

INDICE

RIASSUNTO	3
CAPITOLO 1: INTRODUZIONE.....	4
1.1 Inquinamento da metalli pesanti nell'ambiente	4
1.2 Il mercurio	8
1.2.1 L'elemento libero	8
1.2.2 Mercurio ionico e formazione del metilmercurio	11
1.2.3 Tossicità del metilmercurio	15
1.2.4 Altre fonti di mercurio e metilmercurio	18
1.3 Il biorisanamento ambientale.....	23
1.4 Meccanismi di tolleranza ai metalli pesanti nei funghi.....	29
1.5 <i>Trichoderma harzianum</i>	35
1.6 Scopo della ricerca	42
CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI	43
2.1 Effetti del cadmio e del mercurio sulla crescita <i>in vitro</i> di <i>Trichoderma harzianum</i>	43
2.1.1 Determinazione del peso secco del micelio fungino	43
2.1.2 Determinazione della velocità di crescita.....	44
2.2 Costruzione della libreria sottrattiva	45
2.2.1 Condizioni di crescita del fungo.....	45
2.2.2 Prelievo del micelio.....	45
2.2.3 Estrazione dell'RNA totale	46
2.2.4 Quantificazione dell'RNA totale.....	48
2.2.5 Isolamento e purificazione dell'RNA messaggero.....	52
2.2.6 Retrotrascrizione da mRNA a cDNA	54
2.2.7 Costruzione delle librerie sottrattive (SSH library).....	56
2.2.8 Clonaggio genico	66
2.3 Analisi dei livelli d'espressione genica mediante Real-Time RT-PCR	74
2.3.1 Condizioni di crescita del fungo e prelievo del micelio	74
2.3.2 Estrazione dell'RNA totale, quantificazione e retro trascrizione in cDNA.....	75
2.3.3 Real-Time RT-PCR: principio ed esecuzione	79
2.4 Saggio con ammoniaca del substrato Czapek.....	92
2.5 Analisi HPLC e Gas-cromatografica del substrato Czapek	93
2.5.1 Cenni teorici: HPLC e GC	93
2.5.2 Fase operativa.....	98

CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE	100
3.1 Effetti del cadmio e del mercurio (II) sulla crescita <i>in vitro</i> di <i>Trichoderma harzianum</i>	100
3.2 Analisi dei diversi profili d'espressione genica ottenuti mediante PCR-Select.....	103
3.3 Analisi dei geni differenzialmente espressi ottenuti dalla <i>SSH library mercurio specifica</i> mediante Real-Time RT-PCR	109
3.4 Effetti sulla crescita di <i>Trichoderma harzianum</i> in presenza di mercurio (II) sterilizzato in autoclave e per microfiltrazione.....	115
3.5 Saggio con ammoniaca: formazione del cloruro mercurioso	117
3.6 Risultati analisi HPLC e GC del substrato Czapek	120
3.7 Effetti del mercurio I e del mercurio II sulla crescita di <i>Trichoderma harzianum</i>	121
3.8 Analisi dei livelli d'espressione genica su micelio cresciuto in presenza di mercurio (II) microfiltrato.....	125
CAPITOLO 4: CONCLUSIONI.....	128
Note Bibliografiche	134

Riassunto

Il lavoro della presente tesi ha riguardato lo studio della capacità di *Trichoderma harzianum* di crescere in presenza di mercurio. L'obiettivo principale era quello di comprendere i meccanismi biomolecolari coinvolti nella risposta metabolica allo stress indotto da mercurio in *T. harzianum*.

E' stato studiato l'accrescimento radiale su piastra in terreno colturale agarizzato in presenza di cadmio e mercurio e il peso secco del micelio del fungo accresciutosi in terreno colturale liquido nelle medesime condizioni. In entrambi i casi *T. harzianum* ha mostrato una maggiore capacità di crescita in presenza di mercurio.

In un secondo tempo, la ricerca ha avuto come obiettivo quello di identificare i geni differenzialmente espressi nel fungo cresciuto in presenza dei già citati metalli pesanti. La costruzione di due *SSH library*, una specifica per il mercurio e una per il cadmio, ha permesso d'isolare e identificare i geni differenzialmente espressi nel micelio del fungo cresciuto in presenza di cadmio e in presenza di mercurio. In seguito, focalizzando l'attenzione sui geni attivati solo in presenza di mercurio, applicando la tecnica della *Real-Time RT-PCR*, sono stati studiati i livelli d'espressione di questi geni sia in *T. harzianum* cresciuto in presenza di mercurio e in presenza di cadmio, sia in assenza dei suddetti metalli pesanti (controllo). I risultati hanno mostrato una sostanziale sovraespressione di questi geni nel micelio di *T. harzianum* cresciuto in presenza di mercurio rispetto allo stesso cresciuto in presenza di cadmio e nel controllo. La sovraespressione dei geni codificanti per proteine della parete cellulare, suggerirebbe un ruolo attivo e fondamentale di queste nei meccanismi di resistenza al mercurio messi in atto dal fungo.

Capitolo 1: Introduzione

1.1 Inquinamento da metalli pesanti nell'ambiente

L'opinione pubblica mondiale, in questo ultimo decennio, ha mostrato una maggiore sensibilizzazione nei confronti dell'ambiente e della sua salvaguardia. In questo contesto, l'inquinamento da metalli pesanti derivante da reflui pubblici, attività industriali e attività agrarie, rappresenta ancora oggi un problema molto serio.

La relazione fra metalli e attività umane affonda le sue radici addirittura in epoca preistorica. A tal proposito basti pensare che il periodo storico compreso fra il 6000 a. C. e il 1000-1200 a. C. viene definito dagli storici come "*età dei metalli*", indicando per l'appunto il periodo in cui gli uomini iniziarono la lavorazione dei metalli per costruire i primi utensili abbandonando progressivamente l'utilizzazione della pietra. A essere rigorosi quindi, si potrebbe addirittura far risalire a queste epoche una primitiva forma d'inquinamento ambientale da metalli. Tuttavia, in uno scenario più realistico, l'uso da parte dell'uomo dei metalli in maniera tale da indurre profondi e duraturi cambiamenti all'ambiente si deve far risalire al periodo della "*prima rivoluzione industriale*", compreso per convenzione fra il 1760 e il 1830. Oggi, circa 200 anni dopo, potremmo dire di vivere nell'età della "*rimozione*" dei metalli dall'ambiente poiché la consapevolezza dei rischi legati alla diffusione incontrollata dei metalli pesanti nell'ambiente è universalmente accettata e condivisa.

Dal punto di vista ambientale, i metalli di maggiore interesse sono quelli che, per la loro presenza e/o accumulazione, possono avere un effetto tossico o inibitorio sugli esseri viventi. Essi possono essere dispersi sia naturalmente sia in seguito alle attività umane in uno qualsiasi degli elementi della terra: suolo, acqua o aria. Nella tabella 1 sono mostrati i

metalli pesanti di maggior interesse da un punto di vista ambientale e alcuni dati relativi alla loro tossicità in acqua (Wase *et al.*, 1997).

Tabella 1: Esempi di tossicità dei metalli pesanti su alcune specie acquatiche. DL50 indica la concentrazione o dose, letale per il 50 % degli organismi viventi considerati (viene indicato anche il tempo relativo d'esposizione)

Metallo	Specie	Effetti	Concentrazione (mg/L)
Cadmio	Carpa	96 h - DL 50	22
Cromo	Trota	96 h - DL 50	59
Piombo	Trota	96 h - DL 50	3,4
Nichel	Trota	96 h - DL 50	45
Zinco	Trota	48 h - DL 50	35

Da un punto di vista strettamente chimico vengono definiti metalli pesanti *“quegli elementi della tavola periodica che presentano una densità maggiore rispetto a quella dei propri ossidi e una densità superiore a 4-5 g/cm³”* (Lapades, 1974). In genere si comportano come cationi, presentano una bassa solubilità dei loro idrati, hanno una spiccata attitudine a formare complessi, hanno una grande affinità per i solfuri, nei quali tendono a concentrarsi, e presentano diversi stati d'ossidazione a seconda delle condizioni di pH. Gran parte dei metalli pesanti appartiene al gruppo dei cosiddetti "elementi in traccia", comunemente presenti nei suoli e nelle rocce della crosta terrestre in concentrazioni di alcune parti per milione (ppm) o per miliardo (ppb).

Molti dei metalli pesanti rappresentano elementi essenziali per molte funzioni biologiche purché presenti nei vari organismi in concentrazioni molto basse; il superamento di tali concentrazioni si traduce spesso in eventi patologici di vario tipo e determina disfunzioni metaboliche, malformazioni, tumori con conseguenze letali. Alcuni di essi, invece, quali ad esempio, Cd, Pb e Hg sono metalli non essenziali in quanto non entrano in nessun processo biologico noto. Finora nessuno di essi ha contaminato l'ambiente a un punto tale da costituire un pericolo diffuso; tuttavia, in tempi recenti, in alcune località si è dimostrata la presenza di livelli tossici di ciascuno di questi metalli anche come conseguenza d'incidenti molto gravi. Nel 1986,

ad esempio, un drammatico incendio allo stabilimento Schweizerhalle (nei pressi di Basilea) venne spento con acqua che poi defluì nel fiume Reno portando con sé rilevanti quantità di oltre una trentina di sostanze tossiche, tra cui un fungicida contenente mercurio, conservate in uno dei magazzini incendiati. Uno dei prodotti chimici in questione era colorato con una sostanza rossa che divenne immediatamente visibile nelle acque del fiume. Da qui l'appellativo di "*incidente del Reno rosso*". Dall'inquinamento delle acque del Reno, che determinarono la morte dei pesci presenti per una lunghezza di oltre 100 chilometri, furono interessate Svizzera, Germania e Olanda.

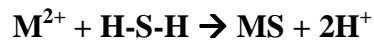
I metalli pesanti sono trasportati prevalentemente tramite l'aria in genere come sostanze adsorbite su o assorbite in materiale articolato sospeso. Per esempio, oltre la metà dei metalli pesanti presenti nei Grandi Laghi del Nordamerica è dovuta al deposito dall'aria. Indagini condotte recentemente in Svezia dimostrano che il deposito di piombo nei sedimenti di un lago europeo si possono far risalire al tempo degli antichi greci, allorché iniziò una massiva produzione dell'argento utilizzato per coniare le monete. Evidentemente il piombo presente in quantità cospicue nell'argento grezzo si liberava nell'aria durante il processo di lavorazione del metallo (Baird, 2006).

Sebbene i vapori di mercurio siano fortemente tossici, i quattro metalli pesanti Hg, Pb, Cd e As non risultano particolarmente tossici come elementi liberi condensati. Tuttavia tutti e quattro sono pericolosi nella loro forma cationica e quando sono legati a brevi catene di atomi di carbonio. Oltretutto è rilevante considerare che i metalli pesanti, al contrario delle sostanze tossiche di natura organica, non possono essere degradati, pertanto essi tendono ad accumularsi nel suolo ed entrare nelle catene alimentari o essere trasportati sia superficialmente che nelle falde acquifere attraverso la fase liquida del suolo.

Sotto il profilo biochimico, il meccanismo della loro attività tossica deriva dalla forte affinità dei cationi metallici per lo zolfo. Pertanto i gruppi "sulfidrilici" (-SH), normalmente presenti negli enzimi che controllano la

velocità delle reazioni metaboliche critiche nel corpo umano, si legano facilmente ai cationi dei metalli pesanti ingeriti o alle molecole che contengono tali metalli. Il complesso metallo-zolfo che ne risulta interessa tutto l'enzima cosicché esso non può svolgere la propria funzione con conseguente danno per la salute dell'uomo fino a causarne, talvolta, la morte.

La reazione dei cationi dei metalli pesanti M^{2+} , dove M sta per Hg, Pb o Cd, con le unità sulfidriliche degli enzimi R-S-H con produzione di sistemi stabili come R-S-M-S-R è analoga alla loro reazione con la semplice sostanza chimica inorganica H_2S , con cui essi formano il solido insolubile MS.



Il potere tossico esercitato dai tre metalli pesanti considerati dipende soprattutto dalla struttura chimica di ciascun elemento, vale a dire dal suo stato ossidativo. Per esempio esiste una notevole differenza fra la tossicità del piombo metallico, quella dello ione Pb^{2+} e quella del piombo sotto forma di composto covalente.

Le forme quasi del tutto insolubili transitano nel corpo umano senza causare danni significativi. Le forme dei metalli che risultano più devastanti sono quelle che provocano una malattia immediata e persino la morte (come quella causata da una dose sufficientemente abbondante di ossido di arsenico), tanto che la terapia non è in grado di esercitare i suoi effetti in tempo utile, e quelle capaci di attraversare la membrana che protegge il cervello, vale a dire la barriera emato-encefalica, o la membrana che protegge il feto (barriera placentare).

Nel caso di alcuni metalli pesanti, come il mercurio, la forma più tossica è quella che presenta gruppi alchilici legati al metallo, poiché molti di questi composti risultano solubili nei tessuti animali e capaci di attraversare le membrane biologiche.

1.2 Il mercurio

1.2.1 L'elemento libero

Il mercurio, l'unico metallo liquido a temperatura ordinaria, è presente raramente in natura come metallo nativo. Il simbolo del mercurio, Hg, deriva dalla parola latina *Hydrargirium* che a sua volta deriva dal greco *Υδραργυρος* (*Hydrargyros*), composto da *hydros* (acqua) e *argyrion* (argento), da cui argento liquido, infatti il metallo viene talvolta definito "argento vivo" (Fig. 1). L'elemento prese il nome del dio romano *Mercurio* per via della sua scorrevolezza e mobilità e dal termine *hydrargirium* derivano idrargirismo, intossicazione cronica da mercurio e idrargirite, minerale, quest'ultimo, più noto col nome di calomelano (Hg_2Cl_2).

Il mercurio era noto in passato in Cina, in India e nell'antico Egitto, infatti proprio qui, in tombe risalenti al 1500 a.C, sono state ritrovate tracce di questo metallo. In Cina, India e Tibet si riteneva che il mercurio prolungasse la vita, curasse le fratture e aiutasse a conservare la buona salute. Si narra che il primo imperatore della Cina, *Qin Shi Huang Di*, sia impazzito e quindi morto per l'ingestione di pillole di mercurio che nelle intenzioni avrebbero dovuto garantirgli vita eterna. Gli antichi greci e romani lo usavano negli unguenti e come cosmetico.



Figura 1: Mercurio allo stato elementare. (Hg).



Figura 2: Mercurio allo stato minerale sotto forma di cinabro (HgS).

Per gli alchimisti il mercurio (il cui simbolo era ☿) era spesso considerato come uno degli elementi primordiali che costituivano la materia. La parola indù per "alchimia" era infatti *rasavātam*, letteralmente "la via del mercurio"; si riteneva quindi che cambiando il tipo e il tenore di zolfo, il mercurio potesse essere trasformato in qualsiasi altro metallo e in special modo in oro.

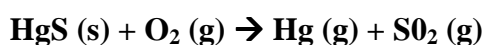
Ottenuto principalmente per riduzione del cinabro (Fig. 2), nell'ambiente si può trovare come risultato del suo rilascio dai depositi naturali conseguente a fenomeni di erosione e dilavamento delle rocce o in seguito a sua evaporazione e rilascio nell'atmosfera conseguente ad attività industriali. Esso può esistere allo stato elementare (Hg^0), come ione mercurioso dimerico (Hg_2^{2+}), come ione mercurico (Hg^{2+}) ed infine come specie organometalliche (metilmercurio, CH_3Hg e dimetilmercurio $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$) che sono sicuramente le più tossiche (Goldwater e Clarkson, 1972). Proprio per la sua mobilità nell'ambiente e per la sua tossicità, il mercurio è uno dei contaminanti ambientali più studiato.

Il mercurio allo stato elementare trova centinaia di applicazioni, molte delle quali (come per esempio i contatti elettrici mobili) traggono vantaggio dalla sua insolita proprietà di essere un liquido ottimo conduttore di elettricità. Viene impiegato nelle lampade fluorescenti e nelle lampade a vapori di mercurio per l'illuminazione stradale dato che gli atomi di mercurio stimolati emettono radiazioni con lunghezze d'onda corrispondenti alla regione della luce visibile. Considerando la contaminazione ambientale da mercurio conseguente alla rottura di queste lampade, esse sono state recentemente sostituite da lampade al vapore di sodio che presentano un minor rischio di tossicità e costituiscono una sorgente luminosa ben più efficace. Il mercurio è il più volatile fra tutti i metalli e il suo vapore presenta una elevata tossicità: un'adeguata ventilazione è raccomandata per qualsiasi ambiente chiuso in cui venga utilizzato il mercurio, dato che la pressione di vapore all'equilibrio del mercurio è centinaia di volte superiore all'esposizione massima raccomandata.

Il mercurio liquido non è molto tossico e, se ingerito, viene per la maggior parte eliminato. Nonostante ciò è rischioso rimanere per troppo tempo a contatto con le gocce del metallo a causa del pericolo che deriva dalla inalazione dei suoi vapori. Essi diffondono dai polmoni al sistema circolatorio, attraversano la barriera emato-encefalica e penetrano nel cervello; il risultato è un grave danno a carico del sistema nervoso centrale, che si manifesta con difficoltà della coordinazione, della vista e della sensibilità tattile. Grosse quantità di vapori di mercurio vengono liberate nell'ambiente in seguito alla combustione del carbone fossile e dell'olio combustibile (i quali spesso contengono tracce dell'elemento fino a parecchie centinaia di ppm) e all'incenerimento dei rifiuti solidi che contengono il mercurio derivante, ad esempio, dalle batterie. Nel nostro secolo, la quantità di mercurio atmosferico è notevolmente aumentata eguagliando allo stato attuale l'immissione dai vulcani che un tempo rappresentavano la fonte principale del mercurio veicolato dall'aria. Nell'aria il mercurio si trova per la maggior parte allo stato di vapore e solo una minima frazione di esso è legato al particolato aerosospeso. Il mercurio gassoso presente nell'aria viene trasportato per lunghe distanze prima di depositarsi sul terreno o nei corsi d'acqua.

Questo metallo forma facilmente amalgami [termine derivante dal latino medievale *amàlgama* e per mediazione deformata araba del greco *málagma* (= *impasto tenero*), dal verbo greco *maláссо* (= *io rammollisco*)], soluzioni o leghe, con quasi ogni altro metallo o combinazione di metalli. Per esempio l'«amalgama dentale» solido usato un tempo per riempire le cavità dei denti presenta all'inizio una consistenza simile a quella dello stucco. Veniva preparato combinando percentuali approssimativamente uguali di mercurio liquido con una miscela formata soprattutto di argento e stagno. Ogni qualvolta l'amalgama veniva coinvolto nella masticazione del cibo si aveva l'evaporazione di una piccola quantità di mercurio. Come è stato dimostrato, l'esposizione al mercurio proveniente da questa sorgente provocava, a lungo termine, problemi di salute in alcuni individui e per tale motivo sono attualmente utilizzate «amalgame» per uso dentistico prive di mercurio.

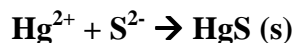
Fino al secolo scorso, gli oggetti venivano placcati con oro (dorati) o argento prima ricoprendoli con un amalgama composto da mercurio e dal metallo prezioso e poi scaldando l'oggetto per far evaporare il mercurio. Allo stesso modo, gli specchi venivano fabbricati applicando al vetro un sottile amalgama di mercurio. Nella lavorazione di alcuni detriti minerali è possibile estrarre minuscole quantità di oro o argento in forma elementare da quantità ben più grandi di materiale di scarto aggiungendo mercurio in forma elementare alla mistura; questo estrae l'oro o l'argento formando un amalgama, che viene poi scaldato per far gocciolare via il mercurio. Dal 1570 fino a circa il 1900, questo procedimento veniva impiegato nell'America centro-meridionale per estrarre l'argento dai minerali; per ogni grammo d'argento prodotto veniva disperso nell'ambiente circa un grammo di mercurio. Attualmente questa procedura viene attuata su vasta scala in Brasile per l'estrazione dell'oro e ciò comporta un notevole inquinamento da mercurio sia dell'aria sia, a causa delle incaute pratiche di lavorazione, dello stesso Rio delle Amazzoni. Notevoli sono i rischi per la salute a cui è sottoposto il personale costretto a lavorare con procedimenti che implicano l'evaporazione del mercurio e ciò perché, come detto in precedenza, questo elemento presenta un'estrema tossicità nella sua forma gassosa. Probabilmente, a causa della forte tossicità dei vapori, l'attesa di vita dal momento dell'ingaggio degli schiavi e dei detenuti utilizzati dai romani per estrarre il mercurio dal cinabro era di circa sei mesi. L'estrazione del mercurio si effettua scaldando questo metallo all'aria e facendo condensare i vapori di mercurio così liberati.



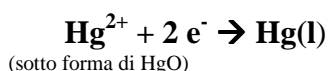
1.2.2 Mercurio ionico e formazione del metilmercurio

Al pari dello zinco e del cadmio, collocati nello stesso sottogruppo della *tavola periodica*, il comune ione del mercurio presenta numero di

ossidazione +2 [Hg^{2+} ione mercurio (II)]. Un esempio di composto di ione (II) di mercurio è il minerale HgS ($\text{Hg}^{2+}\text{S}^{2-}$); questo sale è molto insolubile nell'acqua e, invero, le acque di scarico delle industrie produttrici di cloro-soda vengono talvolta trattate con l'aggiunta di un sale solubile come Na_2S che contiene lo ione solfuro in modo da far precipitare il mercurio ionico come HgS .



Il sale nitrato di Hg^{2+} è idrosolubile e in passato veniva impiegato per trattare il pelame usato nella confezione dei cappelli di feltro. Si osservò che, come conseguenza, il personale impiegato nell'industria del feltro manifestava spesso disturbi nervosi: tremori muscolari, depressione, perdita della memoria, paralisi e infermità mentale. Il vapore di mercurio e, in minor grado, i sali di mercurio colpiscono il sistema nervoso centrale anche se i principali organi bersaglio dell' Hg^{2+} sono rappresentati dal rene e dal fegato, in cui esso può causare danni massivi. L'ossido di mercurio è presente in una pasta contenuta nelle «pile a ossido di mercurio» in miniatura come quelle usate nelle protesi acustiche; durante il funzionamento della pila e il passaggio della corrente si forma mercurio elementare:



Il vantaggio pratico che deriva dall'uso del mercurio è dato dal fatto che nella pila non è contenuta alcuna soluzione acquosa per cui il suo voltaggio rimane costante fino al consumo dei reagenti per poi, a quel punto, precipitare a zero. Se le pile scariche vengono incenerite come rifiuto, si può liberare nell'aria il mercurio sotto forma di vapore cosicché si può asserire che l'incenerimento dei rifiuti urbani è divenuta la principale fonte di inquinamento ambientale da mercurio. Il mercurio contenuto nelle comuni torce elettriche, dove è presente come costituente minore nell'elettrodo di zinco per evitarne la corrosione e prolungare quindi la durata del prodotto, di recente è stato drasticamente ridotto e presto verrà completamente

eliminato. Questo intervento preventivo da solo sarà in grado di eliminare metà del mercurio presente nei rifiuti. Nelle acque naturali, gran parte dell' Hg^{2+} è combinato con materiale particolato sospeso e quindi depositato nei sedimenti. Con anioni capaci di formare legami covalenti più di quanto non lo siano gli ioni nitrato, ossido e solfato, lo ione mercurio Hg^{2+} forma molecole covalenti piuttosto che uno ione solido; ne è un esempio l' HgCl_2 , composto molecolare volatile. Come gli ioni Cl^- formano un composto covalente con Hg^{2+} , così si comporta anche l'anione metile CH_3^- , che dà luogo al liquido volatile molecolare dimetilmercurio, $\text{Hg}(\text{CH}_3)_2$. Il processo di formazione del dimetilmercurio si svolge nei sedimenti fangosi dei fiumi e dei laghi, soprattutto in presenza di condizioni anaerobiche, allorché i batteri e i microrganismi anaerobi convertono Hg^{2+} in $\text{Hg}(\text{CH}_3)_2$. Nel processo di metilazione l'agente metilante è un comune costituente dei microrganismi, la *metilcobalammina*, un derivato della vitamina B_{12} in cui un anione CH_3^- è legato al cobalto. A causa della sua volatilità, il dimetilmercurio evapora (“*degassifica*”) dall'acqua in modo relativamente rapido a meno che non venga trasformato, dalle condizioni di acidità, nel monometile (Regnell *et al.*, 1991). Nella figura 3 vengono illustrate le vie di produzione e il destino del dimetilmercurio e di altre specie chimiche contenenti mercurio in un corpo idrico (Winfrey *et al.*, 1990).

I composti “miscelati” meno volatili CH_3HgCl e CH_3HgOH , spesso indicati complessivamente come CH_3HgX o alquanto erroneamente come CH_3Hg^+ (questo frammento molecolare può non esistere come specie ionica), denominato metilmercurio (o “monometilmercurio”), si formano con le stesse modalità del dimetilmercurio e persino più rapidamente. In soluzioni acquose acide o neutre, la produzione del metilmercurio eccede la formazione del dimetilmercurio. Il metilmercurio risulta un tossico più potente di quanto non siano i sali di Hg^{2+} per la sua solubilità nei tessuti adiposi degli animali dove subisce una bioaccumulazione e una biomagnificazione (Hammerschmidt e Fitzgerald, 2006). Una volta ingerito, il composto CH_3HgX si converte in altri composti in cui X è un aminoacido contenente zolfo; in alcune di queste forme esso risulta

solubile nel tessuto biologico e può così attraversare sia la barriera emato-encefalica che quella placentare dell'uomo, presentando un duplice rischio.

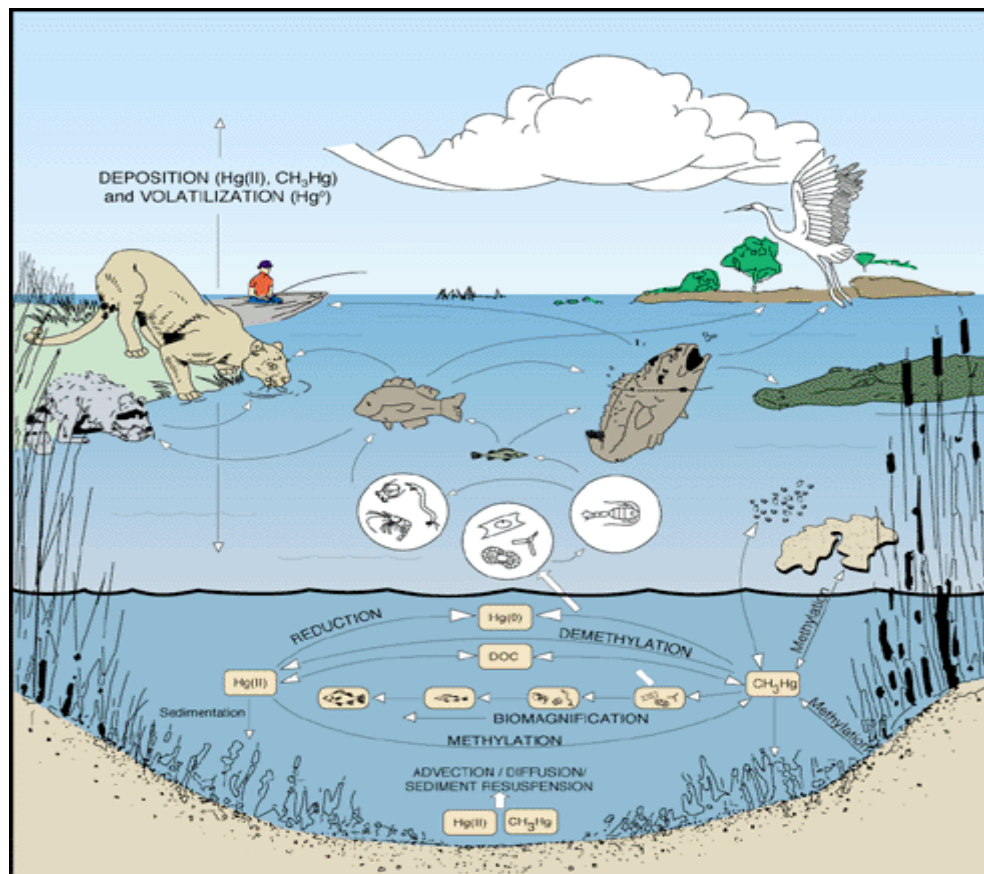


Figura 3: Rappresentazione grafica del ciclo del mercurio nei laghi d'acqua dolce.

Il metilmercurio rappresenta infatti la forma di mercurio più rischiosa, seguita solo dal vapore dell'elemento stesso. Lo ione mercurico, Hg^{2+} , non risulta molto tossico dato che, nello stomaco, si combina con lo ione cloro producendo Hg_2Cl_2 . Il mercurio è presente nell'uomo in gran parte sotto forma di metilmercurio, assunto quasi interamente attraverso un'alimentazione a base di pesce nella quale almeno l'80% del mercurio si trova sotto forma di metilmercurio. Il pesce introduce questa sostanza solubile nell'acqua mediante le branchie e attraverso l'alimentazione. Al contrario degli organoclorurati, che tendono ad accumularsi nei tessuti adiposi del pesce, il metilmercurio è in grado di legarsi al gruppo sulfidrilico delle proteine così da essere distribuito in tutto il sistema muscolare del

pesce: per tale motivo è praticamente impossibile “asportare” le parti contenenti il mercurio prima che il pesce venga mangiato. Il rapporto fra il metilmercurio presente nel tessuto muscolare del pesce e quello disciolto nell'acqua dove il pesce vive è di circa 1.000.000:1 e può superare il valore di 10.000.000:1. Le concentrazioni più elevate si riscontrano in genere nelle grosse specie predatrici marine, a vita lunga, come gli squali e i pesci spada e ancora nelle specie d'acqua dolce come il pesce persico e il luccio. Le specie non carnivore, come il *Coregone salmonide*, non accumulano grosse quantità di mercurio dato che la biomagnificazione attraverso la catena alimentare risulta, in questi pesci, di gran lunga inferiore rispetto a quanto avviene nei pesci carnivori. Nei laghi, il contenuto di mercurio dei pesci risulta in genere superiore nelle acque acide, probabilmente perché la metilazione del mercurio è più rapida in presenza di bassi valori di pH. Pertanto l'acidificazione delle acque naturali aumenta indirettamente l'esposizione al metilmercurio da parte di coloro che si nutrono di pesce (Mason *et al.* 2006; Clarkson *et al.* 2006; Southworth *et al.*, 2004).

1.2.3 Tossicità del metilmercurio

La tossicità del mercurio era nota sin dai tempi antichi: già i romani erano a conoscenza dei danni al sistema nervoso provocati dall'esposizione al metallo (Fig. 4). Ancora più pericolosa è però l'esposizione al metilmercurio. Nell'uomo, l'emivita dei composti di metilmercurio, circa 70 giorni, è di gran lunga superiore di quella dei sali di Hg^{2+} di conseguenza, il metilmercurio può accumularsi nell'organismo a una concentrazione più elevata dello stato stazionario, anche se una persona consuma giornalmente dosi che, prese singolarmente, non dovrebbero risultare dannose.

La maggior parte dei problemi ambientali legati al mercurio, ormai di dominio pubblico, derivano dal fatto che nella forma metilata tale sostanza può determinare un avvelenamento per accumulazione.

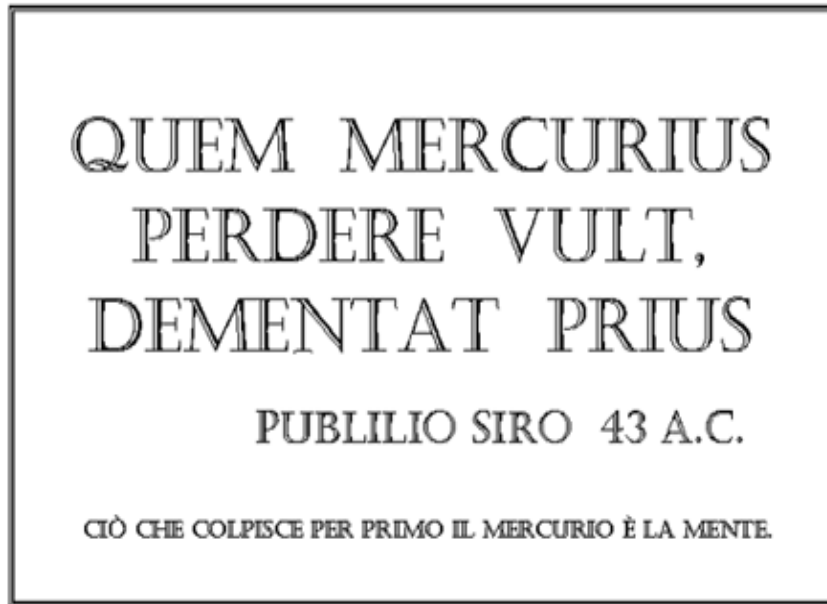


Figura 4: Proverbio latino del 43 a.C. Anche all'epoca era nota la pericolosità del mercurio.

Presso il villaggio di pescatori di Minamata, Giappone, un'industria chimica che impiegava Hg^{2+} come catalizzatore nel processo di produzione del cloruro di polivinile scaricava residui ricchi di mercurio nella baia omonima (Fig. 5).

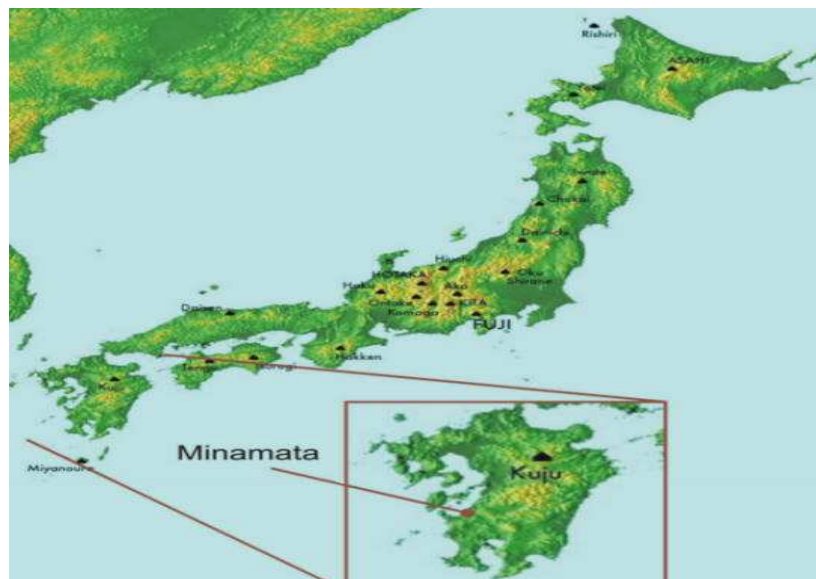


Figura 5: Rappresentazione grafica della baia di Minamata (Giappone).

Il metilmercurio che si veniva così a formare si bioaccumulava nei pesci che costituivano il principale nutrimento della popolazione locale. A titolo di paragone, mentre nel Nordamerica l'attuale limite raccomandato per il mercurio nel pesce destinato ad uso alimentare per l'uomo è di 0,5 ppm la concentrazione del mercurio nei pesci della baia risultò superiore a 100 ppm.

Negli anni '50 migliaia di abitanti di Minamata furono colpiti da intossicazione da mercurio proveniente da questa fonte e centinaia di essi morirono. Infatti, dal momento che l'insorgenza della sintomatologia nell'uomo è piuttosto tardiva, i primi segni della “*malattia di Minamata*” furono osservati nei gatti che si cibavano del pesce di scarto: essi saltavano, si contorcevano, correvano in circolo e infine si lanciavano nell'acqua annegando. Nell'uomo la sintomatologia deriva dalle disfunzioni del sistema nervoso centrale, dato che il cervello rappresenta l'organo bersaglio del metilmercurio; i sintomi comprendono parestesie degli arti superiori e inferiori, offuscamento e persino perdita della acuità visiva, sordità e incoordinazione muscolare, letargia e irritabilità (Honda *et al.*, 2006). Dato che il cloruro di metilmercurio può essere trasmesso al feto, i bambini nati da madri che presentavano anche lievi intossicazioni da mercurio mostravano gravi danni cerebrali, alcuni addirittura con esito letale. I neonati presentavano sintomi simili a quelli della paralisi cerebrale infantile: ritardo psichico, disturbi motori e persino paralisi (Kim *et al.*, 2006). Come nel caso dei livelli elevati di PCB riscontrati nella popolazione residente nei pressi del Lago Michigan, i feti risultavano di gran lunga più colpiti dal metilmercurio di quanto non fossero le madri stesse. Le intossicazioni che si sono verificate a Minamata devono essere senza alcun dubbio annoverate come uno dei principali disastri ambientali dell'era moderna. Tale evento si tradusse infatti, nel tempo, con la morte di oltre 900 persone ed in danni, di varia entità, a carico di oltre 2 milioni di individui (McCurry J., 2006). Nella città di Dryden nell'Ontario settentrionale (Canada), la liberazione del mercurio da un'industria produttrice di cloro-soda nel fiume English-Wabigoon, negli anni '60 e all'inizio degli anni '70, portò a una

bioaccumulazione di questo metallo nei pesci di gran lunga superiore al limite consentito di 0,5 ppm. Come risultato di tale bioaccumulazione, il tasso di metilmercurio nell'acqua, nelle alghe e nei pesci risultò di 1:3000:20.000. Alcuni membri della comunità indiana che si nutrivano regolarmente dei pesci provenienti da queste acque rivelarono livelli di mercurio talmente elevati da presentare segni clinici di intossicazione da tale metallo. Come risultato dell'inquinamento da mercurio, si provvide a ridurre la pesca per uso commerciale nel fiume English-Wabigoon, come anche in alcuni dei Grandi Laghi.

1.2.4 Altre fonti di mercurio e metilmercurio

Composti organici di mercurio sono stati utilizzati come fungicidi in agricoltura e nelle industrie e tale impiego è stato nel tempo fonte d'inquinamento ambientale. A contatto con il suolo, una parte di questi composti subisce una disgregazione e il mercurio (in minima parte) viene intrappolato come composto insolubile formando dei legami con i gruppi sulfurei dell'argilla e del materiale organico. A tal proposito, in passato, si sono verificate centinaia di morti in Iraq e negli Stati Uniti per il consumo di pane fatto con grano le cui sementi erano state trattate con metilmercurio come fungicida. In Svezia e in Canada l'uso del metilmercurio nel trattamento delle sementi comportò una significativa riduzione numerica degli uccelli predatori che si cibavano degli uccelli più piccoli e dei mammiferi che si alimentavano con le sementi disseminate sul terreno. L'impiego in agricoltura dei prodotti a base di metilmercurio è stato attualmente ridotto sia nel Nordamerica e nell'Europa occidentale.

Il mercurio viene lisciviato dalle rocce nei sistemi idrici dai processi naturali, alcuni dei quali vengono accelerati dall'intervento dell'uomo. Recentemente si è constatato che inondazioni di zone coltivate favoriscono la liberazione del mercurio nelle acque. Per esempio, dopo l'inondazione di

vaste zone del Quebec settentrionale e del Manitoba causata dalla costruzione di dighe per centrali idroelettriche, il suolo così sommerso (e in minor grado la vegetazione) liberava una notevole quantità di metilmercurio solubile, derivato dal mercurio «naturale» presente in questi terreni. Altro metilmercurio si formava dal contatto dell' Hg^{2+} legato al suolo con i batteri anaerobi prodotti dalla decomposizione del materiale organico sommerso. In tal modo, il mercurio inorganico precedentemente insolubile veniva trasformato in metilmercurio facilmente solubile in acqua. In seguito questo composto entrava nella catena alimentare attraverso l'assimilazione da parte dei pesci cosicché la popolazione del luogo, nutrendosi prevalentemente con quest'ultimi, iniziò a presentare livelli ematici di mercurio notevolmente elevati. Infatti, la concentrazione del metilmercurio, 5 ppm o più, individuata nei pesci provenienti da queste zone si avvicinava a quella precedentemente riscontrata solo nelle regioni con inquinamento industriale da mercurio.

Attualmente l'assimilazione giornaliera di metilmercurio da parte del 99,9 % degli abitanti dell'Unione Europea e del Nordamerica è al di sotto del «limite di sicurezza» stabilito dalla Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). Comunque, tenendo soprattutto in conto il rischio prenatale e se si applica un fattore di sicurezza di dieci, si può affermare che una considerevole parte della popolazione di queste zone potrebbe superare questo limite (Shea *et al.*, 2004).

I sali dello ione fenilmercurio, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$, sono stati impiegati per la conservazione della vernice in barattolo e per evitare la muffa dopo l'applicazione di pitture a base di lattice, soprattutto in zone umide. Gli stessi sali non presentano per l'uomo la stessa tossicità dei composti di metilmercurio, dato che essi si dissociano nei composti del meno tossico Hg^{2+} . Tuttavia, sin dal 1990, negli Stati Uniti e in Europa, l'uso dei composti del mercurio è stato proibito per le pitture a base di lattice per interni perché è inevitabile una certa ingestione di tale elemento. I composti del fenilmercurio sono stati impiegati in passato come fungicidi nell'industria della carta allo scopo di prevenire la crescita fungina sulla pasta di legno

bagnata. Dato che questa procedura è stata attualmente ridotta e poiché i rifiuti contenenti mercurio sono ora sottoposti ad uno specifico trattamento, la liberazione del mercurio da tali fonti risulta notevolmente diminuita. Negli Stati Uniti è già stata eliminata la carta prodotta usando fungicidi contenenti mercurio impiegata per la conservazione degli alimenti. Tuttavia, a causa delle loro proprietà antisettiche e conservanti, alcuni composti del mercurio vengono ancora impiegati nell'industria farmaceutica e cosmetica. Il mercurio è inoltre alla base di una serie di composti contenenti Hg^{2+} . Dato che questo ione forma il bicloruro insolubile in ambienti ricchi di cloro come l'acido cloridrico presente nello stomaco dell'uomo, esso non rappresenta una forma particolarmente pericolosa dell'elemento. Tuttavia in Inghilterra l'uso dell' Hg_2Cl_2 come polvere per la dentizione per i bambini causò, negli anni '40, numerose morti perché, come è stato recentemente accertato, alcuni soggetti presentavano una spiccata ipersensibilità al composto.

Lo ione mercurio (I), Hg_2^{2+} , si ottiene facilmente per riduzione in soluzione acquosa dei sali di mercurio (II) e si riossida con facilità a Hg^{2+} . Uno studio termodinamico dell'equilibrio $\text{Hg}^{\text{I}}-\text{Hg}^{\text{II}}$ è essenziale per la comprensione della chimica dello stato di ossidazione I del mercurio. I valori termodinamici fondamentali sono i potenziali:



Per l'equilibrio di dismutazione



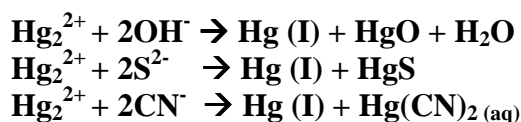
si avrà quindi

$$K = [\text{Hg}^{2+}] / [\text{Hg}_2^{2+}] = 6,0 \times 10^{-3}$$

I potenziali standard implicano evidentemente che soltanto agenti ossidanti aventi potenziali compresi nell'intervallo da -0,79 a -0,85 V possono ossidare il mercurio a Hg^{I} , ma non a Hg^{II} . Dato che nessun agente ossidante

soddisfa questo requisito, si riscontra che quando il mercurio viene trattato con un eccesso di agente ossidante esso viene interamente convertito a Hg^{II}. Però, se il mercurio è presente in un eccesso di almeno il 50 %, si ottiene soltanto Hg^I, dato che, in accordo all'equazione relativa all'equilibrio di dismutazione, Hg (I) riduce facilmente Hg²⁺ a Hg₂²⁺.

La costante relativa al suddetto equilibrio dimostra che, Hg₂²⁺ è sì stabile nei confronti della dismutazione, ma con un margine ristretto. Pertanto, qualsiasi reagente che riduce l'attività (per precipitazione o complessazione) di Hg²⁺ in misura significativamente maggiore di quanto venga diminuita l'attività di Hg₂²⁺, provocherà la dismutazione di Hg₂²⁺. Di tali reagenti ne esistono molti, per cui il numero di composti stabili di Hg^I è piuttosto limitato. In questo modo, quando ad una soluzione di Hg₂²⁺ si aggiunge OH⁻, si forma un precipitato nero costituito da Hg e HgO. Evidentemente l'idrossido di mercurio (I), se potesse venir isolato, dovrebbe risultare una base più forte di HgO. Analogamente, aggiungendo ioni solfuro ad una soluzione di Hg₂²⁺ si ottiene una miscela di mercurio e di HgS, estremamente insolubile. Il cianuro di mercurio (I) non esiste, poiché Hg(CN)₂, quantunque sia solubile, è molto poco dissociato. Le reazioni che intervengono nei casi citati sono:

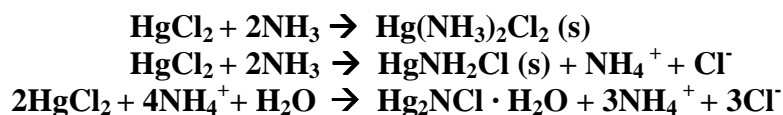


Come indicato sopra, non è possibile ottenere né l'idrossido né l'ossido né il solfuro per aggiunta a soluzioni acquose di Hg₂²⁺ dell'appropriato anione, e tali composti non possono venir preparati nemmeno in altri modi.

Fra i pochi composti del mercurio (I), i meglio caratterizzati sono gli alogenuri. Il fluoruro è instabile nei confronti dell'acqua e si idrolizza dando acido fluoridrico ed idrossido di mercurio (I) non isolabile a causa della dismutazione accennata poc'anzi. Gli altri alogenuri sono estremamente insolubili il che preclude la possibilità d'idrolisi o di dismutazione per dare alogeno-complessi di mercurio (II). Fra gli alogenuri quello più stabile è

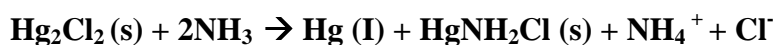
senz'altro il calomelano, Hg_2Cl_2 . Lo stesso ione mercurio (I) forma inoltre pochi complessi. Ciò può essere in parte dovuto alla piccola tendenza di Hg_2^{2+} a formare legami di coordinazione ma probabilmente dovuto soprattutto al fatto che la maggior parte dei leganti, per esempio CN^- , I^- , ammine e solfuri di alchile, formano con lo ione mercurio (II) complessi ancor più stabili cosicché Hg_2^{2+} tende a dismutare.

Dai tempi dell'alchimia è noto che quando questo composto viene trattato con ammoniaca acquosa si forma un residuo nero e questa reazione è ancor oggi usata per l'identificazione qualitativa di Hg_2Cl_2 (*saggio con ammoniaca*). La natura di tale reazione è stata chiarita in tempi relativamente recenti. In questi residui sono contenuti composti azotati di Hg^{II} , oltre a mercurio metallico, ed i composti di Hg^{II} si possono ottenere direttamente da sali di Hg^{II} . Sono noti tre prodotti della reazione di HgCl_2 con ammoniaca, le cui quantità relative dipendono dalle condizioni sperimentali. I prodotti che si possono ottenere sono $\text{Hg}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$, HgNH_2Cl e $\text{Hg}_2\text{NCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ e sono in accordo con le seguenti equazioni:



Gli equilibri qui riportati sembrano essere labili, cosicché è possibile controllare il prodotto che si forma variando le concentrazioni di NH_3 e di NH_4^+ . In soluzione concentrata di NH_4Cl , precipita il diamminocomplesso bianco $\text{Hg}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$, mentre in ammoniaca diluita e senza eccesso di NH_4^+ si forma l'ammide HgNH_2Cl . Il composto $\text{Hg}_2\text{NCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$, mediante la reazione sopra riportata probabilmente non si forma allo stato puro, tuttavia lo si può ottenere trattando con acido cloridrico il composto $\text{Hg}_2\text{NOH} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (*base di Millon*). La stessa base di Millon si ottiene trattando ossido di mercurio giallo con ammoniaca acquosa. Ritornando ai residui neri formati dal mercurio (I), in questi sono presenti oltre al metallo Hg finemente suddiviso, uno o entrambi i composti HgNH_2Cl e $\text{Hg}_2\text{NCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$. La loro insolubilità provoca la dismutazione di Hg_2^{2+} . La reazione globale che si

verifica quindi, quando il calomelano viene trattato con ammoniaca, è la seguente:



Non vi è prova alcuna circa l'esistenza di un qualsiasi composto intermedio ammonobasico o amminico di mercurio (I) (Cotton e Wilkinson, 1984).

1.3 Il biorisanamento ambientale

La continua evoluzione della legislazione in tema ambientale di molti Paesi ha determinato una forte richiesta di metodi di risanamento di aree contaminate da sostanze inquinanti, compresi i metalli pesanti, caratterizzati da costi contenuti e da un basso impatto ambientale. In base a questa premessa, risulta evidente come la ricerca costante di nuovi metodi di risanamento, sempre più efficienti ed efficaci, sia di primaria importanza. Attualmente, i cosiddetti “metodi ufficiali” di risanamento, sono di natura prettamente chimico-fisica e sono caratterizzati da elevati costi d'installazione e di mantenimento (Bargagli, 1998).

Il termine *bioremediation* (biorisanamento) fa riferimento all'impiego di processi biologici per degradare o detossificare i contaminanti presenti nell'ambiente. Il biorisanamento può avvenire mediante i processi descritti di seguito.

Utilizzazione di sostanze biologiche, come ad esempio le *metallotioneine* e i *peptidi* γ -glutamici (fitochelatine). Le prime sono piccoli peptidi ricchi di cisteina che possono legare metalli essenziali come Cu e Zn ma anche metalli non essenziali come Cd. Esse mediano la resistenza al Cu e legano anche, come detto, altri metalli. I secondi sono piccoli peptidi coinvolti nella detossificazione da metalli pesanti di alghe, piante e alcuni funghi e lieviti. Entrambe queste classi di peptidi potrebbero trovare applicazione in futuro per la rimozione dei metalli. Altre molecole con capacità significative di legare i metalli, come ad esempio le melanine fungine, potrebbero essere

sovraprodotte come risultato di un'esposizione a concentrazioni sottoletali di metallo (quest'aspetto verrà trattato più nel dettaglio nel paragrafo 1.4).

Utilizzazione di microrganismi in vivo o in bioreattori. Microrganismi selezionati possono degradare sostanze inquinanti e materiali di scarto nelle acque. Nel 1990, dopo il disastro ecologico provocato in Alaska da una petroliera, il petrolio fuoriuscito dalla stiva che inquinava le spiagge e uccideva uccelli e pesci venne degradato da batteri capaci non soltanto di demolire gli idrocarburi, ma anche di accelerare il processo di ricostituzione del suolo. In questo caso il biorisanamento può realizzarsi sia attraverso l'impiego di processi di fitorisanamento e fitodepurazione (*phytoremediation*) mediante cioè l'utilizzo di piante o di microrganismi, in vivo o in bioreattori, quali batteri, attinomiceti, cianobatteri, e funghi.

Il fitorisanamento o fitodepurazione è un processo naturale che utilizza le piante come filtri biologici in grado di ridurre le sostanze inquinanti, organiche ed inorganiche, presenti nei sedimenti, nei suoli e nelle acque contaminate. In generale, le sostanze inquinanti vengono naturalmente rimosse attraverso processi chimici e biologici tra cui: filtrazione, adsorbimento, assimilazione da parte degli organismi vegetali, degradazione batterica e antibiotica. I trattamenti di fitodepurazione sono però, in ogni caso, trattamenti biologici secondari che necessitano di un trattamento primario di sedimentazione (in una fossa settica) e/o terziari (di affinamento).

In base ai diversi processi fisici, chimici e biologici coinvolti si distinguono generalmente sei tipologie di fitorisanamento: fitodegradazione, fitostabilizzazione, fitovolatilizzazione, fitoestrazione, rizodegradazione e rizofiltrazione. Con la fitodegradazione si ha l'assorbimento e la demolizione del contaminante (organico) attraverso il metabolismo della pianta; con la fitostabilizzazione si ha l'immobilizzazione del contaminante (inorganico) nell'apparato radicale di piante non da raccolto (es. pioppo) o nella rizosfera attraverso essudati radicali; con la fitovolatilizzazione si ha l'assorbimento del contaminante (organico ed inorganico) ed il rilascio in atmosfera di una sua forma modificata meno tossica e comunque più "diluata" rispetto a quella originariamente presente nel terreno (utilizzata ad

es. per mercurio e selenio); con la rizodegradazione si ha la demolizione del contaminante (organico) attraverso l'opera di microrganismi associati alla rizosfera; con la rizofiltrazione si ha la decontaminazione dei corpi idrici effettuata da particolari piante acquatiche (macrofite) di contaminanti organici e inorganici.

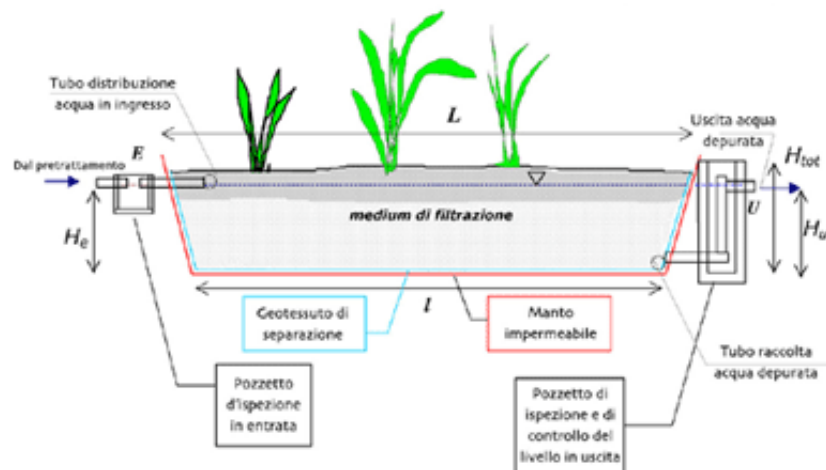


Figura 6: Sezione schematica di un bacino di fitodepurazione (esempio).

La più complessa e completa delle sei è senza dubbio la fitoestrazione. Qui, in una prima fase si ha l'assorbimento radicale, la traslocazione dei contaminanti (inorganici, in particolar modo metalli) all'interno delle parti aeree della pianta e il loro accumulo nelle stesse. In un secondo tempo, si ha la rimozione del contaminante tramite raccolta della pianta ed infine, in ultima istanza, si ha l'incenerimento della pianta e lo smaltimento in discarica. Inoltre, in alcuni casi, attraverso metodiche chimiche, è possibile il recupero selettivo dei metalli contaminanti.

Relativamente all'inquinamento da metalli pesanti, alcuni dei più importanti processi che rimuovono, immobilizzano o detossificano i metalli tossici dall'ambiente naturale sono:

- bioadsorbimento;
- riduzione di metalli tossici;
- precipitazione di complessi metallici insolubili sulla superficie cellulare

- sotto forma di solfuri;
- plasmidi che mediano la resistenza ai metalli tossici.

I processi che contribuiscono alla captazione e alla detossificazione di metalli tossici da parte dei microrganismi possono avere localizzazione diversa. Le reazioni extracellulari comprendono la precipitazione di prodotti secreti come ossalati e solfuri, la complessazione e la chelazione. Ci sono poi alcune sostanze associate alla cellula come i polisaccaridi della capsula con cui possono avvenire reazioni come scambio ionico e intrappolamento del particolato. A livello di parete cellulare si possono verificare: adsorbimento, scambio ionico, formazione di legami covalenti, intrappolamento di particelle, reazioni redox e precipitazione. A livello di membrana cellulare e dello spazio periplasmatico si possono verificare: adsorbimento, scambio ionico, reazioni redox, trasformazione, precipitazione, diffusione e trasporto. A livello intracellulare si può avere l'interazione di metalli con alcune sostanze come le già citate metallotioneine e γ -glutamyl peptidi.

Esistono diversi processi biotecnologici per il trattamento dei materiali inquinati da metalli tossici. Tra questi va menzionato il bioadsorbimento. Il termine bioadsorbimento viene in genere usato per comprendere due noti meccanismi chimico-fisici che regolano l'eliminazione di metalli pesanti da parte di biomasse vive o morte: l'adsorbimento e lo scambio ionico. Il bioadsorbimento consiste nella cattura esocellulare e pericellulare di metalli attraverso adsorbimento dei cationi paragonabile a quello delle resine carbossiliche scambiatrici (attrazione elettrostatica di cationi metallici da parte della superficie carica negativamente della cellula microbica) e attraverso la deposizione-precipitazione sulla superficie microbica che può avvenire per complessazione, chelazione superficiale o per inglobamento da parte delle strutture extracellulari (Wase *et al.*, 1997).

Il bioadsorbimento si può svolgere in due modi:

- 1) utilizzando biomasse libere;
- 2) utilizzando biomasse immobilizzate.

L'utilizzo di biomasse microbiche sospese liberamente presenta degli svantaggi e la presenza di particelle di piccola taglia, la bassa potenza meccanica e la grande difficoltà nel separare biomasse ed effluenti ne costituiscono i principali. Alla luce di ciò e al fine di ovviare a questi problemi, si preferisce generalmente l'utilizzo di particelle di biomassa immobilizzate in reattori a letto impaccato o a letto fluido. Il reattore a letto fluido differisce da quello a letto impaccato in base alla mobilità delle particelle all'interno del reattore stesso: esse sono libere di muoversi nel reattore a letto fluido mentre sono immobilizzate in quello a letto impaccato. Il primo può contenere 80-90 kg di biomassa ed è usato per flussi più ampi ($> 35 \text{ L min}^{-1}$). Un esempio di questo tipo è il cosiddetto "reattore a disco rotante" che tratta effluenti provenienti da miniere. La biomassa in questo caso è organizzata a formare un biofilm che viene fatto ruotare tra una fase gassosa e una fase liquida contenente nutrienti e la soluzione di metalli. Si tratta di un processo su larga scala ($2,5 \cdot 10^4 \text{ m}^3 \cdot \text{day}^{-1}$) che sfrutta processi di bioadsorbimento, precipitazione, trasformazione aerobiche e degradazioni di inquinanti organici. I microrganismi possono ridurre enzimaticamente una varietà di metalli in processi metabolici che non sono correlati alla assimilazione dei metalli. Alcuni microrganismi possono conservare energia per sostenere la crescita accoppiando l'ossidazione di semplici acidi organici e alcoli, H_2 o composti aromatici alla riduzione del Fe (III) o Mn (IV). Esistono anche microrganismi che usano U (VI) come accettore terminale di elettroni e giocano un ruolo importante nella geochimica dell'uranio. Questo meccanismo potrebbe essere uno strumento utile nel rimuovere l'uranio dagli ambienti contaminati. La riduzione enzimatica di Cr (VI) al meno mobile e meno tossico Cr (III) e la riduzione del Hg (II) solubile al volatile Hg (0) può avere effetto sul destino di questi composti nell'ambiente e potrebbe essere usato come una strategia di "remediation".

Microrganismi che usano metalli come accettori terminali di elettroni o riducono metalli come meccanismo di detossificazione hanno un'importante influenza sulla geochimica dei sedimenti acquatici e dei terreni sommersi.

Un esempio di reattore “misto”, con caratteristiche appartenenti ad entrambe le tipologie di reattori, è il sistema utilizzato in una miniera di piombo in Missouri (USA), ovvero il sistema *Meander*. Esso è un sistema complesso che sfrutta le sinergie dei meccanismi di bioadsorbimento, *entrapment* e precipitazione cosicché i metalli sono rimossi con una efficienza del 99%. Nel sistema *Meander* gli effluenti contenenti Pb, Cu, Zn, Mn, Ni, Fe e Cd passano attraverso canali contenenti cianobatteri, alghe e piante superiori. Alghe e spore cianobatteriche addizionate ai fanghi di acque di scarico permettono di ridurre livelli di Cu, Cd, Zn, Hg e Fe nelle acque d’eluizione minerarie. I metalli vengono in questo modo immobilizzati nei sedimenti.

Oltre ai sistemi sopracitati, il reattore più efficiente è senza dubbio quello a letto impaccato. Nella versione più diffusa, esso sfrutta il principio del bioadsorbimento mediante l’utilizzo di biomasse immobilizzate in particelle inerti. Esso può contenere 20 Kg di granuli ed è usato per piccoli volumi (15 L/min). Per le applicazioni commerciali si utilizza generalmente un preparato commerciale denominato *Alga SORBTM* (Bio-Recovery System-Inc., Las Cruces, NM, USA) che contiene biomasse algali immobilizzate su una matrice silicea ed è usato in sistemi colonna. Le colonne sono impaccate con particelle di alghe immobilizzate e il recupero selettivo dei metalli è ottenuto mediante trattamento con reagenti appropriati. Dopo questo trattamento la biomassa rigenerata conserva approssimativamente il 90% dell’originale efficienza di cattura dei metalli anche dopo più di 18 mesi di uso regolare. Per le applicazioni commerciali si usa anche *Biofix*. Esso è un adsorbente costituito da biomasse derivanti da una gran varietà di sorgenti, che comprendono cianobatteri (*spirulina*), lieviti, alghe e piante (*Lemna sp.*). La biomassa risultante è quindi “fusa” con xanthan e guar-gums per dare un prodotto consistente e immobilizzato. La serie di affinità per BioFix è: Al > Cd > Zn > Mn con Cd e Mn molto più basse, originando così una buona differenziazione.

Per quanto riguarda l’utilizzo dei funghi nel biorisanamento ambientale da metalli pesanti è ben documentata, già da tempo, la loro capacità di tollerare e accumulare elevate concentrazioni di questi metalli (Gadd, 1993). Inoltre

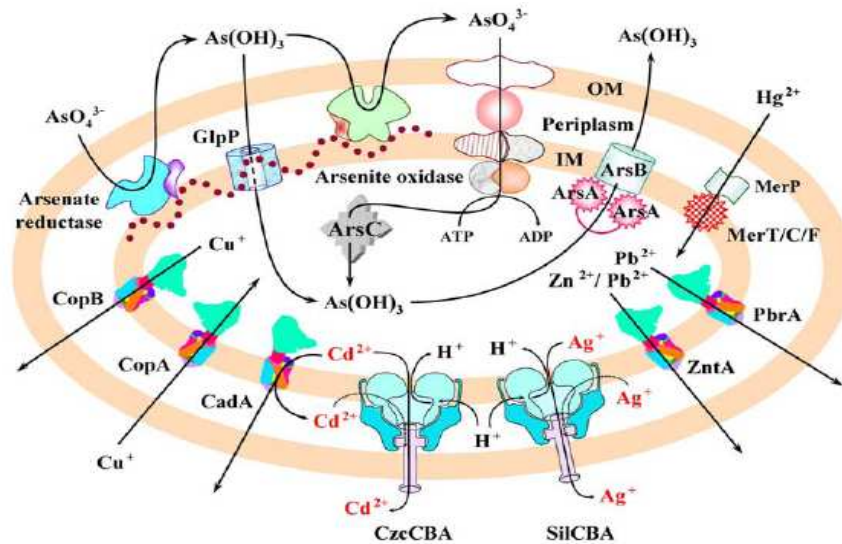
molti di essi producono acidi organici in grado di complessare ioni metallici, possono tollerare un intervallo di pH ampio (Burgstaller e Shinnen, 1993; Pinghe et al., 1998; Kapoor et al., 1999; Clark e Zeto, 1996), e sono in grado di rimuovere ioni di metalli pesanti da soluzioni acquose (Gadd, 1990; Kapoor e Viraraghavan, 1997). Questi organismi possono, infatti, essere naturalmente presenti nei siti inquinati dove svolgono una normale attività metabolica probabilmente grazie all'attivazione di meccanismi biochimici, non ancora del tutto chiari, che consentono loro di tollerare condizioni di stress. La capacità dei microrganismi fungini di tollerare elevate concentrazioni di questi elementi ha stimolato la ricerca scientifica verso la comprensione dei meccanismi che inducono questa tolleranza e verso la possibilità di un loro impiego in strategie di biorisanamento ambientale.

1.4 Meccanismi di tolleranza ai metalli pesanti nei funghi

Gli studi sulla capacità dei microrganismi fungini d'interagire con gli ioni metallici hanno permesso d'individuare alcuni meccanismi che sembrano essere responsabili della tolleranza ai metalli. Tali meccanismi comprendono sia interazioni di tipo extracellulare, dovute all'adsorbimento degli ioni sulla parete cellulare (immobilizzazione ed esclusione), sia interazioni a livello intracellulare (chelazione e accumulo). Ad esempio nei lieviti (Kamizono *et al.*, 1989) il trasporto dello zinco avviene a carico di proteine, localizzate a livello della membrana plasmatica, denominate ZnT1. L'assenza di tali proteine in linee cellulari mutate causa un'aumentata sensibilità alla tossicità dello zinco (Palmiter *et al.*, 1995). Responsabili del trasporto del Cu attraverso la membrana plasmatica in *S. cerevisiae* e *S. pombe* sono, invece, delle ATPasi transmembrana ad elevata affinità per il rame (CTR). Il cadmio penetra nella cellula utilizzando i canali del calcio

voltage dipendenti o associati a recettori transmembrana. Per altri metalli, quali il mercurio, i meccanismi di ingresso nella cellula non sono ancora del tutto chiariti: la cinetica d'ingresso del mercurio sembra però escludere il coinvolgimento di specifici trasportatori.

L'assunzione di mercurio sembra poter realizzarsi anche per endocitosi di particelle alimentari. Le vescicole si fondono con i lisosomi primari per formare eterofago-lisosomi nei quali la componente organica viene degradata. All'interno della cellula, i metalli possono reagire con i componenti citosolici, essere compartmentalizzati in organuli come lisosomi e mitocondri (Ahearn *et al.*, 2004) o essere trasportati nel nucleo.



Toxic ions	Gene mnemonic	Protein function
Hg ²⁺ and organomercurials	<i>mer</i>	Mercuric reductase and transport
AsO ₄ ³⁻ and As(OH) ₃	<i>ars</i>	Arsenate reductase and transport
As(OH) ₃	<i>aso</i>	Arsenite oxidase and transport
AsO ₄ ³⁻	<i>arr</i>	Respiratory arsenate reductase
Cd ²⁺	<i>cad</i>	P-type efflux ATPase
Cd ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺	<i>czc</i>	CBA efflux permease
Co ²⁺ , Ni ²⁺	<i>cnr</i>	CBA efflux permease
Ni ²⁺ , Co ²⁺ , Cd ²⁺	<i>ncc</i>	CBA efflux permease
Ni ²⁺	<i>nre</i>	CBA efflux permease
Cu ²⁺ , Cu ⁺	<i>cop</i> and <i>pco</i>	Copper resistance and transport
CrO ₄ ²⁻	<i>chr</i>	Chromate efflux permease
Ag ⁺	<i>sil</i>	Silver resistance and binding
Pb ²⁺	<i>pbr</i>	Lead resistance and efflux
TeO ₃ ²⁻	<i>tel</i> , <i>teh</i> , or <i>kil</i>	Tellurite resistance

Figura 7: Esempi di meccanismi e sistemi di resistenza a metalli pesanti.

Nel citoplasma i metalli possono legarsi a gruppi funzionali imidazolici, sulfidrilici, carbossilici o amminici di proteine enzimatiche stimolandone o deprimendone l'attività, in relazione alla loro concentrazione (Gadd G.,

2010). Nel nucleo essi possono interagire con le proteine nucleari alterando la complessa struttura della cromatina o con gli enzimi coinvolti nel metabolismo del DNA e dell'RNA modulandone l'attività (Banfalvi *et al.*, 2005). Concentrazioni citotossiche dei metalli provocano nelle cellule l'attivazione di specifiche classi di proteine a funzione protettiva come le *heat shock proteins*, che hanno il compito di preservare la struttura tridimensionale delle proteine (Krone *et al.*, 2003) e le metallotioneine, che hanno il compito di chelare il metallo. L'induzione nelle cellule della sintesi delle metallotioneine costituisce la difesa più rapida ed efficace da parte degli organismi viventi all'esposizione indesiderata ai metalli tossici (Park *et al.*, 2001). In quest'ultimo caso, i metalli adsorbiti dalla cellula fungina vengono dapprima chelati e quindi accumulati nel vacuolo. La chelazione e l'accumulo di metalli pesanti a livello intracellulare sono stati proposti come i possibili meccanismi che conferiscono tolleranza ai metalli. I principali responsabili della chelazione di ioni metallici intracellulari sono le metallotioneine (MT) e le fitochelatine (PC), citate in precedenza, e il glutatione (GSH). Le MT sono proteine a basso peso molecolare, ricche di cisterne, prive o a basso contenuto di aminoacidi aromatici (struttura primaria con una caratteristica distribuzione delle cisteine, es. Cys-X-Cys) e codificate da geni specifici (Rauser e Meuwly, 1995; Rauser, 1999; Cobbett *et al.*, 2000). Esse furono per la prima volta identificate nel 1957 da un gruppo di ricerca interessato allo studio dei costituenti cellulari responsabili dell'accumulo di cadmio nelle cellule renali equine (Margoshes e Vallee, 1956). Il termine metallotioneina fu inizialmente coniato per designare la proteina, isolata dalla corteccia renale equina (Kägi e Vallee, 1961), ricca di zolfo, e capace di legare cadmio e zinco. Dopo il 18° Congresso Internazionale sulle MT, tenutosi nel 1978, il termine MT è stato utilizzato per individuare tutte le proteine a basso peso molecolare con requisiti simili alla metallotioneina equina. Nel 1985 le MT furono convenzionalmente suddivise in 3 classi :

- Classe I : MT con struttura primaria correlabile a quella delle MT dei mammiferi;

- Classe II : MT la cui sequenza non presenta omologia con le MT dei mammiferi;
- Classe III : metallopeptidi atipici, rinvenuti nelle piante (fitochelatine), costituiti da unità gamma-glutamil-cisteiniche aventi alcune proprietà in comune con le MT.

Dal 1997 (48° Meeting Internazionale sulle MT, Kansas City, USA) è stato proposto e adottato un nuovo sistema di classificazione basato sia sulla similarità di sequenza sia sulle relazioni filogenetiche. Questo sistema considera le MT come una superfamiglia suddivisa in famiglie (es. MT dei vertebrati) e sottofamiglie. Le MT sono state rinvenute in taluni procarioti, nei protozoi, in molte piante e funghi e in numerosi phyla, del regno animale (Fig. 8).

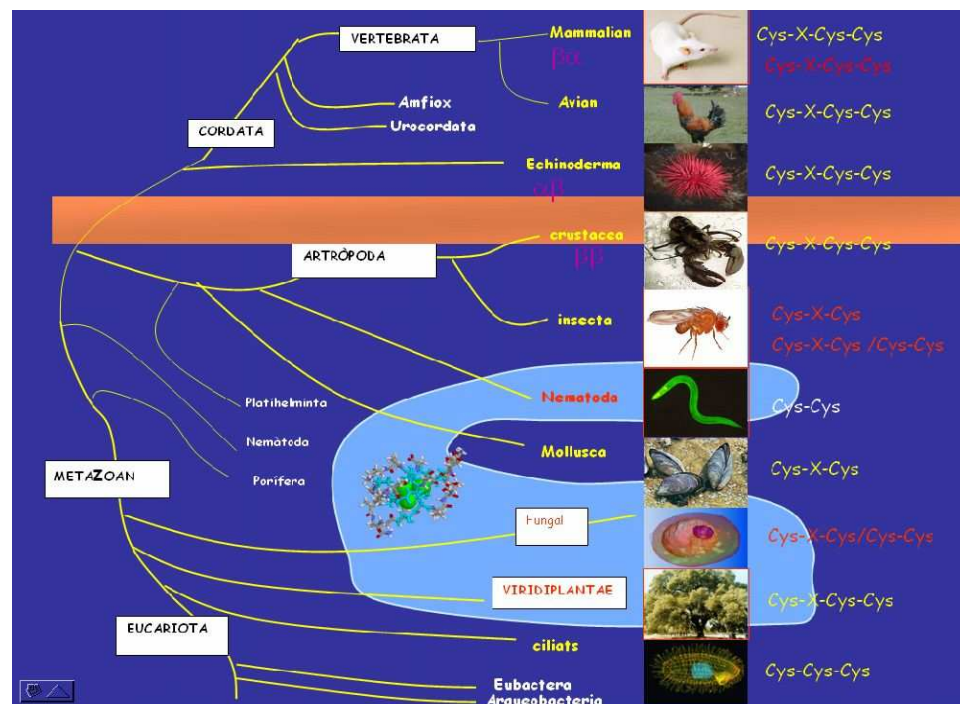


Figura 8: Albero filogenetico delle metallotioneine

La maggior parte delle MT sono organizzate in motivi Cys-Cys, Cys-X-Cys e Cys-X-Y-Cys in cui X e Y sono residui aminoacidici diversi dalla cisteina. Tutti i residui cisteinici sono coinvolti nella complessazione dei metalli ma non sono tutti equivalenti ed è proprio l'abbondanza di cisteina e la sua

disposizione in sequenze caratteristiche che predispone le MT a formare complessi con gli ioni dei metalli pesanti. Da questo punto di vista è stato dimostrato che ioni di circa 18 specie metalliche diverse possono legarsi alle metallotioneine con diversa affinità.

Le MT rappresentano un gruppo molto antico di proteine, con una struttura conservata quasi immutata nel corso dell'evoluzione, si ritiene, pertanto, che queste proteine siano coinvolte in processi fisiologici di importanza fondamentale per la cellula. In effetti, sebbene la loro funzione biologica non sia del tutto chiara, appare certo che le MT giochino un ruolo importante nell'omeostasi dello zinco e del rame e che esercitino un'azione detossificante nei confronti di metalli pesanti tossici. E' stato accertato che le MT fungono da deposito e da trasportatori intracellulari di Zn e che sono in grado di rilasciare e ridistribuire lo stesso nella cellula per processi metabolici o in caso di emergenza (Coyle *et al.*, 2002).

Per quanto riguarda le fitochelatine (PC), esse sono una famiglia di piccoli peptidi la cui struttura generale è $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n=2-11$). Sono anch'esse ricche in cisteine e formano complessi con gli ioni metallici (es. Fig. 9), solitamente compartimentati all'interno del vacuolo. Queste molecole sono indotte nelle piante e nei funghi da molti metalli, incluso cadmio, mercurio, argento, oro, piombo, zinco e arsenico (Rauser, 1990; Grill *et al.*, 1985).

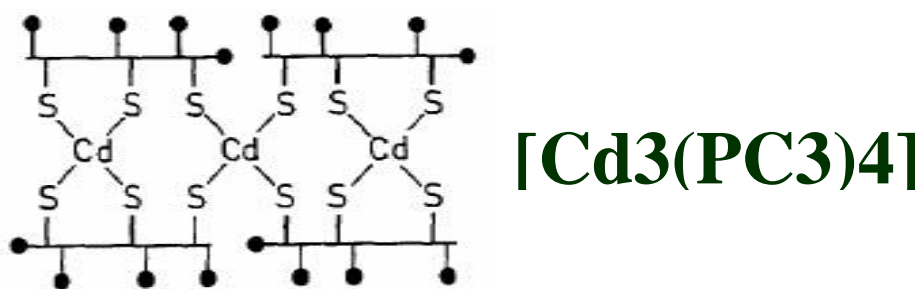


Figura 9: Struttura del complesso fitochelatine-cadmio.

La biosintesi delle PC non è realizzata dai ribosomi ma dall'enzima PC-Sintasi, un enzima del citosol che viene velocemente attivato per esposizione dell'organismo a concentrazioni relativamente alte di metallo

pesante. Grazie al loro alto contenuto in cisteina, questi peptidi sono capaci di chelare diversi ioni di metalli pesanti come Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{+2+} , riducendo in tal modo la concentrazione del metallo nel citosol e permettendo il loro immagazzinamento nei vacuoli, dove si realizza il bioaccumulo dei metalli pesanti tossici. Oltre alla detossificazione dai metalli, è stato mostrato che le PC giocano un ruolo non trascurabile nell'omeostasi di metalli nutrienti essenziali. Oggi è noto che le fitochelatine sono ampiamente distribuite nel regno vegetale dalle alghe ad alcune specie di funghi e licheni, dai muschi alle felci, dalle gimnosperme alle angiosperme. Le PC non derivano comunque dall'attivazione di geni coinvolti nella risposta allo stress, ma vengono prodotte in seguito all'attivazione di una via biosintetica. Uno dei prodotti di questa via è il tripeptide GSH ((γ -Glu-Cys-Gly), molecola estremamente importante non solo per il fatto che dalla sua polimerizzazione derivano le PC ma anche perché risulterebbe essere direttamente coinvolto in molti processi cellulari delle piante come il trasporto dello zolfo, la detossificazione da molecole ad azione erbicida e altri xenobiotici mediante un processo di coniugazione spontanea o catalizzato dalle glutatione S-trasferasi (GST). In relazione a quest'ultimo aspetto, esistono tre principali famiglie di enzimi dotati di attività GSH trasferasica: le GST citosoliche, le GST mitocondriali e le GST microsomiali, strutturalmente molto diverse dalle due precedenti. Le GST citosoliche rappresentano la famiglia più numerosa delle tre con una massa molecolare di 50 Kda, ciascuna costituita da due subunità polipeptidiche. Ogni subunità contiene un sito catalitico indipendente composto da due regioni. Una regione (sito G) è specifica per il legame del GSH o del relativo omologo e presenta nel dominio N-terminale un gruppo amminoacidico conservato. L'altra regione (sito H), che lega il substrato idrofobico, presenta invece una struttura molto variabile nel suo dominio C-terminale. Tra i due siti è interposta una regione variabile di 5-10 residui amminoacidici.

1.5 *Trichoderma harzianum*

Con l'avvento delle coltivazioni intensive si è avuto un elevato utilizzo di fitofarmaci al fine di contrastare l'aumento dell'incidenza di nuove malattie. Nel corso degli anni, quindi, si è evidenziata sempre più la presenza di residui derivanti dai suddetti composti chimici sia nelle acque e nei suoli, sia in alimenti di origine vegetale e animale destinati all'uomo. Con l'intento di ridurre drasticamente l'uso dei fitofarmaci e quindi la presenza di questi residui chimici, da alcuni decenni ormai, diversi Paesi hanno avviato programmi di ricerca per lo sviluppo di agenti biologici di controllo in grado di contrastare gli agenti eziologici delle malattie delle piante. A tal fine sono stati molto utilizzati i funghi appartenenti al genere *Trichoderma*. Le specie di *Trichoderma* sono caratterizzate da una rapida crescita, da riproduzione asessuale con produzione di numerosi propaguli (Williams *et al.*, 2003) e da ubiquitarità nella maggior parte dei suoli dove svolgono un'azione antagonista verso molte specie di funghi (Chet, 1987). Queste caratteristiche favorevoli si associano alla capacità di adattarsi alle diverse condizioni ambientali che li rende molto competitivi nei confronti di altre specie. E' evidente inoltre, da dati di letteratura, una forte resistenza di questi funghi a diverse tossine, composti xenobiotici, inclusi antibiotici prodotti da altri organismi e fungicidi (Harman *et al.*, 1996). I funghi appartenenti a questo genere sono utilizzati sia come efficaci antagonisti dei maggiori funghi patogeni delle piante (Carsolio *et al.*, 1999; De la Cruz *et al.*, 1995; Geremia *et al.*, 1993; Inbar *et al.*, 1995; Rey *et al.*, 2001), sia come alleati per la crescita e lo sviluppo delle piante, inducendo nelle piante una resistenza sistemica e localizzata nei confronti degli stessi patogeni fungini (Bigirimana *et al.*, 1997). Alcuni meccanismi attraverso i quali *Trichoderma* opera quest'azione di biocontrollo sono in parte già noti. Essi producono un'ampia gamma di sostanze ad azione antibiotica, instaurano rapporti di parassitismo nei confronti di altri funghi, competono con gli altri microrganismi del suolo per l'approvvigionamento dei nutrienti ed inibiscono, o degradano, gli enzimi essenziali ai funghi patogeni per la

perforazione e la successiva penetrazione nella superficie fogliare (Zimand *et al.*, 1996).

Oltre a questi scopi, le specie appartenenti al genere *Trichoderma* sono utilizzate per diversi altri fini. Vengono impiegate per la produzione di detersivi, per la produzione di mangimi per animali, per la produzione di biocombustibili, per la realizzazione del processo chimico-industriale di *bleaching*, come “fonte” di geni utilizzati per la produzione di piante transgeniche, per la produzione di alcool e la produzione di enzimi. Questi funghi sono infatti usati per la produzione industriale di cellulasi e altri enzimi che degradano i complessi polisaccaridici negli alimenti, nei mangimi, nella carta e nella cellulosa e nell’industria tessile (Maheshwari *et al.*, 2000). Ad esempio, cellulasi estratte da questi funghi sono aggiunte al mangime dei polli allevati in batteria per aumentare la digeribilità delle emicellulose presenti nell’orzo e in altre colture. Sebbene le prime notizie circa il genere *Trichoderma* risalgano all’inizio del XIX secolo, solo nel recente passato sono state chiarite alcune caratteristiche morfologiche e tassonomiche delle diverse specie appartenenti a questo genere (Gams e Bissett, 1998). Solo nel 1939, infatti, Bisby studiò e descrisse per la prima volta le caratteristiche morfologiche della specie *Trichoderma viride* ma si deve a Rifai uno studio e un approccio più approfondito dell’intero argomento.

Nel 1969, infatti, egli classificò nove differenti specie appartenenti a questo genere con la consapevolezza di non avere di fronte nove entità biologiche correlate a singole specie teleomorfe. Parecchie specie infatti erano incluse in queste nove “entità” o “aggregati” biologici come lui stesso li definì. Solo grazie a studi successivi mediante l’introduzione di tecniche biomolecolari d’identificazione sono note ad oggi ben 89 specie diverse appartenenti al genere *Trichoderma* (Ray, 2005). La forma perfetta, ascogena o teleomorfa, del genere *Trichoderma* (anamorfa, conidiofora o imperfetta) è l’*Hypocrea* Rf. Una delle specie appartenenti al genere *Trichoderma* più utilizzate è il fungo *Trichoderma harzianum* Rifai (teleomorfo: *Hypocrea lizii*

Patouillard). Esso è un ascomicete ubiquitario dei suoli e degli ecosistemi radicali le cui caratteristiche morfologiche sono note da tempo (Fig. 10).

<p><u>Classificazione scientifica:</u> (<i>Cavalier-Smith 1998</i>)</p> <p><u>Dominio:</u> <i>Eukaryota</i> <u>Regno:</u> <i>Fungi</i> <u>Phylum:</u> <i>Ascomycota</i> <u>Subphylum:</u> <i>Pezizomycotina</i> <u>Classe:</u> <i>Sordariomycetes</i> <u>Ordine:</u> <i>Hypocreales</i> <u>Famiglia:</u> <i>Hypocreaceae</i> <u>Genere:</u> <i>Trichoderma</i> <u>Specie:</u> <i>Trichoderma harzianum</i></p>
--

Figura 10: Classificazione tassonomica di *Trichoderma harzianum*
([http:// www.speciesfungorum.org](http://www.speciesfungorum.org))

T. harzianum cresce e si sviluppa come un tipico fungo filamentoso, producendo ife da 5 a 10 μm di diametro. I conidi prodotti e rilasciati in gran numero sono generalmente di colore giallo-verdastro con un diametro che oscilla fra i 3 e i 5 μm di diametro. La loro forma varia da sferica a ellittica-ovoidale. Le colonie di *T. harzianum* crescono rapidamente e il loro colore varia da bianco a beige-giallastro. Il micelio del fungo presenta colorazioni diverse in base allo stadio di sviluppo. Esso infatti presenta una colorazione bianco-ialina durante la fase iniziale d'accrescimento, beige durante la fase avanzata e marrone chiaro durante la fase finale di crescita. I conidiofori sono altamente ramificati e presentano diversi "ciuffi" agglomerati e disposti irregolarmente. Essi si sviluppano generalmente da una zona centrale in maniera concentrica formando un anello attorno a questo punto iniziale. *T. harzianum* presenta molte delle caratteristiche

esposte in precedenza, relativamente a tutto il genere *Trichoderma*. Esso esplica la propria attività antifungina mediante micoparassitismo, competizione e antibiosi. Nel primo caso, si ha una forma di interazione biologica, generalmente di natura trofica, tra due specie di organismi di cui uno è detto parassita e l'altro ospite. Il fenomeno è legato alla secrezione da parte dell'antagonista di enzimi degradativi delle pareti cellulari che determinano la lisi cellulare e la morte dell'ospite. La capacità di *T. harzianum* di svilupparsi sulla parete cellulare dei funghi, di produrre enzimi litici degradanti le pareti cellulari e di parassitizzare molti funghi patogeni è stata oggetto di parecchi studi. Esso è in grado di produrre β -1,3-glucanasi e chitinasi che solubilizzano la parete delle cellule di *Rhizoctonia solani*, di *Sclerotium rolfii* e di *Pythium aphanidermatum* (Fig. 11). Nel caso in cui *T. harzianum* espliciti la sua attività antifungina mediante competizione, si ha l'esclusione di un'altra specie attraverso maggiore rapidità e/o efficienza nello sfruttamento di una risorsa, la quale può essere rappresentata sia dallo spazio circostante sia dai nutrienti a disposizione.

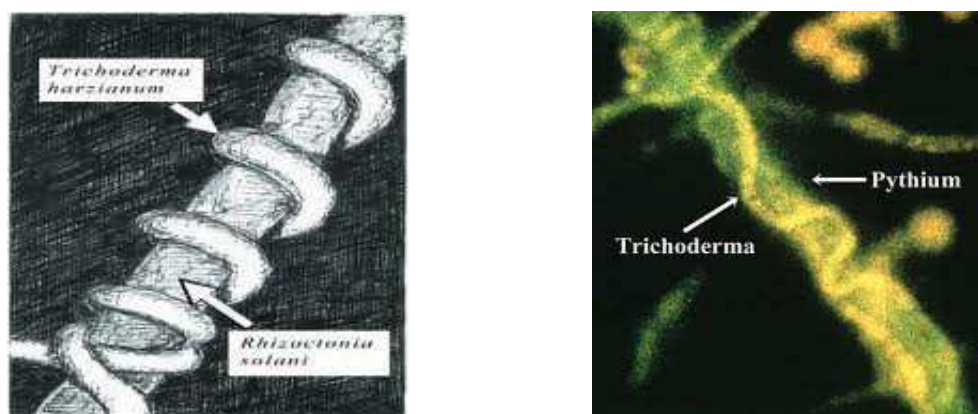


Figura 11: Esempi di micoparassitismo realizzato da *T. harzianum* nei confronti di *Rhizoctonia solani* e *Pythium aphanidermatum*. La secrezione di enzimi litici della parete cellulare provoca la morte dell'ospite (<http://attra.ncat.org/attra-pub/soilborne.html>; <http://www.bacamp.com>)

A tal proposito è nota l'azione antifungina mediante competizione da parte del suddetto fungo nei confronti di *Fusarium oxysporum* f.sp. *vsinfectum* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* rispettivamente in piantagioni di cotone e

melone. Nel terzo ed ultimo caso infine (antibiosi), si verifica l'inibizione di un organismo mediata dall'azione di metaboliti secondari tossici prodotti da *T. harzianum*.

Esso produce infatti una serie di sostanze tossiche volatili e non volatili quali la *trichotecina* e il sesquiterpene *trichodermina* che sembrano avere un'azione inibitrice nei confronti della crescita di altri funghi. Dei tre fenomeni descritti quest'ultimo è quello ancora poco chiaro e tutt'oggi oggetto d'indagine.

Recenti studi hanno messo in evidenza la capacità di questa specie fungina di agire sulla "fitness" (capacità competitiva) delle piante sia migliorando la crescita e lo sviluppo sia inducendo resistenza di tipo sistemico o indotto nei confronti di numerosi funghi patogeni tra cui *Botrytis cinerea*, *Phytophthora capsici*, *Alternaria solani*, *Magnaporthe grisea*, *Colletotrichum graminicola* e *Colletotrichum lindemuthianum* (Harman *et al.*, 2004). I meccanismi che sono alla base di questi effetti sono ancora oggetto di studio.

Recentemente, (<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/index.php>), esperimenti hanno evidenziato come un particolare ceppo di *T. harzianum* stimoli la produzione di radici profonde (un metro sotto la superficie del terreno). Queste permetterebbero la crescita e lo sviluppo di colture quali il mais e di piante ornamentali, durante periodi di siccità. Inoltre nel mais colonizzato dal ceppo T22 si ha una richiesta del 40 % in meno di fertilizzanti azotati rispetto alla stessa coltura coltivata in condizioni standard. In altri lavori (Altomare *et al.*, 1999) è stata osservata la capacità di *T. harzianum* di migliorare la solubilizzazione di fosfati e micronutrienti rendendoli più assimilabili promuovendo così la crescita di piante coltivate. Le caratteristiche della rizosfera sono, in ogni caso, fondamentali per la selezione dei ceppi da utilizzare al fine di raggiungere questi obiettivi. E' stato dimostrato da tempo ormai (Ahmad e Baker, 1987) che il ceppo T22 si adatta molto bene a diverse condizioni. Tollera bene infatti sia i terreni acidi che quelli basici, sia i terreni argillosi che quelli sabbiosi e sia i terreni ricchi di sostanze nutritive che quelli più poveri di tali sostanze.

Per queste sue proprietà diversi ceppi del fungo (in particolar modo il già citato ceppo T22) vengono utilizzati in formulati commerciali come agenti di biocontrollo di numerose malattie delle piante causate da diverse specie fungine fitopatogene ed anche come biofertilizzanti. In questo caso le vie di somministrazione sono principalmente due: applicazione sulla superficie fogliare e applicazione nel suolo. La capacità di *T. harzianum* di tollerare condizioni ambientali ostili, come la carenza di fonti di carbonio e azoto, è stata dimostrata da studi presenti in letteratura ed essa risulterebbe diretta conseguenza della sovraespressione di geni codificanti proteine della parete cellulare (Rosado *et al.*, 2007).

Altri dati presenti in letteratura evidenzerebbero come *T. harzianum* abbia un'elevata resistenza ai metalli pesanti ed inoltre, l'interazione con alcuni di essi, abbia anche un effetto stimolante sulla crescita del fungo stesso (Kredics *et al.*, 2001; Gediga *et al.*, 2000). Infatti, la germinazione di spore e la crescita *in vitro* di *T. harzianum* sono stimulate con concentrazioni di zinco fino a 300 ppm, mentre sono inibite con dosi dello stesso pari 1000 ppm (Dluzniewska, 2003). Inoltre è stato osservato che l'assorbimento di cadmio, zinco e mercurio sulla superficie cellulare del fungo sia, a basse concentrazioni, prevalentemente un processo passivo mentre il loro accumulo risulterebbe indipendente dal pH. Tuttavia, l'incremento dell'accumulo di Zn che si può osservare a pH compreso fra 3 e 5 ad elevate concentrazioni del metallo, potrebbe essere spiegabile con la produzione di composti di chelazione dei metalli con un'elevata affinità per lo Zn associati alla superficie cellulare del fungo (Krantz-Rülcker *et al.*, 1993 e 1996).

Oltre a questo, infine, alcuni dati evidenzerebbero come la presenza di *T. harzianum* stimoli la crescita e lo sviluppo di piante di salice fragile, *Salix fragilis*, cresciute in suoli contaminati da metalli pesanti quali zinco, cadmio, nichel, manganese e piombo (Adams *et al.*, 2007).

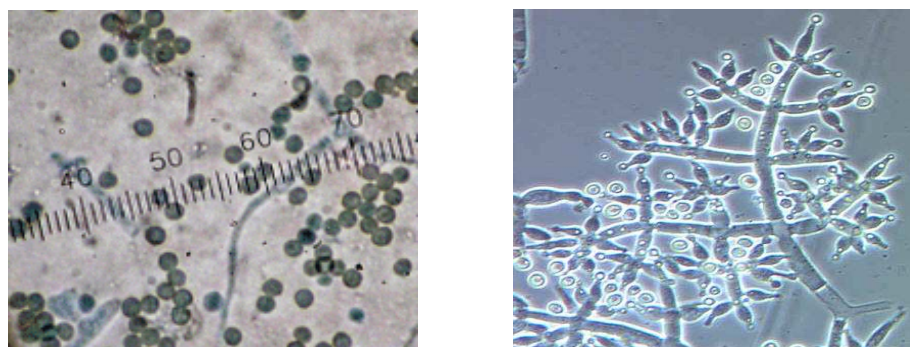


Figura 12: Conidi e conidiofori di *T. harzianum* osservati al microscopio ottico (40X–10X).

E' ormai noto che l'azione antagonista esercitata da *T. harzianum* nei confronti dei funghi fitopatogeni è efficace anche in suoli contaminati da metalli pesanti. Da alcune ricerche è emerso che l'effetto dei metalli pesanti sull'attività *in vitro* di alcuni enzimi extracellulari coinvolti nel micoparassitismo di *T. harzianum* è variabile per i differenti metalli e non vi è correlazione tra le attività enzimatiche ed i diversi livelli di crescita miceliare. In particolare, l'attività chitinasica della β -1,4-N-acetilglucosaminidasi è fortemente inibita in presenza di mercurio e ferro, mentre è stimolata da piombo, rame e alluminio. L'attività della β -1,3-glucanasi viene notevolmente inibita da mercurio stimolata in presenza di manganese e cobalto. Infine, le attività delle proteasi tripsino-simili e chimotripsino-simili sono inibite da mercurio, alluminio e rame, ma vengono stimulate soprattutto da nichel e magnesio (Kredics *et al.*, 2001). Recenti dati, infine, evidenzerebbero come la presenza di metalli pesanti quali piombo, zinco, cadmio e mercurio influiscano in maniera diversa sulla crescita e la sporulazione di *T. harzianum* (Raspanti *et al.*, 2009). In particolar modo è stato osservato che la presenza nel substrato colturale di piombo e zinco (5 - 10 ppm) non ha grossi effetti sulla crescita del fungo mentre lo stesso comportamento non si verifica se nel terreno di crescita sono presenti cadmio o mercurio. Infatti, in queste condizioni, si noterebbe un considerevole rallentamento della crescita fungina sia in presenza di cadmio (5 - 10 ppm) sia in presenza di mercurio a (5 ppm) mentre si avrebbe completa inibizione allorquando quest'ultimo metallo pesante fosse

presente alla concentrazione di 10 ppm. Questo comportamento verrebbe inoltre confermato osservando l'accrescimento radiale di *T. harzianum* su terreno colturale agarizzato contenente i già citati metalli pesanti.

1.6 Scopo della ricerca

La presente tesi si propone di portare un contributo alla comprensione dei meccanismi biomolecolari coinvolti nella risposta metabolica allo stress indotto da metalli pesanti in *T. harzianum*. Per raggiungere tale obiettivo, in un primo momento, è stato valutato il comportamento del fungo in presenza di due metalli pesanti: cadmio e mercurio. Sono stati osservati e studiati parametri come l'accrescimento radiale su piastra in terreno colturale agarizzato in presenza dei suddetti metalli pesanti e il peso secco del micelio del fungo accresciutosi in terreno colturale liquido nelle medesime condizioni. In un secondo momento, date le scarse conoscenze relative ai geni coinvolti nel meccanismo biomolecolare di tolleranza ai metalli pesanti in *T. harzianum*, la ricerca ha avuto come obiettivo quello di identificare i geni differenzialmente espressi nel fungo cresciuto in presenza dei già citati metalli pesanti. Per il raggiungimento di questo obiettivo è stata utilizzata la tecnica della *PCR-select* o *SSH* (“*Suppression Subtractive Hybridization*”) che consente di ottenere librerie di cDNA arricchite di trascritti presenti soltanto in uno dei due campioni confrontati e possiede la peculiarità di permettere l'isolamento anche di sequenze poco espresse (Diatchenko *et al.*, 1996). Una volta isolati e identificati i geni differenzialmente espressi nel micelio del fungo cresciuto in presenza di cadmio e in presenza di mercurio, è stata focalizzata l'attenzione su quelli attivati solo in presenza di quest'ultimo. Applicando la tecnica della *Real-Time RT-PCR* sono stati valutati i livelli d'espressione di questi geni sia in *T. harzianum* cresciuto in presenza di mercurio e in presenza di cadmio, sia in assenza dei suddetti metalli pesanti (controllo).

Capitolo 2: Materiali e Metodi

2.1 Effetti del cadmio e del mercurio sulla crescita *in vitro* di *Trichoderma harzianum*

2.1.1 Determinazione del peso secco del micelio fungino

Il peso secco del micelio di *T. harzianum* cresciuto in presenza di cadmio e mercurio (II) è stato determinato inoculando la sospensione conidica (100.000 spore/mL), in beute contenenti 50 mL di substrato colturale di crescita. Per la crescita è stato utilizzato il substrato Czapek-Dox: 0,3 % di NaNO₃; 0,1 % di K₂HPO₄; 0,05 % di KCl; 0,05 % di MgSO₄·7H₂O; 0,001 % di FeSO₄·7H₂O; 3 % di saccarosio; pH finale 5,3~5,4. Al terreno così preparato è stato aggiunto uno dei seguenti sali di metalli pesanti: HgCl₂ e CdSO₄. Le soluzioni così preparate sono state sterilizzate in autoclave (120 °C, 20 minuti, 2 atm). La concentrazione finale dei metalli pesanti nel substrato di crescita è stata, in entrambi i casi, di 10 ppm. Il campione controllo (testimone) era costituito dallo stesso substrato Czapek-Dox ma esente da metalli pesanti. La concentrazione della sospensione conidica è stata determinata mediante conteggio dei conidi in una cella di *Bürker*. Le colture liquide sono state tenute al buio in termostato alla temperatura di 24 ± 1 °C. Il micelio è stato raccolto mediante filtrazione con imbuto *Büchner*. Il filtro contenente il micelio è stato posto all'interno di un pesafiltro ed essiccato in stufa a 120 °C per 24 h. I prelievi delle colture sono stati effettuati dopo 3, 6, 9 e 12 giorni di crescita dall'inoculazione. Per ogni campione sono state effettuate 3 ripetizioni.

Il peso secco del micelio fungino è stato determinato nuovamente per una serie successiva di esperimenti seguendo, in parte, le modalità operative descritte sopra. In quest'ultimo caso sono state inserite, tuttavia, due variabili operative: la prima relativa alla tipologia di soluzione mercuriale

utilizzata e la seconda relativa alla modalità di sterilizzazione della stessa. In merito al primo punto è stato determinato il peso secco del micelio fungino utilizzando due differenti soluzioni contenenti mercurio: cloruro mercurico o *sublimato corrosivo* HgCl_2 (1 ppm e 10 ppm) e cloruro mercurioso o *calomelano* Hg_2Cl_2 (0,1 ppm e 1 ppm). In merito al secondo punto sono state utilizzate due metodiche di sterilizzazione per le soluzioni sopracitate: mediante aggiunta al brodo colturale e successiva sterilizzazione in autoclave (120 °C, 20 minuti, 2 atm) o mediante sterilizzazione per microfiltrazione (filtro assoluto; diametro nominale dei pori: 0,2 μm) e successiva aggiunta al brodo colturale previamente sterilizzato. I prelievi delle colture sono stati effettuati dopo 4 giorni di crescita dal giorno dell'inoculo. Per ogni campione sono state effettuate 3 ripetizioni.

2.1.2 Determinazione della velocità di crescita

La velocità di crescita radiale di *T. harzianum* accresciuto su substrato agarizzato contenente cadmio e mercurio è stata determinata come di seguito descritto. Tasselli di circa 3-5 mm di diametro, prelevati dal margine di colonie in attivo accrescimento su substrato PDA (patata, destrosio e agar), sono stati posti al centro di piastre contenenti substrato Czapek-Dox Agar addizionato con un sale di metallo pesante (HgCl_2 o CdSO_4) alla concentrazione di 10 ppm. La sterilizzazione è stata effettuata mediante autoclave (120 °C, 20 minuti, 2 atm).

In seguito sono stati effettuati ulteriori esperimenti utilizzando come soluzione mercuriale cloruro mercurioso (Hg_2Cl_2 , 0,1 ppm e 1 ppm) e cloruro mercurico (HgCl_2 , 1 ppm e 10 ppm). In quest'ultima serie d'esperimenti, le due diverse soluzioni saline contenenti mercurio sono state sterilizzate mediante microfiltrazione o mediante autoclave come già descritto.

Il controllo era rappresentato, in entrambi gli esperimenti, da colture accresciutesi sul medesimo substrato di crescita in assenza di metallo pesante. Le piastre sono state incubate in termostato a 24 ± 1 °C al buio e per una durata di 7 giorni. Per ogni campione in esame sono state eseguite 4 ripetizioni e ad intervalli regolari di 24 h sono stati misurati due diametri ortogonali della coltura di cui è stato calcolato il valore medio.

2.2 Costruzione della libreria sottrattiva

2.2.1 Condizioni di crescita del fungo

Colture di *T. harzianum* accresciutesi per 14 giorni su piastre *Petri* contenenti substrato PDA sono state ricoperte con 10 mL di acqua bidistillata sterile e rimosse dal substrato per raschiamento superficiale mediante una spatola sterile. I conidi presenti sono stati separati dalla massa miceliare filtrando la sospensione con imbuto *Robu-Glas*. La concentrazione della sospensione conidica da inoculare in ogni bottiglia di *Roux* (100.000 spore/mL) è stata determinata mediante conteggio delle spore in una cella conta-globuli di *Bürker*. Ciascuna bottiglia conteneva 150 mL di substrato Czapek-Dox addizionato con una soluzione di HgCl₂ o CdSO₄ alla concentrazione di 10 ppm. Il tutto è stato sterilizzato in autoclave prima dell'inoculo. Le colture così preparate sono state incubate in termostato a 24 ± 1 °C per un periodo di 7 giorni.

2.2.2 Prelievo del micelio

In tutte le fasi operative che verranno di seguito descritte, essendo prevista l'estrazione di RNA dal micelio del fungo, sono state adottati degli

accorgimenti particolari al fine di proteggere dalla degradazione l' RNA. In particolar modo, tutte le attrezzature che venivano a contatto con il micelio fungino sono state trattate con dietilpirocarbonato (DEPC) una sostanza in grado d'inattivare l'RNasi, enzima ubiquitario che degrada velocemente l'RNA. A questo fine tutta l'attrezzatura è stata immersa in una pirofila contenente una soluzione allo 0,1% di DEPC in acqua bidistillata overnight. Trascorse 24 h, il tutto è stato autoclavato per degradare il DEPC ed evitare la sua interferenza nelle successive fasi sperimentali. Tutto il materiale così trattato risulta essere *RNasi-free*. Con lo stesso obiettivo, il materiale in plastica è stato trattato con cloroformio e autoclavato. Il micelio del fungo è stato prelevato mediante filtrazione con imbuto *Buchner*. Sull'imbuto è stato adagiato un dischetto di carta da filtro dapprima inumidito con una soluzione allo 0,1 % di acqua, *DEPC-treated*, e su cui, in seguito, è stato versato l'intero contenuto della bottiglia di *Roux*. L'operazione così descritta è stata ripetuta per ogni campione. Il micelio così raccolto dalla superficie del filtro è stato prelevato con spatole, posto all'interno di un mortaio e frantumato con pestello in presenza di azoto liquido. Dopo la frantumazione il micelio è stato distribuito in provette *Falcon* e conservato a -80 °C fino alla successiva fase di estrazione dell'RNA.

2.2.3 Estrazione dell'RNA totale

L'estrazione dell'RNA totale dal micelio fungino è stata effettuata mediante l'utilizzo del kit "*RNAgents Total RNA Isolation System*" (Promega). Prima d'avviare l'intera procedura sono stati attuati tutti quegli accorgimenti, descritti in precedenza, tali da rendere la vetreria, gli attrezzi e i reagenti privi da contaminazione da RNasi.

Il successo di tutta la procedura d'estrazione richiede la perfetta realizzazione di quattro fondamentali passaggi ovvero l'effettiva distruzione

delle cellule e del tessuto, la denaturazione dei complessi nucleoproteici, l'inattivazione delle ribonucleasi endogene e la rimozione del DNA e delle proteine.

In base al protocollo fornito dalla casa produttrice e il suo successivo riadattamento alle condizioni sperimentali adottate, la procedura operativa era costituita da tre fasi principali:

- Estrazione dell'RNA
- Precipitazione e Risospensione dell'RNA
- Lavaggio RNA

La quantità di campione di partenza, in base a dati di esperimenti pilota preliminari, è stata di 0,5 g. Anche per i volumi dei reagenti utilizzati durante tutta la procedura si è fatto riferimento a dati di esperimenti precedenti. Durante la fase di estrazione sono stati aggiunti 6 mL di *denaturing solution* alla provetta contenente il campione in esame, incubando il tutto per 5 minuti in ghiaccio. La *denaturing solution* è costituita da guanidina tiocianato e dal complesso CSB (Citrato / Sarcosina / β -mercaptoetanol). La guanidina tiocianato e il β -mercaptoetanol presenti in questa soluzione sono due potenti inibitori della RNasi mentre l'N-lauril sarcosina e la stessa guanidina tiocianato agiscono degradando i complessi nucleoproteici, permettendo così il rilascio di RNA libero da proteine in soluzione. L'accorgimento d'incubare il campione in ghiaccio ha lo scopo di ridurre al minimo la degradazione di RNA.

Trascorso questo periodo di tempo, dopo aver aggiunto 75 μ L di glicogeno (20 μ g/ μ L) al fine di migliorare la precipitazione, è stata eseguita un'ulteriore frantumazione del campione mediante l'ausilio di un omogenizzatore a lame. In seguito, sono stati aggiunti 0,6 mL di acetato di sodio 2 M e 6 mL di una soluzione Fenolo:Cloroformio:Alcol Isoamilico (25:24:1), mescolando per inversione 4-5 volte e incubando il tutto per 15 minuti in ghiaccio. La soluzione Fenolo:Cloroformio:Alcol Isoamilico permette sia l'eliminazione del DNA cromosomico dal campione sia la separazione fra la fase acquosa contenente RNA e quella organica contenente DNA e proteine. Trascorsi i 15 minuti d'incubazione è stata

completata la fase d'estrazione dell'RNA. Il contenuto della provetta *Falcon* è stato trasferito in una provetta *Corex* da 50 mL, e dopo centrifugazione a 10.000 x g x 20 minuti a 4°C, si è recuperata la fase acquosa contenente RNA, trasferendola in una nuova *Corex*.

Nella successiva fase di precipitazione e risospensione dell'RNA è stato aggiunto un ugual volume di isopropanolo alla fase acquosa contenente RNA precedentemente prelevata. Il tutto è stato incubato a – 20 °C per 30 minuti. L'isopropanolo permette la precipitazione dell'RNA dalla fase acquosa come precipitato gelatinoso biancastro. Trascorso il periodo d'incubazione, la fase acquosa e l'RNA sono stati centrifugati a 10.000 x g x 10 minuti a 4 °C. Il *pellet* biancastro in fondo alla provetta è stato risospeso in 2,5 mL di *denaturing solution*, è stato agitato al vortex fino alla completa risospensione ed è stato aggiunto un volume di 2,5 mL d'isopropanolo, incubando a – 20 °C per 30 minuti. Questa seconda fase è stata completata da una centrifugazione del campione, dopo l'incubazione, a 10.000 x g x 10 minuti a 4 °C.

Nella terza ed ultima fase, quella di lavaggio dell'RNA, alla provetta in esame sono stati aggiunti 5 mL di etanolo (75 %) freddo al fine di lavare il *pellet*. Dopo aver rimosso delicatamente quest'ultimo e ricentrifugato per 10 minuti a 10.000 x g a 4 °C, il *pellet* è stato lasciato ad asciugare per alcuni minuti, quindi lo si è risospeso nel minimo volume di acqua *DEPC treated* e infine lo si è conservato a –80 °C fino alla successiva fase di quantificazione.

2.2.4 Quantificazione dell'RNA totale

L'RNA estratto è stato analizzato allo spettrofotometro per determinarne la concentrazione ed evidenziare eventuali contaminazioni da DNA, da proteine o da fenolo. Un'ulteriore quantificazione è stata effettuata mediante lettura fluorimetrica.

Quantificazione allo spettrofotometro

La lettura spettrofotometrica è stata eseguita su RNA estratto, diluito 1:20 in H₂O-DEPC treated. Per calibrare lo strumento è stata utilizzata una soluzione standard di riferimento di H₂O-DEPC treated. Un'aliquota di RNA diluito è stata posta all'interno di una cuvetta al quarzo, trattata per circa un'ora con una soluzione di HCl-CH₃OH nel rapporto 1:1 e lavata con H₂O-DEPC treated. Il rapporto tra le assorbanze $\Delta 260 / \Delta 280$ è necessario per conoscere il grado di purezza dell'RNA (un rapporto compreso tra 1,9 e 2 è indice di un ottimo grado di purezza). La quantità di RNA contenuto può essere stimata considerando che 1 unità di assorbanza a 260 nm corrisponde a 40 µg di RNA, quindi, si può risalire alla concentrazione di RNA (µg/ml) mediante la formula:

$$40 (\mu\text{g/ml}) \times \text{Abs } 260 \times \text{FD}$$

Dove Abs 260 è l'assorbanza del campione a 260 nm e FD è il fattore di diluizione. La quantità in µg di RNA totale si ottiene attraverso la proporzione:

$$\mu\text{g RNA} : 1000 \mu\text{l} = \mu\text{g RNA totale} : \mu\text{l RNA estratto}$$

Quantificazione al fluorimetro

Prima di effettuare la quantificazione con il metodo *Quant-iT* è stata effettuata una diluizione 1:50 prelevando, per ogni campione, 49 µl H₂O-DEPC e 1 µl di campione. Dalla soluzione così ottenuta sono stati prelevati 7 µl e sono stati posti in un'ependorf da 1,5 ml per la fase successiva. A questo punto è stata realizzata la vera e propria quantificazione dell'RNA con il metodo "*Quant-iT RNA Assay*" (Molecular Probes) che permette di rilevare un segnale di fluorescenza proporzionale alla quantità di RNA presente nel campione analizzato. Il saggio è reso possibile dalla presenza di un colorante fluorescente specifico per l'RNA. La misura è stata effettuata in un volume finale totale di 400 µl. La lettura è stata effettuata al fluorimetro utilizzando come lunghezza d'onda d'eccitazione 630 nm e come lunghezza d'onda d'emissione 680 nm. A causa di problemi legati alla temperatura, in quanto l'efficienza quantica della fluorescenza diminuisce

con l'aumentare della temperatura poiché la maggior frequenza di collisione a temperature elevate aumenta la probabilità di rilassamento collisionale (Amandola, 2000), lo strumento è stato acceso poco prima della lettura.

Mediante la misura di standard di RNA a concentrazione nota è stata costruita una curva di taratura in un intervallo di concentrazioni da 0 a 100 ng per mezzo della quale si è risaliti alla concentrazione di RNA effettivamente presente nel campione. Per preparare la soluzione madre sono stati utilizzati 2 componenti: A (fluoroforo) e B, in rapporto 1:200. In generale si procede utilizzando 100 μ l di componente A per 20 ml di componente B (nel caso specifico si farà riferimento ai campioni da analizzare e al fatto che si utilizzeranno 400 μ l per campione) miscelati in una *falcon* da 50 ml. Quest'ultima, a causa della fotosensibilità del componente A, è stata coperta con carta stagnola. Sono state preparate a questo punto le 6 soluzioni standard per la costruzione della curva di taratura. Il kit *Quant-iT* contiene al suo interno 8 soluzioni standard a concentrazione nota e crescente (ng/ μ l) di RNA. In questo caso si è proceduto considerando i seguenti standard come da schema:

- 0 ng/ μ l **si prelevano 10 μ l** → punto B (bianco – 0 μ l)
- 2 ng/ μ l **si prelevano 10 μ l** → punto 20 ng (20 μ l)
- 4 ng/ μ l **si prelevano 10 μ l** → punto 40 ng (40 μ l)
- 6 ng/ μ l **si prelevano 10 μ l** → punto 60 ng (60 μ l)
- 8 ng/ μ l **si prelevano 10 μ l** → punto 80 ng (80 μ l)
- 10 ng/ μ l **si prelevano 10 μ l** → punto 100 ng (100 μ l)

In ogni provetta così preparata, relativa a ciascun punto della curva, sono stati aggiunti 400 μ l della soluzione madre (*master mix*: A+B 1:200); lo stesso è stato effettuato per le *ependorf* contenenti i campioni incogniti con diluizione 1:50 (*Eppendorf* con 7 μ l):

- MASTER (A:B / 1:200) **si prelevano 400 μ l** → 0 μ l
- MASTER (A:B / 1:200) **si prelevano 400 μ l** → 20 μ l

- MASTER (A:B / 1:200) **si prelevano 400 µl** → 40 µl
- MASTER (A:B / 1:200) **si prelevano 400 µl** → 60 µl
- MASTER (A:B / 1:200) **si prelevano 400 µl** → 80 µl
- MASTER (A:B / 1:200) **si prelevano 400 µl** → 100 µl
- MASTER (A:B / 1:200) **si prelevano 400 µl** → Campione µl

A questo punto lo strumento permette la costruzione di una retta di taratura con la quale è possibile calcolare le concentrazioni effettive dei campioni (ng/µl) a partire dal valore della fluorescenza (FI) e utilizzando i parametri dell'equazione della retta forniti dal fluorimetro:

$$FI = k C + b ; \quad C (\mu\text{g/ml}) = (FI - b)/k;$$

$$C.\text{eff.} (\text{ng}/\mu\text{l}) = \text{Conc.} (\mu\text{g} / \text{ml}) / \mu\text{l RNA} * FD$$

dove:

- *C. eff.* : concentrazione effettiva (ng/µl)
- *Conc.* : concentrazione in µg/ml
- *µl RNA* : volume di RNA (µl)
- *FD* : fattore di diluizione

Affinché la concentrazione dell'RNA stimata si avvicini a quella reale è necessario che il valore di r^2 (coefficiente di correlazione) sia prossimo all'unità. La qualità dell'RNA totale estratto è stata inoltre saggiata elettroforeticamente su gel d'agarosio utilizzando il metodo di Masek *et al.* (2005). In breve, un'aliquota di 2 µg di RNA di ciascun campione è stata miscelata con formammide deionizzata (quantità finale: 60 %), 1/10 di soluzione colorante (50 mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,25 % blu di bromofenolo; 60 % glicerolo) e 1 µl di bromuro d'etidio (1 mg/mL), riscaldata a 65 °C per 5 minuti e posta immediatamente in ghiaccio. Successivamente il campione è stato caricato su di un gel d'agarosio all'1,2 % in tampone TAE (Tris-acetato 0,04 M; EDTA 1 mM) e sottoposto a elettroforesi applicando un voltaggio costante di 5 V/cm. Al termine della corsa elettroforetica il gel è stato fotografato sotto luce UV. Un RNA totale di buona qualità presenta due bande nette a 18S e 28S.

2.2.5 Isolamento e purificazione dell'RNA messaggero

Per l'isolamento dell'mRNA dall'RNA totale è stato utilizzato il kit “*Oligotex for purification of poly A⁺ RNA from total RNA*” della QIAGEN. La presenza all'estremità 3'-OH del trascritto primario di mRNA di una coda poliadenilica (poli-A) di circa 200 nucleotidi è la base fondamentale dell'intera procedura. Il sistema utilizza una resina speciale costituita da piccole particelle in lattice e polistirene. A queste particelle polimeriche sono legati covalentemente degli oligo(dT) che possono ibridarsi specificamente con le code poli A⁺ dell'mRNA. Una volta ibridato all'oligo(dT) delle particelle, l'mRNA può essere dapprima separato dal resto dell'RNA totale (non avente la coda poliadenilica) e poi essere facilmente rilasciato in soluzione diminuendo la forza ionica che destabilizza il complesso dT:A⁺. Quest'ultima fase è realizzata grazie all'impiego di particolari tamponi forniti dal kit nelle fasi finali di lavaggio. Dal punto di vista operativo alcuni dei componenti del kit necessitano di essere riscaldati prima di essere utilizzati per la purificazione. In particolare, la soluzione denominata *Oligotex suspension 10 % (w/v)[=1 mg/10µL]* (10 mM Tris-Cl, pH 7,5 – 500 mM NaCl – 1 mM EDTA – 0,1 % SDS – 0,1 % NaN₃) è stata riscaldata fino a 37 °C in bagnomaria mentre il tampone denominato *OEB* (5 mM Tris-Cl, pH 7,5) è stato incubato a 70 °C. Dopo questa fase preliminare, in provette *ependorf RNasi free* da 1,5 mL, sono state pipettate: la sospensione contenente l'RNA totale appena estratto, un'aliquota di resina *Oligotex suspension*, un'aliquota di tampone *OBB* (20 mM Tris-Cl, pH 7,5 – 1 M NaCl – 2 mM EDTA – 0,2 % SDS) e un'aliquota di acqua *DEPC-Treated* in base alle proporzioni indicate dalla seguente tabella allegata al protocollo originale. Dopo aver incubato il campione così preparato per 3 minuti a 70 °C (si distrugge in questo modo la struttura secondaria dell'RNA) lo stesso è stato posto in bagnomaria alla temperatura di 30 °C per 10 minuti per permettere l'ibridazione fra gli oligo dT₃₀ delle particelle oligotex e la coda poli-A dell'mRNA. La formazione in questo

passaggio di un precipitato è indice della formazione del complesso Oligotex:mRNA. A questo punto, dopo aver centrifugato il campione per 2 minuti a 14.000 x g, il surnatante presente è stato scartato con una pipetta.

Total RNA	Add RNase-free water to:	Buffer OBB (µl)	Oligotex Suspension (µl)	Prep size
≤0.25 mg	250 µl	250	15	Mini
0.25–0.50 mg	500 µl	500	30	Midi
0.50–0.75 mg	500 µl	500	45	Midi
0.75–1.00 mg	500 µl	500	55	Midi
1.0–1.5 mg	650 µl	650	85	Maxi
1.5–2.0 mg	650 µl	650	115	Maxi
2.0–2.5 mg	650 µl	650	135	Maxi
2.5–3.0 mg	650 µl	650	175	Maxi

Il pellet rimanente è stato risospeso in 1 mL di tampone OW2 (10 mM Tris-Cl, pH 7,5 – 150 mM NaCl – 1 mM EDTA) ricentrifugando il tutto per 2 minuti alla massima velocità. Conclusa anche questa centrifugazione, il surnatante rimanente è stato eliminato. Le fasi appena descritte di lavaggio con il tampone OW2, di centrifugazione e di eliminazione del surnatante sono state ripetute una seconda volta. Al *pellet* rimanente sono stati aggiunti 50 µL di tampone OEB (70 °C) il tutto è stato miscelato per pipettamento 3-4 volte ed è stato centrifugato alla massima velocità per 2 minuti. Il surnatante, contenente a questo punto l'eluato di poli-A di mRNA, è stato trasferito in un'altra provetta *Eppendorf RNasi-free*. Per assicurare la massima resa sono stati aggiunti altri 50 µL di buffer OEB a caldo (70 °C) al *pellet*. Il tutto è stato miscelato per pipettamento e centrifugato per 2 minuti alla massima velocità. Il surnatante è stato trasferito combinandolo con il precedente. L'acido ribonucleico messaggero così purificato è stato quantificato con il metodo *quant-it* già descritto in precedenza. Le quantità di mRNA ottenute sono state di 1,6 µg/µL e 1,8 µg/µL nei campioni di *T. harzianum* accresciuti, rispettivamente, con Cd e Hg.

Dopo la quantificazione, l'mRNA è stato retrotrascritto in cDNA come descritto di seguito.

2.2.6 Retrotrascrizione da mRNA a cDNA

Al fine di ottenere le sequenze di cDNA differenzialmente espresse in *T. harzianum* cresciuto in presenza di cadmio e mercurio (II) è stato utilizzato il kit della Clontech Laboratories, Inc., "PCR-select cDNA subtraction kit". Il kit in questione permette sia la retrotrascrizione di RNA in cDNA sia la realizzazione della vera e propria PCR-Select o *Suppression Subtractive Hybridization (SSH)* con il cDNA ottenuto.

Prima fase: sintesi del primo filamento di cDNA

I step.

E' stato prelevato un volume tale da avere un quantitativo di mRNA stampo pari a 2 µg (dato indicato dal kit) sia per il campione Cd sia per il campione Hg. A questo quantitativo è stato aggiunto un volume di primer (10 µM) pari a 1 µL equilibrando il tutto con acqua *PCR-grade* fino a un volume finale di 5 µL.

La sequenza del primer impiegato per la sintesi del cDNA era la seguente:



Lo schema riassuntivo di questo primo step è mostrato sotto.

COMPONENTI	Cadmio (1,6 µg/µL)	Mercurio (1,6 µg/µL)
mRNA stampo (2 µg)	1,25 µL	1,10 µL
Primer (10 mM)	1,00 µL	1,00 µL
Acqua PCR grade	2,75 µL	2,90 µL
<i>Volume finale</i>	<i>5,00 µL</i>	<i>5,00 µL</i>

In seguito, i due campioni in esame sono stati incubati a 70 °C per 2 minuti e raffreddati in ghiaccio per 5 minuti.

II step.

Ai due campioni così preparati sono stati aggiunti: 2 µL di *5X First-strand buffer* (250 mM Tris-HCl pH 8,5; 450 mM MgCl₂; 150 mM KCl; 5 mM ditiotreitolo), 1 µL di nucleotidi *dNTP mix*, 1 µL di trascrittasi inversa *AMV* e 1 µL di acqua *PCR grade* per un volume finale di 5 µL. Anche in questo caso i campioni così preparati sono stati incubati a 42 °C per 190 minuti e raffreddati in ghiaccio per 5 minuti. Lo schema riassuntivo di questo secondo step è mostrato sotto.

COMPONENTI	Cadmio	Mercurio
5X First-strand buffer	2 µL	2 µL
dNTP mix (10 µM ciascuno)	1 µL	1 µL
Acqua PCR grade	1 µL	1 µL
Trascrittasi inversa AMV (20 unità/ µL)	1 µL	1 µL
<i>Volume finale</i>	<i>5 µL</i>	<i>5 µL</i>

Seconda fase: sintesi del secondo filamento di cDNA

Questa fase è stata realizzata aggiungendo nelle provette *ependorf* contenenti i prodotti della precedente fase i seguenti reagenti:

- **16,0 µL** **5X Second-strand buffer**
 0,25 mg/mL BSA
 100 mM Tris-HCl pH 7,5
 500 mM KCl
 50 mM solfato d'ammonio
 25 mM MgCl₂
 0,75 mM β-NAD
- **1,6 µL** **dNTP mix (10 µM ciascuno)**
- **4,0 µL** **20X Second-Strand Enzyme Cocktail**
 DNA polim. I, 6 u/µL
 RNasi H 0,25 u/µL
 E.coli DNA ligasi, 1,2 u/µL

- **48,4 μ L** **Acqua PCR-grade**
- **70,0 μ L** **Volume finale**

In seguito, questa seconda fase è stata completata così come segue:

- Incubazione a 16 °C per 120 minuti
- Aggiunto 2 μ L (6 unità) di T4 DNA polimerasi
- Incubazione a 16 °C per 30 minuti
- Aggiunto 4 μ L di EDTA/Glicogeno (soluzione 20X)
- Aggiunto 100 μ L di soluzione fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1)
- Centrifugazione a 14.000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente
- Recupero surnatante (fase acquosa)
- Aggiunto 100 μ L di soluzione cloroformio:alcol isoamilico (24:1)
- Centrifugazione a 14.000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente
- Recupero surnatante (fase acquosa)
- Aggiunto 40 μ L di NH_4OAc e 300 μ L di etanolo 95%
- Centrifugazione a 14.000 rpm per 20 minuti a temperatura ambiente
- Recupero surnatante
- Sospensione del *pellet* con 500 μ L di etanolo 80 %
- Centrifugazione a 14.000 rpm per 20 minuti a temperatura ambiente
- Eliminazione surnatante
- Lasciato asciugare il *pellet* per 10 minuti
- Risospensione del precipitato in 50 μ L di acqua *PCR grade*

2.2.7 Costruzione delle librerie sottrattive (SSH library)

L'ibridazione soppressiva sottrattiva (suppression subtractive hybridization, SSH) è una tecnica basata sul confronto di due popolazioni di RNA molto

efficace per individuare i geni espressi soltanto in una delle due popolazioni sottoposta ad uno specifico trattamento e con la peculiarità di riuscire ad isolare anche sequenze poco espresse (Diatchenko *et al.* 1996).

I vantaggi della SSH rispetto alle altre tecniche di analisi di espressione genica sono: piccole quantità di RNA iniziali (1-2 µg) e un protocollo semplice e veloce. Il cDNA del campione di cui si vuole evidenziare il corredo genetico funge da “tester” mentre l’altro campione funge da “driver”. La figura mostra nei dettagli quali sono state le fasi operative dell’intero procedimento sperimentale:

1. Digestione del cDNA con RsaI
2. Ligazione degli adattatori
3. Prima ibridazione
4. Seconda ibridazione
5. Prima PCR
6. Seconda PCR

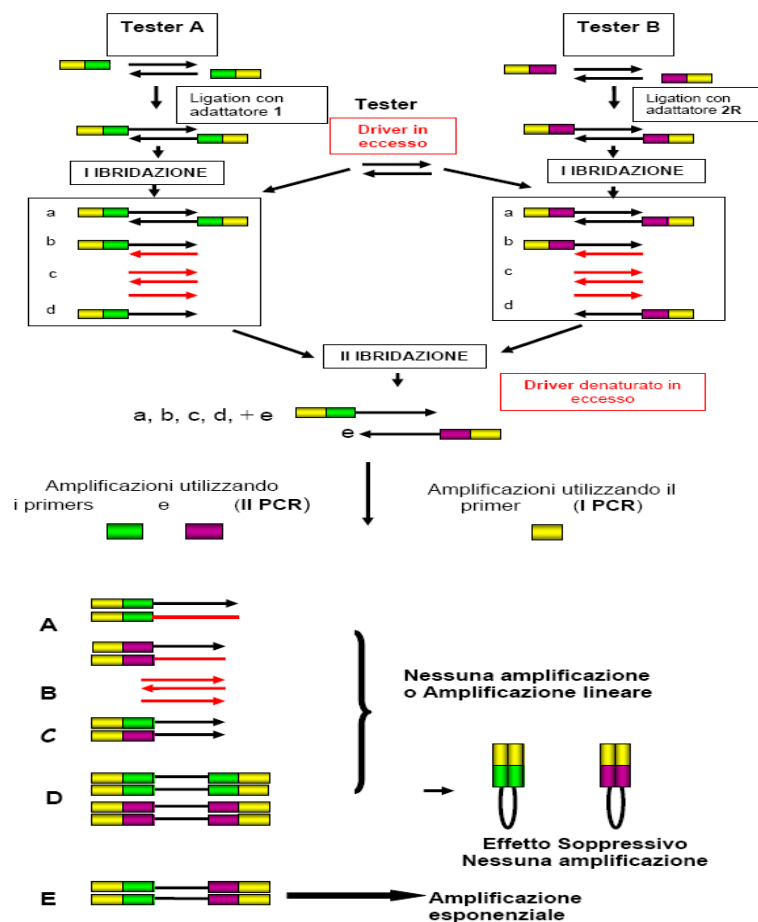


Figura 13: Rappresentazione schematica della PCR-Select

Dopo la digestione con *RsaI*, successiva purificazione e precipitazione, il cDNA “tester” viene suddiviso in 2 aliquote ed a ciascuna si lega un differente adattatore: 1 e 2R. Gli adattatori, privi del gruppo fosfato al 5', si legano solo all'estremità 5' del cDNA e permettono l'appaiamento dei primer nella fase di annealing ed amplificazione in PCR.

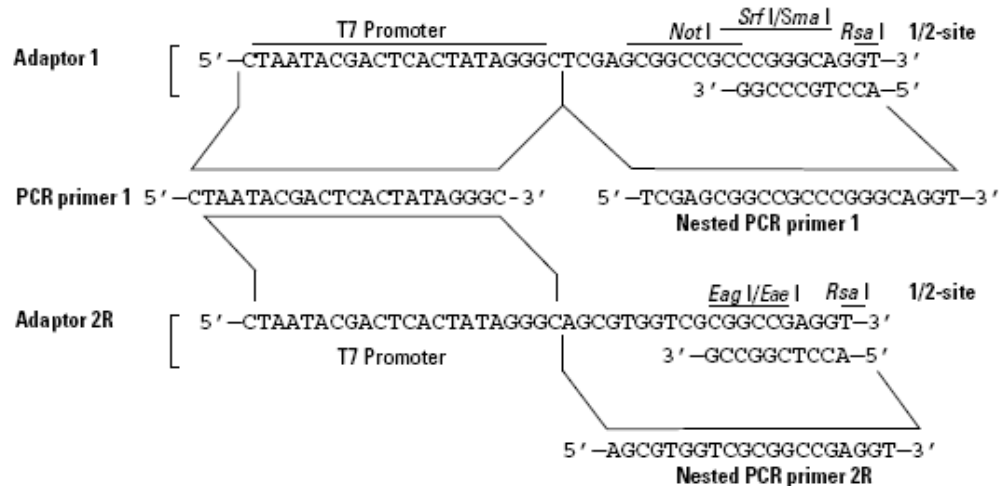


Figura 14: Sequenza degli adattatori e dei primer per la PCR.

Al cDNA “driver”, invece, non viene legato nessun adattatore. Nella prima ibridizzazione, il cDNA “driver” viene aggiunto in eccesso ad ogni campione di cDNA “tester” legato all’adattatore. In seguito a denaturazione per mezzo del calore e alla successiva fase di annealing si ottengono diverse generazioni di molecole in ogni campione indicate nella figura 13 con le lettere: **a**, **b**, **c** e **d**. In questa miscela, le molecole del **tipo b** si formano in quantità maggiore poichè, in una cinetica di ibridizzazione di ordine zero, il reannealing avviene più velocemente. Durante questa fase la maggior parte dei trascritti del “tester” non differenziali si lega al “driver” e la rimanente frazione del “tester”, che rimane a singolo filamento (molecole del **tipo a**), risulta arricchita di sequenze differenzialmente espresse. Nella seconda ibridizzazione i prodotti della 1° ibridizzazione vengono miscelati insieme al cDNA “driver” denaturato in eccesso. La frazione a singolo filamento del “tester” 1 ibriderà con la stessa frazione nel tester 2R, formando una popolazione di sequenze differenzialmente espresse a doppio filamento:

molecole ibride del **tipo e** contenenti alle due estremità i due adattatori. Ricostruite le estremità con l'enzima DNA polimerasi, i nuovi ibridi contengono alle estremità 5' e 3' differenti siti di annealing per i nested primer le cui sequenze sono complementari a quelle degli adattatori. L'intera popolazione creata è sottoposta a PCR per amplificare le sequenze desiderate differenzialmente espresse. Le molecole del **tipo a e d**, che hanno perso i siti di appaiamento dei primer, non subiscono alcuna amplificazione. Le molecole del **tipo b**, a causa dell'effetto soppressivo da PCR, non subiscono nessuna amplificazione richiudendosi su se stesse. Le molecole del **tipo c** che contengono un solo sito per l'annealing del primer subiscono un'amplificazione di tipo lineare. Solo le molecole del **tipo e** contenenti i due adattatori vengono amplificate esponenzialmente. Una seconda PCR serve a ridurre la quantità di prodotti secondari e ad arricchire la miscela di sequenze differenzialmente espresse. Infine, il cDNA ottenuto viene inserito all'interno di un vettore per la clonazione.

La tecnica descritta per sommi capi sopra ha permesso la costruzione di due librerie sottrattive:

- *SSH library Hg-Specifica*: ottenuta utilizzando come *tester* il cDNA retrotrascritto da RNA estratto e purificato (mRNA) dal micelio del fungo cresciuto in presenza di mercurio mercurico (10 ppm) e come *driver* il cDNA retrotrascritto da RNA estratto e purificato (mRNA) dal micelio del fungo cresciuto in presenza di cadmio (10 ppm);
- *SSH library Cd-Specifica*: ottenuta utilizzando come *tester* il cDNA retrotrascritto da RNA estratto e purificato (mRNA) dal micelio del fungo cresciuto in presenza di cadmio (10 ppm) e come *driver* il cDNA retrotrascritto da RNA estratto e purificato (mRNA) dal micelio del fungo cresciuto in presenza di mercurio mercurico (10 ppm).

La libreria mercurio-specifica contiene, pertanto, i geni di *T. harzianum* attivati o modulati positivamente dal mercurio e dalla quale sono stati sottratti i geni espressi in comune dal fungo cresciuto in presenza di cadmio. Viceversa, la libreria sottrattiva cadmio-specifica contiene i trascritti indotti da cadmio e dalla quale sono stati eliminati i geni uguali a quelli che il fungo esprime in presenza di mercurio.

Descrizione dettagliata delle diverse fasi

Digestione dei cDNA con l'enzima di restrizione RsaI

La digestione del cDNA a doppio filamento è stata effettuata utilizzando l'enzima di restrizione RsaI per ottenere frammenti più corti e con estremità coesive. La procedura operativa seguita prevedeva, in primo luogo, la preparazione di una miscela di reazione per ogni campione (HgCl₂ e CdSO₄). Essa è stata così preparata:

- **43,5 µL** **cDNA ds**
- **5,0 µL** **10 X Rsa I Restriction Buffer**
100 mM BisTris Propano HCl pH 7,0;
100 mM MgCl₂
1 mM DTT
- **1,5 µL** **Rsa I (10 u/µL)**
- **50,0 µL** **Volume finale**

La miscela così preparata è stata incubata a 37 °C per 90 minuti. Trascorso questo tempo, sono stati aggiunti 2,5 µL di EDTA/Glicogeno (soluzione 20 X) e 50 µL di miscela fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1) centrifugando il tutto a 14.000 rpm per 10 minuti a 25 °C. A questo punto, è stato recuperato il surnatante (fase acquosa) trasferendolo in una nuova provetta *ependorf*, è stato aggiunto un volume di miscela cloroformio:alcol isoamilico (24:1) ed è stato nuovamente centrifugato il tutto a 14.000 rpm per 10 minuti a 25 °C. Anche in questo caso è stata recuperata la fase acquosa trasferendola in altra *ependorf*, sono stati aggiunti 25 µL di NH₄Oac 4 M e 187,5 µL di etanolo 95 %. Il tutto è stato centrifugato per 10

minuti a 14.000 rpm e 25 °C. Dopo questa fase è stato eliminato il surnatante, sono stati aggiunti 200 µL di etanolo 80 % al *pellet* sul fondo della provetta ed è stata avviata un'altra centrifugazione alle medesime condizioni viste precedentemente. A questo punto, il surnatante è stato eliminato e il campione è stato lasciato ad asciugare per 5 minuti con lo scopo di permettere l'evaporazione dell'etanolo residuo. Questa fase è stata completata solubilizzando il precipitato con 5 µL di acqua *PCR-grade*.

Ligazione degli adattatori ai cDNA digeriti con *RsaI*

In questa fase era prevista la preparazione iniziale di una soluzione madre (*master mix*) da aggiungere a differenti campioni in ugual volume. Essa è stata preparata aggiungendo in una provetta eppendorf i seguenti reagenti:

- **14 µL 5 X DNA Ligation Buffer**
 250 mM Tris-HCl (pH 7,8)
 50 mM MgCl₂
 10 mM DTT
 0,25 mg/mL BSA
- **4 µL T4 DNA Ligasi (400 u/ µL; contenente 3 mM ATP)**
- **21 µL Acqua PCR-Grade**

A questo punto, è stata avviata la vera e propria reazione di ligazione aggiungendo in ogni *eppendorf* i diversi reagenti indicati dal protocollo come da schema seguente:

Reagenti	Mercurio		Cadmio	
	Tester 1-1	Tester 1-2	Tester 2-1	Tester 2-2
Tester cDNA *	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
Adattatore 1 (10 µM)	2 µL	-	2 µL	-
Adattatore 2 (10 µM)	-	2 µL	-	2 µL
Master	6 µL	6 µL	6 µL	6 µL
<i>Volume finale</i>	<i>10 µL</i>	<i>10 µL</i>	<i>10 µL</i>	<i>10 µL</i>

* 1 µL cDNA digerito con *RsaI* + 5 µL di acqua PCR-Grade

I campioni così preparati sono stati incubati a 16 °C per 24 h. La reazione di ligazione è stata bloccata aggiungendo 1 µL di miscela 20 X

EDTA/glicogeno (0,2 M EDTA; 1 mg/mL glicogeno) incubando i campioni a 72 °C per 5 minuti.

L'efficienza della ligazione è stata valutata mediante PCR. In particolare, i campioni di cDNA ligati con gli adattatori sono stati diluiti in H₂O (1:200) e mescolati con primer in base al seguente schema:

Componenti	Provette Eppendorf (µL)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Tester 1-1	1	1	-	-	-	-	-	-
Tester 1-2	-	-	1	1	-	-	-	-
Tester 2-1	-	-	-	-	1	1	-	-
Tester 2-2	-	-	-	-	-	-	1	1
forThG3PDH (10 µM)	1	1	1	1	1	1	1	1
revThG3PDH (10 µM)	-	1	-	1	-	1	-	1
PCR Primer 1 (10 µM)	1	-	1	-	1	-	1	-

Le sequenze dei primer utilizzati sono le seguenti:

- **forThG3PDH (10 µM)** 5'-ACCACCGTCCACTCCTACAC-3'
- **revThG3PDH (10 µM)** 5'-ACGACCTCGTCGCTGGTGTA-3'
- **PCR Primer 1 (10 µM)** 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

I primi due primer che amplificano un frammento di 380 bp sono stati utilizzati come controllo. Essi sono stati disegnati sulla base della sequenza nucleotidica della gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi di *T. harzianum* nota in banca dati e forniti dalla Eurofins MWG GmbH.

In ciascuna provetta tipo *epENDORF* sono stati aggiunti 22 µL soluzione madre preparata così come segue:

-2,5 µL	10X PCR reaction buffer 200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl
-0,5 µL	dNTP Mix 10 mM cad. di dATP, dCTP, dTTP, dGTP
-0,75 µL	MgCl₂ (50 mM)
-0,2 µL	DNA polimerasi (5u/ µL) <i>Taq</i> DNA Polymerase, recombinant (Invitrogen)
-18,05 µL	Acqua PCR-Grade

-22 μ L **Volume finale (per ogni campione)**

I campioni sono stati miscelati, ricoperti da una goccia di olio minerale per evitare l'evaporazione e incubati a 75 °C per 5 minuti al fine di permettere l'estensione degli adattatori.

Immediatamente dopo è stata avviata la reazione di PCR in termociclatore *MyCycler* (Biorad) alle seguenti condizioni:

Denaturazione 94 °C, 3 minuti, 1 ciclo

Amplificazione:

<i>Denaturazione</i>	94 °C, 45 secondi	} 30 cicli
<i>Appaiamento</i>	55 °C, 30 secondi	
<i>Allungamento</i>	72 °C, 1,5 minuti	

Allungamento finale 72 °C, 5 minuti, 1 ciclo

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 2 % in tampone TAE.

Prima ibridazione

La prima ibridazione è stata effettuata combinando i seguenti reagenti in provette *ependorf* da 500 μ L in base ai seguenti schemi:

Campione "Mercurio"

Reagente	Tester 1-1	Tester 1-2
cDNA digerito con <i>RsaI</i> (<i>driver</i>)	1,5 μ L	1,5 μ L
Tester 1-1 con adattatore 1 ligato	1,5 μ L	-
Tester 1-2 con adattatore 2R ligato	-	1,5 μ L
4X Hybridization Buffer	1,0 μ L	1,0 μ L
<i>Volume finale</i>	4,0 μ L	4,0 μ L

Campione "Cadmio"

Reagente	Tester 2-1	Tester 2-2
cDNA digerito con <i>RsaI</i> (<i>driver</i>)	1,5 μ L	1,5 μ L
Tester 2-1 con adattatore 1 ligato	1,5 μ L	-
Tester 2-2 con adattatore 2R ligato	-	1,5 μ L
4X Hybridization Buffer	1,0 μ L	1,0 μ L
<i>Volume finale</i>	4,0 μ L	4,0 μ L

I campioni così preparati sono stati ricoperti con una goccia di olio minerale, incubati a 98 °C per 90 minuti e in seguito a 68 °C per circa 8 ore.

Seconda ibridazione

I prodotti derivanti dalla prima ibridazione sono stati riuniti in un'unica provetta *ependorf*. Alla soluzione così formata è stato aggiunto altro driver denaturato per arricchire ulteriormente la sequenze differenzialmente espresse.

Le fasi della seconda ibridazione sono state le seguenti:

- Preparazione delle soluzioni contenenti i cDNA *driver* come da schema qui riportato:

Reagenti	Hg (µL)	Cd (µL)
cDNA <i>driver</i>	1	1
4X Hybridization Buffer	1	1
Acqua PCR-Grade	2	2
<i>Volume finale</i>	4	4

- Trasferimento dalle soluzioni così preparate di 1 µL in provetta *ependorf* da 500 µL e aggiunta di una goccia di olio minerale
- Incubazione a 98 °C per 90 secondi
- Trasferimento dei campioni nelle provette *ependorf* contenenti i prodotti della prima ibridazione
- Incubazione a 68 °C per 24 h
- Aggiunta di 200 µL di *Dilution buffer pH 8,3* (20 mM HEPES pH 6,6; 20 mM NaCl; 0,2 mM EDTA pH 8,0)
- Incubazione a 68 °C per 7 minuti
- Conservazione a – 20 °C.

Amplificazione mediante PCR

Prima d'avviare la prima amplificazione mediante PCR è stata preparata una soluzione madre (*master mix*) come indicato dallo schema sottostante:

-15 µL	10X PCR reaction buffer 200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl
-3 µL	dNTP Mix 10 mM cad. di dATP, dCTP, dTTP, dGTP
-6 µL	PCR Primer 1 (10 µM)
-3 µL	50X Advantage cDNA Polymerase Mix KlenTaq-1 DNA Polymerase
-117 µL	Acqua PCR-Grade
-144 µL	Volume finale (per 6 campioni)

Dopo aver preparato la soluzione madre, aliquote di 24 µL sono state distribuite in 6 provette *ependorf* contenenti 1 µL ciascuna di cDNA bersaglio. Le provette così preparate sono state coperte con una goccia di olio minerale e incubati a 75 °C per 5 minuti. Subito dopo sono state avviate le reazioni di PCR alle condizioni indicate qui di seguito:

Denaturazione 94 °C, 25 secondi, 1 ciclo

Amplificazione:

<i>Denaturazione</i>	94 °C, 10 secondi	} 27 cicli
<i>Appaiamento</i>	66 °C, 30 secondi	
<i>Allungamento</i>	72 °C, 1,5 minuti	

Allungamento finale 72 °C, 3 minuti, 1 ciclo

I prodotti ottenuti da quest'amplificazione sono stati utilizzati nella PCR secondaria. Prima della sua realizzazione è stata preparata una soluzione madre come da schema di seguito:

-15 µL	10X PCR reaction buffer 200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl
-3 µL	dNTP Mix 10 mM cad. di dATP, dCTP, dTTP, dGTP
-6 µL	Nested Primer 1 (10 µM)
-6 µL	Nested Primer 2R (10 µM)

-3 µL	50X Advantage cDNA Polymerase Mix KlenTaq-1 DNA Polymerase
-111 µL	Acqua PCR-Grade
-144 µL	Volume finale (per 6 campioni)

Dopo aver preparato la soluzione madre, aliquote di 24 µL sono state distribuite in 6 provette *ependorf* contenenti 1 µL di una diluizione 1:30 di prodotto amplificato nella PCR primaria.

I campioni così preparati sono stati ricoperti con una goccia di olio minerale e sottoposti alle reazioni di PCR in termociclatore alle seguenti condizioni:

Denaturazione	94 °C, 30 secondi	} 20 cicli
Appaiamento	68 °C, 30 secondi	
Allungamento	72 °C, 1,5 minuti	

I prodotti amplificati sono stati conservati a -20 °C e successivamente utilizzati per il clonaggio genico mediante vettore plasmidico.

Gli amplificati ottenuti dalle PCR primaria e secondaria sono stati analizzati sottoponendo 8 µL ad elettroforesi in gel d'agarosio al 2 % in tampone TAE impiegando una cella elettroforetica (*Sub-Cell GT, Bio-Rad*).

I frammenti sono stati colorati con bromuro d'etidio e osservati in un transilluminatore a luce UV.

2.2.8 Clonaggio genico

I frammenti di cDNA, differenzialmente espressi ed amplificati, sono stati inseriti mediante trattamento con T4 DNA ligasi in una molecola di DNA *carrier* detta vettore, in modo che l'intera molecola ricombinante possa essere replicata in quantità illimitate all'interno di un batterio come *E. coli*, che cresce e si divide rapidamente.

In questo modo il frammento viene clonato, generando una collezione di cloni che viene definita libreria genica di cDNA.

La scelta del vettore dipende da vari fattori quali la complessità, la maneggevolezza, la selezione e la loro capacità d'inserzione. Un esempio di vettore disponibile per il clonaggio è il plasmide *pGEM-T Easy Vector* (Promega).

Qui di seguito viene mostrata una molecola di DNA circolare chiusa presente nei batteri come materiale extracromosomico (Fig. 15).

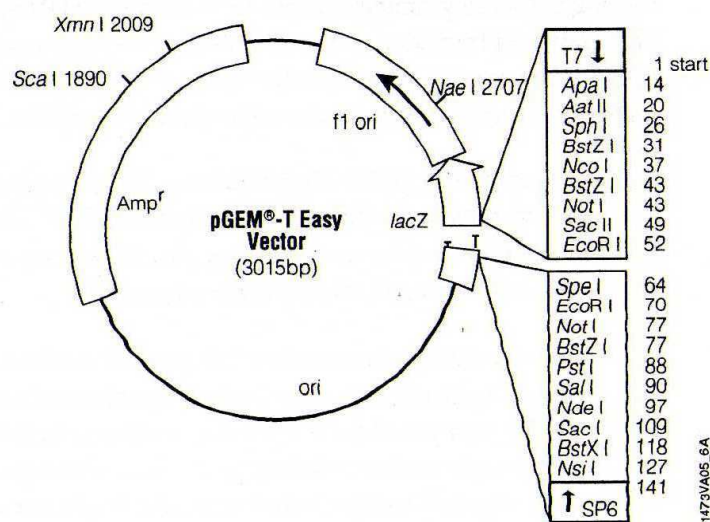


Figura 15: pGEM-T Easy Vector e zona di clonaggio multipla.

Questo vettore, presente in natura, è stato modificato e potenziato in laboratorio per acquisire numerosi vantaggi quali:

- Dimensioni ridotte rispetto all'originario per permetterne un facile inserimento nel batterio.
- Un'origine di replicazione rilassata che consente la replicazione del plasmide non strettamente collegata alla divisione cellulare e quindi molto più frequente di quella cromosomica.

- Resistenza ad un antibiotico come l'ampicillina che consente la selezione delle cellule batteriche contenenti il plasmide.
- Zona di polylinker nel plasmide detta anche sito di clonaggio multiplo (MSC) che contiene i siti di taglio per gli enzimi di restrizione. La varietà di siti di restrizione permette di trovare facilmente un enzima adatto sia per il vettore che per il frammento di DNA estraneo da inserire. Inoltre, questo sito fa parte del gene *lacZ* che codifica per una porzione del polipeptide β -galattosidasi (zona aminotermine di 150 aminoacidi). Quando il plasmide viene inserito all'interno della cellula batterica, il gene può essere attivato aggiungendo al terreno l'induttore isopropil- β -D-tiogalattopiranoside (IPTG) che induce la produzione dell'enzima β -galattosidasi, codificando la zona carbossiterminale. L'enzima attivo è in grado di idrolizzare una sostanza incolore, X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galattopiranoside), producendo un composto blu insolubile. Tuttavia, la presenza di un inserto nella regione MSC interrompe il gene *lacZ* e l'enzima risultante, non essendo attivo, è incapace di idrolizzare X-Gal. In questo modo un plasmide ricombinante è facilmente individuabile poiché, in presenza di X-Gal, le cellule che lo contengono producono colonie bianche o incolore, mentre quelle che non lo contengono formano colonie blu. Questo sistema, detto selezione bianco/blu, consente l'identificazione molto rapida dei ricombinanti.

Il plasmide pGEM viene tagliato con l'enzima di restrizione *EcoR* V che crea estremità coesive con una timina in posizione 3' (Fig. 16).

La presenza della base timina favorisce l'inserimento del DNA estraneo avente adenine all'estremità terminale 3'.

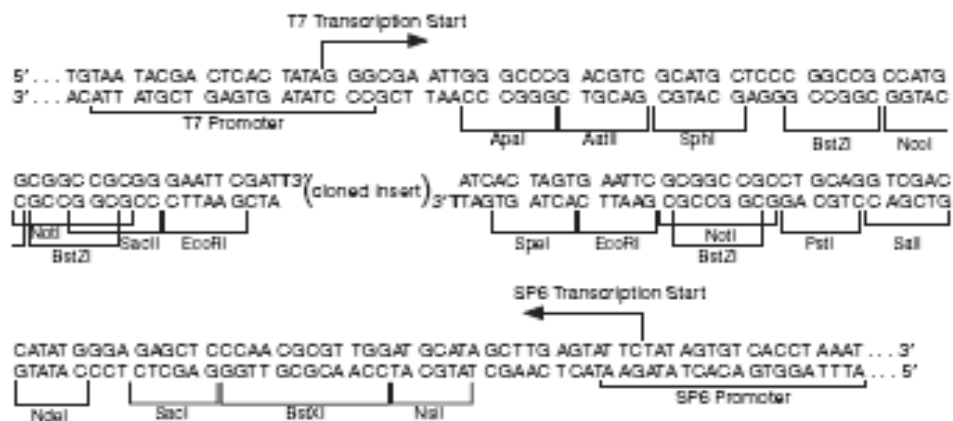


Figura 16: pGEM-T Easy Vector e zona di inserto del clone.

L'inserimento è stato effettuato utilizzando il "Protocol for Ligations Using the pGEM-T Easy Vector" (Promega) e miscelando in un tubo da 0,5 ml i seguenti reagenti secondo la tabella di seguito mostrata:

Tabella 2: Reazione standard d'inserzione del clone.

Reagenti	Libreria Hg-Specifica	Libreria Cd-Specifica
2X Rapid Ligation Buffer	5 µl	5 µl
pGEM-T Easy Vector	1 µl	1 µl
Prodotti della 2° PCR	3 µl	3 µl
T4 DNA Ligase	1 µl	1 µl
Volume totale	10 µl	10 µl

I campioni sono stati incubati a 4°C *overnight*. Le successive fasi operative sono state:

- Preparazione del terreno di coltura
- Preparazione del brodo di coltura
- Trasformazione
- Miniprep

Preparazione del terreno LB-AMP SOLIDO

E' stato preparato un terreno per la crescita delle colonie su piastra avente la seguente composizione (per 1 litro di substrato):

- 15 g Agar

- 10 g Bacto-tryptone
- 5 g Bacto-yeast extract
- 5 g NaCl
- *H₂O distillata fino a volume*

La soluzione è stata portata ad un pH pari a 7 con idrossido di sodio ed è stata sterilizzata in autoclave a 120 °C per 30 minuti. Una volta raffreddata (circa 40 °C) è stata aggiunta ampicillina (100 µg/ml), IPTG (0.5 mM) e X-Gal (80 µg/ml). Il terreno è stato versato in piastre *Petri* flambando velocemente in camera sterile.

Preparazione del brodo LB medium

Il suddetto brodo di coltura è stato preparato con i seguenti componenti (per 1 litro di soluzione):

- 10 g Bacto-tryptone
- 5 g Bacto-yeast extract
- 5 g NaCl
- *H₂O distillata fino a volume*

La soluzione è stata portata ad un pH pari a 7 con idrossido di sodio ed è stata sterilizzata in autoclave a 120 °C per 30 minuti. Una volta raffreddata (circa 40 °C), è stata aggiunta ampicillina ad una concentrazione finale di 100 µg/ml.

Trasformazione

Viene definita trasformazione la procedura che permette l'incorporazione del plasmide nel batterio. Essa è stata effettuata seguendo il protocollo "*Transformation Using the pGEM-T Easy Vector*" (Promega) e utilizzando cellule ospiti "*JM109 High Efficiency Competent Cell*" (Promega). Trasferiti i 10 µl dei prodotti di ligazione in una provetta *ependorf* sterile da 1,5 mL, sono stati aggiunti 50 µL di cellule batteriche di *E. coli*. Il tutto è stato posto in ghiaccio per 30 minuti dopo miscelazione del contenuto per

pipettamento. E' stato effettuato lo shock termico riscaldando dapprima le provette a bagnomaria alla temperatura di 42 °C per 50 secondi e successivamente ponendo i campioni di nuovo in ghiaccio. A questa miscela di reazione sono stati aggiunti 950 µL di substrato *SOC medium* costituito da: Bacto-tryptone 2 %; Bacto-yeast extract 0,5 %; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgSO₄ 10 mM; MgCl₂ 10 mM e C₆H₁₂O₆ 20 mM. Il tutto è stato incubato per 90 minuti a 37°C sotto continua agitazione. Infine, 1000 µL di ogni campione sottoposto a trasformazione, sono stati distribuiti con anse sterili mediante *streak-plate method* (strisciamento) sui terreni preparati precedentemente. Le piastre sono state incubate a 37 °C *overnight* (Fig. 17). Trascorso il periodo d'incubazione, le colonie batteriche trasformate con plasmidi contenenti l'inserto apparivano di colore bianco. Dopo essere state conteggiate e numerate, con l'aiuto di pinzette e bastoncini sterilizzati, sono state prelevate ed incubate in beute contenenti 6 mL di LB + ampicillina (100 µg/mL) a 37°C *overnight* sotto agitazione, in modo tale da ottenere una concentrazione di cellule batteriche ottimale per la successiva estrazione di DNA plasmidico.

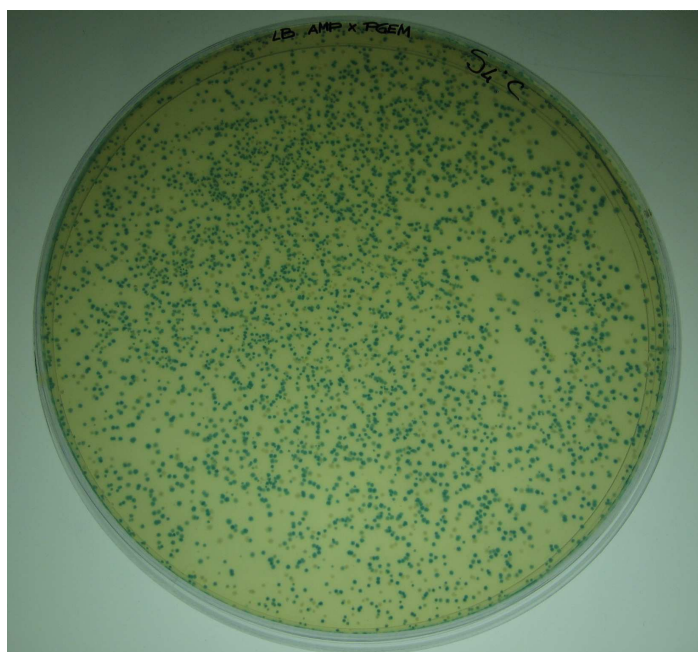


Figura 17: Piastra Petri, SSH library Hg-specifica.

Miniprep

Per isolare il DNA plasmidico dalle cellule di *E. coli* trasformate è stato utilizzato il “*Pure Link Quick Plasmid Miniprep Kit*” (Invitrogen).



Figura 18: Incubazione coltura liquida.

Trascorse 24 h, la coltura liquida è stata divisa in due aliquote: un’aliquota destinata allo stock in glicerolo e conservata a -80°C , l’altra destinata alla *miniprep*. La procedura consiste nel precipitare le cellule, centrifugando a 4000 rpm per 15 minuti e risospenderle con un Buffer contenente Rnase A. L’aggiunta successiva di *Lysis Buffer* permette la parziale lisi delle cellule con conseguente fuoriuscita del plasmide. Per la separazione del DNA batterico è stato aggiunto il *Precipitation Buffer* avente funzione di neutralizzare la soluzione, bloccando così il processo di lisi. A questo punto il tutto è stato centrifugato, trasferendo il surnatante in colonne filtranti contenenti una speciale membrana silicea. Questa permette di legare il DNA plasmidico e di “scartare” il lisato cellulare (Fig. 19).

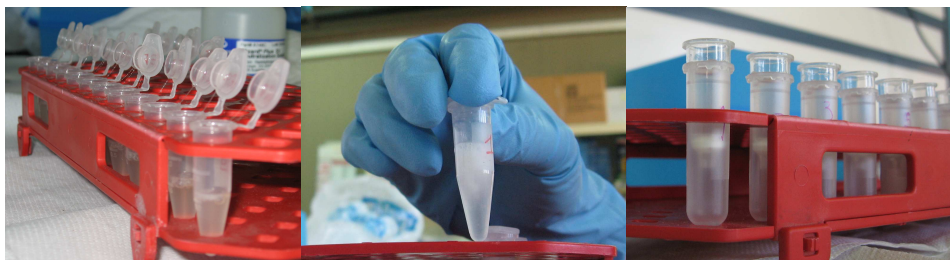


Figura 19: Lisi, precipitazione e purificazione in colonna.

Dopo i lavaggi della colonna con *Wash Buffer W10* e *Wash Buffer W9*, il DNA plasmidico è stato eluito con *TE Buffer*.

La presenza degli inserti nei plasmidi purificati è stata verificata mediante PCR utilizzando la coppia di primer *pUC/M13* (Promega) di cui si riportano le sequenze:

Forward: 5'-d(CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC)-3'

Reverse: 5'-d(TCACACAGGAAACAGCTATGAC)-3'

La miscela di reazione è stata così preparata:

-5,0 µL	10X PCR reaction buffer 200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl
-1,0 µL	dNTP Mix 10 mM cad. di dATP, dCTP, dTTP, dGTP
-1,0 µL	Primer pUC/M13 forward(100 µM)
-1,0 µL	Primer pUC/M13 reverse(100 µM)
-1,5 µL	MgCl₂ (50 mM)
-0,25 µL	DNA polimerasi (5u/ µL) <i>Taq</i> DNA Polymerase, recombinant (Invitrogen)
-0,5 µL	Plasmide purificato
-39,75 µL	Acqua PCR-Grade
-50 µL	Volume finale

mentre le condizioni di PCR sono state le seguenti:

<i>Denaturazione</i>	<i>94 °C, 2 minuti, 1 ciclo</i>
<i>Amplificazione:</i>	
<i>Denaturazione</i>	<i>94 °C, 1 minuto</i>
<i>Appaiamento</i>	<i>55 °C, 1 minuto</i>
<i>Allungamento</i>	<i>72 °C, 1 minuto</i>
	} <i>30 cicli</i>
<i>Allungamento finale</i>	<i>72 °C, 7 minuti, 1 ciclo</i>

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati su gel d'agarosio (1%) colorato con bromuro d'etidio. Il DNA plasmidico dei cloni è stato quantificato mediante “*Quant-iT DNA Assay Kit* (Invitrogen)” e precipitato con acetato d'ammonio 3 M (1/10 di volume) ed etanolo (2,5 volumi). Dopo centrifugazione a 13.000 rpm per 10 minuti il *pellet* è stato asciugato all'aria per 10 minuti in modo da eliminare i residui d'etanolo.

Analisi delle sequenze

I plasmidi precipitati sono stati inviati per l'analisi della sequenza presso la “*EUROFINS MWG GmbH*” (Germania) che ha effettuato il sequenziamento automatico degli inserti con il primer T7. Una volta sequenziati, le sequenze nucleotidiche dei singoli cloni sono state confrontate con quelle depositate nelle banche dati (*GenBank database*) utilizzando il programma BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990) disponibile on-line ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)).

2.3 Analisi dei livelli d'espressione genica mediante Real-Time RT-PCR

2.3.1 Condizioni di crescita del fungo e prelievo del micelio

Sono state realizzate due serie d'esperimenti di *Real-Time RT-PCR*. In entrambi i casi la concentrazione conidica finale è stata di 100.000 spore per ogni bottiglia di *Roux* (150 mL). Per la prima serie d'esperimenti le soluzioni di metalli pesanti impiegate sono state CdSO₄ e HgCl₂ con una concentrazione finale di 10 ppm. La sterilizzazione di queste soluzioni è stata realizzata in autoclave, contestualmente a quella del substrato Czapek. Relativamente alla seconda serie di esperimenti, la concentrazione della

soluzione di cloruro mercurico utilizzata è stata di 1 ppm mentre la sua sterilizzazione è avvenuta mediante microfiltrazione. Le colture sono state incubate in termostato a 24 ± 1 °C al buio per un periodo di 4 giorni e tutta l'attrezzatura necessaria all'estrazione di RNA è stata trattata con una soluzione allo 0,1 % di dietil-piropirone. Infine, dopo la frantumazione, il micelio è stato distribuito in provette *falcon RNasi free* e conservato a -80 °C fino alla successiva fase di estrazione dell'RNA totale.

2.3.2 Estrazione dell'RNA totale, quantificazione e retro trascrizione in cDNA

L'estrazione di RNA totale dal micelio fungino è stata effettuata mediante l'utilizzo del kit "*RNAagents Total RNA Isolation System*" (Promega). L'intera procedura, già descritta nei particolari nel precedente paragrafo, è costituita da tre fasi principali:

- Estrazione dell'RNA
- Precipitazione e Risospensione dell'RNA
- Lavaggio RNA

Anche in questo caso la quantità di campione di partenza è stata di 0,5 g. Tralasciando la descrizione dettagliata delle fasi operative, per le quali si rimanda al paragrafo 2.2.3, è bene sottolineare che l'intera procedura è stata eseguita in maniera tale da eliminare la presenza dell'enzima RNasi.

Dopo l'estrazione dell'RNA totale, purificazione in mRNA (procedura operativa e kit "*Oligotex for purification of poly A⁺ RNA from total RNA*" della QIAGEN descritto nel paragrafo 2.2.5) e sua quantificazione (metodo *Quant-it* descritto nel paragrafo 2.2.4), è stata effettuata la retro trascrizione in cDNA. In questo caso, per la sua realizzazione, è stato eseguito il primo step indicato dal kit "*SuperScript III Platinum Two-Step qRT-PCR with SYBR Green*" (Invitrogen). Il cDNA è una molecola di DNA a filamento singolo che viene prodotta su uno stampo di RNA a opera dell'enzima

trascrittasi inversa (RT). Il cDNA è sintetizzato quindi a partire da mRNA maturo (già sottoposto a splicing negli eucarioti) utilizzando tale enzima. La trascrittasi inversa, una DNA polimerasi diretta da RNA, opera su un singolo filamento di mRNA generando il DNA complementare basandosi sull'appaiamento delle basi azotate (regole di Chargaff) fra RNA (A, U, G, C) e DNA (A, T, G, C). Per ottenere cDNA eucariota:

1. una cellula eucariota trascrive il DNA in RNA (pre-mRNA);
2. la stessa cellula processa i filamenti di pre-mRNA eliminando gli introni, aggiungendo un'estremità poli-A ed un cappuccio 5' (chiamato anche cappuccio RNA 7-metilguanosina o RNA 7-G);
3. i filamenti di mRNA maturo vengono estratti dalla cellula;
4. l'mRNA viene messo in soluzione a contatto con un oligonucleotide primer di poli-T, che ibridizza con la coda poli-A dell'mRNA.
5. la trascrittasi inversa riconosce il primer ed avvia la produzione del cDNA, in presenza dei deossinucleotidi necessari per l'allungamento (senza la presenza del primer, l'enzima non esplica la propria funzione).

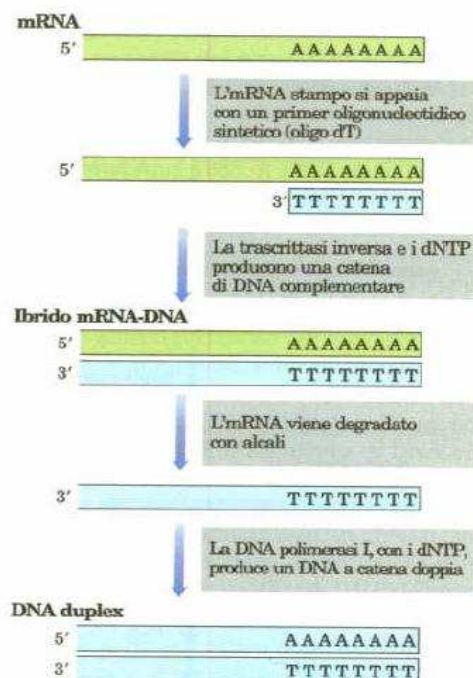


Figura 20: Costruzione della catena di cDNA a partire da mRNA.

In questo specifico caso, dapprima è stata utilizzata la *trascrittasi inversa* e un primer oligo-(dT) contenente un gruppo 3'-OH libero ("*2X-RT Reaction Mix*") mentre, nella seconda fase, alla miscela di reazione è stato aggiunto un enzima con attività ribonucleasica (RNA-asi H) che degrada l'RNA degli ibridi DNA-RNA neoformati. Il primer utilizzato è stato un oligonucleotide di deossitimidina (oligo-dT) composto da circa 12-18 bp in grado di legarsi specificatamente alla sequenza di poli-(A) presente all'estremità 3' della maggior parte delle molecole di mRNA degli eucarioti. Oltre al primer e alla RT, vengono forniti i 4-deossiribonucleotidi trifosfato per consentire la costruzione della prima catena di cDNA. La costruzione della prima catena di cDNA, a partire dall'RNA estratto dal micelio di *T. harzianum* cresciuto in presenza di cadmio, mercurio e in assenza dei suddetti metalli pesanti (controllo), è stata effettuata preparando 3 provette da 200 µl per ogni campione, suddivise secondo tale schema:

- 3 provette per campione "*T. harzianum* cresciuto in presenza di mercurio" [+RT]
- 3 provette per campione "*T. harzianum* cresciuto in presenza di cadmio" [+RT]
- 3 provette per campione "*T. harzianum* controllo" [+RT]

- 3 provette per campione "*T. harzianum* cresciuto in presenza di mercurio" [-RT]
- 3 provette per campione "*T. harzianum* cresciuto in presenza di cadmio" [-RT]
- 3 provette per campione "*T. harzianum* controllo" [-RT]

Come si vede dallo schema sopra, nel primo gruppo di provette (9 totali) è stato aggiunto l'enzima trascrittasi inversa per dar luogo alla formazione di cDNA [+RT]. Il secondo gruppo di provette, in cui non è stata aggiunta trascrittasi inversa [-RT], è stato utilizzato come controllo negativo dell'avvenuta conversione da mRNA a cDNA. In base al protocollo fornito

dalla casa produttrice per ogni provetta si è fatto riferimento a un volume finale di 20 μL che sono stati suddivisi come segue:

- **12 μL di soluzione madre**
- **8 μL da ripartire fra RNA del campione e $\text{H}_2\text{O-DEPC}$**

La soluzione madre, per ogni campione, è stata così preparata:

- **10 μL di 2X-RT Reaction Mix** (contenente oligo-dT₂₀, 10 mM MgCl_2 , dNTPs e un tampone specifico ottimizzato dalla casa produttrice per la sintesi della prima catena di cDNA e per la realizzazione delle Real-time RT-PCR)
- **2 μL di RT Enzyme Mix** (contenente Superscript III RT e RNAsi-Out, per degradare l'eventuale RNAsi ancora presente).

Al fine di convertire in cDNA una quantità di RNA uguale per tutti i campioni è stata considerata come punto di partenza la quantità di RNA determinata precedentemente ($\text{ng}/\mu\text{L}$) e dai dati è stato possibile risalire al campione limitante (il campione a concentrazione più bassa di RNA $\text{ng}/\mu\text{L}$). Applicando la seguente proporzione è stata determinata la quantità in ng presente in 8 μL finali:

$$1. \text{ RNA limitante (ng}/\mu\text{L)} : 1 \mu\text{L} = X \text{ (ng)} : 8 \mu\text{L}$$

Successivamente, dai ng determinati, è stato calcolato il volume di RNA da prelevare da ogni campione (μL) secondo la seguente proporzione:

$$2. \text{ RNA dei diversi campioni (ng}/\mu\text{L)} : 1 \mu\text{L} = \text{ng determinati} : X \text{ (}\mu\text{L)}$$

A questo punto, ad ogni campione [+RT] e [-RT] sono stati aggiunti in successione $\text{H}_2\text{O-DEPC}$, RNA e soluzione madre. Il volume di $\text{H}_2\text{O-DEPC}$

Treated ovviamente è dato dalla differenza fra 8 μL totali e il volume (μL) determinato per l'RNA. La quantità di soluzione madre è stata preparata in un'unica provetta in base al numero delle reazioni totali. Al fine di proteggere l'RNA dalla degradazione tutti i campioni sono stati posti in ghiaccio per l'intera durata della fase operativa. Infine, le provette così preparate, sono state incubate a:

- 25 °C, 10 minuti
- 42 °C, 50 minuti
- 85 °C, 5 minuti

In seguito, a ciascun campione è stato aggiunto 1 μL di RNasi H, incubando per 20 minuti a 37 °C. La catena di cDNA così sintetizzata è stata conservata a -20 °C per le successive fasi sperimentali.

2.3.3 Real-Time RT-PCR: principio ed esecuzione

La PCR real-time, denominata anche PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale (rtq-PCR), è un metodo di amplificazione (PCR) e quantificazione simultanee del DNA. La PCR (*Polymerase Chain Reaction* o *Reazione a catena della polimerasi*) è una tecnica mediante la quale un frammento di acido desossiribonucleico (DNA) può essere riprodotto in un gran numero di copie. Tale tecnica fu messa a punto nel 1983 dal biochimico statunitense Kary B. Mullis e dal suo collaboratore Fred A. Faloona presso la *Cetus Corporation di Emeryville, California*. Al momento della sua scoperta, la PCR non sembrava avere una rilevanza pratica; soltanto a partire dal 1991 essa cominciò a essere utilizzata e attualmente è largamente conosciuta nei laboratori di tutto il mondo. La PCR rende più rapido l'ottenimento di copie di un frammento di DNA rispetto alla classica tecnica del clonaggio. La reazione a catena della polimerasi si basa sullo stesso meccanismo di duplicazione del DNA che si verifica all'interno delle

cellule viventi. Durante il processo di duplicazione i due filamenti si separano e un enzima specifico, la DNA-polimerasi, produce una copia di ciascuno, utilizzandolo come stampo. La polimerasi procede appaiando un nucleotide complementare a ogni nucleotide di un filamento; in tal modo si formano due catene di DNA identiche a quella iniziale. Normalmente il processo si verifica in una cellula durante la mitosi, ossia durante il processo di divisione cellulare che porta alla formazione di due cellule figlie geneticamente identiche alla madre. Per lo svolgimento della PCR, è necessaria la presenza dell'enzima DNA polimerasi, dei quattro (ATGC) deossinucleotidi liberi e di un breve filamento di nucleotidi, purificato in laboratorio, che ha la funzione d'innescare la reazione. Esso prende il nome di *primer* o iniziatore oligonucleotidico (vedi Fig. 21). La reazione a catena della polimerasi avviene in tre fasi. Nella prima, denominata *denaturazione* (*denaturation*), il frammento di DNA viene riscaldato a una temperatura di 90-95 °C per 30 secondi, allo scopo di indurre la separazione dei due filamenti complementari che lo compongono. Nella seconda fase, detta *annealing* o *attacco*, la temperatura viene mantenuta per 20 secondi a 55 °C, il che determina la formazione del legame tra i *primers* con i due filamenti di DNA. Nella terza fase, la *polimerizzazione* o *extention*, la temperatura viene innalzata a 72 °C e la polimerasi copia con grande rapidità il DNA, aggiungendo a ciascun filamento i nucleotidi complementari. Queste tre fasi costituiscono un ciclo della PCR che si realizza in meno di 2 minuti. Teoricamente un ciclo potrebbe ripetersi in modo indefinito ma, in realtà, i nucleotidi liberi, la polimerasi e i *primers* devono essere rinnovati ogni 30 cicli circa. Nell'arco di 30 cicli, generalmente in meno di tre ore, si possono ottenere un miliardo di molecole di DNA. L'enzima polimerasi, utilizzato nei primi esperimenti della reazione a catena della polimerasi, risultava degradarsi facilmente al calore; ciò costringeva i ricercatori ad aggiungere una certa quantità di enzima per ciascun ciclo in modo da sostituire le molecole enzimatiche inattivate nel corso della reazione. Attualmente i ricercatori dispongono di una variante termostabile della polimerasi denominata *Taq* che non subisce

l'effetto del calore. All'inizio tale enzima veniva estratto da *Thermus aquaticus*, un batterio termofilo che vive nelle pozze di acqua calda del parco nazionale di Yellowstone. La polimerasi *Taq* viene attualmente ottenuta in laboratorio da batteri modificati geneticamente. Durante l'esecuzione della PCR è necessario impedire che la miscela di reazione venga contaminata con frammenti di DNA diversi da quelli che si vogliono amplificare.

La Real-Time PCR è una tecnica che consente di amplificare un DNA partendo da un pool di RNA di un tipo cellulare e utilizza una strategia che consente di rilevare l'amplificato nel momento stesso in cui si forma (Heid, 1996). Questa tecnica, che si è molto evoluta rispetto alla sua primitiva versione in cui veniva impiegato l'etidio bromuro, si basa sull'impiego di leganti fluorescenti, o di sonde marcate con composti fluorescenti, oppure di inneschi a marcatura fluorescente, che forniscono un segnale la cui intensità, misurabile in ogni singolo istante, è direttamente correlata con la quantità di amplificato in quello stesso istante (Marin, 1999).

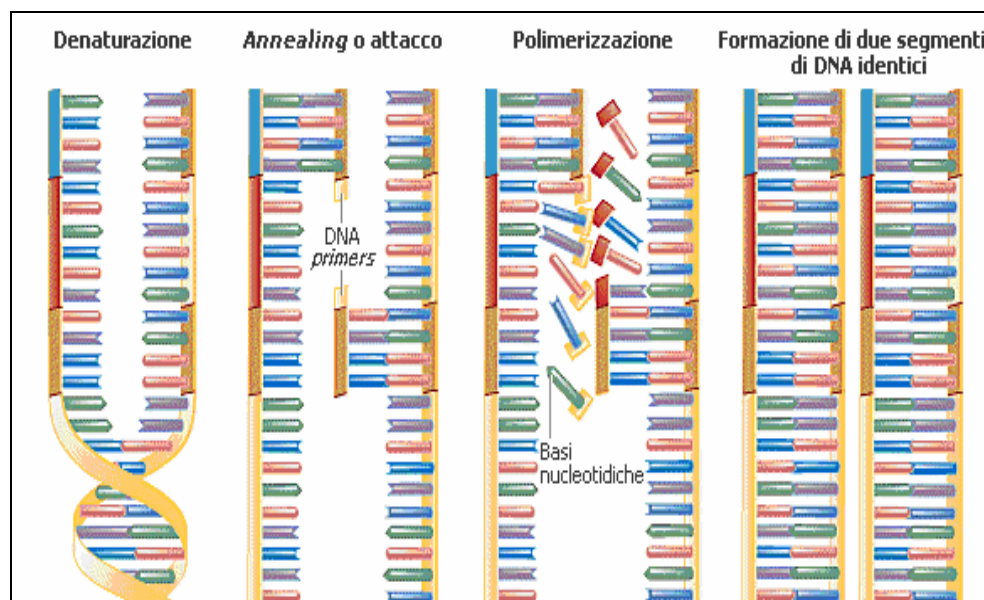


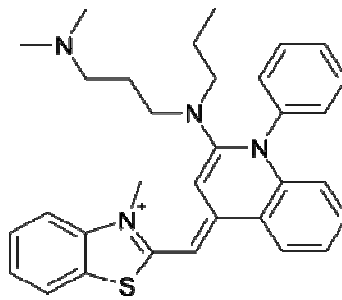
Figura 21: Reazione a catena della DNA-polimerasi.

E' costituita da due tappe: 1° Retro trascrizione del RNA; 2° Amplificazione del cDNA ottenuto nella tappa 1. Questa tipologia di PCR è capace di

fornire in tempo reale informazioni precise e riproducibili sulla quantità iniziale di acido nucleico presente come stampo nella miscela di reazione. Ciò è reso possibile grazie all'uso di una strumentazione collegata ad un sistema di rilevazione per la raccolta dati. Tale strumentazione consta di un dispositivo di regolazione ciclica della temperatura, di un computer, di un rivelatore ottico per l'emissione fluorescente, di un apparecchio d'acquisizione dei dati e di un software d'analisi. L'indicatore grazie al quale è possibile risalire con estrema sensibilità alla quantità di stampo è la fluorescenza emessa dal campione durante ogni ciclo di sintesi, a differenza di quanto avviene nelle altre forme di RT-PCR quantitative che rivelano invece l'ammontare del prodotto amplificato nelle fasi finali della reazione di polimerizzazione (*end-point*). L'*end-point* è variabile da campione a campione e non rappresenta pertanto un attendibile riferimento per la valutazione della quantità di stampo amplificata. Esistono due configurazioni del sistema di rivelazione: si possono utilizzare sonde sequenza-specifiche marcate con fluorofori oppure composti fluorescenti che si legano in modo aspecifico alla doppia elica del DNA, come il *SYBR Green*. Il primo tipo di approccio, più specifico e più costoso, prevede l'utilizzo di una sonda a doppia marcatura, che contiene un tracciante *reporter* ed un tracciante *quencher* (Heid *et al.*, 1996). La valutazione quantitativa dell'acido nucleico è affidata alla rivelazione e la conseguente quantificazione di un "*reporter*" fluorescente il cui segnale cresce in maniera proporzionale alla quantità di prodotto di PCR nella reazione. A tal proposito viene disegnata una sonda gene-specifica che si appaia nella zona compresa fra i due *primers* (*forward* e *reverse*); tale sonda è solitamente lunga 20-30 paia di basi e contiene un colorante fluorescente (*reporter*), solitamente di colore verde all'estremità 5' ed un colorante *quencher* (spengitore), di colore rosso, all'estremità 3'. In condizioni di normale appaiamento sonda-DNA stampo, se il campione viene irradiato, l'energia fluorescente emessa dal colorante ad alta energia in 5' viene assorbita totalmente dal *quencher* a bassa energia. Fino a quando, in altri termini, la sonda resta intatta la vicinanza tra *reporter* fluorescente e *quencher* annulla

l'emissione del segnale di fluorescenza perchè si verifica un trasferimento di energia dal primo al secondo. Nel momento in cui la DNA-polimerasi, replicando lo stampo, incontra la sonda appaiata al suo interno, grazie alla sua attività esonucleasica 5' → 3', comincia a degradarla. L' allontanamento tra il reporter ed il *quencher* pone fine all'attività di assorbimento di quest'ultimo e fa in modo che il reporter inizi ad emettere fluorescenza. Quest'ultima incrementerà a ogni ciclo proporzionalmente al tasso di degradazione della sonda. L'accumularsi del prodotto amplificato viene rivelato monitorando quindi l'incremento di fluorescenza del *reporter*.

Quando la PCR genera dei prodotti, la sonda va incontro ad idrolisi rilasciando la fluorescenza del tracciante reporter ed indicando la loro presenza. Il secondo approccio prevede invece l'utilizzo del *SYBR Green*, un composto organico aromatico, facente parte del gruppo delle cianidrine ed avente proprietà fluorofore, che si lega al DNA a doppio filamento. Intercalandosi nella molecola di DNA e man mano che la PCR va avanti producendo DNA a doppio filamento, la fluorescenza aumenta in seguito al legame del colorante con i prodotti di amplificazione (Wittwer *et al.*, 1997). Il valore della fluorescenza emessa è misurata ad ogni ciclo ed è rappresentativo della quantità di prodotto sintetizzata fino a quel punto. Maggiore è la quantità del trascritto presente all'inizio della reazione, minore sarà il numero di cicli che serviranno a raggiungere il punto in cui il segnale risulta essere statisticamente significativo rispetto al segnale di fondo (Gibson *et al.*, 1996). Le molecole come il *SYBR Green* sono altamente fluorescenti solo quando sono intercalate nella doppia elica di DNA. Quando il DNA è in stato di singolo filamento le molecole di *SYBR Green* non si legano alle basi del DNA e la fluorescenza emessa è molto bassa. A seguito della polimerizzazione da parte della Taq polimerasi le molecole di *SYBR Green* si trovano intercalate nel DNA a doppia elica. Maggiore è il numero di molecole di fluoroforo intercalate, maggiore sarà il segnale di fluorescenza (Fig. 22).



SYBR Green

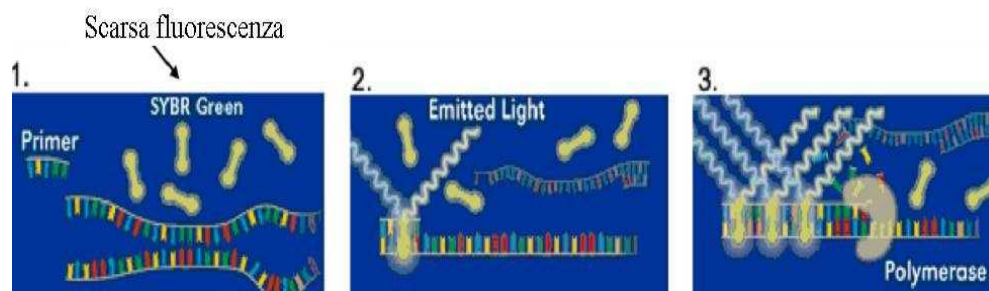


Figura 22: Schema della RT-PCR con SYBR Green

I vantaggi dell'utilizzo del *SYBR Green* sono l'estrema versatilità (può essere utilizzato con qualunque coppia di *primers* e dunque per qualunque sequenza), l'economicità e l'intenso segnale di fluorescenza. Il metodo basato su *SYBR Green* possiede tuttavia lo svantaggio di produrre un segnale non specifico poiché la molecola può legarsi anche a sequenze di DNA aspecifico generando falsi positivi. L'ostacolo può essere parzialmente superato effettuando una curva di dissociazione (*melting curve*) al termine della amplificazione PCR. La curva di *melting* consiste in un aumento graduale della temperatura da 50 °C, condizione in cui tutto il DNA è a doppia elica e la fluorescenza è massima, a 94 °C, temperatura alla quale tutto il DNA è in forma dissociata e la fluorescenza è minima. Ogni frammento di DNA a doppia elica si dissocia ad una caratteristica temperatura, chiamata temperatura di *melting* (T_m), definita come la temperatura alla quale il 50% del DNA è in forma di singolo filamento. Alla temperatura corrispondente al T_m dei prodotti di PCR si noterà un flesso nella curva di *melting* e quindi si potrà valutare se durante la PCR si sono

formati prodotti aspecifici o secondari. Se i flessi di fluorescenza sono più di uno, si evince che nella reazione di PCR si sono formati amplificati aspecifici. I flessi di fluorescenza, per comodità, vengono trasformati in picchi eseguendo la derivata prima della curva. A differenza di ciò che avviene in una PCR qualitativa o “*end-point*”, in cui l’amplificato viene apprezzato nella fase finale della reazione (quando cioè l’amplificazione ha raggiunto il *plateau* dovuto all’esaurimento dei nucleotidi e alla diminuita efficienza della Taq polimerasi), nella Real-Time RT-PCR la quantificazione avviene durante la fase esponenziale dell’amplificazione, rendendo il risultato della quantificazione più preciso ed affidabile. Registrando la quantità di emissione fluorescente per ogni ciclo è possibile monitorare la reazione di polimerizzazione durante la sua fase esponenziale nella quale il primo incremento significativo di prodotti neo-sintetizzati è collegato alla concentrazione iniziale di stampo nel campione. Infatti, maggiore è il numero di copie iniziali dell'acido nucleico, prima si osserverà un incremento significativo della fluorescenza. Considerando un sistema di riferimento ortogonale cartesiano (x-y) e riportando nell'asse delle ascisse i vari cicli di polimerizzazione e nell'asse delle ordinate il logaritmo della concentrazione di cDNA, una generica reazione di polimerizzazione sarà rappresentata da una curva (che apparirà sigmoideale in una rappresentazione non logaritmica ma lineare) che può essere scomposta in tre fasi (vedi Fig. 23).

1. ***Exponential phase (fase esponenziale)***: in questa fase la reazione è estremamente specifica. Ad ogni ciclo il prodotto viene raddoppiato crescendo in maniera esponenziale.
2. ***Linear phase (fase lineare)***: fase caratterizzata da grande variabilità. I componenti della reazione cominciano ad essere consumati e la reazione subisce un rallentamento.
3. ***End-Point (plateau)***: fase caratterizzata dalla mancata formazione dei prodotti. Quelli formati se lasciati a lungo, si degradano.

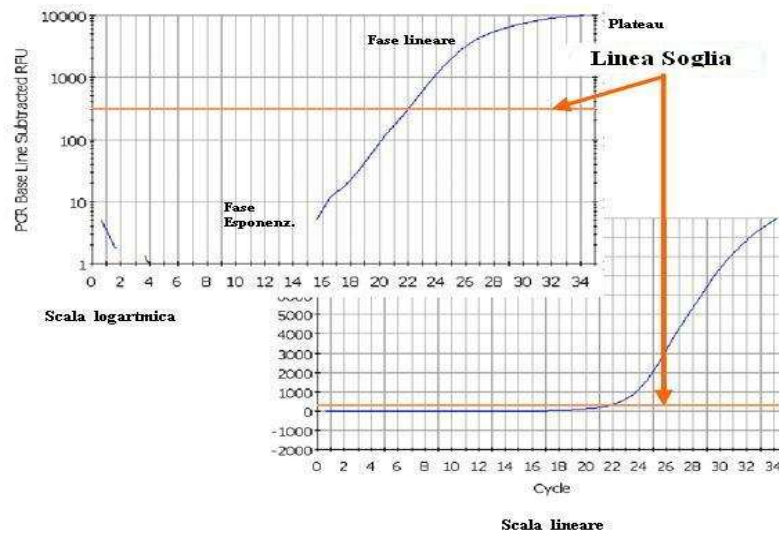


Figura 23: Fasi della Real-Time RT-PCR in scala lineare e logaritmica con linea soglia.

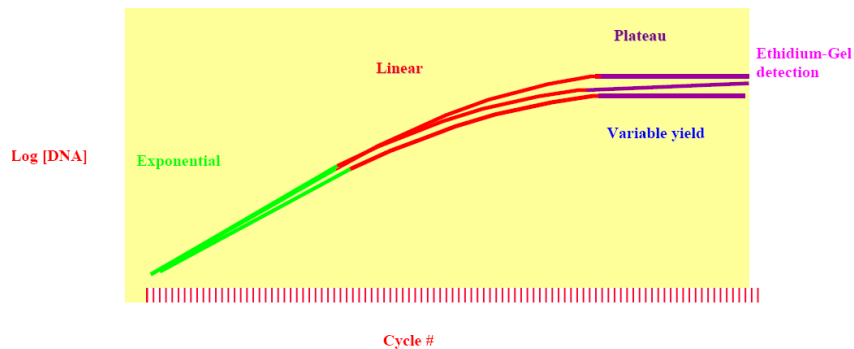


Figura 24: Fasi della RT- PCR.

Come detto, una normale RT-PCR (Reverse Transcriptase – PCR) quantitativa misura la quantità del prodotto finale amplificato in corrispondenza dell'*end-point* di tale curva. Nella *Real-Time RT-PCR*, invece, si può apprezzare la quantità di amplificato nelle fasi iniziali della reazione di polimerizzazione. E' possibile dunque fissare in maniera significativa una soglia di fluorescenza al di sopra della linea di base di tale curva alla quale corrisponderà un determinato ciclo-soglia, C_T , definito come "il numero di cicli necessari affinché l'emissione fluorescente superi il valore fissato". Il ciclo soglia si raggiunge quando il sistema comincia a

rivelare un incremento del segnale associato ad una crescita esponenziale del prodotto polimerizzato, durante la fase logaritmica in corrispondenza della quale si possono ricavare le informazioni più utili sulla reazione. La pendenza del tratto rappresentante la fase log-lineare è indicativa dell'efficienza dell'amplificazione. Questa è stimata intorno al 90-100 % e può essere influenzata da un certo numero di variabili tra cui la lunghezza dell'amplicone, la struttura secondaria e la qualità dei *primers* adoperati. Tuttavia, affinché tale pendenza sia un indicatore della reale amplificazione, è necessario che nella curva si visualizzi un punto di flesso rappresentante l'inizio della fase di crescita logaritmico-lineare. Il parametro importante per la quantificazione è dunque il C_T ; più elevata è la quantità iniziale di cDNA, prima il prodotto accumulato verrà rivelato nel processo di polimerizzazione e più basso sarà il C_T . La soglia dovrebbe essere fissata al di sopra di ogni linea di base ed all'interno della fase d'incremento esponenziale (che nella rappresentazione logaritmica appare lineare). Alcuni software consentono la determinazione del ciclo soglia attraverso un'analisi matematica della curva di crescita avendo così una maggiore riproducibilità ciclo dopo ciclo. Un $C_T = 40$ rappresenta, ad esempio, un'assenza di amplificazione dello stampo e pertanto non può essere incluso nei calcoli. I parametri che caratterizzano il grafico delle curve di amplificazione di un'analisi di Real-time RT-PCR sono quindi:

- **linea di base (*baseline*):** linea orizzontale che indica il valore al di sopra del quale inizia l'accumulo di fluorescenza;
- **linea di soglia (*threshold line*):** linea parallela alla linea di base, che interpola le curve di amplificazione nella fase esponenziale (può essere posizionata automaticamente dal software o autonomamente dall'operatore);
- **ciclo di soglia (C_T) (*threshold cycle*):** ciclo di PCR misurato per ciascun campione, in cui la curva di amplificazione interseca la linea di soglia (Fig. 25).

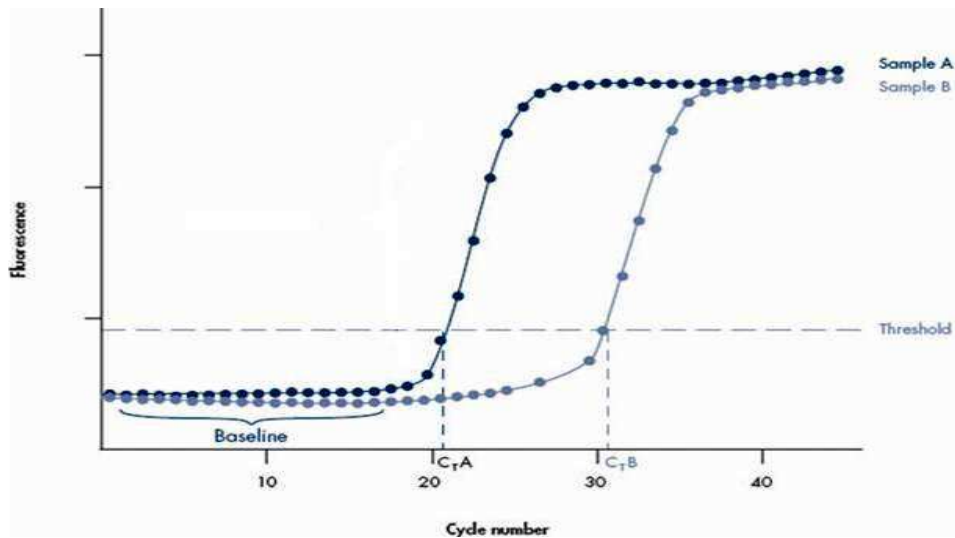


Figura 25: Parametri della curva di amplificazione

Per valutare i livelli d'espressione genica tra vari campioni è necessario confrontarli con i dati relativi all'espressione di un secondo gene scelto come controllo interno. Quest'ultimo deve essere caratterizzato da una certa abbondanza e costanza nell'espressione tra i diversi campioni, rispetto all'RNA totale. Nel caso in cui i geni estratti provengano da tessuti vegetali o da tessuti fungini, si utilizza generalmente come gene-controllo (*normalizer*) il gene *EF* codificante per la proteina *elongation factor*. Questa è coinvolta nella biosintesi proteica ed è abbondantemente e costantemente espressa in tutte le cellule, per cui i suoi livelli di espressione si mantengono costanti rispetto all'RNA totale prodotto dalle cellule, indipendentemente dalla temperatura di conservazione. Nel realizzare la Real-time RT-PCR, sia per amplificare il gene bersaglio sia per amplificare l'*elongation factor*, è consigliabile effettuare un controllo negativo con una serie di provette in doppio rispetto al numero di campioni (contenenti tutti i reagenti necessari per la reazione eccetto lo stampo). L'eventuale rivelazione di amplificazione in tali eppendorf è indice di contaminazione da DNA nei campioni.

Gli esperimenti di Real-time RT-PCR sono stati effettuati sfruttando il secondo step previsto dal protocollo del kit impiegato per la costruzione

della prima catena di cDNA, ovvero il “*Superscript III Platinum-two step qRT-PCR kit with SYBR Green*” (Invitrogen).

Per ogni reazione è stato considerato un volume finale di 25 μL , ripartito fra la soluzione madre e il campione di cDNA incognito.

In particolar modo sono stati aggiunti in successione:

- 12,5 μL **Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG**
- 0,25 μL **Rox reference Dye**
- 0,5 μL **Fwd primer 2 μM finali (da soluz. 10 pmol/ μL)**
- 0,5 μL **Rve primer 2 μM finali (da soluz. 10 pmol/ μL)**
- 2 μL **cDNA incognito (da 28,53 ng di mRNA)**
- 9,25 μL **H₂O-PCR Grade**
- 25 μL **Volume finale**

Il *Rox* rappresenta un composto passivo che non partecipa alla reazione di polimerizzazione ma è utilizzato per normalizzare le fluttuazioni nella fluorescenza tra i diversi pozzetti non correlate a processi di polimerizzazione bensì a micro differenze nelle concentrazioni e nei volumi. La normalizzazione si raggiunge dividendo l'intensità dell'emissione del colorante fluorescente per quella del riferimento passivo e fornisce dunque in uscita il parametro definito R_n .

Sulla base delle sequenze dei cloni ottenute dalla *SSH library Hg-specifica* (vedi capitolo relativo ai risultati) sono state costruite le diverse coppie di primer necessarie all'amplificazione dei frammenti tramite Real-Time RT-PCR.

Le sequenze delle diverse coppie di primer, specificatamente sintetizzate presso la *MWG-Biotech*, sono riportate nella tabella successiva.

L'amplificazione è stata effettuata adottando diverse condizioni di PCR in base alle caratteristiche proprie di ogni coppia di primer e, in special modo, in base al caratteristico valore di T_m .

Tabella 3: Coppie di primer utilizzati per la Real-Time RT-PCR

PRIMER	SEQUENZA PRIMER
Ribosomal Protein S25 (forclone2Cd)	5'-CATCAAGGACCTCGAGGAGA-3'
Ribosomal Protein S25 (revclone2Cd)	5'-TCTCATGGCCCATTTTCTTC-3'
Hydrophobin (forclone6CD)	5'-CAGTCACAAGAGCAGCCTGA -3'
Hydrophobin (revclone6CD)	5'-CCCCTTGAAGACCATTGTG-3'
14.3.3 like protein (forclone9Cd)	5'-ATGCAAACCTCGGCAAAGAAC -3'
14.3.3 like protein (revclone9Cd)	5'-TCCCCATTAACCAGACAAGC-3'
Polysaccharide deacetylase (forclone1Cd)	5'-GTGTGAATGGCGCATCAG -3'
Polysaccharide deacetylase (revclone1Cd)	5'-CCGCCATTCTGACCTGCT-3'
Unknown 1 (forclone4Cd)	5'-CCCGATATCGTCATTAGTGC-3'
Unknown 1 (revclone4Cd)	5'-CGCTGGACGAGGAAGTAATA-3'
Unknown 2 (forclone5Cd)	5'-CAACCAAATTGTCGAGGAC -3'
Unknown 2 (revclone5Cd)	5'-CAGAAGATCGGTGGAGAAGA-3'
Unknown 3 (forclone7Cd)	5'-CGTCATCAGCCATACATTG -3'
Unknown 3 (revclone7Cd)	5'-TCGTATGAATGCGTCAGAGG-3'
Unknown 4 (forclone8Cd)	5'-CAGTGGGCCAGTCTAAAGAA -3'
Unknown 4 (revclone8Cd)	5'-GGAGAATTCTTGGGTTGGAG-3'
Elongation factor (forEFTr)	5'-AGCGAAGGTGACCACCATAC -3'
Elongation factor (revEFTr)	5'-AAGGAGACCAAGGCTGACAA-3'

In particolare, per quanto riguarda *l'Elongation factor*, la *14.3.3 like protein*, la *Ribosomal protein S25*, la *Polysaccharide deacetylase* e *l'Hydrophobin* le condizioni di PCR utilizzate sono state:

- 94 °C x 2 minuti
 - 95 °C x 15 secondi
 - 55 °C x 40 secondi
 - 72 °C x 40 secondi
- } 40 cicli

Per quanto riguarda *l'Unknown 1*, *l'Unknown 3* e *l'Unknown 4*:

- 94 °C x 2 minuti
 - 95 °C x 15 secondi
 - 56 °C x 40 secondi
 - 72 °C x 40 secondi
- } 40 cicli

Mentre per quanto riguarda l'*Unknown 2*:

- 94 °C x 2 minuti
 - 95 °C x 15 secondi
 - 54 °C x 40 secondi
 - 72 °C x 40 secondi
- } 40 cicli

Ogni coppia di primer è stata testata su ciascuno degli stampi di cDNA:

- cDNA da micelio fungino cresciuto in presenza di mercurio
- cDNA da micelio fungino cresciuto in presenza di cadmio
- cDNA da micelio fungino cresciuto in assenza dei suddetti metalli pesanti (controllo).

Per ogni campione sono state effettuate delle prove in triplo. Dopo ciascuna reazione il valore dell'intensità della fluorescenza registrata dal computer è stato utilizzato dal software per i successivi calcoli. Il valore del rapporto R_n rilevato è stato visualizzato graficamente rispetto al numero di cicli fornendo la curva d'amplificazione ed il relativo C_T per ogni campione. Per quantificare la concentrazione dello stampo, tra le varie metodologie possibili, è stata utilizzata quella del "*comparative treshold*" che non utilizza concentrazioni standard note ma compara la concentrazione relativa della sequenza target con il valore della sequenza scelta come riferimento. Affinché il calcolo del ciclo soglia sia valido è necessario che l'efficienza dell'amplificazione del target e quella dell'amplificazione del riferimento (EF) siano praticamente uguali. Fintantoché sia il gene bersaglio che il controllo endogeno possiedono un range dinamico simile questo metodo rappresenta quello più pratico; naturalmente ci si aspetta che il riferimento endogeno abbia un livello di espressione più elevato e pertanto un minore C_T .

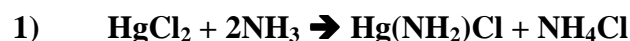
Per la quantificazione è stata applicata la seguente formula calcolando il ΔC_T come segue:

$$\Delta C_T = \Delta C_T (\text{target}) - \Delta C_T (EF)$$

I valori così normalizzati sono stati direttamente comparati in modo tale da ottenere i diversi livelli d'espressione degli otto geni isolati dalla *libreria mercurio-specifica*.

2.4 Saggio con ammoniaca del substrato Czapek

La seguente reazione di *disproporzione o dismutazione* (2) è stata utilizzata per saggiare qualitativamente l'avvenuta riduzione del cloruro mercurico (HgCl_2) a cloruro mercurioso (Hg_2Cl_2) nelle condizioni di sterilizzazione in autoclave. La riduzione del mercurio mercurico (Hg^{2+}) a mercurio mercurioso (Hg_2^{2+}) è stata considerata, infatti, la causa principale delle divergenze sperimentali osservate fra i risultati sinora ottenuti in questo dottorato di ricerca e quelli di un altro studio pubblicato nel 2009 (*Implications of cysteine metabolism in the heavy metal response in Trichoderma harzianum and in three Fusarium species*, Raspanti *et al.* Chemosphere, 2009).



Mentre la reazione con cloruro mercurico e ammoniaca (1) porta infatti alla sola formazione del cloruro di mercurio ammonio (precipitato biancastro), la stessa reazione condotta con cloruro mercurioso e ammoniaca (2) porta alla formazione di mercurio metallico nero finemente suddiviso, facilmente distinguibile già ad occhio nudo, oltre al già citato cloruro di mercurio ammonio. Sono state saggiate delle aliquote di substrato Czapek, con e senza saccarosio, contenenti cloruro mercurico sterilizzato in autoclave e per microfiltrazione con filtro assoluto.

Il controllo era rappresentato, in tutti i casi, da substrato Czapek privo di cloruro mercurico e da substrato Czapek contenente cloruro mercurioso sterilizzato in autoclave e per microfiltrazione.

Tabella 4: Componenti del Substrato Czapek-Dox e rispettive concentrazioni (mM)

Substrato Czapek-Dox	
Reagenti	Concentrazione (mM)
NaNO ₃	23,529
K ₂ HPO ₄	5,740
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2,028
KCl	6,711
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,035
Saccarosio	87,642

2.5 Analisi HPLC e Gas-cromatografica del substrato Czapek

2.5.1 Cenni teorici: HPLC e GC

La gas-cromatografia (GC) è una tecnica cromatografica impiegata a scopo analitico. Come tutte le tecniche cromatografiche, si basa sulla diversa ripartizione di una sostanza tra una fase stazionaria ed una fase mobile, in funzione dell'affinità della sostanza con la fase stazionaria.

Con questa tecnica è possibile analizzare campioni gassosi, liquidi o solidi ed essa tuttora conserva una posizione di primo piano fra le tecniche di separazione di miscele complesse. L'unica grande limitazione della cromatografia in fase gassosa è rappresentata dal fatto che il campione deve

essere volatile in un intervallo di temperatura compreso tra 25 e 270 °C circa, temperatura comunemente raggiunta dai forni degli strumenti in commercio e compatibile con le colonne cromatografiche usate. Esiste tuttavia una lunga serie di applicazioni (a cominciare dall'analisi dei composti di per sé volatili e dei gas) che rendono molto utile la presenza del gas-cromatografo in ogni laboratorio di analisi.

I meccanismi basilari di separazione che si sfruttano in gas-cromatografia sono adsorbimento e ripartizione (tra le fasi):

- **adsorbimento:** la fase stazionaria è un solido sulla cui superficie si trovano dei siti attivi in grado di stabilire una serie di legami secondari (dipolo-dipolo, ponte idrogeno, Van der Waals, dipolo-dipolo indotto, ecc.) con le diverse molecole della miscela da risolvere;
- **ripartizione:** la fase stazionaria è liquida e si verifica una vera e propria solubilizzazione delle sostanze che si ripartiscono tra le due fasi immiscibili.

La fase stazionaria è generalmente costituita da un liquido non volatile supportato su una polvere che riempie uniformemente una colonna ("colonna impaccata") oppure distribuito come film sottile spesso qualche micrometro sulla parete interna di una colonna di lunghezza superiore ai 10 metri e di diametro inferiore al millimetro ("colonna capillare"). Tale liquido può variare a seconda dell'applicazione e quindi in base alla tipologia di composti che si intendono analizzare. La fase mobile è un gas, detto anche *gas di trasporto*, *gas vettore* o *gas carrier*. Generalmente, vengono scelti gas chimicamente inerti, a bassa viscosità ed ottenibili ad elevata purezza (99,9%) quali l'azoto, l'elio o l'argon; per alcune applicazioni vengono anche utilizzati l'idrogeno o l'anidride carbonica. La derivatizzazione chimica permette di aumentare la volatilità di certi analiti in modo da poterli sottoporre ad analisi gas-cromatografica in maniera

opportuna. La presenza dell'acqua va limitata in quanto può contribuire al deterioramento della fase stazionaria o potrebbe danneggiare il rivelatore. Naturalmente tutto dipende dal tipo di analisi, dalla colonna e dal solvente usato. Il campione posto in testa alla colonna e sottoposto al flusso costante del gas di trasporto, viene separato nelle sue componenti in funzione della loro affinità (di solito per polarità) alla fase stazionaria; un'ulteriore variabile su cui si agisce spesso per migliorare la separazione è la temperatura della colonna, che può essere mantenuta costante ("isoterma") o fatta variare secondo un gradiente desiderato ("gradiente di temperatura"). Quando il campione esce dall'estremità finale della colonna (*eluato*) viene raccolto da un rivelatore.

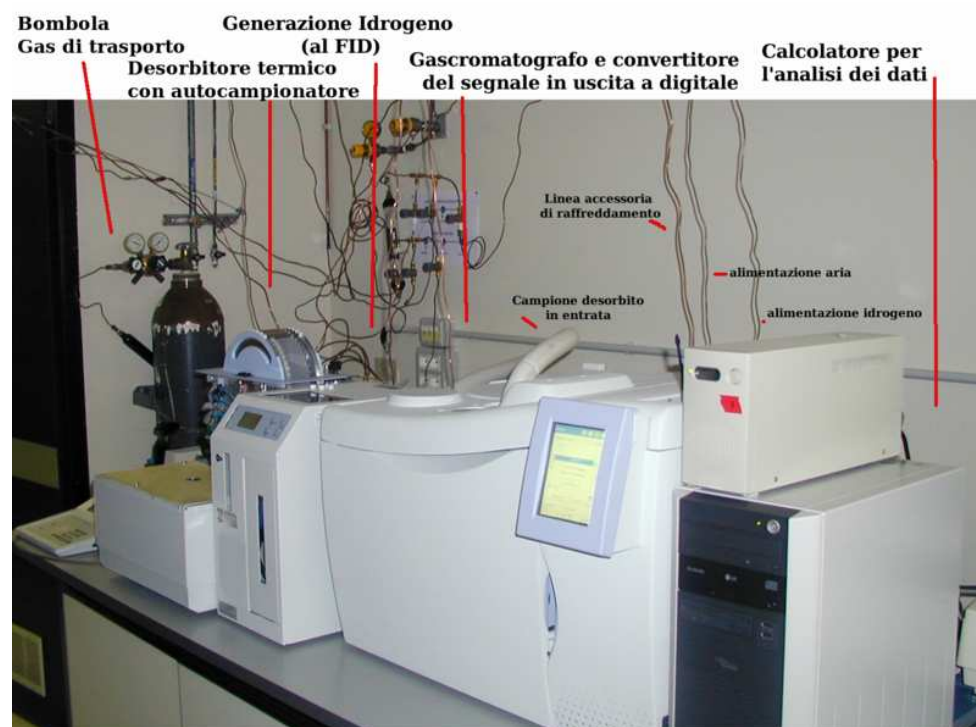


Figura 26: Gascromatografo con unità per il desorbimento termico.

Il diagramma che rappresenta il segnale generato dal rivelatore in funzione del tempo - fissato a zero l'istante in cui il campione è stato immesso nella colonna - è il cromatogramma del campione. Il cromatogramma si presenta come una sequenza di picchi di varia ampiezza ed altezza distribuiti lungo

l'asse del tempo. Dal tempo di ritenzione di ogni picco è possibile dedurre l'identità chimica del composto eluito; dall'area o dall'altezza dei picchi è possibile dedurre le concentrazioni o le quantità assolute dei vari composti presenti nel campione analizzato, a seconda del rivelatore impiegato (Douglas *et al.*, 2005; Kenneth *et al.*, 2002).

La cromatografia liquida ad alta prestazione o cromatografia liquida ad alta pressione, conosciuta più semplicemente con l'acronimo inglese HPLC, è una tipologia di cromatografia liquida. Si tratta di una tecnica cromatografica che permette di separare due o più composti presenti in un solvente sfruttando l'equilibrio di affinità tra una "fase stazionaria" posta all'interno della colonna cromatografica e una "fase mobile" che fluisce attraverso essa. Una sostanza più affine alla fase stazionaria rispetto alla fase mobile impiega un tempo maggiore a percorrere la colonna cromatografica (tempo di ritenzione) rispetto ad una sostanza con bassa affinità per la fase stazionaria ed alta per la fase mobile.

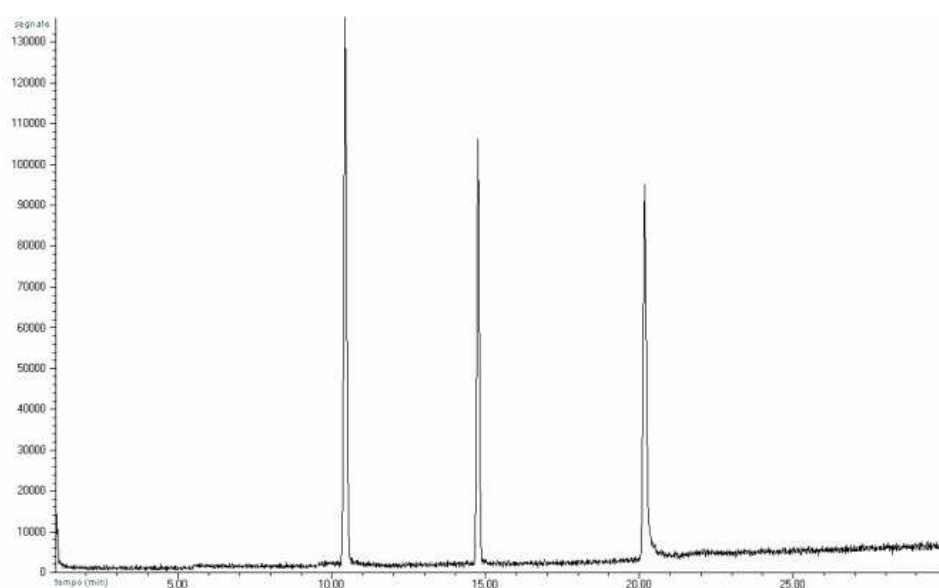


Figura 27: Esempio di cromatogramma di una miscela di tre sostanze.

Il campione da analizzare è iniettato all'inizio della colonna cromatografica dov'è "spinto" attraverso la fase stazionaria dalla fase mobile, applicando pressioni dell'ordine delle centinaia di atmosfere. Per ottenere un'elevata

efficienza nella separazione è necessario che le dimensioni delle particelle del riempimento siano molto ridotte (di solito hanno diametri compresi da 3 a 10 μm). Per questo motivo è indispensabile applicare un'elevata pressione se si vuole mantenere una ragionevole velocità di flusso dell' eluente e quindi un tempo d'analisi adeguato. Alla fine della colonna sono posti un rivelatore (IR, UV-VIS, spettrofluorimetrico, spettrometro di massa) e un calcolatore che permettono un'analisi in continuo all'uscita della colonna, permettendo quindi di quantificare e/o identificare le sostanze iniettate.



Figura 28: Esempio di strumentazione per l'analisi HPLC.

I vantaggi principali di questa tecnica sono: dimensioni ridotte della colonna, ciò evita problemi di deviazioni longitudinali (movimenti della fase mobile longitudinali) e di percorsi alternativi; velocità di eluizione (passaggio della fase mobile attraverso la colonna) costante e regolabile; velocità di esecuzione ridotta; piccole quantità di composto necessarie all'analisi (nell'ordine dei 5-10 microgrammi di campione solubilizzato in apposito solvente); vantaggi questi a favore di una maggiore accuratezza e

precisione. Lo svantaggio principale è il costo molto più elevato dell'attrezzatura rispetto ad una cromatografia su colonna tradizionale, anche se non è possibile paragonare le due metodiche poiché presentano campi di applicazione diversi (Skoog *et al.*, 1995).

2.5.2 Fase operativa

La formazione di composti 1,2-dicarbonilici da saccarosio, a temperature d'esercizio elevate, è nota da tempo (Lorenzo *et al.*, 2010). Durante un eccessivo riscaldamento o un prolungato periodo di conservazione i carboidrati vanno incontro a processi di degradazione il cui culmine è la formazione di composti molto reattivi come i composti 1,2-dicarbonilici. L'intero processo chimico che porta alla loro formazione viene indicato col termine di *caramellizzazione*.

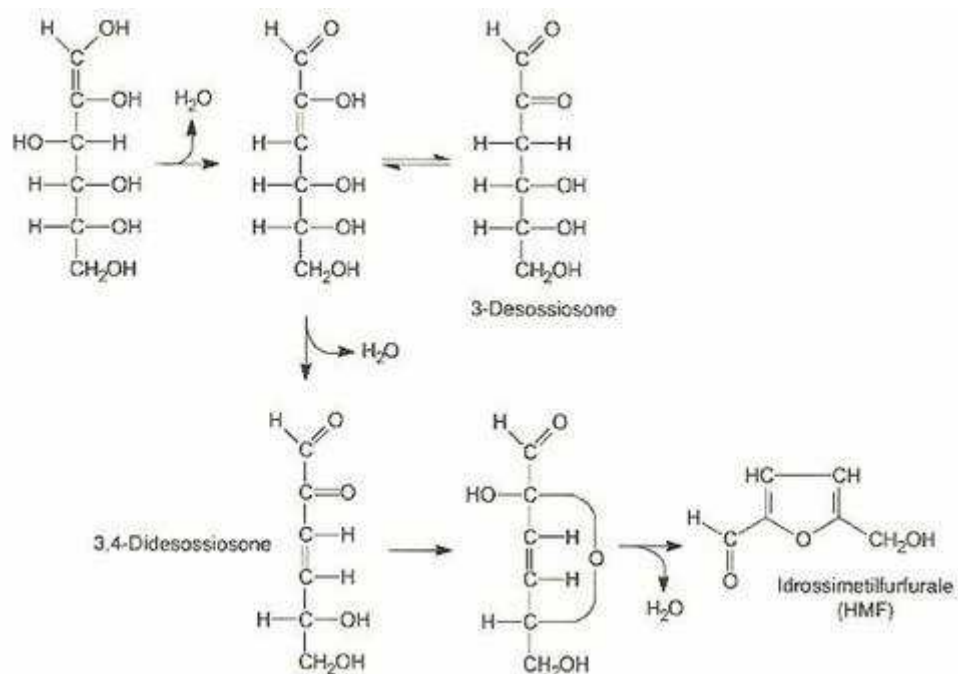


Figura 29: La reazione di caramellizzazione che porta alla formazione di HMF.

La caramellizzazione si verifica principalmente a temperature superiori a 100 °C, con formazione di aromi e pigmenti, ma anche in presenza di luce, ossigeno, tracce di metalli, ad un intervallo di pH compreso tra 3 e 10. Attraverso isomerizzazione, disidratazione e beta-eliminazione, dallo zucchero contenuto nella matrice organica di partenza si ottiene un composto, derivato del furano, noto sotto il nome di 5-idrossimetilfurfurale (HMF).

Alla luce di queste considerazioni preliminari, utilizzando la metodica descritta in uno studio del 2003 (Weigel *et al.*, 2003), sono state analizzate delle aliquote di substrato Czapek sterilizzate in autoclave, in presenza e in assenza di cloruro mercurico, mediante le tecniche cromatografiche descritte in precedenza.

Capitolo 3: Risultati e discussione

3.1 Effetti del cadmio e del mercurio (II) sulla crescita *in vitro* di *Trichoderma harzianum*

I risultati relativi all'effetto dei metalli pesanti cadmio e mercurio (II) sulla crescita di *T. harzianum* hanno messo in luce due diversi aspetti. In primo luogo è stata osservata una maggiore crescita radiale su piastra del micelio del fungo cresciuto su substrato agarizzato contenente mercurio II (cloruro mercurico; 10 ppm), rispetto allo stesso micelio cresciuto in presenza di cadmio (solfato di cadmio; 10 ppm) o in assenza di metalli pesanti (testimone).

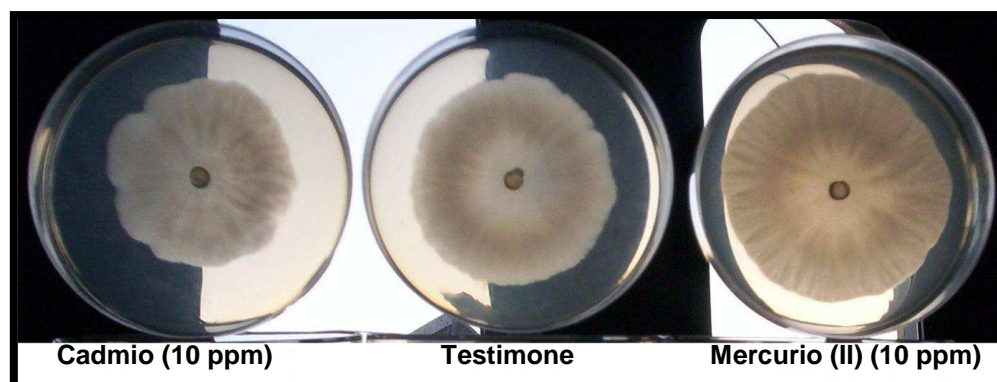


Figura 30: Colonie di *T. harzianum* cresciuto su substrato Czapek-Dox Agar addizionato con metalli pesanti (cadmio e mercurio II) dopo 4 giorni di crescita.

Nei rilievi sperimentali effettuati dopo 3, 6, 9 giorni d'incubazione, l'accrescimento diametrico del micelio è risultato inferiore del 7 % con cadmio e superiore del 7 % con mercurio (II), rispetto al controllo (Fig. 31).

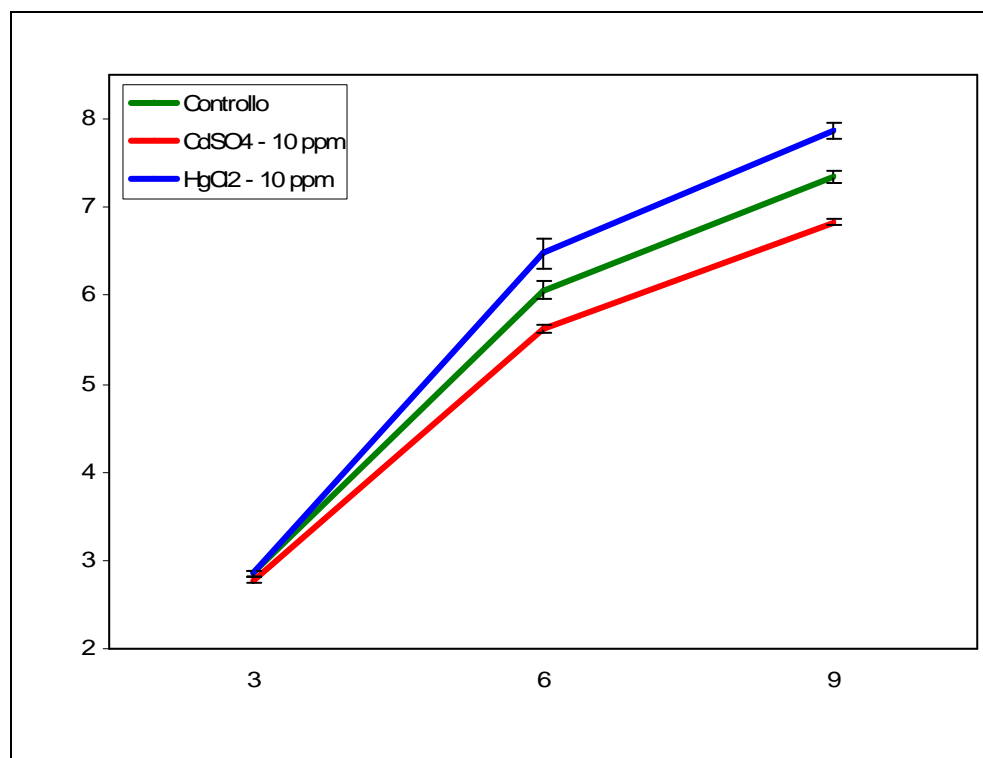


Figura 31: Accrescimento radiale su piastra di *T. harzianum* cresciuto su substrato Czapek-Dox Agar con cadmio e mercurio (II) dopo 3, 6 e 9 giorni di crescita.

Inoltre, la biomassa miceliare del fungo accresciutosi per 12 giorni nel substrato Czapek-Dox in presenza di mercurio (II) e cadmio alla concentrazione finale di 10 ppm ha evidenziato un comportamento diverso del fungo rispetto al controllo. In particolar modo, il peso secco del micelio di *T. harzianum* cresciuto in presenza di cadmio risultava essere di 1,45 mg/mL, corrispondenti a una velocità di crescita pari a 0,12 mg/mL/giorno dopo 12 giorni di crescita; nel caso di substrato colturale contenente mercurio (II), questo valore risultava invece essere pari a 2,67 mg/mL dopo 12 giorni di crescita, con una velocità di crescita di 0,22 mg/mL/giorno; nel caso del campione controllo, infine, questo valore era di 2,12 mg/mL con una velocità di crescita pari a 0,18 mg/mL (Fig. 32). Quindi, la crescita di *T. harzianum* rispetto al controllo è inibita del 35 % in presenza di cadmio mentre è stimolata del 30~35 % in presenza di mercurio (II). In questa serie d'esperimenti la sterilizzazione del metallo è stata effettuata in autoclave.

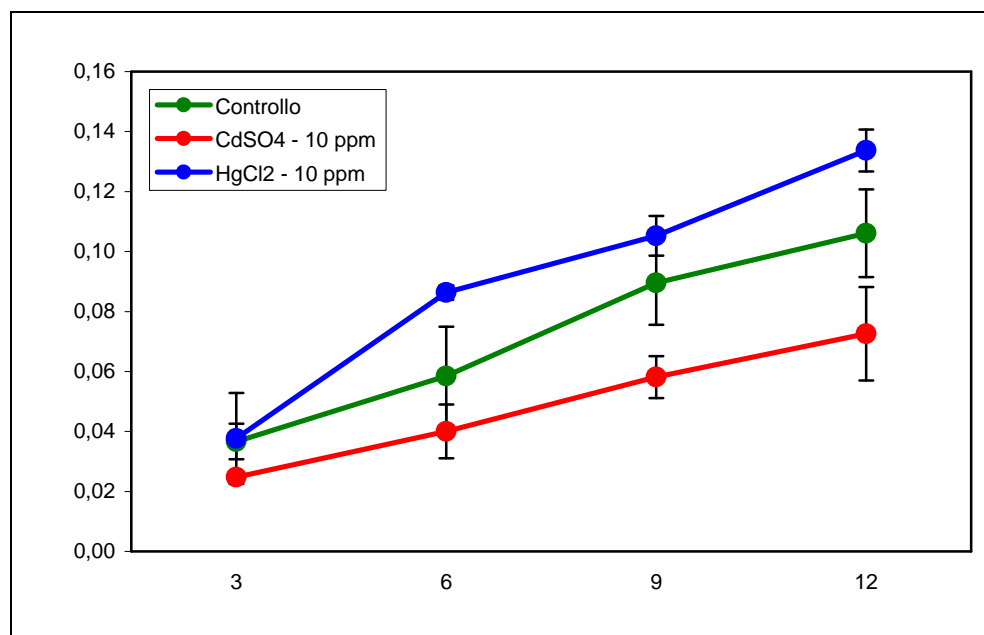


Figura 32: Peso secco della biomassa miceliare di *T. harzianum* a differenti giorni di crescita in presenza di cadmio e mercurio (II) su substrato liquido Czapek-Dox.

3.2 Analisi dei diversi profili d'espressione genica ottenuti mediante PCR-Select

Gli esperimenti condotti mediante PCR-select hanno permesso di costruire due *SSH library*: una specifica per il cadmio e una specifica per il mercurio (II). Grazie a queste sono stati individuati diversi cloni espressi differenzialmente nelle colture cresciute in presenza di cadmio e in presenza di mercurio (II). I diversi metalli pesanti sono stati sterilizzati in autoclave insieme ai substrati di crescita. La lunghezza delle sequenze di cDNA analizzate era compresa in un intervallo compreso fra 218 e 965 paia di basi. In questo modo sono state identificate con successo ben 190 EST totali. In particolare, dalla *SSH cDNA library* Cd specifica, sono state isolate 177 ESTs (*Expressed Sequence Tags*) corrispondenti a ben 109 differenti geni (tab. 5).

Tabella 5: Caratteristiche della libreria sottrattiva cadmio specifica

SSH cDNA library cadmio specifica	
EST totali	177
Geni corrispondenti	109
Geni ridondanti	42 (105 cloni)
Funzione nota	23 (53 cloni)
Funzione sconosciuta	19 (52 cloni)

Questi cloni sono stati analizzati mediante l'algoritmo BLAST-X (*Basic Local Alignment Search Tool*) al fine di assegnare un'identità putativa a ciascun clone. La percentuale dei geni con funzione nota è stata del 50 % mentre la percentuale dei geni ridondanti è stata del 39 %. I 105 cloni EST (42 geni) mostrandoti ridondanza sono stati assegnati, in base a questo studio incrociato, a 23 geni aventi funzione nota (53 cloni) e a 19 geni (52 cloni) aventi funzione sconosciuta. Allo stesso modo, dalla *SSH cDNA library* specifica per mercurio (II) sono state isolate 13 EST corrispondenti a 8 differenti geni (tab. 6).

Tabella 6: Caratteristiche della libreria sottrattiva mercurio (II) specifica

SSH cDNA library mercurio (II) specifica	
EST totali	13
Geni corrispondenti	8
Geni ridondanti	2 (7 cloni)
Funzione nota	2 (7 cloni)
Funzione sconosciuta	0

Questi cloni, analizzati anch'essi mediante l'algoritmo BLAST-X, hanno evidenziato una percentuale di geni funzionalmente conosciuti pari al 44 % mentre la percentuale di geni ridondanti è stata del 22 %. I 7 cloni EST (2 geni) mostranti ridondanza sono stati assegnati a soli 2 geni funzionali (7 cloni). Le identità putative assegnate e le relative percentuali d'omologia nell'ambito della *SSH cDNA library mercurio (II) specifica* sono mostrate nelle tabelle che seguono.

Tabella 7: Proteine codificate dai geni della libreria sottrattiva mercurio (II) specifica sulla base delle sequenze tradotte.

Proteina	Numero di cloni
Hydrophobin	4
Ribosomal protein S25	3
Polysaccharide deacetylase	1
14-3-3-like protein	1
Unknown	1
Unknown	1
Unknown	1
Unknown	1

Tabella 8: Identità e omologie relative ai geni isolati mediante la libreria sottrattiva mercurio (II) specifica. La percentuale d'omologia è stata determinata mediante l'algoritmo BLAST-X. In aggiunta è stata effettuata un'ulteriore analisi delle EST in database mediante l'algoritmo BLASTN.

GenBank Accession n.	Length (bp)	Best BLAST match	Identity (%)	Score	E. value
FG068292	450	Polysaccharide Deacetylase (<i>Burkholderia mallei</i>)	45	40,4	0,048
FG068293	272	40SRibosomal Protein S25 (<i>Neurospora crassa</i>)	85	96,7	6E -19
FG068295	449	Iron-Sulfur cluster-binding protein (<i>Marinobacter algicola</i>)	32	34,3	3,4
FG068296	273	Hypothetical protein FG05179.1 (<i>Giberella zeae PH-1</i>)	66	57,0	5E -07
FG068297	218	Hydrophobin (<i>Trichoderma atroviride</i>)	80	79,3	9E -14
FG068298	324	Hypothetical protein FG09277.1 (<i>Giberella zeae PH-1</i>)	54	124	3E -27
FG068298	469	Hypothetical protein FG03971.1 (<i>Giberella zeae PH-1</i>)	74	235	8E -61
FG068300	293	14-3-3-like Protein (<i>Hypocrea jecorina</i>)	78	206	3E -50

I due geni differenziali ridondanti hanno un'elevata omologia, rispettivamente, per l'idrofobina e per la proteina ribosomiale S25.

Tra gli altri geni isolati soltanto due hanno mostrato omologie di sequenza, mentre quattro di essi non hanno mostrato alcuna omologia con sequenze note in database. Poiché questi geni con funzione sconosciuta potrebbero codificare per proteine che rivestono un ruolo importante nella risposta metabolica del fungo allo stress da mercurio, sono di fondamentale importanza ulteriori e approfonditi approcci sperimentali in tal senso.

Tra i geni differenzialmente espressi della libreria sottrattiva mercurio specifica di particolare interesse è il gene che mostra un'elevata omologia per l'idrofobina.

Le idrofobine sono proteine anfipatiche costituite da brevi sequenze amminoacidiche con otto residui di cisteina nelle posizioni conservate. Esse sono state osservate soltanto nei funghi e prevalentemente nelle strutture aeree quali ife aeree, corpi fruttiferi e spore dove contribuiscono alla idrofobicità della superficie di queste ultime (Wösten *et al.*, 1994).

Queste proteine sono coinvolte in numerose altre funzioni, soprattutto della crescita e dello sviluppo dei funghi. Diversi geni codificanti per idrofobine sono stati identificati nel genoma di *Trichoderma* tra cui anche *T. harzianum*, ma il loro ruolo non è ancora del tutto chiaro (Lora *et al.*, 1994; Munoz *et al.*, 1997; Linder *et al.*, 2005; Rocco *et al.*, 2007).

E' ampiamente dimostrato, tuttavia, che le idrofobine sono implicate in vario modo nelle interazioni dei funghi con le piante e altri microrganismi. Sulla base delle evidenze sperimentali di questo studio si potrebbe formulare l'ipotesi che la funzione dell'idrofobina espressa da *T. harzianum* nell'interazione specifica con il mercurio sia quella di legare, attraverso i gruppi sulfidrilici dei residui cisteinici, questo metallo pesante e permettere quindi il suo accumulo nella parete cellulare del fungo.

Questa conclusione potrebbe essere rafforzata dall'osservazione che la crescita del fungo in presenza di mercurio sia correlata ad un aumento apparente della parete cellulare dove l'idrofobina è localizzata.

Inoltre, la crescita della parete è anche suggerita dalla maggiore espressione, riscontrata peraltro in presenza di mercurio, della putativa polisaccaride deacetilasi, un enzima coinvolto nei processi d'estensione della parete cellulare. Rimane inoltre da osservare che l'espressione d'idrofobina è specifica nel caso di micelio fungino cresciuto in presenza di mercurio mentre il gene non risulta essere attivato in presenza di cadmio. Ciò potrebbe suggerire che l'idrofobina osservata nei nostri esperimenti sia una possibile "Hg-binding protein".

Nell'ambito della *SSH cDNA library cadmio specifica* (tabella 9) tra i numerosi geni ridondanti identificati particolarmente interessante è il gene che mostra un'elevata omologia per una cadmio-metallotioneina (Cd-MT) prodotta dal fungo acquatico *Heliscus lugdunensis* (Jaekel *et al.*, 2005).

Tabella 9: Proteine codificate dai geni della libreria sottrattiva cadmio specifica sulla base delle sequenze tradotte.

Proteina	Numero di cloni
Unknown	4
Hypothetical CHGG (01040) e MGG	4
Phenol 2-monooxygenase	4
Thioesterase	4
Unknown	4
Elongation factor 3	4
MFS monosaccharide transporter	3
Ammonium permease	3
Hypothetical kinase	3
ADP, ATP carrier protein	3
Unknown	3
Unknown	3
Unknown	3
Unknown	3
Sphingolipid desaturase	3
C2H2 transcription factor (Rpn4)	2
Unknown	2
Ribosomal protein L32	2
Unknown	2
Unknown	2
Unknown	2
Unknown	2
Unknown	2
Unknown	2
ATP synthase subunit	2
Metallothionein	2
S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	2
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2
Hypothetical ZZ type zinc finger domain protein	2
Mannosyltransferase	2
Unknown	2
Histone H2B	2
Exo-beta-1,3 glucanase	2
Transcriptional elongation protein Spt4	2
Translation initiation factor eIF1	2
F1F0 ATP synthase subunit F	2
Unknown	2
Histone H4	2
Unknown	2
Unknown	2
Unknown	2
Unknown	2
Unknown	2

Nei funghi le MT sono indotte prevalentemente da Cu, mentre Cd-MT sono state riscontrate soltanto in *Beauveria bassiana*, *Colletotrichum gloeosporioides* e in un isolato di *Saccharomyces cerevisiae*. E' la prima volta che in *T. harzianum* viene individuata una parte di gene codificante per una metallotioneina e più precisamente una Cd-MT.

Questa sembrerebbe una risposta specifica al cadmio dal momento che la libreria sottrattiva relativa al mercurio non ha mostrato nessun incremento di questa particolare classe di proteine.

Si potrebbe pertanto suggerire che il meccanismo di detossificazione dei metalli pesanti in *T. harzianum* segua percorsi metabolici specifici per ogni singolo metallo. Infine la presenza in quest'ultima libreria sottrattiva di una "zinc finger like protein" potrebbe far sospettare che le modifiche indotte dal cadmio sull'espressione dei geni riscontrati nella genoteca differenziale possano attuarsi mediante il legame del metallo a specifiche proteine regolanti la trascrizione.

3.3 Analisi dei geni differenzialmente espressi ottenuti dalla SSH library mercurio specifica mediante Real-Time RT-PCR

I livelli d'espressione degli otto geni differenzialmente espressi ottenuti dalla SSH library mercurio (II) specifica sono stati studiati con la tecnica Real-Time RT-PCR. La sequenza di ogni clone è stata depositata in *Genbank database* e in base a queste sequenze sono state disegnate le diverse coppie di primer (forward e reverse) impiegate per la Real-Time RT-PCR. In una prima serie d'esperimenti sono stati studiati i diversi livelli d'espressione di questi otto geni isolati dal micelio di *T. harzianum* cresciuto in presenza di mercurio (II), in presenza di cadmio e in assenza di metalli pesanti (controllo). Come gene-controllo endogeno (standard) è stato scelto l'*EF*, gene che codifica per l'*Elongation Factor*.

I risultati sperimentali di questa prima serie d'esperimenti sono mostrati nelle tabelle che seguono. Dalla tabella 10 ("*mercurio II*" normalizzato con "*cadmio*") si può notare come i livelli d'espressione dei geni codificanti le putative *Hydrophobin* e *40S Ribosomal Protein S25* siano rispettivamente 19 e 17 volte più elevati rispetto a quelli misurati in presenza di cadmio. Di contro, è stato piccolo l'aumento nei livelli d'espressione della *Polysaccharide deacetylase* (5 volte) e della *Hypothetical protein FG03971.1* (8 volte). Per quanto riguarda i livelli d'espressione dei geni codificanti le putative *14-3-3 like protein* e *Hypothetical protein FG09277.1* sono stati ottenuti dei valori rispettivamente di 30 e 32 volte superiori ai livelli d'espressione misurati in presenza di cadmio. Infine, è stato evidenziato un significativo aumento nei livelli d'espressione dei trascritti codificanti la putativa *Iron-sulfur cluster binding protein* (24 volte) e la putativa *Hypothetical protein FG05179.1* (20 volte).

Tabella 10: Livelli d’espressione dei geni isolati mediante la libreria sottrattiva mercurio specifica. Valori relativi al “mercurio (II)” normalizzato con il “cadmio”.

EST	Identità putative	Livelli d’espressione genica (Hg normalizzato vs Cd)
FG068292	Polysaccharide Deacetylase	4,96 ± 0,05
FG068293	40SRibosomal Protein S25	16,80 ± 0,1
FG068295	Iron-Sulfur cluster-binding protein	24,42 ± 0,15
FG068296	Hypothetical protein FG05179.1	19,70 ± 0,1
FG068297	Hydrophobin	19,29 ± 0,12
FG068298	Hypothetical protein FG09277.1	32 ± 0,25
FG068298	Hypothetical protein FG03971.1	8,22 ± 0,09
FG068300	14-3-3-like Protein	29,65 ± 0,18

In seguito, i livelli d’espressione di questi otto geni sono stati normalizzati con i livelli d’espressione degli stessi geni isolati nel micelio del fungo cresciuto in assenza di metalli pesanti (controllo). I risultati di tali esperimenti (tabella 11) hanno messo in evidenza una generale sovraespressione degli otto geni nel micelio da fungo cresciuto in presenza di mercurio. In particolar modo si può notare come i livelli d’espressione dei geni codificanti le putative *Hydrophobin* e *40S Ribosomal Protein S25* siano rispettivamente 14 e 12 volte più elevati rispetto a quelli misurati nel controllo. I livelli d’espressione rispettivamente della *Polysaccharide deacetylase* e della *14-3-3 like protein* sono risultati circa 68 e 20 volte superiori a quelli misurati nel controllo. Infine è stato evidenziato un significativo aumento nei livelli d’espressione dei trascritti codificanti la putativa *Hypothetical protein* FG03971.1 (10 volte), la putativa

Hypothetical protein FG09277.1 (21 volte), la putativa *Hypothetical protein FG05179.1* (14 volte) e la putativa *Iron-sulfur cluster binding protein* (10 volte).

Tabella 11: Livelli d’espressione dei geni isolati mediante la libreria sottrattiva mercurio specifica. Valori relativi al “mercurio (II)” normalizzato con il “controllo”.

EST	Identità putative	Livelli d’espressione genica (Hg normalizzato vs controllo)
FG068292	Polysaccharide Deacetylase	66,72 ± 0,1
FG068293	40SRibosomal Protein S25	11,39 ± 0,03
FG068295	Iron-Sulfur cluster-binding protein	9,51 ± 0,01
FG068296	Hypothetical protein FG05179.1	14,72 ± 0,03
FG068297	Hydrophobin	14,12 ± 0,07
FG068298	Hypothetical protein FG09277.1	21,41 ± 0,18
FG068298	Hypothetical protein FG03971.1	10,13 ± 0,13
FG068300	14-3-3-like Protein	19,29 ± 0,1

Infine, i livelli d’espressione di questi otto geni isolati dal micelio di *T. harzianum* cresciuto in presenza di cadmio sono stati normalizzati con i livelli d’espressione degli stessi geni isolati nel micelio del fungo cresciuto in assenza di metalli pesanti (controllo).

Nei risultati di tali esperimenti, mostrati nella tabella 12, questi geni risultano essere *downregulated* rispetto al controllo eccezion fatta per il gene codificante la *Polysaccharide deacetylase* e il gene codificante la *Hypothetical protein FG03971.1*.

In questi casi, infatti, il livelli d'espressione dei geni codificanti le due putative proteine, risultano essere rispettivamente 14 volte (*Polysaccharide deacetylase*) e 1 volta (*Hypothetical protein FG03971.1*) più elevati rispetto a quelli misurati nel controllo.

Tabella 12: Livelli d'espressione dei geni isolati mediante la libreria sottrattiva mercurio specifica. Valori relativi al "cadmio" normalizzato con il "controllo".

EST	Identità putative	Livelli d'espressione genica (Cd normalizzato vs controllo)
FG068292	Polysaccharide Deacetylase	13,45 ± 0,14
FG068293	40SRibosomal Protein S25	0,68 ± 0,02
FG068295	Iron-Sulfur cluster-binding protein	0,39 ± 0,03
FG068296	Hypothetical protein FG05179.1	0,75 ± 0,1
FG068297	Hydrophobin	0,73 ± 0,01
FG068298	Hypothetical protein FG09277.1	0,67 ± 0,01
FG068298	Hypothetical protein FG03971.1	1,23 ± 0,05
FG068300	14-3-3-like Protein	0,65 ± 0,15

Qui di seguito vengono riportati i risultati d'insieme relativi a questa prima serie d'esperimenti di Real-Time RT-PCR. Da quanto esposto fino ad ora appare evidente che i livelli d'espressione di questi otto geni isolati mediante la *SSH library mercurio specifica* risultino avere una generale sovraespressione nel caso di micelio di *T. harzianum* cresciuto in presenza di mercurio mentre risultano essere *downregulated* nel caso di micelio fungino cresciuto in presenza di cadmio e nel caso del controllo.

Tabella 13: Livelli d'espressione dei geni isolati mediante la libreria sottrattiva mercurio (II) specifica. Valori cumulativi della prima serie d'esperimenti di Real-Time RT-PCR.

Identità putative	Hg normalizzato vs Controllo	Hg normalizzato vs Cd	Cd normalizzato vs Controllo
Polysaccharide Deacetylase	66,72	4,96	13,45
40SRibosomal Protein S25	11,39	16,80	0,68
Iron-Sulfur cluster-binding protein	9,51	24,42	0,39
Unknown	14,72	19,70	0,75
Hydrophobin	14,12	19,29	0,73
Unknown	21,41	32	0,67
Unknown	10,13	8,22	1,23
14-3-3-like Protein	19,29	29,65	0,65

Questa netta differenza nei livelli d'espressione risulta essere ancora più evidente se si osserva la seguente rappresentazione grafica in cui vengono mostrati i risultati delle Real-Time RT-PCR (Fig. 33).

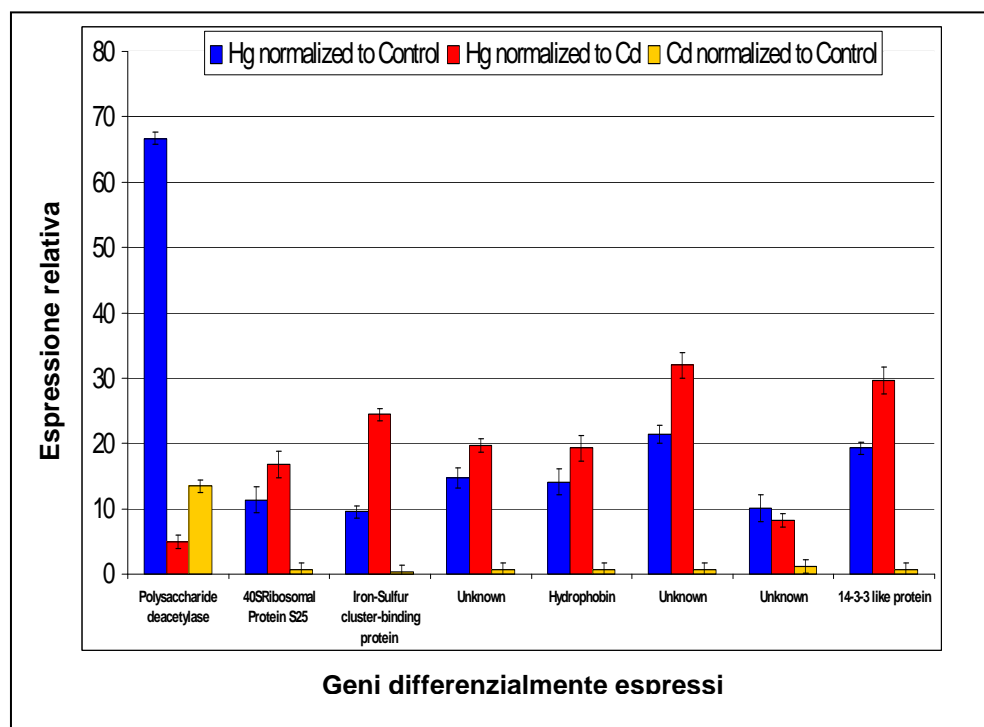


Figura 33: Rappresentazione grafica dei livelli d’espressione dei geni isolati mediante libreria sottrattiva mercurio (II) specifica in *T. harzianum*. Valori normalizzati con “mercurio (II)”, “cadmio” e “controllo”. Sterilizzazione mediante autoclave.

I risultati sembrerebbero suggerire che la maggiore crescita di *T. harzianum* in presenza di mercurio sia una diretta conseguenza della sovraespressione degli otto geni differenzialmente espressi.

E’ importante ribadire che in questa prima serie d’esperimenti i substrati di crescita, in presenza e in assenza di metalli pesanti, sono stati sterilizzati in autoclave.

3.4 Effetti sulla crescita di *Trichoderma harzianum* in presenza di mercurio (II) sterilizzato in autoclave e per microfiltrazione

Esperimenti di crescita condotti su substrato Czapek-Dox in presenza di mercurio (II; come HgCl_2) sterilizzato in autoclave e per microfiltrazione hanno messo in evidenza che *T. harzianum* si comporta in maniera diversa a seconda del processo di sterilizzazione seguito.

I risultati di tali esperimenti mostrano come il fungo cresce più di un normale controllo su substrato Czapek contenente cloruro mercurico sterilizzato in autoclave mentre non si osserva crescita nel caso in cui la sterilizzazione avvenga per microfiltrazione (tab. 14 -15).

I risultati ottenuti confermerebbero sia quanto finora osservato in questo lavoro sia quanto detto nello studio pubblicato nel 2009 (Raspanti *et al.*, 2009)

Tabella 14: Peso secco micelio *T. harzianum* dopo 4 giorni di crescita in presenza di cloruro mercurico sterilizzato per microfiltrazione.

HgCl₂ 10 ppm
(Sterilizzazione per microfiltrazione con filtro assoluto diametro 0,2 μm)

	Peso secco medio (mg/mL)	Dev. Std
Controllo	1,700	0,003
Hg 10 ppm	<i>N.C.</i>	<i>N.C.</i>

Δ Peso	-
Δ Peso %	-

Tabella 15: Peso secco micelio *T. harzianum* dopo 4 giorni di crescita in presenza di cloruro mercurico sterilizzato in autoclave.

HgCl₂ 10 ppm

(Sterilizzazione in autoclave; fase di sterilizzazione 120 °C, 20 min)

	Peso secco medio (mg/mL)	Dev. Std
Controllo	1,746	0,005
Hg 10 ppm	2,748	0,002

Δ Peso (mg)	1,002
Δ Peso %	36,5

3.5 Saggio con ammoniaca: formazione del cloruro mercurioso

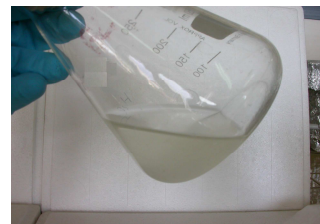
Il differente comportamento del cloruro mercurico sulla crescita di *T. harzianum* in funzione della metodologia di sterilizzazione seguita ha suggerito la possibile trasformazione del mercurio (II) in mercurio (I) dal momento che i processi di caramellizzazione degli zuccheri che intervengono durante la sterilizzazione ad alta temperatura sono processi di ossidazione certamente catalizzati da metalli che possano fungere da ossidanti. A questo proposito il saggio con ammoniaca ha confermato la formazione di sali di mercurio (I) nel substrato di coltura sterilizzato in autoclave.

Nella prima serie d'esperimenti in cui sono state saggiate delle aliquote di substrato Czapek contenente cloruro mercurico sterilizzato in autoclave e per microfiltrazione è stata, infatti, confermata la riduzione del cloruro mercurico a cloruro mercurioso solo nella soluzione sterilizzata in autoclave. Tale riduzione è confermata dalla formazione del precipitato nerastro di mercurio metallico finemente suddiviso che si staglia, come corpo di fondo, nei campioni saggiati contenenti cloruro mercurico autoclavato.

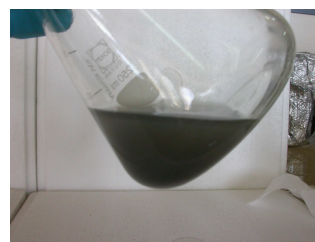
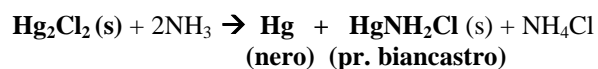
Di contro, la suddetta riduzione, non si è verificata nei campioni contenenti cloruro mercurico microfiltrato, infatti, in questi casi, il saggio dava esito negativo (vedi figure di seguito).

Saggio su substrato Czapek contenente cloruro mercurico (HgCl₂) microfiltrato

1) Cloruro Mercurico HgCl₂



2) Cloruro Mercurioso Hg₂Cl₂ (Testimone 1)

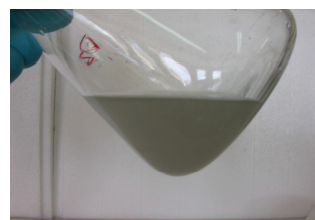
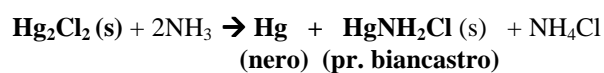
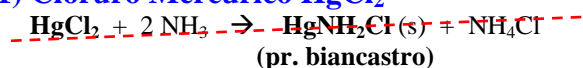


3) Controllo (Testimone 2)

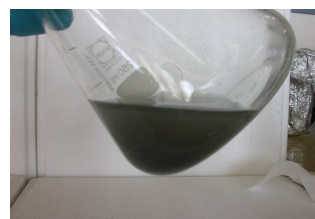
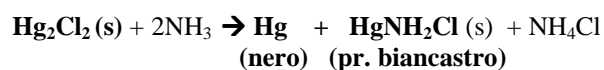


Saggio su substrato Czapek contenente cloruro mercurico (HgCl₂) autoclavato

1) Cloruro Mercurico HgCl₂



2) Cloruro Mercurioso Hg₂Cl₂ (Testimone 1)



3) Controllo (Testimone 2)

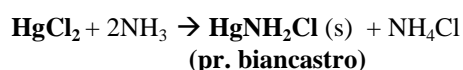


Nella seconda serie d'esperimenti, per confermare l'effettivo verificarsi di una reazione di ossido-riduzione in autoclave, sono state saggiate delle

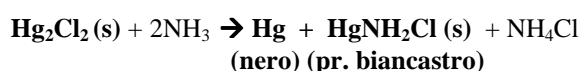
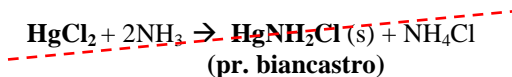
aliquote di substrato Czapek privo di saccarosio e addizionato di cloruro mercurico. I risultati di tali esperimenti hanno confermato il verificarsi in autoclave di una reazione di ossido-riduzione in cui l'agente riducente è il saccarosio del substrato Czapek. Saggiando infatti con ammoniaca il substrato contenente cloruro mercurico autoclavato e privo di saccarosio, la già citata formazione di mercurio metallico nero finemente suddiviso non si è verificata. Di contro, il saggio con ammoniaca del testimone ha portato alla formazione del mercurio metallico nero (vedi figure di seguito).

Saggio con NH₃ su Substrato Czapek contenente cloruro mercurico sterilizzato in autoclave senza (1) e con (2) saccarosio:

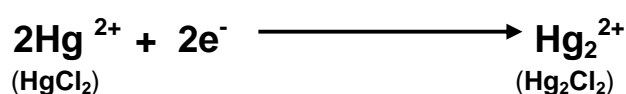
**1) Cloruro Mercurico HgCl₂ - autoclavato
(senza saccarosio)**



**2) Cloruro Mercurico HgCl₂ – autoclavato
(con saccarosio)**



Riassumendo, quindi, nelle condizioni di sterilizzazione in autoclave si è osservata la riduzione del mercurio mercurico (Hg²⁺) a mercurio mercurioso (Hg₂²⁺). Il primo, infatti, acquistando due elettroni si riduce a mercurio mercurioso (monometrico bivalente -Hg-Hg-) portando alla formazione di cloruro mercurioso (Hg₂Cl₂).



3.6 Risultati analisi HPLC e GC del substrato Czapek

L'ossidazione del saccarosio nelle condizioni di sterilizzazione in autoclave è stata confermata dall'analisi del substrato Czapek mediante gascromatografia e HPLC. I risultati di tali esperimenti hanno evidenziato la formazione in autoclave di composti 1,2-dicarbonilici derivanti, per l'appunto, dall'ossidazione del saccarosio. I composti 1,2-dicarbonilici formati sono: 5-idrossimetilfurfurale (HMF), 3-deossiglucosulosio (3-DG), gliossale (G) e metilgliossale (MG). Dall'analisi in HPLC risulta inoltre che la quantità relativa dei composti 1,2-dicarbonilici formatasi è verosimilmente uguale sia in substrato Czapek addizionato di cloruro mercurico sia nel controllo. I risultati relativi a queste analisi sono riportate nelle immagini e nella tabella seguenti.

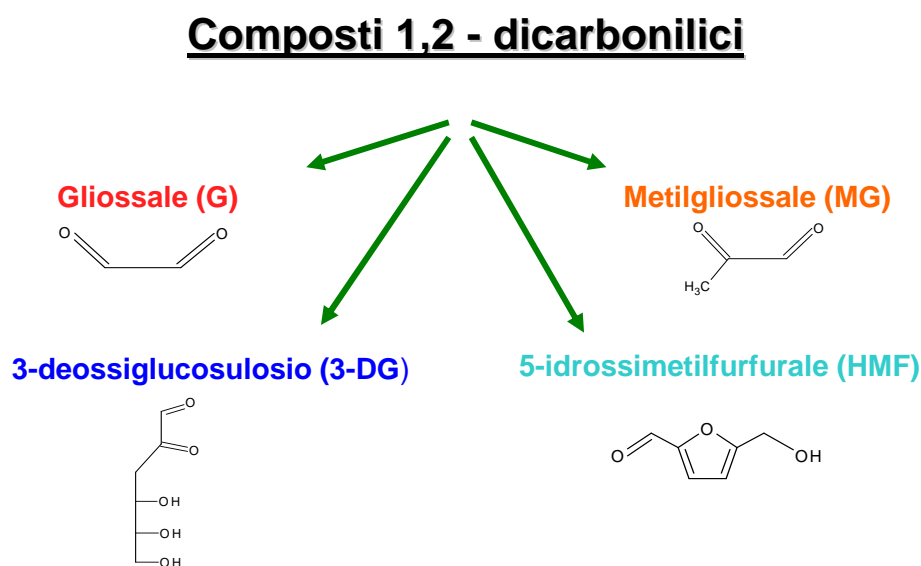


Tabella 16: Risultati analisi GC e HPLC del substrato Czapek autoclavato con e senza cloruro mercurico

	3-DG (ppm)	G (ppm)	MG (ppm)	HMF (ppm)
Controllo	0,93	6,66	11,83	0,079
HgCl₂	0,93	5,76	10,7	0,063

3.7 Effetti del mercurio I e del mercurio II sulla crescita di *Trichoderma harzianum*

I risultati relativi all'effetto del cloruro mercurioso sulla crescita di *T. harzianum* hanno dimostrato l'effettivo coinvolgimento di questa forma mercuriale nello stimolo alla crescita finora osservato.

I dati relativi al peso secco della biomassa miceliare del fungo accresciutosi su substrato Czapek-Dox in presenza di mercurio (I) e mercurio (II) hanno evidenziato un diverso comportamento di *T. harzianum* a seconda della forma mercuriale utilizzata e a seconda della via di sterilizzazione impiegata.

Se da un lato, infatti, è stato osservato un maggiore sviluppo miceliare, rispetto al controllo, sia su substrato Czapek-Dox contenente cloruro mercurioso sia su substrato Czapek-Dox contenente cloruro mercurico (entrambi sterilizzati in autoclave); dall'altro, lo stesso comportamento non si è ripetuto utilizzando le medesime soluzioni mercuriali sterilizzate per microfiltrazione.

In questi casi, infatti, solo il peso secco del micelio cresciuto su substrato Czapek contenente cloruro mercurioso microfiltrato è risultato essere maggiore del controllo.

Utilizzando cloruro mercurico, invece, è stata osservata la totale inibizione del fungo a 10 ppm mentre, a valori più bassi (1 ppm), il fungo sembrerebbe crescere meno del controllo riuscendo, in ogni caso, a tollerare questa forma estremamente tossica di mercurio.

Nei grafici di seguito sono mostrati i risultati relativi a questi esperimenti.

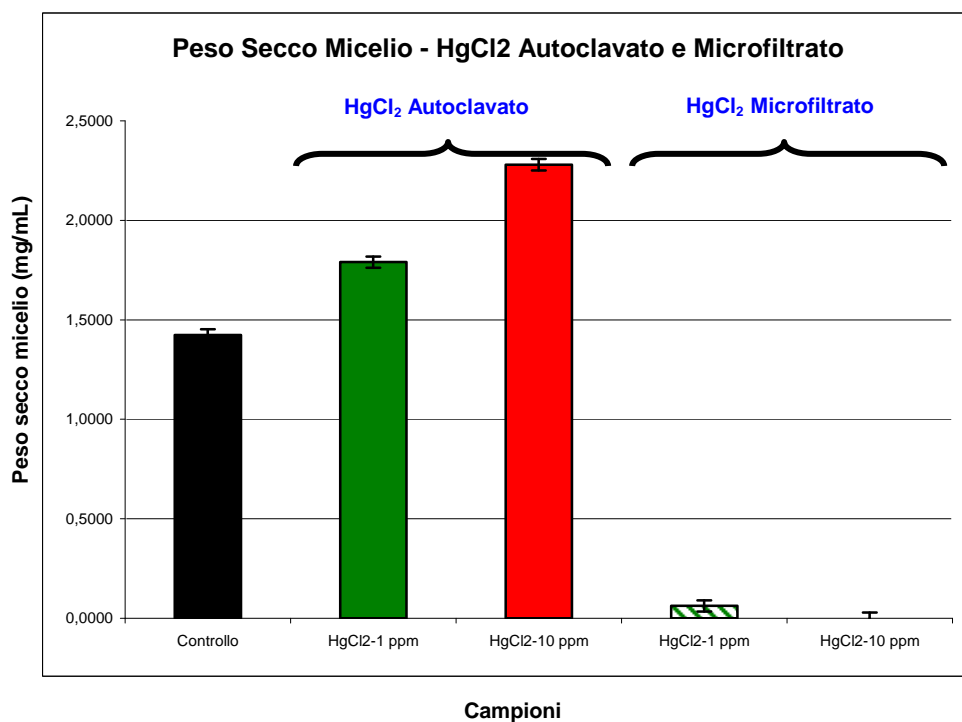


Figura 34: Peso secco della biomassa miceliare di *T. harzianum* dopo 4 giorni di crescita in presenza di cloruro mercurico HgCl₂ autoclavato e microfiltrato su substrato liquido Czapek-Dox.

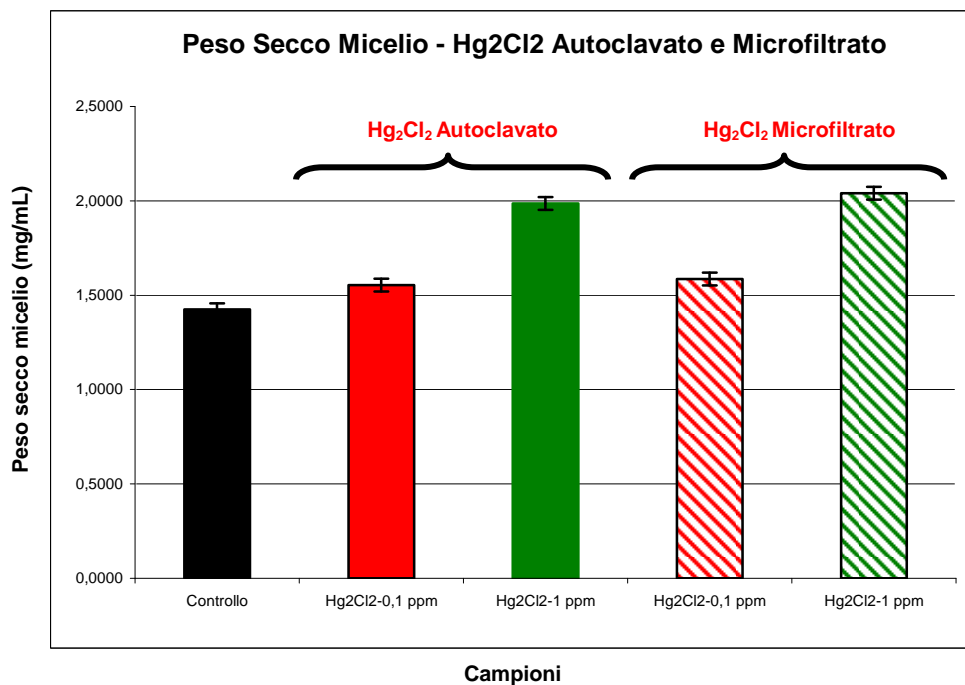


Figura 35: Peso secco della biomassa miceliare di *T. harzianum* dopo 4 giorni di crescita in presenza di cloruro mercurioso Hg₂Cl₂ autoclavato e microfiltrato su substrato liquido Czapek-Dox.

I risultati relativi agli esperimenti d'accrescimento radiale su piastra hanno evidenziato una sostanziale congruenza con i dati appena esposti. Infatti, nei casi in cui la sterilizzazione del metallo veniva realizzata mediante microfiltrazione, è stata osservata una maggiore crescita radiale in presenza di cloruro mercurioso anziché in presenza di cloruro mercurico e in assenza di metalli pesanti (testimone).

Di contro, nei casi in cui la sterilizzazione veniva effettuata in autoclave, è stato osservato un comportamento differenziato.

In questo caso, infatti, si è osservata una maggiore crescita radiale su piastra sia in presenza di cloruro mercurico sia in presenza di cloruro mercurioso rispetto al controllo.

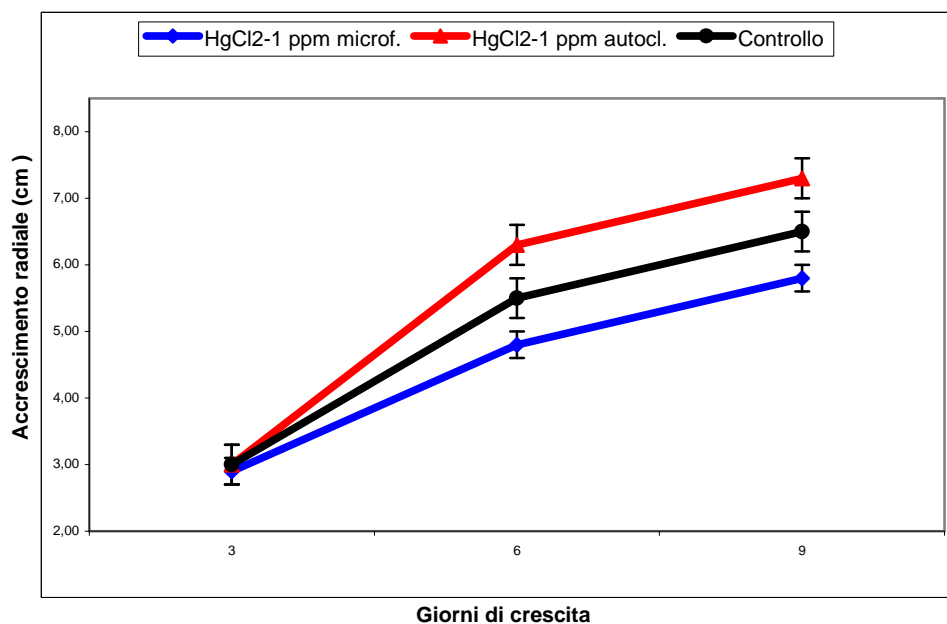


Figura 36: Accrescimento radiale su piastra del micelio di *T. harzianum* cresciuto su substrato Czapek-Dox Agar con cloruro mercurico sterilizzato per microfiltrazione e in autoclave; osservazioni dopo 3, 6 e 9 giorni di crescita.

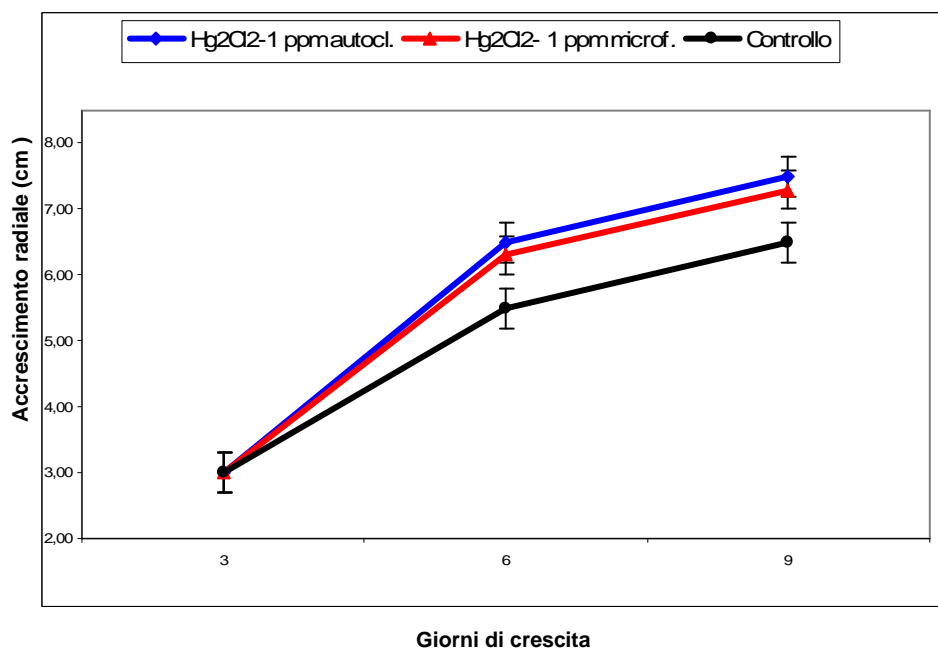


Figura 37: Accrescimento radiale su piastra di *T. harzianum* cresciuto su substrato Czapek-Dox Agar con cloruro mercurioso sterilizzato per microfiltrazione e in autoclave; osservazioni dopo 3, 6 e 9 giorni di crescita.

3.8 Analisi dei livelli d'espressione genica su micelio cresciuto in presenza di mercurio (II) microfiltrato

Dal momento che i risultati della crescita miceliare dimostravano che il mercurio (II) aveva un comportamento stimolante se presente nel brodo colturale durante la sterilizzazione, mentre inibiva la crescita se aggiunto microfiltrato dopo la sterilizzazione in autoclave, in una seconda serie d'esperimenti sono stati studiati i livelli d'espressione di questi otto geni su micelio di *T. harzianum* cresciuto su substrato Czapek addizionato di cloruro mercurico sterilizzato per microfiltrazione. I risultati di questi esperimenti sono mostrati nella tabella che segue.

Tabella 17: Livelli d'espressione dei geni isolati mediante la libreria sottrattiva mercurio (HgCl₂ microfiltrato) specifica. Valori relativi al "mercurio" normalizzato con il "controllo".

EST	Identità putative	Livelli d'espressione genica (Hg normalizzato vs controllo)
FG068292	Polysaccharide Deacetylase	0,13 ± 0,2
FG068293	40SRibosomal Protein S25	0,79 ± 0,1
FG068295	Iron-Sulfur cluster-binding protein	0,57 ± 0,1
FG068296	Hypothetical protein FG05179.1	0,96 ± 0,3
FG068297	Hydrophobin	0,94 ± 0,2
FG068298	Hypothetical protein FG09277.1	0,90 ± 0,5
FG068298	Hypothetical protein FG03971.1	0,42 ± 0,1
FG068300	14-3-3-like Protein	1,11 ± 0,2

Dalla tabella si può notare l'assenza della caratteristica sovraespressione nei livelli d'espressione di questi otto geni come invece osservata nei precedenti esperimenti di Real-Time RT-PCR. Questa netta divergenza fra le due serie di esperimenti di Real Time RT-PCR risulta essere ancor più evidente se si osserva la tabella e il grafico sottostanti in cui vengono messi a confronto le due serie d'esperimenti.

Tabella 18: Livelli d'espressione dei geni isolati mediante la libreria sottrattiva mercurio specifica. Valori relativi al micelio cresciuto in presenza di mercurio delle due serie d'esperimenti di Real-Time RT PCR.

EST	Identità putativa	<i>HgCl₂ microfiltrato (2010)</i>	<i>HgCl₂ autoclavato (2009)</i>
FG068292	Polysaccharide Deacetylase	0,13 ± 0,2	66,72 ± 0,1
FG068293	40S Ribosomal Protein S25	0,79 ± 0,1	11,39 ± 0,03
FG068295	Iron-Sulfur cluster-binding protein	0,57 ± 0,1	9,51 ± 0,01
FG068296	Hypothetical protein FG05179.1	0,96 ± 0,3	14,72 ± 0,03
FG068297	Hydrophobin	0,94 ± 0,2	14,12 ± 0,07
FG068298	Hypothetical protein FG09277.1	0,90 ± 0,5	21,41 ± 0,18
FG068298	Hypothetical protein FG03971.1	0,42 ± 0,1	10,13 ± 0,13
FG068300	14-3-3-like Protein	1,11 ± 0,2	19,29 ± 0,1

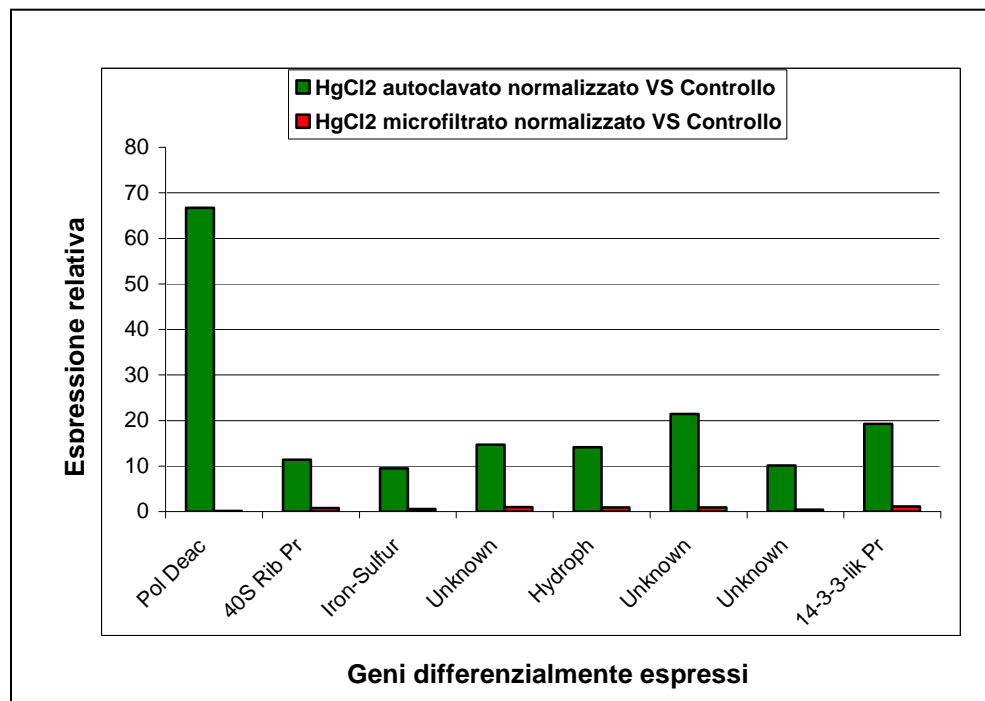


Figura 38: Livelli d'espressione dei geni isolati dalla SSH library mercurio specifica in *T. harzianum* cresciuto su substrato liquido (Czapek-dox) in presenza di cloruro mercurico sterilizzato in autoclave e mediante microfiltrazione

Capitolo 4: Conclusioni

Il crescente interesse per la tutela degli ecosistemi ha stimolato molte ricerche verso lo sviluppo di strategie di biorisanamento ambientale basate sull'impiego di sistemi biologici e la comprensione dei meccanismi molecolari attraverso i quali gli organismi rispondono agli stress indotti dalle sostanze inquinanti. I metalli pesanti sono tra i più pericolosi composti che alterano la qualità dell'ambiente per cause sia naturali, quali il substrato pedogenetico, che antropiche, quali le attività industriali, civili ed agrarie. Uno dei motivi principali che determinano la tossicità dei metalli pesanti è l'impossibilità ad essere degradati e di essere pertanto soggetti al fenomeno della biomagnificazione e dell'accumulo lungo la catena alimentare. Tra gli organismi che possono essere impiegati nel biorisanamento i funghi dimostrano un elevato potenziale perchè colonizzano tutti gli ecosistemi, esplorano grandi volumi di suolo grazie alle loro estese ramificazioni ifali, producono acidi organici chelanti di metalli e tollerano un ampio *range* di pH. Nei funghi la resistenza ai metalli pesanti e la capacità del loro accumulo sono chiaramente evidenti, tuttavia, i meccanismi molecolari alla base di questi fenomeni sono ancora sconosciuti. In questa tesi di dottorato di ricerca, pertanto, ci si prefigge l'obiettivo di dare un contributo alla comprensione dei meccanismi di tolleranza e detossificazione adottati dai funghi in risposta allo stress da metalli pesanti ed in particolar modo in risposta allo stress da mercurio. Per il raggiungimento di questo obiettivo sono state utilizzate tecniche chimiche, biochimiche e di biologia molecolare al fine d'identificare i geni espressi e il loro livello d'espressione in *T. harzianum* cresciuto in presenza di metalli pesanti, quali il cadmio e, in particolar modo, il mercurio.

In un primo momento è stato osservato il comportamento di *T. harzianum* in presenza dei suddetti metalli pesanti. E' stato osservato sia l'accrescimento radiale su piastra, sia il peso secco del micelio del fungo accresciutosi, in

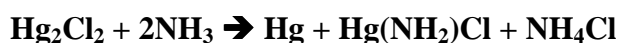
entrambi i casi, in presenza di mercurio, cadmio e su substrato di crescita privo dei suddetti metalli pesanti. In seguito, l'obiettivo è stato quello di determinare i geni differenzialmente espressi nel micelio del fungo cresciuto in presenza di questi metalli pesanti. Al tal fine sono state costruite due *SSH library*: una specifica per il mercurio e una specifica per il cadmio. Queste hanno permesso d'identificare alcuni geni del fungo coinvolti nella risposta allo stress da cadmio e da mercurio. Tra questi, di particolare interesse risultano essere i geni codificanti per l'idrofobina e la polisaccaride deacetilasi, entrambi espressi nel micelio del fungo cresciuto in presenza di mercurio. Le idrofobine sono proteine secrete dai funghi costituite da un centinaio di amminoacidi, compresi otto residui di cisteina, disposti in modo tale che la proteina possa ripiegarsi e formare un complesso idrofobico. Tra le varie funzioni attribuite alle idrofobine la più importante è quella di un suo coinvolgimento nei processi di differenziazione. Si potrebbe ipotizzare che il ruolo dell'idrofobina nell'interazione specifica tra *T. harzianum* e mercurio sia quello di chelare questo metallo pesante, attraverso i residui di cisteina, ed accumularlo nella parete cellulare.

A questo punto si è focalizzata l'attenzione sugli otto geni isolati dalla *SSH library mercurio specifica* andando perciò a valutare i livelli d'espressione di questi geni. I risultati hanno confermato quanto anticipato dalle librerie sottrattive. I livelli d'espressione di questi otto geni, infatti, mostrano una generale sovraespressione nel micelio di *T. harzianum* cresciuto in presenza di mercurio rispetto allo stesso cresciuto in presenza di cadmio e nel controllo. La sovraespressione dei geni codificanti per proteine della parete cellulare, suggerirebbe un ruolo attivo e fondamentale di queste nei meccanismi di resistenza al mercurio messi in atto dal fungo.

In un secondo momento, riscontrando una sostanziale divergenza fra i risultati finora ottenuti e quelli di un altro lavoro pubblicato nel 2009 (Raspanti *et al.*), sono stati avviati degli esperimenti al fine di capire quale fosse la natura e il motivo di queste divergenze. Da questo lavoro risulterebbe infatti un comportamento opposto a quello osservato e descritto fino ad ora. In altre parole la presenza di mercurio nel substrato di crescita

inibirebbe la crescita di *T. harzianum*. L'unica differenza riscontrata nell'ambito dei due lavori è stata la modalità di sterilizzazione della soluzione salina contenente mercurio (in entrambi i casi cloruro di mercurio -HgCl₂). Mentre nel lavoro del 2009, infatti, la sterilizzazione della soluzione avveniva per microfiltrazione, tramite filtro assoluto da 0,2 µm di diametro, nel nostro caso essa veniva realizzata in autoclave, contestualmente al substrato di crescita. Alla luce di ciò sono stati effettuati nuovi esperimenti di crescita sia su piastra che su terreno colturale liquido, introducendo questa nuova variabile operativa. In questi nuovi esperimenti si è in effetti osservato un comportamento diverso del fungo a seconda della modalità di sterilizzazione e somministrazione del metallo pesante. Il cloruro di mercurio, alla concentrazione di 10 ppm, ha infatti inibito la crescita miceliare quando veniva sterilizzato tramite microfiltrazione mentre ha stimolato la crescita quando veniva sterilizzato in autoclave, contestualmente al terreno. Questi risultati contraddittori fra di loro hanno però confermato sia i risultati fino ad ora ottenuti durante questo dottorato, sia quelli pubblicati nello studio del 2009.

A questo punto, ipotizzando la riduzione in autoclave del mercurio (II) a mercurio (I), sono stati effettuati nuovi esperimenti a sostegno di tale tesi. I risultati sperimentali hanno in effetti confermato che in queste condizioni di temperatura, pressione e pH, il mercurico (II) si riduce a mercurio (I). Sfruttando infatti la seguente reazione chimica di *disproporzione o dismutazione*, in grado di distinguere qualitativamente il cloruro mercurioso dal cloruro mercurico, si è giunti alla conclusione che in queste condizioni il mercurio mercurico (Hg²⁺) si riduce a mercurio mercurioso (Hg₂²⁺).



Mentre la reazione con cloruro mercurico e ammoniaca porta infatti alla sola formazione del cloruro di mercurio ammonio (precipitato biancastro), la stessa reazione condotta con calomelano e ammoniaca porta alla formazione di mercurio metallico nero finemente suddiviso facilmente visibile già ad

occhio nudo, oltre al già citato cloruro di mercurio ammonio. Saggiando con ammoniaca il substrato Czapek addizionato con cloruro mercurico e sterilizzato in autoclave, si è avuta la formazione di una polvere nerastra di mercurio metallico. Lo stesso non si è verificato con il campione contenente substrato Czapek e cloruro mercurico microfiltrato. Questi risultati hanno trovato conferma anche grazie ad un altro esperimento in cui la preparazione del substrato Czapek è stata effettuata senza aggiungere saccarosio. Mancando tale carboidrato infatti, unico “vero” agente riducente del terreno di coltura, la riduzione di HgCl_2 a Hg_2Cl_2 non si è verificata. In aggiunta a questo, peraltro, mediante analisi gas-cromatografica e in HPLC del substrato Czapek è stata dimostrata l’ossidazione del saccarosio in autoclave con formazione di composti 1,2-dicarbonilici come il 3-deossiglucosulosio (3-DG), il gliossale (G), il metilgliossale (MG) e il 5-idrossimetilfurfurale (HMF).

La riduzione del mercurio mercurico a mercurio mercurioso osservata e confermata da questi esperimenti, in queste condizioni operative, risulta essere una novità. Ad oggi, infatti, non risultano in merito dati presenti in letteratura.

Sulla base di queste evidenze sperimentali sono stati avviati una serie di esperimenti di crescita tali da permettere l’osservazione del comportamento del fungo in presenza delle due forme di mercurio. Le due tipologie di soluzioni saline, cloruro mercurico (mercurio II) e cloruro mercurioso (mercurio I), sono state aggiunte al substrato colturale liquido dopo microfiltrazione o direttamente al terreno poco prima della sterilizzazione in autoclave. I risultati sperimentali hanno evidenziato un comportamento tale da far supporre un reale coinvolgimento del mercurio (I) allo stimolo finora osservato in *T. harzianum*. Infatti, lo sviluppo miceliare dei campioni contenenti mercurio (I) microfiltrato alla concentrazione di 0,1 ppm e 1 ppm sembrerebbero essere, dopo 4 giorni di crescita, maggiore del controllo del 10,2 % nel primo caso e del 30,2 % nel secondo. Da notare come questi valori risultino essere paragonabili a quelli ottenuti utilizzando il medesimo sale alla medesime concentrazioni ma sterilizzato in autoclave: 8,3 % in più

per il campione a 0,1 ppm e 28,3 % in più per il campione a 1 ppm. In merito al cloruro mercurico invece, a 10 e 1 ppm, *T. harzianum* cresce più del controllo solo quando la soluzione salina è aggiunta poco prima della sterilizzazione in autoclave. Nei casi in cui la stessa è aggiunta tramite microfiltrazione al terreno di coltura sterile si ha la totale inibizione della crescita fungina per concentrazioni maggiori a 1 ppm mentre si osserva uno sviluppo miceliare inferiore al controllo a 1 ppm. Analizzando, invece, il comportamento di *T. harzianum* in campioni contenenti mercurio (II) aggiunto prima della sterilizzazione in autoclave è stata osservata una crescita miceliare maggiore del controllo sia a 1 ppm (12,6 %), sia a 10 ppm (37,5 %). Oltre questa concentrazione il mercurio (II) ha un'azione inibitrice nei confronti di *T. harzianum* anche quando la sua aggiunta avvenga poco prima della sterilizzazione in autoclave.

Anche i risultati dei nuovi esperimenti d'accrescimento radiale su piastra hanno confermato l'andamento finora osservato. Rispetto al controllo, infatti, si è osservato un maggiore accrescimento diametrico su substrato Czapek agarizzato contenente mercurio mercurioso (I) sia quando la sterilizzazione veniva effettuata in autoclave sia quando essa veniva realizzata per microfiltrazione.

Alla luce di questi interessanti risultati, sono stati condotti ulteriori esperimenti di Real-Time RT-PCR monitorando il livelli d'espressione degli otto geni isolati con la *SSH library mercurio* specifica nel micelio di *T. harzianum* cresciuto su substrato Czapek addizionato di cloruro mercurico microfiltrato. I risultati di tali esperimenti hanno permesso di constatare una netta divergenza fra i risultati dei primi esperimenti di Real-Time RT-PCR e quest'ultimi. In presenza di mercurio (II) microfiltrato, infatti, questi otto geni risulterebbero essere *downregulated* rispetto al controllo non riscontrando più quella caratteristica sovraespressione osservata nella prima serie d'esperimenti.

Altri esperimenti di Real-Time RT-PCR sono attualmente in corso al fine di valutare i livelli d'espressione di questi otto geni in *T. harzianum* cresciuto su substrato Czapek in presenza di cloruro mercurioso.

I risultati di questi esperimenti evidenzerebbero che la caratteristica mercurio tolleranza mostrata da *T. harzianum* durante l'attività sperimentale di questo dottorato di ricerca si possa riferire non solo al mercurio cationico bivalente (Hg^{2+}), come in prima istanza ipotizzato, ma anche alla forma dimerica monovalente (Hg_2^{2+}). Dai dati inoltre risulterebbe evidente che il fungo tollera e resista alle due forme mercuriali in maniera differente. Infatti, se da un lato tollera la forma in assoluto più tossica del mercurio, quella cioè bivalente, fino a concentrazioni di 1 ppm (3,6 μM), dall'altro tollera la forma dimerica monovalente del mercurio fino a concentrazioni di 3 ppm (6,3 μM). Inoltre gli esperimenti condotti hanno evidenziato la capacità di *T. harzianum* di crescere e svilupparsi più del controllo su substrato colturale contenente mercurio (I) (0,1 ppm – 0,21 μM ; 1 ppm – 2,1 μM).

Analizzando poi i livelli d'espressione degli otto geni isolati dalla *SSH library mercurio specifica* si nota come essi mostrino una generale sovraespressione nel micelio di *T. harzianum* cresciuto in presenza di mercurio rispetto allo stesso cresciuto in presenza di cadmio e nel controllo. La sovraespressione dei geni codificanti per proteine della parete cellulare suggerirebbe un ruolo attivo e fondamentale di queste nei meccanismi di resistenza al mercurio messi in atto dal fungo. I risultati suggerirebbero, inoltre, che la maggiore crescita di *T. harzianum* in presenza di mercurio sia una conseguenza diretta di questa sovraespressione.

Alla luce di ciò, gli obiettivi futuri di una possibile ricerca potrebbero essere quelli di studiare i livelli d'espressione di questi stessi geni nel micelio del fungo cresciuto in presenza di altri metalli pesanti per valutare se i loro maggiori livelli d'espressione siano esclusivamente legati alla presenza di mercurio. In ultima analisi, lo sfruttamento della capacità di *T. harzianum* di crescere e tollerare il mercurio presente potrebbe essere una valida alternativa agli attuali sistemi (a costi elevati) impiegati per l'abbattimento di questo pericoloso metallo pesante dall'ambiente.

Note Bibliografiche

Adams P., FA De-Leij, and JM Lynch, 2007. *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. *Microb Ecol.*; 54(2): 306-13.

Ahearn G.A., Mandal P. K. and Mandal A., 2004. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review, *J Comp Physiol B*, 174(6): 439-52.

Ahmad J. S. and Baker R., 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*, *Phytopathol.* 77: 182-189.

Altomare C., Norvell W. A., Björkman T. and Harman G. F., 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Env. Microbial.* 65: 2926-2933.

Amandola G., Terreni V., 2000. *Analisi chimica strumentale e tecnica*, 1: 125-128.

Baird C., Cann M., 2006. *Chimica ambientale*, Zanichelli, Bologna, pp 177.

Banfalvi G., Gacsi M., Nagy G., Kiss Z. B. and Basnakian A. G., 2005. Cadmium induced apoptotic changes in chromatin structure and subphases of nuclear growth during the cell cycle in CHO cells. *Apoptosis*, 10(3): 631-42.

Bargagli R., 1998. Chemical elements and plants life. In: *Trace elements in terrestrial plants: an ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery*, 1-21.

Bigirimana J., 1997. Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. *Med.Fac.Landbouww. Univ.Gent* 62, 1001-1007.

Burgstaller W., Schinner F., 1993. Leaching of metals with fungi. *Journal of biotechnology*, 27: 91-116

Carsolio C., Benhamou N., Haran S., Cortes C., Gutierrez A., Chet I., Herrea-Estrela A., 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene *ech42* in mycoparasitism. *Appl. Environ. Microb.* 65, 929-953.

Chet I., 1987. Trichoderma-application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi, p. 137-160. In I. Chet (ed.), Innovative approaches to plant disease control. J. Willey and sons, New York, N.Y.

Clark R. B., Zeto S. K., 1996. Mineral acquisition by micorrhizal maize grown on acid and alkaline soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 28: 1495-1503.

Clarkson T. W. and Magos L., 2006. The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 36, No. 8, pp. 609-662.

Cobbett C. S. and Goldsbrough P. B., 2000. Mechanism of metal resistance: phytochelatin and metallothioneins. In: *Phytoremediation of toxic metals*. Edited by Raskin I., Ensley B., 247-269.

Cotton F. A., Wilkinson G., 1984. *Chimica inorganica*. Sec.Edizione, Casa editrice ambrosiana – Milano, pp. 564- 590.

Coyle P., Philcox J. C., Carey L. C., and Rofe A.M., 2002. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci*, 59(4): 627-47.

De la Cruz J., Pintor-Toro J.A., Benitez T., Liobell A., and Romero L.C., 1995. A novel endo-beta-1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.*, 177, 6937-6945.

Diatchenko L., Lau Y.F., Campbell A.P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E.D., Siebert P.D., 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl Acad Sci*. 93:6025-6030

Dluzniewska J., 2003. Reaction of fungi of *Trichoderma* genus to selected abiotic factors. *Electronic journal of polish agricultural universities*, 6 (2): 4.

Douglas A. Skoog; Donal M. West; F. James Holler; Stanley R. Crouch, 2005. *Chimica analitica*, 2a ed. Napoli, Edises.

Enciclopedia Encarta, 2006. Microsoft corporation.

Gadd G. M., 1990. Fungi and yeast for metal accumulation. *Microbial mineral recovery*, 149-276.

- Gadd G. M., 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New phytologist*, 124: 25-60.
- Gadd G. M., 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 156: 609 - 643.
- Gams G. and Bissett J., 1998. *Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics*, London GBR: CRC press, pp. 3-5.
- Gediga K., Matkowski K., Plaskowska E., 2000. *Trichoderma harzianum* rifai as a colonizer of soils polluted with nickel and lead. *Zeszyty Problemowe postepow nauk rolniczych*, 471: 903-911.
- Gema Arribas-Lorenzo and Francisco J. Morales, 2010. Analysis, Distribution, and Dietary Exposure of Glyoxal and Methylglyoxal in Cookies and Their Relationship with Other Heat-Induced Contaminants, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58 (5), pp 2966–2972
- Geremia R.A., Goldman G.H., 1996. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology* 86, 980-985.
- Gibson U.E., Heid C.A., Williams P.M., 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome* 6: 995-1001.
- Goldwater L. and Clarkson T., 1972, *Metallic contaminants and human health*. Academic press inc.; p. 17-55.
- Grill E., Winnacker E. L., Zenk M. H., 1985. Phytochelatins: the principal heavymetal complexing peptides of higher plants. *Science*, 230: 674-676.
- Hammerschmidt C. R. and Fitzgerald F.W., 2006. Bioaccumulation and Trophic Transfer of Methylmercury in Long Island Sound. *Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 51, 3, pp. 416-424.
- Harman G. E. et al, 1996. Biological and integrated control of *Botrytis* bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. *Biol.Control* 7, 259-266.
- Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I., Lorito M., 2004. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Microb.* 2, 43-56.

Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6:986-94.

Honda S., Hylander L. and Sakamoto L., 2006. Recent Advances in Evaluation of Health Effects on Mercury with Special Reference to Methylmercury: A Minireview. *Environmental Health and Preventive Medicine*, Vol. 11, 4, pp. 171-176.

Inbar J., and Chet I., 1995. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microb.*, 141, 2823-2829

Jaeckel P., Krauss G. J. and Krauss G., 2005. Cadmium and zinc response of the fungi *Heliscus lugdunensis* and *Verticillium cf. alboatrum* isolated from highly polluted water. *Science of The Total Environment*, 346: 274-279.

Jeremias H. R. Kägi, Bert L. Vallee With the technical assistance of Janet M. Carlson, 1961. Metallothionein: a Cadmium and Zinc-containing Protein from Equine Renal Cortex. II. PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES, *J. Biol. Chem.*, Sep 1961; 236: 2435 - 2442.

Kai U. Weigel · Tommy Opitz · Thomas Henle, 2003. Studies on the occurrence and formation of 1,2-dicarbonyls in honey, *Eur Food Res Technol* (2004) 218:147–151

Kamizono A., Nishizawa M., Teranishi Y., Murata K., and Kimura A., 1989. Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Gen Genet*, 219(1-2): 161-7.

Kapoor T. and Viraraghavan D., 1997. Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 61: 221-227.

Kapoor T., Viraraghavan D., Roy Cullimore, 1999. Removal of heavy metal using the fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 70: 95-104.

Kenneth A. Rubinson; Judith F. Rubinson, 2002. *Chimica analitica strumentale*, 1a ed. Bologna, Zanichelli.

Kim E.H., Kim I.K., Kwon J.Y., Kim S.W. and Park Y.W, 2006. The effect of fish consumption on blood mercury levels of pregnant women. *Yonsei medical journal*, Vol. 47, 5, pp. 626-633.

Krantz-Rülcker C., Allard B. and Schnürer J., 1993. Interactions between a soil fungus, *Trichoderma harzianum*, and IIb metals-adsorption to mycelium and production of complexing metabolites. *BioMetals*, 6: 223-230.

Krantz-Rülcker C., Allard B. and Schnürer J., 1996. Adsorption of IIb-metals by three common soil fungi-comparison and assessment of importance for metal distribution in natural soil systems. *Soil Biol. Biochem.*, 28 (7): 967-975.

Kredics L., Dóczi I., Antal Z., Manczinger L., 2001. Effect of heavy metals on growth and extracellular enzymes activities of mycoparasitic *Trichoderma* strains. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 66: 249-254.

Krone P. H., 2003. Heat shock proteins in development, aging, and evolution. *Semin Cell Dev Biol*, 14(5): 249.

Lapades D.N.. 1974: Dictionary of scientific and technical terms. McGraw-Hill, New York, pp 674.

Linder M.B., Szilvay G.R., Nakari-Setälä T., Penttillä M.E., 2005. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev.*, 29: 877-896.

Lora J.M., de la Cruz J., Benitez T., Liobell A. and Pintor-Toro J.A., 1994. A putative catabolite-repressed cell wall protein from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Mol. Gen. Genet.*, 242 (4): 461-466.

Maheshwari R., Bharadwaj G. and Bhat M., 2000. Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes, *Microbiol. Mol. Biol.*, 64: 461 - 488.

Margoshes M. and Vallee B. L., 1956. Flame photometry and spectrometry; principles and applications, *Methods Biochem Anal*, 3: 353-407.

Marin M.G, 1999. Diagnostica di laboratorio: tecniche di amplificazione genica. Milano: Edizioni Sorbona. 50.

Masek, T., Vopalensky V., Suchomelova P., and Pospisek P., 2005. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Anal. Biochem.*, 336:46-50.

Mason R. P., Kim E. H., Cornwell J. and Heyes D., 2006. An examination of the factors influencing the flux of mercury, methylmercury and other constituents from estuarine sediment, *Marine Chemistry*, Vol. 102, No. 1-2, pp. 96-110.

McCurry J., 2006. Japan remembers Minamata, *Lancet*, Vol. 367, 9505, pp. 99-100.

Munoz G., Nakari-Setälä T., Agostin E. and Penttillä M.E., 1997. Hydrophobin gene *srh1*, expressed during sporulation of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Curr. Genet.* 32 (3): 225-230.

Nielson D.L., Cox M.M., 2006. *I principi di biochimica di Lehninger*, Zanichelli.

Park J. D., Liu Y. and Klaassen C. D., 2001. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals(1). *Toxicology*, 163(2-3): 93-100.

Pinghe Y., Qiming Y., Bo J., Zhao L., 1998. Biosorption removal of cadmium from aqueous solution by using pretreated fungal biomass cultured from starchwastewater. *Water Resource*, 33: 1960-1963.

Raspanti E., Cacciola S. O., Gotor C., Romero L. C. and Garcia I., 2009. Implications of cysteine metabolism in the heavy metal response in *Trichoderma harzianum* and in three *Fusarium* species, *Chemosphere*, 76(1): 48-54.

Rausser W. E. and Meuwly P., 1995. Retention of cadmium in roots of maize seedlings. Role of complexation by phytochelatins and related thiol peptides. *Plant Physiol.*, 109: 195-202.

Rausser W. E., 1990. Phytochelatins. *Ann. Rev. Biochem.*, 59: 60-86.

Rausser W. E., 1999. Structure and functions of metal chelators produced by plants; the case of organic acid, amino acids, phytin and metallothioneins. *Cell Biochem. Biophys*, 31: 19-48.

Ray R. C., 2005. *Microbial biotechnology in agriculture and aquaculture*, Enfield, NH, USA: Science Publishers, pp 346-348.

Regnell O. and Tunlid A., 1991. Laboratory Study of Chemical Speciation of Mercury in Lake Sediment and Water under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Appl Environ Microbiol.*, 57(3): 789-795.

Rey M., Delgado-Jarana J., Benites T., 2001. Improved antifungal activity of a mutant of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 which produces more extracellular protein. *Appl. Microbiol. Bio.* 55, 604-608.

Rosado, M Rey, AC Codon, J Govantes, MA Moreno-Mateos, and T Benitez, 2007. QID74 Cell wall protein of *Trichoderma harzianum* is involved in cell protection and adherence to hydrophobic surfaces. *Fungal Genet Biol.* 44(10): 950-64.

Ruocco M., Lanzuise S., Woo S.L., Lorito M., 2007. The novel hydrophobin HYTRA1 from *Trichoderma harzianum* T22 plays a role in *Trichoderma*-plants interactions. XIII International Congress on Plant Microbe Interactions. Sorrento, Italy.

Shea M. K., Perry L. K. and Shah M., 2004. Health Effects of Methylmercury, *Physicians for Social Responsibility*, pp. 901-933.

Skoog D. A., J.J. Leary., 1995. *Chimica analitica strumentale*. Edises.

Southworth G. R., Peterson M. J. and Bogle M. A., 2004. Bioaccumulation Factors for Mercury in Stream Fish, *Environmental Practice*, Vol. 6, No. 2, pp. 135-143.

Wase, D. A., Forster C. , 1997. *Biosorbents for Metal Ions*. London, GBR: CRC Press, p 1.

Williams J., Clarkson J. M., Mills P. R. and Cooper R.M., 2003. Saprotrophic and Mycoparasitic Components of Aggressiveness of *Trichoderma harzianum* Groups toward the Commercial Mushroom *Agaricus bisporus*, *Appl. Envir. Microbiol.*, 69: 4192 - 4199.

Winfrey M. R., Rudd J. W. M., 1990, Environmental factors effecting the formation of methylmercury in low pH lakes, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9, pp. 853-869.

Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., Rasmussen R.P., 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22: 133-138.

Wösten H.A.B., Asgeirsdóttir S.A., Krook J.H., Drenth J.H.H., Wessels J.G.H., 1994. The fungal hydrophobin SC3p self-assembles at the surface of aerial hyphae as a protein membrane constituting the hydrophobic rodlet layer. *Eur. J. Cell. Biol.*, 63: 122-129.

Zimand G., Elad Y., Chet I., 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopatology*, 86, 1255-1260.