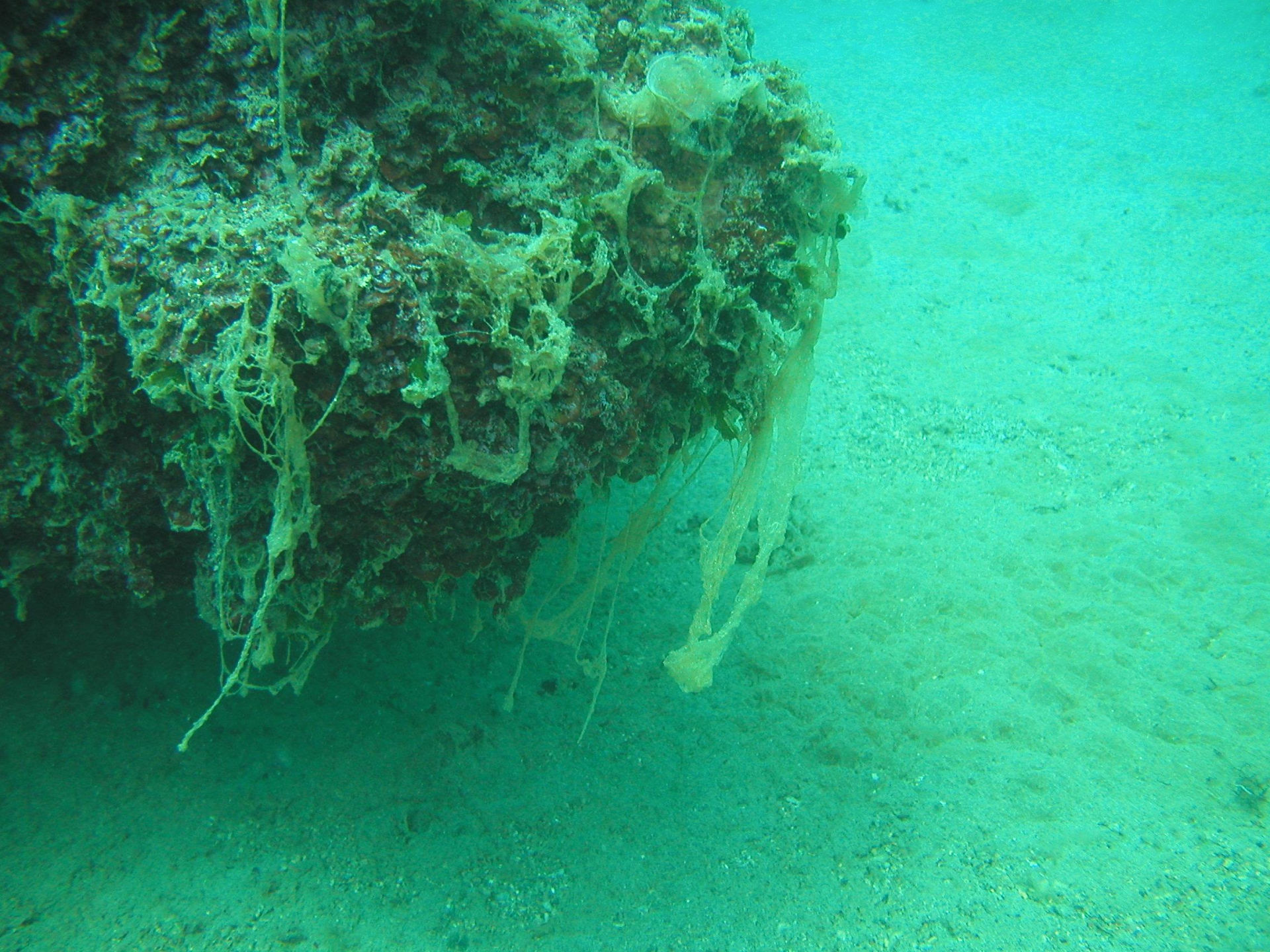














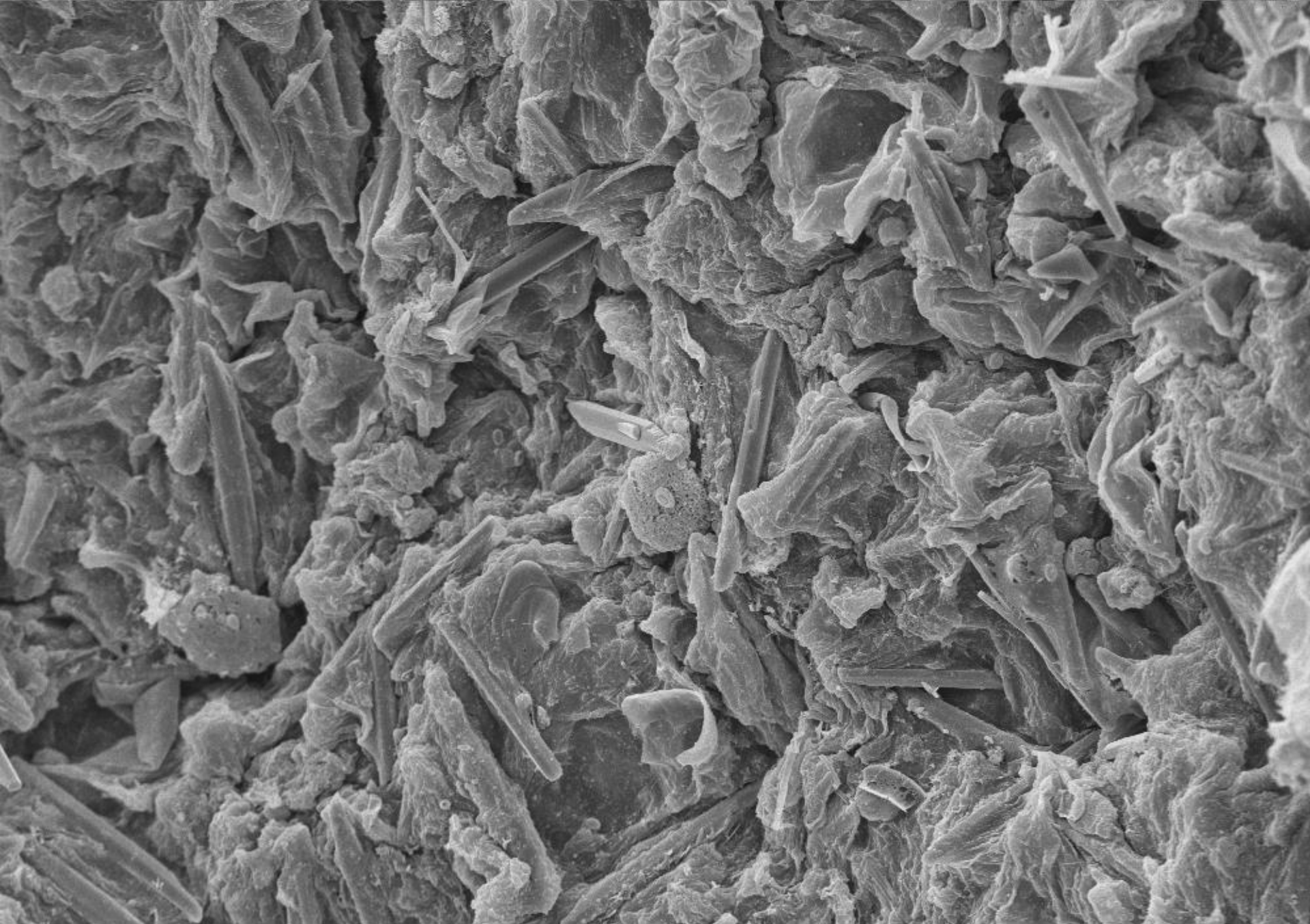








Microscopia SEM di mucillagini adriatiche

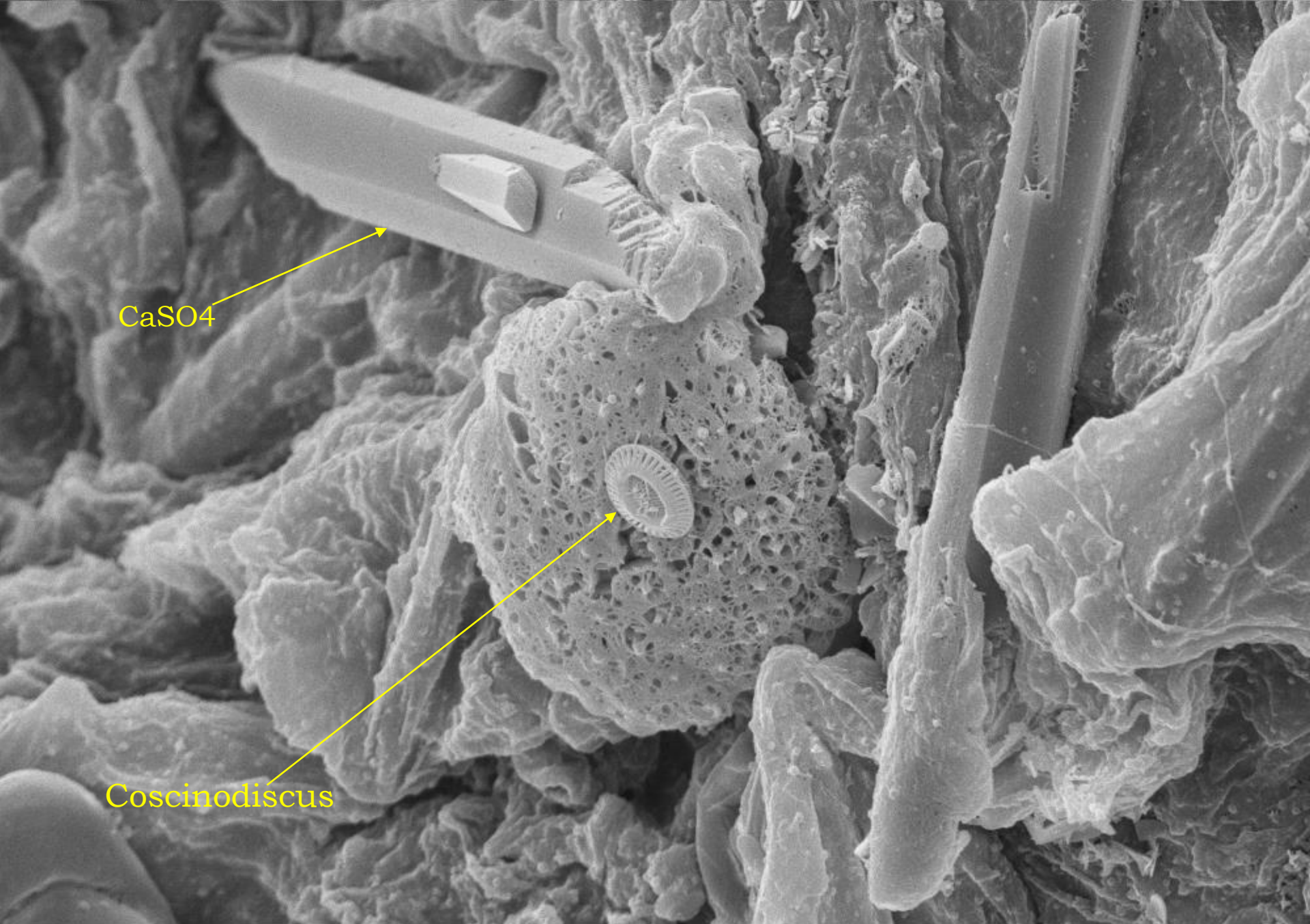


EHT=13.31 kV WD= 16 mm Mag= 600 X Detector= SE1

20µm



Photo No =1482



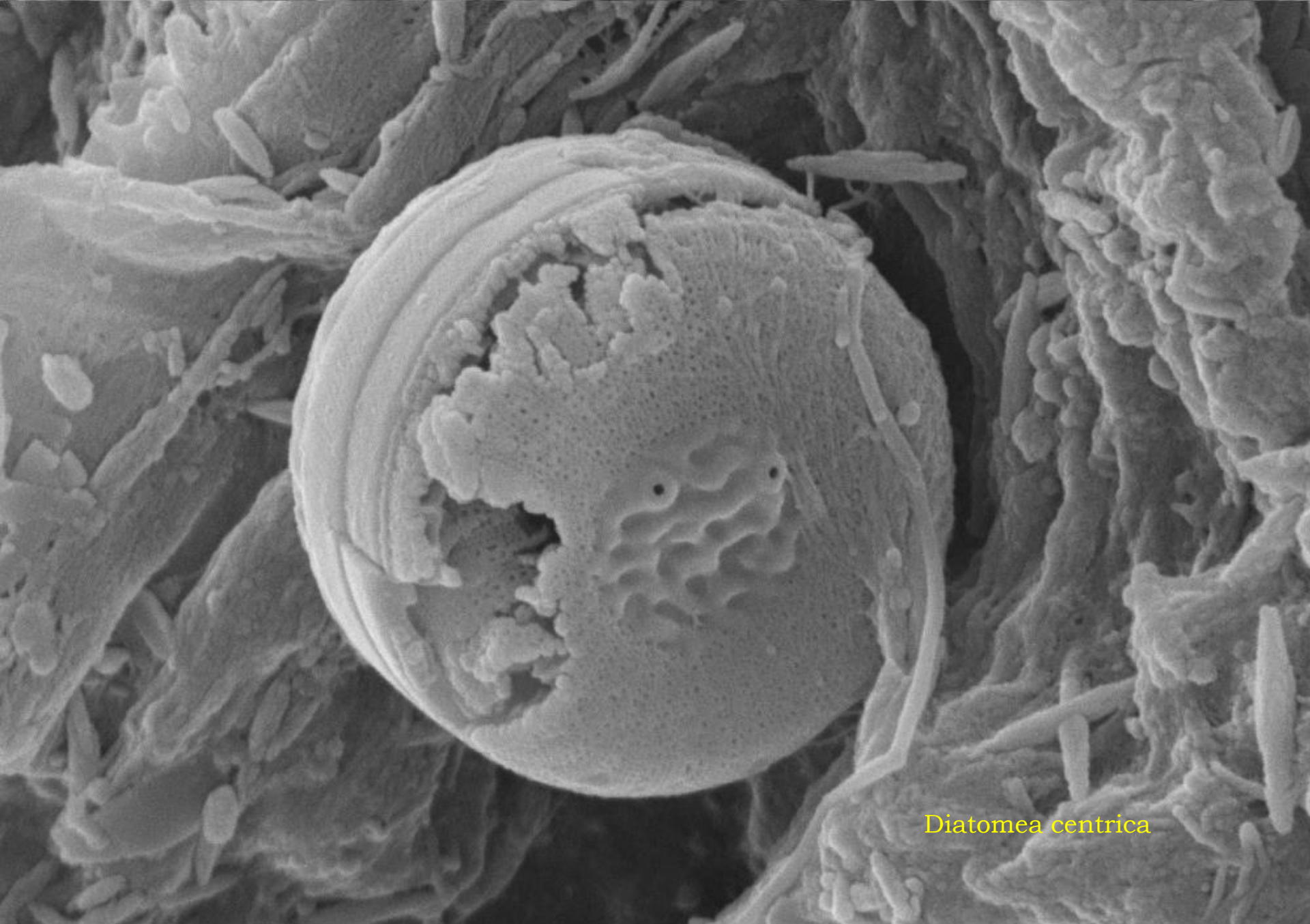
CaSO4

Coscinodiscus

EHT=13.31 kV WD= 16 mm Mag= 2.70 K X Detector= SE1

2µm

Photo No =1484



Diatomea centrica

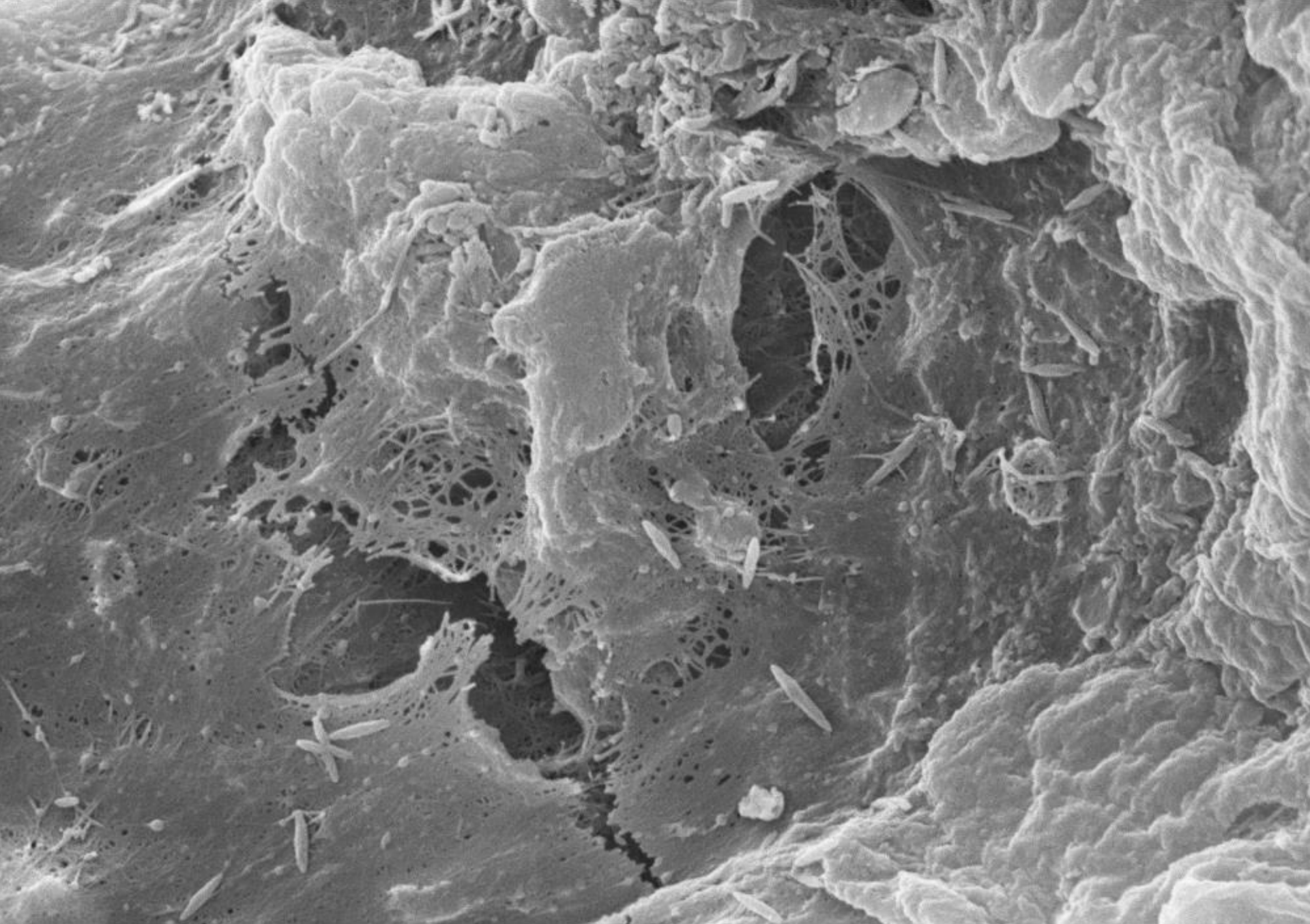
EHT=15.17 kV WD= 9 mm

Mag= 11.04 K X Detector= SE1

1µm



Photo No =1499



EHT=13.31 kV WD= 16 mm

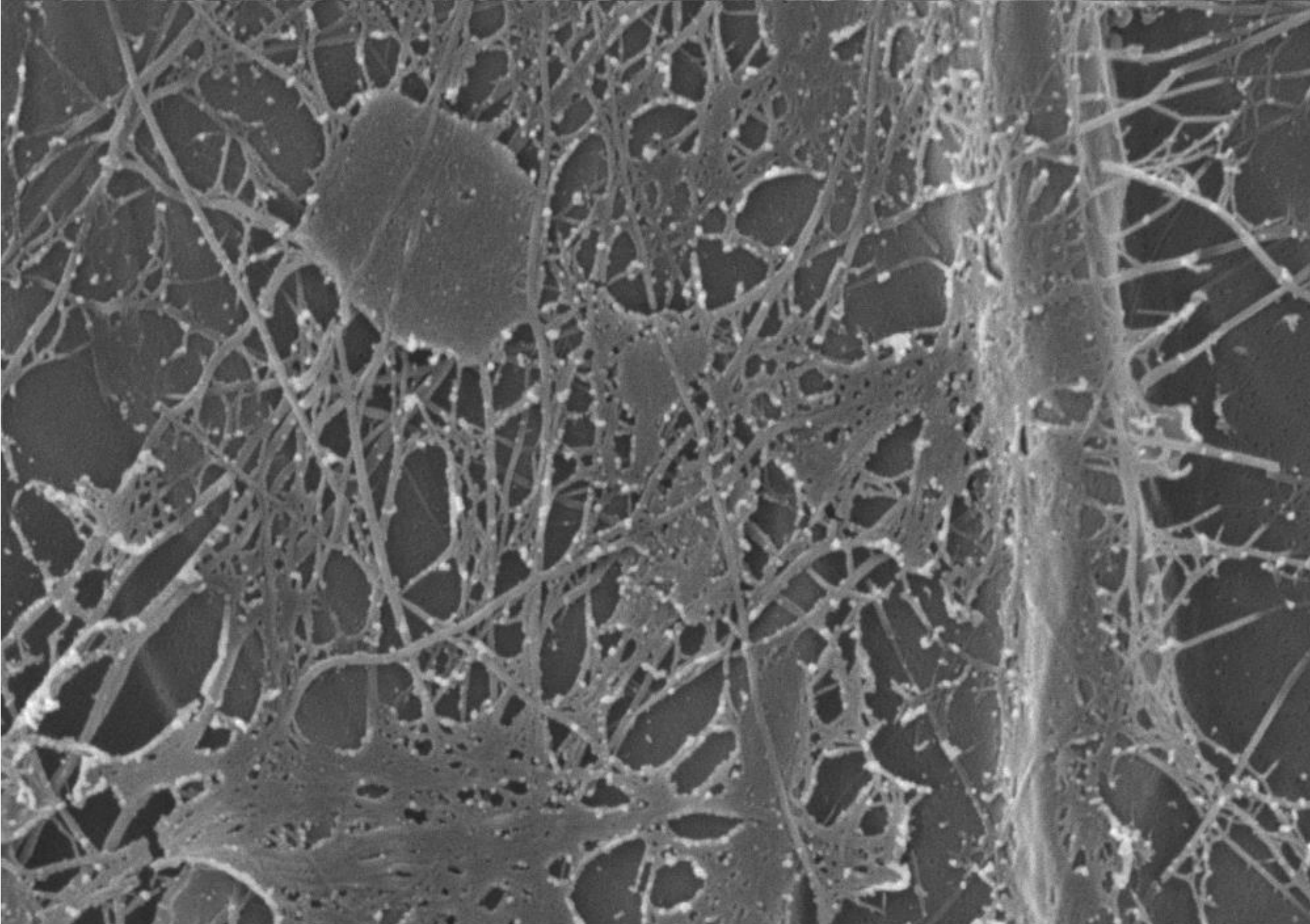
Mag= 4.62 K X Detector= SE1

64

1 μ m



Photo No =1493



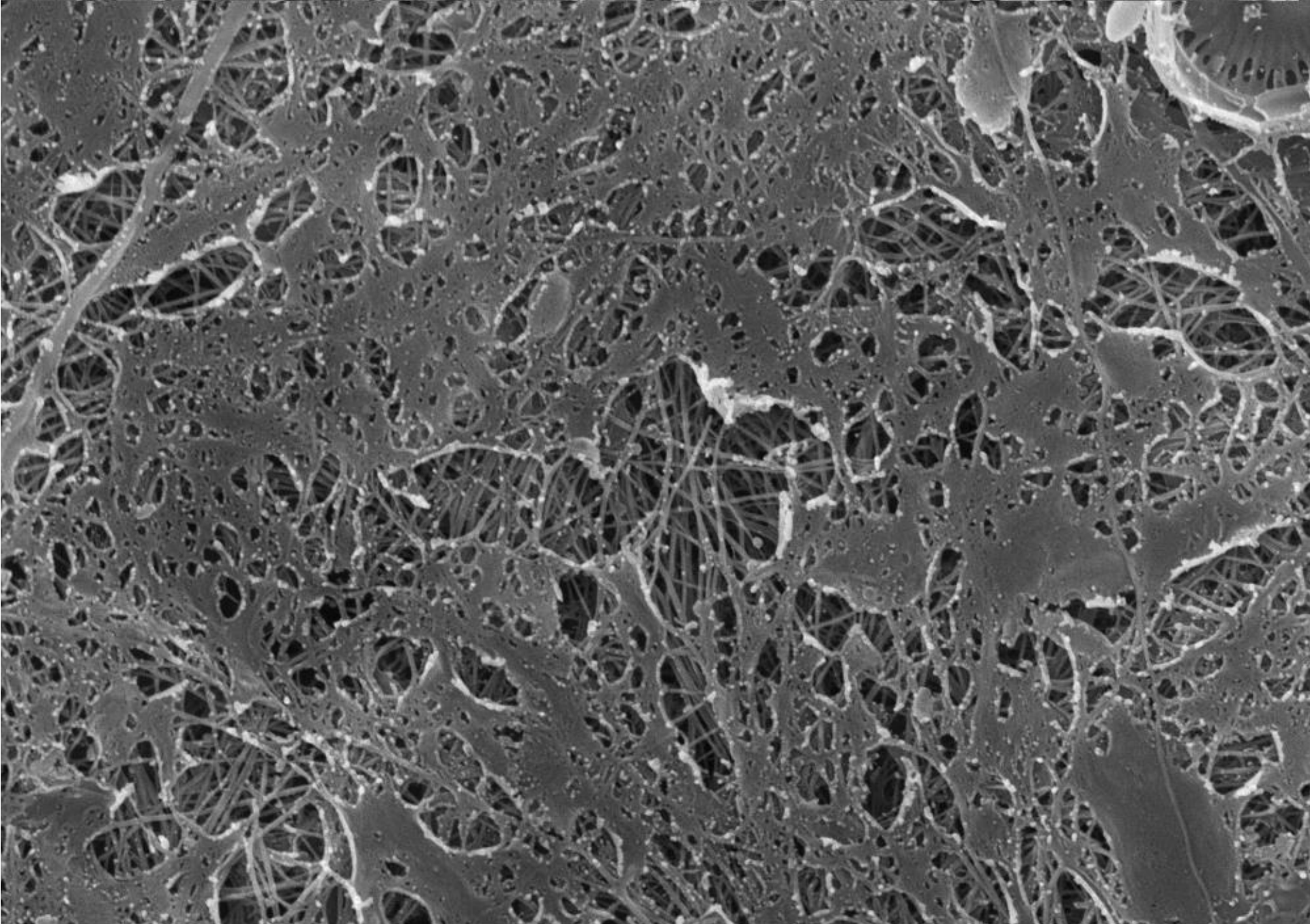
EHT=15.17 kV WD= 10 mm

Mag= 8.02 K X Detector= SE1

1 μ m



Photo No =1519



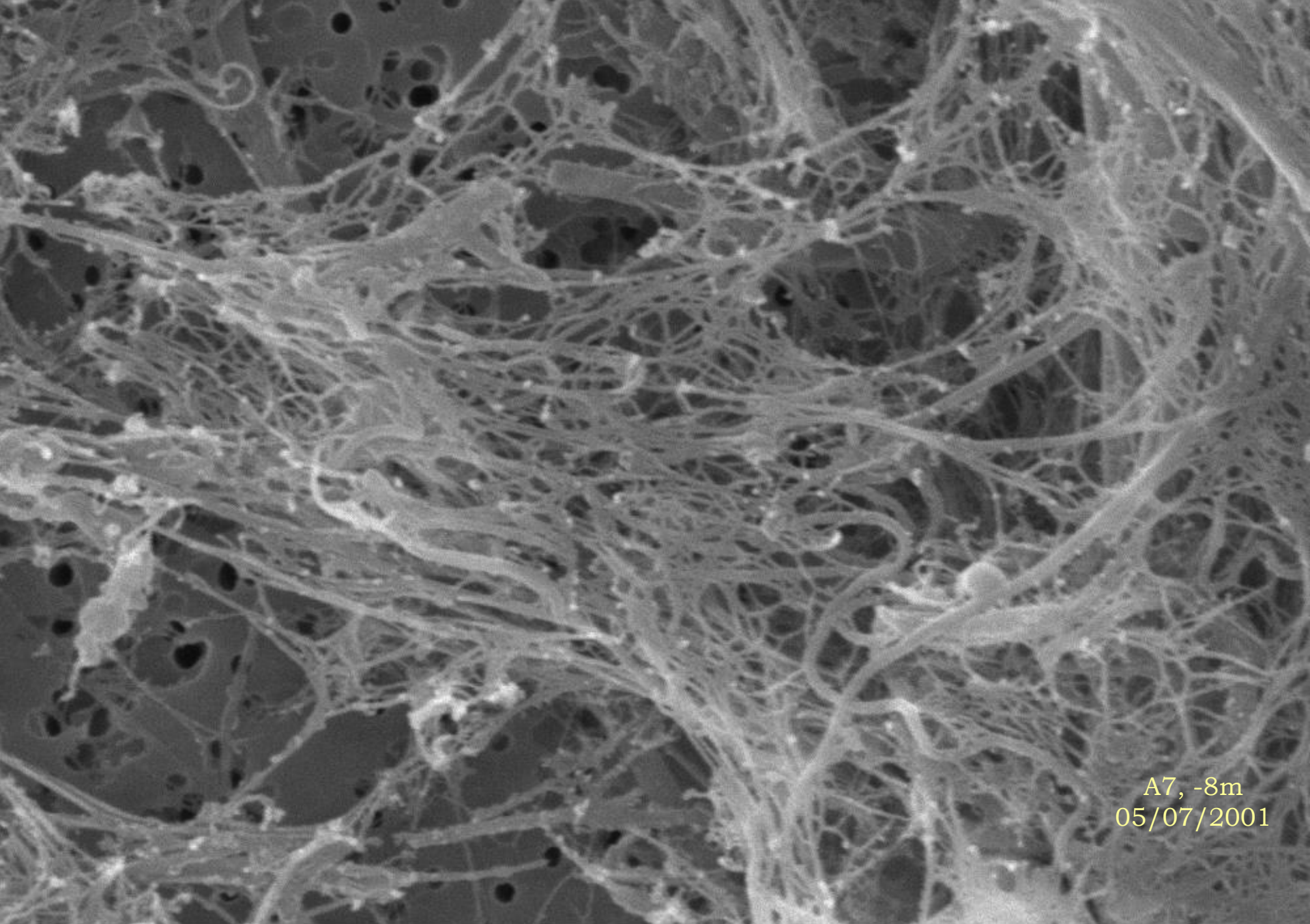
EHT=16.94 kV WD= 15 mm

Mag= 5.03 K X Detector= SE1

1 μ m



Photo No. =1561



A7, -8m
05/07/2001

EHT=15.35 kV WD= 11 mm

Mag= 11.75 K X

Detector= SE1

1μm



Photo No =3004

Microscopia SEM di mucillagini bentoniche tirreniche

Aggregati algali bentonici tirrenici ed adriatici

J. Phycol. 52, 550–563 (2016)
© 2016 Phycological Society of America
DOI: 10.1111/jpy.12415

ORGANIC AGGREGATES FORMED BY BENTHOPLEUSTOPHYTE BROWN ALGA *ACINETOSPORA CRINITA* (ACINETOSPORACEAE, ECTOCARPALES)¹

Michele Giani

National Institute of Oceanography and Experimental Geophysics (OGS), Trieste 34151, Italy

Gianfranco Sartoni, Caterina Nuccio

Department of Biology, University of Firenze, Firenze 50121, Italy

Daniela Berto

Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Chioggia 30015, Italy

Carla Rita Ferrari

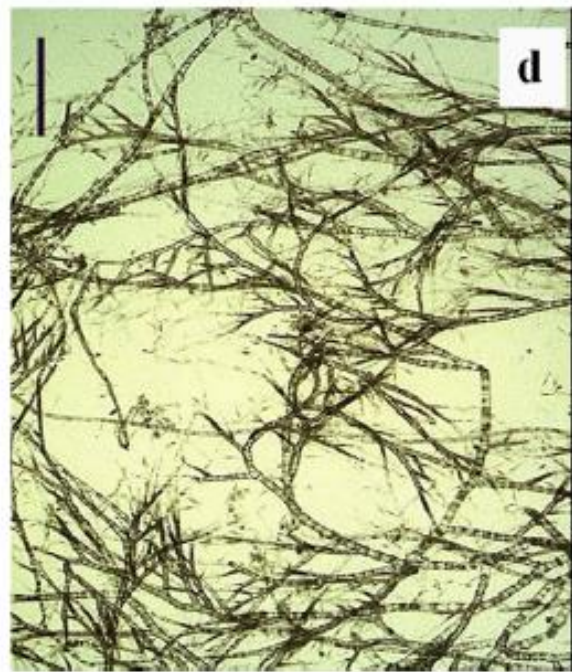
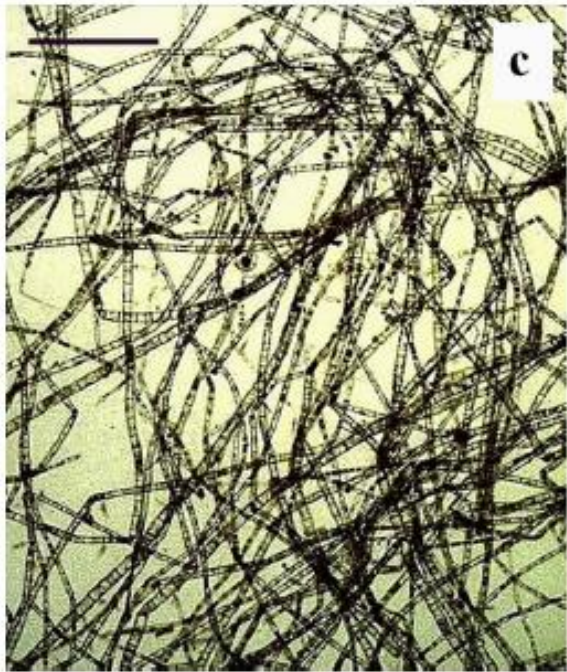
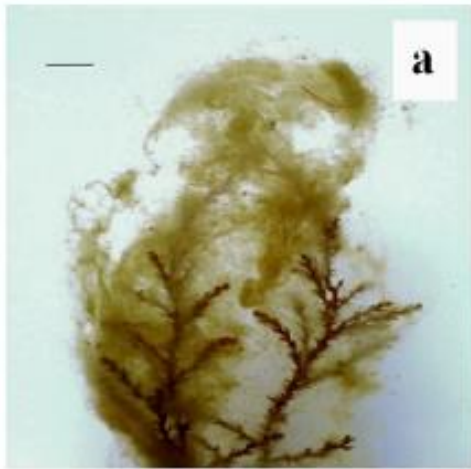
Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente dell'Emilia Romagna, Cesenatico 47042, Italy

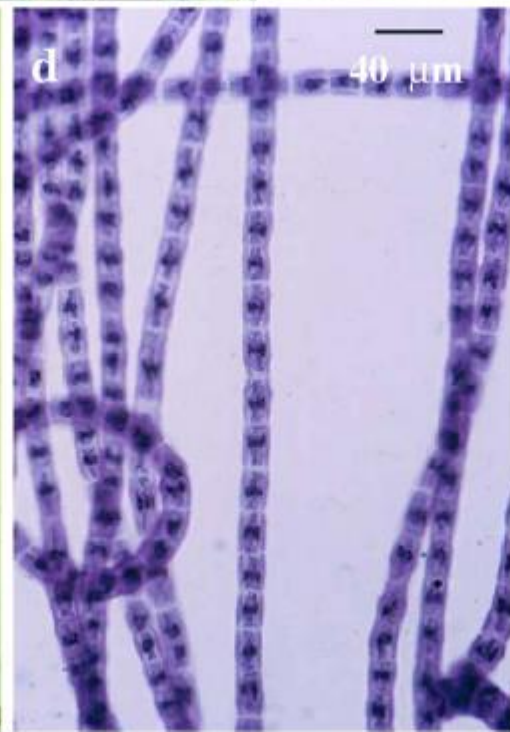
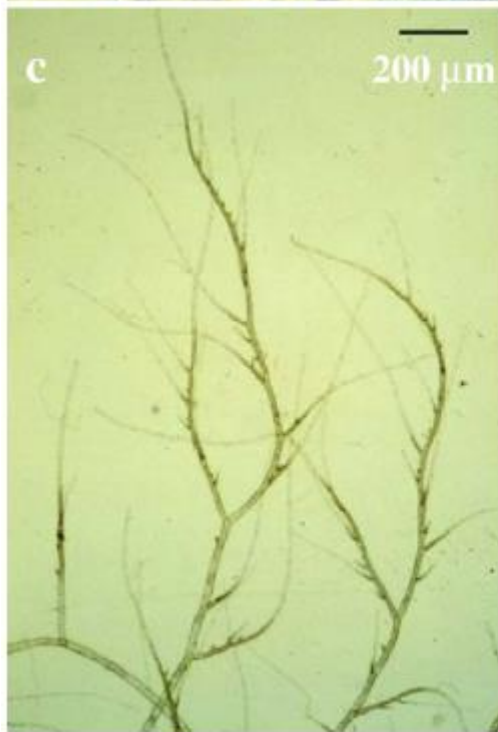
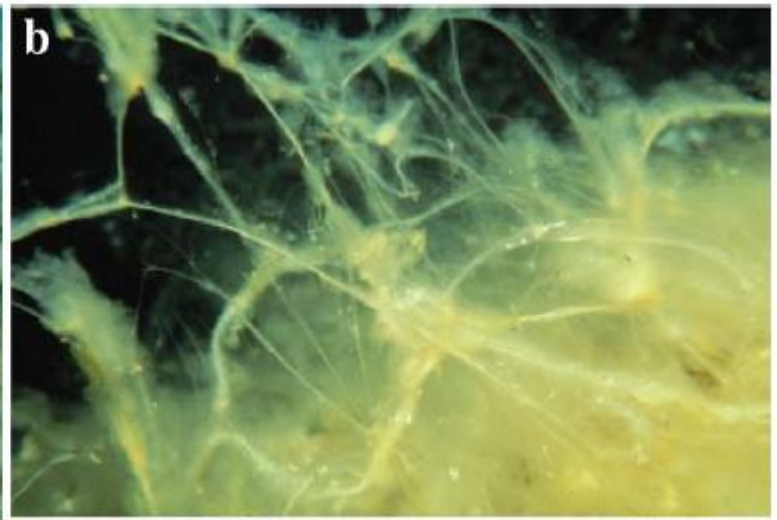
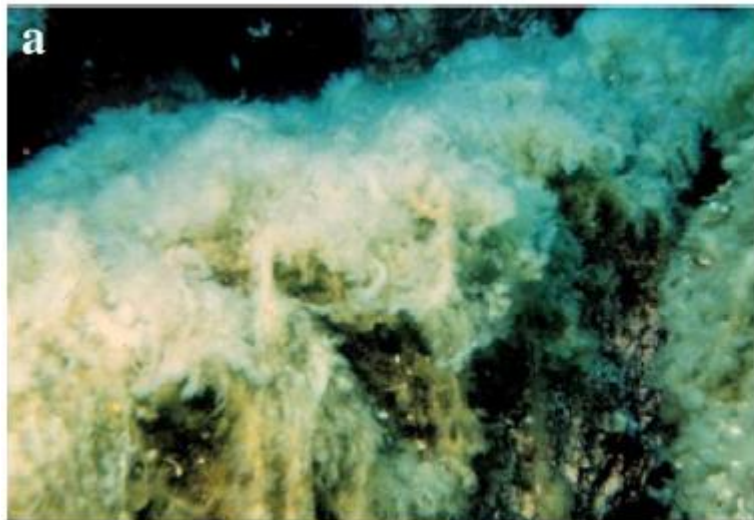
Mirjana Najdek

Institut "Ruder Bošković", Center for Marine Research, Rovinj 52210, Croatia

*Paola Sist and Ranieri Urbani*²

Department of Life Sciences, University of Trieste, Trieste 34127, Italy





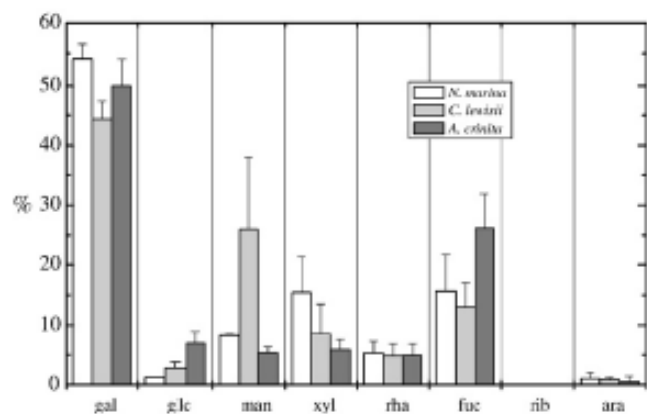


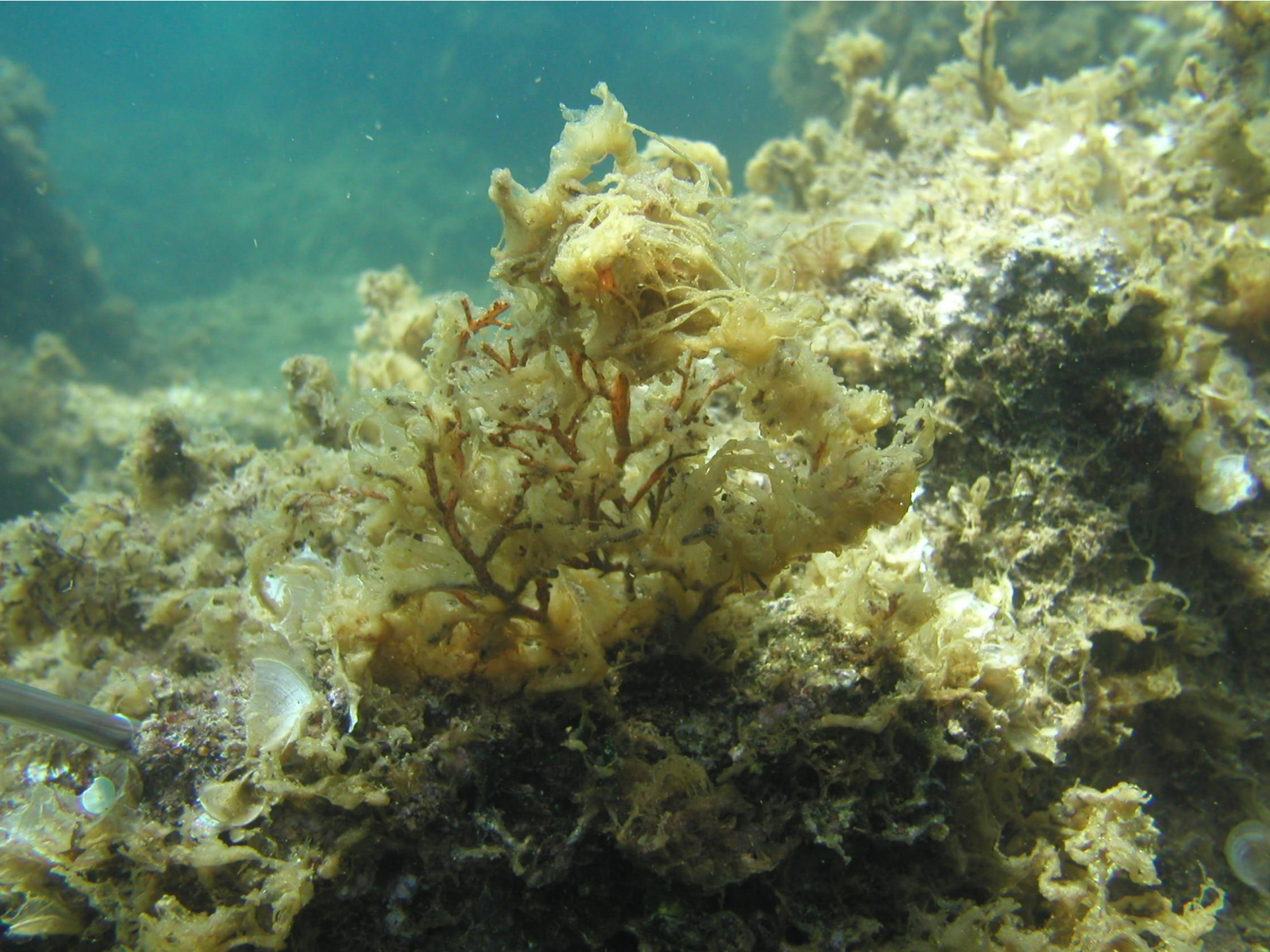
Fig 6. Relative monosaccharide composition (% w/w) of purified polysaccharides from aggregates produced by different macroalgae.

Table 4

Polysaccharide chain properties from light scattering and viscometry

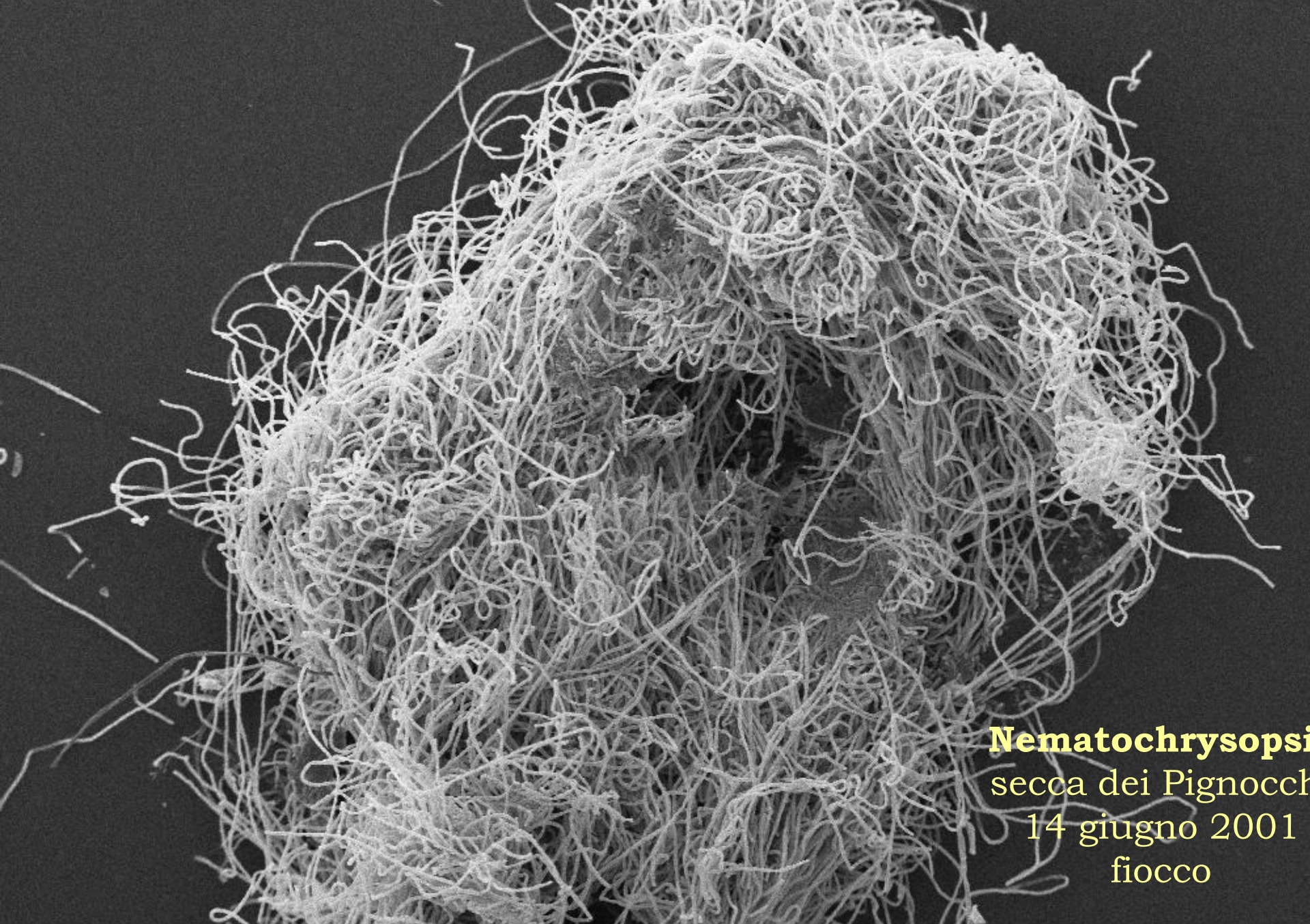
Aggregates	[NaCl]/M	$[\eta]/\text{dL g}^{-1}$	M_w	R_G/nm	$A_2/\text{cm}^3 \text{ mol g}^{-2}$
<i>C. lewisii</i>	0.4	4.4	974,000	151	$-7.0 \cdot 10^{-8}$
(C1)	0.6		>6,000,000		$-3.0 \cdot 10^{-5}$
<i>C. lewisii</i> ,	0.5	2.52	742,000	101	$4.8 \cdot 10^{-6}$
<i>A. crinita</i>					
(CA1)	0.6	1.54	855,000	117	$-5.2 \cdot 10^{-8}$











Nematochrysoptera
secca dei Pignocchi
14 giugno 2001
fiocco

EHT=15.35 kV WD= 11 mm Mag= 35 X Detector= SE1

100µm 

Photo No =3022

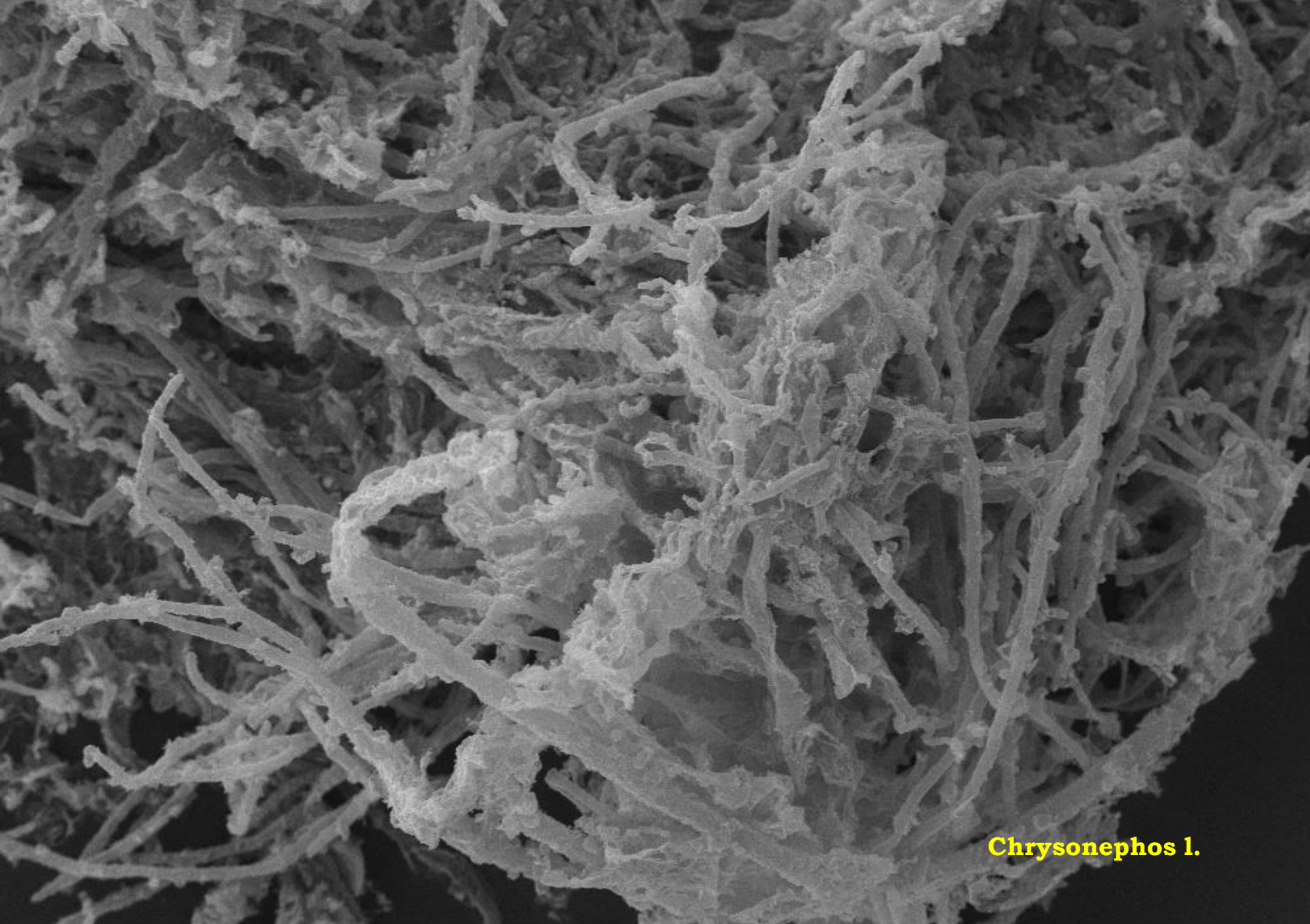
Chrysonephos l.
secca dei Pignocchi
14 giugno 2001
fiocco

EHT=14.05 kV WD= 9 mm Mag= 270 X Detector= SE1

20µm



Photo No.=4360



Chrysonephos 1.

EHT=16.19 kV WD= 9 mm Mag= 124 X Detector= SE1


100µm



Photo No =4365

Palmella



EHT=14.05 kV WD= 9 mm Mag= 15.02 K X Detector= SE1
1µm  Photo No =4361

Risultati della ricerca

La caratterizzazione della frazione polisaccaridica nelle diverse condizioni studiate (colture, colonna d'acqua) permette di trarre delle conclusioni comuni:

- il materiale fresco è principalmente prodotto dalla **componente fitoplanctonica** ed è a più alto peso molecolare.
- I polisaccaridi hanno **struttura polielettrolitica**
- La struttura aggregata **geliforme** è determinata principalmente dai polisaccaridi.
- La composizione di questa frazione semi-labile presenta elevati valori di fucosio che tendono a calare con il procedere della degradazione ad opera della comunità batterica. Sulla base di questi risultati si sono individuati il **gal** e la somma **(fuc+rha)** come bioindicatori dello stato di degradazione della materia organica aggregata.

-

Risultati della ricerca

- La capacità aggregante dei biopolimeri saccaridici è influenzata **dalla forza ionica**. I macroaggregati si formano al aloclino con l'aumentare della forza ionica

