



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DEL MOLISE

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL MOLISE

DIPARTIMENTO DI AGRICOLTURA, AMBIENTE E ALIMENTI

IN COLLABORAZIONE CON:



CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE,
ISTITUTO PER LO STUDIO DEI MATERIALI
NANOSTRUTTURATI,
ROMA.



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ',
DIPARTIMENTO DI SANITÀ' PUBBLICA
VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE,
ROMA.

DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOTECNOLOGIA DEGLI ALIMENTI

CICLO XXVII

“Biosonde a cellule per l'identificazione dei pericoli
chimico-tossicologici negli alimenti”

S.S.D. CHIM/01 CHIM/10

Coordinatore: Ch.mo Prof. Emanuele Marconi

Tutor: Ch.mo Prof. Emanuele Marconi

Dott. Roberto Dragone

Dott.ssa Chiara Frazzoli

Dottorando: Dott. Gerardo Grasso

Matr. 146252

Introduzione	4
Scopo del lavoro	6
1- BIOSONDA AMPEROMETRICA A CELLULE DI <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	
1.1 Basi della ricerca	7
1.1.1 Composti bisfenolici: bisfenolo A e B	7
1.1.2 Pesticidi: erbicida diuron e conservanti del legno	12
1.1.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
1.1.4 Biosensori amperometrici	23
1.2 Materiali e metodi	26
1.2.1 Biosaggi respirometrici sul bisfenolo A e B	28
1.2.2 Biosaggi respirometrici sull'erbicida diuron	30
1.2.3 Biosaggi respirometrici sui conservanti del legno	33
1.3 Risultati e Discussione	36
1.3.1 Bisfenolo A e B	36
1.3.2 Diuron	45
1.3.3 Conservanti del legno	49
1.4 Conclusioni	51

2- BIOSONDA OTTICA A CELLULE MICROBICHE WILD TYPE E TRANSGENICHE DI *ESCHERICHIA COLI*

Introduzione	53
2.1 Basi della ricerca	54
2.1.1 Antibiotici zootecnici: aspetti di sanità pubblica e metodi di <i>screening</i>	54
2.1.2 Metodi di <i>screening</i> : l'approccio biosensoristico	61
2.1.3 Biosensori ottici, proteine fluorescenti e <i>bioreporter</i> cellulari	63
2.1.4 <i>Escherichia coli</i>	65
2.1.4a Impiego di <i>E. coli</i> nei test di <i>screening</i> dei chinolonici su agar	66
2.1.4b Operone lac e β -galattosidasi: introduzione ed applicazioni biotecnologiche	67
2.1.5 Promotori chinoloni inducibili	71
2.2 Materiali e Metodi	75
2.2.1 Saggio spettrofotometrico della β -galattosidasi endogena	78
2.2.2 Saggio fluorimetrico del promotore lac	79
2.2.3 Misure fluorimetriche dell'attività del promotore <i>yorb</i>	80
2.2.4 Protocollo di ingegnerizzazione	81
2.3 Risultati e Discussione	83
2.3.1 Saggio spettrofotometrico della β -galattosidasi endogena	83
2.3.2 Saggio fluorimetrico del promotore lac	88
2.3.3 Misure fluorimetriche dell'attività del promotore <i>yorb</i>	92

2.4 Conclusioni	97
3- BIOSONDA POTENZIOMETRICA A CELLULE VERO MODIFICATE CON ANTICORPI ANTI-AFB₁ (Bioelectric Recognition Assay System o BERA System®)	
3.1 Basi della ricerca	98
3.1.1 Aflatossina B ₁	98
3.1.2 Biosensori potenziometrici e BERA System®: modificazione della membrana plasmatica per elettroinserzione di anticorpi anti-AFB ₁	101
3.2 Materiali e Metodi	105
3.3 Risultati e Discussione	109
Bibliografia	112

Introduzione

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO), ogni anno milioni di persone in tutto il mondo sono affette da malattie di origine alimentare (conosciute come *foodborne illness* o *foodborne diseases*). Alimenti non sicuri contenenti batteri nocivi, virus, parassiti o sostanze chimiche possono essere la causa di più di 200 malattie, che vanno dalla diarrea al cancro [WHO, 2014]. Questo fenomeno è collegato alla presenza negli alimenti, o nei mangimi, di contaminanti biotici (es. batteri) e abiotici di origine biologica (es. aflatossine) e/o di origine antropica, ad esempio residui di composti agrochimici (come i pesticidi) o antibiotici a uso veterinario.

La contaminazione può avvenire in diversi punti della catena di produzione alimentare dalle materie prime fino al prodotto finito (*from farm to fork*), se le contaminazioni di origine naturale come ad esempio quella da aflatossine sono oggetto di studio già dalla prima metà del secolo scorso riguardo all'impatto sulla salute degli animali, alcune contaminazioni chimiche di origine antropica sono state identificate solo più recentemente: un esempio è la contaminazione legata al rilascio di sostanze dai recipienti agli alimenti in essi contenuti (fenomeno noto con il nome di 'migrazione').

I pericoli chimico-tossicologici legati alla presenza di residui e/o contaminanti negli alimenti sono causati dall'attività biologica di tali sostanze. In particolare la contaminazione chimica dei prodotti alimentari può incidere sulla salute a seguito di una singola esposizione a breve termine o, più spesso, dopo un'esposizione a lungo termine.

Gli studi di citotossicità *in vitro* vengono utilizzati durante le fasi iniziali di valutazioni tossicologiche, a livello di *screening*, per identificare precocemente eventuali pericoli per la salute. Questi possono, infatti, fornire informazioni utili riguardanti determinate sostanze che agiscono su alcuni *target* cellulari. Tali test possono essere utilizzati, ad esempio, per prevedere la tossicità di sostanze ad attività ignota, per identificare i meccanismi di azione, per preparare o completare profili tossicologici e mirare la strategia sperimentale di eventuali studi *in vivo*. In particolare organismi eucariotici unicellulari utilizzati come marcatori per indagini tossicologiche (ad esempio il *Saccharomyces cerevisiae*, preso come modello di studio in diverse ricerche), possono essere impiegati quali mediatori biologici in dispositivi biosensoristici (biosonde a cellule) [Baronian, 2004; Dragone *et al.*, 2014; Frazzoli *et al.*, 2007 Walmsley & Keenan, P., 2000]. In tal senso questi dispositivi possono costituire la base per il possibile sviluppo di nuovi test tossicologici di *screening*, rapidi e di facile uso. I dispositivi biosensoristici a cellule intere sono caratterizzati da un diverso approccio analitico rispetto ad altri dispositivi biosensoristici: utilizzando entità biologiche intatte possono, infatti, evidenziare le interazioni e gli effetti di esposizione a diverse contaminanti su strutture cellulari

funzionali, consentendo così di valutare parametri tossicologici come ad es. la bioaccessibilità [Dragone & Grasso, 2012].

La respirazione cellulare durante il catabolismo aerobico (correlata al consumo cellulare di O₂) è un indicatore del tasso metabolico e un importante *endpoint* tossicologico: in *S. cerevisiae* questo parametro cellulare si è mostrato essere molto sensibile alla presenza di diversi xenobiotici sia inorganici che organici (es. erbicidi, surfactanti e metalli pesanti) [Braconi *et al.*, 2011; Campanella *et al.* 1995; Dragone *et al.*, 2014; Dragone *et al.*, 2015; Frazzoli *et al.*, 2007] e la sua affidabilità quale *endpoint* tossicologico è stata confermata da biosaggi respirometrici condotti sulla linea cellulare umana U-937 [Dragone *et al.*, 2009]. I mitocondri (le strutture cellulari dove avviene la fosforilazione ossidativa, ovvero l'ultima fase della respirazione cellulare) svolgono un ruolo centrale all'interno delle cellule; inoltre le disfunzioni mitocondriali (legate ad esempio alle alterazioni dello stato redox e metabolismo cellulare) sembrerebbero essere coinvolte in diversi processi come l'invecchiamento, insorgenza di malattie neurodegenerative e cancerogenesi [Apte & Sarangarajan, 2008; Lin & Beal, 2006]. Quindi, studi degli effetti chimico-tossicologici sulla respirazione cellulare possono aiutare per una migliore comprensione dei potenziali meccanismi d'azione di molecole in grado di interferire con il catabolismo aerobio e riducono l'utilizzo di animali come raccomandato dalla Commissione Europea.

Un altro importante vantaggio nell'impiego di biosonde a cellule è di poter modificare il mediatore biologico in modo da aumentare la sensibilità e/o la specificità di risposta in presenza del contaminante d'interesse. Questo permette l'utilizzo delle biosonde a cellule anche per l'identificazione e la rilevazione di una specifica sostanza d'interesse oppure della sua classe di appartenenza.

Le modificazioni cellulari eseguite in questo lavoro sono state ottenute enzimaticamente (rimozione della parete cellulare), geneticamente (introducendo opportuni geni per la produzione di cellule transgeniche) e per elettro-inserzione di anticorpi sulla superficie della membrana plasmatica (BERA System®). La rimozione di strutture, come la parete cellulare, in grado di ostacolare/rallentare l'*uptake* intracellulare di agenti chimici potenzialmente tossici (es. metalli pesanti) *aumenta* la risposta cellulare. Inoltre attraverso l'ingegneria genetica è possibile realizzare *bioreporters inducibili*, in grado di produrre un segnale ottico rilevabile come risposta alla presenza dell'analita d'interesse: questo tipo di *bioreporter* usa specifici costrutti di DNA, generalmente costituiti da un opportuno promotore inducibile che controlla l'espressione di un gene reporter (codificante per una proteina fluorescente rilevabile otticamente) [Struss *et al.*, 2010]. Infine, l'introduzione di anticorpi nella membrana plasmatica di cellule di origine animale, consente il rilevamento (BERA System®),

mediante misure potenziometriche, di specifiche sostanze che fungono da antigene dell'anticorpo utilizzato.

L'impiego di biosonde a cellule può quindi rappresentare una nuova opportunità tecnologica per lo studio, rivelazione e individuazione dei pericoli chimico-tossicologici negli alimenti.

Scopo del lavoro

In questo progetto di tesi di Dottorato è stato studiato e testato l'impiego biosonde a cellule per l'identificazione dei pericoli chimico-tossicologici di alcuni residui e contaminati potenzialmente presenti negli alimenti. A tal fine sono stati impiegati tre tipi di biosonde a cellule:


1. Una biosonda amperometrica a cellule di *Saccharomyces cerevisiae* per lo studio delle interferenze sul catabolismo aerobio derivanti dall'esposizione a diversi contaminanti e residui (composti bisfenolici, erbicida diuron e conservanti del legno); la ricerca ha incluso l'ottimizzazione delle procedure sperimentali, l'immobilizzazione e la modificazione dell'elemento biologico di riconoscimento (da cellule intere a sferoplasti);
2. Una biosonda ottica a cellule microbiche *wild type* e transgeniche di *Escherichia coli* per la rilevazione di residui dell'antibiotico chinolonico ciprofloxacina in campioni di latte bovino. Lo studio ha riguardato la misura dell'attività della β -galattosidasi endogena come marcatore indiretto della proliferazione cellulare e l'utilizzo di sistemi *bioreporter* inducibili in presenza del chinolonico ciprofloxacina;
3. Una biosonda potenziometrica a cellule Vero modificate con anticorpi per la rilevazione dell'aflatossina B₁; il sistema studiato (Bioelectric Recognition Assay o BERA System®) è stato sviluppato nel *Laboratory of Enzyme Technology, School of Food Science, Biotechnology and Development, Agricultural University of Athens (AUA)*.

1- BIOSONDA AMPEROMETRICA A CELLULE DI *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1.1 Basi della ricerca

1.1.1 Composti bisfenolici: bisfenolo A e B

Il *packaging* è diventato un elemento indispensabile nel processo di produzione alimentare, assicurando una maggiore garanzia di sicurezza del prodotto, preservandolo da contaminazioni microbiche in modo che possa godere di una *shelf life* più lunga. Attualmente più di 30 diversi materiali plastici (tra cui polietilene, polipropilene, policarbonato e cloruri di polivinile) vengono utilizzati come materiali da imballaggio alimentare [Marsh & Bugusu, 2007]. Tra i diversi materiali utilizzati nell'imballaggio alimentare, le materie plastiche sono sostanze di utilizzo relativamente recente rispetto agli altri materiali, ma in continua crescita grazie alle buone proprietà (durezza, resistenza all'urto, bassa conducibilità termica, resistenza ad acidi e basi, ecc.), a un basso costo di produzione e trasporto. Tra i diversi materiali plastici utilizzati nell'industria impiantistica ed

alimentare, il policarbonato (codice identificativo di riciclaggio ) è un polimero costituito da monomeri di bisfenolo A (2,2-bis (4-idrossifenil) propano o BPA) (Fig. 1). Il BPA è un composto organico aromatico ampiamente utilizzato (grazie ad una serie di caratteristiche fisiche di robustezza e trasparenza) nei materiali destinati a venire a contatto con alimenti, ad esempio, bottiglie di plastica riutilizzabili, biberon, piatti, calici, tazze, stoviglie per forno a microonde e contenitori, nonché carta termosensibile (utilizzata ad es. per gli scontrini) e materiali per odontoiatria [Geens *et al.*, 2012a].

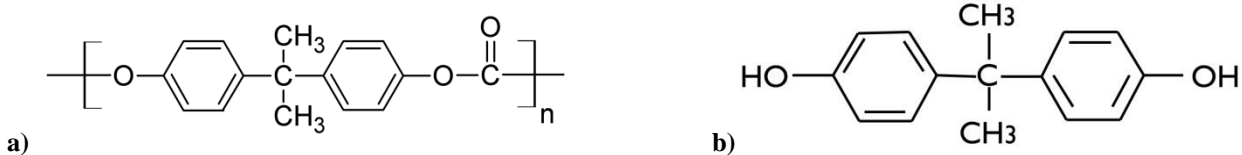


Fig. 1. a) Policarbonato di bisfenolo A b) molecola di bisfenolo A.

Le resine epossidiche contenenti BPA ampiamente utilizzate in campo alimentare sono un'altra potenziale fonte di contaminazione alimentare da BPA [Geens *et al.*, 2012a].

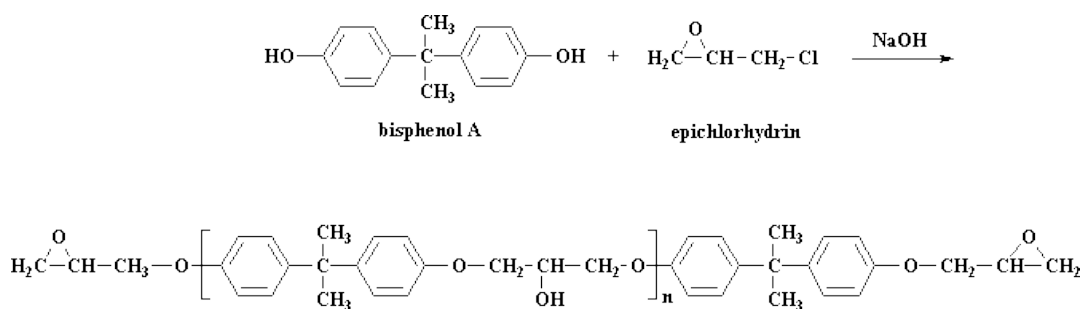


Fig. 2. Reazione di formazione del composto chimico Bisfenolo A diglicidil etere (comunemente abbreviato come BADGE o DGEBA) utilizzato come costituente di resine epossidiche.

Ad esempio il BADGE (acronimo di Bisfenolo A diglicidil etere) (Fig. 2) è un monomero utilizzato per la produzione di resine epossidiche che rivestono l'interno di contenitori metallici per alimenti. Tali resine sono materiali polimerici prodotti da monomeri ottenuti dalla reazione tra bisfenolo-A ed epiclorina; hanno la funzione di impedire la corrosione e la cessione di metalli del contenitore all'alimento [Simal-Gándara *et al.*, 1998]. Riguardo l'imballaggio primario (quello cioè posto a diretto contatto con il prodotto alimentare) [Decreto Legislativo 22/1997 (art. 35)], questo può rappresentare una sorgente di contaminazione: durante i processi di lavorazione, stoccaggio e trasporto, i materiali destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari possono infatti interagire con il cibo, determinando un trasferimento nel prodotto di sostanze chimiche presenti nella loro composizione, attraverso un fenomeno noto col nome di 'migrazione'. Quest'aspetto ha assunto una certa importanza nella sicurezza alimentare e le autorità competenti, sia a livello nazionale che comunitario, hanno emesso una vasta legislazione al fine di controllare le contaminazioni pericolose e tutelare la salute dei consumatori. I fenomeni di migrazione del BPA possono essere legati al i) rilascio di monomeri che residuano nel materiale del *packaging* polimerico a causa di un'incompleta polimerizzazione ii) idrolisi/amminolisi del legame estere tra due monomeri di BPA (Fig. 3) dovuta, ad esempio, al contatto con cibi di natura acida o basica o al calore liberato in processi di sterilizzazione di lattine o di plastiche in polycarbonato [Gallart-Ayala *et al.*, 2013].

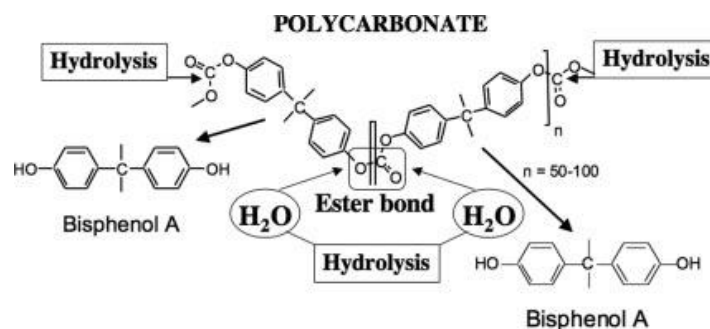


Fig. 3. Reazione di idrolisi del legame estere del BPA nelle plastiche in polycarbonato (tratta da Welshons *et al.*, 2006).

È chiaro come il BPA possa quindi contaminare i cibi e le bevande conservati in materiali che lo contengono nel momento in cui si realizza la sua migrazione dal materiale all'alimento con conseguente potenziale esposizione dei consumatori attraverso l'alimentazione.

In letteratura sono riportati diversi studi di migrazione riguardanti il BPA [Geens *et al.*, 2012a]. I fenomeni di migrazione possono verificarsi in particolari condizioni: il riscaldamento di liquidi (ad esempio latte, minestrine, ecc) in contenitori a base di BPA accelera il deterioramento della plastica con il conseguente cedimento di sostanze indesiderate; inoltre versare liquidi molto caldi in contenitori di plastica senza lasciare che il liquido si raffreddi prima di travasare o utilizzare contenitori in plastica usurati (dai quali la migrazione di sostanze indesiderate è maggiore rispetto ai contenitori nuovi) e sterilizzatori a caldo (vapore o microonde) sono azioni che favoriscono la migrazione e quindi la contaminazione degli alimenti con BPA.

L'esposizione alimentare al BPA si può realizzare anche attraverso una via più indiretta di esposizione alimentare: la natura chimica lipofila di molte sostanze chimiche, infatti, favorisce fenomeni di bioconcentrazione lungo la catena alimentare, responsabili di un'iniziale concentrazione nei tessuti adiposi degli organismi esposti, e di un successivo e progressivo bioaccumulo nei tessuti degli organismi che occupano i livelli superiori della catena alimentare. Questa condizione favorisce di conseguenza un'esposizione al BPA anche attraverso le matrici alimentari contaminate (es. latte vaccino) [Maragou *et al.*, 2006].

Le caratteristiche lipofile del BPA rendono possibile il suo accumulo anche nei tessuti adiposi umani, favorendo la creazione di un "*body burden*" [Frazzoli *et al.*, 2008]. Uno studio condotto per determinare i livelli di BPA nei tessuti umani [Geens *et al.*, 2012b] ha mostrato come questa sostanza, rilevata in quasi tutti i tessuti, si concentra maggiormente in quello adiposo (in media pari a 3,78 ng/g), seguito da fegato (1.48 ng/g) e cervello (0.91 ng/g).

Una volta bioaccumulato, il BPA può essere successivamente rilasciato in particolari condizioni fisiologiche dell'organismo, ad esempio nel corso della gravidanza e durante l'allattamento (attraversamento della placenta, rilascio nel latte materno), determinando un flusso di esposizione madre-figlio. Studi di biomonitoraggio di BPA nel latte materno, rilevato mediante analisi HPLC, indicano la sua presenza in quest'alimento [Ye *et al.*, 2008], da sempre raccomandato per il neonato per l'eccezionale contenuto nutritivo; i risultati di un secondo studio [Ye *et al.*, 2008] indicano come il BPA risulti presente in più del 60% dei campioni di latte materno testati.

Negli ultimi anni c'è stata una crescente preoccupazione per gli impatti potenziali di esposizione al BPA sul sistema endocrino. Gli interferenti endocrini, indicati dalla Commissione Europea e altri

organismi internazionali col nome “*Endocrine Disrupting Chemicals*” o EDC, sono una classe eterogenea di contaminanti emergenti. Un interferente endocrino è una sostanza esogena, o una miscela, che altera la funzionalità del sistema endocrino, causando effetti avversi sulla salute di un organismo, oppure della sua progenie o di una (sotto) popolazione [European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife, Weybridge 2-4/12/1996].

Studi scientifici indicano come il BPA si comporti da xenoestrogeno, ovvero una molecola che mima l'attività degli estrogeni endogeni. In particolare, il BPA è in grado di legare e attivare il recettore umano degli estrogeni, allo stesso modo dell'17- β -estradiolo, sebbene con una capacità 1000-5000 volte inferiore rispetto all'ormone endogeno. Il BPA, sembra inoltre responsabile d'interazioni con diversi recettori oltre a quelli ormonali, tra cui quelli degli ormoni tiroidei e il recettore γ di attivazione dei proliferatori perossisomali [Geens *et al.*, 2012a], dimostrando quindi un'eterogeneità d'interazione biologica. Probabilmente ciò favorisce l'implicazione del BPA in diverse patologie, come il cancro al seno [Goodson *et al.*, 2011], malattie cardiovascolari e neurocomportamentali [Matsuda *et al.*, 2012; Wolstenholme *et al.*, 2012] e disfunzioni metaboliche come il diabete e l'obesità [Trasande *et al.*, 2012]. Infine, esso è stato classificato come sostanza tossica per la riproduzione, ossia come probabile riduttore della fertilità [Geens *et al.*, 2012a]. Tuttavia numerosi punti restano ancora da chiarire ed è necessaria una maggior conoscenza dell'intero spettro di patologie potenzialmente associabili a questo contaminante.

Di particolare interesse è l'impatto che il BPA può avere sullo sviluppo del bambino. Molti studi hanno cercato di valutare i suoi effetti a basse dosi, ma nessuno ha ancora prodotto risultati certi e inequivocabili. Inoltre la maggior parte di questi si concentra sulla sua attività estrogenica, trascurando altri possibili meccanismi d'azione sulla cellula. Le incertezze sui risultati ottenuti hanno portato l'EFSA (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare) nel 2006 a rivedere e rialzare di ben cinque volte la dose giornaliera tollerabile (TDI) rispetto al valore del 2002, fissandola in 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di peso corporeo/giorno. Nel settembre 2010 si è nuovamente pronunciata sull'argomento, ma soltanto per ribadire il parere espresso nel 2006 (e riconfermato nel 2008). Il 28 gennaio 2011 la Commissione europea ha adottato la direttiva 2011/8/UE ha modificato il "principio di precauzione" adottato nel 2002 dal Parlamento europeo, vietando la produzione di materie plastiche a base di BPA per la fabbricazione di oggetti e articoli per l'infanzia, in particolare dei biberon, e destinate a venire a contatto con prodotti alimentari per bambini di età compresa fra zero e tre anni.

Nel gennaio 2015 è stato pubblicato il nuovo parere dell'EFSA sul BPA: l'esposizione è stata valutata in modo aggregato considerando sia la dieta (rilascio da materiali a contatto con alimenti) sia le fonti non alimentari (polvere, cosmetici e carta termica). Nuovi dati e metodologie di valutazione hanno

portato a ridurre di un fattore 10 la dose giornaliera tollerabile (TDI), da 50 µg/kg peso corporeo/giorno a 4 µg/kg peso corporeo/giorno. Le incertezze circa i potenziali effetti del BPA sulla ghiandola mammaria, la riproduzione, il metabolismo, lo sviluppo neurocomportamentale e il sistema immunitario sono stati caratterizzati e considerate nel calcolo della TDI. Inoltre, la TDI è temporanea in attesa dei risultati di uno studio a lungo termine sul ratto, tuttora in corso. EFSA ha concluso che i più alti livelli stimati di esposizione umana sono comunque da tre a cinque volte inferiori alla nuova TDI; quindi, dopo il divieto dei biberon contenenti BPA, i livelli di esposizione attuali non pongono alcun rischio per la salute dei consumatori. Le raccomandazioni per ulteriori approfondimenti includono, tra le altre, la tossicocinetica nell'essere umano, gli effetti sulle reni e sulla ghiandola mammaria, l'assorbimento e l'esposizione attraverso la cute, nonché i potenziali residui nelle carni e nel pesce.

I pericoli connessi all'esposizione al BPA hanno indotto le industrie produttrici di *commodities* e *specialities* in plastica, alla ricerca di materiali con caratteristiche chimiche e strutturali analoghe a quelle del BPA e al tempo stesso prive di rischi per la salute, almeno secondo quanto riportato dalla normativa vigente. Molti analoghi bisfenolo possono essere ottenuti per reazioni di condensazione di un chetone o aldeide con fenoli sia con variazioni nel derivato carbonilico sia nei sostituenti sull'anello aromatico. Anche se un gran numero di composti può essere ottenuta per questa via, molti sono troppo costosi per applicazioni a livello industriale: dei circa 30000 composti con subunità OH-CH₂-Ar-Ar-OH, circa 1000 sono disponibili in commercio [Geens *et al.*, 2012a].

Un esempio di materiale sostitutivo del BPA è quello del Bisfenolo B o 2,2-bis(4-idrossifenil)butano (BPB) (Fig. 4), un composto organico strutturalmente analogo al BPA utilizzato dalle industrie come agente plastificante, che si è dimostrato essere un contaminante alimentare al pari del BPA [Grumetto *et al.*, 2008].

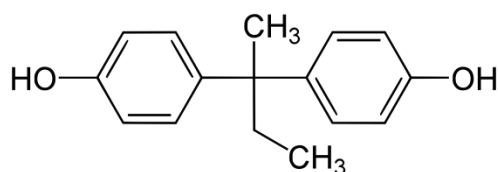


Fig. 4. Molecola di BPB.

Inoltre alcuni studi scientifici hanno fornito prove che il BPB mostra effetti simili sull'organismo esposto, a quelli promossi dal BPA. Uno studio ha saggiato l'attività del BPB e del BPA sulla frazione epatica S9 di ratto, dimostrando l'effetto estrogenico di entrambe le molecole [Yoshihara *et al.*, 2004]. Inoltre, uno studio atto a rilevare le proprietà estrogeniche del BPB e del BPA sulla linea umana di cellule tumorali del seno (MCF-7) ha indicato che il BPB mostra un effetto estrogenico più potente del

BPA [Kitamura *et al.*, 2005). Infine, il profilo HPLC dei metaboliti di BPB è simile a quello dei metaboliti del BPA, il che potrebbe indicare lo stesso tipo di attivazione metabolica [Yoshihara *et al.*, 2001].

Di conseguenza, i dati scientifici disponibili sembrano indicare che il BPA e il BPB potrebbero avere simili meccanismi di azione e che il BPB non ha effetti endocrini inferiori al BPA. Pertanto, considerando il divieto emanato dalla Comunità Europea, relativo all'impiego del BPA per la fabbricazione di *baby products*, la generale mancanza di dati scientifici su derivati del BPA e la correlazione chimico-strutturale del BPA e del BPB, è fondamentale la valutazione del potenziale tossico dei composti correlati al BPA, tuttora impiegati nella produzione di oggetti commerciali (tra cui i *baby products*) e per i quali la normativa vigente non prevede ancora restrizioni.

1.1.2 Pesticidi: erbicida diuron e conservanti del legno

Nel 1962 venne pubblicato un libro fondamentale per la nascita del movimento ambientalista nonché uno tra i più autorevoli del ventesimo secolo. La scrittrice si chiamava Rachel Carson e il titolo, “Primavera silenziosa”, denunciava la pericolosità derivante dall’uso spropositato di pesticidi ed insetticidi (DDT) per l’ambiente e le possibili ripercussioni sulla catena alimentare.

La Carson per prima si è concentrata sulle connessioni ambientali: le sostanze esogene, come i pesticidi, si distribuiscono nel suolo nell’acqua o nell’aria. Il suo intento era quello di incoraggiare un uso più attento e consapevole dell’impatto ecosistemico di certe sostanze forse troppo frettolosamente utilizzate in modo così diffuso e così poco conosciute. Dieci anni dopo la pubblicazione, il DDT venne vietato per l’uso agricolo negli USA e nel 1978 anche in Italia (pur restando ancora in circolazione attraverso la catena alimentare e utilizzato in modeste quantità come insetticida nelle regioni in cui la malaria assume un carattere endemico).

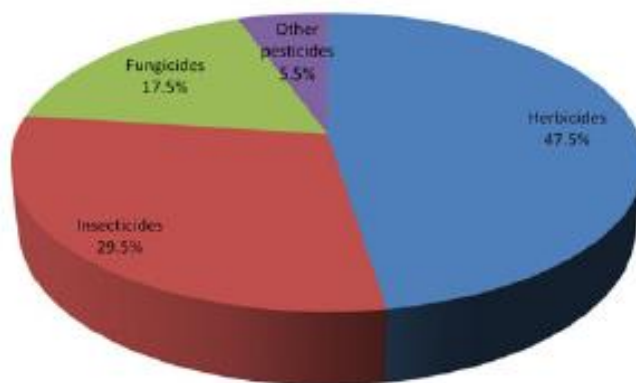


Fig. 5. Consumo mondiale di pesticidi (tratto da De *et al.*, 2014).

I pesticidi sono definiti come qualsiasi sostanza o miscela di sostanze destinata a prevenire, distruggere, respingere o attenuare ogni parassita [FAO, U. 2002]. Gli esempi di pesticidi includono erbicidi, insetticidi, rodenticidi, fungicidi, fumiganti e prodotti per il trattamento del legno [Thundiyil, *et al.*, 2008].

Il consumo mondiale di pesticidi (Fig. 5) è di circa due milioni di tonnellate all'anno (45% viene utilizzato solo in Europa) [Meffe & de Bustamante, 2014; De *et al.*, 2014]. La prima *review* fatta in Italia sulla presenza di 161 composti organici emergenti (acronimo inglese EOCs inclusi pesticidi, prodotti farmaceutici, industriali, estrogeni e stupefacenti) nelle acque superficiali e sotterranee riporta la presenza di 137 pesticidi in entrambi i compartimenti ambientali analizzati in concentrazioni fino a $4,78 \times 10^5$ ng / L). [Meffe & de Bustamante, 2014] tra cui l'erbicida fenilureico diuron (nome commerciale del 3-(3,4-dichlorofenil)-1,1-dimetilurea o DCMU) (Fig. 6).

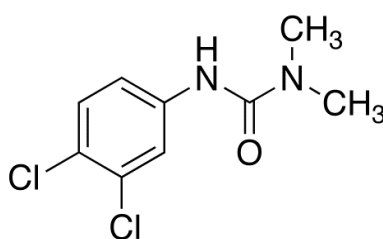


Fig. 6. Molecola di diuron.

Questo dato non stupisce dal momento che il diuron è tra gli erbicidi più utilizzati in Italia [Carracciolo *et al.*, 2005], previa autorizzazione da parte del Ministero della Sanità italiano alla importo non superiore a 0,5 kg / ha [Decreto 26 febbraio 2009].

Il diuron è un composto appartenente al gruppo dei composti dell'urea registrato come erbicida pre-emergenza (utilizzato cioè all'inizio della primavera, prima che le piante crescano) e post-emergenza (utilizzato una volta che la fase iniziale della stagione primaverile iniziale quando le piante hanno

cominciato a crescere) selettivo per dicotiledoni e alcune erbe annuali, che può essere utilizzato da solo o in combinazione con altri erbicidi. Il diuron può essere impiegato per il controllo delle erbe infestanti nelle aree industriali, intorno ai fabbricati agricoli ed ai canali di irrigazione e drenaggio; il suo utilizzo è esteso anche a diverse colture es. di soia, cotone, agrumi, canna da zucchero, erba medica, grano, uva, ananas, cacao e caffè. Inoltre può essere utilizzato come fungicida su uve/vigneti e come alghicida nelle produzioni ittiche commerciali [Da Rocha *et al.*, 2012].

Considerando il vasto impiego di questo erbicida diversi studi relativi il suo destino e comportamento ambientale sono stati condotti, per valutare la trasformazione e distribuzione del diuron nei diversi comparti ambientali (suolo, acque sotterranee, acque superficiali e sedimento, aria), considerando l'intervento, ad esempio, di fenomeni di fotolisi e degradazione nel suolo ed in acqua. Tali risultati mostrano come il diuron sia relativamente stabile (degradazione nel suolo molto lenta) e non sensibile alla luce [Liu *et al.*, 2010].

Persistence categories	Time required for 50% of the applied pesticide to degrade at or near the soil surface (half-life)	Examples of pesticide classes (there are several exceptions in each class)
Low persistence	Less than 30 days	Carbamate and organophosphate herbicides
Moderate persistence	30–100 days	Triazine, urea, amide, and phenoxy herbicides
High persistence	Greater than 100 days	Chlorinated hydrocarbon insecticides

Fig. 7. Persistenza di pesticidi nel suolo (tratta da Kamrin, M. A. , 2010).

A causa della sua moderata persistenza (Fig. 7), la contaminazione ambientale da diuron rappresenta un importante problema di salute pubblica, in particolare per la potenziale contaminazione degli alimenti che potrebbe derivarne e i possibili effetti negativi sulla salute del consumatore. Oltre al principale meccanismo d'azione, ossia l'inibizione della fotosintesi attraverso il blocco della catena di trasporto elettronico dei tilacoidi [Van Rensen 1989] e l'inibizione della sintesi di ATP [Estève *et al.*, 2009], in letteratura sono riportati effetti teratogeni sul ratto [Fernandes *et al.*, 2012) e di interferenza endocrina [McKinlay *et al.*, 2008]. Inoltre il diuron mostra un effetto inibitorio sulla respirazione di *S. cerevisiae* [Convent & Briquet, 1978; Convent *et al.*, 1978; Giessler *et al.*, 1994; Meunier & Colson, 1989]. In particolare questo erbicida è in grado di bloccare il trasporto di elettroni tra il citocromo b e c1 (Complesso III) della catena di trasporto mitocondriale, incluso un effetto di 'extrariduzione' del citocromo b566 [Convent & Briquet, 1978].

Oltre agli erbicidi un'altra importante classe di pesticidi è quella dei conservanti del legno; si tratta di formulazioni organiche e /o inorganiche applicate come rivestimento per proteggere strutture in legno

contro il bio-decadimento (conseguenza dell'attacco di funghi, batteri ed insetti), estendendo la durata e la vita del legno stesso. Una delle formulazioni inorganiche di conservanti del legno più usate al mondo (sin dagli anni '40) è l'arseniato di rame cromato (acronimo inglese **CCA**) conosciuto con diversi marchi commerciali mondiali come ad esempio "Tanalith".

I legni trattati con CCA vengono impiegati come materiali da costruzione, ad esempio, per la realizzazione di pali e graticci dei vigneti, attrezzature per parco giochi, banchine, ponti, recinzioni e paratie. Sebbene il trattamento con questi conservanti causi la fissazione delle componenti alle fibre del legno, diversi studi hanno evidenziato come l'esposizione agli agenti atmosferici dei legni trattati con CCA possa causare la lisciviazione degli elementi cromo (Cr), rame (Cu) ed arsenico (As), in particolare in condizioni di elevata salinità, pH acidi ed elevate temperature [Hingston *et al.*, 2001]; la lisciviazione può provocare la contaminazione del suolo / sedimenti, di acque superficiali e sotterranee [Balasoiu *et al.*, 2001; Bhattacharya *et al.*, 2002; Wang, & Mulligan, 2006]; c'è inoltre da considerare la pericolosità dei legni trattati smaltiti per incenerimento [Solo-Gabriele & Townsend, 1999].

A causa dell'elevata tossicità degli elementi Cr, Cu e As contenuti nella formulazione del CCA [Vodyanitskii, 2013] a partire dagli anni '90 sono state adottate una serie di restrizioni all'uso residenziale di legni trattati con CCA in Europa, zone dell'Asia e in Nord America, dove del CCA è ora consentito solo per applicazioni industriali ed agricole [Shultz *et al.*, 2007]. Riguardo queste ultime, l'utilizzo di conservanti del legno per i pali e i graticci dei vigneti può rappresentare una potenziale fonte di contaminazione del prodotto vino [Christ & Burritt, 2013; Lansbury & Beder, 2005].

Tab. 1. Composizione percentuale dei tre tipi di conservanti CCA per il legno.

Tipo	CuO (%)	CrO ₃ (%)	As ₂ O ₅ (%)
CCA-A	18.1	65.5	16.4
CCA-B	19.6	35.3	45.1
CCA-C	18.5	47.5	34.0

Nonostante l'introduzione di restrizioni, il CCA di tipo C (la formulazione commercialmente più popolare) [AWPA, 1999], è ancora ampiamente utilizzato in tutta l'Africa per la protezione di legni impiegati per pali e traversine ferroviarie. Inoltre il legno trattato con questo conservante viene utilizzato come combustibile nelle aree urbane povere africane [Niyobuhungiro *et al.*, 2013], diventando così una pericolosa fonte di inquinamento ambientale ed un rischio per la popolazione locale [Dalvie *et al.*, 2014; Ramudzuli & Horn, 2014]. Gli animali possono assorbire l'arsenico e il cromo da diverse fonti (incluso il suolo) e gli esseri umani per inalazione, oppure attraverso l'acqua e il cibo. Ad esempio il riso è una delle colture di base note per il suo elevato potenziale di accumulo di

arsenico [Abedin *et al.*, 2002; Peralta-Videa *et al.*, 2009]. Riguardo gli effetti nocivi causati dai tre componenti del CCA (arsenico, cromo e rame), oltre ai potenziali effetti diabetogeni per esposizione all' arsenico [Navas-Acien, *et al.*, 2008; Rahman *et al.*, 1998], tutti e tre gli elementi mostrano effetti cancerogeni [Smith *et al.*, 1992; Theophanides & Anastassopoulou, 2002; Chen *et al.*, 1992; Zhitkovich, 2011], e di interferenza endocrina [Watson & Yager, 2007; Davey *et al.*, 2007; Davey *et al.*, 2008; Borgs & Mallard, 1998 Handy, 2003].

Riguardo gli effetti mitocondriali e sul catabolismo aerobio, l' arsenico sembra interferire nella fosforilazione ossidativa (diminuzione della formazione *in vitro* di ATP) [Hughes, 2002] ed inibire la catena di trasporto elettronico [Chen *et al.*, 2007] così come il cromo [Dixit *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004]. Riguardo il rame, i mitocondri sembrano essere un importante bersaglio dello ione Cu^{2+} , in grado di aumentare la produzione delle ROS e la perossidazione lipidica [Gaetke & Chow, 2003; Hosseini *et al.*, 2014].

La pericolosità degli elementi contenuti nel CCA ha spinto negli anni alla produzione ed l'introduzione sul mercato di nuove formulazioni di conservanti per il legno [Shultz *et al.*, 2007] contenenti il rame quale ingrediente attivo primario ed, in sostituzione del cromo e dell' arsenico, biocidi inorganici od organici. Tra i conservanti alternativi al CCA maggiormente impiegati troviamo l' **ACQ** (acronimo inglese di *Alkaline Copper Quaternary*), i cui ingredienti attivi di base sono l'ossido di rame (67%) e composti di ammonio quaternario (33%) che agiscono da co-biocidi contro funghi ed insetti [Lebow, 2004]. Un altro conservante del legno utilizzato con successo è il **Wolmanit CX-10** privo di Cr e contenete rame, rame-HDO (rame chelato con diossido di N-cicloesil-diazonio) e composti di boro e il **Tanalith E**, un conservante a base di l'azolo di rame commercializzato con il marchio "Tanalith" in tutta Europa e in altri mercati internazionali, che è entrato in largo uso in Canada, Stati Uniti, Giappone ed Australia [Lebow, 2004]. Riguardo le potenziali problematiche ambientali e sanitarie legate all'uso di tali formulazioni prive di As e Cr, finora sono stati condotti solo pochi studi relativi ai fenomeni di lisciviazione ed al loro potenziale impatto ambientale ed ecosistemico [Kennedy, 2004; Velleux *et al.*, 2012].

1.1.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Una valutazione tossicologica ha come obiettivo quello di individuare possibili rischi per la salute dell'uomo e dell'ambiente derivanti dalla esposizione ad uno o più agenti potenzialmente tossici. Questa indagine viene effettuata attraverso una serie di studi, sia sperimentali (*in vitro*, *in vivo*) che epidemiologici (su una popolazione umana comunque esposta alla sostanza). Uno studio tossicologico sperimentale *in vitro* come quello descritto in questa tesi viene utilizzato in una fase iniziale, a livello

di *screening*, verso sostanze di attività ignota con diversi scopi tra cui identificare i meccanismi di azione, gli enzimi coinvolti nel metabolismo e mirare la strategia sperimentale di eventuali studi in vivo. Comunque i saggi di citotossicità *in vitro* sono una componente importante di ogni batteria di test tossicologici.

Diversi modi possono essere impiegati per saggiare la tossicità di una sostanza nei confronti di un determinato organismo. Una volta la maggior parte dei test di tossicità misurava il numero di organismi uccisi da una determinata dose o concentrazione. Più recentemente c'è stata una tendenza a misurare anche altri effetti, quali la riduzione del numero di uova deposte o di giovani nati, la diminuzione della crescita corporea e il malfunzionamento di alcuni processi fisiologici (respirazione o sintesi di enzimi). I test *in vivo* condotti sugli animali superiori richiedono però tempi di osservazione e costi maggiori e il loro utilizzo solleva una serie di questioni etiche anche se sostituire completamente i test sugli animali superiori non è possibile. I test *in vivo* vengono solitamente effettuati in una fase successiva, per verificare i risultati positivi ottenuti *in vitro*: la risposta (derivante dall'esposizione a una data sostanza) di un organismo complesso, con i suoi tessuti ed organi integrati fra loro, è certamente più vicina (con le dovute precauzioni), sul piano fisiologico, a quella umana. Inoltre sono comunque possibili discrepanze come ad esempio risultati positivi *in vitro* e negativi *in vivo* che devono portare a riconsiderare ad esempio la rilevanza/natura degli *endpoints* (valori derivati da test di tossicità che sono il risultato di misure specifiche effettuate durante o a conclusione del test) studiati, così come la possibile implicazione di meccanismi attivi solo *in vitro*.

A parte questo, con le tecniche *in vitro* (utilizzo di colture cellulari o tissutali, cellule isolate, porzioni di tessuto, frazioni subcellulari, colture di cellule transgeniche) in aggiunta all'utilizzo di software con database che associano struttura e attività tossicologica (studi *in silico*), si può giungere all'elaborazione di modelli in grado di predire il profilo tossicologico di nuovi prodotti chimici, permettendo una riduzione del numero d'animali impiegati negli esperimenti di laboratorio.

Con l'utilizzo di organismi semplici, dotati di un ciclo vitale relativamente breve, è possibile ridurre notevolmente i tempi di analisi, in modo da poter conoscere in tempo reale, il livello di tossicità di un campione.

La possibilità e l'importanza di usare un organismo modello cellulare per caratterizzare i complicati processi che avvengono nelle cellule degli eucarioti superiori può essere riassunta dall'aforisma di Albert Kluyver del 1926: "Dall'elefante al batterio produttore dell'acido butirrico - è lo stesso!" o dalla più nota e aggiornata versione di Jacob e Monod del 1954: "quello che è vero per *E. coli* è quasi sicuramente vero anche per un elefante" [Friedmann, 2004].

Saccharomyces cerevisiae è considerato un organismo modello in genetica e biologia molecolare. Oltre all'utilizzo millenario da parte dell'uomo nel processo di panificazione nonché nella produzione di bevande quali birra e vino [Legras *et al.*, 2007], questo fungo unicellulare è stato protagonista, suo malgrado, di passaggi fondamentali nella storia della biologia. Le osservazioni di Schwann, che nel 1836 scoprì la sua natura organica, proponendo questo “vegetale microscopico” quale agente di fermentazione ebbero una certa influenza sia sulla teoria germinale di Pasteur che sulla tecnica antisettica di Lister. Il termine stesso “enzima”, utilizzato per la prima volta nel 1878 da Kühne, significa “all'interno del lievito” proprio perché si riteneva che potessero trovarsi solo all'interno delle cellule. L'esperimento fondamentale effettuato nel 1897 da Buchner, che può essere considerato come l'inizio della biochimica moderna, era basato sulla dimostrazione che in presenza di un estratto di lievito privo di cellule, si otteneva comunque la fermentazione alcolica [Buchner, 1997]. Nel 1996 è stato il primo eucariota di cui sia stato interamente sequenziato il genoma [Goffeau *et al.*, 1996].

Le cellule di *S. cerevisiae* sono generalmente di forma ellissoidale (da 5 a 10 μm per il diametro maggiore e 1-7 μm per quello minore). Nella Fig. 7a è possibile distinguere le diverse strutture subcellulari. Ovviamente le cellule di lievito condividono la maggior parte delle caratteristiche strutturali e funzionali degli eucarioti superiori. A differenza di cellule di mammifero, le principali peculiarità sono la presenza di una parete cellulare rigida e il vacuolo, corrispondente ai lisosomi degli eucarioti pluricellulari.

In *S. cerevisiae*, l'insieme della parete, spazio periplasmico e membrana comprende c.a. il 15% del volume totale cellulare, con il ruolo principale di controllo delle proprietà osmotiche e di permeabilità della cellula.

Sebbene presenti una complessità genetica maggiore di quella dei batteri, *Saccharomyces cerevisiae* condivide con quest'ultimo molti vantaggi tecnici che hanno consentito il suo impiego nel campo della genetica classica e della genetica molecolare. Possiede infatti un tempo di generazione breve (tempo di duplicazione cellulare c.ca 90 - 140 min a 30°C, a seconda del mezzo di coltura) che permette una semplice ed economica coltivazione in laboratorio. Nonostante la loro semplicità, le cellule di *S. cerevisiae* hanno le stesse caratteristiche generali di eucarioti multicellulari, con forti omologie dal punto di vista sia genetico che proteomico.

Queste caratteristiche generali di *Saccharomyces cerevisiae* lo rendono particolarmente adatto per studi tossicologici e quale elemento biologico di riconoscimento per dispositivi biosensoristici [Baronian, 2004; Campanella *et al.*, 1995; Campanella *et al.*, 1997; Dragone *et al.*, 2014; Dragone *et al.*, 2014; Frazzoli *et al.*, 2007; Haubenstricker *et al.*, 1990; Välimaa *et al.*, 2008; Walmsley & Keenan, P., 2000].

Le cellule di lievito contengono mitocondri che strutturalmente ricordano la controparte mammifera. Sono organelli complessi con una doppia membrana (interna ed esterna), un proprio genoma e apparato di sintesi proteica (Fig. 8)

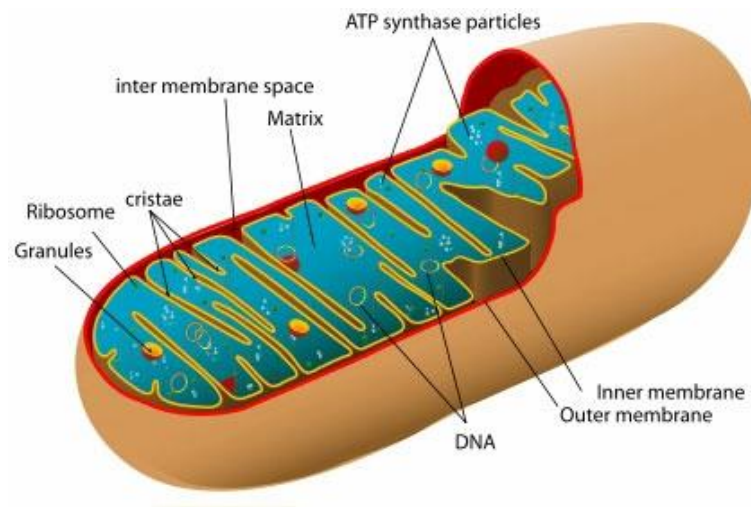


Fig. 8. Struttura schematica del mitocondrio.

Le due membrane presentano differenti proprietà a causa della loro diversa composizione. La *membrana esterna* è caratterizzata da un elevato rapporto lipidi/proteine [Zinser *et al.*, 1991] ed è liberamente permeabile a molecole con peso molecolare fino a 1 kDa (grazie alla presenza di porine).

Lo *spazio intermembrana* delimitato dalle due strutture presenta una composizione di soluti molto simile a quella del citosol.

La *membrana interna* appare ripiegata in una serie di invaginazioni verso lo spazio interno (*matrice*) dette *cristae*; è molto ricca di proteine e costituisce una barriera di permeabilità: la presenza di cardiolipina (responsabile della forte impermeabilità ai protoni) [Haines & Dencher, 2002] e di specifici sistemi di trasporto impedisce alla maggior parte delle molecole e ioni di attraversarla liberamente. Contiene i complessi proteici della catena di trasporto elettronica e l'ATP sintasi (verosimilmente il complesso ripiegamento della membrana aumenta l'area a disposizione di tali complessi). L'impermeabilità permette la generazione del gradiente elettrochimico che fornisce la forza motrice protonica per la produzione di ATP.

Nella *matrice* sono contenuti molti enzimi del metabolismo energetico (inclusi quelli del ciclo di Krebs).

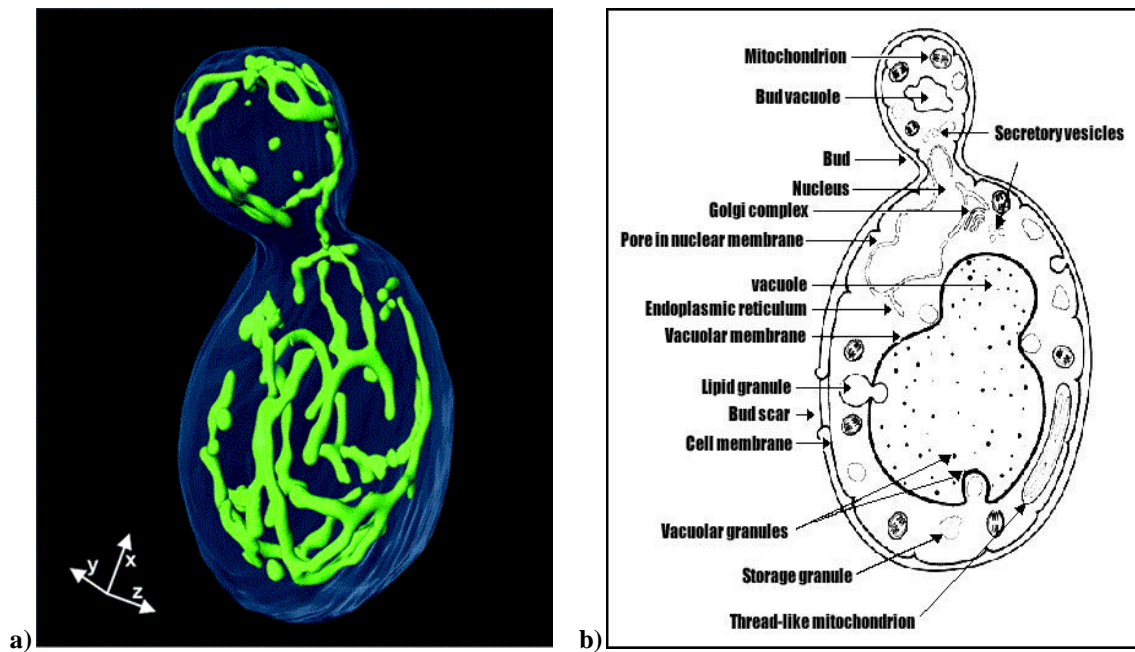


Fig. 9. a) Rete mitocondriale ramificata in una cellula di *S. cerevisiae* evidenziata con una tecnica a fluorescenza (Ansgar Santel, Stanford University, CA) b) Rappresentazione schematica di una cellula di *S. cerevisiae*.

Solitamente nei libri di testo vengono raffigurati come strutture statiche, di forma cilindrica (Fig. 8) e distribuite nel citosol. Tuttavia nelle cellule di *S. cerevisiae* (e in quelle degli eucarioti multicellulari) i mitocondri costituiscono una rete tubulare ramificata [Shaw & Nunnari, 2002] (Fig. 9b) che cambia forma e dimensione, modellata da eventi di fissione e fusione regolati da diversi eventi biochimici e cellulari [Okamoto & Shaw, 2005; Escobar-Henriques & Langer, 2006] (Fig. 10) e dipendenti da cambiamenti del ciclo vitale e lo status nutrizionale e fisiologico a cui è sottoposto la cellula [Hoffmann & Avers, 1973; Stevens, 1977; Stevens, 1981].

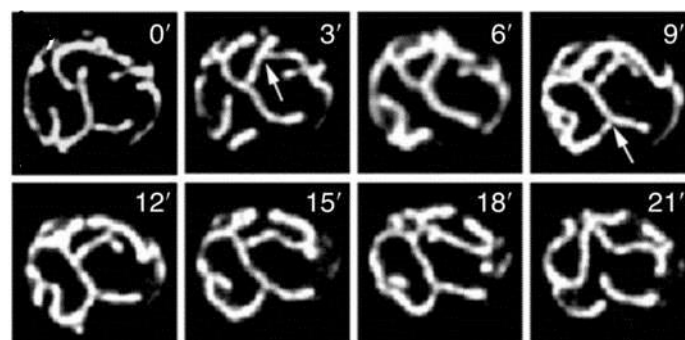


Fig. 10. Immagini tridimensionali ottenute tramite microscopia a fluorescenza che mostrano i cambiamenti nel tempo (21 minuti) di forma della rete tubulare mitocondriale di cellule di *S. cerevisiae* in fase logaritmica di crescita (modificata da Shaw & Nunnari, 2002).

In condizioni aerobiche, quando sono coinvolti nella sintesi di ATP accoppiata alla fosforilazione ossidativa, si allargano, si allungano e si collocano alla periferia della cellula; questa disposizione forse permette loro di situarsi vicino al punto d'ingresso dell'ossigeno e la struttura allungata si pensa faciliti un rapida distribuzione dell'ATP attraverso la cellula.

Oltre alla produzione di ATP accoppiata alla fosforilazione ossidativa (ultima fase della respirazione cellulare), i mitocondri svolgono in tutti gli organismi eucarioti un ruolo centrale nella cellula e sono coinvolti in processi cellulari importanti quali:

- Omeostasi del calcio;
- Sintesi e desaturazione degli acidi grassi e lipidi (cardiolipina);
- Biosintesi dell'ergosterolo (in *S. cerevisiae*);
- Risposte adattative a stress (inclusa la regolazione dello stato redox della cellula);
- Sintesi di biomolecole (amminoacidi, acidi dicarbossilici, basi azotate, ecc.);
- Mobilizzazione del glicogeno;
- Apoptosi.

Molte disfunzioni mitocondriali (correlate inoltre all'alterazione dello stato redox cellulare e del metabolismo) sono coinvolte in processi come l'invecchiamento, l'insorgenza di malattie neurodegenerative e la cancerogenesi [Apte & Sarangarajan, 2008; Lin & Beal, 2006]. Appare quindi evidente come indagini condotte impiegando organismi modello siano fondamentali per una migliore comprensione dei potenziali meccanismi d'azione di molecole in grado di interferire con le attività mitocondriali.

Una caratteristica peculiare che distingue le cellule di *S. cerevisiae* (e le cellule vegetali) dagli altri eucarioti è la presenza di una parete cellulare, una struttura di rivestimento specializzata che circonda la membrana citoplasmatica. In *S. cerevisiae* la parete cellulare (Fig. 11) è una struttura elastica (spessore 70 - 100 nm) costituita da una rete di catene di β 1,6 e β 1,3 glucani (55% - 65%) intimamente associate con chitina (1% - 2%) e mannoproteine (35% - 40%) [Klis *et al.*, 2002].

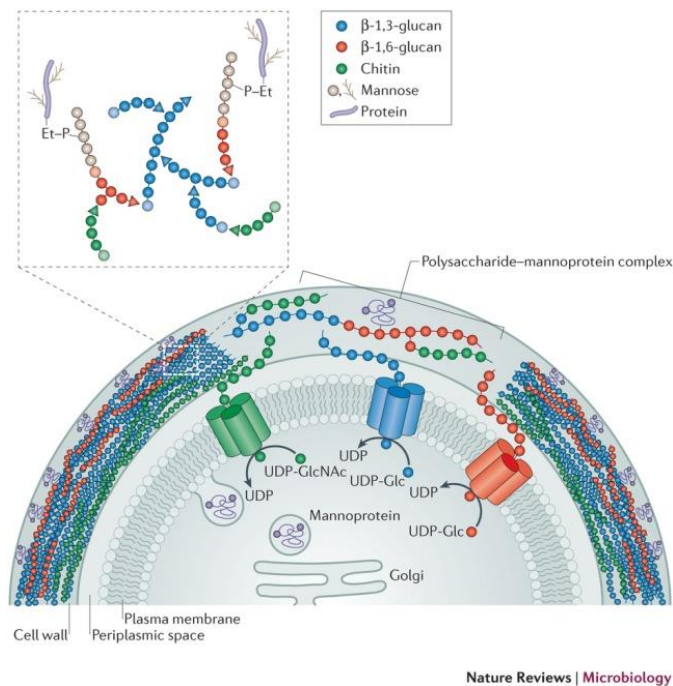


Fig. 11. Struttura della parete cellulare di *S. cerevisiae*.

La parete cellulare ha quattro funzioni principali [Klis *et al.*, 2006]:

1. Mantenimento dell'omeostasi osmotica attraverso la limitazione del flusso di molecole d'acqua verso l'interno della cellula (legato alla differenza di osmolarità tra il citosol e l'esterno) che causerebbe un eccessivo rigonfiamento della cellula sino alla lisi cellulare;
2. Protezione contro stress fisici (es. danni meccanici), grazie alle proprietà di robustezza ed elasticità;
3. Mantenimento della forma cellulare (condizione essenziale per la morfogenesi)
4. Costituzione di un'impalcatura per lo strato glicoproteico esterno, in grado di limitare la permeabilità e la porosità della parete cellulare a macromolecole e contribuendo probabilmente alla ritenzione di acqua.

Tuttavia le cellule, tramite digestione enzimatica, possono essere parzialmente o completamente private della parete cellulare per ottenere rispettivamente sferoplasti oppure protoplasti. La digestione della parete cellulare è necessaria all'interno di molte procedure sperimentali come ad esempio l'immunofluorescenza [Eitzman *et al.*, 1989] e la purificazione di proteine; inoltre l'assenza di questa struttura permette, in particolari condizioni, la fusione dei protoplasti per il trasferimento di materiale genetico, ad esempio allo scopo di creare di nuovi ceppi di lievito caratterizzati da un migliore potenziale biotecnologico [Curran & Bugeja, 1996].

Uno degli enzimi solitamente utilizzati per la digestione enzimatica della parete cellulare è la zymolyase. Si tratta in realtà di una miscela enzimatica ricavata dal batterio Gram positivo *Arthrobacter luteus*, le cui attività enzimatiche principali sono β -1,3 glucanasica e β -1,3-glucano

laminaripentao-idrolasica: la zymolyase è dunque in grado di idrolizzare delle catene di glucani β 1,3, rilasciando laminaripentaose (pentamero) come prodotto principale (Fig. 12a). Sono inoltre presenti in piccole quantità anche proteasi e mannasi che agiscono rispettivamente sulle glicoproteine e i mannani.

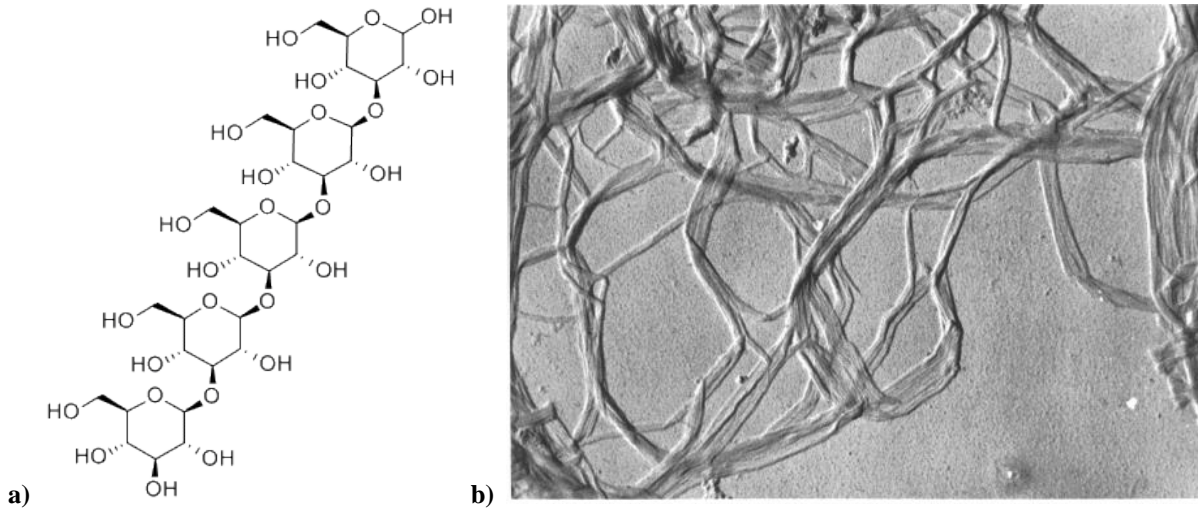


Fig. 12. a) Molecola di laminopentaose b) network fibrillare residuo presente sulla superficie di sferoplasti di *S. cerevisiae* (tratta da Necas, 1971).

1.1.4 Biosensori amperometrici

Un biosensore è “*un dispositivo analitico autonomo quantitativo o semi-quantitativo, in grado di fornire informazioni analitiche quantitative o semi-quantitative tramite un elemento biologico di riconoscimento o integrato all’interno o intimamente associato ad un trasduttore chimico fisico*” [Wilson *et al.*, 1999]. Concettualmente il funzionamento di un biosensore si basa sulla conversione di una risposta biologica in un segnale quantificabile: quando la specie chimica d’interesse interagisce con la componente biologica sensibile viene prodotto un segnale, poi convertito a livello di un opportuno trasduttore (a diretto contatto con il mediatore biologico) in un secondo segnale (elettrico) che è funzione della concentrazione della sostanza d’interesse. Questo viene poi processato, amplificato e elaborato graficamente al computer. Un biosensore può essere più o meno specifico per un particolare analita, oppure progettato per essere classe specifico; la scelta del trasduttore (rilevatore, sensore o elettrodo) viene fatta in base alla natura del segnale e alla reazione biologica che lo genera.

Diverse classificazioni sono state proposte e vengono attualmente utilizzate, tra queste :

1. in base al sistema biologico

- biocatalitici (es. ad enzima o cellule intere)
- affinità selettiva di legame (es. ad anticorpi o acidi nucleici)

2. in base al trasduttore

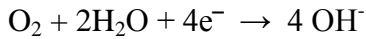
- sensori elettrochimici (es. amperometrici o potenziometrici)
- sensori ottici (es. luminescenza o fluorescenza)

Tra i vari tipi di biosensori, quelli elettrochimici sono la classe più diffusa, con numerosi esempi di dispositivi commercializzati con successo. I biosensori amperometrici sono biosensori elettrochimici che rivelano l'intensità di corrente che passa tra un elettrodo di riferimento e uno di lavoro. I due elettrodi e la soluzione in cui sono immersi costituiscono una cella elettrochimica. Normalmente tra i due elettrodi del trasduttore (uno di misura e l'altro di riferimento) immersi nella stessa soluzione passa una corrente costante (fondo); ma se in soluzione avviene una reazione tale da produrre/consumare (a quel potenziale applicato) molecole elettroattive, si produrrà una variazione di corrente che verrà quindi registrata. Questa variazione di corrente, se si opera in condizioni polarografiche (corrente di diffusione limite), è linearmente correlata alla variazione della concentrazione della specie che si sta misurando.

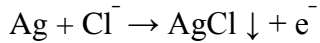
In questo lavoro di tesi per la biosonda a cellule di *S. cerevisiae* è stato usato quale trasduttore un sensore tipo elettrodo di Clark, uno dei sensori elettrochimici più utilizzati per la misura dell'O₂ nei dispositivi biosensoristici. L'elettrodo (o sensore) di Clark (ossimetro) è costituito da due elettrodi (Fig. 13): uno di misura (catodo) e uno di riferimento (anodo) a potenziale costante (es. Ag/AgCl/Cl⁻) immersi in una opportuna soluzione elettrolitica; durante la misura viene mantenuta una ddp di -650/-750 mV (necessaria per la riduzione dell'O₂) tra gli elettrodi. Il contatto con l'esterno è assicurato da una sottile membrana in Teflon organica (spessore ~10 μm) permeabile all'O₂: l'ossigeno diffonde attraverso la membrana ed è ridotto elettrochimicamente al catodo, producendo un segnale di corrente; tale segnale viene poi convertito all'interno dell'analizzatore in differenza di potenziale (attraverso un semplice circuito a resistenze calibrate) e quindi correlato alla concentrazione di ossigeno nella soluzione esaminata. La presenza della membrana gas permeabile, assieme alla ddp opportunamente fissata tra il catodo e l'anodo aumenta drasticamente la selettività dell'elettrodo, eliminando la possibile interferenza data dalla riduzione di specie anioniche eventualmente presenti nel campione.

Le reazioni redox agli elettrodi sono le seguenti:

➤ Catodo:



➤ Anodo:



➤ Reazione globale:

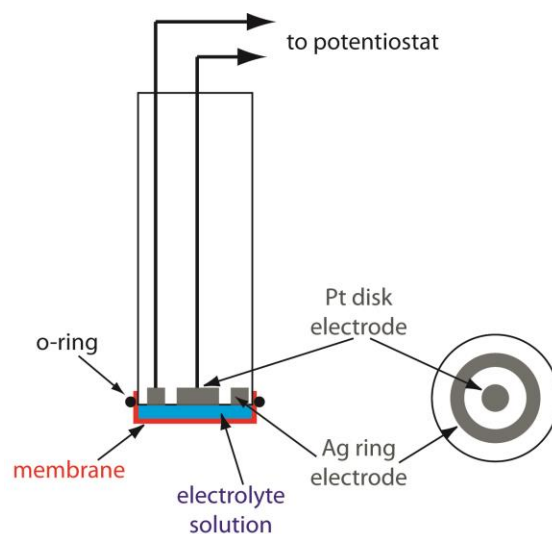


Fig. 13. Elettrodo di Clark per la misura dell'O₂.

Maggiore è la pressione parziale dell'ossigeno, più alta è la concentrazione di O₂ nel corpo della soluzione, e più intensa è la corrente catodica (corrente limite di diffusione) che si produce sull'elettrodo di misura. Quando la velocità di diffusione dell'ossigeno dalla soluzione al catodo eguaglia la velocità di solubilizzazione dello stesso si determina il valore della corrente che corrisponde allo stato stazionario.

La reazione è molto sensibile alla temperatura e per mantenere una relazione lineare tra la concentrazione dell'ossigeno e la corrente misurata, la temperatura dell'elettrodo deve essere controllata entro un intervallo teorico di $\pm 0,1^\circ\text{C}$.

1.2 Materiali e metodi

Per i test respirometrici si è utilizzato lievito disidratato *Saccharomyces cerevisiae* Type II (Sigma-Aldrich, USA).

Per il **terreno agarizzato** usato per il mantenimento e l'immobilizzazione di cellule e sferoplasti di *S. cerevisiae* (test respirometrici su conservanti del legno) si sono utilizzati i seguenti costituenti:

- Agar microbiology tested and powdered (Sigma-Aldrich).
- Estratto di lievito per microbiologia (Merck Millipore, USA),
- Peptone Universale M66 (Merck Millipore, USA)
- D-(+)-glucosio monoidrato per microbiologia $\geq 99.0\%$ (Fluka Analytical Chemical, Germania)

Per la rimozione della parete di *S. cerevisiae* si sono utilizzati i seguenti reattivi:

- D-sorbitolo (Fluka Analytical Chemical, Germania)
- Zymolyase-20T (20000 unità/g) (AMS Biotechnology Ltd, Svizzera).

Contaminanti testati

- Nitrato di mercurio 0.005 mol/L (0.01N) (Sigma Aldrich, Milano);
- ACQ (Hangzhou Lin'an Tianhong Bio-tech Co. Ltd, Cina),
- Wolmanit CX-10 (BASF Wolman GmbH, Germania)
- CCA (Tanalith C) (Lonza Wood Protection, Holland)
- Tanalith E (Lonza Wood Protection, Holland).
- BPB $>98\%$ (fornito dalla TCI Europe nv);
- BPA 99+% fornito dalla Sigma-Aldrich;
- 2,4-DNP 98% (fornito dalla ACROS Organics, Thermo Fisher Scientific – Belgio);
- Diuron $\geq 98\%$ (Sigma-Alrich S.r.l. Milano).

Altri reagenti utilizzati:

- Solfito di sodio (Fluka Analytical Chemical, Germania)
- Formaldeide soluzione 37% (Fluka Analytical Chemical, Germania)
- Azoturo di sodio p.a. $\geq 99.0\%$, (AMS Biotechnology Ltd, Svizzera).
- Etanolo 96% (Sigma-Alrich S.r.l. Milano)
- Metanolo (assay (GLC) $\geq 99.9\%$) (Carlo Erba, Italia)

Tutte le soluzioni sono state preparate per diluizione utilizzando acqua deionizzata e purificata prodotta dal sistema **Millipore Milli-Q®** ZFMQ 230 04 (Merck Millipore, USA).

Per le misure di ossigeno disciolto si sono utilizzati due ossimetri (Fig. 14):

- a) Elettrodo Orion® modello 97-08 (Thermo Scientific) accoppiato ad un potentiometro GLP 22 (Crison, Milano);
- b) Elettrodo modello 332/P (Amel Instruments S.r.l, Milano).

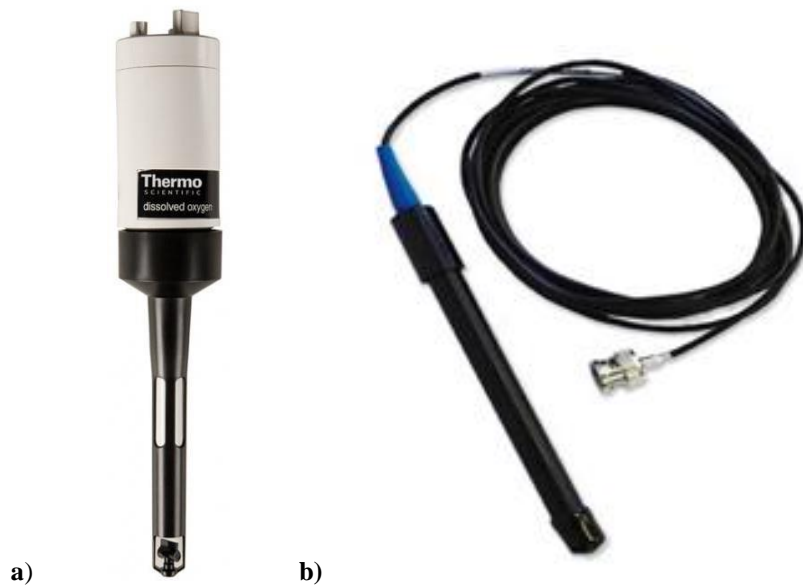


Fig. 14. Sensori amperometrici per la misura dell'O₂ disciolto a) elettrodo Orion® modello 97-08 e b) elettrodo Amel modello 360.

Entrambi gli ossimetri sono stati interfacciati con un registratore analogico mod. 868 (Amel Instruments S.r.l, Milano) per misurare e registrare simultaneamente la concentrazione di O₂ (espressa in ppm).

Conte cellulari

Per determinare il numero di cellule impiegate nei biosaggi respirometrici sui composti bisfenolici, il 2,4 dinitrofenolo ed il diuron si sono costruite curve di calibrazione mediante misure turbidimetriche (spettrofotometro UV/Visible Unicam UV2) su diluizioni decimali seriali a partire da una sospensione cellulare di $2 \cdot 10^8$ UFC/mL (le diverse concentrazioni sono state determinate al microscopio ottico Reichert-Jung MicroStar 110 mediante emocitometro).

Per i biosaggi respirometrici sui conservanti del legno, il numero di cellule è stato determinato mediante diluizioni decimali seriali e conte in piastra. Queste si sono effettuate su terreni di coltura agarizzati solidi con differente composizione (percentuale di costituenti) al fine di selezionare ed ottenere una concentrazione cellulare adatta per i biosaggi respirometrici.

1.2.1 Biosaggi respirometrici sul bisfenolo A e B

Il metodo impiegato negli esperimenti condotti su BPA, BPB (e 2,4 DNP) ha previsto una fase di esposizione (in assenza di nutrienti) di 24 h seguita dal biosaggio respirometrico.

- Prima di ogni test (12 ore), 50,0 mg \pm 1,0 mg di lievito disidratato *Saccharomyces cerevisiae* si sono reidratati in provette con 10 ml di acqua Milli-Q (conservate in vasi Dewar senza alcuna agitazione); per impedire la proliferazione delle cellule, durante questo intervallo di tempo non è stato aggiunto nessun nutriente (la concentrazione cellulare è stata sempre verificata mediante metodo turbidimetrico);
- Le *stock solution* di BPA, BPB e 2,4 DNP (100 mg/L) sono state preparate in acqua Milli-Q, conservate al buio a 4 °C e le concentrazioni sono state verificate periodicamente attraverso letture spettrofotometriche. A partire da ciascuna *stock solution* sono state poi effettuate diluizioni seriali in acqua Milli-Q per ottenere le altre concentrazioni testate per ciascuna sostanza (vedi Tab.3 nella sezione Risultati e Discussione);
- Una taratura su due punti degli elettrodi è stata effettuata regolarmente utilizzando:
 - a) una misura in ossigeno atmosferico (punto di massimo) ($T = 25,0 \pm 0,1$ °C; $P = 760 \pm 1$ mmHg; $O_2 \sim 21\%$ v/v) e
 - b) una misura in una soluzione di solfito di sodio (10 g/L) (punto di zero);
- Una soluzione di glucosio 3 M in acqua Milli-Q è stata preparata settimanalmente per le repliche dei test al fine di eliminare possibili variazioni tra replicate successive;
- I campioni di controllo (bianchi) sono stati preparati aggiungendo 150 μ L di sospensione cellulare di *S. cerevisiae* in 12,500 mL di acqua Milli-Q;
- I campioni test (esposti) sono stati preparati aggiungendo la stessa quantità di sospensione cellulare di *S. cerevisiae* in 12,500 mL di soluzione di BPA, BPB o 2,4 DNP in acqua Milli-Q alla concentrazione desiderata;
- In fase di esposizione (durata 24h), le diverse camere di misura in vetro (volume 25 mL) contenenti i campioni sono state immerse in un bagno termostatico ($25,0 \pm 0,1$ °C) sotto costante agitazione (200 rpm) e coperte con dischi di carta da filtro; quest'ultima soluzione tecnica ha permesso di limitare l'evaporazione dell'acqua (riduzione < 5 % del volume totale

per 24h) dai campioni, ma anche prevenire interferenze di contaminanti provenienti dall'aria (ad esempio particelle di polvere), assicurando al tempo stesso il corretto scambio O₂ con l'atmosfera;

Sia per i campioni di controllo (bianchi) che per i campioni test (esposti) i biosaggi respirometrici sono stati effettuati in un sistema aperto in piccole camere di misura in vetro (volume 25 mL), immerse in un bagno termostatico (25,0 ± 0,1 ° C) sotto costante agitazione (200 rpm). Gli elettrodi tarati sono stati immersi nelle camere di misura contenenti le diverse soluzioni e successivamente sono state aggiunte aliquote di 2,500 mL di soluzione di glucosio 3 M (concentrazione finale 0,5 M come nei biosaggi respirometrici per il diuron).

Come diretta conseguenza dell'improvviso cambiamento dello status nutrizionale cellulare (aumento del catabolismo aerobio da un livello basale livello basale fino ad massimo valore fisiologico) la concentrazione dell'O₂ disciolto diminuisce rapidamente (decremento dei segnali). Al raggiungimento di un equilibrio in cui la velocità di consumo cellulare di O₂ è uguale alla velocità di solubilizzazione dell'O₂ dell'aria nella soluzione, i segnali misurati da ciascun elettrodo raggiungono una stabilità (plateau con una fluttuazione inferiore di 0,02 ppm). Una volta raggiunta questa condizione 100 µL di soluzione acquosa 0,02 M di NaN₃ sono stati aggiunti a ciascun camera di misurazione. La completa inibizione della respirazione cellulare causata dal NaN₃ [Dragone *et al.*, 2014] determina un progressivo aumento di O₂ disciolto fino al raggiungimento di una stabilità (plateau con una fluttuazione inferiore di 0,02 ppm) che corrisponde alla quantità di O₂ disciolto nei campioni in assenza della respirazione di cellule di *S. cerevisiae*.

Il parametro analitico calcolato per ogni biosaggio respirometrico è stato la variazione della concentrazione di O₂ disciolto (ΔppmO_2) tra i due *plateau* (prima e dopo l'aggiunta di NaN₃) della curva sperimentale (Fig.14), considerando i valori medi della concentrazione di O₂ disciolto 15 minuti prima dell'aggiunta di NaN₃ (primo *plateau*) e una volta raggiunto il secondo *plateau*. L'interferenza percentuale della respirazione cellulare ($\rho\%$) è stato calcolata con il seguente algoritmo:

$$\rho\% = [(1 - (\Delta\text{ppmO}_2 \text{ exp} / \Delta\text{ppmO}_2 \text{ blk}) * 100] \quad (1)$$

dove $\Delta\text{ppmO}_2 \text{ exp}$ = valore medio della variazione della concentrazione di O₂ disciolto (in ppm) per campioni test (esposti), e $\Delta\text{ppmO}_2 \text{ blk}$ = valore medio della variazione della concentrazione di O₂ disciolto (in ppm) per i campioni di controllo (bianchi). Nelle condizioni sperimentali descritte, valori compresi tra $\rho\% = 100\%$ (quando $\Delta\text{ppmO}_2 \text{ exp} = 0$) e $\rho\% = 0\%$ (quando $\Delta\text{ppmO}_2 \text{ exp} = \Delta\text{ppmO}_2 \text{ blk}$), indicando un' interferenza di tipo inibitorio sulla respirazione cellulare di *S. cerevisiae*. Al contrario, valori

compresi tra zero e $-\infty$ indicano un'interferenza di tipo iperstimolatorio. Per tutti i biosaggi respirometrici sono state effettuate 4 repliche (4 ripetizioni per ogni bianco ed esposto all'interno dello stesso biosaggio). Sono state calcolate le deviazioni standard relative percentuali (RSD%) $\leq 20\%$, per valutare la ripetibilità sia per i campioni di controllo (bianchi) che per i campioni test (esposti).

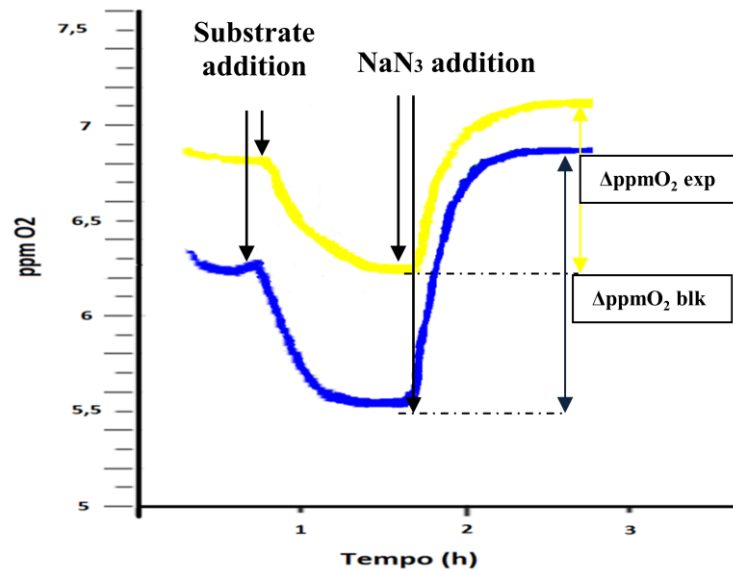


Fig. 15. Esempio di curve respirometriche; in blu il segnale relativo al campione di controllo (bianco), in giallo quello relativo al campione test (esposto); i parametri analitici sono $\Delta\text{ppm}(\text{O}_2)\text{blk}$ e $\Delta\text{ppm}(\text{O}_2)\text{exp}$, ossia la variazione di consumo di O_2 tra i due *plateau* (prima e dopo l'aggiunta di NaN_3) della curva sperimentale rispettivamente per bianchi ed esposti.

1.2.2 Biosaggi respirometrici sul diuron

I biosaggi respirometrici effettuati sono stati condotti partendo dal metodo descritto da Frazzoli *et al*, 2007 utilizzando però un confronto con bianchi procedurali esterni (come nei biosaggi respirometrici dei composti bisfenolici). In particolare sospensioni cellulari di *S. cerevisiae* sono state esposte a quattro differenti concentrazioni di diuron:

- 241.20 $\mu\text{g/L}$ (10^{-6}M , molto oltre il limite stabilito dalla Direttiva 98/83/EC per singolo pesticida in acqua potabile);
- 24.12 $\mu\text{g/L}$ (10^{-7}M , 200 volte oltre il limite);
- 2.41 $\mu\text{g/L}$ (10^{-8}M , 20 volte oltre il limite);
- e 0.024 $\mu\text{g/L}$ (10^{-10}M , 4 volte al di sotto del limite).

Per valutare la relazione tra dose e risposta, le sospensioni cellulari di *S. cerevisiae* sono state esposte individualmente a queste quattro concentrazioni di erbicida per periodi di tempo di 6 h e 24 h.

Gli esperimenti sono stati allestiti e condotti come descritto di seguito:

- Prima di ogni biosaggio (12 ore), 50 mg \pm 1.0 mg di lievito disidratato *Saccharomyces cerevisiae* sono stati reidratati in provette con 10 mL di acqua MilliQ (conservate in vasi Dewar senza alcuna agitazione); per impedire la proliferazione delle cellule, durante questo intervallo di tempo non è stato aggiunto nessun nutriente (la concentrazione cellulare è stata sempre verificata mediante metodo turbidimetrico);
- Una soluzione di glucosio 0,5M in acqua Milli-Q è stata preparata settimanalmente per le repliche dei test al fine di eliminare possibili variazioni; grazie a una serie di test preliminari questa concentrazione si è dimostrata essere ottimale per il raggiungimento del massimo tasso di respirazione cellulare (eccesso di fonte di carbonio);
- La *stock solution* di diuron (10^{-2} M) è stata preparata sciogliendo 60,3 mg di erbicida solido in 25 mL di metanolo puro. Sono state poi effettuate diluizioni decimali seriali in acqua Milli-Q per ottenere le quattro *working solutions* 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M e 10^{-8} M di diuron utilizzate per le aggiunte durante i biosaggi respirometrici; tutte le soluzioni sono state conservate al buio a 4 °C e le concentrazioni sono state verificate periodicamente attraverso letture spettrofotometriche;
- Una taratura su due punti degli elettrodi è stata effettuata regolarmente utilizzando:
 - a) una misura in ossigeno atmosferico (punto di massimo) ($T = 25,0 \pm 0,1$ °C; $P = 760 \pm 1$ mmHg; $O_2 \sim 21\%$ v/v) e
 - b) una misura in una soluzione di solfito di sodio (10 g/L) (punto di zero).

I biosaggi respirometrici sono stati effettuati sono stati condotti in un sistema aperto in piccole camere di misura in vetro (volume 25 mL), immerse in un bagno termostatico ($25,0 \pm 0,1$ °C) sotto costante agitazione (200 rpm). A ciascun campione, contenente glucosio 0,5 M sono state aggiunte:

- a) aliquote di soluzioni metanolica di diuron di concentrazione nota ai campioni test (diluizioni 1:100 in modo da ottenere la concentrazione finale desiderata) e pari aliquote di soluzioni metanoliche (senza diuron) ai campioni di controllo;
- b) aliquote di 0,150 mL di sospensione cellulare di *S. cerevisiae* in ciascuna soluzione.

Al termine di ciascuna esposizione (sia per 6h che per 24 h), gli elettrodi a O_2 tarati sono stati immersi in ciascun campione; una volta raggiunta la stabilità dei segnali (*plateau* con una fluttuazione inferiore di 0,02 ppm), sono stati aggiunti 100 μ L di soluzione di azoturo di sodio (NaN_3) 0.02 M per inibire completamente la respirazione delle cellule di *S. cerevisiae*. Questo determina un incremento della concentrazione di quantità di O_2 disciolto fino al raggiungimento di una stabilità (*plateau* con una fluttuazione inferiore di 0,02 ppm) che corrisponde alla quantità di O_2 disciolto in assenza della

respirazione di cellule di *S. cerevisiae*. Una curva respirometrica dell'esperimento è mostrato in Fig. 16:

Typical experimental respirometric kinetic curves

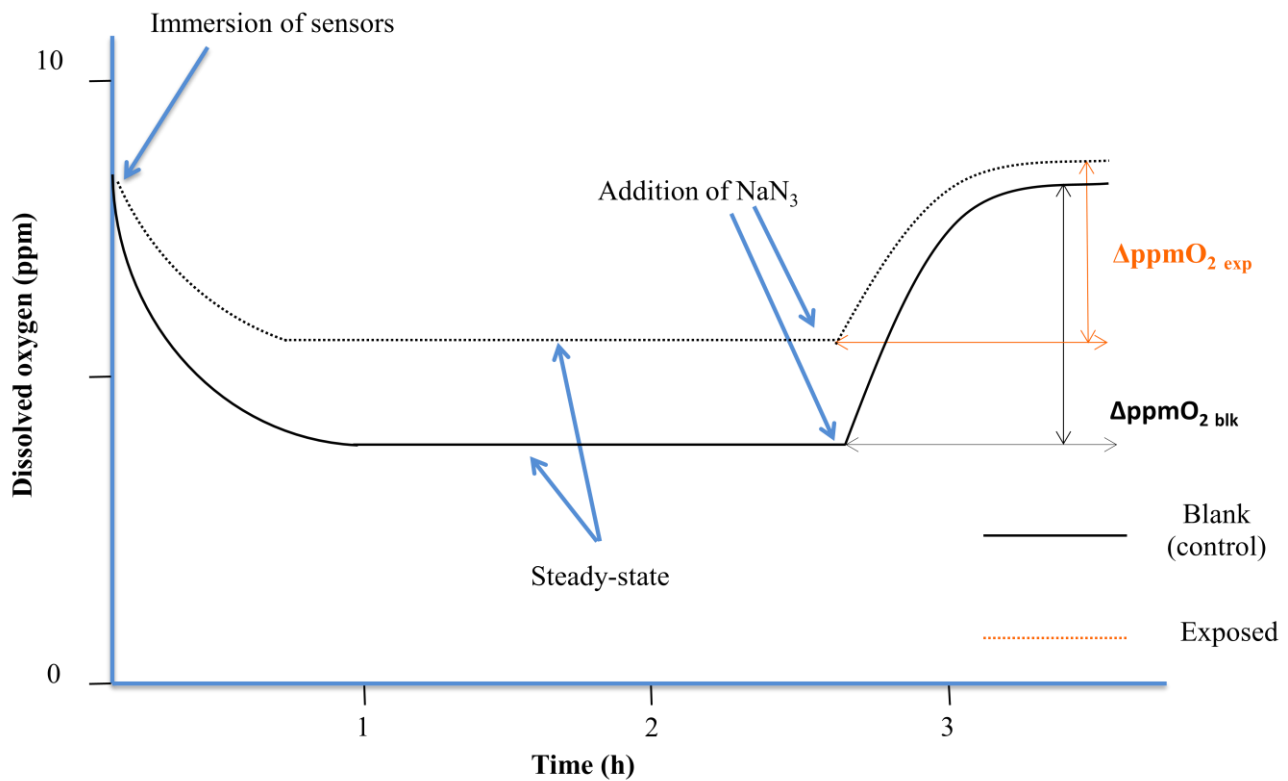


Fig. 16. Curva respirometrica ottenuta con i biosaggi respirometrici sull'erbicida diuron: i parametri analitici sono $\Delta\text{ppm}(\text{O}_2)_{\text{blank}}$ e $\Delta\text{ppm}(\text{O}_2)_{\text{exposed}}$, la variazione della concentrazione di O_2 disciolto (ΔppmO_2) tra i due *plateau* della curva sperimentale prima e dopo l'aggiunta di NaN_3 per i campioni di controllo (bianchi) e i campioni test (esposti) (tratta da Dragone *et al.*, 2015).

Il parametro analitico calcolato per ogni biosaggio respirometrico è stato la variazione della concentrazione di O_2 disciolto (ΔppmO_2) tra i due *plateau* della curva sperimentale prima e dopo l'aggiunta di NaN_3 (Fig. 15), considerando i valori medi della concentrazione di O_2 disciolto 15 minuti prima dell'aggiunta di NaN_3 (primo *plateau*) e 15 minuti una volta raggiunto il secondo *plateau*. L'interferenza percentuale della respirazione cellulare ($\rho\%$) è stato calcolato con lo stesso algoritmo descritto nella sezione relativa ai biosaggi respirometrici per i composti bisfenolici.

Per tutti i biosaggi respirometrici sono state effettuate 4 repliche (4 ripetizioni per ogni bianco ed esposto all'interno dello stesso biosaggio). Sono state calcolate le deviazioni standard relative percentuali ($\text{RSD}\%$) $\leq 20\%$, per valutare la ripetibilità sia per i campioni di controllo (bianchi) che per i campioni test (esposti).

1.2.3 Biosaggi respirometrici sui conservanti del legno

L'immobilizzazione delle cellule di *S. cerevisiae* è stata eseguita ottimizzando il protocollo descritto da Campanella *et al.*, 1995; In particolare l'ottimizzazione ha riguardato la variazione della composizione percentuale del terreno di coltura in modo tale da ottenerne una concentrazione di cellule minore (a vantaggio della sensibilità del metodo) rispetto a quella ottenuta con il terreno tradizionale ed adatta per i biosaggi respirometrici:

Tab 2. Conte cellulari in piastra utilizzando un terreno di coltura; a: tradizionale, b: alternativo per composizione percentuale; RSD% ≤ 3 su 4 repliche.

Composizione del mezzo di coltura	UFC/mL (10^6)
a) estratto di lievito, 1% peptone, 1%, glucosio, 2%	50,28
b) estratto di lievito, 0,17% peptone, 0,17%, glucosio, 0,30%	9,77

- 50 mg \pm 1.0 mg di lievito disidratato *Saccharomyces cerevisiae* è stata inoculata in terreno di coltura (0,17% estratto di lievito, 0,17% peptone 0,30% glucosio); le cellule sono state coltivate per 30 ore a 37 ° C sotto agitazione (250 rpm) in beute da 100 mL contenenti 50 mL di terreno di coltura;
- 0,200 mL di coltura cellulare è stata mescolata con terreno agarizzato (0,17% estratto di lievito, 0,17% peptone 0,30% glucosio e agar 1%) in una piastra Petri sterile in modo da disperdere ed intrappolare (per inclusione) le cellule in modo uniforme nel terreno agarizzato;
- Dal terreno agarizzato contenente le cellule di *S. cerevisiae* si sono ricavati dischetti di adeguate dimensioni (circa 8 mm di diametro e spessore di circa 1 mm) in modo da poter essere fissate alla testa dell'elettrodo a O₂ per l'assemblaggio della biosonda a cellule.

Per la lisi parete cellulare, cellule di *S. cerevisiae* sono stati trattate con una soluzione enzimatica preparata con la seguente composizione:

- 0,5 mg di zymolyase 20T (20000 unità/g)
- sorbitolo 0,5 M (quale soluto compatibile o osmoregolatore)

- tampone fosfato 0,06 M, pH = 7,50

Le cellule sono state lasciate in incubazione in piastra Petri sterile con soluzione enzimatica per 2 ore a temperatura ambiente ($25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$). Tali condizioni sperimentali sono state selezionate ed ottimizzate testando differenti tempi e concentrazioni di miscela enzimatica. Dopo il tempo fisso i dischi sono stati lavati con la stessa soluzione di sorbitolo 0,5 M in tampone fosfato in modo tale da rimuovere l'enzima e quindi ogni possibile interferenza con la misura respirometrica.

Nel caso dei biosaggi respirometrici su cellule di *S. cerevisiae* immobilizzate in terreno agarizzato la concentrazione O_2 misurata è quello che rimane dopo la diffusione del gas attraverso lo spessore del gel (interposto tra la soluzione e la membrana dell'elettrodo) e la differenza tra la concentrazione di O_2 nel corpo della soluzione e la concentrazione O_2 misurata dal sensore corrisponde al O_2 consumato durante la respirazione cellulare.

Le misurazioni sono state effettuate in un sistema aperto in piccole camere di misura in vetro (volume 25 mL), immerse in un bagno termostatico ($25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$) sotto costante agitazione (200 rpm).

- Una taratura su due punti degli elettrodi è stata effettuata regolarmente utilizzando:
 - a) una misura in ossigeno atmosferico (punto di massimo) ($T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$; $P = 760 \pm 1$ mmHg; $\text{O}_2 \sim 21\%$ v/v);
 - b) una misura in una soluzione di solfito di sodio (10 g/L) (punto di zero).

I biosaggi respirometrici effettuati sono stati condotti partendo dal metodo descritto da Frazzoli *et al*, 2007 (utilizzando un "bianco interno"). Dopo la taratura la biosonda amperometrica è stata assemblata accoppiando l'elettrodo a O_2 con il dischetto di terreno agarizzato + cellule di *S. cerevisiae* (intere o sferoplasti) posizionato tra una membrana da dialisi e una membrana di Teflon gas permeabile e fissata tramite un O-ring alla testa dell'elettrodo a O_2 . La biosonda amperometrica è stata immersa in tampone fosfato ($\text{pH} = 7,50 \pm 0,01$); una volta raggiunta una stabilità dei segnali (*plateau* con fluttuazione ≤ 0.02 ppm entro 15 minuti), la concentrazione dell' O_2 è risultata essere di c.ca 7,00 ppm ($T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$; $P_{\text{barometrica}} = 760 \pm 5$ mmHg). In queste condizioni l'attività respiratoria delle cellule di *S. cerevisiae* è dovuta al solo catabolismo aerobio basale. L'aggiunta di una soluzione di glucosio (concentrazione finale 0,5 M) determina un incremento del catabolismo aerobio fino al massimo valore fisiologico e quindi un rapido decremento dei segnali (diminuzione della concentrazione dell' O_2 disciolto). Una volta raggiunto un *plateau* (chiamato *stato-stazionario I* con fluttuazione $\leq 0,02$ ppm in un intervallo di 15 minuti) il tasso di diffusione del O_2 all'interno del disco è in equilibrio con il consumo del gas da parte delle cellule di *S. cerevisiae*. A questo punto è stata aggiunta la sostanza

da testare: se questa esercita un'interferenza di tipo inibitorio sul catabolismo aerobio delle cellule, il consumo di O₂ diminuisce e la concentrazione di O₂ disciolto aumenta sino al raggiungimento di un *plateau* (chiamato *stato-stazionario II* con fluttuazione ≤ 0,02 ppm in un intervallo di 15 minuti). A questo punto 100 µL di soluzione acquosa 0,02 M NaN₃ sono stati aggiunti a ciascuna camera di misurazione. L'interruzione della respirazione cellulare determina un progressivo aumento di O₂ disciolto fino al raggiungimento di un secondo *plateau* (chiamato *stato-stazionario III* con fluttuazione ≤ 0,02 ppm in un intervallo di 15 minuti) che corrisponde alla quantità di O₂ disciolto in assenza della respirazione di cellule di *S. cerevisiae*.

Il parametro analitico calcolato per ogni biosaggio respirometrico è stato la variazione della concentrazione di O₂ disciolto (ΔppmO_2) tra gli stati stazionari I e II ($\Delta\text{ppm(O}_2\text{)I-II}$) e tra gli stati stazionari II e III ($\Delta\text{ppm (O}_2\text{)I-III}$) della curva sperimentale (indicati in Fig. 16). L'interferenza percentuale della respirazione cellulare ($\rho\%$) è stata calcolata con il seguente algoritmo:

$$\rho\% = [\Delta\text{ppm (O}_2\text{)I-II} / \Delta\text{ppm (O}_2\text{)I-III}] * 100 \quad (2)$$

Ogni sostanza è stata testata in tre concentrazioni diverse (comprese tra 0,20 – 0,42 % (v/v)). Per tutti i biosaggi respirometrici sono state effettuate 4 repliche (4 ripetizioni per ogni bianco ed esposto all'interno dello stesso biosaggio). Sono state calcolate le deviazioni standard relative percentuali (RSD%) ≤ 20%, per valutare la ripetibilità sia per i campioni di controllo (bianchi) che per i campioni test (esposti).

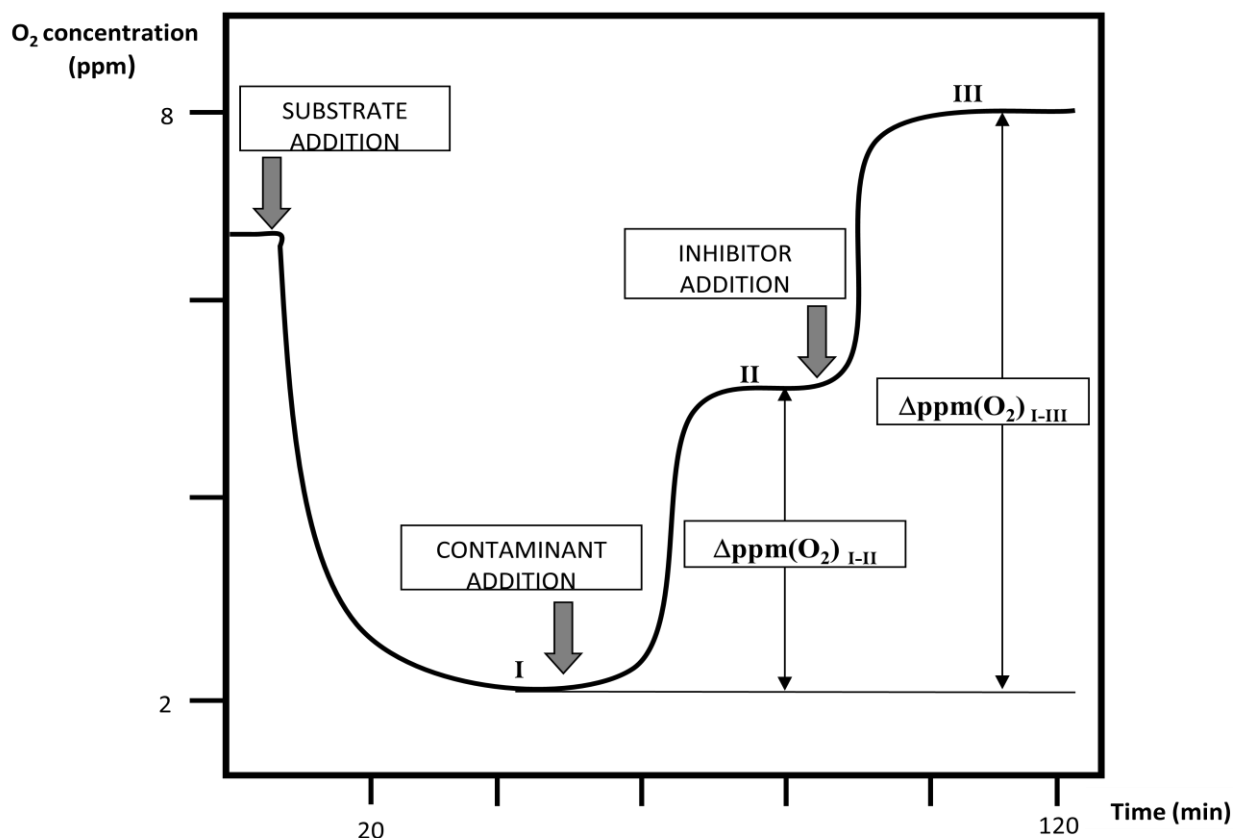


Fig. 17. Tipica curva respirometrica ottenuta con i biosaggi respirometrici sui conservanti del legno: i parametri analitici sono $\Delta\text{ppm}(\text{O}_2)\text{I-II}$ e $\Delta\text{ppm}(\text{O}_2)\text{I-III}$, dove $\Delta\text{ppm}(\text{O}_2)\text{I-II}$ è la variazione di consumo di O_2 tra lo stato stazionario I e II e $\Delta\text{ppm}(\text{O}_2)\text{I-III}$ è la variazione di consumo di O_2 tra lo stato stazionario I e III (tratta da Dragone *et al.*, 2014).

1.3 Risultati e Discussione

1.3.1 Bisfenolo A e B

I risultati dei biosaggi respirometrici effettuati con la biosonda amperometrica a cellule di *S. cerevisiae* su diverse concentrazioni di BPA, BPB e il 2,4 dinitrofenolo (2,4 DNP) sono riassunti nella Tab. 3, mentre la relazione tra la dose testata e l'indice $\rho\%$ è mostrato dalla curva dose-effetto (Fig. 17). Il 2,4 DNP è stato utilizzato come composto di riferimento per i suoi già noti effetti di alterazione delle funzioni mitocondriali [Chance & Williams, 1956].

L'esposizione a lungo termine (24h) delle cellule di *S. cerevisiae* a dosi crescenti (5-100 ppm) di BPA e BPB determina un aumento del $\rho\%$ da valori negativi a valori positivi. A parità di tempo di esposizione non si osserva una simile variazione per il 2,4 DNP e questa differenza è stata verificata eseguendo dei biosaggi respirometrici per la concentrazione di 5 ppm di 2,4 DNP a due diversi tempi

di esposizione (4 e 9 h) (Fig. 18). Nelle condizioni sperimentali descritte, valori compresi tra $\rho\% = 100\%$ (quando $\Delta\text{ppmO}_2 \text{ exp} = 0$) e $\rho\% = 0\%$ (quando $\Delta\text{ppmO}_2 \text{ exp} = \Delta\text{ppmO}_2 \text{ blk}$), indicando un' interferenza di tipo inibitorio sulla respirazione cellulare di *S. cerevisiae*. Al contrario, valori compresi tra zero e $-\infty$ indicano un interferenza di tipo iperstimolatorio.

E' stata trovata una relazione significativa tra campioni di controllo e campioni test per tutte le concentrazioni ($p < 0,05$) utilizzando per l'analisi della varianza il metodo ANOVA a blocchi randomizzati.

Tab. 3. Concentrazioni testate di BPA, BPB e 2,4 DNP (in mM e ppm) con I corrispondenti valori medi di indice di interferenza respiratoria ($\rho\%$).

Composto	Concentrazione (ppm)	Concentrazione (mM)	$\rho\%$ (RSD% ≤ 20)
BPA	5	0,02	-21,04
	15	0,07	7,78
	30	0,13	10,45
	100	0,44	17,09
BPB	5	0,02	-19,05
	15	0,06	14,42
	30	0,12	23,74
	100	0,41	42,34
2,4 DNP	5	0,03	4,20
	15	0,08	94,27
	30	0,16	100,00
	100	0,54	100,00

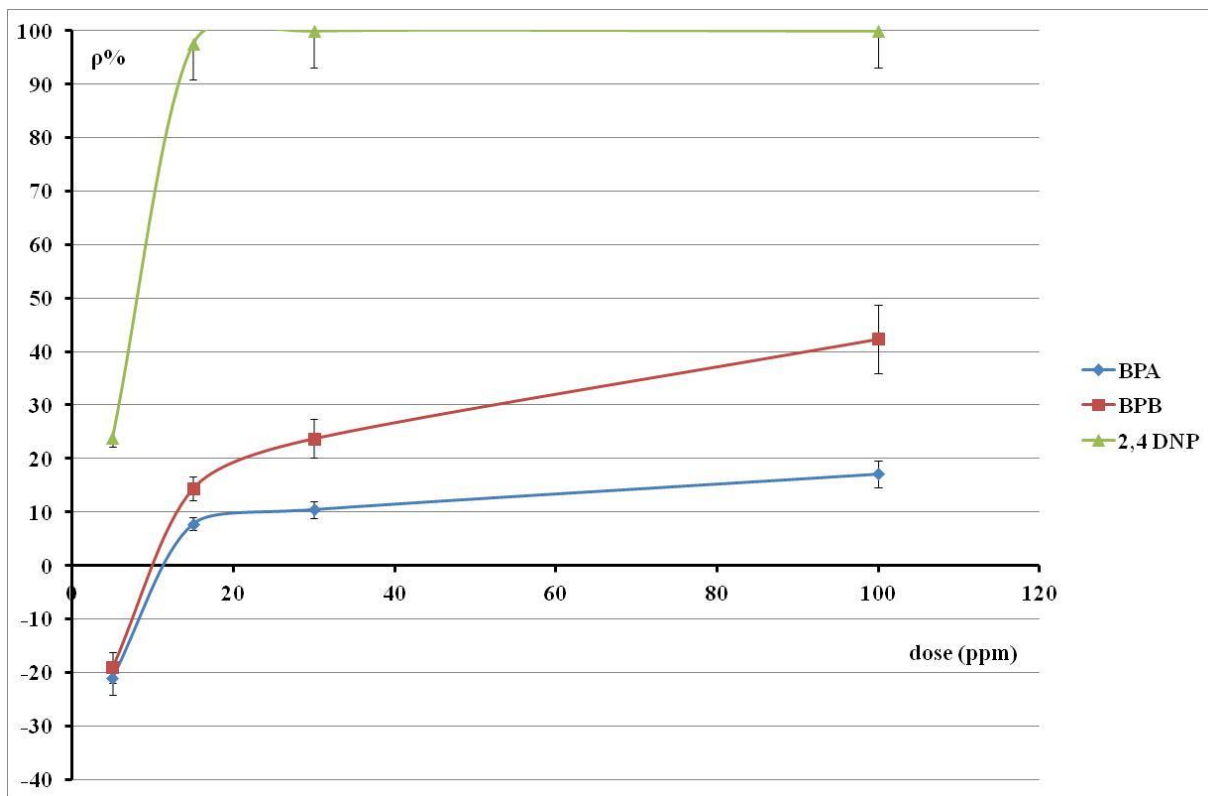


Fig. 18. Curve dose-effetto di BPA (curva blu), BPB (curva rossa) e 2,4 DNP (curva verde) a seguito di esposizioni a lungo termine di 24h.

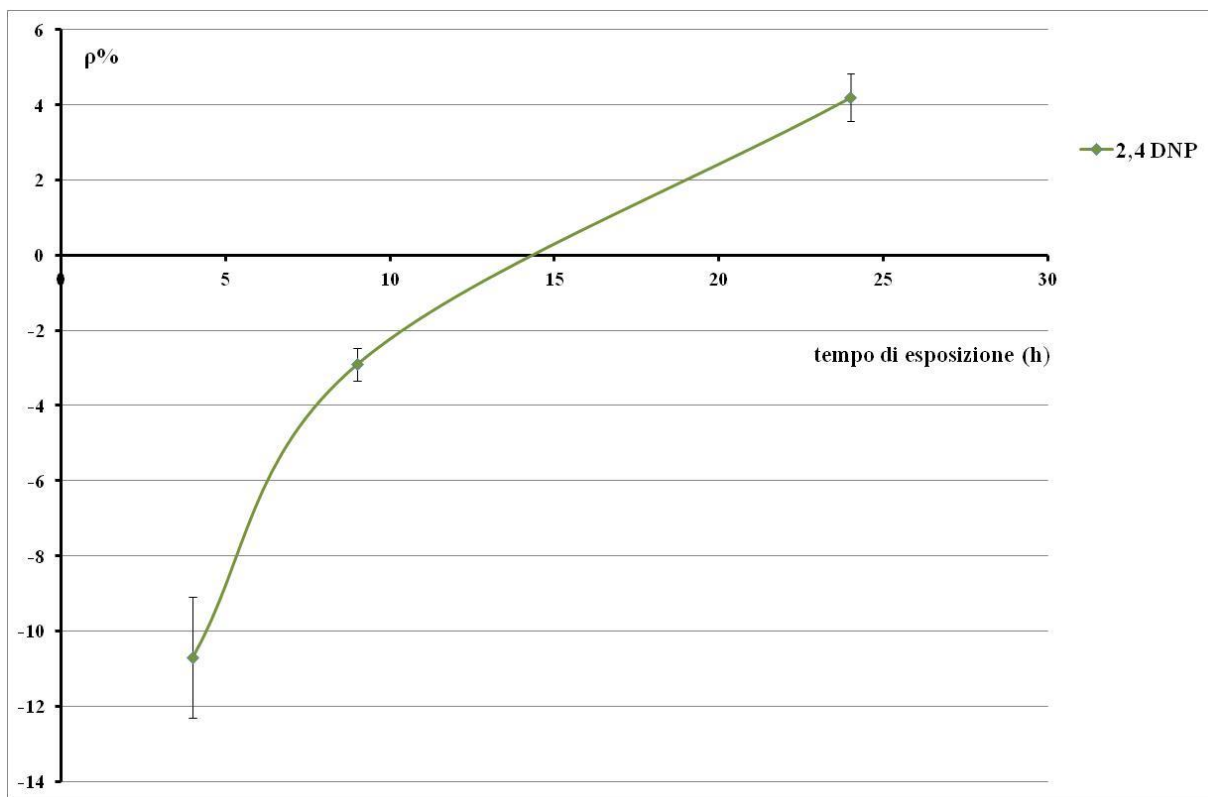


Fig. 19. Curva dose-effetto di 2,4 DNP 5 ppm per tempi di esposizione differenti ($\leq 24h$).

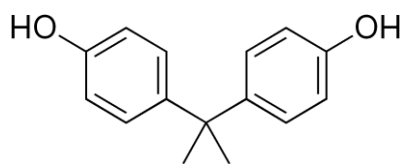
Le curve dose-effetto ottenute per esposizioni a lungo termine (24h) per i composti bisfenolici (BPA e BPB) sarebbero attribuibili ad effetti di interferenza della respirazione cellulare (catabolismo aerobio) di tipo iperstimolatorio (valori negativi del $\rho\%$) ed inibitorio (valori positivi del $\rho\%$).

I risultati preliminari di biosaggi respirometrici hanno dimostrato che nelle condizioni sperimentali adottate il catabolismo aerobio delle cellule di *S. cerevisiae* è ad un livello massimo fisiologico. L'interferenza di tipo iperstimolatorio sarebbe dunque causata da un effetto di disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa nei mitocondri. Alcune prove di un parziale disaccoppiamento causato dai composti bisfenolici sono state riportate per esposizioni di sospensioni mitocondriali di epatociti di ratto a dosi simili a quelle testate in questo studio [Nakagawa & Tayama, 2000]. I disaccoppianti della fosforilazione ossidativa sono un gruppo eterogeneo di sostanze in grado di interferire/perturbare l'attività respiratoria e la bioenergetica cellulare in generale; questo avviene attraverso una dissipazione energeticamente improduttiva del gradiente elettrochimico protonico ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) (esistente tra lo spazio intermembrane e la matrice mitocondriale) e una diminuzione della forza motrice protonica Δp (che fornisce l'energia necessaria per la sintesi di ATP da parte del Complesso V), definita come segue:

$$\Delta p = \Delta\mu_{\text{H}^+} / F = \Delta \psi - 59 \cdot \Delta \text{pH} \quad (3)$$

dove F è la costante di Faraday, $\Delta \psi$ il potenziale di membrana (negative rispetto all'esterno) e ΔpH il gradient di pH (alcalino rispetto all'esterno) [Kadenbach, 2003]. Tra i possibili meccanismi alla base di tale dissipazione ci sono (I) azione protonofora *carrier type* da parte di acidi deboli lipofilici (es. disaccoppianti "classici" come il 2,4 DNP), (II) azione ionofora *carrier type* da parte di molecole organiche cicliche (es. valinomicina) (III) formazione di canali attraverso la membrana mitocondriale interna (es. gramicidina A) (IV) aumento della permeabilità protonica della membrana mitocondriale interna per cambiamenti di fluidità (es. anestetici locali) o (V) attraverso l'induzione poro della transizione della permeabilità mitocondriale (acronimo inglese PTP).

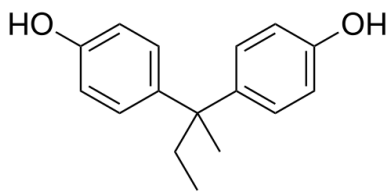
Per quanto riguarda l'ipotesi del meccanismo di disaccoppiamento dei composti bisfenolici, la presenza di due gruppi ossidrilici dissociabili (Fig. 20) potrebbe suggerire una dissipazione del $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ attraverso il meccanismo (I) (analogamente al 2,4 DNP).



Bisfenolo A

Peso molecolare = 228.3

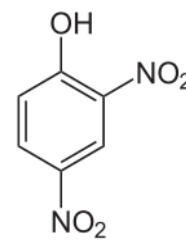
pKa = 9.6



Bisfenolo B

Peso molecolare = 242.3

pKa = 10.2



2,4 Dinitrofenolo

Peso molecolare = 184.1

pKa = 4.1

Fig. 20. Strutture molecolari del BPA, BPB e 2,4 DNP con relativi pesi molecolari e pKa.

Si tratta di un meccanismo descritto per acidi deboli con proprietà lipofile, le cui caratteristiche chimiche consentono un facile diffusione attraverso le membrane mitocondriali; la successiva deprotonazione a livello della matrice mitocondriale (ambiente alcalino) determina la dissipazione del gradiente elettrochimico protonico e quindi il disaccoppiamento [Nelson & Cox, 2005].

Il trasporto per diffusione passiva attraverso le membrane biologiche si verifica più facilmente se la molecola è in forma non ionizzata (non dissociata). Per gli acidi deboli (il cui equilibrio di dissociazione può essere riassunto come $HA \leftrightarrow H^+ + A^-$) la frazione delle molecole dissociate (il rapporto tra la forma A^- ionizzata e la forma HA non ionizzata) può essere calcolato in modo approssimativo mediante l'equazione di Henderson-Hasselbach:

$$pH - pKa = \log [A^-/HA] \quad (4)$$

Supponendo che il pH della matrice mitocondriale di *S. cerevisiae* sia intorno a 7,5 [Orii *et al.*, 2011] è possibile calcolare la percentuale di dissociazione nella matrice mitocondriale dei composti testati. A differenza del 2,4 DNP, la cui percentuale di ionizzazione nella matrice mitocondriale sarebbe > 99%, le basse percentuali di ionizzazione per BPA (0,8%) e BPB (0,2%) ridurrebbero significativamente la resa di un meccanismo di disaccoppiamento basata su un azione protonofora *carrier type* (meccanismo I). Un meccanismo di disaccoppiamento ipotizzabile per i composti bisfenolici potrebbe dipendere dal carattere anfifilico del BPA [Balaz, 2009] e del BPB (strutturalmente simile al BPA). L'esistenza nelle molecole anfifiliche di distinte regioni, una polare (idrofila) e una non polare (idrofobica) [IUPAC Gold Book, <http://goldbook.iupac.org/A00303.html>] ne permette l'interazione con le membrane biologiche (anch'esse costituite da molecole fosfolipidiche a carattere anfifilico) (Fig. 21); in particolare la regione idrofoba sarebbe in grado di interagire con il *core* lipidico mentre la regione idrofila con la regione delle teste polari del doppio strato fosfolipidico.

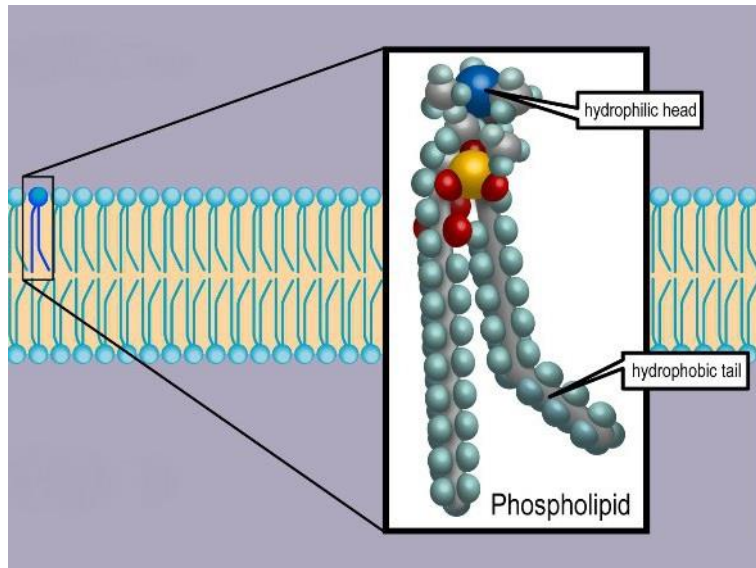


Fig. 21. Struttura schematica di un doppio strato fosfolipidico.

E' possibile ipotizzare dunque che un accumulo di molecole bisfenoliche a livello della membrana mitocondriale interna possa perturbare o interferire con le componenti della membrana stessa, presumibilmente alterandone la permeabilità protonica. Questa ipotesi di accumulo sarebbe avvalorata da una serie di dati sperimentali disponibili:

- Misure di spettroscopia NMR applicate a sistemi modello di vescicole fosfolipidiche (piccole e grandi vescicole unilamellari di fosfatidilcolina) hanno dimostrato come il BPA sia in grado di interagire con le membrane ed accumularsi nella regione all'interfaccia tra le teste polari e il *core* lipidico [Okamura *et al.*, 1999; Okamura *et al.*, 2004] (Fig. 22). Questa interazione è in grado di rallentare la diffusione del BPA all'interno della membrana e di sincronizzarne la mobilità con i movimenti della matrice fosfolipidica [Okamura *et al.*, 2004];
- E' stata dimostrata l'interazione del BPA con la fosfatidilcolina, il principale costituente fosfolipidico delle membrane mitocondriali in *S. cerevisiae* [Janssen *et al.*, 1999] e delle membrane delle cellule eucariotiche in generale (inclusi i mammiferi); l'abbondanza di questo fosfolipide potrebbe facilitare l'accumulo di composti bisfenolici nei mitocondri e favorire il meccanismo di disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa ipotizzato.

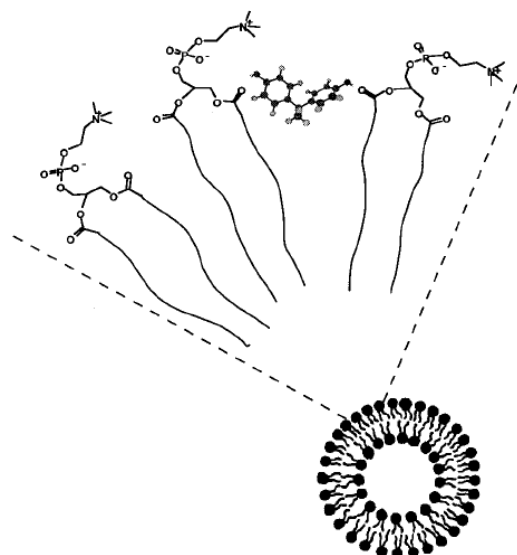


Fig. 22. Rappresentazione schematica dell'interazione tra il BPA e piccole vescicole unilamellari di fosfatidilcolina (tratta da Okamura *et al.*, 1999).

Riguardo invece i valori positivi del $\rho\%$, nelle condizioni sperimentali adottate queste indicano un'interferenza di tipo inibitorio sulla respirazione cellulare di *S. cerevisiae*. Questa sarebbe attribuibile alla comparsa di uno stress ossidativo, quando la presenza di sostanze pro-ossidanti (e/o la sovrapproduzione dei loro intermedi reattivi) determina uno squilibrio nel sistema di controllo cellulare. Le specie reattive dell'ossigeno (acronimo inglese ROS) sono sottoprodotti costitutivi del metabolismo aerobico, prodotti principalmente a livello della catena di trasporto mitocondriale [Turrens, 1997]. Questo tipo di radicali liberi contenente O_2 parzialmente ridotto viene coinvolto in reazioni radicaliche a catena che possono causare danni considerevoli anche a distanza dal loro sito di produzione. Comunque, in condizioni fisiologiche, le ROS vengono prontamente neutralizzate da sistemi di difesa cellulari enzimatici (es. superossido dismutasi, catalasi e glutazione perossidasi) e non enzimatici (es. glutazione), noti collettivamente come *free radical scavengers*. In caso di sovrapproduzione di ROS, i sistemi di difesa cellulare possono risultare insufficienti, determinando la perdita dell'omeostasi redox cellulare e dunque lo stress ossidativo, in grado di causare danni potenziali alle strutture cellulari (ed alle loro funzioni), in particolare quelle mitocondriali [Kowaltowski & Vercesi, 1999].

L'interferenza di tipo inibitorio legata allo stress ossidativo potrebbe dipendere da diverse cause, inclusa l'interferenza di tipo iperstimolatorio (disaccoppiamento). A tal proposito, la maggior parte degli studi riportati in letteratura mostra una correlazione inversa tra disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa e produzione di ROS. Tuttavia, molti di questi studi vengono utilizzati mitocondri isolati che, a causa delle condizioni sperimentali adottate, si trovano in uno stato bioenergetico ottimale, molto diverso da quello delle cellule intere in condizioni fisiologiche. Aon *et al.* hanno dimostrato che un parziale disaccoppiamento in cellule intere (esposte a basse

concentrazioni di FCCP, un potente disaccoppiante) può aumentare l'aumento di livello di ROS rilevabile [Aon *et al.*, 2010].

I risultati qui presentati per i composti bisfenolici sono stati ottenuti utilizzando cellule reidratate di *S. cerevisiae* in condizioni di non proliferazione, probabilmente caratterizzate da uno stato redox sub-ottimale. Sarebbe dunque ragionevole assumere una correlazione diretta tra disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa e produzione di ROS.

Lo stress ossidativo ipotizzato potrebbe anche dipendere dal rallentamento del flusso di elettroni lungo la catena di trasporto mitocondriale, dovuto alla parziale inibizione dei complessi di trasporto. I risultati ottenuti Nakagawa & Tayama, 2000 mostrano come, oltre all'effetto di disaccoppiamento, i composti bisfenolici siano in grado di inibire parzialmente la catena di trasporto elettronico, principalmente a livello dei Complessi I e II di mitocondri isolati di epatociti di ratto. Contrariamente ai mammiferi, i mitocondri di *S. cerevisiae* non possiedono un Complesso I-tipo NADH deidrogenasi multi-subunità [Bakker *et al.*, 2001]; è invece presente la succinato deidrogenasi (Complesso II) [Lemire & Oyedotun, 2002]. Si può dunque supporre che, nel caso di *S. cerevisiae*, avvenga una parziale inibizione del Complesso II da parte dei composti bisfenolici.

Il rallentamento del flusso di elettroni attraverso la catena di trasporto elettronico mitocondriale e l'aumento del consumo di O₂ (a causa dell'effetto disaccoppiamento) potrebbe promuovere una riduzione incompleta dell'O₂ e dunque la formazione di ROS a livello del Complesso IV (citocromo c ossidasi). In condizioni normali, tale complesso riduce completamente l'O₂ a H₂O e la produzione di composti intermedi di O₂ parzialmente ridotto è molto bassa, ma l'interferenza di tipo iperstimolatorio potrebbe aumentare tale produzione.

Infine, almeno nel caso di BPA, lo stress ossidativo potrebbe essere dovuto ad un'attività alterata dei *free radical scavengers*. Diversi studi hanno dimostrato come l'esposizione al BPA promuova lo stress ossidativo attraverso l'alterazione delle attività enzimatiche di superossido dismutasi, catalasi, glutazione reduttasi e glutazione perossidasi [Kabuto *et al.*, 2002; Chitra *et al.*, 2003] e la sua influenza sulla sintesi ed il riciclo del glutazione [Gualtieri *et al.*, 2011].

Il coinvolgimento parallelo o sequenziale di questi tre meccanismi (interferenza di tipo iperstimolatorio, rallentamento del flusso di elettroni ed attività alterata dei *free radical scavengers*) potrebbe determinare uno stress ossidativo, e dunque l'interferenza di tipo inibitorio (valori δ positivi).

In questo studio, il 2,4 DNP è stato utilizzato come composto di riferimento per i suoi effetti di stimolazione della respirazione cellulare causata dall'induzione del disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa [Chance & Williams, 1956]. Per gli acidi deboli con proprietà lipofile (come il 2,4 DNP) il meccanismo di disaccoppiamento si basa su un'azione protonofora *carrier type* della

molecola. Nelle nostre condizioni sperimentali, l'interferenza di tipo iperstimolatorio a seguito dell'esposizione a DNP 2,4 (valori negativi del ρ %) si osserva solo per il tempo <24 h alla dose più bassa testata (5 ppm) (Fig.18). Infatti i biosaggi respirometrici condotti utilizzando la stessa dose per 24 h di esposizione mostrano una parziale inibizione della respirazione fino a completa inibizione a dosi più elevate (Fig.17).

Questi risultati differenti tra 2,4 DNP e composti bisfenolici sarebbero da attribuire alle differenti cinetiche di comparsa delle due interferenze (tempo-dipendenza dei fenomeni di tossicità), probabilmente perché basate su meccanismi differenti, oltre ad una dose dipendenza con un generale aumento dell'interferenza di tipo inibitoria sulla respirazione delle cellule di *S. cerevisiae*.

Alla più alta dose testata (0,41 mM), il più alto valore di δ % (42,34 %) per il BPB sembrerebbe riflettere la maggiore tossicità di questo composto rispetto al BPA (17,09%). Una possibile spiegazione potrebbe essere correlata alle differenze strutturali tra i due composti: le misure NMR effettuate da Okamura e collaboratori (1999) indicano come BPA interagisca con la membrana fosfolipidica modello con i due gruppi -CH₃ orientati verso l'interno del doppio strato [Okamura *et al*., 1999]. La presenza nel BPB di un gruppo di -CH₃ in più nella catena idrocarburica tra i due gruppi fenolici potrebbe rendere l'interazione con la membrana ancora più forte e quindi aumentare la citotossicità del composto.

A sostegno di questa ipotesi, i risultati di uno studio comparativo tra i diversi composti bisfenolici indicano come la citotossicità di questi composti sembrerebbe aumentare con la lunghezza relativa e / o il peso molecolare del ponte idrocarburico tra i due gruppi fenolici probabilmente a causa della maggiore affinità per il nucleo lipidico della membrana [Nakagawa & Tayama, 2000].

1.3.2 Diuron

Dai risultati riportati in letteratura il diuron risulta essere un inibitore debole del citocromo bc1 (Complesso III) della catena di trasporto elettronico mitocondriale [Fisher & Meunier, 2008]; tuttavia gli studi riportati in letteratura mostrano effetti inibitori di concentrazioni comprese tra 10^{-6} e 10^{-5} M [Convent & Briquet, 1978; Estève *et al.*, 2009; Hollis *et al.*, 2000]. In questo studio è stata invece evidenziata un'inibizione della respirazione cellulare per concentrazioni di diuron $\leq 10^{-6}$ M, sia per esposizioni a breve termine (Fig. 23) che a lungo termine (Fig. 24). Sono stati effettuati test statistici utilizzando ANOVA for Randomised Block Design ed è stata trovata una relazione significativa tra i campioni di controllo (bianchi) ed i campioni test (esposti) per tutte le concentrazioni e per entrambi i tempi di esposizione ($p < 0,03$). L'unica eccezione ha riguardato i risultati per esposizione a breve termine al diuron 10^{-6} M poiché in queste condizioni non c'è inibizione ($\rho\% = 0$): in questo caso il test non restituisce un valore significativo a causa della mancanza di differenza tra i campioni bianchi ed esposti.

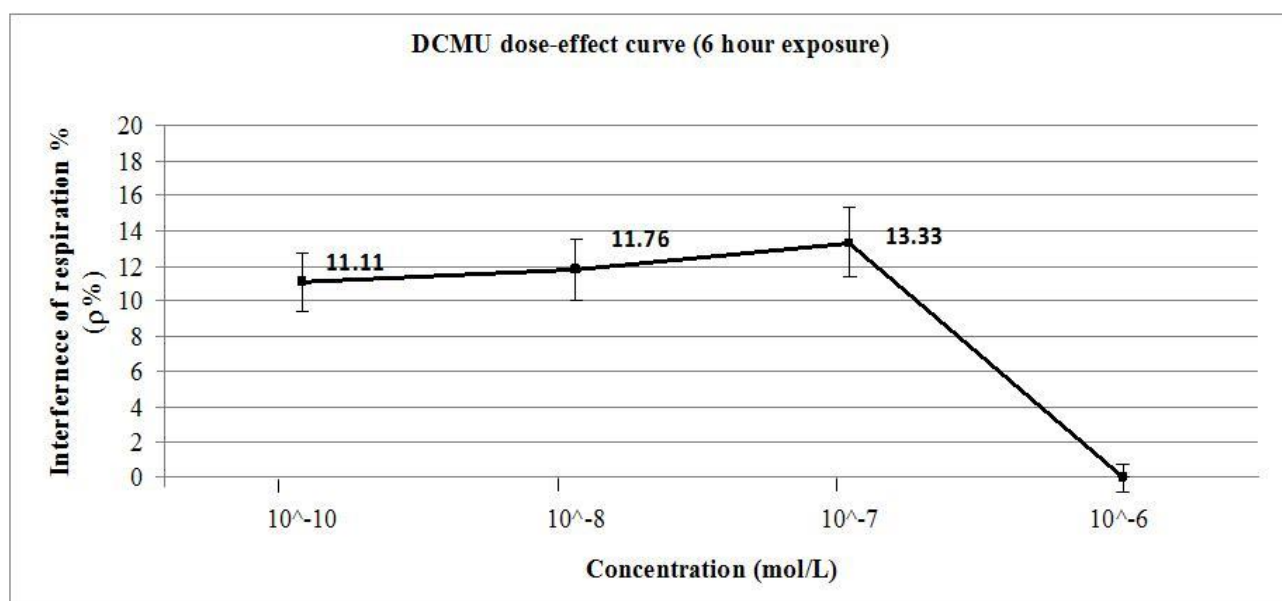


Fig. 23. Curva dose-effetto per 6h di esposizione di *S. cerevisiae* a diverse concentrazioni di diuron (tratta da Dragone *et al.*, 2015).

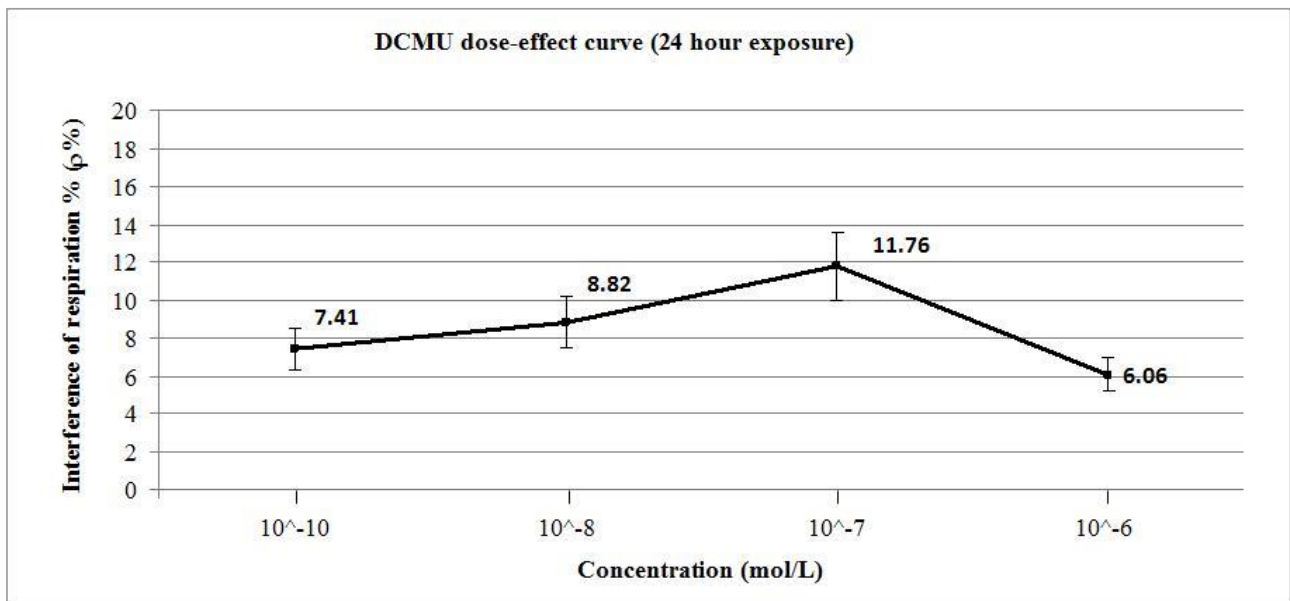


Fig. 24. Curva dose-effetto per 24h di esposizione di *S. cerevisiae* a diverse concentrazioni di diuron (tratti da Dragone *et al.*, 2015).

L'interpretazione dei risultati si è basata sullo studio della letteratura scientifica disponibile per *S. cerevisiae*. In particolare i *trend* ottenuti inducono ad ipotizzare il coinvolgimento di almeno tre meccanismi intracellulari dimostrati per *S. cerevisiae* esposto a xenobiotici:

- un meccanismo di **tossicità**;
- un meccanismo di **detossificazione/difesa** cellulare;
- un meccanismo di **riparazione** cellulare.

Per quanto riguarda il meccanismo di tossicità, l'inibizione osservata trova una possibile spiegazione nella presenza di stress ossidativo dovuta alle specie reattive dell'ossigeno (ROS). In presenza di alcune sostanze come antimicina A, Complesso III è uno dei principali siti per la produzione di ROS [Chen *et al.*, 2003] e il diuron è un inibitore che agisce in modo simile all'antimicina A sul Complesso III in *S. cerevisiae* [Convent & Briquet, 1978; Convent *et al.*, 1978; Fisher & Meunier, 2008; Giessler *et al.*, 1994; Meunier & Colson, 1989; Rieske, 1980].

Riguardo il meccanismo di detossificazione cellulare, questo potrebbe essere legato all'azione di un sistema presente in *S. cerevisiae*, basato sull'estruzione cellulare di xenobiotici (compresi erbicidi) queste molecole tramite pompe d'efflusso situate sulla membrana plasmatica (chiamate *ATP-binding cassette* o trasportatori ABC) (Fig. 25).

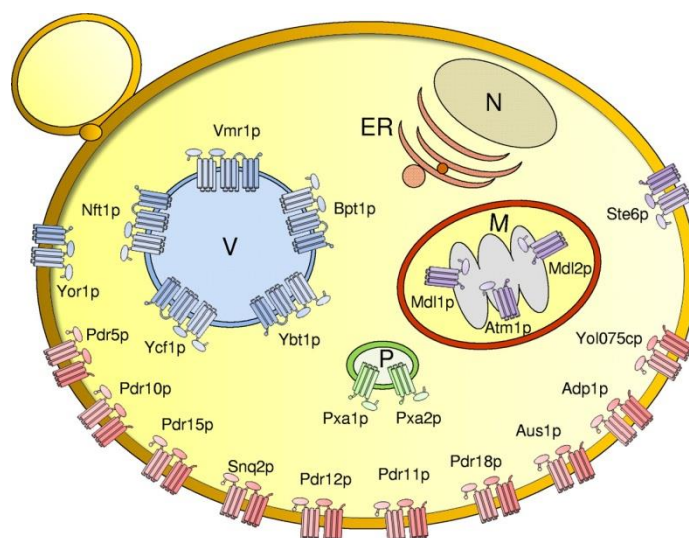


Fig. 25. Localizzazione subcellulare dei trasportatori ABC di *S. cerevisiae* (tratta da Paumi *et al.*, 2009).

I trasportatori ABC della membrana plasmatica mediano la traslocazione ATP-dipendente di un gran numero di composti strutturalmente e funzionalmente non correlati e possono essere visti come la prima linea di difesa in *S. cerevisiae* [Jungwirth & Kuchler, 2006; Roger *et al.*, 2001].

Il ruolo dei trasportatori ABC nella resistenza al diuron nelle cellule di *S. cerevisiae* è stata dimostrata [Roger *et al.*, 2001]. Comunque, poiché la maggior parte delle conoscenze sul *network* PDR è emersa dagli esperimenti effettuati utilizzando tecniche come *gene knockout*, il funzionamento dinamico di questo *network* è ancora poco conosciuto [Fardeau *et al.*, 2007].

Riguardo invece il meccanismo di riparazione cellulare, questo sarebbe legato all'induzione di una risposta adattativa allo stress ossidativo dovuta all'accumulo di ROS. Nelle cellule di *S. cerevisiae*, come in tutti gli organismi aerobici, esistono meccanismi di difesa e protezione contro lo stress ossidativo, come *free radical scavengers*, e sistemi di riparazione / rimozione delle molecole danneggiate (es. proteine e lipidi) [Herrero *et al.*, 2008, Moradas-Ferreira & Costa, 2000].

E' importante menzionare come ognuno di questi processi sia caratterizzato da una propria cinetica d'innesco e d'azione, che si suppone siano dose e tempo d'esposizione dipendenti. Queste cinetiche sono d'importanza critica per l'interpretazione dei risultati ottenuti: secondo l'interpretazione data, i valori di $\rho\%$ provengono dalla combinazione cinetica delle velocità dei tre meccanismi, come una sorta di istantanea ai due tempi di esposizione di 6h e 24h.

Nelle condizioni sperimentali adottate, i meccanismi di detossificazione e riparazione cellulare sembrano già essere attivi durante l'esposizione a breve termine (come dimostrato in cellule di *S. cerevisiae* esposte all'erbicida acido 2,4 diclorofenossiacetico) [Teixeira *et al.*, 2004]: infatti, alle dosi comprese tra 10^{-10} M e 10^{-7} M, i valori di $\rho\%$ diminuiscono quando il tempo di esposizione aumenta

da 6h a 24h; alla dose di 10^{-6} M, invece, l'aumentare del tempo d'esposizione determinerebbe una prevalenza del meccanismo di tossicità sui meccanismi di detossificazione e riparazione, (già attivati al tempo di esposizione di 6h).

Infine, va anche menzionato il possibile verificarsi di accumulo di diuron a livello delle membrane mitocondriali tramite interazione di questo erbicida con il fosfolipide fosfatidilcolina (PC). PC è un importante costituente dei fosfolipidi di entrambe le membrane mitocondriali in *S. cerevisiae* [Janssen *et al.*, 1999] (vedi sezione Risultati e discussione per i composti bisfenolici). Le interazioni specifiche tra le teste polari delle molecole di PC e dei gruppi funzionali delle molecole di diuron è stato recentemente sfruttata per la progettazione di nuove formulazioni a lento rilascio di diuron basato sull'incorporazione dell'erbicida in vescicole di PC [Undabeytia *et al.*, 2012].

Pertanto, negli scenari di esposizione a 6h e 24 h possono essere discussi come segue:

- per l'esposizione a breve termine (6h), i risultati ottenuti mostrano un'interferenza sulla respirazione cellulare per le concentrazioni di diuron comprese tra 10^{-10} M - 10^{-7} M che drasticamente diminuisce a zero per la concentrazione di 10^{-6} M (Fig. 22). Secondo lo "schema a tre meccanismi" la più alta concentrazione testata (10^{-6} M) è in grado di attivare i meccanismi di detossificazione e riparazione cellulare (spiegando in questo modo il valore di $\rho\% = 0\%$); a più basse dosi ($10^{-10} - 10^{-7}$ M) tale attivazione è ritardata a causa di un effetto di tolleranza, quindi, permettendo l'eventuale accumulo del diuron a livello mitocondriale e l'innescò del meccanismo di tossicità (spiegando così il valore $\rho\%$ compresi tra l'11% e il 13%).

- per l'esposizione a lungo termine (24h); il valore del $\rho\%$ per l'esposizione al diuron 10^{-6} M si mostra invece significativamente diverso rispetto a quello ottenuto per l'esposizione a 6h (Fig. 24). Questo interessante valore può essere spiegato in termini di saturazione dei meccanismi cellulari di detossificazione/riparazione. In queste condizioni il diuron può dunque accumularsi ed esercitare l'effetto inibitorio sulla respirazione ($\rho\% = 6,06\%$), mentre a più basse dosi tale effetto viene attenuato dalla rapidità d'azione dei meccanismi di detossificazione/riparazione ($\rho\% = 7,41\%$ per 10^{-10} M; $\rho\% = 8,82\%$ per 10^{-8} M; $\rho\% = 11,76\%$ per 10^{-7} M).

1.3.3 Conservanti del legno

La biosonda amperometrica a cellule intatte è stata impiegata per valutare l'interferenza sulla respirazione di *S. cerevisiae* esposte a diversi conservanti per il legno. I risultati sono riportati nelle Tab. 4 e 5:

Tab. 4. Risultati dei biosaggi respirometrici ottenuti impiegando cellule intatte di *S. cerevisiae* quali mediatori biologici della biosonda amperometrica; RSD% ≤ 7% su quattro replicate; ud = non rilevabile nd = non determinato.

Conservante del legno	ρ%			
	Concentrazione (% v/v)			
	0,25	2,4	4,7	9,0
(Wolmanit) CX-10	88	93	97	nd
ACQ	ud	22	79	nd
CCA-C (Tanalith C)	ud	63	66	nd
Tanalith E	ud	ud	42	93

Tab. 5. Confronto dei risultati ottenuti utilizzando cellule intatte e sferoplasti di *S. cerevisiae* quali mediatori biologici della biosonda amperometrica; RSD% ≤ 7 su quattro replicate; ud = non rilevabile nd = non determinato.

Sostanza	Concentrazione (%v/v)	ρ% Cellule intatte	ρ% Sferoplasti
CCA-C (Tanalith C)	2,4	63	84
	1,5	61	80
	0,25	ud	34
Hg	0,42	92	98
	0,30	67	81
	0,20	53	69

Il valore più alto del ρ% (97%) risultato per il Wolmanith CX-10 al 4,7% rispetto agli altri conservanti alla stessa concentrazione può essere spiegato per la nota efficacia del chelato Cu-HDO quale biocida verso un ampio spettro di microorganismi, incluso *S. cerevisiae* [Huff *et al.*, 2011].

Per i conservanti ACQ, CCA-C e Tanalith E alle più basse concentrazioni testate (0,25% v/v) non è stato possibile rilevare alcun effetto probabilmente perché a queste concentrazioni le componenti attive dei conservanti non sono in grado di penetrare le cellule di *S. cerevisiae* ed interferire con la funzione respiratoria mitocondriale. Lo stesso risultato si è ottenuto per il Tanalith E al 2.4% (v/v) e dunque per questo conservante è stata testata una concentrazione in più (9% con IRA index del 93%).

La stessa metodologia (utilizzando però cellule modificate o sferoplasti di *S. cerevisiae* quali elementi biologici di riconoscimento) è stata poi impiegata per lo studio degli effetti di due sostanze

selezionate: lo ione Hg^{2+} quale metallo pesante in grado di interferire in modo significativo ($\rho\% = 53\%$) con la funzione respiratoria di *S. cerevisiae* non modificato già a basse dosi (0,20% v/v) e il conservante per il legno CCA-C. L'unico cambiamento nella procedura è stato l'incubazione (durata 2h) del dischetto di terreno agarizzato contenente le cellule di *S. cerevisiae* con una soluzione enzimatica di zymolyase in tampone fosfato e sorbitolo (descritta nella sezione Materiali e Metodi) prima dell'assemblaggio della biosonda amperometrica. I risultati (riportati in Tab. 5) mostrano come la parziale rimozione della parete cellulare:

- i) determini un aumento (fino al 33%) del $\rho\%$ per tutte le concentrazioni testate;
- ii) permetta la rilevazione degli effetti di interferenza sulla respirazione a più basse concentrazioni (in questo senso il risultato ottenuto per il CCA-C allo 0,25% v/v è particolarmente significativo).

La spiegazione dei risultati ottenuti con gli sferoplasti risiede nella capacità della parete cellulare di accumulare cationi di metalli o di metalloidi attraverso un meccanismo non selettivo; questa capacità ritentiva (basata sulla chelazione dei cationi) può essere osservata sia utilizzando cellule intere che le componenti isolate della parete cellulare [Wang & Chen, 2006].

La presenza di diversi gruppi funzionali (es. gruppi carbossilici, idrossilici, amminici o imidazolici) può facilitare interazioni chimico-fisiche tra la parete cellulare ed i cationi [Jianlong, 2002; Brady & Duncan, 1994]. In particolare l'analisi di spettroscopia infrarossa su componenti della parete cellulare di *S. cerevisiae* parzialmente purificati ha permesso di caratterizzare le interazioni con i cationi di metalli pesanti [Brady, *et al.*, 1994]; i dati indicano come, nel processo di accumulo, lo strato esterno di mannoproteine svolga un ruolo più importante dello strato interno di glucani e chitina [Brady *et al.*, 1994].

Riguardo le interazioni dei singoli elementi del CCA con la parete cellulare di *S. cerevisiae*, lo ione Cr^{6+} sembrerebbe essere efficacemente assorbito da *S. cerevisiae* in soluzione acquosa in condizioni di pH vicino alla neutralità [Krauter *et al.*, 1996], il bioassorbimento dello ione As^{5+} da parte di *S. cerevisiae* è stato poco approfondito, mentre riguardo lo ione Cu^{2+} analisi di spettroscopia infrarossa hanno evidenziato come i gruppi funzionali carbossilici ed amminici sembrerebbero svolgere il ruolo più importante nell'adsorbimento di questo ione [Dong *et al.*, 2009].

Nel complesso tali interazioni potrebbero quindi rallentare il passaggio intracellulare delle componenti inorganiche del CCA-C, giustificando i valori più bassi del $\rho\%$ ottenuti utilizzando cellule intatte (e l'impossibilità di rilevare l'effetto d'interferenza alla concentrazione di 0,25% v/v).

Il secondo *step* dell'assorbimento di cationi di metalli o di metalloidi da parte di *S. cerevisiae* coinvolge il trasporto attraverso la membrana plasmatica (ad esempio, per diffusione o per trasporto

attivo) [Pócsi, 2011]. Probabilmente a seguito della parziale rimozione della parete, la diffusione dei cationi all'interno della cella non è ostacolata; ciò determina la maggiore sensibilità delle cellule di *S. cerevisiae* modificate (sferoplasti) verso le sostanze testate. La modificazione strutturale delle cellule di *S. cerevisiae* attraverso un semplice trattamento enzimatico (durata 2h) ha consentito di ottenere un mediatore biologico mai utilizzato prima, più sensibile, mantenendo accettabile la rapidità del biosaggio respirometrico. L'assenza della parete cellulare rende però gli sferoplasti più vulnerabili alle variazioni di osmolarità delle soluzioni testate (rispetto alle cellule intatte di *S. cerevisiae*); questo aspetto deve essere necessariamente considerato durante la fase di progettazione della biosonda.

1.4 Conclusioni

La biosonda amperometrica a cellule di *S. cerevisiae* si è mostrata adatta per evidenziare l'interferenza sulla respirazione cellulare (catabolismo aerobio) dovuta all'esposizione a diverse concentrazioni di composti bisfenolici (BPA e BPB) e due tipi di pesticidi (l'erbicida diuron ed i conservanti del legno).

In particolare riguardo i composti bisfenolici, l'esposizione per 24 h a diverse concentrazioni (*range* 0,2 – 0,44 mM) ha prodotto due tipi di interferenza: una di tipo iperstimolatorio (legata ad un meccanismo di disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa) ed una di tipo inibitorio (legata all'induzione di uno stress ossidativo). Dai risultati ottenuti, confrontati con quelli del 2,4 DNP (composto di riferimento dai noti effetti mitocondriali), appaiono evidenti una tempo-dipendenza oltre ad una dose dipendenza dei fenomeni di tossicità ed i dati riportati in letteratura hanno permesso di formulare una serie di ipotesi circa le possibili cause di tali interferenze ed i meccanismi coinvolti.

Riguardo i risultati ottenuti per l'erbicida diuron, la biosonda amperometrica ha evidenziato gli effetti di questo pesticida per concentrazioni $\leq 10^{-6}$ M (fino a 10^4 volte più basse rispetto a quelle riportate sinora in letteratura e fino a 4 volte sotto il limite europeo per la presenza di singolo pesticida in acqua potabile) sia per esposizioni a breve termine (6h) che a lungo termine (24h); in generale i risultati ottenuti si adattano bene ai meccanismi riportati e descritti in letteratura per *S. cerevisiae*. Più specificatamente i *trend* ottenuti sarebbero da attribuirsi al coinvolgimento di almeno tre meccanismi: tossicità, detossificazione e riparazione cellulare; le differenze intrinseche nelle cinetiche d'innescio e d'azione di tali meccanismi (presumibilmente dose- e tempo d'esposizione dipendenti) influenzano i valori di $p\%$ ed i *trend* delle curve dose-effetto per entrambi i tempi di esposizione.

Riguardo i risultati ottenuti per i conservanti del legno, il cambiamento della composizione percentuale del terreno di coltura per *S. cerevisiae* ha permesso di ottenere una concentrazione di cellule adatta per i biosaggi respirometrici e minore (a vantaggio della sensibilità del metodo) rispetto

a quella riportata per il terreno tradizionale. L'utilizzo di sferoplasti di *S. cerevisiae* (cellule parzialmente private della parete cellulare) ha determinato un aumento (fino al 33%) del $\rho\%$ per tutte le concentrazioni delle sostanze testate, consentendo la rilevazione degli effetti di interferenza sulla respirazione cellulare a più basse concentrazioni. La modificazione strutturale delle cellule di *S. cerevisiae* attraverso un semplice trattamento enzimatico (durata 2h) ha consentito di ottenere un mediatore biologico mai utilizzato prima, più sensibile, mantenendo accettabile la rapidità del biosaggio respirometrico. L'assenza della parete cellulare rende però gli sferoplasti più vulnerabili alle variazioni di osmolarità delle soluzioni testate (rispetto alle cellule intatte di *S. cerevisiae*); questo aspetto deve essere necessariamente considerato durante la fase di progettazione della biosonda.

Complessivamente l'utilizzo della biosonda amperometrica a cellule di *S. cerevisiae* si è dimostrato adatto per gli scopi prefissati di studio delle interferenze sul catabolismo aerobio derivanti dall'esposizione a diversi residui e contaminanti potenzialmente presenti negli alimenti (per alcuni questo tipo di interferenza non è ancora stata ben investigata).

Il vantaggio dell'utilizzo di questa biosonda per studi di effetti sulla respirazione cellulare risiede nella semplicità del sistema proposto, rispetto a quelli descritti in letteratura (che utilizzano ad es. mitocondri isolati). Inoltre l'applicazione di tale dispositivo consente di evidenziare, in come in una sorta di fotografia istantanea, la risultante della combinazione dei fenomeni tossicologici e degli effetti sulla respirazione cellulare.

2- BIOSONDA OTTICA A CELLULE MICROBICHE WILD TYPE E TRANSGENICHE DI *ESCHERICHIA COLI*

Introduzione

La tecnologia descritta in questa seconda parte della tesi di Dottorato è basata sull'utilizzo di una biosonda ottica mediante la progettazione e sviluppo di un sistema relativamente rapido (~ 3h) per la rilevazione di residui di antibiotici chinolonici nel latte bovino, basata essenzialmente sulla rilevazione dell'effetto dovuto all'interazione cellulare con molecole appartenenti alla classe dei chinolonici. Nello specifico tale tecnologia è basata su microrganismi unicellulari, utilizzati sia tal quali che opportunamente modificati (OGM *bioreporter inducibili* e *costitutivi*), in grado di rispondere in modo specifico e sufficientemente rapido (~ 3h) quando esposti ai chinolonici alla concentrazione di interesse ovvero a concentrazione ≤ 1 LMR (acronimo di *Limite Massimo di Residuo*).

Durante la prima fase del progetto di ricerca è stato selezionato il batterio *E. coli* ATCC 11303 in quanto si tratta di un microorganismo precedentemente utilizzato per test di *screening* in piastra (su campioni reali, inclusi quelli di latte) per la rilevazione di antibiotici chinolonici [Althaus *et al.*, 2009; Ferrini *et al.*, 2006; Gaudin *et al.*, 2004; Nouwset *et al.*, 1999; Myllyniemi *et al.*, 2001; Okerman *et al.*, 2001]. Nella prima fase sperimentale si è verificato se l'*E. coli* selezionato rispondesse alla presenza di chinolonici in terreno liquido (condizione differente da quella dei metodi in piastra descritti in letteratura), il cui meccanismo è l'inibizione della replicazione del DNA (processo fondamentale prima della duplicazione cellulare). In particolare è stata utilizzata la **ciprofloxacina** quale chinolone "modello" [Riddle *et al.*, 2000]; si tratta del metabolita attivo dell'enrofloxacin (altro chinolone di interesse veterinario) nonchè la prima molecola del gruppo ad essere impiegata in campo veterinario per il trattamento delle infezioni da *E. coli*, *Salmonella*, *Pasteurella*, *Mycoplasma* e ad oggi usato anche nel pollame, nel bestiame bovino, nei maiali e in acquacoltura [Cocker *et al.*, 2002; Skirrow and Blaser, 2000].

Inizialmente è stata valutata la possibilità di rilevazione indiretta dell'inibizione della proliferazione cellulare di *E. coli* ATCC 11303 wild type mediante la rilevazione delle variazioni nel catabolismo del lattosio: sono stati quindi eseguiti test, dopo esposizione a ciprofloxacina, misurando **l'attività enzimatica della β -galattosidasi endogena (misura ottica di assorbimento)**. I risultati positivi ottenuti hanno confermato la possibilità di rilevazione dell'effetto dei chinolonici su tale microorganismo e quindi, dell'assenza di eventuali impedimenti chimico-strutturali all'ingresso intracellulare dell'antibiotico in terreno liquido (condizione fondamentale per i test con cellule ingegnerizzate - OGM).

Considerando i risultati positivi ottenuti una prima ingegnerizzazione delle cellule ha riguardato la realizzazione di un *bioreporter* basato sulla **misura ottica di emissione di fluorescenza** correlata all'**attività del promotore lac** (sequenza nucleotidica dell'operone lac che regola la trascrizione dei geni coinvolti nel catabolismo del lattosio) a monte del *gene reporter* codificante la proteina fluorescente mCherry.

Nella seconda fase del progetto si è proceduti all'ingegnerizzazione di un secondo ceppo di *E. coli* il DH5 α (risultato più adatto rispetto al ceppo ATCC 11303) mediante la messa a punto di un opportuno costruito di DNA contenente un promotore chinolone-inducibile (**promotore yorB**, identificato a seguito di un'attenta analisi critica della letteratura scientifica) a monte di un *gene reporter* codificante una proteina fluorescente (**mCherry** o **GFP**). Le cellule ingegnerizzate sono state poi utilizzate per le **misure ottiche in emissione (fluorimetriche) correlate all'attività del promotore yorB ciprofloxacina inducibile**.

2.1 Basi della ricerca

2.1.1 Antibiotici zootecnici: aspetti di sanità pubblica e metodi di *screening*

In ogni fase della produzione lattiero-casearia esiste un rischio, più o meno rilevante, di contaminazione da parte di un'ampia gamma di sostanze chimiche. Queste includono i prodotti chimici utilizzati in azienda (pesticidi, detersivi, sanificanti), contaminanti presenti nell'acqua di abbeverata e nei mangimi (es. inquinanti organici persistenti, metalli pesanti e micotossine) oppure sostanze provenienti da trattamenti terapeutici dell'animale (ad es. antibiotici).

L'utilizzo di antibiotici nella pratica veterinaria è diffuso sia per il trattamento sia per la prevenzione di patologie ad eziologia microbica. In ambito zootecnico esiste anche la possibilità di impiego fraudolento o non controllato di tali farmaci che, se somministrati con la dieta, hanno la capacità fungere da promotori della crescita dell'animale da reddito. I chinolonici sono tra gli antibiotici maggiormente utilizzati in veterinaria (includendo nella categoria anche le sostanze antibatteriche di sintesi), ed in particolare il sottogruppo dei fluorochinoloni. Queste molecole farmacologiche possiedono un'attività antimicrobica rapida e ad ampio spettro verso batteri d'interesse clinico (la maggior parte dei batteri Gram-negativi e alcuni Gram-positivi), sono ben tollerati dagli animali e possono essere somministrati per differenti vie.

Come per gli antibiotici appartenenti ad altre classi, la presenza dei residui chinolonici negli alimenti di origine animale (incluso il latte) determina una serie di problemi:

i) problemi di natura sanitario-tossicologica:

- fenomeni di antibiotico-resistenza;
- depauperamento della normale flora intestinale;
- bioaccumulo;
- reazioni d'ipersensibilità e intolleranze nei consumatori.

ii) problemi di natura tecnologica nell'azienda di trasformazione:

- azione inibitoria verso la microflora lattica e conseguente compromissione delle caratteristiche tecnologiche del prodotto utilizzato per la produzione di prodotti fermentati.

Il largo utilizzo di antibiotici, l'utilizzo di mangimi medicati, l'adozione di misure profilattiche di massa e l'utilizzo di farmaci antimicrobici come promotori di crescita hanno portato ad una pressione selettiva che è alla base del progressivo aumento dei fenomeni di antibiotico resistenza. Si tratta di una problematica allarmante, oggetto della Direttiva 2003/99/EC e considerata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come uno dei principali problemi emergenti di Sanità Pubblica. Frequentemente infatti si verifica l'insorgenza di ceppi batterici a resistenza crociata, estesa cioè a più antibiotici con caratteristiche simili compromettendone così l'uso futuro.

In particolare, il problema riguarda la somministrazione in zootecnia di molecole impiegate anche in terapia umana [Mølbak K., 1999; Van Looveren *et al.*, 2001; White *et al.*, 2001]. Tra i più recenti esempi di selezione di ceppi zoonotici resistenti e di successiva diffusione all'uomo c'è quello della resistenza ai chinoloni, antibiotici battericidi ad ampio spettro, approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) anche per uso veterinario nel 1994.

I chinoloni e i fluorochinoloni sono inibitori selettivi della DNA girasi o topoisomerasi IV e quindi della duplicazione e trascrizione del DNA batterico. Le principali azioni veterinarie nel trattamento delle infezioni delle vie respiratorie e del tratto gastrointestinale impiegano i fluorochinoloni di terza generazione (sottogruppo di chinoloni ad ampio spettro d'azione, espanso in particolare contro Gram positivi patogeni quali *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* ed un' aumentata efficienza contro Gram negativi quali *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*).

L'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) e il Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC) hanno pubblicato la seconda relazione congiunta sulla resistenza agli antimicrobici nei batteri zoonosici.

I dati del 2010 provenienti dagli Stati membri dell'UE segnalano la diretta implicazione dell'uso di fluorochinoloni in allevamento (es. ciprofloxacina e acido nalidixico) nello sviluppo della resistenza a questa classe di farmaci antimicrobici da parte di *Salmonella* e *Campylobacter*. La campilobatteriosi umana è comunemente una malattia autolimitante e trattata con farmaci antimicrobici al fine di diminuire la durata temporale delle manifestazioni cliniche e prevenire le possibili complicazioni. Gli antimicrobici di prima scelta risultano essere proprio i fluorochinoloni e, tra questi, la ciprofloxacina. La **ciprofloxacina** (Fig. 26) è metabolita attivo dell'enrofloxacin, la prima molecola del gruppo ad essere impiegata in campo veterinario per il trattamento delle infezioni da *E. coli*, *Salmonella*, *Pasteurella*, *Mycoplasma* e ad oggi usato anche nel pollame, nel bestiame bovino, nei maiali e in acquacoltura [Cocker *et al.*, 2002; Skirrow & Blaser, 2000].

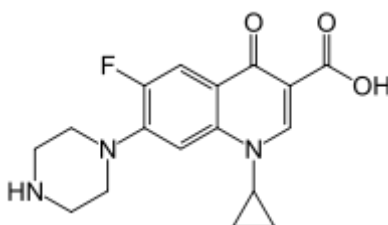


Fig. 26. Struttura molecolare della ciprofloxacina

Fino a pochi anni fa la resistenza ai fluorochinoloni era attribuita esclusivamente a modificazioni cromosomiali e alla conseguente alterazione degli enzimi bersaglio (DNA girasi o topoisomerasi IV), spesso in combinazione con la ridotta espressione di porine nella membrana esterna (diminuzione della permeabilità di membrana) o con l'iperespressione di pompe d'efflusso. In *Campylobacter* la resistenza a tali antibiotici è mediata da una mutazione puntiforme del gene *gyrA* che conferisce resistenza ad alte dosi di chemioterapico (MIC ciprofloxacina >16 µg/ml) [Luo *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Ge *et al.*, 2005]. Solo negli ultimi anni sono stati descritti meccanismi di resistenza mediati da plasmidi, determinanti di resistenza trasferibili che contribuiscono alla loro disseminazione e che spesso portano altri geni di resistenza clinicamente rilevanti (espressione di proteine Qnr, espressione di una aminoglicoside acetiltransferasi fluorochinolone-specifica, espressione di un trasportatore della famiglia MFS) [Robicsek *et al.*, 2006; Robicsek *et al.*, 2006a; Jacoby, 2005; Tran & Jacoby, 2002; Périchon *et al.*, 2007].

Negli anni il criterio tossicologico in uso per la gestione dei residui di farmaci veterinari (circa 600 molecole, inclusi gli antibiotici) negli alimenti di origine animale ha subito un'evoluzione dal concetto di "residuo zero" a quello del Limite Massimo di Residui o Limite Massimo Residuale (**LMR**). La regolamentazione a livello comunitario (Reg. CEE 2377/90 e successivi aggiornamenti) stabilisce infatti, per determinate molecole di interesse, un valore di LMR, ovvero la concentrazione residuale

massima (espressa in mg/Kg o µg/Kg) che è tollerabile nei prodotti alimentari destinati al consumo umano.

Tab. 6. Principali fluorochinoloni utilizzati nei trattamenti veterinari di bovine da latte.

Fluorochinolone	Residuo <i>marker</i>*	LMR nel latte* (µg/ Kg)
Flumechina	Flumechina	50
Danofloxacin	Danofloxacin	30
Enrofloxacin	Somma di Enrofloxacin e Ciprofloxacina (prevalenza di Ciprofloxacina**)	100
Ciprofloxacina (principale metabolita attivo dell'Enrofloxacin)		
Marbofloxacina	Marbofloxacina	75

*(Reg. CE N.37/2010); ** (Idowu *et al.*, 2010).

Sulla base degli LMR viene stabilito il **tempo di sospensione** a cui il produttore primario, nel rispetto delle buone pratiche produttive, deve attenersi obbligatoriamente. Si tratta dell'intervallo di tempo che deve intercorrere tra l'ultima somministrazione dell'antibiotico e l'ottenimento di un prodotto salubre, che non contenga cioè residuo farmacologico oltre l'LMR. Il tempo di sospensione (stabilito sulla base di criteri tossicologici) dipende essenzialmente dal principio attivo del farmaco, dalla specie animale trattata e dal suo metabolismo, dalla via di somministrazione e dal prodotto considerato (latte, uova, carne, ecc.). Durante il tempo di sospensione, il latte prodotto dall'animale viene separato in fase di mungitura e smaltito secondo la normativa vigente, con notevoli perdite economiche per l'azienda produttrice.

Nonostante le precauzioni adottate in azienda zootecnica, restano tuttavia frequenti i problemi di sicurezza alimentare legati ad eventi quali il mancato rispetto dei tempi di sospensione (isolamento inefficace dell'animale dal ciclo produttivo) o l'errata individuazione degli animali trattati (mancata tracciabilità dell'animale, che quindi confluisce nel gruppo produttivo). Per fronteggiare simili situazioni, negli ultimi anni la Comunità Europea ha ridefinito la normativa in materia di sicurezza alimentare con nuovi regolamenti che mirano all'applicazione del sistema HACCP (analisi dei pericoli e dei punti critici di controllo) e dell'autocontrollo aziendale (introdotto con la Dir. 93/43/CEE) sin dalla produzione primaria (attualmente, l'applicazione dei sistemi HACCP è obbligatoria solo per l'industria alimentare e la distribuzione). Per rispondere a *standard* di qualità sempre più elevati, la

Comunità Europea ha esteso l'obbligo di applicazione dei piani di autocontrollo basati sull'HACCP anche alla produzione primaria (es. mungitura e conservazione del latte in azienda agricola; Reg. CE n. 178/2002) e ad attività tecnico/produttive ad essa associate (es. la manipolazione di prodotti primari sul luogo di produzione), dove sino ad oggi era richiesta solamente la realizzazione ed applicazione di manuali di buona prassi igienica. Un contributo decisivo alla definizione delle modalità di applicazione dei piani HACCP è stato dato dal gruppo di Regolamenti CE 852/2004 – 853/2004 – 854/2004 e Direttiva 2002/99/CE noti complessivamente come “Pacchetto igiene” (integrato dal Reg. CE 183/2005 che stabilisce i requisiti per l'igiene dei mangimi). Questa ridefinizione del ruolo del produttore primario nel quadro della responsabilità di filiera nella valutazione e gestione del rischio (con audit da parte dell'autorità pubblica) comporta lo sviluppo e l'applicazione delle buone pratiche di produzione e del sistema HACCP nella realtà dell'impresa agro-zootecnica. Alla ricerca pubblica spetta il compito di trasferire il *know how* scientifico alle aziende per la redazione e l'aggiornamento dei piani di autocontrollo aziendali, nonché lo sviluppo di tecnologia trasferibile (economico, adeguato per dimensioni e resistenza, rapido, validato, facile nell'uso e nella manutenzione) e applicabile durante la quotidianità produttiva dell'azienda.

Sebbene l'interfaccia tra produzione primaria/post-primaria rappresenti un punto strategico della filiera, ad oggi questa non è supportata da adeguata tecnologia in grado di stabilire in tempi rapidi (tempi di conferimento del latte) la presenza di residui di antibiotici (come ad esempio i chinolonici) nel latte. Un monitoraggio rapido e in continuo della filiera lattiero-casearia rappresenta una vera rivoluzione nel settore zootecnico da latte, offrendo enormi vantaggi: minimizzare e tracciare la progressione nella produzione post-primaria di un latte certificato ma non conforme (per cause accidentali) a causa della presenza di residui chinolonici, e di supporto all'autocontrollo (verifica delle Buone Pratiche Aziendali) per i produttori primari.

In generale, i metodi analitici per il monitoraggio dei residui di farmaci veterinari possono essere classificati in due gruppi: **metodi di screening** e di conferma. La Commissione Europea raccomanda l'ottimizzazione di questi sistemi già in uso oltre che lo sviluppo di sistemi innovativi.

I metodi di conferma si basano principalmente su tecniche cromatografiche (cromatografia liquida, LC) accoppiate a tecniche di spettrometria di massa (MS) [Martins-Júnior *et al.*, 2007] o rilevazione UV [Marazuela & Moreno-Bondi, 2004]. Anche l'elettroforesi capillare rappresenta un valido approccio alternativo per l'analisi, la separazione e lo *screening* simultaneo di residui di antibiotici in campioni alimentari [García-Ruiz & Marina, 2006; Zhou *et al.*, 2008]. I metodi strumentali forniscono informazioni complete che consentono di identificare e quantificare la sostanza d'interesse; tuttavia, si tratta di tecniche complesse, costose, che richiedono personale qualificato, molto tempo e diverse procedure di preparazione (es. estrazione) del campione.

I metodi di *screening* sono caratterizzati da un elevato *throughput*, facilità di utilizzo, rapidità di analisi, buona selettività, basso costo, percentuale di campioni falsi negativi <5% (il tasso di falsi positivi accettabile per i metodi di *screening* validati si attesta invece intorno al 10% poiché rappresentano un rischio di natura esclusivamente economica per i produttori).

Nel corso degli ultimi anni i cambiamenti delle esigenze riguardo la determinazione di residui di farmaci veterinari hanno portato ad un grande aumento del numero di kit commerciali (basati su test di inibizione microbiologica e di dosaggio immunologico). I primi metodi di screening sviluppati per la rivelazione dei residui sono stati i **test basati sul principio dell'inibizione microbica**: questi test sfruttano la sensibilità di uno o più microrganismi all'antibiotico e a concentrazioni prossime al LMR e sono tutt'oggi ampiamente utilizzati. Kit basati su questo principio sono disponibili in commercio sia in versione da laboratorio che da campo (es. BR test, Eclipse test, Copan test, DelvoTest, Lumac, Arla, ecc.), danno una risposta di tipo qualitativo (presenza/assenza dell'antibiotico) e garantiscono una buona rivelazione principalmente di sulfamidici, beta-lattamici e tetracicline. Le versioni commerciali disponibili differiscono per il tipo dell'organismo di prova, dell'indicatore, della temperatura e del periodo di incubazione richiesti, e nello spettro (più o meno ampio) dei residui rivelati.

I metodi microbiologici commerciali, soprattutto se paragonati ai metodi immunologici o recettoriali, sono economicamente vantaggiosi ed hanno la potenzialità di coprire un ampio spettro di molecole di interesse. Sono disponibili in 2 formati: *tube test* e *(multi)plate test*. Il primo, comunemente impiegato per lo *screening* di routine del latte, si presenta sotto forma di ampolle e piastre multi-test contenenti un agar semi-solido con un numero standardizzato di spore (ad es. di *Bacillus stearothermophilus*) e addizionato di un indicatore di pH. La proliferazione cellulare, o crescita batterica, determina, dopo incubazione (in assenza di antibiotico o sua presenza a concentrazione sub-inibente) a temperatura adeguata e per un periodo di tempo dell'ordine delle 3 ore, un'acidificazione del mezzo con conseguente viraggio colorimetrico, indicativo di un campione negativo. Su questo principio è basato anche il Valio T101U, esempio di test microbiologico commerciale per i chinoloni. Questo test utilizza come microrganismo lo *Streptococcus thermophilus* T101 (starter impiegato nella produzione di Emmenthal svizzero e di yogurt e sensibile ad un ampio spettro di antibiotici antimastitici, inclusi i chinoloni enrofloxacin e danofloxacin). Il test T101 può essere impiegato sia nell'azienda di produzione che in laboratorio per analizzare campioni di latte di singole vacche o latte di cisterna.

Ashwin *et al.* riportano lo sviluppo e la validazione di un metodo basato sul trattamento del campione per recuperare, purificare e concentrare le molecole di interesse seguito da un metodo basato sull'inibizione della crescita batterica e selettivo per i fluorochinoloni. Il test è presentato in un formato simile a quello dei test commerciali Premi Test® e Delvotest® (DSM, Delft, Paesi Bassi). Il

metodo necessita di essere ottimizzato per l'instabilità del microrganismo utilizzato (cellule vegetative), esistono tuttavia indicazioni preliminari sulla conferma della sensibilità del metodo e dei tempi di risposta (4.5 – 5 ore a 37°C) utilizzando un prototipo a cellule liofilizzate [Ashwin *et al.* 2009].

Il *format* multipiastra prevede invece l'utilizzo di piastre Petri contenenti un opportuno terreno agarizzato inoculato con il microrganismo test ad una concentrazione standardizzata (UFC/ml di terreno). Dischetti contenenti il campione addizionato con l'antibiotico (ad una concentrazione rilevabile dal sistema) e depositati sulla superficie del terreno solidificato sono in grado di inibire la crescita del ceppo test: dopo opportuna incubazione, sulle piastre sono distinguibili ad occhio aloni di inibizione della crescita batterica intorno ai diversi dischetti contenenti il campione antibiotato. L'impiego di soluzioni di conferma in grado di neutralizzare l'attività di specifiche classi di antibatterici (es. MgSO₄ per chinolonici) consente di ottenere un'indicazione presuntiva della classe di appartenenza dell'inibente presente. Infatti, previa aggiunta di tali soluzioni ai campioni positivi si ottiene la scomparsa dell'alone di inibizione. In questo modo i test di *screening* e *post-screening* possono essere condotti parallelamente e le analisi chimiche di conferma possono essere applicate solamente ai campioni positivi [Ferrini *et al.*, 2006].

Tra i metodi microbiologici multipiastra impiegati nella fase di screening è importante ricordare lo STAR method (metodo a 5 piastre) validato con campioni di latte addizionati di 66 antibiotici ad otto diverse concentrazioni. I chinoloni sono tra le famiglie rilevate a concentrazioni pari o inferiori all'LMR sulla piastra di *Escherichia coli* [Gaudin *et al.*, 2004]. Sebbene la combinazione di diversi batteri test consenta, potenzialmente, di coprire l'intero spettro di sostanze antibatteriche di interesse, un grosso limite dei metodi multipiastra è rappresentato dai lunghi tempi di risposta. L'incubazione prevista di 18-24 ore, necessaria per ottenere una patina uniforme facilmente distinguibile ad occhio, rallenta eccessivamente i tempi di analisi.

I **test basati su dosaggi immunologici** sono rapidi, forniscono generalmente risultati qualitativi (risposta sì/no senza indicazioni sulla concentrazione dell'analita) o semiquantitativi, e sono spesso test portatili utilizzabili *in situ*. Possono essere suddivisi in immunodosaggi competitivi, dosaggi immunometrici e dosaggi di *immunobinding* (dosaggi in fase solida). Nell'immunodosaggio competitivo (es. Parallax Assay) la molecola di antibiotico da analizzare (antigene) presente nel campione compete con una quantità fissa di antigene marcato, in presenza di una quantità limitante di antibiotico. All'equilibrio, l'antigene libero viene separato da quello legato all'anticorpo e la quantità di antigene marcato viene determinato (nel caso del Parallax Assay) mediante una misura di fluorescenza. Questo valore è inversamente proporzionale alla quantità di antibiotico presente nel campione. Tali dosaggi possono essere precisi, accurati ed economici; tuttavia, non si prestano ad

essere automatizzati, possono essere meno sensibili di altri immunodosaggi, comportano un certo dispendio di tempo e, in genere, la curva dose-risposta copre solo un intervallo di concentrazione relativamente ristretto.

I dosaggi immunometrici si differenziano dagli immunodosaggi competitivi per vari aspetti, sebbene forniscano un'informazione quantitativa simile. Sono stati messi a punto numerosi dosaggi immunometrici con anticorpi marcati con enzimi (Enzyme Immuno Assay o EIA molto spesso contrassegnati dalla sigla ELISA). La maggior parte utilizza un substrato colorimetrico che viene misurato (spettrofotometro) per determinare la concentrazione di antibiotico (antigene) presente nel campione. Tra i dosaggi di immunobinding (dosaggi in fase solida) si può citare l'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) competitivo: in questo sistema l'anticorpo non marcato viene incubato in presenza dell'antibiotico (antigene) presente nel campione. I kit ELISA disponibili in commercio (dosaggi di legame antigene-anticorpo marcato con enzimi), sono sistemi di rilevazione di facile esecuzione, semplici e in grado di dare risposte in tempi brevi. Nei formati commerciali le reazioni vengono, di norma, eseguite all'interno di pozzetti di polivinile o polistirene su cui sono adesi o gli anticorpi specifici per l'antigene di interesse o l'antigene stesso. Sono caratterizzati da una percentuale di falsi positivi abbastanza alta e dovuta ad interazioni aspecifiche tra gli anticorpi e le componenti della matrice (interferenti) in campioni non sufficientemente purificati.

2.1.2 Metodi di *screening*: l'approccio biosensoristico

Nell'ambito del controllo della filiera alimentare i metodi di *screening* rivestono un ruolo importante per quanto riguarda il rispetto delle norme di autocontrollo aziendale e quindi il loro sviluppo è raccomandato dalla stessa comunità europea. Ad esempio i test di *screening* basati su dosaggi immunometrici possiedono caratteristiche vantaggiose in termini di sensibilità e specificità; inoltre i tempi di analisi sono inferiori rispetto a quelli richiesti per i test microbiologici (che sono però più semplici ed economici). Tuttavia nessuno dei metodi di *screening* attualmente in uso sembra rispondere in modo completo a tutte le seguenti caratteristiche che risultano vantaggiose nell'ambito di un monitoraggio in continuo ed *in situ*:

- Rapidità/capacità di fornire risultati in tempo reale
- Precisione, affidabilità, ripetibilità
- Multi-analitico
- Misura quantitativa o semiquantitativa
- Economicità

- Applicazione *on-line*
- Automazione, utilizzo per il monitoraggio di processo
- Facilità di esecuzione (minima formazione necessaria da parte dell'operatore)

In una linea di produzione, il termine *rapido* può significare avere risultati analitici per un *tank* di latte in un tempo sufficiente per non acquisire il prodotto oppure rimuoverlo prima di farlo confluire nel *bulk* di produzione. Oltre alla filiera del latte alimentare, la possibilità di discriminare precocemente prodotti non conformi è dirimente anche, ad esempio, nei caseifici. Un test rapido dovrebbe dunque fornire risultati in tempo reale ossia con una tempistica che consenta una risposta adatta alle esigenze di produzione e che richieda una assente/minima preparazione del campione.

Per queste ragioni una metodologia collocabile per caratteristiche tra i sistemi di *screening* già in uso e le tecniche laboratoristiche di conferma sarebbe estremamente vantaggiosa; questi metodi potrebbero essere utilizzati all'interno della filiera produttiva nei controlli di *routine*, per un monitoraggio continuo dei diversi parametri di qualità/sicurezza della produzione e la gestione precoce delle situazioni di allerta. Negli ultimi anni lo sviluppo di nuovi metodi di *screening* è notevolmente aumenta (Fig. 27). Tra i metodi di ultima generazione, quelli basati sull'impiego di biosensori risultano i più interessanti poiché, ad esempio, si prestano alla completa automazione (riduzione dell'errore umano).

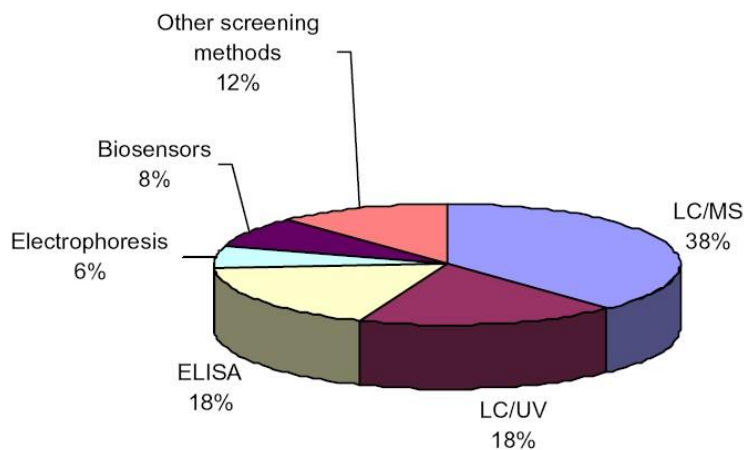


Fig. 27. Metodi analitici utilizzati per la determinazione degli antibiotici negli alimenti.
(tratta da Cháfer-Pericás *et al*, 2010).

La biosensoristica è una tecnologia particolarmente adatta per effettuare un monitoraggio in filiera, in continuo ed in tempo reale, di un gran numero di campioni. Tra i diversi vantaggi d'uso troviamo i costi relativamente ridotti, prestazioni analitiche superiori ai tradizionali metodi di screening, la

possibilità di automazione per l'effettuazione diretta da parte dell'operatore su campo (es. *tank* o sala mungitura) e un uso ridotto o assente di pretrattamenti del campione (monitoraggio in tempo reale) e di reattivi chimici (eco-compatibilità) [Dragone & Grasso, 2012].

2.1.3 Biosensori ottici, proteine fluorescenti e *bioreporter* cellulari

Negli ultimi due decenni, gli sviluppi nelle tecniche ottiche (es. sistemi a fibre ottiche) hanno dato un impulso allo sviluppo di sensori chimici e biosensori ottici di maggiore versatilità, portando alla realizzazione di nuovi dispositivi particolarmente promettenti per la loro potenziale applicazione, ad esempio, nella valutazione della qualità e della sicurezza alimentare [Narsaiah *et al.*, 2012]. In particolare le tecniche ottiche (es. luminescenza, fluorescenza e colorimetria) possono essere impiegate nei dispositivi biosensoristici a cellule microbiche, nei quali il segnale ottico prodotto dall'interazione tra le cellule e l'analita d'interesse viene correlato con la concentrazione dell'analita stesso (determinazione quantitativa o semi-quantitativa) [Su *et al.*, 2011]. Inoltre le tecniche di rilevazione ottica sono particolarmente interessanti per la loro potenziale applicazione allo *screening* ad alta processività (*high throughput screening* o HTS) in quanto permettono biosensori di monitorare più analiti contemporaneamente [Brogan & Walt, 2005].

In particolare, tra i fenomeni ottici, la fluorescenza (luminescenza che si verifica durante l'irradiazione di una sostanza da radiazioni elettromagnetiche; <http://goldbook.iupac.org/F02453.html>) viene ampiamente sfruttato per le più svariate applicazioni di ricerca, grazie alle sue caratteristiche di selettività e sensibilità, in particolare nel campo della biologia molecolare e cellulare, inclusa la realizzazione di biosensori [Velasco-Garcia, 2009]. Ad esempio sono state ampiamente sviluppate tecniche per il monitoraggio dell'attività di promotori, per misure di genotossicità, per il monitoraggio di inquinanti ambientali o per misure riguardanti la sicurezza alimentare che utilizzano proteine *reporter* fluorescenti; tali tecniche sfruttano i vantaggi di stabilità dei *reporter* fluorescenti (che inoltre non necessitano dell'aggiunta di substrati esogeni) e di non invasività dei sistemi di rilevamento ottico [Norman *et al.*, 2005; Patel, 2002; Sagi *et al.*, 2003].

In questa ricerca di tesi di Dottorato sono state utilizzate due proteine fluorescenti, la proteina mCherry e la GFP quali *reporter* fluorescenti (fluorofori) per misurare l'attività del promotore lac (operone lac) e yorB (promotore chinolone inducibile).

Il primo fluoroforo selezionato per la sperimentazione è stata la proteina mCherry (Fig. 28) una proteina monomerica fluorescente rossa, di uso generale, isolata dall'esacorallo *Discosoma*. Questa è caratterizzata da una maturazione molto rapida ($t_{0,5}=15$ min con un'elevata efficienza di *folding* a 37°C) e da un'elevata luminosità, risultando altamente fotostabile e resistente al *photobleaching*

(diminuzione della fluorescenza di un campione dovuta alla degradazione fluoroforo) [Shaner *et al.*, 2005].

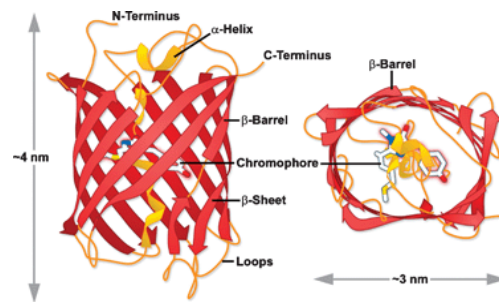


Fig. 28. Struttura della proteina fluoroforo mCherry.

Inoltre la proteina mCherry è risultata addirittura più vantaggiosa (come proteina reporter) rispetto alla GFP per misure biosensoristiche di genotossicità su *E. coli* [Martineau *et al.*, 2009].

Il secondo fluoroforo selezionato per la misura dell'attività del promotore *yorB* in presenza di ciprofloxacina è stata la Green Fluorescent Protein (GFP) (Fig. 29), una proteina isolata dalla medusa *Aequorea victoria*, ampiamente utilizzata nel campo della microscopia di fluorescenza, in biologia molecolare e cellulare come *reporter* di espressione e per la realizzazione di dispositivi biosensoristici [Chalfie & Kain, 2005; Norman *et al.*, 2005; Sagi *et al.*, 2003]

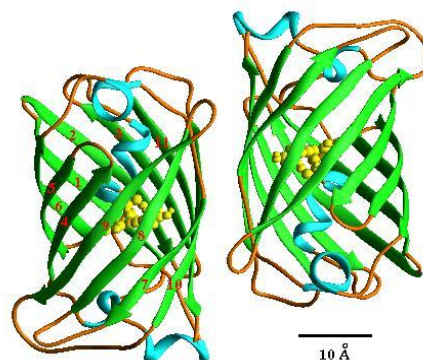


Fig. 29. Struttura della GFP.

Il termine *bioreporter* si riferisce ad un organismo geneticamente modificato nel quale viene utilizzato uno specifico network di regolazione genetico per produrre un segnale d'uscita (generalmente di natura ottica o elettrochimica) identificabile e quantificabile in risposta alla presenza di una specifica causa (ad es. uno specifico analita o una classe di analiti). I *bioreporter* possono essere distinti in due classi principali: i *bioreporter costitutivi* (chiamati anche "*lights-off*"), mediante i quali è possibile stimare la tossicità generale (non-specifica) di un campione attraverso l'inibizione del segnale d'uscita costantemente prodotto dal microrganismo vivente ingegnerizzato [Ripp & Saylor, 2011].

Il vantaggio di questi *bioreporter* risiede nella possibilità di correlare il segnale luminoso emesso con l'attività enzimatica/metabolica della cellula: la diminuzione di tale attività (dovuta alla presenza di contaminanti chimici nel campione) si traduce in una diminuzione/inibizione del segnale bioluminescente prodotto dal *bioreporter*. I *bioreporter inducibili* (chiamati anche “lights-on”) (Fig. 30) utilizzano invece uno specifico costrutto di DNA costituito da una sequenza promotrice inducibile (attivata dall'analita d'interesse) fusa ad un adatto gene reporter (ad es. un gene che codifica per una proteina luminescente o fluorescente).

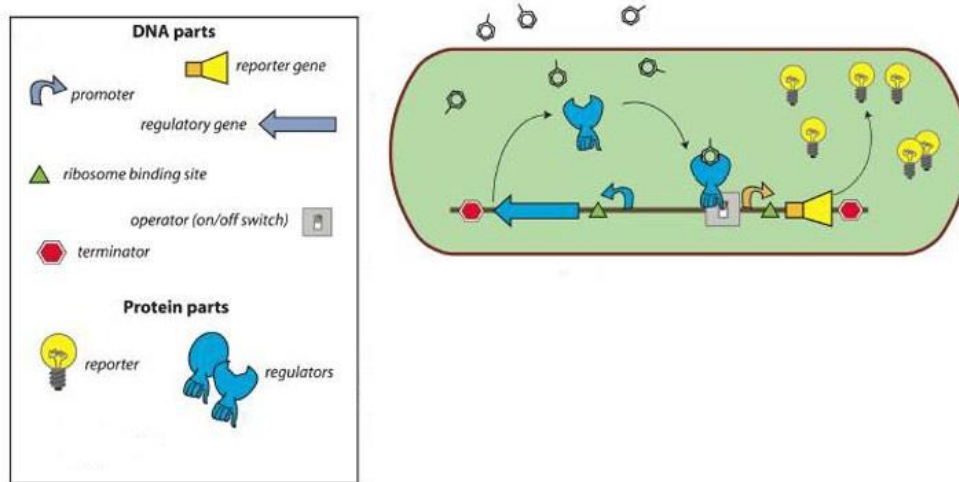


Fig. 30. Meccanismi molecolari d'innescio nei *bioreporter* ottici a cellule intere. Un bioreporter “lights-on” emette luce quando il promotore viene attivato dall'analita/i d'interesse. [modificata da Tecon & Roelof, 2008].

Uno dei sistemi reporter più utilizzati per la realizzazione di *bioreporter* inducibili è quello della cassetta genica della luciferasi batterica (*lux*); questa è costituita da cinque geni strutturali *luxCDABE* derivanti dall'operone del batterio *Vibrio fischeri*. I geni *luxCDE* codificano un complesso enzimatico (acido grasso reduttasi, sintetasi e transferasi) preposto alla sintesi del substrato della luciferasi a sua volta codificata dai geni *luxA* e *luxB* [Close *et al.*, 2012].

Esempi interessanti di potenziali applicazioni in campo alimentare di dispositivi biosensoristici che utilizzano *bioreporter* inducibili riguardano la rilevazione di arsenico inorganico estratto dal riso [Baumann, & van der Meer, 2007] e la rilevazione di residui antibiotici tetraciclinici [Hansen, & Sørensen, 2000; Kurittu *et al.*, 2000] in campioni di pesce [Pellinen *et al.*, 2002] e in carne di pollame [Virolainen *et al.*, 2008].

2.1.4 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) (Fig. 31) rimane ad oggi il batterio più studiato, un classico organismo modello oggetto di intense indagini metaboliche, biochimiche e genetiche che hanno permesso di migliorare la comprensione dei meccanismi biochimici e genetici presenti in altri organismi (celebre la citazione di Jacob e Monod del 1954: “quello che è vero per *E. coli* è quasi sicuramente vero anche per un elefante”).

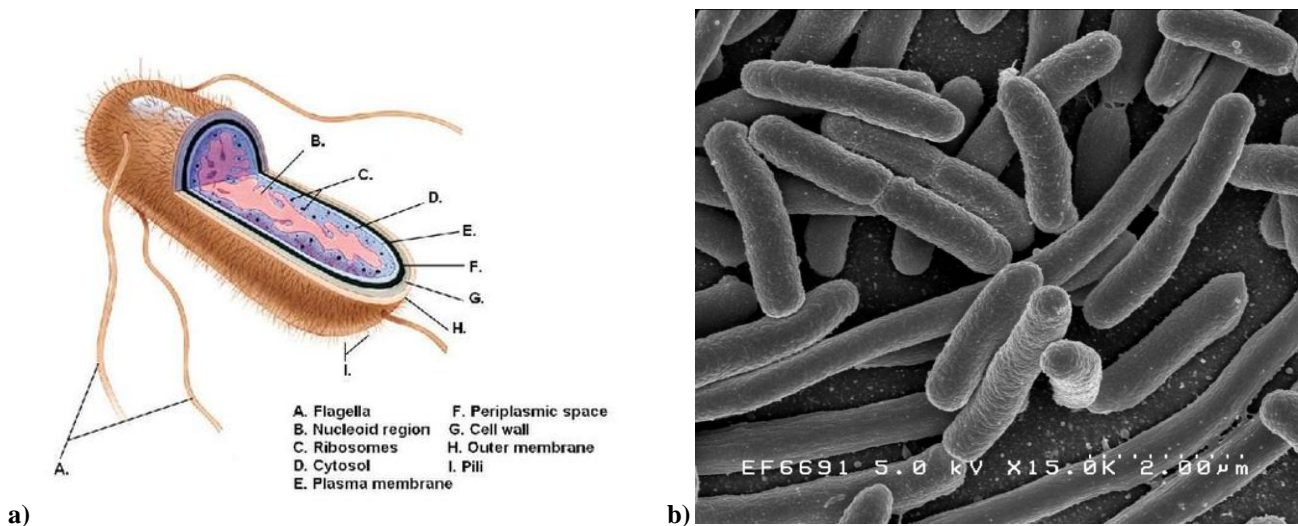


Fig. 31. a) Struttura di una cellula di *E. coli* b) cellule di *E. coli* al microscopio elettronico.

Grazie alla sua crescita rapida (tempo di generazione di *E. coli* è di 20 minuti durante la fase di crescita esponenziale in brodo LB a 37°C), alle semplici esigenze nutrizionali e la conoscenza completa della sua sequenza genomica, è l'organismo più utilizzato in studi di genetica molecolare e si conosce molto di più su *E. coli* rispetto a qualsiasi altro organismo vivente. Si tratta di un batterio anaerobio facoltativo Gram negativo che comprende una serie di specie straordinariamente diverse dal punto di vista sia genetico che fenotipico [Chaudhuri & Henderson, 2012; Leimbach *et al.*, 2013].

2.1.2a Impiego di *E. coli* nei test di *screening* dei chinolonici su agar

La somministrazione dei chinolonici agli animali da reddito è diventata una pratica comune e, negli ultimi decenni, si sono succeduti diversi studi volti all'individuazione del microrganismo più adatto per lo *screening* microbiologico di tali residui.

In particolare, i ceppi di elezione in tal senso sono *B. subtilis* e *E. coli* [Ellerbroek, 1991] comparati in termini di sensibilità a enrofloxacin, ciprofloxacina e flumechina. Dai risultati ottenuti, *E. coli* è risultato il ceppo dal profilo di sensibilità più adatto per la rilevazione dei contaminanti fluorochinolonici e quindi utile per integrare i metodi ad ampio spettro già disponibili ma non in grado di garantire *performance* adeguate nello *screening* dei residui chinolonici. Ulteriori dati [Okerman *et*

al., 2007] hanno dimostrato come nell'ambito dei chinolonici la difloxacina sia l'unico antibiotico più facilmente rilevabile da *B. subtilis* piuttosto che da *E. coli*. Inoltre, sono disponibili in letteratura dati sulla ottimale combinazione pH/terreno di coltura per la rivelazione di molecole differenti: pH 6 per acido nalidixico, flumechina, acido ossonilico e difloxacina; pH 8 per tutti gli altri.

I metodi multi-piastra ad ampio spettro prevedono dunque la piastra test *E. coli* per la rivelazione dei chinolonici a differenti combinazioni di pH: *E.coli* 14 a pH 6 [Okerman *et al.*, 2001] *E.coli* 11303 a pH 7.2 [Ferrini *et al.*, 2006; Myllyniemi *et al.*, 1999; Myllyniemi *et al.*, 2001] o pH 8 [Gaudin *et al.*, 2004]. Il Laboratorio Comunitario di Riferimento (CRL) per le sostanze di categoria B1 (Dir. 96/23/CE) ha proposto lo STAR method (*Screening test for antibiotic residues*) per la rivelazione di residui di sostanze antibatteriche utilizzando ceppi batterici sensibili. Lo stesso è stato validato in latte [Gaudin *et al.*, 2004] e muscolo secondo la Decisione 2002/657/CE (valutazione di specificità, limite di rivelazione, applicabilità e robustezza) [Gaudin *et al.*, 2010]. Il metodo è basato sull'utilizzo di 5 microrganismi test:

- *Bacillus subtilis* (a pH= 8)
- *Kokuria varians* (a pH= 8)
- *Bacillus cereus* (a pH= 6)
- *Escherichia coli* (a pH= 8)
- *Bacillus stearothermophilus* (a pH 7.4)

In particolare, la piastra Ec8 (*Escherichia coli* ATCC 11303 a pH = 8) è quella in grado di rivelare residui chinolonici (danofloxacina, enrofloxacina, ciprofloxacina, marbofloxacina) a concentrazioni \leq LMR e, solo in un caso (flumechina), a concentrazioni $> 4x$ LMR.

2.1.2b Operone lac e β -galattosidasi: introduzione ed applicazioni biotecnologiche

L'operone lac di *E. coli* (Fig. 32) è un unità funzionale che regola la trascrizione dei geni coinvolti nel metabolismo del lattosio ed costituita dal **promotore lac**, un sito di regolazione trascrizionale chiamato l'**operatore** (o), un sito di legame CAP(c) e tre *geni strutturali* (che codificano per una proteina che non ha funzione regolatrice) **lacZ** e lacY lacA codificano rispettivamente per gli enzimi **β -galattosidasi**, β -galattoside permeasi e β -galattoside transacetilasi) [Oehler *et al.*, 1990].

L'operone lac è un sistema molto studiato ed utilizzato in applicazioni di genetica molecolare a per due ragioni:

- 1) La trascrizione dell'operone lac è strettamente regolata e coordinata da una proteina repressore (**repressore lac**) che interagisce con le sequenze del promotore;

2) L'enzima β -galattosidasi è un marcatore enzimatico ampiamente utilizzato in studi di genetica molecolare.

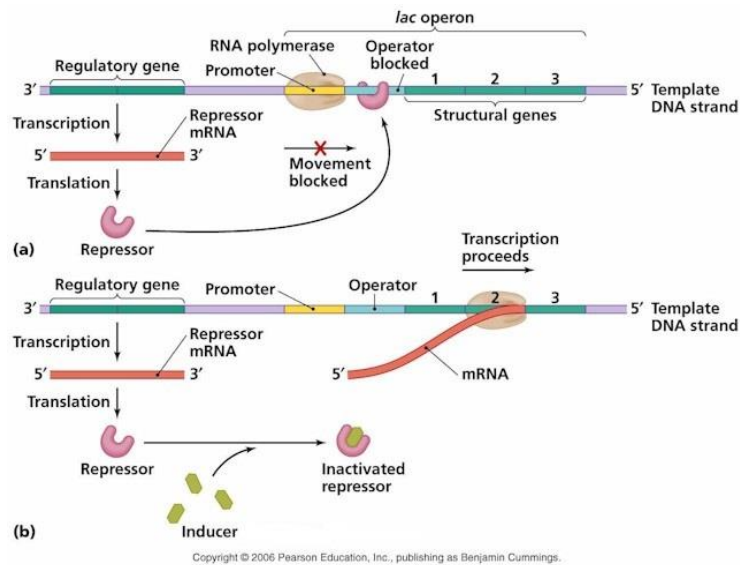


Fig. 32. Meccanismi di funzionamento dell'operone lac.

L'operone lac appartiene al tipo di operoni che attivano la trascrizione in risposta alla comparsa di un **induttore** (substrato o una molecola molto simile). Anche se il lattosio è il normale substrato dell'enzima β -galattosidasi, l'induttore naturale che si lega al repressore lac e inattiva è in realtà l'allolattosio (prodotto del catabolismo del lattosio); i livelli di questo induttore (inizialmente prodotto dall'attività basale della β -galattosidasi) aumentano quando accrescono i livelli di lattosio, portando all'inattivazione del repressore e alla trascrizione dell'operone lac. Questo viene controllato attraverso un meccanismo di **regolazione negativa**: i geni sono trascritti a meno che non vengano "spenti" dal **repressore lac** sintetizzata dal gene lacI [Lewis *et al.*, 1996]

È possibile indurre artificialmente l'operone lac utilizzando alcuni induttori che assomigliano agli induttori naturali dell'operone lac, ma non sono metabolizzabili. Un esempio è quello dell' isopropil- β -D-1-tiogalattopiranoside (**IPTG**) (Fig. 33), un analogo del lattosio non metabolizzabile comunemente utilizzato nelle procedure di clonazione che richiedono induzione dell'attività β -galattosidasi.

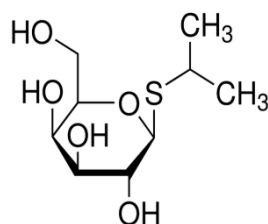


Fig. 33. Molecola di IPTG.

La principale funzione dell' IPTG è quella di legarsi alla proteina repressore LacI e alterarne la conformazione in modo da impedire la repressione della codifica del gene lacZ (β -galattosidasi).

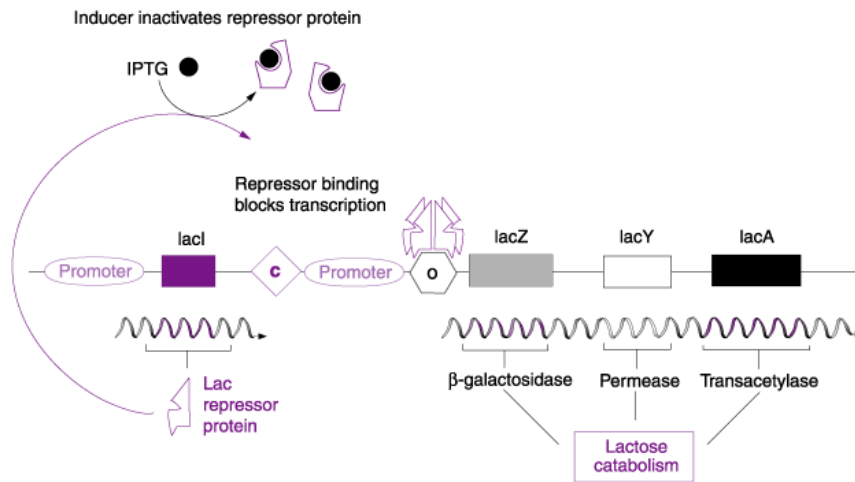


Fig. 34. Meccanismo d'azione della proteina repressore e dell'induttore IPTG.

L'espressione della β -galattosidasi viene comunemente utilizzata nella selezione di colonie batteriche ricombinanti (in una tecnica di *screening* chiamata **Blue white screen**) assieme a **X-gal** (abbreviato anche in BCIG per bromo-cloro-indolil-galattopiranoside) (Fig. 35), un composto organico **incolore** costituito da galattosio legato a un indolo sostituito.

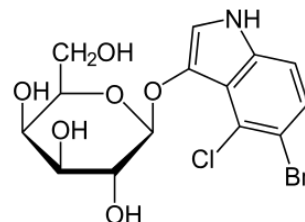


Fig. 35. Molecola di X-gal.

Trattandosi di un analogo strutturale del lattosio X-gal si comporta da **substrato artificiale** e può essere idrolizzato dalla β -galattosidasi (Fig. 36), producendo galattosio e 5-bromo-4-cloro-3-idrossiindolo (1):

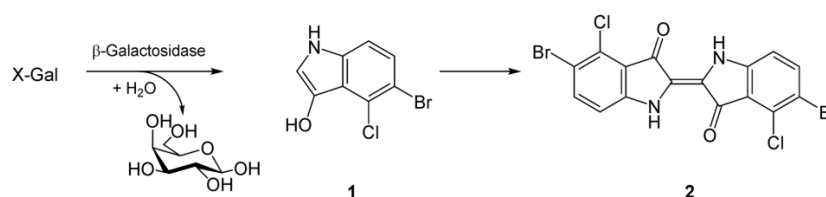


Fig. 36. Reazione dell'X-gal catalizzata dalla β -galattosidasi.

Quest'ultimo poi dimerizza spontaneamente e viene ossidato in 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indaco (2), un prodotto insolubile di **colore blu intenso**.

La presenza di prodotto di colore blu può quindi essere utilizzato per valutare la presenza dell'enzima β -galattosidasi attiva di origine endogena (di seguito chiamata **saggio della β -galattosidasi endogena**). Utilizzando questa tecnica il gene lacZ può dunque essere facilmente utilizzato come *gene reporter*, trovando impiego in varie applicazioni nel campo della biologia molecolare, genetica, embriologia e batteriologia [Bronstein *et al.*, 1994].

Oltre all'X-gal possono essere utilizzati substrati artificiali alternativi come l'**orto-nitrofenil- β -galattoside (ONPG)** (Fig. 37).

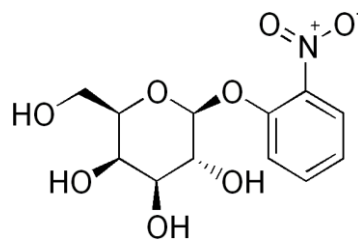


Fig. 37. Molecola di OPNG.

Si tratta di un substrato normalmente incolore che può essere idrolizzato dalla β -galattosidasi (Fig. 38) in galattosio ed **orto-nitrofenolo** (composto di colore giallo che può essere identificato mediante lettura spettrofotometrica a 420 nm) [Bronstein *et al.*, 1994].

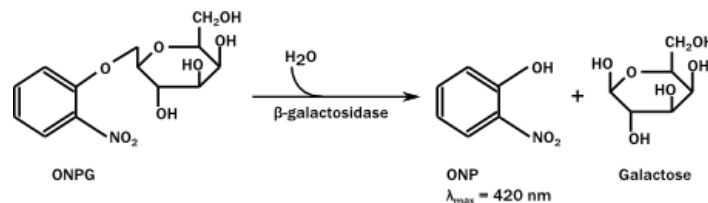


Fig. 38. Reazione dell' OPNG catalizzata dalla β -galattosidasi.

Sebbene agisca da substrato artificiale necessita, come nel caso dell'X-gal, dell'IPTG quale induttore dell'operone lac.

In questa seconda parte di programma di ricerca si è proceduti utilizzando il ceppo *E. coli*: ATCC 11303 (*wild type*) per valutare indirettamente l' effetto di inibizione della proliferazione cellulare attraverso la misura attività dell'enzima β -galattosidasi (enzima dell'operone lac coinvolto nel catabolismo del lattosio). Nello specifico si è utilizzato un **saggio spettrofotometrico della β -galattosidasi endogena** su cellule di *E. coli* wild type utilizzando:

- bromo-cloro-indolil-galattopiranoside (**X-gal**);
 - orto-nitrofenil- β -galattoside (**ONPG**);
- quali substrati artificiali della β -galattosidasi.

2.1.5 Promotori chinoloni inducibili

Lo studio iniziale della letteratura disponibile sui meccanismi di resistenza ai chinolonici ha permesso un primo confronto e selezione di promotori potenzialmente utilizzabili nella fase di ingegnerizzazione cellulare. La resistenza ai chinolonici è basata su elementi genetici di natura sia cromosomica che plasmidica. Attualmente, si conoscono almeno tre tipi di sistemi di resistenza:

1. Mutazioni che alterano i target d'azione (DNA girasi e Topoisomerasi IV)
2. Sistema plasmidico (geni *qnr*)
3. Sistemi di riduzione dell'accumulo intracellulare (pompe di efflusso)

La ricerca della sequenza promotrice adatta per i nostri scopi si è concentrata su i sistemi 2 e 3.

Sistema plasmidico (geni *qnr*)

Il meccanismo di resistenza ai chinoloni di tipo extracromosomico (plasmidico) maggiormente dettagliato è quello basato sulle proteine Qnr (Qnr A, B, C, D, S) [Strahilevitz *et al.*, 2009]. Si tratta di una famiglia di proteine caratterizzate da ripetizioni in tandem di 5 amminoacidi in grado di legare il complesso di DNA- DNA girasi o DNA-topoisomerasi IV, proteggendolo dall'azione inibitoria dei chinoloni. In particolare, è stato evidenziato un meccanismo di induzione ciprofloxacina mediata del promotore del gene *qnrA1* (risposta nel *range* 0.1 $\mu\text{g/mL}$ - 2 $\mu\text{g/mL}$ in *Escherichia coli* J53) [Xu *et al.*, 2007]. Riguardo il promotore del gene che codifica per una delle varianti proteiche *qnrB*, è stato individuato il sito di legame LexA a monte del gene plasmidico *qnrB*. Il repressore LexA (insieme alla proteina RecA) è uno dei principali elementi regolatori della risposta SOS; si tratta del principale sistema presente in *E. coli* coinvolto nei processi di riparazione del DNA, indotto quando il cromosoma batterico viene severamente danneggiato (formazione di regioni di DNA a singolo filamento). In condizioni normali il legame della proteina repressore Lex A alla sequenza "SOS box" presente sul sito operatore dei geni SOS o Din (*Damage inducible*), ne garantisce la repressione. A seguito del danneggiamento del DNA, il legame di RecA e tali regioni determina l'attivazione della proteina che svolge un'attività proteolitica verso il repressore LexA. L'abbassamento della concentrazione di LexA porta ad una derepressione (attivazione) della risposta SOS. Nel caso specifico, questa determina un aumento dei livelli di espressione del gene *qnrB*. [Strahilevitz *et al.*

2009]. La conoscenza limitata e la complessità del meccanismo di regolazione dell'attività dei promotori, però potrebbe comportare difficoltà nella progettazione del costrutto da utilizzare nella fase di ingegnerizzazione cellulare. Inoltre, è anche da considerare che la risposta SOS può essere attivata in seguito all'esposizione ad antibiotici quali i fluorochinoloni (es. ciprofloxacina), ma anche le rifamicine, i β -lattamici, trimetoprim e mitomicina ad agenti fisici in grado di danneggiare il DNA (es. raggi UV).

Sistemi di riduzione dell'accumulo intracellulare (pompe di efflusso)

Nei batteri Gram negativi la membrana esterna è la principale barriera cellulare di diffusione per i chinolonici. La permeabilità di membrana viene regolata attraverso l'espressione di porine (es. OmpF e OmpC in *E. coli*) che costituiscono canali di diffusione passiva (gradiente-dipendente) delle molecole. In aggiunta, sia i batteri Gram negativi che Gram positivi possiedono sistemi di efflusso aspecifici a trasporto attivo, alcuni espressi costitutivamente, altri controllati da sistemi di regolazione. I trasportatori batterici di efflusso (Fig. 39) vengono generalmente raggruppati in cinque superfamiglie (sulla base dell'omologia della sequenza amminoacidica):

1. *superfamiglia dei facilitatori maggiori (MFS)*;
2. *ATP-binding cassette (ABC)*;
3. *famiglia della resistenza-nodulazione-divisione (RND)*;
4. *famiglia delle proteine di resistenza multi farmaco (MRP)*;
5. *famiglia estrusione multi farmaco e composti tossici (MATE)*

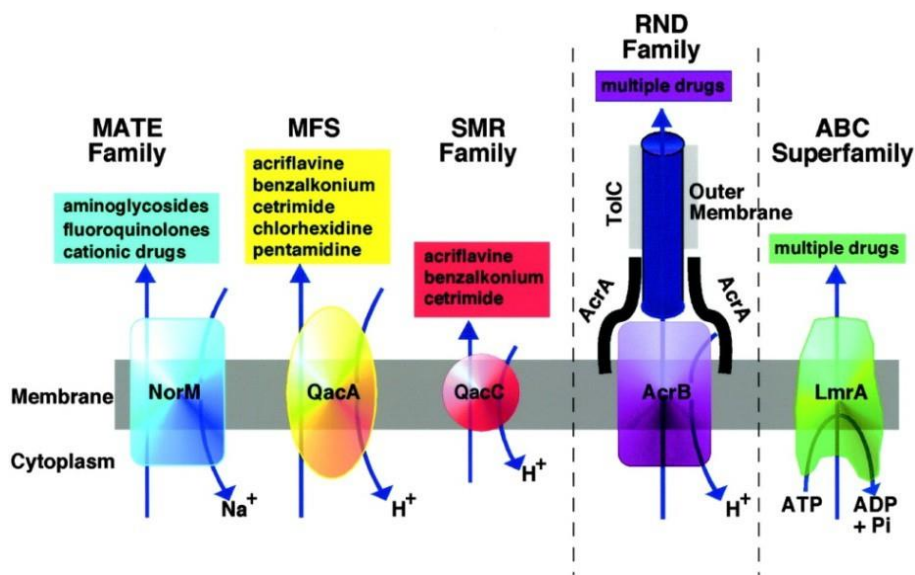


Fig. 39. Trasportatori batterici di efflusso (tratta da Piddock, 2006).

I trasportatori di efflusso degli antibiotici appartengono ai gruppi RND (nei batteri Gram negativi), MFS (nei batteri Gram positivi), e MATE (nei batteri Gram negativi). I trasportatori di fluorochinoloni nei Gram positivi sono trasportatori di resistenza multi farmaco (FQ-MDR). In Tab. 7 sono riportati alcuni esempi di pompe di efflusso in grado di trasportare fluorochinoloni.

Tab. 7. Principali caratteristiche di alcune pompe di efflusso per i chinoloni.

Pompa di efflusso	Tipo di controllo dell'espressione genica	Substrati trasportati	Altri fattori che regolano positivamente l'espressione genica	Note
AcrAB-TolC	Espressione costitutiva	Ciprofloxacina, farmaci lipofili, coloranti (bromuro di etidio, acriflavina), detergenti acidi biliari, ammine quaternarie, trifenilfosfonio	Crescita in un mezzo povero di nutrienti, fase stazionaria di crescita, shock osmotico	Il substrato si lega alle due regioni <i>loop</i> L1 e L2 della proteina AcrB
NorA	/	Cloruro di benzalconio, norfloxacina,	/	Conoscenza limitata del sistema di regolazione (complesso)
MexAB-OprM	Espressione costitutiva	fluoroquinoloni, β lattamici, cloramfenicolo, trimetoprim, aminoglicosidi, coloranti (bromuro di etidio e cristal violetto) triclosano (disinfettante)	Crescita in un mezzo povero di nutrienti, fase stazionaria di crescita, shock osmotico	
CmeABC	L'espressione non sembra essere condizionata dalla presenza del substrato	Fluorochinoloni (ciprofloxacina), macrolidi (eritromicina, azitromicina, tilomicina), chetolidi (telitromicina)	/	/
QacA	/	Apparentemente limitato ai fluorochinoloni più idrofilici	/	/
Bmr	Espressione costitutiva; l'espressione è regolata positivamente dal legame al promotore della proteina BmrR + substrato	fluorochinoloni, coloranti (es. bromuro di etidio), inibitori energetici	/	44% di omologia con NorA

La polispecificità di tali sistemi potrebbe rappresentare un ostacolo all'utilizzo per l'ingegnerizzazione del mediatore biologico della biosonda: l'esposizione a uno qualunque delle molecole dello spettro di

substrati trasportabili (antibiotici appartenenti a diverse classi, coloranti, detergenti e disinfettanti) della pompa potrebbe infatti favorire una sovraespressione della pompa e di conseguenza una ‘risposta crociata’ (qui utilizzato in analogia con il termine resistenza crociata o cross resistenza) a tutti gli altri substrati della pompa.

Un esempio di meccanismo di resistenza cromosomico ai chinoloni è basato su un sistema di pompa ad efflusso (NorA) non specifica, in grado cioè di rispondere ed espellere dalla cellula antibiotici appartenenti a diverse classi (inclusa quella dei chinolonici) e la cui regolazione multi fattoriale (coinvolge geni differenti ed è basata su sistema di promotori – repressori) risulta molto complessa. [Kaatz & Seo, 1995; Kaatz *et al.*, 2000; Kaatz *et al.* 2005; Hutter *et al.*, 2004].

Particolarmente interessante per l’individuazione di un promotore attivato dai chinolonici è uno studio pubblicato qualche anno fa sui meccanismi d’azione (MOAs) di 37 composti antibatterici (incluso il fluorochinolone ciprofloxacina) nel modello *B. subtilis*; lo scopo era quello di individuare e sequenziare le sequenze promotrici per la creazione di un *database* di profili di espressione genica. Questo studio è servito come riferimento per un lavoro più recente [Urban *et al.*, 2007], in cui sono stati analizzati profili di espressione genica per identificare i geni *up*-regolati in presenza di specifici antibiotici, da utilizzare per la progettazione di *bioreporter* luminescenti. Per ogni molecola o classe di composti analizzati sono stati individuati più geni e le corrispondenti potenziali regioni promotrici. In particolare, per la ciprofloxacina sono state identificate 3 sequenze promotrici di altrettanti geni (indicate in Tab. 8).

Tab. 8. Geni indotti dalla ciprofloxacina (tratta da Urban *et al.*, 2007).

Gene	Controllo dell’espressione
dinB	gene inducibile da danni al DNA
yneA	Sistema SOS
yorB	Probabilmente fa parte del regulone LexA (sistema SOS)

Per concentrazioni tra 0.06 e 4 µg/mL di ciprofloxacina. si osserva una sovraespressione dei geni riportati in Tabella 5. L’induzione si osserva anche in presenza dell’antibiotico azaserina per tutti e tre i geni; il chemioterapico antitumorale 5 fluorouracile risulta induttore del gene reporter dinB. Come per il gene plasmidico qnrB il coinvolgimento della risposta SOS potrebbe rendere più complesso il meccanismo.

2.2 Materiali e Metodi

Ceppi di *E. coli*

I ceppi di *E. coli* ATCC 11303 e DH5 α sono stati forniti dalla Invitrogen S.r.l. (Italia). In particolare per i saggi spettrofotometrici della β -galattosidasi endogena (cellule wild type) e il saggio fluorimetrico del promotore lac (cellule ingegnerizzate) è stato utilizzato il ceppo ATCC 11303 mentre per le misure fluorimetriche dell'attività del promotore *yorb* è stato utilizzato il ceppo DH5 α . Si tratta di un ceppo non patogeno, caratterizzato da un'elevata efficienza di trasformazione, sviluppato in laboratorio per le procedure di clonazione ed frequentemente utilizzato nelle tecniche del DNA ricombinante (<http://www.straininfo.net/strain/68571>) (Fig. 40).

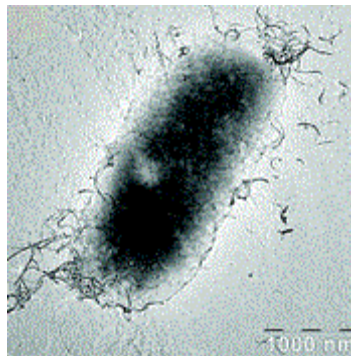


Fig. 40. Cellula di *E. coli* DH5 α .

Terreni di coltura liquidi

Tutte le soluzioni sono state preparate utilizzando acqua deionizzata e purificata prodotta dal sistema **Millipore Milli-Q®** ZFMQ 230 04 (Merck Millipore, USA).

Luria Bertani (LB)

Tra i diversi terreni liquidi, il brodo Luria Bertani (LB) (fornito dalla Sigma-Aldrich, Italia) contiene fattori nutritivi ed elettroliti essenziali che consentono la crescita rapida (e con buone rese in termini di grammi di cellule per moli di substrato) di molte specie batteriche, inclusa *E. coli*. Inoltre durante la fase di crescita esponenziale in brodo LB a 37°C il tempo di generazione di *E. coli* è di 20 minuti [Sezonov *et al.*, 2007]

Tab. 9. Caratteristiche del brodo Luria Bertani (LB).

Composizione MHB	Quantità (g/L)
Triptone	10
Estratto di lievito	5
NaCl	5
pH finale	7,2

Mueller Hinton Broth (MHB)

Il Mueller Hinton Broth MHB (fornito dalla Oxoid, Italia) è un terreno generico utilizzato per i test di sensibilità agli antibiotici. In particolare l'amido presente nella sua composizione (Tab. 10) agisce come sostanza protettiva in grado di assorbire le tossine prodotte dai batteri e rilasciate nel mezzo di coltura, riducendo così possibili interferenze durante i test. (<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Fluka/Datasheet/70192dat.pdf>).

Tab. 10. Caratteristiche del Mueller Hinton Broth (MHB).

Composizione MHB	Quantità (g/L)
Infuso di carne di bue	2,0
Caseina idrolizzata	17,5
Amido	1,5
pH finale	7,4

Soluzione di ciprofloxacina

La *stock solution* di ciprofloxacina $\geq 98.0\%$ (HPLC) (fornita dalla Fluka, Milano) 10 mg L^{-1} (pari a 100x LMR del latte) è stata preparata in H₂O milliQ microfiltrata (sterile) e conservata a 4°C a riparo dalla luce. La concentrazione della soluzione è stata periodicamente verificata tramite misura spettrofotometrica ($\lambda_{\text{max}} = 271 \text{ nm}$).

Misure strumentali ottiche

Le misure ottiche fluorimetriche e spettrofotometriche (densità ottica OD) sono state effettuate utilizzando due strumenti: il fluorimetro per micropiastre Beckman Coulter DTX880 (Fig. 41a) e lo spettrofotometro per micropiastre Thermo Scientific™ Multiskan™ GO (Fig. 41b).



Fig. 41. a) Fluorimetro per micropiastre Beckman Coulter DTX880 e b) spettrofotometro per micropiastre Thermo Scientific™ Multiskan™ GO

Entrambi gli strumenti possono analizzare diversi campioni contemporaneamente (grazie all'utilizzo delle micropiastre) e possono essere utilizzati per applicazioni di laboratorio riguardanti analisi di DNA, RNA e ricerche in biologia cellulare (<http://www.thelabworldgroup.com/microplate-readers/beckman-coulter-dtx880-multi-mode-microplate-reader-200275>; <http://www.thermoscientific.com/content/tfs/en/product/multiskan-go-microplate-spectrophotometer.html>).

2.2.1 Saggio spettrofotometrico della β -galattosidasi endogena

Protocollo di crescita ed esposizione del ceppo di *E. coli* ATCC 11303 *wild type* (X-gal quale substrato artificiale)

- 1) *E. coli* ATCC 11303 è stato colturato *overnight* (O/N) in brodo Luria-Bertani (LB).
- 2) 200 μ L di questa coltura sono stati inoculati in 1800 μ L di brodo LB (rapporto pre-inoculo: LB; 1:10). 10%
 - 2a) Per i campioni di controllo (*blank*) (in triplicata) si sono aggiunti 5 μ L di X-gal (50mg/L) e 5 μ L di IPTG (1M) o 50 μ L di latte.
 - 2b) Per i campioni test (in triplicata) si sono aggiunti 5 μ L di X-gal (50mg/L), 5 μ L di IPTG (1M) o 50 μ L di latte e 20 μ L (1x LMR) di soluzione di ciprofloxacina (100x LMR = 10mg/L).
- 3) Le colture batteriche si sono incubate in piastre multi pozzetto (Fig. 44) a 37°C in incubatore con agitatore a scuotimento (170 rpm) per i rispettivi tempi di 2 h, 3 h o 18 h.
- 4) Dopo l'incubazione, è stata misurata l'assorbanza dei campioni a tre lunghezze d'onda diverse: 600 nm, 612 nm e 654 nm; l'effetto della ciprofloxacina sulla proliferazione cellulare è stata dunque valutata monitorando i valori di OD (densità ottica) ai rispettivi tempi di 2 h, 3 h e 18 h.

Protocollo di crescita ed esposizione del ceppo di *E. coli* ATCC 11303 *wild type* (ONPG quale substrato artificiale)

- 1) *E. coli* ATCC 11303 è stato colturato *overnight* (O/N) in brodo LB.
- 2) La coltura O/N (pre-inoculo) è stata inoculata in brodo LB mantenendo una percentuale di pre-inoculo del 30 %
 - 2a) Per i campioni di controllo (*blank*) (in triplicata) si sono aggiunti 20 μ L di latte.
 - 2b) Per i campioni test (in triplicata) si sono aggiunti 20 μ L di latte e 5, 10 o 20 μ L di soluzione stock di ciprofloxacina (100x LMR = 10mg/L) per ottenere le concentrazioni finali di 1x, 10x e 20x LMR rispettivamente.

- 3) Le colture batteriche sono state incubate a 37°C in un incubatore a scuotimento (170 rpm) per i rispettivi tempi (1 h e 2 h)
- 4) Dopo l'aggiunta di ONPG (100 µL di soluzione *stock*, concentrazione 4mg/mL), la coltura è stata incubata per 10 min. (T=37°C ed incubatore a scuotimento, 170 rpm) e si è proceduti alle letture in assorbanza a 420 nm e 600 nm.

2.2.2 Saggio fluorimetrico del promotore lac

Protocollo di crescita ed esposizione del ceppo di *E. coli* ATCC 11303 + *Lac::Cherry* ingegnerizzato in assenza o in presenza di latte (aggiunto al 2,5% al punto 2)

1. *E. coli* ATCC 11303 + *Lac::Cherry* è stato colturato durante la notte (O/N) in brodo Luria-Bertani (LB) contenente 100 µg/mL di ampicillina e 0.1 mM di IPTG.
2. La coltura cresciuta O/N (pre-inoculo) è stata inoculate in brodo LB (mantenendo una percentuale di pre-inoculo pari al 30 %) in un volume complessivo di 2,0 mL contenente 100 µg/mL di ampicillina e 0.1 mM di IPTG.
 - 2a) Per i campioni di controllo (*blank*) (in triplicata) non è stata aggiunta ciprofloxacina.
 - 2b) Per i campioni test (in triplicata) si sono aggiunti 5 e 20 µL (1x LMR) di *stock solution* di ciprofloxacina (100X LMR= 10mg/L) per ottenere le concentrazioni finali di 1x e 20x LMR rispettivamente.
3. Le colture batteriche sono state incubate a 37°C in incubatore con agitatore a scuotimento (170 rpm) per i rispettivi tempi.
4. Dopo l'incubazione si è misurata la fluorescenza direttamente sulle colture cellulari utilizzando un filtro di eccitazione a 535 nm/ filtro di emissione a 625 nm ed espressi come Unità Relative di Fluorescenza (acronimo inglese RFU)

Protocollo di crescita ed esposizione del ceppo di *E. coli* ATCC 11303 + *Lac::Cherry* ingegnerizzato in presenza di latte allo 0,8% in MHB

1. *E. coli* ATCC 11303 + *Lac::Cherry* è stato colturato durante la notte (O/N) in brodo Luria-Bertani (LB) contenente 100 µg/mL di ampicillina e 0.1 mM di IPTG.
2. 200µL di questa coltura sono stati inoculati in 1800 µL di MHB contenente 100 µg/mL di ampicillina e 0.1 mM di IPTG (percentuale pre-inoculo: 10%) e 0,8% di latte.

- 2a) Per i campioni di controllo (*blank*) (in triplicata) non è stata aggiunta ciprofloxacina.
- 2b) Per i campioni test (in triplicata) sono stati aggiunti 20 µL di *stock solution* di ciprofloxacina (concentrazione finale 1x LMR)
3. Le colture batteriche sono state incubate a 37°C in incubatore con agitatore a scuotimento (170 rpm) per i rispettivi tempi.
4. Dopo l'incubazione si è misurata la fluorescenza direttamente sulle colture cellulari utilizzando un filtro di eccitazione a 535 nm/ filtro di emissione a 625 nm ed espressi come Unità Relative di Fluorescenza (acronimo inglese RFU).

2.2.3 Misure fluorimetriche dell' attività del promotore *yorb*

Protocollo di crescita ed esposizione del ceppo di *E. coli DH5α + yorB::mCherry* (oppure *E. coli DH5α + yorB::GFP*) ingegnerizzato in presenza di latte allo 2,5% in brodo LB

1. *E. coli DH5α + yorB::mCherry* (oppure *E. coli DH5α + yorB::GFP*) è stato colturato *overnight* (O/N) in brodo LB.
2. La coltura cresciuta O/N (pre-inoculo) è stata inoculate in brodo LB (mantenendo una percentuale di pre-inoculo pari al **30 %**) in un volume complessivo di 2,0 mL con o senza 50 µL di latte (2,5%).
 - 2a) **Per i campioni di controllo (*blank*)** (in triplicata) sono stati fatti crescere in assenza di ciprofloxacina.
 - 2b) **Per i campioni test** (in triplicata) sono stati aggiunti 10, 20 o 50 µL di *stock solution* di ciprofloxacina (concentrazione finale 0,5, 1x e 20x LMR).
3. Le colture batteriche sono state incubate a 37°C in incubatore a scuotimento (170 rpm) per i rispettivi tempi.
4. Dopo l'incubazione, la fluorescenza è stata misurata direttamente sulla coltura cellulare utilizzando un filtro di eccitazione a 535 nm e un filtro di emissione a 625 nm (per la GFP un filtro di eccitazione a 485 nm/ filtro di emissione a 535 nm) e i valori espressi in RFU.

Protocollo di crescita ed esposizione del ceppo di *E. coli* DH5 α + *yorB::mCherry* ingegnerizzato in presenza di latte allo 0,8% o 0,4% in MHB

1. *E. coli* DH5 α + *yorB::mCherry* è stato colturato *overnight* (O/N) in brodo LB.
2. La coltura cresciuta O/N (pre-inoculo) è stata inoculate in MHB (mantenendo una percentuale di pre-inoculo pari al **30 %**) in un volume complessivo di 2,0 mL con o senza 16 μ L di latte (0,8%) o 8 μ L di latte (0,4%).
 - i. 2a) **Per i campioni di controllo (*blank*)** (in triplicata) sono stati fatti crescere in assenza di ciprofloxacina.
 - ii. 2b) **Per i campioni test** (in triplicata) sono stati aggiunti 20 o 50 μ L di *stock solution* di ciprofloxacina (concentrazione finale 1x e 20x LMR).
3. Le colture batteriche sono state incubate a 37°C in incubatore a scuotimento (170 rpm) per i rispettivi tempi.
 - 1) Dopo l'incubazione, la fluorescenza è stata misurata direttamente sulla coltura cellulare utilizzando un filtro di eccitazione a 535 nm /filtro di emissione a 625 nm per mCherry e un filtro di eccitazione a 485 nm/ filtro di emissione a 535 nm per GFP e i valori espressi in RFU.

2.2.4 Protocollo di ingegnerizzazione

Per la fase di ingegnerizzazione dei ceppi di *E. coli* ATCC 11303 e DH5 α si è utilizzato un protocollo standard [Green & Sambrook, 2012] descritto di seguito.

Costruzione del vettore plasmidico

Si è dunque proceduti all'ingegnerizzazione del ceppo *E. coli* ATCC 11303 mediante il **plasmide pGEM-Teasy** (Fig. 42), contenente il **gene mCherry** (o il gene GFP) posto sotto il controllo del **promotore Lac** (o il **promotore yorB**) e contenente il gene marker di resistenza all'ampicillina (**Amp^r**). Il frammento pGem:Cherry è stato clonato nei siti di restrizione SacI and SalI del vettore plasmidico pGem-T Easy ed utilizzato per la trasformazione delle cellule di *E.coli* competenti (vedi sotto)

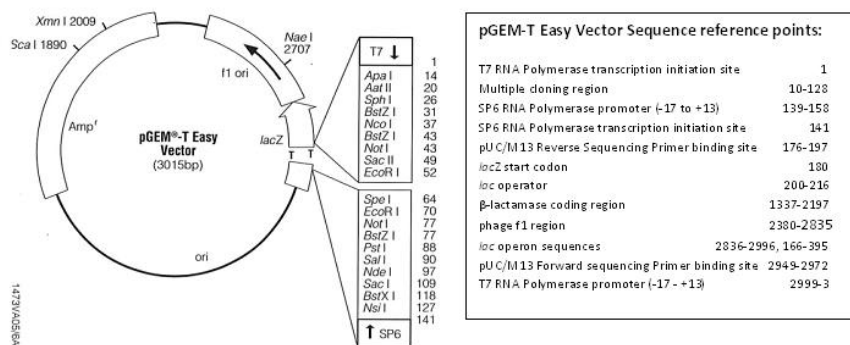


Fig. 42. Struttura del plasmide pGEM-Teasy.

Preparazione di cellule di *E. coli* competenti e trasformazione

Reagenti:

Luria-Bertani (LB): 20g in 1000 mL di acqua doppiamente distillata, pH aggiustato a 7,2 e sterilizzato mediante autoclave (121°C per 15 minuti).

LB Agar: 20g di brodo Luria-Bertani contenente 1.5% di agar in 1000 mL di acqua doppiamente distillata ed autoclavata.

MHB: 23 g in 1000 mL di acqua doppiamente distillata, pH aggiustato a 7,4 e sterilizzato mediante autoclave (121°C per 15 minuti).

Cloruro di calcio (0,1M) 200 mL di soluzione autoclavata sterilizzato mediante autoclave (121°C per 15 minuti).

Preparazione di cellule di *E. coli* competenti

Lo *stock* batterico di glicerolo è stato piastrato e colturato *overnight* su LB agar a 37°C. Si è poi prelevata una singola colonia batterica dalla piastra che è stata inoculata in 5 mL di mezzo LB e incubata *overnight* a 37 ° C. Le cellule sono state coltivate per 3h sotto vigorosa agitazione monitorando la crescita (letture spettrofotometriche di assorbimento cellulare, OD₆₀₀) della coltura fino ad ottenere un valore di OD₆₀₀ pari a 0,5. Poi sono state trasferite in provette da 50 mL di polipropilene ghiacciate ed incubate per 10 minuti. Le cellule sono state recuperate da ciascuna provetta per centrifugazione a 7500 rpm per 5 min a 4°C. Il surnatante è stato scartato e il *pellet* di cellule è stato risospeso in 25 mL di soluzione di CaCl₂ 0,1 M ghiacciata, mescolate lentamente per

ottenere una sospensione uniforme facendo attenzione a mantenere le provette nel bagno di ghiaccio, incubate per 15 minuti. Le cellule sono state recuperate per centrifugazione a 5000 rpm per 10min a 4⁰C e il *pellet* è stato risospeso con un lento movimento circolare in 12,5 mL di soluzione di CaCl₂ 0,1 M ghiacciata. Le provette sono state incubate in ghiaccio per 30 minuti. Le cellule sono state recuperate per centrifugazione a 5000 rpm per 10min a 4⁰C e il *pellet* è stato risospeso in 850 µL di CaCl₂ 0.1 M ghiacciata e 150 µL di soluzione di glicerolo 75% sterile. La sospensione è stata mescolata lentamente in bagno di ghiaccio. Le cellule sono state utilizzate direttamente per la trasformazione o dispensate in aliquote da 100 µL, in provette sterili e congelate (azoto liquido, -70⁰C).

Trasformazione delle cellule *E. coli* competenti

- (i) Ad ogni miscela di ligazione sono stati aggiunti 200 µL di soluzione di CaCl₂ contenente cellule di *E. coli* competenti; la miscela è stata stati mescolati con un pipettaggio ripetuto ed incubata in ghiaccio per 30 min.
- (ii) Le provette sono state sottoposte ad uno shock termico per incubazione in bagno d'acqua a 42°C per 90 secondi ed immediatamente trasferite in un bagno di ghiaccio per 2 minuti.
- (iii) Ad ogni provetta si sono aggiunti 800 µL di mezzo (LB o MHB) ed incubate in agitazione per 45-60 min a 37°C.
- (iv) Le provette sono state centrifugate a 3000 rpm per 5 min, il surnatante scartato e i *pellet* risospesi in 200 µL di mezzo (LB o MHB).
- (v) Un volume di 50 µL di cellule trasformate competenti è stato poi utilizzato per inoculare i il mezzo di coltura (LB o MHB) ed incubate a 37°C per 12-16 h.

2.3 Risultati e Discussione

2.3.1 Saggio spettrofotometrico della β-galattosidasi endogena

I saggi spettrofotometrici della β-galattosidasi endogena sono stati eseguiti utilizzando quale induttore del gene LacZ l'IPTG, o latte (2,5%) o entrambi. In particolare è stata misurata l'assorbanza a 600 nm, 612 nm e 654 nm (indicate rispettivamente come OD₆₀₀, OD₆₁₂ e OD₆₅₄) delle colture batteriche di *E. coli* 11303.

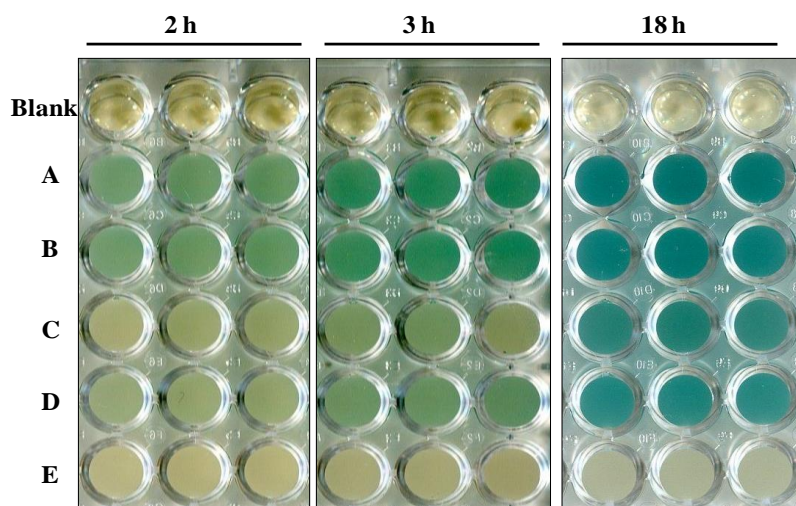


Fig. 43. Piastra multi pozzetto per il saggio spettrofotometrico della β -galattosidasi endogena su *E. coli* 11303 utilizzando IPTG.

- A) *E. coli* ATCC 11303 + Latte + X-gal + IPTG;
- B) *E. coli* ATCC 11303 + Latte + X-gal
- C) *E. coli* ATCC 11303 + Latte + X-gal + IPTG + 1X Cipro
- D) *E. coli* ATCC 11303 + Latte + X-gal + 1X Cipro
- E) LB + Latte

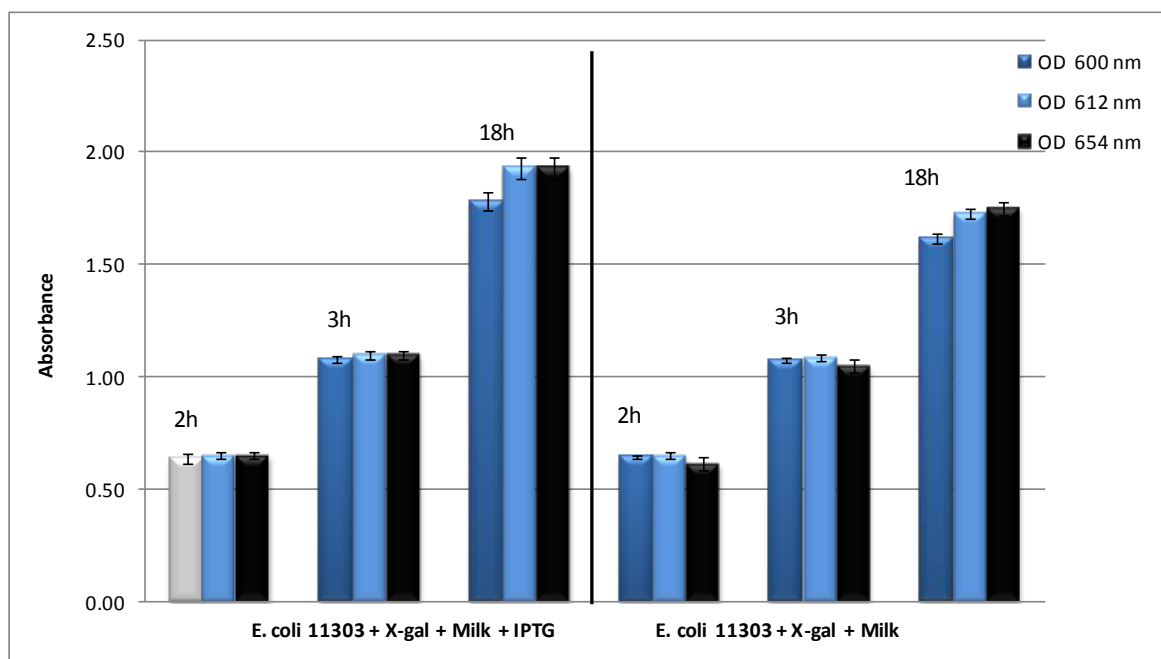


Fig. 44. Misure spettrofotometriche di assorbanza su colture cellulari di *E. coli* 11303 contenenti IPTG e latte.

Dai risultati ottenuti (Figg. 44) si può osservare come il lattosio presente nel latte utilizzato per i test sia in grado di attivare il gene endogeno gene *LacZ* di *E. coli* ATCC 11303, con un effetto di

induzione simile a quello dell'IPTG. Generalmente il tenore di lattosio nel latte bovino è intorno a 50 g/L; considerando la quantità di latte utilizzato (2,5 %) per la preparazione dei campioni, la concentrazione molare finale di lattosio dovrebbe essere circa $4 \cdot 10^{-3}$ M, un valore dello stesso ordine di grandezza della concentrazione finale dell'IPTG aggiunto ($2,5 \cdot 10^{-3}$ M).

Si è dunque proceduti alla valutazione dell'effetto inibente della ciprofloxacina 1x LMR in presenza di latte.

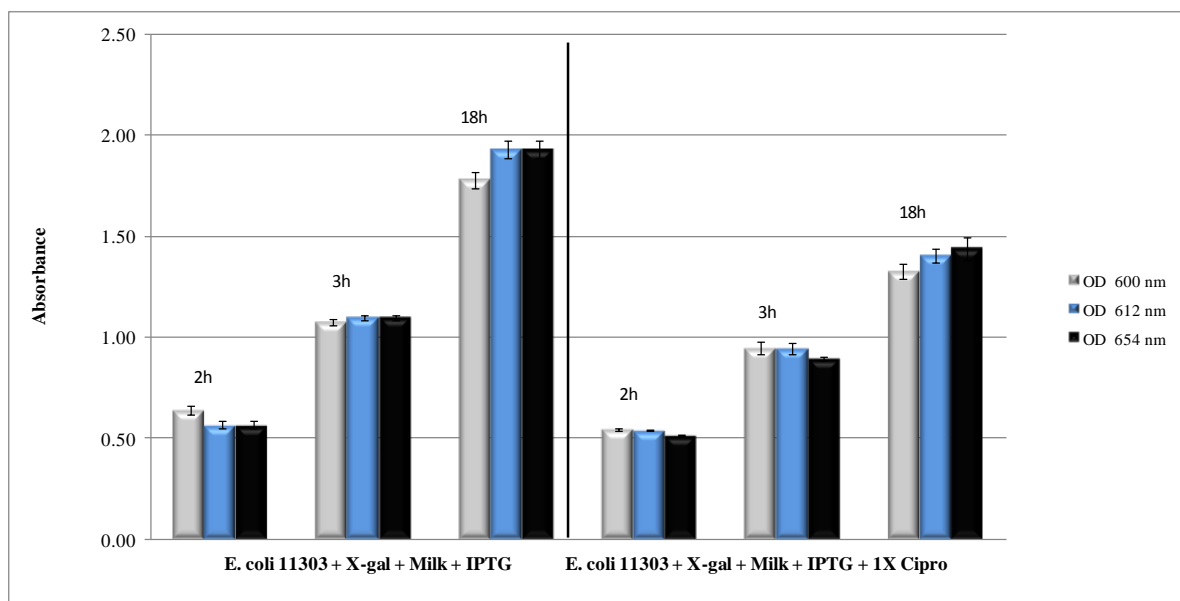


Fig. 45. Misure spettrofotometriche di assorbanza su colture cellulari di *E. coli* ATCC 11303 conenenti IPTG e latte in assenza o in presenza di ciprofloxacina 1x LMR.

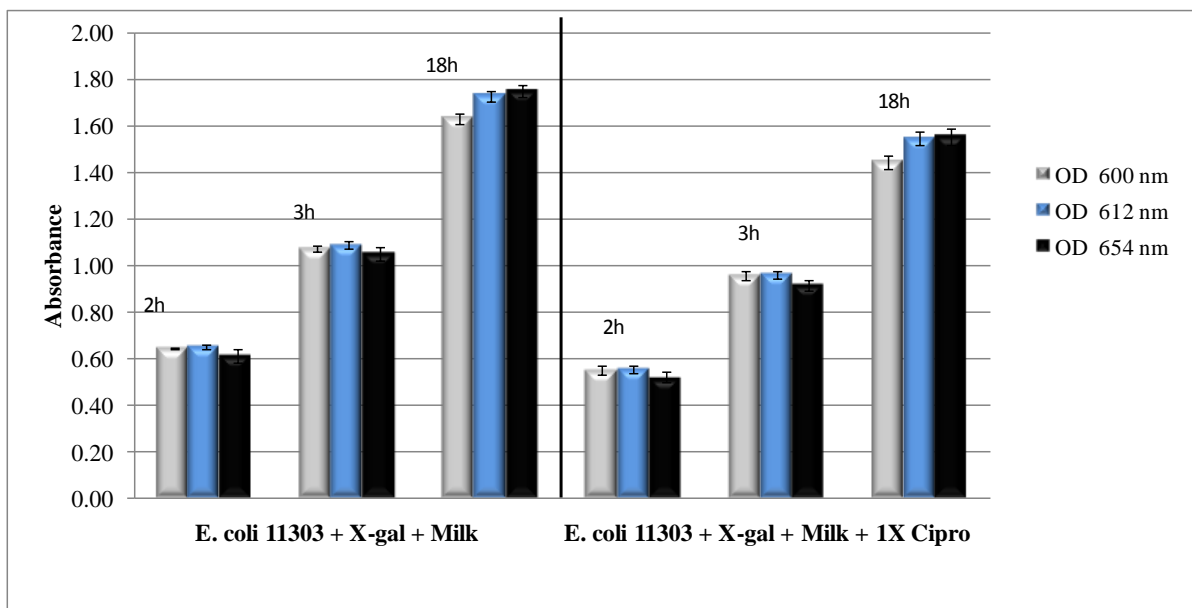


Fig. 46. Misure spettrofotometriche di assorbanza su colture cellulari di *E. coli* ATCC 11303 contenenti latte in assenza o in presenza di ciprofloxacina 1x LMR.

Riguardo l'effetto dell'antibiotico, la ciprofloxacina sembrerebbe ridurre significativamente la proliferazione cellulare delle colture di *E. coli* ATCC 11303 contenente latte e IPTG già dopo 2h di esposizione (Fig. 45 e 46).

Utilizzo del ONPG quale substrato artificiale

Test preliminari (Fig. 47) hanno evidenziato come l'utilizzo di ONPG quale substrato artificiale della (β -galattosidasi) consenta una rilevazione indiretta più sensibile della proliferazione batterica di colture cellulari di *E. coli* ATCC 11303 (rispetto alla lettura di OD₆₀₀)

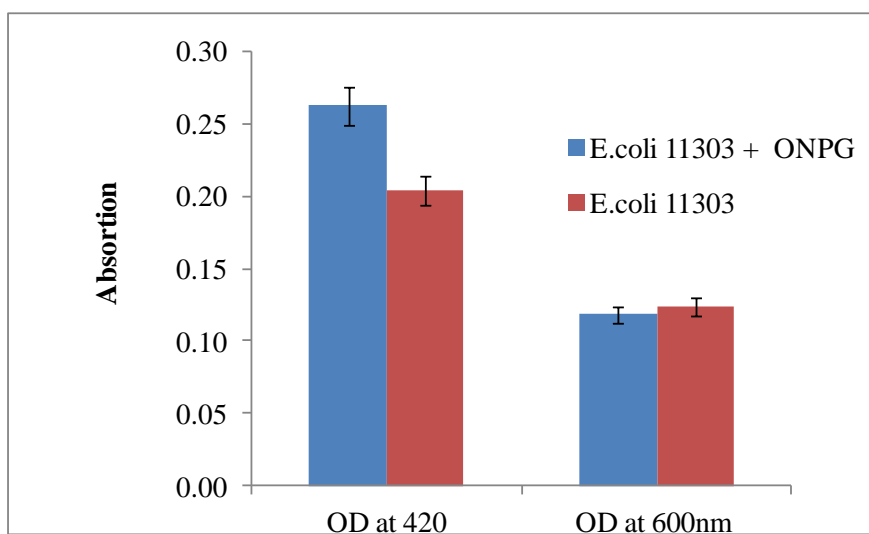


Fig. 47. Misure spettrofotometriche di assorbanza a 420nm e 600nm su colture di *E. coli* ATCC 11303 in presenza o in assenza di ONPG.

Partendo da questi risultati si è dunque proceduti alla verifica della correlazione tra densità ottica della coltura cellulare a 420 nm e l'attività della β -galattosidasi endogena di *E. coli* ATCC 11303.

Tab.10. Misure di assorbanza (OD₄₂₀ e OD₆₀₀) effettuate su colture di *E. coli* 11303 (in diverse percentuali) in presenza di ONPG.

Percentuale di coltura utilizzata	OD ₄₂₀			media	OD ₆₀₀			media	OD ₄₂₀ / OD ₆₀₀
10%	0.281	0.281	0.281	0.281	0.085	0.087	0.085	0.085	3.280
20%	0.384	0.381	0.381	0.382	0.115	0.118	0.115	0.116	3.293
30%	0.481	0.485	0.489	0.485	0.128	0.125	0.128	0.148	3.277
40%	0.641	0.621	0.621	0.627	0.199	0.198	0.199	0.19	3.303
50%	0.731	0.75	0.75	0.743	0.222	0.232	0.222	0.22	3.300

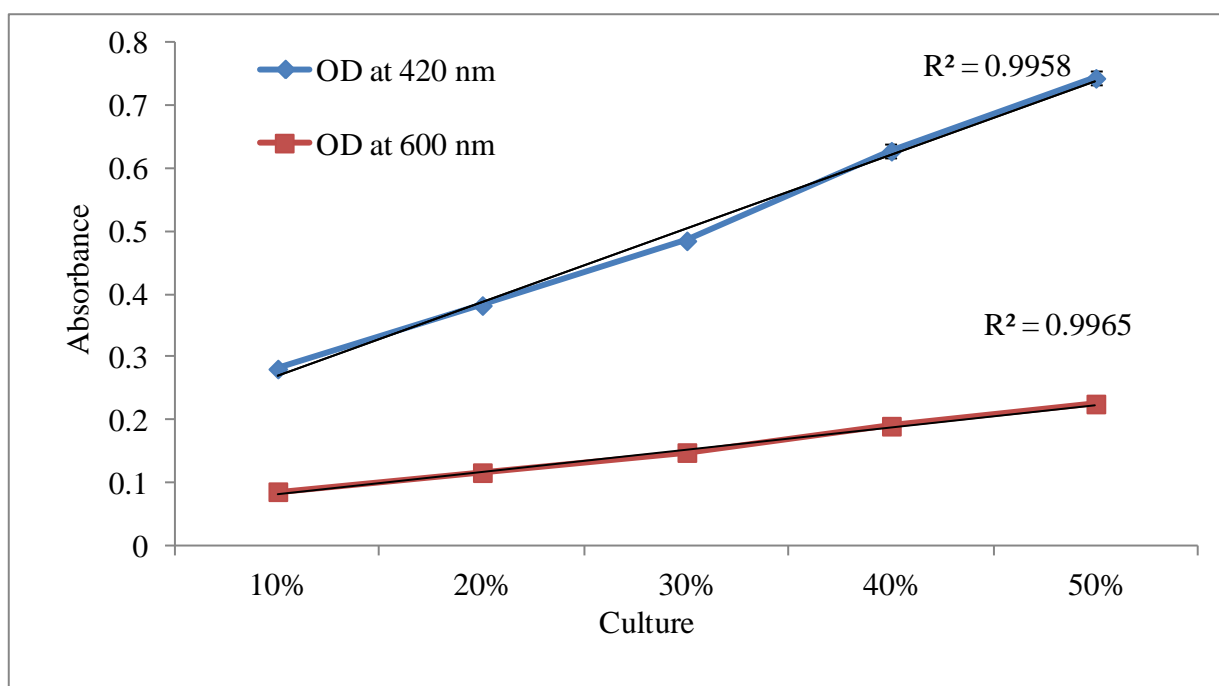


Fig 48. Relazione i valori misurati di OD₄₂₀ e OD₆₀₀ (in presenza di ONPG) per differenti percentuali di coltura utilizzate.

I dati sperimentali hanno mostrato un'ottima correlazione lineare tra l'attività della β -galattosidasi e la densità della coltura cellulare di *E. coli* ATCC 11303 (Fig. 48) per differenti percentuali di coltura. In particolare il rapporto OD_{420nm}/OD_{600nm} rimane pressoché costante (con un valore pari a 3.30) al variare delle percentuali di coltura utilizzate. Questi risultati hanno confermato il vantaggio nell'utilizzo di ONPG quale substrato artificiale della β -galattosidasi per una rilevazione indiretta della proliferazione batterica.

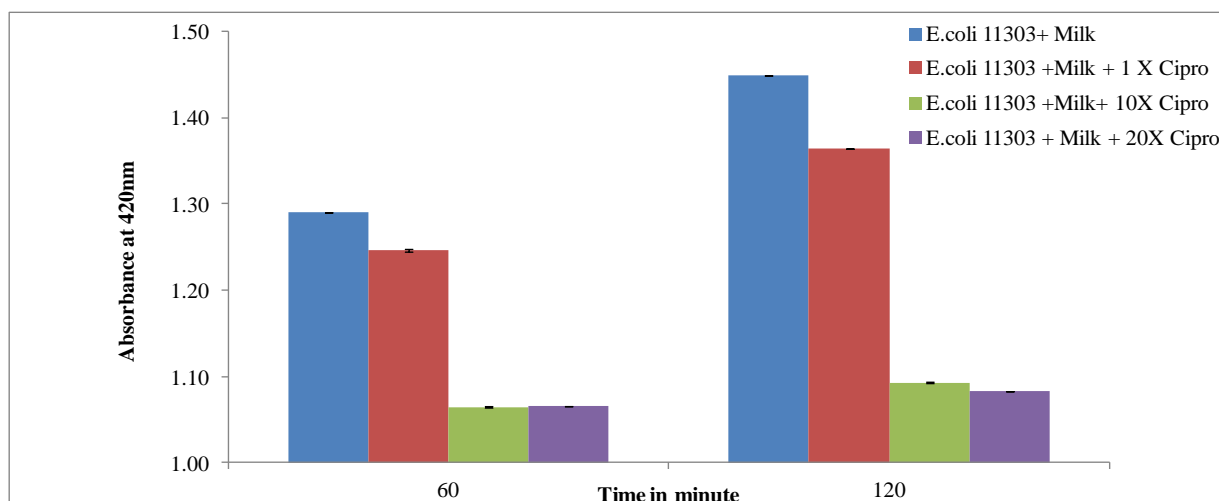


Fig 49. Misure spettrofotometriche di assorbanza (OD_{420}) su colture cellulari di *E. coli* ATCC 11303 in assenza o in presenza di ciprofloxacina (1x, 10x e 20 x LMR) in presenza di ONPG.

I risultati sperimentali ottenuti (Fig. 49) mostrano come l'utilizzo di ONPG quale substrato artificiale della β galattosidasi consenta di rivelare l'effetto della ciprofloxacina sulla proliferazione del ceppo *E. coli* 11303 nel mezzo di crescita contenente latte entro un tempo di esposizione di un ora.

2.3.2 Saggio fluorimetrico del promotore lac

Considerando i risultati positivi ottenuti con i saggi spettrofotometrici della β -galattosidasi endogena si è proceduto con una prima ingegnerizzazione delle cellule batteriche per la realizzazione un *bioreporter* basato **misura ottica di emissione di fluorescenza** correlata all' **attività del promotore lac (saggio fluorimetrico del promotore lac)**. Nello specifico questo promotore (che regola la trascrizione dei geni coinvolti nel catabolismo del lattosio incluso il gene della β -galattosidasi) è stato posto a monte del *gene reporter* codificante la proteina fluorescente **mCherry**.

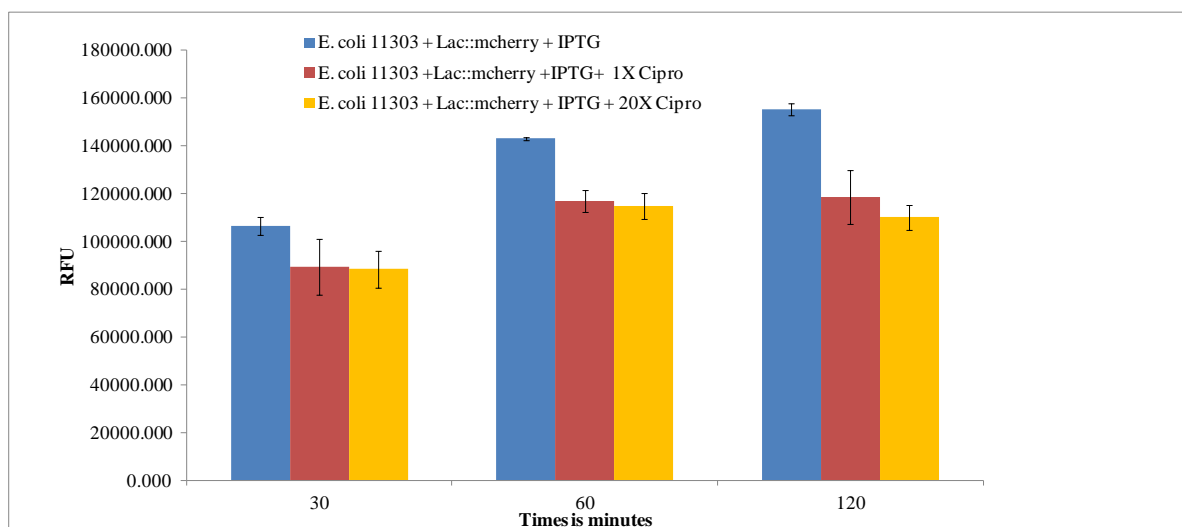


Fig. 50. Misure di fluorescenza di *E. coli* ATCC 11303 + Lac::mcherry in assenza o in presenza di ciprofloxacina (1x e 20x LMR).

La misura indiretta della proliferazione cellulare tramite il saggio fluorimetrico del promotore lac ha mostrato dei risultati molto simili a quelli ottenuti impiegando il saggio spettrofotometrico della β -galattosidasi endogena (Fig. 50): la ciprofloxacina (aggiunta a colture cellulari **in assenza di latte**) ha infatti ridotto significativamente (rispetto al controllo) la proliferazione delle cellule ingegnerizzate di *E. coli* 11303 **entro 1 ora di esposizione**.

I saggi sono dunque stati ripetuti nelle stesse condizioni sopra riportati con l'aggiunta di 50 μ L di latte nei campioni (concentrazione finale 2,5%).

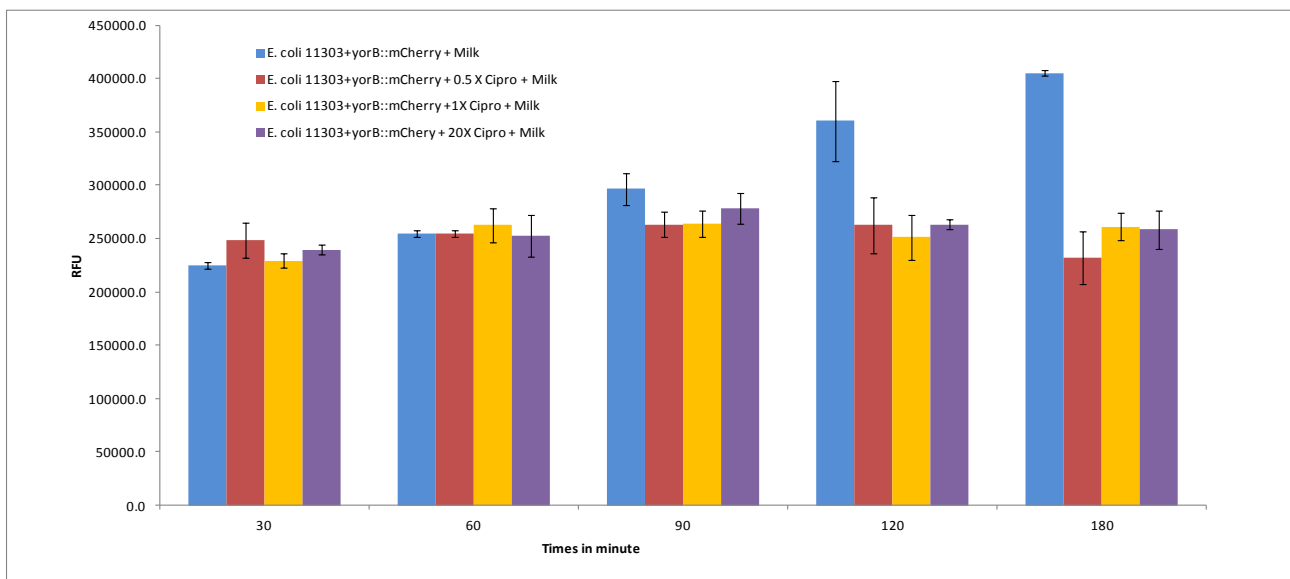


Fig. 51. Misure di fluorescenza su colture cellulari di *E. coli* ATCC 11303 + Lac::mCherry + latte in assenza o in presenza di ciprofloxacina (1x and 20x LMR).

I risultati ottenuti mostrano come la ciprofloxacina (aggiunta in diverse concentrazioni alle colture cellulari **in presenza di latte**) ha ridotto significativamente (rispetto al controllo) la proliferazione delle cellule ingegnerizzate *E. coli* 11303+lac::mCherry **entro 2 ore (120 minuti)** di esposizione. La presenza di latte sembrerebbe interferire con la misura di fluorescenza.

Per verificare l'interferenza del latte sono state effettuate delle fluorimetriche sul terreno di coltura LB (in assenza di cellule).

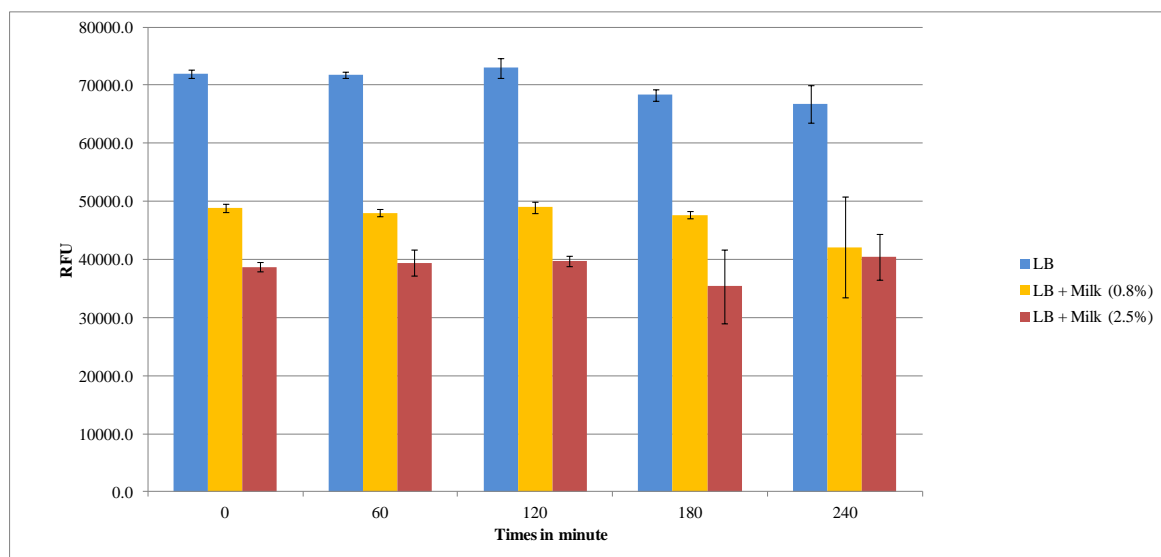


Fig. 52. Misure di fluorescenza su terreno LB in assenza o in presenza di diverse percentuali di latte.

I risultati (Fig.51) mostrano chiaramente come la presenza di latte (per entrambe le percentuali testate) nel terreno LB riduca significativamente il segnale di emissione in fluorescenza.

Sono dunque state effettuate due modifiche al protocollo sperimentale utilizzato; nello specifico è stato cambiato il terreno di coltura (sostituzione del terreno Luria Bertani o LB con il **Mueller Hinton Broth o MHB**) ed è stata diminuita la percentuale di latte aggiunto al terreno (dal 2,5% allo **0,8%**); sono state inoltre effettuate misure spettrofotometriche per verificare se l'interferenza riguardasse la sola misura di fluorescenza.

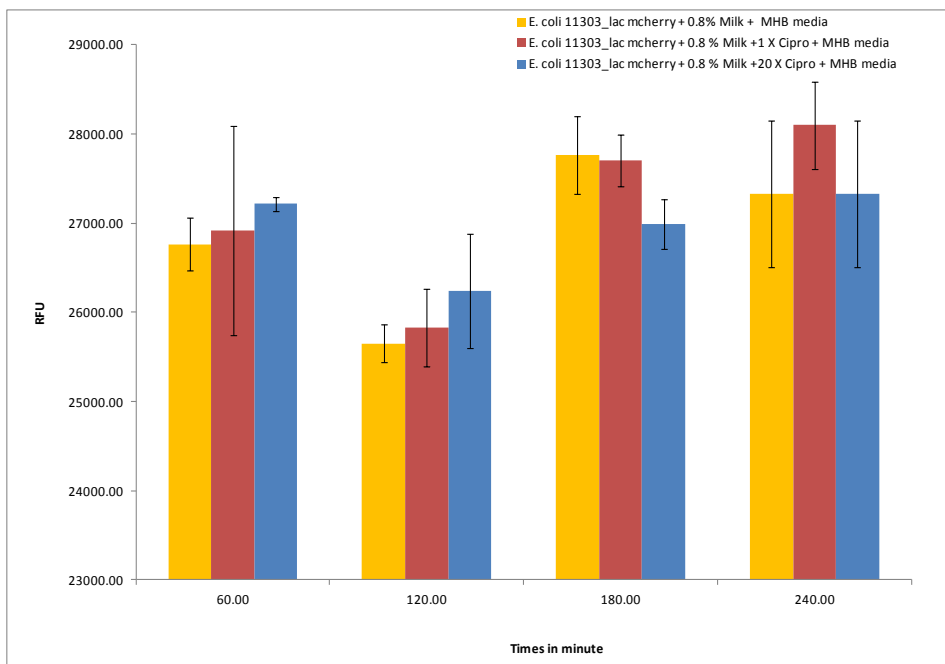


Fig. 52. Misure di fluorescenza su colture cellulari di *E. coli* ATCC 11303+Lac::mCherry in assenza o in presenza di ciprofloxacina (1x e 20x LMR).

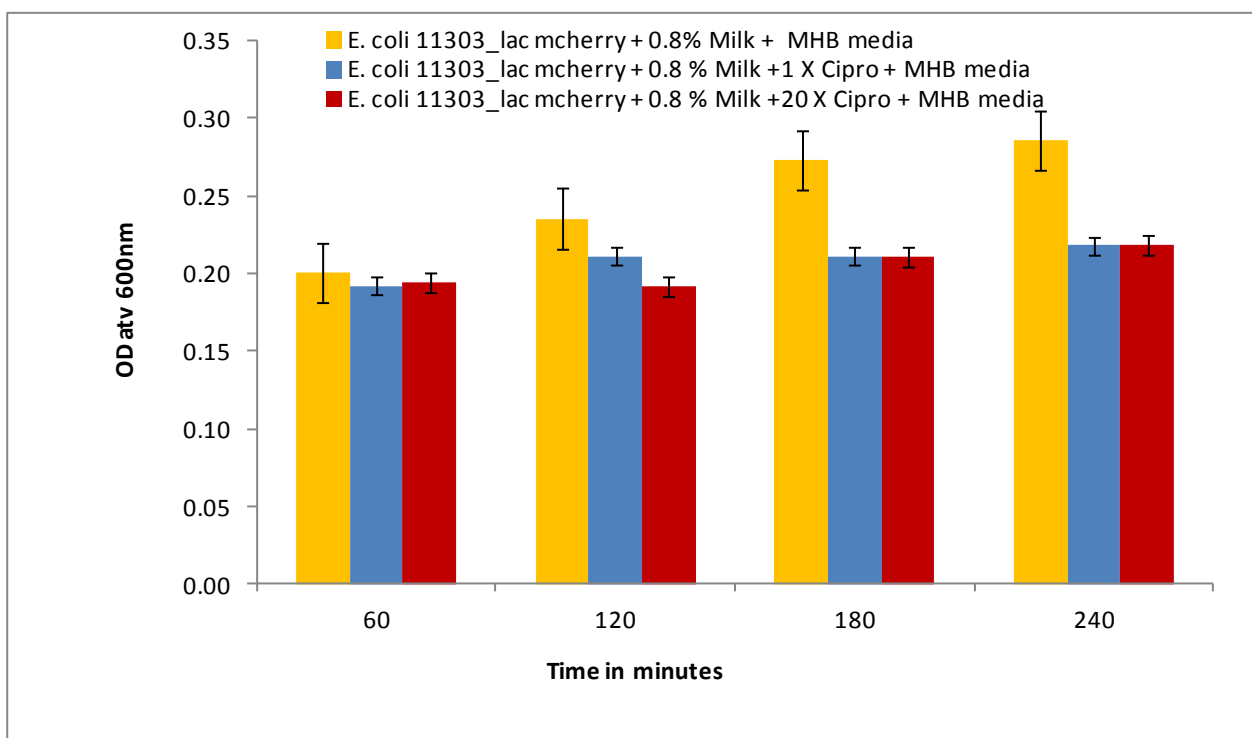


Fig. 53. Misure spettrofotometriche di assorbanza su colture cellulari di *E. coli* ATCC 11303+Lac::mCherry in assenza o in presenza di ciprofloxacina (1x e 20x LMR).

Dal confronto degli istogrammi relativi alle misure fluorimetriche (Fig.52) e spettrofotometriche (Fig.53), risulta evidente una maggiore interferenza sulle prime.

2.3.3 Misure fluorimetriche dell' attività del promotore *yorB*

Durante la fase iniziale del progetto di ricerca di tesi di Dottorato è stata condotta un'attenta analisi critica della letteratura scientifica, per uno studio di fattibilità deduttivo-logico da dati teorico-sperimentali, al fine scegliere il costrutto più adatto e procedere alla messa a punto dell'*E. coli* transgenica sensibile ai chinolonici.

Nei test descritti di seguito è stata valutata l'attività chinolone-specifica di un promotore di origine batterica (**promotore *yorB*** proveniente da *B. subtilis*). Quale vettore di espressione è stato utilizzato il plasmide **pGEM-Teasy**, contenente il **gene mCherry (gene reporter)** posto sotto il controllo del **promotore *yorB*** e contenente il gene *marker* di resistenza all'ampicillina (**Amp^r**). Riguardo il ceppo utilizzato, è stato scelto *E. coli* DH5 α , risultato più adatto per questo tipo di sperimentazione rispetto al ceppo ATCC 11303.

I risultati di alcuni test preliminari hanno permesso di stabilire un valore in percentuale del pre-inoculo (da una coltura O/N) adatto alla rilevazione (**30%**) confrontandolo con altre diluizioni di pre-inoculo: 1%, 5%, 10%, 20% e 40%; tale percentuale era già risultata ottimale durante i saggi spettrofotometrici della β -galattosidasi endogena con OPNG quale substrato artificiale (vedi sopra).

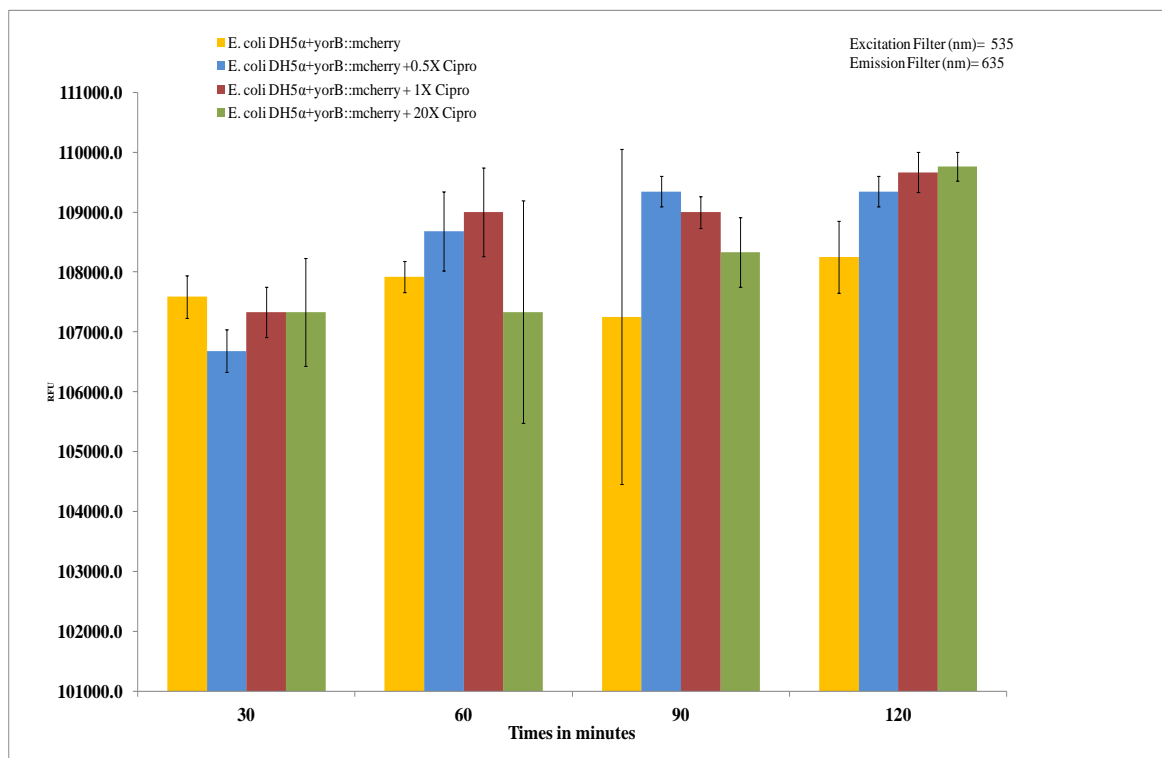


Fig. 54. Misure di fluorescenza su colture di *E. coli* DH5 α +*yorB*::*mCherry* (in assenza di latte) in assenza o in presenza di ciprofloxacina (0.5x, 1x e 20x LMR).

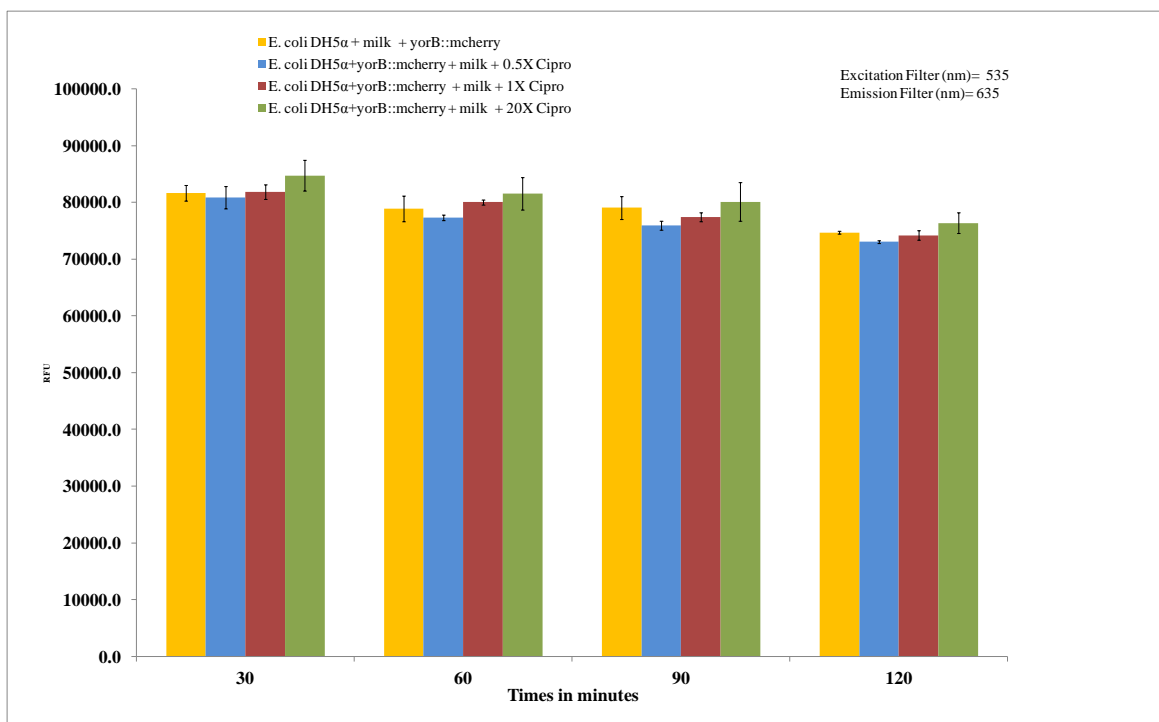


Fig. 55. Misure di fluorescenza su colture di *E. coli* DH5 α +yorB::mCherry (in presenza di latte 2,5%) in assenza o in presenza di ciprofloxacina (0.5x, 1x e 20x LMR).

Anche per i risultati riportati in Fig. 55 e 56 la presenza di latte al 2,5% sembrerebbe interferire con la misura di fluorescenza. Nelle prove successive come per i saggi fluorimetrici del promotore lac (vedi sopra) il latte è stato aggiunto alla coltura in due percentuali differenti <2,5% (**0.8%** e **0.4%**) ed è stato utilizzato il terreno MHB.

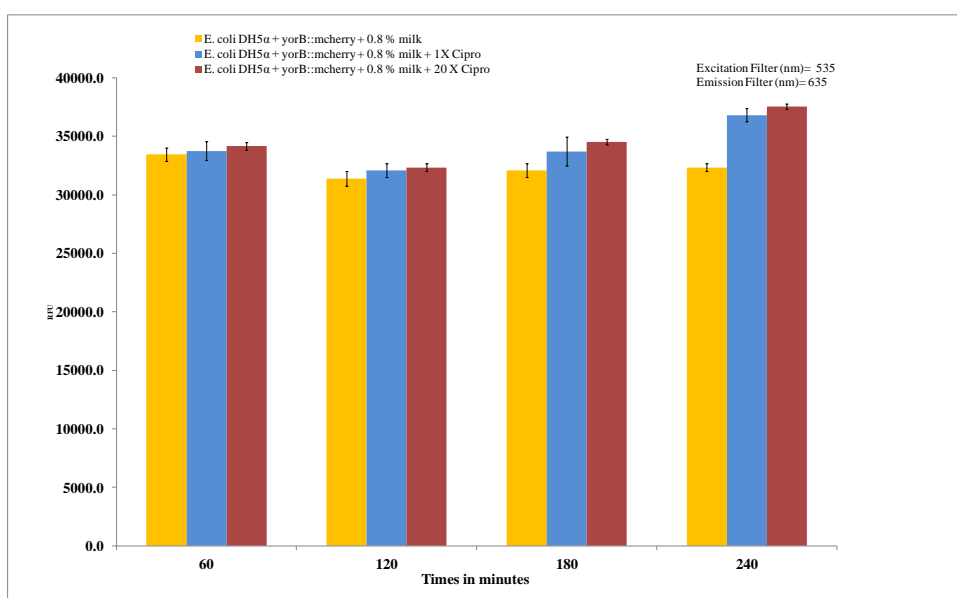


Fig. 56. Misure di fluorescenza su colture cellulari di *E. coli* DH5 α + yorB::mCherry in MHB in assenza o in presenza di ciprofloxacina (1x e 20x LMR) e in presenza di latte 0,8%.

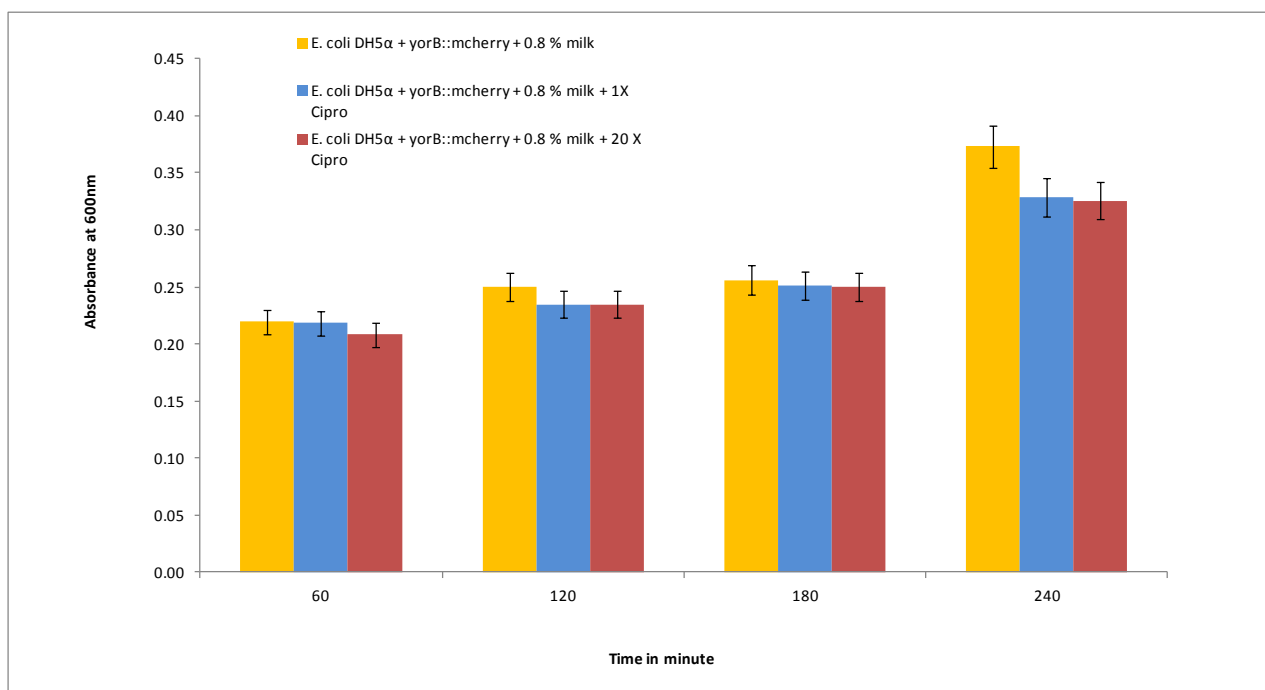


Fig. 57. Misure spettrofotometriche di assorbanza (OD_{600}) su colture di *E. coli* DH5α + yorB::mCherry in MHB in assenza o in presenza di ciprofloxacina (1x e 20x LRM) e latte allo 0,8 %.

Secondo i risultati ottenuti riportati in Fig. 56 e 57 variazioni significative tra i valori ottenuti dai campioni test e quelli di controllo si osservano solo dopo 120 minuti (2h) per le colture esposte a ciprofloxacina 20x LMR e dopo 180 minuti (3h) nel caso delle colture esposte a ciprofloxacina 1X LMR.

I test sono stati ripetuti mantenendo la percentuale di latte allo 0,4% :

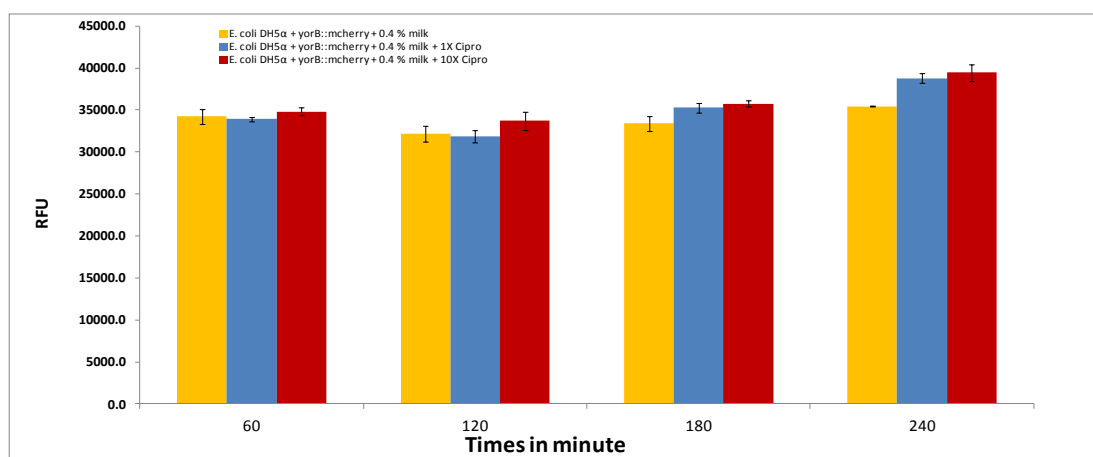


Fig. 58. Misure di fluorescenza su colture cellulari di *E. coli* DH5α + yorB::mCherry in MHB in assenza o in presenza di ciprofloxacina (1x e 20x LMR) e latte allo 0,4 % .

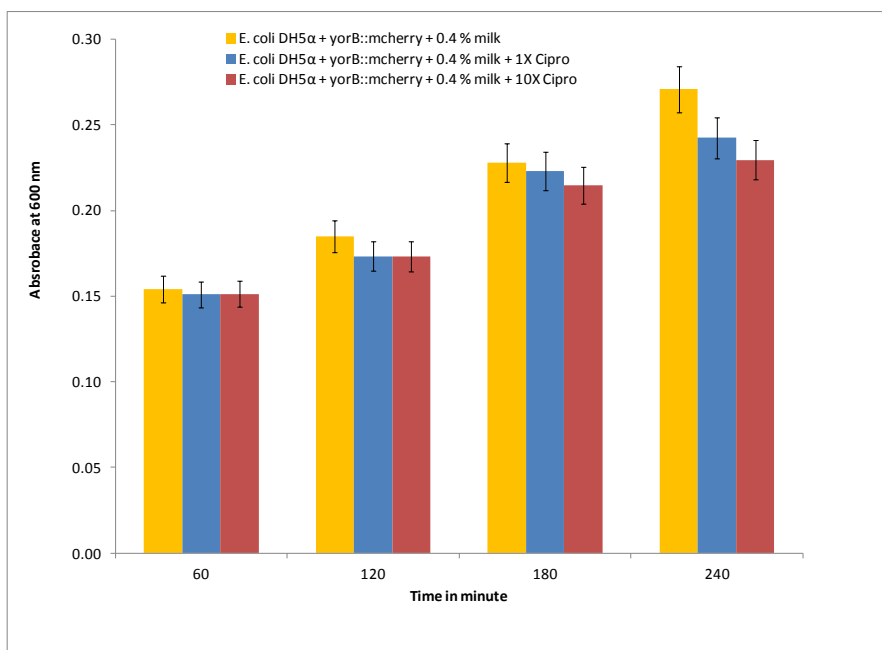


Fig. 60. Misure spettrofotometriche di assorbance (OD_{600}) su colture di *E. coli* DH5 α + yorB::mCherry in MHB in assenza o in presenza di ciprofloxacina (1x e 20x LMR) e latte allo 0,4 %.

I risultati mostrano come in colture contenenti il 30% pre-inoculo (da colture *overnight* di *E. coli* DH5 α + yorB::mCherry) e 0.8% o 0.4% di latte in mezzo MHB il gene *mCherry* venga indotto precocemente (2-3 ore) in presenza di ciprofloxacina (rispetto al controllo). I valori mostrano variazioni significative dopo 120 minuti (2h) in presenza di ciprofloxacina 20x LMR e dopo 180 minuti (3h) in presenza di ciprofloxacina 1x LMR.

Misure fluorimetriche sul terreno MHB in presenza delle due percentuali di latte testate (0,8% e 0,4%), mostrano comunque un'interferenza nella lettura ottica (Fig. 61).

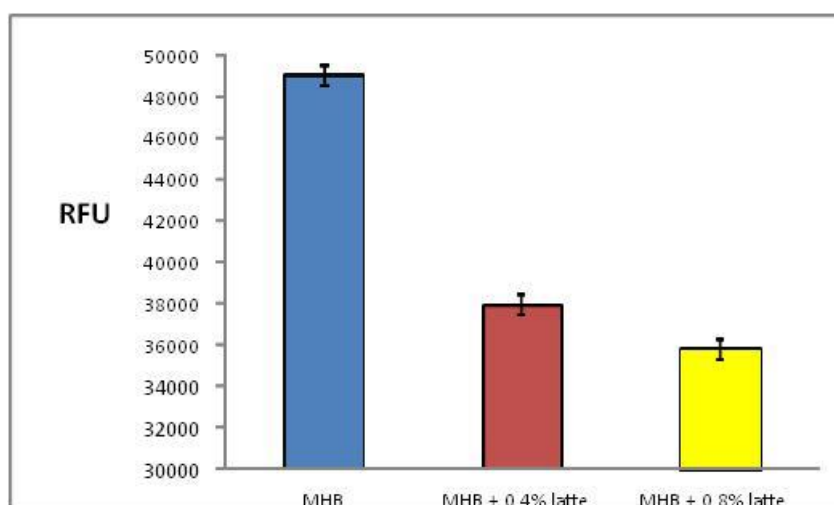


Fig. 61. Misure di fluorescenza del mezzo MHB con aggiunta di differenti percentuali di latte.

Espressione della proteina GFP sotto il controllo del promotore *yorB*

Dopo mCherry è stata testata l'efficacia di un secondo fluoroforo, la GFP. Il ceppo di *E. coli* DH5 α è stato dunque ingegnerizzato utilizzando quale vettore di espressione il plasmide pGEM-Teasy (lo stesso impiegato negli altri test), contenente il gene GFP posto sotto il controllo del promotore *yorB* e contenente il gene *marker* di resistenza all'ampicillina (Amp^r). Le cellule ingegnerizzate sono state poi utilizzate per misure spettrofotometriche di assorbanza (proliferazione cellulare) e misure fluorimetriche (attività del promotore *yorB*).

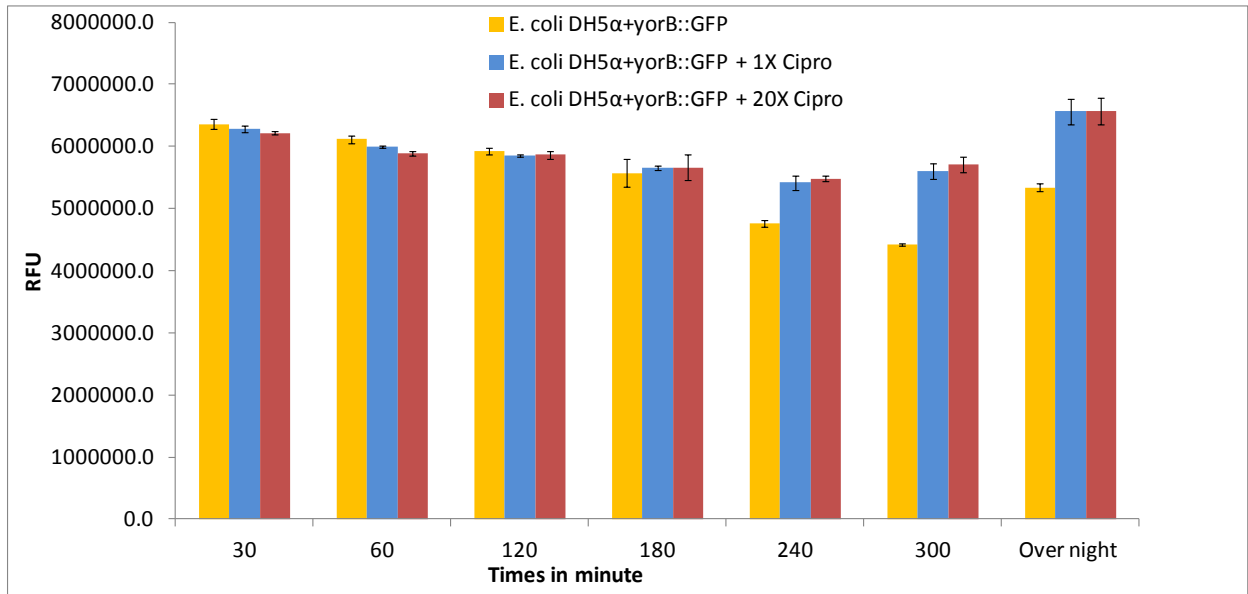


Fig. 62. Misure fluorimetriche su colture di *E. coli* DH5 α +*yorB*::GFP in assenza o in presenza di ciprofloxacina (1x e 20x LMR).

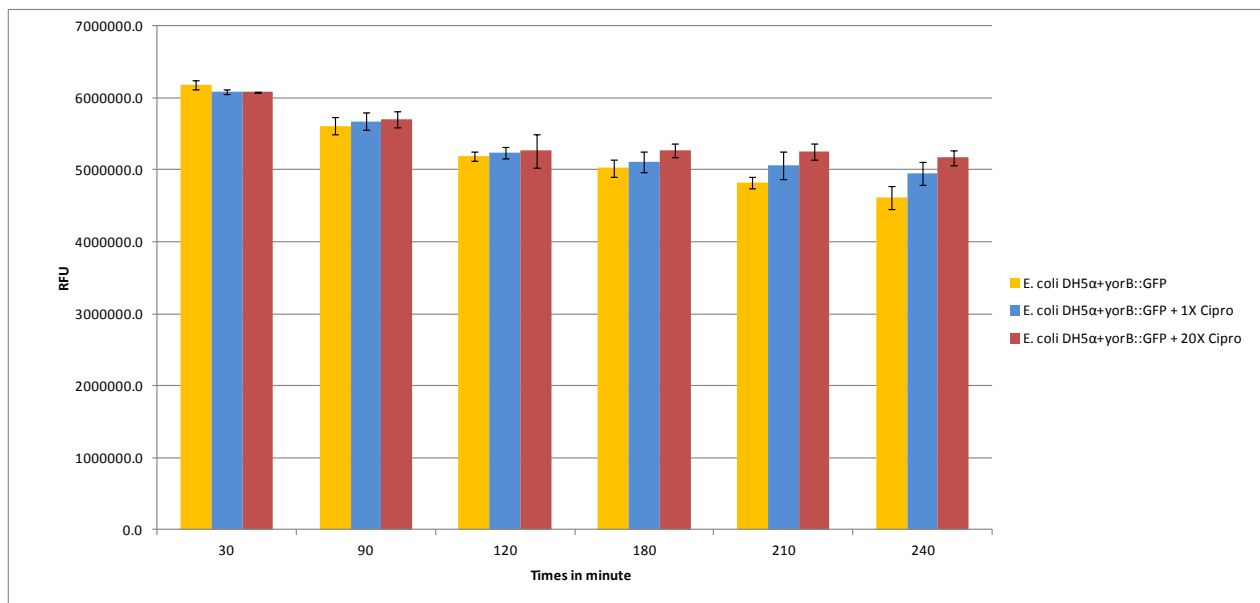


Fig. 63. Misure fluorimetriche su colture di *E. coli* DH5 α +*yorB*::GFP in assenza o in presenza di ciprofloxacina (1x e 20x LMR).

I risultati ottenuti (mostrati in Fig. 62 e 63 ottenute da valori medi di misure in triplicata) differenze significative tra campioni test e campioni di controllo solo dopo 4 ore di esposizione.

In conclusione, il promotore *yorB* è in grado di produrre una risposta in presenza di ciprofloxacina; tuttavia la presenza di latte in entrambi i mezzi di coltura (LB e MHB) sembra causare una drastica riduzione del valore di fluorescenza. Sulla base dei risultati sperimentali ottenuti tale riduzione non sembrerebbe essere attribuibile ad una minore attività del promotore e quindi ad un'effettiva diminuzione dell'induzione genica di *mcherry* o di *GFP*.

2.6 Conclusioni

Dalle prove sperimentali eseguite utilizzando la biosonda ottica a cellule di *E. coli*, i risultati ottenuti con *E. coli* DH5 α . transgenica (contenente il costrutto ciprofloxacina inducibile) hanno mostrato la possibilità di trasferimento della metodologia sul latte. Infatti, i dati ottenuti mostrano una precoce induzione di mCherry in seguito all'esposizione a ciprofloxacina 20x LMR (120 minuti) e a ciprofloxacina 1x LMR (180 minuti) addizionata al latte bovino (in assenza di residui di altri antibiotici ad uso veterinario). Per ottenere un risultato analitico positivo, sia il protocollo di ingegnerizzazione delle cellule che il protocollo sperimentale di esecuzione del saggio (ad es. concentrazione di latte aggiunto, tipo di terreno liquido utilizzato) sono stati ottimizzati.

Meno consistenti sono stati i risultati ottenuti con il saggio fluorimetrico del promotore *lac* (attraverso l'espressione di mCherry) utilizzando cellule di *E. coli* ingegnerizzate.

La misura indiretta della proliferazione cellulare attraverso l'attività della β -galattosidasi endogena del ceppo *E. coli* ATCC 11303 ha prodotto risultati migliori e particolarmente interessanti sono stati quelli ottenuti utilizzando ONGP come substrato artificiale dell'enzima, che ha permesso la rilevazione della ciprofloxacina 1x LMR nel latte entro 60 minuti di esposizione. Pertanto secondo i dati attualmente disponibili il sistema di rilevazione della ciprofloxacina basato sul monitoraggio indiretto della proliferazione cellulare di *E. coli* ATCC 11303 si è dimostrato essere il più adatto, soprattutto in termini di tempi di risposta.

3- BIOSONDA POTENZIOMETRICA A CELLULE VERO MODIFICATE CON ANTICORPI ANTI-AFB₁ PER LA RILEVAZIONE DELL'AFLATOSSINA B₁

(Bioelectric Recognition Assay System o BERA System®)

in collaborazione con



*Laboratory of Enzyme Technology, School of Food Science, Biotechnology and Development,
Agricultural University of Athens (AUA).*

3.1 Basi della ricerca

3.1.1 Aflatossina B₁

Le aflatossine sono metaboliti secondari prodotti da alcune specie di funghi filamentosi appartenenti al genere *Aspergillus* come *Aspergillus flavus* (aflatossine B₁ e B₂) e *Aspergillus parasiticus* (aflatossine B₁, B₂, G₁ e G₂).

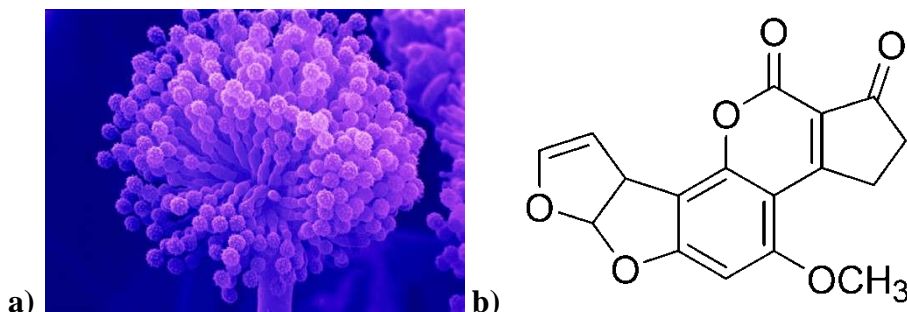


Fig. 64 a) Immagine al microscopio di una testa conidiale di *Aspergillus* e b) struttura molecolare dell'aflatossina B₁.

Si tratta di funghi saprofiti capaci di crescere in ambienti in cui l'acqua ha una bassa attività e di contaminare prodotti vegetali in ogni stadio del ciclo produttivo, dal campo (fase di pre-raccolto) alla fase di immagazzinamento (post-raccolto), anche se sono più comunemente presenti durante le fasi di essiccazione e il successivo stoccaggio di materie prime, mangimi ed alimenti [Sweeney & Dobson, 1998].

Tab. 11. Condizioni ottimali di temperatura ed umidità per la crescita di *Aspergillus flavus* e *parasiticus* e per la produzione di micotossine.

Specie	Range di temperatura ottimale di crescita (°C)	Range di temperatura ottimale per la produzione di micotossine (°C)	Attività dell'acqua (a_w) per la produzione di micotossine
<i>Aspergillus flavus</i>	25-35	30-33	0,95-0,99
<i>Aspergillus parasiticus</i>	32-35	33	0,95-0,99

Una delle micotossine di maggior rilevanza in ambito alimentare e di maggior interesse tossicologico è l'aflatossina B₁ (AFB₁) (Fig. 64b).

La lettera “B” nel nome sta ad indicare la colorazione fluorescente blu prodotta dall'aflatossina se viene illuminata con luce UV, mentre il numero 1 in pedice indica la rilevanza del composto [Sweeney & Dobson, 1998].

Prodotti alimentari come cereali (mais, sorgo, miglio perlato, riso, frumento), semi oleosi (arachide, soia, girasole, cotone), spezie (peperoncino, pepe nero, coriandolo, curcuma, zenzero), e alberi da noci (mandorle, pistacchi, noci, cocco, noci del Brasile) sono particolarmente soggette ad infezione da *Aspergillus* poiché sono in grado di fornire carboidrati o oli vegetali, fonti di azoto organico o inorganico ed oligoelementi necessari per la crescita dei funghi e per la produzione di aflatossine. [Anthony *et al.*, 2012; Reddy *et al.*, 2010].

In generale i processi di trasformazione degli alimenti possono modificare la distribuzione e/o la stabilità dell'AFB₁. Ad esempio durante il processo di macinazione dei cereali, le aflatossine vengono ridistribuite (ma non distrutte) e concentrate in alcune frazioni che possono poi essere utilizzato nella preparazione di mangimi per animali [Bullerman & Bianchini, 2007]. I processi ad alta temperatura possono causare una riduzione variabile del contenuto di aflatossine: ad esempio durante le fasi di ebollizione del mosto o durante la fermentazione finale [Chu *et al.*, 1975], durante la cottura comune oppure a pressione del riso contaminato da AFB₁ [Bullerman & Bianchini, 2007] o durante la torrefazione dei chicchi di caffè [Soliman, 2002].

La relazione tra alimentazione e sintomatologia da esposizione alle aflatossine è stata accertata per la prima volta a seguito di un evento epidemico (noto come “Turkey X disease”) che colpì un elevato numero di tacchini in Inghilterra nel 1960 [Wogan, 1973]. Tra le aflatossine, l'AFB₁ risulta essere la più pericolosa sia per quanto riguarda le intossicazioni acute che quelle croniche [Cullen & Newberne, 1993]. La IARC (acronimo inglese dell'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro)

ha classificato l'AFB₁ nel Gruppo I (cancerogenicità accertata per l'uomo) [IARC, 2002.]. E' stata osservata una maggiore suscettibilità alle aflatossine nei negli individui giovani, anche se questa sembra variare ugualmente in funzione di altri fattori quali la specie, il sesso e i fattori nutrizionali [Williams *et al.*, 2004]. Sono stati inoltre osservati effetti immunosoppressivi a trasmissione transplacentare nei maiali [Pier *et al.*, 1985] e nell'uomo [Denning *et al.*, 1990; Turner *et al.*, 2007]. L'esposizione cronica alle aflatossine sembrerebbe avere anche importanti effetti e conseguenze a livello nutrizionale negli animali (es. diminuzione delle sintesi di DNA e proteine, riduzione nell'efficienza di conversione del cibo e del tasso di crescita ed influenza sulle concentrazioni delle vitamine A e D) [Williams *et al.*, 2004].

L'attuale politica e le strategie dell'UE in materia di aflatossine si basano sull'adozione di un ampio quadro normativo per ridurre al minimo la presenza di aflatossine in diversi prodotti alimentari e mangimi:

- La Direttiva 2002/32/CE stabilisce i livelli massimi di aflatossine B₁ nelle materie prime per mangimi
- Il Regolamento di esecuzione (UE) 884/2004 della Commissione stabilisce condizioni particolari per determinati prodotti alimentari importati da alcuni paesi terzi a causa del rischio di contaminazione da aflatossine di questi prodotti;
- Il Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione stabilisce i livelli massimi di aflatossine (B1, B2, G1, G2 and M1);
- Il Regolamento (CE) n. 401/2006 della Commissione stabilisce i metodi di campionamento e di analisi per il controllo efficace delle micotossine, incluse le aflatossine;
- Al fine di assistere le autorità competenti nel controllo ufficiale della contaminazione da aflatossine nei prodotti alimentari che sono soggetti al regolamento di esecuzione (UE) 884/2014, è stato elaborato un documento di orientamento chiamato "Documento di orientamento per le autorità competenti per il controllo del rispetto della legislazione UE in materia di aflatossine "; questo documento guida è attualmente in riesamina e la versione aggiornata sarà disponibile nella primavera del 2015.

Il 3 febbraio 2004, l'EFSA ha adottato un parere relativo all'AFB₁ quale sostanza indesiderabile nell'alimentazione degli animali, esortando al monitoraggio della presenza di AFB₁ nei mangimi importati e di AFM₁ (prodotta dal catabolismo epatico della AFB₁ assunta con la dieta) nel latte fresco. Il 29 gennaio del 2007 l'EFSA si è nuovamente pronunciata riguardo il potenziale aumento del rischio per la salute dei consumatori legata possibile aumento dei livelli massimi esistenti per le aflatossine in mandorle, nocciole, pistacchi e prodotti derivati. Nel giugno del 2009 l'EFSA ha

adottato una dichiarazione, relativa agli effetti sulla salute pubblica, di un aumento dei livelli di aflatossine totali da 4 µg / kg a 10 µg / kg per frutta secca a guscio diversa da mandorle, nocciole e pistacchi.

3.1.2 Biosensori potenziometrici e BERA System®: modificazione della membrana plasmatica per elettroinserzione di anticorpi anti-AFB₁

La potenziometria è uno dei più diffusi metodi analitici strumentali e ha assunto negli anni una posizione di rilievo nell'analisi sensoristica. La misura potenziometrica consiste essenzialmente nella rilevazione di una variazione di potenziale che, in assenza di corrente, si instaura fra due elettrodi, un elettrodo di riferimento (a potenziale costante) e un elettrodo indicatore che assume un valore di potenziale che è funzione della concentrazione (attività) di una o più specie in soluzione, secondo una relazione logaritmica (definita per soluzioni diluite dall'equazione di Nernst).

Tra le tipologie di elettrodi disponibili in commercio, negli ultimi decenni gli elettrodi serigrafati (*screen printed electrodes* o SPE), vengono usati sempre maggiormente per applicazioni sensoristiche e biosensoristiche (ad esempio analisi *in situ* di inquinanti ambientali) grazie ad una serie di caratteristiche vantaggiose come, ad esempio, la semplicità, la rapidità di risposta e l'elevata sensibilità [Li *et al.*, 2012].

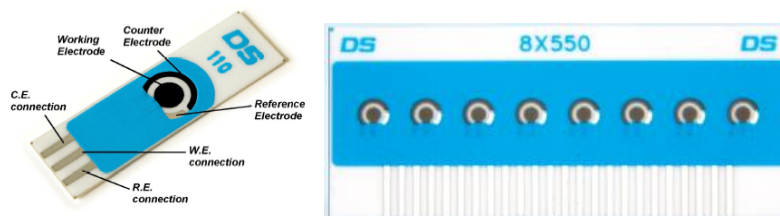


Fig. 65. Elettrodi serigrafati al carbonio (SPCEs) (DropSens).

La serigrafia è una tecnica che consiste in deposizioni di inchiostro strato-per-strato su un substrato solido (es. plastica, alluminio o ceramica) attraverso l'utilizzo di uno schermo che definisce la geometria del sensore. [Renedo *et al.*, 2007]. Una configurazione-tipo di elettrodi serigrafati al carbonio (*Screen Printed Carbon Electrodes* o SPCEs), ampiamente utilizzati nella ricerca in campo elettrochimico, è mostrata in Fig. 65: un elettrodo di lavoro di forma circolare di carbonio, un elettrodo di pseudo-riferimento in argento (costituito da un semplice filo di Ag) ed un contro elettrodo di carbonio. Essenzialmente la differenza tra un elettrodo di riferimento ed uno di pseudo-riferimento è la mancanza di equilibrio termodinamico nel secondo [Inzelt, 2013]; questo significa che il suo

potenziale di riferimento non è noto e dipenderà dalla composizione della soluzione con cui viene a contatto.

Alcuni parametri biochimici cellulari, quali concentrazioni di ioni inorganici (H^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- , ecc.), il potenziale di membrana ed i potenziali redox, possono essere rilevati per via elettrochimica in particolare attraverso misure potenziometriche.

Una cellula vivente può infatti essere descritta come un sistema elettrochimico dinamico [Bery & Grivell, 1995]: molti processi biologici quali reazioni redox e cambiamenti nella composizione/concentrazione ionica coinvolgono infatti trasferimenti di elettroni e di cariche. Ad esempio tutte le cellule viventi mantengono un differenza di potenziale attraverso la membrana plasmatica (V_m o **potenziale di membrana**) (Fig. 66), solitamente negativa rispetto all'esterno della cellula. Il valore base relativamente statico della differenza di potenziale transmembrana delle cellule quiescenti è chiamato **potenziale di membrana a riposo**.

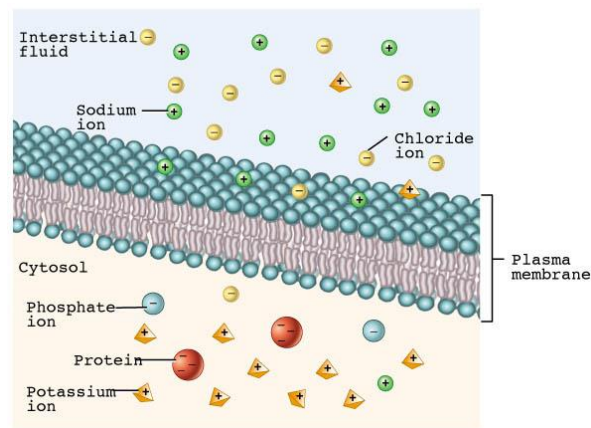


Fig. 66. Rappresentazione schematica della membrana cellulare e degli ioni coinvolti nella formazione del V_m .

Il potenziale di membrana a riposo ($E_i - E_o$) viene definito dall'equazione di Goldman:

$$E_i - E_o = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_K [K^+]_o + P_{Na} [Na^+]_o + P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_o} \right) \quad (4)$$

Dove P_K , P_{Na} e P_{Cl} rappresentano rispettivamente le permeabilità della membrana agli ioni K^+ , Na^+ e Cl^- . Considerando che la membrana plasmatica della maggior parte delle cellule viventi è più permeabile allo ione K^+ rispetto agli altri due ioni, l'equazione può essere semplificata così:

$$E_i - E_o = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_K [K^+]_o}{P_K [K^+]_i} \right)$$

$$E_i - E_o = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} \right)$$
(5)

L'equazione (4) assume dunque la forma della nota equazione di Nernst per lo ione K^+ .

Nelle cellule non eccitabili questo potenziale di membrana a riposo può subire modifiche in risposta a cambiamenti del flusso di ioni (es. ioni sodio, calcio, e cloruro) come risultato di variazioni nell'attività dei vari canali ionici, trasportatori ionici, e scambiatori presenti sulla superficie della membrana plasmatica. In particolare si parla di 'depolarizzazione' quando il valore assoluto del potenziale di membrana diminuisce e di 'iperpolarizzazione' quando il valore assoluto del potenziale di membrana aumenta.

Il metodo *Bioelectric Recognition Assay (BERA) System*® è un metodo biosensoristico basato sull'impiego di cellule a "membrane ingegnerizzata" quali mediatori biologici. L'ingegnerizzazione avviene attraverso l'inserimento (ad esempio per elettroinserzione) di molecole recettoriali (ad esempio anticorpi) sulla superficie della membrana plasmatica cellulare. Il legame selettivo della molecola d'interesse al rispettivo recettore provoca un cambiamento nella struttura della membrana e che questo fenomeno determini cambiamenti nelle attività dei canali ionici (es. canali ionici a controllo meccanico che possono essere aperti in risposta a stimoli meccanici della membrana su cui sono inseriti), misurabili come variazione del potenziale di membrana a riposo. I segnali prodotti da tale variazione possono dunque utilizzati per la rilevazione specifica di determinati analiti d'interesse. Il BERA System® si è dimostrato applicabile per la rilevazione di pesticidi organofosforici e carbammici [Mavrikou *et al.*, 2008], del 2, 4, 6-tricloroanisolo (sostanza responsabile del cosiddetto 'sentore di tappo' nel vino) [Varelas *et al.*, 2011] di virus delle piante [Perdikaris *et al.*, 2011] e dell'aflatossina M_1 (AFM₁) [Larou *et al.*, 2013].

Nel BERA System® l'elettroporazione viene sfruttata per l'elettroinserzione di anticorpi sulla superficie della membrana plasmatica (Fig. 67). L'elettroporazione è una tecnica basata sull'applicazione di impulsi ad alto voltaggio che determinano un'elettropermeabilizzazione transiente della membrana plasmatica delle cellule, attraverso la formazione di pori [Weaver & Chizmadzhev, 1996; Tieleman, 2004]. Questo fenomeno viene sfruttato per l'introduzione nelle cellule di molecole di DNA, sonde fluorescenti o di enzimi e viene ampiamente utilizzata per applicazioni biotecnologiche o per il *drug delivery*. Riguardo il BERA System®, la verifica del corretto

orientamento degli anticorpi (ossia con il sito di legame dell'antigene rivolto verso l'esterno) dopo l'elettroinserzione è stata verificata e dimostrata con l'ausilio di tecniche di microscopia a fluorescenza [Kokla *et al.*, 2013].

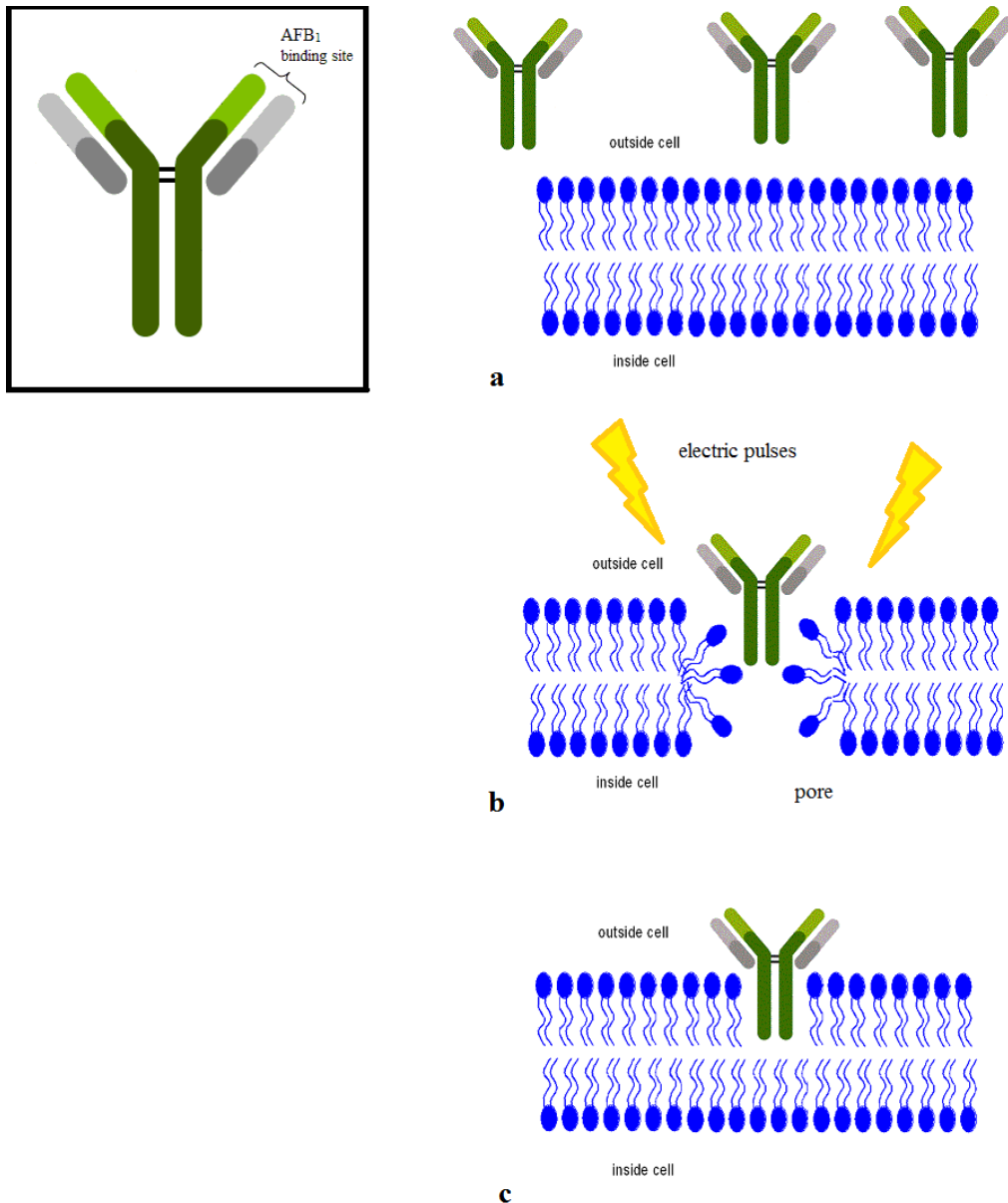


Fig. 67. Rappresentazione schematica del meccanismo di elettroinserzione degli anticorpi anti-AFB₁ sulla superficie della membrana plasmatica: la sospensione anticorpi anti-AFB₁-cellule Vero (a) viene sottoposta ad impulsi elettrici ad alto voltaggio (b) che determinano l'apertura transiente di pori nella membrana plasmatica, nei quali avviene l'inserzione degli anticorpi (c).

I risultati descritti di seguito sono stati ottenuti utilizzando il metodo BERA System® per la rilevazione dell'AFB₁ in terreno di coltura; questa parte del progetto di ricerca di tesi di Dottorato è stata svolta presso il *Laboratory of Enzyme Technology, School of Food Science, Biotechnology and Development* dell' *Agricultural University of Athens* (AUA) sotto la supervisione del Prof. S. Kintzios.

3.2 Materiali e Metodi

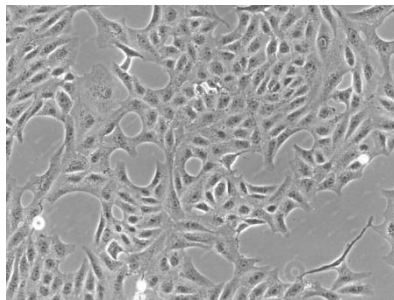


Fig. 68. Immagine al microscopio di cellule Vero.

Per le misure elettrochimiche con il BERA System® sono state modificate cellule Vero di epitelio renale di scimmia *Chlorocebus sabaesus* (Fig. 68); si tratta di una delle linee cellulari continue (che possono cioè essere replicate per diversi cicli di divisione senza diventare senescenti) di origine mammifera più frequentemente utilizzata in microbiologia ed in biologia molecolare e cellulare [Ammerman *et al.*, 2008]. Inoltre questa linea cellulare si è dimostrata adatta per test tossicologici [Chen *et al.*, 2009; Creppy *et al.*, 2004; Freire *et al.*, 2005, Rasooly *et al.*, 2013].

Le cellule Vero (LGC Promochem, Gran Bretagna) sono state coltivate in un terreno Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 10x (Biochrom AG) ottimizzato per la crescita di questa linea cellulare con l'aggiunta di altre componenti riportate in Tab.12:

Componente	Concentrazione finale	Fornitore
DMEM 10x	1x	Biochrom AG
Siero fetale bovino	10%	Gibco
NaHCO ₃ 7,5% v/v	33 mM	Sigma Aldrich
L-alanina L-glutammina	2 mM	Biochrom AG
Antibiotici	100U/100µg	Biochrom AG
Piruvato di sodio	0,5 mM	Biochrom AG
Tripsina	0,02 mM	Sigma Aldrich

Tab.12. Composizione del terreno DMEM ottimizzato per la crescita di cellule Vero.

Dopo aver distaccato le cellule dalle piastre di coltura per aggiunta di una soluzione di 0,5 mg/mL di tripsina e 0,2 mg/mL EDTA in PBS (acronimo inglese di *Phosphate Buffer Saline* o tampone salino fosfato), le cellule ($\approx 2.5 \cdot 10^6$ cellule, contate con l'ausilio di un emocitometro) sono state concentrate per centrifugazione (4 min a 1000 rpm). Il surnatante è stato rimosso e sostituito con 400 µL di soluzione di anticorpi anti-AFB₁ (5µg/mL) per ottenere una concentrazione cellulare di $\approx 6.11 \cdot 10^6$ cells/mL; le sospensioni anticorpi-cellule Vero sono state poste in bagno di ghiaccio per 20 minuti (allo scopo di rallentare i movimenti cellulari e molecolari) prima del trattamento elettroporativo.

L'elettroinsezione degli anticorpi nella membrana cellulare è stata eseguita utilizzando un Eppendorf Eporator® (Fig. 69): 400 µL di sospensioni sono state poste in cuvette per elettroporazione (volume 800 µL). Si è dunque proceduto all'applicazione di un protocollo standard di elettroinsezione ottimizzato per il BERA System®: a ciascuna cuvetta sono stati applicati due impulsi (durata: 0,7 ms) di campo elettrico pari a $1800 \text{ V} \cdot \text{cm}^2$.

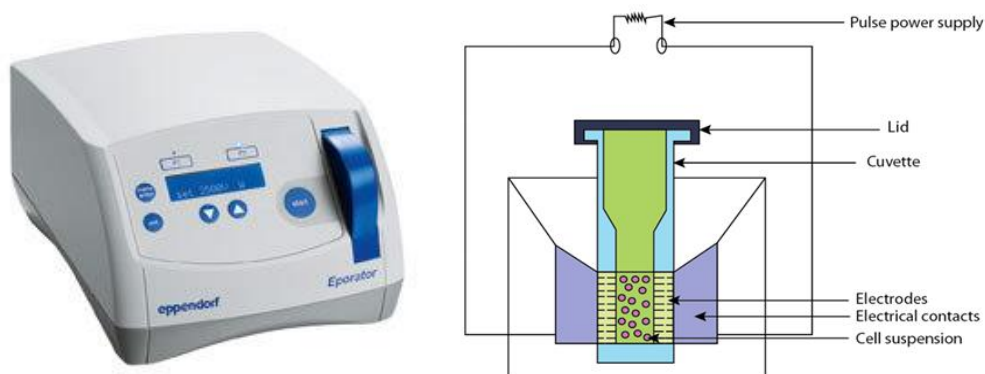


Fig. 69. Elettroporatore Eppendorf Eporator® e schema interno dello strumento.

Dopo il trattamento elettroporativo, il contenuto di ciascuna cuvetta è stato svuotato in piastre Petri aggiungendo 3 mL di DMEM in ciascuna; le piastre sono state incubate *overnight* a 37° C e 5% CO₂; il giorno successivo da ciascuna piastra è stato rimosso il mezzo, le cellule adese sono state lavate delicatamente per aggiunta di con 1 mL of PBS (successivamente rimosso) e distaccate dalla piastra per aggiunta di una soluzione di 0,5 mg/ml di tripsina e 0,2 mg/ml EDTA in PBS. Infine è stato aggiunto 1 mL di DMEM, pipettando su e giù per 2-4 volte per risospendere gentilmente le cellule. L'aggiunta ulterior di 1 mL di DMEM ha permesso di ottenere una concentrazione di cellule Vero modificate pari a $\approx 1,25 \times 10^6$ cellule/mL.

Le cellule Vero modificate con anticorpi anti-AFB₁ sono state utilizzate in sospensione (in DMEM) per misure di potenziale a circuito aperto (*open circuit potential* o *OCP*) ossia misure potenziometriche in assenza di corrente.

Tutte le misure di OCP sono state effettuate utilizzando elettrodi serigrafati al carbonio (*Screen Printed Carbon Electrodes* o *SPCEs*), nello specifico un *set* elettrochimico serigrafato composto da otto celle elettrochimiche (8xSPCEs), forniti dalla DropSens (Oviedo, Spagna), ciascuna composta da tre elettrodi con elettrodi di lavoro al carbonio.

Ciascun *set* elettrochimico 8xSPCEs è stato interfacciato ad un multipotenziostato e i segnali elettrochimici sono stati registrati utilizzando il software UiEChem (Uniscan Instruments Ltd, Gran Bretagna).

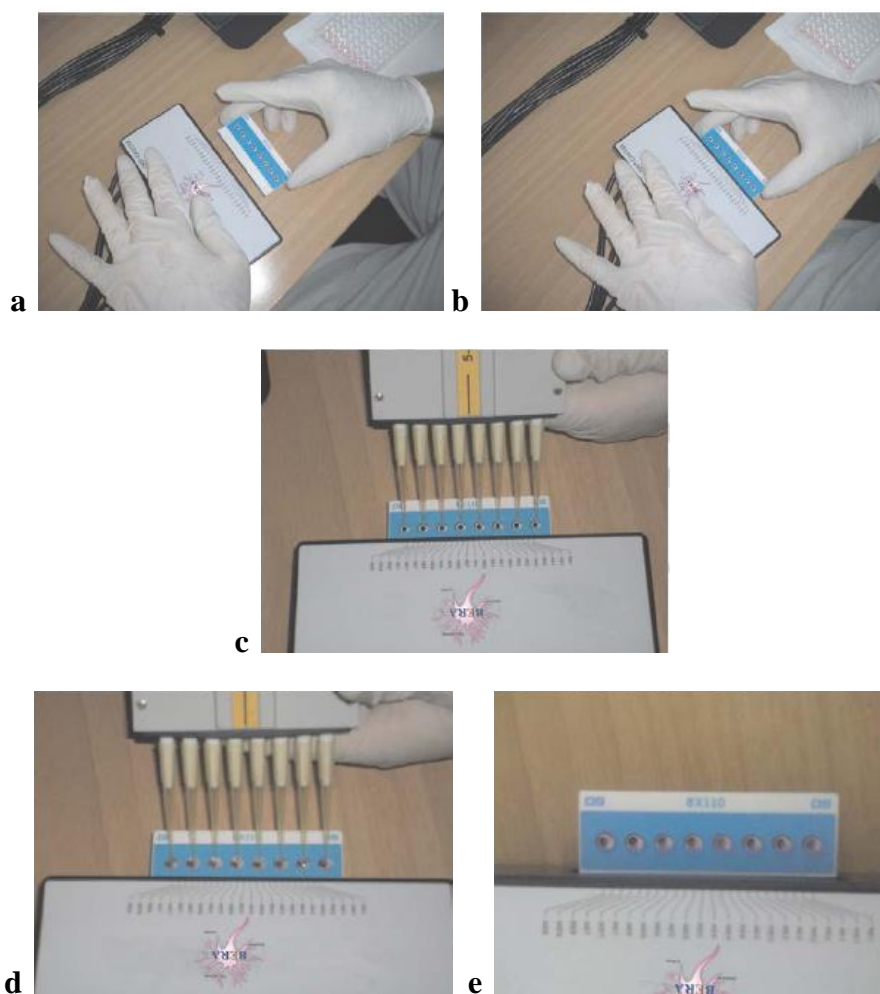


Fig. 70. Fasi sperimentali di preparazione delle misure biosensoristiche con il BERA System®: a e b attacco del *set* elettrochimico all'adattatore del multipotenziostrato; c deposizione delle sospensioni di cellule Vero modificate sulle superfici degli elettrodi serigrafati (volumi da 36 μL ciascuno); d deposizione delle soluzioni di DMEM fortificato con AFB₁ (tenendo conto del fattore di diluizione) o non fortificato (nel caso delle misure potenziometriche sulle sospensioni cellulari di controllo) (volumi di 4 μL ciascuno); elettrodi serigrafati pronti per le misure elettrochimiche.

Le tre concentrazioni di AFB₁ testate (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) sono state ottenute per diluizioni seriali in DMEM a partire da una soluzione *stock* di AFB₁ (concentrazione 2000 ppm in dimetilsolfossido).

Queste concentrazioni corrispondono a 1x LMR, 10x LMR e 50x LMR considerando il limite massimo residuale (2,0 $\mu\text{g} / \text{kg}$) fissato dall'Unione Europea per prodotti alimentari come arachidi, frutta a guscio, frutta secca e relativi prodotti di trasformazione, cereali e prodotti derivati dai cereali, compresi prodotti trasformati a base di cereali [EC Reg. No 1881/2006].

3.3 Risultati e Discussione

I risultati ottenuti dalle misure potenziometriche sulle sospensioni di cellule Vero modificate con anticorpi anti-AFB₁ in assenza o in presenza di di AFB₁ (1x LMR, 10x LMR e 50x LMR) sono riportati negli istogrammi in Fig. 69, 70 e 71. Ciascun istogramma si riferisce ad una replica eseguita nelle stesse condizioni sperimentali e riporta i valori medi (4 ripetizioni) di OCP di acquisiti per singolo test.

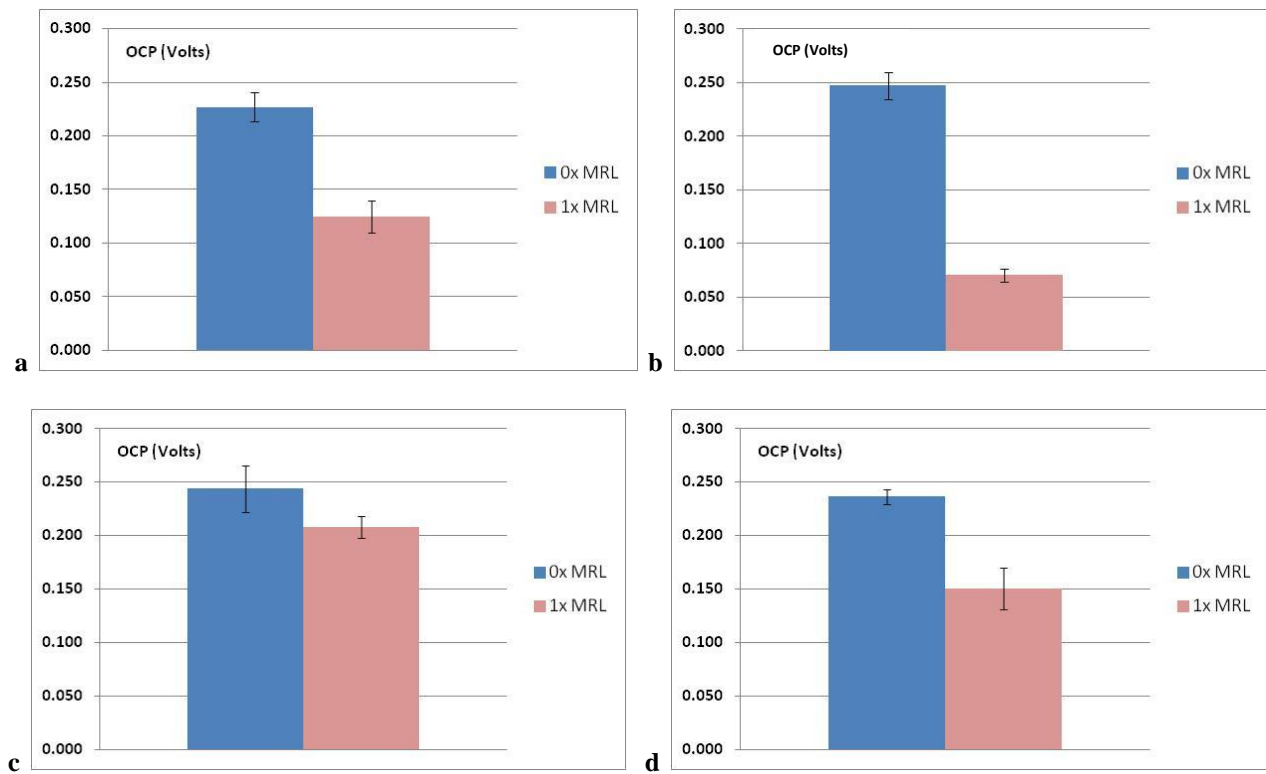


Fig. 71. Istogrammi di valori medi di OCP misurati su sospensioni di cellule Vero modificate in mezzo di coltura fortificato (AFB₁ 1x MRL) e non fortificato.

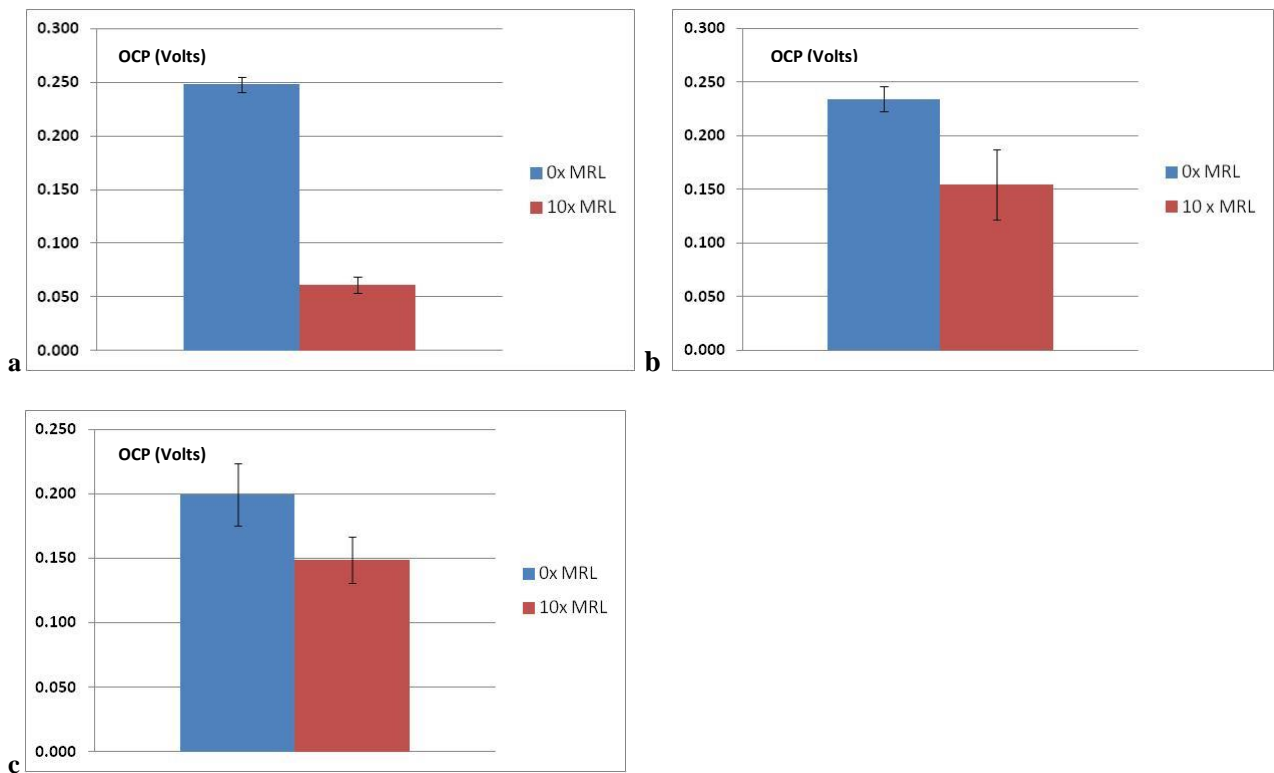


Fig. 72. Istogrammi di valori medi di OCP misurati su sospensioni di cellule Vero modificate in mezzo di coltura fortificato (AFB₁ 10x MRL) e non fortificato.

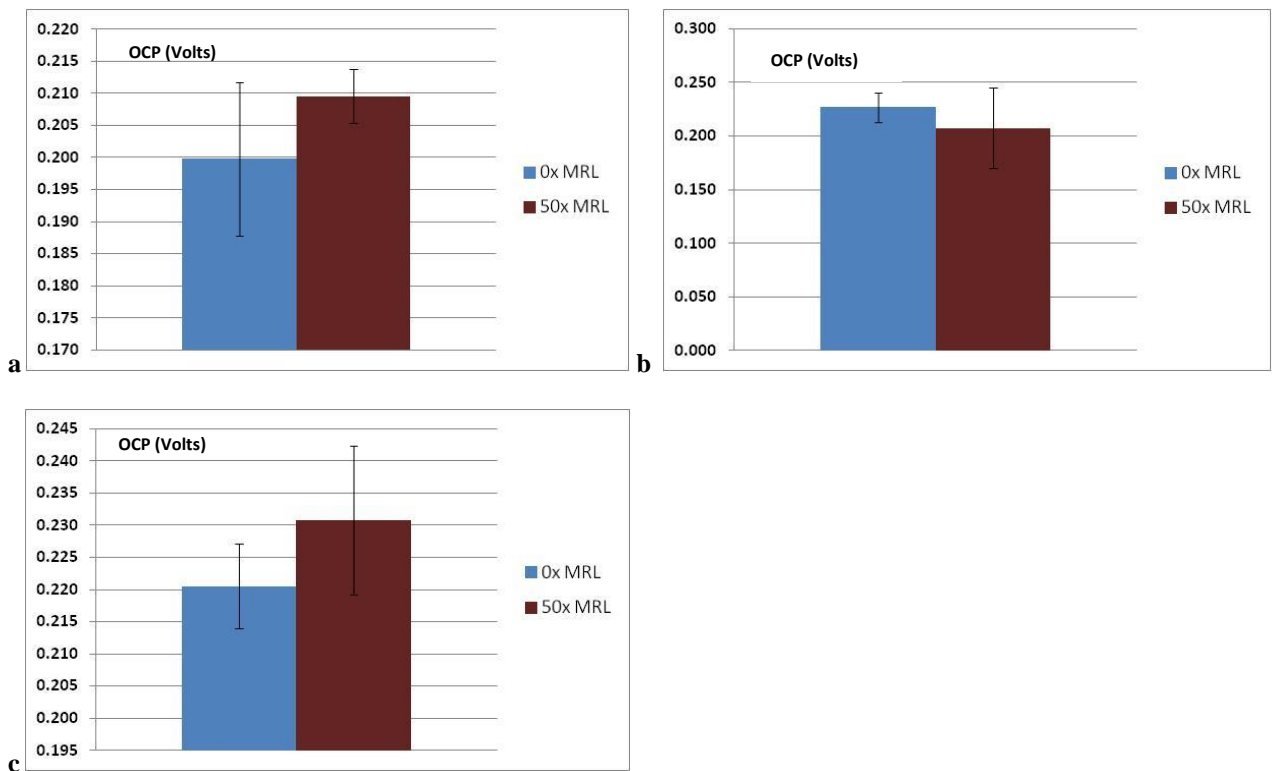


Fig. 73. Istogrammi di valori medi di OCP misurati su sospensioni di cellule Vero modificate in mezzo di coltura fortificato (AFB₁ 50x MRL) e non fortificato.

I risultati riportati in Fig. 71 mostrano come i valori medi di OCP misurati su sospensioni di cellule Vero modificate con anticorpi anti- AFB₁ in mezzo di coltura fortificato (con AFB₁ 1x LMR) diminuiscono in modo significativo rispetto al controllo (sospensione cellulare in mezzo non fortificato). In particolare la presenza di AFB₁ sembra indurre una depolarizzazione del potenziale di membrana delle cellule modificate esposte all'aflatossina ed un andamento simile si osserva per i risultati delle misurazioni effettuate su cellule esposte ad una concentrazione 10 volte maggiore (10x LMR) di aflatossina (Fig. 72). Una maggiore concentrazione di AFB₁ (50 x LMR) sembra invece indurre un'iperpolarizzazione (aumento) del potenziale di membrane delle cellule modificate esposte anche se non significativa rispetto al controllo (incremento della variabilità dei segnali ottenuti) (Fig. 73). Questa condizione potrebbe essere causata da un "effetto di saturazione" degli anticorpi legati all' AFB₁.

Sulla base ai risultati ottenuti, il BERA System® sembra essere in grado di rilevare la presenza di AFB₁ in concentrazione molto basse (dell'ordine dei ppb) in terreno liquido. Riguardo gli sviluppi e le applicazioni future del sistema di rivelazione, potrebbe essere utile apportare delle modifiche/ottimizzazioni come ad esempio utilizzare un'appropriata matrice di immobilizzazione che aiuti a stabilizzare i segnali di potenziale misurati e ridurre la variabilità.

In conclusione, sulla base dei risultati ottenuti, le biosonde a cellule possono rappresentare una nuova opportunità tecnologica per lo sviluppo di sistemi per studi citotossicologici *in vitro* e sistemi di *screening* di possibili contaminanti e residui degli alimenti.

Bibliografia

Ammerman, N. C., Beier-Sexton, M., & Azad, A. F. (2008). Growth and maintenance of Vero cell lines. *Current protocols in microbiology*, A-4E.

Aon, M. A., Cortassa, S., & O'Rourke, B. (2010). Redox-optimized ROS balance: a unifying hypothesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(6), 865-877.

Apte, S., & Sarangarajan, R. (Eds.). (2008). *Cellular respiration and carcinogenesis*. Springer Science & Business Media.

Ashwin, H., Stead, S., Caldow, M., Sharman, M., Stark, J., De Rijk, A., & Keely, B. J. (2009). A rapid microbial inhibition-based screening strategy for fluoroquinolone and quinolone residues in foods of animal origin. *Analytica chimica acta*, 637(1), 241-246.

AWPA, American Wood Preservers' Association Book of Standards (1999), American Wood Preservers' Association, Grandbury, TX.

Abedin, M. J., Feldmann, J., & Meharg, A. A. (2002). Uptake kinetics of arsenic species in rice plants. *Plant Physiology*, 128(3), 1120-1128.

Anthony, M. H., Francis, D. M., Patrick, N., Berka, G. T. A., & Haruna, O. G. (2012). Aflatoxin Contamination in Foods and Feeds: A Special Focus on Africa. *TRENDS IN VITAL FOOD AND CONTROL ENGINEERING*, 187.

Bakker, B. M., Overkamp, K. M., van Maris, A. J., Kötter, P., Luttik, M. A., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews*, 25(1), 15-37.

Balasoïu, C. F., Zagury, G. J., & Deschenes, L. (2001). Partitioning and speciation of chromium, copper, and arsenic in CCA-contaminated soils: influence of soil composition. *Science of the Total Environment*, 280(1), 239-255.

Balaz, S. (2009). Modeling kinetics of subcellular disposition of chemicals. *Chemical reviews*, 109(5), 1793-1899.

Baumann, B., & van der Meer, J. R. (2007). Analysis of bioavailable arsenic in rice with whole cell living bioreporter bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(6), 2115-2120.

Baronian, K. H. R. (2004). The use of yeast and moulds as sensing elements in biosensors. *Biosensors and bioelectronics*, 19(9), 953-962.

Bery, M.N.; Grivell, M.B. An electrochemical description of metabolism. In *Bioelectrochemistry of Cells and Tissues*; Walz, D., Berg, H., Milazzo, G., Eds.; Birkhauser Verlag: Basel, Switzerland, 1995; pp. 134-158.

Bhattacharya, P., Mukherjee, A. B., Jacks, G., & Nordqvist, S. (2002). Metal contamination at a wood preservation site: characterisation and experimental studies on remediation. *Science of the Total Environment*, 290(1), 165-180.

- Borgs, P., & Mallard, B. A. (1998). Immune-endocrine interactions in agricultural species: chromium and its effect on health and performance. *Domestic animal endocrinology*, 15(5), 431-438.
- Braconi, D., Santucci, A., Jacomelli, G., Bernardini, G., Millucci, L., & Micheli, V. (2011). *Saccharomyces cerevisiae as a Tool to Evaluate the Effects of Herbicides on Eukaryotic Life*. INTECH Open Access Publisher.
- Brady, D., & Duncan, J. R. (1994). Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(1), 149-154.
- Brady, D., Stoll, A. D., Starke, L., & Duncan, J. R. (1994). Chemical and enzymatic extraction of heavy metal binding polymers from isolated cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering*, 44(3), 297-302.
- Brogan, K. L., & Walt, D. R. (2005). Optical fiber-based sensors: application to chemical biology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9(5), 494-500.
- Bronstein, I., Fortin, J., Stanley, P. E., Stewart, G. S., & Kricka, L. J. (1994). Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. *Analytical biochemistry*, 219(2), 169-181.
- Buchner, E. (1997). Alcoholic fermentation without yeast cells. *Cornish-Bowden (1997) pp*, 25-31.
- Bullerman, L. B., & Bianchini, A. (2007). Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1), 140-146.
- Campanella, L., Favero, G., & Tomassetti, M. (1995). Immobilised yeast cells biosensor for total toxicity testing. *Science of the total environment*, 171(1), 227-234.
- Campanella, L., Favero, G., Mastrofini, D., & Tomassetti, M. (1997). Further developments in toxicity cell biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 44(1), 279-285.
- Caracciolo, A. B., Giuliano, G., Grenni, P., Guzzella, L., Pozzoni, F., Bottoni, P. & Funari, E. (2005). Degradation and leaching of the herbicides metolachlor and diuron: a case study in an area of Northern Italy. *Environmental Pollution*, 134(3), 525-534.
- Chalfie, M., & Kain, S. R. (Eds.). (2005). *Methods of Biochemical Analysis, Green Fluorescent Protein: Properties, Applications and Protocols* (Vol. 47). John Wiley & Sons.
- Chance, B., & Williams, G. R. (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 17, 65-134.
- Chen, C. J., Chen, C. W., Wu, M. M., & Kuo, T. L. (1992). Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water. *British journal of cancer*, 66(5), 888.
- Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S. J., & Gibson, S. B. (2007). Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species. *Journal of cell science*, 120(23), 4155-4166.
- Chen, Q., Tang, S., Jin, X., Zou, J., Chen, K., Zhang, T., & Xiao, X. (2009). Investigation of the genotoxicity of quinocetone, carbadox and olaquinox in vitro using Vero cells. *Food and chemical toxicology*, 47(2), 328-334.

- Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., & Lesnefsky, E. J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 36027-36031.
- Chitra, K. C., Latchoumycandane, C., & Mathur, P. P. (2003). Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology*, 185(1), 119-127.
- Chu, F.S., Chang, C.C., Ashoor, S.H., Prentice, N., 1975. Stability of aflatoxin B1 and ochratoxin A in brewing. *Applied Microbiology* 29 (3), 313–31
- Christ, K. L., & Burritt, R. L. (2013). Critical environmental concerns in wine production: an integrative review. *Journal of Cleaner Production*, 53, 232-242.
- Corrigendum to Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption (OJ L 330 of 5.12.1998) *Official Journal L 111* , 20/04/2001 P. 0031 - 0031
- Clark, L. C., & Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of sciences*, 102(1), 29-45.
- Close, D., Xu, T., Smartt, A., Rogers, A., Crossley, R., Price, S., & Saylor, G. (2012). The evolution of the bacterial luciferase gene cassette (lux) as a real-time bioreporter. *Sensors*, 12(1), 732-752.
- Coker, A. O., Isokpehi, R. D., Thomas, B. N., Amisu, K. O., & Obi, C. L. (2002). Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerging infectious diseases*, 8(3), 237-244.
- Convent, B. & Briquet, M. (1978). Properties of 3-(3, 4-Dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea and Other Inhibitors of the Cytochrome bc1 Segment of the Mitochondrial Respiratory Chain in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 82(2), 473-481.
- Convent, B., Briquet, M., Goffeau, A. (1978). Kinetic evidence for two sites in the inhibition by diuron of the electron transport in the bc1 segment of the respiratory chain in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 92(1), 137-145.
- Creppy, E. E., Chiarappa, P., Baudrimont, I., Borracci, P., Moukha, S., & Carratù, M. R. (2004). Synergistic effects of fumonisin B 1 and ochratoxin A: are in vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity?. *Toxicology*, 201(1), 115-123.
- Cullen JM, Newberne PM. Acute hepatotoxicity of aflatoxins. In: Eaton DL, Groopman JD, eds. *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. London: Academic Press, 1993:1-26.
- Curran, B. P., & Bugeja, V. C. (1996). Protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. In *Yeast Protocols* (pp. 45-49). Humana Press.
- Dalvie, M. A., Africa, A., & Naidoo, S. (2014). Relationship between firewood usage and urinary Cr, Cu and As in informal areas of Cape Town: research. *South African Medical Journal*, 104(1), 61-64.
- Da Rocha, M. S., Arnold, L. L., Pennington, K. L., Muirhead, D., Dodmane, P. R., Anwar, M. M., ... & Cohen, S. M. (2012). Diuron-induced rat bladder epithelial cytotoxicity. *Toxicological Sciences*, 130(2), 281-288.

Davey, J. C., Bodwell, J. E., Gosse, J. A., & Hamilton, J. W. (2007). Arsenic as an endocrine disruptor: effects of arsenic on estrogen receptor-mediated gene expression in vivo and in cell culture. *Toxicological sciences*, 98(1), 75-86.

Davey, J. C., Nomikos, A. P., Wungjiranirun, M., Sherman, J. R., Ingram, L., Batki, C., & Hamilton, J. W. (2008). Arsenic as an endocrine disruptor: arsenic disrupts retinoic acid receptor-and thyroid hormone receptor-mediated gene regulation and thyroid hormone-mediated amphibian tail metamorphosis. *Environmental health perspectives*, 116(2), 165.

De, A., Bose, R., Kumar, A., & Mozumdar, S. *Worldwide Pesticide Use In Targeted Delivery of Pesticides Using Biodegradable Polymeric Nanoparticles*. Imprint: Springer. 2014. pp 5-6.

Decreto Legislativo n° 22 del 5 febbraio 1997, Attuazione delle direttive 91/156/CEE sui rifiuti, 91/689/CEE sui rifiuti pericolosi e 94/62/CE sugli imballaggi e sui rifiuti di imballaggio". *Gazzetta Ufficiale* n. 38 del 15 febbraio 1997.

Decreto 26 febbraio 2009, Inclusione della sostanza attiva diuron nell'allegato I del decreto legislativo 17 marzo 1995, n. 194, in attuazione della direttiva 2008/91/CE del 29 settembre 2008 della Commissione. (09A07341). *Gazzetta Ufficiale* n. 148 del 29 giugno 2009.

Direttiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 7 maggio 2002, relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

Direttiva 2011/8/UE della Commissione del 28 gennaio 2011 che modifica la direttiva 2002/72/CE per quanto riguarda le restrizioni d'impiego del bisfenolo A nei biberon di plastica. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

Denning, D. W., Allen, R., Wilkinson, A. P., & Morgan, M. R. (1990). Transplacental transfer of aflatoxin in humans. *Carcinogenesis*, 11(6), 1033-1035.

Dixit, V., Pandey, V., & Shyam, R. (2002). Chromium ions inactivate electron transport and enhance superoxide generation in vivo in pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) root mitochondria. *Plant, Cell & Environment*, 25(5), 687-693.

Dong, L., Diao, Z., Du, J., Jiang, Z., Meng, Q., & Zhang, Y. (2009, June). Mechanism of Cu (II) Biosorption by *Saccharomyces Cerevisiae*. In *Bioinformatics and Biomedical Engineering, 2009. ICBBE 2009. 3rd International Conference on* (pp. 1-4). IEEE.

Dragone, R., & Grasso, G. (2012). Biosensoristic Devices: Monitoring and Diagnostics in Agro-Zootechnical Productions. *Cameroon-Nigeria-Italy scientific cooperation: veterinary public health and sustainable food safety to promote "one health/one prevention"*, 12, 70.

Dragone, R., Frazzoli, C., Grasso, G., & Rossi, G. (2014). Sensor with Intact or Modified Yeast Cells as Rapid Device for Toxicological Test of Chemicals. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 3(02), 35.

Dragone, R., Cheng, R. Grasso, G., & Frazzoli, C. (2015). Diuron in water: functional toxicity and intra-cellular detoxification patterns of active concentrations assayed in tandem by a yeast-based probe. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [articolo in stampa].

Dröse, S., & Brandt, U. (2008). The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex. *Journal of Biological Chemistry*, 283(31), 21649-21654.

EFSA-Q-2005-100 (2006). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)PROPANE (Bisphenol A). The EFSA Journal (2006) 428, 1 of 75.

EFSA-Q-2008-382 (2008). Toxicokinetics of Bisphenol A Scientific Opinion of the Panel on Food additives, Flavourings, Processing aids and Materials in Contact with Food (AFC). The EFSA Journal (2008) 759, 1 of 10.

EFSA-Q-2009-00864 , EFSA-Q-2010-00709 , EFSA-Q-2010-01023. Scientific Opinion on Bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of Bisphenol A- EFSA Panel on food contact materials, enzymes, flavourings and processing aids (CEF). EFSA Journal 2010; 8(9):1829.

Eitzman, P. D., Hendrick, J. L., & Srienc, F. (1989). Quantitative immunofluorescence in single *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Cytometry*, 10(4), 475-483.

Ellerbroek, L. 1991. Zum mikrobiologischen Nachweis der Chinolonsäurederivate 10 Enrofloxacin, Ciprofloxacin und Flumequine. *Fleischwirtschaft* 71, 187-189.

Escobar-Henriques, M., and T. Langer, 2006 Mitochondrial shaping cuts. *Biochim. Biophys. Acta* 1763: 422–429.

Estève, K.; Poupot, C.; Dabert, P.; Mietton-Peuchot, M. & Milisic, V. A *Saccharomyces cerevisiae*-based bioassay for assessing pesticide toxicity. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 2009, 36, 1529-1534.

European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife, Weybridge 2-4/12/1996.

FAO, U. (2002). International code of conduct on the distribution and use of pesticides. *UN Food and Agricultural Organization, Rome, Italy*.

Fardeau, V., Lelandais, G., Oldfield, A., Salin, H., Lemoine, S., Garcia, M., ... & Devaux, F. (2007). The central role of PDR1 in the foundation of yeast drug resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 282(7), 5063-5074.

Fernandes, G. S., Favareto, A. P. A., Fernandez, C. D., Bellentani, F. F., Arena, A. C., Grassi, T. F., & Barbisan, L. F. (2012). Effects of diuron on male rat reproductive organs: a developmental and postnatal study. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 75(16-17), 1059-1069.

Ferrini, A. M., Mannoni, V., & Aureli, P. (2006). Combined Plate Microbial Assay (CPMA): A 6-plate-method for simultaneous first and second level screening of antibacterial residues in meat. *Food additives and Contaminants*, 23(1), 16-24.

Fisher, N., & Meunier, B. (2008). Molecular basis of resistance to cytochrome bc1 inhibitors. *FEMS yeast research*, 8(2), 183-192.

- Frazzoli, C., Dragone, R., Mantovani, A., Massimi, C., & Campanella, L. (2007). Functional toxicity and tolerance patterns of bioavailable Pd (II), Pt (II), and Rh (III) on suspended *Saccharomyces cerevisiae* cells assayed in tandem by a respirometric biosensor. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389(7-8), 2185-2194.
- Frazzoli, C., Petrini, C., & Mantovani, A. (2008). Sustainable development and next generation's health: a long-term perspective about the consequences of today's activities for food safety. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, 45(1), 65-75.
- Freire, P. F., Labrador, V., Martín, J. P., & Hazen, M. J. (2005). Cytotoxic effects in mammalian Vero cells exposed to pentachlorophenol. *Toxicology*, 210(1), 37-44.
- Friedmann, H. C. (2004). From butyribacterium to *E. coli*: an essay on unity in biochemistry. *Perspectives in biology and medicine*, 47(1), 47-66.
- Gaetke, L. M., & Chow, C. K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189(1), 147-163.
- Gallart-Ayala, H., Núñez, O., & Lucci, P. (2013). Recent advances in LC-MS analysis of food-packaging contaminants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 42, 99-124.
- García-Ruiz, C., & Marina, M. L. (2006). Recent advances in the analysis of antibiotics by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 27(1), 266-282.
- Gaudin V., Maris P., Fuselier R., Ribouchon J.L., Cadieu N., Rault A. (2004) Validation of a microbiological method: the STAR protocol, a five-plate test, for the screening of antibiotic residues in milk. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assessn* 21 (5):422-33.
- Gaudin, V., Hedou, C., Rault, A., & Verdon, E. (2010). Validation of a Five Plate Test, the STAR protocol, for the screening of antibiotic residues in muscle from different animal species according to European Decision 2002/657/EC. *Food Additives and Contaminants*, 27(7), 935-952.
- Ge, B., McDermott, P. F., White, D. G., & Meng, J. (2005). Role of efflux pumps and topoisomerase mutations in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(8), 3347-3354.
- Geens, T., Aerts, D., Berthot, C., Bourguignon, J. P., Goeyens, L., Lecomte, P., & Covaci, A. (2012a). A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and Chemical Toxicology*, 50(10), 3725-3740.
- Geens, T., Neels, H., & Covaci, A. (2012b). Distribution of bisphenol-A, triclosan and n-nonylphenol in human adipose tissue, liver and brain. *Chemosphere*, 87(7), 796-802.
- Giessler, A., Geier, B. M., Rago, J. P., Slonimski, P. P., & Jagow, G. (1994). Analysis of cytochrome-b amino acid residues forming the contact face with the iron-sulfur subunit of ubiquinol: cytochrome-c reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *European journal of biochemistry*, 222(1), 147-154.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), 546-567.

- Goodson, W. H., Luciani, M. G., Sayeed, S. A., Jaffee, I. M., Moore, D. H., & Dairkee, S. H. (2011). Activation of the mTOR pathway by low levels of xenoestrogens in breast epithelial cells from high-risk women. *Carcinogenesis*, 32(11), 1724-1733.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: a laboratory manual*.
- Grumetto, L., Montesano, D., Seccia, S., Albrizio, S., & Barbato, F. (2008). Determination of bisphenol A and bisphenol B residues in canned peeled tomatoes by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(22), 10633-10637.
- Gualtieri, A. F., Iwachow, M. A., Venara, M., Rey, R. A., & Schteingart, H. F. (2011). Bisphenol A effect on glutathione synthesis and recycling in testicular Sertoli cells. *Journal of endocrinological investigation*, 34(5), e102-e109.
- Haines, T. H., & Dencher, N. A. (2002). Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS letters*, 528(1), 35-39.
- Handy, R. D. (2003). Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 135(1), 25-38.
- Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. (2000). Detection and quantification of tetracyclines by whole cell biosensors. *FEMS microbiology letters*, 190(2), 273-278.
- Haubenstricker, M. E., Meier, P. G., Mancy, K. H., & Brabec, M. J. (1990). Rapid toxicity testing based on yeast respiratory activity. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 44(5), 669-674.
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., & Cabisco, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1780(11), 1217-1235.
- Hingston, J. A., Collins, C. D., Murphy, R. J., & Lester, J. N. (2001). Leaching of chromated copper arsenate wood preservatives: a review. *Environmental Pollution*, 111(1), 53-66.
- Hollis, R. P., Killham, K., & Glover, L. A. (2000). Design and application of a biosensor for monitoring toxicity of compounds to eukaryotes. *Applied and environmental microbiology*, 66(4), 1676-1679.
- Hosseini, M. J., Shaki, F., Ghazi-Khansari, M., & Pourahmad, J. (2014). Toxicity of copper on isolated liver mitochondria: impairment at complexes I, II, and IV leads to increased ROS production. *Cell biochemistry and biophysics*, 70(1), 367-381.
- Huff, J., Qureshi, S., Hodgkinson, D., Nicklin, C., Götsche, R., Hettler, W. and Roper, D.V. (2011) Microbiocidal Compositions and Their Use. US Patent No. 7,910,569.
- Hughes, M. F. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology letters*, 133(1), 1-16.
- Hutter, B., Fischer, C., Jacobi, A., Schaab, C., & Loferer, H. (2004). Panel of Bacillus subtilis reporter strains indicative of various modes of action. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(7), 2588-2594.

IARC. 2002. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monogr. 82:171.

Idowu, O. R., Peggins, J. O., Cullison, R., & Von Bredow, J. (2010). Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in lactating dairy cows and beef steers following intravenous administration of enrofloxacin. *Research in veterinary science*, 89(2), 230-235.

Inzelt, G. (2013). Pseudo-reference Electrodes. In *Handbook of Reference Electrodes* (pp. 331-332). Springer Berlin Heidelberg.

Jacoby, G. A. (2005). Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 41(Supplement 2), S120-S126.

Janssen, M. J. F. W., Koorengel, M. C., De Kruijff, B., & De Kroon, A. I. P. M. (1999). Transbilayer movement of phosphatidylcholine in the mitochondrial outer membrane of *Saccharomyces cerevisiae* is rapid and bidirectional. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1421(1), 64-76.

Jianlong, W. (2002). Biosorption of copper (II) by chemically modified biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, 37(8), 847-850.

Jungwirth, H., & Kuchler, K. (2006). Yeast ABC transporters—a tale of sex, stress, drugs and aging. *Febs Letters*, 580(4), 1131-1138.

Kaatz, G. W., & Seo, S. M. (1995). Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(12), 2650-2655.

Kaatz, G. W., Seo, S. M., O'Brien, L., Wahiduzzaman, M., & Foster, T. J. (2000). Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from NorA in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(5), 1404-1406.

Kaatz, G. W., Thyagarajan, R. V., & Seo, S. M. (2005). Effect of promoter region mutations and mgrA overexpression on transcription of norA, which encodes a *Staphylococcus aureus* multidrug efflux transporter. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(1), 161-169.

Kabuto, H., Amakawa, M., & Shishibori, T. (2004). Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice. *Life sciences*, 74(24), 2931-2940.

Kadenbach, B. (2003). Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1604(2), 77-94.

Kamrin, M. A. (2010). *Pesticide profiles: toxicity, environmental impact, and fate*. CRC press.

Kennedy, M. J. (2004). Depletion of copper-based preservatives from pine decking and impacts on soil-dwelling invertebrates. *Environmental Impacts of Preservative-Treated Wood*, 124.

Kintzios, S., Pistola, E., Panagiotopoulos, P., Bomsel, M., Alexandropoulos, N., Bem, F. & Levin, R. (2001). Bioelectric recognition assay (BERA). *Biosensors and Bioelectronics*, 16(4), 325-336.

- Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., ... & Ohta, S. (2005). Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicological Sciences*, 84(2), 249-259.
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., & Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews*, 26(3), 239-256.
- Klis, F. M., Boorsma, A., & De Groot, P. W. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 23(3), 185-202.
- Kokla, A., Blouchos, P., Livaniou, E., Zikos, C., Kakabakos, S. E., Petrou, P. S., & Kintzios, S. (2013). Visualization of the membrane engineering concept: evidence for the specific orientation of electroinserted antibodies and selective binding of target analytes. *Journal of Molecular Recognition*, 26(12), 627-632.
- Kowaltowski, A. J., & Vercesi, A. E. (1999). Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(3), 463-471.
- Krauter, P., Martinelli, R., Williams, K., & Martins, S. (1996). Removal of Cr (VI) from ground water by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biodegradation*, 7(4), 277-286.
- Kurittu, J., Lönnberg, S., Virta, M., & Karp, M. (2000). A group-specific microbiological test for the detection of tetracycline residues in raw milk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8), 3372-3377.
- Lansbury, N., & Beder, S. (2005). Treated Timber, Toxic Time-bomb: The Need for a Precautionary Approach to the Use of Copper Chrome Arsenate (CCA) as a Timber Preservative.
- Larou, E., Yiakoumettis, I., Kaltsas, G., Petropoulos, A., Skandamis, P., & Kintzios, S. (2013). High throughput cellular biosensor for the ultra-sensitive, ultra-rapid detection of aflatoxin M1. *Food Control*, 29(1), 208-212.
- Lebow, S. (2004, February). Alternatives to chromated copper arsenate (CCA) for residential construction. In *Environmental Impacts Of Preservative-Treated Wood Conference* (pp. 8-11).
- Legras, J. L., Merdinoglu, D., Cornuet, J., & Karst, F. (2007). Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular ecology*, 16(10), 2091-2102.
- Lemire, B. D., & Oyedotun, K. S. (2002). The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate: ubiquinone oxidoreductase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1553(1), 102-116.
- Lewis, M., Chang, G., Horton, N. C., Kercher, M. A., Pace, H. C., Schumacher, M. A., & Lu, P. (1996). Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer. *Science*, 271(5253), 1247-1254.
- Li, M., Li, Y. T., Li, D. W., & Long, Y. T. (2012). Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays—A review. *Analytica chimica acta*, 734, 31-44.
- Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443(7113), 787-795.

- Liu, Y., Xu, Z., Wu, X., Gui, W., & Zhu, G. (2010). Adsorption and desorption behavior of herbicide diuron on various Chinese cultivated soils. *Journal of hazardous materials*, 178(1), 462-468.
- Luo, N., Sahin, O., Lin, J., Michel, L. O., & Zhang, Q. (2003). In vivo selection of Campylobacter isolates with high levels of fluoroquinolone resistance associated with gyrA mutations and the function of the CmeABC efflux pump. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(1), 390-394.
- Maragou, N. C., Lampi, E. N., Thomaidis, N. S., & Koupparis, M. A. (2006). Determination of bisphenol A in milk by solid phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1129(2), 165-173.
- Marazuela, M. D., & Moreno-Bondi, M. C. (2004). Multiresidue determination of fluoroquinolones in milk by column liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A*, 1034(1), 25-32.
- Martineau, R. L., Stout, V., & Towe, B. C. (2009). Whole cell biosensing via recA:: mCherry and LED-based flow-through fluorometry. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(4), 759-766.
- Martins-Júnior, H. A., Kussumi, T. A., Wang, A. Y., & Lebre, D. T. (2007). A rapid method to determine antibiotic residues in milk using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(2), 397-405.
- Matsuda, S., Matsuzawa, D., Ishii, D., Tomizawa, H., Sutoh, C., Nakazawa, K., ... & Shimizu, E. (2012). Effects of perinatal exposure to low dose of bisphenol A on anxiety like behavior and dopamine metabolites in brain. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 39(2), 273-279.
- Mavrikou, S., Flampouri, K., Moschopoulou, G., Mangana, O., Michaelides, A., & Kintzios, S. (2008). Assessment of organophosphate and carbamate pesticide residues in cigarette tobacco with a novel cell biosensor. *Sensors*, 8(4), 2818-2832.
- Meffe, R., & de Bustamante, I. (2014). Emerging organic contaminants in surface water and groundwater: a first overview of the situation in Italy. *Science of the Total Environment*, 481, 280-295.
- Meunier, B., & Colson, A. M. (1989). Two nuclearly inherited loci conferring increased diuron resistance to NADH oxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics*, 15(1), 31-38.
- Mølbak, K., Baggesen, D. L., Aarestrup, F. M., Ebbesen, J. M., Engberg, J., Frydendahl, K., & Wegener, H. C. (1999). An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. *New England Journal of Medicine*, 341(19), 1420-1425.
- Moradas-Ferreira, P., & Costa, V. (2000). Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. *Redox Report*, 5(5), 277-285.
- Myllyniemi, A. L., Rintala, R., Backman, C., & Niemi, A. (1999). Microbiological and chemical identification of antimicrobial drugs in kidney and muscle samples of bovine cattle and pigs. *Food Additives & Contaminants*, 16(8), 339-351.

- Myllyniemi, A. L., Nuotio, L., Lindfors, E., Rannikko, R., Niemi, A., & Bäckman, C. (2001). A microbiological six-plate method for the identification of certain antibiotic groups in incurred kidney and muscle samples. *Analyst*, 126(5), 641-646.
- Nakagawa, Y., & Tayama, S. (2000). Metabolism and cytotoxicity of bisphenol A and other bisphenols in isolated rat hepatocytes. *Archives of toxicology*, 74(2), 99-105.
- Narsaiah, K., Jha, S. N., Bhardwaj, R., Sharma, R., & Kumar, R. (2012). Optical biosensors for food quality and safety assurance—a review. *Journal of food science and technology*, 49(4), 383-406.
- Navas-Acien, A., Silbergeld, E. K., Pastor-Barriuso, R., & Guallar, E. (2008). Arsenic exposure and prevalence of type 2 diabetes in US adults. *Jama*, 300(7), 814-822.
- Necas, O. (1971). Cell wall synthesis in yeast protoplasts. *Bacteriological reviews*, 35(2), 149.
- Nelson and Michael M. Cox, Oxidative phosphorylation and photophosphorylation In: Lehninger Principles of Biochemistry Edition: 4th (2005) Publisher: WH Freeman ISBN: 0716743396. Chapter 19, pag. 707.
- Niyobuhungiro, R., Naidoo, S., Dalvie, A., & Von Blotnitz, H. (2013). Occurrence of CCA-treated timber in caterers' fuelwood stocks in the Cape Town region. *South African Journal of Science*, 109(1-2), 1-5.
- Norman, A., Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. (2005). Construction of a ColD cda promoter-based SOS-green fluorescent protein whole-cell biosensor with higher sensitivity toward genotoxic compounds than constructs based on recA, umuDC, or sulA promoters. *Applied and environmental microbiology*, 71(5), 2338-2346.
- Oehler, S., Eismann, E. R., Krämer, H., & Müller-Hill, B. (1990). The three operators of the lac operon cooperate in repression. *The EMBO journal*, 9(4), 973.
- Okamoto, K., and J. M. Shaw, 2005 Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 39: 503–536.
- Okamura, E., Kakitsubo, R., & Nakahara, M. (1999). NMR determination of the delivery site of bisphenol A in phospholipid bilayer membranes. *Langmuir*, 15(23), 8332-8335.
- Okamura, E., Wakai, C., Matubayasi, N., Sugiura, Y., & Nakahara, M. (2004). Limited slowdown of endocrine-disruptor diffusion in confined fluid lipid membranes. *Physical review letters*, 93(24), 248101.
- Okerman, L., Croubels, S., De Baere, S., Hoof, J. V., De Backer, P., & De Brabander, H. (2001). Inhibition tests for detection and presumptive identification of tetracyclines, beta-lactam antibiotics and quinolones in poultry meat. *Food Additives & Contaminants*, 18(5), 385-393.
- Okerman, L., Noppe, H., Cornet, V., & De Zutter, L. (2007). Microbiological detection of 10 quinolone antibiotic residues and its application to artificially contaminated poultry samples. *Food additives and contaminants*, 24(3), 252-257.
- Orij, R., Brul, S., & Smits, G. J. (2011). Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1810(10), 933-944.

- Patel, P. D. (2002). (Bio) sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(2), 96-115.
- Paumi, C. M., Chuk, M., Snider, J., Stagljar, I., & Michaelis, S. (2009). ABC transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and their interactors: new technology advances the biology of the ABCC (MRP) subfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(4), 577-593.
- Pellinen, T., Bylund, G., Virta, M., Niemi, A., & Karp, M. (2002). Detection of traces of tetracyclines from fish with a bioluminescent sensor strain incorporating bacterial luciferase reporter genes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(17), 4812-4815.
- Peralta-Videa, J. R., Lopez, M. L., Narayan, M., Saupe, G., & Gardea-Torresdey, J. (2009). The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: implications for the food chain. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(8), 1665-1677.
- Perdikaris, A., Vassilakos, N., Yiakoumettis, I., Kektsidou, O., & Kintzios, S. (2011). Development of a portable, high throughput biosensor system for rapid plant virus detection. *Journal of virological methods*, 177(1), 94-99.
- Périchon, B., Courvalin, P., & Galimand, M. (2007). Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(7), 2464-2469.
- Piddock, L. J. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical microbiology reviews*, 19(2), 382-402.
- Pier AC, McLoughlin ME, Richard JL, Baetz A, Dahfren RR. In utero transfer of aflatoxin and selected effects in neonatal pigs. In: Lacey J, ed. *Trichothecenes and other mycotoxins*. New York: Wiley, 1985:495-506.
- Pócsi, I. (2011). Toxic metal/metalloid tolerance in fungi—a biotechnology-oriented approach. In *Cellular Effects of Heavy Metals* (pp. 31-58). Springer Netherlands.
- Rahman, M., Tondel, M., Ahmad, S. A., & Axelson, O. (1998). Diabetes mellitus associated with arsenic exposure in Bangladesh. *American Journal of epidemiology*, 148(2), 198-203
- Ramudzuli, M. R., & Horn, A. C. (2014). Arsenic residues in soil at cattle dip tanks in the Vhembe district, Limpopo Province, South Africa. *south African Journal of science*, 110(7-8), 1-7.
- Rasooly, R., Hernlem, B., He, X., & Friedman, M. (2013). Non-Linear Relationships between Aflatoxin B₁ Levels and the Biological Response of Monkey Kidney Vero Cells. *Toxins*, 5(8), 1447–1461. doi:10.3390/toxins5081447.
- Reddy, K. R. N., Salleh, B., Saad, B., Abbas, H. K., Abel, C. A., & Shier, W. T. (2010). An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Reviews*, 29(1), 3-26.
- Regolamento (CEE) n. 2377/90 del Consiglio, del 26 giugno 1990, che definisce una procedura comunitaria per la determinazione dei limiti massimi di residui di medicinali veterinari negli alimenti di origine animale. *GU n. L 224 del 18/08/1990*.

Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 28 gennaio 2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare. *GU del 01/02/2002 n. L 31.*

Regolamento (CE) N. 1831/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2003, sugli additivi destinati all'alimentazione animale. *GU del 18/10/2003 n. L 268.*

Regolamento (CE) N. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, sull'igiene dei prodotti alimentari. *GU del 30/04/2004 n. L 139.*

Regolamento (CE) N. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale. *GU n. L 139.*

Regolamento (CE) N. 854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano. *GU del 30/04/2004 n. L 139.*

Regolamento (CE) N. 183/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 12 gennaio 2005, che stabilisce requisiti per l'igiene dei mangimi. *GU dell' 08/02/2005 n. L 35.*

Regolamento (CE) N. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari.

Regolamento (CE) N. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea.*

Regolamento (CE) N. 37/2010 della Commissione, del 22 dicembre 2009, concernente le sostanze farmacologicamente attive e la loro classificazione per quanto riguarda i limiti massimi di residui negli alimenti di origine animale. *GU del 20/01/2010 n L 15*

Regolamento di esecuzione (CE) N. 884/2014 che stabilisce condizioni particolari per l'importazione di determinati mangimi e alimenti da alcuni paesi terzi a causa del rischio di contaminazione da aflatossine e che abroga il regolamento (CE) n. 1152/2009.

Renedo, O. D., Alonso-Lomillo, M. A., & Martinez, M. J. (2007). Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta*, 73(2), 202-219.

Rieske, J. S. (1980). Inhibitors of respiration at energy-coupling site 2 of the respiratory chain. *Pharmacology & therapeutics*, 11(2), 415-450.

Ripp, S., Layton, A. C., & Saylor, G. S. (2011). *The microbe as a reporter: Microbial bioreporter sensing technologies for chemical and biological detection*(pp. 281-305). Caister Academic Press: Norfolk, UK.

Robicsek, A., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet infectious diseases*, 6(10), 629-640.

Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C. H., & Hooper, D. C. (2006a). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature medicine*, 12(1), 83-88.

- Rogers, B., Decottignies, A., Kolaczowski, M., Carvajal, E., Balzi, E., & Goffeau, A. (2001). The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 3(2), 207-214.
- Sagi, E., Hever, N., Rosen, R., Bartolome, A. J., Premkumar, J. R., Ulber, R., ... & Belkin, S. (2003). Fluorescence and bioluminescence reporter functions in genetically modified bacterial sensor strains. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 90(1), 2-8.
- Schultz, T. P., Nicholas, D. D., & Preston, A. F. (2007). A brief review of the past, present and future of wood preservation. *Pest management science*, 63(8), 784-788.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of bacteriology*, 189(23), 8746-8749.
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A., & Tsien, R. Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature methods*, 2(12), 905-909.
- Shaw, J. M., & Nunnari, J. (2002). Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends in cell biology*, 12(4), 178-184.
- Skirrow, M. B., & Blaser, M. J. (2000). Clinical aspects of *Campylobacter* infection. *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC, 69-88.
- Simal-Gándara, J., Paz-Abuín, S., & Ahrné, L. (1998). A critical review of the quality and safety of BADGE-based epoxy coatings for cans: implications for legislation on epoxy coatings for food contact. *Critical reviews in food science and nutrition*, 38(8), 675-688.
- Smith, A. H., Hopenhayn-Rich, C., Bates, M. N., Goeden, H. M., Hertz-Picciotto, I., Duggan, H. M., & Smith, M. T. (1992). Cancer risks from arsenic in drinking water. *Environmental health perspectives*, 97, 259.
- Soliman, K. M. (2002). Incidence, level, and behavior of aflatoxins during coffee bean roasting and decaffeination. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 50(25), 7477-7481.
- Solo-Gabriele, H., & Townsend, T. (1999). Disposal practices and management alternatives for CCA-treated wood waste. *Waste Management and Research*, 17(5), 378-389.
- Stevens, B. (1977). Variation in number and volume of mitochondria in yeast according to growth conditions. A study based on serial sectioning and computer graphics reconstruction. *Biol. Cell*. 28, 37-56.
- Stevens, B. (1981). Mitochondrial structure: In *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae. Life Cycle and Inheritance* (ed. J. N. Strathern, E. W. Jones & J. R. Broach), pp. 471-504. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Hooper, D. C., & Robicsek, A. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical microbiology reviews*, 22(4), 664-689.
- Struss A K, Pasini P, Daunert S (2010) Biosensing Systems Based on Genetically Engineered Whole Cells'. In: *Recognition Receptors in Biosensors*. Springer New York, pp. 565-598.

- Sweeney, M. J., & Dobson, A. D. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International journal of food microbiology*, 43(3), 141-158.
- Su, L., Jia, W., Hou, C., & Lei, Y. (2011). Microbial biosensors: a review. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 1788-1799.
- Tecon, R., der Meer, V., & Roelof, J. (2008). Bacterial biosensors for measuring availability of environmental pollutants. *Sensors*, 8(7), 4062-4080.
- Teixeira, M. C., Telo, J. P., Duarte, N. F., & Sá-Correia, I. (2004). The herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid induces the generation of free-radicals and associated oxidative stress responses in yeast. *Biochemical and biophysical research communications*, 324(3), 1101-1107.
- Theophanides, T., & Anastassopoulou, J. (2002). Copper and carcinogenesis. *Critical reviews in oncology/hematology*, 42(1), 57-64.
- Thundiyil, J. G., Stober, J., Besbelli, N., & Pronczuk, J. (2008). Acute pesticide poisoning: a proposed classification tool. *Bulletin of the World Health Organization*, 86(3), 205-209].
- Tieleman, D. P. (2004). The molecular basis of electroporation. *BMC biochemistry*, 5(1), 10.
- Turner, P. C., Collinson, A. C., Cheung, Y. B., Gong, Y., Hall, A. J., Prentice, A. M., & Wild, C. P. (2007). Aflatoxin exposure in utero causes growth faltering in Gambian infants. *International Journal of Epidemiology*, 36(5), 1119-1125.
- Tran, J. H., & Jacoby, G. A. (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5638-5642.
- Turrens, J. F. (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience reports*, 17(1), 3-8.
- Trasande, L., Attina, T. M., & Blustein, J. (2012). Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. *Jama*, 308(11), 1113-1121.
- Undabeytia, T., Recio, E., Maqueda, C., Sánchez-Verdejo, T., & Balek, V. (2012). Slow diuron release formulations based on clay-phosphatidylcholine complexes. *Applied Clay Science*, 55, 53-61.
- Urban, A., Eckermann, S., Fast, B., Metzger, S., Gehling, M., Ziegelbauer, K., & Freiberg, C. (2007). Novel whole-cell antibiotic biosensors for compound discovery. *Applied and environmental microbiology*, 73(20), 6436-6443.
- Välímäa, A. L., Kivistö, A., Virta, M., & Karp, M. (2008). Real-time monitoring of non-specific toxicity using a *Saccharomyces cerevisiae* reporter system. *Sensors*, 8(10), 6433-6447.
- Van Looveren, M., Daube, G., De Zutter, L., Dumont, J. M., Lammens, C., Wijdooghe, M., ... & Goossens, H. (2001). Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* strains isolated from food animals in Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(2), 235-240.
- Van Rensen, J. J. S. (1989). Herbicides interacting with photosystem II. *Herbicides and plant metabolism*, (38), 21.

- Varelas, V., Sanvicens, N., & Kintzios, S. (2011). Development of a cellular biosensor for the detection of 2, 4, 6-trichloroanisole (TCA). *Talanta*, *84*(3), 936-940.
- Velasco-Garcia, M. N. (2009). Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 20, No. 1, pp. 27-33). Academic Press.
- Velleux, M., Redman, A., Paquin, P., Santore, R., England Jr, J. F., & Julien, P. Y. (2012). Exposure Assessment Framework for Antimicrobial Copper Use in Urbanized Areas. *Environmental science & technology*, *46*(12), 6723-6732.
- Virolainen, N. E., Pikkemaat, M. G., Elferink, J. A., & Karp, M. T. (2008). Rapid detection of tetracyclines and their 4-epimer derivatives from poultry meat with bioluminescent biosensor bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, *56*(23), 11065-11070.
- Vodyanitskii, Y. N. (2013). Contamination of soils with heavy metals and metalloids and its ecological hazard (analytic review). *Eurasian Soil Science*, *46*(7), 793-801.
- Walmsley, R. M., & Keenan, P. (2000). The eukaryote alternative: advantages of using yeasts in place of bacteria in microbial biosensor development. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *5*(6), 387-394.
- Wang, J., & Chen, C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Biotechnology advances*, *24*(5), 427-451.
- Wang, Y., Fang, J., Leonard, S. S., & Rao, K. M. K. (2004). Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, *36*(11), 1434-1443.
- Wang, S., & Mulligan, C. N. (2006). Occurrence of arsenic contamination in Canada: sources, behavior and distribution. *Science of the Total Environment*, *366*(2), 701-721.
- Watson, W. H., & Yager, J. D. (2007). Arsenic: extension of its endocrine disruption potential to interference with estrogen receptor-mediated signaling. *Toxicological sciences*, *98*(1), 1-4.
- Weaver, J. C., & Chizmadzhev, Y. A. (1996). Theory of electroporation: a review. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, *41*(2), 135-160. Tieleman, D. P. (2004). The molecular basis of electroporation. *BMC biochemistry*, *5*(1), 10.
- Welshons, W. V., Nagel, S. C., & vom Saal, F. S. (2006). Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*, *147*(6), s56-s69.
- Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M., & Aggarwal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American journal of clinical nutrition*, *80*(5), 1106-1122.
- White, D. G., Zhao, S., Sudler, R., Ayers, S., Friedman, S., Chen, S., ... & Meng, J. (2001). The isolation of antibiotic-resistant Salmonella from retail ground meats. *New England journal of medicine*, *345*(16), 1147-1154.
- WHO World Health Organization (2014). Food safety. Fact sheet n°399 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/>).

Wilson, G. S., Thévenot, D. R., Toth, K., & Durst, R. A. (1999). Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification.

Wogan, Gerald N. "Aflatoxin carcinogenesis." *Methods in cancer research*. Vol. 7. Academic Press New York, 1973. 309-344.

Wolstenholme, J. T., Edwards, M., Shetty, S. R., Gatewood, J. D., Taylor, J. A., Rissman, E. F., & Connelly, J. J. (2012). Gestational exposure to bisphenol a produces transgenerational changes in behaviors and gene expression. *Endocrinology*, 153(8), 3828-3838.

Xu, X., Wu, S., Ye, X., Liu, Y., Shi, W., Zhang, Y., & Wang, M. (2007). Prevalence and expression of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrA1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(11), 4105-4110.

Ye, X., Bishop, A. M., Needham, L. L., & Calafat, A. M. (2008). Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for measuring parabens, triclosan, and other environmental phenols in human milk. *Analytica Chimica Acta*, 622(1), 150-156.

Yoshihara, S. I., Makishima, M., Suzuki, N., & Ohta, S. (2001). Metabolic activation of bisphenol A by rat liver S9 fraction. *Toxicological Sciences*, 62(2), 221-227.

Yoshihara, S. I., Mizutare, T., Makishima, M., Suzuki, N., Fujimoto, N., Igarashi, K., & Ohta, S. (2004). Potent estrogenic metabolites of bisphenol A and bisphenol B formed by rat liver S9 fraction: their structures and estrogenic potency. *Toxicological Sciences*, 78(1), 50-59.

Zhang, Q., Lin, J., & Pereira, S. (2003). Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* in animal reservoirs: dynamics of development, resistance mechanisms and ecological fitness. *Animal Health Research Reviews*, 4(02), 63-72.

Zhitkovich, A. (2011). Chromium in drinking water: sources, metabolism, and cancer risks. *Chemical research in toxicology*, 24(10), 1617-1629.

Zhou, X., Xing, D., Zhu, D., Tang, Y., & Jia, L. (2008). Development and application of a capillary electrophoresis–electrochemiluminescent method for the analysis of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in milk. *Talanta*, 75(5), 1300-1306.

Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C. D., Fasch, E. V., Kohlwein, S. D., Paltauf, F. R. I. T. Z., & Daum, G. U. N. T. H. E. R. (1991). Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 173(6), 2026-2034.