

Tecnologica
2009

FRANCESCA DECOROSI

Studio di ceppi batterici per il biorisanamento di suoli contaminati da Cr(VI)

PREMIO TESI DOTTORATO
FIRENZE UNIVERSITY PRESS – UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE



PREMIO FIRENZE UNIVERSITY PRESS
TESI DI DOTTORATO

- 16 -

Francesca Decorosi

**Studio di ceppi batterici
per il biorisanamento di suoli contaminati
da Cr(VI)**

Firenze University Press
2010

Studio di ceppi batterici per il biorisanamento di suoli
contaminati da Cr(VI)/ Francesca Decorosi. – Firenze :
Firenze University Press, 2010.
(Premio FUP. Tesi di dottorato ; 16)

<http://digital.casalini.it/9788884539366>

ISBN 978-88-8453-985-4 (print)
ISBN 978-88-8453-936-6 (online)

Progetto di copertina: Alberto Pizarro Fernández

© 2010 Firenze University Press
Università degli Studi di Firenze
Firenze University Press
Borgo Albizi, 28
50122 Firenze, Italy
<http://www.fupress.com/>

Printed in Italy

Sommario

Capitolo 1	
Introduzione	1
1. Il problema mondiale dell'inquinamento da cromo	1
1.1. Proprietà ed impiego antropico del cromo	1
1.2. Tossicità del cromo	2
1.3. Il cromo nel suolo	4
1.4. Contaminazione ambientale da cromato	7
2. Interazioni tra cromo e batteri	11
2.1. Tossicità del Cr(VI) nei batteri e meccanismi di resistenza batterica al Cr(VI)	11
2.2. Influenza del Cr(VI) sulle comunità microbiche del suolo	20
3. Biorisanamento di suoli contaminati da cromato	22
4. Metodi per lo studio di microrganismi da impiegare nel biorisanamento	25
4.1. Caratterizzazione fenomica dei microrganismi	25
4.2. Studio dei meccanismi batterici di resistenza al Cr(VI)	28
Capitolo 2	
Scopo	33
Capitolo 3	
Materiali e metodi	35
1. Caratterizzazione dei ceppi 22, 28, 34 e 56	35
1.1. Sequenziamento del 16S rDNA	35
1.2. Identificazione dei ceppi batterici mediante Biolog-ID	37
1.3. Determinazione della riduzione batterica del Cr(VI)	37
1.4. Analisi Phenotype Microarray (PM) degli isolati batterici	40
2. Studio dei meccanismi di resistenza al Cr(VI)	41
2.1. Esperimenti di ibridazione del DNA	41
2.2. Identificazione dei geni interrotti	45
2.3. Analisi Phenotype Microarray (PM) del ceppo 28 e dei mutanti	46
2.4. Caratterizzazione genetica e funzionale del gene (<i>oscA</i>) interrotto nel mutante Crg8	47
2.5. Determinazione della Cr(VI)-MIC batterica in presenza di diverse fonti di zolfo	62

Capitolo 4	
Risultati e discussione	65
1. Caratterizzazione di ceppi batterici per il biorisanamento di suoli contaminati da Cr(VI)	65
1.1. Identificazione dei ceppi	65
1.2. Influenza delle fonti di carbonio/energia sulla riduzione del Cr(VI)	66
1.3. Caratterizzazione fenotipica dei ceppi mediante Phenotype Microarray (PM)	71
2. Studio dei meccanismi di resistenza al Cr(VI) IN <i>Pseudomonas corrugata</i> 28	78
2.1. Caratterizzazione dei mutanti Cr(VI)-sensibili di <i>P. corrugata</i> 28	78
2.2. Caratterizzazione genetica e funzionale del gene (<i>osCA</i>) interrotto nel mutante Crg8	91
2.3. Composti organici dello zolfo e resistenza al Cr(VI) in <i>P. corrugata</i> 28	108
Capitolo 5	
Conclusioni	111
Bibliografia	115

Capitolo 1

Introduzione

1. Il problema mondiale dell'inquinamento da cromo

1.1. Proprietà ed impiego antropico del cromo

Il cromo (numero atomico 24; peso atomico 51,996; densità $7,19 \text{ g/cm}^3$) è un elemento di transizione appartenente al gruppo VI-B della tavola periodica degli elementi ed è considerato un metallo pesante poiché ha una densità superiore a 5 g/cm^3



Figura 1.1. Il minerale cromite.

(Nies 1999). L'identificazione del cromo come elemento chimico risale al 1789 ed avvenne ad opera del chimico francese Nicolas-Louis Vauquelin, che nominò questo nuovo elemento "cromo" per la molteplicità di colori dei suoi composti. Nella crosta terrestre il cromo è presente in concentrazioni variabili comprese tra 10 e 150 mg/Kg, con una media di 40 mg/Kg, (Bini et al. 2008) e si può trovare sottoforma di circa 40 diversi minerali (Sokolov et al. 2005), tuttavia la cromite (figura 1.1), la cui forma pura ha formula $\text{FeO} \cdot \text{Cr}_2\text{O}_3$, è l'unico minerale da cui viene estratto il cromo. Il più grande deposito terrestre di cromite è il complesso di Bushveld (Sud Africa) che si estende su 12000 Km² e contiene il 60% delle riserve terrestri di cromite. Altre importanti riserve mondiali di cromite si trovano in Zimbabwe, Madagascar, Kazakhstan, India, Finlandia, Brasile, Filippine ed in una fascia montuosa, che si estende dall'Albania attraverso la Grecia, la Turchia fino all'Iran e al Pakistan. Il maggior produttore mondiale di cromite è costituito dal Sud Africa (48% della produzione mondiale), seguito da Kazakhstan (19%) e India (15%), mentre produttori minori sono Brasile, Finlandia, Turchia e Zimbabwe (International Chromium Development Association, 2007).

Il cromo, grazie alle sue proprietà, quali la durezza, la resistenza alla corrosione e all'ossidazione e la colorazione dei suoi composti, trova largo impiego in ambito industriale. La domanda mondiale di cromo, nell'ultimo decennio, è aumentata del 5% ogni anno ed è passata da 15 milioni di tonnellate nel 2000 a 22 milioni di tonnellate nel 2007. Il 94% della cromite estratta ogni anno viene utilizzata per produrre leghe di ferro-cromo che vengono successivamente impiegate prevalentemente per la produzione di acciaio e acciaio inossidabile, il 4% viene impiegato per le fonderie e l'industria refrattaria ed infine il 2% viene utilizzato per la produzione di composti chimici del cromo. Tra questi il cromato di sodio rappresenta il composto primario da cui si ottengono un'altra varietà di composti che vengono impiegati nella concia-tura delle pelli, nella produzione di coloranti, nella finitura metallica (cromatura), e nella preservazione del legno (International Chromium Development Association, 2007).

1.2. Tossicità del cromo

Il cromo può esistere in vari stati di ossidazione (da -2 a +6), tuttavia Cr(III) e Cr(VI) sono le forme maggiormente stabili nell'ambiente (Zayed & Terry 2003). Il Cr(III) non è considerato un composto altamente tossico per gli organismi viventi (Amrani et al. 1999) sia perché forma composti poco insolubili, sia perché i complessi idrati del Cr(III) permeano con difficoltà le membrane biologiche (Cohen et al. 1993; Czako-Ver et al. 1999). Il Cr(III) rappresenta un micronutriente essenziale nei mammiferi in quanto è un costituente del fattore di tolleranza al glucosio, un complesso molecolare il cui ruolo sembra quello di promuovere la rimozione del glucosio dal sangue potenziando l'attività dell'insulina (Sreekanth et al. 2008).

Il Cr(VI) è un composto altamente tossico con dimostrata attività mutagena (Petrilli & De Flora 1977) ed è classificato dalla USEPA come composto cancerogeno per l'uomo (gruppo A) [USEPA 1982 Integrated risk information system (IRIS) US Environmental Protection Agency, Environmental criteria and Assessment Office, June 2 1992, Cincinnati, OH]. E' ampiamente riconosciuto, sulla base di numerose evidenze epidemiologiche, che l'esposizione occupazionale al Cr(VI) favorisce l'insorgenza di neoplasie polmonari e nasali (Langard 1990; Gibb et al. 2000). In un recente studio del National Toxicology Program (NTP Technical Report on the toxicology and carcinogenesis studies of sodium dichromate hidydrate in F344/N rats and B6C3F1 mice. NIH Publication 07-5887, 2007) in cui sono stati valutati, per tre mesi di sperimentazione, gli effetti dell'ingestione di Cr(VI) attraverso l'acqua potabile in topi e in ratti, è stato osservato un aumento dell'incidenza di formazioni neoplastiche a carico del cavo orale e dell'intestino. Gli esperimenti condotti hanno messo in evidenza anche segni di tossicità a livello del fegato e di altri organi interni, indicando che il Cr(VI) non viene completamente neutralizzato dai sistemi di detossificazione del

tratto gastrointestinale e riesce a penetrare nella circolazione sistemica. E' stato dimostrato, in uno studio condotto su un gruppo di volontari umani, che l'ingestione di acque contenenti Cr(VI) determina un significativo aumento del contenuto in Cr(VI) a livello eritrocitario (Zhitkovich 2005): tale dato supporta ulteriormente l'ipotesi che il Cr(VI) ingerito attraverso le acque possa penetrare nella circolazione sistemica. Complessivamente questi studi hanno evidenziato che la pericolosità del cromo per la salute umana non è limitata ai luoghi di lavoro, ma può estendersi ad una più ampia fascia di popolazione umana attraverso l'ingestione di acque contaminate.

Studi condotti allo scopo di valutare gli effetti indotti da Cr(VI) a livello cellulare hanno dimostrato che cellule esposte a Cr(VI) subiscono vari tipi di lesioni alle principali macromolecole tra le quali lipidi (Scocciati et al. 2008), proteine (Sumner et al. 2005) ed acidi nucleici. In presenza di Cr(VI) il DNA può subire lesioni sia a livello delle basi azotate sia a livello dello scheletro zucchero-fosfato, in particolare sono state osservate rotture delle eliche del DNA, formazione di legami covalenti crociati tra le due eliche, formazione di legami stabili del DNA con proteine, formazione di addotti con il cromo, ossidazioni delle basi azotate e formazione di siti abasici (Salnikow & Zhitkovich 2008; Stearns & Wetterhahn 1997; Sugden et al. 2001; Voitkun et al. 1998). Tali danni cellulari indotti dal Cr(VI) dipendono dal processo di riduzione che esso subisce una volta penetrato nella cellula. Il cromato [Cr(VI)], un anione che forma sali prevalentemente solubili, attraversa facilmente le membrane cellulari sfruttando i canali del solfato poiché presenta una forte similarità strutturale con tale ione

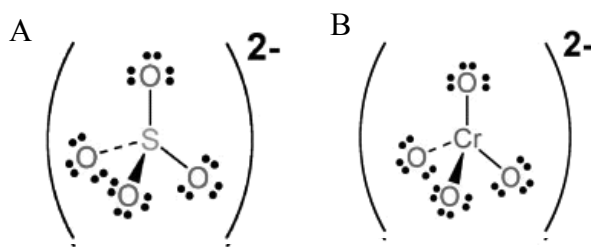


Figura 1.2. Struttura degli ioni solfato (A) e cromato (B).

(figura 1.2) (Cervantes et al. 2001). E' stato stimato che in cellule umane e in quelle di altri mammiferi esposte a cromato si verifica un forte accumulo

intracellulare di Cr(VI) con concentrazioni da 10 a 100 volte più elevate rispetto a quella esterna (Messer et al. 2006; Reynolds et al. 2007; Reynolds & Zhitkovich 2007). Il cromato, una volta penetrato all'interno della cellula, va incontro a processi di riduzione che coinvolgono molecole riducenti quali l'ascorbato, il glutatione, la cisteina, la riboflavina o l'intervento di vari tipi di enzimi (De Flora & Wetterhahn 1989; Johannes et al. 2008) che portano alla formazione di Cr(V), Cr(IV) (Bose et al. 1992; Kalabegishvili et al. 2003; Lay & Levina 1998; Myers et al. 2000; Stearns & Wetterhahn 1997; Suzuki et al. 1992) ed infine Cr(III), che rappresenta una forma termodinamicamente stabile (Dillon et al. 1997; Ortega et al. 2005). Cr(V) e Cr(IV) sono

composti molto reattivi e possono direttamente danneggiare le macromolecole cellulari. E' stato inoltre dimostrato che il Cr(V), essendo altamente instabile, non appena formato si ossida nuovamente a Cr(VI) reagendo con l'ossigeno molecolare in un processo ciclico che porta alla formazione di numerose specie reattive dell'ossigeno (ROS: reactive oxygen species) (Ackerley et al. 2004). Lo stress ossidativo subito dalla cellula in seguito alla formazione di ROS potrebbe essere almeno in parte responsabile della tossicità cellulare del Cr(VI). E' stato, ad esempio, dimostrato che la tossicità del cromato in cellule di lievito è principalmente dovuta ad un esteso danno ossidativo subito dalle proteine cellulari (Sumner et al. 2005). Il Cr(III), prodotto dalla riduzione intracellulare del Cr(VI), può costituire la forma prevalente di cromo all'interno della cellula (Sugiyama et al. 1991) ed è probabile che esso possa indurre danno al DNA. Infatti, studi condotti in vitro hanno dimostrato che il Cr(III) in presenza di perossido di idrogeno può indurre rotture nelle singole eliche del DNA od ossidazione delle basi azotate (Tsou et al. 1996), inoltre a basse concentrazioni il Cr(III) riduce la fedeltà della replicazione della DNA polimerasi inducendo mutazioni (Snow & Xu 1991), mentre a elevate concentrazioni provoca la formazione di legami covalenti tra le due eliche del DNA (Bridgewater et al. 1994).

1.3. Il cromo nel suolo

La forma trivalente del cromo è quella maggiormente stabile e rappresentata in natura. Nel suolo, a valori di pH alcalini o debolmente acidi, il Cr(III) tende a precipitare sottoforma di composti insolubili e si trova prevalentemente come $\text{Cr}(\text{OH})_3$ o, in presenza di Fe(III), come $(\text{Cr}_x, \text{Fe}_{1-x})(\text{OH})_3$ (Bartlett & Kimble 1976; Sass & Ray 1987). La solubilità del Cr(III) nel suolo può aumentare in seguito alla formazione di complessi con molecole o ioni di piccole dimensioni, diversi dallo ione idrossido (OH^-). I complessi del Cr(III) con molecole organiche ad elevato peso molecolare, come gli acidi umici del suolo, presentano invece una limitata solubilità e quindi la maggior parte del Cr(III) è immobilizzata (Kotas & Stasicka 2000).

Il Cr(VI) può trovarsi in forme diverse e la percentuale relativa di ognuna dipende sia dal pH sia dalla concentrazione totale del Cr(VI) (Kotas & Stasicka 2000). In figura 1.3 viene illustrata l'abbondanza relativa delle diverse specie di Cr(VI) in funzione del pH, per una concentrazione totale di Cr(VI) pari a 10^{-6} M. A valori di pH superiori a 7 prevale la forma CrO_4^{2-} , mentre a valori di pH acidi prevale la forma HCrO_4^- . In condizioni acide, quando la concentrazione del Cr(VI) totale supera 10^{-2} M, il HCrO_4^- tende a condensare formando lo ione $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ secondo la seguente reazione: $2 \text{HCrO}_4^- \leftrightarrow \text{Cr}_2\text{O}_7^{2-} + \text{H}_2\text{O}$. Nelle condizioni di pH tipiche del suolo il Cr(VI) si trova nelle forme HCrO_4^- , CrO_4^{2-} e $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (Kotas & Stasicka 2000) che presentano un'elevata solubilità nel suolo soprattutto in condizioni alcaline e debolmente acide

(Zachara et al. 1989). A pH acidi la mobilità del cromato può diminuire perché in queste condizioni le superfici minerali di ossidi di ferro e alluminio acquisiscono

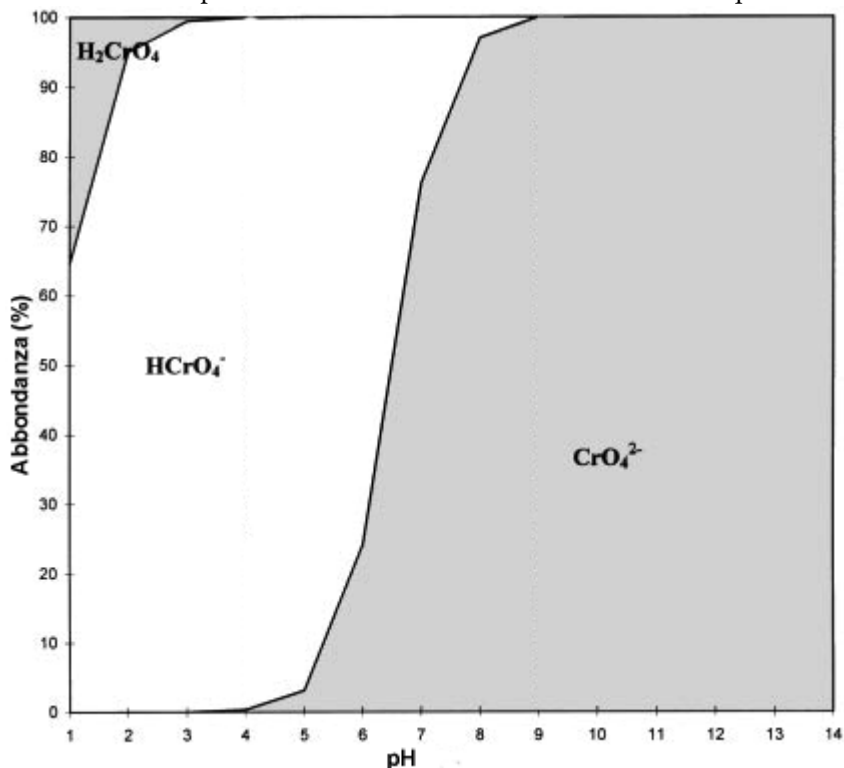


Figura 1.3. Abbondanza percentuale delle specie H_2CrO_4 , HCrO_4^- e CrO_4^{2-} in soluzione acquosa in dipendenza dal pH, ad una concentrazione totale di Cr(VI) pari a 1×10^{-6} M [da Kotas & Stasicka (2000), modificata].

carica positiva e possono assorbire il cromato, limitandone la mobilità. Comunque la competizione esercitata da altri anioni del suolo (SO_4^{2-} , HCO_3^-) per il legame alle superfici minerali riduce la quantità di cromato che si lega alle particelle di suolo e conseguentemente la mobilità del Cr(VI) risulta in genere elevata anche in suoli acidi (Zachara et al. 1987).

Nei suoli il Cr(VI) ha principalmente origine antropica e viene rapidamente ridotto a Cr(III) (Rai et al. 1989). Il principale fattore abiotico che nel suolo influenza la riduzione del Cr(VI) a Cr(III) è rappresentato dal potenziale redox. In condizioni riducenti il Cr(VI) viene ridotto a Cr(III) tramite reazioni redox con specie inorganiche disciolte in acqua (Fe^{2+} , S^{2-}), dal trasferimento di elettroni alle superfici minerali o da reazioni con sostanze organiche quali sostanze umiche, carboidrati e proteine. La riduzione del Cr(VI) dipende inoltre dal valore del pH e tende ad aumentare con l'abbassarsi del pH.

In alcuni casi il Cr(III) può essere ossidato a Cr(VI) (Bartlett & James 1979): qualora il Cr(III), mobilizzato dal legame con piccole molecole organiche come ad esempio, acido citrico o acido fulvico, venga a contatto con ossidi e/o idrossidi di manganese [Mn(III), Mn(IV)], può essere ossidato a Cr(VI) con conseguente formazione di Mn(II) che viene ossidato nuovamente a MnO₂ dall'ossigeno atmosferico. Quindi il Cr(III) può essere convertito in Cr(VI) in suoli umidi e ben areati contenenti ossidi e/o idrossidi di manganese e molecole organiche capaci di mobilizzare il Cr(III). Globalmente i processi che nel suolo trasformano il Cr(III) in Cr(VI) e viceversa formano un ciclo, le cui fasi vengono schematicamente rappresentate in figura 1.4.

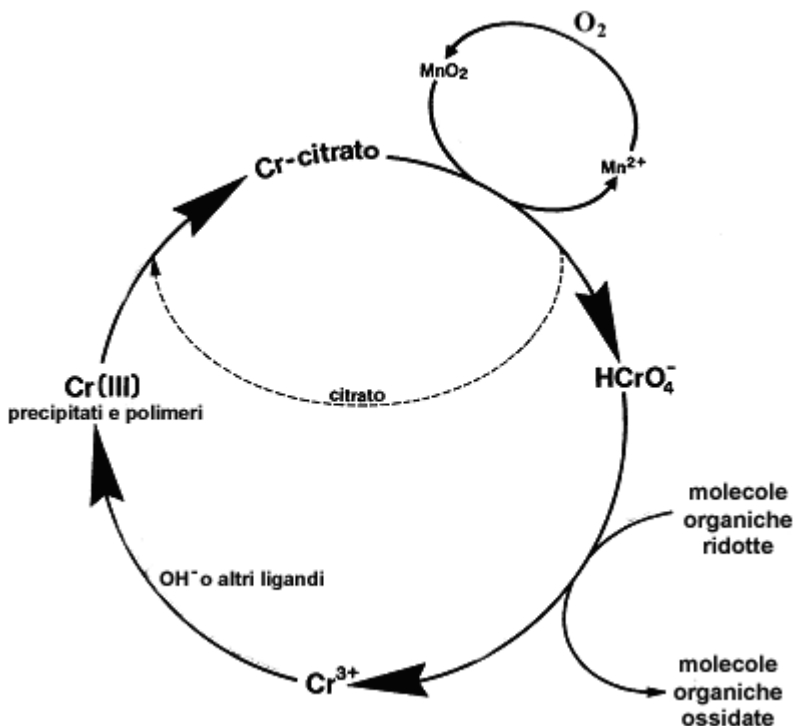


Figura 1.4. Rappresentazione schematica del ciclo del cromo nel suolo [da Bartlett (1991), modificata].

James e collaboratori (1997) hanno proposto un modello che permette di valutare il livello del Cr(VI) nel suolo tenendo conto dei principali fattori abiotici (presenza di sostanza organica, di ossidi e/o idrossidi di manganese, valore del pH) che influenzano le reazioni di riduzione del Cr(VI) e di ossidazione del Cr(III) (figura 1.5). Occorre comunque considerare che il destino del cromo nel suolo viene influenzato non soltanto da fattori abiotici ma anche dall'attività dei microrganismi. Numerosi mi-

crorganismi presenti nel suolo hanno infatti la capacità di ridurre il Cr(VI) a Cr(III) (paragrafo 1.2.1).

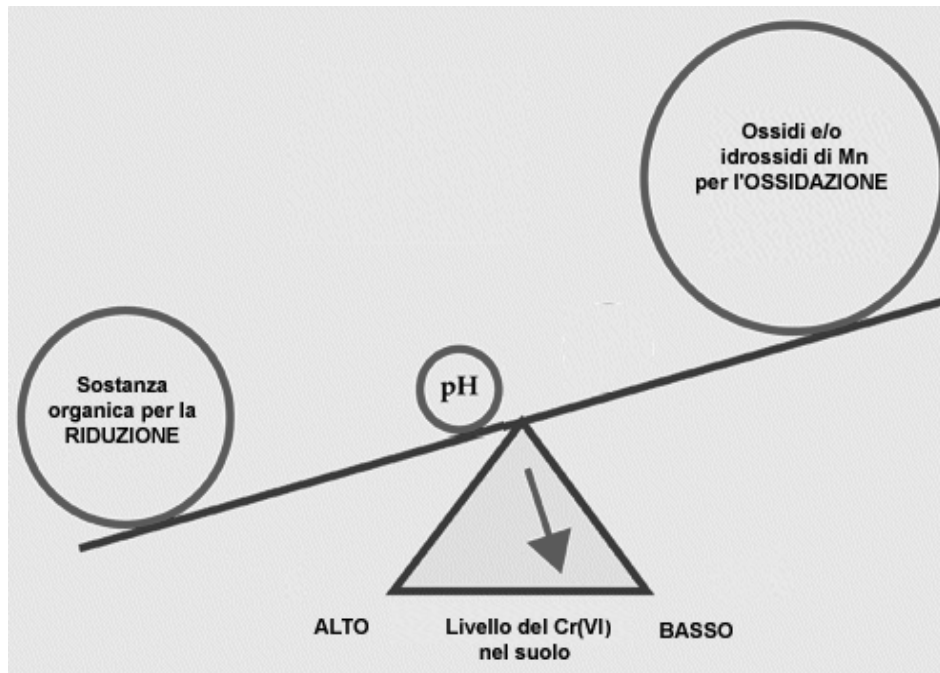


Figura 1.5. Equilibrio tra ossidazione del Cr(III) e riduzione del Cr(VI). Il volume delle due sfere contenente gli ossidi e/o idrossidi di manganese e la sostanza organica sono proporzionali alla quantità di agenti ossidanti e riducenti rispettivamente; la distanza dal fulcro della bilancia rappresenta la loro reattività. La piccola sfera che indica il pH si muove verso destra all'aumentare del valore del pH determinando un aumento del potere ossidativo del suolo nei confronti del Cr(III), e verso sinistra al diminuire del valore del pH aumentando la riduzione del Cr(VI). La posizione finale dell'ago della bilancia, determinata dalla posizione e dal volume delle tre sfere, indica il livello di Cr(VI) nel suolo [da James *et al.* (1997), modificata].

1.4. Contaminazione ambientale da cromo

Le attività antropiche hanno portato ad un aumento significativo del contenuto di cromo nel suolo. I maggiori contributi all'immissione di cromo nell'ambiente sono dovute a varie attività industriali (placcatura al cromo, verniciatura, attività metallurgica, preservazione del legno e conciatura) (Bini *et al.* 2008) che, in seguito ad una gestione non corretta dei processi di lavorazione e dello smaltimento dei residui industriali, possono rilasciare grandi quantitativi di cromo nell'ambiente (Salunkhe *et al.* 1998). Pratiche agronomiche che prevedono l'impiego di fanghi di depurazione,

compost e residui di conceria come ammendanti e fertilizzanti, contribuiscono ulteriormente all'introduzione di cromo nel suolo (Bini et al. 2000; Mc Grath 1995).

Il Cr(VI) che viene rilasciato nel suolo può venir ossidato a Cr(III), tuttavia, qualora la capacità riducente del suolo non sia sufficiente per trasformare tutto il Cr(VI) introdotto in Cr(III), il Cr(VI) può persistere (Rai et al. 1989). Il Cr(VI) che permane nel suolo, a causa della sua elevata mobilità, può essere facilmente dilavato e causare contaminazione delle acque superficiali e di falda.

La contaminazione dei suoli con composti del Cr(III) riceve minore attenzione in virtù della loro scarsa mobilità e tossicità, ma occorre considerare che, come sopra riportato, in suoli ricchi di ossidi e/o idrossidi di manganese può verificarsi l'ossidazione del Cr(III) a Cr(VI) (Bartlett & James 1979), con conseguente accumulo di Cr(VI) nel suolo. Secondo la stima dell'European Pollutant Emission Register (EPER) riferita all'anno 2004, l'Europa emette annualmente nell'ambiente 1109,86 tonnellate di cromo e l'Italia rappresenta il secondo paese che maggiormente contribuisce a tale emissione (14,7% delle emissioni totali), preceduto dalla Francia (58,0%) e seguito dalla Germania (4,2%) e dal Regno Unito (3,6%). In Italia la contaminazione dei suoli e delle acque con Cr(VI) rappresenta un problema grave e molto diffuso. Sono stati individuati numerosi casi di inquinamento da cromato, che ha portato ad un contenuto di Cr(VI) nelle acque di falda molto più elevato rispetto al limite di 5 µg/l imposto dalla normativa italiana (D.M. 471/99). Uno dei casi più conosciuti è il disastro ambientale causato dalla Stoppani, un'azienda specializzata nella produzione di sali di cromo, con sede a Cogoleto in provincia di Genova. Il Decreto del Presidente del Consiglio dei Ministri del 23 Novembre 2006 ha stabilito lo stato di emergenza per la Stoppani, che in trenta anni di attività ha portato ad una elevatissima e diffusa contaminazione di cromo esavalente delle acque sotterranee, superficiali e di battigia per molti Km² intorno alla fabbrica. L'attività dell'industria galvanica Tricom, operante dal 1974 fino al 2003 a Tezze sul Brenta in provincia di Vicenza, ha causato la contaminazione da Cr(VI) di una falda freatica che si estende nei comuni di Cittadella, Fontaniva e Tezze sul Brenta. Nel 2001, a causa degli elevati livelli di Cr(VI) misurati nelle acque di falda, è stato vietato il consumo di acqua prelevata dai pozzi nel comune di Cittadella (Ordinanza di Cittadella del 10 settembre 2001). Nel comune di Torino le Acciaierie Vitali, operanti dal 1900 fino al 1989, hanno determinato un ampio inquinamento del suolo e delle acque di falda. A seguito di un intervento di caratterizzazione della zona contaminata è stato proposto un progetto di risanamento, approvato nel 2003 (delibera n. 51 del 28 marzo 2003 del dirigente del Settore Tutela Ambiente del Comune di Torino). Nel 2008, a Spinetta Marengo, in provincia di Alessandria, è stato rilevato inquinamento da Cr(VI) di una falda acquifera di un'area sulla quale insiste uno stabilimento in cui fino agli anni settanta è stata attiva la produzione di pigmenti da parte dell'azienda Montedison. L'importanza della problematica dell'inquinamento da cromo in Italia è stata stigmatizzata da una giornata di stu-

dio, organizzata dal Gruppo di Scientifico Italiano di Studio e Ricerche (GSISR), tenutasi a Milano il 9 febbraio 2004, su “Esperienza di applicazione del D.M. 471/99, valori di fondo, serbatoi interrati, inquinamento da cromo, movimentazione, materiali di scavo” nella quale il tema del cromo è stato trattato insieme alle maggiori tematiche legate alla contaminazione dei suoli.

A livello internazionale Pakistan ed India costituiscono due paesi in cui il problema della contaminazione ambientale da cromo è particolarmente grave, a causa di un forte sviluppo dell'industria conciaria verificatosi negli ultimi decenni (Gupta & Sinha 2006; ur Rahman & Sakano 2001). E' stato stimato che in India vengono rilasciate annualmente nell'ambiente solo dall'attività di concitura delle pelli da 2000 a 3200 tonnellate di cromo, con concentrazioni di cromo negli effluenti da 2000 a 5000 mg/l (Chandra et al. 1999). Questo forte rilascio di cromo nell'ambiente si riflette pesantemente sullo stato del suolo e delle acque sotterranee. A Kapnur (India), un importante centro industriale con attività prevalente nel settore del trattamento delle pelli, sono stati rilevati nel 1997 livelli di Cr(VI) nelle acque sotterranee superiori a 5 mg/l. Un forte contributo all'inquinamento da cromo in India è dato anche all'attività di estrazione della cromite. Nello stato indiano di Orissa si trova la valle di Sukinda da cui viene estratto il 97% della cromite di origine indiana e in settanta anni di attività estrattiva le acque impiegate nelle miniere per lavare il minerale sono state rilasciate in campo aperto con conseguente grave contaminazione dei suoli e dei corpi idrici della zona.

Numerosi casi di contaminazione da cromo sono noti anche negli Stati Uniti: è stato stimato dall'USEPA che le industrie statunitensi utilizzano più di 50000 tonnellate di cromo ogni anno e ne rilasciano 4500 Kg/giorno nell'ambiente (Tseng & Bielefeld 2002). Il caso forse più conosciuto di inquinamento da cromo esavalente negli Stati Uniti è quello dovuto all'attività dell'azienda Pacific Gas and Electric Company verificatosi a Hinkley in California e descritto nel film “Erin Brockovich”. Esistono comunque numerosi altri casi documentati, come riportato dalla “National Priority List” della USEPA che riporta 296 siti negli Stati Uniti contaminati da cromo. Di seguito vengono riportati tre esempi. L'attività dell'American Celcure Wood Preserving Corporation (Celcure) un'azienda con sede a Jacksonville, in Florida, (operante per trenta anni nel trattamento preservativo del legno e chiusa nel 1981) ha causato un forte inquinamento delle acque sotterranee. Ad Odessa in Texas la falda freatica presenta tre zone di contaminazione dovute l'attività di tre aziende che hanno operato nel settore della placcatura al cromo per circa venti anni. Nella provincia di Hudson (New Jersey), in cui dal 1905 al 1976 sono state attive industrie per la produzione di cromato e dicromato, sono presenti 130 siti contaminati con residui di lavorazione della cromite (figura 1.6). Nel 15% dei casi la concentrazione di cromo totale nel suolo è maggiore di 10000 mg/Kg, con percentuali di Cr(VI) variabili tra 1 e 50% (Burke et al. 1991).



Figura 1.6. Sito altamente contaminato da residui di lavorazione della cromite nella contea di Hudson. La colorazione gialla del suolo è dovuta alla presenza di cromato [da Burke *et al.* (1991), modificata].

La contaminazione ambientale da cromo è un problema presente anche in Oceania. E' stato riportato che in Nuova Zelanda l'industria conciaria e del legno producono ogni anno rispettivamente 6400 e 1600 tonnellate di acque reflue considerate la fonte principale di contaminazione da cromo del suolo e delle acque (Carey et al. 1996).

Quanto sopra riportato fornisce soltanto una visione limitata del problema dell'inquinamento da cromo nel mondo. Gli esempi descritti infatti rappresentano soltanto una piccola parte dei casi documentati ed anche qualora fosse possibile ottenere una lista completa dei siti mondiali con una dimostrata contaminazione da cromo, questa non sarebbe esaustiva poiché in alcuni paesi, nei quali si è avuto un forte sviluppo industriale senza una concomitante gestione dei rifiuti prodotti dalle industrie, l'inquinamento da cromo non è ben documentato.

2. Interazioni tra cromo e batteri

2.1. Tossicità del Cr(VI) nei batteri e meccanismi di resistenza batterica al Cr(VI)

Il Cr(VI) penetra nelle cellule batteriche sottoforma di cromato sfruttando i canali di ingresso dello ione solfato (Cervantes et al. 2001). Come già descritto nel paragrafo 1.1.2, la riduzione intracellulare del Cr(VI) a Cr(III) determina la formazione di specie instabili del cromo [Cr(V) e Cr(IV)] e di specie reattive dell'ossigeno che provocano danno alle macromolecole cellulari e in particolare al DNA (Cervantes et al. 2001; Petrilli & De Flora 1977). La morte batterica, che può conseguire in seguito ad esposizione a Cr(VI), è dovuta all'accumularsi di numerosi danni cellulari che impediscono la sopravvivenza del microrganismo (Aertsen & Michiels 2004). Un ulteriore fattore che può contribuire alla morte di batteri esposti a cromato consiste nell'attivazione di profagi che possono trovarsi integrati nel genoma batterico. In *Shewanella oneidensis* MR-1 è stato infatti ipotizzato che il Cr(VI) e/o il Cr(III), che si accumula nella cellula in seguito alla riduzione del Cr(VI), possano attivare il ciclo litico dei profagi, poiché in presenza di Cr(VI) si verifica una forte sovraespressione dei geni di tre profagi integrati nel genoma (Middleton et al. 2003).

Tabella 1.1. Principali ceppi batterici resistenti al Cr(VI) (isolati successivamente all'anno 1998) [da Viti & Giovannetti (2007), modificata].

Ceppo Batterico	Resistenza al Cr(VI) (mg/l)	Riferimento bibliografico
<i>Exiguobacterium</i> sp. ZM-2	643	(Alam & Malik 2008)
<i>Ochrobactrum</i> sp. CSCr-3	800	(He et al. 2009)
<i>Brevibacterium</i> sp.	2600	(Faisal & Hasnain 2004)
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	2600	(Faisal & Hasnain 2004)
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i>	500	(Camargo et al. 2003)
<i>Bacillus maroccanus</i> ChrA21	1040	(Viti et al. 2003)
<i>Bacillus</i> sp. ES29	1500	(Camargo et al. 2003)
<i>Bacillus cereus</i> ES04	1500	(Camargo et al. 2003)
<i>Corynebacterium hoagii</i> ChrB20	1144	(Viti et al. 2003)
<i>Bacillus circulans</i>	100	(Srinath et al. 2002)
<i>Bacillus megaterium</i>	150	(Srinath et al. 2002)
<i>Frankia</i> sp.	52-91	(Richards et al. 2002)
<i>Ochrobactrum tritici</i> 5bv11	>2600	(Francisco et al. 2002)
<i>Pseudomonas</i> sp. CRB5	520	(McLean & Beveridge 2001)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	52	(Badar et al. 2000)

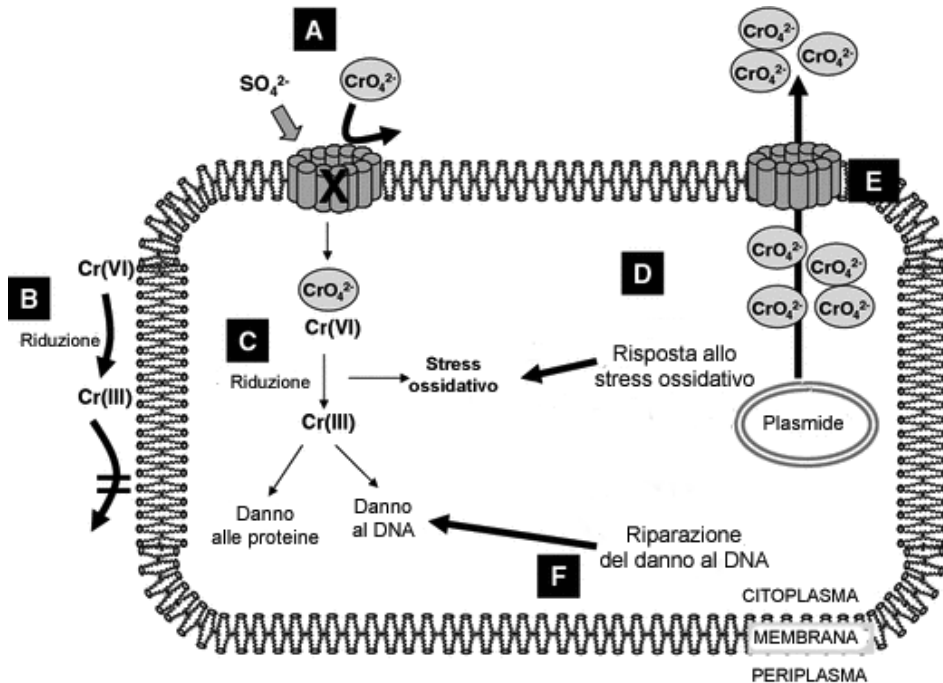


Figura 1.7. Principali meccanismi di tossicità e resistenza al Cr(VI) nei batteri. I meccanismi di tossicità e resistenza sono rappresentati rispettivamente da frecce sottili e spesse. A) Sistema di trasporto del solfato, la cui inattivazione (X) può bloccare l'ingresso del cromato, B) riduzione extracellulare del Cr(VI) a Cr(III), C) riduzione intracellulare del Cr(VI) a Cr(III) che può generare stress ossidativo e danno a proteine e DNA, D) risposta allo stress ossidativo che riduce gli effetti tossici causati dal Cr(VI), E) pompe di efflusso che estrudono il Cr(VI) dalla cellula, che possono avere localizzazione plasmidica, F) riparazione dei danni al DNA indotti da Cr(VI) [da Ramirez-Diaz (2008), modificata].

In natura esistono batteri in grado di sopravvivere ed accrescersi anche in presenza di elevate concentrazioni di Cr(VI) (tabella 1.1) mettendo in atto meccanismi di tolleranza e resistenza al Cr(VI). I concetti di tolleranza e resistenza ai metalli pesanti hanno due significati diversi. Secondo Gadd (1992a) la "resistenza" può essere definita come la capacità dei microrganismi di sopravvivere agli effetti tossici di un metallo mediante meccanismi di detossificazione messi in atto in diretta risposta alla presenza del metallo. La trasformazione di cationi metallici in forme meno tossiche o volatili, la riduzione della permeabilità della membrana cellulare, la produzione di proteine come, ad esempio, le metallotionine nei lieviti (Butt & Acker 1987) e nei cianobatteri (Silver & Phung 1996) sono alcuni dei meccanismi più comuni di resistenza. Gadd (1992a) definisce la "tolleranza" come l'abilità dei microrganismi di sopravvivere all'azione tossica dei metalli grazie a intrinseche proprietà che limitano la tossicità del metallo, quali la composizione della parete cellulare, la produzione di polisaccaridi

esacellulari, l'escrezione di metaboliti capaci di legare o precipitare i metalli pesanti convertendoli in forme innocue (Gadd 1992b). Tali meccanismi sono stati anche definiti come "meccanismi gratuiti di resistenza" (Gadd & Griffiths 1978). In ogni caso la distinzione fra tolleranza e resistenza è difficile in quanto, spesso, i microrganismi si avvalgono contemporaneamente sia di meccanismi diretti (resistenza) che di meccanismi indiretti (tolleranza) per sopravvivere in presenza di metalli pesanti.

Uno dei principali meccanismi di tolleranza al Cr(VI) nei batteri consiste nel bioassorbimento ossia nel legame del Cr(VI), o del Cr(III) prodotto dalla riduzione abiotica del Cr(VI), con le componenti della superficie batterica (Han et al. 2006; Ozturk & Aslim 2008; Quintelas et al. 2008).

I principali meccanismi batterici di resistenza al Cr(VI) ad oggi noti (figura 1.7) possono dipendere da geni localizzati sia a livello cromosomico sia a livello plasmidico. Generalmente i geni plasmidici codificano trasportatori di membrana che mediano l'efflusso del cromato dalla cellula. I geni cromosomici sono invece coinvolti nella riduzione del Cr(VI), nella detossificazione dei radicali liberi che si creano nella cellula in seguito al metabolismo del Cr(VI), nella riparazione dei danni indotti al DNA e nell'omeostasi del ferro e dello zolfo (Ramirez-Diaz et al. 2008).

Efflusso del cromato. Il cromato, una volta penetrato all'interno della cellula mediante i trasportatori del solfato, può essere estruso tramite pompe di efflusso inserite nella membrana citoplasmatica. La pompa di efflusso più studiata è ChrA, inizialmente caratterizzata in *P. aeruginosa* (Cervantes et al. 1990) e *Cupriavidus metallidurans* (precedentemente nominata *Ralstonia metallidurans*) (Nies et al. 1990), ed il cui gene è stato successivamente individuato nel genoma di diversi procarioti (Diaz-Perez et al. 2007). In *P. aeruginosa* *chrA* si localizza sul plasmide pUM505, mentre in *C. metallidurans* si trova sia sul plasmide pMOL28 sia sul cromosoma (Nies et al. 1990). In alcuni batteri *chrA* è inserito all'interno di trasposoni, ad esempio nel trasposone Tn5719 del plasmide pB4 di un batterio non coltivabile (Tauch et al. 2003), in un trasposone del plasmide pCNB1 di *Comamonas* CNB-1 (Ma et al. 2007) ed infine nel trasposone TnOtChr cromosomico di *Ochrobactrum tritici* 5bv11 (Branco et al. 2008). Gli elementi mobili su cui si localizza il gene *chrA* possono essere trasmessi orizzontalmente nelle popolazioni batteriche favorendo la diffusione della resistenza al cromato in specie diverse.

In *C. metallidurans* il gene *chrA* si trova in un operone con *chrB*, anch'esso necessario per l'efflusso del cromato. È stato proposto che il prodotto proteico codificato da *chrB* possa attivare l'efflusso del cromato tramite l'interazione con la proteina ChrA oppure agendo come un regolatore trascrizionale che induce l'espressione dell'operone *chrAB* in risposta al Cr(VI) (Branco et al. 2008; Peitzsch et al. 1998) (figura 1.8).

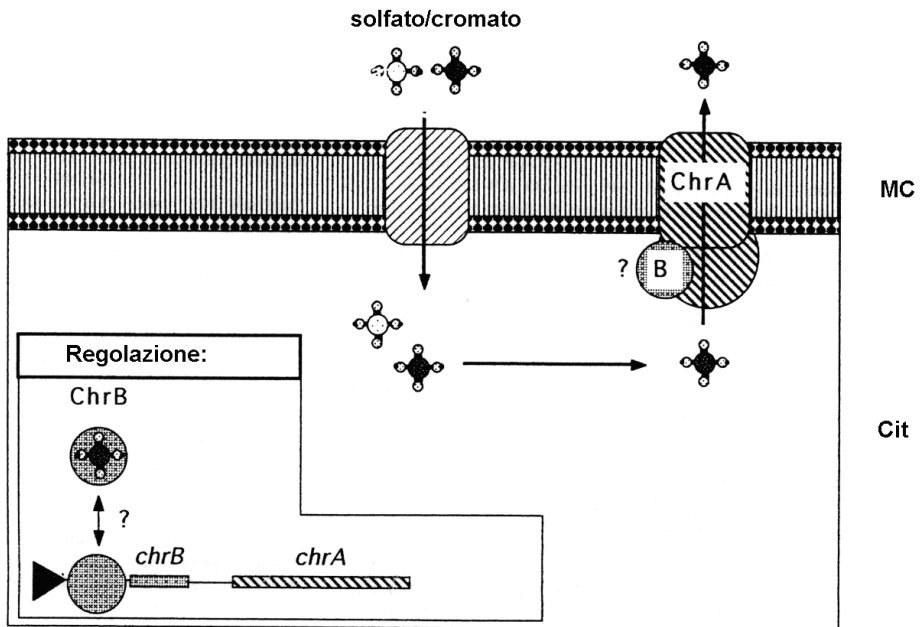


Figura 1.8. Trasporto del cromato in *C. metallidurans*. Il cromato è trasportato nella cellula attraverso il sistema di trasporto del solfato. Il cromato, ad alte concentrazioni, è “pompat” fuori dalla cellula dalla proteina ChrA (forse associata con la proteina ChrB). L’operone *chrAB* può essere regolato dalla proteina ChrB. MC: membrana citoplasmatica; Cit: citoplasma

Sistemi di protezione contro lo stress ossidativo. Un importante contributo alla resistenza batterica al Cr(VI) è dato da enzimi coinvolti nella neutralizzazione di specie altamente reattive che si formano durante la riduzione del Cr(VI) a Cr(III) e nel mantenimento del corretto stato redox della cellula. In *E. coli* è stato dimostrato che gli enzimi superossido dismutasi (SOD) e catalasi hanno un ruolo importante nella protezione dallo stress indotto da Cr(VI) (Ackerley et al. 2006) poiché consentono di detossificare lo ione superossido e il perossido di idrogeno. La SOD trasforma lo ione superossido in acqua ossigenata e questa viene a sua volta neutralizzata dall’azione della catalasi che la trasforma in acqua.

Un ampio studio di trascrittomico condotto per valutare la risposta di *Caulobacter crescentus* a vari metalli pesanti ha messo in luce che questo batterio, in risposta al Cr(VI), attiva alcuni geni coinvolti nella risposta allo stress ossidativo, tra cui i geni codificanti per la SOD, per la glutazione S-transferasi, per la tioredossina e per la peptidasi metionina solfossido riduttasi (Hu et al 2005). La glutazione S-transferasi è un enzima la cui funzione consiste nel legare composti tossici (prodotti xenobiotici o dello stress ossidativo) al glutatione, favorendo in tal modo la loro rimozione dalla cellula (Hu et al. 2005). La tioredossina, un enzima coinvolto nel mantenimento dello stato redox della cellula, promuove la riduzione dei ponti disolfuro che si creano nelle

proteine in seguito all'esposizione ad agenti ossidanti. La peptide metionina solfossido reduttasi, in un processo che coinvolge anche la tioredossina, favorisce il recupero dei residui di metionina ossidati (Hu et al. 2005). In *Shewanella oneidensis* MR-1 esposta al Cr(VI), per brevi periodi, è stato osservato un aumento dell'espressione dei geni codificanti la catalasi e una proteina antiossidante appartenente alla famiglia Ahp/Tsa (Brown et al. 2006), mentre un'esposizione protratta più a lungo causa induzione di geni codificanti tioredossine e glutaredossine (Chourey et al. 2006). Il ruolo primario delle glutaredossine consiste nel partecipare alla sintesi dei deossiribonucleotidi mediata dall'enzima ribonucleotide reduttasi (Hu et al. 2005), tuttavia esse svolgono un'importante funzione anche nella risposta allo stress ossidativo: in condizioni di stress ossidativo i residui di cisteina delle proteine possono formare legami disolfuro con il glutatione (Bellomo et al. 1987) compromettendo la funzionalità delle proteine stesse, le glutaredossine avrebbero il ruolo di rimuovere tali modificazioni liberando i residui di cisteina dal legame con il glutatione (Li et al. 2005). Il glutatione è un'importante molecola antiossidante che partecipa alla protezione dallo stress ossidativo (Carmel-Harel & Storz 2000), tuttavia il suo ruolo nella risposta al Cr(VI) deve essere ancora chiarito. Si ritiene infatti che il glutatione possa interagire con il Cr(VI) riducendolo a Cr(V) con conseguente produzione di ROS e che inoltre possa favorire la formazione di rotture del DNA indotte da Cr(VI) e di addotti glutatione-Cr(III)-DNA (Ackerley et al. 2006). D'altra parte poiché in *E. coli* l'assenza di glutatione causa un aumento della tossicità del cromato, è stato ipotizzato che la capacità di detossificazione del glutatione compensi gli effetti negativi che possono prodursi in seguito alla sua interazione col Cr(VI) (Helbig et al. 2008).

Riparazione di danni al DNA. Un ruolo importante nella resistenza al Cr(VI) è attribuito ad enzimi coinvolti nella riparazione dei danni al DNA indotti da Cr(VI), che è un forte agente mutageno (Petrilli & De Flora 1977).

In *E. coli* il Cr(VI) induce il sistema SOS (Llagostera et al. 1986) che comprende un insieme di geni la cui espressione viene regolata dalle proteine RecA e LexA (figura 1.9).

La risposta SOS si attiva in seguito alla formazione di rotture a singola elica nel DNA e la sua principale funzione consiste nella riparazione del danno al DNA, tuttavia essa svolge un ruolo anche nell'attivazione di elementi genetici mobili, nell'arresto della divisione cellulare e nel controllo della respirazione (Aertsen & Michiels 2006). Il sistema SOS viene ritenuto un promotore dell'evoluzione batterica, infatti esso comprende DNA-polimerasi, coinvolte nella riparazione del danno al DNA, dette "inclinati all'errore" (error-prone) che introducono modificazioni nella sequenza in basi del DNA durante il processo di duplicazione del DNA (Smith & Walker 1998).

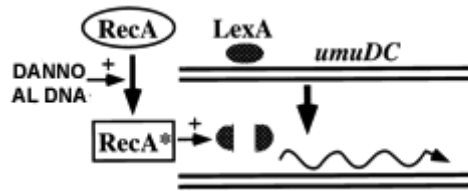


Figura 1.9 Regolazione dei geni del sistema SOS. In assenza di danno al DNA la proteina RecA è inattiva ed il repressore trascrizionale LexA si lega in corrispondenza dell'operatore dei geni del sistema SOS (ad es. *umuDC*), bloccandone la trascrizione. Rotture a singola elica nel DNA determinano l'attivazione della proteina RecA (RecA*) che interagendo con LexA ne determina la rottura. Il conseguente distacco di LexA dall'operatore attiva la trascrizione dei geni SOS

Un ruolo importante nel processo di riparazione del danno al DNA indotto da Cr(VI) è svolto dalle DNA elicasi, enzimi che permettono la separazione delle due eliche del DNA. In *P. aeruginosa* è stato dimostrato che le elicasi RecG e RuvB, coinvolte nella riparazione del danno al DNA mediante sistemi di ricombinazione, sono necessarie per la resistenza al Cr(VI) (Miranda et al. 2005). In *S. oneidensis* MR-1 è stato osservato un aumento dell'espressione delle elicasi codificate dai geni SO0368, *uvrD* e *hrpA* in seguito ad esposizione a cromato (Brown et al. 2006b). In *C. crescentus* esposto a Cr(VI) viene sovraespresso un gene codificante per RecA (Hu et al. 2005), una elicasi che, oltre a controllare l'attivazione del sistema SOS, è coinvolta nella riparazione del danno al DNA (Chen et al. 2008).

Modulazione del metabolismo dello zolfo. Studi volti a chiarire i meccanismi che stanno alla base della resistenza batterica al Cr(VI) hanno fatto ipotizzare che esiste una correlazione tra resistenza al Cr(VI) e metabolismo dello zolfo, infatti l'esposizione a Cr(VI) induce nei batteri la modulazione di geni coinvolti nel trasporto del solfato e nell'utilizzazione intracellulare dello zolfo (Brown et al. 2006b; Hu et al. 2005).

Modulazione del metabolismo del ferro. Gli studi di trascrittomica condotti su *S. oneidensis* MR-1 hanno mostrato che il Cr(VI) causa l'induzione di diversi geni codificanti proteine correlate al metabolismo del ferro: proteine che legano il ferro a livello intracellulare, enzimi per la biosintesi di siderofori, proteine per il trasporto intracellulare del ferro (Brown et al. 2006). La relazione tra metabolismo del ferro e resistenza al Cr(VI) è stata ulteriormente dimostrata studiando un mutante sensibile al Cr(VI) di *S. oneidensis* MR-1 alterato in un gene regolatorio coinvolto nell'attivazione di geni necessari per l'acquisizione del ferro e per il suo immagazzinamento cellulare (Chourey et al. 2008). È stato ipotizzato che la modulazione del metabolismo del ferro in batteri esposti a Cr(VI) possa avere la funzione di legare il ferro intracellulare in modo da impedire una possibile sinergia tra Cr(VI) e ferro nel promuovere lo stress ossidativo (Ramirez-Diaz et al. 2008). È noto infatti che il ferro, nella sua forma ridotta, convertendo il perossido di idrogeno nel radicale ossidrilico

attraverso la reazione di Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^-$) favorisce la formazione di radicali liberi nella cellula (Touati 2000).

Modulazione del metabolismo energetico. In studi di trascrittomico e proteomico condotti in *S. oneidensis* MR-1 e *C. crescentus* (Brown et al. 2006b; Hu et al. 2005; Thompson et al. 2007) è stato osservato che, in seguito ad esposizione a cromo, si verifica una sottoespressione di geni che codificano le componenti della catena degli elettroni per la respirazione aerobica ed in *S. oneidensis* MR-1 anche alcuni enzimi coinvolti nel metabolismo anaerobico.

Riduzione del Cr(VI) a Cr(III). La capacità di ridurre il Cr(VI) a Cr(III), piuttosto

Tabella 1.2. Principali ceppi batterici capaci di ridurre il Cr(VI) a Cr(III) (isolati successivamente all'anno 1998) [da Viti & Giovannetti (2007), modificata].

Ceppo batterico	Condizioni di riduzione	Riferimento bibliografico
<i>Exiguobacterium</i> sp. ZM-2	aereobiosi	(Alam & Malik 2008)
<i>Ochrobactrum</i> sp. CSCr-3	aereobiosi	(He et al. 2009)
<i>Burkholderia cepacia</i> MCMB-821	aereobiosi e anaereobiosi	(Revati Wani et al. 2007)
<i>Pseudomonas stutzeri</i> KC	aereobiosi	(Zawadzka et al. 2007)
<i>D. vulgaris</i> strain Hildenborough	anaereobiosi	(Goulhen et al. 2006)
<i>Cellulomonas flavigena</i>	anaereobiosi	(Xu et al. 2005)
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	aereobiosi	(Faisal & Hasnain 2004)
<i>Brevibacterium</i> sp.	aereobiosi	(Faisal & Hasnain 2004)
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	aerobiosi e anaereobiosi	(Middleton et al. 2003)
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i>	aereobiosi	(Camargo et al. 2003)
<i>Bacillus maroccanus</i> ChrA21	aereobiosi	(Viti et al. 2003)
<i>Bacillus</i> sp. ES29	aereobiosi	(Camargo et al. 2003)
<i>Corynebacterium hoagii</i> ChrB20	aereobiosi	(Viti et al. 2003)
<i>Cellulomonas</i> sp.	aereobiosi	(Sani et al. 2002)
<i>Bacillus</i> sp. ATCC 700729	aereobiosi	(Shakoori et al. 2000)
<i>Pseudomonas</i> sp. CRB5	aerobiosi e anaereobiosi	(McLean & Beveridge 2001)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	aereobiosi	(Badar et al. 2000)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A2Chr	aereobiosi	(Ganguli & Tripathi 1999)

diffusa tra i batteri (tabella 1.2), non è necessariamente correlata alla resistenza al Cr(VI) (Bopp & Erlich 1988). Infatti, esistono batteri sensibili al Cr(VI) ma capaci di ridurlo a Cr(III) e batteri resistenti al Cr(VI) che non hanno la capacità di ridurlo. È plausibile ipotizzare che la capacità di ridurre il Cr(VI) a Cr(III) rappresenti un meccanismo che favorisce la resistenza al cromo soltanto qualora essa avvenga a livello

extracellulare, in questo caso infatti il Cr(III) risulta scarsamente tossico poiché non riesce a penetrare nella cellula (Salnikow & Zhitkovich 2008).

Il processo di riduzione microbica del Cr(VI) può avvenire secondo due diverse modalità: riduzione indiretta o riduzione diretta. La riduzione microbica indiretta del Cr(VI) dipende dalla riduzione abiotica del Cr(VI) da parte di agenti riducenti che costituiscono composti terminali del metabolismo batterico (figura 1.10). I principali

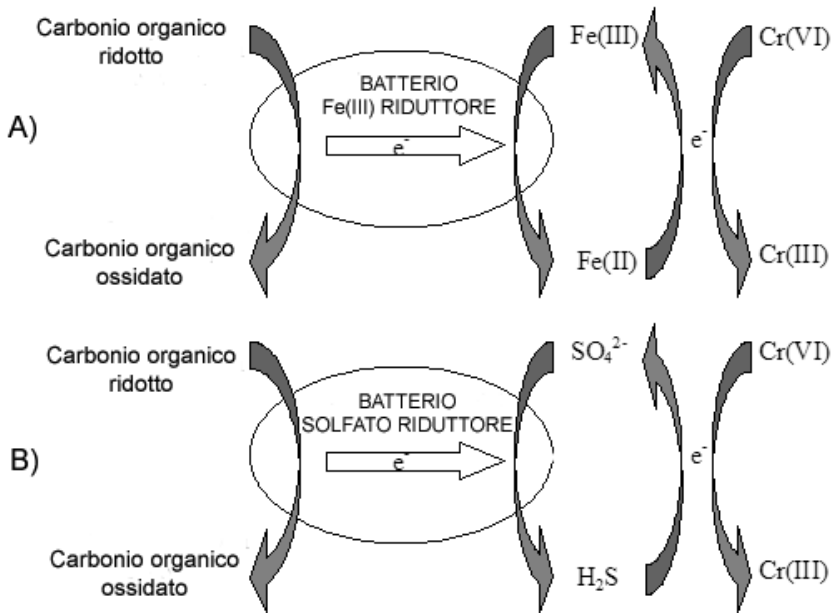


Figura 1.10. Riduzione batterica indiretta del Cr(VI) mediata da A) batteri che riducono il Fe(III) o B) da batteri che riducono il solfato.

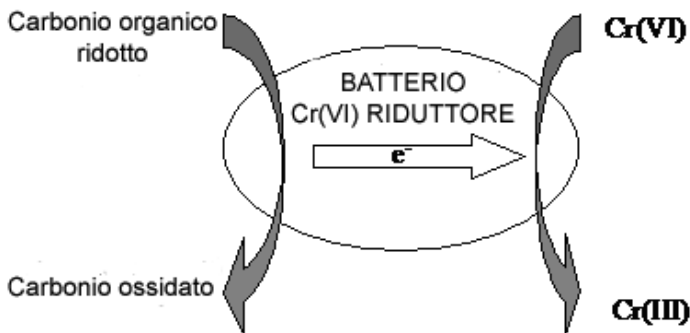


Figura 1.11 Riduzione batterica diretta del Cr(VI).

microrganismi che mediano la riduzione indiretta del Cr(VI) sono rappresentati dai batteri anaerobi ferro riduttori e solfato riduttori che impiegano il Fe^{3+} e il SO_4^{2-} come accettori finali di elettroni e producono Fe^{2+} e HS^- che possono a loro volta ridurre il Cr(VI) (Arias & Tebo 2003; Pettine et al. 1998; Pettine et al. 1994; Sedlak & Chan 1997; Xu et al. 2005; Wielinga et al. 2001).

La riduzione microbica diretta del Cr(VI) è condotta da numerosi tipi di batteri ad opera di reduttasi o attraverso la produzione di molecole organiche riducenti (amminoacidi, nucleotidi, zuccheri, vitamine, acidi organici o glutatione) (Ramirez-Diaz et al. 2008) (Figura 1.11).

La riduzione microbica diretta è stata dimostrata sia in aerobiosi sia in anaerobiosi. In condizioni di anaerobiosi il Cr(VI) può essere impiegato come accettore finale di elettroni nella catena respiratoria (Francis et al. 2000; Tebo & Obraztova 1998) o può essere ridotto dal citocromo c3 o da idrogenasi a livello dello spazio periplasmatico (Chardin et al. 2003; Michel et al. 2001). In aerobiosi la riduzione enzimatica del cromato dipende prevalentemente da reduttasi solubili, ossia citoplasmatiche, che usano il NADH o il NADPH come cofattori. Le reduttasi capaci di ridurre il cromato, dette anche cromato-reduttasi, sono enzimi a bassa specificità e possono ridurre oltre al cromato anche altri substrati (Ackerley et al. 2004). La cromato-reduttasi solubile maggiormente studiata è una proteina denominata ChrR isolata da *P. putida* (Park et al. 2000). Questa reduttasi è una flavoproteina NADH dipendente che riduce oltre al Cr(VI) anche il cianuro ferrico. La riduzione del Cr(VI) a Cr(III) ad opera di questo enzima avviene in due tappe, inizialmente il Cr(VI) acquisisce un elettrone generando Cr(V), che viene quindi ridotto a Cr(III) mediante il trasferimento di due ulteriori elettroni (Ackerley et al. 2004). La cromato-reduttasi YieF di *E. coli* è una flavoproteina che catalizza la riduzione diretta del Cr(VI) a Cr(III) trasferendo quattro elettroni, di cui tre riducono il Cr(VI) mentre uno viene ceduto all'ossigeno (Ackerley et al. 2004). Questo enzima ha suscitato notevole interesse in quanto determina la produzione di una quantità di ROS inferiore a quella prodotta da ChrR e potrebbe quindi avere un ruolo maggiore nella cromato resistenza. YieF ha la capacità di ridurre un'ampia gamma di substrati, infatti oltre al Cr(VI) riduce il ferrocianuro, il vanadio (V), il molibdeno (VI), il 2,6 dicloroindofenolo (Ackerley et al. 2004). In *B. megaterium* TKW3 è stata isolata una cromato-reduttasi associata alla membrana che utilizza il NADH associata alla membrana, ma per essa non è stato ancora chiarito il meccanismo di azione (Cheung et al. 2006). Ulteriori esempi di enzimi capaci di ridurre il Cr(VI) sono dati dalla nitroreduttasi NfsA/NfsB di *Vibrio harveyi* (Kwak et al. 2003), e da un enzima citoplasmatico di *Thermos scotoductus* SA-01 appartenente ad una famiglia di enzimi capace di ridurre vari substrati xenobiotici (Opperman et al. 2008).

2.2. Influenza del Cr(VI) sulle comunità microbiche del suolo

La comunità microbica del suolo è costituita da un pool di microrganismi caratterizzato da un'elevata versatilità metabolica e fisiologica. I microrganismi del suolo hanno un ruolo essenziale nei cicli geobiochimici degli elementi, controllano la decomposizione del materiale vegetale ed animale, partecipano alla formazione della struttura del suolo, svolgono funzioni fondamentali nella trasformazione di sostanze xenobiotiche e d'altri inquinanti. E' stato osservato che il mantenimento della diversità microbica è un fattore critico per la fertilità del suolo e che la soppressione e/o l'inattivazione di gruppi microbici può danneggiare il funzionamento dell'ecosistema suolo anche per molto tempo (Borneman et al. 1996; Brookes 1995; Ranalli et al. 1996).

L'effetto del Cr(VI) sulle comunità microbiche del suolo è stato valutato in vari studi in cui sono stati analizzati suoli diversi con storie differenti di contaminazione da cromo e pertanto è complesso estrapolare quale siano le modificazioni generali indotte dal Cr(VI) sulle comunità microbiche del suolo. L'effetto del Cr(VI) sulla porzione eterotrofa coltivabile della comunità microbica del suolo è stato valutato in uno studio condotto da Viti e collaboratori (2006) che ha previsto l'impiego di microcosmi di suolo artificialmente contaminati con diverse concentrazioni di Cr(VI). Elevate concentrazioni di Cr(VI) nel suolo (250 e 1000 mg/Kg) determinano nei primi giorni di esposizione una diminuzione del numero dei batteri eterotrofi coltivabili, ma a lungo termine il loro numero tende a aumentare fino ad essere anche superiore rispetto a quello osservato nei microcosmi di controllo. Tale risultato può essere spiegato considerando che la sostanza organica, rilasciata dalla lisi delle cellule microbiche sensibili al Cr(VI) può essere impiegata per la crescita di batteri eterotrofi organotrofi che tollerano il Cr(VI) (Viti et al. 2006). L'analisi della biodiversità dei batteri eterotrofi coltivabili, valutata sulla base della morfologia delle colonie sviluppatesi in piastra, ha mostrato che all'aumentare della concentrazione del Cr(VI) presente nel suolo la biodiversità tende a diminuire e questa diminuzione si accentua all'aumentare del tempo di esposizione al Cr(VI). Contemporaneamente alla riduzione della biodiversità, il Cr(VI) seleziona alcune specie che divengono dominanti (Viti & Giovannetti 2005; Viti et al. 2006). La riduzione della biodiversità delle specie che costituiscono le comunità microbiche del suolo è un fenomeno comune che si verifica in seguito alla contaminazione dei suoli con metalli pesanti. Sulla base di studi cinetici di denaturazione-rinaturazione del DNA estratto da comunità microbiche di suoli non contaminati e contaminati con metalli pesanti è stato stimato che in un grammo di suolo non contaminato sono contenute circa un milione di genomi batterici diversi, mentre in presenza di metalli pesanti la ricchezza in specie può ridursi fino al 99,9% (Gans et al. 2005). Un ulteriore effetto del Cr(VI) sulle comunità microbiche del suolo consiste nella selezione di microrganismi a crescita rapida. E' stato

osservato che in suoli artificialmente contaminati con elevate dosi di Cr(VI) (250 e 1000 mg/Kg) i batteri che crescono rapidamente corrispondono a circa il 90% dei batteri eterotrofi coltivabili, mentre in suoli non contaminati essi costituiscono soltanto il 40-45% (Viti et al. 2006). Un risultato simile è stato ottenuto in un lavoro in cui comunità microbiche estratte da suoli liberi e rizosferici, contaminati e non con Cr(VI), sono state analizzate mediante il metodo dell'incorporazione della timidina triziata (Ipsilantis & Coyne 2007). Un'ipotesi per spiegare la selezione di microrganismi a rapida crescita in suoli contaminati da Cr(VI) è stata formulata da DiazRavina e Baath (1996) secondo i quali la materia organica rilasciata dalla morte cellulare dei microrganismi sensibili al Cr(VI) costituisce una fonte di nutrienti che avvantaggia i microrganismi a crescita rapida, che possono quindi affermarsi.

In letteratura è riportato che la contaminazione del suolo con metalli pesanti determina la selezione di popolazioni resistenti (Brim et al. 1999; Viti et al. 2008), tuttavia nel caso del Cr(VI) gli studi condotti forniscono dati discordanti. Talvolta è stato osservato che l'esposizione al cromo causa la selezione di popolazioni resistenti al Cr(VI) (Viti & Giovannetti 2001), tuttavia numerosi studi riportano che comunità microbiche estratte da suoli contaminati con cromato e non contaminati, presentano livelli simili di tolleranza al Cr(VI) (Bader et al. 1999; Ipsilantis & Coyne 2007; Luli et al. 1983; Shi et al. 2002; Viti et al. 2006) e che la maggior parte dei ceppi isolati da suoli contaminati con cromo possono essere sensibili al Cr(VI). In suoli contaminati da Cr(VI), i microrganismi sensibili al Cr(VI) possono sopravvivere in zone in cui il Cr(VI) non è presente, o perché esso si distribuisce in modo non omogeneo nel suolo o perché viene ridotto a Cr(III) (Shi et al. 2002). Ranjard e collaboratori (2000) hanno proposto che i batteri che vivono nella parte più superficiale degli aggregati di suolo siano maggiormente esposti agli effetti tossici dei metalli e quindi in tale zona si verificherebbe un arricchimento in batteri resistenti. Nel caso del Cr(VI), è possibile che la presenza di batteri resistenti e capaci di ridurre il Cr(VI) a Cr(III) nella zona superficiale degli aggregati di suolo possa impedire al Cr(VI) di penetrare nella zona più interna dell'aggregato nel quale conseguentemente potrebbero sopravvivere batteri sensibili al Cr(VI).

Le comunità microbiche del suolo subiscono varie alterazioni a livello metabolico in seguito ad esposizione a Cr(VI), è stato ad esempio dimostrato che in comunità microbiche del suolo esposte a cromato si verifica un'alterazione dell'attività di alcuni enzimi idrolitici (Speir et al. 1995; Viti et al. 2006), ed una diminuzione nel contenuto in ATP (Viti et al. 2006). Alla luce degli studi riportati, emerge che il Cr(VI) ha un forte impatto sulle comunità microbiche del suolo determinando alterazioni della loro struttura e della loro funzione

3. Biorisanamento di suoli contaminati da cromo

La diffusa e grave contaminazione degli ambienti terrestri con Cr(VI) pone seri problemi per la salute umana e più in generale degli organismi viventi e richiede quindi la messa a punto di strategie di risanamento che consentano di recuperare gli ambienti contaminati da cromo. La legislazione italiana ha stabilito con il D.M. 471/99 i livelli massimi di concentrazione di cromo totale e di Cr(VI) accettabili in acque e suoli (tabella 1.3).

Tabella 1.3. Concentrazioni massime ammesse di cromo totale e Cr(VI) nei suoli e nelle acque, stabilite dal D.M. 471/99

	<i>Suoli</i>	<i>Acque</i>
Cromo totale	150 mg/kg per uso residenziale, 800 mg/kg per uso industriale	50 µg/l
Cr(VI)	2 mg/kg per uso residenziale, 15 mg/kg per uso industriale	5 µg/l

Le tecniche tradizionalmente impiegate per il risanamento di suoli contaminati da Cr(VI) si basano su trattamenti chimico-fisici e prevedono la rimozione del Cr(VI) dal suolo, l'immobilizzazione del Cr(VI) o la riduzione del Cr(VI) a Cr(III) (tabella 1.4). La rimozione del Cr(VI) dal suolo viene effettuata tramite lavaggio del suolo con acqua e non rappresenta un sistema di risanamento conclusivo in quanto le acque di lavaggio, ricche in Cr(VI), devono essere successivamente trattate. L'immobilizzazione del Cr(VI) prevede trattamenti quali la solidificazione/stabilizzazione o la vetrificazione che hanno lo scopo di bloccare il Cr(VI) impedendone la diffusione, ma tali tecniche determinano una forte alterazione delle proprietà chimiche, fisiche e biologiche del suolo. La riduzione del Cr(VI) a Cr(III), effettuata tramite l'aggiunta al suolo di agenti riducenti, non consente di eliminare il cromo dal suolo, tuttavia il Cr(III) presenta bassa tossicità ed inoltre, essendo scarsamente mobile, non è soggetto a dilavamento con conseguente salvaguardia delle acque sotterranee. Le tecniche di risanamento chimico-fisico dei suoli contaminati da Cr(VI) hanno degli indubbi vantaggi, tuttavia presentano diversi aspetti negativi come ad esempio l'elevato costo, dovuto alla grande quantità di sostanze chimiche impiegate e di energia consumata (Higgins et al. 1997), o le profonde alterazioni che provocano nelle proprietà, nella struttura e nella fertilità del suolo (Jing et al. 2007). Suoli contaminati da Cr(VI) possono andare incontro ad un'attenuazione naturale della tossicità di questo inquinante dovuta alla sua riduzione abiotica e biotica a Cr(III), tuttavia tale processo è di norma molto lento (Tokunaga et al. 2003).

Tabella 1.4. Vantaggi e svantaggi delle principali tecniche chimico-fisiche per la bonifica di suoli contaminati da Cr(VI) [da Higgins *et al.* (1997), modificata].

Tecnica	Processo	Vantaggi	Svantaggi
Escavazione e deposizione fuori-sito	Il suolo contaminato viene rimosso dal sito originario e deposto altrove	Metodo rapido e appropriato per piccoli volumi di suolo, rimuove completamente i contaminanti	Costoso, può causare pericolo per la salute umana durante l'escavazione, il suolo rimosso deve essere trattato, elimina il sito contaminato ma non elimina il contaminante
Lavaggio del suolo <i>ex situ</i>	Il suolo contaminato viene rimosso dal sito originario e lavato	Riduce il volume di materiale contaminato che deve essere trattato, la soluzione di lavaggio può essere riutilizzata dopo il trattamento di decontaminazione	Richiede l'escavazione del suolo contaminato, può causare pericolo per la salute umana durante l'escavazione, elimina il sito contaminato ma non elimina il contaminante, produce acqua contaminata, non è appropriato per tutti i suoli
Lavaggio del suolo <i>in situ</i>	Consiste nel lavaggio <i>in situ</i> dei suoli contaminati e prevede il recupero delle acque di lavaggio	Tecnologia <i>in situ</i> che non richiede escavazione, la sua efficienza può essere incrementata attraverso l'elettrocinetica	Non elimina il contaminante, produce acqua contaminata
Solidificazione/stabilizzazione <i>ex situ</i>	Consiste nell'escavazione del suolo contaminato e successiva stabilizzazione mediante l'aggiunta di cemento, cenere, limo e se necessario acqua	Tecnologia relativamente poco costosa	Può causare pericolo per la salute umana durante l'escavazione, non elimina il contaminante, determina aumento del volume del materiale rimosso
Solidificazione/stabilizzazione <i>in situ</i>	Consiste nel bloccare il suolo <i>in situ</i> come descritto per la solidificazione/stabilizzazione <i>ex situ</i> , previa riduzione del Cr(VI) a Cr(III)	Applicabile a siti con elevato contenuto in acqua	Non elimina il contaminante, prima del trattamento il Cr(VI) deve essere ridotto a Cr(III) in modo da minimizzare il possibile dilavamento dell'inquinante
Vetrificazione (<i>in situ</i> o <i>ex situ</i>)	Il suolo contaminato viene fuso mediante trattamento termico ad elevate temperature e successivamente raffreddato con conseguente formazione di un materiale vetroso inerte	Può ridurre la tossicità e la mobilità del contaminante, può ridurre il volume del suolo contaminato, il prodotto finale non è pericoloso, può essere effettuata <i>in situ</i>	Richiede grandi quantitativi di energia ed un'alta tecnologia, richiede significative quantità di additivi
Riduzione chimica (<i>in situ</i> o <i>ex situ</i>)	Consiste nel promuovere la riduzione del Cr(VI) a Cr(III) mediante l'aggiunta al suolo di sostanze riducenti (solfato di ferro, solfito di sodio, ect...)	Riduce la tossicità e la mobilità del Cr(VI), può essere effettuata <i>in situ</i>	Non rimuove dal suolo il Cr(III) prodotto che può essere nuovamente ossidato a Cr(VI), non è appropriato per suoli dove il livello del cromo deve essere diminuito, richiede il controllo delle caratteristiche chimico-fisiche del suolo, il processo di riduzione può essere lento

Il biorisanamento consiste nell'accelerazione della riduzione microbica del Cr(VI) che viene ottenuta variando i parametri critici da cui essa dipende (Roundhill & Koch 2002). Il biorisanamento è un'alternativa di grande interesse rispetto alle tecnologie di risanamento chimico-fisico poiché presenta costi limitati, è poco invasiva (in quanto può essere effettuata in situ) e non determina alterazioni delle proprietà chimiche, fisiche e biologiche del suolo (Jing et al. 2007; Lovley & Coates 1997). I principali fattori su cui si può agire per condurre con successo il biorisanamento di suoli contaminati con Cr(VI) vengono di seguito indicati.

La limitata presenza in alcuni suoli contaminati da Cr(VI) di microrganismi che presentino una forte resistenza al Cr(VI) associata ad un'elevata capacità di riduzione può essere uno dei motivi che rendono l'attenuazione naturale un processo lento. Ricordiamo infatti che la resistenza al Cr(VI) e la capacità di ridurre il Cr(VI) non sono due fenotipi necessariamente associati (Bopp & Ehrlich 1988). Il processo di bioriduzione del Cr(VI) può essere accelerato tramite inoculazione del suolo contaminato con ceppi batterici selezionati caratterizzati da un'elevata resistenza al Cr(VI) e da una spiccata capacità di ridurre il Cr(VI) a Cr(III) (bioaumento) (Viti & Giovannetti 2007).

La bioriduzione del Cr(VI) nel suolo può essere limitata dalla ridotta disponibilità di nutrienti. In suoli contaminati, infatti, i nutrienti possono non essere sufficienti o adeguati per stimolare la crescita e l'attività metabolica dei microrganismi in grado di ridurre il Cr(VI) (Chen & Hao 1998; Reddy et al. 2003; Salunkhe et al. 1998). È stato dimostrato che l'aggiunta di fonti di carbonio quali acidi organici, letame e melassa a suoli contaminati da Cr(VI) può incrementare la bioriduzione del Cr(VI) (Higgins et al. 1997; Losi et al. 1994a; Tokunaga et al. 2003).

La bioriduzione del Cr(VI) può avvenire sia in condizioni di aerobiosi sia in condizioni di anaerobiosi. In presenza di basse concentrazioni di Cr(VI), la bioriduzione viene favorita in condizioni di anaerobiosi (Tseng & Bielefeldt 2002) e dipende dall'attività di batteri anaerobi obbligati ferro riduttori e solfato riduttori che riducono il Cr(VI) per via indiretta, attraverso le specie chimiche Fe^{2+} e HS^- che derivano dalla respirazione anaerobia rispettivamente di Fe^{3+} e SO_4^{2-} (Fendorf et al. 2000). È stato dimostrato che basse concentrazioni di Cr(VI) possono accelerare l'attività dei batteri solfato riduttori (Kamaludeen et al. 2003) con conseguente incremento della produzione di HS^- che può ridurre il Cr(VI). Tuttavia i batteri solfato riduttori sono particolarmente sensibili al Cr(VI), se comparati con altre popolazioni batteriche, e quindi in suoli anossici in cui sono presenti elevate concentrazioni di Cr(VI) essi non danno un significativo contributo alla riduzione del Cr(VI) (Arias & Tebo 2003). Volendo condurre un intervento di biorisanamento in condizioni anaerobiche può essere utile stimolare l'attività dei batteri solfato e ferro riduttori aggiungendo al suolo Fe^{3+} e SO_4^{2-} . In suoli contaminati con elevate concentrazioni di Cr(VI) il maggior contributo alla detossificazione del Cr(VI) è dovuto a processi di riduzione aerobia (Tseng & Bielefeldt 2002) che dipendono prevalentemente dall'attività di reduttasi

& Bielefeldt 2002) che dipendono prevalentemente dall'attività di reduttasi cellulari capaci di ridurre il Cr(VI) e quindi il biorisanamento di suoli altamente contaminati con Cr(VI) può essere favorito dall'aerazione del suolo.

L'eventuale presenza nel suolo contaminato di altre sostanze tossiche oltre al Cr(VI) è una variabile che occorre considerare quando si effettui un intervento di biorisanamento, poiché esse possono inibire l'attività metabolica e la crescita di batteri responsabili della detossificazione del Cr(VI). I microrganismi impiegati nel bioaumentamento di suoli contaminati da Cr(VI) dovrebbero quindi possedere la capacità di tollerare oltre al Cr(VI) le sostanze tossiche che si trovano nel suolo da risanare.

Il controllo dei parametri che influenzano il processo di biorisanamento del Cr(VI) in interventi di bonifica in situ può essere complesso e quindi in alcuni casi è preferibile trattare il suolo all'interno di bioreattori che permettono di controllare in modo efficiente i parametri del processo (biorisanamento *ex situ*). Il biorisanamento *ex situ* di suoli contaminati da Cr(VI) ha tuttavia numerosi svantaggi tra i quali l'escavazione e il trasporto del suolo contaminato da Cr(VI), con conseguenti problemi di carattere igienico-sanitario ed aumento dei costi (Bonomo & Sezenna 2005).

Agli innegabili vantaggi associati all'impiego di tecniche di biorisanamento per il recupero di suoli contaminati da Cr(VI), quali basso costo e ridotta invasività, non corrisponde una diffusa applicazione. Ad oggi sono stati condotti soltanto alcuni interventi su scala pilota di biorisanamento in situ, o in bioreattore (Jeyasingh & Philip 2005; Salunkhe et al. 1998; Tokunaga et al. 2003; Tseng & Bielefeldt 2002), quindi per poter applicare su larga scala il biorisanamento di suoli contaminati da Cr(VI) è necessario individuare e superare le problematiche che fino ad oggi ne hanno limitato la diffusione.

4. Metodi per lo studio dei microrganismi da impiegare nel biorisanamento

4.1. Caratterizzazione fenomica dei microrganismi

Lo studio dei caratteri fenotipici dei microrganismi viene tradizionalmente effettuato tramite esperimenti allestiti ad hoc, che hanno lo scopo di valutare la capacità del microrganismo di rispondere alle variazioni dei diversi parametri ambientali. Il maggiore limite associato a questi approcci è la loro bassa "processività". Oggi grazie ad un'evoluzione del sistema di identificazione microbica Biolog-ID, prodotto dall'azienda Biolog, è disponibile una tecnologia definita Phenotype Microarray (PM), che ha permesso di aumentare notevolmente la velocità di conduzione degli esperimenti. Questa tecnologia offre la straordinaria possibilità di ottenere una rapida e ampia caratterizzazione fenotipica dei microrganismi permettendo di saggiare contemporaneamente fino a 2000 caratteri fenotipici quali utilizzazione di fonti di car-

bonio/energia, di azoto, di zolfo e di fosforo, tolleranza al pH e agli osmoliti, sensibilità ad innumerevoli sostanze chimiche. Il PM, fornendo una descrizione fenotipica estremamente dettagliata delle caratteristiche funzionali di un microrganismo, può essere definito, in parallelo con le tecniche "genomiche" di analisi degli acidi nucleici e di "proteomica" di analisi delle proteine, come "fenomica".

La tecnologia PM si basa sull'impiego di micropiastre a 96 pozzetti ciascuno dei quali rappresenta un saggio fenotipico. L'esito del saggio viene valutato mediante lo sviluppo del colore dovuto al viraggio di un indicatore di potenziale redox, il violetto di tetrazolio, dovuto all'attività metabolica del microrganismo (figura 1.12).

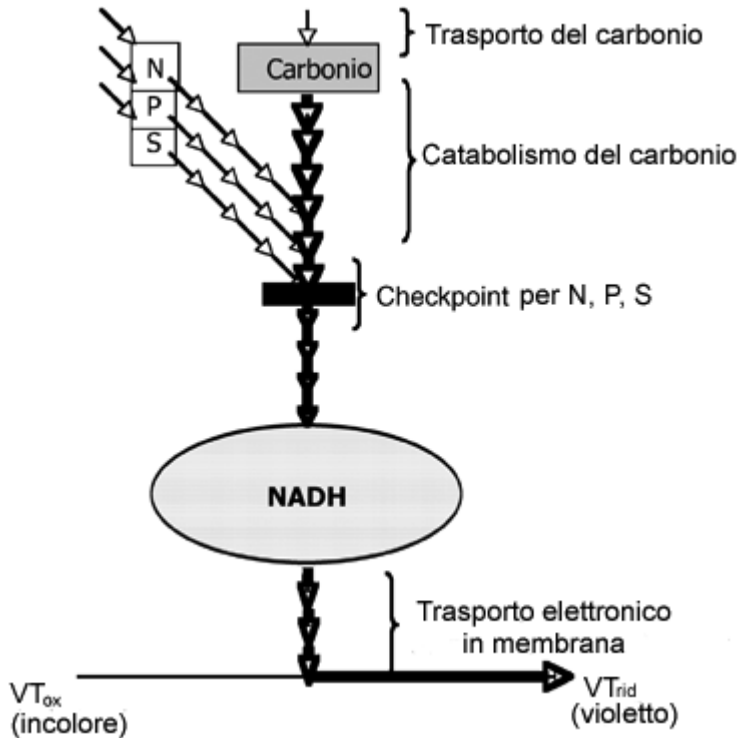


Figura 1.12. Riduzione del violetto di tetrazolio. Il catabolismo di una fonte di carbonio volto alla produzione di NADPH genera un flusso di elettroni che, riducendo il violetto di tetrazolio (VT), determina lo sviluppo del colore viola. La velocità con cui si sviluppa il colore è direttamente correlata al flusso metabolico. Molte cellule riducono il catabolismo delle fonti di carbonio se non hanno sufficiente disponibilità di azoto (N), fosforo (P) e zolfo (S), consentendo di misurare il flusso del catabolismo delle fonti di azoto, fosforo e zolfo [da Bochner (2009), modificata].

Le micropiastre, inoculate con una sospensione del microrganismo da saggiare, vengono incubate all'interno di un apparato denominato OmniLog che ha la duplice

funzione di incubatore e di lettore di piastre. Lo strumento acquisisce ogni 15 minuti l'immagine delle micropiastre e un software traduce i dati di intensità di colore ottenuti per ciascun pozzetto in curve cinetiche. Il software associato allo strumento OmniLog fornisce per ciascuna curva cinetica prodotta alcuni importanti parametri, come l'altezza media e l'area della curva, e permette di paragonare tra loro curve cinetiche ottenute in esperimenti diversi. Ad esempio volendo valutare l'effetto della temperatura sul fenotipo di un dato ceppo potrebbero essere paragonate le curve cinetiche di due esperimenti condotti a temperatura diversa, o altrimenti volendo confrontare i fenotipi di due ceppi microbici si può procedere al confronto delle curve cinetiche ottenute per ciascun ceppo..

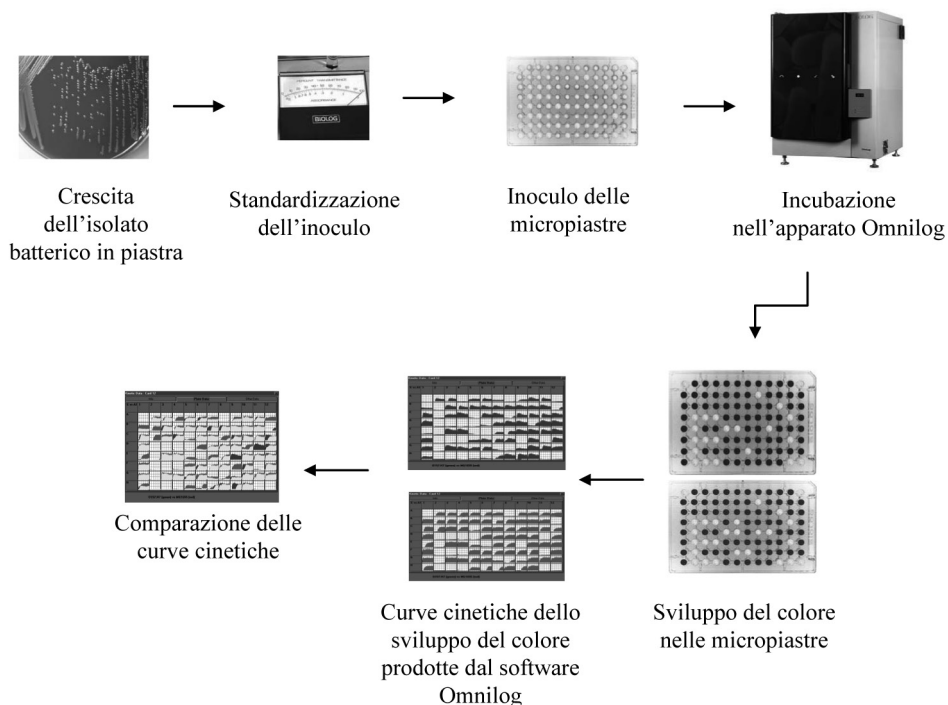


Figura 1.13. Fasi sperimentali della tecnologia PM. A partire dall'isolato batterico (o più in generale microbico) cresciuto in piastra viene preparato una sospensione cellulare standardizzata da inoculare nei pozzetti delle piastre Biolog. Queste vengono incubate nell'apparato OmniLog che registra lo sviluppo del colore ogni 15 minuti tramite una fotocamera, il software associato trasforma i dati dello sviluppo del colore in curve cinetiche. Il software consente inoltre di paragonare le curve cinetiche ottenute da due esperimenti indipendenti.

In figura 1.13 è riportato uno schema delle fasi sperimentali della tecnologia PM. Le micropiastre PM disponibili per la caratterizzazione fenotipica dei batteri sono riportate in tabella 1.5. Una dettagliata descrizione dei composti contenuti nelle piastre

PM può essere ottenuta dal sito web dell'azienda Biolog alla pagina <http://www.biolog.com/pmMicrobialCells.html> L'impiego del PM ha permesso di sostenere importanti lavori volti alla caratterizzazione fenotipica di ceppi batterici e fungini (Bochner 2009; Viti et al. 2008).

Tabella 1.5. Saggi fenotipici delle micropiastre PM attualmente commercializzate per lo studio di batteri.

Micropiastre PM	Saggio fenotipico	Numero dei saggi
PM01-PM02	Utilizzazione di fonti di carbonio	190
PM03	Utilizzazione di fonti di azoto	95
PM04	Utilizzazione di fonti di fosforo e zolfo	59 (fosforo), 35 (zolfo)
PM05-PM08	Utilizzazione di peptidi come fonte di azoto	285
PM09	Sensibilità agli osmoliti	96
PM10	Sensibilità al pH	96
PM11-PM20	Sensibilità a composti tossici	960

L'approccio PM, grazie all'elevata processività che lo contraddistingue, può fornire le informazioni necessarie per evidenziare le potenzialità di un microrganismo da applicare in interventi biorisanamento di suoli contaminati, poiché permette di determinare il profilo di tolleranza al pH, a diversi osmoliti e a numerose sostanze tossiche (metalli pesanti, antibiotici, antimetaboliti, agenti mutageni, etc.) che possono trovarsi nell'ambiente. La tecnologia PM quindi, sebbene fino ad oggi non sia mai stata applicata per lo studio di microrganismi da impiegare nel biorisanamento è una tecnica estremamente utile in questo ambito di ricerca.

4.2. Studio dei meccanismi batterici di resistenza al Cr(VI)

Il reale grado di efficienza del biorisanamento di ambienti contaminati da cromo su larga scala non è ancora stato definito. Per passare da una fase potenziale all'applicazione di strategie che prevedono l'impiego di microrganismi per il recupero di ambienti contaminati da cromo è necessario approfondire la conoscenza dei meccanismi di resistenza e riduzione del Cr(VI).

La resistenza batterica al Cr(VI) e la bioriduzione del Cr(VI) a Cr(III), come qualsiasi altro fenotipo, rappresentano il risultato di processi cellulari che dipendono dall'attività di geni e delle proteine da essi codificate, pertanto è fondamentale identificare i geni e le proteine che stanno alla base di tali fenotipi. Un importante metodo tradizionale che è stato proficuamente impiegato per lo studio della resistenza batte-

rica al Cr(VI) consiste nell'analisi di mutanti sensibili al Cr(VI) che permette di individuare i geni da cui dipende la resistenza al Cr(VI) (Miranda et al. 2005; Rivera et al. 2008). I mutanti possono essere ottenuti tramite l'impiego di agenti mutageni chimico-fisici (radiazioni UV, X e gamma, composti chimici) o attraverso trasposoni, elementi genetici mobili che possono inserirsi nel genoma batterico determinando l'inattivazione di geni. I trasposoni possono contenere al loro interno geni per la resistenza agli antibiotici e permettono quindi una semplice selezione dei mutanti. Inoltre, mentre le tecniche di mutagenesi chimico-fisiche inducono modificazioni della sequenza delle basi o la struttura del DNA che non sono facilmente rintracciabili nel genoma, l'impiego dei trasposoni offre l'importante vantaggio di facilitare l'identificazione dei geni inattivati in quanto la loro sequenza nucleotidica è conosciuta.

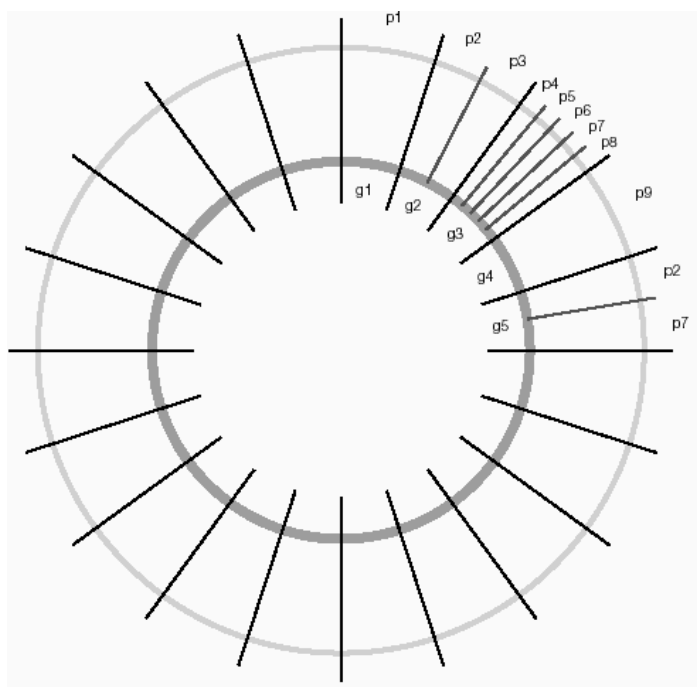


Figura 1.14. Mappe genotipica e fenotipica. A partire da una mappa genotipica (grigio scuro) può essere generata una mappa fenotipica (grigio chiaro). Alcuni geni, come il gene 1 (g1) hanno un unico fenotipo corrispondente (p1), mentre la gran parte dei geni ha molti fenotipi corrispondenti. Alcuni fenotipi possono essere dovuti a più di un gene, come nel caso di p2 che dipende da g2 e g5 [da Bochner (2003), modificata].

La produzione di mutanti consente di individuare i geni coinvolti in un certo fenotipo, tuttavia la comprensione del modo in cui essi intervengano nel determinare il fenotipo spesso non è immediata (figura 1.14). Per citare un unico esempio, in *P. puti-*

da sono stati identificati alcuni geni codificanti proteine a funzione nota la cui inattivazione determina aumento della sensibilità al toluene (piruvato deidrogenasi, la proteina PhoU che regola l'assimilazione del fosfato), tuttavia per tali geni non è stato possibile comprendere quale sia il loro contributo ai processi che conferiscono la resistenza al toluene (Kim et al. 1998). Tale problematica si amplifica nel caso in cui il gene mutato abbia funzione sconosciuta. Per chiarire in che modo un gene influisca nel determinare un dato fenotipo è possibile procedere all'analisi degli mRNA e/o delle proteine del ceppo mutante paragonandolo con quello del ceppo parentale (Chourey et al. 2008; Coulthurst et al. 2008; Mostertz et al. 2008). Il PM costituisce un ulteriore approccio che può essere impiegato in tal senso: come le tecniche di trascrittomiche e proteomiche offrono la possibilità di comparare rispettivamente il trascrittoma e il proteoma di un ceppo parentale con quelli di un mutante, analogamente il PM permette di paragonare il "fenoma", inteso come la molteplicità dei caratteri fenotipici, di ceppo un parentale e dei suoi mutanti. Tramite la tecnologia PM è infatti possibile saggiare fino a 2000 caratteri fenotipici per il ceppo parentale e il mutante e la comparazione delle curve cinetiche di parentale e mutante per ciascuno dei caratteri saggiati permette di valutare quali sono i caratteri perduti o acquisiti dal ceppo mutante rispetto al parentale. A partire da un mutante alterato in un dato gene è possibile ottenere indicazione di quale siano i fenotipi influenzati dall'attività del gene studiato, permettendo così di approfondire la conoscenza del ruolo che esso svolge nella cellula. La tecnologia PM è stata impiegata con successo nello studio di mutanti *P. aeruginosa* (Johnson et al. 2008), di *E. coli* K-12 (Loh et al. 2006) di *Legionella pneumophila* (Sauer et al. 2005).

Un importante contributo allo studio dei meccanismi batterici per la resistenza al Cr(VI) è stato dato negli ultimi anni dallo sviluppo di tecnologie ad alta "processività" di trascrittomiche e proteomiche che permettono di analizzare il trascrittoma e il proteoma, ossia l'insieme degli mRNA e delle proteine presenti nella cellula in un dato momento, nonché le variazioni che tali macromolecole subiscono in seguito all'esposizione ad un determinato stimolo (Brown et al. 2006b; Hu et al. 2005; Thompson et al. 2007). L'analisi del trascrittoma dei microrganismi è stata resa possibile dall'avvento dei DNA-microarray, supporti solidi su cui si possono legare sonde rappresentative di tutti i geni presenti nel genoma di un dato microrganismo. In un tipico esperimento di trascrittomiche, volto a determinare come un microrganismo risponda ad un certo stimolo, il microrganismo viene coltivato in assenza e presenza dello stimolo e successivamente l'RNA totale, estratto dalle due colture, viene retrotrascritto a cDNA. I cDNA ottenuti vengono marcati con due fluorofori diversi, quindi riuniti e ibridati sul DNA-microarray. La scansione del DNA-microarray restituisce un'immagine costituita da una serie di punti, uno per ciascun gene, colorati con intensità diversa nei due colori dei fluorofori impiegati. L'analisi di tale immagi-

ne permette di stabilire come si modifica l'espressione di ciascun gene in risposta allo stimolo indagato (figura 1.15).

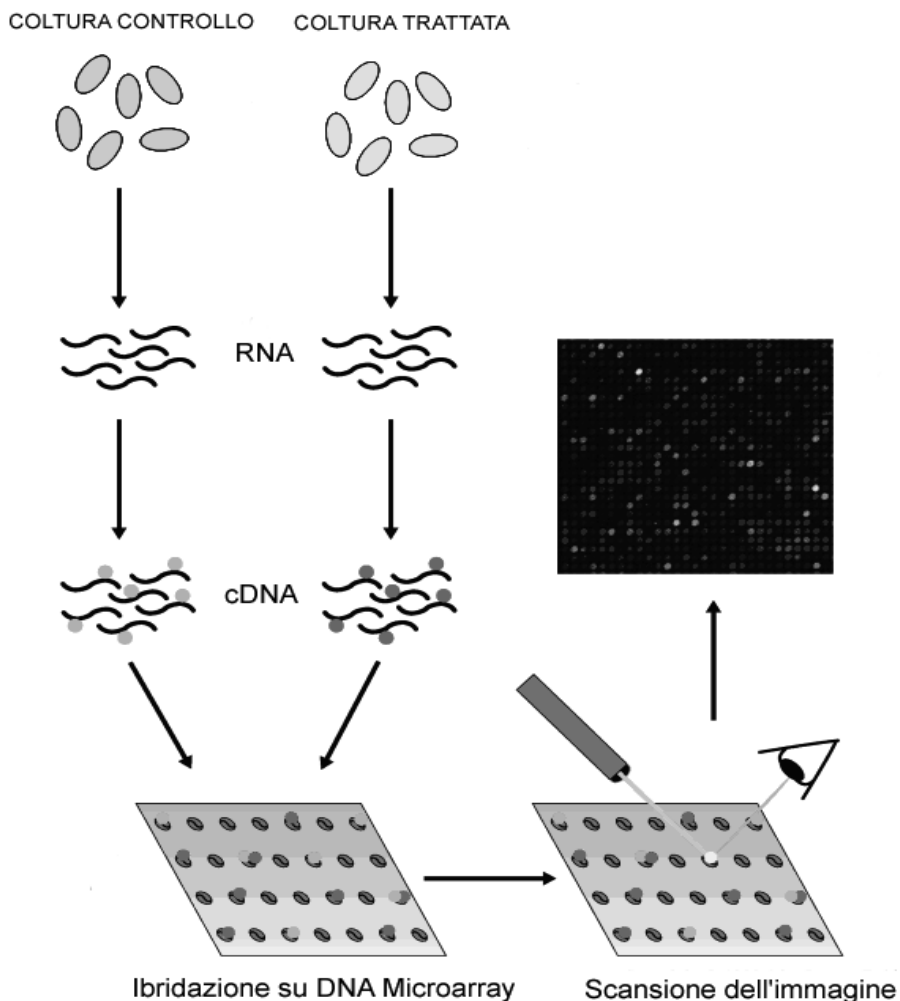


Figura 1.15. Rappresentazione schematica di un esperimento di analisi comparativa del trascrittoma mediante DNA-microarray

L'analisi del proteoma viene effettuata principalmente tramite elettroforesi bidimensionale delle proteine cellulari totali, una tecnica elettroforetica che prevede due elettroforesi successive, condotte a 90° l'una rispetto all'altra: la prima separa le proteine sulla base del loro punto isoelettrico (valore di pH per il quale la proteina assume carica complessiva nulla), la seconda separa le proteine che hanno ugual punto isoelettrico sulla base del loro peso molecolare. I profili elettroforetici delle proteine estratte

da colture esposte e non esposte ad un certo stimolo possono essere tra loro comparate per individuare proteine sovraesposte o sottoregolate in risposta allo stimolo. Le proteine di interesse vengono estratte da gel, tagliate con un'opportuna proteasi (ad es. tripsina) ed i frammenti proteici prodotti vengono caratterizzati mediante spettrometria di massa (figura 1.16). Il confronto del profilo dei frammenti proteici ottenuti con i profili depositati nelle banche dati permette di ottenere l'identificazione della proteina

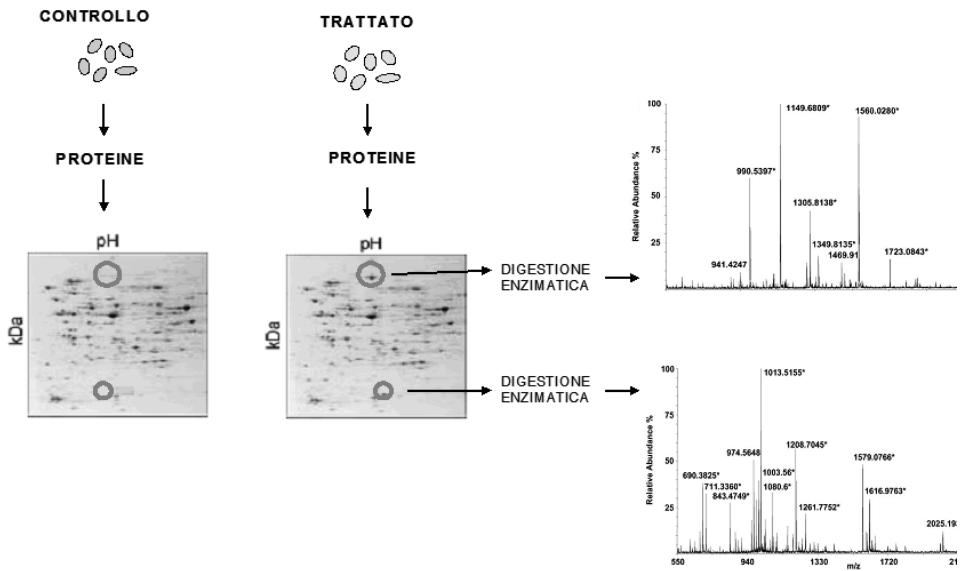


Figura 1.16. Rappresentazione schematica di un esperimento di analisi comparativa del proteoma. I gel di elettroforesi bidimensionale delle proteine estratte dalle colture di controllo e trattate vengono tra loro comparate. In rosso sono cerchiare proteine ottenute dalla coltura trattata e assenti nella coltura di controllo, che possono essere identificate mediante caratterizzazione in spettrometria di massa dei frammenti proteici, prodotti dalle digestione enzimatica con opportune proteasi.

Capitolo 2

Scopo

Il cromo è uno dei metalli pesanti più usati nell'industria (metallurgia, chimica, produzione di refrattari, ecc.) ed è considerato un importante e pericoloso inquinante, sia a livello nazionale sia internazionale: grandi quantità di cromato [Cr(VI)], che è solubile in acqua, altamente tossico, mutageno e cancerogeno, sono state e sono rilasciate nell'ambiente. Generalmente il risanamento di siti contaminati da cromato è attuato tramite l'applicazione di metodologie fisico-chimiche che, oltre ad essere costose, spesso a loro volta provocano danni ambientali. Lo sviluppo di un efficace sistema biologico per il risanamento da cromato è allettante ed auspicabile presentandosi come una strategia poco invasiva per l'ambiente, proponibile per il trattamento di vaste aree, competitiva a livello economico rispetto ai sistemi fisico-chimici. Un microrganismo da impiegare in processi di biorisanamento di un suolo contaminato con Cr(VI) per essere considerato un buon "biorimediatore" non è sufficiente che sia resistente ad alte concentrazioni di Cr(VI) e capace di ridurlo a Cr(III), ma deve anche possedere caratteristiche peculiari che gli consentano di adattarsi alle condizioni chimico-fisiche dell'ambiente da recuperare. Quindi, per poter rendere effettivamente applicabile su larga scala il biorisanamento di suoli contaminati con cromato, è importante avere a disposizione isolati microbici appartenenti a differenti specie, selezionati non solamente per la capacità di ridurre il cromato ma anche per la resistenza ad alte concentrazioni di Cr(VI); conoscere meglio i meccanismi coinvolti nei processi di resistenza e di riduzione del cromato e comprendere come alcuni fattori abiotici influenzino il tasso di riduzione del Cr(VI) a Cr(III).

All'interno di tale problematica s'inserisce questa ricerca che si è posta come obiettivi: la selezione di ceppi batterici con migliore fitness per un loro uso in processi di risanamento di suoli contaminati da cromato;

l'approfondimento delle conoscenze sui meccanismi coinvolti nella resistenza al Cr(VI) in ceppi batterici isolati da suolo contaminato con elevate concentrazione di cromato.

L'approccio sperimentale ha previsto l'impiego di una tecnica ad elevata processività, chiamata Phenotype Microarray, per la caratterizzazione fenomica di isolati batterici altamente resistenti al cromato e l'analisi genetica e fenomica di mutanti Cr(VI)-

sensibili di un ceppo batterico iper-resistente al Cr(VI). I risultati conseguibili potranno contribuire alla realizzazione di un sistema biologico, alternativo agli attuali sistemi chimico-fisici, in grado di ridurre il Cr(VI) a Cr(III) in presenza di elevate concentrazione di cromato.

Capitolo 3

Materiali e metodi

1. Caratterizzazione dei ceppi 22, 28, 34 e 56

1.1. Sequenziamento del 16S rDNA

Il 16S rDNA dei ceppi batterici 22, 28, 34 e 56, ottenuti da un suolo artificialmente contaminato con 1000 mg/Kg Cr(VI) e resistenti fino a 40 mM di Cr(VI) (Mini 2004), è stato amplificato in una reazione di PCR (tabella 3.1) impiegando i *primer* 27f e 1392r (tabella 3.3) a partire da DNA estratto da colonie cresciute su LB (10 g/l triptone, 5 g/l estratto di lievito, 170 mM cloruro di sodio) contenente 5 mM K₂CrO₄, mediante il kit “InstaGene TM Matrix” (Bio-rad).

Tutte le reazioni di amplificazione sono state condotte con l'apparecchio Thermal cycler GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystem) secondo lo schema riportato in tabella 3.2.

Tabella 3.1. Composizione della miscela di reazione per l'amplificazione dell'rDNA 16S

Componente	Concentrazione/volume
Tampone PCR	1x*
DNTPs	200 µM
<i>Primer 27f</i>	0,1 µM
<i>Primer 1392r</i>	0,1 µM
BSA**	0,2 mg/ml
MgCl₂	2 mM
Taq DNA polimerasi (Polymed)	0,025U/µl
H₂O	q.b fino a 25 µl
DNA stampo	2 µl

* 67 mM Tris HCl, pH8,8; 16mM (NH₄)SO₄; 0,01% Tween-20 (Polymed)

** Albumina di siero bovino (Sigma-Aldrich)

Tabella 3.2. Schema di reazione per l'amplificazione del 16S rDNA

Denaturazione iniziale		94 °C per 3'
5 cicli	Denaturazione	94 °C per 30''
	Ibridazione	55 °C per 30''
	Sintesi	72 °C per 60''
25 cicli	Denaturazione	94 °C per 30''
	Ibridazione	51 °C per 30''
	Sintesi	72 °C per 60''
Sintesi finale		72°C per 10'

Il risultato delle reazioni di amplificazione è stato verificato tramite elettroforesi su gel di agarosio 1% (p/v) colorato con bromuro di etido in TEB (90 mM Tris-Borato, 2 mM EDTA, pH 8,3). I prodotti di PCR, purificati mediante il kit QIAquick PCR Purification (Qiagen), sono stati sequenziati mediante il metodo di Sanger, presso il centro BMR Genomics dell'Università di Padova. I campioni sono stati preparati secondo le indicazioni disponibili alla pagina web http://www.bmr-genomics.it/seq_index.html. Ciascun prodotto di PCR è stato sequenziato utilizzando i *primer* riportati in tabella 3.3.

Tabella 3.3. Primer utilizzati per l'amplificazione del 16S rDNA e per il sequenziamento del prodotto di amplificazione.

Pri-mer*	Specificità	Sequenza*	Riferimento	Uso
27f	16S rDNA di batteri	5'AGAGTTTGATC MTGGCTCAG 3'	(Lane 1991)	Amplificazione 16S rDNA e se- quenziamento
1392r	16S rDNA di batteri, ar- chea, eucarioti	5'ACGGGCGGTGT GTRC 3'	(Lane 1991)	Amplificazione 16S rDNA e se- quenziamento
530f	16S rDNA di batteri, ar- chea, eucarioti	5'GTGCCAGCMGC CGCGG 3'	(Lane 1991)	Sequenziamento
907r	16S rDNA di batteri, ar- chea, eucarioti	5'CCGTCAATTCMT TTRAGTTT 3'	(Lane 1991)	Sequenziamento

** i *primer* sono stati sintetizzati dalla MWG Biotech AG e conservati -20°C in soluzioni stock ad una concentrazione di 100 µM.

*M = C:A, R = A:G

Le sequenze ottenute sono state visualizzate e corrette mediante il software FinchTV, scaricabile dal sito web <http://www.geospiza.com/finchtv.html>. La sequenza del 16S

rDNA (circa 1280 pb) di ogni singolo ceppo è stata ottenuta dalla sovrapposizione delle quattro sequenze ottenute impiegando i *primer* 27f, 907r, 530f, 1392r (figura 3.1)

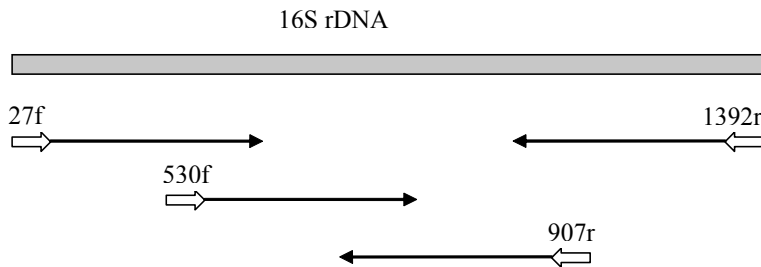


Figura 3.1. Rappresentazione schematica delle sequenze del 16S rDNA ottenute impiegando i *primer* 27f, 530f, 907r e 1392r.

Per ciascun ceppo la sequenza del 16S rDNA è stata paragonata con quelle depositate nella banca dati GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) usando l'algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

1.2. Identificazione dei ceppi batterici mediante Biolog-ID

I ceppi 22, 28, 34 e 56 (aerobi, gram negativi) sono stati identificati mediante l'approccio Biolog-ID (Biolog) impiegando le piastre GN2, secondo la procedura indicata dall'azienda Biolog. Il profilo di utilizzazione delle fonti di carbonio dei ceppi è stato comparato, mediante il software Basic-ID, con quelli di una collezione di specie raccolte nel database MicroLog 1 Release 4,2, per individuare le specie che presentano il profilo più simile rispetto a ai ceppi indagati.

1.3. Determinazione della riduzione batterica del Cr(VI)

La riduzione del Cr(VI) da parte dei ceppi batterici 22, 28, 34 e 56 è stata valutata in presenza di otto diverse fonti di carbonio/energia (glucosio, galattosio, fruttosio, piruvato, citrato, L-prolina, L-alanina e L-asparagina), secondo la seguente procedura:

Inoculare una colonia del ceppo batterico in TMM (tabella 3.4) contenente una delle otto fonti di carbonio (1%, p/v) ed incubare in agitazione a 26°C o.n.

Tabella 3.4. Composizione del mezzo TMM (Tris Minimal Medium).

Composto	Concentrazione/volume
Tris HCl	50 mM
NaCl	80 mM
KCl	20 mM
NH₄Cl	20 mM
Na₂SO₄	3 mM
MgCl₂·6H₂O	1 mM
CaCl₂·6H₂O	0,2 mM
Na₂HPO₄	0,64 mM
FeNH₄ citrato	10 ml di una soluzione 48 mg/ml
Soluzione SL7*	1 ml
Fonte di carbonio	0,2-1%
Aggiustare a pH 7 con HCl	

* Composizione soluzione SL7: 10 mM HCl; 0,5 mM ZnSO₄ x 7H₂O; 0,5 mM MnCl₂ x 4H₂O; 1 mM H₃BO₃; 0,8 mM CoCl₂ x 6H₂O; 0,1 mM CuCl₂ x 2H₂O; 0,1 mM NiCl₂ x 6H₂O; 0,15 mM Na₂MoO₄ x 2H₂O

Utilizzando la coltura ottenuta inoculare, in micropiastre, 200 µL di TMM contenente una delle otto fonti di carbonio (1%, p/v) e 0,2 mM di K₂CrO₄, secondo lo schema riportato in figura 3.2. Allestire due micropiastre seguendo lo stesso schema ma non inoculate per valutare l'eventuale riduzione abiotica del Cr(VI)

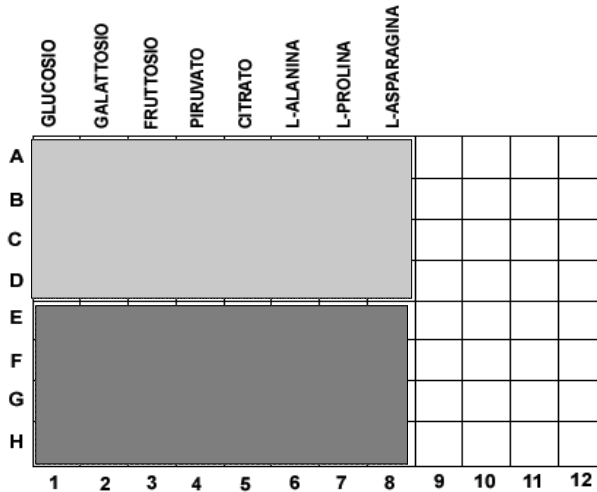
Incubare le micropiastre a 26 °C all'interno di un contenitore chiuso umidificato in modo da impedire l'essiccazione del contenuto dei pozzetti

A tempi successivi (24, 48 e 72 ore) valutare la crescita batterica misurando l'OD₆₀₀ tramite un lettore di piastre (GDV)

A tempi successivi (24, 48 e 72 ore) centrifugare le colture e misurare l'OD₃₈₂ del surnatante; per ottenere la concentrazione del Cr(VI) residuo nel mezzo di coltura confrontare il valore di assorbanza a 382 nm [la lunghezza d'onda per la quale si ha il massimo di assorbimento del Cr(VI)] ottenuto con la curva standard di riferimento che descrive la relazione tra concentrazione del Cr(VI) in TMM e l'assorbanza a 382 nm

Calcolare la percentuale del Cr(VI) ridotto dall'attività dei quattro ceppi in presenza di ciascuna delle otto diverse fonti di carbonio/energia a partire dalla differenza tra la concentrazione media di Cr(VI) residuo nelle colture e la concentrazione media di Cr(VI) residuo nel mezzo di coltura non inoculato.

Micropiastra A



Micropiastra B

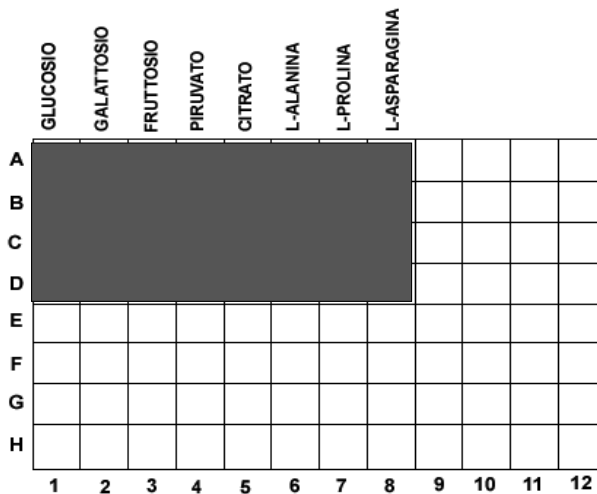


Figura 3.2. Rappresentazione schematica delle micropiastre impiegate per valutare la crescita e riduzione batterica del Cr(VI) su otto diverse fonti di carbonio. La micropiastra A è impiegata per la valutazione della crescita e riduzione del Cr(VI) a 24 ore (pozzetti in grigio chiaro) e a 48 ore (pozzetti in grigio medio). La micropiastra B è utilizzata per la valutazione rispettivamente della crescita e riduzione batterica del Cr(VI), e della riduzione abiotica del Cr(VI) a 72 ore (pozzetti in grigio scuro)

1.4. Analisi Phenotype Microarray (PM) degli isolati batterici

I ceppi batterici 22, 28, 34 e 56 sono stati caratterizzati in duplicato mediante PM impiegando le micropiastre PM09 (sensibilità agli osmoliti), PM10 (sensibilità al pH), PM11-PM20 (sensibilità chimica) secondo la seguente procedura:

1. Preparazione del ceppo

Prelevare una colonia batterica, cresciuta su BUG (Biolog) per 24 h a 30 °C, e strisciarla nuovamente su BUG, incubare o.n. a 30 °C

2. Preparazione dei fluidi per l'inoculo delle micropiastre PM

Fluido IF-0. Aggiungendo 25 ml di acqua sterile a 125 ml di fluido IF-0 1,2x (Biolog)

Fluido IF-0+dye. Aggiungere 1,8 ml di dye mixA (Biolog) e 23,2 ml di acqua sterile a 125 ml di 1,2x IF-0, il dye mix A è costituito da un marcatore di potenziale redox (violetto di tetrazolio)

Fluido IF-10+dye. Aggiungendo 23,5 ml di acqua sterile e 1,5 ml di dye mix A (Biolog) a 125 di fluido IF-10 1,2x.

3. Preparazione delle sospensioni cellulari da inoculare nelle micropiastre PM

Inoculare le colonie batteriche cresciute su BUG in 16 ml di IF-0

Aggiustare la torbidità della sospensione al 42% misurata tramite il turbidimetro Biolog

Aggiungere 15 ml della sospensione cellulare preparata al punto precedente a 75 ml di fluido IF-0+dye (torbidità finale 85%)

4. Inoculo della piastre PM 9-20

Aggiungere 600 µl della sospensione cellulare ottenuta a 120 ml di IF-10+dye

Trasferire aliquote da 100 µl nei pozzetti delle piastre PM 9-20 e mantenere a 26 °C per 48 ore nell'incubatore OmniLog

5. Acquisizione dei risultati

All'interno dell'apparato OmniLog una fotocamera CCD (Charge Coupled Device) fotografa le micropiastre ogni 15'. I dati di sviluppo del colore nel tempo vengono trasformati dal software OmniLog File Management/Kinetic plot version, in curve cinetiche. A partire da due curve cinetiche che rappresentano due repliche dello stesso saggio, il software genera una curva media o curva consenso. Un secondo software, l'OmniLog Parametric version, calcola per ciascuna curva cinetica numerosi parametri che descrivono la curva stessa (area della curva, altezza media, etc..) ed offre inoltre la possibilità di confrontare per ciascun pozzetto le curve cinetiche ottenute da due esperimenti diversi. Nelle micropiastre di sensibilità chimica (PM11-PM20) ciascun composto saggiato è presente in quattro pozzetti adiacenti a concentrazioni crescenti, e per ciascun composto il software calcola un ulteriore parametro rispetto a quelli sopra riportati, l'IC50 definito come il pozzetto o la frazione di pozzetto per il

quale un dato parametro che descrive la curva (ad esempio l'altezza media) assume un valore pari al 50% del valore massimo osservato.

I valori di altezza media delle curve cinetiche ottenute dalle piastre PM11-20 per i quattro ceppi batterici, sono stati sottoposti ad analisi delle componenti principali impiegando il software Bionumerics (Applied Maths), che ha permesso di individuare i caratteri fenotipici che maggiormente discriminano tra loro i quattro ceppi.

2. Studio dei meccanismi di resistenza al Cr(VI)

2.1. Esperimenti di ibridazione del DNA

Il DNA genomico di ciascuno dei quattro mutanti sensibili al Cr(VI) (Crg3, Crg8, Crg26, Crg96), ottenuti per mutagenesi inserzionale dell'isolato batterico *P. corrugata* 28 (Mini 2004), mediante l'impiego del trasposone EZ-Tn5 (Epicentre) che contiene un gene per la resistenza alla kanamicina, è stato tagliato con opportuni enzimi di restrizione e ibridato con una sonda per il gene per la resistenza alla kanamicina. Gli esperimenti di ibridazione sono stati condotti come di seguito riportato.

Fase A. Estrazione del DNA genomico.

1. Inoculare il ceppo batterico in 25 ml di terreno liquido LB (contenente 15 µg/ml kanamicina per i mutanti) e incubare a 26°C in agitazione fino a quando l'OD₆₀₀ della coltura raggiunge un valore di 0,5-0,6
2. Centrifugare 20 ml della coltura a 1500 *xg* per 10' ed eliminare il surnatante
3. Risospendere il pellet in 20 ml di TES [50 mM Tris HCl; 20 mM EDTA; 0,3% (p/v) NaCl; pH 8]
4. Centrifugare a 1500 *xg* per 10' e eliminare il surnatante
5. Risospendere le cellule in 10 ml di TE (50 mM Tris HCl; 20 mM EDTA; pH 8) e trasferire in un nuovo tubo
6. Aggiungere 1 ml di lisozima (2 mg/ml in TE), mescolare per 10'' sul vortex ed incubare le cellule a 30°C per 20'
7. Aggiungere 1,1 ml di soluzione SDS/Proteinasi K [per la preparazione della soluzione SDS/Proteinasi K dissolvere 10 mg di Proteinasi K in 1 ml di TE e diluire 50 µl di tale soluzione in 0,5 ml di 10% sodio dodecil solfato (SDS) in TE]
8. Aggiungere 1,4 ml di una soluzione contenente 3M sodio acetato e 1 mM EDTA a pH 5
9. Aggiungere 135 µl di RNaseA (10 mg/ml), e porre le cellule a 37°C per 30'
10. Aggiungere 5 ml di fenolo:cloroformio:isoamilalcol in rapporto 25:24:1 e agitare gentilmente a mano per 15'

11. Centrifugare a 500 xg per 10' e rimuovere la fase acquosa superiore trasferendola in un nuovo tubo
12. Ripetere i due punti precedenti
13. Aggiungere 10 ml di cloroformio: isoamilalcol in rapporto 24:1 e agitare gentilmente a mano per 5'
14. Centrifugare a 500 xg per 10' e trasferire la fase acquosa in un baeker sterile
15. Aggiungere molto lentamente 14 ml di etanolo 100% freddo (-20°C)
16. Recuperare il DNA avvolgendolo su una bacchetta di vetro sterile
17. Immergere il DNA in etanolo al 70% per lasciare poi asciugare all'aria
18. Mettere la bacchetta di vetro in un tubo da 1,5 ml contenente circa 250 μ l di H₂O sterile e lasciare in immersione tutta la notte
19. Verificare l'avvenuta estrazione del DNA genomico in gel di elettroforesi allo 0,7% (p/v) e procedere alla quantificazione del DNA per via spettrofotometrica.

Fase B. Restrizione dei DNA genomico.

Il DNA genomico dei mutanti è stato digerito impiegando in reazioni distinte le endonucleasi di restrizione MluI (Roche Applied Science) e PvuII (Roche Applied Science), che non tagliano all'interno del trasposone EZ-Tn5, secondo la procedura indicata dall'azienda fornitrice.

Fase C. Sintesi della sonda per l'ibridazione.

Utilizzando i *primer* Kanamicina2F (5'GGTTTGCGCATTACAGGGTGTCT3') e Kanamicina2R (5'AGCGTAATGCTCTGCCAGTGTTAC3') è stata amplificata una sequenza interna (977 pb) al gene della resistenza alla kanamicina del trasposone EZ-Tn5 dal DNA genomico dei mutanti. Le reazioni sono state allestite come descritto in tabella 3.5 e sono state condotte con l'apparecchio Thermal cycler GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystem) secondo lo schema riportato in tabella 3.6.

Il risultato delle reazioni di amplificazione è stato verificato tramite elettroforesi su gel di agarosio allo 0,8% (p/v). Il prodotto di PCR è stato purificato mediante il kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) e quantificato mediante BioPhotometer (Eppendorf),

La sonda da impiegare nell'esperimento di ibridazione è stata ottenuta marcando il frammento del gene della resistenza alla kanamicina tramite incorporazione di un analogo fluorescente del dTTP (fluoresceina-11-dUTP) mediante il kit Gene Images Random prime (Amersham Biosciences) secondo le indicazioni dell'azienda produttrice.

Tabella 3.5. Composizione della miscela di PCR per l'amplificazione del gene della resistenza alla kanamicina, localizzato su EZ-Tn5.

Componente	Concentrazione/volume
Tampone PCR	1x*
DNTPs	200 μM
Primer Kanamicina2F	0,1 μM
Primer Kanamicina 2R	0,1 μM
BSA**	0,1 mg/ml
MgCl₂	2 mM
Taq DNA polimerasi (Polymed)	0,025U/μl
H₂O	q.b fino a 25 μl
DNA genomico diluito 1:10	2 μl

* 67 mM Tris HCl, pH8,8; 16mM (NH₄)SO₄; 0,01% Tween-20 (Polymed)

** Albumina di siero bovino (Sigma-Aldrich)

Tabella 3.6. Schema di reazione per l'amplificazione del gene della resistenza alla kanamicina localizzato sul trasposone EZ-Tn5.

	Denaturazione iniziale	94 °C per 3'
30 cicli	Denaturazione	94 °C per 30"
	Ibridazione	63 °C per 30"
	Sintesi	72 °C per 60"
	Sintesi finale	72°C per 10'

Fase D. Southern Blotting.

Il DNA genomico del ceppo parentale e dei mutanti digerito con i due enzimi di restrizione *Mlu*I e *Pvu*II ed il prodotto di amplificazione del gene della kanamicina sono stati sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio allo 0,7% a 4 °C per 12 ore ad un voltaggio pari a 1V/cm.

Il DNA è stato depurinato, denaturato e quindi trasferito su membrana impiegando la seguente procedura:

1. Mantenere il gel in agitazione lenta a temperatura ambiente per 10' in soluzione depurante (250 mM HCl)
2. Mantenere il gel in agitazione lenta a temperatura ambiente per 25' in soluzione denaturante (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH)
3. Mantenere il gel in agitazione lenta a temperatura ambiente per 30' in soluzione neutralizzante (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl; pH 7,5)
4. Trasferire il DNA dal gel su membrana di Hybond N+ (Amersham) per capillarità, tramite un opportuno apparato di trasferimento impiegando una soluzione 10x SSC (0,15 M citrato di sodio e 1,5 M NaCl). Far procedere il trasferimento per 12-15 ore
5. Fissare il DNA alla membrana mediante esposizione ai raggi UV (260 nm) per 3'.

L'ibridazione del DNA è stata effettuata impiegando il termostato da ibridazione Hybridizer HB-ZD (Techne) secondo la seguente procedura:

1. Riscaldare a 60°C un opportuno volume (0,125 ml/ cm² membrana) di soluzione di ibridazione [7% (p/v) SDS; 0,5 M buffer Na-fosfato pH 7,2; 10 mM EDTA] all'interno di un cilindro da ibridazione
2. Porre la membrana all'interno del cilindro contenente la soluzione di ibridazione e mantenere a 60 °C in lenta rotazione per 30'
3. Denaturare la sonda (paragrafo 2.1.3) mantenendola in acqua a 100 °C per 5' e raffreddandola in ghiaccio
4. Aggiungere alla soluzione di ibridazione la sonda ad una concentrazione finale di 10 ng/ml, e lasciare procedere l'ibridazione a 55 °C per almeno 12 ore
5. Lavare la membrana a 60 °C per 15' in 1x SSC, SDS 0,1%
6. Lavare la membrana a 60 °C per 15' in 0,5x SSC, SDS 0,1%

La rivelazione delle bande di ibridazione è stata ottenuta impiegando il kit Gene Images ECF detection (Amersham Bioscience), secondo la seguente procedura:

1. Immergere la membrana per pochi secondi in tampone A (0,3 M NaCl; 0,1M Tris-HCl; pH 7,5) a temperatura ambiente
2. Incubare la membrana in gentile agitazione a temperatura ambiente per un ora in blocking reagent (Amersham Bioscience) diluito 1:10 in tampone A
3. Ripetere il punto 1
4. Diluire il coniugato antiluoresceina-fosfatasi alcalina (Amersham Bioscience) 5000 volte in una soluzione di albumina di siero bovino (Amersham Bioscience) al 5% in tampone A
5. Mantenere la membrana nella soluzione preparata al punto 4 in gentile agitazione a temperatura ambiente per un'ora
6. Porre la membrana in una soluzione 0,3% Tween 20 in buffer A, e mantenere in agitazione a temperatura ambiente per 10'
7. Ripetere nuovamente per due volte il lavaggio descritto al punto 6

8. Immergere brevemente la membrana in tampone A
9. Porre la membrana su un apposito sacchetto in plastica e applicare il reagente di rilevazione (Amersham Bioscience) sulla membrana (circa 25 μ l di reagente per cm² di membrana) distribuendolo uniformemente su tutta la sua superficie
10. Rilevare i segnali di ibridazione mediante scansione in fluorescenza [Thyphoon 9200 (Amersham Bioscience) impostazioni: laser 532 nm, PTM (fotomoltiplicazione) 600V, dimensione dei pixel 200 μ m, filtro 525 nm].

2.2. Identificazione dei geni interrotti

Le sequenze nucleotidiche fiancheggianti il trasposone Ez-Tn5 (Epicentre) nel genoma dei mutanti sono state precedentemente ottenute secondo la metodologia indicata dall'azienda fornitrice (Mini 2004) che prevede di ottenere, a partire dal genoma di ciascun mutante, un plasmide capace di replicarsi in *E. coli*, contenente EZ-Tn5 e le regioni genomiche fiancheggianti. I primer R6KAN-2RP-1 (5'CTACCCTGTGGAACACCTACATCT3') e KAN-2FP1 (5'ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC3') (Epicentre) che si legano all'interno di EZ-Tn5 e che divergono verso l'esterno, sono stati impiegati per sequenziare le regioni fiancheggianti il trasposone (figura 3.3).

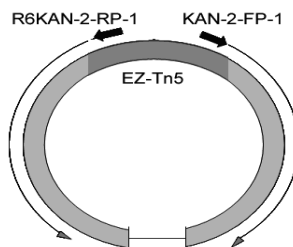


Figura 3.3. Sequenziamento delle regioni fiancheggianti il trasposone EZ-Tn5. A partire da un plasmide che contiene il gene (in grigio chiaro) interrotto dal trasposone EZ-Tn5 (in grigio scuro) si attua una reazione di sequenziamento impiegando come primer oligonucleotidi (frecce nere) che si legano all'interno di EZ-Tn5 e divergono rispetto ad esso (KAN-2 FP1 e R6KAN2 RP-1). I primer si localizzano a monte delle sequenze mosaico del trasposone Ez-Tn5

I primer si legano in EZ-Tn5 a monte di una sequenza che delimita il trasposone ad entrambe le estremità, detta sequenza mosaico (5'AGATGTGTATAAGAGACAG 3'). Per ottenere la sequenza nucleotidica della regione nella quale si è inserito il trasposone, le nucleotidiche ottenute, fiancheggianti Ez-Tn5, sono state analizzate secondo la procedura descritta in figura 3.4. Le sequenze ricostruite sono state analizzate mediante il programma ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) che ricerca all'interno di una data sequenza le possibili ORF (open reading frame),

cioè le sequenze nucleotidiche che potenzialmente potrebbero essere tradotte in sequenze amminoacidiche. Il programma analizza la sequenza oggetto di studio e la sequenza complementare nei tre possibili frame di lettura, ed esegue la traduzione in amminoacidi sulla base delle triplette nucleotidiche individuate. Le sequenze nucleotidiche sono state inoltre paragonate con quelle depositate nella banca dati GenBank del National Center for Biotechnology Information usando l'algoritmo BLASTn (paragrafo 1.1).

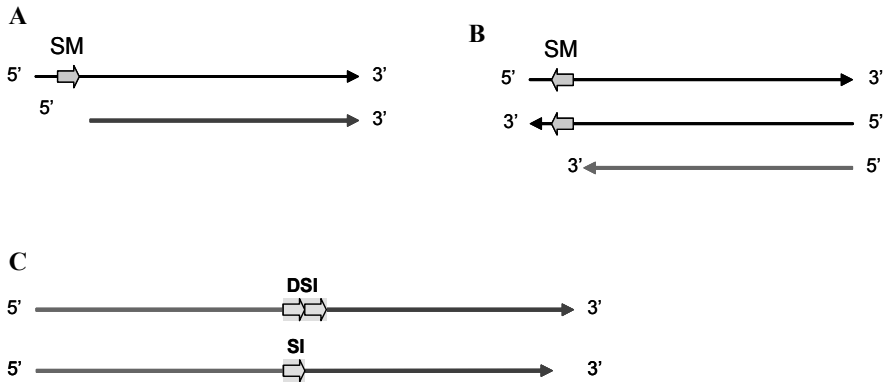


Figura 3.4. Procedura per la ricostruzione della sequenza nucleotidica interrotta dall'inserzione di Ez-Tn5, A) Ritaglio della sequenza ottenuta con il *primer* KAN-2FP-1, B) conversione della sequenza ottenuta con il *primer* R6KAN2RP-1 nella sequenza complementare a polarità opposta e successivo taglio della sequenza, C) ricostruzione della sequenza interrotta dal trasposone e successiva rimozione della duplicazione del sito di inserzione, che si generano in seguito all'inserzione del trasposone. SM: sequenza mosaico; DSI: duplicazione del sito di inserzione; SI: sito di inserzione

2.3. Analisi Phenotype Microarray (PM) del ceppo 28 e dei mutanti

Il ceppo 28 ed i mutanti sono stati caratterizzati a livello fenotipico tramite l'approccio PM impiegando le piastre PM01-02 (utilizzazione di diverse fonti di carbonio/energia), PM03 (utilizzazione di fonti di azoto), PM04 (utilizzazione di fonti di fosforo e zolfo), PM09 (sensibilità agli osmoliti), PM10 (sensibilità al pH), PM11-20 (sensibilità chimica). Ciascun ceppo è stato analizzato in duplicato. La procedura per l'allestimento delle piastre PM09-20 è descritta in paragrafo 3.1.4. Le piastre PM01-02 sono state inoculate con 100 μ l di una sospensione cellulare in IF-0+dye avente una torbidità dell'85% (paragrafo 1.4). Per l'allestimento delle piastre PM03-04 sono stati aggiunti 680 μ l di 2M succinato di sodio/ 200 μ M citrato a 68 ml della sospensione cellulare IF-0+dye con torbidità pari all'85%, quindi la sospensione ottenuta è stata inoculata nelle piastre in aliquote da 100 μ l. Le piastre sono state incubate

nell'apparato OmniLog secondo la modalità descritta nel paragrafo 1.4. Utilizzando il software OmniLog Parametric version sono state confrontate le curve consenso del ceppo parentale con quelle di ciascun mutante.

2.4. Caratterizzazione genetica e funzionale del gene (*oscA*) interrotto nel mutante Crg8

2.4.1. Identificazione dei geni fiancheggianti *oscA*

Una sequenza nucleotidica di circa 6700 pb comprendente *oscA* ed i geni ad esso fiancheggianti è stata amplificata mediante l'impiego dei *primer* fadf (5'ctggcttgaccagatctgctgc3') e *cysAr* (5'GTTTCATCACCACGATGCG3'), disegnati su regioni conservate rispettivamente di un gene codificante una desaturasi degli acidi grassi ed del gene *cysW* di ceppi di *Pseudomonas*. I *primer*, analizzati mediante il software OligoAnalyzer 3.0 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>), presentavano i seguenti requisiti, necessari per consentire un'efficiente amplificazione della sequenza bersaglio:

1. Lunghezza di 18-20 nucleotidi (massimo 25)
2. Assenza di ripetizioni successive di una singola base, in particolare non devono contenere tre o più G o C di seguito,
3. Temperatura di melting intorno ai 50-60 °C
4. Contenuto in G+C compreso tra il 40 e il 60%
5. Assenza di regioni complementari al loro interno
6. Assenza di formazione di dimeri tra se stessi o con altri *primer* di reazione

Per l'amplificazione è stato impiegato un enzima ad alta processività e fedeltà che permette di amplificare sequenze fino a 20 kb, contenuto nel kit Expand Long Template PCR System (Roche Applied Science) (tabella 3.7).

La reazione di amplificazione sono state condotte con l'apparecchio Thermal cycler GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystem) secondo lo schema riportato in tabella 3.8.

Il risultato delle reazioni di amplificazione è stato verificato in elettroforesi su gel di agarosio allo 0,8% (p/v). Il prodotto di PCR ottenuto è stato purificato mediante il kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) e sequenziato presso il centro BMR Genomics dell'Università di Padova.

Tabella 3.7. Composizione della miscela di PCR per l'amplificazione dell'intorno genomico di *oscA*.

Componente	Concentrazione /volume
Buffer 1 (Roche Applied Science)	1x
DNTPs	350 μM
Primer fadf	0,3 μM
Primer cysAr	0,3 μM
BSA*	0,2 mg/ml
MgCl₂	2 mM
Expand Long Template PCR (Roche Applied Science)	0,075U/μl
H₂O	q.b fino a 25 μl
DNA genomico diluito 1:10	2 μl

*Albumina di siero bovino (Sigma-Aldrich)

Tabella 3.8. Schema di reazione per l'amplificazione dell'intorno genomico di *oscA*

Denaturazione iniziale		94 °C per 2'
10 cicli	Denaturazione	94 °C per 10"
	Ibridazione	55 °C per 30"
	Sintesi	68 °C per 8'
	<hr/>	
20 cicli	Denaturazione	94 °C per 15"
	Ibridazione	51 °C per 30"
	Sintesi	68 °C per 8' + 20" per ogni ciclo successivo
<hr/>		
Sintesi finale		68°C per 7'

La sequenza dell'intero prodotto di PCR è stata ottenuta mediante la strategia del *primer walking*. Sono state quindi inizialmente ottenute le sequenze nucleotidiche terminali (800 pb circa) del prodotto di PCR impiegando gli stessi *primer* usati per la reazione di amplificazione (fadf e cysAr). Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state visualizzate e corrette mediante il software FinchTV e su di esse sono stati disegnati nuovi *primer* utilizzati in una seconda reazione di sequenziamento che hanno consentito di estendere ulteriormente la sequenza del prodotto di PCR. Il processo è stato ripetuto più volte fino ad ottenere il sequenziamento completo del prodotto di amplificazione. In tabella 3.9 sono riportati i *primer* impiegati per il sequenziamento dell'intero prodotto di PCR. Tutti i *primer* sono stati analizzati mediante il software OligoAnalyzer e per ognuno di essi sono stati verificati i requisiti precedentemente descritti.

Il completamento della sequenza del gene *cysW* è stato ottenuto mediante la tecnica di PCR inversa che permette di amplificare una sequenza ignota, fiancheggiata da una sequenza nota, mediante la procedura descritta in figura 3.5.

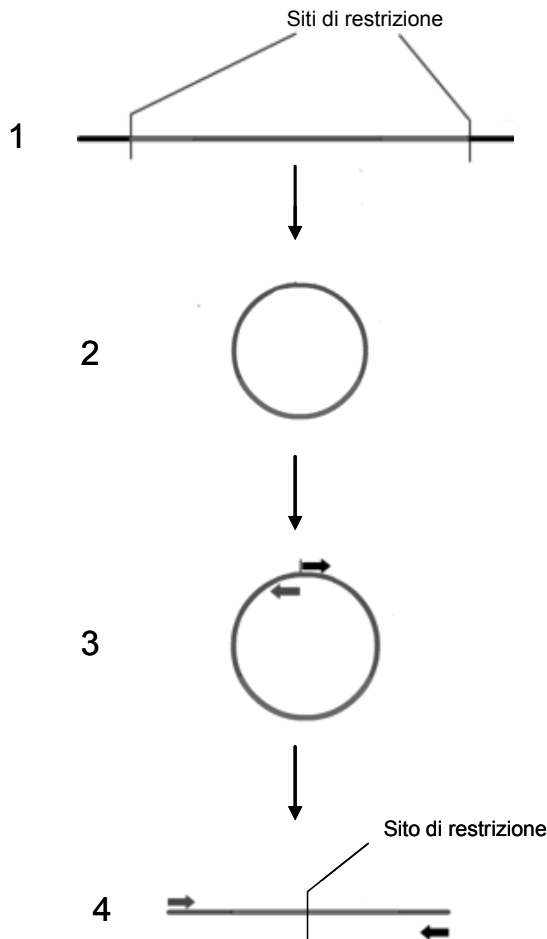


Figura 3.5. Fasi della tecnica di PCR inversa: 1) taglio del genoma mediante un enzima di restrizione che genera un frammento genomico di dimensioni amplificabili mediante PCR, contenente la sequenza nota (in grigio scuro) e le regioni sconosciute fiancheggianti (in grigio chiaro), 2) ligazione intramolecolare dei frammenti di restrizione, 3) amplificazione mediante *primer* che si legano a livello della sequenza nota e che divergono rispetto ad essa, 4) sequenziamento del prodotto di amplificazione

Un μg di DNA genomico di *P. corrugata* 28 è stato digerito con l'endonucleasi di restrizione ClaI (Roche Applied Science) ed al termine della reazione l'enzima è stato inattivato a 65 °C per 20 minuti. I frammenti genomici, ad una concentrazione pari a 10 ng/ μl , sono stati sottoposti a ligazione intramolecolare con l'enzima T4 DNA ligasi (Roche Applied Science) incubando la miscela a 16 °C per quattro ore. Un'aliquota della miscela di reazione è stata utilizzata come template in una reazione di PCR in cui sono stati impiegati i *primer* *cysAf* (5'TGCACGAGGACATCAACC3') e *cysArw1* (tabella 3.9). La reazione è stata allestita come descritto in tabella 3.10 ed è stata condotta con l'apparecchio Thermal cycler GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystem) secondo lo schema descritto in tabella 3.11

Tabella 3.9. *Primer* impiegati per il sequenziamento del prodotto di amplificazione ottenuto con i *primer* *fadf* e *cysAr*, comprendente il gene *oscA* ed i geni fiancheggiati.

Primer	Sequenza
fadf	5'GTT CAT CAC CAC GAT GCG3'
fadfw1	5'GAT CATCGACGGTTTCGC3'
sbprw1	5'TCCTGCCATTGACGCATC3'
sbpr	5'GCCAAGGCATAACGGCGAATTGAC3'
sbpf	5'TGCTCGCTGGAACCTTCCT3'
sbpfw1	5'GAGCTGATTACAAGCTAAGG3'
cysArw2	5'TCACTGACCCGTAICTCAC3'
cysArw1	5'TACACAGCACCCAGCCAT3'
cysAr	5'GTTTCATCACCACGATGCG3'

Tabella 3.10. Composizione della miscela di PCR per l'amplificazione della porzione terminale del gene *cysA*

Componente	Concentrazione/volume
Tampone PCR	1x*
DNTPs	200 μM
Primer <i>cysAf</i>	0,1 μM
Primer <i>cysAw1</i>	0,1 μM
BSA**	0,2 mg/ml
MgCl₂	2 mM
Taq DNA polimerasi (Polymed)	0,025U/ μl
H₂O	q.b fino a 50 μl
DNA stampo	25 μl

* 67 mM Tris HCl, pH8,8; 16mM (NH₄)SO₄; 0,01% Tween-20 (Polymed);

** Albumina di siero bovino (Sigma-Aldrich)

Tabella 3.11. Schema di reazione per l'amplificazione della porzione terminale del gene *cysA*.

Denaturazione iniziale		94 °C per 3'
30 cicli	Denaturazione	94 °C per 30''
	Ibridazione	56 °C per 30''
	Sintesi	72 °C per 60''
Sintesi finale		72°C per 10'

Il risultato delle reazioni di amplificazione è stato verificato in elettroforesi su gel di agarosio. Il prodotto principale di amplificazione (circa 3000 pb) è stato tagliato da gel e sottoposto a nuova amplificazione. Il prodotto di PCR ottenuto è stato purificato mediante il kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) e la regione iniziale di tale prodotto è stata sequenziata mediante l'impiego *primer cysAf* del presso il centro BMR Genomics (paragrafo 1.1).

2.4.2. Analisi trascrizionale dei geni *osca*, *sbp*, *cysT*, *cysW* e *cysW*

2.4.2.1 Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA

Per il ceppo parentale e per il mutante Crg8 sono state allestite sei colture (in duplicato) in 50 ml TMM (1,5 mM Na₂SO₄) (tabella 3.4). Le colture sono state incubate a 26 °C in agitazione fino a raggiungere una OD₆₀₀ pari a 0,5. Cinque colture del ceppo parentale e del mutante sono state quindi addizionate di K₂CrO₄ ad una concentrazione finale di 1 mM e poste nuovamente in incubazione per tempi diversi (rispettivamente 5', 15', 30', 60', 90'). Un volume (500 µl) della coltura di controllo (priva di K₂CrO₄) e di quelle trattate con K₂CrO₄ è stato sottoposto alla seguente procedura per arrestare la crescita ed al contempo proteggere l'RNA da eventuale degradazione:

1. Trasferire i 500 µl di coltura in un tubo da 1,5 ml e aggiungere 1 ml di RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen),
2. Mescolare la sospensione cellulare sul vortex per 5''
3. Incubare a temperatura ambiente per 5'
4. Centrifugare a 500 *xg* per 10'
5. Eliminare il surnatante e conservare ed il pellet a -80 °C.

I campioni sono stati sottoposti a estrazione dell'RNA totale mediante l'impiego del kit RNeasy Mini(Qiagen) secondo procedura indicata dall'azienda fornitrice. L'RNA estratto è stato sottoposto ad elettroforesi in gel di agarosio allo 0,8% (p/v) per verificarne l'integrità: l'RNA non degradato dà luogo a due bande ben definite di peso molecolare di circa 1500 pb e 2900 pb che rappresentano rispettivamente l'rRNA 16S e 23S. La quantificazione dell'RNA è stata ottenuta per via spettrofotometrica mediante

BioPhotometer (Eppendorf). Per ciascuno dei campioni di RNA (250 ng) è stato sintetizzato il cDNA impiegando l'enzima SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) secondo la seguente procedura indicata dall'azienda fornitrice.

2.4.2.2. Analisi di cotrascrizione

Le regioni intergeniche *oscA-sbp*, *sbp-cysW*, *cysW-cysT*, *cysT-cysW*, *cysW-cysW* sono state amplificate mediante PCR a partire dal cDNA derivato da RNA estratto dalle colture di *P. corrugata* 28 non esposte o esposte a Cr(VI) per tempi diversi (5', 15', 30', 60', 90'). Come controllo positivo è stato impiegato DNA genomico del ceppo 28, mentre come controllo negativo RNA non retrotrascritto estratto dal ceppo 28, esposto o non esposto a Cr(VI), per assicurarsi che gli eventuali prodotti di amplificazione ottenuti a partire da cDNA non derivino da DNA genomico contaminante i campioni di RNA. In tabella 3.12 sono riportati i *primer* che sono stati impiegati nelle reazioni di amplificazione. Le reazioni di amplificazione sono state allestite come descritto in tabella 3.13. Tutte le reazioni di amplificazione sono state condotte con l'apparecchio Thermal cycler GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystem) secondo lo schema descritto in tabella 3.14. Il risultato delle reazioni di amplificazione è stato verificato in elettroforesi su gel di agarosio allo 0,8% (p/v).

Tabella 3.12. *Primer* impiegati per l'amplificazione delle regioni intergeniche *oscA-sbp*, *sbp-cysA*, *cysA-cysT*, *cysT-cysW*, *cysW-cysA*.

Primer	sequenza	Sequenza amplificata
rtoscAf	5'ATGAGCGCATCTCTACGCAGC3'	Regione intergenica oscA-sbp
rtsbpr	5'GAGGTAGGCTTCGGCGATCT3'	Regione intergenica oscA-sbp
rtsbpf	5'TCCTGGCGCTGAAAGAAGAC3'	Regione intergenica sbp-cysT
rtcysTr	5'GGAAACCACCAGCATCAGCA3'	Regione intergenica sbp-cysT
rtcysTf	5'AAAACCGAGATCCTGCCGC3'	Regione intergenica cysT-cysW
rtcysWr	5'TCCTGCATCAGCGGGATC3'	Regione intergenica cysT-cysW
rtcysWf	5'AGATTGTGTTTGCCTGCC3'	Regione intergenica cysW-cysA
rtcysAr	5'GCCAGTCCAGTTGCACCATGT3'	Regione intergenica cysW-cysA

Tabella 3.13. Composizione della miscela di PCR per l'amplificazione delle regioni intergeniche *osca-sbp*, *sbp-cysA*, *cysA-cysT*, *cysT-cysW*, *cysW-cysA*.

Componente	Concentrazione/volume
Tampone PCR	1x*
DNTPs	200 μM
Primer A, Primer B**	0,1 μM ciascuno
BSA***	0,1 mg/ml
MgCl₂	1,5 mM
Taq DNA polimerasi (Polymed)	0,025U/μl
H₂O	q.b fino a 25 μl
cDNA	1 μl

* 67 mM Tris HCl, pH8,8; 16 mM (NH₄)SO₄; 0,01% Tween-20 (Polymed)

**Le coppie di *primer* impiegate (A, B) sono state: *rtoscAf-rtsbp*, *rtsbpf-rtcysTr*, *rtcysTf-rtcysWr*, *rtcysWf-rtcysAr*

***Albumina di siero bovino (Sigma-Aldrich)

Tabella 3.14. Schema di reazione per l'amplificazione delle regioni intergeniche *osca-sbp*, *sbp-cysA*, *cysA-cysT*, *cysT-cysW*, *cysW-cysA*.

Denaturazione iniziale	94 °C per 3'
30 cicli	Denaturazione 94 °C per 30"
	Ibridazione 59 °C -0,1 °C ogni ciclo, per 30"
	Sintesi 72 °C per 60"
Sintesi finale	72°C per 10'

2.4.2.3. Analisi dell'espressione genica

L'espressione dei geni *osca*, *sbp*, *cysW* in *P. corrugata* 28 e nel mutante Crg8 in risposta ad esposizione al Cr(VI) è stata valutata mediante real time PCR su cDNA ottenuto da colture dei due ceppi batterici esposte per tempi successivi (0', 5', 15', 30' 60' e 90') al Cr(VI). I fattori di espressione relativa sono stati calcolati tramite il metodo di Pfaffl (Pfaffl et al. 2002) impiegando come gene "normalizzatore" il gene codificante il 16S rRNA, secondo la seguente formula (equazione di Pfaffl):

Fattore di espressione = $(E_{target})^{\Delta CT_{target}} / (E_{ref})^{\Delta CT_{ref}}$
(controllo-campione) / (controllo-campione)

dove E_{target} , E_{ref} indicano rispettivamente l'efficienza di amplificazione del gene bersaglio e del gene normalizzatore, ΔCT_{target} (controllo-campione) e ΔCT_{ref} (controllo-campione) rappresentano la differenza tra il ciclo soglia misurato nel controllo (condizione di non esposizione) e il ciclo soglia misurato nel campione (condizione di esposizione), rispettivamente per il gene bersaglio e per il gene normalizzatore. L'efficienza di amplificazione per ciascun gene è calcolata sulla base di una retta che definisce come varia il ciclo soglia in funzione di diluizioni progressive del DNA bersaglio e si definisce come $E=10^{(-1/slope)}$, dove la slope è il coefficiente angolare della retta.

Tutti i campioni di cDNA ottenuti dalla retrotrascrizione di RNA estratto da due repliche di colture di *P. corrugata* 28 e del mutante Crg8 esposte al Cr(VI) per 0', 5', 15', 30', 60', 90', sono stati diluiti 1:10 e 1:100. Il cDNA tal quale e le due diluizioni (1:10 e 1:100) sono stati impiegati come template in reazioni di real time PCR. Ciascuna reazione è stata eseguita in triplicato. Le reazioni di amplificazione sono state condotte in micropiastre da 96 pozzetti in un volume finale di 25 μ l. In tabella 3.15 vengono riportati i *primer* che sono stati impiegati nelle reazioni di amplificazione dei geni *osca*, *sbp*, *cysW* e del gene codificante l'rRNA 16S. La miscela di reazione è stata allestita come descritto in tabella 3.16, impiegando il kit Platinum SYBRGreen qPCR Supermix UDG (Invitrogen). Tutte le reazioni di amplificazione sono state condotte con l'apparecchio iCycler (Bio-rad) secondo lo schema descritta in tabella 3.17.

Tabella 3.15. *Primer* impiegati per l'amplificazione in *real time* PCR dei geni *osca*, *sbp*, *cysA*.

Primer*	sequenza	Sequenza amplificata
rtoscAf	5'ATGAGCGCATCTCTACGCAGC3'	Porzione <i>osca</i>
rtoscAr	5'CAAAACGAAGGTCCCGCAAG3'	Porzione <i>osca</i>
rtsbpf	5'TCCTGGCGCTGAAAGAAGAC3'	Porzione <i>sbp</i>
rtsbpr	5'GAGGTAGGCTTCGGCGATCT3'	Porzione <i>sbp</i>
rtcysAf	5'CTTGCGCATGAAGCCCAA3'	Porzione <i>cysA</i>
rtcysAr	5'GCCAGTCCAGTTGCACCATGT3'	Porzione <i>cysA</i>
rt16sf	5'CATTGAGACAGGTGCTGCAT'	Porzione del gene codificante il 16SrRNA
rt16sf	5'CACCGGCAGTCTCCTTAGAG3'	Porzione del gene codificante il 16SrRNA

*I *primer* per le reazioni di *real time* PCR sono stati disegnati in modo da soddisfare i requisiti descritti nel paragrafo C.2.4 Inoltre, 1) per ciascun *primer* è stata verificato il grado di specificità mediante la ricerca di sequenze simili nel genoma di *P. fluorescens* Pf-5 tramite il software BLASTn; 2) i *primer* sono stati disegnati su regioni del cDNA template non soggette alla formazione di strutture secondarie (l'analisi delle strutture secondarie delle molecole di cDNA è stata effettuata mediante il "DNA mfold server" del Dr. Micheal Zuker al sito <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>); 3) Il DNA stampo amplificato da ciascuna coppia di *primer* è stato scelto in modo che avesse una lunghezza di 75-150 pb.

Tabella 3.16. Composizione della miscela di *real PCR* per l'amplificazione di regioni interne dei geni *oscA*, *sbp*, *cysA*, e del gene codificante l' rRNA 16S.

Componente	Concentrazione/volume
PlatinumSYBRGreen qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen)	1x*
Primer A, Primer B**	0,4 μM ciascuno
Fluoresceina (Bio-rad)***	25 nM
H₂O	q.b fino a 25 μl
cDNA	1 μl

*SYBRGreen I; 30 U/ml Platinum *Taq* DNA polymerase; 20 mM Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM KCl; 3mM MgCl₂; 200 μM dGTP; 200 μM dATP; 200 μM dCTP; 200 μM dTTP; 20 U/ml UDG; e stabilizzatori.

** Le coppie di *primer* impiegate (A, B) sono state: *rtoscAf-rtoscAr*, *rtsbpf-rtsbpf*, *rtcysAf-rtcysAr*, *rt16Sf-rt16Sr*, per l'amplificazione rispettivamente dei geni *oscA*, *sbp*, *cysA* e del gene codificante il 16S rRNA.

***La fluoresceina viene utilizzata nel termociclatore iCycler (Bio-rad) per normalizzare il segnale di fluorescenza.

Tabella C.17. Schema di reazione per l'amplificazione mediante *real time PCR* di regioni interne dei geni *oscA*, *sbp*, *cysA* e del gene codificante l'rRNA 16S e per la determinazione della curva di *melting*

	Denaturazione iniziale	95 °C per 2'
	Denaturazione	95 °C per 10''
45 cicli	Ibridazione	56 °C per 10''
	Sintesi	72 °C per 10''
85 cicli	Curva di <i>melting</i>	65°C + 0,4°C per 10' ogni ciclo

I valori di ciclo soglia dei diversi campioni sono stati esportati per la successiva elaborazione. I tre valori di ciclo soglia ottenuti dai tre replicati tecnici di PCR per ciascun campione sono stati mediati ed i valori medi ottenuti sono stati impiegati per calcolare il fattore di espressione relativo per i tre diversi geni *oscA*, *sbp*, *cysW* nel ceppo parentale e mutante esposti per 5', 15', 30', 60' e 90' al Cr(VI), mediante l'impiego del software REST (<http://rest.gene-quantification.info/>). Tale software calcola i fattori di espressione relativi sulla base dell'equazione di Pfaffl e per ciascuno di essi esegue un'analisi statistica di randomizzazione per saggiarne la significatività.

2.4.3. Complementazione genica

2.4.3.1. Costruzione dei plasmidi pCHR61e pCHR62

I plasmidi pCHR61 e pCHR62 sono stati costruiti a partire dal vettore pBBR1MCS-5 (Kovach et al. 1995) (figura 3.6), un plasmide capace di replicarsi in *Pseudomonas*, portante il promotore costitutivo Plac di *E. coli* seguito da un sito di clonaggio multiplo (MCS) ed un gene codificante un enzima che conferisce la resistenza alla gentamicina.

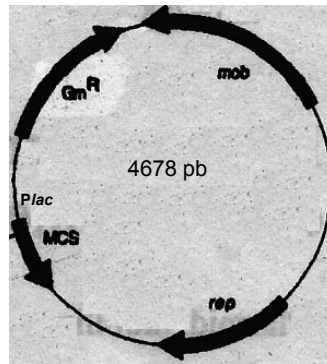


Figura 3.6. Plasmide pBBR1MCS-5. Gm^R = gene per la resistenza alla gentamicina; *rep* = gene codificante la proteina di inizio della duplicazione plasmidica; *mob* = gene per la mobilizzazione del plasmide durante la coniugazione; MCS (sito multiplo di clonaggio) portante in sequenza i siti di taglio per i seguenti enzimi di restrizione: *KpnI*, *ApaI*, *XhoI*, *Sall*, *Bsp106 I*, *ClaI*, *HindIII*, *EcoRI*, *PstI*, *SmaI*, *BamHI*, *SpeI*, *XbaI*, *BstXI*, *SacI*; *Plac*: promotore dell'operone *lac* di *E. coli* localizzato a monte del MCS.

Plasmide pCHR61. Il plasmide pCHR61 è costituito dal vettore pBBR1MCS-5 contenente, a livello del MCS, una sequenza portante il gene *oscA* con il relativo promotore. In figura 3.7 viene rappresentata la procedura per la costruzione del pCHR61, le cui fasi vengono descritte in dettaglio di seguito. Una sequenza nucleotidica di 1144 pb comprendente il gene *oscA* è stata amplificata dal genoma di *P. corrugata* 28 mediante l'impiego dei primer *oscAf* (5' GGAGTTGGAAGTGACCGAAA3') e *oscAr* (5' CACGATGGTTGAGGTGTACG3') (tabella 3.18). Tutte le reazioni di amplificazione sono state condotte con l'apparecchio Thermal cycler GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystem) secondo lo schema descritto in tabella 3.19

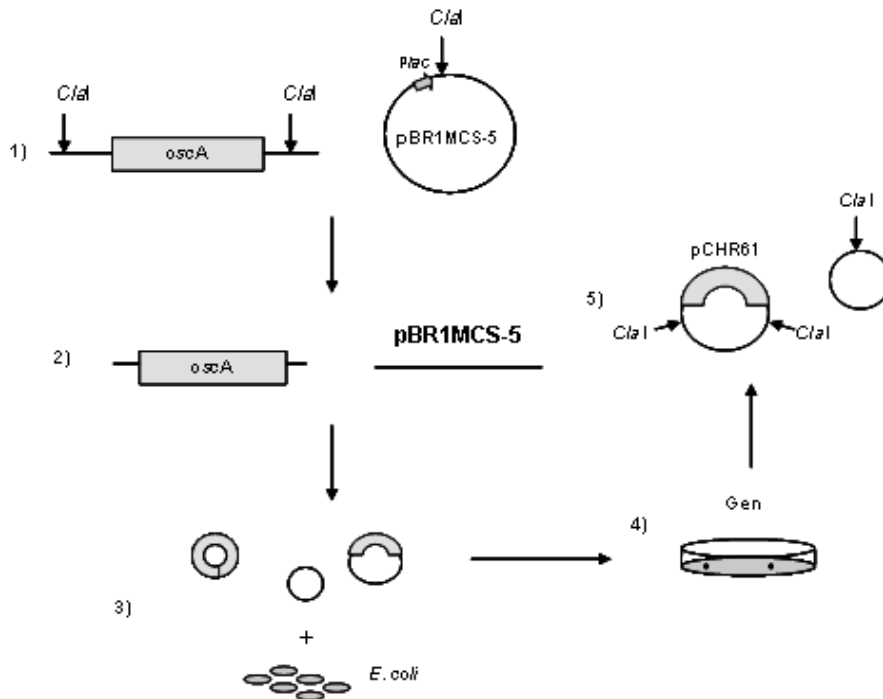


Figura 3.7. Procedura impiegata per la costruzione del plasmide pCHR61: 1) Il prodotto di amplificazione contenente il gene *oscA* ed il vettore pBBR1MCS-5 sono stati tagliati con l'enzima di restrizione *ClaI*, 2) i prodotti di digestione sono stati sottoposti a ligazione intermolecolare, 3) i prodotti di ligazione sono stati trasformati in *E. coli*, 4) le cellule di *E. coli* sono state piastrate su terreno selettivo contenente gentamicina, 5) dai cloni di *E. coli* sono stati estratti i plasmidi e le loro dimensioni sono state verificate mediante digestione con *ClaI* e successiva elettroforesi in gel di agarosio

. Il risultato delle reazioni di amplificazione è stato verificato in elettroforesi su gel di agarosio allo 0,8% (p/v). Il prodotto di PCR è stato purificato mediante il kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) e quantificato mediante lo spettrofotometro Bio-Photometer (Eppendorf).

Il vettore pBBR1MCS-5 ed il prodotto di amplificazione sono stati digeriti con l'enzima di restrizione *ClaI* (Roche Applied Science), secondo la procedura indicata dall'azienda fornitrice. L'enzima è stato inattivato a 65 °C per 20 minuti. I prodotti di digestione del prodotto di PCR e del vettore pBBR1MCS-5 sono stati sottoposti a ligazione intermolecolare (tabella 3.20) a 16 °C per quattro ore.

Dieci μl del prodotto di ligazione sono state trasformate in cellule di *E. coli* DH5 α rese competenti secondo la seguente procedura:

1. Inoculare cellule di *E. coli* DH5 α cresciute in piastra su LB in 3 ml di LB liquido e incubare in agitazione o.n. a 37 °C.
2. Inoculare un volume della coltura cresciuta in 50 ml LB liquido in modo da ottenere una OD₆₀₀ pari a 0,1 ed incubare a 37 °C in agitazione
3. Quando la coltura raggiunge una OD₆₀₀ di circa 0,3-0,5 trasferire in tubi da 50 ml e porre in ghiaccio per 10'
4. Centrifugare a 3000 xg a 4 °C per 10'
5. Eliminare il surnatante e risospendere il pellet in 1 ml di 0,1 M CaCl₂ freddo, successivamente portare il volume a 10 ml con 0,1 M CaCl₂ e lasciare in ghiaccio per 10'
6. Centrifugare a 3000 xg a 4 °C per 10'
7. Eliminare il surnatante e risospendere il pellet in 1 ml di 0,1 M CaCl₂ freddo.
8. Incubare in ghiaccio per 2-3 ore
9. Aggiungere glicerolo 40% (v/v) in rapporto 1:1 e aliquotare 200 μl della sospensione cellulare in tubi da 1,5 ml.
10. Conservare a -80°C fino al momento dell'uso.

La procedura di trasformazione seguita è descritta di seguito:

1. Scongelare le cellule competenti di *E. coli* DH5 α in ghiaccio
2. Aggiungere il DNA
3. Incubare in ghiaccio per 30'
4. Mantenere a 42 °C per 90''
5. Trasferire rapidamente in ghiaccio e aggiungere 800 μl di LB
6. Incubare a 37 °C in agitazione per 45'
7. Piastrare su terreno LB contenente 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di gentamicina e incubare a 37 °C o.n.

Le colonie batteriche sono state recuperate ed inoculate in 100 ml di LB contenente 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicina, quindi incubate a 37 °C o.n. I plasmidi sono stati estratti dalle colture mediante il kit Plasmid purification Midi (Qiagen) secondo la procedura indicata dall'azienda fornitrice e quindi sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio allo 0,8% (p/v). Plasmidi caratterizzati da una dimensione maggiore rispetto al vettore pBBR1MCS-5, sono stati sottoposti a digestione enzimatica con ClaI e la dimensione dei frammenti ottenuti sono state stimate tramite elettroforesi in gel di agarosio 0,8% (p/v). Plasmidi costituiti da due frammenti, uno di 4678 pb corrispondente al vettore pBBR1MCS-5 ed uno di 909 pb corrispondente alla sequenza contenente *oscA* sono stati sequenziati mediante *primer* T7 (5'TAATACGACTCACTATAGGG3'), che si lega a valle del sito multiplo di clonazione del vettore pBBR1MCS-5. Un plasmide in cui il gene *oscA* presenta lo stesso orientamento di Plac è stato selezionato per gli esperimenti di complementazione e denominato pCHR61.

Plasmide pCHR62. Il plasmide pCHR62 è costituito dal vettore pBBR1MCS-5 contenente, a livello del MCS, l'operone *oscA-sbp*. In entrambi i plasmidi *oscA* ed *oscA-sbp*, presentano lo stesso orientamento del promotore Plac del vettore pBBR1MCS-5. In figura 3.8 vengono rappresentate le fasi necessarie alla costruzione del pCHR62 che vengono descritte in dettaglio di seguito. Una sequenza nucleotidica di circa 1850 pb comprendente i gene *oscA* ed *sbp* è stata amplificata dal genoma di *P. corrugata* 28 mediante l'impiego dei primer XhoIcysopf (5' GACTCGAGCATGGGTATGCAAGTGCAAG3') e BamHIoscAsbpr (5'CGGGATCCGCACAATCAGACTGAGGTAC3') che presentano all'estremità 5' rispettivamente i siti di taglio per gli enzimi di restrizione *XhoI* e *BamHI* (sequenze sottolineate) (tabella 3.18). Tutte le reazioni di amplificazione sono state condotte nell'apparecchio Thermal cycler GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystem) secondo lo schema riportato in tabella 3.21.

I prodotti di digestione del prodotto di PCR e del vettore pBBR1MCS-5 sono stati sottoposti a ligazione intermolecolare secondo lo schema di reazione riportato in tabella 3.22. Per impedire che il vettore tagliato possa rilegarsi su se stesso, esso è stato preventivamente trattato con 0,5 U fosfatasi alcalina (Roche Applied Science) per 2 ore a 37 °C. La miscela di reazione è stata incubata a 16°C per quattro ore.

Cellule competenti di *E. coli* DH5α sono state trasformate con 10 µl del prodotto di ligazione tra il prodotto di PCR digerito con *XhoI* e *BamHI*, contenente i geni *oscA-sbp*, ed il vettore pBBR1MCS-5 tagliato con gli stessi enzimi, come precedentemente descritto. Le colonie dei ceppi trasformati sono state inoculate in 30 ml di LB contenente 20 µg/µl di gentamicina ed incubate a 37 °C o.n.. Dalle colture ottenute sono stati estratti i plasmidi mediante il kit Plasmid extraction midi (Qiagen). Plasmidi caratterizzati da una dimensione maggiore rispetto al vettore pBBR1MCS-5, sono stati sottoposti a digestione enzimatica con *XhoI* e *BamHI* e le dimensioni dei frammenti di digestione sono state determinate tramite elettroforesi. Un plasmide di circa 6000 pb in lunghezza costituito da due frammenti, uno di 4678 pb corrispondente al vettore pBBR1MCS-5 ed uno di circa 1850 pb corrispondente alla sequenza contenente *oscA-sbp*, è stato denominato pCHR62 ed impiegato per i successivi esperimenti di complementazione.

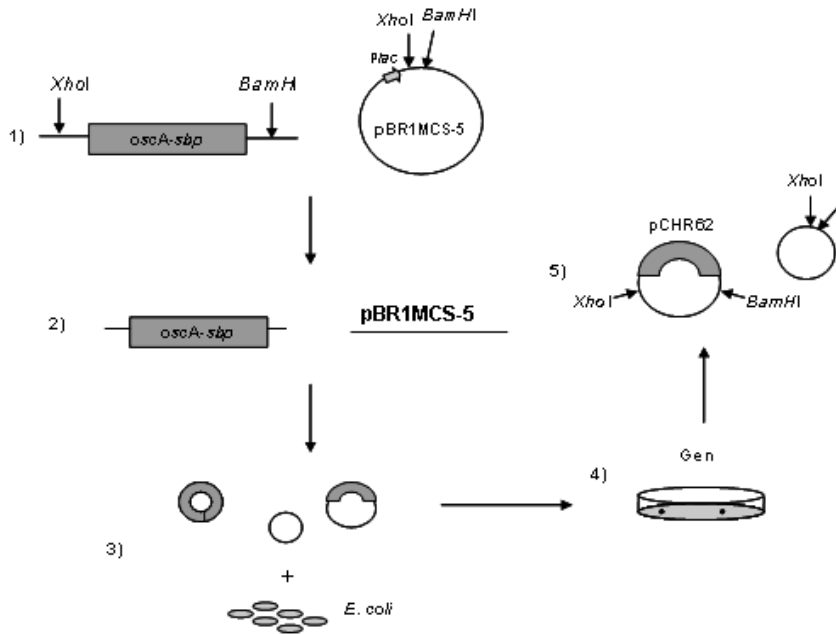


Figura C.8. Procedura impiegata per la costruzione del plasmide pCHR62: 1) Il prodotto di amplificazione contenente i geni *oscA* ed *spb*, ed il vettore pBBR1MCS-5 sono stati tagliati con gli enzimi di restrizione *XhoI* e *BamHI*, 2) i prodotti di digestione sono stati sottoposti a ligazione intermolecolare, 3) i prodotti di ligazione sono stati trasformati in *E. coli*, 4) le cellule di *E. coli* sono state piastrate su terreno selettivo contenente gentamicina, 5) dai cloni di *E. coli* sono stati estratti i plasmidi e le loro dimensioni sono state verificate mediante digestione con *XhoI* e *BamHI* e successiva elettroforesi in gel di agarosio

2.4.3.2. Trasformazione dei plasmidi nel ceppo 28 e nel mutante *Crg8*

Il vettore pBBR1MCS-5 e i plasmidi pCHR61 e pCHR62 sono stati inseriti nel ceppo 28 e nel mutante *Crg8* mediante elettroporazione.

Le cellule del ceppo parentale ed del mutante sono state rese elettrocompetenti secondo la seguente procedura:

1. Inoculare il ceppo parentale ed il mutante in 3 ml rispettivamente di LB e LB contenente 15 $\mu\text{g/ml}$ kanamicina, ed incubare in agitazione a 26 °C o.n.
2. Inoculare 100 ml di LB, e 100 ml di LB contenente 15 $\mu\text{g/ml}$ kanamicina con il 2% (v/v) rispettivamente delle colture del parentale e del mutante ottenute al punto 1
3. Incubare le colture in agitazione a 26 °C fino ad ottenere una OD_{600} di circa 0,3-0,5
4. Mantenere in ghiaccio per 10'

5. Trasferite in tubi da 50 ml e centrifugare a 5000 *xg* a 4 °C per 10'
6. Eliminare il surnatante e risospendere il pellet in 1 ml di glicerolo 10% (v/v) freddo
7. Portare il volume a 10 ml con glicerolo 10% (v/v) e centrifugare per 10' a 5000 *xg* a 4 °C
8. Ripetere per due volte i punti 6 e 7
9. Eliminare il surnatante e risospendere il pellet in 80 µl di glicerolo 10% (v/v)
10. Aliquotare 40 µl della sospensione cellulare in due tubi
11. Conservare a -80 °C fino al momento dell'uso.

Tre aliquote cellule elettrocompetenti del ceppo parentale e del mutante sono state trasformate con 300 ng rispettivamente dei plasmidi pBBR1MCS-5, pCHR61, pCHR62, secondo la seguente procedura:

1. Scongela le cellule elettrocompetenti in bagno di ghiaccio
2. Aggiungere il DNA alle cellule
3. Trasferire l'intero volume in una cuvetta per elettroporazione (Bio-rad)
4. Inserire la cuvetta nell'elettroporatore Bio-rad Gene Pulser (Bio-rad) e generare l'impulso elettrico (V = 2KV, C = 125 µF, R = 200 Ω)
5. Rapidamente risospendere le cellule in 2 ml SOC (20 g/l triptone; 1,5 g/l estratto di lievito; 0,5 g/l NaCl; 5 ml/l di 2M MgCl₂; 3,6 g/l glucosio)
6. Incubare la sospensione a 30 °C per un ora
7. Piastrare le cellule del ceppo parentale su LB contenente 20 µg/ml gentamicina e le cellule del mutante Crg8 su LB contenente 20 µg/ml gentamicina e 15 µg/ml kanamicina.

Le colonie del ceppo parentale e del mutante Crg8 contenenti i plasmidi pBBR1MCS-5, pCHR61, pCHR62 sono state recuperate, nuovamente isolate e conservare per le successive analisi in presenza degli opportuni antibiotici (tabella 3.23).

Tabella 3.23. Antibiotici aggiunti ai terreni utilizzati per il mantenimento del ceppo parentale *P. corrugata* 28 e del mutante Crg8, portanti i plasmidi pBBR1MCS-5, pCHR61 e pCHR62

Ceppo + plasmide	Antibiotico/i
<i>P. corrugata</i> 28 + pBBR1MCS-5	20 µg/ml gentamicina
<i>P. corrugata</i> 28 + pCHR61	20 µg/ml gentamicina
<i>P. corrugata</i> 28 + pCHR62	20 µg/ml gentamicina
Mutante Crg8 + pBBR1MCS-5	20 µg/ml gentamicina e 15 µg/ml kanamicina
Mutante Crg8 + pCHR61	20 µg/ml gentamicina e 15 µg/ml kanamicina
Mutante Crg8 + pCHR62	20 µg/ml gentamicina e 15 µg/ml kanamicina

2.4.3.3. Analisi dell'utilizzazione delle fonti di zolfo mediante PM da parte del mutante Crg8 trasformato con il plasmide pCHR61

Il mutante Crg8 trasformato con pCHR61 è stato sottoposto ad analisi PM impiegando la micropiastra PM04 (utilizzo fonti di fosforo-zolfo) in duplicato, secondo la procedura descritta nel paragrafo 2.3.

2.4.3.4. Determinazione della concentrazione di Cr(VI) minima inibente la crescita [Cr(VI)-MIC]

La Cr(VI)-MIC del ceppo parentale di *P. corrugata* 28 e del mutante Crg8 portanti i plasmidi pBBR1MCS-5, pCHR61 e pCHR62 è stata determinata secondo la seguente procedura:

1. Inoculare i ceppi in 3 ml di TMM (tabella 3.4) addizionato degli opportuni antibiotici (tabella 3.23) ed incubare in agitazione a 26 °C o.n.
2. Preparare dei tubi di vetro contenenti 5 ml di terreno TMM ed aggiungere ai tubi concentrazioni crescenti di K₂CrO₄ (da 0 a 40 mM) (per ciascuna concentrazione di K₂CrO₄ allestire due repliche)
3. Inoculare, per ciascun ceppo cresciuto o.n., i tubi allestiti al punto 2 con 100 µl di coltura
4. Incubare i tubi a 26 °C in agitazione e a tempi successivi determinare la torbidità delle colture mediante fotocolorimetro Klett-Summerson (Klett MFG Co. Inc.)
5. Per ciascun ceppo, e per ciascun valore di concentrazione di K₂CrO₄, determinare il valore medio di torbidità (calcolato sulla base di due repliche). La Cr(VI)-MIC è data dalla concentrazione minima di K₂CrO₄ per la quale non si osserva crescita batterica.

2.5. Determinazione della Cr(VI)-MIC batterica in presenza di diverse fonti di zolfo

La Cr(VI)-MIC di *P. corrugata* 28 in presenza di diverse concentrazioni di solfato e diverse fonti di organiche zolfo è stata determinata secondo la seguente procedura:

1. Allestire una coltura di *P. corrugata* 28 in TMM (tabella 3.4) contenente 500 µM Na₂SO₄ e incubare o.n. a 26 °C
2. Lavare per due volte la coltura e risospenderla in TMM privo di Na₂SO₄.
3. Preparare, utilizzando come base le componenti del TMM, 28 terreni di coltura contenenti differenti fonti di zolfo organico e differenti concentrazioni di Na₂SO₄ (tabella 3.24)
4. Aggiungere ai 28 mezzi di coltura preparati come descritto al punto 3 concentrazioni crescenti di K₂CrO₄ (da 0 a 60 mM) in modo da ottenere 336 terreni di coltura

che differiscono per fonte di zolfo organico, concentrazione di Na_2SO_4 e concentrazione di K_2CrO_4 .

5. Inoculare i 336 terreni di coltura diversi con la sospensione cellulare preparata al punto 1. Ciascuna condizione è stata saggiata in triplo.
6. Incubare in agitazione a 26 °C
7. A tempi successivi (24 e 48 ore) determinare la crescita tramite determinazione della OD_{600} .
8. Calcolare la OD_{600} media sulla base delle tre repliche. La Cr(VI)-MIC è il minimo di concentrazione di K_2CrO_4 per il quale non si ha crescita batterica

Tabella 3.24. Composizione in fonti di zolfo dei ventiquattro diversi tipi di TMM (TMM1-TMM24).

Fonte di zolfo organico (300 μM)	Na_2SO_4 (μM)			
	0	30	300	3000
Nessuna	TMM1	TMM2	TMM3	TMM4
Cisteina	TMM5	TMM6	TMM7	TMM8
Glutazione	TMM9	TMM10	TMM11	TMM12
Metionina	TMM13	TMM14	TMM15	TMM16
Acido etansolfonico	TMM17	TMM18	TMM19	TMM20
Taurina	TMM21	TMM22	TMM23	TMM24
Dimetilsofossido	TMM25	TMM26	TMM27	TMM28

Capitolo 4

Risultati e discussione

1. Caratterizzazione di ceppi batterici per il biorisanamento di suoli contaminati da Cr(VI).

L'efficacia degli interventi di biorisanamento di suoli contaminati da Cr(VI) è spesso limitata dalla scarsa conoscenza del fenotipo dei microrganismi resistenti al Cr(VI) e capaci di ridurlo a Cr(III) dopo essere stati inoculati nei suoli. Per poter biorisanare con efficacia un suolo contaminato da Cr(VI) è necessario conoscere, oltre alle caratteristiche proprie del suolo, anche il fenotipo dei microrganismi da impiegare che devono persistere e mantenersi metabolicamente attivi nel suolo. All'interno di questa problematica è stata condotta una ricerca con lo scopo di attuare una profonda caratterizzazione di quattro ceppi batterici iper-resistenti al Cr(VI) [40 mM MIC-Cr(VI)] e capaci di ridurlo. Tale studio ha previsto l'identificazione dei ceppi, la valutazione delle loro capacità di riduzione del Cr(VI) su diverse fonti di carbonio/energia ed un ampio studio fenotipico condotto mediante la tecnologia PM.

1.1. Identificazione dei ceppi

I quattro isolati batterici, denominati 22, 28, 34 e 56, sono stati identificati mediante analisi delle sequenze del 16S rDNA e l'approccio Biolog-ID. I ceppi 22 e 28 presentano sequenze del 16S rDNA identiche tra loro che mostrano una similarità del 99% con le sequenze di *P. aurantica* (accession number AY271792) e *P. fluorescens* (accession number AY447045). Le sequenze del 16S rDNA degli isolati 34 e 56 sono identiche tra loro e presentano una similarità del 99% con le sequenze di *P. mendocina* LGM1223T (accession number DQ178223) e *P. pseudoalcaligenens* (accession number AB109888). L'attribuzione di specie nei batteri viene di norma effettuata basandosi su un livello di similarità delle sequenze del 16S rDNA uguale o superiore al 97%, tuttavia all'interno del genere *Pseudomonas* esistono specie diverse con un livello di similarità del 16S rDNA superiore al 99% e conseguentemente l'analisi del 16S

rDNA ha permesso di identificare gli isolati soltanto a livello di genere (*Pseudomonas*). Quindi per identificare gli isolati a livello di specie è stato impiegato l'approccio Biolog-ID, che consente di attribuire un ceppo ad una determinata specie sulla base del profilo di utilizzazione di 95 fonti di carbonio. I risultati ottenuti hanno mostrato che gli isolati 22 (100% probabilità e 0,76 similarità) e 28 (99% probabilità e 0,76 similarità) appartengono alla specie *P. corrugata*, mentre gli isolati 34 (100% probabilità e 0,85 similarità) e 56 (100% probabilità e 0,72 similarità) appartengono alla specie *P. mendocina*.

1.2. Influenza delle fonti di carbonio/energia sulla riduzione del Cr(VI)

Uno dei principali fattori che influenza la riduzione microbica del Cr(VI) nel suolo è costituito dalla disponibilità di nutrienti (paragrafo A.3). Tra questi la sostanza organica, che supporta l'attività dei microrganismi chemioorganotrofi eterotrofi, ha un ruolo di primaria importanza nello stimolare la bioriduzione del Cr(VI) (Fulladosa et al. 2006; Losi et al. 1994b; Laxman & More 2002; Wang & Xiao 1995). È stato osservato che l'aggiunta di sostanza organica nel suolo favorisce la riduzione batterica del Cr(VI) a Cr(III) sia in anaerobiosi (Jeyasingh & Philip 2005) sia in anaerobiosi (Bank et al. 2007). Il biorisanamento di suoli contaminati da Cr(VI) può venire quindi favorito dall'aggiunta di sostanza organica, tuttavia la scelta del tipo di fonte di carbonio/energia non può essere casuale, perché fonti di carbonio/energia diverse stimolano in misura diversa la riduzione del Cr(VI). In *Vibrio fisheri* la riduzione del Cr(VI) è stimolata sia da glucosio sia da glicerolo, tuttavia il glucosio favorisce maggiormente il processo riduttivo (Fulladosa et al. 2006). Un ceppo di *Enterobacter cloacae* in presenza di acetato e glicerolo riduce il Cr(VI) più rapidamente che in presenza di glucosio (Wang et al. 1989). *Burkholderia cepacia* MCMB-821 riduce il Cr(VI) sfruttando come fonte di elettroni diversi composti organici, ma presenta una massima efficienza di riduzione su glucosio, fruttosio, lattosio e amido (Wani et al. 2007). La dipendenza della bioriduzione del Cr(VI) dal tipo di sostanza organica è stata osservata anche in un consorzio batterico estratto da sedimenti contaminati con dicromato (Smith et al. 2002). Quanto riportato suggerisce che, volendo biorisanare un suolo contaminato da Cr(VI) tramite un ceppo batterico selezionato, può essere opportuno aggiungere al suolo una o più fonti di carbonio/energia in grado di rendere il più efficace possibile la bioriduzione del Cr(VI). Pertanto allo scopo di individuare fonti di carbonio/energia che stimolino la capacità dei ceppi 22, 28, 34 e 56 di ridurre il Cr(VI) a Cr(III), sono state saggiate otto diverse fonti di carbonio/energia (glucosio, L-alanina, L-prolina, fruttosio, galattosio, piruvato, L-asparagina e citrato). In figura 4.1 viene riportata la percentuale di Cr(VI) ridotto dai ceppi, misurata come decremento della concentrazione del Cr(VI) nel mezzo di coltura, a partire da una

concentrazione iniziale di K_2CrO_4 pari a 0,2 mM. La percentuale di Cr(VI) ridotto è stata.

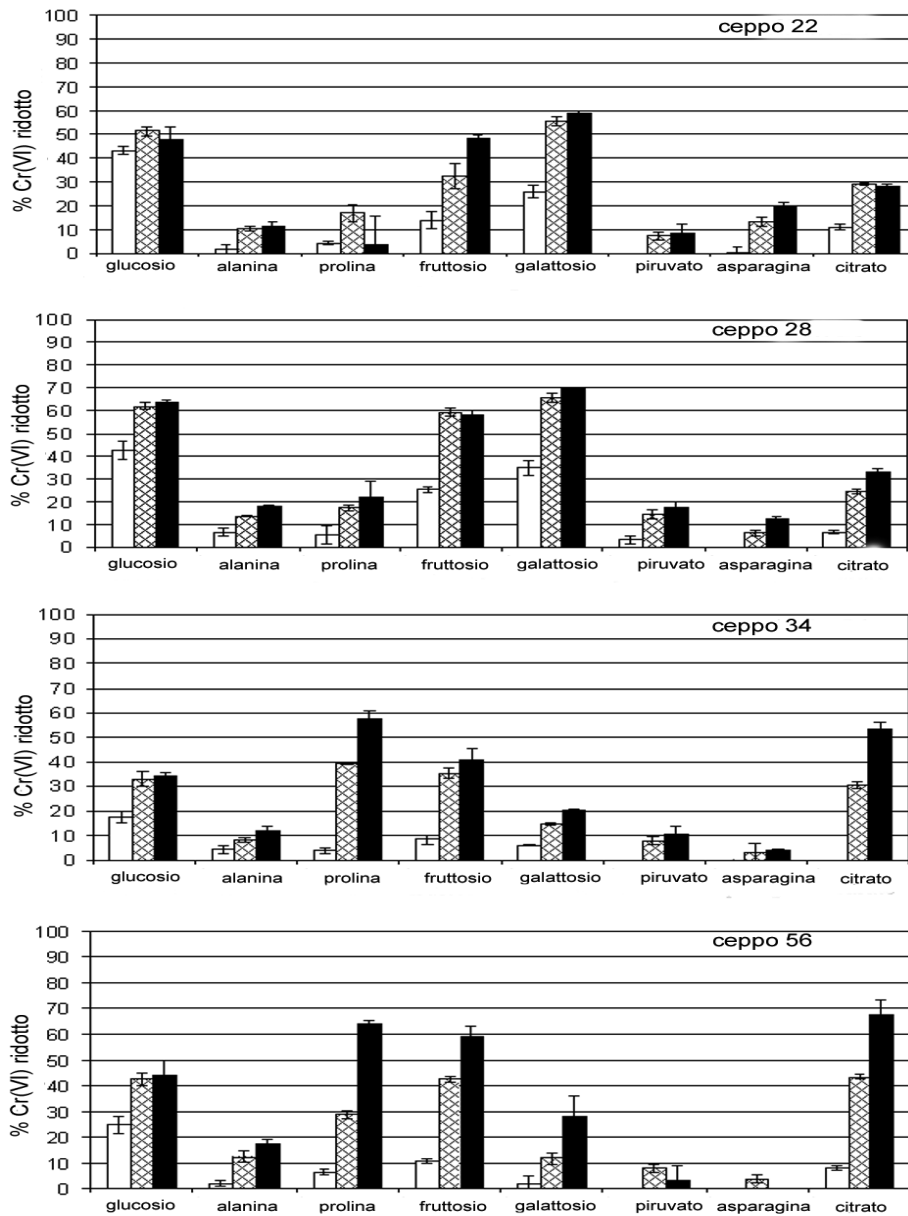


Figura 4.1. Percentuale di Cr(VI) ridotto dai ceppi di *P. corrugata* 22 e 28 e di *P. mendocina* 34 e 56 in TMM addizionato di 0,2 mM K_2CrO_4 e varie fonti di carbonio/energia dopo 24 ore (barre vuote), 48 ore (barre a reticolo) e 72 ore (barre piene) di incubazione a 26 °C. La riduzione del Cr(VI) è stata seguita misurando il decremento dell'assorbanza a 382 nm [l'assorbanza al tempo 0 di 0,2 mM K_2CrO_4 nel mezzo privo di cellule è stato utilizzato come con-

trollo]. I dati rappresentano le medie di almeno quattro esperimenti indipendenti, le barre indicano la deviazione standard valutata a 24, 48 e 72 ore. Per ciascuna fonte di carbonio/energia impiegata è stato anche allestito un controllo costituito dal mezzo di coltura privo di cellule che ha permesso di constatare che il Cr(VI) non subisce riduzione abiotica in presenza delle fonti di carbonio/energia utilizzate e di concludere che la riduzione osservata nelle colture batteriche è totalmente attribuibile all'attività dei ceppi

Nei ceppi 22 e 28 la capacità di ridurre il Cr(VI) è più elevata in presenza di glucosio, fruttosio, e galattosio. Per i ceppi 34 e 56 invece, i substrati che maggiormente favoriscono la riduzione sono prolina, fruttosio e citrato. Le percentuali di Cr(VI) ridotto su questi substrati variano tra il 40% (riduzione ottenuta dal ceppo 34 su fruttosio) e il 70% (riduzione ottenuta dal ceppo 28 su galattosio). La capacità riduttiva dei ceppi 22, 28, 34 e 56 è simile a quella di altri batteri resistenti al Cr(VI) (Viti et al. 2003; Viti & Giovannetti 2007; Wang & Xiao 1995). In uno studio di caratterizzazione di 34 ceppi batterici resistenti al Cr(VI), isolati da un suolo originatosi sul serpentino, il 38,2% degli isolati ha ridotto una quantità di Cr(VI) superiore al 40% e soltanto uno di essi è stato in grado di ridurre una quantità di Cr(VI) superiore all'80% [in 48 ore di crescita partendo da una concentrazione iniziale di Cr(VI) pari a 1 mM] (Pal & Paul 2004). Srinath e collaboratori (2001) hanno valutato la capacità di ridurre il Cr(VI), in condizioni di anaerobiosi e aerobiosi, di 45 ceppi batterici resistenti al Cr(VI) in un mezzo complesso contenente 0,4 mM Cr(VI) dopo 72 ore di crescita. In anaerobiosi il 78% degli isolati è stato capace di ridurre una percentuale di Cr(VI) superiore al 50% e soltanto due isolati superiore al 90%, mentre in aerobiosi la percentuale massima di riduzione è stata osservata per un ceppo di *Aeromonas* in grado di ridurre il 62,6% del Cr(VI) iniziale. Viti e collaboratori (2003), valutando la capacità di ridurre il Cr(VI) di ceppi batterici resistenti al Cr(VI), isolati da un suolo artificialmente contaminato con 750 mg/Kg K_2CrO_4 , cresciuti in mezzo minimo con 0,2 mM Cr(VI) in aerobiosi, hanno osservato che la percentuale di Cr(VI) ridotto in 96 ore varia tra il 56% e il 69%. Percentuali più elevate di Cr(VI) ridotto, prossime al 100%, sono state riportate per colture batteriche in fase di lisi, ma in tal caso la riduzione del Cr(VI) è presumibilmente dovuta al materiale organico rilasciato dalla lisi cellulare, e quindi non direttamente ascrivibile all'attività batterica (Deleo & Ehrlich 1994; McLean & Beveridge 2001).

I ceppi 22, 28, 34 e 56, che possono ridurre con efficienza il Cr(VI) in presenza di opportune fonti di carbonio/energia, si presentano come validi candidati per il biorisanamento di suoli contaminati da Cr(VI) cui venga aggiunta sostanza organica per sostenere la loro attività riduttiva. Tuttavia l'aggiunta di fonti di carbonio/energia a suoli contaminati non è un intervento di semplice gestione, in quanto per ottenere il risanamento completo può essere necessario apportare un'alta quantità di nutrienti. È stato stimato, ad esempio, che il biorisanamento di un'area contaminata con 3785

litri di benzina da parte della popolazione batterica naturale richiederebbe il consumo di 4538 Kg di ossigeno con la produzione di 3175 Kg di biomassa batterica (McCarty 1990). Il consumo di elevate quantità di sostanza organica, oltre a porre problemi di tipo economico, porta alla produzione di una grande quantità di biomassa che deve essere rimossa e smaltita per non causare alterazioni del suolo, come ad esempio ostruzione dei pori superficiali e conseguente modificazione dei movimenti delle acque (Matin et al 1995). Per ottimizzare il biorisanamento è quindi necessario progettare un sistema che preveda un limitato sviluppo di biomassa microbica. Matin e collaboratori (1995), in uno studio sul biorisanamento di suoli contaminati da tricloroetilene, hanno proposto di superare questa problematica ponendo in un ceppo di *E. coli* i geni necessari per la detossificazione dell'inquinante sotto il controllo di promotori da affamamento. I geni controllati da promotori di affamamento vengono trascritti ad elevata efficienza quando la cellula è in carenza nutrizionale e si trova quindi in una condizione di crescita limitata. Il lavoro condotto da Matin e collaboratori dimostra che è possibile costruire ceppi batterici che possono efficacemente detossificare un inquinante senza dover aggiungere nutrienti al suolo e quindi evitare un'eccessiva produzione di biomassa. Tuttavia l'introduzione di ceppi batterici geneticamente modificati nell'ambiente pone problemi di tipo etico. Un'alternativa all'impiego di microrganismi geneticamente modificati consiste nell'impiegare sostanza organica capace di stimolare la riduzione del Cr(VI), ma non la crescita batterica. Allo scopo di identificare tra le 8 fonti di carbonio/energia saggiate quelle che maggiormente stimolano la riduzione del Cr(VI) nei ceppi 22, 28, 34 e 56 limitandone la crescita, la capacità di riduzione del Cr(VI) di ciascun isolato è stata confrontata con la produzione di biomassa valutata mediante la determinazione della densità cellulare (OD_{600}). In tabella 4.1 sono riportate crescita e riduzione relative dei ceppi, valutate rispetto a quelle ottenute su citrato, che, tra le otto fonti di carbonio/energia saggiate, è quella che stimola maggiormente la crescita dei quattro ceppi. I dati si riferiscono alla crescita cellulare e alla quantità di Cr(VI) ridotto determinate al termine della fase esponenziale di crescita, perché la gran parte dell'attività riduttiva si esplica durante la fase esponenziale (Camargo et al. 2003; He et al. 2009). I risultati ottenuti, come atteso, indicano che nei quattro ceppi crescita e riduzione del Cr(VI) possono non essere tra loro correlate. Ad esempio i ceppi 22 e 28 mostrano una buona crescita ma una riduzione limitata su L-prolina, mentre sui monosaccaridi glucosio, fruttosio e galattosio, riducono con elevata efficienza il Cr(VI) e presentano una crescita ridotta. La quantità di Cr(VI) ridotto in presenza di questi monosaccaridi è circa due volte superiore a quella ridotta in presenza di citrato, mentre la crescita è del 38%, 72% e 54% (per il ceppo 22) e del 46%, 62% e 70% (per il ceppo 28), rispettivamente per glucosio, fruttosio e galattosio, rispetto a quella ottenuta su citrato (100%). Pertanto glucosio, fruttosio e galattosio possono considerarsi delle fonti di carbonio/energia di elezione da impiegare in interventi di biorisanamento di suoli contaminati con

Cr(VI) attuato con i ceppi 22 e 28. I ceppi 34 e 56 hanno la massima capacità di riduzione in presenza di L-prolina e citrato, che tuttavia inducono anche un'elevata crescita cellulare. I ceppi 34 e 56 presentano la minima produzione di biomassa su galattosio, ma tale fonte di carbonio/energia non sostiene un'elevata riduzione del Cr(VI). Il fruttosio è la fonte su cui si ottiene il miglior compromesso tra limitata crescita (44% per il ceppo 34 e 42% per il ceppo 56 rispetto a quella ottenuta su citrato) e riduzione del Cr(VI) (74% per il ceppo 34 e 87% per il ceppo 56, rispetto a quella ottenuta su citrato), e pertanto costituisce la migliore fonte di carbonio/energia da utilizzare in interventi di biorisanamento di suoli inoculati con i ceppi 34 e 56.

Tabella 4.1. Crescita e riduzione del cromato dei ceppi di *Pseudomonas* su TMM addizionato di 0,2 mM K₂CrO₄ e di diverse fonti di carbonio/energia [1% (p/v)].

	Ceppo 22		Ceppo 28		Ceppo 34		Ceppo 56	
	Crescita ^a (%)	Riduzione ^b (%)	Crescita (%)	Riduzione (%)	Crescita (%)	Riduzione (%)	Crescita (%)	Riduzione (%)
Citrato	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Glucosio	38,3	173,7	46,0	187,9	76,3	63,3	62,1	64,1
Fruttosio	72,2	170,2	61,8	178,8	44,2	74,3	41,8	86,7
L-alanina	72,1	40,3	83,1	57,6	80,5	22,0	67,7	26,3
L-prolina	94,9	17,5	95,1	66,7	99,2	106,4	86,0	94,1
Galattosio	53,7	208,8	70,4	210,6	29,6	37,6	30,9	41,6
Piruvato	76,2	33,3	92,5	56,1	83,4	19,3	73,2	5,8
L-asparagina	65,8	70,2	89,4	36,4	76,0	9,2	71,0	0,0

^a Crescita relativa rispetto a quella mostrata su citrato (100%) alla fine della fase esponenziale di crescita. I dati sono la media di tre determinazioni.

^b Riduzione del Cr(VI) espressa come percentuale della riduzione su citrato (100%) alla fine della fase esponenziale di crescita. I dati sono la media di tre determinazioni

1.3. Caratterizzazione fenotipica dei ceppi mediante Phenotype Microarray (PM).

Per ottenere un'approfondita caratterizzazione fenotipica dei ceppi è stato utilizzato l'approccio PM (Introduzione, paragrafo 4.1), una tecnologia innovativa ad elevata processività che, mediante l'impiego di un indicatore di potenziale redox che modifica la propria colorazione in presenza di attività metabolica, permette di saggiare numerosi caratteri fenotipici di un microrganismo. Per poter valutare se i ceppi 22, 28, 34 e 56 presentano peculiari caratteristiche che li rendano in grado adattarsi alle diverse condizioni che possono ritrovarsi nel suolo, per ciascun isolato sono stati saggiati 1150 diversi caratteri fenotipici quali resistenza a diversi osmoliti (PM09), al pH (PM10), e a numerose sostanze tossiche (PM11-PM20). Per ogni isolato l'analisi PM

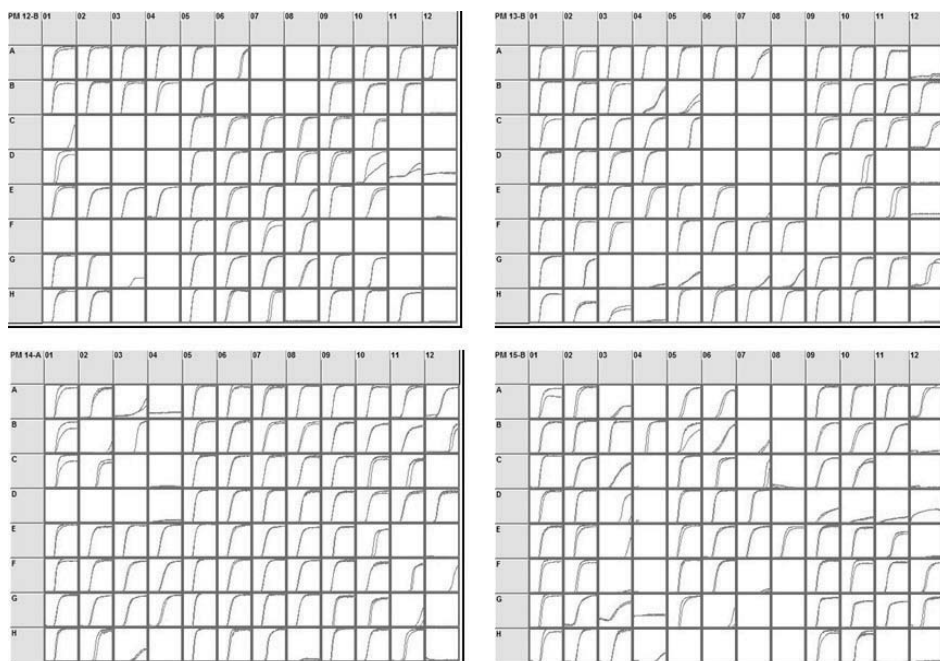


Figura 4.2. Comparazione delle curve cinetiche ottenute per il ceppo 28 sulle piastre PM12-15 in due esperimenti indipendenti, ottenuti incubando le micropiastre a 26 °C per 48 ore. Le curve ottenute dai due esperimenti sono riportate rispettivamente in rosso e verde

è stata condotta in duplicato e per ciascun saggio fenotipico è stata prodotta la curva cinetica consenso, ossia la curva media ottenuta a partire dalle due curve conseguite dai due esperimenti indipendenti. Il PM è una tecnologia ad elevata riproducibilità

(Homann et al. 2005), a titolo esemplificativo in figura 4.2 viene riportato il confronto tra le curve cinetiche del ceppo 28 ottenute impiegando le micropiastre PM12-15 in due esperimenti indipendenti.

Il confronto delle curve cinetiche consenso dei quattro isolati, ottenute sulle piastre PM9-PM20, mostra che i ceppi 22 e 28, appartenenti alla specie *P. corrugata*, hanno un profilo fenotipico molto simile tra loro e diverso da quello dei ceppi 34 e 56 appartenenti alla specie *P. mendocina*. Per mettere in evidenza le differenze fenotipiche che sussistono tra le due specie in figura 4.3 è riportato a titolo esemplificativo il confronto tra il profilo fenotipico di *P. corrugata* 22 e di *P. mendocina* 56.

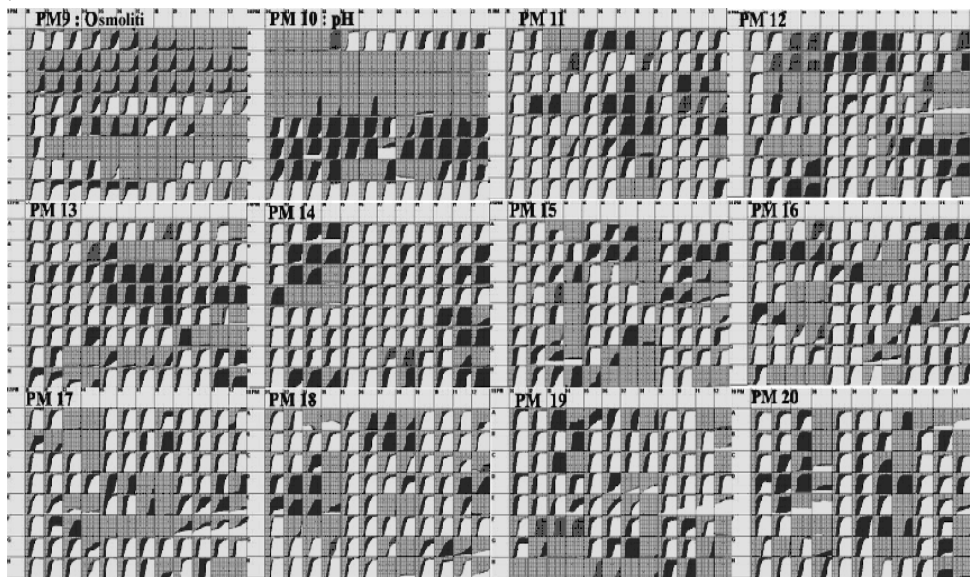


Figura 4.3. Comparazione PM delle curve cinetiche dei ceppi *P. corrugata* 22 e *P. mendocina* 56 ottenute dalle piastre PM9-PM20 (1150 caratteri). Le micropiastre sono state incubate a 26°C per 48 ore. Le curve cinetiche relative a *P. corrugata* 22 sono riportate in grigio chiaro, mentre quelle relative a *P. mendocina* 56 sono riportate in grigio scuro, le zone di sovrapposizione tra le curve relative ai due ceppi sono indicate in bianco

I risultati ottenuti dalla piastra PM09 che contiene diversi osmoliti (cloruro di sodio, cloruro di potassio, solfato di sodio, etilene glicol, formato di sodio, urea, lattato di sodio, fosfato di sodio, benzoato di sodio, solfato di ammonio, nitrato di sodio, nitrito di sodio) a concentrazioni crescenti, indicano che i ceppi 34 e 56 sono dotati di una maggiore osmotolleranza rispetto ai ceppi 22 e 28: questi ultimi mostrano attività metabolica fino al 4% di cloruro di sodio (pozzetti A1-A12) e al 2% di formato di sodio

(E1-E6), mentre i ceppi 34 e 56 fino al 5,5% di cloruro di sodio e al 6% di formato di sodio.

I risultati ottenuti dalla piastra PM10 (pozzetti A1-A12) hanno mostrato che i ceppi 22 e 28 non hanno attività metabolica a valori di pH alcalini ma sono attivi fino a pH 5, mentre i ceppi 34 e 56 sono metabolicamente attivi in un intervallo di valori di pH tra da 5,5 a 10. I saggi fenotipici che permettono di valutare le attività batteriche rispettivamente di decarbossilazione a pH 4,5 e deamminazione a pH 9 di vari amminoacidi (PM10, pozzetti B1-D12 e E1-G12) hanno indicato che in presenza di L-norvalina (pozzetto D3) e β -idrossiglutamato (pozzetto D6) i ceppi 34 e 56 sono attivi anche a pH 4,5. Tale risultato può essere spiegato ipotizzando i ceppi 34 e 56 possano decarbossilare L-norvalina e β -idrossiglutamato per ottenere ammine e conseguentemente abbassare l'acidità del mezzo di coltura (Maurer et al. 2005).

L'impiego delle piastre PM11-PM20 ha permesso di valutare il grado di sensibilità degli isolati batterici a 240 sostanze tossiche (presenti nella piastre PM a quattro diverse concentrazioni). Gli isolati non mostrano attività metabolica in presenza di D,L-metionina idrossamato (PM17, pozzetti F5-F8) un analogo della metionina, e di esammina cloruro di cobalto (PM19, pozzetti H1-H4), che interferisce con la sintesi del DNA. Tutti i ceppi mostrano un elevato grado di resistenza al triclosan, un composto aromatico clorurato utilizzato come antibatterico (PM18, pozzetti G1-G4), al fungicida tolfluanide (PM20, pozzetti H5-H8) e ad alcuni acidi organici (acido sorbico, acido tannico, acido tiosalicilico). Inoltre gli isolati sono resistenti a vari metalli pesanti [cromato di potassio (PM13, pozzetti C9-C12), cloruro di cesio (PM13, pozzetti F1-F4), dicromato di sodio (PM14, pozzetti D9-D12), tellurito di potassio (PM11, pozzetti G9-G12), solfato di alluminio (PM16, pozzetti F9-F12), cloruro di cromo (PM16, pozzetti G1-G4), selenito di sodio (PM16, pozzetti F5-F8)] e a numerosi antibiotici [ad es. bleomicina (PM11, pozzetti C1-C4) cloramfenicolo (PM11, pozzetti F1-F4), ceftriaxone (PM11, pozzetti G1-G4), cefalotina (PM11, pozzetti H1-H4), puromicina (PM15, pozzetti F9-F12) ampicillina (PM13, pozzetti A1-A4)]. L'aver individuato nei ceppi 22, 28, 34 e 56 una resistenza multipla a metalli pesanti ed antibiotici non è un risultato sorprendente, poiché costituisce una caratteristica comune a molti batteri isolati da ambienti contaminati con metalli pesanti (Allen et al. 1977; Lighthart 1979) comunque tale peculiarità è di fondamentale importanza in ceppi batterici da impiegare in interventi di biorisanamento.

Al fine di approfondire le relazioni esistenti tra gli isolati ed individuare caratteri fenotipici peculiari di ciascun ceppo, la mole dei dati fenotipici ottenuti dalle piastre di sensibilità chimica (PM11-20) è stata analizzata con metodi statistici. I valori di altezza media delle curve cinetiche consenso degli isolati sono stati comparati tra loro mediante analisi delle componenti principali (PCA) impiegando il software Bionumerics (Applied Maths) (figura 4.4).

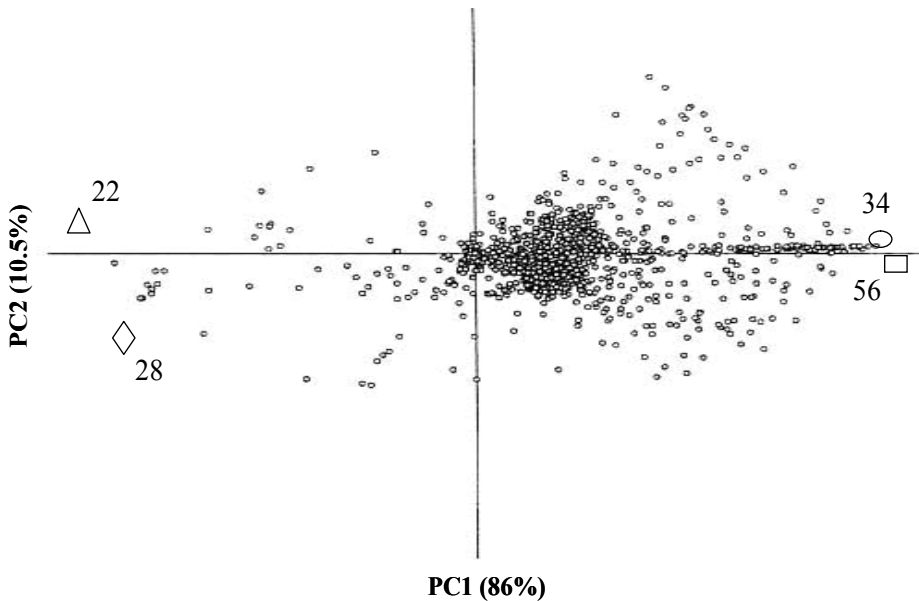


Figura 4.4. Analisi delle componenti principali dei profili PM dei ceppi di *P. corrugata* 22 e 28 e di *P. mendocina* 34 e 56, ottenuti dall'analisi di 960 caratteri fenotipici (PM11-20). Nel grafico sono rappresentati i quattro ceppi (22, 28, 34 e 56) e i caratteri fenotipici saggiati in relazione alle due componenti principali. L'asse X rappresenta la prima componente e l'asse Y la seconda componente. Se un carattere appare sulla destra lungo l'asse X rappresenta un carattere positivo per i ceppi 34 e 56 e negativo per i ceppi 22 e 28. Analogamente se un carattere appare sulla sinistra lungo l'asse X, è un carattere positivo per i ceppi 22 e 28 e negativo per i ceppi 34 e 56. Caratteri che si localizzano in prossimità dell'origine degli assi hanno basso potere discriminante nei confronti dei ceppi.

L'analisi della componenti principali è una procedura matematica che permette, a partire da una serie di campioni descritti da numerose variabili tra loro correlate, di ottenere un numero limitato di variabili "artificiali" (componenti principali) tra loro non correlate, che sono combinazioni lineari delle variabili originali e descrivono gran parte della variabilità esistente tra i campioni. Le due componenti principali vengono usualmente rappresentate graficamente come i due assi di un grafico cartesiano all'interno del quale si posizionano i campioni. Campioni che si trovano vicini nel piano cartesiano sono tra loro simili, mentre campioni che si localizzano in punti tra loro lontani, sono tra loro diversi. La prima componente principale che rende conto del 86% della variazione fenotipica tra i ceppi, separa gli isolati in due gruppi in base alla specie: un gruppo contiene i ceppi 22 e 28 di *P. corrugata*, l'altro i ceppi 34 e 56 di *P. mendocina*, confermando le similarità già messe in evidenza dalla semplice osservazione dei profili fenotipici. La seconda componente, che rende conto del

10,5% della variabilità fenotipica, mostra che i ceppi 34 e 56 hanno un profilo fenotipico quasi identico, mentre i profili dei ceppi 22 e 28 non sono completamente sovrapponibili.

I caratteri che maggiormente discriminano la coppia dei ceppi 34, 56 da quella dei ceppi 22, 28 sono quelli che presentano un valore assoluto elevato sulla prima componente principale. In tabella 4.2 sono riportati i 50 caratteri che presentano i valori assoluti più elevati sulla prima componente principale: per ciascuno di essi viene riportato il valore IC50 relativo a ciascun ceppo, determinato dal software OmniLog. Il valore IC50 viene definito come il pozzetto o la frazione di pozzetto per il quale un dato parametro, che descrive la curva (ad esempio l'altezza media), assume un valore pari al 50% del valore massimo osservato.

Gli antibiotici che inibiscono la sintesi della parete batterica (penicilline) costituiscono l'unica classe di composti verso i quali i ceppi 22 e 28 presentano, rispetto ai ceppi 34 e 56, un maggior grado di resistenza. I ceppi 34 e 56 sono più resistenti dei ceppi 22 e 28 a vari antibiotici che inibiscono la sintesi proteica, tra cui tetracicline (tetraciclina, doxiciclina, penimepiciclina, demeclociclina, rolitettraciclina, oxtettraciclina, clortetraciclina) che agiscono a livello della subunità 30S del ribosoma batterico (Biswas et al. 2008), amminoglicosidi (streptomina, tobramicina, spectinomina, capreomicina, igromicina B, geneticina, apramicina) che si legano a livello del 16S rDNA (Mingeot-Leclercq et al. 1999), e macrolidi (spiramicina, oleandromicina, tilosina, eritromicina) che si legano a livello della subunità 50S del ribosoma batterico (Weisblum 2009). I ceppi 34 e 56 presentano inoltre una maggiore resistenza a vari antibiotici chinolonici (norfloxacina, ciprofloxacina, enoxacina, acido nalidixico, ofloxacina) che impediscono il rilassamento del DNA, inibendo le DNA girasi e topoisomerasi IV (Yoshida et al. 1993), a numerosi cationi e anioni tossici, contenenti metalli (cesio, cadmio e tallio) o semimetalli (vanadio, arsenico, boro), ad analoghi delle basi azotate che bloccano la sintesi del DNA e ad agenti intercalanti del DNA ad effetto mutageno.

Saggiando 1150 caratteri fenotipici per ciascun isolato è stato possibile individuare importanti differenze fenotipiche tra i ceppi di 34 e 56 di *P. mendocina* ed i ceppi 22 e 28 di *P. corrugata*. Gli isolati 34 e 56 sono caratterizzati, rispetto ai ceppi 22 e 28, da una maggiore osmotolleranza e dalla capacità di resistere a pH alcalini. I ceppi 22 e 28 tollerano maggiormente, rispetto ai ceppi 34 e 56, i valori di pH acidi, tuttavia questi ultimi in presenza di L-norvalina e β -idrossigluttammato, la cui decarbossilazione permette l'innalzamento del valore del pH, risultano metabolicamente attivi anche a pH 4,5. L'analisi dei dati relativi alla sensibilità chimica nel complesso ha inoltre mostrato che sebbene tutti i ceppi presentino una resistenza multipla a metalli pesanti, antibiotici, etc.. i ceppi 34 e 56 di *P. mendocina* sono dotati di un'abilità "eccezionale" nel resistere alle sostanze tossiche.

Concludendo l'analisi fenotipica dei ceppi ha reso possibile individuare negli isolati 34 e 56 caratteristiche idonee per un loro impiego nel biorisanamento di suoli contaminati da Cr(VI), anche in suoli altamente contaminati da ulteriori inquinanti. I ceppi 22 e 28 di *P. corrugata* 28 che presentano un'intrinseca tolleranza a valori di pH acidi, senza richiedere l'attivazione di sistemi di decarbossilazione degli amminoacidi, si presentano come validi candidati da impiegare in ambienti caratterizzati da un valore di pH acido nei quali la contaminazione da Cr(VI) non sia associata ad un concomitante cospicuo inquinamento da ulteriori sostanze tossiche. L'analisi dei risultati relativi alla caratterizzazione fenotipica dei ceppi 22, 28 34 e 56, ottenuti tramite PM, ha messo in evidenza che tale approccio è estremamente utile per selezionare ceppi batterici da impiegare in processi di biorisanamento.

Tabella 4.2. Valori di IC50 per i ceppi di *Pseudomonas* 22, 28, 34 e 56 relativi ai 50 caratteri con il maggiore valore assoluto sulla prima componente principale

COMPOSTO	Piastra PM (pozzetti)	IC 50				
		Ceppo 22	Ceppo 28	Ceppo 34	Ceppo 56	
Inibitori del rilassamento del DNA	<i>Norfloxacin</i>	16 (B01-B04)	1,30	1,40	>4,4	>4,1
	<i>Ciprofloxacina</i>	20 (D05-D08)	2,30	2,20	>4,4	>4,4
	<i>Enoxacin</i>	11 (E05-E08)	1,90	2,00	>4,3	>4,3
	<i>Acido nalidixico</i>	11(E09-E12)	3,00	2,90	>4,4	>4,4
	<i>Ofloxacina</i>	11 (H09-H12)	3,70	2,40	>4,4	>4,4
	<i>Acido pipemidico</i>	18 (B05-B08)	1,90	3,10	>4,4	>4,3
Intercalanti del DNA	<i>9-Aminoacridina</i>	14 (B01-B04)	1,50	1,40	>4	>4,2
	<i>Acriflavina</i>	14 (A01-A04)	2,70	2,60	>4,4	>4,4
Analoghi degli acidi nucleici	<i>Acido 5- Fluoroorotico</i>	12 (F09-F12)	<0,6	<0,7	>4,4	>4,4
	<i>5- Fluorouracile</i>	13 (D05-D08)	<0,6	<0,6	>4,3	>4,3
Inibitori della sintesi della parete	<i>Carbenicillina</i>	12 (A09-A12)	>4,4	>4,4	3,4	3,4
	<i>Penicillina G</i>	12 (A01-A04)	>4,4	>4,4	2,5	2,5
	<i>Feneticillina</i>	19 (F01-F04)	>4,4	>4,4	1	1,2
	<i>Oxacillina</i>	12 (B01-B04)	>4,2	>4,4	1,3	1,3
	<i>Amoxicillina</i>	11 (B01-B04)	>4,4	>4,4	3,5	3,4
Anioni e cationi	<i>Ortovanadato di sodio</i>	14 (H09-H12)	2,60	3,40	>4,4	>4,4
	<i>Cloruro di Cesio</i>	13 (F01-F04)	3,50	3,40	>4,4	>4,4

	COMPOSTO	Piastra PM (pozzetti)	IC 50			
			Ceppo 22	Ceppo 28	Ceppo 34	Ceppo 56
tossici	<i>Metavanadato di sodio</i>	14 (F09-F12)	2,30	2,90	>4,4	>4,4
	<i>m-Arsenito di sodio</i>	18 (D01-D04)	1,10	1,20	3,4	3,4
	<i>Cianato di sodio</i>	14 (C09-C12)	2,30	3,10	>4,4	>4,4
	<i>Metaborato di sodio</i>	14 (E09-E12)	1,40	2,10	3,4	3,6
	<i>Cloruro di Cadmio</i>	14 (D01-D04)	<0,6	<0,6	1,6	1,3
	<i>Acido Borico</i>	14 (C01-C04)	1,40	2,10	3,4	3,3
	<i>Acetato di Tallio</i>	13 (F09-F12)	<0,6	<0,6	1,3	1,3
	<i>Arsenato di sodio</i>	14 (B09-B12)	3,20	3,50	>4,4	>4,4
Inibitori della sintesi proteica	<i>Tetraciclina</i>	12 (A05-A08)	1,5	1,7	> 4,4	> 4,4
	<i>Doxiciclina</i>	13 (C05-C08)	<0,6	<0,9	>4,2	>4,3
	<i>Penimepiciclina</i>	12 (B05-B08)	<0,7	<1	3,7	4
	<i>Demeclociclina</i>	11 (D05-D08)	1,1	<0,6	3,8	4
	<i>RoliTetraciclina</i>	13 (D09-D12)	1,4	1,7	> 4,4	> 4,4
	<i>Oxitetraciclina</i>	20 (F05-F08)	1,6	2	3,9	3,8
	<i>Clortetraciclina</i>	11 (A05-A08)	<0,7	<0,7	3,2	3,3
	<i>Diidrostreptomici- na</i>	19 (G05-G08)	2,00	1,30	3,7	3,5
	<i>Streptomicina</i>	16 (E01-E04)	<0,7	<0,6	2,3	1,9
	<i>Tobramicina</i>	12 (F01-F04)	<0,7	<0,6	2	< 1
	<i>Spectinomicina</i>	12 (G01-G04)	3,30	2,50	> 4,3	> 4,4
	<i>Capreomicina</i>	11 (D01-D04)	1,50	1,70	3,4	3,4
	<i>Igromicina B</i>	17 (B05-B08)	3,30	2,50	> 4,3	> 4,3
	<i>Geneticina</i>	13 (E05-E08)	2,90	2,40	> 4,2	>4,3
	<i>Apramicina</i>	20 (A05-A08)	3,50	3,10	>4,3	> 4,2
	<i>Spiramicina</i>	12 (H01-H04)	2,20	2,40	>4,2	>4,3
	<i>Oleandromicina</i>	15 (F05-F08)	2,30	2,50	3,5	3,6
<i>Tilosina</i>	13 (H09-H12)	2,40	2,50	>4,1	>4,2	
<i>Eritromicina</i>	11 (F05-F08)	1,80	<0,6	3,4	3,5	
Altri composti	<i>Orfenadrina</i>	20 (B01-B04)	2,40	2,40	3,3	3,5
	<i>18-Corona-6-Etere</i>	20 (D09-D12)	3,20	3,40	>4,4	>4,4
	<i>Proflavina</i>	20 (D01-D04)	1,10	<0,9	3,7	3,9
	<i>5-Cloro-7-Iodo- Idrossichinolina</i>	16 (A09-A12)	1,40	1,50	>4,3	>4,4
	<i>Clorexidina</i>	19 (C01-C04)	2,40	2,50	2,9	3,4
	<i>EGTA</i>	14 (H01-H04)	1,60	2,40	>4,1	>4,1

2. Studio dei meccanismi di resistenza al Cr(VI) in *Pseudomonas corrugata* 28

Quattro mutanti sensibili al Cr(VI) del ceppo iper-resistente *P. corrugata* 28 [40 mM MIC-Cr(VI)] sono stati caratterizzati al fine di approfondire la conoscenza della resistenza batterica al Cr(VI). La caratterizzazione dei mutanti è stata condotta tramite l'identificazione dei geni mutati e l'analisi del loro fenotipo mediante l'approccio altamente innovativo Phenotype Microarray (PM).

2.1. Caratterizzazione dei mutanti Cr(VI)-sensibili di *P. corrugata* 28

I mutanti di *P. corrugata* 28 oggetto del presente studio, denominati Crg3, Crg8, Crg26 e Crg96, sono stati selezionati in base alla loro ridotta resistenza al Cr(VI) rispetto a quella del ceppo parentale da una collezione di oltre 14000 mutanti ottenuti per mutagenesi inserzionale impiegando il trasposone Ez-Tn5. I mutanti presentano rispetto al parentale anche una minore capacità di ridurre il Cr(VI) (tabella 4.3).

Tabella 4.3. Cr(VI)-MIC e riduzione del Cr(VI) del ceppo parentale *P. corrugata* 28 e dei mutanti (Mini 2004).

Ceppo	Cr(VI) -MIC (mM)	% Cr(VI) ridotto*
Parentale	40	52,3 ± 6,1
Crg3	10	17,6 ± 1,4
Crg8	6	28,4 ± 0,8
Crg26	15	32,7 ± 5,5
Crg96	2	41,6 ± 1,1

*Percentuale di Cr(VI) ridotto in 48 ore, rispetto ad una concentrazione iniziale di 0,2 mM di K₂CrO₄

Crg96 è il mutante che ha la maggiore sensibilità al Cr(VI) e la maggiore capacità di ridurre il Cr(VI), d'altra parte il mutante Crg3, che ha una MIC-Cr(VI) intermedia, presenta la minore capacità di ridurre il Cr(VI). Tale risultato conferma quanto osservato in ceppi naturali: la resistenza al Cr(VI) e la capacità di ridurre il Cr(VI) non sono necessariamente correlate (Bopp & Ehrlich 1988).

Per poter correlare un fenotipo alterato ad una specifica mutazione ottenuta per inserzione di un trasposone è necessario che il trasposone sia inserito in un unico sito nel genoma. Pertanto sono stati condotti esperimenti di ibridazione del DNA genomico dei mutanti con una sonda costituita da una regione del trasposone EZ-Tn5.

Il DNA genomico del ceppo parentale e dei mutanti è stato digerito con due enzimi di restrizione (*Mlu*I o *Pvu*II), in due distinte reazioni. Gli enzimi di restrizione *Mlu*I e *Pvu*II sono stati scelti basandosi sui seguenti criteri: 1) assenza di siti di taglio all'interno del trasposone EZ-Tn5, 2) restrizione del genoma in frammenti ben risolvibili in elettroforesi su gel di agarosio. Il genoma del ceppo parentale, che non con-

tiene il trasposone non presenta alcuna banda di ibridazione. I genomi dei mutanti, tagliati con *PvuI* o *MluI*, danno luogo a singole bande di ibridazione di dimensioni diverse, indicando che il trasposone si è inserito un'unica volta nel genoma di ciascun mutante e in siti diversi (figura 4.5), conseguentemente i mutanti risultano idonei per lo studio dei geni coinvolti nella resistenza al Cr(VI).

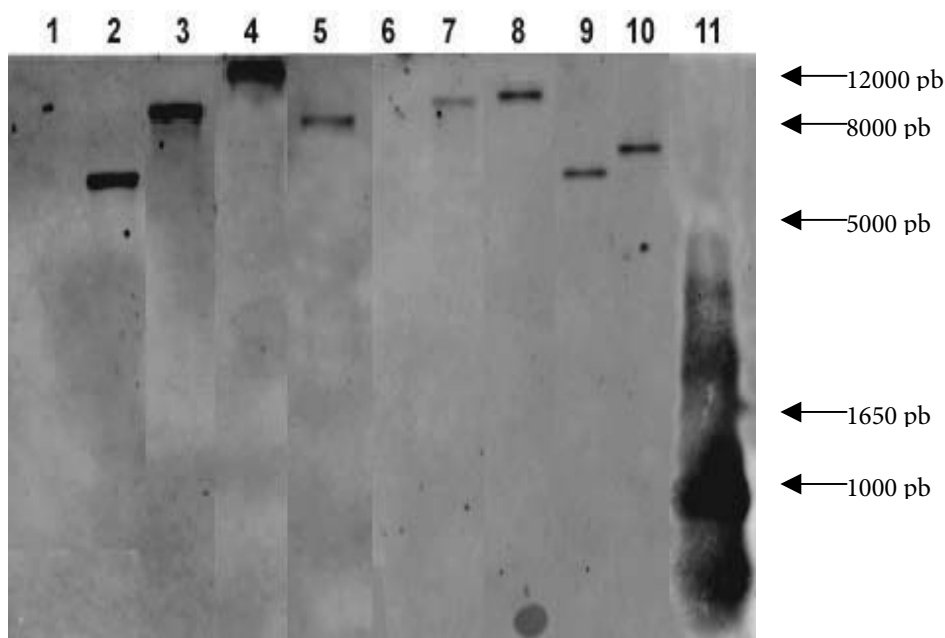


Figura 4.5. Ibridazione del DNA genomico del ceppo di *P. corrugata* 28 e dei mutanti Crg3, Crg8, Crg26, Crg96 tagliato con *MluI* o *PvuII*, impiegando come sonda una porzione del gene per la resistenza alla kanamicina contenuto all'interno del trasposone EZ-Tn5. 1) genoma di *P. corrugata* 28/ *PvuII*, 2) genoma di Crg3/ *PvuII*, 3) genoma di Crg8/ *PvuII*, 4) genoma di Crg26/ *PvuII*, 5) genoma di Crg96/ *PvuII*, 6) genoma di *P. corrugata* 28/ *MluI*, 7) genoma di Crg3/ *MluI*, 8) genoma di Crg8/ *MluI*, 9) genoma di Crg26/ *MluI*, 10) genoma di Crg96/ *MluI*, 11) prodotto di amplificazione del gene per la resistenza alla kanamicina contenuto in Ez-Tn5. Come marcatore di peso molecolare è stato impiegato il DNA Molecular Weight Marker VI (Roche Applied Science)

Al fine di individuare i geni interrotti dall'inserzione del trasposone nei mutanti le rispettive sequenze nucleotidiche sono state ricostruite impiegando la metodologia descritta nel paragrafo 2.2. La sequenza nucleotidica ricostruita di ciascun mutante, è stata sottoposta ad analisi mediante il programma ORF finder che ricerca all'interno di una data sequenza le possibili ORF (*Open Reading Frame*), ossia le sequenze nucleotidiche che potenzialmente potrebbero essere tradotte in sequenze amminoacidi-

che (paragrafo 2.2). Le sequenze nucleotidiche sono state inoltre paragonate con quelle depositate nella banca dati GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando l'algoritmo BLASTn. Tale algoritmo individua nella banca dati le sequenze che risultano simili alla sequenza nucleotidica esaminata e fornisce un'indicazione del grado di similarità di ciascuna di esse rispetto alla sequenza esaminata (paragrafo 1.1). L'analisi condotta ha prodotto i risultati riportati in tabella 4.4.

Tabella4.4. Geni interrotti nei mutanti Cr(VI)-sensibili di *P. corrugata* 28.

Mutante	Omologo del gene interrotto	Locus Tag*	Organismo	Identità (%)	Prodotto genico
Crg3	Gene codificante una proteina appartenente alla famiglia degli enzimi malici	PFL_0443	<i>Pseudomonas fluorescens Pf-5</i>	90	Proteina appartenente alla famiglia degli enzimi malici
Crg8	Gene a funzione sconosciuta	PFL_0191	<i>Pseudomonas fluorescens Pf-5</i>	84	Ipotetica piccola proteina a funzione sconosciuta
Crg26	<i>sth</i>	PFL_1958	<i>Pseudomonas fluorescens Pf-5</i>	91	Piridin nucleotide transidrogenasi solubile
Crg96	<i>recG</i>	PFL_6071	<i>Pseudomonas fluorescens Pf-5</i>	83	DNA elicasi ATP-dipendente RecG

*identificativo numerico del gene nel genoma batterico

Per approfondire il ruolo dei geni inattivati nei mutanti e quindi comprendere in che modo essi intervengano nel determinare la resistenza al Cr(VI) in *P. corrugata* 28, i mutanti sono stati sottoposti ad un'estesa caratterizzazione fenotipica mediante la tecnologia PM, impiegando piastre metaboliche (PM01-PM04) e di sensibilità chimica (PM11-PM20) che hanno permesso di saggiare 1536 diversi caratteri fenotipici. Confrontando le curve cinetiche di ciascun mutante rispetto al ceppo parentale sono stati individuati i fenotipi acquisiti e perduti da ciascun mutante (tabelle 4.5 e 4.6). Tutti i mutanti, come prevedibile, hanno acquisito rispetto al ceppo parentale, la capacità di resistere alla kanamicina e ad altri antibiotici aminoglicosidici (neomicina, geneticina, paromomicina), che si legano irreversibilmente alle proteine dei ribosomi batterici (tabella 4.6). L'acquisizione della resistenza verso tali antibiotici è dovuta alla presenza nel genoma dei mutanti del trasposone EZ-Tn5 che porta un gene per la re-

sistenza alla kanamicina. Tale gene codifica un enzima (3'-amminoglicoside fosfo-transferasi) che inattiva gli antibiotici amminoglicosidici modificandone la struttura chimica (Mingeot-Leclercq et al. 1999)

Tabella 4.5. Comparazione dei profili fenotipici dei mutanti rispetto al profilo fenotipico del ceppo parentale, relativamente al metabolismo (PM01-PM05, PM09-PM10)

Substrato	Modalità di azione	Fenotipo dei mutanti*			
		Crg3	Crg8	Crg26	Crg96
<i>Fenotipi acquisiti – Maggiore crescita</i>					
L-arabinosio	fonte di carbonio		+94		
D-mannitolo	fonte di carbonio	+89			
acido D-galatturonico	fonte di carbonio		+69		
L-guanina	fonte di azoto				+155
<i>Fenotipi perduti – Minore crescita</i>					
acido D-saccarico	fonte di carbonio	-121	-101		
acido D,L-malico	fonte di carbonio	-131			
acido L-malico	fonte di carbonio	-81			
ammonio	fonte di azoto		-102		
acetammide	fonte di azoto		-123	-113	
S-metil-L-cisteina	fonte di zolfo		-164		
cistationina	fonte di zolfo		-185		
glutazione	fonte di zolfo		-125		
L-metionina	fonte di zolfo		-128		
D-metionina	fonte di zolfo		-152		
glicil-L-metionina	fonte di zolfo		-107		
N-acetil-D,L-metionina	fonte di zolfo		-158		
L- metionina solfossido	fonte di zolfo		-150		
taurina	fonte di zolfo		-131		
acido butansolfonico	fonte di zolfo		-115		
acido 2-idrossietansolfonico	fonte di zolfo		-123		
acido metansolfonico	fonte di zolfo		-141		

*Le unità sono arbitrarie. Il software OmniLog-PM genera curve cinetiche di respirazione (tramite lo sviluppo del colore del violetto di tetrazolio) per ciascun pozzetto e calcola la differenza tra le aree sottese alle curve cinetiche del ceppo parentale e del ceppo mutante. Valori positivi indicano che il mutante ha una velocità di respirazione maggiore del ceppo parentale, contrariamente valori negativi indicano che il mutante ha una velocità di respirazione minore del parentale.

Tabella 4.6. Comparazione dei profili fenotipici dei mutanti rispetto al profilo fenotipico del ceppo parentale, relativamente alla sensibilità chimica (PM11-PM20).

Composto chimico	Modalità di azione	Fenotipo dei mutanti			
		Crg3	Crg8	Crg2 6	Crg96
<i><u>Fenotipi acquisiti - Resistenza</u></i>					
neomicina	sintesi proteica, amminoglicoside	+298	+667		+150
kanamicina	sintesi proteica, amminoglicoside	+347	+678	+499	+576
geneticina (G418)	sintesi proteica, amminoglicoside	+286	+475	+372	+412
paromomicina	sintesi proteica, amminoglicoside	+432	+770	+541	+715
2,2'-dipiridil	chelante, Fe ⁺⁺	+339			
5-Fluorouracile	analogo di acido nucleico, pirimidina	+234			
<i><u>Fenotipi perduti - Sensibilità</u></i>					
norfloxacin	DNA topoisomerasi, chinolone	-112	-283		-103
acido pipemidico	rilassamento del DNA, girasi, topoisomerasi, chinolone	-282	-227		-123
dodina	funghicida, guanidina, permeabilità di membrana	-304	-188	-184	
captano	fungicida, carbammato, multisito	-589	-171		-661
enoxacin	DNA topoisomerasi, chinolone				-105
acido nalidixico	DNA topoisomerasi				-129
rifampicina	RNA polymerasi				-158
cromato di potassio	anione tossico	-109			-100
cloruro di cromo	trasporto, catione tossico			-256	-457
L-glutamico- γ -idrossamato	tRNA sintetasi				-108
ciprofloxacina	DNA topoisomerasi, chinolone				-307
tolilfluamide	funghicida, fenyisulfamide				-535
2-nitroimidazolo	ribonucleotide DP riduttasi	-314			
protamina solfato	membrana, ATPasi	-192			
EGTA	chelante, Ca ⁺⁺			-180	
cetilpiridinio cloruro	membrana, detergente, cationico	-226			
EDTA	chelante, Ca ⁺⁺			-143	
polimixina B	membrana	-127			
5,7-dicloro-8-idrossichinaldina	chelante, lipofilico			-251	

*Le unità sono arbitrarie. Il software OmniLog-PM genera curve cinetiche di respirazione (tramite lo sviluppo del colore del violetto di tetrazolio) per ciascun pozzetto e calcola la differenza tra le aree sottese alle curve cinetiche del ceppo parentale e del ceppo mutante. Valori positivi indicano che il mutante ha una velocità di respirazione maggiore del ceppo parentale, contrariamente valori negativi indicano che il mutante ha una velocità di respirazione minore del parentale.

2.1.1. Mutante Crg3

Nel mutante Crg3 l'inserzione del trasposone è avvenuta a livello di un gene che codifica una proteina appartenente alla famiglia degli enzimi malici (EM) (tabella 4.4). Gli EM catalizzano la decarbossilazione ossidativa dell'L-malato a piruvato con concomitante riduzione del cofattore NAD^+ o NADP^+ . L'analisi fenotipica, condotta tramite PM, del mutante Crg3 ha confermato quanto ottenuto dall'analisi genetica. Il mutante infatti mostra rispetto al ceppo parentale una minore attività su acido malico, il substrato dell'EM, e su acido D-saccarico (tabella 4.5) che in *Pseudomonas* attraverso passaggi enzimatici successivi può essere trasformato in acido L-malico (Dagley & Trudgill 1965, Lerondel et al. 2006). L'acido D-saccarico infatti viene convertito in 2-ossoglutarato e successivamente in acido L-malico dagli enzimi del ciclo dell'acido tricarbossilico.

L'EM può ridurre il NADP^+ a NADPH durante la trasformazione di acido malico a acido piruvico e anidride carbonica. Il NADPH è un coenzima chiave che fornisce potere riducente nelle vie anaboliche, ossia nelle reazioni che permettono la sintesi dei costituenti cellulari. La principale via metabolica che in eucarioti e batteri contribuisce alla sintesi di NADPH è la via dei pentoso fosfati (Soderberg 2005). In tale processo il glucosio 6-fosfato viene trasformato in ribulosio-5-fosfato, con concomitante riduzione di due molecole di NADP^+ a NADPH ad opera degli enzimi glucosio-6-fosfato-deidrogenasi (G6PDH) e 6-fosfogluconato-deidrogenasi (6PGDH). Ulteriori importanti contributi alla produzione di NADPH possono essere dati da enzimi che catalizzano reazioni di ossidazione in cui gli elettroni vengono trasferiti da intermedi metabolici al NADP^+ , tra cui l'EM ed ulteriori enzimi quali l'isocitrato deidrogenasi (ICDH)- NADP^+ dipendente e la glutammato deidrogenasi (GDH)- NADP^+ dipendente (Bériault et al. 2005; Bridges et al. 1975; Duncan et al. 1992); dall'enzima piridin nucleotide transidrogenasi legata a membrana che sfrutta la forza proton motrice per produrre NADPH da NADH secondo la seguente reazione: $\text{NADH} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{NADPH}$ (Voordouw et al. 1983), dal ciclo del mannitolo (figura 4.6), dimostrato fino ad oggi nei funghi, che coinvolge il D-mannitolo e produce NADPH attraverso la seguente reazione:

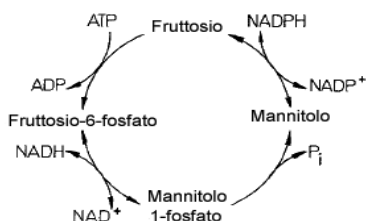
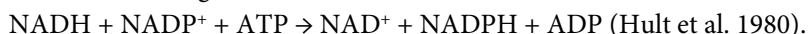


Figura 4.6. Il ciclo del mannitolo in *Alternaria alternata*.

Nel mutante Crg3 l'inattivazione dell'EM probabilmente causa una carenza di NADPH, che può essere compensata potenziando altre vie volte alla produzione di tale coenzima. La maggiore attività metabolica del mutante rispetto al ceppo parentale su D-mannitolo potrebbe far ipotizzare che in *P. corrugata* 28 sia presente un meccanismo di produzione del NADPH simile a quello dimostrato nei funghi (ciclo del mannitolo), tramite cui il mutante potrebbe sopperire alla carenza di NADPH.

L'analisi delle curve cinetiche ottenute dai dati fenomici di sensibilità chimica ha messo in evidenza che il mutante Crg3 presenta, rispetto al ceppo parentale, una maggiore sensibilità nei confronti di due classi di sostanze chimiche: sostanze che inducono danno alla membrana citoplasmatica quali dodina, cetilpiridinio cloruro, polimixina B e protamina solfato e sostanze che causano stress ossidativo quali norfloxacina e acido pipemidico (Dwyer et al. 2007; Yoshida et al. 1993), captano (Suzuki et al. 2004) e 2-nitroimidazolo (Kovacic & Osuna 2000) (tabella 4.6). Dodina, cetilpiridinio cloruro, polimixina B e protamina solfato sono rispettivamente un surfattante, un sale di ammonio quaternario e due polipeptidi cationici che interferiscono con la membrana citoplasmatica modificandone la struttura e alterandone la selettività (Cabral 1991; Cabral 1993; Nizet 2006; Johansen et al. 1997; Tattawasart et al. 1999). Gli antibiotici chinolonici norfloxacina e acido pipemidico, il fungicida captano e 2-nitroimidazolo, inducendo stress ossidativo nella cellula, possono causare danni alla membrana cellulare. Quando la cellula si trova in condizione di stress ossidativo la membrana viene danneggiata dal processo di perossidazione dei lipidi (figura 4.7), una reazione a catena, attivata dalle specie reattive dell'ossigeno, che modifica la struttura degli acidi grassi e determina un aumento non fisiologico della permeabilità della membrana (Wong-Ekkabut et al. 2007).

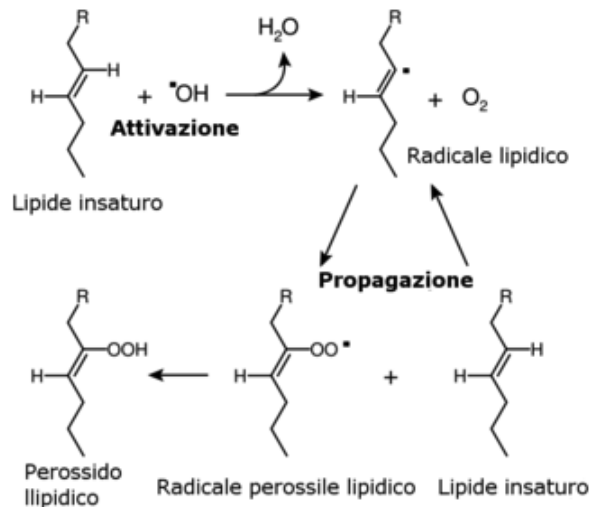


Figura 4.7. Rappresentazione schematica del processo di perossidazione lipidica.

Uno dei principali meccanismi per la riparazione dei danni alla membrana consiste nell'attivazione della biosintesi dei lipidi (Ballas & Burka 1974) per fornire nuovi lipidi che sostituiscano quelli danneggiati. È stato dimostrato che la biosintesi degli acidi grassi, componenti fondamentali dei lipidi, richiede NADPH che proviene dall'attività dell'EM (Wise & Ball 1964). Pertanto, considerato che i principali danni dovuti a Cr(VI) sono da ricondurre a stress ossidativo, è possibile ipotizzare che in *P. corrugata* 28 l'EM abbia un ruolo fondamentale nel fornire potere riducente per la biosintesi di lipidi necessario alla riparazione dei danni indotti alla membrana causati da Cr(VI) (Sinha et al. 2005; Coudray et al. 2009).

Il NADPH, oltre ad intervenire nella biosintesi dei lipidi per la riparazione dei danni alla membrana, contribuisce direttamente a tutti i processi coinvolti nella risposta allo stress ossidativo. Numerosi enzimi coinvolti nella neutralizzazione degli agenti ossidanti e nel mantenimento del corretto stato redox della cellula necessitano infatti di NADPH per la loro attività [catalasi, glutatione reduttasi, tioredossina riduttasi, metionina solfossido riduttasi (paragrafo A.2.1)] (Ejiri et al. 1979; Kirkman et al. 1987; Mustacich & Powis 2000). Un meccanismo comune che gli organismi hanno per rispondere allo stress ossidativo consiste nell'aumentare la produzione di NADPH mediante il potenziamento della fase ossidativa della via dei pentoso fosfati e dell'attività degli enzimi che riducono il NADP⁺ a NADPH, tra cui l'EM, ICDH-NADP⁺ dipendente e la GDH-NADP⁺ dipendente (Marino et al. 2007; Pollak et al. 2007). Il ruolo dell'EM nel produrre NADPH per la risposta allo stress ossidativo è stato ampiamente dimostrato in piante e animali (Aragão et al. 1997; Casati & Andreo 2001; Revilla et al. 1987; Smeets et al. 2005), mentre nei batteri un aumento dell'attività dell'EM è stato trovato soltanto in *P. fluorescens* esposta a menadione, un composto che all'interno della cellula causa la formazione di ROS (Singh et al. 2007; Singh et al. 2008). L'aumentata sensibilità di Crg3 rispetto al parentale verso alcuni composti che inducono danno ossidativo supporta l'ipotesi che l'EM produca NADPH necessario all'attività degli enzimi coinvolti nella neutralizzazione degli agenti ossidanti e nel mantenimento del corretto stato redox della cellula.

In conclusione l'analisi PM del mutante Crg3 ha permesso di chiarire che in *P. corrugata* 28 l'EM è un enzima chiave nella risposta al Cr(VI) in quanto fornisce NADPH necessario sia all'attività di enzimi che rinnovano le componenti di membrana danneggiate in seguito alla perossidazione lipidica indotta da Cr(VI), sia all'attività degli enzimi quali catalasi, glutatione reduttasi, tioredossina riduttasi e metionina solfossido riduttasi, che sono necessari per la risposta allo stress ossidativo.

2.1.2. Mutante Crg26

Nel mutante Crg26 il trasposone ha interrotto un gene codificante una piridin nucleotide transidrogenasi solubile (tabella 4.4), un enzima che trasferisce atomi di i-

drogeno dal NAD al NADP secondo la seguente reazione reversibile: $\text{NAD}^+ + \text{NADPH} \leftrightarrow \text{NADH} + \text{NADP}^+$ (Voordouw et al. 1983).

Le maggiori differenze fenotipiche tra il mutante Crg26 e il ceppo parentale sono legate ad agenti che inducono inibizione della respirazione cellulare: la dodina che danneggia la membrana cellulare e compromette la respirazione (Cabral 1993), il chelante lipofilico 5,7-dicloro-8-idrossichinaldina (Hirsch & Dosdogru 1947), e i chelanti EDTA e EGTA che possono influenzare negativamente la respirazione chelando il ferro, necessario alla funzionalità dei complessi della catena respiratoria (Weinbach et al. 1976; Yoon et al. 2004) (tabella 4.6). Tali risultati suggeriscono quindi che la piridin nucleotide transidrogenasi abbia un ruolo nel rispondere ad agenti che inducono inibizione respiratoria. In mitocondri isolati è stato dimostrato che il Cr(VI) può avere un effetto inibitorio sulla respirazione (Arillo & Melodia 1988; Dixit et al. 2002). L'effetto indotto dal Cr(VI) sulla respirazione batterica non è mai stato studiato in maniera diretta, tuttavia in *S. oneidensis* MR-1 e *C. crescentus* esposti a Cr(VI) è stata osservata un'inibizione dell'espressione dei geni codificanti le componenti della catena respiratoria (Brown et al. 2006b; Hu et al. 2005; Thompson et al. 2007). Alterazioni nella respirazione possono portare ad una modificazione nell'equilibrio tra i pool di NAD(H) e NADP(H) che nei batteri è regolato dall'attività delle piridin nucleotide transidrogenasi. I batteri possiedono oltre alla piridin nucleotide transidrogenasi solubile una seconda forma di tale enzima, associata alla membrana citoplasmatica. Entrambi i tipi di piridin nucleotide transidrogenasi catalizzano la stessa reazione ($\text{NAD}^+ + \text{NADPH} \leftrightarrow \text{NADH} + \text{NADP}^+$), ma è stato proposto che esse abbiano un ruolo diverso. In condizioni di normale attività della catena respiratoria, il pool cellulare del NADP(H) è maggiormente ridotto rispetto a quello del NAD(H) (Andersen & von Meyenburg 1977; Voordouw et al. 1983), quindi l'ossidazione del NADPH risulta termodinamicamente favorita ed è catalizzata dalla forma solubile della piridin nucleotide transidrogenasi, che non è associata ad alcuna fonte di energia. Al contrario la riduzione del NADP^+ risulta termodinamicamente sfavorita ed è catalizzata dalla piridin nucleotide transidrogenasi associata alla membrana, che sfrutta l'energia del gradiente protonico per far procedere la reazione. In condizioni di esposizione al cromato l'inibizione della catena respiratoria indotta da Cr(VI) potrebbe causare un incremento della concentrazione di NADH nella cellula. D'altra parte l'attività degli enzimi coinvolti nella risposta allo stress ossidativo e nelle vie biosintetiche per la neosintesi delle componenti cellulari danneggiate può determinare una diminuzione della concentrazione del NADPH. In queste condizioni il rapporto tra i livelli di NADPH e NADH potrebbe modificarsi a favore del NADH e conseguentemente la reazione $\text{NADH} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{NADPH}$ potrebbe risultare termodinamicamente favorita e quindi verrebbe catalizzata dalla piridin nucleotide transidrogenasi solubile. Questa ipotesi è supportata dal calcolo dell'energia libera di Gibbs (ΔG) della reazione mediante l'equazione di Van't Hoff (tabella 4.7), a partire

Tabella 4.7. Calcolo dell'energia libera di Gibbs della reazione $\text{NADH} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{NADPH}$ sulla base dei livelli di nucleotidi piridinici misurati in cellule di *Azotobacter vinelandii* in funzione del flusso di ossigeno [da Voordouw *et al.* (1983), modificata].

Velocità di ossidazione delle cellule ($\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$)	Esperimento 1			Esperimento 2			Esperimento 3				
	0.23	0.115	0	0	0.12	0.06	0	0	0.26	0.156	0.052
Livello di nucleotidi piridinici ($\text{nmol mg protein}^{-1}$)	3.41	3.57	3.70	3.74	3.80	3.80	3.93	4.18	4.89	4.99	5.15
NAD ⁺	0.454	0.294	0.160	0.120	0.429	0.380	0.221	0.123	0.885	0.603	0.565
NADP ⁺	0.112	0.372	1.61	1.53	0.068	0.102	1.8	1.7	0.247	0.217	1.10
NADH	0.125	0.125	0.075	0.050	0.114	0.149	0.057	0.034	0.188	0.254	0.179
NADPH	5259	3478	184.1	45.38	6673	6633	-1420	-995	3553	5616	975.1
ΔG (J mol^{-1})*											

* Il calcolo del ΔG è stato effettuato sulla base dell'equazione di Van't Hoff $\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln Q$, dove ΔG° è l'energia libera standard della reazione, R è la costante dei gas ideali ($8,31451 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T è la temperatura assoluta della reazione e Q è il rapporto tra il prodotto della concentrazione dei prodotti della reazione e il prodotto della concentrazione dei reagenti. Nel caso della reazione $\text{NADH} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{NADPH}$, poiché la costante di equilibrio della reazione è pari a 1, l'equazione di Van't Hoff si semplifica in $\Delta G = -RT \ln Q$. La temperatura della reazione è stata posta uguale a 298 °K corrispondenti a 25 °C. Nell'esperimento numero 2, in condizione di flusso nullo di ossigeno, il valore di ΔG risulta negativo e quindi la reazione $\text{NADH} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{NADPH}$ è termodinamicamente favorita

dai livelli dei nucleotidi piridinici misurati in *A. vinelandii* in dipendenza dal flusso dell'ossigeno (Voordouw et al. 1983). Il ΔG è una funzione di stato che descrive se una specifica reazione avviene spontaneamente o meno: valori di ΔG negativi indicano che la reazione avviene spontaneamente ed è irreversibile, valori di ΔG positivi indicano che la reazione avviene spontaneamente in senso opposto, mentre quando ΔG assume valore zero la reazione è all'equilibrio. Come mostrano i dati riportati in tabella 4.7, quando le cellule si trovano in anaerobiosi si ha un aumento della concentrazione cellulare del NADH, similmente a quanto accade in condizioni di inibizione respiratoria. In cellule di *E. coli* esposte a cianuro, un potente inibitore del complesso IV della catena respiratoria, è stato misurato un aumento di sedici volti della concentrazione del NADH (Woodmansee & Imlay 2002). Il calcolo del ΔG della reazione $\text{NADH} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{NADPH}$ in condizioni di anaerobiosi mostra che la reazione può risultare termodinamicamente favorita. E' plausibile quindi che anche in seguito ad esposizione a Cr(VI) il livello di NADH aumenti e la piridin nucleotide transidrogenasi solubile catalizzi la reazione $\text{NADH} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{NADPH}$, alimentando la produzione di NADPH. In conclusione l'analisi del mutante Crg26 ha messo in evidenza che in *P. corrugata* 28 la piridin nucleotide transidrogenasi solubile è un enzima coinvolto nella risposta al Cr(VI) e probabilmente svolge una funzione simile a quella dell'ME, ossia produce NADPH da impiegare nella riparazione dei danni determinati dallo stress ossidativo indotto dal Cr(VI).

2.1.3. Mutante Crg96

Il gene inattivato nel mutante Crg96 codifica per una elicasi ATP-dipendente RecG (tabella 4.4) coinvolta nella la riparazione di danni al DNA che inducono arresto delle polimerasi (PALs: *polymerase arresting lesions*) (McGlynn & Lloyd 2001). Durante il processo di duplicazione cromosomica la forca replicativa può bloccarsi in corrispondenza di PALs (Cox et al. 2000) e la risoluzione del blocco della DNA polimerasi in corrispondenza di queste lesioni dipende da un complesso sistema enzimatico che consente alla forca replicativa, mediante la formazione di una giunzione di Holliday, di retrocedere rispetto alla lesione, di ripararla e successivamente oltrepassarla. In questo processo la RecG elicasi promuove la formazione della giunzione di Holliday ed è quindi un enzima chiave nella risoluzione delle PALs (McGlynn & Lloyd 2001). L'analisi PM del mutante Crg96 conferma che tale enzima è coinvolto nella resistenza ad agenti che inducono PALs. Il mutante risulta infatti rispetto al ceppo parentale maggiormente sensibile rispetto al ceppo parentale agli antibiotici chinolonici (norfloxacin, acido pipemidico, enoxacin, acido nalidixico, ciprofloxacina) (tabella 4.6), che bloccano la progressione della forca replicativa formando le-

gami covalenti tra le eliche del DNA e gli enzimi girasi e topoisomerasi I (Goss et al. 1965; Wentzell & Maxwell 2000). Un'aumentata sensibilità agli antibiotici chinolonici è stata dimostrata anche in un mutante di *Staphylococcus aureus* alterato nel gene *recG* (Niga et al. 1997). Inoltre il mutante Crg96 risulta maggiormente sensibile al Cr(III) rispetto al ceppo parentale (tabella 4.6). L'attività genotossica del Cr(III) è stata ampiamente dimostrata in vitro, in particolare è stato osservato che questo catione causa diversi tipi di lesioni al DNA (Arakawa et al. 2000; Köster & Beyersmann 1985) tra cui PALs date da legami crociati tra le due eliche del DNA mediati da cromo (Bridgewater et al. 1994). Il Cr(III) è considerato poco tossico in vivo, in quanto essendo scarsamente solubile non riesce a penetrare le membrane cellulari, tuttavia, in uno studio condotto su *E. coli* è stato osservato, in presenza di cloruro di cromo, un aumento della trascrizione a partire da promotori coinvolti nella risposta al danno al DNA (Plaper et al. 2002). Il Cr(III) che penetra nella cellula, sebbene in quantità estremamente ridotta, ha comunque un effetto genotossico, pertanto la diminuita resistenza del mutante Crg96 al Cr(III) rispetto al ceppo parentale indica che l'elicasi RecG permette di rimuovere le lesioni PALs indotte dal Cr(III). Occorre inoltre ricordare che il Cr(VI) quando penetra all'interno della cellula viene ridotto attraverso una serie di passaggi a Cr(III) che può accumularsi nella cellula (Buttner & Beyersmann 1985; Wise et al. 1993).

In conclusione, sebbene il ruolo delle RecG elicasi nella resistenza al cromo sia già stato descritto (Miranda et al. 2005), l'analisi PM del mutante Crg96 ha permesso di evidenziare per la prima volta che l'attività riparatrice di questo enzima in cellule esposte a Cr(VI) potrebbe essere diretta soprattutto nei confronti di lesioni PALs indotte dal Cr(III).

2.1.4. Mutante Crg8

Nel mutante Crg8 il trasposone ha interrotto una gene a funzione sconosciuta (tabella 4.4) codificante un'ipotetica piccola proteina di 60 amminoacidi, priva di domini proteici noti classificata dal database COG (Cluster of Orthologous Group) come appartenente al COG5583. L'identificazione di una potenziale sequenza Shine-Dalgarno (GGAG), che rappresenta il sito di legame dei ribosomi, 11 pb a monte del potenziale codone di inizio della traduzione (ATG), suggerisce che il gene venga realmente tradotto in una proteina.

Dai risultati ottenuti mediante l'analisi PM di questo mutante emerge che esso presenta uno spettro di utilizzazione dei composti dello zolfo profondamente alterato rispetto al parentale, essendo incapace di utilizzare vari composti organosolforilati come fonte di zolfo (S-metil-L cisteina, cistationina, glutatione, L-metionina, D-metionina, glicil-L-metionina, N-acetil-D,L-metionina, L-metionina solfossido, taurina, acido butansolfonico, acido 2-idrossietansolfonico, acido metansolfonico) (tabella

4.5). I composti organosolforilati che il mutante Crg8 non è in grado di utilizzare, vengono assimilati dai batteri in seguito all'attivazione della risposta da affamamento da zolfo (SSR: *sulfur starvation response*) (van der Ploeg et al. 1996; Kahnert et al. 2000), un processo cellulare complesso (Tralau et al. 2007) che in ambienti in cui vi è carenza di solfato, tiosolfato o cisteina, composti dello zolfo definiti preferenziali per il metabolismo batterico, consente di utilizzare molecole organiche solforilate denominate non preferenziali come fonti di zolfo (Endoh et al. 2005; Kahnert et al. 2000; Kertesz 2000; van der Ploeg et al. 1996). Il gene interrotto in Crg8, essendo necessario per l'utilizzazione dei composti organici non preferenziali dello zolfo, può essere considerato un gene che contribuisce all'attivazione della SSR.

Il mutante Crg8 presenta, rispetto al ceppo parentale, alcune differenze fenotipiche relative all'utilizzazione di fonti di carbonio e azoto (tabella 4.5), che sono probabilmente da attribuire ai legami che esistono tra metabolismo di zolfo, carbonio e di azoto (Quan et al. 2002), tuttavia l'esatta comprensione di come il gene interrotto influenzi il metabolismo di carbonio e azoto necessita di ulteriori approfondite ricerche.

Il mutante Crg8 presenta inoltre, rispetto al ceppo parentale, una maggiore sensibilità a norfloxacina, acido pipemidico e captano (tabella 4.6), agenti che inducono stress ossidativo a livello cellulare (Dwyer et al. 2007; Suzuki et al. 2004), facendo ipotizzare che il gene interrotto sia coinvolto anche nella risposta allo stress ossidativo. Per comprendere come un gene, la cui funzione primaria sembra essere quella di partecipare all'attivazione della SSR, possa giocare un ruolo chiave anche nella risposta allo stress ossidativo occorre considerare che è stato dimostrato che lo stress ossidativo determina nella cellula una condizione di affamamento da zolfo (Brown et al. 2006a; Brown et al. 2006b; Mostertz et al. 2004; Pinto et al. 2004; Salunkhe et al. 2005), poiché induce un'alterazione dello stato redox della cellula che determina un'insufficiente riduzione del solfito, una perdita di solfuro in seguito ai danni subiti dalla membrana (Benov et al. 1996), un'aumentata domanda di composti protettivi contenenti tioli (Fahey 2001) e un'aumentata biosintesi di centri ferro-zolfo, che sono distrutti dalle specie reattive dell'ossigeno (Layer et al. 2007). L'attivazione della SSR, portando ad un aumento dello zolfo cellulare, rappresenta uno dei meccanismi che le cellule mettono in atto per rispondere allo stress ossidativo (Brown et al. 2006a; Brown et al. 2006b; Thompson et al. 2007). Il gene interrotto nel mutante Crg8, in quanto partecipa all'attivazione della SSR, contribuisce alla risposta allo stress ossidativo. Il Cr(VI) causa nella cellula una condizione di affamamento da zolfo probabilmente più severa rispetto a quella indotta da altri composti che generano stress ossidativo, infatti il Cr(VI), oltre ad essere un forte agente ossidante, sottoforma di cromato è anche un competitore dello ione solfato per il trasporto a livello cellulare. E' infatti noto che il cromato penetra nelle cellule attraverso i trasportatori del solfato (Cervantes et al. 2001) e in presenza di tale ione tossico la quantità di solfato che en-

tra nella cellula si riduce. La condizione di forte affamamento di zolfo determinata nelle cellule dal Cr(VI) rende quindi il gene interrotto fondamentale per la risposta cellulare al Cr(VI).

Un ulteriore fenotipo perduto dal mutante Crg8 rispetto al parentale consiste nella resistenza alla dodina (tabella 4.6), un surfattante che induce danno alle membrane citoplasmatiche con conseguente alterazione della loro permeabilità selettiva e perdita di metaboliti (Brown & Sister 1960; Cabral 1991). La perdita di metaboliti contenenti zolfo determinerebbe una condizione di affamamento da zolfo nelle cellule (Benov et al. 1996) nella cui risoluzione sarebbe coinvolto il gene interrotto.

In conclusione l'analisi PM del mutante Crg8 ha permesso di attribuire una funzione ad un gene a funzione fino ad oggi sconosciuta. E' stato infatti chiarito che il gene interrotto partecipa all'attivazione della SSR permettendo alle cellule di utilizzare vari composti organosolforilati come unica fonte di zolfo. Alla luce di questo importante risultato il gene interrotto nel mutante Crg8 è stato denominato *oscA* (*organosulfur compounds*). Dall'analisi PM del mutante è inoltre emerso che *oscA* è un gene chiave per la risposta al Cr(VI), poiché permette di risolvere la condizione di affamamento da zolfo indotta da cromato.

2.2. Caratterizzazione genetica e funzionale del gene (*oscA*) interrotto nel mutante Crg8

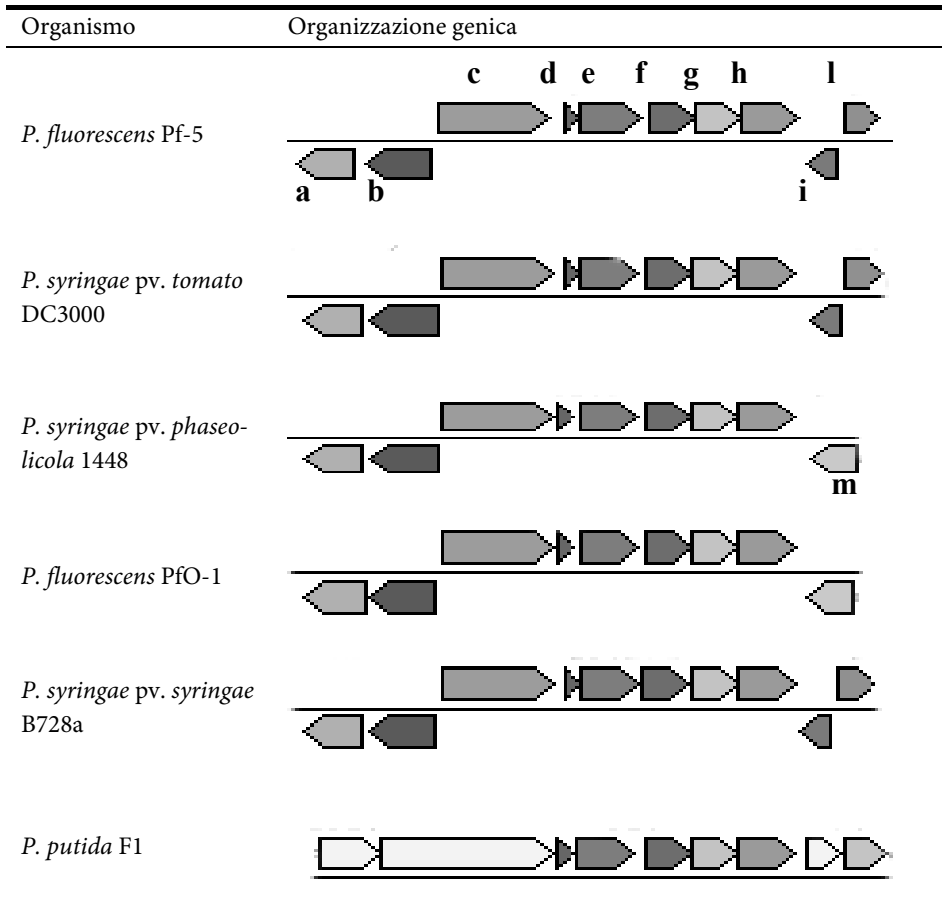
Per approfondire la conoscenza del ruolo di *oscA*, un gene considerato fino ad oggi a funzione sconosciuta, sono stati condotti alcuni esperimenti che hanno previsto l'identificazione del contesto genomico in cui *oscA* si inserisce, la valutazione dell'influenza del Cr(VI) sull'espressione di *oscA* e dei geni ad esso associati, la complementazione del mutante Crg8.

2.2.1. Identificazione dei geni fiancheggianti *oscA*

Allo scopo di individuare i geni localizzati a monte ed a valle del gene *oscA* in *P. corrugata* 28, una regione genomica di circa 7200 pb è stata amplificata mediante PCR e successivamente sequenziata. I due *primer forward* e *reverse*, necessari per amplificazione di tale regione, sono stati disegnati su geni conservati che si trovano rispettivamente a monte e a valle di *oscA* in ceppi batterici di cui è stato sequenziato il genoma. In tabella 4.8 è riportata l'organizzazione dei geni adiacenti ad *oscA* in ceppi batterici appartenenti al genere di *Pseudomonas*. In tutti i ceppi considerati, a valle del gene *oscA* si trovano in sequenza i geni *sbp*, *cysT*, *cysW* e *cysW* codificanti le componenti del trasportatore ABC del solfato. A valle di *cysW* l'organizzazione dei geni non risulta conservata.

A monte di *oscA*, in tutti i ceppi considerati, ad eccezione di *P. putida* F1, si trovano

Tabella 4.8. Organizzazione dei geni fiancheggianti *oscA* in cinque ceppi batterici di *Pseudomonas* che presentano una sequenza nucleotidica di *oscA* simile a quella di *P. corrugata* 28.



La ricerca della sequenze nucleotidiche più simili ad *oscA* è stata eseguita all'interno del database GenBank mediante il software BLASTn. L'organizzazione dei geni fiancheggianti *oscA* è stata ottenuta dal software "Gene Neighborhoods" disponibile ad sito web della Integrated Microbial Genome (<http://img.jgi.doe.gov>). Geni codificanti per proteine diverse sono stati indicati con lettere diverse: a) sensore contenente una diguanilato ciclasi, b) desaturasi degli acidi grassi, c) diguanilato ciclasi/fosfodiesterasi con dominio PAS/PAC, d) ipotetica proteina a funzione sconosciuta codificata da *oscA*, e) trasportatore ABC del solfato, proteina periplasmatica che lega il solfato, f) CysT, trasportatore ABC del solfato, permeasi, g) CysW, trasportatore ABC del solfato, permeasi, h) CysA, trasportatore ABC del solfato, proteina che lega l'ATP, i) ipotetica proteina a funzione sconosciuta, l) proteina che lega nucleotidi ciclici, m) ipotetica proteina a funzione sconosciuta, n) trasportatore di efflusso, famiglia RND, subunità MFP, o) proteina per la resistenza all'acriflavina, p) ipotetica proteina a funzione sconosciuta, q) fattore sigma 54, proteina contenente il dominio di interazione.

tre geni: un gene, con lo stesso orientamento di *oscA* codificante una diguanilato ciclasi fosfodiastarsi con dominio PAS/PAC e due geni, ad orientamento opposto ad *oscA*, codificanti una desaturasi degli acidi grassi ed un sensore contenente una diguanilato ciclasi. Quindi il gruppo di geni identificati in tabella 4.8 con le lettere da “a” ad “h” sono conservati nei ceppi analizzati, ad eccezione di *P. putida* F1.

Nell'ipotesi che tale organizzazione sia presente anche in *P. corrugata* 28 sono stati disegnati due *primer* in grado di amplificare la regione genomica compresa tra il gene della desaturasi degli acidi grassi e *cysW*. A tale scopo sono state allineate, mediante il software ClustalW, le sequenze nucleotidiche del gene *cysW* di tutti i ceppi considerati e le sequenze nucleotidiche del gene della desaturasi degli acidi grassi di tutti i ceppi, eccetto quello di *P. putida* F1. In corrispondenza di regioni conservate entro le sequenze nucleotidiche dei due geni, sono stati disegnati i due *primer* *fadf* e *cysWr* (figure 4.9 e 4.10) che, analizzati mediante il software OligoAnalyzer 3.0, risultano soddisfare i requisiti descritti nel paragrafo 2.4. L'amplificazione, ottenuta impiegando i *primer* *fadf* e *cysWr* e il DNA genomico di *P. corrugata* 28 come bersaglio, come atteso, ha generato un prodotto di amplificazione di circa 7200 pb. Il sequenziamento completo del prodotto di PCR è stato realizzato mediante *primer walking* (paragrafo 2.4.1) e la sequenza nucleotidica ottenuta è stata analizzata con il software ORF finder. Le ORF identificate dal software sono state paragonate con quelle depositate in Genbank mediante il software BLASTn. Il prodotto di amplificazione contenendo soltanto la regione iniziale della ORF terminale (gene *cysW*), non ha permesso di ottenere la sequenza completa di *cysW* che è stata quindi ottenuta mediante PCR inversa come descritto nel paragrafo 2.4.1.

FadPsph	GTGACTGGTTTTCTGTGGAATGTCAGTGATAATGCACG-CGTAACCTTTTTTCTTCATGAG	59
FadPssyr	-----	
FadPstom	-----ATGCTCATCGCAACTTTTTTCTTCACGAG	29
FadPf-5	-----ATGCCTGGGCTGTTTTT	17
FadPfl01	-----	
FadPsph	TATCTTTACGAGGGCCAAACAGCCTATGTGTACAACGGTTTGCCTCGACCTTTCCGCTCTG	119
FadPssyr	-----ATGTTGTACAACGGTTTGCCTCGACCTTTCCGCTCTG	35
FadPstom	TCACCTTTTCGAGGGCCAAACAGCCTATGTGGTACAACGGTTTGCCTCGACCTTTCCGCTCTG	89
FadPf-5	TTCTTTTACGAGGGCCTTATCGCCTATGTGGTACGAAGTTTACTTGGCTTGTCGGCCTG	77
FadPfl01	-----ATGTTGTACGAAGTTTCTTGGCTTGTCGGCCTG	35
	**** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
FadPsph	GCAGGTAATAGCAGTCACGCTGGCGATGACCCATGTGACTATTGTCGGCGTCACGGTCTA	179
FadPssyr	GCAGTTAATAGCGTACGCTGGTCATGACCCATATAACGATCATTTGGCGTCACGGTCTA	95
FadPstom	GCAGGTAATAGCAGTCACGCTGGCGATGACCCACGTGACGATCGTCGGGGTCACGGTCTA	149
FadPf-5	GCAACTGGTGGCAGTCACCTGTTGATGACCCACGTGACCATTTGTCGGCGTCACGGTCTA	137
FadPfl01	GTGCGTGGTCGGCTCACCTGGTATGACCCACGTGACGATCGTTGCGGTCACGGTCTA	95
	* *	
FadPsph	TCTGCACCGCTACTCAGCCCACCGCTCGCTTGAGCTCAATGCGGGGCTGAAACACTTCTT	239
FadPssyr	TCTGCACCGCTATTCAGCCCACCGCTCACTTGAGCTCAACGCGGGTCTGAAACACTTCTT	155
FadPstom	TCTGCACCGCTACTCGGCCACCGCTCGCTTGAACCTCAATGCGGGGCTGAAACACTTTTT	209
FadPf-5	TCTGCATCGCTATTCGCGCACCGTTCCCTGGAACCTCAACGCGGGCTGAAACACTTCTT	197
FadPfl01	CTTGCACCGCTACTCGGCCATCGCTCCCTGGAGCTGAATGCGGGGCTGAAACACTTCTT	155
	**** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
FadPsph	CCGTTTTCTGGCTGTGGTGACCCTGCCAGAACACCGCGAGTGGACAGCCATCCACCG	299

FadPssyr	CCGCTTCTGGCTGTGGCTGACCCTGCCAGAACAACCTCGCGAGTGGACAGCCATCCACCG	215
FadPstom	CCGCTTCTGGCTGTGGCTGACCACGGCGCAGAACAACCCCGAGTGGACCCCATCCACCG	269
FadPf-5	CCGCTTCTGGCTGTGGCTGACCACGGCGCAGAACAACCCCGAGTGGACCCCATCCACCG	257
FadPf101	CCGTTTCTGGCTGTGGCTGACCACGGCGCAGAACAACCCCGAGTGGACTGCCATCCACCG	215
	*** ***** ** ***** * ** ***** ***** ** ***** **	
FadPspH	CAAACACCACGCCAAATGCGAAACCGTCGACGACCCGCACAGCCCGGTCTCAAAGGCCT	359
FadPssyr	CAAACACCACGCCAAATGCGAAACTGTGCGATGACCCGCACAGCCCGGTCTCAAAGGGTCT	275
FadPstom	CAAACACCACGCCAAATGCGAAACCGTCGACGACCCGCACAGCCCGGTCTCAAAGGCCT	329
FadPf-5	CAAGCACCACGCCAAAGTGCAGAAACCGCGACGACCCGCACAGCCCGGTCTCAAAGGCCT	317
FadPf101	CAAACACCACGCCAAATGCGAAACCGAAGACGACCCGCACAGCCCGGTCTCAAAGGGTCT	275
	*** ***** * ** ***** * ** ***** ***** ** ***** **	
FadPspH	GTCCACCGTGTGCGCAAAGGCGCCGAGCTGTACCAGCAAGAGCTCAGAACCAGGACAC	419
FadPssyr	GTCCACCGTGTGCGCAAAGGCGCCGAGCTGTACCAGCAAGAGCTCAGAACCAGGACAC	335
FadPstom	GTCCACCGTGTGCGCAAAGGCGCCGAGCTGTACCAGCAAGAGCTCAGAACCAGGACAC	389
FadPf-5	GTCCACCGTGTGCGCAAAGGCGCGAGAGCTGTATCGCGAAGAGCCGAGAACCAGGACAC	377
FadPf101	GTCCACCGTCTGTGCAAAGGCGCAGAGCTGTATCGCGAAGAGCGCAGAACCAGGAAAC	335
	***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** **	
FadPspH	CCTGCGTATCTACGGCAAGAACTGCCCGAAGACTGGATCGAGCGCAACCTGTATTTCGCG	479
FadPssyr	CCTGCGTATCTACGGCAAGAACTGCCCGAAGACTGGATCGAGCGCAACCTGTATTTCGCG	395
FadPstom	TCTGCGTATCTACGGCAAGAACTGCCCGAAGACTGGATCGAGCGCAACCTTTTACCTCGCG	449
FadPf-5	CCTGCGCATCTACGGCAAGAACTGCCCGAAGACTGGATCGAACGCAACCTCTACAGCCG	437
FadPf101	CCTGCGCATCTACGGCAAGAACTGCCCGAAGACTGGATCGAGCGCAACCTCTACAGCCG	395
	***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** **	
FadPspH	CTACAAGCTGCTGGGTATCGCCCTGATGGCAGTCATCGACGTGGCACTGTTCCGGTGGCT	539
FadPssyr	CTACAAGCTGCTGGGCATCGCGCTGATGGCGGTGATCGATGTGGCGCTGTTCCGGTGGCT	455
FadPstom	TTACAAAATGCTGGGTATTTGTGCTGATGGCAGTCATCGACCTGGCGCTGTTCCGGTGCCAT	509
FadPf-5	CTACAAGCTGGCGCGGTGGCGCTGATGGCAGCCATCGACCTGCTGCTGTTCCGGCACCAT	497
FadPf101	CTACCGCTGCTGGGCATCGCGCATCATGGCGGTGCTGCGACTGCTGTTCCGGCACCAT	455
	*** ** *	
FadPspH	CGGTATCACCGTGTGGGCGCTCCAGATGATGTGGATTCCCTTCTGGGCTGCTGGCGTGGT	599
FadPssyr	CGGTATCACCGTGTGGGCGGTGCAGATGATGTGGATTCCCTTCTGGGCTGCGCGGTGGT	515
FadPstom	CGGCATCACCGTGTGGGCGATCCAGATGATGTGGATTCCCGTCTGGGCTGCGCGGTGGT	569
FadPf-5	CGGCATCACCATCTGGGCGCATCCAGATGATGTGGATTCCCGTCTGGGCGCGCGGTGGT	557
FadPf101	CGGCATCACCATCTGGGCGCATCCAGATGATGTGGATCCCGTCTGGGCGCGCGGTGGT	515
	*** ***** * ***** * ***** ***** ** ***** ** ***** *	
FadPspH	CAACGGTCTGGGCCATGCGCTCGGCTATCGCAACTTCGAATGCCGTGACGCGGCCACCAA	659
FadPssyr	CAACGGTCTGGGTCTATCGGCTCGGCTATCGCAACTTCGAATGCCGTGATCGCGGCCACCAA	575
FadPstom	CAACGGTCTGGGTCTATCGGCTCGGCTATCGCAACTTTGAATGCCGTGATCGCGGCCACCAA	629
FadPf-5	CAATGGCTGGGCGATGCGGTGGGCTACCGCAACTTCGAATGCCGCGACGCCGCCACCAA	617
FadPf101	CAACGGCTCGGCCATCCGCTCGGCTACCGCAACTTCGAATGCCGCGACGCCGCCACCAA	575
	*** *	
FadPspH	TCTGGTGCCGTGGGCGATCGTGATCGGTGGTGAAGAGCTGCACAACAACCACACACCTA	719
FadPssyr	TCTGGTGCCGTGGGCGATCGTGATCGGCGGCGAAGAGCTGCACAACAATCACACACCTA	635
FadPstom	TCTGGTGCCGTGGGCGATCGTGATCGGCGGCGAAGAGCTGCACAATAATCACACACCTA	689
FadPf-5	CTGGTGCCCTGGGCGATCATCGTGCGGCGCGAAGAGCTGCACAACAACCACACACCTA	677
FadPf101	TCTGGTGCCGTGGGCGATCCTGATCGGCGGCGAAGAGCTGCACAACAACCATCACACCTA	635
	***** ***** * ***** ** ***** ***** ** ***** *****	
FadPspH	TCCCAACTCGGCCAAGCTGTGCGTCAAGCCCTGGGAATTCGACATGGGCTGGGCGTGGAT	779
FadPssyr	TCCCAACTCGGCCAAGCTGTGCGTCAAAACCTGGGAATTCGACATGGGCTGGGCGTGGAT	695
FadPstom	CCCCAACTCGGCCAAGCTTTCCGTCAAGCCCTGGGAATTCGACATGGGCTGGGCGTGGAT	749
FadPf-5	CCCCAACTCGGCCAAGCTCTCGGTGAAGAAGTGGGAGTTCGACCTGGGCTGGGCGTGGAT	737
FadPf101	CCCCAACTCGGCCAAGCTGTGCGTCAAGAAGTGGGAGTTCGACCTGGGCTGGGCGTGGAT	695
	***** ***** ** *	
FadPspH	CAAAGTGTTCAGTTTCTGGGCTGGCCAAAGTCCAGCGGGTTCGCGCCCATCGCCCCATCG	839
FadPssyr	CAAGTCTTTCAGCTTCTGCGTCTGGCCAAGGTCCAGCGGGTTCGCGCCCATTCGCCCATCG	755
FadPstom	CAAGTGTTCAGCTTCTGCGTCTGGCCAAGGTCCAGCGGGTTCGCGCCCATTCGCCCATCG	809
FadPf-5	CAAGTCTTTCAGCTTCTGCGTCTGGCCAGGTTCCAGCGGTTCGCGCCCATTCGCCCATCG	797
FadPf101	CCAGTCTTTCAGCTTCTGCGTCTGGCCAAGGTTCGCAACGGGTTCCGCCCATTCGCCCATCG	755
	* * * * * ***** ***** * ***** ** * * * * * * * * * * * * * *	
FadPspH	GGTCGAAGGCAAGGGCCACATGGACATGGACACCGCCATGGCGATCTCAACAACCGTTT	899
FadPssyr	GGTCGAAGGCAAGGGCCACATGGACATGGACACCGCGATGGCGATCTCAACAACCGTTT	815

cysAPf5 ATCAACCTGGACATCCAGAGCGGCGAGCTGGTGGCCCTGCTGGGCCCGTCCGGCTGCGGC 120
cysAPf01 ATCAGTCTGGACATCCACAGCGGTGAACCTGGTGGCATTGCTCGGCCCGTCCGGCTGCGGC 120
cysAPsph ATCAGTCTGGACATCCAGAGTGGCGAGCTGGTGGCTTTGCTCGGCCCGTCCAGGCTGCGGC 120
cysAPssyr ATCAGTCTGGACATCCAGAGTGGCGAGCTGGTGGCTTTGCTGGGCCCGTCCAGGCTGCGGC 120
cysAPstom ATCAGTCTGGACATCCAGAGTGGCGAGCTGGTGGCTTTGCTGGGCCCGTCCAGGCTGCGGC 120
cysAPputF1 ATCAACCTGGACATCAACAGCGGCGAGCTGGTGGCTTTGCTCGGCCCGTCCGGCTGCGGC 120

cysAPf5 AAGACCACCCTGCTCGGCATCATCGCCGGCTGGAACCCCGGACCAAGGCAGCATCGTG 180
cysAPf01 AAGACCACCCTGCTCGGCATCATTGCCGGTCTGGAACCCCGGATAACGGCAACATCGTG 180
cysAPsph AAGACCACCCTGCTCGGCATATTGCCGGCTGGAACCCCGGATGACGGCAGTATCGTG 180
cysAPssyr AAGACCACCCTGCTCGGCATCATTGCCGGCTGGAACCCCGGATGACGGCAGCATCGTG 180
cysAPstom AAGACTACCTTGTTCGCATATTGCCGGTCTGGAACCTCGGATGACGGCAGCATCGTG 180
cysAPputF1 AAGACCACCCTGCTCGGCATCATTGCCGGCTGGAACCCCGGACAGGGCAACATCGTG 180

cysAPf5 TTCCACGGCGAGGATGTCTCGGGCCACGACGTGCGTGATCGCAACGTGCGTTTCGTGTTC 240
cysAPf01 TTCCACGGCGAAGACGTGTCGGGCCACGACGTGCGGGATCGCAACGTGCGTTTCGTGTTC 240
cysAPsph TTCCATGGCGAAGATGTTCCGGCCATGACGTGCGTGATCGCAACGTGCGTTTCGTGTTC 240
cysAPssyr TTCCATGGCGAAGATGTTCCGGCCACGACGTGCGTGATCGCAACGTGCGTTTCGTGTTC 240
cysAPstom TTCCACGGTGAAGACGTTTCGGGCCATGACGTGCGTGATCGCAACGTGCGTTTCGTGTTC 240
cysAPputF1 TTCCATGGCGAGGACGTTTCGGCCATGACGTGCGTGACCGTAACTGCGTTTCGTGTTC 240

cysAPf5 CAGCACTACGCCCTGTTCCGCCACATGAGCGTGTTCGACAACGTGCGTTTCGGCTGCGC 300
cysAPf01 CAGCACTACGCCCTGTTCCGCCACATGACCGTGTTCGACAACGTGCGTTTCGGCTGCGC 300
cysAPsph CAGCATTACGCCCTGTTCCGCCACATGACCGTGTTCGACAACGTGCGTTTCGGCTGCGC 300
cysAPssyr CAGCACTACGCCCTGTTCCGCCACATGAGCGTGTTCGACAACGTGCGTTTCGGCTGCGC 300
cysAPstom CAGCACTATGCCCTGTTCCGCCACATGACCGTTTTTCGACAACGTGCGTTTCGGCTGCGC 300
cysAPputF1 CAGCACTACGCCCTGTTCCGCCACATGAGCGTGTTCGACAACGTGCTTTTCGGCTGCGC 300

cysAPf5 ATGAAGCCGAAGAACCAGCGCCCGAGGAGCAAGATCGCCGAGAAGTCCACGAGCTG 360
cysAPf01 ATGAAGCCGAAAAACCAGCGCCCGAACGAAAGCCAGATCGCCGACCAAGTTCCAGGAGCTG 360
cysAPsph ATGAAGCCCAAACGCGAGCGCCCGAACGAGACACGGATGCGCGAGAAGTCCATGAGCTG 360
cysAPssyr ATGAAGCCAAAGCGGAGCGCCCGAACGAAACGCGGATCGCCGAGAAGTCCATGAGCTG 360
cysAPstom ATGAAGCCCAAGAGGAGCGCCCGAACGAAACGCGCATCGCCGAAAAAGTCCAGGAGCTG 360
cysAPputF1 ATGAAGCCCAAGGGGAGCGCCCAAGCGAGAACAAAGATGCGCGAGAAGTGCATGAGCTG 360

cysAPf5 CTGAACATGGTGCAGCTGGACTGGCTCTCAGACCGTTATCCCGGAACAGCTCTCCGGCGC 420
cysAPf01 CTGAACATGGTGCACACTGGACTGGCTGTCGGATCGTTATCCGGAGCAACTGTCGGCGGC 420
cysAPsph CTGAACATGGTGCAGCTGGACTGGCTGGCCAGCCGTTATCCGGAGCAACTGTCGGGTGGA 420
cysAPssyr CTGAACATGGTGCAGCTGGACTGGCTGGCCAGCCGTTATCCGGAGCAACTGTCGGGTGGA 420
cysAPstom CTGAACATGGTGCAGCTGGACTGGCTGGCTGATCGTACCCGGACAGTTGTCGGGTGGT 420
cysAPputF1 CTGAACATGGTGCACACTGGACTGGCTGTCAGACCGCTACCCCGAGCAGCTTTCGGGTG 420

cysAPf5 CAGCGCCAGCGTATCGCCTGGCCCGCGCCCTGGCGGTGAGGCCAAGGTGCTGCTGCTG 480
cysAPf01 CAGCGTCAAGCGTATCGCCTGGCCCGCGCCCTGGCGGTGAGGCCAAGGTGCTGCTGCTG 480
cysAPsph CAGCGCCAGCGTATCGCCTGGCCCGCGCCCTGGCGGTGAGGCCAAGGTGCTGCTGCTG 480
cysAPssyr CAGCGCCAGCGAATCGCCTGGCCCGCGCCCTGGCGGTGAGGCCAAGGTGCTGCTGCTG 480
cysAPstom CAGCGTCAAGCGTATCGCCTGGCCCGCGCACTGGCGGTGAGGCCAAGGTGCTGCTGCTG 480
cysAPputF1 CAGGTCAGCGTATCGCCTGGCCCGTGCCTGGCGGTGAGGCCAAGGTGCTGCTGCTG 480

cysAPf5 GACGAACCTTCGGCGCCCTCGACGCCAAGGTGCGCAAGGACTGCGCGCTGGCTGGCG 540
cysAPf01 GACGAGCCGTTTCGGCGCCCTCGACGCCAAGGTGCGTAAAGAGCTGCGCCGCTGGCTGGCG 540
cysAPsph GACGAGCCGTTTCGGCGCCCTGGACGCCAAGGTGCGCAAGGAACTGCGTTCGCTGGCTGGCG 540
cysAPssyr GACGAGCCGTTTCGGCGCCCTGGACGCCAAGGTTCGCAAGGAGCTGCGTTCGCTGGCTGGCG 540
cysAPstom GACGAGCCGTTTCGGCGCCCTGGACGCCAAGGTTCGCAAGGAACTGCGTTCGCTGGCTGGCG 540
cysAPputF1 GACGAGCCATTTCGGTGCCTGGATGCCAAGGTGCGAAAGAGCTGCGCGCTGGCTGGCG 540

cysAPf5 CGGCTGCACGAAGACATCAACCTGACTTCGGTATTTCGTTACCCACGACCAGGAAGAAGCC 600
cysAPf01 CGCCTGCACGAAGACATCAACCTGACTTCGGTATTTCGTTACCCACGACCAGGAAGAAGCC 600
cysAPsph CGCCTGCACGAAGACATTAACCTGACTTCGGTATTTCGTTACCCACGATCAGGAAGAGGCC 600
cysAPssyr CGCCTGCACGAAGACATCAACCTGACTTCGGTATTTCGTTACCCACGATCAGGAAGAGGCC 600
cysAPstom CGCTTGCACGAGGACATCAACCTGACTTCGGTATTTCGTTACCCACGATCAGGAAGAGGCC 600
cysAPputF1 CGGCTGCACGAGGATATCAACCTGACTTCGGTATTTCGTTACCCACGACCAGGAAGAAGCC 600

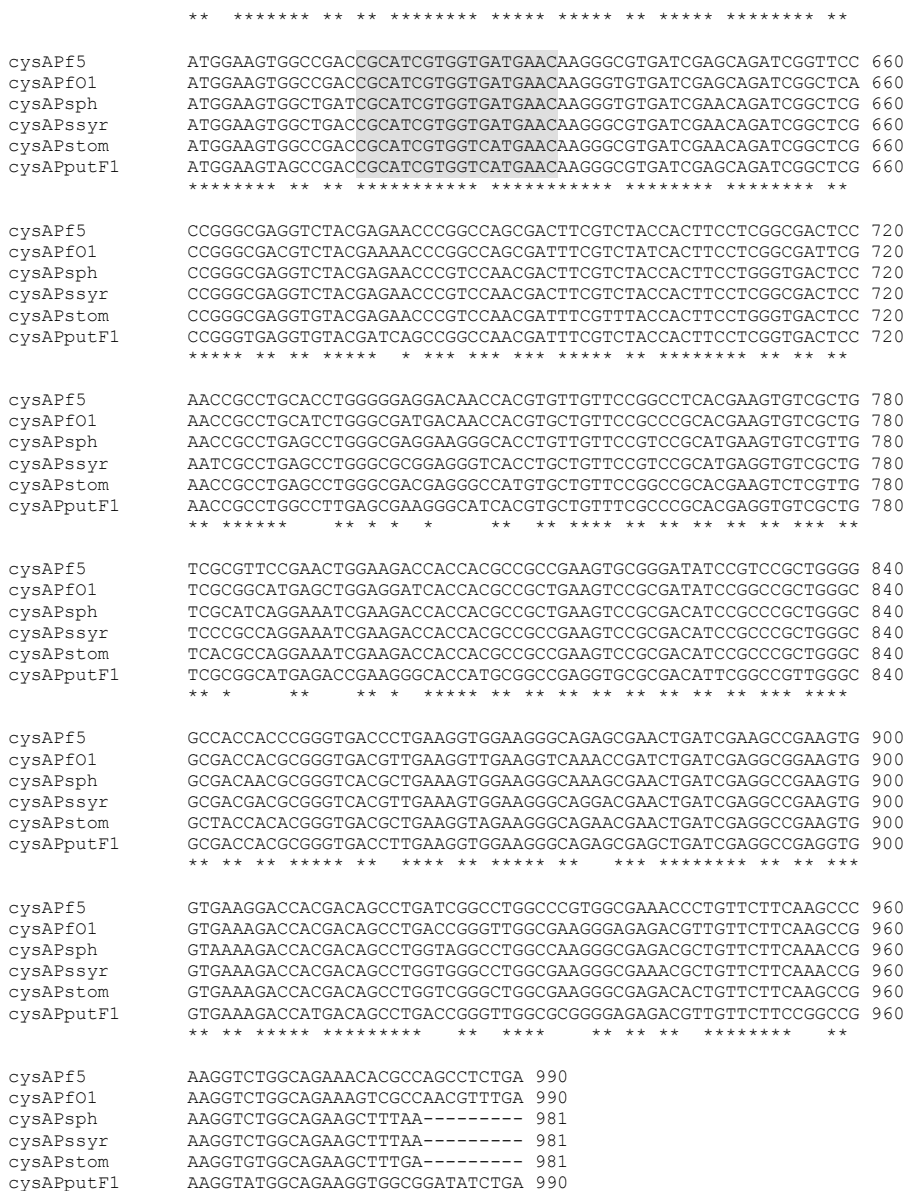


Figura 4.10. Allineamento dei geni *cysA* dei ceppi batterici di *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448 (*cysAPsph*), *P. syringae* pv. *syringae* B728a (*cysAPssyr*), *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*cysAPstom*), *P. fluorescens* Pf-5 (*cysAPf-5*), *P. fluorescens* PfO-1 (*cysAPf01*), *P. putida* F1 (*cysAPputF1*). In giallo è indicata la regione su cui è stato disegnato il *primer cysAr*.

I risultati conseguiti hanno permesso di comprendere l'organizzazione dei geni fiancheggianti *osCA* (figura 4.11).

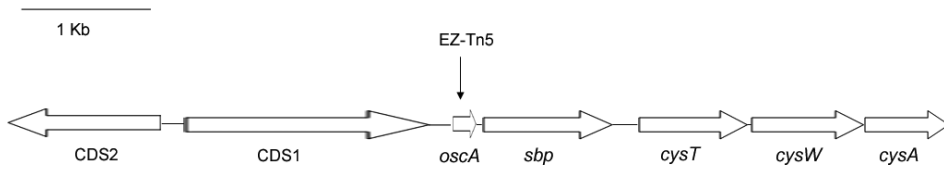


Figura 4.11. Organizzazione dei geni fiancheggiati *oscA* in *P. corrugata* 28. CDS2 = desaturasi degli acidi grassi; CDS1 = diguanilato-cilcasi/fosfodiesterasi; *sbp* = componente periplasmatica del trasportatore ABC del solfato; *cysT* = permeasi del trasportatore ABC del solfato; *cysW* = permeasi del trasportatore ABC del solfato; *cysA* = ATP-asi del trasportatore ABC del solfato. La freccia verticale indica il punto di inserimento del trasposone EZ-Tn5 nel genoma del mutante Crg8

Il gene *oscA* si localizza a valle di due ORF (CDS1 e CDS2), la cui sequenza nucleotidica mostra elevata similarità rispettivamente con un gene codificante una diguanilato ciclasi/fosfodiesterasi con sensore PAS/PAC (80% di identità con *P. fluorescens* PflO-1, PflO1_0192) e con un gene codificante una desaturasi degli acidi grassi (89% di identità con *P. fluorescens* PflO-1, PflO1_0191). CDS1 ha lo stesso orientamento di *oscA*, mentre CDS2 presenta orientamento opposto. A valle di *oscA* si trova un cluster genico codificante le componenti del trasportatore ABC del solfato: *sbp* (89% di identità con *P. fluorescens*, PflO1_0194), *cysT* (89% di identità con *P. fluorescens* PflO-1, PflO1_0195), *cysW* (88% di identità con *P. fluorescens* Pf-5, Pfl_0194) e *cysA* (89% di identità con *P. fluorescens* Pf-5, Pfl_0195). I trasportatori ABC rappresentano sistemi di trasporto ad elevata affinità per il proprio substrato e catalizzano il trasferimento del substrato dall'esterno all'interno della cellula, sfruttando l'energia rilasciata dall'idrolisi dell'ATP. I trasportatori ABC sono formati da un "core" che permette l'ingresso del substrato nella cellula da una o più componenti periplasmatiche che hanno la funzione di legare il substrato ad elevata affinità nello spazio periplasmatico e presentarlo al "core" del trasportatore. Il "core" è formato da due componenti inserite nella membrana citoplasmatica che formano il canale attraverso il quale il substrato penetra nella cellula e da una componente associata al versante citoplasmatico della membrana con attività ATP-asi, che fornisce l'energia necessaria per il trasporto del substrato. Nel trasportatore ABC del solfato CysT e CysW costituiscono le componenti transmembrana, mentre CysA rappresenta la componente con attività ATP-asi. Il solfato viene legato a livello periplasmatico da due diverse proteine: Sbp (sulphate binding protein) che presenta elevata affinità per il solfato, e CysP, che può legare il solfato ma che ha una maggiore affinità per il tiosolfato (Hryniewicz et al. 1990; Kertesz 2001) (figura 4.12)

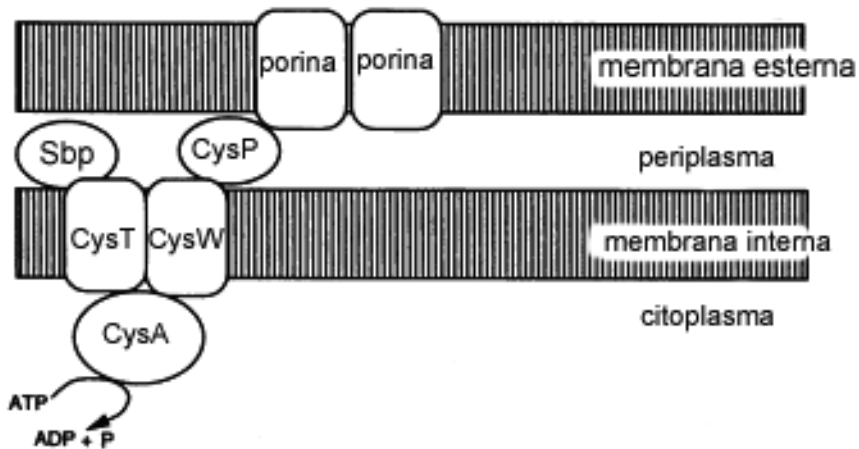


Figura 4.12. Trasportatore ABC del solfato di *E. coli*. Il solfato, penetrato nello spazio periplasmatico attraverso porine, viene trasportato nel citoplasma attraverso il trasportatore ABC del solfato. Sbp = proteina che lega il solfato, CysP = proteina che lega il tiosolfato, CysT = componente transmembrana, CysW = componente transmembrana, CysA = proteina che lega e idrolizza l'ATP

Un'estesa ricerca di omologhi del gene *oscA* in GenBank, mediante il software BLASTn, ha messo in evidenza che tale gene è presente in vari batteri Gram negativi e Gram positivi. In figura 4.13 viene riportata l'organizzazione dei geni a valle di *oscA* in tali batteri. Con l'unica eccezione di *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* i geni che si trovano a valle di *oscA* sono relative all'utilizzazione dello zolfo. In *Pseudomonas*, *Shewanella* e in *Bacillus haolodurans* C-125 l'organizzazione dei geni localizzati a valle di *oscA* è identica a quella trovata nel ceppo di *P. corrugata* 28, *oscA* è seguito dai geni che codificano le componenti del trasportatore ABC del solfato (*sbp*, *cysT*, *cysW* e *cysW*). In *Bacillus clausii* KSM-K16, *Morella thermoacetica* ATCC39073 ed in *Methylobacillus flagellatus* i geni a valle di *oscA* sono coinvolti nel trasporto e nel metabolismo dei solfonati. Infine in altri ceppi di *Bacillus oscA* si localizza a monte di geni coinvolti nel processo di riduzione del solfato che porta alla sintesi della cisteina.

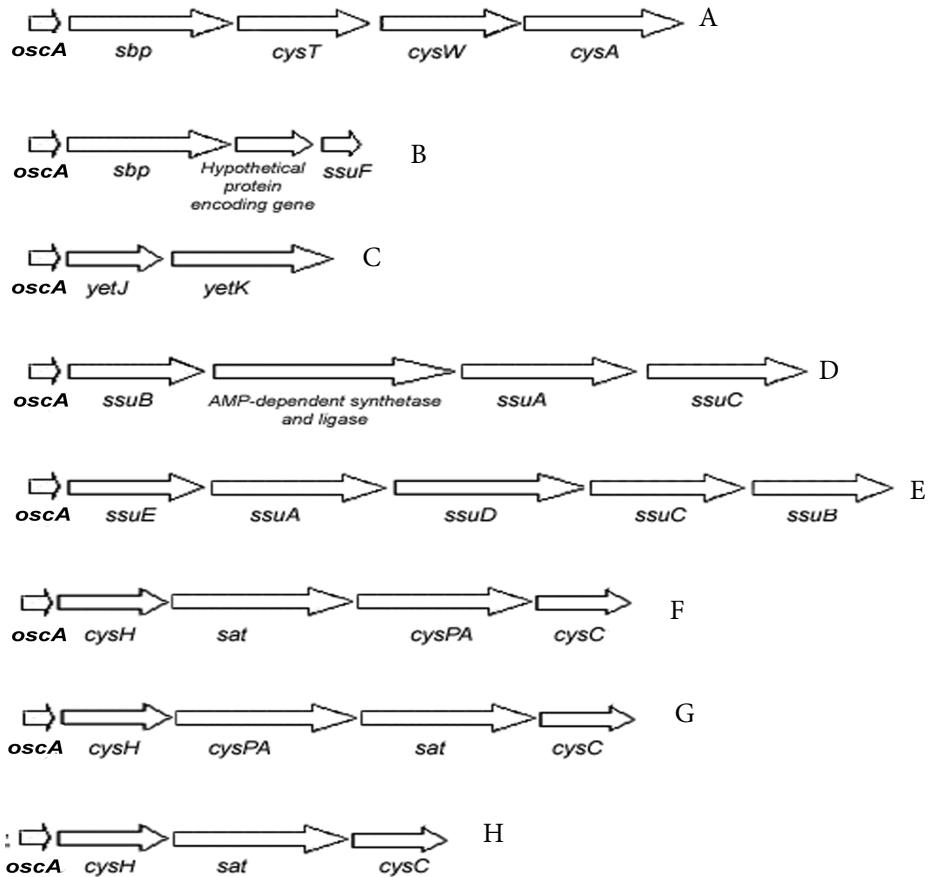


Figura 4.13. Organizzazione dei geni a valle di *oscA* in A) ceppi di *Pseudomonas*, *Shewanella* e in *Bacillus halodurans* C-125; B) *Methylobacillus flagellatus* KT; C) *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168; D) *Morella thermoacetica* ATCC39073; E) *B. clausii* KSM-K16; F) *B. halodurans* C-125; G) *B. licheniformis* ATCC14580; H) *B. cereus* ATCC10987, *B. cereus* ATCC14579, *B. anthracis* "Ames Ancestor". *oscA* = piccola ipotetica proteina a funzione sconosciuta; *sbp* = componente periplasmatica del trasportatore ABC del solfato; *cysT* = permeasi del trasportatore ABC del solfato; *cysW* = permeasi del trasportatore ABC del solfato; *cysA* = ATP-asi dell'ABC trasportatore del solfato; *ssuF* = proteina legante il complesso molibdeno-pterina, *yetJ* = proteina integrale di membrana che interagisce con FtsH, *yetK* = permeasi appartenente alla superfamiglia dei trasportatori di droghe/metaboliti (DMT), *ssuB* = componente legante l'ATP del trasportatore ABC di nitrato/solfonato/bicarbonato, *ssuA* = componente legante il substrato del trasportatore ABC di nitrato/solfonato/bicarbonato, *ssuC* = componente permeasica del trasportatore ABC di nitrato/solfonato/bicarbonato, *ssuE* = FMN riduttasi, *ssuD* = alcansolfonato monossigenasi, *cysH* = fosfoadenosina fosfosolfato riduttasi, *sat* = solfato adenilil-trasferasi, *cysPA* = fosfato/solfato permeasi, *cysC* = adenilil-solfato chinasi.

2.2.2. Analisi trascrizionale

Per valutare se in *P. corrugata* 28 *oscA* sia organizzato in un operone con in geni adiacenti o se formi un'unità trascrizionale indipendente, la sequenza nucleotidica contenente le sei ORF schematizzata in figura 4.11 è stata analizzata mediante il software FGENESB che permette, a partire da una sequenza nucleotidica contenente ORF, di predirne la struttura operonica. Sulla base dell'analisi bioinformatica prodotta da FGENESB, nella sequenza nucleotidica oggetto di indagine sono presenti due distinti operoni, il primo comprendente *oscA* e *sbp*, il secondo contenente i geni *cysT*, *cysW* e *cysW*. Per verificare la correttezza della predizione del software è stato condotto un esperimento di cotrascrizione che si basa sull'assunzione che geni appartenenti allo stesso operone siano trascritti in una stessa molecola di mRNA, mentre operoni distinti vengono trascritti come molecole di mRNA diverse. Conseguentemente una regione intergenica che si localizza tra due geni appartenenti ad un medesimo operone trova un corrispettivo anche a livello del trascrittoma (mRNA), al contrario una regione intergenica che nel genoma separa due geni che si trovano su due unità trascrizionali indipendenti, non essendo trascritta, non è rilevabile nel trascrittoma. L'esperimento ha previsto l'amplificazione mediante PCR le sequenze intergeniche *oscA-sbp*, *sbp-cysT*, *cysT-cysW*, *cysW-cysW* a partire da cDNA retrotrascritto da RNA estratto da colture di *P. corrugata* 28 non esposte o esposte a cromato per tempi diversi (5, 15, 30, 60 e 90 minuti). I primer impiegati per amplificare ciascuna regione intergenica sono stati disegnati sulle regioni codificanti i due geni adiacenti.

L'amplificazione dei campioni di RNA non retrotrascritto (controllo) non ha mai prodotto amplificazione indicando la correttezza dei risultati ottenuti dall'amplificazione del cDNA (figura 4.14). L'amplificazione dei campioni di cDNA ha dato esito positivo per le regioni intergeniche *oscA-sbp*, *cysT-cysW*, *cysW-cysW*, mentre nessun prodotto di amplificazione è stato ottenuto per la regione intergenica *sbp-cysT*. I risultati ottenuti indicano che *oscA* e *sbp* si trovano su un'unica unità trascrizionale mentre *cysT*, *cysW* e *cysW* si localizzano su una seconda unità trascrizionale, confermando la predizione del software FGENESB.

Allo scopo di valutare come in *P. corrugata* 28 l'espressione degli operoni *oscA-spb* e *cysTWA* venga influenzata dall'esposizione al cromato è stato condotto un esperimento di real time PCR che ha previsto l'amplificazione dei geni *oscA*, *sbp*, e *cysW*, quest'ultimo scelto come rappresentante dell'operone *cysTWA*, a partire da cDNA ottenuto da RNA estratto da colture di *P. corrugata* 28 non esposte o esposte al cromato per tempi diversi (5, 15, 30, 60 e 90 minuti). L'esperimento ha permesso di valutare il livello di espressione relativa dei tre geni per ciascun tempo di esposizione al cromato rispetto alla condizione di non esposizione (tabella 4.9). Nel ceppo parentale i tre geni sono fortemente sovraespressi in seguito ad esposizione al cromato, la

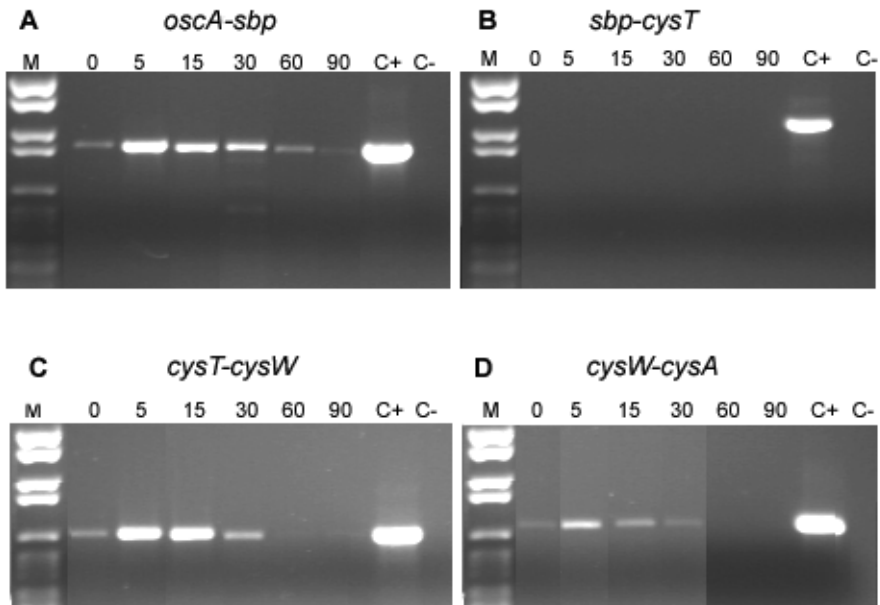


Figura 4.14. Prodotti di amplificazione delle reazioni di PCR eseguite su cDNA retrotrascritto da RNA estratto da colture di *P. corrugata* 28 esposte per 0, 5, 15, 30, 60 e 90 minuti al cromato (1 mM). Sono state amplificate le regioni intergeniche *oscA-sbp* (A), *sbp-cysT* (B), *cysT-cysW* (C), *cysW-cysA* (D). C+ = controllo positivo costituito da DNA genomico di *P. corrugata* 28; C- = controllo negativo costituito da RNA non retrotrascritto; M= marcatore di peso molecolare (marker VI Roche).

sovrappressione è massima a 5 minuti e successivamente diminuisce. La sovrappressione di *sbp* e *cysW* è significativa fino a 30 minuti di esposizione al cromato, mentre quella di *oscA* risulta significativa fino al termine dell'esperimento (90 min). È stato inoltre osservato che il grado di sovrappressione dell'operone *oscA-sbp* è maggiore di quello di *cysW*.

La modulazione dell'espressione dei geni coinvolti nel trasporto del solfato in seguito ad esposizione a cromato è già stata osservata nei batteri. In uno studio di analisi del trascrittoma di *Shewanella oneidensis* MR-1 esposta al cromato è stato dimostrato che l'esposizione al cromato induce un sovrappressione dei geni *oscA* (SO4651), *sbp* (SO4652), *cysW-2* (SO4654) e *cysW-2* (SO4655) (Brown et al. 2006b; Thompson et al. 2007), ma non è stato chiarito come l'aumento dell'espressione di questi geni consenta a *S. oneidensis* di rispondere allo stress indotto da Cr(VI). Infatti, gli autori, sebbene suggeriscano che la sovrappressione dei geni coinvolti nel trasporto del solfato

Tabella 4.9. Espressione relativa di *oscA*, *sbp* e *cysA* in colture esposte al cromato (1 mM) per tempi diversi (5, 15, 30, 60 e 90 minuti) rispetto a colture non esposte

Ceppo	Gene	Fattore di espressione *				
		5 min	15 min	30 min	60 min	90 min
Parentale	<i>oscA</i>	115,9	41,6	27,7	9,0	4,7
	<i>sbp</i>	135,4	44,5	3,7	NS**	NS
	<i>cysA</i>	32,1	19,6	7,8	NS	NS
Mutante Crg8	<i>sbp</i>	8,5	NS	NS	ND***	ND
	<i>cysA</i>	9,1	NS	NS	ND	ND

* Fattore di espressione relativa calcolato mediante il software MCS-REST. Tutti I valori mostrati sono statisticamente significativi (P=0.01).

** NS = valore non statisticamente significativo (P>0.05). Per ciascun campione, il valore del fattore di espressione è stato calcolato dai risultati di tre esperimenti di *real time* PCR condotti a partire da RNA totale estratto da due colture indipendenti.

***ND= valore non determinato.

possa permettere alla cellula di risolvere la condizione di affamamento da zolfo causata dallo stress ossidativo dovuto al Cr(VI), non considerano che un generico aumento del trasporto del solfato causa un parallelo aumento dell'ingresso di cromato nella cellula. Nel nostro studio l'esperimento di *real time* PCR condotto in *P. corrugata* 28 ha permesso di comprendere in che modo la cellula moduli il trasporto del solfato per limitare i danni da cromato. In *P. corrugata* 28 l'esposizione al cromato induce un aumento dell'espressione del "core" del trasportatore codificato dall'operone *cysTWA*. Contemporaneamente viene sovraespresso, in modo ancora più intenso di quanto accade per *cysTWA*, *sbp* codificante la componente periplasmatica del trasportatore. Sbp può legare sia il solfato sia il cromato, ma ha un'affinità superiore per lo ione solfato (Jacobson et al. 1991). Un incremento a livello periplasmatico della concentrazione di Sbp avrebbe quindi l'effetto di aumentare l'affinità del trasportatore ABC per il solfato. Complessivamente l'aumento di espressione dell'operone *cysTWA* e di *sbp* limita l'ingresso del cromato nella cellula e potenzia il trasporto del

solfato, permettendo in tal modo di risolvere la condizione di affamamento da zolfo indotto dal Cr(VI), sia a causa dello stress ossidativo che esso provoca, sia a causa della competizione che esercita a livello dei trasportatori del solfato.

L'esperimento di real time PCR è stato effettuato anche per il mutante Crg8, limitatamente ai geni *sbp* e *cysW* (*oscA* in questo ceppo è interrotto dal trasposone) con il medesimo schema descritto per il ceppo parentale. Tale esperimento ha avuto lo scopo di valutare come l'alterazione del gene *oscA* influenzi l'espressione dei geni *sbp* e dell'operone *cysTWA* in seguito ad esposizione al cromato. I risultati ottenuti (tabella 4.9) indicano che l'inattivazione del gene *oscA* causa una diminuzione della sovraespressione dei geni *sbp* e *cysW*: essi mantengono un livello di sovraespressione significativo solo a 5 min di esposizione al cromato. La diminuzione dell'espressione di *sbp* può essere ricondotta ad un effetto polare esercitato dall'inserzione del trasposone in *oscA*. L'effetto polare consiste nella diminuzione della trascrizione di uno o più geni operonici, dovuta ad una mutazione in un gene situato a monte all'interno dello stesso operone. Se in un gene operonico viene introdotta una mutazione che trasforma una tripletta di basi da codone codificante un amminoacido a codone che indica termine della traduzione (codone non senso), i ribosomi si staccano prematuramente dall' mRNA e, non trovando un sito di inizio della traduzione subito a valle (in quanto il mRNA è ancora in via di sintesi), lasciano "scoperto" l'mRNA che può ripiegarsi in strutture secondarie e determinare arresto precoce della trascrizione. E' ipotizzabile che nel mutante Crg8 l'inserzione del trasposone Ez-Tn5 nella sequenza codificante di *oscA* inserisca nel frame di lettura del gene un codone non senso che causa arresto della traduzione con conseguente effetto polare sul gene *sbp*. Nel mutante Crg8 si verifica anche una minore trascrizione di *cysTWA* rispetto a quella osservata nel ceppo parentale. Tale fenomeno, non ascrivibile ad un effetto polare esercitato dall'inserzione di Ez-Tn5 in *oscA* che si trova in un'unità operonica distinta rispetto a *cysTWA*, può essere spiegato ipotizzando che i prodotti genici dell'operone *oscA*-*sbp* abbiano un ruolo regolativo nell'attivazione dell'operone *cysTWA*. Tale ruolo di regolazione dell'espressione di *cysTWA* potrebbe essere associato ad *oscA* piuttosto che a *sbp*, in quanto, ad oggi, Sbp è conosciuta come proteina che lega il solfato nel periplasma e ad essa non risulta associata alcuna funzione regolativa. Comunque la modalità con cui *oscA* possa regolare l'espressione genica di *cysTWA* resta ignota in quanto il suo ipotetico prodotto genico non possiede domini conservati che possano suggerire il suo meccanismo di azione.

2.2.3. Complementazione genetica

Per confermare e approfondire il ruolo svolto da *oscA* sono stati condotti esperimenti di complementazione. A partire da un vettore a basso numero di copie che si

propaga in *Pseudomonas* (pBBR1MCS-5) sono stati costruiti due plasmidi: pCHR61 e pCHR62, portanti rispettivamente il gene *oscA* e l'operone *oscA-sbp* (figura 4.15)

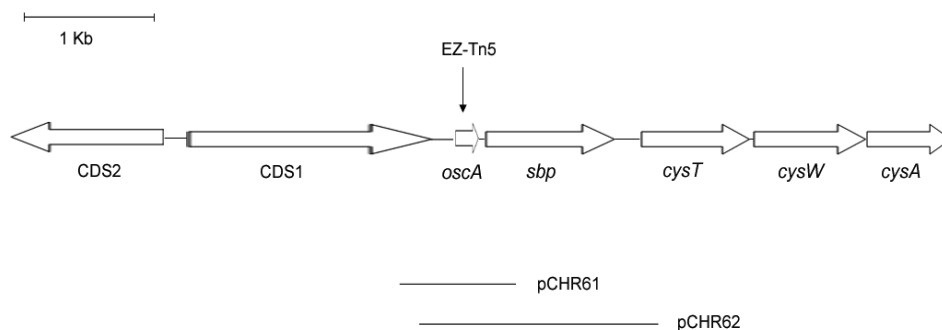


Figura 4.15. Sequenze nucleotidiche del genoma di *P. corrugata* 28 clonate in pBBR1MCS-5 per ottenere i due plasmidi pCHR61 e pCHR62. In pCHR61 è stato inserito il gene *oscA* e porzioni delle due ORF adiacenti, in pCHR62 è stato inserito l'intero operone *oscA-sbp* e porzioni delle due ORF adiacenti.

Il vettore non modificato pBBR1MCS-5 e i due plasmidi pCHR61 e pCHR62 sono stati inseriti mediante elettroporazione nel ceppo parentale e nel mutante Crg8. Il mutante Crg8 portante il plasmide pCHR61 è stato saggiato per la sua capacità di utilizzare vari composti dello zolfo come unica fonte dello zolfo mediante la tecnologia PM (PM04, E01-H12). Le curve cinetiche del ceppo mutante complementato con pCHR61, del ceppo mutante non complementato e del ceppo parentale sono state comparate tra loro (figura 4.16). Il mutante Crg8 in cui è stato inserito il plasmide pCHR61 recupera in modo completo la capacità di utilizzare composti organosolforilati non preferenziali come fonte di zolfo, mostrando un profilo di utilizzazione di tali composti del tutto simile a quello del ceppo parentale. Tale risultato dimostra che il gene *oscA* è necessario all'utilizzazione di composti organosolforilati non preferenziali come fonte alternativa di zolfo.

L'inserzione di pCHR61 in Crg8 consente soltanto un limitato recupero delle resistenza al Cr(VI) rispetto al ceppo parentale (tabella 4.10) Questo dato potrebbe suggerire che la diminuita resistenza del ceppo Crg8 al Cr(VI) non sia attribuibile al solo gene *oscA* che esercita effetto polare sul gene *sbp*. Tuttavia la determinazione della MIC-Cr(VI) del ceppo Crg8 complementato con pCHR62, che porta l'intero operone *oscA-sbp*, ha permesso di escludere tale ipotesi in quanto il ceppo presenta una MIC-Cr(VI) paragonabile a quella osservata per Crg8 trasformato con pCHR61. La motivazione del mancato recupero dell'iper-resistenza al Cr(VI) da parte del ceppo Crg8

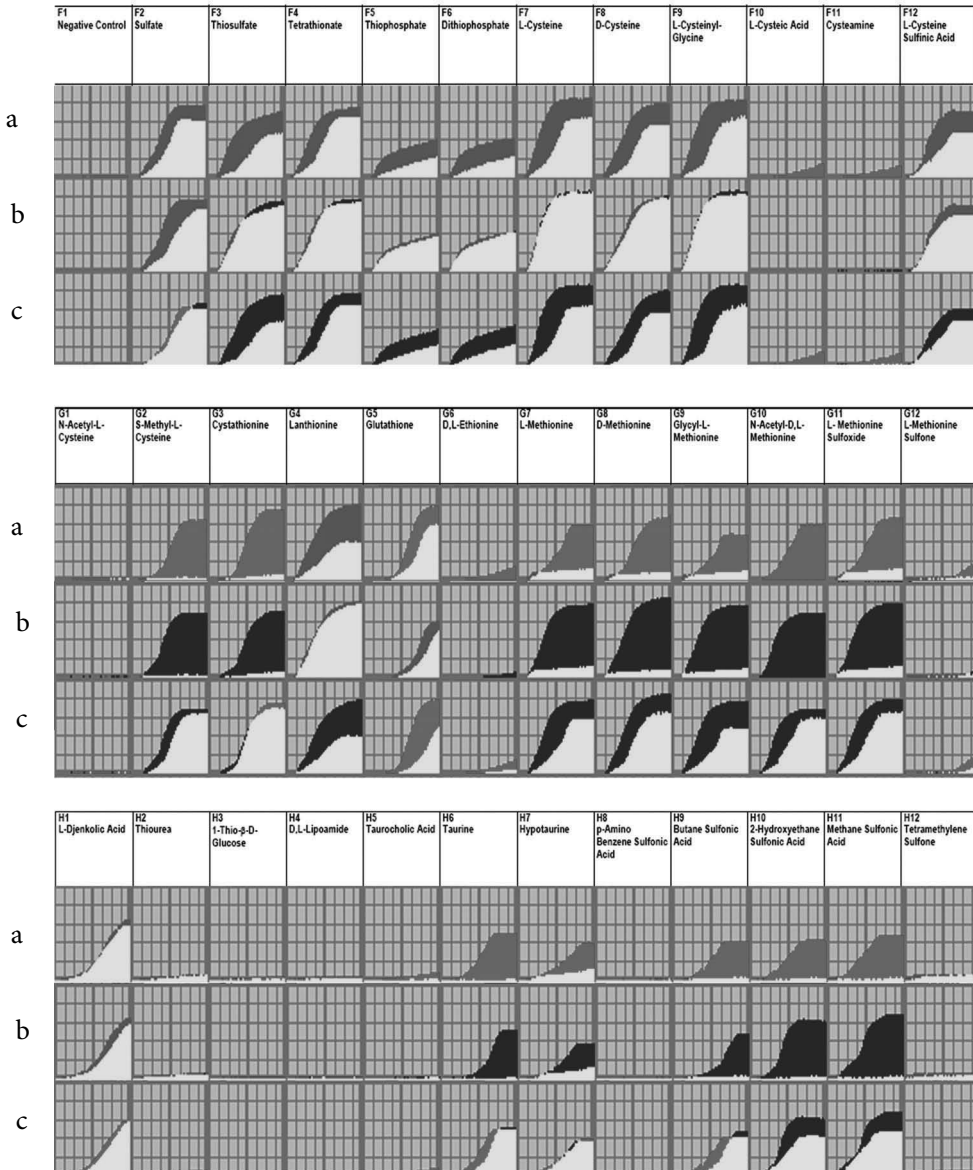


Figura 4.16. Comparazione PM delle curve cinetiche di utilizzazione di composti dello zolfo (PM04, E01-H12) del ceppo parentale e del mutante Crg8 (a), del mutante Crg8 e del mutante Crg8 complementato con pCHR61 (b), del ceppo parentale e del mutante Crg8 complementato con pCHR61 (c). Per ciascun pozzetto è stata riportata la fonte di zolfo saggata. Il software OmniLog attribuisce alle curve cinetiche di ciascun ceppo colori diversi, il grigio intermedio al ceppo parentale, il grigio chiaro al mutante Crg8 e il nero al mutante Crg8 complementato con pCHR61. Le zone di sovrapposizione delle curve di due ceppi diverse sono riportate in bianco

complementato con pCHR61 emerge dalla determinazione della MIC-Cr(VI) del ceppo parentale trasformato con pCHR61 e pCHR62. L'introduzione di tali plasmidi all'interno del ceppo parentale porta ad un significativo abbattimento della sua resistenza al Cr(VI), suggerendo che in *P. corrugata* 28 la resistenza al Cr(VI) dipende non soltanto dalla presenza del gene *oscA*, ma anche dal suo numero di copie nella cellula. L'introduzione di pCHR61 o pCHR62 nella cellula provoca un aumento del numero delle copie di *oscA*, è stato infatti riportato che derivati del vettore pBBR1MCS si moltiplicano nella cellula circa 10 volte (Xiong & Maser 2001).

Tabella 4.10. MIC-Cr(VI) del ceppo parentale e del mutante Crg8 trasformati con pBBR1MCS-5, pCHR61 e pCHR62 valutata a 24 ore di crescita.

Plasmide inserito	MIC-Cr(VI)*	
	Ceppo parentale 28	Mutante Crg8
Nessun plasmide	40	6
pBBR1MCS-5	40	6
pCHR61	22	11
pCHR62	29	12

* K_2CrO_4 (mM).

L' aumento del numero di copie di *oscA* può determinare uno sbilanciamento della sua funzione con conseguente perdita della risposta ottimale al cromato. Come è emerso dall'analisi trascrizionale di *oscA-sbp* e dell'operone *cysTWA*, *oscA* ha molto probabilmente un ruolo nel determinare la sovraespressione dell'operone *cysTWA* quando la cellula viene a trovarsi in presenza di cromato. Un aumento del numero delle copie di *oscA* nella cellula potrebbe determinare un inappropriato e non fisiologico incremento dell'espressione dell'operone *cysTWA* con conseguente iperpotenziamento del trasporto del solfato. Questo aumento sregolato del trasporto del solfato può facilitare l'ingresso del cromato all'interno della cellula con conseguente abbassamento del grado di resistenza al cromato del ceppo parentale complementato con pCHR61 e pCHR62.

Complessivamente i dati ottenuti dagli esperimenti di complementazione confermano che *oscA* è un gene a funzione regolativa e che da esso dipende l'utilizzazione di composti organosolforilati e la modulazione del trasporto del solfato in seguito ad esposizione a Cr(VI).

2.3. Composti organici dello zolfo e resistenza al Cr(VI) in *P. corrugata* 28

Dallo studio del mutante Crg8 di *P. corrugata* 28 è emerso che le molecole organiche dello zolfo possono avere un ruolo chiave nel favorire la resistenza batterica al Cr(VI). Questo risultato è di particolare rilevanza per i batteri del suolo, poiché mentre negli ambienti acquatici il solfato rappresenta la specie di zolfo maggiormente rappresentata e può raggiungere concentrazioni consistenti (2,78 mg/ml nell'acqua di mare), nel suolo il solfato è presente in concentrazione dell'ordine dei microgrammi per grammo di suolo e costituisce soltanto l'1-5% dello zolfo totale presente (Kertesz 2000). Lo zolfo presente nel suolo si trova prevalentemente sottoforma di esteri del solfato, solfonati e amminoacidi solforilati (figura 4.17).



Figura 4.17. Speciazione dello zolfo nell'acqua di lago, nei suoli di prateria e nei suoli forestali. Nei diagrammi vengono rappresentate le frazioni di solfato (bianco), esteri del solfato (punti), amminoacidi solforilati (linee) e solfonati (nero) presenti nei tre ambienti. Per l'acqua di lago solfonati e amminoacidi solforilati sono rappresentati in un'unica frazione (in nero) [da (Kertesz 2000c), modificata].

Allo scopo di valutare se tali molecole possano influenzare la resistenza al Cr(VI) del ceppo 28, è stato valutato l'effetto di cisteina, metionina, glutatione, acido etansolfonico, taurina, dimetilsolfossido (DMSO) sulla MIC-Cr(VI) del ceppo in presenza di diverse concentrazioni di solfato (tabella 4.11).

La resistenza di *P. corrugata* 28 al Cr(VI) in assenza di fonti organiche di zolfo è influenzata dalla concentrazione di solfato nel mezzo di coltura: all'aumentare della concentrazione di tale ione aumenta infatti la MIC-Cr(VI), indicando, come noto, che esiste una competizione tra solfato e cromato per l'ingresso nella cellula (figura 4.18 A-B). La presenza nel mezzo di cisteina, metionina, glutatione e acido etansolfonico causa un aumento della MIC-Cr(VI) rispetto a quella osservata in presenza di solo solfato fino a valori rispettivamente di 150 mM, 120 mM, 40 mM, rendendola indipendente dalla concentrazione di solfato nel mezzo.

Tabella 4.11. MIC-Cr(VI) (mM) di *P. corrugata* 28 valutata su TMM contenente concentrazioni crescenti di Na₂SO₄ e 300 μM di una fonte organica di zolfo (cisterna, metionina, glutazione, taurina, acido etansolfonico e dimetilsofossido). Le colture sono state allestite in micro-piastra e incubate in agitazione a 26°C per 48 ore. I valori di MIC-Cr(VI) sono stati ottenuti dalla valutazione di tre esperimenti indipendenti

	-	cisteina	metioni- na	glutazione	acido etansolfo- nico	taurina	DMSO
	0	4*	150	32	120	40	4
Na ₂ SO ₄ (μM)	3	4	150	32	120	40	4
	30	4	150	32	120	40	ND
	300	12	150	40	120	40	12
	3000	40	150	52	120	40	40

*MIC-Cr(VI)

Questo risultato suggerisce che, in presenza di tali molecole solforilate, viene meno la competizione tra cromato e solfato a livello dei trasportatori del solfato, probabilmente in seguito al blocco dei trasportatori del solfato (figura 4.18 C-D). Si può ipotizzare che in assenza di trasporto di solfato il batterio ottenga lo zolfo necessario alla sua crescita dalle molecole organiche (cisteina, glutazione, acido etansolfonico) acquisite dalla cellula tramite l'attivazione di trasportatori dedicati. La resistenza al Cr(VI) del ceppo 28 in presenza di metionina rimane costante da 0 fino a 30 μM di solfato aggiunto [32 mM MIC-Cr(VI)], mentre a concentrazioni più elevate di solfato (300 e 3000 μM) tende ad aumentare, suggerendo che *P. corrugata* 28 in presenza di metionina probabilmente attiva i trasportatori di questo amminoacido e limita il trasporto del solfato (figura 4.18 E-F). In presenza di taurina e dimetilsofossido lo spettro di resistenza al Cr(VI) del ceppo 28 rimane invariato rispetto a quello osservato in assenza di fonti alternative di zolfo: la comportamento suggerisce che queste due molecole non siano utilizzate dal batterio come fonte di zolfo.

Complessivamente i risultati ottenuti hanno permesso di confermare che alcune molecole dello zolfo hanno un importante ruolo nel favorire la resistenza batterica al Cr(VI) in *P. corrugata* 28. La loro presenza nell'ambiente non solo può permettere al batterio di risolvere la condizione di affamamento da zolfo, che si instaura nella cellula in seguito ad esposizione al Cr(VI), ma può permettere di inibire in modo più o meno completo il trasporto del solfato bloccando così l'ingresso del cromato nella cellula

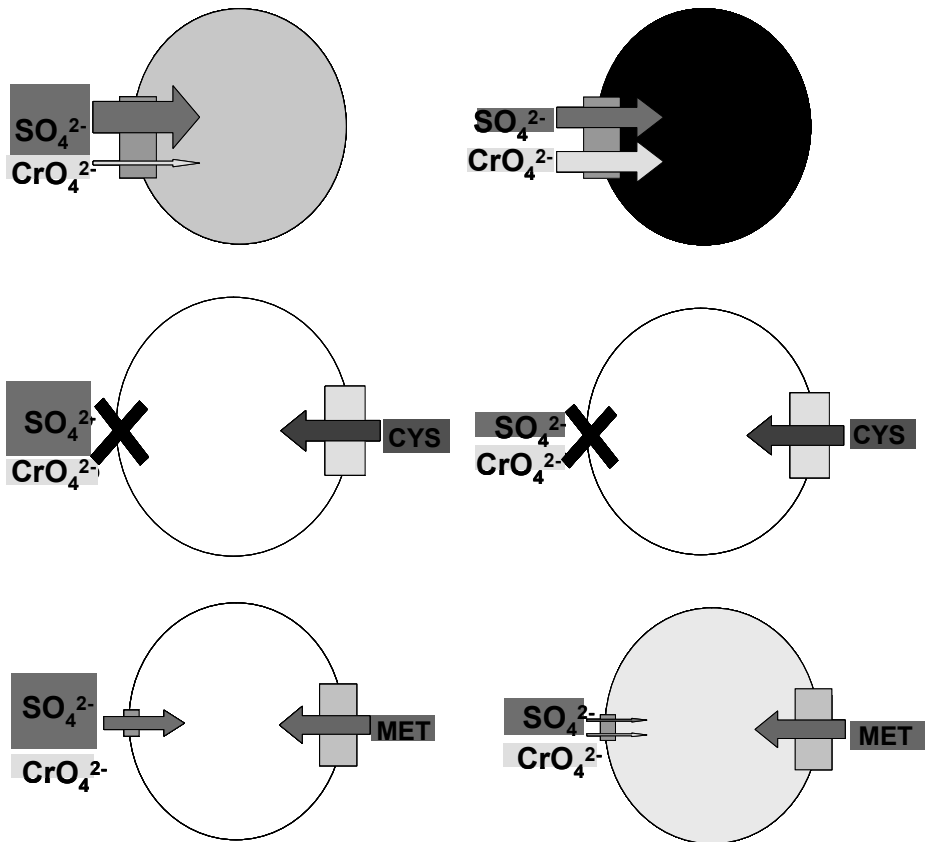


Figura 4.18. Rappresentazione schematica del trasporto di solfato, cromato e fonti organiche di zolfo in *P. corrugata* 28 in dipendenza dalla concentrazione di solfato e dalla presenza/assenza di fonti organiche di zolfo nel mezzo di coltura. Il colore della cellula batterica (rappresentata in ciascuna figura da un cerchio) è un'indicazione della quantità di cromato penetrato nella cellula, che può essere nulla (bianco), moderata (grigio) o elevata (nero). Le frecce indicano i flussi di cromato, solfato, cisteina e metionina all'interno della cellula tramite i relativi trasportatori, rappresentati da rettangoli. Le dimensioni relative delle frecce che indicano il flusso di cromato e solfato rappresentano le loro entità relative. La dimensione del rettangolino che indica il trasportatore del solfato, è un'indicazione dell'entità del trasporto ad esso associato. La croce nera indica il blocco del trasportatore del solfato. In A, C ed E sono rappresentate condizioni di alta concentrazione di solfato, mentre in B, D ed F di bassa concentrazione di solfato.

Capitolo 5

Conclusioni

Il cromato [Cr(VI)] costituisce uno dei maggiori problemi legati all'inquinamento ambientale da metalli pesanti, sia per la sua elevata pericolosità per salute dell'uomo (è molto tossico, mutageno e cancerogeno) che per la sua mobilità (responsabile di una rapida diffusione dal sito d'inquinamento). Il cromato penetra facilmente all'interno delle cellule attraverso il sistema di trasporto del solfato e va incontro ad un processo riduttivo che porta alla formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e di Cr(III) che danneggiano le macromolecole cellulari. Nel suolo reazioni di riduzione abiotiche e/o biotiche possono trasformare il Cr(VI) in Cr(III) che, avendo scarsa mobilità e permeando con difficoltà le membrane biologiche, è ritenuto poco tossico. Tuttavia la capacità riducente del suolo non sempre è sufficiente per ridurre in Cr(III) tutto il Cr(VI) presente che, quindi, può persistere e costituire un rischio per tutti gli organismi viventi.

Per risanare i suoli contaminati da Cr(VI) sono state sviluppate tecnologie chimico-fisiche che hanno limiti legati ai costi elevati e ad un alto impatto ambientale. Il biorisanamento, sfruttando la capacità dei microrganismi di ridurre il Cr(VI) a Cr(III), costituisce un'alternativa di grande interesse alle tecnologie di risanamento chimico-fisico. Pertanto al fine di portare un contributo per lo sviluppo di un efficiente sistema biologico per il risanamento ambientale da cromo esavalente, quattro ceppi batterici, isolati da suoli artificialmente contaminati con cromato di potassio, altamente resistenti al Cr(VI) [40 mM MIC-Cr(VI)] e capaci di ridurlo, dopo essere stati identificati come appartenenti alle specie di *P. corrugata* (ceppi 22 e 28) e di *P. mendocina* (ceppi 34 e 56), sono stati profondamente caratterizzati attraverso la determinazione delle fonti carbonio/energia che sostengono la riduzione del Cr(VI) e mediante la tecnologia del Phenotype Microarray che ha consentito di saggiare 1150 caratteri fenotipici.

L'attività metabolica di un microrganismo chemiorganotrofo eterotrofo nel suolo può essere limitata dalla carenza di sostanza organica, pertanto nel progettare un processo di biorisanamento di un suolo contaminato con cromato che preveda l'aggiunta di sostanza organica particolare attenzione deve essere rivolta alla scelta del tipo di fonte di carbonio/energia da aggiungere, sia perché fonti di carbonio/energia

diverse stimolano in misura differente il processo riduttivo del Cr(VI) sia perché alcune fonti di carbonio/energia possono indurre un eccessivo aumento della biomassa microbica con conseguente alterazione delle proprietà del suolo. I risultati ottenuti dagli esperimenti condotti sui ceppi 22, 28, 34 e 56 hanno indicato che i ceppi di *P. corrugata* (isolati 22 e 28) in presenza di fruttosio, galattosio e glucosio presentano una crescita limitata e riducono con elevata efficienza il Cr(VI) [tra il 40% e il 70% di Cr(VI) ridotto in 72 ore], mentre il fruttosio è la fonte di carbonio/energia più idonea per sostenere la riduzione del Cr(VI) a Cr(III) nei ceppi di *P. mendocina* (isolati 34 e 56).

L'approccio Phenotype Microarray ha permesso di saggiare lo spettro di resistenza dei ceppi batterici anche a valori estremi di pH e a numerosi osmoliti evidenziando che i ceppi 22 e 28 tollerano ambienti acidi, mentre i ceppi 34 e 56 sono caratterizzati da una elevata resistenza a osmoliti e ambienti alcalini. L'analisi globale dei dati ottenuti mediante l'applicazione dell'approccio PM ha messo in evidenza che, sebbene tutti i ceppi presentino un elevato grado di resistenza a sostanze tossiche (metalli pesanti, antimetaboliti, etc.), gli isolati 34 e 56 sono caratterizzati da una resistenza "eccezionale" che li rende candidati di elezione per l'impiego nel biorisanamento di suoli contenenti, oltre al Cr(VI), altri inquinanti.

La limitata conoscenza dei meccanismi di resistenza batterica al Cr(VI) e dei geni che sono coinvolti in tale fenotipo è un ulteriore fattore che limita la possibilità di applicare con successo su larga scala il biorisanamento di suoli contaminati da Cr(VI). Pertanto quattro mutanti del ceppo *P. corrugata* 28 (Crg3, Crg8, Crg26 e Crg96) sensibili al Cr(VI) sono stati caratterizzati tramite un approccio integrato di genetica e di fenomica. I risultati ottenuti hanno messo in luce che l'iper-resistenza di *P. corrugata* 28 al Cr(VI) dipende almeno da tre processi: 1) la riparazione, mediata dalla RecG elicasi ATP-dipendente, delle lesioni al DNA che sono probabilmente indotte dal Cr(III), prodotto finale della riduzione intracellulare del Cr(VI); 2) il potenziamento, mediato dall'enzima malico e dalla piridin nucleotide transidrogenasi solubile, della produzione di NADPH, coenzima necessario sia per sostenere la biosintesi di nuovi componenti cellulari che sostituiscono quelli danneggiati dalle specie reattive che si formano in seguito alla riduzione intracellulare del Cr(VI), sia per l'attività di numerosi enzimi coinvolti nella detossificazione dei ROS e nel mantenimento del corretto stato redox della cellula; 3) l'attivazione della risposta di affamamento da zolfo (SSR) che permette alla cellula di risolvere la condizione di carenza intracellulare di zolfo indotta da Cr(VI).

L'analisi Phenotype Microarray del mutante Crg8 di *P. corrugata* 28, oltre a dimostrare l'importanza della SSR per la resistenza al Cr(VI), ha permesso di attribuire la funzione ad un gene fino ad oggi a funzione sconosciuta. Tale gene, da noi denominato *oscA*, codificante una ipotetica piccola proteina di 60 amminoacidi, è necessario

per attivare il sistema cellulare che permette di utilizzare come fonte di zolfo alcuni composti organici solforilati, che vengono acquisiti e metabolizzati dalla cellula soltanto quando essa si trova in ambienti carenti di fonti di zolfo definite preferenziali (solfato, tiosolfito, cisteina). L'analisi genetica e funzionale di *oscA* ha permesso di approfondire la conoscenza del ruolo svolto da tale gene nella resistenza al Cr(VI): *oscA*, che si trova in operone con *sbp*, il gene codificante per la componente periplasmatica dell'ABC trasportatore del solfato, viene fortemente sovraespresso in presenza di cromato e a sua volta induce la sovraespressione dell'operone *cysTWA*, che codifica le componenti che formano il "core" del trasportatore ABC del solfato. I risultati ottenuti suggeriscono che la cellula risponda al cromato modulando l'espressione del trasportatore del solfato, che rappresenta la via di ingresso del cromato nella cellula: la cellula aumenta i trasportatori del solfato nella membrana e contemporaneamente li rende altamente selettivi verso il solfato, grazie ad un forte incremento della componente periplasmatica Sbp del trasportatore, favorendo l'acquisizione del solfato e limitando quella del cromato. L'analisi dell'influenza di alcune molecole organiche dello zolfo sulla resistenza al Cr(VI) di *P. corrugata* 28 ha permesso di ipotizzare che in presenza di cromato la cellula possa utilizzare tali molecole come fonti di zolfo, inibendo in modo completo o parziale il trasporto del solfato con conseguente blocco completo o parziale dell'ingresso del cromato nella cellula. Lo studio dei meccanismi di resistenza al Cr(VI) in *P. corrugata* 28 ha quindi permesso di chiarire che le molecole organiche dello zolfo possono costituire un importante fattore che influenza la resistenza al Cr(VI) nei batteri e suggerisce la necessità di valutare nella gestione d'interventi di biorisanamento di suoli contaminati da cromato la concentrazione di zolfo organico in essi presenti. I risultati conseguiti nel corso di questa ricerca, oltre ad avere un interesse scientifico di base, forniscono valide informazioni che potranno essere utilizzate per la progettazione di un sistema biologico per il risanamento di ambienti contaminati con Cr(VI).

Capitolo 6

Bibliografia

- Ackerley, D. F., Barak, Y., Lynch, S. V., Curtin, J. & Matin, A., *Effect of chromate stress on Escherichia coli K-12*, «J Bacteriol», 188, 2006, pp. 3371-3381.
- Ackerley, D. F., Gonzalez, C. F., Keyhan, M., Blake, R. & Matin, A., *Mechanism of chromate reduction by the Escherichia coli protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative stress during chromate reduction*. «Environ Microbiol», 6, 2004, pp. 851-860.
- Aertsen, A. & Michiels, C. W., *Upstream of the SOS response: figure out the trigger*, «Trends Microbiol», 14, 2006, pp. 421-423.
- Aertsen, A. & Michiels, C. W., *Stress and how bacteria cope with death and survival*, «Crit Revs Microbiol», 30, 2004, pp. 263-273.
- Alam, M. Z. & Malik, A., *Chromate resistance, transport and bioreduction by Exiguobacterium sp ZM-2 isolated from agricultural soil irrigated with tannery effluent*, J Basic Microbiol, 48, 2008, pp. 416-420.
- Allen, D. A., Austin, B. & Colwell, R.R., *Antibiotic resistance patterns of metal-tolerant bacteria isolated from an estuary*, «Antimicrob Agents Chemother», 12, 1977, pp. 540-542.
- Amrani S., Rizki M., Creus A. & Marcos R., *Genotoxic activity of different chromium compounds in larval cells of Drosophila melanogaster, as measured in the wing spot test*, «Environ Mol Mut», 34, 1999, pp. 47-51.
- Andersen, K. B. & von Meyenburg, K. J., *Charges of nicotinamide adenine nucleotides and adenylate energy charge as regulatory parameters of the metabolism in Escherichia coli*, «J Biol Chem», 252, 1977, pp. 4151-4156.
- Aragão, M. E. F., Jolivet, Y., Silva Lima, M. G., Fernandes de Melo, D. & Dizengramel, P., *NaCl-induced changes of NAD(P) malic enzyme activities in Eucalyptus citriodora leaves*, «Tress», 12, 1997, pp. 66-72.
- Arakawa, H., Ahmad, R., Naoui, M. & Tajmir-Riahi, H. A., *A comparative study of calf thymus DNA binding to Cr(III) and Cr(VI) ions - evidence for the guanine N-7-chromium-phosphate chelate formation*, «J Biol Chem», 275, 2000, pp. 10150-10153.
- Arias, Y. M. & Tebo, B. M., *Cr(VI) reduction by sulfidogenic and nonsulfidogenic microbial consortia*, «Appl Environ Microbiol», 69, 2003, pp. 1847-1853.
- Arillo, A. & Melodia, F., *Effects of hexavalent chromium on trout mitochondria*, «Toxicol Lett», 44, 1988, pp. 71-76.

- Badar, U., Ahmed, N., Beswick, A. J., Pattanapitpaisal, P. & Macaskie, L. E., *Reduction of chromate by microorganisms isolated from metal contaminated sites of Karachi, Pakistan*, «Biotechnol Letts», 22, 2000, pp. 829-836.
- Bader, J. L., Gonzalez, G., Goodell, P. C., Ali, A. S. & Pillai, S. D., *Chromium-resistant bacterial populations from a site heavily contaminated with hexavalent chromium*, «Water Air Soil Poll», 109, 1999, pp. 263-276.
- Ballas, S. K. & Burka, E. R., *Stimulation of lipid synthesis in reticulocytes as a response to membrane damage*, «Blood», 44, 1974, pp. 263-273.
- Bank, T. L., Vishnivetskaya, T. A., Jardine, P. M., Ginder-Vogel, M. A., Fendorf, S. & Baldwin, M. E., *Elucidating biogeochemical reduction of chromate via carbon amendments and soil sterilization*, «Geomicrobiol J», 24, 2007, pp. 125-132.
- Bartlett, R. J., *Chromium cycling in soils and water - links, gaps, and methods*, «Environ Health Perspec», 92, 1991, pp. 17-24.
- Bartlett, R. J. & James, B., *Behavior of chromium in soils: III. Oxidation*, «J Environ Qual», 8, 1979, pp. 31-35.
- Bartlett, R. J. & Kimble, J. M., *Behaviour of chromium in soli: I. Trivalent form*, «J Environ Qual», 5, 1976, pp. 379-382.
- Bellomo, G., Mirabelli, F., Di Monte, D., Richelmi, P., Thor, H., Orrenius, C. & Orrenius, S., *Formation and reduction of glutathione-protein mixed disulfides during oxidative stress. A study with isolates hepatocytes and menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone)*, «Biochem Pharmacol», 36, 1987, pp. 1313-1320.
- Benov, L., Kredich, N. M. & Fridovich, I., *The mechanism of the auxotrophy for sulfur-containing amino acids imposed upon Escherichia coli by superoxide*, «J Biol Chem», 271, 1996, pp. 21037-21040.
- Bériault, R., Chénier, D., Singh, R., Middaugh, J., Mailloux, R. & Appanna, V., *Detection and purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase, malic enzyme and NADP dependent isocitrate dehydrogenase by blu native polyacrilamide gel electrophoresis*, «Electrophoresis», 26, 2005, pp. 2897.
- Bini, C., Casaril, S., & Pavoni, B., *Fertility gain and heavy metal accumulation in plants and soil, studied by means of a compost amended cultivation of Taraxacum officinale*, «Toxicol Environ Chem», 77, 2000, pp. 131-142.
- Bini, C., Maleci, L. & Romanin, A., *The chromium issue in soils of the leather tannery district in Italy*, «J Geochem Explor», 96, 2008, pp. 194-202.
- Biswas, S., Raoult, D. & Rolain, J. M., *A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis*, «Int J Antimicrob Agents», 32, 2008, pp. 207-220.
- Bochner, B. R., *Global phenotypic characterization of bacteria*, «FEMS Microbiol Rev», 33, 2009, pp. 191-205.
- Bochner, B. R., *New technologies to assess genotype-phenotype relationships*, «Nat Rev Genet», 4, 2003, pp. 309-314.
- Bonomo, L. & Sezenna, E., *Criteri per la selezione delle tecnologie*, in L. Bonomo, *Bonifica di siti contaminati*, McGraw Hill, Milano 2005, pp. 630-658.

- Bopp, L. H. & Ehrlich, H. L., *Chromate resistance and reduction in Pseudomonas fluorescens strain LB300*, «Arch Microbiol», 150, 1988, pp. 426-431.
- Borneman, J., Skroch, P. W., O'Sullivan, K. J., Palus, J. A., Rumjanek, N. G., Jansen, J. L., Nienhuis, J. & Triplett, E. W., *Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin*, «Appl Environ Microbiol», 62, 1996, pp. 1935-1943.
- Bose, R. N., Moghaddas, S. & Gelerinter, E., *Long-lived chromium(IV) and chromium(V) metabolites in the chromium(VI) glutathione reaction - NMR, ESR, HPLC, and kinetic characterization*, «Inorg Chem», 31, 1992, pp. 1987-1994.
- Branco, R., Chung, A. P., Johnston, T., Gurel, V., Morais, P. & Zhitkovich, A., *The chromate-inducible chrBACF operon from the transposable element TnOtChr confers resistance to chromium(VI) and superoxide*, «J Bacteriol», 190, 2008, pp. 6996-7003.
- Bridges, R. B., Palumbo, M. P. & Wittenberger, L., *Purification and properties of an NADP-specific 6-phosphogluconate dehydrogenase from Streptococcus faecalis*, «J Biol Chem», 250, 1975, pp. 6093-6100.
- Bridgewater, L. C., Manning, F. C. & Patierno, S. R., *Base-specific arrest of in vitro DNA replication by carcinogenic chromium: relationship to DNA interstrand crosslinking*, «Carcinogenesis», 15, 1994, pp. 2421-2427.
- Brim, H., Heuer, H., Krogerrecklenfort, E., Mergeay, M. & Smalla, K., *Characterization of the bacterial community of a zinc-polluted soil*, «Can J Microbiol», 45, 1999, pp. 326-338.
- Brookes, P. C., *The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals*, «Biol Fertl Soils», 19, 1995, pp. 269-279.
- Brown, I. F. & Sister, H. D., *Mechanisms of fungitoxic action of n-dodecylguanidine acetate*, «Phytopathology», 50, 1960, pp.830-839.
- Brown, S. D., Martin, M., Deshpande, S., Seal, S., Huang, K., Alm, E., Yang, Y., Wu, L., Yan, T., Liu, X., Arkin, A., Chourey, K., Zhou, J. & Thompson, D. K., *Cellular response of Shewanella oneidensis to strontium stress*, «Appl Environ Microbiol», 72, 2006a, pp. 890-900.
- Brown, S. D., Thompson, M. R., Verberkmoes, N. C., Chourey, K., Shah, M., Zhou, J., Hettich, R. L. & Thompson, D. K., *Molecular dynamics of the Shewanella oneidensis response to chromate stress*, «Mol Cell Proteomics», 5, 2006b, pp. 1054-1071.
- Burke, T., Fagliano, J., Goldoft, M., Hazen, R. E., Iglewicz, R. & Mckee, T., *Chromite ore processing residue in Hudson County, New-Jersey*, «Environ Health Perspec», 92, 1991, pp. 131-137.
- Buttner, B. & Beyersmann, D., *Modification of the erythrocyte anion carrier by chromate*, «Xenobiota», 15, 1985, pp. 735-741.
- Cabral, J. P., *Damage to the cytoplasmic membrane and cell-death caused by dodine (dodecylguanidine monoacetate) in Pseudomonas syringae ATCC 12271*, «Antimicrob Agents Chemother», 35, 1991, pp. 341-344.
- Cabral, J. P., *Dodecylguanidine monoacetate (dodine) causes severe membrane damage in Pseudomonas syringae above the critical micelle concentration*, «J Basic Microbiol», 33, 1993, pp. 219-225.
- Camargo, F. A., Bento, F. M., Okeke, B. C. & Frankenberger, W. T., *Chromate reduction by chromium-resistant bacteria isolated from soils contaminated with dichromate*, «J Environ Qual», 32, 2003, pp. 1228-1233.

- Carey, P. L., McLaren, R. G., Cameron, K. C. & Sedcole, J. R., *Leaching of copper, chromium, and arsenic through some free-draining New Zealand soils*, «Aust J Soil Res», 34, 1996, pp. 583-597.
- Carmel-Harel, O. & Storz, G., *Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae responses to oxidative stress*. «Ann Rev Microbol», 54, 2000, pp. 439-461.
- Casati, P. & Andreo, C. S., *UV-B and UV-C induction of NADP-malic enzyme in tissues of different cultivars of Phaseolus vulgaris (bean)*, «Plant Cell Environ», 24, 2001, pp. 621-630.
- Cervantes, C., Campos-Garcia, J., Devars, S., Gutierrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzman, J. C. & Moreno-Sanchez, R., *Interactions of chromium with microorganisms and plants*, «FEMS Microbiol Rev», 25, 2001, pp. 335-347.
- Cervantes, C., Ohtake, H., Chu, L., Misra, T. K. & Silver, S., *Cloning, nucleotide-sequence, and expression of the chromate resistance determinant of Pseudomonas aeruginosa plasmid pUM505*, «J Bacteriol», 172, 1990, pp. 287-291.
- Chandra, P., Sinha, S. & Rai, U. N. (1999). *Bioremediation of Cr from water and soil by vascular aquatic plants*. In E. L. Kruger, T. A. Anderson & J. R. Coats (Eds) *Phytoremediation of soil and water contaminants* (pp. 274-282). Washington, DC: American Chemical Society.
- Chardin, B., Giudici-Ortoni, M. T., De Luca, G., Guigliarelli, B. & Bruschi, M., *Hydrogenases in sulfate-reducing bacteria function as chromium reductase*, «Appl Microbiol Biotechnol», 63, 2003, pp. 315-321.
- Chen, J. H. & Hao, O. J., *Microbial chromium (VI) reduction*, «Cri Rev Environ Sci Tech», 28, 1998, pp. 219-251.
- Chen, Z. C., Yang, H. J. & Pavletich, N. P., *Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures*, «Nature», 453, 2008, pp. 489-493.
- Cheung, K. H., Lai, H. Y. & Gu, J. D., *Membrane-associated hexavalent chromium reductase of Bacillus megaterium TKW3 with induced expression*, «J Microbiol Biotechnol», 16, 2006, pp. 855-862.
- Chourey, K., Thompson, M. R., Morrell-Falvey, J., Verberkmoes, N. C., Brown, S. D., Shah, M., Zhou, J., Doktycz, M., Hettich, R. L. & Thompson, D. K., *Global molecular and morphological effects of 24-hour chromium(VI) exposure on Shewanella oneidensis MR-1*, «Appl Environl Microbiol», 72, 2006, pp. 6331-6344.
- Chourey, K., Wei, W., Wan, X. F. & Thompson, D. K., *Transcriptome analysis reveals response regulator SO2426-mediated gene expression in Shewanella oneidensis MR-1 under chromate challenge*, «BMC Genom», 9, 2008.
- Cohen, M. D., Kargacin, B., Klein, C. B. & Costa, M., *Mechanisms of chromium carcinogenicity and toxicity*, «Crit Rev Toxicol», 23, 1993, pp. 255-281.
- Coudray, C., Faure, P., Rachidi S., Jeunet, A., Richard, M. J., Roussel, A. M. & Favier, A., *Hydroxyl radical formation and lipid peroxidation enhancement by chromium. In vitro study*, «Biol Trace Elem Res», 32, 2009, pp. 161-179.
- Coulthurst, S. J., Lilley, K. S., Hedley, P. E., Liu, H., Toth, I. K. & Salmond, G. P. C., *DsbA plays a critical and multifaceted role in the production of secreted virulence factors by the phyto-*

- pathogen *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica*, «J Biol Chem», 283, 2008, pp. 23739-23753.
- Cox, M. M., Goodman, M. F., Kreuzer, K. N., Sherratt, D. J., Sandler, S. J. & Marians, K. J., *The importance of repairing stalled replication forks*, «Nature», 404, 2000, pp. 37-41.
- Czako-Ver, K., Batie, M., Raspor, P., Sipiczki, M. & Pesti, M., *Hexavalent chromium uptake by sensitive and tolerant mutants of *Schizosaccharomyces pombe**, «FEMS Microbiol Lett», 178, 1999, pp. 109-115.
- Dagley, S. & Trudgill, P. W., *The metabolism of galactarate, γ -glucarate and various pentoses by species of *Pseudomonas**, «Biochem J», 95, 1965, pp. 48-58.
- De Flora, S. & Wetterhahn, K. E., *Mechanism of chromium metabolism and genotoxicity*, «Life Chem Rep», 7, 1989, pp. 169-244.
- Deleo, P. C. & Ehrlich, H. L., *Reduction of hexavalent chromium by *Pseudomonas fluorescens* LB300 in batch and continuous cultures*, «Appl Microbiol and Biotechnol », 40, 1994, pp. 756-759.
- Diaz-Perez, C., Cervantes, C., Campos-Garcia, J., Julian-Sanchez, A. & Riveros-Rosas, H., *Phylogenetic analysis of the chromate ion transporter (CHR) superfamily*, «FEBS J», 274, 2007, pp. 6215-6227.
- Diaz-Ravina, M. & Baath, E., *Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels*, «Appl Environ Microbiol», 62, 1996, pp. 2970-2977.
- Dillon, C. T., Lay, P. A., Cholewa, M., Legge, G. J. F., Bonin, A. M., Collins, T. J., Kostka, K. L. & Shea-McCarthy, G., *Microprobe X-ray absorption spectroscopic determination of the oxidation state of intracellular chromium following exposure of V79 Chinese hamster lung cells to genotoxic chromium complexes*, «Chem Res Toxicol», 10, 1997, pp. 533-535.
- Dixit, V., Pandey, V. & Shyam, R., *Chromium ions inactivate electron transport and enhance superoxide generation in vivo in pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) root mitochondria*, «Plant Cell Environ», 25, 2002, pp. 687-693.
- Duncan, P. A., White, B. A. & Mackie, R. I., *Purification and properties of NADP-dependent glutamate dehydrogenase from *Ruminococcus flavefaciens* FD-1*, «Appl Environ Microbiol», 58, 1992, pp. 4032-4037.
- Dwyer, D. J., Kohanski, M. A., Hayete, B. & Collins, J. J., *Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli**, «Mol Syst Biol», 3, 2007, pp. 91.
- Ejiri, S. I., Weissbach, H. & Brot, N., *Reduction of methionine sulfoxide to methionine by *Escherichia coli**, «J Bacteriol», 139, 1979, pp. 161-164.
- Endoh, T., Habe, H., Nojiri, H., Yamane, H. & Omori, T., *The sigma(54)-dependent transcriptional activator SfnR regulates the expression of the *Pseudomonas putida* sfnFG operon responsible for dimethyl sulphone utilization*, «Mol Microbiol», 55, 2005, pp. 897-911.
- Fahey, R. C., *Novel thiols of prokaryotes*, «Ann Rev Microbiol», 55, 2001, pp. 333-356.
- Faisal, M. & Hasnain, S., *Comparative study of Cr(VI) uptake and reduction in industrial effluent by *Ochrobactrum intermedium* and *Brevibacterium* sp.*, «Biotechnol Lett», 26, 2004, pp. 1623-1628.

- Fendorf, S., Wielinga, B. W. & Hansel, C. M., *Chromium transformations in natural environments: The role of biological and abiological processes in chromium(VI) reduction*, «Int Geol Rev», 42, 2000, pp. 691-701.
- Francis, C. A., Obraztsova, A. Y. & Tebo, B. M., *Dissimilatory metal reduction by the facultative anaerobe Pantoea agglomerans SP1*, «Appl Environ Microbiol», 66, 2000, pp. 543-548.
- Francisco, R., Alpoim, M. C. & Morais, P. V., *Diversity of chromium-resistant and -reducing bacteria in a chromium-contaminated activated sludge*, «J Appl Microbiol», 92, 2002, pp. 837-843.
- Fulladosa, E., Desjardin, V., Murat, J. C., Gourdon, R. & Villaescusa, I., *Cr(VI) reduction into Cr(III) as a mechanism to explain the low sensitivity of Vibrio fischeri bioassay to detect chromium pollution*, «Chemosphere», 65, 2006, pp. 644-650.
- Gadd, G. M., *Metals and microorganisms - A problem of definition*, «FEMS Microbiol Lett», 100, 1992a, pp. 197-203.
- Gadd, G. M., *Microbial control of heavy metal pollution*, in J. C. Fry, G. M. Gadd, R. A. Herbert, C. W. Jones & I. A. Watson-Craik, *Microbial control of pollution*, Cambridge University Press, Cambridge 1992b, pp. 59-88.
- Gadd, G. M. & Griffiths, A. J., *Microorganisms and heavy metals toxicity*, «Microb Ecol», 9, 1978, pp. 133-141.
- Ganguli, A. & Tripathi, A. K., *Survival and chromate reducing ability of Pseudomonas aeruginosa in industrial effluents*, «Lett Appl Microbiol», 28, 1999, pp. 76-80.
- Gans, J., Wolinsky, M. & Dunbar, J., *Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil*, «Science», 309, 2005, pp. 1387-1390.
- Gibb, H. J., Lees, P. S., Pinsky, P. F. & Rooney, B. C., *Lung cancer among workers in chromium chemical production*, «Am J In Med», 38, 2000, pp. 115-126.
- Goss, W. A., Deitz, W. H. & Cook, T. M., *Mechanism of action of nalidixic acid on Escherichia coli.II. Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis*, «J Bacteriol», 89, 1965, pp. 1068-1074.
- Goulhen, F., Gloter, A., Gouyot, F. & Bruschi, M., *Cr(VI) detoxification by Desulfovibrio vulgaris strain Hildenborough: microbe-metal interactions studies*, «Appl Microbiol Biotechnol», 71, 2006, pp. 897.
- Gupta, A. K. & Sinha, S., *Chromium levels in vegetables and grains grown on tannery effluent irrigated area of Jajmau, Kanpur, India: influence on dietary intake*, «Bull Environ Contam Toxicol», 77, 2006, pp. 658-664.
- Han, X., Wong, Y. S. & Tam, N. F. Y., *Surface complexation mechanism and modeling in Cr(III) biosorption by a microalgal isolate, Chlorella miniata*, «J Coll Interf Sci», 303, 2006, pp. 365-371.
- He, Z., Gao, F., Sha, T., Hu, Y. & He, C., *Isolation and characterization of a Cr(VI)-reduction Ochrobactrum sp. strain CSCr-3 from chromium landfill*, «J Hazard Mat», 163, 2009, pp. 869-873.
- Helbig, K., Bleuel, C., Krauss, G. J. & Nies, D. H., *Glutathione and transition-metal homeostasis in Escherichia coli*, «J Bacteriol», 190, 2008, pp. 5431-5438.
- Higgins, T. E., Halloran, A. R. & Petura, J. C., *Traditional and innovative treatment methods for Cr(VI) in soil*, «J Soil Cont», 6, 1997, pp. 767-797.

- Hirsch, J. & Dosedogru, S., *The antistaphylococcal effect of penicillin streptomycin and 5,7-dochloro-8-hydroxyquinaldine (Sterosan) in vitro*, «Arch Biochem», 14, 1947, pp. 213-227.
- Homann, O. R., Cai, H., Becker, J. M. & Lindquist, S. L., *Harnessing natural diversity to probe metabolic pathways*, «PLoS Gen», 1, 2005, pp. 715-718.
- Hryniewicz, M., Sirko, A., Palucha, A., Bock, A. & Hulanicka, D., *Sulfate and thiosulfate transport in Escherichia coli K-12 - identification of a gene encoding a novel protein involved in thiosulfate binding*, «J Bacteriol», 172, 1990, pp. 3358-3366.
- Hu, P., Brodie, E. L., Suzuki, Y., McAdams, H. H. & Andersen, G. L., *Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in Caulobacter crescentus*, «J Bacteriol», 187, 2005, pp. 8437-8449.
- Hult, K., Veide, A. & Gatenbeck, S., *The distribution of NADPH regenerating mannitol cycle among fungal species*, «Arch Microbiol», 128, 1980, pp. 253-255.
- Ipsilantis, I. & Coyne, M. S., *Soil microbial community response to hexavalent chromium in planted and unplanted soil*, «J Environ Qual», 36, 2007, pp. 638-645.
- Jacobson, B. L., He, J. J., Vermersch, P. S., Lemon, D. D. & Quioco, F. A., *Engineered inter-domain disulfide in the periplasmic receptor for sulfate transport reduces flexibility - site-directed mutagenesis and ligand-binding studies*, «J Biol Chem», 266, 1991, pp. 5220-5225.
- James, B. R., Pretura, J. C., Vitale, R. J. & Gorge, R. M., *Oxidation-reduction chemistry of chromium: relevance to the regulation and remediation of chromate-contaminated soils*, «J Soil Cont», 6, 1997, pp. 569-580.
- Jeyasingh, J. & Philip, L., *Bioremediation of chromium contaminated soil: optimization of operating parameters under laboratory conditions*, «J Hazard Mater», 118, 2005, pp. 113-120.
- Jing, Y. D., He, Z. L. & Yang, X. E., *Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils*, «J Zhejiang Univ SCI B», 8, 2007, pp. 192-207.
- Johannes, J., Bluschke, A., Jehmlich, N., von Bergen, M. & Boll, M., *Purification and characterization of active-site components of the putative p-cresol methylhydroxylase membrane complex from Geobacter metallireducens*, «J Bacteriol», 190, 2008, pp. 6493-6500.
- Johansen, C., Verheul, A., Gram, L., Gill, T. & Abee, T., *Protamine-induced permeabilization of cell envelopes of Gram-positive and Gram-negative bacteria*, «Appl Environ Microbiol», 63, 1997, pp. 1155-1159.
- Johnson, D. A., Tetu, S. G., Phillippy, K., Chen, J., Ren, Q. H. & Paulsen, I. T., *High-throughput phenotypic characterization of Pseudomonas aeruginosa membrane transport genes*, «PLoS Gen», 4, 2008.
- Kahnert, A., Vermeij, P., Wietek, C., James, P., Leisinger, T. & Kertesz, M. A., *The ssu locus plays a key role in organosulfur metabolism in Pseudomonas putida S-313*, «J Bacteriol», 182, 2000, pp. 2869-2878.
- Kalabegishvili, T. L., Tsibakhashvili, N. Y. & Holman, H. Y. N., *Electron spin resonance study of chromium(V) formation and decomposition by basalt-inhabiting bacteria*, «Environ Sci Technol», 37, 2003, pp. 4678-4684.
- Kamaludeen, S. P., Megharaj, M., Juhasz, A. L., Sethunathan, N. & Naidu, R., *Chromium-microorganism interactions in soils: remediation implications*, «Rev Environ Contam Toxicol», 178, 2003, pp. 93-164.

- Kertesz, M. A., *Riding the sulfur cycle - metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria*, «FEMS Microb Rev», 24, 2000, pp. 135-175.
- Kertesz, M. A., *Bacterial transporters for sulfate and organosulfur compounds*, «Res Microbiol», 152, 2001, pp. 279-290.
- Kim, K., Lee, S. J., Lee, K. H. & Lim, D. B., *Isolation and characterization of toluene-sensitive mutants from the toluene-resistant bacterium Pseudomonas putida GM73*, «J Bacteriol», 180, 1998, pp. 3692-3696.
- Kirkman, H. N., Galiano, S. & Gaetani, G. F., *The function of catalase-bound NADPH*, «J Biol Chem», 262, 1987, pp. 660-666.
- Köster, A. & Beyersmann, D., *Chromium binding by calf thymus nuclei and effects on chromatin*, «Toxicol Environ Chem», 10, 1985, pp. 307-313.
- Kotas, J. & Stasicka, Z., *Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation*, «Environ Poll», 107, 2000, pp. 263-283.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M. & Peterson, K. M., *Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector PBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes*, «Gene», 166, 1995, pp. 175-176.
- Kovacic, P. & Osuna, J. A., *Mechanisms of anti-cancer agents. Emphasis on oxidative stress and electron transfer*, «Curr Pharm Dess», 6, 2000, pp. 277-309.
- Kwak, Y. H., Lee, D. S. & Kim, H. B., *Vibrio harveyi nitroreductase is also a chromate reductase*, «Appl Environ Microbiol», 69, 2003, pp. 4390-4395.
- Lane, D. J., *16S/23S rRNA sequencing*, in E. Stackebrandt & Goodfellow, M., *Nucleic acid techniques in bacteria systematic*, John Wiley & Sons, Chichester, UK 1991, pp. 115-175.
- Langard, S., *One hundred years of chromium and cancer: a review of epidemiological evidence and selected case reports*, «Am J Ind Med», 17, 1990, pp. 189-215.
- Laxman, R. S. & More, S., *Reduction of hexavalent chromium by Streptomyces griseus*, «Min Eng», 15, 2002, pp. 831-837.
- Lay, P. A. & Levina, A., *Activation of molecular oxygen during the reactions of chromium(VI/V/IV) with biological reductants: implications for chromium-induced genotoxicities*, «J Am Chem Soc», 120, 1998, pp. 6704-6714.
- Layer, G., Gaddam, S. A., yala-Castro, C. N., Choudens, S. O., Lascoux, D., Fontecave, M. & Outten, F. W., *SufE transfers sulfur from SufS to SufB for iron-sulfur cluster assembly*, «J Biol Chem», 282, 2007, pp. 13342-13350.
- Lerondel, G., Doan, T., Zamboni, N., Sauer, U. & Aymerich, S., *YtsJ has the major physiological role of the four paralogous malic enzyme isoforms in Bacillus subtilis*, «J Bacteriol», 188, 2006, pp. 4727-4736.
- Li, M., Huang, W., Yang, Q., Liu, X. G. & Wu, Q. Y., *Expression and oxidative stress tolerance studies of glutaredoxin from cyanobacterium Synechocystis sp PCC 6803 in Escherichia coli*, «Prot Expr Pur», 42, 2005, pp. 85-91.
- Lighthart, B., *Enrichment of cadmium-mediated antibiotic-resistant bacteria in a Douglas-fir (Pseudotsuga menziesii) litter microcosm*, «Appl Environ Microbiol», 37, 1979, pp. 849-853.
- Llagostera, M., Gariddo, S., Guerrero, R. & Barbé, J., *Induction of SOS genes of Escherichia coli by chromium compounds*, «Environ Mutagen», 8, 1986, pp. 571-577.

- Loh, K. D., Gyaneshwar, P., Papadimitriou, E. M., Fong, R., Kim, K. S., Parales, R., Zhou, Z. R., Inwood, W. & Kustu, S., *A previously undescribed pathway for pyrimidine catabolism*, «Proc Natl Acad Sci U S A», 103, 2006, pp. 5114-5119.
- Losi, M. E., Amrhein, C. & Frankenberger, W. T., *Bioremediation of chromate-contaminated groundwater by reduction and rrecipitation in surface soils*, «J Environ Qual», 23, 1994a, pp. 1141-1150.
- Losi, M. E., Amrhein, C. & Frankenberger, W. T., *Factors affecting chemical and biological reduction of hexavalent chromium in soil*, «Envir Toxicol Chem», 13, 1994b, pp. 1727-1735.
- Lovley, D. R. & Coates, J. D., *Bioremediation of metal contamination*, «Curr Opin Biotechnol», 8, 1997, pp. 285-289.
- Luli, G. W., Talnagi, J. W., Strohl, W. R. & Pfister, R. M., *Hexavalent chromium-resistant bacteria isolated from river sediments*, «Appl Environ Microbiol», 46, 1983, pp. 846-854.
- Ma, Y. F., Wu, J. F., Wang, S. Y., Jang, C. Y., Zhang, Y., Qi, S. W., Liu, L., Zhao, G. P. & Liu, S. J., *Nucleotide sequence of plasmid pCNB1 from Comamonas strain CNB-1 reveals novel genetic organization and evolution for 4-chloronitrobenzene degradation*, «Appl Environ Microbiol», 73, 2007, pp. 4477-4483.
- Marino, D., Gonzalez, E. M., Frendo, P., Puppo, A. & Arrese-Igor, C., *NADPH recycling systems in oxidative stressed pea nodules: a key role for the NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase*, «Planta», 225, 2007, pp. 413-421.
- Matin, A., Little, C. D., Fraley, C. D. & Keyhan, M., *Use of starvation promoters to limit growth and selectively enrich expression of trichloroethylene- and phenol-transforming activity in recombinant Escherichia coli*, «Appl Environ Microbiol», 61, 1995, pp. 3323-3328.
- Maurer, L. M., Yohannes, E., Bondurant, S. S., Radmacher, M. & Slonczewski, J. L., *pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in Escherichia coli K-12*, «J Bacteriol», 187, 2005, pp. 304-319.
- McCarty, P. L., *Scientific limits to remediation of contaminated soils and ground water*, in S. D. David, W. Meling & A. Hall, *Ground water and soil contamination remediation*, National Academy Press, Washington D. C. 1990, pp. 38-52.
- McGlynn, P. & Lloyd, R. G., *Rescue of stalled replication forks by RecG: simultaneous translocation on the leading and lagging strand templates supports an active DNA unwinding model of fork reversal and Holliday junction formation*, «Proc Natl Acad Sci U S A», 98, 2001, pp. 8227-8234.
- Mc Grath, *Chromium and nichel*, in B. J. Alloway, *Heavy metals in soil*, Blackie Academic & Professional, London 1995.
- McLean, J. & Beveridge, T. J., *Chromate reduction by a Pseudomonas isolated from a site contaminated with chromate and copper arsenate*, «Appl Environ Microbiol», 67, 2001, pp. 1076-1084.
- Messer, J., Reynolds, M., Stoddard, L. & Zhitkovich, A., *Causes of DNA single-strand breaks during reduction of chromate by glutathione in vitro and in cells*, «Free Rad Biol Med», 40, 2006, pp. 1981-1992.
- Michel, C., Brugna, M., Aubert, C., Bernadac, A. & Bruschi, M., *Enzymatic reduction of chromate: comparative studies using sulfate reducing bacteria - Key role of polyheme cytochromes c and hydrogenases*, «Appl Microbiol Biotechnol», 55, 2001, pp. 95-100.

- Middleton, S. S., Latmani, R. B., Mackey, M. R., Ellisman, M. H., Tebo, B. M. & Criddle, C. S., *Cometabolism of Cr(VI) by Shewanella oneidensis MR-1 produces cell-associated reduced chromium and inhibits growth*, «Biotechnol Bioengin», 83, 2003, pp. 627-637.
- Mingeot-Leclercq, M., Glupczynski, Y. & Tulkens, P. M., *Aminoglycosides: activity and resistance*, «Antimicrob Agents Chemother», 43, 1999, pp. 737.
- Mini, A., *Studio degli effetti del cromato sulla comunità batterica del suolo e dei meccanismi coinvolti nella cromato resistenza dei batteri*, «Tesi di Dottorato in Scienza del Suolo e Climatologia», 2004.
- Miranda, A. T., Gonzalez, M. V., Gonzalez, G., Vargas, E., Campos-Garcia, J. & Cervantes, C., *Involvement of DNA helicases in chromate resistance by Pseudomonas aeruginosa PAO1*, «Mutat Res», 578, 2005, pp. 202-209.
- Mostertz, J., Hochgrafe, F., Jurgen, B., Schweder, T. & Hecker, M., *The role of thioredoxin TrxA in Bacillus subtilis: a proteomics and transcriptomics approach*, «Proteomics», 8, 2008, pp. 2676-2690.
- Mostertz, J., Scharf, C., Hecker, M. & Homuth, G., *Transcriptome and proteome analysis of Bacillus subtilis gene expression in response to superoxide and peroxide stress*, «Microbiol-ogy», 150, 2004, pp. 497-512.
- Mustacich, D. & Powis, G., *Thioredoxin reductase*, «Biochem J», 346 Pt 1, 2000, pp. 1-8.
- Myers, C. R., Carstens, B. P., Antholine, W. E. & Myers, J. M., *Chromium(VI) reductase activity is associated with the cytoplasmic membrane of anaerobically grown Shewanella putrefaciens MR-1*, «J Appl Microbiol», 88, 2000, pp. 98-106.
- Nies D. H., *Microbial heavy metal resistance*, «Appl Microbiol Biotechnol», 51, 1999, pp. 730-750.
- Nies, A., Nies, D. H. & Silver, S., *Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from Alcaligenes eutrophus*, «J Biol Chem», 265, 1990, pp. 5648-5653.
- Niga, T., Yoshida, H., Hattori, H., Nakamura, S. & Ito, H., *Cloning and sequencing of a novel gene (recG) that affects the quinolone susceptibility of Staphylococcus aureus*, «Antimicrob Agents Chemother», 41, 1997, pp. 1770-1774.
- Nizet, V., *Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens*, «Curr Issue Mol Biol», 8, 2006, pp. 11-26.
- Opperman, D. J., Piater, L. A. & van Heerden, E., *A novel chromate reductase from Thermus scotoductus SA-01 related to old yellow enzyme*, «J Bacteriol», 190, 2008, pp. 3076-3082.
- Ortega, R., Fayard, B., Salome, M., Deves, G. & Susini, J., *Chromium oxidation state imaging in mammalian cells exposed in vitro to soluble or particulate chromate compounds*, «Chem Res Toxicol», 18, 2005, pp. 1512-1519.
- Ozturk, S. & Aslim, B., *Relationship between chromium(VI) resistance and extracellular polymeric substances (EPS) concentration by some cyanobacterial isolates*, «Environl Sci Poll Res», 15, 2008, pp. 478-480.
- Pal, A. & Paul, A. K., *Aerobic chromate reduction by chromium-resistant bacteria isolated from serpentine soil*, «Microbiol Res», 159, 2004, pp. 347-354.

- Park, C. H., Keyhan, M., Wielinga, B., Fendorf, S. & Matin, A., *Purification to homogeneity and characterization of a novel Pseudomonas putida chromate reductase*, «Appl Environ Microbiol», 66, 2000, pp. 1788-1795.
- Peitzsch, N., Eberz, G. & Nies, D. H., *Alcaligenes eutrophus as a bacterial chromate sensor*, «Appl Environ Microbiol», 64, 1998, pp. 453-458.
- Petrilli F.L. & De Flora S., *Toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium compounds in Salmonella thyphimurium*, «Appl Environ Microbiol», 33, 1977, pp. 805-809.
- Pettine, M., Barra, I., Campanella, L. & Millero, F. J., *Effect of metals on the reduction of chromium (VI) with hydrogen sulfide*, «Wat Res», 32, 1998, pp. 2807-2813.
- Pettine, M., Millero, F. J. & Passino, R., *Reduction of chromium(VI) with Hydrogen-Sulfide in NaCl Media*, «Mar Chem», 46, 1994, pp. 335-344.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L., *Relative expression software tool (REST (c)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*, «Nucl Acids Res», 30, 2002.
- Pinto, R., Tang, Q. X., Britton, W. J., Leyh, T. S. & Triccas, J. A., *The Mycobacterium tuberculosis cysD and cysNC genes form a stress-induced operon that encodes a tri-functional sulfate-activating complex*, «Microbiology», 150, 2004, pp. 1681-1686.
- Plaper, A., Jenko-Brinovec, S., Premzl, A., Kos, J. & Raspor, P., *Genotoxicity of trivalent chromium in bacterial cells. Possible effects on DNA topology*, «Chem Res Toxicol», 15, 2002, pp. 943-949.
- Pollak, N., Dolle, C. & Ziegler, M., *The power to reduce: pyridine nucleotides-small molecules with a multitude of functions*, «Biochem J», 402, 2007, pp. 205-218.
- Quan, J. A., Schneider, B. L., Paulsen, I. T., Yamada, M., Kredich, N. M. & Saier, M. H., *Regulation of carbon utilization by sulfur availability in Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, «Microbiology», 148, 2002, pp. 123-131.
- Quintelas, C., Femandes, B., Castro, J., Figueiredo, H. & Tavares, T., *Biosorption of Cr(VI) by a Bacillus coagulans biofilm supported on granular activated carbon (GAC)*, «Chem Eng J», 136, 2008, pp. 195-203.
- Rai D., Eary, L. E., Zachara & J.M., *Environmental chemistry of chromium*, «Sci tot environ», 1989, pp. 15-23.
- Ramirez-Diaz, M. I., Diaz-Perez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-Garcia, J. & Cervantes, C., *Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds*, «Biomaterials», 21, 2008, pp. 321-332.
- Ranalli, G., Colangelo, M., Maddoni, F., Salzano, G. & Sorlini, C., *Studi sulla biodiversità della microflora dei suoli mediante tecniche microbiologiche, biochimico-enzimatiche, bioelettriche e genetiche innovative*, in P. L. Manachini, M. G. Fortina & C. Parini, *Biodiversità microbica. Aspetti tassonomici, biotecnologici e metodologici*, CNR-RAISA, Roma 1996, pp. 89-92.
- Ranjard, L., Nazaret, S., Gourbière, F., Thioulouse, J., Linet, P. & Richaume, A., *A soil micro-scale study to reveal the heterogeneity of Hg(II) impact on indigenous bacteria by quantification of adapted phenotypes and analysis of community DNA fingerprints*, «FEMS Microbiol Ecol», 31, 2000, pp. 107-115.

- Reddy, K. R., Chinthamreddy, S., Saichek, R. E. & Cutright, T. J., *Nutrient amendment for the bioremediation of a chromium-contaminated soil by electrokinetics*, «Energy Sources», 25, 2003, pp. 931-943.
- Revati Wani, K., Odam, K. M., Gawai, K. R. & Dhakephalkar, P. K., *Chromate reduction by Burkholderia cepacia MCMB-821 isolated from pristine habitata of alkaline crater lake*, «Appl Microbiol Biotechnol», 175, 2007, pp. 627-632.
- Revilla, E., Fabregat, I., Santa, M. C. & Machado, A., *The NADPH-producing pathways (pentose phosphate and malic enzyme) are regulated by the NADPH consumption in rat mammary gland*, «Biochem Int», 14, 1987, pp. 957-962.
- Reynolds, M., Stoddard, L., Bepalov, I. & Zhitkovich, A., *Ascorbate acts as a highly potent inducer of chromate mutagenesis and clastogenesis: linkage to DNA breaks in G(2) phase by mismatch repair*, «Nucl Acids Res», 35, 2007, pp. 465-476.
- Reynolds, M. & Zhitkovich, A., *Cellular vitamin C increases chromate toxicity via a death program requiring mismatch repair but not p53*, «Carcinogenesis», 28, 2007, pp. 1613-1620.
- Richards, J. W., Krumholz, G. D., Chval, M. S. & Tisa, L. S., *Heavy metal resistance patterns of Frankia strains*, «Appl Environ Microbiol», 68, 2002, pp. 923-927.
- Rivera, S. L., Vargas, E., Ramirez-Diaz, M. I., Campos-Garcia, J. & Cervantes, C., *Genes related to chromate resistance by Pseudomonas aeruginosa PAO1*, «Antonie Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol», 94, 2008, pp. 299-305.
- Roundhill, D. M. & Koch, H. F., *Methods and techniques for the selective extraction and recovery of oxoanions*, «Chem Soc Rev», 31, 2002, pp. 60-67.
- Salnikow, K. & Zhitkovich, A., *Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: Nickel, arsenic, and chromium*, «Chem Res Toxicol», 21, 2008, pp. 28-44.
- Salunkhe, P., Topfer, T., Buer, J. & Tummeler, B., *Genome-wide transcriptional profiling of the steady-state response of Pseudomonas aeruginosa to hydrogen peroxide*, «J Bacteriol», 187, 2005, pp. 2565-2572.
- Salunkhe, P. B., Dhakephalkar, P. K. & Paknikar, K. M., *Bioremediation of hexavalent chromium in soil microcosms*, «Biotechnol Lett», 20, 1998, pp. 749-751.
- Sani, R. K., Peyton, B. M., Smith, W. A., Apel, W. A. & Petersen, J. N., *Dissimilatory reduction of Cr(VI), Fe(III), and U(VI) by Cellulomonas isolates*, «Appl Microbiol Biotechnol», 60, 2002, pp. 192-199.
- Sass, B. M. & Ray, D., *Solubility of amorphous chromium(III)-iron(III) hydroxide solid solutions*, «Inorg Chem», 26, 1987, pp. 2228-2232.
- Sauer, J. D., Bachman, M. A. & Swanson, M. S., *The phagosomal transporter A couples threonine acquisition to differentiation and replication of Legionella pneumophila in macrophages*, «Proc Nat Acad Sci USA», 102, 2005, pp. 9924-9929.
- Scocianti, V., Iacobucci, M., Paoletti, M. F., Fraternali, A. & Speranza, A., *Species-dependent chromium accumulation, lipid peroxidation, and glutathione levels in germinating kiwifruit pollen under Cr(III) and Cr(VI) stress*, «Chemosphere», 73, 2008, pp. 1042-1048.
- Sedlak, D. L. & Chan, P. G., *Reduction of hexavalent chromium by ferrous iron*, «Geochim Cosmochim Acta», 61, 1997, pp. 2185-2192.

- Shakoori, A. R., Makhdoom, M. & Haq, R. U., *Hexavalent chromium reduction by a dichromate-resistant Gram-positive bacterium isolated from effluents of tanneries*, «Appl Microbiol Biotechnol», 53, 2000, pp. 348-351.
- Shi, W., Becker, J., Bischoff, M., Turco, R. F. & Konopka, A. E., *Association of microbial community composition and activity with lead, chromium, and hydrocarbon contamination*, «Appl Environ Microbiol», 68, 2002, pp. 3859-3866.
- Silver, S. & Phung, L. T., *Bacterial heavy metal resistance: new surprises*, «Ann Rev Microbiol», 50, 1996, pp. 753-789.
- Singh, R., Lemire, J., Mailloux, R. J. & Appanna, V. D., *A novel strategy involved anti-oxidative defense: the conversion of NADH into NADPH by a metabolic network*, «PLoS ONE», 3, 2008, pp. 2682.
- Singh, R., Mailloux, R. J., Puisseux-Dao, S. & Appanna, V. D., *Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased NADPH synthesis and decreased NADH production in Pseudomonas fluorescens*, «J Bacteriol», 189, 2007, pp. 6665-6675.
- Sinha, S., Saxena, R. & Singh, S., *Chromium induced lipid peroxidation in the plants of Pistia stratiotes L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes*, «Chemosphere», 58, 2005, pp. 595-604.
- Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., Van, L. A. & Vangronsveld, J., *Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in Phaseolus vulgaris after Cd application*, «Plant Physiol Biochem», 43, 2005, pp. 437-444.
- Smith, B. T. & Walker, G. C., *Mutagenesis and more: umuDC and the Escherichia coli SOS response*, «Genetics», 148, 1998, pp. 1599-1610.
- Smith, W. A., Apel, W. A., Petersen, J. N. & Peyton, B. M., *Effect of carbon and energy source on bacterial chromate reduction*, «Biorem J», 6, 2002, pp. 205-215.
- Snow, E. T. & Xu, L. S., *Chromium(III) bound to DNA-templates enhances DNA polymerase processivity during replication in vitro*, «Biochemistry», 30, 1991, pp. 11238-11245.
- Soderberg, T., *Biosynthesis of ribose-5-phosphate and erythrose-4-phosphate in archaea: a phylogenetic analysis of archaeal genomes*, «Archea», 1, 2005, pp. 347-352.
- Sokolov, V., I. I. & Kulczycka, *The possibility of recycling flur dust of the ferrochromium productions in Kazakhstan*, «Manag Environ Qual», 16, 2005, pp. 647-665.
- Speir, T. W., Kettles, H. A., Parshotam, A., Searle, P. L. & Vlaar, L. N. C., *A simple kinetic approach to derive the ecological dose value, ED(50), for the assessment of Cr(VI) toxicity to soil biological properties*, «Soil Biol Biochem», 27, 1995, pp. 801-810.
- Sreekanth, R., Pattabhi, V. & Rajan, S. S., *Molecular basis of chromium insulin interactions*, «Biochem Biophys Res Commun», 369, 2008, pp. 725-729.
- Srinath, T., Khare, S. & Ramteke, P. W., *Isolation of hexavalent chromium-reducing Cr-tolerant facultative anaerobes from tannery effluent*, «J Gen Appl Microbiol», 47, 2001, pp. 307-312.
- Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P. W. & Garg, S. K., *Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria*, «Chemosphere», 48, 2002, pp. 427-435.
- Stearns, D. M. & Wetterhahn, K. E., *Intermediates produced in the reaction of chromium(VI) with dehydroascorbate cause single-strand breaks in plasmid DNA*, «Chem Res Toxicol», 10, 1997, pp. 271-278.

- Sugden, K. D., Campo, C. K. & Martin, B. D., *Direct oxidation of guanine and 7,8-dihydro-8-oxoguanine in DNA by a high-valent chromium complex: A possible mechanism for chromate genotoxicity*, «Chem Res Toxicol», 14, 2001, pp. 1315-1322.
- Sugiyama, M., Tsuzuki, K. & Ogura, R., *Effect of ascorbic-acid on DNA damage, cytotoxicity, glutathione-reductase, and formation of paramagnetic chromium in chinese-hamster V-79 cells treated with sodium chromate(VI)*, «J Biol Chem», 266, 1991, pp. 3383-3386.
- Sumner, E. R., Shanmuganathan, A., Sideri, T. C., Willetts, S. A., Houghton, J. E. & Avery, S. V., *Oxidative protein damage causes chromium toxicity in yeast*, «Microbiology», 151, 2005, pp. 1939-1948.
- Suzuki, T., Miyata, N., Horitsu, H., Kawai, K., Takamizawa, K., Tai, Y. & Okazaki, M., *NAD(P)H-dependent chromium(VI) reductase of Pseudomonas ambigua G-1: Cr(VI) intermediate is formed during the reduction of Cr(VI) to Cr(III)*, «J Bacteriol», 174, 1992, pp. 5340-5345.
- Suzuki, T., Nojiri, H., Isono, H. & Ochi, T., *Oxidative damages in isolated rat hepatocytes treated with the organochlorine fungicides captan, dichlofluanid and chlorothalonil*, «Toxicology», 204, 2004, pp. 97-107.
- Tattawasart, U., Maillard, J. Y., Furr, J. R. & Russel, A. D., *Development of resistance chlorexidine diacetate and cetylpyridinium chloride in Pseudomonas sutzeri and change in antibiotic susceptibility*, «J Hosp Inf», 42, 1999, pp. 219-229.
- Tauch, A., Schluter, A., Bischoff, N., Goesmann, A., Meyer, F. & Puhler, A., *The 79370-bp conjugative plasmid pB4 consists of an IncP-1 beta backbone loaded with a chromate resistance transposon, the strA-strB streptomycin resistance gene pair, the oxacillinase gene bla(NPS-1), and a tripartite antibiotic efflux system of the resistance-nodulation-division family*, «Mol Gen Genom», 268, 2003, pp. 570-584.
- Tebo, B. M. & Obratzova, A. Y., *Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors*, «FEMS Microbiol Lett», 162, 1998, pp. 193-198.
- Thompson, M. R., Verberkmoes, N. C., Chourey, K., Shah, M., Thompson, D. K. & Hettich, R. L., *Dosage-dependent proteome response of Shewanella oneidensis MR-1 to acute chromate challenge*, «J Prot Res», 6, 2007, pp. 1745-1757.
- Tokunaga, T. K., Wan, J., Firestone, M. K., Hazen, T. C., Olson, K. R., Herman, D. J., Sutton, S. R. & Lanzirrotti, A., *In situ reduction of chromium(VI) in heavily contaminated soils through organic carbon amendment*, «J Environ Qual», 32, 2003, pp. 1641-1649.
- Touati, D., *Iron and oxidative stress in bacteria*, «Arch Biochem Biophysics», 373, 2000, pp. 1-6.
- Tralau, T., Vuilleumier, S., Thibault, C., Campbell, B. J., Hart, C. A. & Kertesz, M. A., *Transcriptomic analysis of the sulfate starvation response of Pseudomonas aeruginosa*, «J Bacteriol», 189, 2007, pp. 6743-6750.
- Tseng, J. K. & Bielefeld, A. R., *Low-temperature chromium(VI) biotransformation in soil with varying electron acceptors*, «J Environ Qual», 31, 2002, pp. 1831-1841.
- Tsou, T. C., Chen, C. L., Liu, T. Y. & Yang, J. L., *Induction of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by chromium(III) plus hydrogen peroxide and its prevention by scavengers*, «Carcinogenesis», 17, 1996, pp. 103-108.

- ur Rahman, M. A. & Sakano, T., *Health impact assessment of chrome-based leather tanning: short report of an ongoing case study of Pakistan*, «Promotion and Education», 8, 2001, pp. 21-22.
- Van der Ploeg, Jr., Weiss, M. A., Saller, E., Nashimoto, H., Saito, N., Kertesz, M. A. & Leisinger, T., *Identification of sulfate starvation-regulated genes in Escherichia coli: a gene cluster involved in the utilization of taurine as a sulfur source*, «J Bacteriol», 178, 1996, pp. 5438-5446.
- Viti, C., Bochner, B. R. & Giovannetti, L., *Florence conference on phenotype microarray analysis of microorganisms - the environment, agriculture, and human health*, «Ann Microbiol», 58, 2008, pp. 347-349.
- Viti, C. & Giovannetti, L., *The impact of chromium contamination on soil heterotrophic and photosynthetic microorganisms*, «Ann Microbiol», 51, 2001, pp. 201-213.
- Viti, C. & Giovannetti, L., *Characterization of cultivable heterotrophic bacterial communities in Cr-polluted and unpolluted soils using biologic and ARDRA approaches*, «App Soil Ecol», 28, 2005, pp. 101-112.
- Viti, C. & Giovannetti, L. (2007). *Bioremediation of soils polluted with hexavalent chromium using bacteria-the challenge*. In S. N. Singh & R. D. Tripathi (Eds) *Environmental Bioremediation Technologies* (pp. 57-76). Berlin: Springer-Verlag.
- Viti, C., Mini, A., Ranalli, G., Lustrato, G. & Giovannetti, L., *Response of microbial communities to different doses of chromate in soil microcosms*, «Appl Soil Ecol», 34, 2006, pp. 125-139.
- Viti, C., Pace, A. & Giovannetti, L., *Characterization of Cr(VI)-resistant bacteria isolated from chromium-contaminated soil by tannery activity*, «Curr Microbiol», 46, 2003, pp. 1-5.
- Viti, C., Quaranta, D., De Philippis, R., Corti, G., Agnelli, A., Cuniglio, R. & Giovannetti, L., *Characterizing cultivable soil microbial communities from copper fungicide-amended olive orchard and vineyard soils*, «World J Microbiol Biotechnol», 24, 2008, pp. 309-318.
- Voitkun, V., Zhitkovich, A. & Costa, M., *Cr(III)-mediated crosslinks of glutathione or amino acids to the DNA phosphate backbone are mutagenic in human cells*, «Nucleic Acids Res», 26, 1998, pp. 2024-2030.
- Voordouw, G., van der Vies, S. M. & Themmen, A. P., *Why are two different types of pyridine nucleotide transhydrogenase found in living organisms?* «Eur J Biochem», 5, 1983, pp. 527-533.
- Wang, P. C., Mori, T., Komori, K., Sasatu, M., Toda, K. & Ohtake, H., *Isolation and characterization of an Enterobacter cloacae strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions*, «Appl Environ Microbiol», 55, 1989, pp. 1665-1669.
- Wang, Y. T. & Xiao, C., *Factors affecting hexavalent chromium reduction in pure cultures of bacteria*, «Water Res», 29, 1995, pp. 2467-2474.
- Wani, R., Kodam, K. M., Gawai, K. R. & Dhakephalkar, P. K., *Chromate reduction by Burkholderia cepacia MCMB-821, isolated from the pristine habitat of alkaline crater lake*, «Appl Microbiol Biotechnol», 75, 2007, pp. 627-632.
- Weinbach, E. C., Diamont, S. L., Claggett, C. E. & Kon, H., *Iron-sulfur proteins of Entamoeba histolytica*, «J Parassitol», 62, 1976, pp. 127-128.
- Weisblum, B., *Macrolide resistance*, «Drug Resist», 1, 2009, pp. 29-41.

- Wentzell, L. M. & Maxwell, A., *The complex of DNA gyrase and quinolone drugs on DNA forms a barrier to the T7 DNA polymerase replication complex*, «J Mol Biol», 304, 2000, pp. 779-791.
- Wielinga, B., Mizuba, M. M., Hansel, C. M. & Fendorf, S., *Iron promoted reduction of chromate by dissimilatory iron-reducing bacteria*, «Environ Sci Technol», 35, 2001, pp. 522-527.
- Wise, E. M. & Ball, E. G., *Malic enzyme and lipogenesis*, «Proc Natl Acad Sci U S A», 52, 1964, pp. 1255-1263.
- Wise, J. P., Orenstein, J. M. & Patierno, S. R., *Inhibition of lead chromate clastogenesis by ascorbate - relationship to particle dissolution and uptake*, «Carcinogenesis», 14, 1993, pp. 429-434.
- Wong-Ekkabut, J., Xu, Z., Triampo, W., Tang, I. M., Tieleman, D. P. & Monticelli, L., *Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study*, «Biophys J», 93, 2007, pp. 4225-4236.
- Woodmansee, A. N. & Imlay, J. A., *Reduced flavins promote oxidative DNA damage in non-respiring Escherichia coli by delivering electrons to intracellular free iron*, «J Biol Chem», 277, 2002, pp. 34055-34066.
- Xiong, G. M. & Maser, E., *Regulation of the steroid-inducible 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase gene in Comamonas testosteroni*, «J Biol Chem», 276, 2001, pp. 9961-9970.
- Xu, W. H., Liu, Y. G., Zeng, G. M., Li, X., Tang, C. F. & Yuan, X. Z., *Enhancing effect of iron on chromate reduction by Cellulomonas flavigena*, «J Hazard Mat», 126, 2005, pp. 17-22.
- Yoon, Y. S., Cho, H., Lee, J. H. & Yoon, G., *Mitochondrial dysfunction via disruption of complex II activity during iron chelation-induced senescence-like growth arrest of Chang cells*, «Ann N Y Acad Sci», 1011, 2004, pp. 123-132.
- Yoshida, H., Nakamura, M., Bogaki, M., Ito, H., Kojima, T., Hattori, H. & Nakamura, S., *Mechanism of action of quinolones against Escherichia coli DNA gyrase*, «Antimicrob Agents Chemother», 37, 1993, pp. 839-845.
- Zachara, J. M., Ainsworth, C. C., Cowan, C. E. & Resch, C. T., *Adsorption of chromate by subsurface soil layers*, «Soil Sci Soc Am J», 53, 1989, pp. 418-428.
- Zachara, J. M., Girvin, D. C., Schmidt, R. C. & Resch, C. T., *Chromate adsorption on amorphous iron oxyhydroxide in the presence of major groundwater ions*, «Environ Sci Technol», 21, 1987, pp. 589-594.
- Zawadzka, A. M., Crawford, R. L. & Paszczyński, A. J., *Pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid) produced by Pseudomonas stutzeri KC reduces chromium(VI) and precipitates mercury, cadmium, lead and arsenic*, «Biomaterials», 20, 2007, pp. 145-158.
- Zayed, A. M. & Terry, N., *Chromium in the environment: factors affecting biological remediation*, «Plant Cell Environ», 249, 2003, pp. 139-156.
- Zhitkovich, A., *Chromium: exposure, toxicity and biomonitoring approaches*. In S. H. Wilson & W. A. Suk (Eds) *Biomarkers of environmentally associated disease: technologies, concepts and perspectives*, CRC Press LLC, New York 2005, pp. 269-287.

Ringraziamenti

Al termine di questo testo vorrei ringraziare Carlo e Luciana per i loro consigli ed il loro continuo supporto, Enrico per il suo prezioso contributo alla realizzazione di questo studio, e tutti coloro che, anche con un semplice sorriso, mi hanno aiutato a superare ogni difficoltà che ho dovuto affrontare.

Ringrazio i miei genitori per tutto il tempo che hanno dedicato a me e alle mie splendide figlie ed infine Mirko per il suo buon senso che ogni giorno mi aiuta a dare il giusto valore ad ogni cosa.

PREMIO FIRENZE UNIVERSITY PRESS
TESI DI DOTTORATO

- Coppi E., *Purines as Transmitter Molecules. Electrophysiological Studies on Purinergic Signalling in Different Cell Systems*, 2007
- Natali I., *The Ur-Portrait. Stephen Hero ed il processo di creazione artistica in A Portrait of the Artist as a Young Man*, 2007
- Petretto L., *Imprenditore ed Università nello start-up di impresa. Ruoli e relazioni critiche*, 2007
- Mannini M., *Molecular Magnetic Materials on Solid Surfaces*, 2007
- Bracardi M., *La Materia e lo Spirito. Mario Ridolfi nel paesaggio umbro*, 2007
- Bemporad F., *Folding and Aggregation Studies in the Acylphosphatase-Like Family*, 2008
- Buono A., *Esercito, istituzioni, territorio. Alloggiamenti militari e «case Herme» nello Stato di Milano (secoli XVI e XVII)*, 2008
- Castenasi S., *La finanza di progetto tra interesse pubblico e interessi privati*, 2008
- Gabbiani C., *Proteins as Possible Targets for Antitumor Metal Complexes: Biophysical Studies of their Interactions*, 2008
- Colica G., *Use of Microorganisms in the Removal of Pollutants from the Wastewater*, 2008
- Inzitari M., *Determinants of Mobility Disability in Older Adults: Evidence from Population-Based Epidemiologic Studies*, 2009
- Di Carlo P., *I Kalasha del Hindu Kush: ricerche linguistiche e antropologiche*, 2009
- Pace R., *Identità e diritti delle donne. Per una cittadinanza di genere nella formazione*, 2009
- Macrì F., *Verso un nuovo diritto penale sessuale. Diritto vivente, diritto comparato e prospettive di riforma della disciplina dei reati sessuali in Italia*, 2009
- Vignolini S., *Sub-Wavelength Probing and Modification of Complex Photonic Structures*, 2009
- Decorosi F., *Studio di ceppi batterici per il biorisanamento di suoli contaminati da Cr(VI)*, 2009
- Di Patti F., *Finite-Size Effects in Stochastic Models of Population Dynamics: Applications to Biomedicine and Biology*, 2009

Finito di stampare presso
Grafiche Cappelli Srl - Osmannoro (FI)