

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA



DIPARTIMENTO DI SCIENZE ECOLOGICHE E BIOLOGICHE

DOTTORATO DI RICERCA IN “EVOLUZIONE BIOLOGICA E BIOCHIMICA”

XXV CICLO

“Proprietà filmogene del fungo *Pleurotus ostreatus* : produzione, caratterizzazione e risposta a contaminanti ambientali”

S.S.D. BIO/19

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Lorena Pesciaroli

Coordinatore del corso

Prof.ssa Laura Zucconi

Tutore

Prof. Federico Federici

Co-tutore

Dott. Alessandro D'Annibale

10 Giugno 2013

*Alla mia Famiglia
ma soprattutto
a me stessa....*

Ringraziamenti

Dopo tre anni eccomi nuovamente qui a scrivere i ringraziamenti. È una strana sensazione perché questo momento segna la fine di un percorso e, forse, l'inizio di qualcosa di nuovo. In queste poche righe voglio ringraziare, in modo semplice ma sincero, tutte quelle persone che, in un modo o nell'altro, mi hanno sempre sostenuto e hanno contribuito alla riuscita di questo lavoro.

Desidero ringraziare il Prof. Federici per la stima che ancora una volta ha avuto nei miei confronti e il Prof. Petruccioli che, nonostante i mille impegni, ha sempre trovato il tempo per fornirmi preziosi insegnamenti.

Un ringraziamento particolare va al Dott. Alessandro D'Annibale che ha seguito l'intero progetto, ha investito la sua conoscenza ed il suo tempo in interessanti e soprattutto lunghi confronti sull'intero lavoro svolto consigliandomi e guidandomi costantemente in questi tre anni.

Ringrazio anche la Dott.ssa Silvia Crognale che, con amicizia e professionalità, è sempre stata pronta ad aiutarmi con suggerimenti, spunti e interessanti chiacchierate.

Grazie ai colleghi, ma ancor di più amici, Guglielmo, Julia e Fabiana che hanno sempre saputo darmi una parola di conforto e la cui compagnia ha reso più spensierate le lunghe giornate trascorse in laboratorio.

Non avrei mai potuto concludere questo lavoro se non avessi avuto il sostegno della mia famiglia che mi ha seguita con affetto e pazienza, incentivandomi in ogni momento. Ringrazio, quindi, Andrea dalle cui sorprendenti manifestazioni di affetto ho tratto la forza per superare i momenti più difficili e per essere stato sempre presente sia come punto di riferimento sia come valvola di sfogo.

Ringrazio, inoltre, i miei genitori perché senza di loro non sarei potuta diventare quella che oggi sono.....grazie mamma e papà per aver sempre creduto in me.

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 I biofilm microbici	1
1.1.1 Cenni storici	1
1.1.2 Struttura dei biofilm	2
1.1.3 Formazione del biofilm	5
1.1.4 Cambiamenti a cui i microrganismi vanno incontro nella transizione tra la fase planctonica e quella di crescita in biofilm	7
1.1.5 La dispersione	9
1.1.6 Biofilm fungini	10
1.1.7 Vantaggi associati alla crescita in biofilm	13
1.1.8 Aspetti ambientali dei biofilm	14
1.1.9 Aspetti clinici dei biofilm	16
1.1.10 Metodi di studio dei biofilm	17
1.2 Funghi agenti di carie bianca (white rot)	19
1.2.1 Enzimi ligninolitici prodotti dai funghi “white-rot”	20
1.2.1.1 Applicazioni degli enzimi ligninolitici	22
1.2.2 Il fungo white rot <i>Pleurotus ostreatus</i>	23
1.2.3 Studi condotti su <i>Pleurotus ostreatus</i>	24
1.3 I metalli pesanti: definizione e tossicità	25
1.3.1 Effetti dei metalli pesanti sui funghi <i>white rot</i>	27
1.3.2 Cadmio ed effetti di tossicità	29
1.4 Produzione olearia	30
1.4.1 Composizione delle acque di vegetazione	30
1.4.2 Tossicità delle acque di vegetazione	31

2. SCOPO DEL LAVORO	33
3. FORMAZIONE DEL BIOFILM SU MEMBRANE CIRCOLARI	36
3.1 Materiali e metodi	38
3.1.1 Microorganismo utilizzato	38
3.1.2 Preparazione del pre-inoculo	38
3.1.3 Terreni colturali	38
3.1.3.1 Terreno LB (Luria-Bertani)	38
3.1.3.2 Terreno M9 (Minimal-medium)	39
3.1.3.3 Terreno SA (Saccarosio/Asparagina)	39
3.1.4 Tampone di lavaggio	39
3.1.5 Sviluppo del biofilm fungino	40
3.1.5.1 Determinazione dello sviluppo microbico in biofilm	41
3.1.5.2 Valutazione dell'attività metabolica mediante saggio dell'MTT	41
3.1.5.3 Analisi strutturale del biofilm fungino	42
3.1.5.4 Trattamento delle acque di vegetazione	42
3.1.5.4.1 Determinazione della domanda chimica di ossigeno (COD)	42
3.1.5.4.2 Determinazione dei fenoli totali	43
3.1.5.4.3 Determinazione degli zuccheri totali	44
3.1.5.5.4 Determinazione delle attività enzimatiche	44
3.1.6 Analisi statistica	45
3.2 Risultati e discussioni	46
3.2.1 Produzione di biofilm	46
3.2.2 Attività metabolica del biofilm fungino	50
3.2.3 Analisi strutturale del biofilm fungino	54
3.2.4 Trattamento delle acque di vegetazione	58

4. FORMAZIONE DEL BIOFILM FUNGINO SU CALGARY

BIOFILM DEVICE	60
4.1 Materiali e metodi	62
4.1.1 Formazione del biofilm in CDC Biofilm reactor (CBR)	62
4.1.2 Formazione del biofilm fungino in Drip Flow Biofilm Reactor (DFR)	62
4.1.3 Formazione del biofilm fungino su sistemi piastre MBEC™	63
4.1.4 Determinazione dello sviluppo fungino in biofilm	64
4.1.5 Analisi strutturale del biofilm fungino	64
4.1.5.1 Microscopio elettronico a scansione (SEM)	64
4.1.5.2 Microscopio elettronico a trasmissione (TEM)	65
4.1.5.3 Microscopio elettronico a fluorescenza	65
4.1.6 Caratterizzazione biochimica del biofilm fungino	66
4.1.6.1 Determinazione delle proteine	66
4.1.6.2 Determinazione della chitina	67
4.1.6.3 Determinazione degli zuccheri totali	67
4.1.6.4 Determinazione dei lipidi	68
4.1.6.5 Determinazione dell'EPS	68
4.1.7 Prove di suscettibilità al cadmio	69
4.1.8 Trattamento delle acque reflue	69
4.2 Risultati e discussioni	71
4.2.1 Formazione del biofilm fungino in CDC Biofilm Reactor (CBR)	71
4.2.2 Formazione del biofilm fungino in Drip Flow Biofilm Reactor (DFR)	72
4.2.3 Formazione del biofilm fungino su piastre MBEC™	74
4.2.4 Analisi morfostrutturale del biofilm di <i>P. ostreatus</i>	78
4.2.5 Caratterizzazione biochimica delle colture di <i>P. ostreatus</i>	84
4.2.6 Risposta comparativa a contaminanti ambientali	85

4.2.6.1 Prove di suscettibilità al Cadmio	86
4.2.6.2 Prove di detossificazione delle acque di vegetazione	92
5. FORMAZIONE DEL BIOFILM MISTO FUNGO/BATTERIO	96
5.1 Materiali e metodi	98
5.1.1 Microrganismi utilizzati	98
5.1.2 Formazione del biofilm misto fungo-batterio	98
5.1.3 Quantificazione del biofilm misto	99
5.1.3.1 Estrazione del DNA genomico totale	99
5.1.3.2 Primer utilizzati nelle reazioni di PCR	99
5.1.3.3 PCR Quantitativa (Real time PCR)	100
5.1.3.4 Costruzione delle curve di calibrazione	101
5.1.4 Analisi strutturale del biofilm misto	101
5.2 Risultati e discussioni	102
5.2.1 Prove di co-sviluppo su piastra	102
5.2.2 Formazione del biofilm misto	103
5.2.3 PCR Quantitativa o Real-time PCR	103
5.2.3.1 Estrazione del DNA genomico da biofilm	104
5.2.3.2 Scelta del primer e ottimizzazione delle condizioni di PCR	105
5.2.3.3 Curve standard	107
5.2.3.4 Quantificazione della componente batterica e fungina nei biofilm misti	111
5.2.4 Analisi strutturale del biofilm misto	113
6. CONCLUSIONI	116
7. BIBLIOGRAFIA	120

1. INTRODUZIONE

1.1 I biofilm microbici

E' noto come i microrganismi in natura raramente vivano come cellule solitarie, ma piuttosto si trovino sotto forma di comunità aggregate tenute insieme da polisaccaridi prodotti dalle cellule stesse. Queste comunità prendono il nome di biofilm. Un biofilm può essere definito come una complessa comunità funzionale di microrganismi associati in modo stabile ad una superficie e racchiusi in una matrice di materiale polisaccaridico extracellulare (Bandara et al., 2010).

Negli ambienti naturali i biofilm rappresentano quasi sempre delle comunità microbiche eterospecifiche che ospitano microrganismi che condividono il loro materiale genetico, svolgono uno specifico compito all' interno della comunità e occupano nicchie distinte nel biofilm stesso. Per cui il biofilm può essere paragonato a una comunità complessa e altamente differenziata come sono le nostre città (Watnick and Kolter, 2000).

La formazione dei biofilm è così prevalente che può essere considerata un tratto positivo che viene fissato precocemente durante l'evoluzione microbica, caratteristica questa, importante per la sopravvivenza dei microrganismi sulle superfici in diversi ambienti (Hall-Stoodley, 2004). La produzione di biofilm costituisce, quindi, la strategia di crescita microbica più diffusa in molti ecosistemi naturali.

1.1.1 Cenni storici

L'importanza dei biofilm è una scoperta relativamente recente. Infatti, i biologi hanno incominciato ad analizzare la fisiologia di queste comunità microbiche solo negli ultimi 15-20 anni un fatto straordinario, se si pensa che il microscopista olandese Antoine van Leeuwenhoek descrisse i primi biofilm alla fine del Seicento. Infatti, fu il primo che, raschiando la superficie dei suoi denti, osservò gli "animalucula" che costituivano una comunità microbica. Inoltre, usando l'acido acetico tentò di distruggere questa comunità ma si accorse che riusciva a eliminare solo le cellule che galleggiavano liberamente. Sebbene questi studi portarono alla scoperta di associazioni batteriche, i biofilm, la microbiologia trascurò questo genere di osservazioni concentrandosi soprattutto sui batteri planctonici.

Heukelekian ed Heller (1940) osservarono che la crescita e l'attività dei microrganismi marini risultava essere favorita in presenza di una superficie cui essi potessero attaccarsi. Zobell (1943), di seguito, osservò che il numero di microrganismi sviluppatosi su di una superficie era enormemente più alto se paragonato al numero di quelli presenti in forma planctonica nel mezzo colturale. Nel 1969 Jones e collaboratori, con l'aiuto della microscopia elettronica a scansione e a trasmissione, studiando i sistemi di filtraggio delle acque di scarico e basando i loro studi sulla morfologia delle cellule che costituivano i biofilm, scoprirono che questi potevano essere formati da una diversa varietà di microrganismi. Inoltre, con l'utilizzo del rosso di rutenio, un colorante specifico per i polisaccaridi, e del tetrossido di osmio come fissativo, scoprirono che la matrice che circondava e racchiudeva le cellule in biofilm era rappresentata da polisaccaride.

La scoperta che le colonie batteriche non solo erano tenaci, ma resistenti agli agenti antimicrobici arriva nel 1973 grazie a studi condotti da Characklis (1973) sui fanghi industriali. Nel 1978 Costerton e collaboratori (1978) proposero la teoria secondo la quale i biofilm sono dotati di particolari funzioni necessarie per la colonizzazione di superfici non solo abiotiche ma anche biotiche e che le cellule batteriche presenti sotto forma di biofilm differiscono profondamente dalle loro corrispondenti forme planctoniche.

Due spinte importanti negli ultimi anni, quali l'utilizzo del microscopio confocale a scansione laser e un'indagine relativa ai geni coinvolti nelle fasi di formazione dei biofilm, hanno drasticamente migliorato la nostra comprensione relativa alla formazione, struttura e funzione dei biofilm microbici (Donlan, 2002a).

1.1.2 Struttura dei biofilm

Un biofilm può essere definito come una complessa comunità funzionale di microrganismi associati in modo stabile ad una superficie e racchiusi in una matrice di materiale polisaccaridico extracellulare (Bandara et al., 2010). I biofilm possono essere composti da una singola specie microbica, ma comunemente sono costituiti da microrganismi appartenenti a più specie come ad esempio i biofilm formati da cellule batteriche e funghi insieme.

Se i biofilm possono essere metaforicamente chiamati "le città dei microorganismi", allora l'EPS rappresenta la "casa" delle cellule che compongono il biofilm stesso (Watnick and Kolter, 2000). Gli EPS sono biopolimeri di origine microbica di natura polisaccaridica

nei quali i microrganismi appartenenti al biofilm sono immersi. La percentuale della matrice polisaccaridica extracellulare presente in un biofilm si aggira solitamente tra il 50% e il 90% del carbonio organico totale e per questo motivo esso viene considerato la materia prima del biofilm stesso (Flemming et al., 2000). L'EPS è una sostanza altamente idratata essendo in grado di incorporare grandi quantità di acqua nella sua struttura tramite la formazione di legami idrogeno prevenendo così l'essiccamento dei biofilm presenti negli ambienti naturali. L'EPS può essere di natura idrofobica sebbene molti tipi risultano essere costituiti da porzioni sia idrofiliche che idrofobiche (Sutherland, 2001). Sutherland notò che alcune delle caratteristiche dell'EPS possono avere un marcato effetto sul biofilm stesso. Primo, la composizione e la struttura dei polisaccaridi determinano la conformazione primaria degli stessi. Per esempio, molti EPS batterici possiedono nella loro struttura residui di esosi tenuti insieme da legami β -1,3 o β -1,4, i quali conferiscono alla molecola maggiore rigidità, minore deformabilità e in alcuni casi ne influenzano anche il grado di solubilità come è stato osservato nello scheletro cellulosico di xantano di *Xanthomonas campestris*. La presenza di legami glicosidici α -1,2 e α -1,6 riscontrati in molti destrani, invece, conferisce a tali strutture maggiore flessibilità. Secondo, l'EPS presente nei biofilm non è generalmente uniforme ma varia spazialmente e temporalmente. Leriche e collaboratori (2000) hanno usato la specificità di legame delle lectine a semplici zuccheri per valutare lo sviluppo del biofilm da parte di differenti organismi. Essi dimostrarono che differenti organismi producono una differente quantità di EPS la quale aumenta con l'età del biofilm.

Gli esopolisaccaridi sintetizzati dalle cellule microbiche variano nella loro composizione e nelle loro caratteristiche sia chimiche che fisiche. Alcune sono macromolecole neutre, ma la maggior parte sono polianioniche a causa della presenza di acidi uronici e in alcuni casi di residui inorganici, come il fosfato o più raramente il solfato (Sutherland, 2001). Questa caratteristica è importante perché permette l'associazione di cationi bivalenti, come il calcio e il magnesio, i quali conferiscono una più alta forza di legame nello sviluppo del biofilm. Inoltre, i polisaccaridi presenti nei biofilm, non esistono da soli, ma possono interagire con molte specie molecolari, come lectine, proteine, lipidi o altri polisaccaridi. La risultante struttura terziaria comprende quindi un insieme di polisaccaridi e altre macromolecole, in cui le cellule e i prodotti delle cellule stesse ne sono intrappolati.

La matrice dei biofilm è un ambiente dinamico dove possono accumularsi nutrienti e dove le cellule microbiche mantengono il giusto grado di omeostasi. Essa mostra un alto

grado di eterogeneità, tanto che al suo interno possono coesistere più microambienti tra loro diversificati. La natura della matrice polimerica, oltre ad essere correlata, come già detto, alle strutture esopolisaccaridiche, dipende anche da diversi fattori estrinseci, come le proprietà chimico-fisiche dell'ambiente dove il biofilm è localizzato, e da fattori intrinseci, come il genotipo delle cellule che lo compongono. La struttura della matrice del biofilm può variare in base allo stato fisiologico delle cellule, alla disponibilità dei nutrienti, all'ambiente in cui esso si forma, nonché alle specie microbiche che lo compongono (Sutherland, 2001).

Tolker-Nielsen and Molin (2000) notarono che ogni comunità microbica sviluppata in biofilm risulta essere unica sebbene alcuni degli attributi strutturali possono essere considerati universali quali ad esempio la presenza di vuoti interstiziali o canali. Quest'ultimi risultano essere parte integrante della struttura del biofilm e attraverso di essi ha luogo il flusso di liquido seguito dalla diffusione di nutrienti, ossigeno e anche di agenti antimicrobici. Infatti, misure effettuate in situ attraverso microelettrodi e finalizzate a valutare il livello di ossigeno nel biofilm rivelarono che esso era disponibile anche negli strati più profondi, indicando che questi canali consentissero il trasporto di massa dell'ossigeno attraverso lo spessore del biofilm stesso (Lewansowski et al., 1993). Presumibilmente questi canali sono parte vitale sia per la struttura che per la funzione del biofilm e possono essere considerati un punto chiave per la formazione e per il mantenimento del biofilm stesso.

La matrice esopolisaccaridica è una caratteristica fondamentale di ogni biofilm, in quanto non solo tiene insieme ogni membro della comunità microbica, ma determina la suddivisione del biofilm in diversi microambienti. All'interno di un biofilm si vengono a formare nicchie occupate da cellule massimamente adattate alle condizioni di quel particolare microambiente.

I biofilm non sono dunque semplici strutture adese ad una superficie, ma rappresentano dei sistemi biologici caratterizzati dall'aver un alto grado di organizzazione dove i microrganismi che li compongono sono strutturati e coordinati in comunità funzionali, capaci, se necessario, di cooperare nei processi metabolico-riproduttivi e infettivi (Davey e O'Toole, 2000).

1.1.3 Formazione del biofilm

In natura i microrganismi sono attirati da superfici solide su cui si depositano, aderiscono e si moltiplicano attivamente formando delle comunità aggregate. Questo accumulo di cellule può ingrandirsi a tal punto da includere detriti organici ed inorganici, nutrienti ed anche altri microrganismi formando così un biofilm altamente eterogeneo. Infatti in modo dipendente dall'ambiente in cui il biofilm si viene a formare, possono essere racchiusi in esso anche materiali di natura non cellulare, quali cristalli minerali, particelle di argilla e limo (Donlan, 2002).

Una volta che un biofilm si è formato e che la matrice esopolisaccaridica è stata secreta dalle cellule sessili, la struttura risultante è altamente viscoelastica con le caratteristiche tipiche di un materiale gommoso (Stoodley et al., 1998).

Quando i biofilm si accrescono su piccole superfici, hanno una bassa resistenza alla trazione e sono soggetti a facile rottura a differenza di quanto accade se il biofilm si viene a sviluppare su superfici più estese (Donlan e Costerton, 2002).

Studi genetici di biofilm costituiti da una singola specie microbica hanno dimostrato che essi si formano attraverso un processo costituito da più fasi (Watnick e Kolter, 1999), che richiedono dei segnali intercellulari (Davies et al., 1998) e che i microrganismi che formano il biofilm presentano un profilo di trascrizione genica distinto rispetto a quello della corrispettiva controparte planctonica (Pringent-Combaret et al., 1999)

Watnick e Kolter (2000) hanno paragonato l'organizzazione dei biofilm a quella di una città poiché sia l'ottimizzazione della vita in città sia la formazione di un biofilm maturo avvengono secondo fasi ben precise. Nel primo caso sarà necessario scegliere dapprima la città in cui vivere, a questo segue la scelta del vicinato che meglio si addice alle varie esigenze e per ultimo si procede con la costruzione della casa in cui vivere. Per la formazione del biofilm, invece, i microrganismi dovranno dapprima aderire ad una superficie solida per poi portare alla formazione di microcolonie ed infine favorire la formazione di un biofilm maturo. In fig. 1 è rappresentata la successione delle fasi necessarie per far avvenire la formazione di un biofilm batterico.

L'adesione al substrato e la formazione di microcolonie sono eventi influenzati da fattori ambientali quali osmolarità, pH, disponibilità di ferro, ossigeno, temperatura e disponibilità di nutrienti, mentre la maturazione del biofilm, responsabile dell'architettura e dello spessore, è regolata da quello che prende il nome di "quorum-sensing" cioè quel sistema di

regolazione che permette alle cellule di rispondere efficientemente ad un segnale dell'ambiente circostante.

La prima fase per la formazione del biofilm implica l'adesione delle cellule ad una superficie o ad un'interfaccia solido-liquido. Questo è un processo che dipende sia dalla probabilità che il microrganismo entri in contatto diretto con la superficie stessa, sia dall'instaurarsi di interazioni cellula-superficie in grado di superare le forze repulsive che possono generarsi fra le superfici. Le interazioni cellula-superficie, oltre ad essere regolate dal semplice contatto della cellula con la superficie, risultano essere anche regolate dalle condizioni ambientali esterne quali ad esempio l'osmolarità.

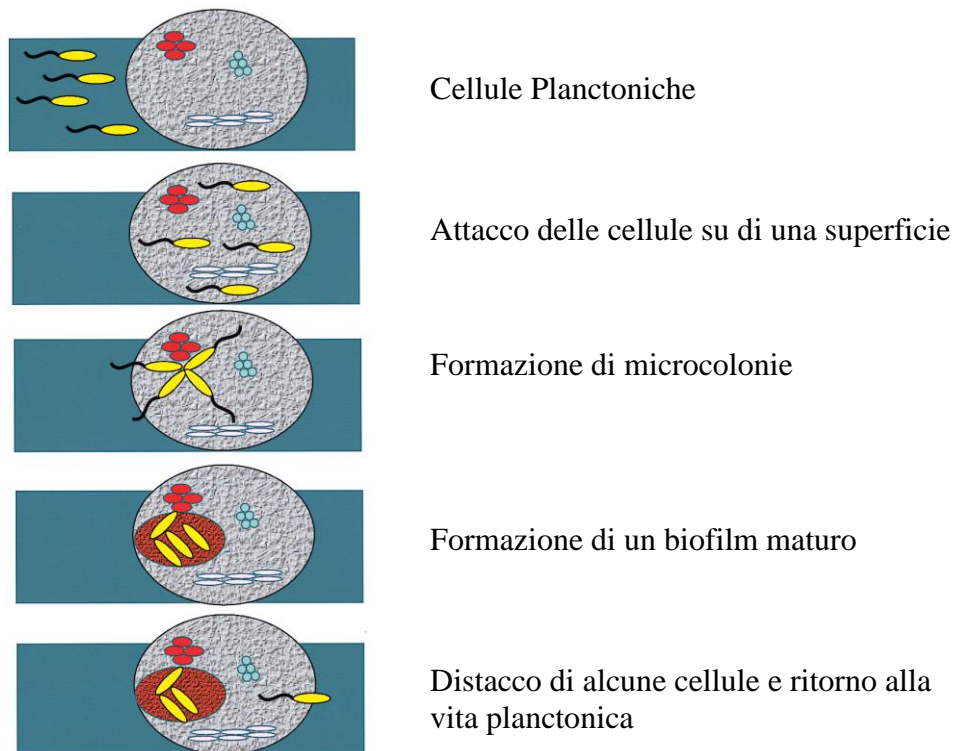


Fig. 1 Rappresentazione schematica delle fasi di formazione del biofilm di una specie batterica su di una roccia già colonizzata da altre specie batteriche. Dopo una prima adesione reversibile al substrato, le cellule batteriche si aggregano a formare microcolonie, secernono polisaccaride che consente loro di formare un biofilm maturo. Quando le condizioni ambientali diventano sfavorevoli, alcune cellule si distaccano e ritornano alla vita planctonica.

La seconda fase nella formazione del biofilm implica lo sviluppo di microcolonie cioè di comunità batteriche che si sviluppano in seguito all'adesione di alcune cellule alle superfici (Davey e O'Toole, 2000). Tuttavia, non basta la sola interazione stabile con la superficie per formare una microcolonia, ma sono necessari anche uno sviluppo clonale e interazioni stabili cellula-cellula (Reisner et al., 2003). Lo sviluppo clonale è controllato semplicemente dai nutrienti presenti nell'ambiente. Tuttavia, sono necessarie distinte vie di trasduzione del segnale per la produzione della matrice esopolisaccaridica, struttura predominante che media le interazioni stabili cellula-cellula (Yildiz e Schoolnik, 1999; Watnick e Kolter, 2000). Dopo le fasi iniziali di adesione, le microcolonie si sviluppano in un biofilm maturo e questa fase risulta essere associata alla produzione di EPS. Il biofilm maturo può essere costituito da uno strato omogeneo di cellule, o da una struttura complessa di cellule intervallate dalla presenza di canali dell'acqua la cui funzione è quella di permettere la diffusione dei nutrienti nel biofilm (Davey e O'Toole, 2000). La struttura di un biofilm maturo, sia mono che multi-specie, può variare non solo in funzione delle diverse specie microbiche che lo compongono, ma anche in funzione dei differenti parametri che caratterizzano l'ambiente in cui il biofilm si viene a formare.

1.1.4 Cambiamenti a cui i microrganismi vanno incontro nella transizione tra la fase planctonica e quella di crescita in biofilm

La formazione del biofilm coinvolge cambiamenti genetici programmati nell'organizzazione e nel metabolismo delle forme solitarie e planctoniche dei microrganismi (Sauer et al., 2003). Strutturalmente, le cellule lasciano le loro condizioni di vita solitaria e planctonica e si attaccano ad una superficie o ad altre cellule all'interno di una matrice esopolimerica. La struttura delle cellule individuali non viene alterata significativamente, ma le cellule si organizzano in una struttura comune e mostrano nuove caratteristiche e fenotipi. Un cambiamento frequentemente rilevabile nel fenotipo delle cellule organizzate in biofilm, rispetto alla loro controparte planctonica è una maggiore tolleranza a stress chimici, biologici e fisici. Infatti, una delle caratteristiche più importanti delle popolazioni microbiche che crescono in biofilm è la loro aumentata resistenza ad agenti antimicrobici (Costerton et al., 1999). Conseguentemente, gli agenti antimicrobici convenzionali spesso non riescono ad eradicare le infezioni dei microrganismi quando sono presenti in biofilm.

Recenti studi genomici e proteomici hanno condotto all'identificazione di molti geni e prodotti di geni differentemente espressi durante la formazione del biofilm, rivelando la complessità di questo processo di sviluppo. La disponibilità di sequenze complete dei genomi batterici, insieme allo sviluppo di microarray con i quali può essere saggiata l'espressione dell'intero genoma di un organismo, hanno avviato l'era sulla ricerca post-genomica dei biofilm.

Durante la transizione tra la fase planctonica e quella di crescita in biofilm, i microrganismi vanno incontro a profondi cambiamenti sia nell'espressione genica sia nelle loro caratteristiche biochimiche (Sauer, 2003). Durante la formazione del biofilm ad esempio, si ha un quadro di espressione genica che è completamente diverso da quello che si ha durante la crescita planctonica (Vilain and Brözel, 2006); inoltre, si ha l'attivazione di circuiti regolatori fondamentali nelle interazioni tra le cellule e la superficie del supporto nonché nella maturazione dello stesso. Anche l'espressione di geni per la produzione del polisaccaride è incrementata nelle cellule cresciute in biofilm in rispetto a quelle presenti in forma planctonica in terreni liquidi (Davies et al., 1993). Inoltre, nelle cellule in biofilm sono prodotti alti livelli cellulari di GMP ciclico che induce un aumento nella sintesi di EPS e quindi nella formazione del biofilm e nel comportamento aggregativo delle cellule stesse (Dow et al., 2007).

Costerton e collaboratori (1995) dimostrarono che l'adesione delle cellule a una superficie induce l'espressione di geni che risultano essere coinvolti nella formazione del biofilm.

L'adesione stessa ad una superficie induce la regolazione positiva dell'espressione di geni necessari per la produzione dell'EPS. Infatti, negli studi condotti su *Pseudomonas aeruginosa*, Davies e Geesey (1995) dimostrarono che la trascrizione del gene *algC* che controlla la sintesi dell'alginato (esopolisaccaride), è attivata dall'adesione ad una superficie solida. Studi condotti da Pulcini (2001) dimostrarono che i geni *algD*, *algU*, *rpoS* e i geni che controllano la sintesi di polifosfochinasi (PPK) sono up-regolati durante la formazione del biofilm da parte di *P. aeruginosa* e che almeno 45 geni risultano essere in modo differenziale espressi nelle cellule sessili (Donlan e Costerton, 2002).

Anche fattori chimico fisici interni al biofilm stesso possono indurre l'espressione di alcuni geni. Infatti, Becker e collaboratori (2001) dimostrarono che la carenza di ossigeno negli strati più profondi del biofilm di *Staphylococcus aureus* porta a una sovra-espressione di geni che codificano per enzimi coinvolti nella glicolisi e nei processi fermentativi.

Recenti approcci molecolari e genetici, usati per studiare i biofilm batterici, hanno identificato geni e circuiti regolatori importanti per le iniziali interazioni con la superficie delle cellule, la formazione del biofilm e il ritorno dei biofilm microbici al modo di crescita planctonico (O'Toole et al., 2000).

E' quindi evidente che, durante il processo di crescita dei batteri all' interno dei biofilm, si ha un modello di espressione genetica estremamente differente da quello che i microrganismi seguono in caso di crescita in fase planctonica (Vilain and Brözel, 2006). Quindi i biofilm sono considerati differenti nella fisiologia e nel meccanismo di azione rispetto ai microrganismi cresciuti in colture planctoniche.

1.1.5 La dispersione

Per “dispersione” si intende il processo attraverso il quale una cellula appartenente ad un biofilm si distacca da esso per tornare alla fase planctonica. Ciò permette a tale cellula di cercare nuovi ambienti favorevoli per lo sviluppo, colonizzare altre superfici e formare un nuovo biofilm (Parsek and Fuqua, 2003). Sauer e collaboratori (2003), studiando il processo di dispersione in *P. aeruginosa* in laboratorio, hanno osservato che alcune cellule abbandonano il biofilm quando le condizioni ambientali diventano altamente sfavorevoli, come ad esempio a seguito di un forte decremento del pH.

Tuttavia, le cellule costituenti il biofilm, essendo bloccate all'interno dell'esopolisaccaride e potendosi trovare in strati profondi del biofilm, devono spendere notevoli quantità di energia per regolare i geni che ne permettano il ritorno al fenotipo planctonico. Tutto ciò rende la dispersione un processo estremamente complesso. Sono quindi necessari dei cambiamenti sia dal punto di vista genetico che dal punto di vista biochimico per permettere ad una cellula di abbandonare il biofilm. Per prima cosa è necessario coordinare la rottura della matrice esopolisaccaridica. Infatti, viene attivata la sintesi di enzimi che presentano attività idrolitica e che possono essere secreti nella matrice extracellulare oppure rimanere associati alla parete cellulare.

In seguito, alcuni geni chiave per l'adesione alla superficie, come ad esempio il gene *pil A* che codifica per le subunità strutturali dei pili di tipo IV, vengono silenziati. Inizia quindi la sintesi di flagelli necessari per la motilità natatoria (Parsek and Fuqua, 2003).

Tale processo richiede vie di controllo dell' espressione genica complesse ed altamente specializzate, come dimostrano gli ampi cambiamenti nella fosforilazione di varie proteine analizzate tramite esperimenti di elettroforesi bidimensionale (Sauer, 2003).

1.1.6 Biofilm fungini

I funghi sono microrganismi adattati a crescere in modo adeso sulle superfici, aspetto che risulta evidente non solo dalle loro modalità di assorbire i nutrienti ma anche dalla loro capacità di secernere enzimi extracellulari necessari per digerire le molecole complesse presenti nel mezzo colturale nonché dalla loro crescita ifale di tipo apicale (Jones, 1994). Sebbene i funghi siano dei candidati ideali per la formazione di biofilm per la loro abilità nel produrre polisaccaridi extracellulari (EPS) (Gutiérrez et al., 1995), lectine (Tsvileva et al., 2004, Kobayashi et al. 2005) e idrofobine (Armenante et al., 2010), questo aspetto risulta essere ancora poco conosciuto. Di contro, ci sono dei modelli ben definiti, dei criteri e fenotipi messi a punto per la caratterizzazione dei biofilm di lievito. Molte informazioni che si hanno sulla formazione dei biofilm fungini derivano da studi condotti su lieviti appartenenti al genere *Candida* (Seneviratne, 2008; Blankeship et al., 2006) e *Saccharomyces* (Reynolds e Fink, 2001) e *Cryptococcus neoformans* (Martinez e Casadevall 2006) o su funghi lievito-simili come ad esempio *Aerobasidium pullulans* (Gorbushina e Palinska, 1999). Tuttavia, i biofilm formati dai lieviti gemmanti, sono più paragonabili ai biofilm batterici piuttosto che a quelli formati dai funghi filamentosi. Ciò è dovuto al fatto che le cellule di lievito che si formano dal processo di gemmazione, sono piuttosto differenti sia nella morfologia che nella modalità di crescita, rispetto alle cellule ifali dei funghi filamentosi. Sebbene molte specie di lievito siano dimorfiche e possano passare ad una modalità di crescita filamentosa quando colonizzano le superfici (Douglas, 2003), i biofilm formati dai funghi filamentosi presentano però delle caratteristiche morfologiche peculiari. In particolare, molti funghi producono, oltre alle ife invasive e/o alle strutture che si estendono tra l'interfaccia liquido-aria, anche delle strutture specializzate necessarie per la penetrazione, la sporulazione e l'acquisizione dei nutrienti. Tutte queste differenze nella morfologia e nella modalità di crescita complicano la conoscenza sui biofilm formati dai funghi filamentosi. La letteratura risulta essere ancora carente di informazioni inerenti ai biofilm di funghi filamentosi, e questo probabilmente è dovuto al fatto che questi microrganismi non si adattano in modo preciso alla definizione

restrittiva dei biofilm basata su modelli batterici (Harding et al., 2009). Vi sono però alcune caratteristiche legate alla biologia dei funghi che consentono di distinguere i biofilm fungini da quelli batterici.

Harding e collaboratori (2009) proposero dei criteri per la formazione di biofilm da parte dei funghi filamentosi che riguardano sia alcune caratteristiche strutturali (crescita fungina aggregata, crescita delle cellule associate a una superficie ed incorporazione delle cellule in una matrice polimerica extracellulare prodotta dalle cellule stesse) sia un'alterata espressione genica che si traduce in cambiamenti fenotipici (aumentata tolleranza a composti antimicrobici o biocidi, cambiamenti nella produzione e/o rilascio di enzimi e metaboliti e cambiamenti fisiologici). Gli stessi autori, inoltre, hanno proposto un modello, seppur preliminare, per descrivere la formazione dei biofilm da parte dei funghi filamentosi (Fig. 1.1). Secondo questo modello, la formazione del biofilm si articola in sei fasi distinte, che possono essere sintetizzate come segue: 1) Adsorbimento o contatto fisico del microorganismo con una superficie che include anche la deposizione di spore, frammenti ifali o sporangi; 2) Attacco attivo alla superficie, fase che implica spesso la secrezione di sostanze adesive da parte delle spore germinanti; 3) Formazione di microcolonie di tipo I con conseguente elongazione apicale e ramificazione delle ife a cui si associa la produzione di matrice cellulare che consente un attacco tenace delle colonie al substrato; 4) Maturazione iniziale che decorre con la formazione di microcolonie di tipo II e/o con la genesi di una rete ifale stratificata estremamente compatta; 5) Maturazione o sviluppo riproduttivo caratterizzato dalla formazione di corpi fruttiferi, sclerozi o altre strutture viventi; 6) Dispersione o fase planctonica che implica il rilascio e la dispersione di spore o altri frammenti che possono poi iniziare di nuovo il ciclo.

Un interessante aspetto inerente alla biologia dei funghi e che non ha una controparte nei biofilm batterici è dato dalla componente aerea. La morfogenesi aerea fungina richiede la secrezione di proteine che prendono il nome di idrofobine. Queste sono proteine a basso peso molecolare (7000-10000 Da) ricche in residui di cisteina, esclusive dei funghi filamentosi, che risultano essere importanti per lo svolgimento di un ampio spettro di funzioni associate alla crescita ed allo sviluppo di questi organismi. Le idrofobine sono coinvolte non solo nella formazione delle strutture aeree ma anche nell'attacco delle ife alle superfici idrofobiche (Wosten, 2001). Nei funghi, infatti, possono funzionare anche come molecole adesive. È stato dimostrato che in molti casi l'adsorbimento delle strutture fungine alle superfici è mediato dalle stesse idrofobine.

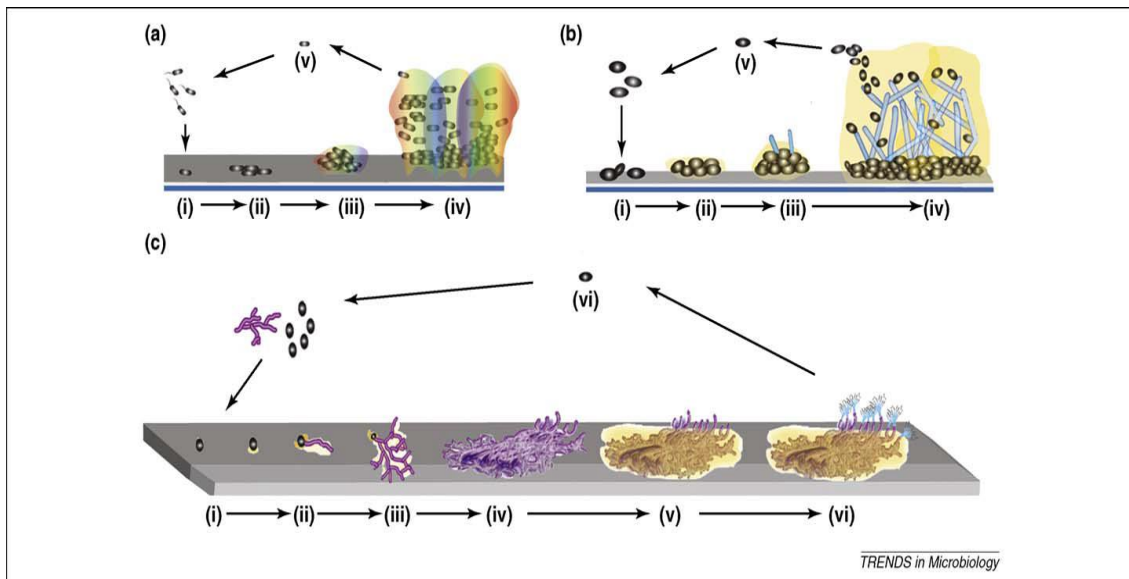


Fig. 1.1 Modelli di sviluppo del biofilm in batteri, lieviti e funghi filamentosi. Nei batteri (a) e in *Candida albicans* (b), sono articolati generalmente in cinque fasi distinte: (i) assorbimento, (ii) adesione, (iii) formazione di microcolonie, (iv) maturazione del biofilm, e (v) dispersione. Il modello per la formazione del biofilm nei funghi filamentosi (c) comprende le seguenti fasi: (i) assorbimento, (ii) attacco attivo al substrato, (iii) formazione di microcolonie I, (iv) formazione di microcolonie II, (v) sviluppo del biofilm maturo, e (vi) dispersione o ritorno alla fase planctonica.

Infatti, risultano coinvolte nell'attacco delle ife a substrati solidi e nell'adsorbimento dei funghi patogeni alla superficie dei loro organismi ospiti. La caratteristica peculiare di queste proteine è che si possono auto-assemblare all'interfaccia idrofilica-idrofobica e possono alterare le proprietà della superficie ifale in risposta a stimoli ambientali. Le idrofobine formano anche degli strati designati a sigillare le aggregazioni ifali in strutture più complesse.

In base alla distribuzione dei residui di cisteina nella struttura primaria delle idrofobine, esse vengono raggruppate in due classi, denominate I e II. Le idrofobine di classe I vengono prodotte sia dai funghi basidiomiceti che dagli ascomiceti, mentre quelle di classe II sono esclusive degli ascomiceti. I biofilm formati dai funghi filamentosi che producono l'una o l'altra classe di proteine sono caratterizzati dall'aver un diverso grado di stabilità. Infatti, i biofilm formati da quei funghi che producono le idrofobine di classe I risultano

essere molto stabili (solubilizzabili solo con acido formico o acido trifluoroacetico puro) mentre quelli in cui vi è la produzione di idrofobine di classe II risultano molto meno stabili (solubilizzabili anche con trattamenti più blandi quali etanolo al 60% oppure SDS caldo al 2%) (Armenante, 2008).

1.1.7 Vantaggi associati alla crescita in biofilm

E' noto che la formazione del biofilm costituisce la strategia di crescita microbica più diffusa in molti degli ecosistemi naturali (Stoodley et al., 2002).

Come già descritto precedentemente, uno dei componenti principali del biofilm è rappresentato dal materiale polisaccaridico extracellulare secreto dalle cellule che compongono il biofilm stesso. L'EPS gioca un ruolo fondamentale sia nella struttura che nella funzione del biofilm. Esso rappresenta l'interfaccia tra il biofilm stesso e l'ambiente in cui si trova e molti dei vantaggi del biofilm sono proprio da attribuirsi ad esso. Infatti, la matrice di EPS ha la potenzialità di prevenire l'accesso di alcuni agenti antimicrobici all'interno del biofilm agendo come uno scambiatore di ioni e limitando, quindi, la diffusione di vari composti dall'ambiente circostante al biofilm (Gilbert et al., 1997) caratteristica, questa, dipendente dalla natura sia dell'agente antimicrobico sia della matrice esopolisaccaridica. I biofilm quindi rappresentano un vantaggio, anche a livello evolutivo permettendo la sopravvivenza delle cellule microbiche anche in ambienti ostili.

Innanzitutto, è evidente come i biofilm siano in grado di svilupparsi in condizioni di carenza di nutrienti o in ambienti estremamente oligotrofici. Infatti, i nutrienti necessari per lo sviluppo dei microrganismi, seppur presenti in basse concentrazioni nell'ambiente in cui il biofilm si forma, vengono intrappolati all'interno della complessa architettura dell' EPS. Inoltre, l'elaborata architettura del biofilm fornisce anche l'opportunità di cooperazione metabolica, favorendo quindi un ambiente ideale per le relazioni sintrofiche. Il sintrofismo è un esempio di simbiosi che si instaura tra due specie microbiche metabolicamente distinte, le quali dipendono l'una dall'altra per l'utilizzo di determinati substrati. Tale processo è possibile per il fatto che, generalmente, i biofilm sono delle comunità etero-specifiche di microrganismi, di conseguenza i prodotti di scarto delle vie cataboliche di un determinato microrganismo possono essere una fonte di energia ottimale per un altro (Schink, 1997).

Inoltre, le cellule cresciute in biofilm sono caratterizzate dall'aver una maggiore tolleranza a stress chimici, biologici e fisici rispetto alla loro controparte planctonica. La resistenza ad alcuni di questi fattori di stress è imputabile, ancora una volta, alla presenza della matrice extracellulare. L'EPS, infatti, fornisce protezione dalle radiazioni ultraviolette, dai cambiamenti di pH, dallo stress osmotico nonché, essendo una struttura altamente idratata, dall'essiccamento. La strategia di crescita che porta alla formazione dei biofilm, quindi, da origine a una comunità molto più resistente all'azione di fattori di stress inclusa la presenza di metalli pesanti e contaminanti organici persistenti (Sauer, 2003; Kidambi et al., 1995). Anche la capacità dei biofilm di resistere in ambienti in cui sono presenti i metalli è imputabile all'EPS essendo quest'ultimo in grado di sequestrare non solo tossine ma anche di legare i metalli pesanti.

Anche la presenza di canali per l'acqua, che rappresentano una caratteristica fondamentale nella struttura dei biofilm microbici, è vantaggiosa. Attraverso questi canali avvengono gli scambi di nutrienti e metaboliti con la fase acquosa aumentandone quindi la disponibilità nonché la rimozione di metaboliti potenzialmente tossici (Kokare et al., 2009).

I biofilm inoltre forniscono un'ideale nicchia per lo scambio di DNA extracromosomiale; il processo di coniugazione avviene ad un tasso più elevato tra le cellule cresciute in biofilm piuttosto che tra quelle presenti in colture planctoniche. Questo è probabilmente dovuto al fatto che le cellule in un biofilm sono molto vicine tra di loro e comunicano tramite stabili interazioni cellula-cellula (Donlan, 2002; Hausner and Wuertz, 1999).

1.1.8 Aspetti ambientali dei biofilm

La contaminazione ambientale da metalli pesanti e/o da sostanze organiche di differente natura rappresenta una delle principali emergenze sia a livello nazionale che internazionale. Le tradizionali strategie impiegate per il recupero di suoli contaminati da tali sostanze si basano principalmente su approcci chimico-fisici che sono però proibitivi a livello economico, soprattutto per il trattamento di vaste aree, e creano spesso, a loro volta, problemi a livello ambientale (Blowes, 2002). Pertanto, sia a livello nazionale che internazionale, è nata l'esigenza di mettere a punto un'efficiente strategia di biorisanamento accettabile dal punto di vista economico e soprattutto a basso impatto ambientale. Un notevole contributo allo sviluppo di un efficace sistema di biorisanamento

può essere dato da una maggiore conoscenza sullo sviluppo di biofilm microbici. I biofilm microbici, infatti, sono in grado di contrastare in modo più efficiente dei microrganismi cresciuti in colture planctoniche, gli stress ambientali (carenza di nutrienti, improvvisi cambiamenti di pH, sostanze tossiche, situazioni di siccità, etc.) e di degradare o inattivare inquinanti ambientali. I meccanismi che conferiscono resistenza e tolleranza agli stress da parte dei biofilm microbici risultano essere ancora poco conosciuti. Studi recenti hanno ipotizzato che la tolleranza dei biofilm possa essere legata a molteplici fattori tra i quali: l'eterogeneità metabolica della comunità microbica dipendente dalla struttura del biofilm, la ridotta diffusione o il sequestro delle sostanze tossiche nella matrice esterna, nonché la presenza nella comunità di cellule specializzate altamente resistenti che vengono definite "persistenti" e che rappresentano delle varianti fenotipiche del ceppo wild-type (Coenye et al., 2011). Le interazioni tra le popolazioni microbiche che costituiscono un biofilm creano gradienti redox che possono promuovere il processo di mineralizzazione, attraverso la combinazione di processi aerobici e anaerobici, anche di composti che sono difficilmente degradabili. Nella matrice dei biofilm, caratterizzata da un alto grado di eterogeneità per la presenza di numerosi microambienti, si possono creare nicchie nelle quali specifici gruppi di degradatori a lenta crescita possono sopravvivere (Singh et al., 2006).

Tuttavia, nonostante i significativi progressi conseguiti in questa area, le informazioni circa i complessi meccanismi che sovrintendono alla crescita in biofilm e sulle relazioni che intercorrono tra biofilm microbici, contaminanti e ambiente risultano essere ancora poco comprese. La quasi totalità degli studi finalizzati alla comprensione delle relazioni che intercorrono tra le cellule durante la maturazione del biofilm sono stati condotti su biofilm monospecifici di interesse clinico. Nell'ambiente, invece, la maggior parte dei biofilm risulta essere costituita da microrganismi appartenenti a specie diverse di eucarioti e di procarioti. La cooperazione tra le specie all'interno di un biofilm costituisce un elemento chiave nel determinare le caratteristiche fisiologiche e le capacità di degradazione dei microrganismi; ad esempio è stato osservato che biofilm misti (*Penicillium/Bacillus*) portano ad un incremento della degradazione del polietilene presente nell'ambiente (Seneviratne et al., 2006). L'interazione di microrganismi diversi assume un ruolo fondamentale soprattutto in ambienti co-contaminati da metalli pesanti e inquinanti organici. Inoltre, l'uso di biofilm misti consente lo sviluppo di nuove applicazioni biotecnologiche in campo ambientale (Seneviratne et al., 2007). I biofilm quindi, per la capacità di aderire ai substrati, per la resistenza a metalli pesanti ed inquinanti organici, per

l'elevata carica microbica (che facilita la mineralizzazione delle sostanze organiche) e per la capacità di immobilizzare composti organici ed inorganici tramite bioadsorbimento (sequestro per interazione tra inquinanti e biomassa microbica), bioaccumulo (aumento della concentrazione dell'inquinante nella cellula) e bioprecipitazione (formazione di precipitati insolubili per le interazioni con prodotti metabolici microbici), possono essere considerati dei validi candidati nei processi di risanamento di suoli inquinati da composti organici persistenti e da metalli pesanti (D'Annibale et al., 2006). Ciò nonostante, sono necessari ulteriori studi per arrivare ad applicare con successo e su larga scala strategie che impiegano i biofilm microbici per il recupero di ambienti contaminati.

1.1.9 Aspetti clinici dei biofilm

Gli studi condotti sui biofilm fungini hanno riguardato soprattutto aspetti di carattere clinico. Le infezioni dovute alla presenza dei biofilm microbici rappresentano una delle principali sfide per la medicina moderna. Infatti, è noto che i biofilm microbici sono i responsabili di circa il 65% delle infezioni umane di cui il primo e più semplice esempio è rappresentato dalla formazione della placca sulla superficie dei denti (Potera, 1999).

Molte delle malattie, che si manifestano nell'uomo, sono dovute allo sviluppo di microrganismi in forma filmogena sulle superfici di dispositivi medici quali ad esempio cateteri, protesi valvolari cardiache e protesi articolari (Donlan, 2001). Indagini di microscopia elettronica a scansione hanno mostrato che le superfici interne dei cateteri, dei tubi e delle sacche di drenaggio sono comunemente ricoperte da microrganismi immersi in una matrice polisaccaridica. Solitamente il primo passo nella formazione del biofilm si ha immediatamente dopo l'inserimento del dispositivo medico la cui superficie viene ricoperta dalle sostanze presenti nei fluidi corporei dell'ospite, primo fra tutte le proteine. I microrganismi possono aderire alla superficie del dispositivo in modo dipendente dall'idrofobicità sia del microrganismo sia del dispositivo stesso. Una volta adesi alla superficie, i microrganismi possono passare dallo stato di adesione reversibile a quello irreversibile, grazie all'interazione tra le sostanze polisaccaridiche prodotte dai microrganismi e le sostanze prodotte dall'organismo ospite portando quindi allo sviluppo di un biofilm spesso e fortemente adeso (Ohkawa et al., 1990).

Vi sono anche esempi di malattie croniche, quali la fibrosi cistica, correlate alla formazione dei biofilm direttamente sui tessuti e non su dispositivi medici ma i dati al riguardo risultano essere molto più carenti (Donlan e Costerton, 2002).

I meccanismi della patogenesi dei biofilm includono:

- distacco di aggregati o cellule dai biofilm con diffusione in altri distretti;
- produzione di endotossine;
- resistenza al sistema immunitario anche attraverso plasmidi di resistenza derivanti dai processi di coniugazione;
- ridotta suscettibilità delle cellule nei biofilm agli agenti antimicrobici.

1.1.10 Metodi di studio dei biofilm

Negli ultimi anni sono stati descritti vari metodi e sistemi per studiare *in vitro* sia le fasi dello sviluppo sia la struttura dei biofilm microbici (McLean et al., 2004). Questi possono, sulla base del parametro da considerare, essere classificati in i) saggi per la quantificazione della biomassa dei biofilm, che non discriminano cellule vitali da quelle che non lo sono; ii) saggi di vitalità, che consentono di quantificare le cellule vitali e iii) saggi di quantificazione della matrice polisaccaridica che si basano sull'utilizzo di coloranti in grado di legarsi in modo specifico alle varie componenti della matrice stessa (Peeters et al., 2008).

Il **crystal violetto** (CV) è un colorante basico che si lega alla superficie di molecole cariche negativamente e ai polisaccaridi presenti nella matrice extracellulare (Li et al., 2003). Visto che sia le cellule, indipendentemente dalla vitalità, sia la matrice polisaccaridica vengono colorate dal CV, quest'ultimo risulta essere poco adatto per effettuare saggi di vitalità del biofilm (Pitts et al., 2003).

Il colorante fluorescente **Syto9** colora l'acido nucleico diffondendo passivamente attraverso le membrane cellulari ed andandosi a legare al DNA delle cellule sia vitali che morte (Boulos et al., 1999). Visto che il DNA è anche una parte sostanziale della matrice extracellulare (Whitchurch et al., 2002), questo colorante fornisce informazioni sulla biomassa totale del biofilm. Syto 9 viene anche utilizzato in studi di microscopia confocale a scansione laser (CSLM) per la determinazione della composizione e morfologia dei

biofilm (Strathmann et al., 2002). Questo colorante è usato anche per quantificazioni di routine della biomassa di biofilm batterici e di lievito (Honraet et al., 2005; Honraet e Nelis, 2006).

Per discriminare tra cellule vitali e non, sono disponibili tecniche di quantificazione basate sulla valutazione dell'attività metabolica. Diversi saggi implicano l'uso di sali di tetrazolio come ad esempio l'**XTT** (2,3-bis(2-metossi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilammino)carbonil]-2-H-idrossido di tetrazolio) (McCluskey et al., 2005). Si tratta di un saggio colorimetrico basato sulla riduzione di tale sale a formazano solubile in acqua. Il valore di assorbanza che si legge risulta essere proporzionale al numero di cellule microbiche metabolicamente attive. Il saggio di riduzione dell'XTT è stato usato estensivamente per la quantificazione di cellule vitali in colture planctoniche (Gabrielson et al., 2002) e in biofilm batterici (Berit et al., 2002; Pettit et al., 2005) e di lievito (Honraet et al., 2005).

Un altro saggio finalizzato a valutare la vitalità si basa sulla riduzione della **resazurina** da parte delle cellule metabolicamente attive. Questo è un composto blu che quando viene ridotto porta alla formazione della resorufina, un composto organico rosa che risulta essere fluorescente (O'Brien et al., 2000).

Interessante è anche la quantificazione della matrice presente nel biofilm. Il colorante 1,9-dimethylmethylen blu (**DMMB**), originariamente utilizzato per quantificare i glicosamminoglicani solfati presenti nei condrociti, è stato anche usato per quantificare la matrice polisaccaridica del biofilm di *S. aureus* (Totè et al., 2007). Il DMMB forma un prodotto di complessazione insolubile con i polisaccaridi solfati presenti nella matrice del biofilm. L'ammontare di colorante che viene rilasciato a seguito dell'aggiunta di una soluzione di decomplessazione viene misurato spettrofotometricamente e il valore ottenuto riflette la quantità di polisaccaridi solfati presenti nella matrice del biofilm (Barbosa et al., 2003).

La maggior parte delle conoscenze che abbiamo sull'ultrastruttura dei biofilm sono state ottenute grazie alla microscopia confocale a scansione laser (CSLM) e alla microscopia elettronica a scansione (SEM). molte informazioni relative allo sviluppo, composizione, distribuzione e relazione con il substrato derivano da studi effettuati attraverso il SEM (Bragadeewaran et al., 2010). Inoltre, l'applicazione del CLSM alla ricerca sui biofilm ha radicalmente alterato la nostra percezione sulla struttura e funzione dei biofilm (Lawrence et al., 1991). Questo è infatti uno strumento comunemente utilizzato per l'analisi del

biofilm permettendo di ottenere informazioni circa la struttura tridimensionale del biofilm e l'identificazione e distribuzione di diversi composti utilizzando coloranti fluorescenti (Denkhaus et al., 2007).

1.2 Funghi agenti di carie bianca (*white rot*)

I funghi *white rot*, appartenenti generalmente alla classe dei basidiomiceti, sono considerati i degradatori di lignina più efficienti in natura. Questi microrganismi colonizzano il legno, invadono il lume delle cellule vegetali e rilasciano ossidasi esocellulari in grado di degradare la lignina. La denominazione *white rot* deriva proprio dall'aspetto bianco e fibroso che il legno assume quando viene attaccato da questi funghi in quanto la degradazione della lignina in concomitanza all'accumulo di ossidi di manganese determinano una colorazione biancastra nel materiale legnoso sottoposto a questo tipo di degradazione (Blanchette et al., 1987).

I funghi *white rot* hanno sviluppato, nel corso dell'evoluzione, un sistema degradativo aspecifico basato sulla produzione di un gruppo di enzimi extracellulari che agiscono sui vari substrati attraverso meccanismi radicalici. La bassa specificità di substrato di tale sistema enzimatico permette a questi organismi di degradare un'ampia varietà di composti organici tra cui numerose molecole di sintesi chimica ad elevata persistenza che, essendo estranee ai processi biologici, risultano nocive sia all'ambiente che alla salute umana. Ne sono un esempio i composti recalcitranti come i pesticidi clorurati (Kennedy et al., 1990), gli idrocarburi policiclici aromatici (Bumpus 1989) e i bifenili policlorurati (Fernando et al., 1990). Le capacità degradative dei funghi *white rot* consentono una loro applicazione nei processi di micorisanamento, trattamento biologico basato sui funghi per la bonifica di siti contaminati.

I funghi *white rot* vengono classificati in cinque gruppi principali, a seconda del tipo di substrato colonizzato e del tipo di enzimi ossidativi rilasciati:

- 1) al primo gruppo appartengono quei microrganismi, tra cui *Coriolus versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Phlebia radiata* (Ander et al., 1980; Eriksson et al., 1983), che producono lignina perossidasi, manganese perossidasi e laccasi;
- 2) il secondo gruppo comprende i funghi con attività manganese perossidasi e laccasi; essi, pur non producendo lignina perossidasi, sono comunque degli

efficienti degradatori della lignina. Appartengono a questo gruppo *Dichomitus squalens*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* e *Panus tigrinus* (Galliano et al., 1991; Giovannozzi Sermanni et al., 1994);

- 3) nel terzo gruppo si inseriscono quei funghi che rilasciano lignina perossidasi associata prevalentemente alla laccasi; infatti, solo nel fungo *Coriolus pruinosum* tale associazione avviene con la manganese perossidasi;
- 4) il quarto gruppo include quei funghi che rilasciano solo la lignina perossidasi;
- 5) il quinto gruppo è costituito da quelle specie fungine non ancora completamente caratterizzate, tra cui *Fomes lignosus* e *Trametes cingulata*, che sono in grado di demolire la lignina anche se in essi non è stato rilevato alcuno dei suddetti enzimi ossidativi (Tour et al., 1995).

1.2.1 Enzimi ligninolitici prodotti dai funghi “white-rot”

Il corredo di enzimi ligninolitici prodotti dai funghi *white rot*, consiste principalmente di perossidasi (Mn-perossidasi e lignina-perossidasi), fenolossidasi (laccasi) ed un insieme di enzimi di supporto (ossidasi che producono H₂O₂) quali, ad esempio, glucosio ossidasi e aril-alcool ossidasi (Fakoussa e Hofrichter, 1999).

La **lignina perossidasi** (LiP; EC 1.11.1.14, Diarilpropano: perossido di idrogeno ossido reductasi) è l'enzima ligninolitico più studiato. Fu scoperto per la prima volta nel fungo *Phanerochaete chrysosporium* (Glenn et al., 1983). Si tratta di una glicoproteina che contiene come gruppo prostetico un gruppo eme (ferro protoporfirinico IX) e richiede il perossido di idrogeno per la sua attività catalitica (Gold et al., 1984; Tien e Kirk, 1984). La LiP è espressa in forme enzimatiche multiple, isoenzimi, con peso molecolare compreso tra 38 e 47 kDa e punti isoelettrici tra 3.2 e 4.7 (Hatakka, 1994). La LiP ha una bassa specificità di substrato per i composti aromatici e ossida sia strutture fenoliche che non fenoliche, preferendo quelle metossi-sostituite, grazie al suo potenziale redox ($E^{\circ} > +1.5$ V) (Kernesten et al., 1990). I composti fenolici vengono convertiti in fenossiradicali e quindi in chinoni che, a loro volta, possono anche polimerizzare (Odier et al., 1988) mentre i composti aromatici non fenolici sono ossidati a cationi radicali arilici. La LiP è un enzima estremamente fragile, che può essere inattivato dal suo stesso co-substrato, il perossido di

idrogeno, e da sostanze fenoliche (Chung e Aust, 1995). Per questo motivo un suo utilizzo applicativo sembra essere poco praticabile.

La **manganese perossidasi** (MnP, EC 1.11.1.13., Mn(II): perossido d'idrogeno ossidoreduttasi), è stata scoperta anch'essa in *P. chrysosporium* (Kuwara et al., 1984). Agisce in modo preferenziale sui substrati fenolici, utilizzando la coppia redox Mn(II)/Mn(III), come intermediario (Glenn e Gold, 1985). Tuttavia, alcuni studi presenti in letteratura riportano la capacità della MnP di ossidare anche substrati non fenolici caratterizzati da elevato potenziale redox, quali alcoli benzilici metossi-sostituiti (Buswell et al., 1995; D'Annibale et al., 1996). La capacità catalitica della MnP è incrementata dalla presenza di appropriati mediatori, quali tioli (Forrester et al., 1988; Hofrichter et al., 1998), lipidi, acidi grassi insaturi e loro derivati (Kapich et al., 1999), acidi organici (malico, ossalico, tartarico etc.) che agiscono da agenti chelanti del Mn(III) (Warishii et al., 1992) e facilitano l'ossidazione di vari composti aromatici (Hofrichter et al., 1998) e acidi organici (Perez e Jeffries, 1992; Hofrichter et al., 1998). Anche la MnP è un enzima extracellulare glicosilato, che contiene un gruppo eme (Glenn e Gold, 1985), espressa in forme isoenzimatiche multiple, con pesi molecolari compresi tra 38 e 50 kDa e punti isoelettrici tra 2.9 e 7 (Fakoussa e Hofrichter, 1999).

La **laccasi** (EC 1.10.3.2., *p*-benzenediolo: O₂ ossidoreduttasi) è una fenolossidasi con bassa specificità e quindi una capacità di ossidare un'ampia varietà di substrati aventi potenziale redox minori di 0.8-0.9 V (D'Annibale et al., 1996).

La laccasi è una proteina che contiene rame e per questo è conosciuta anche come "ossidasi a rame blu" (Reinhammar e Malstrom, 1981). Questo enzima è prodotto da quasi tutti i funghi ligninolitici quali, *Trametes versicolor* (Fahaereus e Reinhammar, 1967), *P. radiata* (Kantelinen et al., 1989), *Pycnoporus cinnabarinus* (Eggert et al., 1996), *N.frowardii* (Hofrichter e Fritsche, 1997) e anche da molti altri funghi, come *Neurospora Crassa*, *Aspergillus nidulans* (Thurston, 1994), e piante superiori, quali *Nicotiana tabacum* e *Acer pseudoplatanus* (O'Malley et al., 1993).

Le laccasi sono prevalentemente glicoproteine monomeriche extracellulari con un contenuto variabile di carboidrati (5-45%); i residui glicosidici più comunemente ritrovati sono il mannosio, il galattosio e il glucosio, prevalentemente legati all'azoto dei residui di asparagina. La porzione glicosidica non ha un ruolo diretto sull'attività enzimatica; tuttavia, laccasi sottoposte a deglicosilazione si sono dimostrate più sensibili sia all'attacco proteolitico che alle elevate temperature. Sembra quindi probabile che la presenza di

carboidrati abbia un ruolo nella stabilizzazione e protezione dell'enzima in condizioni potenzialmente denaturanti. La laccasi può essere espressa in forme enzimatiche multiple, con pesi molecolari (59-110 kDa) e potenziali redox (0.4-0.8 V) molto variabili (Xu, 1997).

Tale enzima catalizza l'ossidazione di composti fenolici tramite la sottrazione di un elettrone e la formazione di un fenossiradicale, con la contemporanea riduzione di ossigeno ad acqua. Tali radicali generati enzimaticamente possono soggiacere a varie reazioni non enzimatiche, tra le quali l'accoppiamento ossidativo che porta alla formazione di oligomeri e polimeri o, in alternativa, si possono ottenere dei chinoni (Bollag et al., 1988). Si pensa che questa funzione sia utile, a livello fisiologico, per neutralizzare l'azione potenzialmente citotossica dei fenoli e semichinoni mediante la loro conversione in polimeri (Haars e Huermann, 1981).

1.2.1.1 Applicazioni degli enzimi ligninolitici

Gli enzimi ligninolitici hanno molte applicazioni sia in campo ambientale che in quello industriale.

Applicazioni ambientali: sia la laccasi che la MnP sono state ampiamente studiate per la detossificazione di sostanze inquinanti in siti contaminati. La laccasi può immobilizzare composti tossici, quali aniline ed altri aromatici sia naturali che xenobiotici (tramite l'incorporazione negli acidi umici), in aggregati insolubili facilmente precipitabili (Bollag, 1992). Anche la Mn-perossidasi è in grado di ossidare un ampio spettro di composti aromatici, fenolici e non, tra i quali il 4-ammino-2-nitrotoluene e gli idrocarburi aromatici policiclici (Collins et al., 1996).

Questi enzimi rivestono un ruolo importante nella rimozione dei composti fenolici presenti nei reflui; la MnP e in particolar modo le laccasi sono in grado di ossidare fenoli come catecoli, tirosolo e idrossitirosolo, composti normalmente presenti nelle acque di scarico dei reflui oleari (Gianfreda et al., 1998). La laccasi è anche in grado di ossidare ammine aromatiche a chinoni e prodotti di accoppiamento ossidativo.

Applicazioni industriali: la laccasi e la MnP rivestono un ruolo importante nell'industria della carta per la loro capacità di degradare la lignina residua presente, ad esempio, nella pasta cellulosica.

Nel settore tessile la laccasi ha trovato largo impiego nei processi di eliminazione dei colori in eccesso durante la manifattura dei tessuti. Inoltre la laccasi e la MnP vengono sfruttate per la rimozione delle sostanze coloranti sintetiche, come trifenilmetano dagli effluenti di scarico (Schliephake e Lonegram, 1996).

Nel settore alimentare la laccasi viene sfruttata come agente stabilizzante di alcuni fenoli quali i flavonoidi nel trattamento di bevande quali vino, succhi di frutta e tè. Inoltre, le laccasi fungine vengono utilizzate per stimare il contenuto fenolico nei succhi di frutta naturali (Cliffe et al., 1994), per valutare la qualità igienica del mosto d'uva e per saggiare i livelli di α -glucosidasi e α -amilasi attraverso reazioni colorimetriche (Murao et al., 1985).

1.2.2 Il fungo white rot *Pleurotus ostreatus*

Pleurotus ostreatus (dal latino *ostrea*, "ostrica", per l'aspetto del cappello) è un organismo fungino che appartiene al phylum dei *Basidiomycota* (ordine Agaricales) ed alla famiglia delle Pleurotaceae. Le spore sono bianche, ellissoidali-subcilindriche, a contenuto granulare fitto e non amiloidi mentre il micelio appare biancastro e cotonoso. La forma è tipica e ricorda quella della conchiglia di un bivalve. Il gambo è laterale, molto corto o addirittura mancante, con il cappello che sembra essere attaccato direttamente al legno. Ha un colore che varia nelle diverse tonalità del bruno, del grigio, dell'ardesia e talvolta con sfumature violacee. *P. ostreatus*, noto come "gelone" per la sua crescita prevalentemente invernale, si può trovare attaccato al legno di numerose latifoglie. Può essere sia parassita, anche causa di carie e marciumi, sia saprotrofo, traendo nutrimento dalla sostanza organica morta. *P. ostreatus* molto apprezzato per la sua edibilità, è stato a lungo coltivato in Asia, sebbene ora sia diffuso in tutto il mondo. Tale fungo, oltre ad essere interessante dal punto di vista commerciale, lo è anche per le sue numerose potenziali applicazioni nei processi di bioconversione di lignocellulosa, di scarti agricoli o industriali nonché per essere fonte di enzimi e altri prodotti utili per numerose applicazioni sia industriali che mediche

1.2.3 Studi condotti su *Pleurotus ostreatus*

P. ostreatus è uno dei funghi più diffusi in tutto il mondo ed è oggetto di numerosi studi. E' stato impiegato in prove di biorisanamento di siti contaminati e nel trattamento di acque reflue essendo in grado di degradare un'ampia varietà di composti organici persistenti (Leonardi et al., 2007) e assorbire molti metalli pesanti (Xiangliang et al., 2005).

Le proprietà filmogene di *P. ostreatus* sono state studiate in relazione al biocontrollo (Jayasinghearachchi et al., 2006), alla solubilizzazione di rocce fosfatiche e alla fissazione biologica dell'azoto in biofilm misti con diazotrofi (Jayasinghearachchi et al., 2004). Inoltre, questo fungo risulta essere anche in grado di formare biofilm stabili in associazione con specie batteriche appartenenti al genere *Pseudomonas* (Jayasinghearachchi et al., 2006). Nel biofilm che si viene a costituire, il fungo fornisce al batterio un'ideale nicchia consentendo a quest'ultimo di costruirsi una sufficiente densità di popolazione ed agisce allo stesso tempo come vettore per il batterio.

P. ostreatus, essendo un *white rot*, possiede tutta una serie di enzimi ligninolitici che gli conferiscono la capacità di degradare un'ampia varietà di composti organici strutturalmente essa correlati alla lignina. Infatti, è in grado di degradare idrocarburi policiclici aromatici (IPA), bifenili policlorurati (PCB) e clorofenoli e, per tale ragione, è stato impiegato con successo nel biorisanamento di matrici contaminate da composti organici persistenti (Eggen et al., 1998). Tutti i ceppi di *P. ostreatus* sono in grado di decomporre in maniera selettiva i PCB mostrando una preferenza per quelle molecole aventi gli atomi di cloro in posizione orto>meta>para rispetto alla giunzione che connette i due anelli aromatici dello scheletro bifenilico. Inoltre, l'efficienza di degradazione diminuisce all'aumentare del grado di clorurazione. In studi condotti su suolo in condizioni non axeniche, *P. ostreatus* ha mostrato la capacità di rimuovere circa il 40% di una miscela commerciale di PCB a basso grado di clorurazione, il Delor 103, in due mesi rispetto a *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor*, i quali non hanno mostrato nessuna abilità nel degradare i PCB nel suolo (Kubàtovà et al., 2000).

Alcuni studi hanno mostrato come questo fungo sia in grado di degradare un'ampia varietà di IPA sia in coltura liquida (Bezalel et al., 1996) sia in fase solida su miscele di materiali lignocellulosici (Wolter et al., 1997). E' stata dimostrata una degradazione superiore al 25% della quantità iniziale di IPA contenenti dai quattro ai sei anelli aromatici, nella paglia

contenente una concentrazione iniziale di IPA di 10 ppm, mostrando una capacità di mineralizzazione degli IPA del 19-53% in 15 settimane. *P. ostreatus* è, inoltre, in grado di promuovere l'incorporazione di antracene, benzo[α]pirene e fluorantene nelle matrici umiche presenti nel suolo (Bogan et al., 1999).

Sebbene la degradazione degli IPA da parte di *P. ostreatus* sia stata studiata in dettaglio, c'è poca informazione riguardo al processo di degradazione che avviene nel suolo in presenza della microflora indigena. Infatti, nelle condizioni in situ, la microflora del suolo non solo contribuisce alla degradazione degli IPA ma è anche in grado di influenzare l'attività degradativa del fungo (Baldrian et al., 2000).

Inoltre, nonostante siano stati effettuati molti studi sulla degradazione degli IPA in suoli contaminati, poca attenzione è stata invece posta sugli effetti che i diversi fattori ambientali possono avere sul processo degradativo. Uno dei più seri problemi nei processi di decontaminazione è dato dalla presenza di diversi gruppi inquinanti quali i metalli pesanti. Il cadmio, ad esempio, è abbastanza ubiquitario e la sua presenza nel suolo si associa frequentemente a contaminazioni di tipo organico. Dalla letteratura è noto che i metalli pesanti presenti nel suolo sono in grado di influenzare l'attività degli enzimi ligninolitici prodotti dal fungo *P. ostreatus* (laccasi e Mn-perossidasi).

P. ostreatus suscita anche notevole interesse per le numerose applicazioni nel settore medico. Infatti i benefici medici forniti dal fungo includono l'ipercolesterolemia, gli effetti antitumorali, come anche il miglioramento dello status antiossidante durante il processo di invecchiamento. E' stato anche dimostrato che diversi estratti di *P. ostreatus* presentano distinte caratteristiche mediche e che il DNA isolato da questo fungo possiede potenzialità bioterapeutiche in topi affetti dal carcinoma di Ehrlich. Sebbene siano note le proprietà antiossidanti del fungo, gli studi sono stati incentrati su enzimi antiossidanti secreti dal fungo mentre poco è conosciuto sugli enzimi antiossidanti intracellulari di *P. ostreatus* (Keyhani et al., 2007).

1.3 I metalli pesanti: definizione e tossicità

L'industrializzazione globale ha condotto al rilascio nell'ambiente di metalli pesanti tossici e persistenti e responsabili di numerosi effetti ecologici gravi e duraturi nel tempo rappresentando quindi una seria minaccia non solo per l'ambiente stesso ma anche per gli animali, compreso l'uomo, in esso presenti.

Ogni anno, migliaia di tonnellate di metalli vengono introdotte nell'ambiente dalle attività minerarie ed industriali alle quali si aggiunge il rilascio dovuto alla lisciviazione naturale dei depositi minerari, delle rocce e alle emissioni vulcaniche.

La presenza dei metalli in molti degli ecosistemi naturali risulta, quindi, abbastanza ubiquitaria.

Con la definizione “metalli pesanti” vengono identificati quegli elementi che presentano le seguenti caratteristiche comuni:

- hanno una densità superiore ai 5 g/cm³;
- si comportano in genere come cationi;
- presentano una bassa solubilità dei loro idrati;
- hanno una spiccata attitudine a formare complessi;
- hanno diversi stati di ossidazione a seconda delle condizioni di pH.

Generalmente vengono considerati metalli pesanti elementi quali Ag, Ba, Cd, Co, Cr, Mn, Hg, Mo, Pb, Cu, Sn, Tl, Ti, V e Zn ed alcuni metalloidi, con proprietà simili, quali l'As, l'Sb, il Bi ed il Se. Tra questi, gli elementi più frequentemente associati a scenari di inquinamento sono: Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sn, Zn e Se (Salomon e Forstner, 1984; Adriano, 1986; Alloway, 1995).

I metalli pesanti inoltre si possono dividere in: metalli tossici (Hg, Cr, Pb, Zn, Cu, Ni, Cd, As, Co, Sn); metalli preziosi (Pd, Pt, Ag, Au, Ru) e radionuclidi (U, Th, Ra, Am) (Wang e Chen, 2006).

Il pericolo dovuto alla presenza nel suolo di metalli pesanti consiste nel possibile rilascio alle acque superficiali mediante fenomeni di erosione e ruscellamento superficiale, dalla possibilità di percolazione e inquinamento delle acque profonde in terreni con scarsa capacità di ritenzione e dall'assimilazione dell'inquinante da parte dei vegetali e il conseguente ingresso della sostanza tossica nella catena alimentare (bioaccumulo). Le concentrazioni dei metalli pesanti aumentano progressivamente nel passaggio attraverso i diversi anelli della catena biologica alimentare (biomagnificazione). Sotto il profilo biochimico, la tossicità dei metalli è causata dalla forte affinità dei cationi metallici per lo zolfo. Infatti i gruppi “sulfidrilici” (SH), normalmente presenti negli enzimi, si legano facilmente ai cationi dei metalli pesanti ingeriti o alle molecole che contengono tali metalli.

Dato che il complesso metallo-zolfo che ne risulta interessa tutto l'enzima, questo può non funzionare normalmente con conseguente danno per la salute.

Il potere tossico esercitato dai metalli pesanti dipende anche dalla struttura chimica di ciascun elemento, vale a dire dalla sua speciazione. Alcuni metalli pesanti (Hg, Cd, Pb, ecc.) sono tossici per lo sviluppo della biomassa microbica, altri a basse concentrazioni risultano essenziali alla vita microbica (Ni, Cu, Zn), sebbene a dosi più elevate risultano essere nocivi. Ciò nonostante vi sono dei microrganismi che, vivendo in aree contaminate da metalli pesanti, hanno evoluto caratteristiche di metallo-resistenza e/o metallo-tolleranza (Baldi, 2003).

1.3.1 Effetti dei metalli pesanti sui funghi *white rot*

I funghi *white rot* trovano numerose applicazioni nei processi di biorisanamento e negli ultimi anni è stata posta l'attenzione sugli effetti che i metalli pesanti possono avere su questi organismi fungini. Affinché si espliciti la tossicità del metallo, è necessario che avvenga il contatto tra le specie attive del metallo stesso e le varie componenti cellulari (Gadd e White, 1989). La membrana cellulare rappresenta il sito iniziale di attacco per il metallo e il danno che questo può apportare alla membrana è dato dalla perdita di soluti cellulari mobili, come ad esempio il K^+ , e dall'aumentata permeabilità della cellula ai materiali esterni (Norris e Kelly, 1977). I meccanismi indiretti della tossicità dei metalli coinvolgono tutti quei processi che portano alla formazione dei radicali liberi che risultano essere deleteri per le cellule.

Alcuni metalli pesanti sono essenziali per il metabolismo dei funghi; altri, invece, non hanno alcun ruolo biologico. Sebbene i funghi abbiano delle richieste metaboliche specifiche per i metalli in traccia, gli stessi metalli sono spesso tossici a concentrazioni solo di poco più alte di quelle richieste (Hughes et al., 1991). Nei funghi agenti di carie bianca, alcuni ioni metallici partecipano in modo diretto ai processi di degradazione della lignina. Il manganese, ad esempio, gioca un ruolo importante sia nell'espressione della Mn-perossidasi e laccasi, sia nei processi di degradazione della lignina mentre il rame viene utilizzato come cofattore nel sito catalitico della laccasi.

Metalli quali il cromo, il cadmio, il mercurio e l'argento, non solo non sono elementi essenziali, ma risultano essere altamente tossici anche se presenti a basse concentrazioni. Questi metalli esplicano la loro tossicità agendo sulla crescita, sui processi riproduttivi,

sulle varie attività metaboliche, sulla morfologia del micelio nonché su alcune attività enzimatiche (Baldrian, 2003). In generale, i metalli pesanti causano una riduzione della crescita, seguita da cambiamenti morfologici in tutti i funghi tanto che alcuni di essi cambiano il colore del micelio in loro presenza. I metalli pesanti in genere sono potenti inibitori di alcune reazioni enzimatiche e possono causare un danno ossidativo alle proteine attraverso il loro legame ai residui amminoacidici presenti negli enzimi (Vallee et al., 1972). Il mercurio, ad esempio, esercita i suoi effetti tossici principalmente attraverso il legame ai gruppi -SH presenti nei siti attivi degli enzimi causando l'inattivazione irreversibile dell'enzima. Il rame e il cadmio, in seguito al legame ai residui amminoacidici aromatici, possono anche causare un danno ossidativo delle proteine come conseguenza dell'induzione dello stress ossidativo associato alla produzione di specie reattive dell'ossigeno come, ad esempio, i radicali ossidrilici e gli anioni superossido (Stohs et al., 1995). Nei funghi *white rot*, particolare attenzione è stata rivolta alla tossicità che i metalli hanno nei confronti degli enzimi extracellulari. Questi enzimi, essendo rilasciati nell'ambiente extracellulare, risultano spesso sottoposti ad alte concentrazioni di metalli. Una volta entrati nelle cellule, inoltre, i metalli possono anche influenzare la produzione degli enzimi stessi agendo a livello della trascrizione e traduzione dei geni corrispondenti. Ciò nonostante molti microrganismi fungini mettono in atto dei meccanismi di difesa sia intracellulari, che coinvolgono la sintesi di composti chelanti a basso peso molecolare a base peptidica (Howe et al., 1997) sia extracellulari, che portano alla sintesi e alla secrezione di polisaccaridi extracellulari, di composti melanino-simili e di acido ossalico (Gadd, 2004). Ad esempio, alcune melanine fungine sono efficienti nei processi di bioassorbimento del rame (Gadd e De Rome, 1988) o di altri composti tossici (Gadd et al., 1990). La produzione di acido ossalico, invece, è importante nei processi di immobilizzazione, portando a una diminuzione della biodisponibilità e aumentando nei funghi produttori la tolleranza ai metalli (Sayer e Gadd, 1997).

1.3.2 Cadmio ed effetti di tossicità

Il Cadmio è uno dei componenti più pericolosi presente nei rifiuti sia industriali che municipali, con effetti cancerogeni e mutageni (Beyersmann 1994; Koeleman et al., 1999; Zeng et al., 2010). Il cadmio non riveste alcun ruolo biologico e sia esso che i suoi

composti risultano tossici perfino a basse concentrazioni e tendono ad accumularsi negli organismi e negli ecosistemi. Il Cadmio è un agente citotossico, e agisce come potente inibitore di diversi sistemi enzimatici mostrando particolare affinità di legame per i gruppi sulfidrilici, idrossilici e per i ligandi contenenti azoto (Gadd, 1992). Esso è in grado di indurre la formazione di radicali liberi come risultato delle sue reazioni con gruppi tiolici o con gli enzimi che normalmente svolgono un ruolo di protezione da queste specie reattive (Splittgerber e Tappel, 1979; Singhal et al., 1987). Il cadmio è un metallo altamente tossico per quasi tutti gli organismi viventi, compreso l'uomo, tanto che la sua tossicità ha suscitato notevole interesse nel corso degli anni visto l'impatto che esso può avere sulla salute soprattutto con effetti a lungo termine. La tossicità del cadmio è stata ampiamente studiata nelle piante, sebbene sia il meccanismo di tossicità sia la risposta delle cellule al metallo non risulta essere ancora del tutto ben stabilita. Molte piante sono sensibili al cadmio anche se presente a basse concentrazioni in quanto esso inibisce la crescita della pianta alterando il processo di fotosintesi nonché il trasporto e la distribuzione di macro e micronutrienti (Benavides et al., 2005). E' noto dalla letteratura che il contenuto di cationi polivalenti può essere affetto dalla presenza del Cd attraverso la competizione per i siti di legame posti sulle proteine o sui trasportatori. Infatti, in molte specie di piante, il Cd porta ad un decremento del calcio (Sandalio et al., 2001) che è coinvolto nella regolazione del metabolismo delle piante e nella trasduzione del segnale con conseguente alterazione di tali processi (Rentel e Knight., 2004).

Poco è invece noto circa la risposta al cadmio da parte dei microrganismi e, in modo particolare, dei microrganismi del suolo. La quantità di cadmio disponibile è parzialmente dipendente dalla capacità di scambio cationico (CSC) dell'ambiente, la quale, a sua volta dipende dal contenuto in sostanza organica e in minerali argillosi, quali la montmorillonite e la caolinite. L'effetto protettivo di quest'ultimi nei confronti del cadmio è legato al fatto che questi presentano una elevata CSC e una capacità di assorbire elevate quantità di cadmio esogeno (Babich e Stotzky, 1977a). Studi condotti in coltura pura hanno mostrato che varie specie di batteri, inclusi gli attinomiceti, e di funghi mostrano una sensibilità differente al cadmio (Babich e Stotzky, 1977b) e che la tossicità di tale metallo sui microrganismi potrebbe essere diminuita dall'incorporazione di cisteine (Tynecka et al., 1974), zinco e magnesio (Laborey e Lavollay, 1973), agenti chelanti (Upitis et al., 1973) e minerali argillosi (Babich e Stotzky, 1977b).

Una maggiore tossicità del cadmio si verifica in condizioni aerobiche piuttosto che anaerobiche (Nakamura e Ashida, 1959) e risulta essere aumentata a pH alcalini (Babich e Stotzky, 1977b). Quindi, la sua tossicità sui microrganismi negli ambienti naturali dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche dell'ambiente in cui l'inquinante è depositato.

1.4 Produzione olearia

La produzione dell'olio di oliva rappresenta uno dei settori agro-alimentari economicamente più rilevanti dell'area mediterranea in cui è concentrato ben più dell'80% della produzione mondiale. Il processo di estrazione dell'olio d'oliva ha un forte impatto ambientale dovuto sia all'utilizzo di grandi volumi di acqua durante il processo stesso sia alla generazione di grandi quantità di solidi e di acque di scarto stimate tra i 10 e i 30 milioni di m³ l'anno (Anastasiou et al., 2011).

Le acque di lavaggio, le acque di vegetazione (AV) e le sanse sono i principali prodotti di scarto della produzione olearia che devono essere opportunamente trattati o valorizzati.

Per acqua di lavaggio si intende l'acqua di rete utilizzata per il lavaggio preliminare delle olive e dei vari macchinari utilizzati nel frantoio. Queste acque, dopo opportuna modificazione della loro composizione chimica, possono essere riutilizzate come fertilizzanti per il terreno (Vlyssides et al., 2004).

Le sanse, invece, sono prodotti di scarto costituiti da solidi come bucce, residui della polpa, frammenti di nocciolino e da una quantità di acqua che può essere variabile.

Le acque di vegetazione (AV), infine, costituiscono, insieme alle acque di lavaggio delle olive e degli impianti, le acque reflue dei frantoi. Ad oggi, non esiste un metodo di trattamento/smaltimento soddisfacente sia da un punto di vista economico che qualitativo e questo a causa delle enormi quantità che se ne producono, della natura frammentata delle aziende produttrici e della loro composizione (McNamara et al., 2008).

1.4.1 Composizione delle acque di vegetazione

Le AV variano notevolmente nella loro composizione chimica in relazione al tipo di olive, al tipo di suolo, al sistema di coltivazione, al grado di maturazione e alla modalità di conservazione del frutto, all'età della pianta ed al processo di estrazione utilizzato. Ad ogni

modo, esse sono caratterizzate da una colorazione scura e da un contenuto di acqua dell'85%, di sostanza secca del 15% e di sali minerali del 2%. Questo refluo è caratterizzato da un elevato carico organico con una domanda chimica (COD) e una domanda biologica (BOD) di ossigeno che raggiungono valori compresi tra 50 e 150 g/L. Questo refluo ha un pH debolmente acido (con valori compresi tra 4 e 6) dovuto ad un alto contenuto di acidi grassi quali acido acetico, acido tartarico, acido malico e acido lattico. Tra i costituenti organici molto abbondanti sono gli zuccheri (20-60 g/L) quali fruttosio, mannosio, glucosio e saccarosio ed i fenoli (0,5-25 g/L) la cui tipologia è ampiamente variabile tanto che ad oggi, sono stati identificati ben 30 composti fenolici diversi per questo tipo di refluo (McNamara et al., 2008).

1.4.2 Tossicità delle acque di vegetazione

Le acque di vegetazione contengono delle sostanze con proprietà fitotossiche ed attività antimicrobiche, antivirali ed antifungine (Tuncel & Nergiz, 1993; Aziz et al., 1998; Saravanakumar et al., 2009; Vagelas et al., 2009). Tali proprietà sono dovute principalmente all'alto contenuto di composti fenolici che nell'olio di oliva rappresenta circa il 2% del contenuto totale presente nel frutto, mentre il 98% si ritrova solubilizzato nelle acque di vegetazione con concentrazioni che variano da 3-8 g/L (Rodis et al., 2002).

I composti antimicrobici maggiormente attivi sono l'idrossitirosole, l'oleuropeina, l'acido 4-idrossibenzoico, l'acido vanillico e l'acido cumarico.

Lo smaltimento diretto delle AV su suolo ha un forte impatto sulle proprietà sia fisiche che chimiche dello stesso. Le AV contengono numerose sostanze grasse che possono alterare la porosità del suolo e quindi limitare gli scambi gassosi acqua/aria. Questo influisce negativamente sia sulla respirazione degli apparati radicali e quindi sulla quantità delle colture agrarie sia sull'attività della microflora aerobia presente nel suolo (Ranalli et al., 1989; Anastasiou et al., 2011). Le AV possono anche modificare la composizione chimica di un terreno; il loro pH debolmente acido, infatti, sebbene non vada ad alterare in modo significativo il pH del suolo, consente una maggiore mobilizzazione dei metalli pesanti dai sedimenti. Infine l'alto rapporto C/N può portare ad uno squilibrio dell'ecosistema determinando una forte competizione nell'approvvigionamento di N tra microrganismi e piante (Anastasiou et al., 2011). In caso invece di riversamento di tale refluo in corsi d'acqua, l'alto contenuto in zuccheri ridotti può stimolare la respirazione microbica

causando un abbassamento della concentrazione di ossigeno disciolto, mentre l'alto contenuto in fosforo può portare ad eutrofizzazione (McNamara et al., 2008).

Lo smaltimento della AV, quindi, dato il loro carico organico e soprattutto l'alta concentrazione di composti di natura fenolica, rappresenta un problema ambientale di notevole rilevanza. Negli ultimi decenni sono stati proposti diversi metodi di trattamento di tale refluo. Ad oggi, le pratiche più diffuse in Europa per lo smaltimento della AV consistono nello spandimento sul suolo (permesso solo in alcuni Paesi) o nell'evaporazione effettuata in appositi bacini. Tuttavia, questi sistemi non consentono l'abbattimento dell'alto carico organico e della tossicità del refluo (McNamara et al., 2008). Negli ultimi anni, sono stati proposti metodi alternativi mirati a risolvere tale problematica come trattamenti chimico-fisici e biologici. I primi includono la decantazione, l'incenerimento, l'ultrafiltrazione e l'osmosi inversa, mentre i secondi comprendono il compostaggio, la digestione aerobica e/o anaerobica e il trattamento enzimatico.

2. SCOPO DEL LAVORO

Nella maggior parte degli ambienti naturali i microrganismi si trovano generalmente sotto forma di comunità aggregate tenute insieme da polisaccaridi prodotti dalle cellule che prendono il nome di biofilm. Di notevole interesse risulta essere lo sviluppo di sistemi semplificati atti a comprendere come i meccanismi fisiologici di una determinata specie nei biofilm si modifichino rispetto alle loro controparti planctoniche. Inoltre, è importante anche capire se e come tali meccanismi variano nel momento in cui si viene a realizzare un'associazione eterogenea di specie diverse all'interno del biofilm e/o in presenza di fattori esogeni di stress.

Le attitudini filmogene del fungo *Pleurotus ostreatus* e la capacità di formare biofilm stabili in associazione con specie batteriche appartenenti al genere *Pseudomonas* sono note da tempo. Tuttavia, le condizioni necessarie allo sviluppo del biofilm non sono state finora oggetto di indagini accurate. Essendo la bibliografia inerente alla formazione dei biofilm di funghi filamentosi ancora povera di informazione, a differenza di quanto è invece riportato per i biofilm batterici, gli obiettivi del presente lavoro di tesi sono stati quelli di:

- i) determinare i parametri ambientali e le condizioni necessarie alla formazione del biofilm del fungo *P. ostreatus*;
- ii) caratterizzare a livello biochimico e strutturale il biofilm fungino ottenuto in monocultura;
- iii) valutare se e come cambiava la risposta a contaminanti ambientali rispetto alla controparte planctonica;
- iv) valutare le capacità di *P. ostreatus* di formare un biofilm stabile in associazione con il batterio *Pseudomonas alcaliphila*.

In particolare, le proprietà filmogene di *P. ostreatus* sono state valutate utilizzando due diversi approcci metodologici che forniscono entrambi informazioni originali ed innovative essendo la letteratura scientifica ancora carente di informazioni. Il primo prevedeva l'utilizzo di piastre a 12 pozzetti in cui venivano alloggiare membrane circolari di vario materiale, quali supporti di adesione. L'obiettivo era quello di valutare l'impatto che alcune variabili chiave, come ad esempio il terreno colturale o il supporto stesso, hanno sulla formazione, sull'attività metabolica e sull'ultrastruttura dei biofilm di questo

fungo. Il secondo approccio, invece, prevedeva l'utilizzo dei sistemi MBECTM-P&G e MBECTM-HTP costituiti da un coperchio recante 96 supporti verticali (peg) che, nel primo caso, confluivano su una piastra standard mentre, nel secondo, su un sistema a 12 canali inter-comunicanti. In entrambe le configurazioni, i peg rappresentano la superficie di ancoraggio e quindi di sviluppo del biofilm. In questo caso, l'obiettivo era non solo quello di valutare l'idoneità di questi sistemi per la formazione del biofilm fungino ma anche di ottenere dei biofilm caratterizzati dall'aver una distribuzione spaziale omogenea su tutti i peg della piastra e, quindi, compatibili con le successive prove di esposizione ai tossicanti. In relazione a questo, si è voluto accertare se colture in biofilm del fungo oggetto di studio fossero caratterizzate o meno da una maggiore tolleranza a fattori di stress come ampiamente riportato in letteratura. A questo scopo, la risposta a contaminanti ambientali inorganici ed organici è stata determinata comparativamente in colture filmogene e planctoniche. In particolare, da una parte, veniva determinata la tolleranza ai metalli pesanti, quali il cadmio, ed espressa in termini di Concentrazione minima inibitoria e fungicida (MIC₉₀ e MFC, rispettivamente); dall'altra, la risposta differenziale di colture filmogene e planctoniche veniva desunta dalla capacità di rimozione del carico organico (COD) e dei fenoli da acque reflue di frantoio oleario provenienti da un impianto a 3-fasi. A questo scopo sono state selezionate delle acque reflue caratterizzate dall'aver concentrazioni di fenoli in grado di esercitare, sulla base di dati presenti in letteratura, un'azione tossica concentrazione-dipendente sulla specie in studio.

La struttura del biofilm fungino è stata studiata mediante microscopia elettronica sia a scansione che a trasmissione. Queste osservazioni strutturali venivano integrate mediante la microscopia a fluorescenza abbinata all'impiego di fluorocromi con alta specificità di legame. Le analisi venivano effettuate su biofilm esposti e non esposti ai contaminanti ambientali in modo da valutare se differenze strutturali fossero alla base di una diversa risposta ai contaminanti stessi o, viceversa, se l'esposizione a questi ultimi potesse indurre delle modifiche strutturali.

Pur essendo l'attività svolta mirata prevalentemente alla caratterizzazione del biofilm fungino mono-specifico, gli approcci sperimentali sono stati definiti in previsione della messa a punto di sistemi misti. In relazione a questo, ad esempio, la maggior parte degli esperimenti è stata effettuata su tipici terreni utilizzati per la crescita batterica. L'ottimizzazione del processo di formazione dei biofilm misti fungo/batterio, risulta essere di particolare interesse per il fatto che in natura i biofilm sono generalmente costituiti da

microrganismi appartenenti a specie diverse e questo rappresenta un punto di fondamentale importanza sia nei processi di biorisanamento sia in applicazioni rilevanti in agricoltura. Per quanto concerne i biofilm misti di *P. ostreatus*, la maggior parte di tali applicazioni coinvolge sistemi binari con batteri dei generi *Rhizobium* e *Pseudomonas*. In questo studio, è stato selezionato un ceppo Cromo-resistente di *Pseudomonas alcaliphila* caratterizzato dall'aver una spiccata attitudine filmogena. Sulla base di prove preliminari su piastra volte ad accertare la presenza o meno di fenomeni di mutua inibizione dei due microrganismi, l'approccio metodologico ritenuto più adeguato alla formazione del biofilm misto prevedeva l'applicazione dell'inoculo batterico su un biofilm fungino sviluppato sul sistema MBEC™ HA-P&G. La microscopia elettronica a scansione, in questo caso, veniva utilizzata non solo per valutare la struttura del biofilm misto ma anche per monitorarne la formazione nel tempo. Inoltre, è stato messo a punto un sistema di rilevazione basato su real time PCR al fine di quantificare il contributo dei due partner nella formazione del biofilm misto. Questo obiettivo è stato ritenuto di rilevanza alla luce dell'assenza di informazione in merito nella letteratura scientifica.

3. FORMAZIONE DEL BIOFILM SU MEMBRANE CIRCOLARI

In natura, i microrganismi vivono prevalentemente attaccati a superfici formando biofilm. I biofilm batterici sono stati molto studiati nel corso degli anni e in letteratura sono riportate numerose informazioni soprattutto in relazione alla struttura, alle proprietà e ai vantaggi di queste comunità. D'altra parte, sebbene i funghi siano dei candidati ideali per la formazione di biofilm a causa della loro abilità di produrre polisaccaridi extracellulari (EPS) (Gutiérrez et al., 1995), lectine (Tshivileva et al., 2004, Kobayashi et al., 2005) e idrofobine (Armenante et al., 2010), si registra una notevole carenza di informazione riguardante aspetti fisiologici e strutturali di biofilm fungini. Infatti, la maggior parte degli studi, effettuati sui biofilm fungini, riguardano il genere *Candida*, che ha ricevuto maggiore attenzione soprattutto in relazione al suo coinvolgimento in numerose infezioni di tipo clinico (Douglas, 2003).

Il ceppo fungino *Pleurotus ostreatus* P3004 riveste notevole importanza sia da un punto di vista commerciale sia per le numerose applicazioni in campo ambientale. E' stato impiegato in prove di biorisanamento di siti contaminati e nel trattamento di acque reflue essendo in grado di degradare un'ampia varietà di composti organici tra cui numerose molecole di sintesi chimica ad elevata persistenza (Leonardi et al., 2007) e di assorbire molti metalli pesanti (Xiangliang et al., 2005). Sebbene le proprietà filmogene di *P. ostreatus* siano note da tempo e studiate soprattutto in relazione al biocontrollo (Jayasinghearachchi et al., 2006), alla solubilizzazione di rocce fosfatiche e alla fissazione biologica dell'azoto in biofilm misti con diazotrofi (Jayasinghearachchi et al., 2004), la letteratura risulta essere ancora povera di informazioni e le condizioni di sviluppo del biofilm non sono state oggetto di indagini accurate. L'obiettivo del nostro lavoro è stato, quindi, quello di studiare l'impatto che alcune variabili chiave, quali ad esempio il supporto solido di adesione e il terreno di crescita, potessero avere non solo sulla formazione ma anche sull'attività metabolica e sull'ultrastruttura del biofilm di *P. ostreatus* ottenuto sia in coltura statica che agitata. A questo scopo, è stato utilizzato un nuovo approccio metodologico che prevedeva l'uso di piastre multi-pozzetto in cui venivano alloggiare membrane circolari di vario materiale essendo nota l'influenza che le

proprietà delle superfici su cui i microrganismi aderiscono, hanno sia sulla quantità che sulla struttura del biofilm fungino (Hawser et al., 1994; Chandra et al., 2001).

I biofilm rappresentano un vantaggio evolutivo in quanto consentono la sopravvivenza dei microrganismi anche in ambienti ostili, conferendo loro una maggiore resistenza all'azione di fattori di stress. I biofilm microbici, infatti, sono in grado di contrastare in modo più efficiente dei microrganismi cresciuti in colture planctoniche, gli stress ambientali e di degradare o inattivare inquinanti ambientali. Un notevole contributo allo sviluppo di sistemi di risanamento di siti contaminati o processi di trattamento di acque reflue, che vedono coinvolti i microrganismi, può essere dato da una maggiore conoscenza delle caratteristiche fisiologiche dei biofilm microbici. Sono state, quindi, condotte delle prove finalizzate a valutare comparativamente in colture filmogene e planctoniche la risposta a contaminanti ambientali. In particolare, sono state selezionate, a questo scopo, acque reflue di frantoio oleario provenienti da un impianto a 3-fasi, caratterizzate dall'aver un elevato carico organico associato ad alte concentrazioni di composti fenolici.

3.1 MATERIALI E METODI

3.1.1 Microrganismo utilizzato

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato il ceppo fungino *Pleurotus ostreatus* 3004. Il fungo veniva fatto crescere su terreno Malt Extract Agar (MEA) a 28°C e conservato a 4°C.

3.1.2 Preparazione del pre-inoculo

La biomassa necessaria a fornire l'inoculo per le varie prove veniva ottenuta mediante sospensione di piccoli frammenti di micelio fungino in acqua sterile (5 ml) e successiva omogeneizzazione con l'ausilio di un Potter. La sospensione fungina così ottenuta, veniva utilizzata per inoculare beute Erlenmeyer da 500 ml contenenti 95 ml di terreno di pre-coltura (glucosio, 10 g/l; estratto di malto, 5g/l). Le beute così inoculate venivano poi incubate a 28 °C in shaker orbitale ad agitazione costante (150 rpm) per 120 ore.

Al termine dell'incubazione le colture così ottenute venivano omogeneizzate mediante Ultra Turrax (IKA Labortechnik, Germania) (2 strokes per 5 s ciascuno a media velocità) e la biomassa recuperata mediante centrifugazione a 6000 rpm per 10 minuti veniva lavata per due volte e poi risospesa in 20 ml di acqua deionizzata previa sterilizzazione in modo da raggiungere una concentrazione di 2.5 g/l di micelio in peso secco.

3.1.3 Terreni colturali

In previsione della messa a punto di condizioni compatibili con la formazione di biofilm misti sono stati adottati tre terreni liquidi, comunemente impiegati per la crescita di colture batteriche, vale a dire LB, M9 e SA, il contenuto in C e N (g/l) per ciascun di essi era 0.65 e 0.21, 0.8 e 0.35, 9.15 e 0.42 rispettivamente.

3.1.3.1 Terreno LB (Luria-Bertani)

- Triptone 10 g/l;
- Estratto di lievito 5 g/l;
- NaCl 5 g/l

Il terreno veniva sterilizzato in autoclave a 121°C per 20 minuti.

La crescita del ceppo fungino veniva anche valutata su terreno LB diluito 1:10 (v/v).

3.1.3.2 Terreno M9 (Minimal-medium)

- Na₂HPO₄ 6 g/l;
- KH₂PO₄ 3 g/l;
- NaCl 0.5 g/l;
- NH₄Cl 1 g/l

Il pH veniva aggiustato in un caso a 7.4 e nell'altro a 6.5 prima della sterilizzazione: il primo, infatti, risulta quello comunemente utilizzato per la crescita dei batteri, mentre il secondo è più adatto alla crescita del ceppo fungino.

Dopo sterilizzazione in autoclave (121°C per 20 minuti) venivano aggiunti 2 ml/l di una soluzione stock 1 M di MgSO₄ e 5 ml/l di una soluzione di glucosio al 40%, entrambi sterilizzati per filtrazione.

3.1.3.3 Terreno SA (Saccarosio/Asparagina)

- Saccarosio 20 g/l;
- Asparagina 2 g/l;
- K₂HPO₄ 1 g/l

Dopo sterilizzazione in autoclave (121°C per 20 minuti), venivano aggiunti 5 ml/l di una soluzione stock di MgSO₄ al 10% previa filtrazione.

3.1.4 Tampone di lavaggio

Phosphate-buffer saline (PBS) è stato utilizzato come tampone per il lavaggio del micelio fungino.

- NaCl 8 g/l (137 mM);
- KCl 0.2 g/l (2.7 mM);
- Na₂HPO₄ 1.44 g/l (10 mM);
- KH₂PO₄ 0.24 g/l (1.76 mM)

Dopo aver aggiustato il pH a 7.4, il tampone veniva sterilizzato in autoclave.

3.1.5 Sviluppo del biofilm fungino

Le prove finalizzate a valutare la formazione del biofilm fungino su membrane circolari, sono state condotte utilizzando piastre multi-pozzetto a 12 posizioni a base polistirenica (piastre TC, PBI International).

Per favorire lo sviluppo del biofilm, il fungo veniva fatto crescere su delle membrane circolari pre-pesate di vario materiale le cui caratteristiche sono di seguito riportate:

- 1) **Spugna poliuretana (PU):** Ø dei pori, 350 µm; spessore, 2 mm. I dischetti di poliuretano venivano sottoposti a lavaggi in acqua deionizzata bollente prima della sterilizzazione.
- 2) Filtri Whatman (Milano, Italy) in fibra di vetro in 100% borosilicato autoclavabili:
 - **GF-D:** Ø dei pori, 2.7 µm; Spessore, 0.68 mm.
 - **GF-A:** Ø dei pori, 1.6 µm; Spessore 0.26 mm.
 - **GF-B:** Ø dei pori, 1.0 µm; Spessore 0.68 mm.
- 3) **Foglio in acciaio inox 316L (SSN):** Ø dei pori, 26 µm; spessore, 50 µm. I dischetti di SSN venivano lavati in etanolo al 50% e poi sterilizzati.
- 4) **Nylon (NY):** Filtri idrofilici Albet (Barcellona, Spagna) autoclavabili. Ø dei pori, 0.2 µm; spessore 115 µm.
- 5) **Teflon (TF):** Filtri idrofobici Albet autoclavabili. Ø dei pori, 0.2 µm; Spessore 65 µm.
- 6) Filtri in vetro Duran VWR (Milano, Italia):
 - **Duran 0 (D0):** Ø dei pori, 160-250 µm; spessore, 2.5 mm
 - **Duran 4 (D4):** Ø dei pori, 10-16 µm, spessore, 2.0 mm
- 7) **Policarbonato (PC):** Filtri idrofilici Albet autoclavabili, traslucidi e quindi adatti per analisi al microscopio elettronico. Ø dei pori, 0.2 µm; Spessore 10 µm.
- 8) **Idrossiapatite** (Biosurface Technologies Corp., Bozeman, Montana)

I supporti solidi pre-pesati, venivano sterilizzati in autoclave (121°C per 20 min) e aggiunti asetticamente a ciascun pozzetto della piastra. Quest'ultimi venivano inoculati con 0.4 ml di sospensione fungina per avere un inoculo di 1.0 ± 0.1 mg di biomassa in peso secco e la piastra veniva messa ad incubare in condizioni statiche per 90 minuti (fase di adesione). Al termina di questa prima fase, a ciascun pozzetto venivano aggiunti 1.8 ml di LBD, SA o

M9 e le piastre venivano messe ad incubare per 7 giorni a 30°C in condizioni statiche o in agitazione orbitale (*ca.* 25 rpm).

3.1.5.1 Determinazione dello sviluppo microbico in biofilm

La biomassa microbica è stata determinata gravimetricamente ed espressa in g/l di brodo colturale. Al termine dell'incubazione, dopo aver rimosso il terreno colturale, in ciascun pozzetto venivano aggiunti 1.8 ml di PBS e la piastra veniva messa ad incubare sotto agitazione orbitale (70 rpm per 5 min). Questa procedura di lavaggio veniva ripetuta tre volte al fine di rimuovere la biomassa planctonica (BP) e/o quella debolmente adesa (BDA). Ciascun supporto veniva poi posizionato su di un filtro Whatman GF-D precedentemente pesato e posto in stufa a 105 °C per 24 ore. Le quantità sia di BDA che di biofilm (BF) venivano determinate separatamente per via gravimetrica. Nei pozzetti di controllo (CT), il BF, eventualmente formato, veniva rimosso con l'ausilio di uno scraper flessibile per cellule (Sarstedt, Newton NC) e determinato anch'esso per via gravimetrica. Il rapporto tra biofilm e biomassa totale (BF/BT) era calcolato come un indice di resa del biofilm.

3.1.5.2 Valutazione dell'attività metabolica mediante saggio dell'MTT

Per la valutazione dell'attività metabolica è stato utilizzato il sale di tetrazolio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT; Sigma) secondo la procedura di Hawser e Douglas (1993) lievemente modificata come di seguito:

dopo aver aggiunto in ciascun pozzetto 1.4 ml della soluzione di MTT (5 mg/ml in tampone PBS preriscaldato a 37°C), la piastra veniva incubata a 37 °C per 5 ore. Al termine dell'incubazione, la solubilizzazione del formazano prodotto veniva condotta in un bagno ad ultrasuoni (Branson, 125 W) utilizzando una miscela costituita da dimetilsolfossido e tampone glicina-NaOH 0.2 M pH 8.6 (6:1, vol/vol). Il formazano solubilizzato veniva letto spettrofotometricamente a 578 nm ($\epsilon_{578} = 16900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e i dati espressi come attività metabolica specifica (AMS) riferita a unità di massa secca di biofilm.

3.1.5.3 Analisi strutturale del biofilm fungino

Le analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM) sono state effettuate al fine di determinare la struttura del biofilm fungino mono-specifico in funzione del supporto di adesione e del terreno di crescita utilizzati.

L'analisi al SEM è stata condotta sui biofilm ottenuti sui terreni colturali SA e LBD. Per quanto riguarda i supporti, sono stati selezionati due supporti polari (GF-B e D0), uno mediamente idrofobico (SSN) ed, infine, uno altamente idrofobico (Teflon).

I biofilm fungini venivano trattati secondo il protocollo riportato da Di Bonaventura e collaboratori (2006) e analizzati mediante l'utilizzo del microscopio elettronico JSM 5200 (JEOL, Tokyo Japan).

3.1.5.4 Trattamento delle acque di vegetazione

Le acque di vegetazione (AV), prelevate da un frantoio locale (Perugia, Italia) che opera attraverso un processo di estrazione a 3-fasi, presentavano la seguente composizione: pH, 5.1; domanda chimica di ossigeno (COD), 70.0 g/l; zuccheri totali, 21.4 g/l; fenoli totali, 6.5 g/l e colore, 2469 unità colorimetriche standard. Prima del loro utilizzo le acque di vegetazione venivano centrifugate a 6000 rpm per 30 min., sterilizzate (121 °C per 15 min) e quindi conservate a -20°C.

Sia le colture planctoniche sia quelle in biofilm di *P. ostreatus* ottenute su terreno LBD e sui supporti SSN, TF e D0, venivano lavate con tampone PBS prima di essere esposte alle AV (2.8 ml in ciascun pozzetto). Le piastre venivano poi messe ad incubare in un agitatore orbitale (50 rpm) a 30°C per 192 ore. I campioni prelevati a tempi prestabiliti venivano centrifugati e successivamente analizzati per determinare il contenuto residuo in COD, zuccheri e fenoli totali. La percentuale di riduzione di questi parametri veniva calcolata dalla differenza tra la loro rimozione nelle colture attive e quella osservata nella condizione di controllo (CN, assenza di supporto).

3.1.5.4.1 Determinazione della domanda chimica di ossigeno (COD)

La determinazione del COD, che consente il dosaggio delle sostanze organiche ossidabili chimicamente da parte di una fonte ossidante (bicromato di potassio, $K_2Cr_2O_7$) in

soluzione acida, veniva effettuato secondo la metodica definita dal protocollo APAT CNR-IRSA 5130 (2003). Per la determinazione è stato utilizzato un incubatore ad alta temperatura, modello ECO 6 (Velp Scientifica, Usmate) e i seguenti reagenti:

- soluzione di $K_2Cr_2O_7$ 0.25 N;
- Solfato di mercurio ($HgSO_4$);
- H_2SO_4 concentrato al 98% e contenente $AgSO_4$ allo 0.07%;
- Indicatore *o*-fenantrolina-ferroso-solfato;
- Sale di Mohr 0.1 N- solfato ferroso ammonico $Fe(NH_4)_2(SO_4)$.

I provettoni, dotati di un refrigerante a cadere, contenenti 10 ml di campione (diluito 1/200) o di acqua per il bianco, 5 ml di bicromato in presenza di solfato di mercurio e 15 ml di acido solforico concentrato venivano messi ad incubare per 2 ore a 197°C. al termine dell'incubazione e dopo raffreddamento venivano aggiunti 40 ml di acqua distillata e due gocce di indicatore. Quindi, il COD è stato determinato mediante retro-titolazione del bicromato di potassio residuo presente nei campioni e nel bianco, usando il sale di Mohr come titolante (viraggio dal verde all'arancio). Il COD è stato così determinato:

$$COD (mg/l) = (V_1 - V_2) * N * 8000 * d / V$$

dove:

V_1 = volume della soluzione del sale di Mohr usato per la titolazione del bianco;

V_2 = volume della soluzione del sale di Mohr usato per la titolazione del campione;

V = volume del campione utilizzato;

N = normalità della soluzione del sale di Mohr;

8000 = peso equivalente dell'ossigeno in mg;

d = diluizione del campione.

3.1.5.4.2 Determinazione dei fenoli totali

I fenoli totali sono stati determinati mediante la procedura descritta da Singleton et al., (1999). Questo metodo si basa sull'impiego del reattivo di Folin-Ciocalteu, costituito da una miscela di acido fosfotungstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) o fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$). In ambiente basico (Na_2CO_3), questi acidi reagiscono con gli -OH fenolici formando una miscela di ossidi di tungsteno (W_8CO_{23}) e molibdeno (Mo_8O_{23}), di colore blu, che assorbono in un range compreso tra 720-770 nm. I reagenti utilizzati erano:

- Reattivo di Folin-Ciocalteu (Fluka, Buchs, Svizzera) diluito 1:10 in acqua distillata,
- Soluzione di Na₂CO₃ al 7.5% (p/v).

Ogni saggio veniva condotto come di seguito: a 200 µl di campione opportunamente diluito (1/100) venivano aggiunti 1 ml di reattivo Folin-Ciocalteu e 800 µl di Na₂CO₃. I campioni così preparati venivano incubati al buio per 2 ore e quindi, l'assorbanza veniva misurata a 760 nm. La retta di taratura è stata ottenuta utilizzando come standard il tirosolo nel range di 0-150 µg/ml.

3.1.5.4.3 Determinazione degli zuccheri totali

Per la determinazione degli zuccheri totali è stato utilizzato il metodo proposto da Hodge e Hofreiter (1962), basato sull'idrolisi dei legami glicosidici da parte dell'acido solforico concentrato e sulla successiva deidratazione dei monosaccaridi. I prodotti deidratati reagendo con il fenolo originano un composto dal colore arancio misurabile spettrofotometricamente.

I reagenti utilizzati per il saggio erano i seguenti:

- Fenolo in cristalli 50 g/l;
- H₂SO₄ concentrato al 98 % (Sigma).

Ogni saggio veniva condotto come di seguito: in provetta venivano miscelati nell'ordine 200 µl di campione opportunamente diluito (1/400), 200 µl della soluzione di fenolo ed 1 ml di acido solforico concentrato. I campioni si lasciavano reagire per 30 min e quindi si procedeva alla lettura spettrofotometrica dell'assorbanza a 490 nm contro bianco (200 µl di acqua, 200 µl di soluzione di fenolo e 1 ml di acido solforico). La retta di taratura era ottenuta utilizzando come standard glucosio nel range 0-100 µg/ml.

3.1.5.4.4 Determinazione delle attività enzimatiche

Saggi enzimatici per valutare la produzione di enzimi ligninolitici sono stati effettuati ad ogni prelievo per l'intera durata della fermentazione. Per le misurazioni veniva utilizzato lo spettrofotometro UV-1800 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

3.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

3.2.1 Produzione di biofilm

In natura, i microrganismi vivono prevalentemente attaccati a superfici formando comunità aggregate denominate biofilm. I biofilm batterici sono stati studiati intensivamente nel corso degli anni e in letteratura sono riportate numerose informazioni soprattutto in relazione alla struttura, alle proprietà e ai vantaggi di queste comunità. D'altra parte, anche i funghi filamentosi sono dei candidati eccellenti per la formazione dei biofilm sebbene questo aspetto risulti essere ancora poco conosciuto. *Pleurotus ostreatus* è un fungo white-rot in grado di formare biofilm stabili anche in associazione con batteri appartenenti al genere *Pseudomonas*. Ciò nonostante, la letteratura scientifica sull'argomento è decisamente carente e ad oggi non vi sono studi relativi alle condizioni e parametri che favoriscono lo sviluppo di questa specie fungina in biofilm.

In questo lavoro, lo studio relativo alle condizioni di formazione del biofilm di *P. ostreatus* è stato condotto su piastre in polistirene a 12 pozzetti in cui venivano allegiate membrane circolari costituite da vari materiali che coprivano un intervallo di tensione superficiale del supporto compreso tra 19 e 64.5 mN m⁻¹. In particolare, sono stati utilizzati supporti polari come la fibra di vetro GFA, GFB e GFD, il vetro Duran 0 e 4 (D0 e D4) e l'idrossiapatite (HA); a media idrofobicità quali il poliuretano (PU), l'acciaio 316L (SSN), il policarbonato (PC) e il nylon (NY) e ad alta idrofobicità come il Teflon (TF). Inoltre, in previsione della formazione dei biofilm misti fungo/batterio, sono stati utilizzati mezzi liquidi standard per la crescita batterica, costituiti dai terreni saccarosio-asparagina (SA), Luria Bertani (LB) e M9. E' stato fissato un end-point di 7 giorni, al termine del quale sono stati determinati e comparati su base statistica i dati di produzione di biofilm e attività metabolica ottenuti in colture sia agitate che statiche. L'end-point è stato determinato sulla base del raggiungimento della fine della fase di crescita esponenziale in colture planctoniche del fungo. In particolare, la produzione di biomassa planctonica sui terreni SA e M9 non differiva in modo significativo dopo 7 giorni di incubazione (2.44 ± 0.09 vs. 2.35 ± 0.18 g/l), mentre il terreno LB doveva essere diluito 1:10 (LBD) per equalizzare i livelli di crescita (2.15 ± 0.22 g/l).

Per quanto concerne il tempo di contatto pre-incubazione, invece, sono stati allestiti degli esperimenti preliminari che prevedevano un'applicazione dell'inoculo sui supporti

selezionati in assenza del terreno colturale per 60, 90 e 240 min. Questa variabile è stata presa in considerazione in quanto ritenuta critica nell'insediamento di biofilm di *Candida* spp. (Chandra et al., 2001). L'analisi della varianza sui dati di formazione del biofilm in funzione della variabile tempo di pre-incubazione indicava l'assenza di significatività del suo effetto principale sia in coltura agitata (P=0.513) sia in quella statica (P=0.236). Conseguentemente, è stato adottato un tempo di contatto pari a 90 min che in altri studi (Chandra et al., 2001; Lal et al., 2009 e Bandara et al., 2010) rappresentava condizione standard nella formazione di biofilm fungini.

L'adozione di piastre a 12 posizioni è risultata essere idonea alla formazione del biofilm fungino consentendo di ottenere da 1.0 a 14.9 mg in peso secco di biomassa adesa per pozzetto.

I dati relativi alla formazione del biofilm sono stati sottoposti ad analisi della varianza a doppia classificazione in funzione del terreno colturale (TC) e del tipo di supporto (SUP) utilizzati e per facilitare le comparazioni, le colture agitate e stazionarie venivano trattate separatamente.

L'analisi ANOVA mostrava che, in modo indipendente dalle condizioni idrodinamiche (agitata e statica), sia gli effetti principali delle variabili supporto e terreno di crescita sia la loro interazione erano altamente significativi (P<0.001) (Tab.1).

Tab. 1 Quadro sinottico relativo all'ANOVA dei dati di biofilm ottenuti dopo 7 giorni di incubazione a 28°C in coltura sia agitata che stazionaria in funzione del terreno di crescita (TC) e del supporto (SUP) utilizzati.

Sorgente di variazione	Coltura statica					Coltura agitata				
	DF	SS	MS	F	P	DF	SS	MS	F	P
TC	2	130.10	65.05	57.84	<0.001	2	240.83	120.41	33.57	<0.001
SUP	11	659.47	59.95	53.31	<0.001	11	939.67	85.43	23.82	<0.001
TC x SUP	22	225.81	10.26	9.13	<0.001	22	389.54	17.71	4.936	<0.001
Scarti	44	49.48	1.12			42	150.65	3.59		
Totale	79	1015.02	12.85			77	1713.52	22.25		

Il quadro dei confronti incrociati dei livelli di produzione del biofilm in funzione delle variabili terreno colturale e supporto di adesione in relazione alle colture statiche ed agitate, vengono mostrati in Fig. 1. In coltura stazionaria, l'ANOVA condotta sull'effetto principale della variabile terreno, indipendentemente dal supporto utilizzato, mostrava che il terreno SA era il migliore per la formazione del biofilm mentre in condizioni agitate non vi erano differenze significative tra SA e M9. In entrambe le condizioni, quindi, il terreno LBD risultava essere il meno idoneo alla formazione del biofilm. L'idoneità o meno del terreno colturale alla formazione del biofilm potrebbe essere imputabile alle caratteristiche nutrizionali del terreno stesso. Infatti, il terreno SA è caratterizzato dall'aver un contenuto in C e un rapporto C/N più alti rispetto agli altri due terreni colturali. Una importante caratteristica dei biofilm microbici è che la loro stabilità e architettura dipendono in gran parte dalla quantità di sostanza polimerica extracellulare prodotta che ha il compito di inglobare e promuovere allo stesso tempo l'adesione delle cellule alla superficie del supporto (Harding et al., 2009). In relazione a questo aspetto, Rosado e collaboratori (2003) hanno dimostrato che in colture di *P. ostreatus* "florida" ottenute su un terreno complesso in cui il rapporto C/N era del tutto simile a quello di SA (20.5 vs. 21.8 rispettivamente) si aveva la più alta produzione di EPS. Lo stesso risultato è stato ottenuto anche in colture liquide di *P. pulmonarius* che rappresenta una specie simile a quella oggetto del nostro studio (El-Dein et al., 2004). Inoltre, è stata altresì dimostrata la correlazione positiva tra la presenza di asparagina, che nel terreno SA rappresenta l'unica fonte di N, e la produzione di EPS. In tal senso, questo aminoacido esercitava un effetto significativamente superiore rispetto ad altre fonti di N sulla formazione di un film di micelio in colture sommerse di *Lentinula edodes* F-249 e questo effetto era probabilmente dovuto ad un aumento dell'attività lectinica fungina (Tsivileva et al., 2004).

Per quanto riguarda l'effetto principale della variabile supporto, a prescindere dal terreno e dalle condizioni idrodinamiche, il PU risultava essere il supporto più adeguato alla produzione di biofilm fatta eccezione per le colture agitate condotte sul terreno colturale SA in cui lo sviluppo del biofilm avveniva in modo preferenziale sui supporti GFB e D0 (Fig. 1). L'idoneità del PU allo sviluppo del biofilm di *P. ostreatus* è in linea con quanto osservato da Ashter e collaboratori (1990) con *Phanerochaete chrysosporium*, un altro fungo appartenente al raggruppamento ecologico dei white-rot. Secondo questo studio, l'idoneità di questo supporto alla formazione del biofilm sarebbe ascrivibile all'elevata rugosità e porosità piuttosto che alla chimica di superficie di questo materiale.

Il TF, unico supporto idrofobico ad essere utilizzato, è risultato il meno idoneo alla formazione del biofilm. La produzione di biofilm su HA e SSN, invece, era significativamente influenzata dalle condizioni idrodinamiche. In modo particolare, la formazione del biofilm fungino su questi supporti risultava sfavorita dalla condizione agitata (Fig.1d, 1e e 1f).

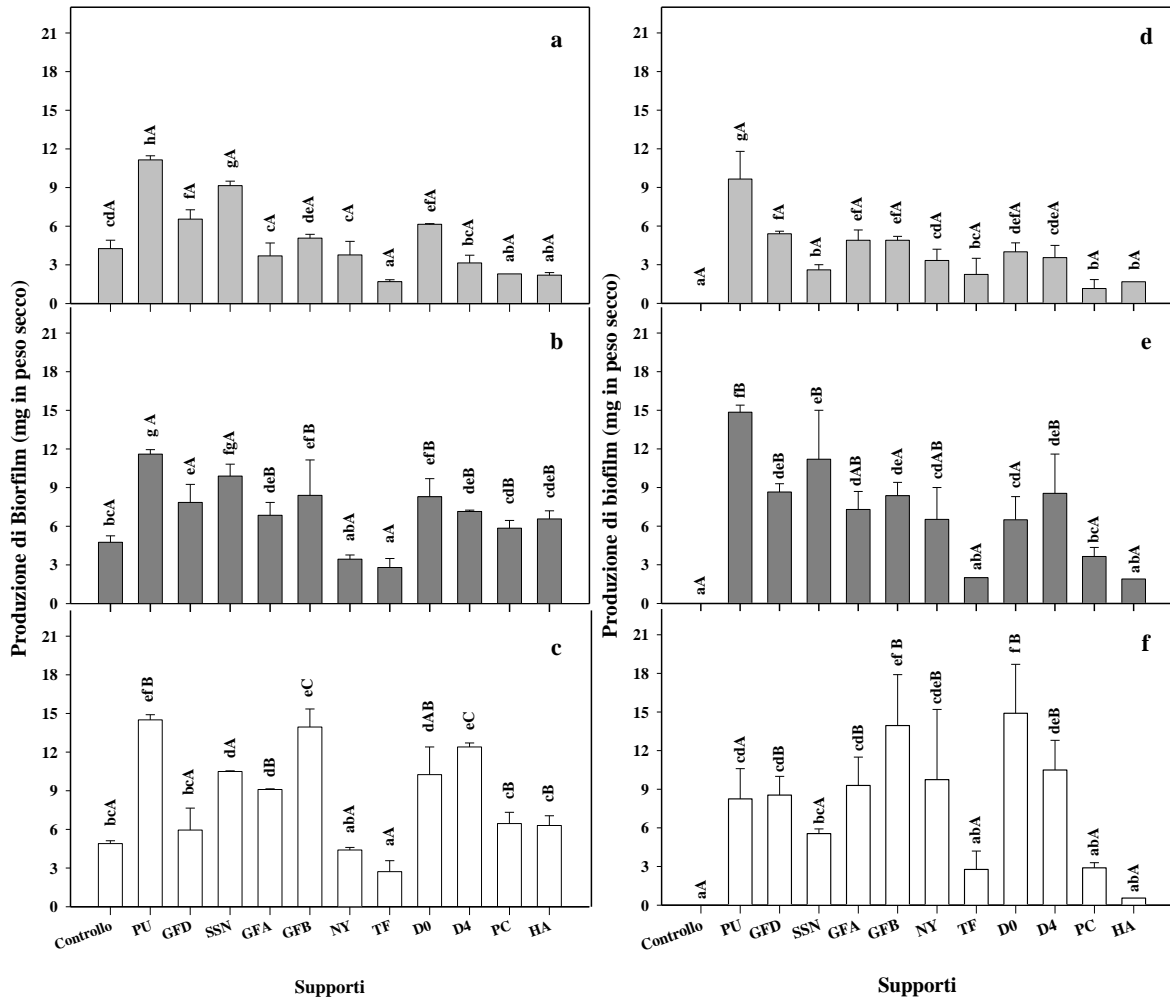


Fig. 1 (a-f) Produzione di biofilm di *P. ostreatus* cresciuto per 7 giorni a 28 °C in condizioni statiche sui terreni LBD, M9 e SA (1a, 1b and 1c, rispettivamente) e in agitazione orbitale (25 rpm) negli stessi terreni (1d, 1e and 1f, rispettivamente) in assenza ed in presenza di vari supporti. I dati sono la media \pm deviazione standard di 3 repliche. Comparazioni multiple appaiate sono state effettuate mediante il test LSD di Fisher ($P \leq 0.05$). Le stesse lettere minuscole e maiuscole sopra le barre denotano l'assenza di differenze significative tra supporti all'interno dello stesso terreno e tra terreni all'interno dello stesso supporto, rispettivamente.

Nella condizione di controllo (CN), e quindi in assenza di supporto, il biofilm si veniva a formare solo in condizione statica (4.5 mg in peso secco) e la sua formazione non era influenzata dalla variabile terreno colturale (Fig. 1a, 1b e 1c).

I dati ottenuti sono stati sottoposti anche ad analisi multivariata mediante l'approccio delle componenti principali (PCA) al fine di ottenere una visione generale sulla struttura dei dati e sull'impatto delle condizioni di incubazione. La Fig. 2 mostra come il 76.8% della variabilità veniva spiegato dalla prima e dalla seconda componente principale (42.4% e 34.4%, rispettivamente). Le Fig. 2A e 2B mostrano rispettivamente i grafici relativi alle osservazioni (score plot) e alle variabili (loading plot) prese in esame. Dai grafici si può notare che gli scores relativi alla coltura statica e a quella agitata si separano tra loro lungo la prima componente (Fig. 2A). In aggiunta, le osservazioni connesse alle condizioni CN, TF, NY, PC e HA in coltura agitata, si localizzavano nel quadrante diagonalmente opposto a quello dove si localizzavano le variabili BF e BF/BT (biofilm e rapporto biofilm su biomassa totale, rispettivamente), indicando che erano negativamente correlate ad entrambe (Fig. 2B). Le osservazioni relative al PU e GFB, in coltura statica, invece, si localizzavano nel quadrante alto a sinistra che corrisponde a quello delle variabili BF e BF/BT indicando una relazione positiva come confermato anche dall'analisi ANOVA. Un effetto significativo delle condizioni idrodinamiche è stato osservato per il supporto SSN, per il quale gli scores della coltura agitata e stazionaria si localizzano nel quadrante alto a destra e in basso a sinistra, in corrispondenza della posizione delle variabili BP e BF, rispettivamente. Quindi l'adesione a questo supporto è favorita in condizioni di crescita stazionaria.

3.2.2 Attività metabolica del biofilm fungino

Sui biofilm fungino monospecifici sono state effettuate prove atte a valutare come le caratteristiche dei supporti o dei terreni utilizzati influenzassero l'attività metabolica specifica valutata mediante il saggio di riduzione del sale di tetrazolio MTT.

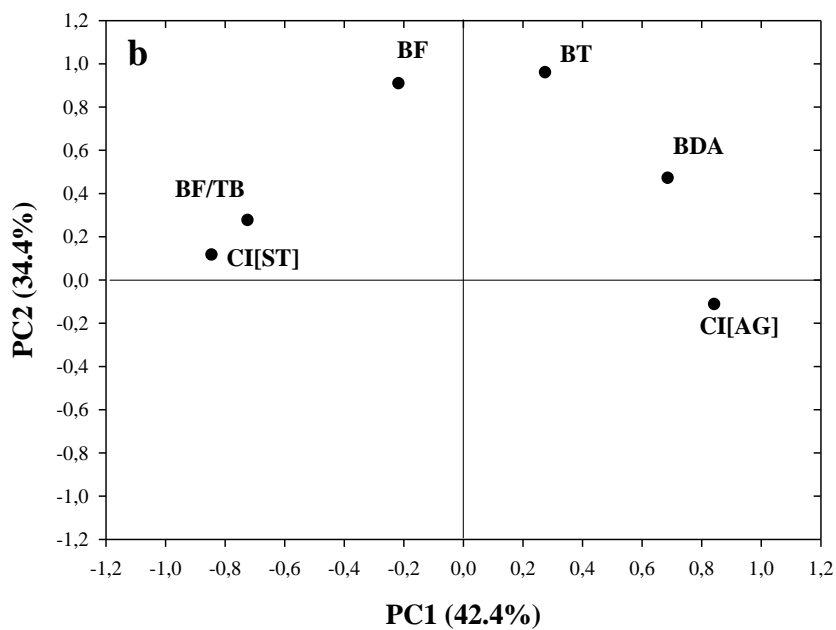
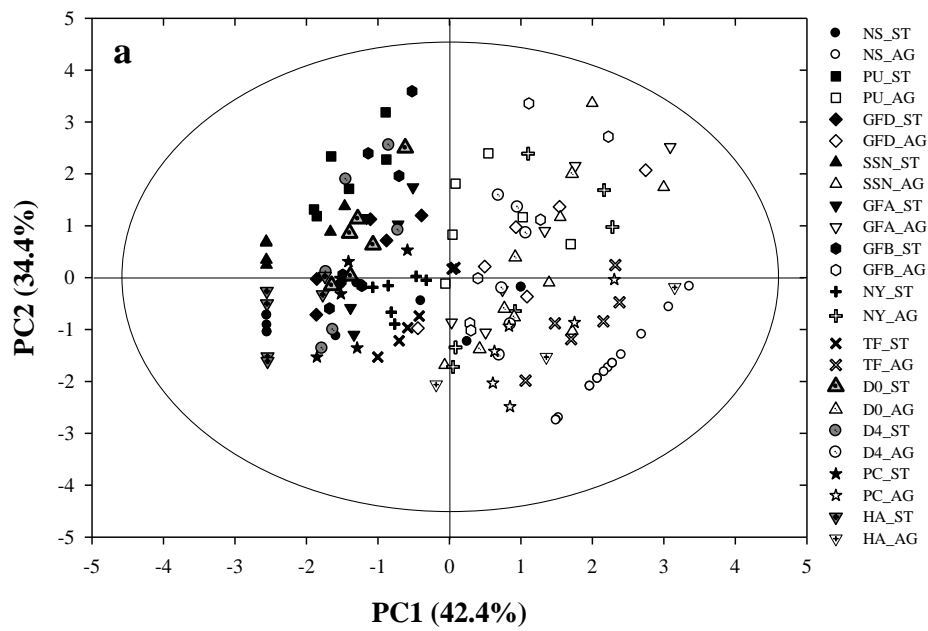


Fig. 2 (a-b) Analisi delle componenti principali (PCA). In 2(a) sono rappresentati gli scores plot delle differenti combinazioni di supporto/terreno di crescita sia in condizione statica che agitata. La fig. 2b mostra il loading plot delle variabili biofilm (BF), biomassa debolmente adesa (BDA), biomassa totale (BT) e rapporto tra biofilm e biomassa totale (BF/BT). Le condizioni idrodinamiche (CI) venivano introdotte come variabile categorica a due livelli e indicate con le codifiche ST (stazionaria) e AG (agitata).

La Tabella 2 di seguito riportata, fornisce una sinopsi dell'attività metabolica specifica dei biofilm, determinata dalla capacità di ridurre il sale di tetrazolio MTT e riferita ad unità di tempo e di massa, in funzione della natura del supporto, del mezzo colturale e delle condizioni idrodinamiche.

Come già osservato anche per la produzione di biofilm, l'analisi ANOVA dei dati relativi all'attività metabolica specifica indicava elevati livelli di significatività delle variabili supporto e terreno colturale nonché della loro interazione ($P < 0.001$).

Per quanto concerne l'effetto del supporto, in condizioni statiche, i biofilm metabolicamente più attivi erano quelli sviluppati su TF, PC e NY in cui le relative attività metaboliche specifiche non differivano le une dalle altre. I biofilm sviluppati su PU, per i quali erano stati riscontrati elevati livelli di sviluppo in condizioni statiche, esibivano bassi valori di attività metabolica. Inoltre, un'elevata attività nel pozzetto di CN e quindi in assenza di supporto (da 58 a 80 $\mu\text{moli of MTT formazano h}^{-1}\text{g}^{-1}$ biofilm) confermava l'abilità di *P. ostreatus* di sviluppare biofilm sul fondo piatto in polistirene. La presenza di un'elevata quantità di EPS potrebbe spiegare perché l'attività metabolica specifica nella maggior parte dei casi non era correlata alla quantità di biomassa sessile ottenuta (Tab. 2 vs Fig.1). Infatti, sebbene il PU rappresentava il supporto più adatto alla formazione del biofilm, i valori di attività metabolica ottenuti erano tra i più bassi, e questo potrebbe essere dovuto al fatto che l'elevata porosità del supporto favorisce la penetrazione delle ife al suo interno ma allo stesso tempo questa penetrazione limita la diffusione sia di ossigeno che di nutrienti portando quindi alla formazione di un biofilm metabolicamente meno attivo.

In coltura agitata, invece, i biofilm ottenuti su SSN mostravano i valori più elevati di attività metabolica specifica insieme ai biofilm sviluppatosi su PC e NY mentre quelli su TF e HA risultano essere i meno attivi. Quindi, le prestazioni dei supporti TF e SSN erano significativamente influenzate dalle condizioni idrodinamiche.

Per quanto concerne l'influenza della variabile terreno colturale, in contrasto con quanto osservato per i livelli di produzione del biofilm, l'analisi ANOVA ha indicato come il terreno colturale LBD fornisse complessivamente valori di attività metabolica specifica superiori rispetto agli altri due terreni colturali in entrambi i regimi idrodinamici (Tabella 2).

Tabella 2. Attività metabolica specifica dei biofilm di *P. ostreatus* ottenuti a 28 °C per 7 giorni in coltura stazionaria e agitata in assenza e in presenza di membrane circolari caratterizzate dall'aver differenti valori di tensione superficiale e dimensione dei pori.

Supporti	Proprietà dei supporti		Attività metabolica specifica dei biofilm ($\mu\text{mol MTT formazano h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{biofilm d.w.}$)*					
	Tensione superficiale (mN/m)	Dimensione pori (μm)	Colture statiche			Colture agitate		
			LBD	M9	SA	LBD	M9	SA
Assenza supporto	n.a. †	n.a. †	57.7±5.7Bb	86.8±5.0Dc	80.0±4.1Cc	0.0±0.0Aa	0.0±0.0Aa	0.0±0.0Aa
Teflon	19.5	0.2	101.2±6.6Cb	117.5±13.7Eb	156.8±15.2Ec	4.1±1.5Aa	16.8±4.0ABa	2.2±0.7Aa
Policarbonato	33.5	0.2	198.4±9.0Ec	68.6±7.3Cb	67.9±5.8Cb	23.1±9.0Ba	75.8±7.0DEb	92.4±14Db
Poliuretano	39.3	350	22.0±0.1Aa	20.0±0.4ABa	18.2±0.3Aa	51.1±7.5CDb	29.3±0.8BCa	46.0±8.3Cb
Acciaio inox 316‡	40.9	26	29.8±3.2Aa	49.0±2.7Bab	49.0±1.2Bab	106.4±13.8Fc	51.0±7.8Cb	89.5±5.1Dc
Idrossiapatite	57.0	0.15	48.0±11.6ABb	14.9±7.7Aa	31.4±7.5ABab	4.7±0.2Aa	4.5±0.2Aa	14.8±0.2ABa
Nylon	46.5	0.2	116.4±22.0Dbc	141.4±16.0Fc	116.2±2.3Dbc	74.0±18.8DEab	82.2±15.42Eab	49.1±13.4Ca
GFA	64.5	1.6	71.3±12.6Bb	45.0±4.1Bab	41.4±0.8Ba	62.3±7.1Db	61.4±6.7CDab	50.3±7.8Cab
GFB	64.5	1.0	43.5±2.7ABc	20.8±4.1ABab	16.1±1.9Aa	40.6±1.4BCc	44.9±3.4Cc	25.3±3.3Bb
GFD	64.5	2.7	45.3±4.0ABb	34.1±4.6Ba	49.2±5.3Bb	52.9±1.6CDb	24.2±3.5Ba	28.2±3.5Ba
Duran 0	64.5	160-250	35.2±2.6Aab	29.4±4.2ABa	28.4±4.7Aa	99.6±8.7Fc	46.6±7.1Cb	23.3±4.4Ba
Duran 4	64.5	10-16	62.8±7.7Bb	36.1±4.1Ba	20.6±3.1Aa	77.8±2.4Ec	56.3±9.8CDb	27.8±3.1Ba

*I dati rappresentano la media \pm deviazione di 3 repliche. Comparazioni multiple appaiate sono state effettuate mediante il test di Fisher ($P \leq 0.05$): le stesse lettere minuscole e maiuscole indicano l'assenza di significatività tra le medie di riga e colonna rispettivamente. †, dato non disponibile.

3.2.3 Analisi strutturale del biofilm fungino

I biofilm sono sistemi tipicamente complessi ed eterogenei che presentano alcune caratteristiche morfologiche necessarie per svolgere le loro funzioni e per garantire la loro efficienza. La loro organizzazione strutturale è stata ampiamente studiata grazie all'utilizzo del microscopio elettronico a scansione (SEM) che permette di ottenere informazioni circa la struttura tridimensionale del biofilm stesso. Il SEM viene utilizzato non solo per analizzare le caratteristiche morfologiche delle cellule nel biofilm ma anche per monitorare la formazione del biofilm stesso (Hawser e Douglas, 1994; Di Bonaventura et al., 2006).

Nel presente lavoro, le analisi al microscopio elettronico a scansione venivano effettuate al fine di determinare la struttura del biofilm fungino di *P. ostreatus* valutando non solo la distribuzione spaziale del microrganismo sul supporto utilizzato ma anche eventuali modificazioni morfologiche nella struttura ifale. In modo particolare, l'analisi al SEM veniva condotta su biofilm di *P. ostreatus* sviluppati sui supporti idrofili (GFB e D4), a media (SSN) e ad alta (Teflon) idrofobicità e sui terreni colturali LBD e SA, che erano risultati essere, rispettivamente, il meno ed il più adatto alla produzione di biofilm.

Sebbene tutti i sistemi esaminati fossero caratterizzati dalla presenza di una rete ifale altamente intrecciata, il grado di aggregazione e compattezza dei biofilm sviluppati sullo stesso supporto variavano significativamente in funzione del terreno di crescita. Ad esempio, nei biofilm formati su SSN, la presenza massiva di matasse ifali cementate all'interno di un'abbondante matrice extracellulare era visibile solo quando questi si sviluppavano su SA (Fig. 3c). Sullo stesso supporto, invece, il biofilm sviluppato in presenza di LBD era caratterizzato da un network di ife intrecciate meno compatte e intervallato dalla presenza di canali vuoti (Fig. 3d). A maggior ingrandimento, le superfici delle ife del biofilm formato su SSN in presenza del terreno SA apparivano ruvide e circondate da filamenti di matrice (inserto, Fig. 3c). Al contrario, le superfici ifali dei biofilm relativi alla combinazione SSN-LBD apparivano o lisce o coperte ad intermittenza da cristalli aciculari (inserto, Fig. 3d). Lo stesso impatto determinato dal terreno colturale sul grado di compattezza era evidenziato anche da un maggior grado di aggregazione nei biofilm sviluppati su GFB e D4 in presenza di SA rispetto a LBD (Fig. 3e vs. 3f, rispettivamente, e Fig. 3a vs. 3b, rispettivamente). Rispetto a quanto osservato per i supporti SSN, GFB e D4, la struttura del biofilm ottenuto sul supporto TF era influenzata

in modo opposto dalla natura del terreno di coltura con un maggior grado di compattezza riscontrato sui biofilm formati su LBD (Fig. 3h vs. 3g).

In entrambi i terreni, tuttavia, le ife dei biofilm su TF mostravano una superficie rugosa, rivestita da filamenti di matrice extracellulare e caratterizzata dall'abbondante presenza di concrezioni monocline e/o bipiramidali (Fig. 3g e 3h). Tuttavia, la presenza di questi cristalli risultava essere maggiormente presente lungo le ife dei biofilm ottenuti sul supporto GFB e sul terreno SA.

La presenza di particelle aciculari, monocicliche o bipiramidali lungo le ife fungine è in accordo con altri studi ultrastrutturali effettuati sui basidiomiceti (Dutton et al., 1993; do Rio et al., 2008). Tali concrezioni potrebbero essere costituite da sali dell'acido ossalico con cationi polivalenti che, come è noto, danno origine a cristalli la cui geometria varia in funzione del tipo di catione associato. Dalla letteratura, infatti, è noto come la presenza di ossalato sia importante per molte funzioni fisiologiche quali i) protezione dalla tossicità dei metalli pesanti agendo l'ossalato come un chelante del metallo stesso (Shimada et al., 1997); ii) ruolo ausiliario del processo di degradazione della lignina agendo come stabilizzatore degli ioni manganese (Hofrichter et al., 1999) e iii) donatore di elettroni per la produzione di NADH (Mäkelä et al., 2010). Tra i funghi white rot, i più alti produttori di ossalato sono *P. ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor* (Shimada et al., 1997).

Le Fig. 4a e 4b, mostrano le zone di contatto del micelio fungino rispettivamente ai supporti D4 e SSN. Dall'analisi delle immagini, risultava essere evidente che l'adesione del micelio era mediata dalla presenza di filamenti o di aggregati di matrice extracellulare. Nella Fig. 4c, invece, risulta essere evidente la presenza del plectenchima ifale che rappresenta una struttura altamente compatta nelle quali le ife si trovano inglobate.

La metodica di preparazione dei campioni per l'analisi al SEM prevedeva una fase di deidratazione che non consente di mantenere la matrice extracellulare nella sua struttura altamente idratata. Ciò nonostante, è stato ugualmente possibile rilevarne la presenza o sotto forma di guaina intorno alle ife fungine (Fig. 3h) o come uno strato continuo dove le ife ne risultavano essere immerse (Fig 4c).

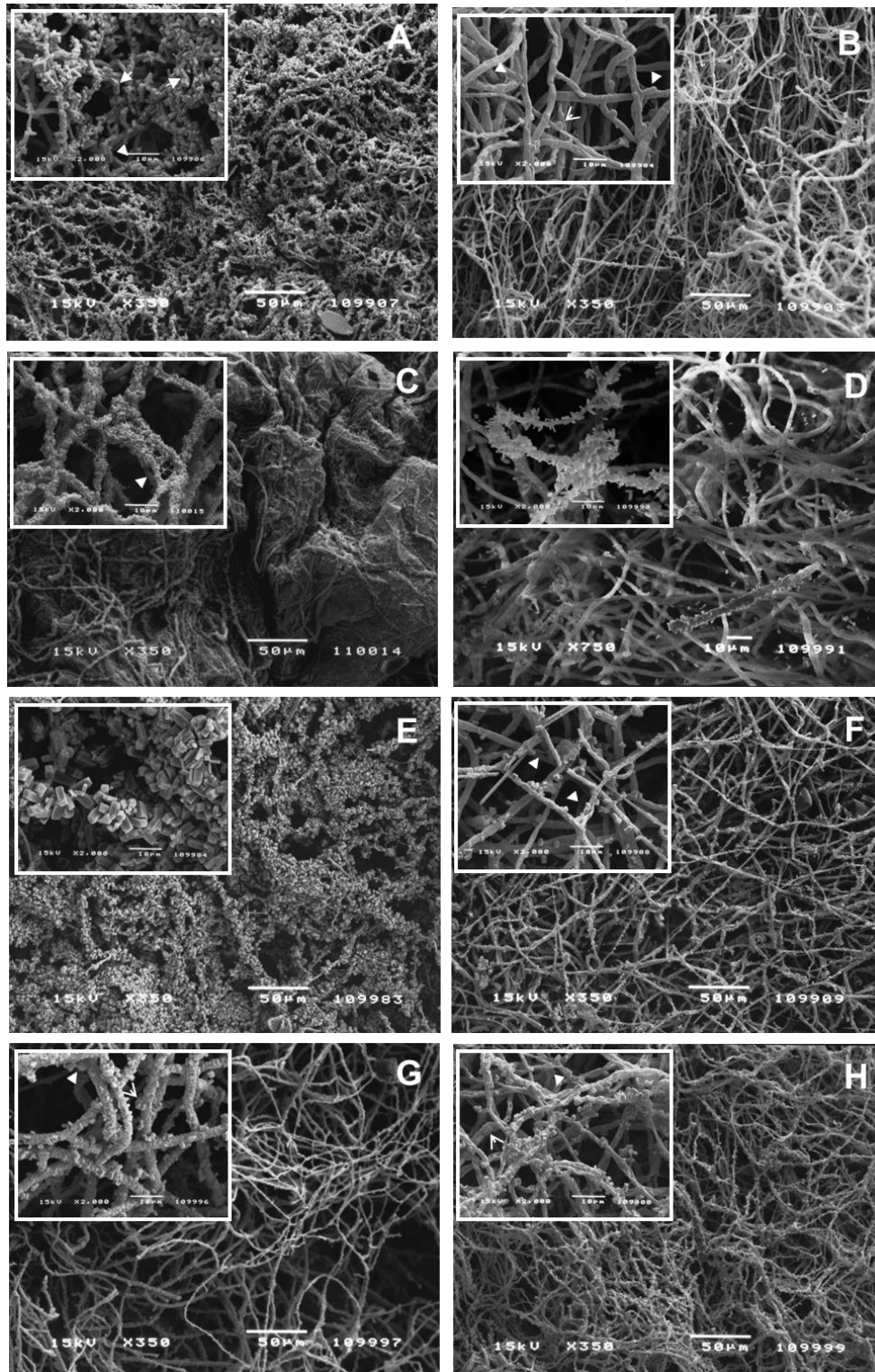


Fig. 3 (a-h) Micrografie al microscopio elettronico a scansione (X 350) di biofilm di *P. ostreatus* cresciuto nei terreni SA e LBD e sui supporti Duran 4 (3a e 3b, rispettivamente), acciaio SSN-316L (3c e 3d, rispettivamente), GF/B (3e e 3f, rispettivamente) e Teflon (3g e 3h, rispettivamente). Negli inserti, sono riportati dettagli a maggior ingrandimento (X 2000).

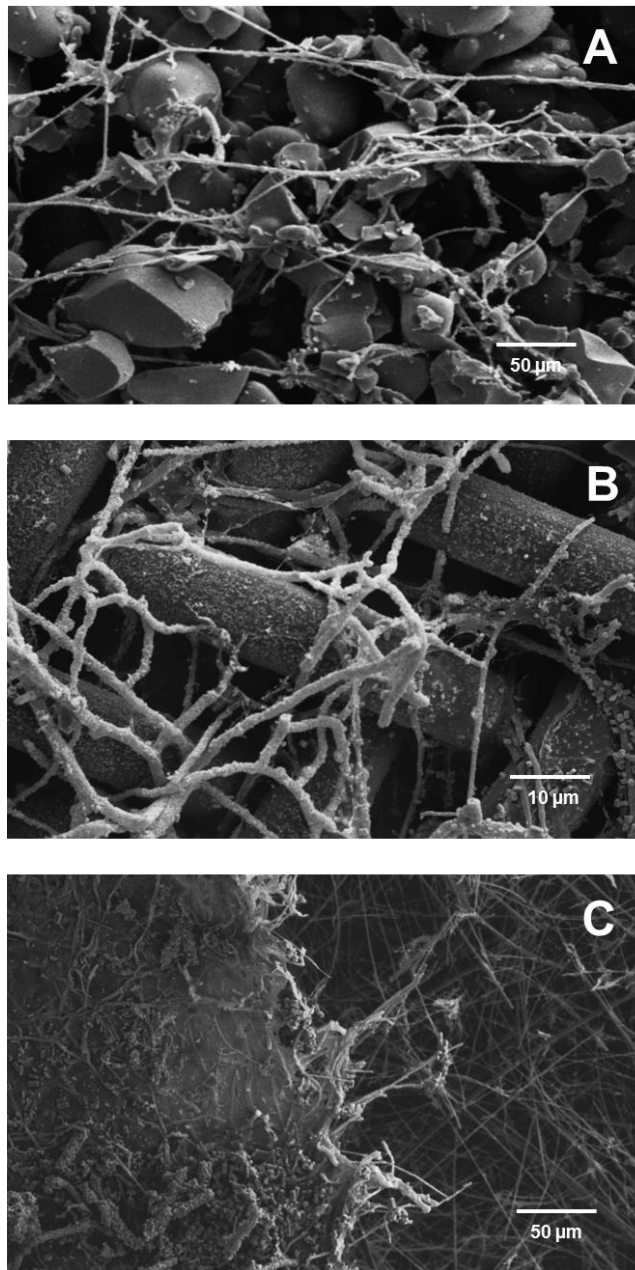


Fig. 4 (a-c) Micrografie al microscopio elettronico a scansione di biofilm di *P. ostreatus* cresciuto sul terreno SA e sui supporti Duran 4 (4a, ingrandimento X 350), SSN (3b, ingrandimento X 750) e GF/B (3c, ingrandimento X 350).

3.2.4 Trattamento delle acque di vegetazione

Le acque di vegetazione, liquidi che costituiscono gli effluenti del processo di produzione a 3 fasi dell'olio d'oliva, sono state utilizzate come sistema modello per effettuare una valutazione comparativa delle prestazioni degradative di colture planctoniche e biofilm di *P. ostreatus*. In modo particolare, sono state confrontate colture planctoniche di 7 giorni con biofilm coevi ottenuti sui supporti Duran 0, SSN e Teflon. Le acque di vegetazione utilizzate erano caratterizzate da una combinazione di valori di carico organico e concentrazione fenolica (COD=70 g/l; fenoli= 6.8 g/l) che dati di letteratura considerano incompatibili con un buon esito di trattamento di questa tipologia di reflui con funghi ligninolitici (Sayadi e Ellouz, 1993; Jaouani et al. 2003). Le quantità rimosse di COD, zuccheri e fenoli totali sono state espresse in termini di velocità e quindi riferite al tempo di trattamento e come resa essendo normalizzate per unità di biomassa.

Come mostrato in tabella 3, i migliori risultati si ottenevano con il biofilm sviluppato sul supporto Duran 0. In modo particolare la percentuale di riduzione del COD era pari al 37.9% mentre la velocità e la resa di rimozione di questo parametro erano, rispettivamente, pari a 138.3 mg/l h e 2.53 mg/mg di biomassa. Il peggior risultato, invece, si otteneva con il biofilm sviluppato sul teflon. Sebbene a bassi livelli, nelle colture si rilevava presenza di attività sia laccasica che manganese perossidasi. I migliori picchi di attività enzimatica si ritrovavano con i biofilm ottenuti su SSN per quanto riguarda le laccasi (65.3 nkat/l) e su Duran 0 per quanto riguarda invece la manganese perossidasi (89.9 nkat/l).

Le colture planctoniche di *P. ostreatus* risultavano essere in grado di crescere e di ridurre parzialmente il carico organico delle acque di vegetazione, sebbene con minore efficienza rispetto alle colture coeve di biofilm sviluppati su Duran 0 e SSN.

Con questi sistemi di biofilm, anche se la percentuale di abbattimento del COD non era alta in termini assoluti, i rispettivi tassi di rimozione risultavano del tutto simili a quelli osservati in un altro studio in cui il trattamento delle acque era stato eseguito in reattori a colonna a bolle d'aria con il fungo *Panus tigrinus* (D'Annibale et al., 2006). Questo suggerisce che l'uso di colture di *P. ostreatus* cresciute in biofilm su dispositivi in grado di garantire l'approvvigionamento dell'ossigeno può portare a prestazioni degradative notevolmente superiori rispetto alle colture cresciute in forma non adesa.

Tabella 3 Rimozione degli zuccheri e dei fenoli totali e relativi parametri di resa di rimozione e massima attività laccasica (Lac) e manganese perossidasi (MnP) di colture di *P. ostreatus* sia planctoniche che in biofilm valutati dopo 8 g di trattamento a 30°C. i dati rappresentano la media di tre repliche e le deviazioni standard erano minori del 10%. La presenza della stessa lettera indicava che le differenze di media non erano statisticamente significative ($P < 0.05$) secondo il test di Tukey.

Parametri	Colture	Biofilm sviluppati su:		
	planctoniche	Duran 0	SSN	Teflon
Rimozione COD (%)	22.3b	37.9d	28.5c	17.6a
Rimozione zuccheri totali (%)	27.0b	29.2c	29.4c	18.9a
Rimozione fenoli totali (%)	58.8c	57.8c	55.9b	37.4a
Attività Lac (nkat/l)	33.7b (4)	41.7c (8)	65.3d (8)	0a
Attività MnP (nkat/l)	78.2b (6)	89.9c (6)	73.2b (6)	12.3a (8)
VRC (mg/l h)	0.081b	0.138d	0.104c	0.064a
VRP (mg/l h)	0.02b	0.02b	0.019b	0.013a
RRC	1.38a	2.53b	2.23b	1.43a
RRZT	0.513a	0.596ab	0.701b	0.47a
RRFT	0.340a	0.358a	0.405a	0.282a

Legenda: VRC: velocità di rimozione del COD; VRP: velocità di rimozione dei fenoli; RRC: resa di rimozione del carico organico (mg COD rimosso/mg biomassa); RRZT: resa di rimozione degli zuccheri totali (mg di zuccheri totali rimossi/mg biomassa); RRFT: resa di rimozione dei fenoli totali (mg di fenoli totali rimossi/mg biomassa). I numeri tra parentesi indicano i giorni a cui si è avuto il picco di attività enzimatica.

4. FORMAZIONE DEL BIOFILM FUNGINO SU CALGARY BIOFILM DEVICE

I biofilm rappresentano la strategia di crescita più diffusa in molti degli ecosistemi naturali e rappresentano un vantaggio a livello evolutivo permettendo la sopravvivenza delle cellule microbiche anche in ambienti ostili. La minore suscettibilità dei biofilm rispetto alle colture planctoniche agli agenti antimicrobici dipende non solo dall'agente stesso ma anche dalla natura degli organismi che costituiscono il biofilm e dall'ambiente in cui esso si viene a costituire. Di notevole interesse, quindi, risulta essere lo sviluppo di sistemi semplificati atti a comprendere come i meccanismi fisiologici di una determinata specie in biofilm si modificano rispetto alla controparte planctonica.

In condizioni di laboratorio, possono essere utilizzati diversi approcci metodologici per studiare le proprietà dei biofilm microbici. In particolare, i sistemi largamente utilizzati per la formazione di biofilm sono rappresentati dalle celle a flusso, reattori di flusso a goccia, reattori spinning-disk e reattori a tubo. Questi sistemi permettono di lavorare con pochi campioni alla volta e, operando in continuo, richiedono grandi quantità di terreno colturale e sono alquanto suscettibili a contaminazioni microbiche. Quindi, al fine di valutare condizioni colturali e/o di esposizione multi-variate, sono stati sviluppati dei sistemi che consentono di sviluppare i biofilm microbici in piastre a 96 pozzetti lavorando in coltura a batch. Questo semplice e versatile apparato per la coltivazione di biofilm è il Calgary Biofilm Device (CBD) commercialmente denominato MBECTM assay (Harrison et al., 2010). Questo sistema è stato ampiamente utilizzato per consentire la formazione del biofilm in molti microrganismi sia batterici che fungini come ad esempio *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* spp. (Ceri et al., 1999), *Mycobacterium* spp. (Bardouniotis et al., 2003) e *Candida* spp. (Harrison et al., 2006).

Inoltre, permettendo di lavorare in parallelo con ben 96 biofilm equivalenti, costituisce un sistema largamente utilizzato per effettuare saggi di suscettibilità dei biofilm a sostanze con proprietà antimicrobiche in modo riproducibile e veloce (Ceri et al., 1999). Nonostante le sue numerose applicazioni, esso non è stato mai utilizzato per i funghi filamentosi a causa principalmente delle difficoltà nella standardizzazione delle condizioni in buona parte legate alle modalità di crescita di questi organismi. Infatti, le prove condotte sui

sistemi MBEC™ HTP e P&G erano finalizzate sia all'ottenimento di biofilm stabili di *P. ostreatus* sia ad una distribuzione spaziale omogenea degli stessi sui supporti di adesione (pegs). Come già menzionato, infatti, una distribuzione spaziale uniforme dei biofilm è un requisito fondamentale nei test di esposizione ai contaminanti ambientali.

4.1 MATERIALI E METODI

4.1.1 Formazione del biofilm in CDC Biofilm reactor (CBR)

Il sistema CBR (Biosurface Technologies, Bozeman, MT, USA) è formato da un vessel di vetro della capacità di un litro su cui è posizionata una porta di drenaggio atta a mantenere il volume del terreno colturale costante (350 ml). La parte superiore di tale reattore è costituita da una testa in polietilene nella quale sono alloggiati otto aste indipendenti e rimovibili in polipropilene e due porte di ingresso di cui una per il terreno colturale e una per gli scambi gassosi. Dal momento che ogni asta è in grado di alloggiare tre supporti di adesione (coupon) rimovibili di forma circolare (1.27 cm di diametro e 0.3 cm di spessore), è possibile valutare 24 varianti sperimentali.

L'agitazione è resa possibile dalla rotazione di una barra magnetica controllata da una piastra di agitazione che garantisce anche la termostatazione.

Il CBR è stato utilizzato in prove preliminari finalizzate a valutare il comportamento del fungo nonché la sua capacità di formazione del biofilm su coupon di vario materiale. I materiali impiegati erano acciaio, vetro, teflon, nylon, policarbonato, poliuretano e gomma siliconica, mentre il terreno di coltura utilizzato era il Luria-Bertani.

La capacità utilizzata era di 300 ml, poiché il reattore veniva utilizzato in batch e quindi non doveva verificarsi la fuoriuscita del terreno esausto. Pertanto esso veniva inoculato con 15 ml di sospensione fungina ottenuta dal pre-inoculo (vedi 3.1.2) ed il restante volume era rappresentato dal terreno di coltura. Il reattore così inoculato veniva posto ad incubare su di una piastra di agitazione a 30 °C e a 150 rpm.

Al settimo giorno di crescita gli holders venivano rimossi dal sistema al fine di valutare lo sviluppo del biofilm sugli stessi su ciascun coupon.

4.1.2 Formazione del biofilm fungino in Drip Flow Biofilm Reactor (DFR)

Il sistema DFR (Biosurface Technologies, Bozeman, MT, USA) consiste di una base rettangolare in polisulfone nella quale sono scavati quattro canali tra loro separati, in cui vengono inseriti dei supporti rettangolari che rappresentano la superficie di sviluppo del biofilm. Questo sistema veniva utilizzato in prove preliminari per valutare la capacità del

fungo di formare biofilm stabili su tre diversi supporti caratterizzati dall'essere uno idrofobico (Teflon), uno mediamente idrofobico (Poliuretano) e uno idrofilico (Idrossiapatite).

Ciascun canale veniva inoculato con 5 ml di sospensione fungina ottenuta dal pre-inoculo (vedi 3.1.2). Il sistema veniva messo dapprima ad incubare per tre giorni su di un agitatore orbitale a 28°C e a 90 rpm (condizione batch) e poi per 4 giorni in continuo flussando in ciascun canale il terreno di crescita LB alla velocità di 1 ml/min come consigliato dalla ditta distributrice.

Al termine dei 7 giorni di incubazione, ciascun supporto veniva rimosso, sottoposto a tre lavaggi per eliminare la biomassa planctonica e quella debolmente adesa. I supporti venivano poi messi in stufa a 65 °C per 24 ore, in essiccatore per 30 minuti e poi pesati. Lo sviluppo del biofilm veniva, quindi, determinato per via gravimetrica ed espresso in milligrammi di biomassa in peso secco adesa su ciascun supporto.

4.1.3 Formazione del biofilm fungino su sistemi MBEC™

Le proprietà filmogene di *P. ostreatus* venivano anche valutate utilizzando i sistemi MBEC™ della ditta Innovotech (Calgary, Canada) denominati MBEC™ High-throughput (HTP) e MBEC™ Physiology & Genetics (P&G) Assay. Questi sistemi sono costituiti rispettivamente, da una piastra in polistirene formata da 12 canali tra loro comunicanti e da 96 pozzetti. In entrambi i sistemi, invece, il coperchio reca 96 supporti verticali denominati peg che rappresentano la superficie di ancoraggio e quindi di sviluppo del biofilm. Gli esperimenti venivano condotti utilizzando piastre con i peg sia in polistirene sia rivestiti con idrossiapatite.

Per quanto riguarda il sistema P&G, a ciascun pozzetto contenente 150 µl di terreno colturale LB venivano aggiunti 30 µl di sospensione fungina mediante una pipetta multicanale recante puntali modificati previa rimozione della parte distale (3-4 mm). La piastra così inoculata, veniva poi messa ad incubare a 30 °C per 4 e 7 giorni su di un agitatore orbitale (150 rpm).

Nel sistema HTP, invece, venivano messi 16.5 ml di terreno LB e 4.5 ml di sospensione fungina. Le condizioni standard di incubazione erano: temperatura, 30°C; tempo di incubazione, 4 e 7 giorni; agitazione di tipo basculante, 25 rpm (SSL3, Stuart, Stone UK) e angolo di inclinazione di 12° secondo le indicazioni del produttore (Innovotech, Calgary,

CA). Al fine di ottimizzare il processo di formazione del biofilm, però, venivano variate una o più condizioni quali: i) introduzione di una fase di adesione statica della durata di tre ore; ii) aumento della velocità di agitazione da 25 a 60 rpm e iii) rimozione della biomassa planctonica e di quella debolmente adesa dopo 48 o 72 ore dall'inoculo con concomitante rinnovo del terreno colturale.

Per entrambi i sistemi, al termine dell'incubazione sia la biomassa planctonica sia quella debolmente adesa, venivano eliminate trasferendo il coperchio in una nuova piastra con 96 pozzetti standard contenente ciascuno 180 µl di PBS e incubata per 15 minuti su di un agitatore orbitale (70 rpm). La procedura di lavaggio, veniva ripetuta per tre volte.

4.1.4 Determinazione dello sviluppo fungino in biofilm

Per il sistema MBEC™, data l'impossibilità di determinare la biomassa in modo diretto mediante peso secco, è stato necessario mettere a punto un sistema indiretto di determinazione della biomassa che garantisse dei buoni livelli di sensibilità. A questo scopo, è stato adottato il sistema basato sulla riduzione del sale di tetrazolio MTT a formazano (vedi sopra). Questo saggio consente, inoltre, di determinare la vitalità del biofilm, essendo la quantità di formazano prodotta proporzionale al numero di cellule metabolicamente attive. Quindi, attraverso il saggio dell'MTT si ha una stima simultanea sia della vitalità sia dello sviluppo del biofilm.

4.1.5 Analisi strutturale del biofilm fungino

La struttura del biofilm fungino, veniva studiata mediante la microscopia elettronica e, in modo particolare, con l'ausilio del microscopio elettronico a scansione e a trasmissione. Queste osservazioni strutturali venivano integrate mediante la microscopia a fluorescenza abbinata all'impiego di fluorocromi con alte specificità di legame.

4.1.5.1 Microscopio elettronico a scansione (SEM)

Al termine dei 4 e 7 giorni di crescita, i peg venivano staccati alla base dal coperchio e immediatamente pre-fissati per 30 minuti a 4 °C in tampone cacodilato 0.1 M pH 7.3 contenente glutaraldeide al 2.5% (A), 0.075 % rosso di rutenio (p/v) e lisina acetato 0.075

M. Dopo tre lavaggi in A (ciascuno di 10 min a 4 °C), i campioni venivano fissati con lo stesso tampone per 2 ore a 4 °C e successivamente, fissati con tetrossido di osmio al 2% in tampone A per 2 ore a 4°C. Le fasi di fissazione erano seguite da 3 lavaggi condotti con il tampone A (15 min a 4°C) a monte della deidratazione con soluzioni a concentrazione crescente di etanolo. I campioni dopo essere stati essiccati venivano attaccati a supporti (stubs) in alluminio, ricoperti con oro e, infine, osservati con il microscopio elettronico a scansione JEOL JSM 5200 (JEOL, Tokyo Japan).

4.1.5.2 Microscopio elettronico a trasmissione (TEM)

I campioni venivano fissati e deidratati come descritto sopra e poi infiltrati per 3 giorni con rapporti decrescenti di etanolo/ resina LR White (SPI Supplies, West Chester, PA). I campioni venivano poi incorporati nella resina LR White e tagliati con un ultramicrotomo Reichert Ultracut (Leica Microsystems Srl, Milan, Italy) usando una lama di diamante. Le sezioni sottili (60-80 nm) ottenute, venivano raccolte su griglie di rame, colorate con acetato di uranile e citrato di piombo e osservate con il microscopio elettronico a trasmissione JEOL 1200 EX II (JEOL, Giappone Tokyo).

4.1.5.3 Microscopio elettronico a fluorescenza

Al termine dei 4 e 7 giorni di crescita, i peg venivano staccati alla base dal coperchio, lavati con PBS per 1 min e colorati per 15 min con Concanavalina A coniugata con il fluorocromo Texas red (Molecular Probes) per avere una concentrazione finale di 200 µg ml⁻¹. Ciascun peg veniva poi lavato con PBS per pochi secondi e poi colorato per 10 sec con la sonda fluorescente Calcofluor White (CWF, Fluka) (concentrazione finale di 20 µg ml⁻¹). Dopo aver rimosso il CWF non legato alla biomassa, i biofilm venivano osservati usando un obiettivo ad immersione 60 X e visualizzati mediante analisi in fluorescenza usando un sistema comprendente un microscopio invertito ad epifluorescenza (Eclipse Ti-U, Nikon, Japan) e filtri Omega XF66-1 tribanda (Omega Optical Inc., Brattleboro, VT, USA). Le immagini venivano catturate con un sistema di camera retro-illuminata Photometrics Cascade CCD (Roper Scientific, Tucson, AZ, USA) e il software di acquisizione/analisi Metamorph (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA, USA).

4.1.6 Caratterizzazione biochimica del biofilm fungino

Al fine di determinare le possibili differenze tra le colture planctoniche e quelle in biofilm nella loro composizione biochimica, venivano effettuati dei saggi atti a valutare il contenuto percentuale di zuccheri totali, lipidi, chitina, proteine totali e matrice extracellulare. In modo particolare, la biomassa fungina veniva ottenuta facendo crescere il fungo su terreno LB a 30 °C per 4 e 7 giorni in agitazione orbitale (150 rpm) utilizzando beute Erlenmeyer per le colture planctoniche e il sistema MBECTM P&G per i biofilm. Al termine dell'incubazione, la biomassa veniva recuperata, lavata con acqua distillata, aliquotata e conservata a -20°C. Indipendentemente dal saggio da effettuare, il campione veniva così preparato: dopo aver aggiunto 4 ml di acqua deionizzata a 10 mg di biomassa in peso secco, la biomassa veniva omogeneizzata a 4 °C con Mini-Turrax a bassa velocità per più cicli ciascuno della durata di 30 sec.

Indipendentemente dal saggio da effettuare, era opportuno in fase di prelievo utilizzare un puntale modificato attraverso la rimozione di 3 mm dalla parte distale.

4.1.6.1 Determinazione delle proteine

Per estrarre il contenuto proteico veniva seguito il metodo proposto da Philips e Gordon (1989) al quale era stata apportata qualche modifica. In particolare, dalla sospensione ottenuta come descritto sopra, veniva prelevato 1 ml di omogenato a cui venivano aggiunti 13 µL di Triton X-100 10% e 252 µL di NaOH 5 M. Dopo aver incubato a 40 °C per 4 ore in agitazione magnetica, il campione veniva neutralizzato con 200 µL di HCl 5 M. Venivano poi prelevate diverse aliquote di campione (da 10 a 200 µL) e di seguito analizzate mediante il metodo di Bradford (1976). Ogni saggio è stato effettuato in doppio miscelando nell'ordine:

- 800 µl di campione
- 200 µl di reattivo (Biorad)

I campioni venivano agitati, incubati per 15 minuti a temperatura ambiente e quindi si effettuava la lettura spettrofotometrica dell'assorbanza a 595 nm contro bianco.

La retta di taratura era costruita utilizzando albumina di siero bovino (BSA) come standard nel range 0-22 µg.

4.1.6.2 Determinazione della chitina

Per la determinazione del contenuto di chitina è stato seguito il metodo proposto da Chen e Johnson (1983).

A 1 ml di omogenato veniva aggiunto 1 ml di HCl 12 N e i campioni incubati a 100 °C per 4 ore e, previo raffreddamento, la sospensione centrifugata (13000 rpm, 5 minuti). Dal surnatante idrolizzato venivano prelevate diverse aliquote (20-200 µl) che, successivamente, venivano portate a secco in corrente di azoto. A ciascun residuo secco, venivano aggiunti in sequenza:

- 1 ml di acqua deionizzata;
- 0.25 ml of 4% acetilacetone (4% acetilacetone in 1.25 N sodio carbonato).
- La miscela veniva incubata a 90°C per 1 h e, al termine dell'incubazione, raffreddata;

Venivano quindi aggiunti in sequenza:

- 2 ml di etanolo (vortexando per sciogliere eventuali precipitati);
- 0.25 ml di reagente di Ehrlich (1.6 g di N-N-dimetil-p-amminobenzaldeide in 60 ml di una miscela di etanolo: HCl 12 N 1:1 v/v)

Si effettuava la lettura spettrofotometrica a 530 nm contro bianco. La retta di taratura era costruita utilizzando la glucosammina come standard nel range 0-30 µg.

Il dato, riferito a unità di biomassa, veniva corretto per la resa di idrolisi della chitina che è pari al 90% dopo digestione per 4 h a 100 °C.

4.1.6.3 Determinazione degli zuccheri totali

A 0.5 ml di omogenato venivano aggiunti 0.5 ml di H₂SO₄ concentrato e dopo aver incubato il campione per 15 minuti a temperatura ambiente, diverse aliquote (da 20 a 70 µl) venivano prelevate e portate a 200 µl con acqua deionizzata.

Per la determinazione degli zuccheri totali è stato seguito il metodo dell'antrone (Roe, 1955). Ogni saggio è stato effettuato in doppio miscelando nell'ordine:

- 0.2 ml di campione o acqua distillata per il bianco
- 1.0 ml di reagente all'antrone (preparato sciogliendo 100 mg di antrone in 2.5 ml di etanolo e portando a volume di 50 ml con H₂SO₄ al 75%)

Le provette venivano tenute in ghiaccio per 5 min agitando periodicamente, incubate a bagnomaria bollente per 10 min e successivamente rimesse in ghiaccio per altri 10 min. La lettura spettrofotometrica veniva fatta a 625 nm contro bianco. La retta di taratura era costruita utilizzando glucosio come standard nel range 0-350 µg/ml.

4.1.6.4 Determinazione dei lipidi

Per la determinazione dei lipidi totali è stato seguito il metodo proposto da Izard and Limberger (2003).

Diverse aliquote di omogenato (da 100 a 1000 µL) venivano prelevate, centrifugate a 13000 rpm per 6 min e il pellet ottenuto sospeso con 600 µL di H₂SO₄ concentrato e trasferito in provette da 20 ml. Per ottimizzare il recupero, le eppendorf venivano lavate con due aliquote di H₂SO₄ concentrato e i lavaggi trasferiti nelle provette da 20 ml. I campioni venivano incubati in bagnomaria bollente per 10 min e dopo raffreddamento per 5 min venivano aggiunti 5 ml di reagente Vanillina/acido fosforico (RV, 0.120 g di vanillina sciolti in 20 ml di acqua e il volume portato a 100 ml con 85% acido fosforico). La lettura spettrofotometrica veniva effettuata a 530 nm dopo incubazione dei campioni a 37 °C per 15 min e raffreddamento a temperatura ambiente per 10 min. La retta di taratura era costruita utilizzando trioleina sciolta in cloroformio come standard (0-100 µg).

4.1.6.5 Determinazione dell'EPS

Sulle colture planctonica e biofilm di *P. ostreatus*, veniva estratto e quantificato l'EPS secondo il metodo proposto da Liu e Fang (2003). In modo particolare, dopo aver aggiunto 10 ml di acqua deionizzata e 60 µl di formaldeide al 36.5% a 750 mg di biomassa, si metteva il campione ad incubare a 4 °C per 1 h. Successivamente, venivano aggiunti 4 ml di NaOH 1 M e si incubava per 3 h a 4 °C. Al termine dell'incubazione, il mix veniva centrifugato (13000 rpm, 20 min, 4 °C) e il surnatante filtrato con una membrana a 0.2 µM. Il filtrato ottenuto, veniva dializzato in beuta contro 2 l di acqua deionizzata provvedendo a cambi ogni 4 ore nelle prime due fasi. Al termine, il dializzato veniva liofilizzato, pesato e analizzato per determinare il contenuto in proteine e zuccheri totali con i metodi sopra descritti.

4.1.7 Prove di suscettibilità al Cadmio

Al fine di valutare il livello di tossicità del Cadmio, venivano condotte delle prove sia sulle colture planctoniche che su quelle in biofilm di *P. ostreatus* prelevate al quarto e al settimo giorno di crescita e finalizzate a determinare la Concentrazione minima inibitoria (MIC) e la Concentrazione minima fungicida (MFC).

Le prove di suscettibilità al metallo venivano condotte utilizzando il sistema MBEC™ P&G in accordo con la procedura descritta da Harrison e collaboratori (2005).

Al termine dei 4 e 7 giorni di crescita, il biofilm sviluppato sui peg veniva lavato con PBS ed esposto a concentrazioni crescenti di metallo per 48 ore a 30°C in agitazione orbitale (150 rpm).

Al fine di determinare il valore di MIC₉₀, dopo l'esposizione al metallo, sia le colture planctoniche che quelle in biofilm venivano lavate con PBS e sottoposte al saggio di riduzione dell'MTT. Per l'indice MFC, invece, al termine della fase di esposizione, le colture venivano trasferite nella piastra di neutralizzazione contenente PBS addizionato con Glutazione ridotto (GSH, 5 mM) e incubate per 30 minuti. A questa fase ne seguiva una di recupero su terreno LB fresco al termine della quale (5 giorni) veniva valutata la vitalità residua. In modo particolare, i dati di riduzione dell'MTT (f) venivano graficati con le rispettive concentrazioni di metallo [Cd, mM] e i dati interpolati dalla funzione a decremento esponenziale a due termini: $f = a \bullet e^{-k[\text{Cd}]}$ dove a è la quantità di formazano prodotto nella coltura non esposta e k è il coefficiente di decadimento esponenziale.

4.1.8 Trattamento delle acque reflue

Le prove di biorisanamento in microcosmo venivano effettuate utilizzando la stessa tipologia di acque utilizzate nel set di esperimenti sui biofilm sviluppati su membrane circolari (vedi 3.5.4). Inoltre, prove successive venivano anche effettuate utilizzando lo stesso refluo concentrato e caratterizzato dall'aver la seguente composizione: pH 5.1, domanda chimica di ossigeno (COD) 85.2 ± 3.9 g/l, zuccheri totali 34.4 ± 2.6 g/l, fenoli 8.8 ± 0.3 g/l. In questo caso, però, sia le colture planctoniche che quelle in biofilm venivano pre-incubate per 144 ore con il refluo tal quale in modo da avere una prima fase di adattamento. In particolare, la biomassa fungina veniva ottenuta facendo crescere il fungo su terreno LB a 30 °C per 7 giorni in agitazione orbitale (150 rpm) utilizzando beute

Erlenmeyer per le colture planctoniche e il sistema MBEC™ P&G. Al termine dell'incubazione, sia le colture planctoniche che quelle in biofilm venivano trasferite sul sistema MBEC™ HA-HTP e messo a contatto con 15 ml di AV precedentemente sterilizzate. Gli esperimenti venivano condotti operando in modalità a batch ripetuto con più cicli consecutivi di trattamento della durata di 96 ore ciascuno. I campioni prelevati ai tempi prestabiliti, venivano centrifugati e successivamente analizzati per determinare il contenuto residuo in COD, zuccheri e fenoli totali come riportato nel cap. 3.

4.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.2.1 Formazione del biofilm in CDC Biofilm reactor (CBR)

Il CDC biofilm reactor è un reattore di recente invenzione e rappresenta uno strumento molto utile per studiare in condizioni di laboratorio i biofilm batterici. La potenzialità risiede nel fatto che consente lo sviluppo di ben 24 biofilm contemporaneamente che possono essere rimossi a tempi diversi e utilizzati per effettuare studi relativi alla cinetica di formazione, alla struttura mediante analisi al SEM o di suscettibilità a sostanze antimicrobiche. Inoltre, altra caratteristica molto importante è che un campione può essere manipolato in modo indipendente dagli altri.

Nel presente lavoro, è stato utilizzato in prove preliminari finalizzate a valutare le capacità del fungo *P. ostreatus* di formare biofilm stabili su questo sistema utilizzando coupon di vario materiale. I materiali che sono stati studiati erano: acciaio, vetro, teflon, nylon, policarbonato, poliuretano e gomma siliconica, mentre il terreno di coltura utilizzato era il Luria-Bertani. Il fungo veniva fatto crescere per 7 giorni al termine dei quali, gli holders in cui alloggiavano i coupon venivano rimossi dal reattore al fine di verificare la presenza del biofilm fungino sugli stessi. Tuttavia, il sistema si è rivelato inadeguato alla produzione dei biofilm di *P. ostreatus* per diverse ragioni. In primo luogo, è stata osservata un'adesione preferenziale del micelio al materiale (polipropilene) di cui sono costituite le aste di supporto dei coupon. Inoltre, il micelio associato ai coupon veniva facilmente rimosso a seguito dei lavaggi con PBS previsti, risultando così biomassa debolmente adesa. Tale facilità di distacco confermava che la biomassa sessile formatasi non costituiva un biofilm, la cui definizione implica, necessariamente, una tenace adesione alle superfici. Una frazione significativa della biomassa presente, inoltre, tendeva ad accumularsi negli inter-spazi compresi tra la parete interna del fermentatore e le aste di supporto dei coupon. Un ulteriore e rilevante limite costruttivo del sistema emergeva dall'osservazione di lievi deformazioni delle aste a seguito di sterilizzazione in autoclave. Il reattore CDC, quindi, non è risultato essere un valido strumento alla formazione del biofilm da parte del fungo *P. ostreatus*.

4.2.2 Formazione del biofilm fungino in Drip Flow Biofilm Reactor (DFR)

Il Drip Flow biofilm Reactor (DFR) è un sistema largamente utilizzato per consentire la formazione di biofilm batterici, come ad esempio *Pseudomonas aeruginosa* (Goeres, 2009) e *Staphylococcus aureus* (Schwartz, 2010). È un sistema utilizzato per studiare, in condizioni di laboratorio, la formazione del biofilm nell'interfaccia aria-liquido operando in condizioni di bassa forza di taglio. Il DFR è un sistema flessibile che può essere facilmente adattato ad un'ampia varietà di condizioni di crescita. Nonostante le sue numerose applicazioni, esso non è stato mai utilizzato con i funghi filamentosi. Il DFR, quindi, è stato utilizzato in prove preliminari per valutarne l'idoneità allo sviluppo di biofilm nella specie in studio su coupon di materiali diversi. I materiali che sono stati utilizzati erano caratterizzati dall'essere uno idrofobico (Teflon), uno mediamente idrofobico (Poliuretano) e uno idrofilico (Idrossiapatite), mentre il terreno di coltura utilizzato era il Luria-Bertani.

Le condizioni utilizzate per la valutare la formazione del biofilm fungino venivano modificate rispetto a quelle utilizzate per garantire la formazione del biofilm di *P. aeruginosa* e consigliate dalla ditta distributrice. Durante la prima fase di crescita del biofilm, il reattore veniva utilizzato in *batch* e affinché non si verificasse la fuoriuscita del terreno colturale, il fermentatore veniva posizionato in piano. Esso veniva quindi inoculato con 5 ml di sospensione fungina ottenuta dal pre-inoculo in modo da formare uno strato sul supporto di adesione e successivamente messo ad incubare in un incubatore ad agitazione orbitale a 28 °C e a 90 rpm. Essendo *P. ostreatus* caratterizzato dall'aver tempi di sviluppo notevolmente più lenti di quelli dei batteri, il fungo veniva fatto crescere in condizione batch per 72 ore, sebbene il protocollo fissasse la durata di questa fase a 6 ore. Al terzo giorno di crescita, tempo fissato per garantire l'adesione del fungo al supporto e per consentire una prima crescita in forma filmogena, da ciascun canale veniva eliminata sia la coltura planctonica residua sia quella debolmente adesa ai vari supporti inclinando il fermentatore di circa 10° con gli appositi sostegni metallici. Dopo aver effettuato due lavaggi della biomassa con PBS, veniva messo in funzione il sistema in continuo. In modo particolare il reattore veniva posto in camera calda e in ciascun canale veniva flussato del terreno colturale fresco tramite una pompa peristaltica settata per avere in ciascun canale un flusso di entrata e uno di uscita pari a 1 ml min⁻¹ (Fig. 1A). Al settimo giorno di crescita, i supporti venivano rimossi dal sistema e dopo aver effettuato tre lavaggi,

ciascuno di 5 minuti in agitazione orbitale con PBS, veniva valutato su ciascuno lo sviluppo del biofilm per via gravimetrica. Già da una prima analisi visiva del biofilm sviluppatosi, si deduceva che il fungo era cresciuto in modo preferenziale su poliuretano, rispetto agli altri due supporti andando a colonizzare la maggior parte della superficie di adesione disponibile (Fig. 1b). Su Teflon, invece, si ottenevano livelli scarsi di biofilm e distribuiti in modo eterogeneo sulla superficie del supporto (Fig. 1a) confermando quanto precedentemente riportato nel Cap. 3.

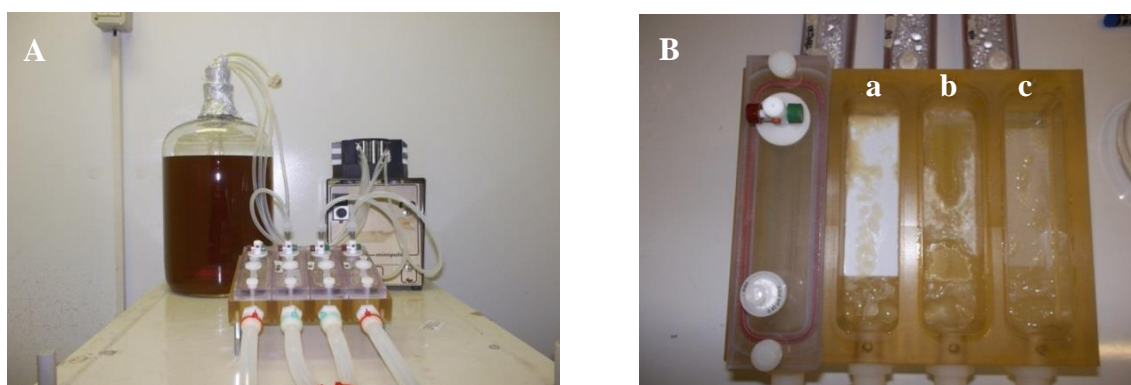


Fig. 1 Sviluppo del biofilm fungino di *P. ostreatus* ottenuto sul Drip Flow Reactor sui supporti a) Teflon, b) Poliuretano e c) Idrossiapatite prima del lavaggio.

L'analisi dei dati ottenuti dopo aver incubato i supporti a 65°C per 24 h, confermava quanto appena descritto. Infatti mentre sul poliuretano si ottenevano 0.94 g in peso secco di biofilm, sul teflon e sull'idrossiapatite si ottenevano dei livelli più bassi di biofilm fungino (0.53 e 0.25 g di peso secco, rispettivamente). Quindi, il teflon e il poliuretano erano, rispettivamente, i supporti più e meno idonei alla formazione del biofilm in accordo con i risultati ottenuti nel primo set sperimentale che prevedeva lo sviluppo del biofilm sulle membrane circolari. Sebbene l'uso del DFR si sia rivelato promettente, per questo sistema valgono le limitazioni tecniche precedentemente riportate, tra le quali un elevato consumo di terreno colturale imposto dal regime in continuo e dalle condizioni di flusso richieste e, ovviamente, il numero limitato di varianti sperimentali valutabili in un singolo

esperimento. A questo si aggiungono tutte le estreme accortezze che sono richieste per scongiurare l'insorgenza di contaminazioni microbiche a cui i sistemi a flusso sono particolarmente suscettibili.

4.2.3 Formazione del biofilm fungino su piastre MBEC™

Il Calgary biofilm device è un sistema largamente utilizzato per effettuare saggi di suscettibilità di biofilm batterici a composti tossici in modo riproducibile e veloce. L'obiettivo generale era di ottenere, non solo biofilm fungini altamente stabili, ma anche caratterizzati dall'aver una distribuzione omogenea sui peg della piastra e, quindi, utilizzabili nelle prove di risposta ai contaminanti ambientali. Nonostante le sue numerose applicazioni, esso non è stato finora mai utilizzato per i funghi filamentosi principalmente a causa delle difficoltà oggettive nella standardizzazione delle condizioni di crescita in buona parte legata alle modalità di sviluppo di questi organismi. Infatti, la sperimentazione sui sistemi MBEC™ ha richiesto una standardizzazione a livello di produzione e applicazione degli inoculi che, in sistemi ove sono in gioco poche decine di microlitri (25-45 µl), costituisce una pre-condizione fondamentale. A questo riguardo, l'uso di 2 cicli di omogeneizzazione con il sistema Ultra-Turrax, ciascuno della durata di 20 s a velocità di 7000 rpm e l'utilizzo di puntali in cui era stata rimossa di 3 mm la parte distale, portavano alla produzione di sospensioni miceliali altamente vitali e ne consentiva un'applicazione altamente riproducibile tra i pozzetti. La vitalità del micelio su ciascun pozzetto veniva valutata mediante il saggio di riduzione del sale di tetrazolio MTT subito dopo l'applicazione dell'inoculo e i dati ottenuti confrontati mediante le comparazioni multiple appaiate e con il Tukey test. In modo particolare, le differenze tra le medie di riga e di colonna confrontate non erano statisticamente significative con un livello di confidenza pari al 95%. Data l'impossibilità di determinare la biomassa cresciuta su ciascun peg in modo diretto per via gravimetrica, è stato necessario mettere a punto un sistema indiretto di determinazione che garantisse dei buoni livelli di sensibilità. A questo scopo, è stato utilizzato il saggio di riduzione di MTT il quale consente di avere una stima simultanea sia della vitalità sia della biomassa presente e in letteratura sono riportati numerosi lavori in cui questo approccio è stato utilizzato a questi scopi. Ad esempio, il saggio di riduzione del sale di tetrazolio MTT veniva utilizzato per monitorare e quantificare in vitro il biofilm di

Candida albicans sviluppatosi sulla superficie dei cateteri di vario materiale (Hawser e Douglas, 1994). Inoltre, tale saggio è stato anche utilizzato per valutare la suscettibilità dei microrganismi ad agenti antimicrobici essendo la riduzione dell'attività metabolica un indice del grado di tossicità del composto utilizzato (Walencka et al., 2006; Chandra et al., 2001). Nel nostro caso, la quantificazione della biomassa è stata resa possibile da una correlazione tra livelli di biomassa di colture planctoniche di 4 e 7 giorni e i relativi livelli di riduzione di MTT. Quindi, avendo ottenuto buone correlazioni tra le micromoli di formazano prodotte e i mg di biomassa, le equazioni delle rette, venivano sfruttate per determinare i mg di biomassa presente su ciascun peg sulla base dei valori di assorbanza ottenuti dopo incubazione con MTT.

Essendo il nostro obiettivo quello di ottenere biofilm con una distribuzione omogenea, veniva condotta un'analisi statistica mediante ANOVA per valutare se vi erano differenze significative tra i biofilm presenti sui singoli peg. In particolare, come riportato anche da Parahitiyawa e collaboratori (2006), i dati venivano analizzati considerando la media dei valori ottenuti per ogni singola colonna (8 pegs per colonna) del sistema CBD (12 colonne totali).

Da una serie di esperimenti preliminari si è potuto notare che l'impiego dei sistemi MBEC con i peg in polistirene non risultavano adatti alla formazione di un biofilm stabile di *P. ostreatus*. Al fine di verificare se l'inidoneità del polistirene nell'offrire ancoraggio alla biomassa fungina potesse essere superata dall'impiego di piastre modificate attraverso un rivestimento del supporto, esperimenti successivi sono stati condotti su piastre Calgary modificate. Infatti, le sperimentazioni successive sono state condotte su sistemi MBEC modificati attraverso un rivestimento dei peg con idrossiapatite (HA) e associati a piastre a 96-pozzetti (MBEC™ Physiology and Genetics assay, HA-P&G) o a sistemi a 12 canali inter-comunicanti (MBEC™ High throughput assay, HA-HTP). I pegs così rivestiti, consentivano al fungo di aderire e, quindi, di svilupparsi su di essi in forma filmogena e questo è probabilmente dovuto alla maggiore rugosità dell'idrossiapatite rispetto al polistirene non modificato. Inoltre, l'idrossiapatite è caratterizzata dall'aver sia ioni carichi positivamente che negativamente i quali, almeno nelle fasi iniziali di ancoraggio, potrebbero interagire con i gruppi funzionali presenti nella parete cellulare di *P. ostreatus*. In uno studio comparativo condotto da Pereira-Cenci e collaboratori (2008), l'idrossiapatite risultava essere il materiale che meglio consentiva la crescita di biofilm di *Candida glabrata* e *Candida albicans*. Inoltre, anche in *Candida tropicalis*, l'utilizzo di

peg di polistirene non modificato non consentiva di ottenere quantità soddisfacenti di biofilm, e il loro rivestimento con L-lisina risultava essere necessario allo scopo (Harrison et al., 2006a).

L'utilizzo del sistema MBEC™ HA-P&G dava luogo ad una uniforme distribuzione del biofilm fungino e ad una significativa produzione di biomassa sessile, i cui livelli crescevano all'aumentare del tempo di incubazione da 4 a 7 giorni (Fig. 2). Infatti, dalle comparazioni multiple appaiate tra le medie di colonna di biofilm coevi effettuate secondo il Tukey test, non si osservavano differenze significative ($P \geq 0.05$).

Con il sistema HA-HTP, invece, sia la quantità che l'uniformità spaziale dei biofilm risultavano essere fortemente influenzate dalle condizioni di incubazione. In particolare, in condizioni di crescita standard (velocità di oscillazione, 25 rpm e angolo di inclinazione, 12°), si osservava un'elevata difformità spaziale nei livelli di biomassa adesa che si concretizzava in un accumulo preferenziale sui “peg” periferici a danno di quelli più interni ($P \leq 0.001$) (Fig. 3A). Inoltre, la maggior parte di biomassa fungina ottenuta al termine dell'incubazione veniva recuperata in forma planctonica. Al fine di aumentare i livelli di biomassa adesa e di incrementare l'omogeneità di distribuzione, sono state effettuate una serie di modifiche alle condizioni di riferimento. Inizialmente è stata introdotta, subito a valle dell'applicazione dell'inoculo, una fase di adesione della durata di 3 ore in condizioni statiche. Questo accorgimento, da solo, non portava ad un miglioramento nella distribuzione dei biofilm sui pegs tanto da avere ancora delle differenze altamente significative tra le medie di colonna (Fig. 3B)

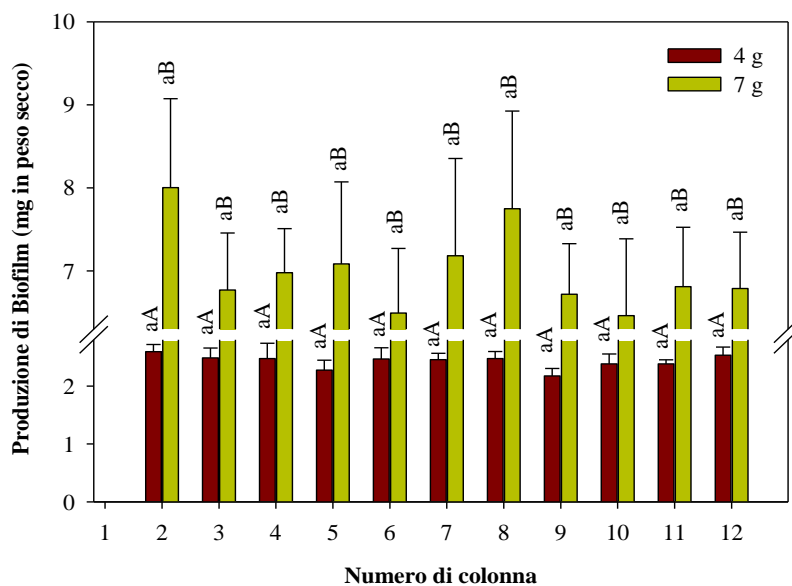


Fig. 2. Produzione di biofilm di *P. ostreatus* nel sistema MBEC in configurazione HA-P&G dopo incubazione per 4 e 7 giorni a 30 °C in terreno LB in agitazione orbitale (150 rpm). I dati sono media \pm deviazione standard di 8 repliche e le comparazioni multiple appaiate tra le medie di colonna sono state condotte con il test di Tukey ($P \leq 0.05$).

Anche l'incremento della velocità di oscillazione da 25 a 60 rpm non ha avuto successo dal momento che le differenze tra le colonne in termini di biomassa adesa risultavano essere ancora altamente significative ($P \leq 0.002$) e la quantità di biomassa adesa ai pegs non differiva da quelle ottenute nelle condizioni standard (Fig. 3C). Al contrario, l'omogeneità di distribuzione del biofilm veniva migliorata attraverso la rimozione programmata della biomassa planctonica e di quella debolmente adesa ai pegs dopo 48 o 72 ore dall'inizio dell'incubazione. Inoltre, l'uso di questo approccio portava a sensibili aumenti nei livelli di biofilm rispetto alle condizioni di riferimento (Fig. 3D e 3E). I migliori risultati in termini di uniformità di distribuzione del biofilm si osservavano quando sia la biomassa planctonica e sia quella debolmente adesa venivano rimosse dopo 48 ore (Fig. 3D).

4.2.4 Analisi morfostrutturale del biofilm di *P. ostreatus*

I biofilm ottenuti con il sistema HA-P&G venivano esaminati in situ mediante la microscopia elettronica in modo da valutare se i biofilm di *P. ostreatus* ottenuti con questi sistemi, rispettassero o meno i criteri strutturali proposti da Harding e collaboratori (2009). L'analisi al SEM del biofilm fungino mostrava la presenza dopo 4 giorni di incubazione di uno strato sottile di biomassa adesa al peg dell'ordine di poche decine di μm , costituita da un network ifale intervallato dalla presenza di canali vuoti (Fig. 4A e 4B). Le ife costituenti il biofilm erano caratterizzate da un diametro medio di $1.3 \pm 0.1 \mu\text{m}$ ed esibivano una superficie liscia e solo a tratti interessata dalla presenza di filamenti di matrice extracellulare (ECM) (Fig. 4B).

All'aumentare del tempo di incubazione, si registrava un incremento rimarchevole nello spessore del biofilm sviluppato per 7 giorni e le ife che costituivano il biofilm erano caratterizzate dall'aver una superficie rugosa in quanto uniformemente rivestite da uno strato di ECM e il loro diametro medio apparente saliva a $3.4 \pm 0.2 \mu\text{m}$ (Fig. 4D). Inoltre, nei biofilm sviluppati per 7 g, era frequentemente osservata la presenza di matasse ifali in cui le ife fungine risultavano essere cementate all'interno di un'abbondante ECM (inserto figura 4D).

La crescita osservata all'aumentare del tempo di incubazione era ascrivibile ad un incremento preferenziale dello spessore del biofilm piuttosto che ad un aumento della superficie del peg colonizzata. Ogni peg del sistema CBD ha una superficie di circa 109 mm² ed è caratterizzato dall'aver la punta rotonda che viene immersa per circa 3-5 mm nel mezzo coltura di crescita e, quindi, l'interfaccia aria-liquido è collocata a circa 4-5 millimetri sopra la punta dopo che la piastra è stata messa in agitazione sia orbitale che basculante (Harrison et al., 2006a). Il fatto di aver ottenuto il biofilm fungino soltanto nella porzione del peg immersa nel terreno colturale, significava che il biofilm di *P. ostreatus* non riusciva a raggiungere e superare l'interfaccia aria-liquido.

Le analisi al SEM hanno dimostrato che tutti i criteri strutturali proposti per descrivere i biofilm dei funghi filamentosi, sono stati pienamente soddisfatti dai biofilm di *P. ostreatus*. Tuttavia, era necessario un tempo di crescita di una settimana per avere un'abbondante produzione e conseguente rilascio di matrice extracellulare.

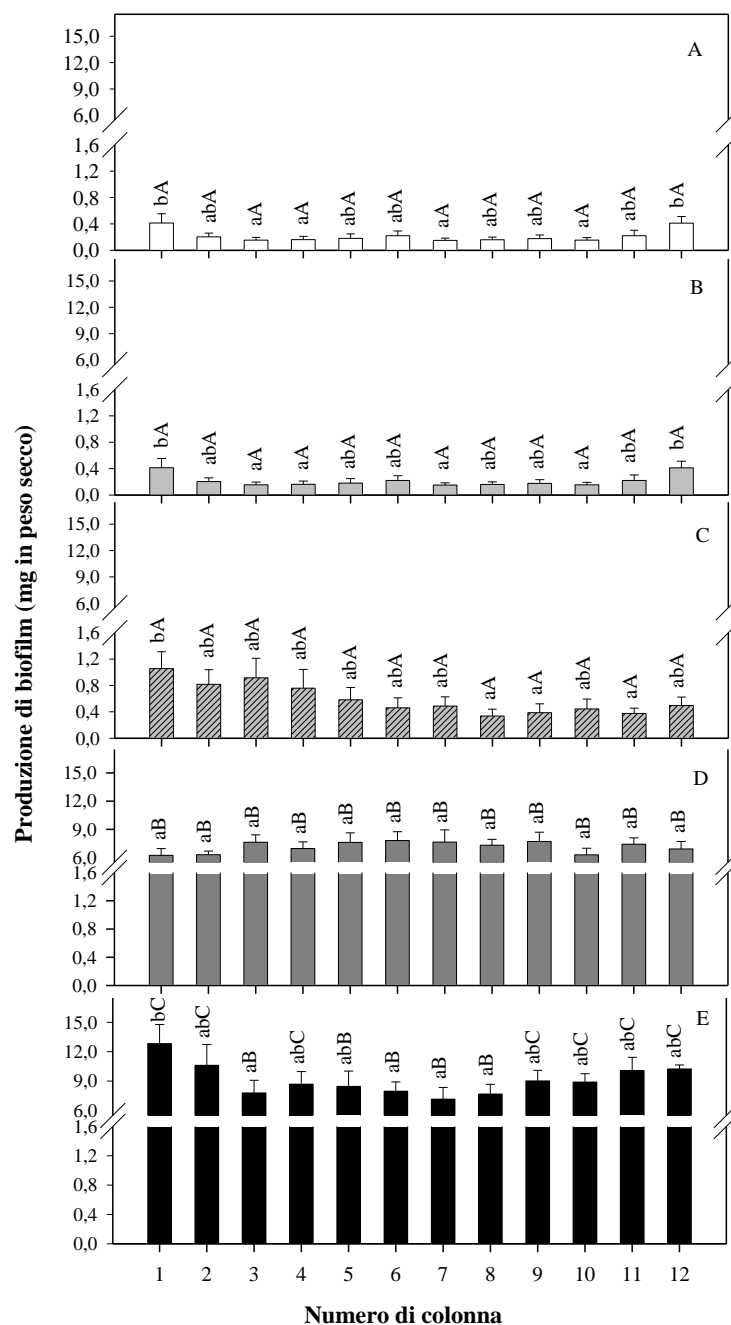


Fig. 3. Produzione di biofilm di *P. ostreatus* nel sistema MBEC™ HA-HTP dopo incubazione per 7 giorni a 30 °C in terreno LB. Le condizioni di riferimento sono: (A) agitazione oscillatoria a 25 rpm con angolo di inclinazione di 12°; (B) introduzione di una fase di adesione statica di 3 ore a seguito dell'inoculo e incubazione come in A; (C) agitazione oscillatoria a 60 rpm con angolo di inclinazione e condizioni di incubazione standard; (D e E) rimozione della biomassa planctonica e di quella debolmente adesa dopo 48 e 72 ore, rispettivamente, e sostituzione concomitante del terreno LB nelle condizioni di incubazione come in (A). I dati sono la media \pm deviazione standard di 8 repliche e le comparazioni multiple appaiate tra le medie di colonna sono state condotte con il test LSD di Fisher ($P \leq 0.05$).

I biofilm fungini venivano analizzati anche mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM). In Fig. 4E è mostrata in sezione longitudinale un'ifa presente nel biofilm a 7 giorni in cui è possibile notare la presenza delle connessioni a fibbia e del setto a doliporo che sono delle tipiche strutture dei funghi basidiomiceti. Nella stessa figura, inoltre, è evidente la presenza di ammassi di matrice extracellulare adesa alla superficie esterna della parete cellulare e, in corrispondenza di queste zone caratterizzate dalla presenza di ECM, era evidente un accumulo di piccole vescicole secretorie a livello intracellulare responsabili, probabilmente, del rilascio di questo materiale. Nella Fig. 4F, relativa alla sezione trasversale di un'ifa del biofilm, si può osservare come l'ECM rilasciata a livello extracellulare vada a costituire una guaina compatta e uniforme di rivestimento attorno all'ifa fungina

L'organizzazione morfostrutturale dei biofilm fungini, veniva anche studiata mediante l'utilizzo della microscopia a fluorescenza dopo colorazione combinata con i fluorocromi Calcofluor White e Concanavalina A coniugata con Texas Red. In particolare, il primo fluorocromo è un colorante eccitabile agli UV, in grado di legarsi alla chitina e ai β -glucani ed è stato a lungo utilizzato per mettere in evidenza le pareti cellulari fungine (Albani e Plancke, 1999) mentre il secondo si lega in modo specifico ai residui α -mannopiranosilici e/o α -glucopiranosilici della matrice extracellulare.

Nel biofilm sviluppati per 4 giorni, la rete miceliale risultava essere caratterizzata dalla presenza di canali vuoti e dalla presenza localizzata di intense macchie fluorescenti rosse dovute al legame della Con-A ai suddetti residui dell'ECM (Fig. 5A). Nei biofilm a 7 giorni, invece, oltre ad essere evidente un incremento della densità del micelio nel biofilm, l'ECM risultava essere più abbondante e con la tendenza a riempire i canali vuoti formando delle strutture simili a dei fasci attorno alle ife e promuovendo l'adesione tra due o più ife (Fig. 5B e inserto 5C).

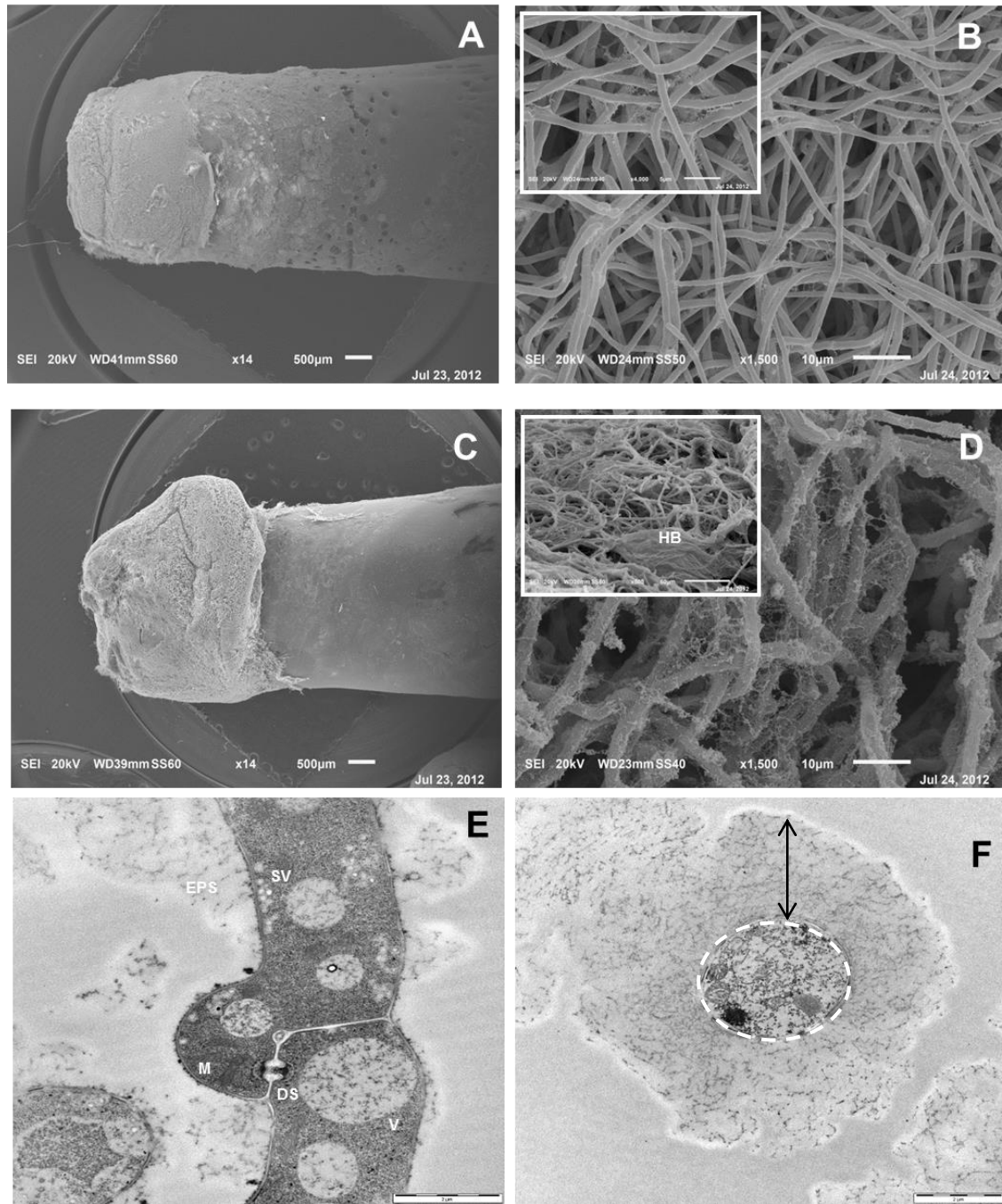


Fig. 4 (A-D) Micrografie al microscopio elettronico a scansione (X 350) e a trasmissione (E-F) del biofilm di *P. ostreatus* cresciuto sui peg del sistema MBEC™ HA-P&G su terreno LB per 4 (A e B) e 7 giorni (C e D) a 30 °C in agitazione orbitale (150 rpm). Negli inserti, sono riportati i dettagli a maggior ingrandimento; (E ed F) sezione longitudinale e trasversale di un'ifa costituente il biofilm a 7 giorni. Abbreviazioni: doliporo (DS), matassa ifale (HB), vacuoli (V), matrice extracellulare (EPS), vescicole secretorie (SV).

L'analisi del biofilm al microscopio elettronico a fluorescenza, oltre a confermare le osservazioni di microscopia elettronica a scansione e a trasmissione, forniva ulteriori interessanti informazioni. In particolare, la fluorescenza, dovuta al legame del Calcofluor White alle strutture di β -glucano, era confinata alle ife fungine, a differenza di quanto osservato in altri studi su biofilm fungini in cui veniva osservata una diffusa fluorescenza blu attribuita al rilascio di materiale esopolisaccaridico costituito da residui di β -glucani (Chandra et al., 2001b; Kuhn et al., 2002).

Nel presente studio, invece, si osservava un'intensa fluorescenza rossa dovuta al legame della Con-A all' ECM suggerendo che il materiale extracellulare secreto risulta essere prevalentemente costituito da α -glucani contenenti residui α -mannopiranosilici o α -glucopiranosilici.

A tal proposito, studi di caratterizzazione strutturale dei polisaccaridi extracellulari prodotti dalle colture planctoniche di *P. ostreatus*, ottenute in coltura agitata, confermavano che questi erano costituiti da due frazioni a differente peso molecolare e rappresentati da residui di (1 \rightarrow 3)- β -D-glucani con bassa solubilità in acqua e (1 \rightarrow 4)- α -D-glucani (Gutiérrez et al., 1996).

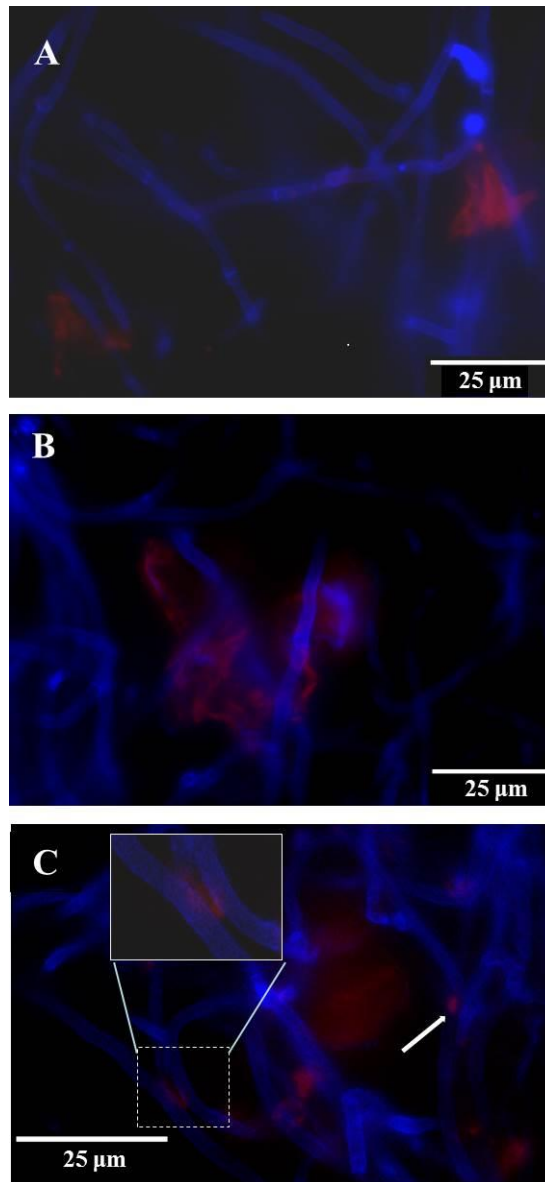


Fig. 5. Micrografie al microscopio elettronico a fluorescenza del biofilm di *P. ostreatus* cresciuto sul sistema MBEC HA-P&G su terreno LB per 4 (A) e 7 giorni (B e C) a 30 °C in agitazione orbitale (150 rpm) e conseguentemente colorato con Concanavalina A coniugata con Texas Red e Calcofluor White. La freccia bianca indica un punto di inizio della formazione dell'ECM.

4.2.5 Caratterizzazione biochimica delle colture di *P. ostreatus*

Il biofilm di *P. ostreatus* veniva anche caratterizzato a livello biochimico al fine di valutare eventuali differenze con la coltura planctonica nella composizione chimica. In particolare, venivano effettuati saggi finalizzati a quantificare il contenuto percentuale di zuccheri totali, lipidi, proteine, chitina e ceneri. Inoltre, veniva anche quantificato il contenuto in ECM di cui si determinava anche la composizione in proteina e zuccheri totali.

Per quanto riguarda i lipidi e le proteine totali, il contenuto percentuale risultava essere maggiormente influenzato dall'età piuttosto che dal sistema colturale preso in esame. Infatti, mentre il contenuto percentuale delle proteine diminuiva dai 4 ai 7 giorni, quello dei lipidi aumentava. Sempre considerando questi due parametri, in modo indipendente dall'età, non si riscontravano delle differenze significative tra i sistemi colturali coevi (planctonica vs. biofilm). Anche per la chitina, il contenuto percentuale aumentava con l'età della coltura, sebbene i biofilm erano caratterizzati dall'aver un minor contenuto rispetto alle colture planctoniche coeve. Mentre per il contenuto in chitina e lipidi, le percentuali ritrovate nei nostri sistemi colturali risultano essere più alte rispetto a quelle riportate da Hadar e Choen-Arazi (1986), il contenuto in proteina risultava essere invece più basso.

Le maggiori differenze tra le colture planctoniche e quelle in biofilm risultavano essere relative ai loro rispettivi contenuti di zuccheri totali ed ECM. In particolare, il contenuto degli zuccheri risultava essere positivamente influenzato sia dal tempo di incubazione, aumentando dai 4 ai 7 giorni, sia dal sistema colturale utilizzato essendo i biofilm caratterizzati dall'aver un contenuto maggiore rispetto alle colture planctoniche. Infatti, per le colture planctoniche e quelle in biofilm, il contenuto in zuccheri totali aumentava dal 39.66 al 44.31 % per le colture di 4 giorni e dal 52.91 al 59.09 % per quelle di 7 giorni, rispettivamente. Per quanto riguarda l'ECM, invece, mentre per le colture planctoniche non si aveva un aumento sostanziale passando dai 4 ai 7 giorni (3.1 e 3.6 % rispettivamente), per i biofilm, il contenuto percentuale saliva dal 6.1 all'11.2 % all'aumentare del tempo di incubazione. Questi dati confermano quanto osservato dall'analisi dei campioni in microscopia elettronica a scansione che avevano evidenziato un accumulo tempo-dipendente di ECM nelle colture in biofilm e una maggiore presenza di questo componente nei biofilm rispetto alle colture planctoniche coeve. Inoltre, le analisi biochimiche effettuate sull'ECM estratto, mostravano che esso risultava essere costituito principalmente

da zuccheri e proteine che rappresentavano, rispettivamente, la maggiore e minore componente.

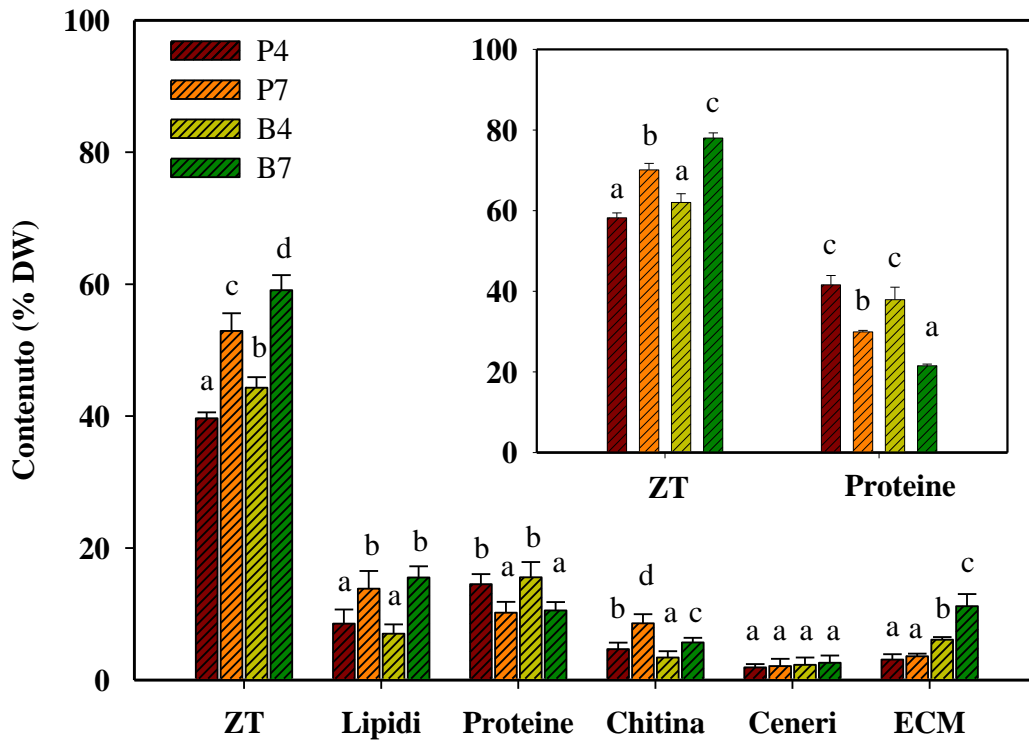


Fig. 6 Contenuto percentuale di zuccheri totali (ZT), lipidi, proteine, chitina, ceneri ed ECM in colture planctoniche (P) e biofilm (B) dopo 4 e 7 giorni di incubazione sul sistema MBEC™ HA-P&G a 30°C e in agitazione orbitale (150 rpm). L'inserto mostra contenuto zuccherino e proteico dell'ECM estratto dai vari sistemi culturali. I dati rappresentano la media \pm deviazione standard di 9 repliche ad eccezione dell'ECM e delle ceneri in cui il numero delle repliche era pari a 3. Le stesse lettere sopra le barre indicano l'assenza di differenze significative per ciascun parametro tra i sistemi culturali.

4.2.6 Risposta comparativa a contaminanti ambientali

Una delle caratteristiche che, generalmente, contraddistingue i biofilm microbici, è una maggiore tolleranza/resistenza a fattori di stress sia fisici che chimici rispetto alla controparte planctonica. Tuttavia, in alcuni casi, queste risposte differenziali sembrano

essere specie-specifiche e/o dipendere dalle condizioni di esposizione. In questa direzione, i biofilm di *P. ostreatus* sono stati comparati con le controparti planctoniche, da una parte, in termini di suscettibilità al cadmio e, dall'altra, in termini di capacità di utilizzo del carico organico di acque reflue di frantoio in presenza di composti tossici quali i fenoli. La scelta è ricaduta sul cadmio in quanto, insieme al mercurio, rappresenta il metallo più tossico sui funghi agenti carie bianca. Per quanto riguarda, le acque di vegetazione, invece, è noto che i fenoli in esse contenuti esercitano sui funghi un'azione tossica dipendente dalla concentrazione.

4.2.6.1 Prove di suscettibilità al Cadmio

L'interazione dei funghi con i metalli pesanti può causare diversi cambiamenti nei processi fisiologici e, in certe circostanze, può portare anche alla morte del micelio. Ciò nonostante, i funghi hanno evoluto dei meccanismi attivi di difesa che alleviano la tossicità dei metalli, ad esempio attraverso l'utilizzo di composti chelanti intra- ed extra-cellulari (Baldrian, 2002).

Al fine di valutare il livello di tossicità del cadmio, e in modo particolare i valori di concentrazione minima inibitoria (MIC₉₀) e concentrazione minima fungicida (MFC), venivano condotte delle prove sia sulle colture planctoniche che su quelle in biofilm prelevate al quarto e settimo giorno per consentire confronti coevi di tolleranza al metallo. La MIC₉₀ viene definita come la concentrazione di metallo in grado di inibire al 90% la crescita fungina mentre la MFC come la concentrazione in grado di portare alla morte cellulare. La scelta del metallo è ricaduta sul Cd sia per la sua presenza ubiquitaria nell'ambiente sia per la sua elevata tossicità esercitata sui funghi white-rot (Ezzohri et al., 2009; Baldrian e Gabriel, 1997). In generale, la tossicità dei metalli risulta essere tempo- e concentrazione-dipendente. Infatti, per quanto riguarda la prima variabile, Harrison e collaboratori (2005a e 2005b) dimostrarono che la maggiore tolleranza delle culture in biofilm rispetto alle loro controparti planctoniche tendeva a diminuire quando il tempo di esposizione veniva aumentato da 5 a 24 ore. Quindi, per effettuare un'affidabile valutazione della diversa suscettibilità dei due sistemi di coltura al Cd, la durata dell'esposizione al metallo è stata prolungata a 48 h.

Indipendentemente dall'età e dalla modalità di crescita (planctonica o biofilm), le relazioni dose-risposta tra concentrazioni di Cd e attività metabolica residua erano interpolate in modo robusto da una funzione a decremento esponenziale a due termini che rendeva possibile un'affidabile determinazione dei valori di MIC₉₀ e MFC. La tabella di seguito riportata, mostra comparativamente questi parametri in colture planctoniche e biofilm coevi insieme ad alcuni parametri che esprimono la bontà dell'interpolazione.

Le colture planctoniche di 7 giorni mostravano una maggiore suscettibilità al Cd rispetto a quelle di 4 giorni, come desunto dai valori di MIC₉₀ e MFC che erano, rispettivamente, 3.5 - e 2 volte inferiori. Le colture planctoniche di *P. ostreatus* risultavano essere piuttosto suscettibili al metallo, e questo era in accordo con il risultato ottenuto da Baldrian e Gabriel (1997) i quali riportavano per questa specie un valore di IC₅₀ pari a 0.18 mM.

Sia i valori di MIC₉₀ che di MFC ottenuti, indicavano che i biofilm di *P. ostreatus* presentavano una maggiore tolleranza al metallo rispetto alla controparte planctonica. Infatti, nei biofilm sviluppati per 4 e 7 giorni la tolleranza al Cd desunta dai rispettivi valori di MIC₉₀, risultava incrementata di un fattore 3.2 e 11.1, rispettivamente. Un incremento pari a 2.4 e 6.5 volte in termini di MFC, invece, era osservato nei biofilm di 4 e 7 giorni rispetto alle controparti planctoniche (Tabella 1).

Così, oltre a soddisfare i criteri strutturali proposti da Harding e collaboratori (2009), il biofilm di *P. ostreatus* presentava anche una maggiore resistenza verso gli agenti tossici rispetto alla coltura planctonica, caratteristica questa che, generalmente, contraddistingue i biofilm microbici (Booth et al., 2011; Harding et al., 2009).

In alcuni casi, la maggiore tolleranza dei biofilm ai metalli pesanti è attribuibile alla presenza di cambiamenti a livello fenotipico che avvengono all'interno della popolazione che costituisce il biofilm. In biofilm di *Candida* sp, la maggior resistenza è ascrivibile alla presenza di cellule specializzate chiamate cellule di persistenza. Ciò nonostante, nei basidiomiceti, la presenza di questa tipologia di cellule di persistenza non è stata ancora dimostrata. Un ulteriore fattore determinante per l'aumentata tolleranza del biofilm fungino rispetto alla controparte planctonica è la limitata diffusione e/o penetrazione delle frazioni cariche delle sostanze antimicrobiche all'interno della matrice extracellulare del biofilm (Harrison et al., 2006b).

Tabella 1. Valori di concentrazione minima inibitoria (MIC₉₀) e concentrazione minima fungicida (MFC) del Cadmio in colture planctoniche e biofilm di *P. ostreatus* di 4 e 7 giorni a 30°C su terreno LB e in agitazione orbitale (150 rpm).

Sistema colturale	MIC ₉₀				MFC			
	Parametri della curva			MIC ₉₀ (mM)	Parametri della curva			MFC (mM)
	R ² _{adj} ^{a)}	F ^{b)}	k ^{c)}		R ² _{adj} ^{a)}	F ^{b)}	k ^{c)}	
Planctonica 4 g	0.933	762.0	0.599±0.03	3.9	0.884 ^{d)}	133.97	0.862±0.15	7.0
Planctonica 7 g	0.878	231.7	2.114±0.26	1.1	0.848	196.5	0.667±0.08	3.5
Biofilm 4 g	0.938	1300.3	0.185±0.01	12.4	0.954	1561.6	0.137±0.01	16.7
Biofilm 7 g	0.979	1792.7	0.190±0.01	12.2	0.978	2060.7	0.101±0.004	22.7

a) coefficiente di determinazione corretto per i gradi di libertà del sistema; b) coefficiente di Fisher-Snedecor; c) coefficiente di decadimento esponenziale e relativo errore standard; d) miglior correlazione con una funzione a decadimento esponenziale a tre termini.

Infatti, l'ECM prodotto dalle cellule che compongono il biofilm è una struttura altamente idratata e costituita da acidi nucleici, proteine e polisaccaridi, i cui gruppi funzionali, quali l'anione carbossilato, gruppi fosfato, sulfidrilico e amminico, conferiscono ad esso una carica poliionica e, quindi, la capacità di interagire con anioni e cationi. Diversi studi di letteratura riportano la capacità di *P. ostreatus* di accumulare ioni cadmio principalmente tramite bioassorbimento (Sanglimsuwan et al., 1993; Favero et al., 1991).

Al fine di valutare l'eventuale presenza di cambiamenti morfologici indotti dalla presenza del metallo rispetto alla condizione di controllo non perturbata, sia le colture planctoniche che quelle in biofilm cresciute per 4 e 7 giorni esposte per 48 ore alle rispettive concentrazioni di MIC₉₀ venivano analizzate mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM).

Come si può notare dalle immagini ottenute al SEM (Fig. 7), in entrambi i sistemi colturali, l'effetto principale dell'esposizione al cadmio era relativo alla produzione e quindi al rilascio della matrice extracellulare. Infatti, per quanto riguarda le colture planctoniche, a differenza di quelle non perturbate in cui le ife fungine apparivano lisce e turgide (Fig. 7A e 7C), in quelle esposte per 48 ore al metallo le ife assumevano un aspetto più irregolare dovuto al rilascio e alla deposizione su di esse di matrice extracellulare. In particolare, nelle colture di 4 giorni l'esposizione alla MIC₉₀ aveva un effetto marcato sulla struttura delle ife che si manifestava con una rilevante perdita di turgore (Fig. 7B). Questo effetto non si evidenziava sulle colture di 7 giorni in cui, l'esposizione al metallo induceva il micelio a produrre e rilasciare una notevole quantità di ECM che andava a rivestire in modo abbastanza omogeneo le ife fungine (Fig. 7D). La presenza dell'ECM nelle colture esposte potrebbe essere dovuta, come sopra menzionato, al fatto che esso svolge un ruolo di protezione del micelio in condizioni di stress agendo sia come scambiatore di ioni sia come materiale adsorbente limitando così la diffusione del tossicante.

Per quanto riguarda il biofilm, invece, la presenza del metallo influenzava sia la capacità di crescita del fungo lungo la superficie del peg sia la struttura dell'ECM prodotta dalle colture stesse. Infatti, in relazione al primo aspetto, a differenza di quanto osservato per le colture non esposte, in presenza del metallo si evidenziava la tendenza del fungo a colonizzare maggiormente la superficie del peg riuscendo ad oltrepassare l'interfaccia liquido-aria e a colonizzare anche la porzione del peg non immersa nel terreno colturale (dato non mostrato). Inoltre, in modo indipendente dalla concentrazione di esposizione utilizzata, si notava un cambiamento nella struttura dell'ECM poiché, mentre nelle colture ottenute in condizioni di crescita non perturbate risultava avere un aspetto filamentoso tanto da costituire una trama sulle ife (Fig. 7E e 7F), in quelle esposte assumeva un aspetto per lo più granuloso. A differenza di quanto osservato per le colture planctoniche, nelle ife dei biofilm esposti al metallo non venivano rilevate perdite di turgore.

Al fine di valutare se, le differenze strutturali osservate nei campioni esposti ai metalli rispetto a quelli ottenuti in condizioni non perturbate fossero imputabili alla presenza di ioni metallici sulle ife stesse, veniva anche effettuata una microanalisi mediante rilevatore EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) integrato con il SEM in grado di fornire uno spettro e una mappa degli elementi presenti nel campione. Nonostante le apprezzabili differenze tra i campioni ottenuti in condizioni non perturbate e quelli esposti al metallo nella struttura sia delle ife fungine che dell'ECM prodotto, la microanalisi effettuata non

rilevava la presenza di ioni cadmio. Sebbene la microanalisi non abbia rilevato la presenza del metallo sulla superficie dei campioni analizzati, non si può escludere il fatto che i cambiamenti strutturali osservati siano dovuti ad una internalizzazione di ioni metallici sia nelle ife fungine sia all'interno dell' ECM essendo la microanalisi in grado di rilevare la presenza di ioni metallici solo negli strati più superficiali del campione.

Quindi, per confermare o smentire quest'ultima ipotesi, veniva effettuata un'analisi al TEM in modo da avere anche in questo caso un confronto con i campioni ottenuti in condizioni non perturbate di cui sono state precedentemente descritte le caratteristiche ultrastrutturali. In particolare, indipendentemente dall'età della coltura e dal sistema colturale (coltura planctonica e biofilm), nei campioni esposti al metallo le ife erano caratterizzate dalla presenza di strutture circolari elettrone-dense sia all'interno che al di fuori ai vacuoli (Fig. 8C e 8D). La frequenza di queste strutture, non riscontrata nelle colture non esposte, era significativamente più alta nei biofilm esposti. La presenza di questi granuli elettrone-densi sia a livello della parete cellulare sia all'interno del citoplasma potrebbe indicare una probabile prima fase di interazione del metallo con i componenti della parete e un successivo accumulo dello stesso nel citoplasma. Molte specie fungine possono essere applicate nei processi di micorisanamento essendo in grado di rimuovere i metalli pesanti da siti inquinati, soprattutto Cd, Hg e Pb (Kalac et al., 2009), attraverso diversi meccanismi tra cui il bio-accumulo o il bio-assorbimento.

Nella coltura planctonica di 4 giorni, l'effetto tossico del cadmio sulle ife fungine era confermato anche dall'analisi al TEM in cui si evidenziava la presenza di ife collassate (Fig 8A) caratterizzate dalla presenza di strutture circolari a rosetta che potrebbero essere imputabili ad aggregati di ioni metallici (inserto fig. 8A). Interessante era la presenza, nelle colture planctoniche di 7 giorni, non solo di ECM che risultava essere più abbondante rispetto alla coltura non perturbata, ma anche di strutture multi-lamellari in corrispondenza della parete cellulare la cui presenza in altri sistemi cellulari risulta essere correlata a una situazione di stress (Fig 8B).

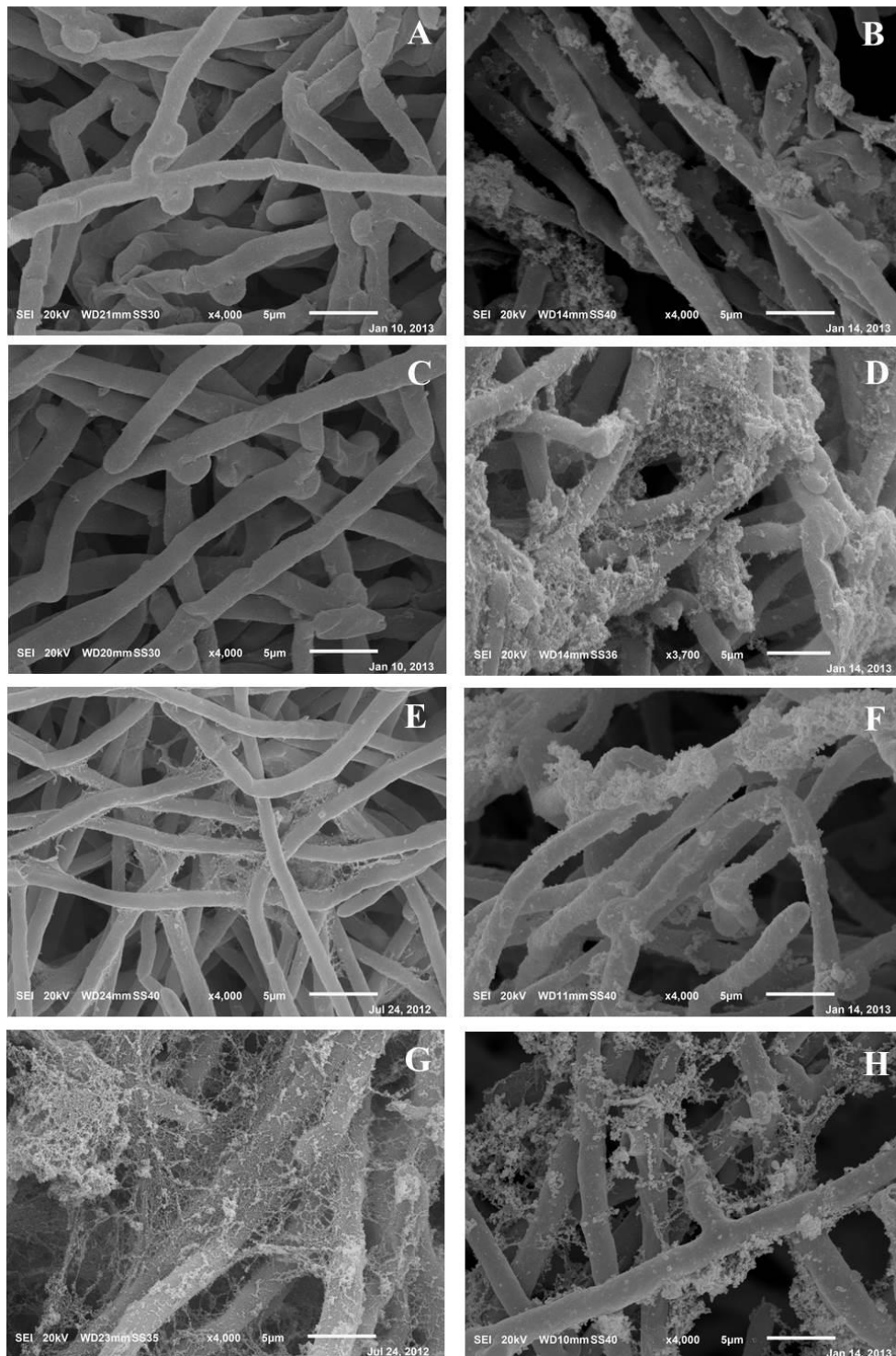


Fig. 7 (A-H). Micrografie al microscopio elettronico a scansione di colture planctoniche e biofilm di *P. ostreatus* cresciute per 4 e 7 giorni in condizioni non perturbate (A-C e E-G, rispettivamente) ed esposte per 48 ore alle concentrazioni di cadmio corrispondenti alla MIC₉₀ (B-D e F-H, rispettivamente)

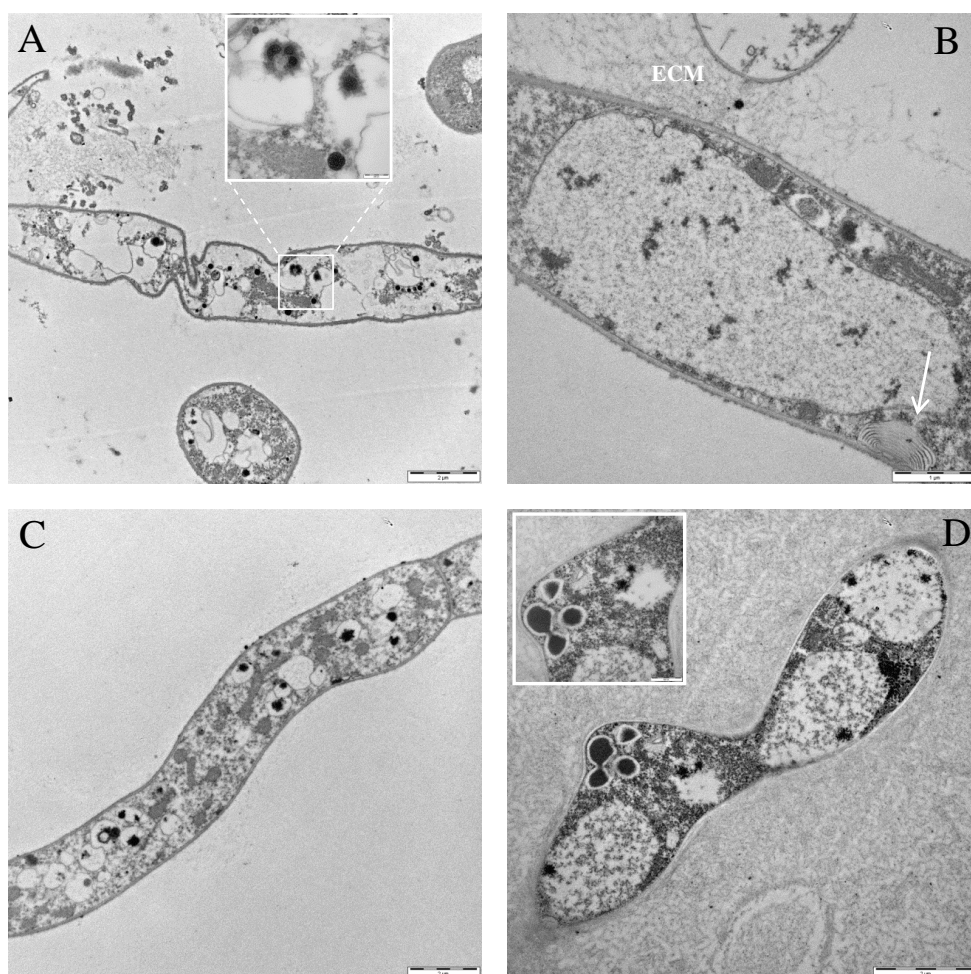


Fig. 8 (A-D). Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione di colture planctoniche e biofilm di *P. ostreatus* cresciute per 4 e 7 giorni ed esposte per 48 ore alle concentrazioni di cadmio corrispondenti alla MIC_{90} (A-C e B-D, rispettivamente).

4.2.6.2 Prove di detossificazione delle acque di vegetazione

Le acque di vegetazione (AV) hanno un'azione fitotossica ed un'ampia gamma di attività antimicrobiche, antivirali ed antifungine dovute principalmente alle componenti fenoliche in esse contenute (Tuncel & Nergiz, 1993; Aziz et al., 1998; Saravanakumar et al., 2009; Vagelas et al., 2009). Lo smaltimento della AV, quindi, dato il loro carico organico e, soprattutto, l'alta concentrazione di composti di natura fenolica, rappresenta un problema ambientale di notevole rilevanza. Considerate le enormi quantità che si producono (ca. 30

milioni di m³ all'anno), la natura frammentata delle aziende produttrici e l'ampia variabilità della composizione chimica delle AV, non esiste un metodo di trattamento/smaltimento soddisfacente sia da un punto di vista economico che tecnico (Mc Namara et al., 2008). Buoni risultati in termini sia di detossificazione sia economici, sembrano derivare dall'utilizzo dei funghi, in particolare i funghi *white rot* che, essendo dotati di un efficace sistema ligninolitico aspecifico, sono in grado di degradare la componente fenolica delle AV (Kissi et al., 2001). Essi, inoltre, grazie alla maggiore tolleranza a composti tossici e alla loro modalità di crescita filamentosa, si sono dimostrati essere più efficienti rispetto ai batteri nel processo di detossificazione delle AV (Neifar, 2012). In questo lavoro è stato utilizzato il micelio di *P. ostreatus* con l'obiettivo di valutare se le colture fungine cresciute in biofilm monospecifici presentavano una maggiore efficacia sia nell'abbattimento del carico organico (COD) che nella rimozione dei composti fenolici rispetto alla controparte planctonica. In particolare, gli esperimenti sono stati condotti utilizzando biofilm e colture planctoniche di 7 giorni ottenute nelle condizioni standard e operando in modalità a batch ripetuto con cicli consecutivi di trattamento della durata di 96 ore ciascuno. Venivano utilizzate, in un caso, delle acque di vegetazione caratterizzate dall'aver un valore di COD e fenoli totali pari a 70 g/l e 6.8 g/l rispettivamente, e nell'altro lo stesso refluo ma più concentrato con valori di COD e fenoli totali pari a 85.2 g/l e 8.8 g/l, rispettivamente. La scelta di questa tipologia di refluo è stata dettata dal fatto che dati di letteratura considerano questi livelli di carico incompatibili con un buon esito di trattamento con funghi ligninolitici (Sayadi e Ellouz, 1993; Jaouani et al., 2003). Sembra, infatti, che alcune specie fungine non siano in grado di degradare i composti organici contenuti nelle AV con valori di COD superiori ai 60 g/l. Sebbene i dati riportati in letteratura considerino i reflui utilizzati in questo studio incompatibili con un buon esito di trattamento biologico, il loro utilizzo aveva proprio l'obiettivo di mettere in evidenza un'eventuale maggiore efficienza delle colture in biofilm rispetto a quelle planctoniche.

Come mostrato in figura 8 (A-D), in entrambe le tipologie di refluo, le prestazioni degradative del biofilm in termini di rimozione del carico organico, passando dal primo all'ultimo ciclo di trattamento, risultavano essere decisamente superiori a quelle delle rispettive colture planctoniche. In particolare, nel refluo tal quale, l'abbattimento massimo del COD era dell' $89.0 \pm 0.6 \%$ e del $68.9 \pm 2.2 \%$, rispettivamente, per la coltura in biofilm e quella planctonica. Inoltre, confrontando l'abbattimento nelle due condizioni sottoposte ad indagine, si nota come l'efficienza di riduzione del carico organico sia

migliore nel refluo tal quale rispetto a quello concentrato ($89.0 \pm 0.6 \%$ vs. $72.4 \pm 3.3 \%$ per il biofilm e $68.9 \pm 2.2\%$ vs. $36.8 \pm 4.1 \%$ per la coltura planctonica, rispettivamente). Ciò nonostante, le percentuali di abbattimento ottenute nel refluo concentrato, evidenziano ancor più le maggiori potenzialità del biofilm rispetto alla controparte planctonica.

In alcuni studi, è stato messo in evidenza il fatto che l'immobilizzazione dei microrganismi a un supporto inerte migliora il processo di detossificazione delle AV. Infatti, tra le varie strategie utilizzate nel trattamento delle AV con i funghi *white rot*, quella dell'immobilizzazione ad un supporto di tipo artificiale, risulta essere piuttosto efficace (Ahmadi et al., 2006a; 2006b), poiché consente di separare la biomassa dal liquido che deve essere trattato (permettendo un possibile riutilizzo della stessa) e perché in generale determina un aumento delle rese in termini di degradazione dei composti organici (Lan et al., 2009). Infatti, come riportato da Neifar e collaboratori (2012), i microrganismi fungini *Corioloopsis polyzona* e *Pycnoporus coccineus* immobilizzati su di un supporto artificiale quale la spugna poliuretana, mostravano maggiori rese sia in termini di degradazione del COD che dei fenoli rispetto alle colture libere.

Quanto osservato per il COD inoltre, risultava ancora più evidente considerando i composti fenolici, dei quali si osservava una rimozione pressoché totale da parte del biofilm, mentre nella coltura planctonica l'attività defenolante risultava essere più debole. In particolare, nel refluo tal quale, mentre nel biofilm la rimozione dei fenoli risultava essere pressoché totale in tutti i cicli di trattamento ($99.1 \pm 0.1 \%$), per le colture planctoniche tale rimozione subiva un forte decremento passando dal primo all'ultimo ciclo di trattamento ($82.3 \pm 0.1 \%$ vs. $37.1 \pm 0.6 \%$). Quanto appena descritto, veniva altresì riscontrato nel trattamento del refluo concentrato. La maggiore capacità delle colture in biofilm di degradare i fenoli era accompagnata da un maggior rilascio di enzimi extracellulari fenolossidanti con una produzione preferenziale dell'enzima laccasi (Lac) piuttosto che della manganese perossidasi (MnP). Infatti, come riportato in letteratura, in *P. ostreatus* la Lac è considerata essere la principale responsabile dell'ossidazione dei composti fenolici e delle ammine aromatiche, riducendo l'ossigeno molecolare ad acqua (Sannia et al., 1986; Martinari et al., 1996; Tsioulpas et al., 2002). Il risultato ottenuto, inoltre, era anche in accordo con studi condotti da Zilly e collaboratori (2002) in cui la sola attività fenolossidante rilevata in *P. pulmonaris* durante il trattamento delle AV era proprio data dalla Lac. Piperidou e collaboratori (2000) riportarono, inoltre, che la sintesi dell'enzima Lac in *P. ostreatus* era indotta proprio dall'esposizione alle AV in quanto i composti

fenolici in esse contenuti sono in grado di stimolare proprio la sintesi di questo enzima (Tomati et al., 1991; Martinez-Nieto et al., 1992).

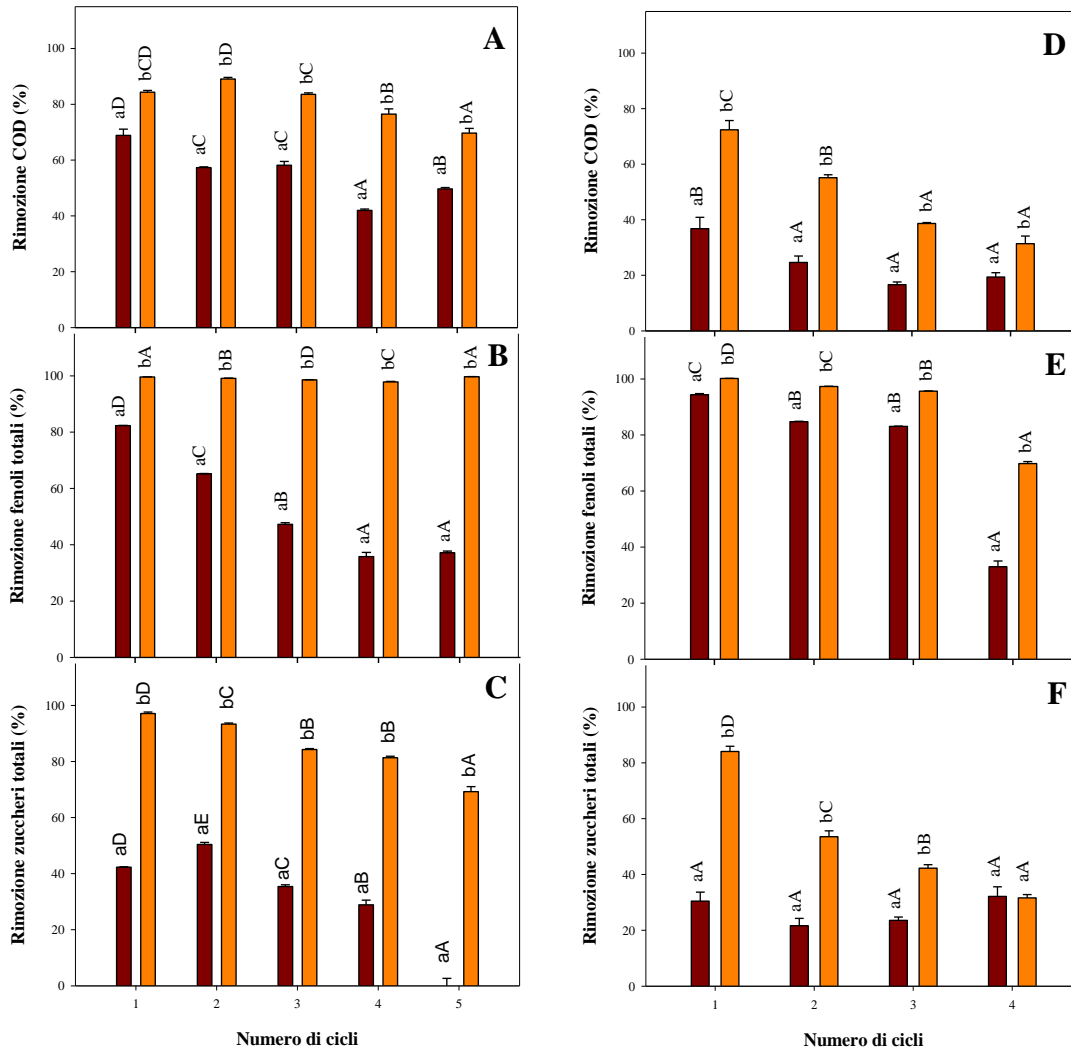


Fig. 7 Rimozioni percentuali di COD (A-D), fenoli totali (B-E) e zuccheri totali (C-F) osservate al termine del trattamento in modalità a batch ripetuto di acque reflue di frantoio tal quali e concentrate con colture planctoniche (barre marroni) e biofilm (barre arancioni) di *P. ostreatus*. Gli esperimenti sono stati condotti su sistema MBECTM in configurazione HA-HTP a 30 °C in agitazione basculante (25 rpm) per 5 e 4 cicli di trattamento. I dati rappresentano la media \pm deviazione standard di due esperimenti paralleli.

5. FORMAZIONE DEL BIOFILM MISTO FUNGO-BATTERIO

I biofilm microbici possono essere composti da una singola specie microbica, ma, comunemente, sono costituiti da microrganismi appartenenti a specie diverse come, ad esempio, i biofilm formati da cellule batteriche e funghi insieme.

I biofilm misti fungo-batterio (BFB) presentano delle caratteristiche ben diverse da quelle dei rispettivi biofilm monospecifici batterici o fungini. In molti casi, la coltura fungina costituisce una superficie biotica che il batterio sfrutta per l'adesione. Spesso i biofilm misti hanno maggiore capacità di sviluppo e abilità di colonizzazione di vari ambienti naturali rispetto alle controparti monospecifiche (Seneviratne et al., 2008).

De Boere e collaboratori (2005) nei loro studi hanno mostrato che in suoli colonizzati da funghi si creavano delle nuove nicchie batteriche che potevano svilupparsi utilizzando come fonte energetica degli essudati di origine fungina e come supporto di adesione la superficie stessa del fungo. Dunque, l'interazione fra diverse specie microbiche è essenziale per la cooperazione metabolica fra di esse ed è anche in grado di fornire protezione meccanica al biofilm.

Numerosi studi hanno messo in evidenza le promettenti potenzialità applicative dei biofilm misti. Le prime considerazioni in tal senso derivavano dall'osservazione dell'associazione in biofilm tra funghi comuni del suolo (specie non micorriziche) e rizobi. In particolare, è stata evidenziata l'aumentata capacità di quest'ultimi nei biofilm misti, rispetto alla coltura monospecifica, nel processo di fissazione dell'azoto molecolare in forma biologica (Jayasinghearach e Seneviratne 2005). I biofilm misti mostrano una maggiore resistenza a vari fattori di stress ambientale quali ad esempio bassi valori di pH o la presenza di metalli pesanti.

Inoculi di biofilm misto possono essere utilizzati con successo soprattutto in relazione al biocontrollo; ad esempio, il co-inoculo di biofilm del fungo *Pleurotus ostreatus* con alcune specie di rizobi con esso compatibili, comportava un aumento del contenuto proteico nel fungo del 147% con un notevole miglioramento del suo valore nutrizionale utile ai fini produttivi (Jayasinghearachchi e Seneviratne 2004a).

I biofilm misti possono avere notevoli applicazioni anche nei processi di rimedio di siti inquinati. Infatti, come riportato da Seneviratne e collaboratori (2006), i biofilm misti presentano una maggiore capacità degradativa nei confronti di molti contaminanti ambientali quali ad esempio il polietilene che viene degradato in modo più efficiente dai biofilm formati dalle specie *Penicillium frequentans* e *Bacillus mycoides*, piuttosto che dalle singole colture monospecifiche. L'inoculo di co-colture batterio-fungo in forma di biofilm in suoli contaminati da idrocarburi policiclici aromatici (PAH), comporta un significativo miglioramento dell'abbattimento delle PAH a più alto peso molecolare, se comparato alla stessa attività svolta da popolazioni microbiche indigene (Boonchan et al. 2000). Nonostante le numerose possibili applicazioni dei biofilm misti, questi aspetti biotecnologici sono ancora poco chiari e poco studiati; sono infatti necessarie altre ricerche per comprendere e selezionare le combinazioni microbiche più efficienti ed utili nelle varie applicazioni (Seneviratne et al., 2008).

Data l'importanza dei biofilm misti e considerata la capacità di *P. ostreatus* di formare biofilm stabili in associazione con specie batteriche appartenenti al genere *Pseudomonas*, obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di ottimizzare le condizioni di crescita così come i parametri ambientali necessari a favorire lo sviluppo di biofilm formati da *P. ostreatus* in associazione con il batterio *Pseudomonas alcaliphila*. La scelta di quest'ultimo è stata dettata dal fatto che è un microrganismo in grado di formare biofilm stabili in tempi piuttosto rapidi e presenta una notevole resistenza a metalli pesanti quali il cadmio e il cromo.

5.1 MATERIALI E METODI

5.1.1 Microrganismi utilizzati

Per studiare i biofilm misti, venivano utilizzati il ceppo fungino *Pleurotus ostreatus* 3004 e il ceppo batterico *Pseudomonas alcaliphila* B4. Mentre il primo, come già descritto nel capitolo 3 veniva fatto crescere e conservato su MEA, il ceppo batterico veniva fatto crescere su terreno Luria-Bertani agarizzato (Tryptone, 10 g/l; Estratto di lievito, 5 g/l; NaCl, 5 g/l e Agar, 15 g/l) a 37° C e conservato sia 4°C sia in stock criogenico a -80°C.

5.1.2 Formazione del biofilm misto fungo-batterio

Le colture di biofilm misto fungo-batterio (BFB) venivano ottenute applicando l'inoculo batterico direttamente sul biofilm fungino monospecifico cresciuto nelle condizioni standard per 4 giorni (capitolo 4.1.3). In particolare, dallo stock criogenico conservato a -80°C, il ceppo batterico veniva piastrato due volte su terreno LBA. La biomassa ottenuta dalla seconda sub-coltura veniva risospesa in LB fino ad avere un OD₆₀₀ pari a 0.78-0.8 e la sospensione batterica veniva diluita 1:30 nello stesso terreno colturale. Questo inoculo standardizzato, contenente approssimativamente $1.0 \cdot 10^7$ CFU ml⁻¹, era utilizzato per inoculare la piastra MBEC™ HA-P&G in cui si era già insediato il biofilm fungino. La piastra così inocolata veniva messa ad incubare a 30°C su di un agitatore orbitale (150 rpm) per 24, 48 e 72 ore.

5.1.3 Quantificazione del biofilm misto

Per monitorare lo sviluppo dei biofilm misti durante le 24, 48 e 72 ore di incubazione, veniva utilizzata la PCR quantitativa o Real Time PCR una tecnica basata sulla reazione a catena della polimerasi in grado, però di misurare la concentrazione iniziale di una sequenza target in un campione biologico.

5.1.3.1 Estrazione del DNA genomico totale

Il kit di estrazione PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) veniva utilizzato per estrarre dai biofilm monospecifici e misti il DNA genomico totale. In particolare, l'estrazione veniva effettuata su 50 mg in peso umido di biofilm sviluppati nei vari tempi di incubazione e conservati a -20 °C. Per valutare sia la qualità che la quantità del DNA genomico estratto veniva effettuata una corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%. I campioni di DNA sono stati quantificati utilizzando i marcatori High DNA Ladder (Invitrogen) e 1 Kb DNA Ladder (Fermentas).

5.1.3.2 Primer utilizzati nelle reazioni di PCR

I geni 16S e 18S, codificanti per rRNA, venivano scelti come geni target per discriminare nel campione misto il ceppo batterico e quello fungino, rispettivamente. Nella tabella sottostante, sono riportate le coppie di primer per amplificare in modo specifico i geni target delle due specie microbiche.

Primer	Gene target	Sequenza (5'→3')	T annealing	Rif. bibliografico
331 F 797 R	16S	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	60°C	Nadkarni et al., 2002
Bact 1369 F Prok 1492 R	16S	CGGTGAATACGT TCYCGG GGWTACCTTGTTACGACT	56°C	Suzuki et al., 2000
FR1 F FF 390 R	18S	AICCATTCAATCGGTAIT CGATAACGAACGAGACCT	50°C	Vainio and Hantula, 2000
EUK 345 F EUK 499 R	18S	AAGGAAGGCAGCAGGCG CACCAGACTTGCCCTCYAAT	60°C	Zhu et al., 2005

5.1.3.3 PCR Quantitativa (Real time PCR)

Le reazioni di PCR quantitative sono state effettuate utilizzando lo strumento LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche) e la molecola fluorescente SYBR Green I in grado di intercalarsi durante la reazione di PCR nel solco maggiore del doppio

filamento di DNA che si forma ad ogni ciclo di amplificazione. Per ogni reazione sono stati utilizzati:

SYBR Green PCR Master mix (Roche)	10 μ l
primers R	1 μ l
primers F	1 μ l
DNA genomico	5 μ l
H ₂ O	3 μ l

Il programma di PCR è costituito da tre step principali: il primo di denaturazione del DNA a doppia elica a 95°C per 5 min; il secondo di amplificazione che avviene in 45 cicli consecutivi costituiti ciascuno da denaturazione, annealing e allungamento; e infine uno step di melting finale.

L'analisi dei dati e la definizione del valore soglia (valore di C_T) è stata effettuata utilizzando il "Metodo della Derivata Seconda", algoritmo fornito dal software in dotazione allo strumento. Per verificare che i prodotti ottenuti non siano aspecifici e che non si siano formati dimeri di primer, al termine dell'amplificazione è stata anche eseguita un'analisi della curva di dissociazione (Curva di Melting), che permette di individuare la temperatura di fusione (T_m) specifica per ogni amplificato esaminato.

5.1.3.4 Costruzione delle curve di calibrazione

La curva standard è una retta, la cui pendenza è indice dell'efficienza della reazione, in cui vengono messe in relazione le diverse concentrazioni di un campione standard con il valore soglia (C_T). Il confronto del C_T di un campione a concentrazione ignota con la curva standard permette di definire la quantità iniziale di template nel campione in analisi. In particolare, le curve standard sono state calcolate utilizzando come standard concentrazioni note di DNA genomico estratto da campioni di biofilm monospecifici (fungo e batterio cresciuti separatamente nelle condizioni standard) e, precedentemente, quantificate su gel di agarosio. I punti delle curve rappresentano delle diluizioni seriali 1:10 dei campioni a concentrazione nota.

5.1.4 Analisi strutturale del biofilm misto

Le caratteristiche morfostrutturali dei biofilm misti venivano determinate mediante un'analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM). In particolare, alla fine di ciascun tempo d'incubazione (24, 48 e 72 ore), dalla piastra venivano staccati meccanicamente dei peg sui quali si era sviluppato il biofilm misto. Questi venivano lavati per tre volte con PBS al fine di eliminare la biomassa planctonica e quella debolmente adesa e infine sottoposti alle fasi di preparazione per l'analisi microscopica come descritto nel paragrafo 4.1.5.

5.2 RISULTATI E DISCUSSIONI

5.2.1 Prove di co-sviluppo su piastra

In previsione dello sviluppo di biofilm misti, il fungo *Pleurotus ostreatus* e il batterio *Pseudomonas alcaliphila* venivano inoculati insieme al fine di vedere se i due microrganismi fossero in grado di coesistere o se lo sviluppo di uno di essi portasse all'inibizione dell'altro. Avendo i due microrganismi tempi e tassi di sviluppo notevolmente differenti, in un caso il fungo e il batterio erano inoculati insieme mentre nell'altro veniva inoculato prima il fungo e poi, a distanza di 48 ore di incubazione, il batterio. In entrambe le condizioni valutate (Fig. 1), non si riscontravano evidenti fenomeni di mutua inibizione, sebbene il batterio mostrasse un tasso di crescita significativamente superiore a quello del fungo situazione, questa, molto più evidente laddove i due microrganismi erano stati inoculati insieme. Queste prime prove indicavano la possibilità concreta di sviluppare biofilm misti e stabili nel tempo di questi due microrganismi non essendo presenti tra i due fenomeni di mutua inibizione.

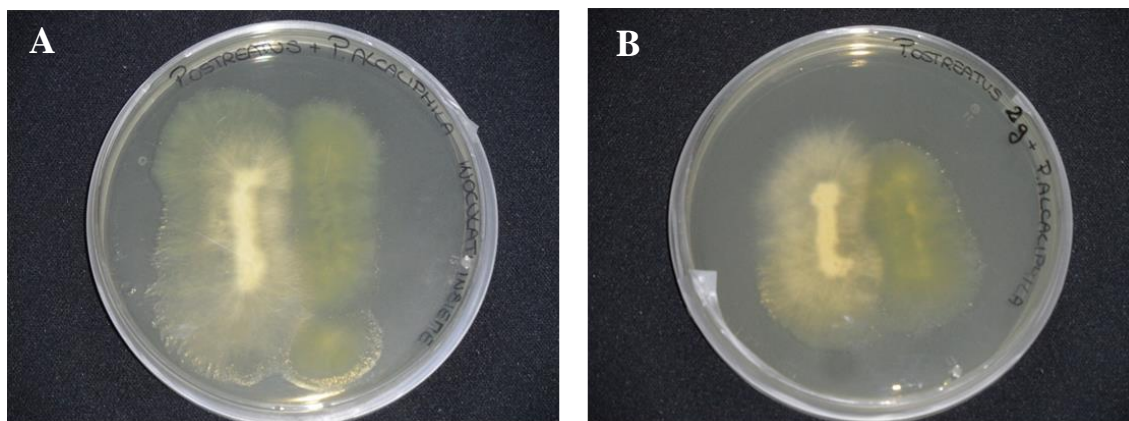


Fig. 1 Crescita del fungo *P. ostreatus* e del batterio *P. alcaliphila* su terreno LB agarizzato. In A i due microrganismi sono stati inoculati insieme mentre in B il batterio è stato inoculato 48 ore dopo il fungo.

5.2.2 Formazione del biofilm misto

Sulla base delle osservazioni preliminari effettuate in piastra, è stato possibile procedere con l'ottimizzazione dell'approccio operativo necessario per ottimizzare la formazione di biofilm misto.

In particolare, la capacità del fungo *P. ostreatus* di formare biofilm stabili in associazione con il batterio *P. alcaliphila* veniva valutata applicando l'inoculo batterico direttamente sul biofilm fungino fatto crescere per 4 giorni nelle condizioni standard utilizzando il sistema MBEC™ HA-P&G. La formazione del biofilm misto veniva monitorata per 24, 48 e 72 ore. La scelta di applicare l'inoculo batterico su biofilm fungini già sviluppati è stata dovuta non solo al fatto che il batterio presentava un tasso di crescita maggiore rispetto al fungo ma anche perché, come mostrato in letteratura, i batteri spesso in natura utilizzano in modo preferenziale una superficie biotica, come quella costituita dal fungo, per accrescersi e svilupparsi sotto forma di biofilm (Seneviratne et al., 2008).

5.2.3 PCR Quantitativa o Real-time PCR

La PCR quantitativa è una tecnica basata sulla reazione a catena della polimerasi che è in grado di misurare la concentrazione iniziale di una sequenza target in un campione biologico in modo dipendente dal suo valore di C_T (Orlando et al., 1998). Il valore soglia (C_T) è un valore numerico attribuito al ciclo in cui il prodotto supera il valore soglia. Le reazioni caratterizzate dall'aver bassi valori di C_T contengono più gene d'interesse che necessita, quindi, di tempi minori per essere amplificato.

La PCR real-time permette di quantificare l'espressione di geni o quantificare in termini assoluti la concentrazione di diverse specie microbiche senza la necessità di coltivarle. Inoltre, non solo mantiene spiccate caratteristiche di sensibilità ma, rispetto alla classica reazione di PCR, garantisce anche miglioramenti in termini di specificità, di precisione e di intervallo di quantificazione del campione incognito. Questi vantaggi sono dovuti all'innovativo sistema di rilevamento e misurazione "in tempo reale" del DNA amplificato, che consente sia di ridurre il numero delle repliche necessarie alla determinazione di ogni campione, sia di abbandonare tutte le manipolazioni successive all'amplificazione, che rappresentano potenziali fonti di alterazione dei risultati (Heid et al., 1996). In questo lavoro, l'analisi quantitativa in tempo reale è stata realizzata utilizzando il SYBR Green I

una molecola fluorescente in grado di intercalarsi al solco maggiore del DNA a doppia elica. Quindi, all'aumentare del prodotto di PCR a ogni ciclo di amplificazione, si verifica un proporzionale aumento di fluorescenza.

5.2.3.1 Estrazione del DNA genomico da biofilm

La fase di estrazione del DNA genomico sicuramente merita una particolare attenzione negli esperimenti in cui lo step successivo è un'analisi quantitativa e qualitativa degli amplificati.

Sebbene siano presenti in bibliografia molti protocolli di laboratorio e Kit commerciali per l'estrazione del DNA genomico da archea, funghi e batteri da campioni ambientali, molti lavori hanno l'obiettivo di effettuare una valutazione comparativa di diversi protocolli di estrazione e sull'effetto che questi possono avere nell'analisi metagenomica delle comunità microbiche ambientali batteriche o fungine (Plassart et al., 2012; Terrat et al., 2012). In questo contesto, lavorando con biofilm costituiti da due diverse specie microbiche, si è presentata la necessità di adottare una metodica idonea all'estrazione simultanea del DNA genomico della specie fungina e di quella batterica presenti entrambe nello stesso campione.

La componente fungina del biofilm è caratterizzata dall'avere una parete cellulare che impedisce la lisi cellulare e il recupero del DNA utilizzando i metodi di estrazione convenzionali (Maaroufi et al., 2004). Infatti, in molte specie fungine, le semplici procedure di lisi, quali ad esempio l'uso di cicli sequenziali di congelamento-disgelamento o l'incubazione a caldo con detergenti e proteasi, non portano ad alte rese di estrazione del DNA. Approcci alternativi per la lisi delle cellule fungine includono una fase di distruzione fisica che prevede l'agitazione dei campioni con microsferi e/o la digestione enzimatica dei polisaccaridi presenti nella parete cellulare per formare sferoplasti, fasi queste seguite poi dalle convenzionali procedure di lisi della membrana (Glee et al., 1987).

D'altro canto metodi di estrazione del DNA da funghi che prevedono la rottura meccanica delle cellule congelate in azoto liquido attraverso l'utilizzo di mortaio e pestello funzionano bene solo per la preparazione su larga scala di DNA da colture fungine (Haugland et al., 1999; van Burik et al., 1998).

Nella scelta del metodo di estrazione si è dovuto, inoltre, tener conto del fatto che i biofilm microbici rappresentano delle comunità eterogenee in cui i microrganismi che lo

compongono aderiscono a una superficie e sono racchiusi all'interno di una complessa matrice extracellulare costituita principalmente da materiale esopolisaccaridico, che può rendere difficoltosa la procedura di estrazione del materiale genetico.

La bibliografia, quindi, riporta per i biofilm protocolli utilizzati per l'estrazione del DNA genomico da campioni di suolo (Miller et al., 1999; Ferrera et al., 2010). Quindi, per estrarre il DNA dai campioni di biofilm venivano confrontati due diversi approcci, il primo implicava l'utilizzo del kit commerciale PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) il secondo, invece, un protocollo di laboratorio che prevedeva una fase estrattiva con fenolo a 65°C (Narvaez-Zapata 2005). La scelta del suddetto kit è stata dettata dal fatto che in precedenti lavori, dove venivano paragonati diversi protocolli di estrazione del DNA genomico da funghi filamentosi, il PowerSoil® DNA Isolation Kit si era dimostrato essere il kit più idoneo portando a maggiori rese di estrazione (Fredricks et al., 2005).

Dalle prove preliminari, si è potuto notare che il kit PowerSoil® non solo garantiva una maggiore riproducibilità anche lavorando con quantitativi di biomassa microbica ridotti (50-100 mg in peso umido) ma permetteva di ottenere campioni di DNA con un elevato grado di purezza (Fig. 2). Quindi, la scelta del protocollo di estrazione da applicare ai campioni in biofilm è ricaduta proprio sul kit commerciale MO BIO. In particolare, per consentire la lisi delle cellule, che nei funghi rappresenta un punto critico data la presenza della parete cellulare, il protocollo prevedeva il trattamento del campione con metodi sia fisici, mediante agitazione meccanica in tubi da micro-centrifuga contenenti beads, sia chimici mediante l'aggiunta di un buffer di lisi cellulare. Ciò nonostante, il kit PowerSoil® portava, a parità di biomassa, a delle rese di estrazione del DNA genomico fungino di gran lunga inferiori (ca. 20 volte) rispetto a quelle ottenute per il ceppo batterico (Fig. 2).

5.2.3.2 Scelta del primer e ottimizzazione delle condizioni di PCR

Al fine di caratterizzare nel tempo la composizione del biofilm misto in termini quantitativi sia di DNA batterico che fungino, venivano scelti come target il gene 16S rRNA e 18S rRNA rispettivamente. In particolare, sono state scelte quattro diverse coppie di primer, due per la quantificazione del fungo *P. ostreatus* e due per il ceppo batterico, caratterizzate dall'essere tutte specifiche e universali in modo distinto per batteri e funghi. Ciò nonostante, le coppie di primer sono state validate con esperimenti di cross amplificazione

finalizzati a valutare l'eventuale formazione di prodotti aspecifici che, con il loro segnale fluorescente, avrebbero contribuito a sovrastimare il campione target.

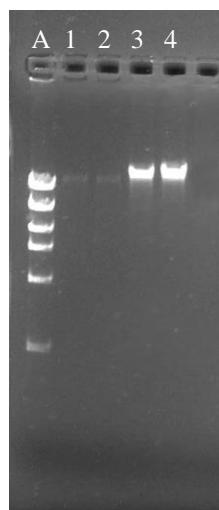


Fig. 2 Corsa elettroforetica dei campioni di DNA genomici estratti da 50 mg di biofilm fungino di *P. ostreatus* (1 e 2) e batterico di *P. alcaliphila* (3 e 4). Il marker utilizzato era l'High DNA Ladder (A).

Per quanto riguarda la coppia di primer Bact 1369 F - Prok 1492 R (Suzuki et al., 2000), pur essendo specifica per batteri, portava alla formazione di un prodotto di amplificazione anche sul DNA genomico fungino, così come la coppia EUK 345 F - EUK 499 R (Zhu et al., 2005) trovava regioni complementari sul DNA batterico. Quindi, dopo ulteriori fasi di ottimizzazione delle condizioni di PCR, rivolte soprattutto, alla temperatura di annealing, la scelta è ricaduta sulla coppia di primer 331 F - 797 R e sulla coppia FR1 F - FF 390 R specifiche, rispettivamente, per il ceppo batterico e quello fungino. La prima coppia di primer è stata disegnata e utilizzata da Nadkarni e collaboratori (2002) per rivelare e quantificare da comunità miste 49 ceppi microbici appartenenti a 34 diverse specie provenienti dai principali gruppi batterici.

La coppia di primer FR1 F - FF 390 R, invece, è stata disegnata da Vainio e Hantula (2000), utilizzata e validata per studi di PCR quantitativa da Prevost-Bouré (2011).

Questo primer è localizzato alla fine della subunità minore (SSU) del gene 18S rRNA, vicino alla regione spaziatrice ITS1, e si è mostrato essere appropriato anche per un'analisi DGGE di comunità fungine che si sviluppano sul legno (Prevost-Bouré et al., 2011).

Una volta scelte le coppie di primer, un altro punto chiave era ottimizzare la loro concentrazione, fase questa necessaria soprattutto in reazioni di SYBR green Q-PCR, dove ci si deve assicurare che, durante la reazione di amplificazione, si formi solo il target (Smith e Osborne 2008). Infatti, per verificare che i prodotti ottenuti non fossero aspecifici e che non si formassero dimeri di primer, al termine dell'amplificazione è stata fatta un'analisi della curva di dissociazione (Curva di Melting) che permette di individuare la temperatura di fusione (T_m) specifica per ogni amplificato esaminato.

In particolare, diverse concentrazioni di biofilm monospecifico sono state utilizzate come stampo per reazioni in cui veniva fatta variare la concentrazione dei primer da 0.5 a 0.125 μM . Dalla figura 3 si nota che per la coppia 331 F - 797 R, alla concentrazione di 0.125 μM e 0.250 μM le sigmoidali ottenute risultavano essere del tutto sovrapponibili, originando dei valori di C_T di 17.02 e 17.06 rispettivamente. Quindi, la concentrazione più bassa di primer veniva definita ottimale e utilizzata per le prove successive. Per la coppia FR1 F - FF 390 R, invece, una riduzione della concentrazione a valori di 0.125 μM portava ad un significativo rallentamento della reazione (C_T 26.96) rispetto alla concentrazione di 0.250 μM (C_T 20.58).

Inoltre, se per la coppia 331 F - 797 R è stata utilizzata la temperatura di annealing di 60 °C, come riportato in letteratura (Nadkarni et al., 2002), per la coppia FR1 F - FF 390 R si è reso necessario un aumento della temperatura di annealing da 50 a 53°C. Infatti, dall'analisi della curva di melting ottenuta, si è evidenziata la presenza di un co-prodotto rappresentato da una spalla sul picco (freccia rossa Fig. 4A) a temperature di annealing basse che scompariva, però, innalzando la temperatura di tre gradi (Fig. 4B).

5.2.3.3 Curve standard

Le condizioni di PCR precedentemente ottimizzate, venivano utilizzate per la costruzione delle curve di calibrazione.

In un esperimento di Q-PCR, la costruzione di curve standard rappresenta il mezzo attraverso il quale è possibile quantificare un campione a concentrazione incognita a partire dal suo valore di CT (Cycle threshold) o ciclo soglia, cioè il primo ciclo in cui il segnale supera il threshold, che rappresenta il valore delle emissioni di fondo.

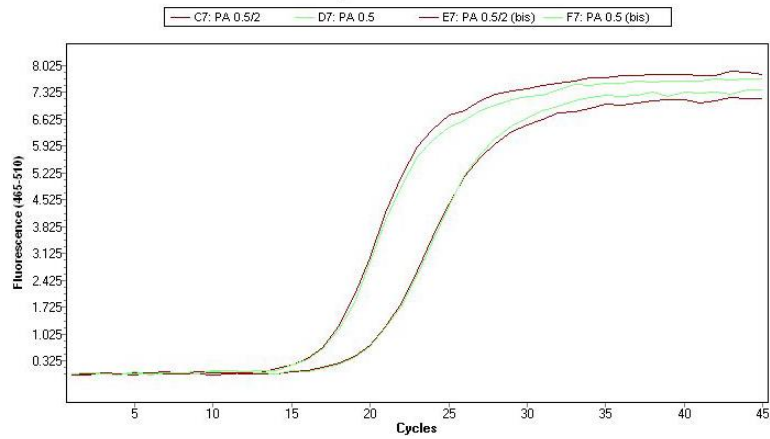


Fig. 3 Curve di amplificazione del DNA genomico estratto dal biofilm batterico monospecifico a due diverse concentrazioni e amplificato con la coppia di primer 331 F - 797 R alle concentrazioni di 0.125 (curva viola) e 0.250 μ M (curva celeste). Sull'asse delle X sono riportati i cicli di amplificazione mentre sull'asse Y la fluorescenza emessa dall'amplificato ottenuto a ogni singolo ciclo.

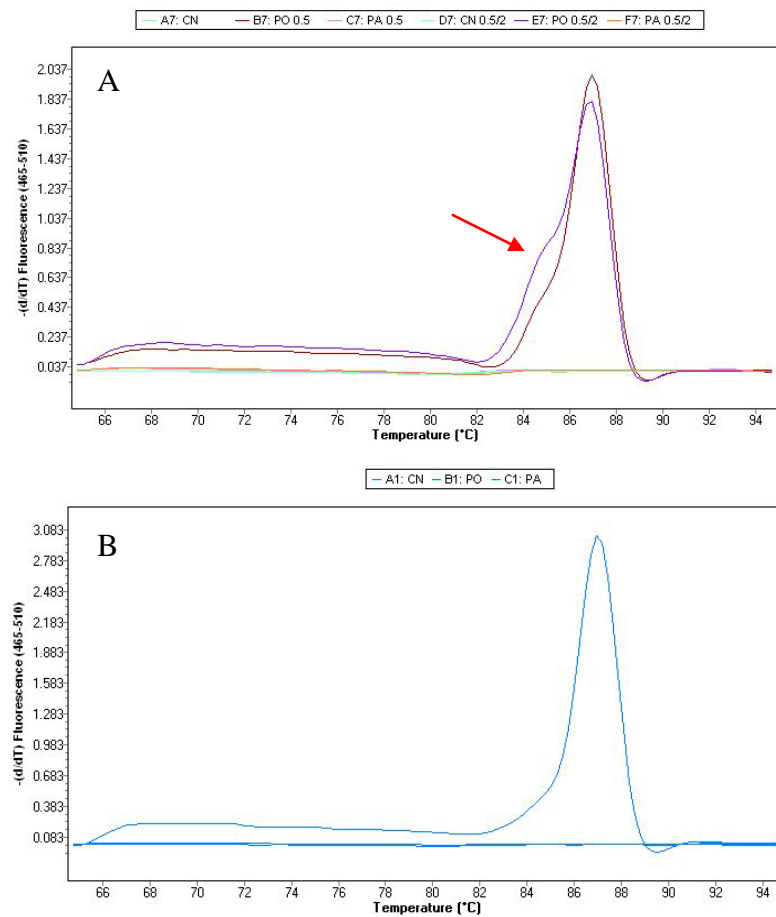


Fig. 4 Curve di Melting relative al campione fungino amplificato con la coppia di primer FR1 F - FF 390 R a 50°C (A) e a 53°C (B).

La quantificazione assoluta utilizza una curva standard in modo da assegnare una determinata quantità a ciascun campione sconosciuto. In generale, la curva può essere costruita utilizzando campioni a concentrazione nota di DNA puro o RNA la cui concentrazione può essere espressa o in nanogrammi assoluti o come numero di copie del gene target. Per rendere affidabile una curva di calibrazione è di estrema importanza lavorare con accuratezza e assicurarsi che il campione di DNA o RNA utilizzati siano stabili.

Va sottolineato, tuttavia, che nei campioni ambientali il numero di geni che codificano per il 16S rRNA può non essere convertito in modo semplice e univoco al numero di cellule poiché il suo numero di copie può variare non solo in funzione della specie batterica presa in considerazione (Klappenbach et al., 2000) ma anche in funzione dello stato fisiologico in cui il microorganismo si trova. Infatti, come riportato da Pérez-Osorio e collaboratori (2010), in colture planctoniche di *P. aeruginosa* il numero di copie del gene 16S risulta essere maggiore quando il microorganismo si trova nella fase di crescita esponenziale rispetto a quella stazionaria (11 vs. 7 copie).

Per quanto riguarda la crescita in biofilm è noto dalla letteratura che, durante il processo di crescita dei microrganismi all' interno dei biofilm, si ha un modello di espressione genetica estremamente differente da quello che i microrganismi seguono in caso di crescita in fase planctonica (Vilain e Brözel, 2006). Inoltre, poiché le cellule batteriche che compongono i biofilm si trovano in molti stati fisiologici differenti, il numero di copie del gene target può variare anche nei diversi strati del biofilm (Pérez-Osorio et al., 2010).

Quindi, le curve standard sono state costruite mettendo in relazione la quantità di DNA genomico estratto da ogni singolo biofilm monospecifico diluite serialmente con i relativi valori di C_T ottenuti, senza l'obiettivo di arrivare ad un valore numerico di cellule per grammo di biofilm.

Va messo in evidenza, tuttavia, che questo tipo di approccio metodologico per la costruzione della curva è stato possibile per il fatto che i campioni di biofilm, sui quali si doveva effettuare l'analisi quantitativa, erano costituiti soltanto da una specie fungina e una batterica.

In figura 5 vengono mostrate oltre alle curve di calibrazione ottenute e utilizzate per la quantificazione del DNA genomico di *P. ostreatus* (Fig. 5A) e *P. alcaliphila* (Fig. 5B) anche i parametri relativi alle rette e indici della bontà della curva ottenuta.

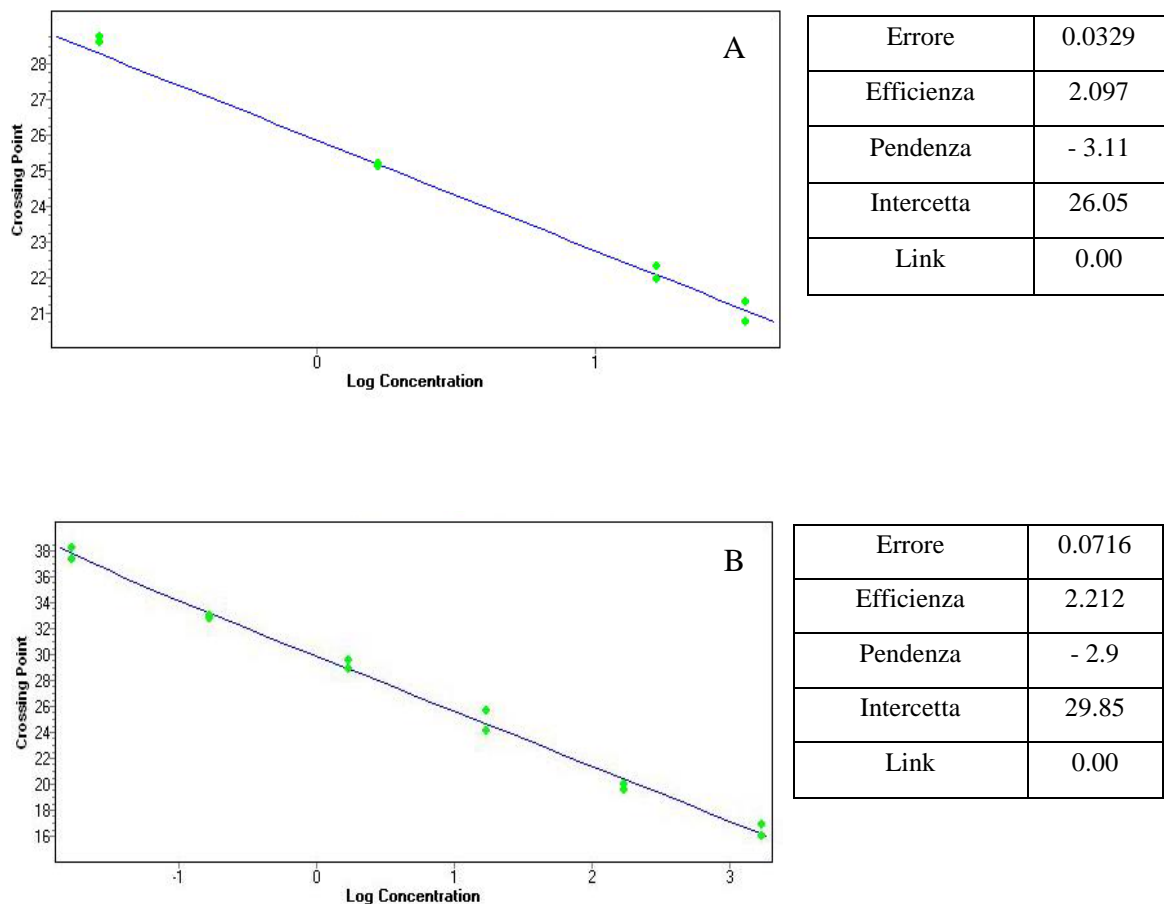


Fig. 5 Curve di calibrazione costruite mettendo in relazione il log di ogni quantità nota di DNA fungino (A) e batterico (B) per ogni diluizione seriale (asse X) e il corrispettivo valore di C_T ottenuto dopo amplificazione (asse Y). I valori di pendenza, intercetta sull'asse Y ed efficienza dei primer riportati nelle tabelle, vengono utilizzati per dimostrare la bontà della curva.

La concentrazione degli standard utilizzati per costruire le curve di calibrazione di *P. ostreatus* e *P. alcaliphilia* variava nel range 7 pg/ μ l - 0.134 pg/ μ l e 34 pg/ μ l - 0.0034 pg/ μ l rispettivamente, e dall'amplificazione di queste quantità di DNA si ottenevano valori di C_T compresi fra 21.29 - 28.77 e 21.05 - 36.48 rispettivamente.

Le curve ottenute utilizzando il DNA genomico estratto dal fungo e dal batterio, hanno mostrato un buon range di efficienza di reazione, confermata sia dalla pendenza delle rette

(-3.11 e -2.9, rispettivamente) che dall'efficienza calcolata dei primers (2.097 e 2.212, rispettivamente). La pendenza della fase log-lineare della reazione di amplificazione è una misura dell'efficienza della reazione stessa. Per ottenere dei risultati accurati e riproducibili, la reazione dovrebbe avere un'efficienza il più possibile vicina al 100% che equivale ad un valore di pendenza della curva pari a -3.32. L'efficienza viene calcolata sulla base dell'espressione: $\text{Efficienza} = 10^{[-1/\text{slope}]} - 1$ e può essere influenzata sia dalle caratteristiche dell'amplicone quali ad esempio la lunghezza, la struttura secondaria nonché il contenuto in GC, sia dalle dinamiche della reazione stessa, dall'uso di reagenti a concentrazioni non ottimali e dalla qualità dell'enzima utilizzato.

5.2.3.4 Quantificazione della componente batterica e fungina nei biofilm misti

Ottenute le curve standard, i campioni di DNA genomico estratti dai biofilm misti ottenuti dopo 24, 48 e 72 ore dall'inoculo della componente batterica e incubati a 30°C in agitazione orbitale (150 rpm), sono stati quantificati rispetto alla componente batterica e a quella fungina richiamando per la quantificazione le rispettive curve di calibrazione. Nella tabella 2, vengono riportati sia i valori di C_T ottenuti per ogni singolo campione, opportunamente diluito in modo tale da ottenere un valore di C_T incluso nel range della rispettiva curva, sia i risultati relativi all'estrazione di DNA genomico dai campioni di biofilm misto (50 mg in peso umido). Dai dati ottenuti, si evidenzia che il quantitativo di DNA totale estratto varia significativamente nel tempo, e questo risulta essere indice non solo delle diverse rese di estrazione fra la componente fungina e batterica, già evidenziate nella messa a punto del protocollo di estrazione, ma può essere anche correlato al fatto che il biofilm misto, strutturandosi in modo completamente diverso, può avere dei coefficienti di resa di estrazione completamente diversi rispetto a quelli ottenuti per i singoli biofilm monospecifici. Infatti, la diminuzione del quantitativo di DNA osservabile dopo le 72 ore di incubazione, potrebbe essere imputabile ad un notevole aumento della matrice extracellulare del biofilm che, a sua volta, potrebbe portare a un'abbassamento delle rese di estrazione rendendo più difficoltosa la lisi cellulare.

Tabella 2. Quantificazione delle due componenti microbiche presenti nel biofilm misto mediante Real Time PCR ed espressa con i valori di C_T e concentrazione in pg/ μ l e quantificazione del DNA genomico del batterio e del fungo espressa in ng di DNA estratto.

Tempo (h)	<i>P. alcaliphila</i>				<i>P. ostreatus</i>			
	DF	C_T	Conc. (pg/ μ l)	DNA (ng)	DF	C_T	Conc (pg/ μ l)	DNA (ng)
0	----	----	----					33.40 \pm 1.27
24	200	24.78 \pm 0.04	2.05 \pm 0.12	40.35 \pm 2.40	50	24.84 \pm 0.04	0.48 \pm 0.01	2.4 \pm 0.05
48	200	23.84 \pm 0.03	4.24 \pm 0.21	84.81 \pm 4.16	20	25.74 \pm 0.04	0.25 \pm 0.01	0.51 \pm 0.02
72	200	24.84 \pm 0.04	1.91 \pm 0.09	38.23 \pm 1.82	20	27.21 \pm 0.12	0.07 \pm 0.002	0.15 \pm 0.004

In figura 6 viene riportata in termini percentuali la composizione stimata del biofilm misto ai vari tempi di incubazione. Sebbene *P. alcaliphila* e *P. ostreatus* nei biofilm misti possano avere presumibilmente delle differenti rese di estrazione rispetto ai biofilm monoculturali, le due componenti microbiche nel biofilm misto venivano calcolate, in termini di biomassa, considerando le rese di estrazione ottenute per le colture monospecifiche (0.66 e 13.4 per 50 mg di biofilm fungino e batterico) e fissando come 100% la quantità totale di DNA estratta e quantificata mediante PCR quantitativa per ciascun tempo di crescita.

Dopo 24 ore di incubazione dall'inoculo batterico, sebbene la quantità di DNA estratto dal batterio risultava essere 20 volte maggiore rispetto a quella estratta dal fungo (40 vs 2.4, vedi tabella 2), il biofilm misto risultava essere costituito quasi per metà dai due microrganismi. Infatti, la biomassa fungina e quella batterica costituivano rispettivamente il 55 e il 45 % del biofilm.

A 48 ore di incubazione, il batterio sembrava essere la componente dominante del biofilm misto costituendo l' 89.3 % di tutta la componente cellulare. A 72 ore di sviluppo, invece, il dato ottenuto evidenziava un rapporto quasi inalterato fra la componente fungina e batterica, che rappresentano rispettivamente il 10.7 e il 91.3 % del biofilm misto, rispetto a

quanto osservato nelle precedenti 24 ore. Risulta tuttavia evidente dai dati mostrati in tabella 2 che la componente cellulare a parità di biofilm analizzato (50 mg in peso umido) risulta essere estremamente diminuita indicando che, nel corso delle 72 ore di incubazione, si verifica un significativo aumento della matrice extracellulare che costituirebbe, quindi, la componente principale del biofilm.

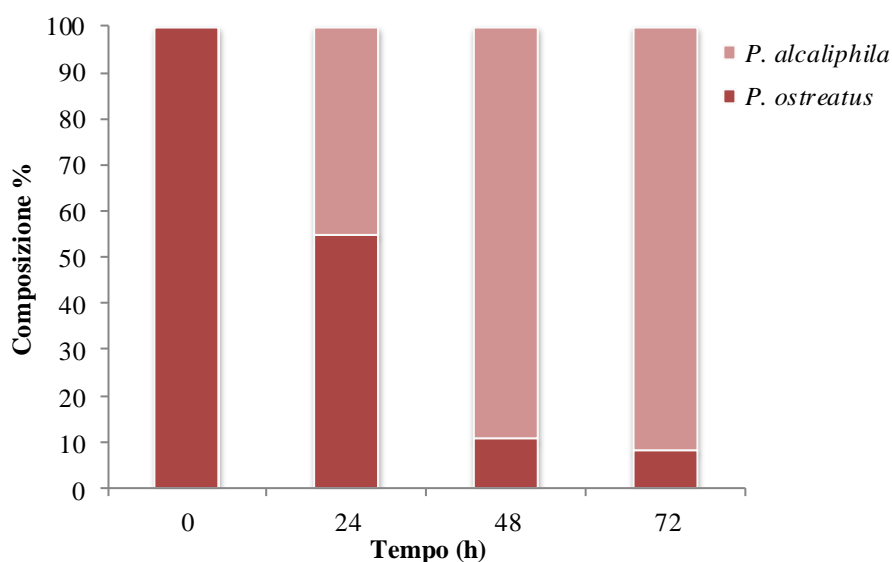


Fig. 6 Quantificazione percentuale stimata della componente fungina e batterica all'interno del biofilm misto sviluppato per 24, 48 e 72 ore a 30°C in agitazione orbitale (150 rpm).

5.2.4 Analisi strutturale del biofilm misto

Il biofilm misto ottenuto dopo 24, 48 e 72 ore di incubazione dall'inoculo batterico veniva sottoposto ad analisi mediante microscopio elettronico a scansione (SEM). L'analisi al SEM veniva utilizzata non solo per evidenziare le caratteristiche morfostrutturali del biofilm misto ma anche come metodologia complementare alle analisi di Real time PCR.

Infatti, come riportato in letteratura, l'analisi al SEM viene applicata non solo per studiare le caratteristiche morfologiche delle cellule in biofilm ma anche per monitorare la formazione del biofilm stesso (Di Bonaventura et al., 2006; Hawser e Douglas, 1998).

Come mostrato in figura 7, dopo 24 ore di incubazione si osservava sulle ife del biofilm fungino una graduale adesione delle cellule batteriche in forma isolata e/o aggregata in

corrispondenza delle quali si iniziava ad osservare la presenza di ECM in forma filamentosa (Fig. 7A).

In accordo con quanto osservato in biofilm formati da *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, le cellule batteriche tendevano ad associarsi in modo piuttosto rapido alle ife fungine (Hogan e Kolter, 2002).

Dopo le prime fasi di adesione ifa-batterio, si osservava nel corso delle 72 ore di incubazione un notevole incremento della produzione di ECM. Infatti, i filamenti di ECM iniziavano ad organizzarsi formando un fitto reticolo tridimensionale già dopo le 48 ore di sviluppo (Fig. 7B) fino arrivare alla deposizione in forma laminare o fasciata di ECM batterico che andava quasi ad oscurare completamente il biofilm fungino (Fig. 7C). Ciò nonostante, essendo entrambi gli organismi in grado di produrre matrice extracellulare, non era possibile definire con precisione se l'abbondante ECM fosse di natura esclusivamente batterica o composto da materiale proveniente da entrambi i microrganismi che costituivano il biofilm. Oltre alla notevole produzione di ECM, dopo 72 ore di incubazione si osservava anche una sostanziale colonizzazione da parte del batterio di aree del peg che non erano state interessate dalla crescita fungina (dato non mostrato).

I risultati ottenuti dall'analisi microscopica confermavano quanto già messo in evidenza negli esperimenti di Real time quantitativa dai quali si evidenziava il fatto che, a parità di biofilm analizzato (50 mg in peso umido), la componente cellulare del biofilm si riduceva in modo consistente dopo le 72 ore di incubazione.

Questo tipo di risultato era in accordo con quanto mostrato nelle osservazioni preliminari su piastra in cui si metteva in evidenza il fatto che il batterio presentava un tasso di crescita più veloce rispetto alla specie fungina. Inoltre, alcuni studi presenti in letteratura mettono in evidenza il fatto che, nei biofilm misti formati da batteri, funghi filamentosi e lieviti vi è una significativa prevalenza delle cellule batteriche sulle altre specie microbiche. Banks e Bryers (1991) studiando la formazione di biofilm misti formati da due specie microbiche quali *Pseudomonas putida* e *Hyphomicrobium* spp. inoculate simultaneamente, osservarono che la specie che aveva una velocità di crescita più elevata diveniva poi quella dominante nella co-coltura; sebbene quella con un tasso di crescita minore rimanesse comunque stabile ed in continuo accrescimento all'interno del biofilm. Un altro studio condotto da Elvers e collaboratori (1998), riporta che batteri, quali *P. alcaligenes*, in colture miste formate con funghi filamentosi mostrano una significativa prevalenza numerica rispetto a questi ultimi dovuta anche in questo caso alla differente velocità di

crescita tra le due specie. I dati ottenuti in PCR quantitativa, sono in accordo con quanto riportato in letteratura poiché il batterio *P. alcaliphila*, essendo caratterizzato dall'aver tassi di crescita maggiori rispetto a *P. ostreatus*, costituisce la maggiore componente cellulare del biofilm misto, rappresentando circa il 90%, già dopo le prime 48 ore di sviluppo.

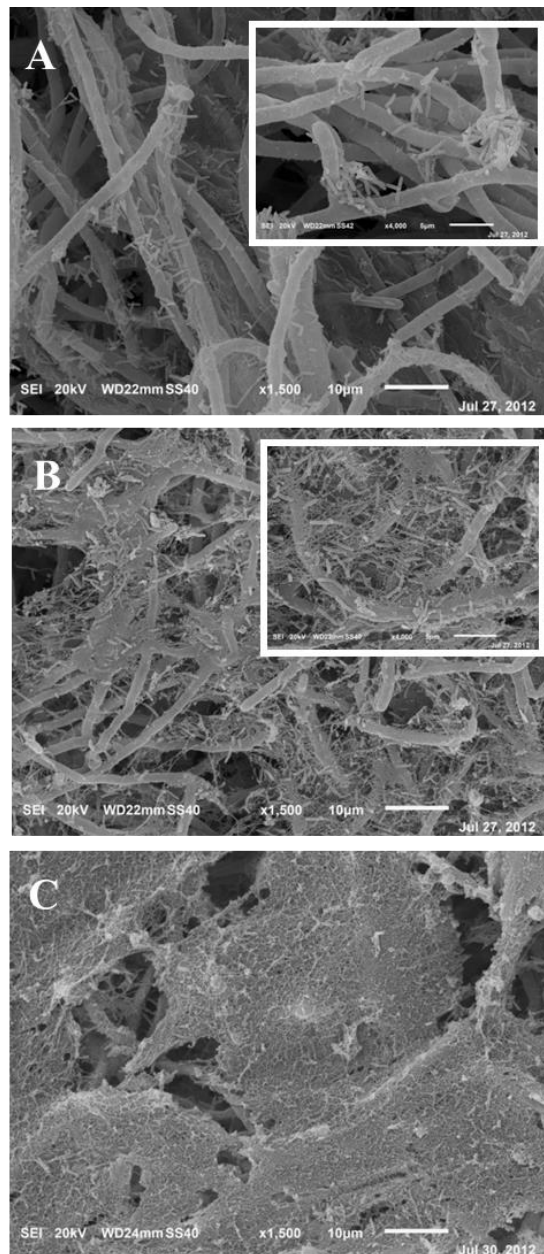


Fig. 7 Micrografie al SEM di biofilm misti *P. ostreatus/P. alcaliphila* ottenuti mediante applicazione dell' inoculo batterico a sistemi fungini mono-specifici di 4 giorni e successiva analisi dopo (A) 24, (B) 48 e (C) 72 ore di incubazione a 30 °C in agitazione orbitale (150 rpm) su sistema MBEC™ HA-P&G.

6. CONCLUSIONI

E' ormai ampiamente accertato che i microrganismi in natura raramente vivono come cellule solitarie; piuttosto, si trovano sotto forma di comunità aggregate tenute insieme da polisaccaridi extracellulari prodotti dalle cellule stesse. Queste comunità prendono il nome di Biofilm e rappresentano la strategia di crescita microbica più diffusa in molti degli ecosistemi naturali. Sebbene i funghi siano dei candidati ideali per la formazione di biofilm a causa della loro abilità di produrre polisaccaridi extracellulari (EPS), lectine e idrofobine, questo aspetto risulta essere ancora poco conosciuto a dispetto di quanto è invece noto per i biofilm batterici e di lievito soprattutto in relazione ad aspetti clinici.

Le proprietà filmogene del fungo white rot *Pleurotus ostreatus* sono note da tempo e sono state studiate soprattutto in relazione al biocontrollo, alla solubilizzazione di rocce fosfatiche e alla fissazione biologica dell'azoto in biofilm misti con diazotrofi. Tuttavia, l'informazione a riguardo risulta essere ad oggi ancora piuttosto carente. Da questo punto di vista, infatti, il lavoro svolto in questa tesi risulta essere abbastanza innovativo fornendo informazioni relative alla formazione, alla caratterizzazione biochimica e strutturale e alla risposta a contaminanti ambientali del biofilm fungino di *P. ostreatus*. In particolare, le proprietà filmogene di *P. ostreatus* sono state valutate utilizzando due diversi approcci metodologici. Il primo prevedeva l'utilizzo di piastre a 12 pozzetti in cui venivano alloggiato delle membrane circolari di vario materiale, quali supporti di adesione; il secondo, invece, prevedeva l'utilizzo dei sistemi MBECTM-P&G e MBECTM-HTP.

Entrambi gli approcci metodologici utilizzati in questo lavoro hanno consentito di ottenere biofilm mono-specifici stabili di *P. ostreatus* che rispondevano perfettamente ai requisiti sia strutturali che funzionali proposti da Harding e collaboratori (2009) per i biofilm di funghi filamentosi.

In particolare, l'adozione di piastre a 12 pozzetti in cui venivano alloggiato membrane circolari di vario materiale quali supporti di adesione, è risultata essere idonea alla formazione del biofilm fungino consentendo di ottenere da 1.0 a 15 mg in peso secco di biomassa adesa per pozzetto. Inoltre, attraverso questo approccio metodologico è stato possibile determinare l'influenza che le variabili terreno colturale e caratteristiche del supporto esercitano non solo sulla formazione ma anche sulla struttura e sull'attività metabolica del biofilm fungino.

Sia per la produzione che per l'attività metabolica del biofilm, l'analisi statistica indicava elevati livelli di significatività non solo delle variabili supporto e terreno colturale anche della loro interazione indicando che l'effetto principale di una variabile dipendeva fortemente dall'altra.

Sebbene, le membrane circolari utilizzate per studiare la formazione del biofilm fungino coprissero un ampio intervallo di tensione superficiale del substrato (da 19 a 64.5 mNm⁻¹) dai dati ottenuti non si è potuto stabilire una relazione definita che legasse questa proprietà alla produzione, all'attività metabolica e alla struttura del biofilm. Infatti, l'ultrastruttura, e, in particolare, il grado di compattezza del biofilm risultava essere maggiormente influenzato dal terreno colturale piuttosto che dalla tipologia del supporto di adesione utilizzato.

I sistemi MBECTM, pur rappresentando un metodo largamente utilizzato in condizioni di laboratorio per lo studio dei biofilm microbici, non sono mai stati utilizzati per i funghi filamentosi. Infatti, il loro utilizzo si è limitato allo studio di biofilm batterici o di lieviti soprattutto in relazione a studi di suscettibilità a composti tossici che possono essere effettuati in modo riproducibile e veloce. Entrambi i sistemi MBECTM si sono dimostrati degli strumenti utili alla formazione e alla caratterizzazione biochimica e strutturale del biofilm di *P. ostreatus* sebbene sia stato necessario adottare delle modifiche che si sostanziano in un rivestimento dei supporti di adesione a base polistirenica con idrossiapatite. In particolare, la sperimentazione ha richiesto non solo una standardizzazione a livello di produzione e applicazione degli inoculi, soprattutto per i sistemi MBECTM-P&G in cui era necessario applicare l'inoculo in modo omogeneo in tutti i pozzetti della piastra, ma anche l'ottimizzazione delle condizioni di incubazione dato che, quelle consigliate dalla ditta distributrice, non risultavano essere idonee allo sviluppo del biofilm nel sistema MBECTM-HTP. Infatti, mentre l'utilizzo del sistema a pozzetti dava luogo ad una uniforme distribuzione del biofilm fungino e ad una significativa produzione di biomassa sessile, nel sistema a canali, invece, sia la quantità che l'uniformità spaziale dei biofilm risultavano essere fortemente influenzate dalle condizioni di incubazione.

Gli studi relativi alla caratterizzazione biochimica e strutturale hanno permesso di evidenziare le differenze tra la coltura planctonica e quella in biofilm di *P. ostreatus*. La principale differenza tra i due sistemi colturali risiedeva nella presenza di un abbondante matrice extracellulare nei sistemi in biofilm. Infatti, dalle analisi in microscopia elettronica si è visto che le ife del fungo cresciuto in biofilm assumevano un aspetto irregolare dovuto

alla presenza su di esse di un rivestimento compatto e uniforme di ECM a differenza, invece, di quanto osservato per le ife del fungo cresciuto in forma dispersa. Questo veniva anche confermato dalle analisi biochimiche dato che il contenuto percentuale di ECM nelle colture in biofilm era maggiore rispetto a quello delle colture planctoniche. Inoltre, la produzione di ECM dipendeva non solo dal sistema colturale utilizzato ma anche dall'età della coltura tanto da avere un'abbondante rilascio nei sistemi sviluppati per 7 giorni.

I sistemi MBECTM, inoltre, si sono dimostrati essere altresì utili negli studi di risposta comparativa ai contaminanti ambientali. Infatti, i biofilm di *P. ostreatus* sono stati comparati con le controparti planctoniche, da una parte, in termini di suscettibilità al cadmio e, dall'altra, in termini di capacità di utilizzo del carico organico di acque reflue di frantoio in presenza di composti tossici quali i fenoli.

Per quanto riguarda la tossicità del cadmio, dagli studi effettuati sulle colture di *P. ostreatus* sviluppate per 4 e 7 giorni in forma planctonica e in biofilm si è visto che il primo sistema colturale risultava essere notevolmente più sensibile al metallo rispetto alle colture coeve cresciute in biofilm, come testimoniato dai valori rispettivi di IC₅₀, MIC₉₀ e MFC. In entrambi i sistemi colturali, l'effetto principale dell'esposizione al cadmio era relativo alla produzione e quindi al rilascio della matrice extracellulare che nelle colture planctoniche risultava essere maggiore rispetto a quelle non perturbate mentre nel biofilm le differenze erano relative all'aspetto che l'ECM prodotto assumeva dopo esposizione.

Tra i contaminanti organici, invece, venivano scelte le acque di vegetazione caratterizzate dall'aver un elevato carico organico associato alla presenza di una notevole quantità di composti fenolici. Anche in questo caso il biofilm presentava una migliore capacità di abbattimento sia del carico organico sia del contenuto in fenoli presenti entrambi a concentrazioni che dati di letteratura riportano essere proibitive per un efficiente trattamento da parte dei funghi ligninolitici.

Nella maggior parte degli ambienti naturali, i biofilm risultano essere costituiti da microrganismi appartenenti a specie diverse come i biofilm formati da batteri e funghi. L'interazione di microrganismi diversi all'interno del biofilm assume un ruolo fondamentale soprattutto in ambienti co-contaminati da metalli pesanti e inquinanti organici, per cui, uno studio approfondito consentirebbe di trarre delle conclusioni che potrebbero essere applicabili ai processi di biorisanamento vedendo coinvolti questi sistemi misti. Pur essendo note le capacità del fungo *P. ostreatus* di formare biofilm misti in associazione con specie batteriche appartenenti al genere *Pseudomonas* l'informazione a

riguardo risulta essere piuttosto carente. Quindi, anche gli studi relativi all'ottimizzazione delle condizioni necessarie alla formazione del biofilm misto di *P. ostreatus* e *P. alcaliphila*, rappresentano un aspetto innovativo che potrebbe aprire le strade a ulteriori studi incentrati all'utilizzo di questi sistemi misti nei processi di biorimediazione. Inoltre, l'approccio molecolare della real time PCR si è dimostrato essere uno strumento utile per determinare il contributo delle due specie microbiche nella costituzione del biofilm misto. In particolare, dagli studi effettuati sui campioni ottenuti a diversi tempi di crescita si è visto che la specie batterica, caratterizzata dall'aver tassi di crescita maggiori rispetto alla specie fungina, costituiva la maggiore componente cellulare del biofilm misto dato, questo, confermato sia dall'analisi quantitativa sia strutturale.

7. BIBLIOGRAFIA

Adriano D.C., (1986). Trace elements in the terrestrial environments. Springer-Verlag, New-York, 533.

Ahmadi, M., Vahabzadeh, F., Bonakdarpour, B., and Mehranian, M. (2006a). Empirical modeling of olive oil mill wastewater treatment using loofa-immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. Process. Biochem. 41: 1148–1154.

Ahmadi, M., Vahabzadeh, F., Bonakdarpour, B., Mehranian, M., Mofarrah, E. (2006b). Phenolic removal in olive oil mill wastewater using loofah-immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. J. Microbiol. Biotech. 22: 119–127.

Albani J.R. and Plancke Y.D., (1999). Interaction between calcofluor white and carbohydrates of 458 alpha 1-acid glycoprotein. Carbohydr. Res. 318:194–200.

Alloway B.J., (1995). Soil processes and the behaviour of heavy metals. Heavy metals in soils. In B.J. Alloway (Ed.) Blackie Academic and Professional Publ. New-York.

Anastasiou C.C., Christou P., Michael A., Nicolaides D., Lambrou T.P. (2011). Approaches to olive mill wastewater treatment and disposal in Cyprus. Environ. Res. 5(2): 49-58.

Ander P. and Eriksson K.E., (1980). Selective degradation of wood components by white-rot fungi. Physiol. Plant. 41: 239-248.

Armenante, A., Longobardi, S., Rea, I., De Stefano, L., Giocondo, M., Silipo, A., Molinaro, A. and Giardina, P. (2010) The *Pleurotus ostreatus* hydrophobin Vmh2 and its interaction with glucans. Glycobiology 20, 594-602.

Aziz N. H., Farag S. E., Mousa L. A. A and Abo-Zaid M. A. (1998). Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. Microbios. 93: 43-54.

Babich H., Stotzky G., (1977) (a). Reductions in the toxicity of cadmium to microorganisms by clay minerals. Appl. Environ. Microbiol. 33(3): 696-705.

Babich H., Stotzky G., (1977) (b). Sensitivity of various bacteria, including actinomycetes, and fungi to cadmium and the influence of pH on sensitivity. Appl. Environ. Microbiol. 33: 681-695.

Baldi F., (2003). Atti della I Summer School “Ricerca, sperimentazione e sviluppo di tecnologie di bonifica di siti contaminate. In Canepa P. e Fava., (Eds.). Savona 8-13 Sett. 2002. Consorzio Interuniversitario Nazionale “La chimica per l’ambiente”, Venezia p. 215.

Baldrian P., Gabriel J., (1997). Effect of heavy metals on the growth of selected wood-rotting basidiomycetes. *Folia Microbiol.* 42: 521-523.

Baldrian P., in der Wiesche C., Gabriel J., Nerud F., Zdražil F., (2000). Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 2471-2478.

Baldrian P., (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungus. *Enzyme Microb. Tech.* 32: 78-91.

Bandara H.M.H.N., Yau J.Y.Y., Watt R.M., Jin L.J. and Samaranayake L.P., (2010). *Pseudomonas aeruginosa* inhibits in-vitro *Candida* biofilm development. *BMC Microbiol.* 10-125.

Barbosa I., Garcia S., Barbier-Chassefière V., Caruelle J.-P., Martelly I. and Papy-Garcia D., (2003). Improved and simple micro assay for sulphated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology* 13: 647–653.

Bardouniotis E., Ceri H. and Olson M.E., (2003). Biofilm formation and biocide susceptibility testing of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium marium*. *Curr. Microbiol.* 46: 28-32.

Banks, M.K. e Bryers, J.D. (1991). Bacterial species dominance within a binary culture biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1974–1979.

Becker P., Hufnagle W., Peters G. and Herrmann M. (2001). Detection of different gene expression in biofilm-forming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus* using micro-representational-difference analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2958–65.

Benavides M.P., Gallego S.M., Tomaro M., (2005). Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant. Physiol.* 17: 21-34.

Beyersmann D (1994). Interactions in metal carcinogenicity. *Toxicol. Lett.* 72, 333–338.

Bezalel L., Hadar P.P.Fu., Freeman J.P., Cerniglia C.E., (1996). Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2547-2553.

Blanchette R.A., Otjen L. and Carlson M.C., (1987). Lignin distribution in cell walls of birch wood decayed by white rot basidiomycetes. *Phytopathol.* 77: 684-690.

Blanchette R.A., (1991) Delignification by wood-decay fungi. *Annu. Rev. Phytopat.* 29: 381-398.

- Blankeship J.R. and Mitchell A.P., (2006).** How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 588-594.
- Blowes D., (2002).** Environmental chemistry. Tracking hexavalent Cr in groundwater. *Science.* 295: 2024-2025.
- Bollag J.M., Shuttleworth K.L., Anderson D.H., (1988).** Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 3086-3091.
- Bollag J.M., (1992).** Decontaminating soils with enzymes. *Environ. Sci. Technol.* 26: 1876-1881.
- Bogan B., Lamar R.T., Burgos W.D., Tien M., (1999).** Extent of humification of anthracene, fluoranthene, and benzo[*a*]pyrene by *Pleurotus ostreatus* during growth in PAH-contaminated soils. *Lett. Appl. Microbiol.* 28: 250-254.
- Boonchan S., Britz M.L. and Stanley G.A. (2000).** Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1007–1019.
- Booth S.C., Workentine M.L., Wen J., Shaykhutdinov R., Vogel H.J., Ceri H., Turner R.J., Weljie A.M., (2011).** Differences in metabolism between the biofilm and planktonic response to metal stress. *J. Proteome Res.* 10: 3190-3199.
- Boulos L., Prévost M., Barbeau B., Coallier J., Desjardins R., (1999).** LIVE/DEAD BacLight[™]: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J. Microbiol. Meth.* 37: 77-86.
- Bradford M.M., (1976).** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bragadeeswaran S. Balasubramanian, ST. Raffi, SM. & Rani, Sophia S. (2010).** Scanning electron microscopy elemental studies of primary film. *World J. Appl. Sci.* 10: 169-172.
- Buswell J.A., Cai Y., Chang S.T., (1995).** Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula edodes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 128: 81-88.
- Ceri H., Olson M.E., Stremick C., Read R.R., Morck D. and Bureti A., (1999).** The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J. Clin. Microbiol.* 37(6): 1771-1776.
- Chandra J., Mukherjeel P.K., Leidichl S.D., Faddoul F.F., Hoyer L.L., Douglas L.J., Ghannouml M.A., (2001).** Antifungal resistance of *Candida* Biofilms formed on Denture acrylic in vitro. *J. Dent. Res.* 80(3): 903-908.

Chandra J., Kuhn D.M., Mukherjee P.K., Hoyer L.L., McCormick T. and Ghannoum M.A., (2001b). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* 183:5385-5394.

Characklis W.G., (1973). Attached microbial growth-II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Res.* 7: 1249-58.

Chen G.C. and Johnson B.R., (1983). Improved colorimetric determination of cell wall chitin in wood decay fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 13-16

Cliffe S., Fawer M.S., Maier G., Takata K., Ritter G., (1994). Enzyme assay for the phenolic content of natural juices. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1824-1828.

Coenye T., De Prijck K., Nailis H. and Nelis H.J., (2011). Prevention of *Candida albicans* biofilm formation. *The Open Mycology Journal*, 5: 9-20

Collins P.J., Kotterman M.J.J., Field J.A., Dobson A.D.W., (1996). Oxidation of anthracene and benzo(α)pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4563-4567.

Costerton J.W., Geesey G.G., Cheng K.J., (1978). How bacterial stick. *Sci. Am.* 238: 86-95.

Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M., (1995). Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 711-745.

D'Annibale A., Crestini C., Di Mattia E., Giovannozzi-Sermanni G., (1996). Veratryl alcohol oxidation by manganese-dependent peroxidase from *Lentinus edodes*. *J. Biotech.* 48: 231-239.

D'Annibale A., Rosetto F., Leonardi V., Federici F., Petruccioli M., (2006). Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 28-36.

D'Annibale, A., Quaratino, D., Federici, F. and Fenice, M. (2006) Effect of agitation and aeration on the reduction of pollutant load from olive-mill wastewater by the white-rot fungus *Panus tigrinus*. *Biochem Eng J* 29: 243-249.

Davey M.E. and O'Toole G.A., (2000). Microbial biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 847-867.

Davies D.G., Chakrabarty A.M. and Geesey G.G., (1993). Exopolysaccharide production in biofilms: Substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1181-1186.

Davies D.G. and Geesey G.G. (1995). Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:860-7.

- Davies, D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W. and Greenberg E.P., (1998).** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280:295–298.
- De Boer W., Folman L.B. and Summerbell R.C. (2005)** Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol. Rev* 29:795–811.
- Denkaus E., Meisen S., Telgheder U., Wingender J., (2007).** Chemical and physical methods for characterisation of biofilms. *Microchim. Acta.* 158: 1-27.
- Di Bonaventura G., Pompilio A., Picciani C., Iezzi M., D’Antonio D. and Piccolomini R., (2006).** Biofilm Formation by the Emerging Fungal Pathogen *Trichosporon asahii*: Development, Architecture, and Antifungal Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:3269-3276.
- Donlan R.M., (2001).** Biofilms and device-associated infections. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 277-28.
- Donlan R.M., (2002).** Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* Vol. 8.
- Donlan R.M. and Costerton, J.W., (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 167-193.
- do Rio, M.C.S., de Oliveira, B.V., de Tomazella, D.P.T., Fracassi da Silva, J.A., Pereira, G.A.G. (2008)** Production of calcium oxalate crystals by the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches’ broom disease of cacao. *Curr. Microbiol* 56, 363–370.
- Douglas L.J., (2003).** *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 11: 30-36.
- Dow J.M., Fouhy Y. and Lucey J., (2007).** Cyclic di-GMP as an intracellular signal regulating bacterial biofilm formation. In: Kjelleberg S., Givskov M., (eds). *The biofilm mode of life: mechanisms and adaptations.* Horizon Bioscience, Norwich. 71-94.
- Dutton, M.V., Evans, C.S., Atkey, P.T., Wood, D.A. (1993)** Oxalate production by *Basidiomycetes*, including the white-rot species *Coriolus versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39, 5-10.
- El-Dein, N.M.M., El-Fallal, A.A., El-Shahat, A.T., Hereher, F.E. (2004)** Exopolysaccharides production by *Pleurotus pulmonarius*: factors affecting formation and their structures. *Pak J. Biol. Sci.* 7, 1078-1084.
- Elvers K.T., Leeming1 K., Moore1 C.P. and Lappin-Scott H.M. (1998).** Bacterial-fungal biofilms in flowing water photo-processing tanks. *J. Appl. Microbiol.* 84: 607–618

- Eggen T., Majcherczyk A., (1998).** Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 41: 111-117.
- Eggert C., Temp U., Eriksson K.E.I., (1996).** The lignolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. Purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1151-1158.
- Eriksson K.E., Johnsrud S.C., Vallander L., (1983).** Degradation of lignin and lignin model compounds by various mutants of the white rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Archives Microbiol.* 135: 161-168.
- Ezzouhri L., Castro E., Moya M., Espinola F., Lairini K., (2009).** Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. *Afric. J. Microbiol. Res.* 3:35-48.
- Fahaereus G. and Reinhammar B., (1967).** Large-scale production and purification of laccase from cultures of *Polyporus versicolor* and some properties of laccase. *Acta. Chem. Scand.* 21: 2367-2378.
- Fakoussa R.M., Hofrichter M., (1999).** Biotechnology and microbiology of coal defradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 25-40.
- Favero N., Costa P., Massimino M.L. (1991).** In vitro uptake of cadmium by basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnol. Lett.* 13: 701–704.
- Fernando T., Bumpus J.A., Aust S.D., (1990).** Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1666-1671.
- Flemming H-C, Wingender J., Griegbe, Mayer C., (2000).** Physico-chemical properties of biofilms. In: Evans LV, editor. *Biofilms: recent advances in their study and control.* Amsterdam: Harwood Academic Publishers; p.19-34
- Forrester I.T., Grabsky M., Burgess R.R., Leatham G.F., (1988).** Manganese, Mn-dependent peroxidises and the degradation of lignin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 992-999.
- Fredricks D.N., Smith C. and Meier A., (2005).** Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5122-5128.
- Gabrielson J., Hart M., Jarelöv A., Kühn I., McKenzie D. and Möllby R., (2002).** Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *J. Microbiol. Meth.* 50: 63–73.

Gadd G.M., De Rome L., (1988). Biosorption of copper by fungal melanins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29: 610-617.

Gadd G.M., White C., (1989). Heavy metal and radionuclide accumulation and toxicity in fungi and yeasts. In: Poole R.K., Gadd G.M., eds. *Metal-microbe interactions*. Oxford: IRL Press. 19-38.

Gadd G.M., Gray D.J., Newby P.J., (1990). Role of melanin in fungal biosorption of tributyltin chloride. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 116-121.

Gadd G.M., (1992). Metals and microorganisms: A problem of definition. *FEMS Microbiol. Lett.* 100: 197-204

Gadd G.M. (2001). *Fungi in Bioremediation*. Cambridge University Press, Cambridge.

Gadd G.M., (2004). Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* 122: 109-119.

Galliano H., Gas G., Seris J.L., Boundet A.M., (1991). Lignin degradation by *Rigidosporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn-peroxidase and laccase. *Enzyme Microb. Technol.* 13: 473-482.

Glee, P. M., Russell P. J., Welsch J. A., Pratt J. C. and Cutler J. E., (1987). Methods for DNA extraction from *Candida albicans*. *Anal. Biochem.* 164: 207–213.

Gianfreda L., Sannino F., Filazzola M.T., Leonowicz A., (1998). Catalytic behavior and detoxifying ability of laccase from the fungal strain *Cerrena unicolor*. *J. Mol. Catal. B:Enzym.* 4: 13-23.

Gilbert P., Das J. and Foley I., (1997). Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res.* 11: 160-167.

Giovannozzi Sermani G., D'Annibale A., Di Lena G., Vitale N.S., Di Mattia E., Minelli V., (1994). The production of exoenzymes of *Lentinus erode* and *Pleurotus ostreatus* and their use for upgrading corn straw. *Biores. Technol.* 48: 173-178.

Glenn J.K., Gold M.H., (1985). Purification and characterization of an extracellular Mn (II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 242: 329-341.

Gold M.H., Kuwara M., Chua A., Glenn J.K., (1984). Purification and characterization of an extracellular H₂O₂-requiring diarylpropane oxygenase from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 234: 353-362.

Gorbushina, A.A. and Palinska, K.A. (1999) Biodeteriorative processes on glass: experimental proof of the role of fungi and cyanobacteria. *Aerobiologia* 15, 183–191

Gutiérrez, A., Martínez, M.J., Almendros, G., González-Vila, F.J. and Martínez, A.T. (1995) Hyphal-sheath polysaccharides in fungal deterioration. *Sci. Total Environ.* 167, 315-328.

Gutiérrez A., Prieto A. and Martínez A.T., (1996). Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. *Carbohyd. Res.* 281:143-154.

Haars A., Chet I., Huttermann A., (1981). Effects of phenolic compounds and tannin on growth and activity of *Fomes annosus*. *Environ. J. Forest. Pathol.* 11: 67-76.

Hall-Stoodley, (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 95-108.

Harding M.W., Marques L.R., Howard R.J., Olson M.E., (2009). Can filamentous fungi form biofilms? *Trends Microbiol.* 17: 475-80.

Harrison J. J., Ceri H., Stremick C. A., Turner R.J. (2004). Biofilm susceptibility to metal toxicity. *Environ. Microbiol.* 6: 1220-1227

Harrison J.J., Turner R.J., Ceri H. (2005a) Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 7:981-94.

Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H (2005b). High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. *BMC Microbiol.* 5:53.

Harrison JJ, Ceri H, Yerly J, Stremick CA, Hu Y, Martinuzzi R, Turner RJ (2006a). The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary Biofilm Device. *Biol Proced Online* 8: 194–215.

Harrison J.J., Rabiei M., Turner R.J., Badry E.A., Sproule K.M., Ceri H. (2006b) Metal resistance in *Candida biofilms*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55:479-491.

Harrison J.J., Stremick C.A., Turner R.J., Allan N.D., Olson M.E. and Ceri H., (2010). Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nature Protocols* 5: 1236-1254.

Hatakka A., (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 125-135.

Haugland R.A., Heckman J.L. and Wymer L.J., (1999). Evaluation of different methods for the extraction of DNA from fungal conidia by quantitative competitive PCR analysis. *J. Microbiol. Meth.* 37:165–176.

Hausner M. and Wuertz S., (1999). High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined in situ analysis. *Appl Environ Microbiol.* 65: 3710-3713.

- Hawser S.P., Baillie G.S. e Douglas, L.J. (1998).** Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. *J. Med. Microbiol.* 47: 253–256.
- Hughes MN, Poole RK (1991).** Metal speciation and microbial growth—the hard (and soft) facts. *J. Gen. Microbiol.*, 137:725–34.
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., and Williams P.M. (1996).** Real Time Quantitative PCR. *PCR Meth. Appl.* 6 (10): 986-994
- Heukelekian H. and Heller A., (1940).** Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *J. Bacteriol.* 40: 547-58.
- Hodge J.E. and Hofreiter B.T., (1962).** *Methods Carbohydr. Chem.* 1: 388-389.
- Hofrichter M., Fritsche W., (1997).** Depolymerization of low rank coal by extracellular fungal enzyme synthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 419-571.
- Hofrichter M., Scheibner K., Schneegab I., Fritche W., (1998).** Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 399-404.
- Hogan, D.A. and Kolter, R. (2002).** *Pseudomonas-Candida* interactions: An ecological role for virulence factors. *Science* 296: 2229–2232.
- Honraet, K., Goetghebeur, E. and Nelis, H.J., (2005).** Comparison of three assays for the quantification of *Candida* biomass in suspension and CDC reactor grown biofilms. *J. Microbiol. Meth.* 63: 287–295.
- Honraet, K. and Nelis, H.J., (2006).** Use of the modified Robbins device and fluorescent staining to screen plant extracts for the inhibition of *S. mutans* biofilm formation. *J. Microbiol. Meth.* 64: 217–224.
- Howe R., Evans R.L. and Ketteridge S.W., (1997).** Copper-binding proteins in ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* 135: 123-131.
- Hughes M.N., Poole R.K., (1991).** Metal speciation and microbial growth-the hard (and soft) facts. *J. Gen. Microbiol.* 137: 725-734.
- Izard J. and Limberger R.J., (2003).** Rapid screening method for quantitation of bacterial cell lipids from whole cells. *Journal of Microbiological Methods* 55: 411 – 418.
- Jayasinghearachchi HS., Seneviratne G., (2004).** Fungal solubilisation of rock phosphate is enhanced by forming fungal-rhizobial biofilms. *Biol. Fertil. Soil.* 40: 432-434.
- Jayasinghearachchi HS., Seneviratne G., (2004).** Can mushrooms fix atmospheric nitrogen? *J. Biosci.* 29: 293-296.

- Jayasinghearachchi HS., Seneviratne G., (2006).** A mushroom-fungus helps improve endophytic colonization of tomato by *Pseudomonas fluorescens* through biofilm formation. Res. J. Microbiol. 1: 83-89.
- Jaouani, A., Sayadi, S., Vanthourhout, M. and Penninckx, M.J. (2003)** Potent fungi for decolorization of olive mill wastewater. Enzyme Microb Technol 33, 802–809.
- Jones H.C., Roth I.L. and Saunder W.M. III., (1969).** Electron microscopic study of a slime layer. J Bacteriol. 99: 316-25.
- Jones J.B.G., (1994).** Fungal adhesion. Mycol. Res. 98: 961-981.
- Kantelinen A., Hatakka A., Viikari L., (1989).** Production of lignin peroxidase and laccase by *Phlebia radiate*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 234-239.
- Kapich A., Hofrichter M., Vares T., Hattaka A., (1999).** Coupling of manganese peroxidase mediated lipid peroxidation with destruction of non phenolic lignin compounds and 14C-labelled lignins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 22: 88-95.
- Kennedy D.W., Aust S.D., Bumpus J.A., (1990).** Comparative biodegradation of alkyl halide insecticides by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporim* (BKM-F-1767). Appl. Environ. Microbiol. 56: 2347-2353.
- Kidambi S.P., Sundin G.W., Palmer D.A., Chakrabarty A.M. and Bender C.L., (1995).** Copper as a signal for alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Environ. Microbiol. 7: 981-994.
- Kissi M., Mountadar M., Assobhei O., Gargiulo E., Palmieri G., Giardina P. and Sannia G. (2001).** Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57: 221-226
- Kobayashi, Y., Nakamura, H., Sekiguchi, T., Takanami, R., Murata, T., Usui, T. and Kawagishi, H. (2005).** Analysis of the carbohydrate binding specificity of the mushroom *Pleurotus ostreatus* lectin by surface plasmon resonance. Anal. Biochem. 336, 87-93.
- Koeleman, M., Ietswaart, H. and van der Laak, W.J. (1999).** Dispersion of PAH and heavy metals along motorways in The Netherlands: an overview. Sci. Total. Environ. 235, 347-349.
- Kokare, C.R., Chakraborty S., Khopade A.N. and Mahadik K.R., (2009).** Biofilm: importance and applications. Indian J. Biotechnol. 8: 159-168.
- Kubàtovà A. Erbanová P., Eichlerová I., Homolka L., Nerud F., Šásek V., (2000).** PCB congener selective biodegradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil. Chemosphere. 43: 207-215.

- Kuhn D.M., Chandra J., Mukherjee P.K. and Ghannoum M.A., (2002).** Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect. Immun.* 70: 878–888.
- Kuwara M., Glenn J.K., Morgan M.A., Gold M.H., (1984).** Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic culture of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 169: 247-250.
- Laborey F., Lavollay J., (1973).** Sur la nature des antagonismes responsables de l'interaction des ions Mg⁺⁺, Cd⁺⁺, et Zn⁺⁺ dans la croissance d'*Aspergillus niger*. *C. R. Acad. Sci. Ser. D* 276: 529-532.
- Lal P., Sharma D., Pruthi P., Pruthi V., (2009).** Exopolysaccharide analysis of biofilm forming *Candida albicans*. *J. Appl. Microbiol.* 109: 128-136
- Leriche V., Sibille P. and Carpentier B., (2000).** Use of an enzyme-linked lectin sorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1851-1856.
- Lewansowski, Z., Altobelli S.A. and Fukushima E., (1993).** NMR and microelectrode studies of hydrodynamics and kinetics in biofilms. *Biotechnol Prog.* 9:40–45.
- Li X., Yan Z. and Xu J., (2003).** Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology* 149: 353–362.
- Liu H. and Fang H.H.P., (2002).** Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *J. Biotechnol.* 95: 249-256.
- Maaroufi Y., Ahariz N., Husson M. and Crokaert F., (2004).** Comparison of different methods of isolation of DNA of commonly encountered *Candida* species and its quantitation by using a real-time PCR-based assay. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3159–3163.
- Mäkelä, M.R., Hildén, K., Lundell, T.K. (2010).** Oxalate decarboxylase: biotechnological update and prevalence of the enzyme in filamentous fungi. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 87: 801–814
- Martirani L., Giardina P., Marzullo L., Sannia G. (1996).** Reduction of phenol content and toxicity of olive oil mill waste waters with the lignolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res.* 30:1914-1918.
- Martinez, L.R. and Casadevall, A. (2006)** Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1021-1033
- Martirani L., Giardina P., Marzullo L. and Sannia G. (1996).** Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res* 30: 1914-1918

- McCluskey C., Quinn J.P. and McGrath J.W., (2005).** An evaluation of three new generation tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity in activated sludge microorganisms. *Microb. Ecol.* 49: 379–387.
- McLean R.J.C., Bates C.L., Barnes M.B., McGowin C.L. and Aron G.M., (2004).** Methods of studying biofilms. *Microbial Biofilms*. ASM Press.
- McNamara C.J., Anastasiou C.C., O’Flaherty V. and Mitchell R., (2008).** Bioremediation of olive mill wastewater. *Int. Biodeter. Biodegr.* 61: 127–134
- Miller D.N., Bryant J.E., Madsen E.L. and Ghiorse W.C. (1999).** Evaluation and Optimization of DNA Extraction and Purification Procedures for Soil and Sediment Samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 4715–4724
- Murao S., Arai M., Tanaka N., Ishikawa H., Matsumoto K., Watanabe S., (1985).** A method for assaying of α -amylase using laccase. *Agric. Biol. Chem.* 49: 981-985.
- Nadkarni M.A., Martin F.E., Jacques N.A. and Hunter N., (2002).** Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiol.* 148: 257–266.
- Nakamura H., Ashida J., (1959).** Adaptation of yeast to cadmium. I. An introductory approach to the resistance mechanism. *Mem. Coll. Sci. Univ. Kyoto Ser. B* 26: 323-336.
- Narváez-Zapata J.A., Rodríguez-Ávila N., Ortega-Morales B.O. (2005).** Method for Recovery of intact DNA for community analysis of marine intertidal microbial biofilms. *Mol. Biotechnol.* 29: 1-5.
- Neifar, M., Jaouani, A., Ghorbel, R.E., Chaabouni, S.E., e Penninckx, M.J. (2009)** Effect of culturing processes and copper addition on laccase production by the white-rot fungus *Fomes fomentarius* MUCL 35117. *Lett. Appl. Microbiol.* 49: 73–78
- Norris P.R., Kelly D.P., (1977).** Accumulation of cadmium and cobalt by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. General Microbiol.* 99: 317-324.
- O'Brien J., Wilson I., Orton T. and Pognan, F., (2000).** Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267: 5421–5426.
- O’Malley D.M., Whetten R., Bao W., Chem C., Sederoff R.R., (1993).** The role of laccase in lignification. *Plant J.* 4: 451-757.
- O’Toole G., Kaplan H.B. and Kolter R., (2000).** Biofilm formation as microbial development. *Ann. Rev. Microbiol.* 54: 49-79.
- Odier E., Mozuch M.D., Kalyanaraman B. and Kirk TK., (1988).** Ligninase-mediated phenoxy radical formation and polymerization unaffected by cellobiose: quinone oxidoreductase. *Biochemistry.* 70: 847-852.

- Ohkawa M., Sugata T., Sawaki M., Nakashima T., Fuse H. and Hisazumi H., (1990).** Bacterial and crystal adherence to the surface of indwelling urethral catheters. *J. Urol.* 143: 7171-21.
- Orlando C., Pinzani P., and Pazzagli M. (1998)** Developments in quantitative PCR. *Clin. Chem. Lab. Med.* 36 (5): 255-269.
- Parahitiyawa N.B., Samaranayake Y.H., Samaranayake L.P., Ye J., Tsang P.W.K., Cheung B.P.K., Yau J.Y.Y. and Yeung S.K.W. (2006).** Interspecies variation in *Candida* biofilm formation studied using the Calgary biofilm device. *APMIS* 114: 298–306.
- Parsek M.R. and Fuqua C., (2004).** Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *J. Bacteriol.* 4427–4440
- Peeters E., Nelis H.J. and Coenye T., (2008).** Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J. Microbiol. Meth.* 72: 157–165.
- Pereira-Cenci T., Deng D.M., Kraneveld E.A., Manders E.M., Del Bel Cury A.A., Ten Cate J.M. and Crielaard W. (2008).** The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch. Oral Biol.* 53:755-764.
- Pérez-Osorio A.C., Williamson K.S. and Franklin M.J., (2010).** Heterogeneous *rpoS* and *rhIR* mRNA Levels and 16S rRNA/rDNA (rRNA Gene) ratios within *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, sampled by laser capture microdissection. *J. Bacteriol.* 192: 2991–3000
- Pettit, R.K., Weber, C.A., Kean, M.J., Hoffmann, H., Pettit, G.R., Tan, R., Franks, K.S. and Horton, M.L., (2005).** Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 2612–2617.
- Phillips M.W. and Gordon G.L.R.. (1989).** Growth characteristics on cellobiose of three different anaerobic fungi isolated from the ovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1695-1702.
- Piperidou, C., Chaidou, C., Stalikas, C., Soulti, K., Pilidis, G., Balis, C., (2000).** Bioremediation of olive oil mill wastewater: chemical alterations induced by *Azotobacter vinelandii*. *J. Agr. Food Chem.* 48: 1941-1948.
- Pitts B., Hamilton M.A., Zilver N. and Stewart P.S., (2003).** A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J. Microbiol. Meth.* 54: 269–276.
- Plassart P., Terrat S., Thomson B., Griffiths R. and Dequiedt S., (2012).** Evaluation of the ISO Standard 11063 DNA Extraction Procedure for Assessing Soil Microbial Abundance and Community Structure. *PLoS ONE* 7: 44279.

- Potera, C., (1999).** Forging a link between biofilms and disease. *Science*. 283: 1837-1838.
- Prévost-Bouré N.C., Christen R., Dequiedt S., Mougél C., Lelièvre M., Jolivet C., Shahbazkia H.R., Guillou L., Arrouays D., Ranjard L., (2011).** Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by Real-Time quantitative PCR.
- Prigent-Combaret, C., Vidal O., Dorel C. and Lejeune P., (1999).** Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181:5993–6002.
- Pulcini E. (2001).** The effects of initial adhesion events on the physiology of *Pseudomonas aeruginosa* [Ph.D. dissertation]. Bozeman (MT): Montana State University
- Reinhammar B., Maelstrom B.G., (1981).** Blue copper containing oxidases. In: Spiro T.G. (Ed) copper proteins (Metal ions in biology 3) Wiley, New York. 109-149.
- Reisner A., Haagensen J.A.J., Schembri M.A., Zechner E. and Molin S., (2003).** Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Mol. Microbiol.* 48(4): 933-946.
- Rentel M.C., Knight M.R., (2004).** Oxidative stress-induced calcium signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 135: 1471-1479.
- Reynolds T.B., Fink G.R., (2001).** Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science*. 291: 878-881.
- Rodis P.S., Karathanos V.T. and Mantzavinou A. (2002).** Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *J. Agric. Food Chem.* 50: 596-601.
- Roe J.H., (1955).** The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *J. Biol. Chem.* 212: 335–343.
- Rosado, F.R., Germano, S., Carbonero, E.R., Da Costa, S.M.G., Iacomini, M., Kimmelmeier, C. (2003).** Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* "florida" (Jack.: Fr.) Kummer. *J. Basic. Microbiol.* 43: 230-237.
- Rypacek V., (1977).** Chemical composition of hemicelluloses as a factor participating in the substrate specificity of wood-destroying fungi. *Wood Sci. Technol.* 11: 59-67.
- Salomon W., Forstner U., (1984).** Metals in the idrocycle. Springer-Verlag, Berlin.
- Sandalio L.M., Dalurzo H.C., Gómez M., Romero-Puertas M.C., del Rio L.A., (2001).** Cadmium induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.* 52: 2115- 2126.

Sanglimsuwan S., Yoshida N., Morinaga T., Murooka Y., (1993). Resistance to and uptake of heavy metals in mushrooms. *J. Ferment. Bioeng.* 75:112-114.

Sannia G., Giardina P., Luna M., Rossi M., Buonocore V., (1986). Laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnol Lett.* 8: 797–800.

Saravanakumar A., Venkateshwaran K., Vanitha J., M. Ganesh, Vasudevan M. and Sivakumar T., (2009). Evaluation of antibacterial activity, phenol and flavonoid contents of *Thespesia populnea* flower extracts. *Pakistan J. Pharmaceutical Sci.* 22: 282-286.

Sauer K., (2003). The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol.* 4: 219-227.

Sayadi, S. and Ellouz, R. (1993) Screening of white rot fungi for the treatment of olive mill waste-water. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 57,141–146.

Sayer J. and Gadd G.M., (1997). Solubilization and transformation of insoluble inorganic metal compounds to insoluble metal oxalates by *Aspergillus niger*. *Mycol. Res.* 106: 653-661.

Schink B., (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 262-280.

Schliephake K. and Lonegram G.T., (1996). Laccase variation during dye decolourization in 200 L packed-bed bioreactor. *Biotechnol. Letters.* 18: 881-886.

Sébastien Terrat S., Christen R., Dequiedt S., Lelièvre M., Nowak V., Regnier T., Bachar D., Plassart P., Wincker P., Jolivet C., Bispo A., Lemanceau P., Maron P.A., Mougell C. and Ranjard L., (2012). Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. *Microb. Biotechnol.* 5: 135–141.

Seneviratne G. and Jayasinghearachchi H.S. (2005). A rhizobial biofilm with nitrogenase activity alters nutrient availability in a soil. *Soil Biol. Biochem.* 37:1975–1978

Seneviratne G., Tennakoon N.S., Weerasekara M.L.M.A.W., Nandasena K.A., (2006). Polyethylene degradation by a developed *Penicillium/Bacillus* biofilm. *Curr. Sci* 90: 20-21.

Seneviratne G., Zavahir J.S., Bandara W.M.M. and Weerasekara M.L.M.A.W., (2007). Fungal/bacterial biofilms: their development for novel biotechnological application. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 739-743.

Seneviratne C.J. (2008). Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis.* 14: 482-590.

Seneviratne G., Zavahir J.S., Bandara W.M.M.S. and Weerasekara M.L.M.A.W., (2008). Fungal-bacterial biofilms: their development for novel biotechnological applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 739–743.

- Shimada M., Akamtsu Y., Tokimatsu T., Mii K., Hattori T., (1997).** Possible biochemical roles of oxalic acid as a low molecular weight compound involved I brown-rot and white-rot wood decays. *J. Biotechnol.* 53: 101-113.
- Singh R., Paul D., Jain R.K., (2006).** Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in microbiology.* 14: 389-397.
- Singhal R.K., Anderson M.E. and Meister A., (1987).** Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. *FASEB J.* 1: 220-223.
- Singleton V.L., Orthofer R. and Lamuela-Raventos R.M. (1995).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by mean of folin-ciocalteau reagent. *Method enzymol.* 299:152-178.
- Slomczynsky D., Nakas J.P. and Tanenbaum S.W. (1995).** Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:907-912.
- Smith C.J. and Osborn A.M., (2008).** Advantages and limitations of quantitative PCR(Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67: 6–20
- Soden D.M., Dobson A.D.W., (2001).** Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiol.* 147: 1755-1763.
- Splitgerber A.G. and Tappel A., (1979).** Inhibition of glutathione peroxidase by cadmium and other metal ions. *Arch. Biochem. and Biophys.* 197: 534-542.
- Stohs S.J. and Bagchi D., (1995).** Oxidative mechanisms in the toxicity of heavy metals. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 321-336.
- Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W., (2002).** Biofilms as complex differentiated communities. *Ann. Rev. Microbiol.* 56: 187-209.
- Strathmann M., Wingender J. and Flemming H.C., (2002).** Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol. Meth.* 50: 237–248.
- Sutherland I.W., (2001).** Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiol.* 147: 3-9.
- Suzuki, M.T., Taylor, L.T. and DeLong, E.F., (2000).** Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 50-nuclease assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4605–4614.
- Tien M., Kirk T.K., (1984).** Lignin degrading enzymes from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 2280-2286.

- Thurston C.F., (1994).** The structure and function of fungal laccases. *Microbiol.* 140: 19-26.
- Toté, K., Vanden Berghe, D., Maes, L., Cos, P., (2007).** A new research tool in the battle against *Staphylococcus aureus* biofilms. In: Gilbert, P., Allison, D., Brading, M., Pratten, J., Spratt, D., Upton, M. (Eds.), *Biofilms: Coming of Age*. The Biofilm Club, Manchester, pp. 175–181.
- Tour U., Winterhalter K. and Fiechter A., (1995).** Enzymes of white rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants in wood decay. *J. Biotechnol.* 41: 1-7.
- Tsivileva, O.M., Pankratov, A.N., Nikitina, V.E., Garibova, L.V. (2004).** Relationship between the molecular structure of nitrogen source and the activity of the extracellular lectins of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] upon submerged cultivation. *Microbiol.* 73, 410–413.
- Tsioulpas A., Dimou D., Ikonomidou D., Aggelis G. (2002).** Phenolic removal in olive oil mill waste-water by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresour Technol.* 84: 251-7.
- Tuncel G. and Nergiz C. (1993).** Antimicrobial effect of some olive phenols in a laboratory medium. *Lett. Appl. Microbiol.* 17: 300-302.
- Tynecka Z., Zylinska W., (1974).** Plasmid borne resistance to some inorganic ions in *Staphylococcus aureus*. *Acta Microbiol. Pol. Ser. A* 6: 83-92
- Upitis V.V., Pakalne D.S., Nollendorf A.F., (1973).** The dosage of trace elements in the nutrient medium as a factor in increasing the resistance of *Chlorella* to unfavorable conditions of culturing. *Microbiol.* 42: 758-762.
- Vagelas I., Kalorizou H., Papachatzis A. and Botu M. (2009).** Bioactivity of olive oil mill wastewater against plant pathogens and post harvest diseases. *Biotech. Biotechnol. Equipment.* 23: 1219.
- Vainio E.J. and Hantula J., (2000).** Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol Res* 104: 927–936.
- Vallee B. and Ulmer D., (1972).** Biological effects of mercury, cadmium and lead. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 91-128.
- van Burik, J. A., Schreckhise R.W., White T.C., Bowden R.A. and Myerson D., (1998).** Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Med. Mycol.* 36:299–303.

- Vilain S. and Brözel V.S., (2006).** Multivariate approach to comparing whole-cell proteomes of *Bacillus cereus* indicates a biofilm-specific proteome. *J. Proteome Res.* 5: 1924-1930.
- Vlyssides A.G., Loizides M., Karlis P.K. (2004).** Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *J. Clean. Prod.* 12: 603-611
- Walencka E., Sadowska B., Różalska S., Hryniewicz W., Różalska B., (2006).** *Staphylococcus aureus* biofilm as a target for single or repeated doses of Oxacillin, Vancomycin, Linezolid and/or Lysostaphin. *Folia Microbiol.* 51(5): 381-386.
- Wang J.L., Chen C., (2006).** Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Biotechnol. Adv.* 24: 427-451.
- Warishii H., Valli K., Gold M.H., (1992).** Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 267: 23688-23695.
- Watnick P. I. and R. Kolter (1999).** Steps in the development of a *Vibrio cholerae* biofilm. *Mol. Microbiol.* 34:586–595.
- Watnick P. and Kolter R., (2000).** Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology.* p. 2675-2679
- Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C. and Mattick, J.S., (2002).** Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295: 1487.
- Wolter M., Zadrazil R., Martens R., Bahadir M., (1997).** Degradation of eight highly condensed polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus sp. Florida* in solid wheat straw substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 398-404.
- Wosten H.A.B., (2001).** Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 625-646.
- Wu, J., Xiao, Y.-Z., Yu, H.-Q. (2005)** Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. *Bioresour. Technol.* 96, 1357–1363.
- Xiangliang, P., Jianlong, W., Daoyong, Z. (2005)** Biosorption of Pb(II) by *Pleurotus ostreatus* immobilized in calcium alginate gel. *Process. Biochem.* 40, 2799-2803.
- Xu F., (1997).** Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccase. *J. Biol. Chem.* 272: 924-928.
- Zeng X, Tang J, Yin H, Liu X, Jiang P, Liu H (2010).** Isolation, identification and cadmium adsorption of a high cadmium-resistant *Paecilomyces lilacinus* Afric J. *Biotechnol.* 9: 6525-6533.

Zilly A., Marques De Souza C.G., Barbosa-Tessmann I.P., Peralta R.M. (2002). Decolorization of industrial dyes by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* producing laccase as the sole phenol-oxidizing enzyme. *Folia. Microbiol.* 47: 272-7.

Zobell C.E., (1943). The effect of solid surfaces on bacterial activity. *J. Bacteriol.* 46: 39-56.

Zhu F., Rammon M., Not F., Marie D. and Vaultot D., (2005). Mapping of picoeucaryotes in marine ecosystems with quantitative PCR of the 18S rRNA gene. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52:79–92.