



Corso di Laurea  
magistrale  
in Scienze  
Ambientali

ordinamento ex D.M.  
270/2004

Tesi di Laurea

Abbattimento di As(V) per riduzione ad As(III) e complessazione con  
nanoparticelle di ferro idrossido biogenerate  
da *Klebsiella oxytoca* DSM 29614

**Relatore**

Ch. Prof. Franco Baldi

**Correlatore**

Prof. Emmanuele Argese

**Laureanda**

Silvia Toscani Matricola  
860870

**Anno Accademico**

2016 / 2017

# INDICE

## ABSTRACT

## INTRODUZIONE

### 1.1. L'Arsenico

- 1.1.1. L'arsenico e le sue caratteristiche
- 1.1.2. Presenza e diffusione dell'arsenico in Italia e nel mondo
- 1.1.3. Ciclo biogeochimico dell'arsenico
- 1.1.4. Fonti antropogeniche dell'arsenico nell'ambiente
- 1.1.5. Effetti della contaminazione da arsenico nell'uomo
- 1.1.6. Metodi di rimozione dell'arsenico dalle acque

### 1.2. Microrganismi e metalli

#### 1.2.1. Metalli con ruolo biologico

- 1.2.1.1. Ruolo dei metalli nelle attività enzimatiche
- 1.2.1.2. Ruolo dei metalli nella respirazione
- 1.2.1.3. I metalli come fonte di energia

#### 1.2.2. Resistenza batterica ai metalli

- 1.2.2.1. Biochimica e genetica della resistenza batterica ai metalli pesanti
- 1.2.2.2. Resistenza all'arsenico

#### 1.2.3. Il bioassorbimento di metalli

### 1.3. Klebsiella oxytoca DSM29614

#### 1.3.1. Produzione di esopolisaccaridi

## **MATERIALI E METODI**

- 2.1. Crescita di *Klebsiella oxytoca* DSM29614
- 2.2. Complessazione di  $As^{5+}$  in colture anaerobiche di *Klebsiella oxytoca* DSM29614
- 2.3. Estrazione dell'esopolisaccaride capsulare
- 2.4. Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) e microanalisi EDS (spettrometria a dispersione di energia)
- 2.5. Separazione delle specie chimiche dell'arsenico nel soprannatante
- 2.6. Analisi delle cellule del ceppo DSM29614
- 2.7. Determinazione di As totale nei campioni con ICP-MS
- 2.8. Esperimento per la respirazione anaerobica di  $As^{5+}$  ad  $As^{3+}$
- 2.9. Determinazione dei carboidrati
- 2.10. Determinazione dell'acido acetico
- 2.11. Determinazione degli spettri FT-IR dei polisaccaridi capsulari

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

- 3.1. Riduzione di  $As^{5+}$  a  $As^{3+}$  in colture di *K. oxytoca*
- 3.2. Caratteristiche dei due polisaccaridi capsulari
- 3.3. Alterazione della fermentazione del citrato dopo l'aggiunta di  $As^{5+}$

## **CONCLUSIONI E ULTERIORI IPOTESI DI LAVORO**

## **BIBLIOGRAFIA**

## ABSTRACT

Spesso si parla dell'arsenico riferendosi ai problemi di inquinamento di falda ad esso correlati. Al giorno d'oggi esistono diverse tecnologie mirate al sequestro di arsenico dalle acque. Una tecnica che sta assumendo importanza in questi ultimi decenni è quella del 'biorisanamento', che si basa sul metabolismo microbico di specifici microrganismi in grado di trasformare metalli pesanti tossici in forme meno nocive.

Il presente lavoro di tesi, portato avanti in collaborazione con l'Università degli Studi di Milano, è incentrato sullo studio dell'abbattimento dell'arseniato in soluzione acquosa in presenza di *Klebsiella oxytoca* DSM 29614. *K. oxytoca* è un microrganismo anaerobico facoltativo che in presenza di citrato ferrico come unica fonte di carbonio, e in condizioni anaerobiche, è in grado di produrre un ferro-gel costituito da nanoparticelle di Fe<sup>3+</sup> idrossido inglobate in una matrice polisaccaridica (EPS). Recenti studi sul genoma di *K. oxytoca* DSM 29614 hanno evidenziato la presenza dell'operone ars, che conferisce l'arsenico-resistenza al ceppo.

L'affinità chimica dell'arseniato per gli idrossidi ferrici e la resistenza del ceppo all'arseniato ci hanno indotto a provare le capacità potenziali del batterio nel ridurre la tossicità dell'arsenico in soluzione acquosa. Abbiamo quindi coltivato il ceppo sia in terreno FeC (ferro citrato) che in terreno NaC (sodio citrato) aggiungendo 50 mg L<sup>-1</sup> di arseniato. Nello specifico, sono state misurate le concentrazioni di arsenico totale nell'esopolisaccaride, nel pellet cellulare e nel surnatante di entrambi i terreni di coltura.

Dai risultati ottenuti è emerso che l'idrossido di ferro è estremamente efficace nel complessare l'arsenico presente nella coltura. Nel terreno FeC si è infatti assistito a un abbattimento completo dell'arseniato addizionato alla coltura, in quanto la concentrazione di arsenico nel surnatante centrifugato e filtrato dopo 48 ore non era più determinabile.

I dati relativi alla speciazione dell'arsenico hanno inoltre evidenziato che nel terreno NaC il ceppo DSM 29216 riduceva dell'83% l'As<sup>5+</sup> ad As<sup>3+</sup>. Questa trasformazione ci ha indotto a considerare una respirazione anaerobica dell'arseniato. Nella prima fase di crescita anaerobica il ceppo di *Klebsiella oxytoca* DSM 29614 fermenta il citrato a CO<sub>2</sub> e acido acetico, e il pH della coltura si abbassa da 7.8 a 6.5-6.6. Quando viene aggiunto dell'arseniato alla coltura, il ceppo passa dalla fase fermentativa alla respirazione anaerobica consumando acido acetico e trasformandolo in CO<sub>2</sub>, e di conseguenza il pH aumenta da 6.6 a 7.1 in 24 ore.

L'assenza dell'aumento di biomassa e l'innescò della gluconeogenesi ci induce tuttavia ad escludere una respirazione anaerobica dell'arseniato, e a prendere in considerazione la presenza di un ulteriore meccanismo di resistenza contro l'arsenico, mai descritto fino ad ora.

# INTRODUZIONE

## 1.1 L' Arsenico

### 1.1.1 L'arsenico e le sue caratteristiche

L'arsenico (As) è un metalloide allo stato solido avente numero atomico 33 e massa atomica 74,9216.

Il numero di massa atomica dei suoi isotopi varia tra 68 e 80 ma solo l'isotopo 75 è stabile. Si presenta in tre forme allotropiche diverse: gialla, grigia e nera.

La configurazione elettronica dell'arsenico,  $s^2p^3$ , giustifica la coesistenza in natura dell' $As^{3+}$  e dell' $As^{5+}$ . Lo ione con carica 3+ deriva dalla perdita dei tre elettroni p, mentre la compartecipazione dei tre elettroni dà origine all'arsenico trivalente.

L'arsenico (III) esiste generalmente sotto forma di ione arsenito,  $AsO_3^{3-}$ , o come una delle sue forme successivamente protonate  $HAsO_3^{2-}$ ,  $H_2AsO_3^-$  o  $H_3AsO_3$ .

Analogamente, la perdita di tutti e 5 gli elettroni dello strato di valenza comporta la formazione di uno ione con carica 5+, e la loro compartecipazione dà origine all'arsenico pentavalente. L'arsenico (V) esiste sotto forma di ione arseniato  $AsO_4^{3-}$  o come una delle sue forme successivamente protonate  $HAsO_4^{2-}$ ,  $H_2AsO_4^-$  o  $H_3AsO_4$ .

In ambienti aerobi, l'arsenico si trova generalmente come  $As^{5+}$ , mentre in condizioni anaerobiche prevale l' $As^{3+}$  (Katsoyannis e Zoubolis, 2004).



*Figura 1: Campione di arsenico nativo*

L'effetto tossico dell'arsenico deriva dalla sua capacità di sostituire parzialmente il fosforo in alcune reazioni biochimiche, essendo i due elementi collocati nello stesso gruppo della tavola periodica e quindi molto simili chimicamente. Per questo motivo in natura i composti dell'arsenico coesistono con quelli del fosforo, e ciò porta spesso a una contaminazione da parte dell'arsenico dei giacimenti di fosfato. A differenza del fosforo, l'arsenico ha un comportamento simile alle specie metalliche, per questo motivo possiede una maggiore tendenza a formare legami ionici anziché covalenti.

### **1.1.2 Presenza e diffusione dell'arsenico in Italia e nel mondo**

La pericolosità delle contaminazioni delle acque di falda sta nel fatto che l'arsenico inorganico, essendo invisibile, inodore e privo di sapore, non è facilmente individuabile. Numerosi acquiferi, in diverse parti del mondo, mostrano presenza di arsenico in concentrazioni superiori ai  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ , ben superiori ai  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  imposti dall'OMS per l'acqua potabile. Le analisi chimiche per determinare la qualità delle acque sotterranee si riferiscono alle cosiddette acque grezze, cioè acque che non hanno ancora subito trattamenti di depurazione.

Le zone più critiche soggette a inquinamento di arsenico si trovano nel delta del Bengala, nelle quali le concentrazioni arrivano fino a 500-1000 ppb. L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha definito questo evento come "il più vasto avvelenamento di massa di una popolazione nella storia umana". L'estensione di tale fenomeno è infatti talmente elevata da colpire approssimativamente 50 milioni di persone. Il problema è da ricercare nella trivellazione di decine di milioni di pozzi artesiani che estraggono l'acqua di falda, un tempo inaccessibile. Questi pozzi di cemento affondano nel terreno per almeno 20 metri e sono stati voluti proprio dall'UNICEF fra gli anni '70 e gli inizi degli anni '80 in un progetto volto a debellare la diarrea, il colera e altre malattie trasmesse con l'acqua, e a ridurre l'elevato tasso di mortalità infantile causata dall'uso di acqua microbiologicamente inquinata attinta da torrenti, stagni e pozzi poco profondi in uso nel passato (Baird, Cann, 2013).

Altro aspetto da considerare è che l'arsenico presente in elevatissime concentrazioni in molti pozzi rurali ha contaminato, e sta tuttora contaminando, le coltivazioni di riso, che rappresenta l'alimento principale delle comunità del Bangladesh. Inoltre i cereali e i fagioli assorbono una quantità ulteriore di arsenico dall'acqua in cui vengono cucinati.

Secondo studi recenti le conseguenze di tale inquinamento potrebbero essere talmente gravi da provocare nel lungo termine disturbi cutanei da contatto e, nei casi peggiori, arsenicosi, malattia che può causare cancro della cute, della vescica, dei reni e dei polmoni. Le lesioni cutanee si riscontrano generalmente dopo un periodo di 5-15 anni di esposizione a concentrazioni elevate di arsenico nell'acqua potabile. Sono numerosi i casi nel Bengala occidentale di persone affette da lesioni cutanee, che rischiano di evolvere in un cancro alla cute. Per giunta, studi epidemiologici condotti in Bangladesh hanno dimostrato una stretta correlazione tra livelli elevati di arsenico nell'acqua e danneggiamento delle facoltà mentali di bambini compresi fra i sei e i dieci anni.

Altre aree interessate dall'inquinamento da arsenico dell'acqua potabile sono il sud America (Argentina, Cile, Messico), la Cina, il Vietnam, il Taiwan, la Romania e molte zone degli Stati Uniti, nelle quali le concentrazioni di arsenico risultano essere superiori a 50 ppb.

In Giappone, Nuova Zelanda, Islanda e Francia l'arsenico si riscontra associato alle acque termali.

Problemi correlati alla presenza di arsenico si riscontrano anche in paesi, come il Ghana, la Grecia, la Thailandia e gli USA, interessati da attività mineraria.

La presenza di As nelle acque di falda si riscontra sia in condizioni ossidanti che riducenti e sia in climi umido/temperati che aridi (Branco, 2007).

Per quanto riguarda il problema dell'arsenico in Italia, nel 2003 è entrato in vigore il D. Lgs. 31/01, che ha individuato nell'arsenico uno dei parametri critici per la qualità dell'acqua potabile, in accordo con le decisioni dell'OMS sulla tossicità di alcune forme di arsenico nelle acque potabili.

Tuttavia numerose regioni italiane non rientrano nei limiti imposti dalla legge; tra queste spiccano la Lombardia, il Trentino, il Lazio e la Sardegna.

Nella regione lombarda, le aree maggiormente inquinate sono quelle a nord-est e sud-est, principalmente per cause naturali, ma alcune contaminazioni antropiche sono comunque presenti (Castelli et al. 2005).

Sono principalmente le falde acquifere comprese tra i 50 e i 120 metri di profondità a contribuire maggiormente all'inquinamento da arsenico nell'area del Po (Molinari et al. 2013).

### 1.1.3 Ciclo biogeochimico dell'arsenico

L'arsenico è rinvenibile, anche se in piccole quantità, in tutte le matrici ambientali, anche se circa il 99% dell'arsenico presente nel pianeta è immagazzinato nella litosfera.

Nella crosta terrestre è ventesimo per abbondanza con una quantità di circa 1,5-3 mg kg<sup>-1</sup> (Mandal e Suzuki, 2002; Frankeberg, W.T., 2002).

L'arsenico è presente come costituente principale in più di 200 minerali, dei quali approssimativamente il 60% sono arseniati, il 20% solfati e il restante 20% arseniti, ossidi, silicati ed arsenico elementare (As) (Smedley e Kinniburgh, 2002).

Dalla litosfera, sia per cause naturali, quali l'attività vulcanica e l'alterazione dei minerali, sia in seguito alle attività antropiche, come quelle legate all'estrazione mineraria, si assiste a una disgregazione dei minerali che imprigionano l'arsenico. Parte di queste particelle viene lisciviata dalle acque e va a depositarsi sulle piane alluvionali e sul fondale dei fiumi e dei mari, eccetto una piccola parte che rimane in sospensione sia nei corpi idrici superficiali sia in quelli profondi. Nell'acqua l'arsenico si rinviene solitamente come acido H<sub>3</sub>AsO<sub>4</sub> di As<sup>5+</sup> o come una delle sue forme anioniche deprotonate.

Un'altra quota delle particelle viene trasportata a distanza dal vento e ritorna sulla superficie terrestre o marina per deposizione. L'arsenico atmosferico consiste principalmente di As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in polvere (Cullen and Reimer, 1989). Studi effettuati nel 1988 da Nriagu e Pacyna hanno dimostrato che le fonti antropiche dell'elemento tossico nell'atmosfera (circa 18.8 ton/anno) costituiscono circa il 70% del flusso globale di arsenico atmosferico. Nell'aria, l'arsenico è presente prevalentemente adsorbito come arsenito e arseniato su particelle di materia, mentre le specie organiche sono di scarsa importanza, ad eccezione di aree caratterizzate dall'uso di pesticidi a base dell'elemento tossico (Mandal e Suzuki, 2002).

Una volta nel terreno una buona parte dell'arsenico viene assorbito dagli esseri viventi, tramite i quali entra nelle catene alimentari per poi tornare agli altri comparti attraverso processi di escrezione e degradazione. I microrganismi sono mediatori di numerose reazioni dell'arsenico, incluse riduzione, ossidazione, metilazione, sia per la sua detossificazione, sia per l'utilizzo metabolico dell'elemento come accettore o donatore di elettroni (Oremland e Stolz, 2003). Le piante superiori possono assorbirlo e utilizzare meccanismi di difesa, diversi a seconda della specie in questione, per limitarne gli effetti fitotossici. Mentre alcune specie tendono ad evitarne l'assorbimento, altre ne limitano la traslocazione e compartimentano l'elemento, ad esempio nei vacuoli della radice (Barberis et al., 2009).

La quota dell'arsenico che rimane nel terreno viene in parte lisciviato dai cationi delle acque che vi percolano e trasportato negli strati profondi della crosta terrestre. Tuttavia, la percentuale maggiore di arsenico nella crosta si rinviene negli strati più superficiali.

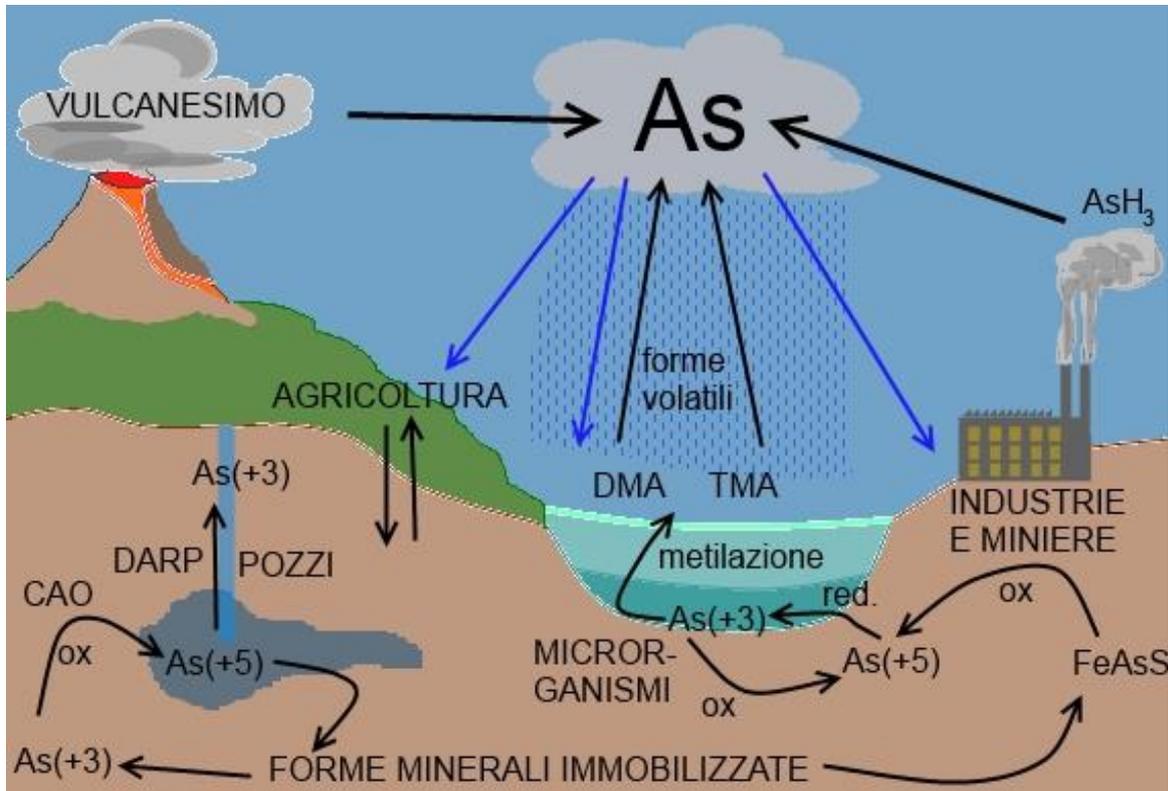


Figura 2: Ciclo biogeochimico dell'arsenico

Al fine di raggiungere l'equilibrio vi è un continuo scambio di sostanze tra i vari comparti ambientali.

L'arsenico infatti subisce in ambiente numerose reazioni chimiche e biologiche che contribuiscono a determinarne le specie predominanti, la sua reattività e la sua biodisponibilità.

La natura chimica dei composti dell'arsenico, e in particolare la loro tendenza a mutare rapidamente stato di valenza e forma chimica in un ampio spettro di valori di pH e di condizioni redox, rende difficile valutarne destino e mobilità nell'ambiente (U.S. EPA, 2003).

Il pH del terreno gioca un ruolo fondamentale nella mobilità dell'arsenico. A pH acidi Fe e Al bloccano l'elemento rendendolo altamente insolubile e poco disponibile per le piante, e la loro azione è tanto più forte quanto più è alto il contenuto di argille tipo montmorillonite, il cui strato interno ne è ricco.

L'aumentare del pH provoca, al contrario, un dissolvimento di arseniati di Al e Fe e un conseguente ulteriore aumento della concentrazione di As in soluzione.

Oltre al pH, un altro fattore di grande rilevanza è il potenziale di ossidoriduzione. Quest'ultimo influisce sulla solubilità dell'arsenico sia variando lo stato di ossidazione dell'As sia quello del Fe.

L'ambiente riducente trasforma l' $As^{5+}$  in  $As^{3+}$ , provocando un aumento della solubilità e della tossicità. Per quanto riguarda il Fe, esso viene ridotto da  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ , e anche in questo caso si assiste a una dissoluzione degli arseniati di Fe, e di conseguenza a un incremento di mobilità del semimetallo.

#### **1.1.4 Fonti antropogeniche dell'arsenico nell'ambiente**

Sebbene le attività umane non siano la causa principale della presenza dell'arsenico nell'ambiente, molte situazioni sono conseguenza di contaminazioni di origine antropica. I composti dell'arsenico sono stati largamente utilizzati come pesticidi prima dell'avvento delle moderne sostanze chimiche organiche. Tuttavia, nonostante al giorno d'oggi l'uso di tali composti in questo settore sia stato ridotto, la contaminazione di arsenico causata da pesticidi rappresenta tuttora una complessa problematica ambientale in parecchie aree del mondo.

Una buona parte della produzione di arsenico a livello mondiale fu impiegata, a partire dagli anni '70, come arsenocromato di rame CCA (Copper Chrome Arsenate) nel trattamento del legname contro la decomposizione e i danni provocati dalle termiti. Inizialmente non era stato previsto, però, che una parte di arsenico lisciviasse con il passare degli anni al di fuori del legno, provocando contaminazioni puntiformi nei luoghi di trattamento del pesticida. Negli USA, questa applicazione, diffusa soprattutto nella costruzione di abitazioni, è stata vietata nel 2003 (Sturchio et al. 2009).

Oltre all'arsenocromato di rame, altri composti dell'arsenico impiegati come pesticidi sono l'arsenito di sodio,  $\text{NaAsO}_3$ , e il Verde di Parigi,  $\text{Cu}_3(\text{AsO}_3)_2$ , erbicidi contenenti entrambi  $\text{As}^{3+}$  nella forma dello ione arsenito,  $\text{AsO}_3^{3-}$ , l'insetticida arseniato di piombo,  $\text{Pb}_3(\text{AsO}_4)_2$ , e l'erbicida arseniato di calcio,  $\text{Ca}_3(\text{AsO}_4)_2$ , contenenti  $\text{As}^{5+}$  come  $\text{AsO}_4^{3-}$ , e lo ione metanoarseniato,  $\text{O}=\text{As}(\text{OH})(\text{CH}_3)\text{O}^-$ , un erbicida largamente utilizzato nelle piantagioni di cotone degli Stati Uniti.

Altri fattori antropici della presenza dell'arsenico nell'ambiente sono costituiti dalle attività industriali. L'arsenico è usato in grandi quantità nell'industria vetraria, per eliminare il colore verde dovuto alla presenza di impurezze a base di composti di ferro.

Insieme al piombo si usa per la fabbricazione di leghe adatte alla produzione dei pallini da caccia. Serve alla fabbricazione di componenti fotoelettrici, di semiconduttori (arseniuro di gallio) che possono essere utilizzati come componenti per microonde, nei diodi LED, componenti di lettori DVD e per radar automobilistici.

L'arsenico è presente nei processi galvanici e di incisione all'acquaforte, per la preparazione di defoglianti e di alcuni fungicidi e antiparassitari, per i fuochi artificiali (i colori bianchi o blu intensi), nell'industria chimica (reagenti e catalizzatori), in quella conciaria, in quella delle vernici, nello stampaggio dei tessuti (De Marco et al., 2007).

Un'ulteriore fonte antropica dell'arsenico è legata alla produzione di energia con combustibili fossili. Le concentrazioni di arsenico presenti nel carbone sono piuttosto variabili (2-82 mg  $\text{kg}^{-1}$ ) in funzione dell'origine geologica (Adriano et al., 1980).

La combustione del carbone, oltre a determinare il rilascio di arsenico nell'atmosfera, determina la produzione di ingenti quantità di ceneri leggere (fly ash) e pesanti (bottom ash) contenenti arsenico, il che ne riduce drasticamente le possibilità di impiego (Beretka and Nelson, 1994). Studi approfonditi hanno messo in evidenza che il contenuto di arsenico presente nelle ceneri è inversamente proporzionale alla dimensione delle particelle di cenere. Le particelle di cenere più piccole sono dunque le più pericolose, sia perché contengono al loro interno concentrazioni di arsenico maggiori, sia perché essendo molto più leggere possono essere trasportate a distanze maggiori e quindi ricadere per fall out su un areale più vasto.

Più che nelle grandi centrali elettriche, il problema dell'arsenico presente nel carbone grezzo diventa particolarmente critico dove la combustione avviene in piccole stufe non ventilate. Infatti in questo caso non è solo l'aria degli ambienti chiusi a contaminarsi, ma anche l'acqua e gli alimenti conservati in tali ambienti, che vengono a contatto con l'aria circostante.

Questo problema è particolarmente accentuato nella provincia cinese di Guizhou, dove i livelli dell'arsenico nel carbone sono straordinariamente elevati, in alcuni casi oltre l'1% (10000 ppm). Molti abitanti di tale zona presentano problemi di salute correlati all'arsenico, dato che sono soliti utilizzare questo carbone per uso domestico, sia per la cottura degli alimenti che per il riscaldamento delle abitazioni (Baird e Cann, 2013).

### **1.1.5 Effetti della contaminazione da arsenico nell'uomo**

L'arsenico è considerato uno dei contaminanti ambientali più pericolosi per l'uomo. L'OMS ha fissato in 10 ppb il limite accettabile per l'arsenico nelle acque potabili tramite una Direttiva alla quale hanno aderito, oltre all'Unione Europea, gli Stati Uniti e il Canada. La conseguenza principale della contaminazione da arsenico dell'acqua potabile è infatti rappresentata dall'insorgenza del cancro, e la sua pericolosità è tale che è stato inserito dall'IARC (International Agency of Reserch on Cancer) nella classe I delle sostanze cancerogene per l'uomo.

Inoltre incrementa il rischio di diabete, problemi vascolari e riduce le funzioni intellettuali nei bambini (Chen Yu et al. 2009), probabilmente per l'azione esercitata da tale elemento sui processi ormonali. L'inalazione di arsenico può portare al cancro al polmone, mentre la sua ingestione può provocare tumori alla vescica e alla cute.

Con l'obiettivo di individuare le dosi di riferimento per la salute, nel 2009 l'EFSA ha proposto quattro patologie o "endpoint": tumori alla vescica, ai polmoni, alla pelle e lesioni cutanee (iper e ipopigmentazioni, cheratosi, melanosi). Lo studio ha inoltre rivelato che nei bambini le esposizioni alimentari sono più elevate, poiché rispetto al proprio peso corporeo essi consumano una quantità maggiore di cibo degli adulti.

Tra i problemi principali nel definire uno standard per i livelli di arsenico nell'acqua potabile vi è anche quello del determinare le circostanze e le condizioni in cui esso agisce come cancerogeno. Nonostante tuttora non si disponga di un modello attendibile della curva dose-risposta per il cancro è ben noto che l'arsenico è in grado di agire come cocancerogeno, ovvero inibisce il meccanismo di riparazione del dna e agisce in sinergia con altri fattori cancerogeni, incrementandone le facultà. Tra i cofattori principali vi sono il fumo, l'esposizione a livelli eccessivi di UV e una dieta povera di selenio. Quest'ultimo agisce infatti da disattivatore dell'arsenico nell'organismo, attraverso la formazione di una biomolecola contenente un legame As=Se e la conseguente riduzione dell'arsenico attivo nell'organismo.

Per gli animali superiori sono tossiche tutte le specie chimiche dell'arsenico; in particolare le specie dell'arsenico trivalente (arsenito,  $\text{AsO}_2$ ) sono più tossiche di quelle dell'arsenico pentavalente (arseniato,  $\text{AsO}_3$ ).

La tossicità dell'arseniato ( $\text{As}^{5+}$ ) è dovuta alla capacità di questo di competere col fosfato per il legame con gli enzimi che utilizzano questo ione: ogni volta che l'arseniato sostituisce il fosfato inorganico nelle reazioni biochimiche del metabolismo energetico si formano esteri dell'arsenico (anziché fosforici) instabili.

Ciò ha per effetto ultimo una minore produzione di ATP (Stefani, Taddei), oltre che all'inattività degli enzimi e di conseguenza il danneggiamento della cellula.

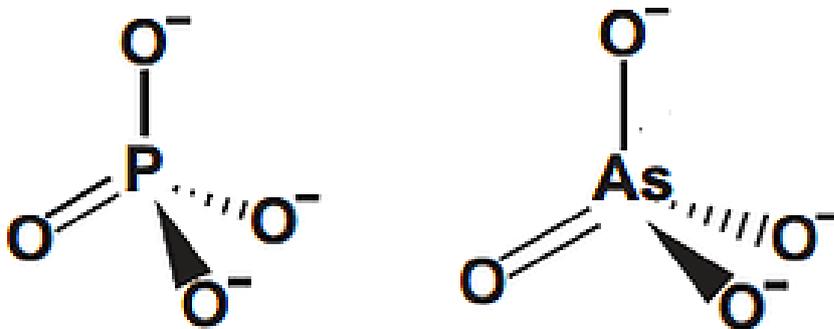


Figura 3: Formule di struttura di fosfato e arseniato

I composti organici di arsenico sono invece poco assorbibili, e per questo risultano essere meno tossici per l'organismo. Inoltre tali composti, una volta giunti nel fegato sono soggetti a biometilazione epatica detossificante, che li rende incapaci di formare legami sulfidrilici con gli enzimi, e di conseguenza facilmente escreti.

La tossicità dell'arsenito ( $\text{As}^{3+}$ ) invece è dovuta alla capacità di formare un complesso stabile con l'acido lipoico, uno dei costituenti dei complessi sovramolecolari di due enzimi che catalizzano reazioni fondamentali del metabolismo energetico. Questi sono la piruvato deidrogenasi, responsabile della decarbossilazione ossidativa dell'acido piruvico ad acetil-CoA, e l'-chetoglutarato deidrogenasi, uno degli enzimi del ciclo dell'acido citrico (Stefani, Taddei).

### 1.1.6 Metodi di rimozione dell'arsenico dalle acque

Per la rimozione dell'arsenico si può ricorrere a differenti metodi, che possono essere suddivisi in tre categorie:

1. processi di adsorbimento;
2. processi a membrana;
3. processi di precipitazione.

Poiché la rimozione viene normalmente attuata, in quanto più efficace, su  $As^{5+}$ , il primo passo consiste comunque nell'ossidazione della forma trivalente a pentavalente (Porro et al. 2004).

Tale ossidazione può essere effettuata in diversi modi:

- attraverso la saturazione con aria, talvolta utilizzando catalizzatori chimico-fisici come rame, carbone attivo in polvere o radiazioni UV;
- per via chimica, utilizzando come ossidanti ipocloriti, reattivi di Fenton, ozono o permanganato;
- per via biologica, tramite l'utilizzo di batteri.

Esistono diverse metodologie di abbattimento dell'arsenico contenuto nelle acque di falda. In alcune regioni dell'Asia fortemente inquinate da arsenico l'acqua potabile prelevata dai pozzi viene fatta scorrere su una superficie con lo scopo di ossidarla all'aria. Lo ione ferroso,  $Fe^{2+}$ , viene ossidato nella forma ferrica insolubile, che si addensa sotto forma di agglomerati di ossido idrato di  $Fe^{3+}$ .

In queste condizioni gli agglomerati di ferro trattengono l'arsenico che scorre su di esse, riducendone drasticamente la concentrazione nell'acqua. Nel caso in cui la quantità di  $Fe^{2+}$  non sia sufficiente a raggiungere tale scopo è necessario aggiungerlo artificialmente.

Uno dei sistemi di rimozione di arsenico più diffusi in alcune zone degli Stati Uniti e in Bangladesh utilizza nanoparticelle di magnetite,  $Fe_3O_4$ .

L'elevato rapporto area di superficie/volume delle nanoparticelle consente di utilizzare quantità assai inferiori di ossido per intrappolare l'arsenico presente nell'acqua in ambedue le forme (C. Baird, M. Cann, 2013).

In alcuni villaggi dell'India, Bangladesh e Vietnam l'arsenico viene rimosso dall'acqua facendola scorrere attraverso filtri a sabbia. Lo scopo principale è quello di eliminare dall'acqua l'elevato contenuto di ferro, che si trova sotto forma di particelle addirittura visibili ad occhio nudo, ma il risultato che si ottiene è quello di una rimozione simultanea di ferro e arsenico.

Di tutte le metodologie di abbattimento dell'arsenico nessuna però risulta essere completamente affidabile. Tra le difficoltà principali emergono il periodico smaltimento degli scarti contenenti arsenico e la necessità di una costante manutenzione delle apparecchiature. Una valida alternativa a tali metodologie, le quali si applicano alle acque di falda, è la potabilizzazione delle acque di superficie.

Il processo utilizzato nei centri di potabilizzazione è la precipitazione dell'arsenico sotto forma di arseniato ferrico,  $\text{FeAsO}_4$ , un sale insolubile che si forma per aggiunta di cloruro ferrico,  $\text{FeCl}_3$ , nell'acqua da trattare. Il sale di arsenico precipitato viene successivamente rimosso tramite filtrazione.

## **1.2 Microrganismi e metalli**

### **1.2.1 Metalli con ruolo biologico**

In base alla presenza o assenza dei metalli nei microrganismi, essi possono essere suddivisi in essenziali e non essenziali. I metalli essenziali sono quindi definiti tali in quanto si rinvencono all'interno di cellule e sono indispensabili per la sopravvivenza delle cellule stesse; al contrario, i metalli non essenziali non partecipano all'attività della cellula, e la loro presenza al suo interno risulta essere dannosa per il microrganismo.

I metalli essenziali hanno quindi un ruolo biologico e possono prendere parte ad attività enzimatiche delle cellule, avere un ruolo ben definito nella respirazione cellulare e infine fungere da fonte di energia per il microrganismo.

#### **1.2.1.1 Ruolo dei metalli nelle attività enzimatiche**

Uno dei metalli essenziali per la sopravvivenza di tutti gli esseri viventi è il ferro. Esso si trova generalmente nello stato di ossidazione +2 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) in ambienti anaerobi, mentre in presenza di ossigeno si rinvengono nello stato +3 ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e forma vari minerali insolubili.

L'essenzialità del ferro è così cruciale che, quando le concentrazioni di questo metallo sono molto basse nell'ambiente, alcuni microrganismi hanno sviluppato dei sistemi adattativi capaci di produrre molecole a basso peso molecolare, i siderofori, che complessano il  $\text{Fe}^{3+}$  con un'altissima affinità, rendendolo poi disponibile per l'utilizzo da parte della cellula (Barbieri et al., 2008).

I siderofori sono molecole di piccole dimensioni, da 500 a 1000 Da, capaci di chelare il ferro. Sono divisi in idrossamati (derivati dall'acido idrossamico) e catecolati (contengono anelli catecolici) come l'enterobactina (Deho et al., 2012). L'enterobactina è un sideroforo prodotto dai batteri enterici e rappresenta l'agente complessante di  $\text{Fe}^{3+}$  più efficiente che si conosca.

Al primo gruppo, gli idrossamati, appartengono invece i ferrocromi, che sono costituiti da tre gruppi idrossamato legati a un esapeptide ciclico.

I siderofori vengono prodotti e secreti all'esterno delle cellule, dove chelano il ferro, formando complessi sideroforo-ferro.

Tali complessi, per mezzo di recettori specifici e di proteine di trasporto, vengono trasportati all'interno della cellula dove sono ridotti enzimaticamente e il ferro è rilasciato in forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ), utilizzabile dalla cellula. Il sideroforo viene quindi secreto nuovamente per catturare altro ferro ferrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ).

La capacità di produrre e secernere siderofori molto efficienti rappresenta un grosso vantaggio per i microrganismi, che possono così colonizzare habitat poveri di ferro (Deho et al., 2012).

Un altro metallo essenziale per la vita di tutti gli esseri viventi è il magnesio. Oltre ad essere in grado di stabilizzare le membrane cellulari, i ribosomi e gli acidi nucleici, il magnesio si rinviene nei pigmenti fotosintetici dei batteri anossigenici e nella clorofilla dei cianobatteri e di tutti gli organismi autotrofi superiori.

Altri metalli, come il sodio e il potassio, conferiscono stabilità a diverse strutture ed enzimi e rivestono un ruolo importante nel mantenere la pressione osmotica cellulare e nel regolare il trasporto secondario di molte sostanze attraverso la membrana cellulare.

Il rame si rinviene in proteine redox come la rusticianina di *Acidithiobacillus ferrooxidans*, dove lo ione  $\text{Cu}^{2+}$  viene ridotto a  $\text{Cu}^+$  in parallelo all'ossidazione di  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ , mentre metalli come il nichel e il molibdeno prendono parte all'azoto-fissazione tramite i siti attivi di alcuni tipi di nitrogenasi.

Infine, lo zinco si rinviene in associazione al ferro nelle ferro-zolfo proteine e nelle dismutasi di *Thermoplasma acidophilum*, mentre il cobalto nel cofattore  $\text{B}_{12}$  delle metil-transferasi quindi nei processi di trasmetilazione.

### **1.2.1.2 Ruolo dei metalli nella respirazione**

Diversi microrganismi che possiedono una catena di trasporto di elettroni di membrana sono in grado di ridurre i metalli, accoppiando la loro riduzione con l'ossidazione dei substrati. Questi batteri appartengono agli anaerobi obbligati, il cui metabolismo non necessita della presenza di ossigeno, che anzi risulta tossico per tali organismi.

I metalli maggiormente responsabili della trasformazione del carbonio organico sono il ferro e il manganese.

Il ferro è un elemento essenziale per la respirazione cellulare in quanto è un componente dei citocromi e di altre proteine che formano la catena di trasporto degli elettroni (Deho et al., 2012).

Tuttavia non è ancora ben chiaro il processo di mobilizzazione di Fe e Mn dai relativi ossidi. Un'ipotesi è che il Fe e Mn presenti nei sedimenti e nelle acque di falda, una volta ridotti, data la loro solubilità vengano rilasciati in acqua.

Nell'ultimo decennio sono stati isolati molti batteri in grado di ridurre ferro e manganese in ambiente anossico, appartenenti ai generi *Pelobacter*, *Desulforomonas* e *Desulforomusa*.

Il meccanismo che adottano consiste in una iniziale adesione agli ossidi, seguita da riduzione e solubilizzazione del metallo e infine formazione di minerali, come ad esempio la magnetite.

Recenti studi hanno evidenziato la presenza in alcuni microrganismi dell'operone ars, un insieme di particolari geni responsabili dell'arsenico resistenza e che consentono quindi ai batteri di sopravvivere ad alte concentrazioni di arsenico. Il processo funziona tramite una pompa  $As^{5+} \rightarrow As^{3+}$  che utilizza l'arsenico (V) come accettore finale di elettroni. Tra i batteri dotati dell'operone ars vi sono *Acidithiobacillus ferrooxidans* ed *Escherichia coli*. La resistenza all'arsenico si rinviene tuttavia sia in batteri gram-positivi sia in batteri gram-negativi.

Altri batteri metallo riducenti sono capaci di ridurre il  $Cr^{6+}$  e l' $U^{6+}$ , mentre un particolare batterio marino, *Desulforomonas acetoxidans*, è in grado di accoppiare la riduzione dello zolfo alla crescita su acetato.

Infine, recenti studi hanno dimostrato che *Shewanella oneidensis* preleva l'ossigeno necessario per la sua respirazione dagli ossidi metallici.

### **1.2.1.3 I metalli come fonte di energia**

Uno tra i metalli che funge da fonte di energia per le cellule è il ferro. Esso è infatti presente nelle ferro-zolfo proteine solubili e di membrana che agiscono da trasportatori di elettroni nel processo di produzione di energia nei procarioti e negli eucarioti (Barbieri et al., 2008). Il  $Fe^{2+}$ , che si rinviene nelle piriti e in altri solfuri misti, è utilizzato da molti microrganismi come unica fonte di energia attraverso la sua ossidazione a  $Fe^{3+}$ . Tra questi vi sono alcuni batteri chemiolitotrofi ubiquitari degli ambienti minerari e archea termofili acidofili tipici di aree geotermiche e vulcaniche, come *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Metallosphaera sedula*.

## 1.2.2 Resistenza batterica ai metalli

### 1.2.2.1 Biochimica e genetica della resistenza batterica ai metalli pesanti

I metalli non essenziali, ovvero quelli che non presentano un ruolo fisiologico, risultano essere dannosi in quanto interferiscono con il normale funzionamento della cellula; tuttavia, anche i metalli essenziali, se presenti in elevate concentrazioni, possono danneggiare la cellula.

Sia i metalli essenziali sia i non essenziali per espletare la loro funzione devono però venire a contatto con l'interno della cellula batterica. Per impedire un danneggiamento da parte di un metallo sarebbe quindi sufficiente per la cellula possedere dei sistemi di trasporto specifici per quei metalli che sono necessari al metabolismo cellulare. Tuttavia, un sistema di trasporto specifico a tal punto da distinguere i vari tipi di metalli sarebbe troppo dispendioso dal punto di vista energetico per la cellula. Di conseguenza, in presenza di elevate concentrazioni di un metallo pesante, la cellula non è in grado di evitarne l'ingresso al suo interno, e ciò porta a un accumulo del metallo all'interno della cellula batterica. In queste condizioni i metalli pesanti possono legarsi ai gruppi sulfidrilici delle proteine o agli ioni bivalenti che hanno un ruolo biologico, impedendo il corretto funzionamento della cellula.

Siccome i metalli, a differenza dei composti organici tossici, non possono venire degradati, i microrganismi hanno col tempo sviluppato meccanismi di resistenza, che possono essere suddivisi in tre categorie:

- trasformazione enzimatica dello stato di ossidazione del metallo
- trasporto attivo di ioni al di fuori della cellula
- sequestro intracellulare o extracellulare del metallo.

Nel primo caso un ruolo rilevante è assunto dal potenziale di ossidoriduzione. Perché un metallo possa venire detossificato mediante riduzione deve avere un potenziale redox compreso tra quello della coppia idrogeno/protone (-421 mV) e ossigeno/idrogeno (+808 mV). Reazioni di riduzione sono quindi possibili per  $\text{Hg}^{2+}$  (+430 mV), cromato (+929 mV), arseniato (+139 mV),  $\text{Cu}^{2+}$  (-268 mV), mentre  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$  hanno tutti un potenziale più negativo di quello della coppia idrogeno/protone e, poiché non possono venire ridotti in condizioni fisiologiche, la resistenza a questi metalli è determinata dalla possibilità di pomparli all'esterno della cellula (Barbieri et al., 2008). I metalli ridotti però devono essere immediatamente espulsi dalla cellula per evitare fenomeni di ri-ossidazione.

La resistenza basata sul sequestro extracellulare di un metallo è stata osservata in alcuni funghi, come *Saccharomyces cerevisiae*, che è in grado di complessare il nichel secernendo glutatione. Il sequestro intracellulare è stato invece rinvenuto solo in un cianobatterio, che produce proteine simili alle metallotioneine animali.

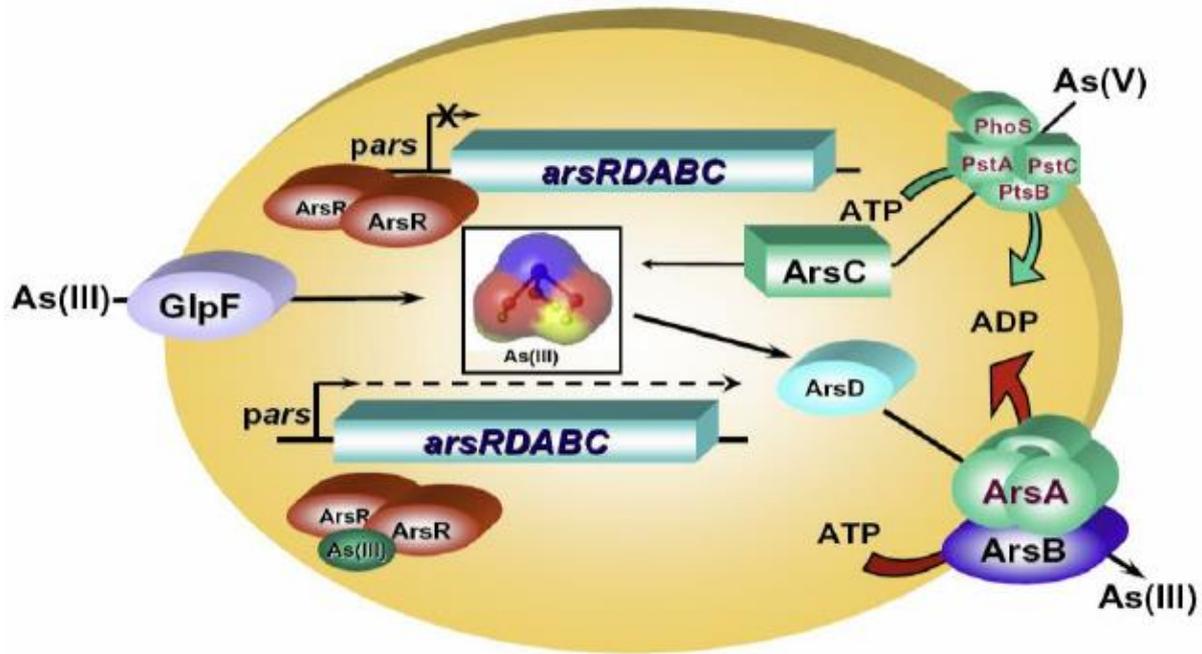
### 1.2.2.2 Resistenza all'arsenico

Le principali forme in cui l'arsenico si rinviene in natura sono la forma pentavalente (arseniato) e quella trivalente (arsenito). L'arseniato presenta una struttura chimica simile a quella del fosfato, essendo As e P collocati nello stesso gruppo della tavola periodica, ed è proprio attraverso i sistemi di uptake del fosfato che penetra nelle cellule. Per lo stesso motivo una volta entrato all'interno della cellula l'arseniato va ad interferire con il normale funzionamento delle biomolecole fosforilate. La similarità strutturale dell'arseniato con il fosfato rende difficile produrre un sistema di efflusso specifico ed efficiente, di conseguenza i sistemi di resistenza a questo composto devono in primo luogo differenziare l'arseniato dal fosfato. Questa differenziazione si realizza mediante la riduzione dell'arseniato ad arsenito, catalizzata dalla arseniato reduttasi (Barbieri et al., 2008). Nonostante l'arsenito sia più pericoloso per la cellula dell'arseniato, la sua struttura chimica è diversa da quella del fosfato, e ciò rende possibile l'istaurare da parte della cellula di un sistema di efflusso specifico che ne impedisca l'accumulo al suo interno. Il meccanismo di resistenza della cellula all'arseniato è quindi costituito dall'associazione tra una reazione di riduzione, catalizzata dall'arseniato reduttasi, e un sistema di efflusso, entrambi regolati dai geni della resistenza all'arsenico (operone *ars*).

Gli operoni *ars*, i geni della resistenza all'arsenico, sono stati rinvenuti sia in batteri gram-positivi sia in gram-negativi (Diorio, 1995), tuttavia tra quelli maggiormente studiati vi sono i plasmidi R773 di *E. coli*.

Uno studio (Carlin et al., 1995) ha dimostrato che quando l'operone *ars* era eliminato dal cromosoma di *E. coli*, la cellula mostrava ipersensibilità ad arsenito e ad arsenato.

In *E. coli* i vari composti dell'arsenico entrano all'interno della cellula tramite i sistemi di uptake del fosfato (*PhoS*, *PstA*, *PstB*, *PstC*) o mediante delle gliceroporine (*GlpF*). Tramite l'arseniato reduttasi (*ArsC*) l'arsenico pentavalente viene ridotto ad arsenico trivalente; quest'ultimo, trasportato verso la membrana da un corepressore (*ArsD*) viene espulso dalla cellula tramite la pompa di membrana chemiosmotica (*ArsA*, *ArsB*). Più nello specifico, *arsA* è una ATPasi associata alla membrana, mentre *arsB* è una proteina integrale di membrana che permette il passaggio dell'arsenito.



ArsR = Repressore  
 ArsAB = Pompa di membrana chemiosmotica  
 ArsC = Arsenato riduttasi  
 ArsD = Corepressore  
 PhoS, PstC, PstB, PstA = Sistemi di uptake del fosfato  
 GlpF = Gliceroporina

Figura 4: Meccanismo di arsenico resistenza in *E. coli*

Un altro operone *ars* sul quale sono stati portati avanti parecchi studi è quello di *S. aureus*. Sia in *E. coli* sia in *S. aureus* l'espressione dell'operone è controllata dal prodotto di *arsR*, un repressore della trascrizione, ma il numero di geni strutturali è variabile da due a quattro in funzione della presenza o dell'assenza di *arsD*, che sembrerebbe codificare per un regolatore secondario deputato a stabilire un livello massimo di trascrizione dell'operone, e di *arsA*, un componente della pompa di efflusso. I geni strutturali codificano per l'arseniato reduttasi (*arsC*), una piccola proteina citosolica che può ricevere il potere riducente via glutaredoxina, come in *E. coli*, o via tioredoxina, come in *S. aureus* (Barbieri et al., 2008).

Per quanto riguarda la pompa di efflusso, mentre in *E. coli* è costituita dalla coordinazione di *arsA* e *arsB*, in *S. aureus* è regolata solo da *arsB*, il quale, per l'espulsione dell'arsenito, sfrutta il gradiente chemiosmotico trans-membrana.

### 1.2.3 Il bioassorbimento di metalli

Mentre la resistenza consiste nella sintesi di specifici enzimi con l'obiettivo di far fronte alla presenza di elevate quantità di un metallo, il bioassorbimento è una risposta non-specifica, dove la sintesi di sostanze complessanti non viene indotta dalla presenza del metallo.

Molti batteri, archea, funghi e alghe unicellulari, infatti, sequestrano grosse quantità di ioni metallici tramite meccanismi chimico-fisici di assorbimento o scambio ionico.

Benchè microrganismi diversi presentino differenti capacità di legarsi ai vari metalli pesanti, il meccanismo di bioassorbimento risulta essere lo stesso. Il processo ha origine con un'attrazione elettrostatica tra la carica dello ione metallico (positiva) e i gruppi funzionali (negativi) delle pareti della cellula. Gruppi carbossilici, aminici, idrossilici, sulfidrilici, fosfati, tioli e solfati sono infatti possibili siti di legame per i metalli in quanto contribuiscono a conferire una carica negativa alla superficie dei microrganismi, e questa rimane anche dopo la loro morte.

La complessazione elettrostatica è una reazione rapida che dipende dalla temperatura, dalla costante associativa del gruppo funzionale con il catione e dal pH (Barbieri et al., 2008).

La capacità di complessare i metalli è propria di tutti gli organismi unicellulari, in quanto dipende generalmente dalle caratteristiche del catione e dalla natura della parete cellulare.

I cationi si suddividono in acidi deboli di Lewis, ai quali appartengono tutti i metalli pesanti, e in acidi forti di Lewis. Agli acidi forti di Lewis appartengono i metalli che, come il  $\text{Na}^+$ , il  $\text{K}^+$  e il  $\text{Mg}^{2+}$ , risultano sempre dissociati in soluzione.

Al contrario, i metalli pesanti in presenza di pH neutro o basico tendono a complessarsi con molecole organiche e di conseguenza a legarsi alle cariche negative delle pareti cellulari.

Per fronteggiare concentrazioni di metallo elevate alcuni microrganismi producono particolari molecole, come i polisaccaridi, in grado di sequestrare gli ioni metallici e impedire il loro ingresso all'interno della cellula. La natura dei polisaccaridi incide sulla capacità complessante dei cationi: i batteri possono produrre infatti dei polisaccaridi neutri, che non hanno affinità per i cationi, e polisaccaridi acidi, che invece legano grandi quantità di metalli tanto da incrostare la parete cellulare (Barbieri et al., 2008).

Ad ogni modo, più i polisaccaridi contengono zuccheri acidi (acido glucuronico, galatturonico) o molecole coniugate con acetato al loro interno, più essi risultano essere in grado di sequestrare ioni metallici.

Altri microrganismi, come *Synecoccus sp*, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa*, trasportano il metallo all'interno della cellula e lo complessano tramite specifiche proteine ricche di gruppi -SH, le metallotioneine, accumulandolo nel citoplasma formando dei corpuscoli intracellulari ricchissimi di metallo.

### **1.3 *Klebsiella oxytoca* DSM29614**

I ceppi di *K. oxytoca* sono batteri ubiquitari che sono principalmente studiati come patogeni opportunisti responsabili delle infezioni nosocomiali (Sugihara et al., 2000). Tuttavia, parecchi ceppi di *K. oxytoca* sono anche conosciuti per produrre esopolisaccaridi di interesse farmaceutico e ambientale (Sugihara et al., 2000; Baldi et al., 2001; Qiang et al., 2013). Inoltre sono stati riportati studi riguardanti la capacità del microrganismo di complessare metalli pesanti nell'esopolisaccaride.

La capacità di *K. oxytoca* DSM 29614 di sintetizzare uno specifico esopolisaccaride (Leone et al., 2007) come agente complessante per i metalli è il risultato dell'adattamento ambientale ai percolati acidi delle discariche, dove fu isolato il microrganismo per la prima volta (Baldi et al., 2001).

*K. oxytoca* e i batteri ferro-ossidanti sono interdipendenti in questo ambiente. Infatti, entrambi possiedono un metabolismo basato sul ferro, ma in un modo complementare: i batteri ferro-ossidanti trasformano il  $Fe^{2+}$  in  $Fe^{3+}$ , mentre *K. oxytoca* riduce il  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ . L'accoppiamento di microrganismi aerobici e anaerobici ricicla efficientemente questo nutriente. Nell'utilizzare il  $Fe^{3+}$  come donatore di elettroni, per esempio, *K. oxytoca* favorisce la crescita dei ferro-ossidanti anche lontano dai luoghi di estrazione mineraria.

#### **1.3.1 Produzione di esopolisaccaridi**

Alcune specie di batteri fermentano citrato come fonte di carbonio ed energia. Comuni fonti di citrato in natura sono funghi e piante. In condizioni aerobiche, la crescita batterica su questo composto dipende dal ciclo dell'acido tricarbossilico e da un appropriato sistema di trasporto.

Il citrato è normalmente fermentato ad acido acetico e CO<sub>2</sub> dal ceppo, poiché nel suo genoma presenta un operone *cit* che codifica almeno per una citrato liasi ed un ossalato decarbossilasi (oad) Na-dipendente tipica anche di altri enterobatteri.

Nel caso del ceppo di *Klebsiella oxytoca* DSM 29614 è presente anche un ossalato decarbossilasi ferro-dipendente (Baldi et al. 2009), e quindi a differenza degli altri ceppi esso cresce vigorosamente in presenza di alte concentrazioni di citrato ferrico.

Utilizzando Fe(III)-citrato, invece di Na-citrato, come unica fonte di energia e di carbonio organico, oltre ad acido acetico e anidride carbonica *K. oxytoca* produce un esopolisaccaride che lega fortemente Fe<sup>3+</sup>, dando luogo alla formazione di un idrogel di Fe-EPS. Numerosi studi hanno infatti evidenziato che il gel si forma in maggior misura in presenza di citrato di ferro, e non con citrati di altri metalli, quali per esempio Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>.

Solo quando a fine fermentazione i nutrienti cominciano a venire a meno e si raggiunge la cosiddetta fase stazionaria, *Klebsiella* inizia a produrre l'esopolisaccaride (EPS). Nella fase stazionaria della crescita, infatti, il ceppo tende a entrare in una fase quiescente e il Fe(III) viene intrappolato in un gel nel quale si formano spontaneamente delle nanoparticelle (5-10 nm) di ferro-idrossido (Arcon et al, 2012).

Il gel è formato da un polisaccaride la cui struttura è costituita da unità eptameriche ramificate di L-ramnosio (Rha), acido D-glucuronico (GlcA) e D-Galattosio (Gal) in un rapporto di 4:2:1. (Leone et al. 2007). Il ferro in Fe-EPS è in forma nanostrutturata di Fe idrossidi/ossidi e generalmente il contenuto totale di Fe è circa del 36%.

Molte sostanze biopolimeriche, tra cui gli esopolisaccaridi, sono capaci di complessare metalli, proteggendo così le cellule da stress ambientali.

Recenti studi hanno evidenziato che durante la fermentazione, circa il 50% dell'iniziale concentrazione di Fe<sup>3+</sup> viene ridotto a Fe<sup>2+</sup>, il quale non si lega al gel e rimane in soluzione. Al contrario, il colore arrugginito del precipitato suggerisce che il complesso Fe-EPS sedimenta non appena formato, portando con sé eventuali metalli presenti nella miscela. È stato infatti dimostrato che metalli come zinco, piombo e cadmio vengono inglobati dal polisaccaride batterico, rendendo *Klebsiella oxytoca* una possibile applicazione per l'abbattimento dei metalli tossici in condizioni anaerobiche.

Tuttavia, la produzione del polimero non è collegata alla metallo-resistenza, in quanto il Fe-EPS è prodotto nell'ultima fase esponenziale della crescita.

## MATERIALI E METODI

### 2.1 Crescita di *Klebsiella oxytoca* DSM29614

Le cellule di *K. oxytoca* DSM29614 erano conservate a  $-80^{\circ}\text{C}$  in glicerolo al 25%. In un secondo momento sono state “resuscitate” inoculandole in un terreno complesso Nutrient Broth (Difco). Negli esperimenti successivi il ceppo è stato cresciuto in due terreni sintetici definiti, dove la sorgente di carbonio ed energia è costituita dal citrato.

Durante la fermentazione il citrato viene convertito in acido acetico, il pH diminuisce di un'unità di pH, e si forma molta anidride carbonica tanto da raggiungere anche 1,8 atm nello spazio di testa delle colture.

I due terreni qui utilizzati si differenziavano solo per l'aggiunta di citrato di sodio (NaC) o di citrato ferrico (FeC). Il terreno NaC conteneva per litro i seguenti ingredienti:

- 14.7 g di Sodio Citrato (50 mM)
- 2.5 g di  $\text{NaHCO}_3$
- 1.5 g di  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0.8 g di  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- 1.68 g di  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 0.1 g di KCl.

Il terreno FeC si differenziava dal terreno NaC per la sostituzione del sodio citrato con 13.5 g di Fe(III)-citrato (50 mM). I due terreni erano successivamente tamponati a pH 7.5 con una soluzione di NaOH 1N e poi sterilizzati in autoclave a  $122^{\circ}\text{C}$  per 22 minuti e raffreddati sotto flusso di azoto.

Negli esperimenti successivi per inoculare 1 litro di coltura si preparavano dei pre-inoculi. Il pre-inoculo consisteva nel preparare 50 ml di terreno a NaC e terreno FeC in condizioni di anaerobiosi. Dopo 24h d'incubazione a  $30^{\circ}\text{C}$ , si prelevano 10 ml del pre-inoculo e si inoculava 1 litro di terreno NaC e FaC rispettivamente.

## **2.2 Complessazione di As<sup>5+</sup> in colture anaerobiche di *Klebsiella oxytoca* DSM29614**

Per questo esperimento dopo 5 giorni dall'inoculo con il ceppo di *K. oxytoca* DSM29614, raggiunta in questa fase fermentativa una torbidità elevata, si aggiungeva sia alla coltura in terreno NaC che in FeC, 50 mg L<sup>-1</sup> di As<sup>5+</sup> come Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (214.68 mg di Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ≡ 50 mg di As) solubilizzato in volume di 50 ml, previa correzione a pH neutro. Dopo 2 giorni d'incubazione si formava un precipitato sul fondo delle colture.

Nelle colture in terreno NaC il flocculato era di color grigio (138 mg L<sup>-1</sup>), mentre in quelle con terreno FeC (5700 mg L<sup>-1</sup>), il flocculato era abbondante tanto da occupare un terzo del volume della coltura e inoltre era di un color ruggine dovuto agli idrossidi di ferro. Ambedue le colture erano centrifugate, le cellule separate dalla fase colloidale, costituita in gran parte da uno specifico esopolisaccaride capsulare (EPS).

## **2.3 Estrazione dell'esopolisaccaride capsulare**

L'EPS era estratto da 1 litro di coltura con una soluzione alcolica (etanolo 75%) e poi lasciato precipitare a 4°C per una notte (Baldi et al., 2009). L'estratto colloidale alcolico era mantenuto a +4°C fino al momento delle analisi. Il contenuto di acqua nell'estratto idroalcolico colloidale da terreno NaC era determinato per pesata ed era del 99%, mentre nell'estratto colloidale con idrossidi di ferro ottenuto da terreno FeC era del 96%. Per altre analisi le due frazioni colloidali erano portate a secco con Rotavapor.

## 2.4 Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) e microanalisi EDS (spettrometria a dispersione di energia)

Ogni campione, dopo essere essiccato, veniva depositato su un supporto biadesivo di carbonio (STAB). Gli STAB venivano successivamente inseriti nello sputter, detto anche doratore, nel quale in condizioni di sotto vuoto veniva insufflato dell'argon. Essi venivano resi conduttivi e adeguati all'osservazione tramite una copertura di particelle nanometriche provenienti da una lamina d'oro sovrastante il campione. In seguito il campione dorato contenente arsenico e ferro era introdotto insieme a uno standard in retini di rame e nichel all'interno del SEM (Scanning Electron Microscopy), nel quale era stato creato preventivamente il vuoto. Per questo studio è stato utilizzato un microscopio elettronico a scansione SEM LEO 1430 (Zeiss, Germany).



*Figura 5: Microscopio elettronico a scansione (SEM)*

Il microscopio elettronico a scansione funziona utilizzando come sorgente luminosa gli elettroni prodotti da un filamento di tungsteno e accelerati da una differenza di potenziale compresa tra 0.3 e 30 KeV. Questo fascio di elettroni viene fatto passare sul campione da analizzare in una zona rettangolare, riga per riga, in modo tale da analizzare l'intero oggetto in maniera sequenziale. Esso è indirizzato sulla parte dell'oggetto che si vuole analizzare dal condensatore e dalla lente obiettivo. Questo strumento è caratterizzato da un'elevata risoluzione.

Esso può infatti ingrandire il campione analizzato fino a 150000-200000 volte. Le analisi di immagine in formato specifico della strumentazione erano eseguite tramite EDS (electron dispersive X-ray (EDX) (XXX Model) = Energy Dispersive Spectroscopy (Oxford Instruments, UK)).

L'analisi chimica, detta microanalisi, è effettuata attraverso la misura dell'energia e della distribuzione delle intensità dei raggi X generati dal fascio elettronico sul campione. L'analisi, che impiega un rivelatore a dispersione di energia (EDS), può essere eseguita su un'area (raster) oppure su un punto (spot) della superficie del campione fermando la scansione del fascio elettronico. La microanalisi consente di ottenere informazioni strutturali, composizionali ed elementari sul campione.

## 2.5 Separazione delle specie chimiche dell'arsenico nel soprnatante

Prima dell'estrazione del polisaccaride si prelevava 5 ml dalle colture in doppio dal terreno NaC e FeC centrifugando a 4500 rpm per 20 minuti, dopodiché il soprnatante era filtrato con filtri tipo "Sterivex" a 0.22  $\mu\text{m}$ . Sul surnatante raccolto è stata effettuata la separazione delle forme di arsenico con l'utilizzo delle cartucce filtranti Sep-Pak® Plus Acell QMA (WATERS). Il filtro di queste cartucce è un potente scambiatore anionico idrofilo a base silicea, che permette il passaggio dell' $\text{As}^{3+}$ , ma trattiene nella colonna l' $\text{As}^{5+}$ .



Figura 6: Cartuccia filtrante Sep-Pak® Plus Acell QMA (WATERS)

La procedura consisteva nel far passare 5 ml di campione acquoso attraverso la cartuccia. Poi era portato a volume finale di 10 ml con l'aggiunta di 5 ml di  $\text{HNO}_3$  0,16 mM per stabilizzare la concentrazione nella soluzione. L' $\text{As}^{5+}$ , rimasto complessato nella stessa colonna, era poi eluito con 5 ml  $\text{HNO}_3$  0,16 mM, al quale erano stati aggiunti 5 ml di milliQ per raggiungere il volume finale di 10 ml.

## 2.6 Analisi delle cellule del ceppo DSM29614

Il pellet di cellule batteriche, ottenuto dalla centrifugazione a 4500 rpm per 25 min da 5ml di sovrantante, e la coltura batterica tale e quale erano in seguito analizzati per il contenuto totale di proteine con il metodo colorimetrico Bradford (AAA) (Bradford, 1976).

Il metodo rileva la presenza di proteine tramite il legame con il colorante (Coomassie Brilliant Blue G-250) ai residui di aminoacidi basici presenti nelle proteine. Per determinare la concentrazione delle proteine era utilizzato uno standard a concentrazione nota (solitamente si utilizza come proteina standard, la siero albumina bovina).

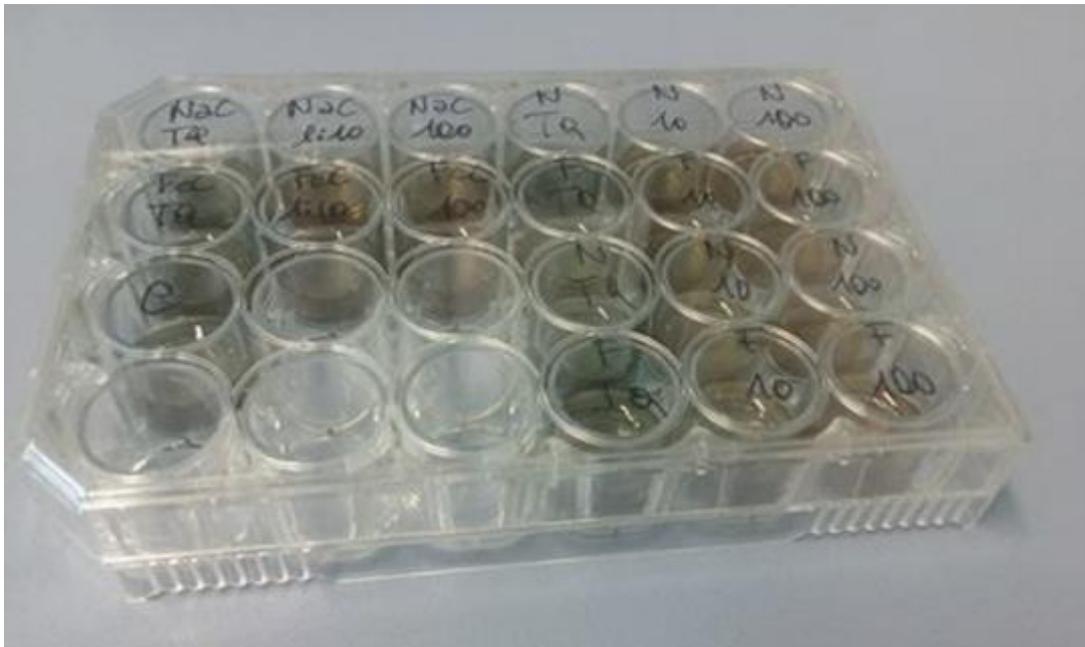


Figura 7: Biolog utilizzato per l'analisi delle proteine

## 2.7 Determinazione di As totale nei campioni con ICP-MS

L'As totale era determinato in vari campioni ottenuti durante i nostri esperimenti: colture tale e quali, sovrantanti centrifugati e filtrati, pellet di cellule e gli esopolissacaridi estratti dai terreni NaC e FeC. La tecnica di determinazione usata in questa tesi è stata spettrometria di massa al plasma accoppiato induttivamente (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).



*Figura 8: Spettrometro di massa al plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS)*

Lo spettrometro di massa al plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) è uno strumento dotato di elevata risoluzione, in grado di determinare diverse sostanze metalliche e non metalliche. Il campione viene inizialmente ionizzato attraverso una torcia al plasma. Successivamente gli ioni vengono separati in funzione del loro rapporto massa/carica da un analizzatore. In funzione della concentrazione di un determinato ione, ne risulta un segnale proporzionale, che viene misurato dal rivelatore. Analizzatore e rivelatore sono collocati all'interno dello spettrometro. A tutti i campioni erano aggiunti degli standard interni per determinare le concentrazioni finali dei campioni.

## **2.8. Esperimento per la respirazione anaerobica di As<sup>5+</sup> a As<sup>3+</sup>**

Durante la prima parte dello studio è stata notata un'alta conversione di As<sup>5+</sup> in As<sup>3+</sup> nelle colture del ceppo di *K.oxytoca* DSM29614 in terreno NaC e FeC. Questo evento ha suggerito che questa conversione potesse essere combinata con la respirazione anaerobica di As<sup>5+</sup> a As<sup>3+</sup>, quando l'arseniato veniva aggiunto alle colture. A questo scopo abbiamo allestito un esperimento specifico qui riportato.

E' stata preparata una coltura da 1 litro di *K.oxytoca* DSM29614 in terreno NaC, poi inoculata (1/100 v/v) con 10 ml di preinoculo. Previa agitazione sotto corrente di azoto, la coltura da 1 litro, appena inoculata, era trasferita con un dosatore in teflon preventivamente sterilizzato in 10 flaconi da 100 ml, che sono stati immediatamente sigillati sotto corrente di azoto con una ghiera d'alluminio e un tappo di gomma per colture anaerobiche. Abbiamo quindi ottenuto 10 colture omogenee con lo stesso numero di batteri.

Si è proceduto poi con la determinazione della densità ottica con spettrofotometro UV visibile a 600 nm e della quantità di proteine totali ottenuta con metodo Bradford.

Dopo 7 giorni di fermentazione del citrato ad acido acetico e CO<sub>2</sub>, a 8 flaconi con le colture in fase stazionaria, è stata aggiunta 1 mM di As<sup>5+</sup> con una siringa perforando il tappo di gomma a tenuta stagna. I 2 flaconi rimanenti erano conservati per il controllo per la fase fermentativa. A tempi determinati in ore (0, 2, 6, 15 e 26 h) venivano analizzate le colture di due flaconi per volta per determinare: la biomassa (D.O. a 600 nm), le proteine, i polisaccaridi totali, il pH, l'acido acetico e la speciazione delle due specie chimiche dell'arsenico come sopra riportato.

## **2.9 Determinazione dei carboidrati**

L'analisi dei carboidrati è stata effettuata con il metodo Dubois. Il metodo è utile per la determinazione della composizione di polisaccaridi e dei loro derivati metilici. Zuccheri semplici, oligosaccaridi, polisaccaridi e i loro derivati danno un colore giallo-arancio se trattati con il fenolo e acido solforico concentrato.

A 1 ml di campione centrifugato (surnatante) sono stati aggiunti 1 ml di fenolo al 5% p/v in H<sub>2</sub>O e 5 ml di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Successivamente si è lasciato reagire a 30°C per 30 minuti, per poi leggere a 490 nm tramite spettrofotometro UV-VIS.

Il valore di assorbanza letto veniva moltiplicato per il fattore  $F=180$  per ottenere la concentrazione in  $\mu\text{g mL}^{-1}$  di carboidrati totali (equivalenti di glucosio); ricavata utilizzando la curva di taratura precedentemente completata utilizzando come standard glucosio anidro [ $5\text{-}200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ].

## **2.10 Determinazione dell'acido acetico**

Monitorare l'andamento dell'acido acetico serviva per sapere se si era in presenza di respirazione anaerobica dell'arseniato. La forte diminuzione o la scomparsa di acido acetico infatti significava un utilizzo da parte del microrganismo di acido acetico come fonte di carbonio.

Per la determinazione dell'acido acetico i campioni prelevati sono stati agitati, centrifugati e filtrati con filtri di acetato di cellulosa a porosità  $0.2 \mu\text{m}$  per prevenire una eventuale contaminazione della colonna. Il pH era poi corretto con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  fino ad arrivare a un valore intorno a 1.

In un secondo momento i campioni erano opportunamente diluiti. La procedura utilizzata prevede la preparazione di 1 ml di campione già diluito o tal quale con l'aggiunta di  $100 \mu\text{l}$  di standard interno. I campioni così preparati sono poi stati iniettati al gascromatografo per la determinazione dell'acido acetico.

Lo strumento utilizzato per l'analisi è un gascromatografo Agilent 6890 con detector FID, equipaggiato con colonna Agilent J&W DB-WAXetr. Lo strumento viene calibrato ogni settimana e il metodo analitico prevede l'utilizzo di uno standard interno (Acido 2-etilbutirrico) per l'identificazione degli acidi grassi volatili.

## **2.11 Determinazione degli spettri FT-IR dei polisaccaridi capsulari**

I due EPS capsulari allo stato solido sono stati analizzati con Spettrometria IR. I vari spettri IR (pastiglie KBr) erano analizzati con FTIR Nicolet Magna 750 instrument.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### 3.1 Riduzione di $As^{5+}$ a $As^{3+}$ in colture di *K.oxytoca*

Le colture di *K.oxytoca* DSM 29614 sono state cresciute in terreno NaC e in FeC in condizioni anaerobiche.

Nella fase stazionaria di crescita poi sono stati aggiunti 50 mg di  $As^{5+}$  in ciascun litro delle due colture. Dopo 2 giorni d'incubazione a 30 °C dall'aggiunta dei sali di arsenico si formava un flocculato, molto più abbondante nel terreno FeC (Fig. 9).

In ciascun terreno addizionato con  $As^{5+}$  sono state determinate le due specie chimiche dell'arsenico ( $As^{5+}$  e  $As^{3+}$ ) e il Fe totale nelle seguenti matrici: surnatanti acquosi, pellets cellulari ed estratto del polisaccaride capsulare. Ogni analisi è stata eseguita in doppio ed è stata poi effettuata una media aritmetica dei due valori.



Figura 9: Le due colture batteriche anaerobiche di *K.oxytoca* cresciute in terreno FeC (a sinistra) e in terreno NaC (a destra)

Dalle analisi chimiche delle due specie dell'arsenico si evince che nel terreno contenente il citrato ferrico (FeC) l'arsenico scompare completamente dal liquido della coltura, mentre nel terreno con citrato di sodio (NaC) il 94 % dell'arseniato aggiunto rimane in soluzione. Di questa percentuale residua, l'86,7% dell'As<sup>5+</sup> è stato ridotto dalla coltura batterica in As<sup>3+</sup> (Tab. 1).

Tabella 1: Determinazione delle specie chimiche dell'arsenico nei due terreni di coltura con *K.oxytoca* DSM29614

	<b>NaC</b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	<b>FeC</b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
<b>As (III)</b>	41,5	n.d.
<b>As (V)</b>	5,5	n.d.

L'assenza di arsenico nel terreno di coltura FeC si spiega con la complessazione e la precipitazione delle forme dell'arsenico con gli idrossidi di ferro in forma di idrogel in una matrice polisaccaridica prodotta durante la crescita batterica (Leone et al, 2007; Baldi et al. 2009).

La riduzione di As<sup>5+</sup> a As<sup>3+</sup> trova invece spiegazione con la presenza dell'operone *ars* nel genoma del nostro ceppo di *Klebsiella oxytoca* DSM29614. Dall'analisi della sequenza del DNA del ceppo (Gallo et al, sottomesso) è nota la presenza dei geni dell'arsenico resistenza (operone *ars*), che comprendono anche un enzima, l'arsenico reduttasi, che riduce la tossicità della forma più ossidata nella forma ridotta dell'arsenico.

Un altro aspetto da prendere in considerazione è la concentrazione di arsenico totale nel pellet cellulare, che risulta essere di 2,8 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) nel terreno NaC, mentre è 50 volte più alta la concentrazione di arsenico totale nel pellet cellulare del terreno FeC.

Tabella 2: Determinazione dell'arsenico totale e ferro totale nelle cellule batteriche raccolte per centrifugazione da i due terreni di coltura con *K.oxytoca* DSM29614

	<b>NAC</b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	<b>FEC</b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ )
<b>As-tot</b>	2,8	136
<b>Fe-tot</b>	n.d.	5306

Questo dimostra che parte degli idrossidi ferrici che rivestono la parete cellulare influenzano il sequestro dell'arsenico dalla fase liquida del terreno di coltura FeC nelle cellule.

Infatti la concentrazione di ferro sulle cellule è molto elevata (40 volte più dell'arsenico), tale da giustificare una coprecipitazione di arsenico sulla parete delle cellule ricoperte da nanoparticelle di ferro idrossidi (Baldi et al. 2009; Baldi et al. 2010).

*Tabella 3: Determinazione dell'arsenico totale nel polisaccaride capsulare dai due terreni di coltura con K.oxytoca DSM29614. L'estratto alcolico polisaccaridico è stato portato a secco sotto vuoto e poi gli elementi sono stati determinati.*

	<b>NaC</b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	<b>FeC</b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
<b>As-tot</b>	974	6862
<b>Fe-tot</b>	694	319954

I risultati delle analisi chimiche mostrano inoltre che gran parte dei due elementi As e Fe sono concentrati fuori dalle cellule nell'essudato polisaccaridico (EPS).

È interessante notare che la quantità di As totale nell'EPS è di 7 volte più elevata nel terreno FeC rispetto al terreno NaC. Questo rapporto è sottostimato, se si considera la quantità di EPS ottenuta dal terreno FeC rispetto al terreno NaC. Infatti la quantità di EPS recuperato dal terreno NaC era solo di 0,328 g (peso secco) per litro, mentre dal terreno FeC l'EPS recuperato era di 5,6 g (peso secco) per litro, cioè una concentrazione di 17 volte più alta (Fig. 10).

L'EPS estratto dalla coltura in terreno NaC in totale conteneva in tutto solo 0,319 mg di As-tot, mentre nell'EPS estratto dal terreno FeC la quantità di As-tot era in totale di 38 mg. Quest'ultima quantità non è lontana dai 50 mg aggiunti all'inizio dell'esperimento, mostrando un recupero del 76% solo nell'EPS, al quale va però aggiunta la quantità di As totale nel pellet cellulare.

È interessante notare anche che nel terreno NaC, dove non abbiamo aggiunto del citrato ferrico, L'EPS conteneva circa 0,227 mg di Fe-tot, che però derivava dalle impurità presenti negli ingredienti del terreno NaC. Infatti l'EPS ha un'altissima affinità per il ferro e riesce a concentrarlo per la presenza di alcuni siderofori secreti sulla superficie del ceppo (Gallo et al., sottomesso).

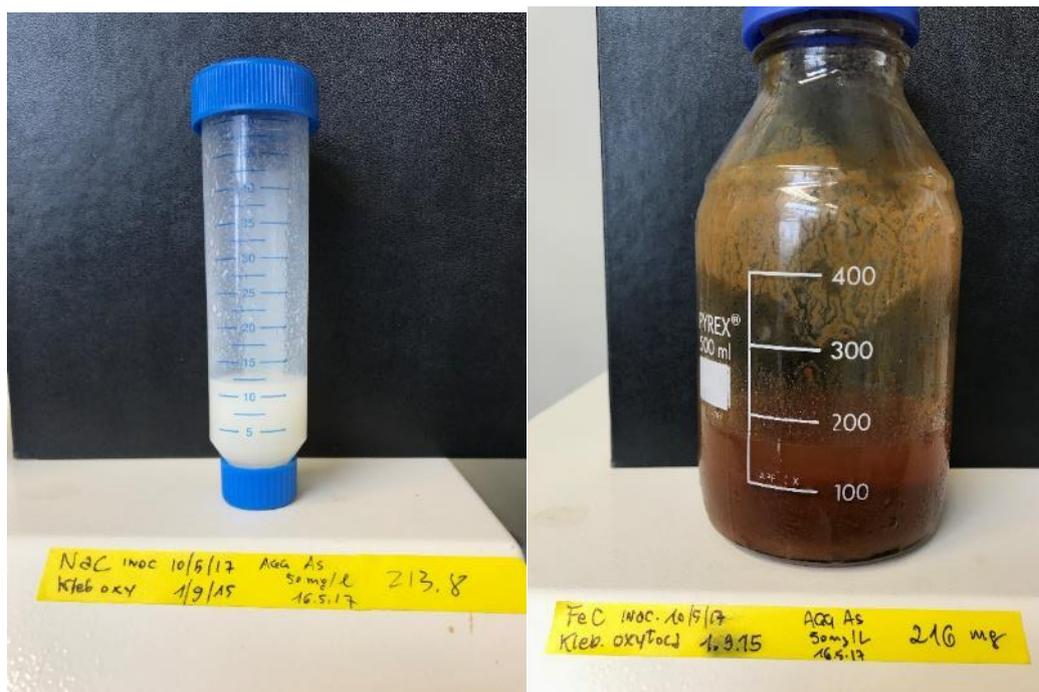


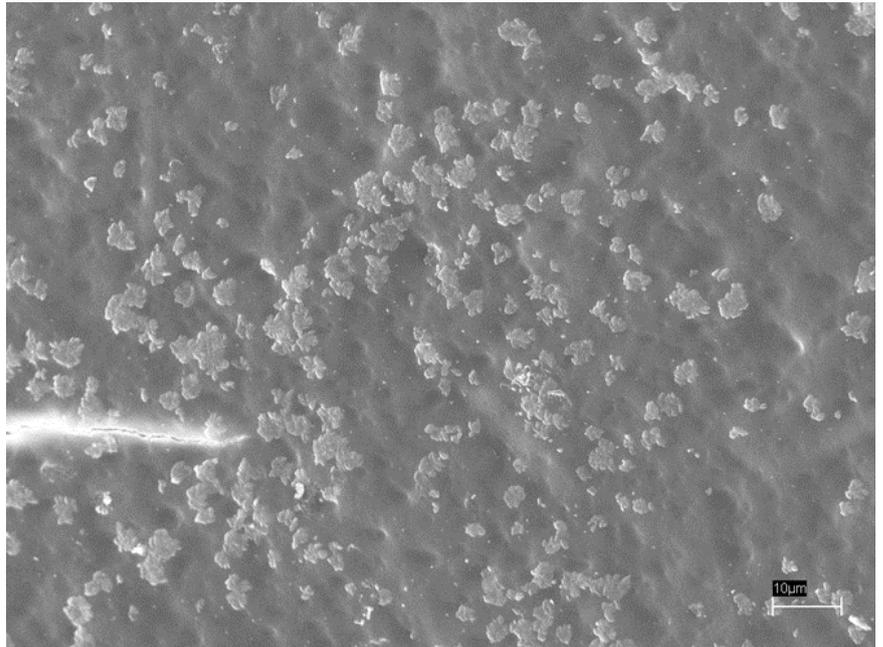
Figura 10: Estrazione idroalcolica dell'EPS capsulare dal terreno NAC (a sinistra) e dal terreno FEC (a destra).

### 3.2 Caratteristiche dei due polisaccaridi capsulari

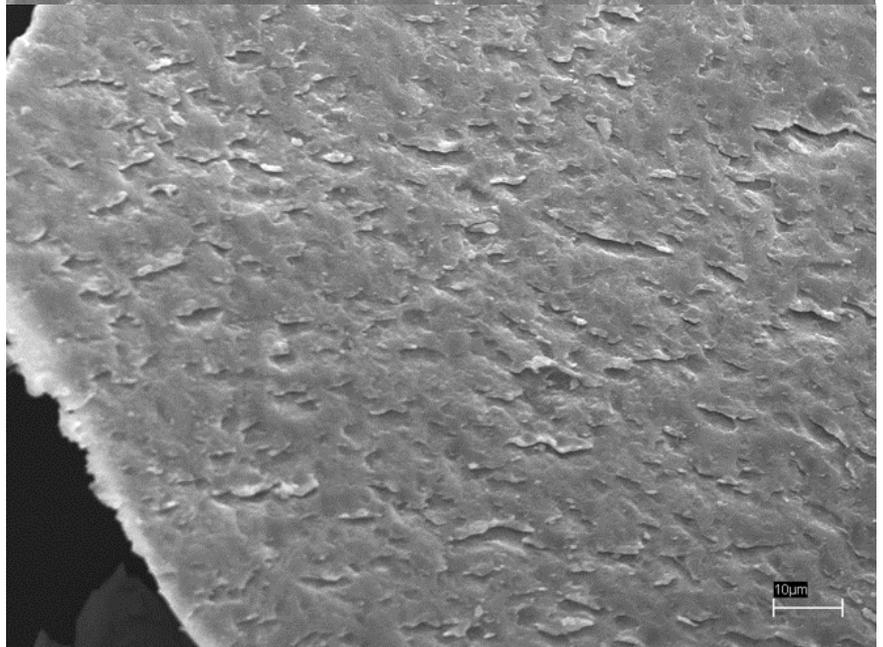
Per studiare in dettaglio le capacità di cattura dell'As con l'EPS prodotto nei due terreni di coltura è stata impiegata una sonda per analisi elementare EDS.

I due EPS, una volta portati a secco, avevano un aspetto a scaglie; questo aspetto risultava evidente anche a livello dell'osservazione microscopica (fig. 3 a, b). I due campioni sembrano simili anche se nella micrografia della Fig. 3 a appaiono delle precipitazioni di tipo salino sulla superficie, forse di NaCl come si evince dall'analisi elementare con sonda EDS.

**a**



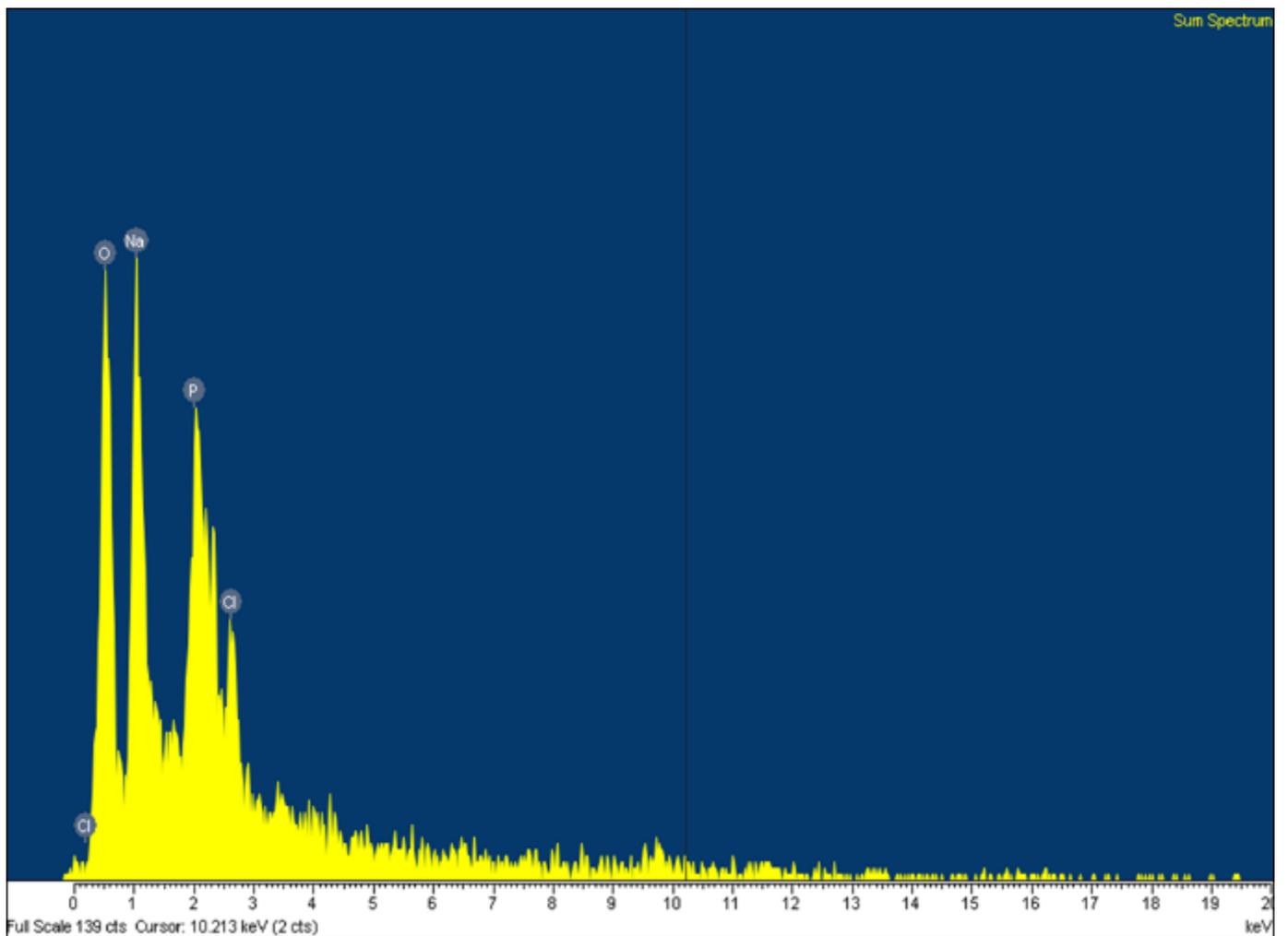
**b**



*Figura 11 a: Micrografie dell'EPS estratto e portato a secco dal terreno di coltura NaC*

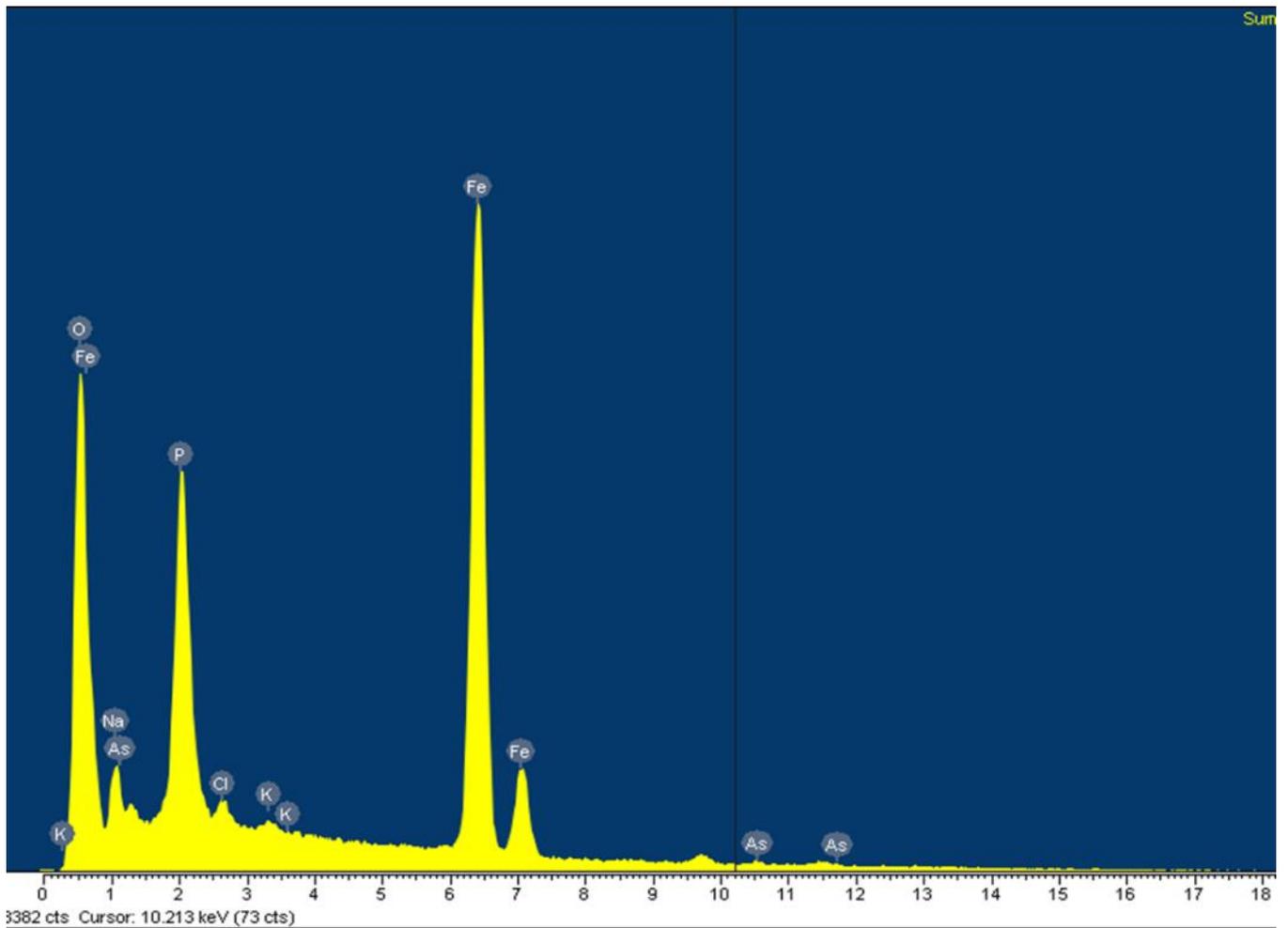
*Figura 11 b: Micrografie dell'EPS estratto e portato a secco dal terreno di coltura FeC.*

*Le dimensioni sono messe in risalto nelle due micrografie dalle due barre di 10 μm.*



Element	Weight%	Atomic%
O K	59.05	69.64
Na K	27.70	22.73
P K	7.58	4.62
Cl K	5.67	3.01
Totals	100.00	

Figura 12: Analisi elementare con sonda EDS dell'estratto polisaccaridico da terreno NaC con tavola delle concentrazioni degli elementi determinati in uno spessore di 10 $\mu$ m di superficie.



Element	Weight%	Atomic%
O K	34.72	60.12
Na K	5.51	6.64
P K	8.91	7.97
Cl K	0.80	0.62
K K	0.28	0.20
Fe K	47.85	23.74
As L	1.93	0.71
Totals	100.00	

Figura 13: Analisi elementare con sonda EDS dell'estratto polisaccaridico da terreno FeC con tavola delle concentrazioni degli elementi determinati in uno spessore di 10 $\mu$ m di superficie.

Lo spettro elementare dell'EPS ottenuto dal terreno NaC mostrava elementi come ossigeno, sodio, fosforo e cloro che sono tipici di materiali organici, e che derivano dai sali del terreno di coltura. In questo materiale non si riscontra l'arsenico poiché, come risulta dall'analisi spettrofotometrica, al di sotto del limite di rilevazione (0,5%) di questa tecnica analitica.

Nel campione di EPS estratto dal terreno FeC si riscontravano alte concentrazioni di Fe e anche di As (0,68% con analisi ICP-MS) determinabili con la sonda EDS (*Fig. 13*)

È interessante notare che le concentrazioni di As diventavano indeterminabili con la sonda EDS quando si polverizzava l'EPS da FeC e si omogenizzavano le scaglie di EPS con un mortaio, dimostrando che l'As si trovava concentrato maggiormente sulla superficie delle scaglie e che c'era quindi una certa disomogeneità nella distribuzione dell'As.

È noto che la sonda EDS determina solo gli elementi sulla superficie del campione poiché i raggi X della sonda EDS non penetrano in profondità (max. 10  $\mu\text{m}$  di spessore).

Tra gli elementi determinati con la sonda EDS si notava il fosforo in alte concentrazioni in ambedue gli spettri EDS. L'evidenza più importante tra i due tipi di EPS è che esso risultava molto più concentrato nell'EPS estratto dal terreno FeC, come risulta dai due spettri FTIR intorno a  $1048\text{ cm}^{-1}$ ; questo fenomeno era già stato riscontrato in un contesto simile in presenza di mercurio (Baldi et al., 2016).

Altre differenze nei due spettri sono meno evidenti (*Fig. 14*). I picchi tra  $3600$  e  $2800\text{ cm}^{-1}$  denotano la struttura polisaccaridica del materiale, mentre i picchi tra  $1640$ - $1400\text{ cm}^{-1}$  denotano una componente proteica tipica dei polisaccaridi capsulari.

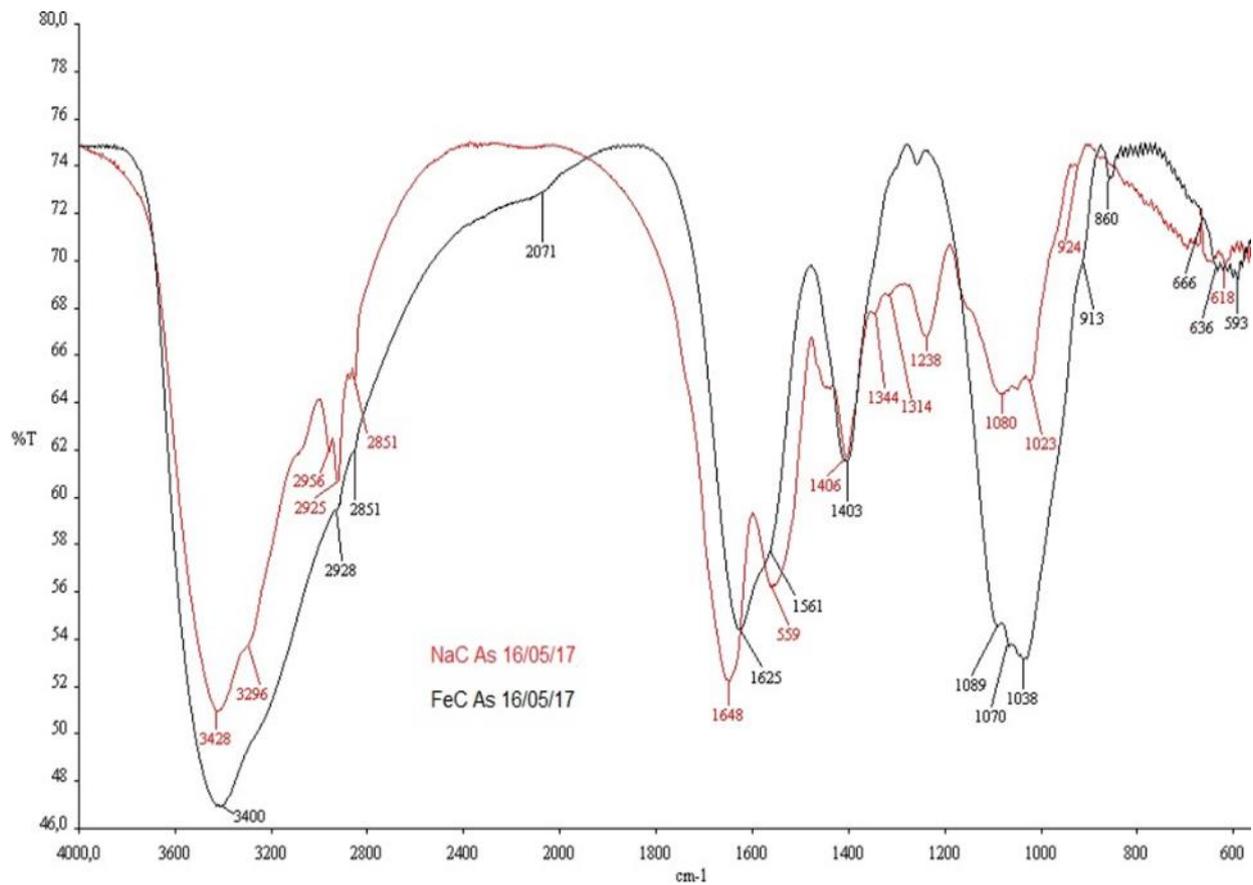


Figura 14: Spettri FT-IR dei due EPS provenienti da due terreni di coltura NaC e FeC

Nella seconda parte del lavoro ci siamo concentrati sul processo di conversione dell'arseniato in arsenito, con l'obiettivo di cercare di capire se in tale conversione fosse coinvolta la respirazione anaerobica, e quindi se l' $\text{As}^{5+}$  diventava l'accettore finale di elettroni quando l'arseniato veniva aggiunto alle colture di *K.oxytoca* DSM29614.

### **3.3 Alterazione della fermentazione del citrato dopo l'aggiunta di $\text{As}^{5+}$**

Per determinare se l'aggiunta di  $\text{As}^{5+}$  altera il metabolismo del ceppo di *K.oxytoca* DSM 29614 è stato allestito un secondo esperimento.

Il microrganismo attraversa una prima fase fermentativa di 5 giorni, nella quale utilizza il citrato di sodio in terreno NaC trasformandolo in  $\text{CO}_2$  e acido acetico, con conseguente acidificazione del terreno.

Durante la fase stazionaria, con l'aggiunta di  $\text{As}^{5+}$ , ci si aspettava di provocare nel ceppo una trasformazione metabolica e di assistere al passaggio dalla fase fermentativa alla fase di respirazione anaerobica, dove  $\text{As}^{5+}$  diventava l'accettore finale di elettroni. Questo cambiamento avrebbe dovuto provocare un'ulteriore riduzione di  $\text{As}^{5+}$  a  $\text{As}^{3+}$ , il consumo di acido acetico, l'innalzamento del pH del terreno e un aumento della biomassa batterica come aumento indiretto delle proteine. Pertanto, è stata monitorata la coltura per 48 h in seguito all'aggiunta di 1 mM di  $\text{As}^{5+}$  alla coltura batterica.

Si è osservato che le concentrazioni e il rapporto di As totale e di  $\text{As}^{3+}$  non cambiavano significativamente dopo l'aggiunta di 1mM di  $\text{As}^{5+}$ . La riduzione di  $\text{As}^{5+}$  ad  $\text{As}^{3+}$  avveniva nel giro di pochi minuti (*Fig. 15*), confermando che questo processo è portato a termine dall'enzima arsenico reductasi invece che da una riduzione dovuta alla respirazione anaerobica.

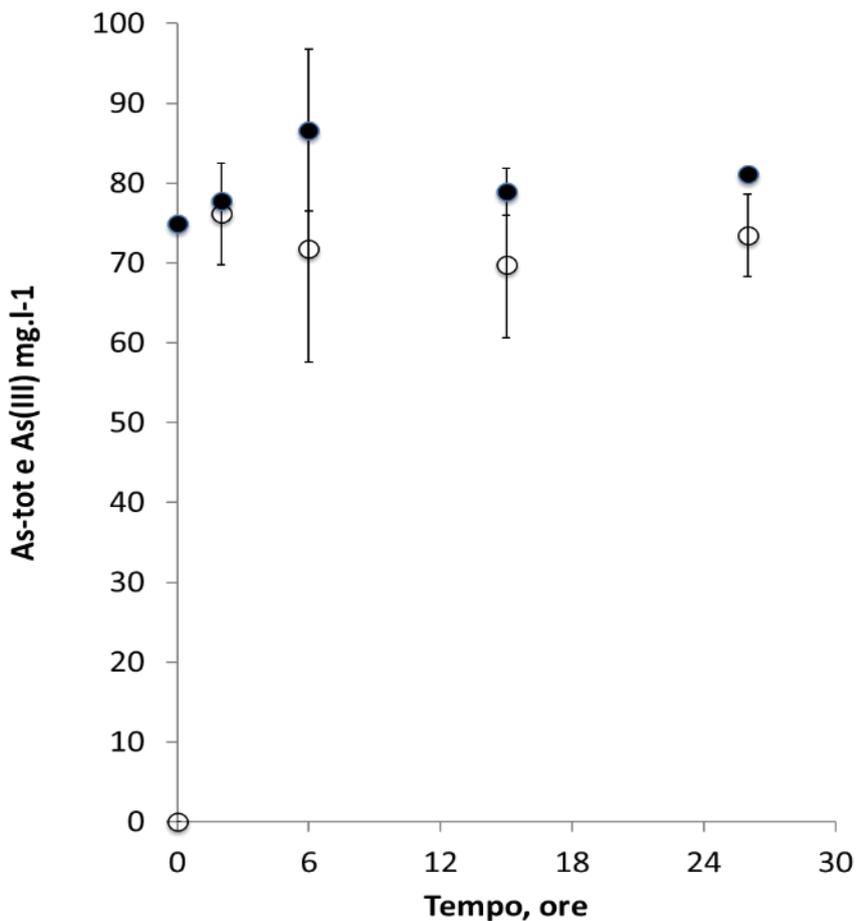


Figura 15: Determinazione di arsenico totale [As-tot] (cerchi neri) e arsenico trivalente [As<sup>3+</sup>] (cerchi vuoti) nel sovrinatante di culture di *K. oxytoca* DSM 29614 dopo l'aggiunta di 1 mM (75 mg L<sup>-1</sup>) di arsenico pentavalente [As<sup>5+</sup>]. Le barre indicano la deviazione standard delle misure.

Le concentrazioni di acido acetico nelle 26 h dell'esperimento diminuiscono sensibilmente (Fig. 16), mentre il pH della coltura aumenta, confermando che l'acido acetico dopo l'aggiunta di As<sup>5+</sup> viene consumato dalle cellule di *K. oxytoca* DSM 29614.

Come si osserva, l'acido acetico subisce una progressiva diminuzione, passando da un valore di 8 g L<sup>-1</sup> al tempo 0 a un valore di 3,9 g L<sup>-1</sup> a 26 h. Come conseguenza della diminuzione dell'acido acetico, che viene utilizzato dal microrganismo come fonte di carbonio, il pH va inevitabilmente incontro a un innalzamento. Come si può notare dal grafico, il pH mostra un andamento crescente, passando da un valore di 6.58 al tempo 0 al valore di circa 7.1 a 26 h.

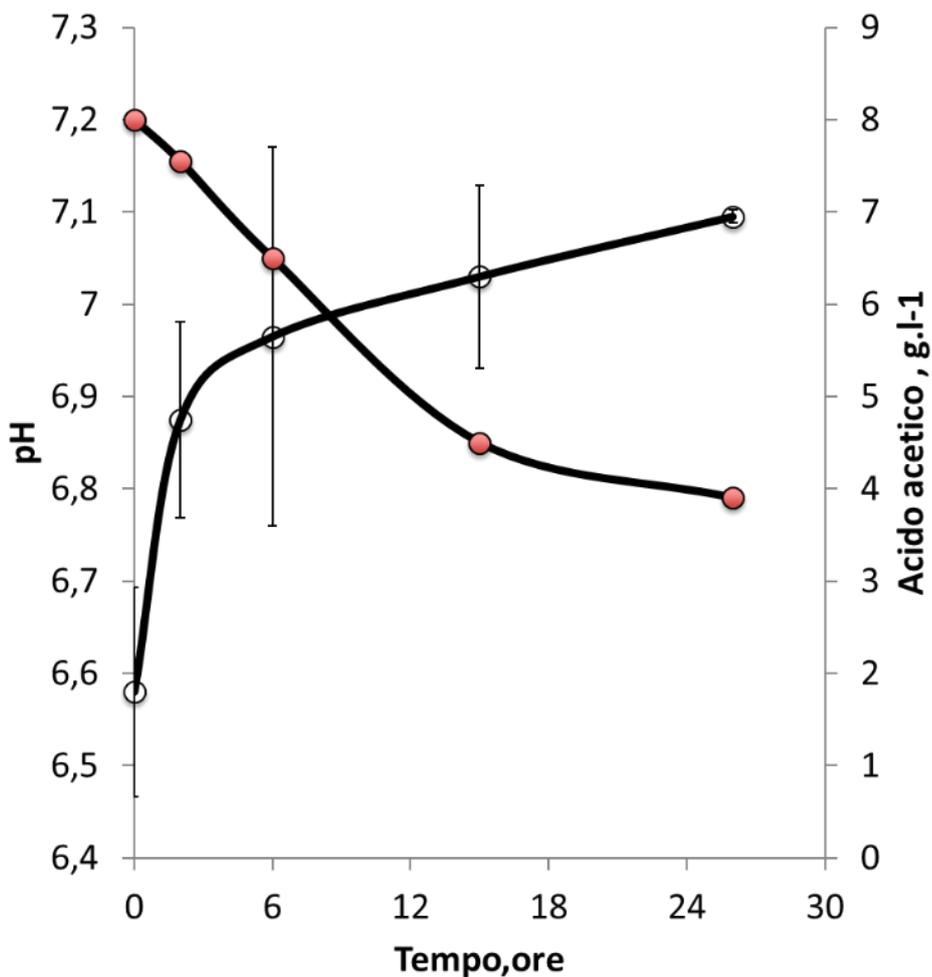


Figura 16: Determinazione di acido acetico (in rosso) e pH (in bianco) nel sovrinatante di colture di *K.oxytoca* DSM 29614 dopo l'aggiunta di 1mM  $As^{+5}$ . Le barre indicano la deviazione standard delle misure.

L'innalzamento del pH e la diminuzione delle concentrazioni di acido acetico sembrerebbero provare l'innesco della respirazione anaerobica; tuttavia l' $As^{+5}$  non sembra essere l'accettore finale di elettroni, altrimenti avremmo dovuto notare un consumo graduale durante le 26 h, come per il pH e l'acido acetico (Fig. 16), e non dopo pochi minuti dall'aggiunta dell' $As^{+5}$  alle colture.

Il passaggio dalla fase di fermentazione alla fase di respirazione è normalmente accompagnato da un aumento di biomassa del microrganismo. A tal proposito sono state effettuate le determinazioni delle proteine e della densità ottica.

Diversamente da come ci eravamo immaginati, i dati ottenuti sia dall'analisi delle proteine sia dalla determinazione della densità ottica non evidenziano nessun aumento della biomassa. Queste rimangono infatti costanti anche dopo le 26 h dopo la fase fermentativa.

Questa contraddizione tra consumo di acido acetico e la mancata crescita della biomassa ha suggerito un'evidenza già descritta (Baldi et al. 2009). Infatti, il comportamento del ceppo di *K.oxytoca* DSM 29614 nella fase stazionaria, nella quale il batterio produceva tardivamente una quantità sensibile di zuccheri e di gran lunga superiore alla produzione di proteine, era dovuto alla sintesi del polisaccaride che aiutava la precipitazione di un idrogel ferrico (Baldi et al, 2009). Si è quindi deciso di procedere con la determinazione dei carboidrati nel pellet, in modo da indagare il loro comportamento in presenza dell' $As^{5+}$ .

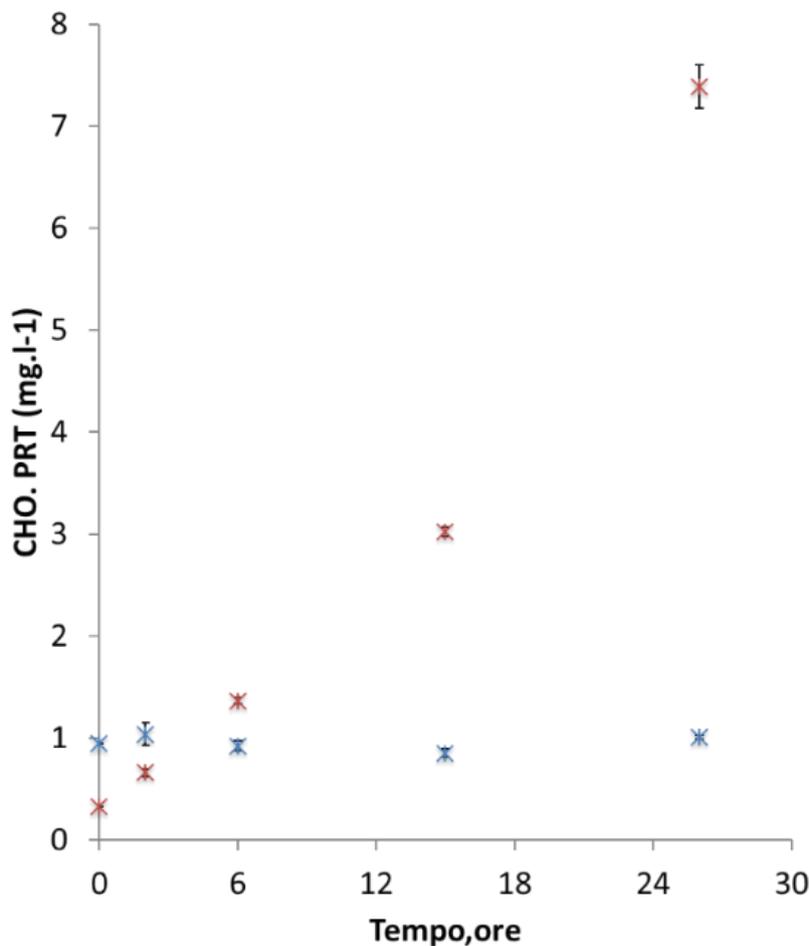


Figura 17: Determinazione di proteine (PRT, in blu) e carboidrati (CHO, in rosso) nel pellet cellulare dopo centrifugazione e filtrazione della coltura di *K.oxytoca* DSM 29614 e dopo l'aggiunta di 1 mM di  $As^{5+}$ . Le barre indicano la deviazione standard.

Il grafico mette in evidenza come la biomassa, espressa con la determinazione delle proteine, rimanga costante anche dopo l'aggiunta dell'arsenico, mentre i carboidrati, che esprimono la produzione dell'EPS capsulare, sono la metà delle proteine nella fase fermentativa, mentre sono 12 volte più alti 26 h dopo l'aggiunta dell'As<sup>+5</sup>.

Alla luce dei dati ottenuti il microrganismo sembrerebbe utilizzare l'energia ottenuta dal consumo dell'acido acetico per produrre polisaccaridi con il processo anabolico della gluconeogenesi (Gallo et al. 2012).

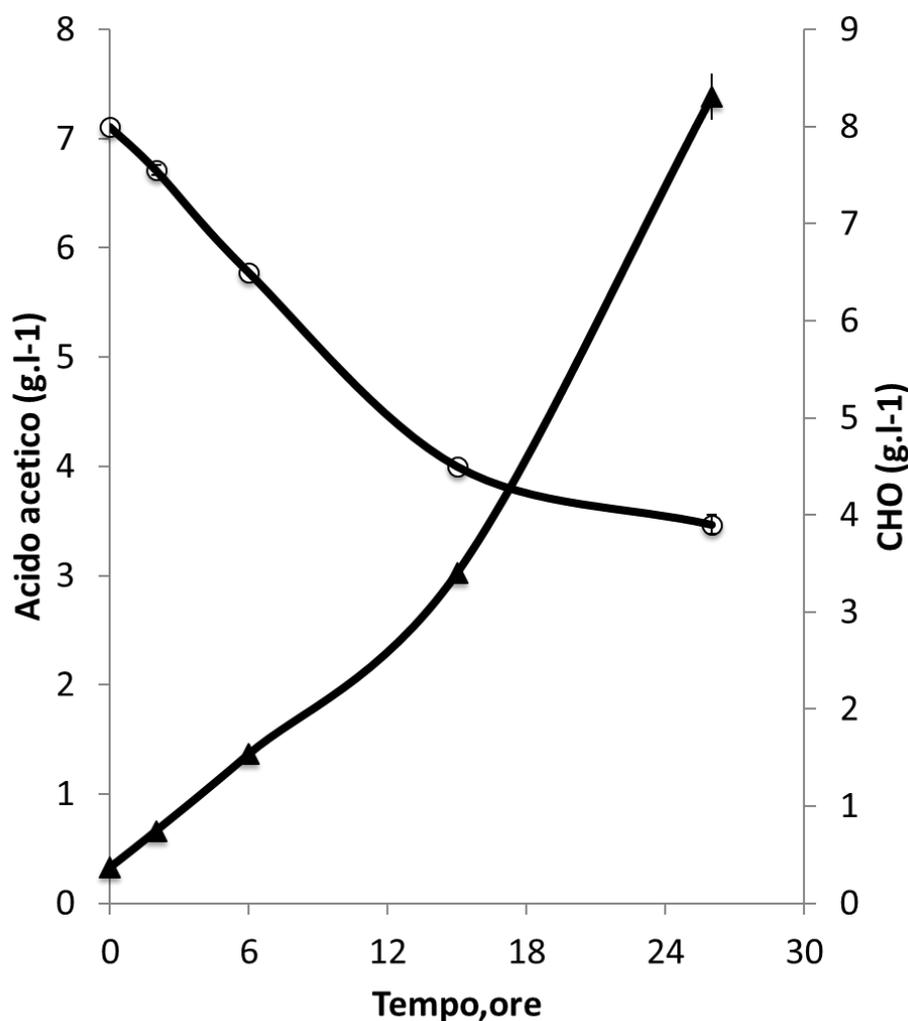


Figura 18: Cinetiche del consumo dell'acido acetico e la produzione di carboidrati (CHO) per la sintesi del EPS capsulare in 26 h

In presenza di arseniato nel mezzo di coltura *Klebsiella oxytoca* DSM 29614 fa quindi uso di due diversi meccanismi di resistenza. Da un lato opera una conversione dell'As<sup>5+</sup> in As<sup>3+</sup>, tramite l'arseniato reductasi, dall'altro lato l'EPS complessa sia l'As<sup>5+</sup> che l'As<sup>3+</sup>.

Rimane in sospeso da dove provenga l'energia necessaria per sintetizzare l'EPS, se si esclude l'As<sup>5+</sup> come donatore di elettroni. Un'ipotesi potrebbe essere la presenza di citocromi allo stato energetico ridotto durante la fase fermentativa che, cedendo gli elettroni e quindi l'ATP necessario per la gluconeogenesi, portano alla produzione del esopolisaccaride capsulare.

L'EPS assume un ruolo molto importante nella colonizzazione da parte di questo microrganismo in ambienti contaminati da metalli pesanti. La letteratura mostra chiara evidenza delle capacità complessanti degli esopolisaccaridi prodotti da *Klebsiella oxytoca* DSM 29614 anche nei confronti del mercurio, un altro metallo pesante di elevata pericolosità ambientale (Baldi et al. 2016).

## CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti è emerso che gli idrossidi di ferro immersi in una matrice polisaccaridica sono estremamente efficaci nel complessare l'As<sup>5+</sup> e l'As<sup>3+</sup> presenti nella coltura. Le due forme chimiche dell'arsenico vengono inglobate nell'EPS capsulare che il microrganismo produce in presenza di ferro, e sequestrato così dalla soluzione.

Nel terreno FeC si è infatti verificato un abbattimento completo dell'arsenico precedentemente addizionato alla coltura. L'indice di abbattimento è talmente elevato che nel surnatante centrifugato e filtrato la concentrazione di arseniato dopo 48 ore non era più determinabile. I dati relativi alla speciazione dell'arsenico hanno inoltre evidenziato nel terreno NaC una riduzione dell'As<sup>5+</sup> a As<sup>3+</sup> del 83% in 48 h d'incubazione. Questa trasformazione è probabilmente dovuta all'arseniato reductasi dell'operone *ars*, la quale esistenza è stata scoperta dal sequenziamento del genoma del ceppo DSM 29614 (Gallo et al. sottomesso).

Nella prima fase di crescita anaerobica il ceppo di *Klebsiella oxytoca* DSM 29614 fermenta il citrato a CO<sub>2</sub> ed acido acetico, e il pH della coltura si abbassa da 7.8 a 6.5-6.6. Quando viene aggiunto 1 mM As<sup>5+</sup> alla coltura, il ceppo consuma l'acido acetico e provoca l'innalzamento del pH, che passa da 6.6 a 7.1 in 26 ore. L'assenza dell'aumento di biomassa e l'innesco della gluconeogenesi (Gallo et al. 2012) fa pensare a un ulteriore meccanismo di resistenza contro l'arsenico, mai descritto fino adesso. La produzione di un EPS che lega l'arsenico specificatamente è dimostrata. La sola parte ancora non completamente individuata è la componente energetica. Un'ipotesi, che non è tuttavia ancora stata validata, potrebbe essere la presenza di citocromi che durante la fase fermentativa agiscono da donatori di elettroni.

In ogni caso le applicazioni biotecnologiche con questo ceppo sono molte, e sono tuttora in corso degli esperimenti (Casentini et al, 2015) per dimostrare l'efficacia degli idrossidi ferrici prodotti con il nostro ceppo nel ridurre le due specie dell'arsenico nelle acque contaminate.

## BIBLIOGRAFIA

Albernathy C. O., Calderon R. L., Chappel W. R. (1997) *Arsenic exposure and Health Effects*, in *The Geochemistry of Arsenic*. Chapman Hall (London).

Amy G., Edwards M., Brandhuber P., McNeill L., Benjamin M., Vagliasindi F., Carlson K., Chwirka J., (2000) *Arsenic Treatability Options and Evaluation of Residual Management Issues*. AWWA Research Foundation, Denver (Colorado).

Baldi et al., (2001) *Gel sequestration of heavy metals by Klebsiella oxytoca isolated from iron mat*. FEMS Microbiology Ecology 36:169-174

Baldi, F., Marchetto, D., Battistel, D., Daniele, S., Faleri, C., De Castro, C., and Lanzetta, R. (2009) *Iron binding characterization of a capsular polysaccharide produced by K. oxytoca isolated from mine acid drainage*. J. Appl. Microbiol. 107: 1241-1250

Baldi F., Marchetto D., Zanchettin D., Sartorato E., Paganelli S., Piccolo O. (2010) *A bio-generated Fe(III)-binding exopolysaccharide used as new catalyst for phenol hydroxylation*. Green Chemistry 12: 1405-1409.

Baldi et al., (2012) *Adaptative biochemical pathways and regulatory networks in Klebsiella oxytoca BAS-10 producing a biotechnologically relevant exopolysaccharide during Fe(III)-citrate fermentation*. Microb Cell Fact. 23: 11-152.

Baldi et al., (2012) *XAS analysis of a nanostructured iron polysaccharide produced anaerobically by a strain of Klebsiella oxytoca*. Biometals 25: 875–881

Baldi F. et al., An extracellular polymeric substance quickly chelates mercury (II) with n-heterocyclic groups. Environmental chemistry

Baldi F. et al., (2016) *Polysaccharide-based silver nanoparticles synthesized by Klebsiella oxytoca DSM 29614 cause DNA fragmentation in E. coli cells*. Biometals 29:321–331

Baldi F., Gallo M., Daniele S., Battistel D., Faleri C., Kodre A., Arčon I. (2017) *An extracellular polymeric substance quickly chelates mercury(II) with N-heterocyclic groups*. Chemosphere 176: 296-304

Bradford M. M., (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem. 72: 248-54.

Butcher G. Bronwyn, Rawlings E. Douglas, (2002) *The divergent chromosomal ars operon of Acidithiobacillus ferrooxidans is regulated by an atypical arsR protein*. Microbiology, 148: 3983–3992

Cai J., Salmon K., dubow M., (1998) *A chromosomal ars operon homologue of Pseudomonas aeruginosa confers increased resistance to arsenic and antimony in Escherichia coli*. Microbiology (1 998), 144,2705-2713

Carlin A., Shi W., Dey S., Rosen B. P., (1995) *The ars Operon of Escherichia coli Confers Arsenical and Antimonial Resistance*. Journal of Bacteriology, p. 981–986

Casentini B., Rossetti S., Gallo M., Baldi f. (2015) *Potentialities of biogenerated iron hydroxides nanoparticles in arsenic water treatment*. In 6th European Bioremediation Conference. Kalogerakis N., Fava F., Manousaki E. (eds). Chania, Crete, Greece: Grafima Publications, pp. 289-292

Chen Y., Parvez F., Gamble M. et al., (2009) *Arsenic exposure at low-to-moderate levels and skin lesions, arsenic metabolism, neurological functions, and biomarkers for respiratory and cardiovascular diseases: Review of recent findings from the Health Effects of Arsenic Longitudinal study (HEALS) in Bangladesh*. Toxicology and Applied Pharmacology

Conio O., Porro R., (2004) *L'arsenico nelle acque destinate al consumo umano*. Franco Angeli (Milano)

Crain A. V., Broderick J. B., (2014) *Pyruvate Formate-lyase and Its Activation by Pyruvate Formate-lyase Activating Enzyme*. The journal of biological chemistry

Czaczyk K., Myszka K., (2007) *Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances (EPS) and Its Role in Microbial Biofilm Formation*. Polish J. of Environ. Stud. Vol. 16, No. 6, 799-806

Diorio C., Cai J., Marmor J., Shinder R., Dubow M. S., (1995) *An Escherichia coli Chromosomal ars Operon Homolog Is Functional in Arsenic Detoxification and Is Conserved in Gram-Negative Bacteria*. Journal of Bacteriology, p. 2050–2056

Frakenberger W. T. Jr. (2002) *Environmental Chemistry of Arsenic*. Marcel Dekker Inc., New York.

Gallo G., Presta L., Perrin E., Gallo M., Marchetto D., Puglia A. M., Fani R., Baldi F. *Genomic traits of Klebsiella oxytoca DSM 29614, an uncommon metal-nanoparticle producer strain isolated from acid mine drainages*. Sottomesso

Gihring M. Thomas, Bond L. Philip, Peters C. Stephen, Banfield F. Jillian, (2003) *Arsenic resistance in the archaeon "Ferropasmaacidarmanus": new insights into the structure and evolution of the ars genes*. *Extremophiles*, 7:123–130

Goldberg S., Johnston C. T., (2001) *Mechanisms of Arsenic Adsorption on Amorphous Oxides Evaluated Using Macroscopic Measurements, Vibrational Spectroscopy, and Surface Complexation Modeling*. *Journal of Colloid and Interface Science* 234, 204–216

Katsoyiannis I. A., Zouboulis A., (2004) *Application of Biological Processes for the Removal of Arsenic from Groundwater*. *Water research*

Lembre P., Lorentz C. and Di Martino P., (2012) *Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World*. *The Complex World of Polysaccharides*

Leone S., De Castro C., Parrilli M., Baldi F., Lanzetta R., (2007) *Structure of the Iron-Binding Exopolysaccharide Produced Anaerobically by the Gram-Negative Bacterium Klebsiella oxytoca BAS-10*. *Eur. J. Org. Chem.* 5183–5189

Mohan D., Pittman C. U., (2007) *Arsenic removal from water/wastewater using adsorbents-A critical Review*. *Journal of Hazardous Materials*

Oremland R. S., Stolz J. F., (2005) *Arsenic, microbes and contaminated aquifers*. *TRENDS in Microbiology* Vol 13 No.2

Pal A., Paul A. K., (2008) *Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation*. *Indian J. Microbiology*, 48:49–64.

Smedley P. L., Kinniburgh D. G., (2002) *A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters*. Applied Geochemistry, 17:517–568

Valiani A., Zaccheo P., (2017) *Prove di rimozione dell'arsenico da acque contaminate mediante un complesso Fe(III)-esopolisaccaride caricato su biochar*

Wu J., Rose B. P., (1993) *Metalloregulated Expression of the ars Operon*. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 268, No. 1, pp. 52-58