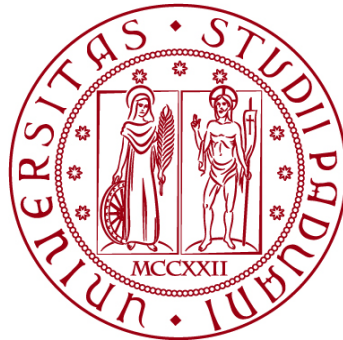


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea magistrale in Biologia Evoluzionistica



TESI DI LAUREA

**Caratterizzazione e preliminare identificazione
tassonomica di isolati batterici ottenuti da suoli
contaminati da arsenico**

**Relatrice: Prof.ssa Michela Zottini
Dipartimento di Biologia**

**Correlatrice: Prof.ssa Silvia Lampis
Dipartimento di Biotecnologie - Università degli Studi di Verona**

Laureanda: Elisa Falesiedi

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

1.INTRODUZIONE.....	4
1.1 Proprietà fisiche e chimiche dell'arsenico	4
1.2 Distribuzione dell'arsenico nell'ambiente	5
1.2.1 Fattori naturali	6
1.2.2 Fattori antropici	7
1.2.3 Arsenico nell'atmosfera	8
1.2.4 Arsenico nell'acqua	9
1.2.5 Arsenico nel suolo	9
1.3 Distribuzione geochimica dell'arsenico in Italia	10
1.4 Tossicità dell'arsenico	12
1.5 Resistenza dell'arsenico nei microrganismi	14
1.5.1 Assorbimento dell'arsenico	15
1.5.2 Esclusione dell'arsenico dalla cellula	15
1.5.3 Metilazione dell'arsenico	17
1.5.4 Riduzione dell'ossianione arsenato (AsO_4^{2-} , AsV)	18
1.5.5 Ossidazione dell'ossianione arsenito (AsO_3^{2-} , AsIII)	18
1.6 Biorisanamento e fitorisanamento di matrici inquinate da As	19
1.6.1 Interazione batteri-pianta nel suolo	23
1.6.2 Trattamenti microbici PGP (Plant Growth Promotion)	23
1.7 VUCC-DBT	31
2. SCOPO.....	32
3. MATERIALI E METODI.....	33
3.1 Provenienza degli isolati batterici in studio	33
3.1.1 Caratteristiche dei suoli di provenienza	33
3.1.2 Ceppi batterici oggetto del presente studio	34
3.2 Reagenti utilizzati	36
3.3 Conservazione e crescita degli isolati	36
3.4 Determinazione del valore di Minimum inhibitory concentration (MIC) per arsenito e arsenato	37
3.5 Identificazione dei tratti PGP (Plant Growth Promotion)	38
3.5.1 Test per la produzione dell'ammoniaca	38
3.5.2 Test per la solubilizzazione del fosfato	38
3.5.3 Test per la produzione dei siderofori	40

3.5.4 Test per la produzione di IAA	42
3.5.4.1 Analisi quantitativa	43
3.5.5 Test per la valutazione dell'attività 1-amminocicopropano-1 carbossilato (ACC) deaminasi	45
3.6 Metodiche molecolari per identificazione isolati batterici	47
3.6.1 Estrazione e quantificazione del DNA genomico	47
3.6.2 BOX-PCR	48
3.6.3 Amplificazione del gene rRNA 16S	50
3.6.4 Purificazione dei prodotti di PCR	51
3.6.5 Sequenziamento ed analisi tassonomica	52
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	53
4.1 Verifica della purezza degli isolati batterici oggetto del presente studio	53
4.2 Valutazione della resistenza ad arsenito e arsenato mediante analisi della concentrazione minima inibente (MIC) la crescita	53
4.3 Analisi dei tratti batterici promotori della crescita delle piante (tratti PGP) sui ceppi batterici in studio	57
4.3.1 Analisi circa la capacità di produzione dell'ammoniaca	57
4.3.2 Determinazione della capacità di solubilizzare il fosforo	61
4.3.3 Determinazione della produzione di siderofori	65
4.3.4 Valutazione della produzione di acido indolacetico (IAA)	68
4.3.5 Determinazione della presenza di attività di ACC deaminasi	73
4.4 Selezione dei ceppi batterici più promettenti di interesse	74
4.5 Analisi BOX-PCR e definizione dei profili BOX	78
4.5.1 Estrazione del DNA totale dalle colture batteriche	78
4.5.2 BOX-PCR	80
4.6 Amplificazione del gene per il 16S rRNA e identificazione tassonomica degli isolati	82
4.6.1 Caratterizzazione tassonomica	91
5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	99
6. BIBLIOGRAFIA.....	101

1. INTRODUZIONE

1.1 Proprietà fisiche e chimiche dell'Arsenico

L'Arsenico (As) è un elemento che appartiene al 15° gruppo e al 4° periodo della tavola periodica (numero atomico 33 e peso atomico 74,92), ed è posizionato tra il fosforo (P) e l'antimonio (Sb).

In ragione delle sue proprietà chimiche, viene classificato come metalloide, condividendo alcune caratteristiche sia dei metalli che dei non metalli.

L'arsenico è presente in tre forme allotropiche: giallo, nero e grigio; la forma elementare As(0) è un solido cristallino fragile dal colore grigio-argento. Si tratta di un elemento molto reattivo, non solubile in acqua; al contrario dei suoi sali, la cui solubilità dipende dal pH e dall'ambiente ionico.

L'arsenico esiste principalmente in quattro stati di ossidazione (-3, 0, +3, +5). In condizioni ossidanti, lo stato di valenza +3 (AsIII, arsenito) e lo stato di valenza +5 (AsV, arsenato) rappresentano le forme più diffuse (WHO, 2001). La speciazione dell'arsenico nell'ambiente dipende fortemente dal potenziale redox (Eh) e dal pH (Lu et al., 2011).

La Fig.1 riporta il diagramma Eh-pH per le forme di arsenico inorganico presenti nell'ambiente naturale.

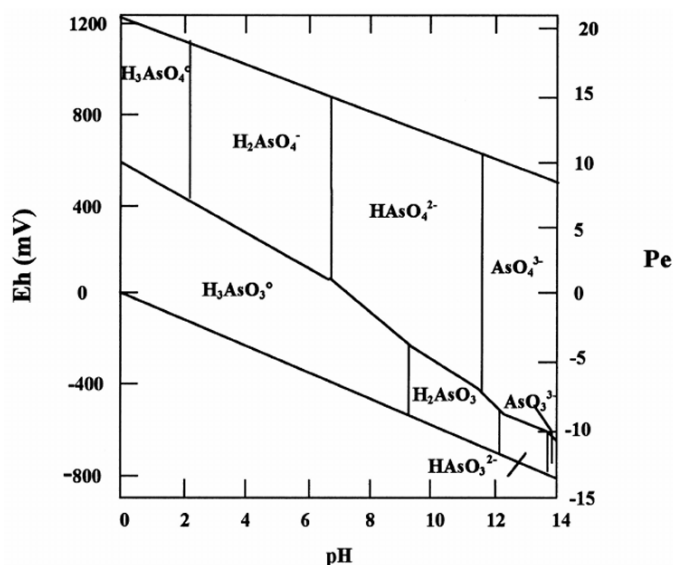


Figura 1. Speciazione dell'arsenico in funzione del pH e del potenziale redox (Eh)

A valori elevati di Eh, si verificano condizioni ossidanti che favoriscono la presenza delle specie dell'arsenico pentavalente (As(V)). Le condizioni riducenti invece, sono caratterizzate da valori minimi di Eh e la specie chimica predominante è l'arsenico trivalente (As(III)). Nello specifico, in condizioni ossidanti l'arsenico inorganico si presenta come H_3AsO_4 , con le specie $HAsO_4^{2-}$ e $H_2AsO_4^-$ presenti a pH 2-11. In condizioni riducenti, H_3AsO_3 rappresenta la forma predominante dell'arsenico. Se l'ambiente presenta valori di Eh < -250 mV, in presenza di zolfo o idrogeno solforato, potrebbero formarsi composti di arsenico come As_2S_3 .

Le specie inorganiche di arsenico As(III) e As(V) possono essere adsorbite sulla superficie dei minerali metallici presenti nel suolo, capacità di adsorbimento direttamente correlata al contenuto di ferro e di alluminio (Golberg., 2002).

In condizioni riducenti, la forma trivalente dell'arsenico (As(III)), costituisce la specie chimica più stabile e maggiormente soggetta ad adsorbimento, in particolar modo a valori di pH elevati. Invece, a pH acido e in presenza di condizioni ossidanti, l'As(V) rappresenta la specie predominante e che viene adsorbita sulla superficie del minerale (Jain et al., 2000).

1.2 Distribuzione dell'arsenico nell'ambiente

L'Arsenico è un agente cancerogeno di classe I, definito come il “re dei veleni”. Secondo l’OMS, rappresenta una delle 10 sostanze chimiche che destano più preoccupazione per la salute umana. (WHO, 2023).

Dalla metà del XIX secolo, i processi di modernizzazione, industrializzazione, urbanizzazione ed ulteriori attività antropogeniche hanno significativamente aumentato il rilascio di metalli pesanti nell'ambiente, causando gravi conseguenze ecologiche (Fig. 2). Tale impatto oggi si riflette nell'attuale scenario di inquinamento ambientale su scala globale (Kumar et al., 2019; Mandal, 2017).

La presenza di arsenico in contesti terrestri ed acquatici è quindi il risultato di una complessa interazione di fattori naturali ed antropici. La mobilitazione naturale di questo inquinante costituisce la principale fonte di problematiche ambientali associate al suo impatto, accentuate ulteriormente dalle attività antropogeniche (Smedley e Kinniburgh, 2002).

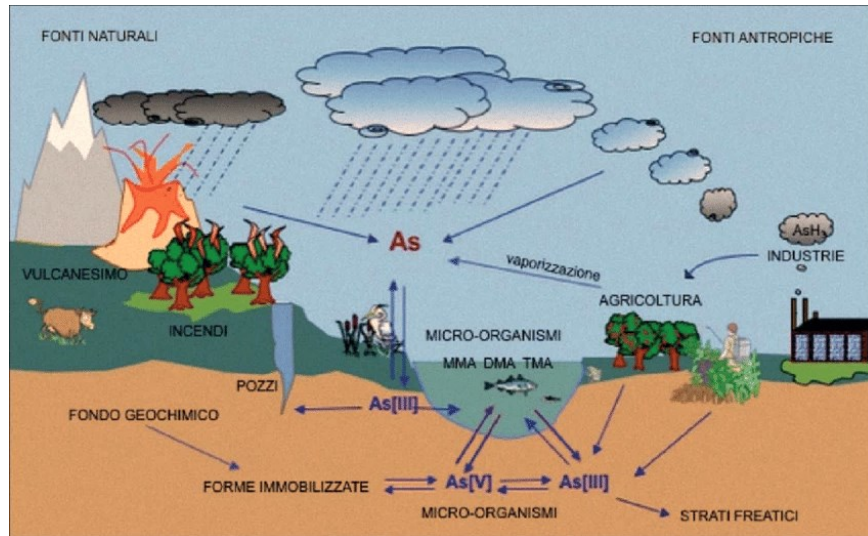


Figura 2. Ciclo biogeochimico dell'arsenico

1.2.1 Fattori naturali

L'arsenico è un elemento naturalmente presente nell'ambiente, è il 20° elemento più abbondante nella crosta terrestre, presente nelle rocce, nel suolo, nell'aria e nell'acqua. Rappresenta una componente importante in più di 200 minerali, dei quali approssimativamente il 60% arsenati, il 20% solfati e il restante 20% arseniti ossidi, silicati ed arsenico elementare, in cui è principalmente presente sotto forma di solfuro. Inoltre, è generalmente legato a carbonio, ferro, ossigeno e zolfo, con i quali forma composti inorganici ed organici in diversi stati di ossidazione. Tra i minerali più diffusi e conosciuti vi è l'arsenopirite (FeAsS) (Smedley e Kinniburgh, 2002; WHO, 2001)

Le cause naturali di diffusione dell'As sono da ricercare prevalentemente nei processi di pedogenesi, nell'attività vulcanica e biologica. I vulcani ne rilasciano circa tremila tonnellate l'anno, i microorganismi producono circa ventimila tonnellate di metilarsine volatili annuali; ma il maggior quantitativo di arsenico viene rilasciato dalla combustione dei combustibili fossili, con una produzione di circa ottantamila tonnellate annuali (Nriagu e Pacyna, 1998).

L'abbondanza terrestre di arsenico è di circa 5 mg/kg, anche se concentrazioni più elevate sono associate a depositi di solfuro (WHO, 2001).

Concentrazioni differenti di arsenico si osservano in base al tipo di roccia:

per le rocce ignee il contenuto di As si aggira intorno a 1,5 mg/kg, nelle rocce sedimentarie si ha un intervallo da 4 mg/kg nelle sabbie e arenarie, fino ad un massimo di 13 mg/kg nelle argille. Nelle rocce metamorfiche, la quantità di As contenuta è influenzata dalla tipologia della roccia da cui derivano.

Tra i principali processi naturali, l'alterazione è uno dei più importanti, attraverso il quale i solfuri di arsenico presenti nei minerali vengono convertiti in una forma altamente mobile, entrando nel ciclo dell'As come polvere o nelle acque sotterranee (Herath, 2016).

1.2.2 Fattori antropici

Il contributo antropogenico delle emissioni di arsenico nell'atmosfera è circa tre volte superiore a quello delle fonti naturali (WHO, 2001).

L'impatto antropogenico emerge come un fattore determinante nell'aumento significativo dei livelli di arsenico nell'ambiente. L'arsenico e i suoi composti sono stati prodotti ed utilizzati commercialmente per secoli. Notevoli quantità di arsenico vengono rilasciate dalle attività industriali, quali industrie di ceramiche, industrie farmaceutiche, industrie cosmetiche, colorifici, vetriere e industrie tessili, liberando notevoli quantità di arsenico sottoforma di triossido di arsenico (As_2O_3), una delle forme più comuni (Rachana et al., 2015; WHO, 2001).

Inoltre l'arsenico viene impiegato per la preparazione di pallini da caccia e per le sue proprietà conduttrici trova applicazione anche nel campo dell'elettronica. La sua presenza nell'ambiente è legata anche all'attività mineraria, alla fusione dei metalli e alla produzione di energia con combustibili fossili, ed ampiamente utilizzato anche come conservante del legno (Bhattacharya et al., 2007).

Un significativo rilascio di arsenico nell'atmosfera lo si ha durante i processi di fusione di minerali contenenti Cu, Pb, Zn e Au (Li e Thornton, 1993).

Anche in ambito agricolo l'arsenico ha trovato storicamente numerose applicazioni fino agli anni '60, per mezzo dell'utilizzo indiscriminato di prodotti contenenti As, presenti in pesticidi, erbicidi, insetticidi, fertilizzanti. Questi prodotti contenevano composti di arsenico come arsenato di calcio ($CaAsO_4$), arsenato di piombo ($PbAsO_4$), arsenato di zinco ($ZnAsO_4$) e molti altri.

Per merito di una maggiore sensibilizzazione e comprensione relativa all'elevata tossicità di questo metalloide, l'impiego dei composti a base di As in agricoltura è gradualmente scomparso nei paesi maggiormente sviluppati, seppur il loro impiego continui in paesi meno sviluppati, contribuendo alla contaminazione ambientale e ad un accumulo di As nel suolo e nelle acque sotterranee (Vaughan, 1993; Bhattacharya et al., 2002).

1.2.3 Arsenico nell'atmosfera

L'emissione di arsenico nell'atmosfera è prevalentemente associata a processi ad alta temperatura, come la produzione di energia elettrica dal carbone, la fusione, la combustione, l'attività vulcanica e il trasporto di polveri dal vento. L'arsenico rilasciato nell'aria esiste principalmente sotto forma di As_2O_3 o in misura minore come composti organici volatili. Anche la biometilazione naturale e la riduzione microbica contribuiscono al rilascio di arsenico nell'aria, per mezzo di microorganismi capaci di formare derivati metilati volatili, come il gas arsina (AsH_3).

Nell'aria l'arsenico è prevalentemente presente adeso al particolato, come miscela di arsenito e arsenato, con scarsa presenza di particelle organiche. Le particelle disperse dal vento vengono poi restituite alla terra mediante deposizione umida o secca, mentre le arsine rilasciate dai microorganismi, subiscono ossidazione nell'aria, riconvertendo l'arsenico in forme meno volatili che si depositano sul suolo (WHO, 2000; WHO, 2001).

È stato dimostrato che l'esposizione dell'uomo all'arsenico tramite l'aria è generalmente molto bassa rispetto a tutte le altre fonti (dieta, acqua), con una concentrazione tra 0,4 e 30 ng/m^3 . I livelli di As per le regioni europee si aggirano tra 0,2 e 1,5 ng/m^3 nelle aree rurali, 0,5- 3 ng/m^3 nelle aree urbane e fino ad un massimo di 50 ng/m^3 in zone industriali, indicando che l'aria contribuisce con meno dell'1% dell'esposizione totale all'arsenico (Hughes et al., 2011).

1.2.4 Arsenico nell'acqua

L'acqua rappresenta la principale via di esposizione all'arsenico per l'uomo. Molti composti dell'arsenico possono dissolversi in acqua contaminando laghi, fiumi o acque sotterranee dissolvendosi in pioggia, neve. Oltre il 97% dell'acqua dolce a livello globale appartiene alle risorse idriche sotterranee, che rappresentano la principale fonte di acqua potabile in molti paesi, quali Bangladesh, Cina, India, Vietnam, Argentina, Messico, Brasile, Cile, Thailandia (IARC, 2004). Pertanto, la contaminazione da arsenico nelle acque sotterranee costituisce una minaccia per la salute pubblica su scala globale (Herath et al., 2016).

Il massimo livello consentito di arsenico nell'acqua potabile, ancora in vigore in alcuni paesi, è di 50 µg/L, mentre il valore di riferimento comunemente adottato secondo le linee guida dell'OMS è di 10 µg/L (WHO, 2001). Le specie inorganiche (arsenito ed arsenato) risultano essere le più abbondanti, a differenza di quelle organiche poco rappresentate.

1.2.5 Arsenico nel suolo

La concentrazione di As nei suoli non contaminati, varia da un minimo di 1 mg/kg ad un massimo di 40 mg/kg, con una concentrazione media intorno a 5 mg/kg (Herath et al., 2016). Si riscontrano concentrazioni più basse in suoli sabbiosi e più elevate in suoli alluvionali ed organici (Mandal e Suzuki, 2002).

Il livello di As nei suoli è influenzato da fattori come la roccia madre, il clima, i componenti organici ed inorganici presenti nel suolo e lo stato di potenziale redox. L'As è presente nel suolo in forma organica e inorganica, tuttavia esiste prevalentemente come specie inorganica, quale arsenito As(III) ed arsenato As(V). Quest'ultimo rappresenta la forma più stabile di As nel suolo in condizioni ossidanti (in ambienti aerobici), mentre la forma trivalente è maggiormente rappresentata a potenziali redox bassi (Fitz e Wenzel, 2002; Takahashi et al., 2004).

Tra le specie organiche più comuni nel suolo, seppur presenti in minori quantità rispetto a quelle inorganiche, si trovano l'acido monometilarsonico (MMA) e l'acido dimetilarsonico (DMA), la cui presenza viene principalmente associata all'attività agricola, in quanto ampiamente utilizzati come pesticidi ed erbicidi.

In condizioni ossidanti i microorganismi presenti nel suolo possono metilare i

composti inorganici producendo forme organiche come MMA, DMA e TMAO (ossido di trimetilarsina) (Fig. 3). I composti inorganici manifestano una maggiore tossicità rispetto ai composti organici e lo stato trivalente risulta più tossico del pentavalente (Adriano, 2001).

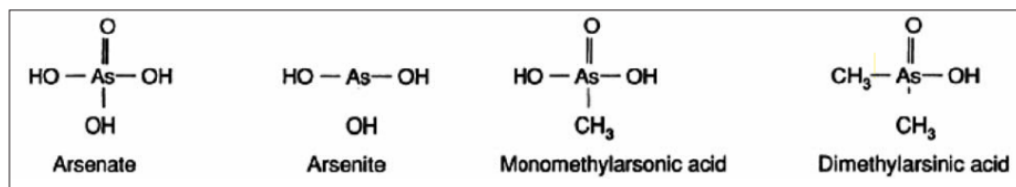


Figura 3. Specie di arsenico maggiormente rilevanti

1.3 Distribuzione geochimica dell'arsenico in Italia

È stata riscontrata la presenza di arsenico nei suoli e nell'acqua di alcune regioni italiane, presenza associata principalmente alla complessità dell'assetto geologico, all'elevata varietà dei suoli, ai processi pedogenetici ma anche all'attività antropica. I suoli italiani, a differenza di quelli europei manifestano alte concentrazioni di As, in un range di 0,79-62,20 mg/kg, con valore medio intorno a 8 mg/kg. Concentrazioni anomale di As (> 20 mg/kg) sono state riscontrate in diverse regioni, quali: Lombardia, Toscana, Lazio, Sardegna, Campania e Trentino (Dall'Aglio, 1996; Zuzolo et al., 2020). Queste aree sono riconducibili a tre distinti ambienti:

1. Mineralizzazioni a solfuri in plutoniti e metamorfiti (Toscana e Sardegna)
2. Apparati vulcanici (Toscana, Lazio, Campania)
3. Pianure alluvionali: con suoli ricchi di materiali organici, argilla, ambienti riducenti

Nella Figura 4, vengono riportate le diverse concentrazioni di As nei suoli agricoli italiani. I maggiori arricchimenti di As si evidenziano in corrispondenza della catena alpina, di sedimenti alluvionali della Pianura Padana, di depositi di pirite della provincia magmatica Toscana (TMP), della provincia magmatica romana

(RMP), di rocce metamorfiche calabresi e di aree mineralizzate della Sardegna.

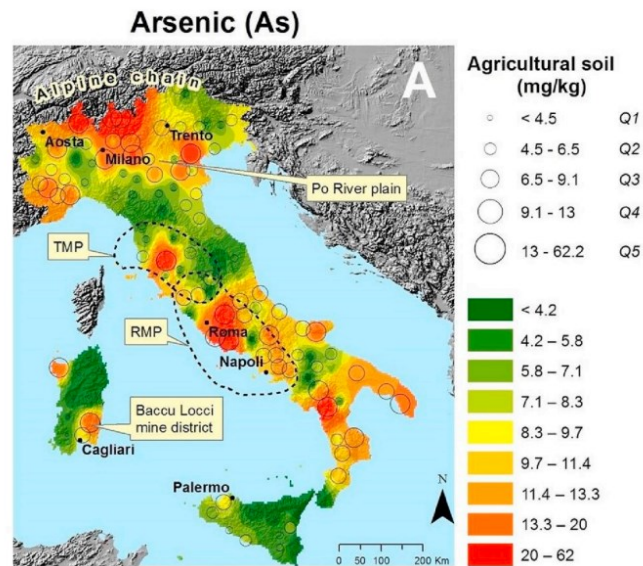


Figura 4. Distribuzione dell'arsenico in Italia

L'elevata concentrazione di As nell'area compresa tra Milano ed Aosta, si presume sia associata alla presenza di un ex sito di estrazione dell'oro. Gli elevati livelli di As che si riscontrano nella zona centrale delle Alpi, probabilmente derivano dalle rocce metamorfiche, mentre nella zona orientale, le alte concentrazioni di As possono essere associate a depositi morenici contenenti materiali trasportati dal gruppo superiore di vulcaniti atesine (lava e tufo). Nell'Italia centrale, le elevate concentrazioni presenti a livello della TMP, sono riconducibili alla presenza di arsenopirite e solfosali, mentre a livello della RMP si riscontra presenza di suoli di origine vulcanica (Zuzolo et al., 2020).

Tra le aree maggiormente inquinate, la Piana di Scarlino, nel Grossetano (Toscana), presenta una combinazione di fattori antropici e naturali, determinando in alcune località una concentrazione di As nei suoli di 1000 mg/Kg. L'inquinamento è stato ricondotto alle inondazioni del Fiume Pecora, caratterizzato dalla presenza significativa di sali di arsenico insolubili, i quali si sono depositati e incorporati nei sedimenti argillosi. Le cause antropiche sono da ricercarsi nelle attività industriali come la lavorazione della pirite ed attività paleo-industriali (Arpat, 2001; Nuova Solmine, 1999).

1.4 Tossicità dell'arsenico

L'arsenico è stato classificato dalla IARC (international Agency for Research on Cancer) come agente cancerogeno di 1 classe.

L'esposizione all'arsenico da parte dell'uomo può avvenire principalmente attraverso ingestione ed inalazione. In primo luogo, tramite assunzione diretta di acqua ed alimenti contaminati, nel secondo caso per inalazione di pesticidi o erbicidi a base di As. Le acque sotterranee contaminate vengono spesso impiegate in ambito agricolo per l'irrigazione delle colture e per il sostentamento alimentare di animali da allevamento. Questa pratica può favorire una via d'ingresso dell'As nella catena alimentare umana (Beni et al., 2007).

Tra gli alimenti che rappresentano la principale fonte di esposizione all'As vi sono i crostacei, pollame, prodotti lattiero-caseari, cereali e frutti di mare.

Uno studio ha stimato i valori medi di As presenti in diversi gruppi di alimenti, identificando i seguenti valori: nei frutti di mare 130 µg/kg, nel riso 130 µg/kg e in altri prodotti correlati ai cereali 92 µg/kg di As. E' stata osservata una maggior assunzione di As in forme inorganiche (AsIII e AsV), che sono maggiormente tossiche rispetto alla sua forma organica, meno tossica. Le forme organiche (arsenobetaina ed arsenocolina) si riscontrano principalmente in alimenti come i frutti di mare (Lynch et al., 2014; Khan et al., 2022).

La metilazione sembra rappresentare la via principale di detossificazione, seppur ulteriori studi hanno dimostrato che i metaboliti metilati possono in parte essere responsabili di alcuni effetti dannosi. A seguito di assorbimento per via digestiva, l'As inorganico subisce un processo di metilazione (monometilato e dimetilato) a livello epatico, dove viene trasformato in composti a minore tossicità (acido monometilarsonico e dimetilarsinico), ed escreto tramite urina.

Tuttavia, è stato osservato che alcuni dei derivati metilati dell'As inorganico, risultano più tossici e reattivi dell'arsenito, inducendo citotossicità (Mitra et al., 2020). Gli effetti tossici dovuti all'As sono correlati alla forma chimica e allo stato di ossidazione, considerando il seguente ordine $\text{As(III)} > \text{MMAO} > \text{DMA(III)} > \text{DMA(V)} > \text{MMA(V)} > \text{As(V)}$ (Vega et al., 2001; WHO, 2001).

Tra i meccanismi tossici più comuni vi è l'inattivazione di enzimi indispensabili a catalizzare alcune reazioni biologiche. L'elevata tossicità di As(III) è strettamente associata alla sua interazione con gli enzimi. Questo ossianione, formando legami

con i gruppi sulfidrilici (-SH), interferisce ed altera la struttura quaternaria degli enzimi alterandone la funzionalità. Il legame tra As(III) e gruppi sulfidrilici può essere inoltre la causa per cui questo elemento, una volta assorbito, si accumula nei capelli e nelle unghie, legandosi alla cheratina.

Ulteriori enzimi, che catalizzano reazioni fondamentali del metabolismo energetico, vengono inibiti dal legame con As(III). Tra questi, l'inibizione dell'enzima piruvato deidrogenasi (responsabile della decarbossilazione ossidativa dell'acido piruvico ad acetil-CoA), determina inibizione nella formazione di ATP. La quantità di piruvato nel sangue aumenta mentre la produzione di ATP si riduce, portando la cellula incontro a lento danneggiamento. Anche α -chetoglutarato deidrogenasi, enzima presente nel ciclo dell'acido citrico, viene inibito dall'azione dell'As(III) (Belton et al., 1985).

Nonostante As(III) sia considerata la forma più tossica, anche la forma pentavalente (AsV), può avere effetti dannosi, in parte a causa della sua conversione ad arsenico trivalente, ma più specificatamente entrando in competizione e sostituendosi al fosfato inorganico (Hughes, 2002). Condividendo proprietà simili all'ossianione fosfato (PO_4^{2-}), l'arsenato (AsO_4^{2-}) è in grado di sostituirsi ad esso in importanti reazioni biochimiche del metabolismo energetico, portando alla formazione di esteri dell'As instabili, anziché esteri fosforici. Nello specifico, l'arsenato può interferire a livello della fosforilazione ossidativa, importante processo coinvolto nella produzione di energia nell'organismo, che porta alla produzione di ATP e simultaneamente all'ossidazione di una molecola di nicotinamide adenina dinucleotide fosforilato (NADPH) (Dixon, 1997). L'arsenato interferisce con questo processo, producendo un estere arsenato dell'ADP instabile, il quale subisce l'arsenolisi, un'idrolisi non enzimatica. Come conseguenza, l'energia metabolica si riduce e viene prodotto glucosio-6-arsenato al posto di glucosio-6-fosfato.

Inoltre, l'eccessiva esposizione all'arsenico inorganico nell'uomo, può provocare cheratosi, arsenicosi, malattie della pelle, cancro a reni e polmoni, malattie cardiovascolari, neuropatie, diabete e disturbi riproduttivi (OMS, 2011).

1.5 Resistenza all'arsenico nei microorganismi

Si ritiene che i sistemi di resistenza all'arsenico si siano sviluppati in condizioni di anaerobiosi, quando le specie di As ridotte (arsenito) predominavano su quelle ossidate (arsenato).

Per fare fronte alla massiccia presenza di arsenico nell'ambiente, differenti microorganismi hanno adottato dei meccanismi di disintossicazione da metalli pesanti, sviluppando resistenza per l'arsenico e in alcuni casi utilizzandolo nei propri processi metabolici, come fonte di energia (Tsai et al., 2009). I diversi meccanismi sviluppati, hanno implicazioni dirette sulla speciazione e sulla mobilità dell'As nell'ambiente (Suhaddnik et al., 2017).

L'arsenico può subire diversi processi di trasformazione, i principali sono: metilazione, ossidazione e riduzione.

Tra i meccanismi sviluppati per contrastare gli effetti dell'arsenico vi sono: l'assorbimento, la compartimentazione, la chelazione di ioni metallici, l'estrusione degli ioni o trasformazione biochimica (Paez Espino et al., 2009; Elahi e Rehman 2019) (Fig.5).

Tra i geni meglio caratterizzati coinvolti nel metabolismo dell'As, si riscontrano quelli degli operoni *ars*, *aio* e *arr*, che possono presentarsi sia nei plasmidi che nei cromosomi.

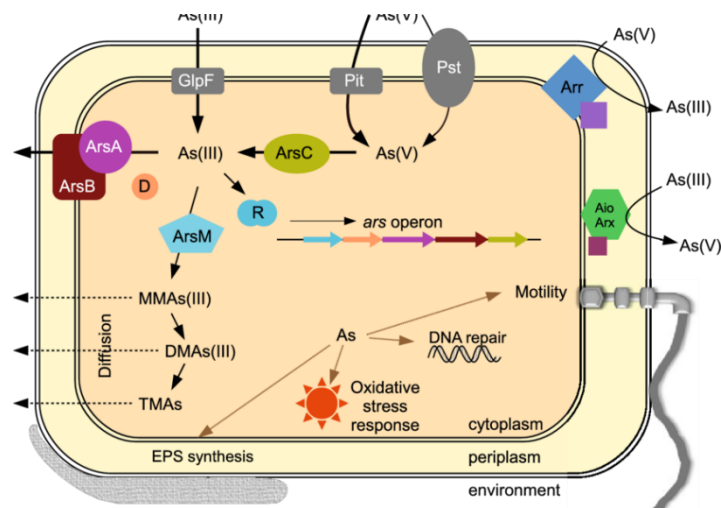


Figura 5. Meccanismi di resistenza all'arsenico nei procarioti

1.5.1 Assorbimento dell'arsenico

L'arsenico può essere utilizzato dai batteri come donatore o accettore di elettroni, ma al di fuori di questo non svolge alcun ruolo metabolico o nutrizionale nel citoplasma cellulare. Di conseguenza, le cellule non hanno sviluppato alcun sistema di assorbimento dedicato all'arsenico.

L'arsenico viene assorbito attraverso la membrana citoplasmatica tramite trasportatori di molecole chimicamente analoghe (Rosen et al., 2009). Nello specifico, la somiglianza chimica tra arsenato (AsV) e fosfato, consente l'assorbimento dell'AsV per mezzo di due trasportatori, quali il sistema Pit (trasportatore aspecifico del fosfato) e Pst (trasportatore specifico del fosfato), entrambi riscontrati in *E. coli* (Rosen., 2002). In quanto Pst è altamente specifico per il fosfato, trasporta l'arsenato con minore efficienza, infatti, comunità microbiche esposte ad alti livelli di arsenato, esprimono maggiormente Pst, al fine di ridurre l'assorbimento di AsV (Kruger et al., 2013).

In maniera analoga, l'arsenito As(III) a pH fisiologico e in soluzione acquosa si presenta come $\text{As}(\text{OH})_3$, strutturalmente simile al glicerolo; consentendogli di attraversare la membrana cellulare tramite l'acquaglicerolporina GlpF, sistema di trasporto del glicerolo (Tsai et al., 2009).

1.5.2 Esclusione dell'arsenico dalla cellula

L'esclusione rappresenta il meccanismo di base della resistenza all'arsenico, ed avviene tramite due fasi principali:

- a) la riduzione citoplasmatica di arsenato (AsV) in arsenito (AsIII), da parte della proteina ArsC
- b) Efflusso di As(III) tramite la pompa ArsB o ArsAB.

In questo processo gioca un ruolo essenziale il sistema Ars, codificato dai geni *ars* dell'operone ars. Gli operoni ars sono stati trovati localizzati nei cromosomi o sui plasmidi di batteri gram-negativi o gram-positivi. I geni *ars* sono co-trascritti in un'ampia gamma di configurazioni genomiche, disposti in maniera differente in base al ceppo specifico (Yan et al., 2019). Ad esempio, in alcuni batteri, l'operone ars a tre geni (arsRBC) consente l'estrusione dell'arsenito solamente tramite

sistema ArsB. In altri batteri, l'operone ars a 5 geni (arsRDABC), consente l'estruzione dell'arsenito dalla pompa ArsAB (Satyapal et al., 2016) (Fig.6).

L'arsenato che viene accumulato dalle cellule, viene trasformato per mezzo dell'arsenato reductasi citoplasmatica (ArsC) codificata dal gene *arsC*, la quale catalizza la trasformazione di AsV in AsIII. La conversione determina la produzione di arsenito, considerevolmente più tossico rispetto all'arsenato, ma rappresenta il substrato per il sistema di efflusso.

L'estruzione dell'arsenito (AsIII) può avvenire tramite una permeasi di efflusso ArsB, codificata dal gene *arsB*. Questa potrebbe svolgere la propria funzione da sola utilizzando il potenziale di membrana per catalizzare l'estruzione dell'arsenito dalla cellula; ciononostante, la partecipazione della proteina ArsA (ATPasi codificata dal gene *arsA*), può conferire un maggiore livello di resistenza. Il complesso ArsAB, (una pompa di efflusso ATP dipendente) viene attivato da ArsD, il quale agisce come chaperone, trasferendo l'arsenito dai complessi legati al glutatione alla subunità ArsA, del complesso ArsAB attivandolo, così consentendo l'estruzione dell'arsenito dalla cellula (Bhardwaj, 2022; Kruger et al., 2013). L'accoppiamento di riduzione ed efflusso produce resistenza sia ad AsV che ad AsIII (Bhardwaj, 2002; Rosen, 1996).

In alcuni batteri come *Actinobacteria* e *α -Proteobacteria*, è stata individuata la presenza della proteina Acr3p, la quale può svolgere la funzione di esclusione dell'arsenito in sostituzione di ArsB. Alcuni dati, indicano che Acr3p può essere accoppiato con ArsA nei casi in cui non si riscontri la presenza del gene *arsB* (Kruger et al., 2013).

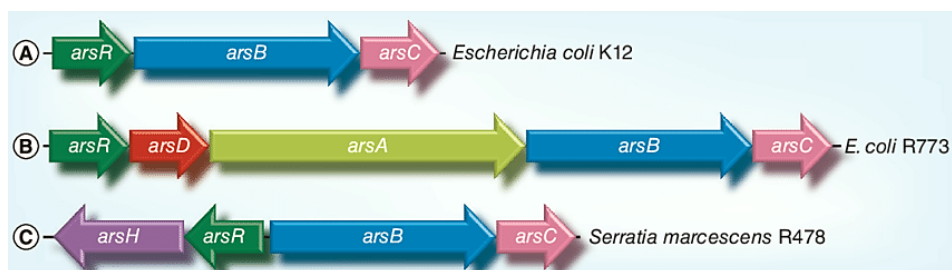


Figura 6. Esempi di organizzazione degli operoni ars

1.5.3 Metilazione dell'arsenico

Un ulteriore meccanismo di resistenza all'arsenico, è rappresentato dalla metilazione di As(III).

Il processo di metilazione è catalizzato da ArsM, una S-adenosilmetionina metiltransferasi, la quale in tre fasi successive, trasferisce gruppi metilici da S-adenosilmetionina (SAM) ad As(III), portando alla formazione di composti metilarsenicali. Le fasi prevedono la metilazione iniziale di As(III) in metilarsenito (MAs(III)), con successiva formazione di dimetilarsenito (DMAs(III)) e trimetilarsenito (TMAs(III)) (Fig.7). I composti metilarsenicali sono maggiormente tossici rispetto all'As(III), per questo non si accumulano nelle cellule e possono seguire diversi percorsi di detossificazione. D'altra parte, il TMAs(III) rappresenta una forma meno tossica che lascia la cellula volatilizzandosi.

In condizioni aerobiche questi intermedi metilarsenicali, possono essere ossidati, formando metilarsenicali pentavalenti come l'acido metilarsonico (MAs(V)), l'acido dimetilarsenico (DMAs(V)) e l'ossido trimetilarsenico (TMAs(V)O), rappresentando forme meno tossiche. L'ossidazione di MAs(III) in MA(V) avviene per mezzo dell'ArsH, una reduttasi che catalizza reazioni di ossido-riduzione nei batteri.

E' stata identificata in *Campylobacter jejuni* la presenza di una permeasi (ArsP) che consente l'estrusione di MAs(III) dalla cellula, conferendo resistenza a MAs(III) e ad altri composti organoarsenicali trivalenti (Yan et al., 2018).

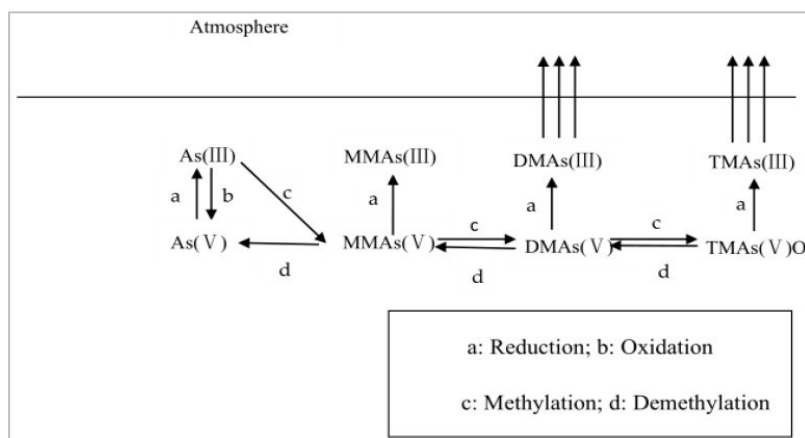


Figura 7. Vie per la trasformazione dell'arsenico

1.5.4 Riduzione dell'ossianione arsenato (AsO_4^{2-} , AsV)

Nei procarioti si distinguono due sistemi di riduzione dell'ossianione AsO_4^{2-} : riduzione citoplasmatica da parte di ArsC (arsenato reduttasi, sistema di detossificazione) e la riduzione per mezzo dell'arsenato reduttasi respiratoria periplasmatica, ArrA (sistema di riduzione dissimilativa).

L'arsenato reduttasi respiratoria viene codificata dai geni dell'operone *arr*. La riduzione dell'arsenato in *Chrysiogenes arsenatis* è catalizzata da arsenato reduttasi respiratoria, un eterodimero costituito da due subunità catalitiche, ArrA (87 kDa) e ArrB (29 kDa), entrambi indispensabili per la riduzione dell'arsenato in arsenito (Krafft e Macy, 1998). Diversi studi hanno dimostrato che ArrA, contiene il sito di legame AsV e il sito catalitico con un cofattore di bismolibdoproteina guanina dinucleotide, mentre ArrB è una proteina con diversi cluster Fe-S, entrambe appartenenti alla famiglia delle dimetilsofossido reduttasi (Yan et al., 2019; Bhardwaj, 2022).

Allo stesso modo, anche l'Arr del ceppo aloalcalifilico *Bacillus selenitireducens* MLS10 è costituito da due subunità, ArrA (110 kDa) e ArrB (34 kDa) (Afkar et al., 2003).

1.5.5 Ossidazione dell'ossianione arsenito (AsO_3^{2-})

L'ossidazione microbica dell'arsenito è catalizzata da due arsenito ossidasi lontanamente correlate, denominate AIO e ARX.

I geni *arx* che codificano per ARX e le sue proteine regolatorie, sono stati riscontrati in un numero limitato di batteri, prevalentemente nei gammaproteobatteri isolati da laghi ad alto pH e alta salinità. Infatti, ARX è codificato dai geni *arxAB*, inizialmente definiti in *Alkalimnicola ehrlichii* MLHE-1, batterio isolato dall'acqua di un lago alcalino-salino. (Ospino et al., 2019).

Al contrario, l'operone *aioAB* è ampiamente distribuito in gran parte dei batteri.

Diversi parametri filogenetici e funzionali, distinguono Aio dagli enzimi Arr/Arx. Questi ultimi contengono entrambi delle subunità di trasferimento degli elettroni molto simili (ArrB/ArxB) corrispondenti alle proteine-[4Fe-4S], mentre questo stesso ruolo è svolto da una proteina Rieske-[2Fe-2S] in Aio (Szyttenholm et al.,

2020). Nei sistemi *arr* ed *arx* si riscontrano diverse omologie seppur differenti organizzazioni genetiche. Sulla base di somiglianze sequenziali tra *aio*, *arr* e *arx*, si presume che *arx* possa essere una variante di *arr*, ma con reazione inversa (Van Lis et al., 2013).

L'ossidazione di As(III) in As(V), in una forma meno tossica, avviene a livello del periplasma ad opera dell'arsenito ossidasi, enzima che permette di catalizzare la reazione. Tendenzialmente, ceppi batterici ossidanti l'arsenito, sono per lo più eterotrofi. AioAB, ossidasi periplasmatica, è costituita da due subunità eterologhe, AioA ed AioB, codificate dai geni dell'operone *aioAB*.

È stato dimostrato che la subunità più grande (AioA) presenta un centro di molibdeno e un cluster 3Fe-4S, condividendo una somiglianza con altri membri della famiglia delle dimetilsolfossido reduttasi, mentre la subunità più piccola (AioB) contiene domini di Rieske 2Fe-2S (Santini e Vanden Hoven, 2004).

Ulteriori studi su *Agrobacterium tumefaciens* e *Herminiimonas arsenicoxydans*, hanno permesso di identificare due importanti sistemi di regolazione trascrizionale: AioS (sensore chinasi) e AioR (regolatore trascrizionale) (Yan et al., 2018).

1.6 Biorisanamento e fitorisanamento di matrici inquinate da As

La persistente presenza dell'arsenico nell'ambiente, richiede approcci innovativi per la sua gestione e mitigazione. Le attuali strategie utilizzate per la decontaminazione dell'arsenico nell'ambiente comprendono una vasta gamma di metodi fisici e chimici; tuttavia, questi metodi sono caratterizzati da costi elevati, applicabilità limitata e possono generare rischio di inquinamento secondario. L'approccio del biorisanamento può rappresentare una valida alternativa ecologica, impiegando microorganismi, piante o enzimi per mitigare o eliminare l'arsenico presente nel suolo o in altri contesti ambientali. Questa tecnica consente di rimuovere o convertire contaminanti nocivi in sostanze meno nocive e/o rimuovere gli elementi tossici dall'ambiente (Kapahi e Sachdeva, 2019).

Differenti metodiche possono essere applicate in contesti di contaminazione da metalli, ma due approcci sono maggiormente efficaci: il biorisanamento e la

fitodepurazione.

L'impiego di microrganismi resistenti e capaci di biotrasformare/biodegradare l'agente contaminante come l'arsenico, rappresenta un aspetto chiave nel biorisanamento, in cui il potenziale metabolico dei microorganismi può essere sfruttato per la decontaminazione degli ambienti inquinati.

Tra le diverse strategie con cui il biorisanamento può essere applicato, si distingue il fitorisanamento, una metodica che sfrutta le proprietà ecofisiologiche delle specie vegetali per rimuovere, degradare o immobilizzare contaminanti presenti in forma organica ed inorganica dal suolo o nelle acque (Wang et., 2017).

L'efficacia di un protocollo di fitorisanamento dipende dalle caratteristiche della matrice ambientale da trattare, dalla specie vegetale utilizzata e dal contaminante presente (Patra et al., 2020).

Si possono distinguere differenti strategie di fitorisanamento tra cui (Fig.8):

i) Fitostabilizzazione: implica l'utilizzo di specie vegetali tolleranti ai metalli per immobilizzare questi ultimi nel sottosuolo e diminuirne la biodisponibilità, impedendo così la loro migrazione nell'ecosistema e riducendo la probabilità che i metalli entrino a far parte della catena alimentare.

ii) Fitovolatilizzazione: strategia di fitodepurazione che implica l'utilizzo di specie vegetali per assorbire gli inquinanti presenti nel suolo, convertendo questi elementi tossici in forme volatili meno tossiche, per essere successivamente rilasciate nell'atmosfera attraverso il processo di traspirazione delle piante. Approccio che può essere applicato per la decontaminazione degli inquinanti organici e per alcuni metalli pesanti come Se, Hg e As.

iii) Fitofiltrazione: utilizzo di piante coltivate idroponicamente per assorbire o adsorbire ioni di metalli pesanti dalle acque sotterranee e dai rifiuti acquosi.

iv) Fitoestrazione: utilizzo di piante iperaccumulatrici per estrarre e rimuovere i contaminanti dal suolo.

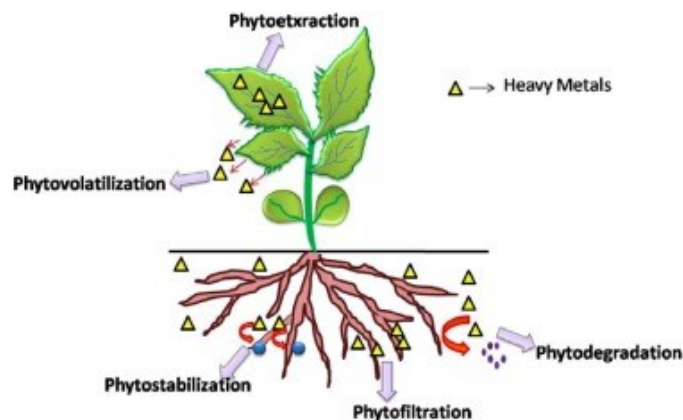


Figura 8. Differenti strategie di fitorisanamento

Tra le differenti strategie, la fitoestrazione rappresenta quella maggiormente praticata (Yan et al., 2020).

Nello specifico, la fitoestrazione implica l'impiego e la coltivazione di specie vegetali per l'assorbimento di contaminanti presenti nel suolo o nell'acqua, traslocandoli e accumulandoli nelle loro parti aeree, le quali in un secondo momento saranno raccolte ed incenerite, generando materiale ricco di contaminante, che verrà successivamente smaltito (Yan et al., 2020).

L'elevata concentrazione del metallo/metalloide che si riscontra nel materiale generato, rispetto a quello presente nel suolo, è indicativo del successo di questo protocollo (Ahmad, 2016). Il processo di fitoestrazione si compone di alcune fasi: i) mobilizzazione dei metalli pesanti presenti nella rizosfera, ii) assorbimento da parte delle radici delle piante, iii) traslocazione di ioni di metalli dalle radici alle parti aeree della pianta, iv) sequestro e compartimentazione degli ioni dei metalli pesanti/metalloidi nei tessuti vegetali (Ali et al., 2013). Ai fini di un buon successo, bisogna considerare alcuni fattori come la tipologia delle specie vegetali utilizzate in base anche alle loro prestazioni, la biodisponibilità dei metalli pesanti, le proprietà del suolo e della rizosfera.

Le piante utilizzate a tali scopi, devono avere determinate caratteristiche come un'elevata capacità di crescita della pianta stessa, delle foglie e del proprio apparato radicale. Inoltre è importante che le specie vegetali siano adattabili a stress biotici e abiotici, così da poter essere facilmente coltivate e raccolte (Ghori et al., 2016).

Le piante iperaccumulatrici rappresentano la tipologia di specie vegetali che

meglio si presta alla fitoestrazione; si tratta infatti di specie in grado di accumulare un quantitativo di metalli 100 volte superiore rispetto alle specie più comuni, poste alle stesse condizioni (Rascio e Navari-Izzo, 2011). Le piante iperaccumulatrici sono in grado di assorbire metalli pesanti presenti nel suolo attraverso le radici e traslocarli ai fusti e alle foglie. Al contrario le specie non iperaccumulatrici, sono in grado di accumulare metalli pesanti solamente a livello dell'apparato radicale, senza la loro successiva traslocazione nelle parti aeree. Questo limiterebbe la loro efficacia in protocolli di fitoestrazione (Ghori et al., 2016) (Fig. 9).

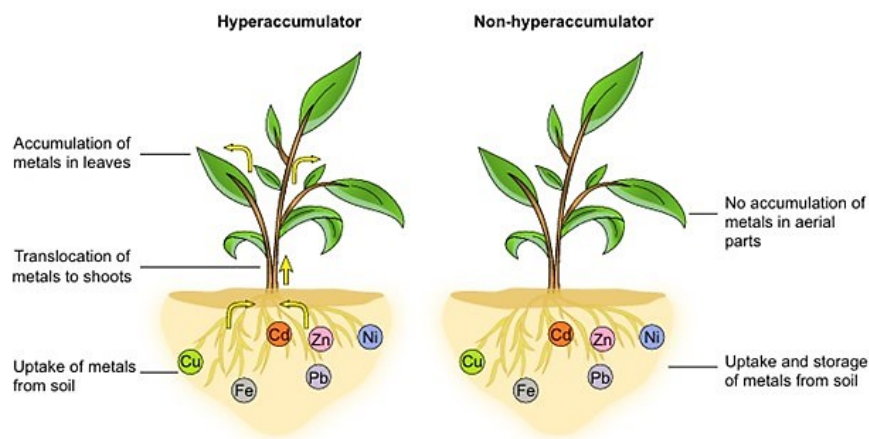


Figura 9. Differenze tra pianta iperaccumulatrice e non-iperaccumulatrice in protocolli di fitoestrazione

Un esempio di specie iperaccumulatrice di As è rappresentato dalla famiglia delle Pteridaceae; la specie di felce più studiata ed utilizzata in questi protocolli è la *Pteris vittata*, un'iper-accumulatrice in grado di sopravvivere ad alte concentrazioni di As presenti nel suolo (Alka et al., 2020).

Diversi studi condotti su *Pteris vittata*, dimostrano la sua capacità di accumulare metalli al di sopra dei livelli standard della sua biomassa fuori terra, continuando a crescere e prosperare in terreni contaminati da As (Zhao et al., 2023). Uno studio condotto da Ma et al., (2001) ha identificato la presenza di *Pteris vittata* in Florida, in un sito contaminato da arsenato di rame cromato (CCA). Su 14 specie vegetali testate, *P.vittata* aveva alte concentrazioni di As a livello delle fronde, pari a 5000 mg/kg, contro le specie di piante non iperaccumulatrici che raramente assorbono As al di sopra di 1 mg/kg.

Si presume che la tolleranza di questa specie nei confronti dell'As, derivi da tratti

sia costitutivi che adattativi, riscontrando una maggiore capacità di *Pteris vittata* di traslocare e accumulare As, grazie ad un maggior numero di fattori di traslocazione e concentrazione, rispetto ad altre specie iperaccumulatrici (Zhao et al., 2023).

1.6.1 Interazione batteri-pianta nel suolo

Il suolo ospita una grande varietà di microorganismi quali batteri, virus, funghi, protozoi e molto altro, costituendo un ecosistema complesso. L'interazione tra i microorganismi e le specie vegetali, rappresenta un processo complesso e dinamico che avviene principalmente a livello della rizosfera (zona del suolo più a contatto con le radici), dove si riscontra una vasta diversità microbiologica, con più alti livelli di attività microbica rispetto al suolo circostante. Gli essudati radicali rilasciati, contengono diverse sostanze chimiche, quali fenoli, acidi organici, amminoacidi, zuccheri ed altre sostanze, che attraggono e favoriscono la crescita di determinate popolazioni microbiche (Compant et al., 2019). Questi essudati fungono da fonti nutritive per i microorganismi presenti, portando ad un aumento dell'attività microbica stessa ed inoltre alterando la biochimica del suolo (Yang et al., 2000).

L'azione coordinata dei microorganismi e delle piante, svolge inoltre un ruolo essenziale nella detossificazione e nell'accumulo di metalli pesanti presenti nel suolo. Le specie microbiche interagendo con le specie vegetali coinvolte nel processo di fitorisanamento, possono migliorare la tolleranza ai metalli, favorendo la crescita delle piante e l'accumulo dei metalli pesanti/metalloidi a livello dei tessuti vegetali (Kong et al., 2017).

1.6.2 Trattamenti microbici PGP (Plant Growth Promotion)

I microorganismi presenti nel suolo, e in particolar modo quelli che vivono nella rizosfera, svolgono un ruolo essenziale, promuovendo la crescita delle piante in presenza di stress biotici e abiotici (Nadeem et al., 2014).

Questi microorganismi includono diverse categorie di batteri con tratti di

promozione della crescita delle piante (PGP), come i batteri endofiti, che colonizzano i tessuti interni della pianta e i batteri rizosferici, presenti nella zona circostante o all'interno delle radici delle piante (Afzal et al., 2019). L'incremento della crescita e l'aumento della produttività delle piante, sono favoriti dalla produzione di regolatori della crescita da parte dei batteri presenti nel suolo, i quali favoriscono inoltre l'assorbimento dei nutrienti da parte delle piante e forniscono protezione contro i parassiti (Nadeem et al., 2014).

In questo modo, i batteri contribuiscono al miglioramento della fitness della pianta facilitando il loro accesso ai nutrienti, rilasciando fitormoni, degradando o sequestrando inquinanti tossici ed attenuando le risposte allo stress (Dellagnezze et al., 2023; Nadeem et al., 2014).

Si possono distinguere due differenti meccanismi che hanno effetto positivo sulla crescita delle piante: meccanismi diretti e meccanismi indiretti.

I meccanismi di azione indiretti sono costituiti da tutti quei processi che riguardano l'inibizione o la mitigazione degli effetti dannosi prodotti da agenti fitopatogeni, mentre la promozione diretta della crescita delle piante include la produzione di ormoni vegetali (auxine, citochine, giberelline, etilene ed acido abscissico), la facilitazione nell'assorbimento dei nutrienti come la solubilizzazione del fosfato minerale, la fissazione dell'azoto, la produzione di acidi organici e la sintesi di enzimi chiave come l'ACC-deaminasi (Nanda et al., 2019; Hayat et al., 2010) (Fig. 10).

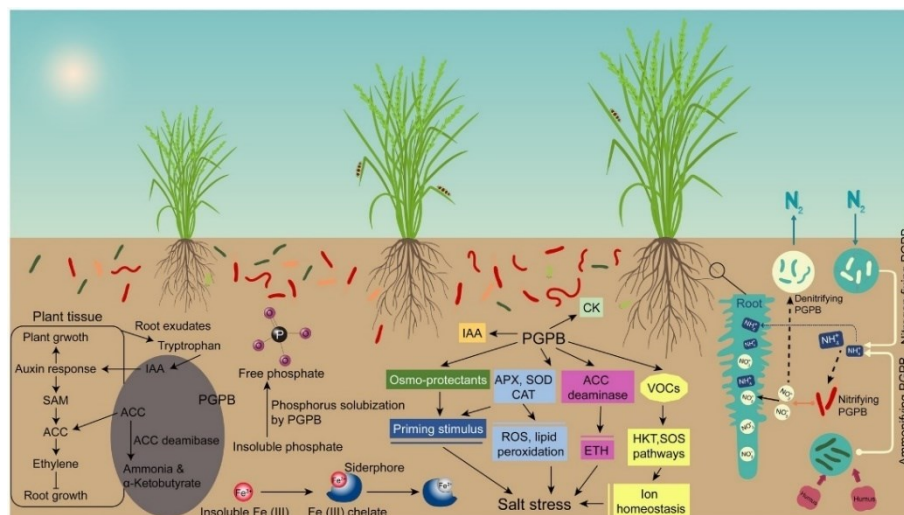


Figura 10. Principali tratti PGP. Fissazione dell'azoto, produzione IAA, produzione siderofori, solubilizzazione del fosfato, attività ACC deaminasi.

- Fissazione dell'azoto

L'azoto (N), rappresenta un elemento essenziale per tutti gli organismi viventi, comprese le piante. Esso costituisce circa il 79% della nostra atmosfera, ed è presente sotto forma di N_2 , una forma inattiva, non assimilabile da parte di animali e piante. Affinché l'azoto possa essere assimilato dalle piante, è indispensabile che sia convertito in forme utilizzabili chimicamente per mezzo dei processi di fissazione, ammonificazione, nitrificazione e denitrificazione. Tra le forme inorganiche maggiormente assimilabili dalle piante vi sono l'ammonio (NH_4^+) e il nitrato (NO_3^-) (Tang et al., 2020). L'azoto atmosferico può essere convertito dai batteri in forme utilizzabili, per mezzo della fissazione biologica dell'azoto. Nello specifico, i batteri azoto fissatori presenti nel suolo (microorganismi diazotrofi liberi) e nei noduli radicali di molte piante (microorganismi simbiotici), riducono l'azoto atmosferico N_2 in una forma reattiva e biologicamente disponibile come l'ammoniaca (NH_3), tramite l'enzima nitrogenasi (Dannenmann et al., 2009).

-Ammonificazione

Un ulteriore processo chiave nel ciclo dell'azoto è rappresentato dall'ammonificazione, che porta alla formazione dello ione ammonio (NH_4^+) a partire dalla materia organica (Dannenmann et al., 2009). Nel suolo, l'azoto si presenta principalmente sotto forma di sostanze organiche (proteine, amminoacidi, acidi nucleici etc.) derivate dalla decomposizione di residui vegetali, animali o altri composti organici. Per mezzo dell'attività dei microorganismi presenti nel suolo, le proteine possono essere idrolizzate per produrre polipeptidi (peptoni) e amminoacidi, in un processo che prende il nome di peptonizzazione. In seguito, gli amminoacidi formatesi, subiscono una deaminazione, durante la quale avviene la rimozione dei gruppi amino, producendo ammoniaca (NH_3). La combinazione dell'ammoniaca con l'acqua presente nei suoli, determina la formazione di ioni ammonio (NH_4^+), rendendo l'azoto disponibile per essere assorbito dalle radici delle piante (Abdelwahed et al., 2021; Bernhard., 2021).

-Solubilizzazione del fosfato

Il fosforo (P) rappresenta il secondo nutriente più importante per le piante, dopo l'azoto. Risulta essere ampiamente presente nel suolo sotto forma di sali minerali o in composti organici, in forma insolubile, inaccessibile alle piante, le quali possono assorbire forme solubili come gli ioni monobasici (H_2PO_4^-) e dibasici (HPO_4^{2-}) (Bhattacharyya e Jha, 2012).

Per superare la carenza di fosforo (P) nel suolo, vengono spesso applicati fertilizzanti a base di fosfati. Tuttavia, questi fertilizzanti presentano alcune limitazioni poiché il fosforo può essere rapidamente immobilizzato nel suolo attraverso reazioni con altri elementi, formando composti insolubili. In questo modo viene ridotta l'efficacia dei fertilizzanti e la disponibilità del fosforo per le piante (Sharma et al., 2013).

I batteri solubilizzanti il fosfato, possono promuovere la crescita delle piante mediante due processi principali: la solubilizzazione e la mineralizzazione del fosforo. La solubilizzazione del fosforo inorganico avviene per mezzo dell'azione di acidi organici a basso peso molecolare (come acido citrico o gluconato) sintetizzati direttamente dai batteri presenti nel suolo (Zaidi et al., 2009). Mentre la mineralizzazione del fosforo organico avviene per mezzo della sintesi di differenti fosfatasi, le quali catalizzano l'idrolisi degli esteri fosforici (Bing et al., 2019; Rebi et al., 2022). È stato dimostrato che le specie appartenenti ai generi *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* e *Sphingomonas*, sono in grado di migliorare la crescita e la salute delle piante proprio attraverso i meccanismi di solubilizzazione e mineralizzazione del fosfato. L'utilizzo di questi microrganismi nel suolo ha mostrato una capacità di ridurre del 50% la necessità di fertilizzanti fosfatici minerali (Suleimanova et al., 2023).

- Produzione di Siderofori

Anche il ferro (Fe) rappresenta un nutriente importante per gli organismi viventi, ampiamente distribuito nell'ambiente ma non prontamente accessibile e

disponibile. Il Fe ricopre un ruolo fondamentale soprattutto per gli enzimi coinvolti nelle reazioni redox, nel sistema fotosintetico delle piante e in molte altre reazioni. Ciononostante, la sua scarsa solubilità non ne consente l'assorbimento da parte delle specie vegetali e dei microrganismi presenti nel suolo. In condizioni di carenza di ferro, i batteri legano questo elemento attraverso due strategie: il rilascio di protoni e acidi organici per ridurre il pH del suolo o la secrezione di complessi ferrocchelanti, (i siderofori) che legano ioni ferrici (Fe^{3+}) (Albelda – Berenguer et al., 2019).

I siderofori sono definiti come “ trasportatori di ferro”, ligandi organici idrosolubili a basso peso molecolare (~ 400-1000 Da) con alta affinità e specificità per il ferro. Nello specifico, i siderofori prodotti dai batteri, mostrano un'elevata affinità per lo ione ferrico (Fe^{3+}). Una volta formato, il complesso sideroforo-ferro, viene riconosciuto e assorbito da specifici recettori presenti sui batteri o sulle piante. In seguito, il complesso viene internalizzato, ridotto allo stato ferroso (Fe^{2+}) e rilasciato dal sideroforo (Saha et al., 2013; Scavino e Pedraza, 2013).

I siderofori sono costituiti da tre gruppi funzionali leganti Fe, con due atomi di ossigeno legati a ciascun gruppo funzionale. Tra i gruppi funzionali identificati nei siderofori microbici figurano principalmente: idrossiamati, catecolati o altri gruppi come carbossilato, citrato o etilendiammina (Timofeeva et al., 2022). La produzione dei siderofori da parte dei batteri non solo agevola l'assorbimento di ferro da parte delle piante, ma svolge anche un ruolo cruciale nel biorisanamento di siti contaminati da metalli pesanti. I siderofori si legano non solo al ferro, ma anche ad altri metalli come il Cr^{3+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , riducendo la loro tossicità e facilitandone la rimozione dall'ambiente (Saha et al., 2015; Braud et al., 2009; Ghosh et al., 2015). Inoltre, i siderofori svolgono un ruolo significativo nel contrastare la proliferazione dei patogeni vegetali, sequestrando ferro, che altrimenti potrebbe essere utilizzato per la loro crescita (Olanrewaiù et al., 2017).

Tra i maggiori produttori di siderofori, si identificano più di 20 generi batterici come: *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Nocardia*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Streptomyces* e molti altri (Timofeeva et al., 2022).

-Produzione dell'acido indolo 3-acetico (IAA)

La maggior parte delle attività fisiologiche nelle piante sono regolate da ormoni vegetali, quali auxine, citochine, acido abscissico (ABA) e gibberelline (GA). Diversi studi hanno dimostrato la capacità da parte dei batteri promotori della crescita delle piante di secernere ormoni vegetali. L'acido indolo 3-acetico (IAA) costituisce l'auxina maggiormente rappresentata e più importante, avendo un ruolo centrale nella regolazione di diversi processi fisiologici come la divisione e l'allungamento cellulare, la differenziazione vascolare, il gravitropismo e il fototropismo (Boopathi et al., 2013). L'acido indolo 3-acetico prodotto dai microorganismi, può fungere da molecola di segnalazione mediando l'interazione tra microorganismi e piante, regolando inoltre la crescita e lo sviluppo delle piante stesse. Questo fitormone, prodotto dai batteri, facilita la comunicazione biochimica tra microorganismi e piante, influenzando vari processi fisiologici come la divisione e l'allungamento cellulare, la formazione delle radici laterali, dei peli radicali e la modulazione delle risposte allo stress (Tang et al., 2023; Spaepen et al., 2007; Glick, 2012).

L'IAA batterico inducendo un aumento della superficie e della lunghezza delle radici, consente alla pianta di aver maggior accesso ai nutrienti presenti nel suolo (Yadav et al., 2022).

Quando i livelli di IAA prodotto dalla pianta non sono ottimali, l'IAA prodotto dai batteri può stimolare e favorire lo sviluppo delle radici. Al contrario, quando i livelli di IAA sono già ottimali, l'IAA batterico può invece inibire un'ulteriore crescita radicale. Pertanto, la produzione batterica di IAA può agire positivamente o negativamente a seconda dei livelli di IAA già presenti nella pianta (Munir et al., 2022).

È stato riscontrato che circa l'80% dei batteri presenti nella rizosfera è in grado di produrre acido indolo 3-acetico, come *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Agrobacterium* e *Rhizobium* (Zhang et al., 2021).

La biosintesi di IAA nei batteri è compiuta sia per via triptofano-dipendente che per via triptofano-indipendente, in base all'utilizzo del triptofano come precursore. Nei batteri si possono distinguere fino a 5 differenti vie di biosintesi di IAA triptofano-dipendenti, riscontrando invece una più rara sintesi di IAA tramite via

triptofano-indipendente (Tang et al., 2023).

L-triptofano (L-Trp), costituisce il precursore chiave per la biosintesi di IAA nella via triptofano-dipendente, ma allo stesso tempo richiede un elevato costo di sintesi per le cellule microbiche; quindi, si riscontra nei microorganismi ad una concentrazione endogena relativamente bassa. (Tang et al., 2023).

- Sintesi dell'enzima ACC deaminasi

L'etilene, ormone vegetale gassoso, è coinvolto in una grande varietà di processi fisiologici, di crescita, sviluppo e nella risposta delle piante agli stress biotici e abiotici. Svolge ruoli importanti nell'induzione della fioritura, nella senescenza, nell'abscissione e nella maturazione dei frutti (Le Bris, 2017; Hao et al., 2017). Cooperando con gli altri ormoni vegetali, l'etilene è in grado di innescare dei meccanismi di difesa e sopravvivenza, coordinando così la crescita e lo sviluppo delle piante in risposta a stress abiotici.

Un aumento del livello di etilene in una pianta sotto stress può avvenire in risposta alla presenza di metalli, sostanze chimiche organiche e inorganiche, troppa o poca acqua, danno da insetti, ferite meccaniche e molto altro (Abeles et al., 1992; Chen et al., 2021).

Un'elevata concentrazione di etilene, oltre un certo livello critico, può provocare uno stato noto come "stress da etilene" nelle piante. Questo fenomeno è associato all'azione dell'enzima ACC ossidasi nei tessuti vegetali; il quale è coinvolto nella biosintesi dell'etilene. Quando la produzione di etilene supera la soglia che l'enzima ACC deaminasi può gestire efficacemente, si verifica uno squilibrio che può influenzare negativamente sullo sviluppo delle radici e dei germogli delle piante (Orozco-Mosqueda et al., 2020).

Diversi batteri che promuovono la crescita delle piante presenti nel suolo, possono agire abbassando i livelli di etilene, ripristinando le condizioni di crescita, grazie all'attività dell'ACC deaminasi (1-amminociclopropano-1-carbossilato (ACC) deaminasi), enzima che idrolizza il precursore (ACC) dell'etilene nelle piante. L'ACC viene idrolizzato producendo ammoniaca e α -chetobutirrato, i quali possono essere utilizzati dal microrganismo come fonte di N e C per la propria crescita. Grazie a questo, il microrganismo agendo sull'ACC ne abbassa i livelli

nella pianta, con conseguente abbassamento anche dei livelli di etilene (Fig.11). Questo meccanismo consente di prevenire situazioni potenzialmente deleterie per la crescita delle piante.

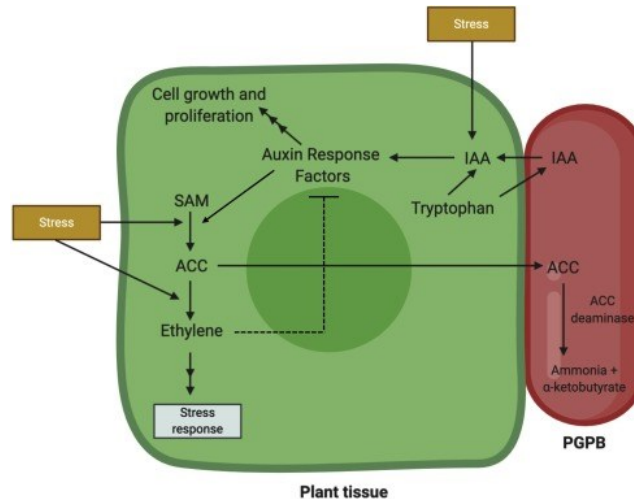


Figura 11. Ruolo dell' ACC- deaminasi batterica nell'interazione con il tessuto vegetale

L'IAA prodotto dai batteri, una volta assorbito, combinato con quello presente nelle piante, può attivare la trascrizione dell'enzima ACC sintasi, aumentando la concentrazione di ACC e portando ad un aumento di etilene sintetizzato. L'incremento di etilene può inibire la trasduzione del segnale di IAA, limitando la crescita mediata da IAA. In questo modo, l'ACC deaminasi non solo attenua l'effetto inibitorio dell'etilene sulla crescita delle piante, ma permette anche all'IAA di promuovere la crescita delle piante in situazioni di presenza o assenza di stress vegetale (Mosqueda et al., 2020; Glick, 2014).

La presenza dell'ACC deaminasi è stata segnalata in diversi generi batterici tra cui: *Aneurinibacillus*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Leclercia*, *Micrococcus*, *Parastrephia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* e *Serratia* (Mosqueda et al., 2020)

1.7 VUCC-DBT

La VUCC-DBT (Verona University Culture Collecton- Department of Biotechnology), è una collezione di risorse microbiche istituita presso il Dipartimento di Biotecnologie dell'Università di Verona e associata all'infrastruttura MIRRI.IT. La Collezione VUCC-DBT è partner del progetto SUS-MIRRI.IT (Sustainable Use of Biological Resources-Microbial Resource Research Infrastructure Italy), finalizzato ad implementare e valorizzare le risorse microbiche conservate nelle biobanche e nelle collezioni di colture in Italia. Tale progetto è stato finanziato nell'ambito del programma PNRR, dall' European Commission – NextGenerationEU, con il progetto SUS-MIRRI.IT "Strengthening the MIRRI Italian Research Infrastructure for Sustainable Bioscience and Bioeconomy", code n. IR0000005.

La Collezione VUCC-DBT è nata nel 2021 e al momento ospita le risorse microbiche provenienti dalle ricerche svolte nei laboratori di microbiologia ambientale e microbiologia agroalimentare del Dipartimento di Biotecnologie. Al momento è costituita da circa 400 ceppi (tra cui principalmente batteri e lieviti), rilevanti in diverse aree di studio quali il biorisanamento, la promozione della crescita delle piante, la biotrasformazione di metalli e metalloidi, la produzione di biosurfattanti e polioidrossialanoati, la valutazione della sicurezza di batteri correlati al settore alimentare e ai criteri di selezione di lieviti e batteri coinvolti nei processi agroalimentari.

2. SCOPO

Il presente lavoro di tesi si propone di implementare la collezione di risorse microbiche VUCC-DBT (Verona University Culture Collection-Department of Biotechnology), attraverso il deposito in essa di nuove biorisorse microbiche. Si tratta di ceppi batterici isolati da suoli inquinati da metalli pesanti e metalloidi, (tra cui l'arsenico), identificati dal punto di vista tassonomico e caratterizzati a livello funzionale per la loro capacità di resistere agli ossianioni dell'arsenico, arsenito (AsIII , AsO_3^{2-}) ed arsenato (AsO_4^{2-}), e per la presenza di tratti di promozione della crescita delle piante (tratti PGP – *Plant Growth Promotion*). La finalità del presente lavoro è anche quella di valutare il potenziale di questi isolati batterici per futuri potenziali utilizzi nell'ambito di protocolli di biorisanamento e fitorisanamento assistito di suoli inquinati.

Partendo da una collezione di ricerca di isolati batterici precedentemente ottenuti da suoli inquinati da arsenico, il presente studio si propone di:

- Valutare la resistenza all'arsenico, nella forma dei sali arsenito e arsenato, per gli isolati batterici ottenuti
- Caratterizzare a livello funzionale gli isolati mediante test specifici per individuare la presenza di tratti di promozione della crescita delle piante (tratti PGP)
- Identificare tassonomicamente i ceppi di interesse capaci di resistere agli ossianioni dell'arsenico e che possiedono tratti di PGP
- Inserire i ceppi identificati nella VUCC-DBT, la collezione di microorganismi dell'Università di Verona.

I ceppi batterici per i quali si riscontrano tratti più promettenti potranno essere presi in considerazione come risorse per possibili applicazioni future nell'ambito del biorisanamento.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Provenienza degli isolati batterici in studio

Nel presente progetto di tesi, sono stati considerati ed analizzati ceppi batterici precedentemente ottenuti tramite arricchimenti selettivi da suoli di due siti industriali, situati in Toscana. Entrambi i suoli presentavano contaminazioni da metalli pesanti e metalloidi con particolare riferimento all'arsenico (Tab.1).

3.1.1 Caratteristiche dei suoli di provenienza

SITO 1	Toscana	Ex Farmoplant
SITO 2	Toscana	ENI

Tabella 1. Locazione sito 1 e sito 2

- Sito 1

Massa-Carrara è una provincia italiana della Toscana. Zona definita ad alto rischio di crisi ambientale, per via di numerose industrie fondate, come la Farmoplant, un'azienda specializzata nella produzione di pesticidi.

Si ritiene che il danno ambientale nel sito e nelle zone limitrofe, sia stato causato in particolar modo da due esplosioni avvenute nel 1988 nel reparto di produzione di un insetticida, il Rogor (Mara et al., 1995). L'esplosione e l'incendio dei serbatoi contenenti insetticidi, determinò una fuoriuscita tossica, identificando successivamente presenza ad alte concentrazioni di metalli pesanti anche a chilometri di distanza dal sito (Minichilli et al., 2006).

Studi svolti precedentemente, hanno analizzato il suolo attraverso due campionamenti, eseguiti a due profondità differenti. Un campione è stato prelevato in superficie del profilo pedologico ad una profondità compresa tra i 10 e i 20 cm, mentre per il secondo campione è stato eseguito un campionamento di profondità tra 0,5 e 1,5 m. Sono state riscontrate differenze nella concentrazione dell'arsenico e nel pH (Tab.2).

	Concentrazione As	pH
Campione superficiale	400 mg/Kg	4,5
Campione a 0,5- 1,5 m	8000 mg/Kg	9

Tabella 2. Caratteristiche dei campionamenti nel sito 1

-Sito 2

Il sito 2, collocato in Toscana, rappresenta un'area industriale, appartenente ad una raffineria petrolchimica chiusa. Dei prelievi eseguiti superficialmente, hanno identificato la presenza di differenti metalli, tra cui l'arsenico, ad una concentrazione pari a 663 mg/Kg.

3.1.2 Ceppi batterici oggetto del presente studio

Gli isolati batterici oggetto del presente lavoro di tesi, erano stati ottenuti mediante colture selettive condotte in presenza di As, dai due suoli di interesse in precedenti studi. Gli arricchimenti selettivi erano stati condotti utilizzando mezzi di crescita differenti: Nutrient Broth, R2A , Tryptone Soy Broth. Inoltre, l'arricchimento era stato condotto sia in presenza di Na_2AsO_3 che Na_2AsO_4 alla concentrazione di 2mM. A seguito di procedure di dereplicazione erano state ottenute colture axeniche per ciascuno degli isolati di interesse e infine i ceppi erano stati conservati in glicerolo al 30% w/vol alla temperatura di -80°C , presso il Laboratorio di Microbiologia Ambientale dell'Università di Verona.

I ceppi batterici erano stati precedentemente nominati, in base alla coltura di arricchimento, al mezzo di crescita utilizzato e alla profondità del campionamento nel suolo. Di seguito (Tab. 3 e Tab.4), viene pertanto riportata la lista dei ceppi batterici oggetto di analisi (35 ceppi per il sito 1 e 23 ceppi per il sito 2).

ISOLATI SITO 1	
CT R2A 400 02	ASV I 400 08
CT R2A 400 04 BIS	ASV I 400 03 (a)
CT TSA 400 01	ASV I 400 03 (b)
CT R2A 400 01	ASIII I 400 03

CT R2A 400 08	CTW 400 06
CT LB 400 06	CT R2A 400 09
CT R2A 400 13	ASIII I B 400 03
CT R2A 400 15	ASV I 400 04 BIS
CT R2A 400 04	CTW 8000 03
CT R2A 400 13 BIS	CTW 400 03
CT R2A 400 14 BIS	CT LB 400 02
ASIII I 400 04	CT LB 400 03 G
ASV I 400 05	CTW 8000 02
ASIII I 400 01	CT LB 400 05
ASIII I B 400 02	CT R2A 400 12
ASV I 400 09	ASIII I 400 05
ASV I 400 10	CTW 8000 04
CTN 400 05 BIS	

Tabella 3. *Isolati batterici appartenenti al sito 1*

ISOLATI SITO 2	
ASIII F1	ASVK (b)
ASIII M2	ASV M3
ASIII N	ASIII F2
ASIII O	ASIII F
ASV B	ASIII I
ASV C	ASV H
ASIII H	ASV 18GR
ASV 1 1 (A)	ASIII G
ASV 1 1 (B)	ASV A
ASV E	ASV 18PK2
ASV L	ASV A1
ASVK (a)	

Tabella 4. *Isolati batterici appartenenti al sito 2*

3.2 Reagenti utilizzati

Soluzione di Arsenito As(III) ed Arsenato As(V)

Entrambe le soluzioni sono state impiegate per verificare l'arsenico resistenza mediante determinazione del valore di Minimum inhibitory concentration (MIC). Le soluzioni sono state sterilizzate mediante filtri 0,25 μ M prima del loro utilizzo (Tab.5)

Reagente	
Arsenito di Sodio (Na_2AsO_3)	50 mM
Arsenato di Sodio (Na_2AsO_4)	200 mM

Tabella 5. Soluzioni Sali Arsenico utilizzate

Soluzione fisiologica (0,9%)

Reagenti	Quantità
NaCl	9 g/L
H ₂ O deionizzata	1 L

Tabella 6. Composizione soluzione NaCl

3.3 Conservazione e crescita degli isolati

I ceppi batterici precedentemente isolati e conservati a -80°C , sono stati rivitalizzati attraverso successivi rinfreschi su mezzo di crescita R2A agar, medesimo mezzo in cui erano stati originariamente criopreservati (Tab.7). A seguito di ciascun rinfresco, i campioni sono stati incubati a 27°C per 48 ore.

In una fase successiva, sono state eseguite diluizioni seriali decimali in soluzione fisiologica (0.9% NaCl) (Tab. 6) in tubi eppendorf da 1,5 ml, per verificare la purezza degli isolati conservati.

Terreno R2A Agar (Reasonar's 2 Agar)

Il Terreno R2A è stato adoperato sia come mezzo agarizzato, che come mezzo liquido. L'R2A liquido prevede la stessa ricetta di preparazione, senza l'aggiunta di agar (Tab.7).

Reagenti	Quantità
Yeast extract	0,5 g/L
Pepton	0,5 g/L
Hydrolyzed casein acid	0,5 g/L
Glucose	0,5 g/L
Starch	0,5 g/L
Sodium pyruvate	0,3 g/L
K ₂ HPO ₄	0,3 g/L
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,05 g/L
Agar	15 g/L
H ₂ O deionizzata	1 L

Tabella 7. Composizione del terreno R2A agar

3.4 Determinazione del valore di Minimum inhibitory concentration (MIC) per arsenito e arsenato.

La concentrazione minima inibente (MIC) rappresenta la concentrazione più bassa alla quale una sostanza antimicrobica, come l'arsenico, è in grado di inibire la crescita di un organismo, in questo caso degli isolati batterici oggetto di studio. Il test è stato eseguito su tutti gli isolati batterici in studio.

Ciascun isolato è stato inoculato in un tubino contenente 5 mL di R2A liquido e incubato a 27°C al buio, in agitazione, alla velocità di 150 rpm per 24 h. Successivamente, dalla coltura liquida è stata prelevata un'aliquota che è stata seminata per mezzo di un'ansa sterile monouso, su piastre Petri contenenti R2A agar addizionato con concentrazioni crescenti dei sali di arsenico (Tab. 5). Per Na₂AsO₃ sono state testate le concentrazioni di: 0, 5, 10 e 20 mM, mentre Na₂AsO₄ è stato testato alle concentrazioni di: 0, 50, 130 mM.

Le piastre sono state incubate a 27°C per 5 giorni, al termine dei quali, ogni singola piastra è stata visionata ed analizzata per identificare eventuali crescite. La MIC è stata quindi determinata come la concentrazione più bassa in grado di inibire la crescita delle colonie batteriche rispetto ad un controllo, rappresentato dalla crescita del medesimo isolato in assenza di sale di arsenico. Tutte le prove sono state condotte in duplicato.

3.5 Identificazione dei tratti di PGP (Plant Growth Promoting)

Tutti gli isolati batterici sono stati caratterizzati a livello funzionale per mezzo di test mirati ad identificare la presenza di tratti promotori della crescita delle piante (PGP). Tutti i test sono stati eseguiti in duplicato.

3.5.1 Test per la produzione dell'ammoniaca

Per rilevare la produzione di ammoniaca, le colture batteriche sono state inoculate in 5 ml di acqua peptonata ed incubate a 27°C in agitazione, per 5 giorni. Dopo l'incubazione, il brodo di coltura è stato trasferito in un eppendorf da 2 ml e centrifugato a 10000 rpm per 5 minuti. In seguito, sono prelevati 1,5 ml di surnatante al quale sono aggiunti 500 µl del reagente di Nessler, secondo metodo descritto da Kumar et al., 2012. Il cambiamento di colore dal giallo al marrone scuro, è indice di produzione dell'ammoniaca (Cappuccino e Sherman., 1992).

3.5.2 Test di solubilizzazione del fosfato

La capacità di solubilizzare il fosfato, è stata testata mediante la crescita dei ceppi batterici su terreni solidi Pikovskayas (PVK) e NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate), entrambi integrati con $\text{Ca}_3(\text{HPO}_4)_2$ o CaHPO_4 , due forme di fosfato insolubili. Gli isolati sono stati dapprima inoculati in tubini contenenti 5 mL di R2A liquido, incubati in agitazione costante a 150 rpm a 27°C per 24-48 h e successivamente seminati mediante trasferimento di un'aliquota

(spot) di 20 µl sulla superficie delle piastre contenenti i terreni PVK e NBRIP. In seguito, le piastre sono state incubate a 27 °C per 10 giorni.

Il test è stato eseguito secondo il protocollo descritto da Andreolli et al., (2016), e viene considerato positivo a seguito della comparsa di un alone chiaro intorno alla colonia, indice della capacità dei batteri di solubilizzare una delle due forme di fosfato inorganico insolubili, addizionate ai terreni PVK e NBRIP. La solubilizzazione del fosfato inorganico può avvenire per mezzo di differenti meccanismi quali la secrezione di acidi organici o produzione di enzimi da parte dei batteri.

Entrambi i terreni PVK (Pikovskaya., 1948) e NBRIP, sono stati descritti da Nautiyal (1999) (Tab. 8 e Tab. 9)

Terreno Pikovskayas (PVK)

Prima dell'aggiunta di agar nel mezzo, mediante soluzione NaOH 1 M, il pH è stato portato a 6.8 - 7.

Reagenti	Quantità
Glucosio	10 g/L
Ca ₃ (PO ₄) ₂ / CaHPO ₄	5 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g/L
NaCl	0,2 g/L
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,1 g/L
KCl	0,2 g/L
Estratto di lievito	0,5 g/L
MnSO ₄ · H ₂ O	0,002 g/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,002 g/L
Agar	15 g/L
H ₂ O	1 L

Tabella 8. Composizione terreno PVK per solubilizzazione del fosfato

Terreno NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium)

Reagenti	Quantità
Glucosio	1 g/L
Fruttosio	1 g/L
Lattosio	1 g/L

Mannitolo	1 g/L
Ca ₃ (PO ₄) ₂ / CaHPO ₄	5 g/L
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	5 g/L
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,25 g/L
KCl	0,2 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 g/L
Agar	15 g/L
H ₂ O	1 L

Tabella 9. Composizione terreno NBRIP per solubilizzazione del fosfato

Per un'analisi semi quantitativa, è stato misurato lo spessore della zona di solubilizzazione intorno alla colonia (alone), per i ceppi risultati positivi al test. La misurazione viene effettuata partendo dall'esterno all'interno dell'anello lattiginoso, eliminando le zone frastagliate intorno alla colonia (Fig. 12).

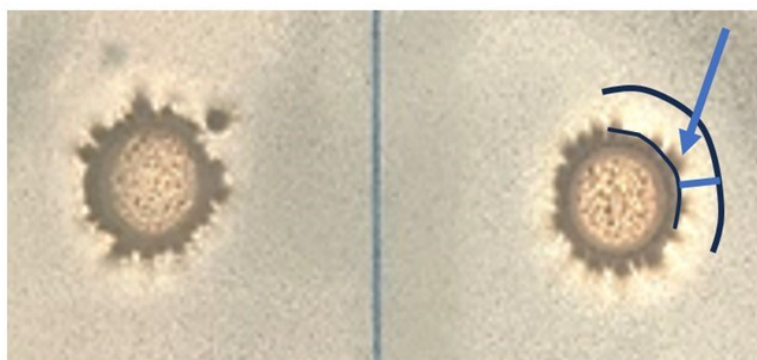


Figura 12. Misurazione alone per la quantificazione della solubilizzazione del fosfato

3.5.3 Test per la produzione di siderofori

La produzione di siderofori è stata indagata mediante test qualitativo su piastra, secondo il metodo descritto da Miranda et al., (2007), apportando alcune modifiche al protocollo.

È stato possibile verificare la produzione dei siderofori grazie alla presenza del colorante Cromo Azul S (CAS) (Sigma-Aldrich) nel mezzo.

Il mezzo di sovrapposizione (O-CAS) è stato preparato secondo il metodo descritto da Schwyn and Neilands (1987), apportando alcune modifiche. Di seguito (Tab. 10, 11, 12, 13) viene riportato il metodo di preparazione, pensato per un volume finale di 100 ml.

Soluzione 1: CAS (Chrome Azul S)

Reagenti	Quantità
CAS (Dye chrome Azul S)	6,05 mg in 5 ml
1mM FeCl ₃ ·6H ₂ O; 10 mM HCl	1 ml

Tabella 10. Soluzione CAS per protocollo rilevazione siderofori

Soluzione 2: CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide)

Reagenti	Quantità
Bromuro di cetil-trimetilammonio (CTAB)	7,21 mg
H ₂ O	4 ml

Tabella 11. Soluzione CTAB per protocollo rilevazione siderofori

Le due soluzioni (Tab.10 e Tab.11) vengono mescolate lentamente sotto stirring e successivamente autoclavate.

Soluzione 3: PIPES (Piperazine-1,4-bis (2-etanesolfonico)) + Agar

La soluzione 3 (Tab.12), deve essere preparata in due fasi. Per prima cosa deve essere autoclavato l'agar 0,9%

Reagenti	Quantità
Agar 0,9%	0,9 gr
H ₂ O	20 ml

Tabella 12. Soluzione Pipes per protocollo rilevazione siderofori

Solo a seguito dell'autoclave, sarà aggiunta all'agar la seguente soluzione (Tab.13), che dovrà essere calibrata e portata a pH 6.8 con soluzione NaOH 1M, filtrata con filtro 0,25µM, ed aggiunta all'agar della soluzione 3.

Reagenti	Quantità
PIPES	3,024 g
H ₂ O	70 ml

Tabella 13. Soluzione Pipes protocollo siderofori

La soluzione 1,2 viene unita alla soluzione 3.

Per la realizzazione di questo test, i ceppi batterici sono stati inoculati in tubini contenenti 5 mL di R2A liquido e incubati a 27°C in agitazione costante a 150 rpm per 48 h. Successivamente, un'aliquota pari a 20 µl della coltura batterica è stata trasferita su piastre di R2A agar. Le piastre sono state incubate a 27°C per 48 h. A questo punto 10 ml di terreno O-CAS (Overlaid CAS) preparato dalla combinazione delle tre soluzioni (CAS, CTAB, PIPES + agar), viene colato sulle piastre, con i ceppi batterici cresciuti precedentemente. Le piastre vengono quindi nuovamente incubate a 27°C per 24/48 h.

Il test viene considerato positivo a seguito della comparsa di aloni intorno alla colonia, indicativo della produzione dei siderofori.

Il test per la rilevazione dei siderofori, si basa sulla loro specifica affinità per il Fe(III), per mezzo del complesso ternario costituito da Cromo azurol S, ferro (III), Bromuro di esadeciltrimetilammonio (CTAB), il quale agisce come indicatore. Quando un chelante forte interagisce con il ferro presente nel complesso, causa la rimozione del colorante, determinando un cambiamento di colore dal blu ad arancione, visibile come alone (Schwyn e Neilands., 1987).

E' stata inoltre eseguita un'analisi semi-quantitativa, la quale prevede la misurazione dello spessore dell'alone intorno alla colonia.

3.5.4 Test per la produzione di IAA

La produzione dell'acido indol-acetico è stata rilevata mediante l'applicazione del protocollo di Gordon e Weber (1951), apportando alcune modifiche.

Ogni ceppo è stato inoculato in tubini contenenti 5 mL di terreno R2A liquido, addizionati con 500 mg/L di triptofano, incubati a 27°C in agitazione a 150 rpm. Il test è stato eseguito rispettivamente dopo 48 e 120 ore, prelevando 1 ml da ciascuna coltura batterica e aggiungendo 2 ml del reagente di Salkowski.

Il reagente di Salkowski consente di rilevare la produzione dell'acido 3-indol acetico (IAA) da parte dei batteri. Viene preparata inizialmente una soluzione di $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0.5 M, portata a volume con acqua deionizzata e l'aggiunta finale di H_2SO_4 puro (Tab 14).

Reagenti	Quantità
Soluzione FeCl ₃ · 6 H ₂ O 0.5 M	7,5 ml
H ₂ O deionizzata	250 ml
H ₂ SO ₄ puro	150 ml

Tabella 14. Reagente di Salkowski per rilevazione IAA

Il test consente di identificare la capacità da parte dei batteri di metabolizzare L-Trp, producendo IAA. Nello specifico, il reagente di Salkowski (miscela di FeCl₃ e H₂SO₄), reagendo con l'acido indol-acetico presente nel mezzo, produce una colorazione rosa, data dalla formazione del complesso IAA con riduzione di Fe³⁺ (Kamnev et al., 2001).

Il test viene ritenuto positivo alla comparsa di una colorazione rosa nel mezzo, valutata su una scala da 1 a 4 in base all'intensità del colore, indicativa della concentrazione di acido indol-acetico presente in soluzione.

Successivamente, i ceppi risultati positivi al test qualitativo sono stati sottoposti ad un'analisi quantitativa con misurazione della densità ottica a 530 nm.

3.5.4.1 Analisi quantitativa

I ceppi risultati positivi al test qualitativo sono stati inoculati in tubini contenenti 5 mL di terreno R2A liquido, addizionato con 500 mg/L di triptofano. Dopo 48 e 120 ore, vengono prelevati 2 ml di coltura e centrifugati a 10000 rpm per 10 minuti. Viene prelevato 1 ml di surnatante al quale vengono aggiunti 2 ml di reagente di Salkowski. A seguito di incubazione di 30 minuti al buio, viene misurata l'assorbanza a 530 nm, determinando la concentrazione di IAA in base ad una retta di taratura standard, precedentemente costruita.

La soluzione di IAA (0,01 g di 3-indoleacetic acid, 10 ml di H₂O deionizzata) è stata preparata ed utilizzata come standard per la costruzione di una retta di taratura, la quale consente la determinazione della concentrazione di IAA prodotta dai batteri.

La retta di taratura è stata costruita alle seguenti concentrazioni di IAA puro: 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 e 0 µg/mL (Fig. 13 e Fig.14).

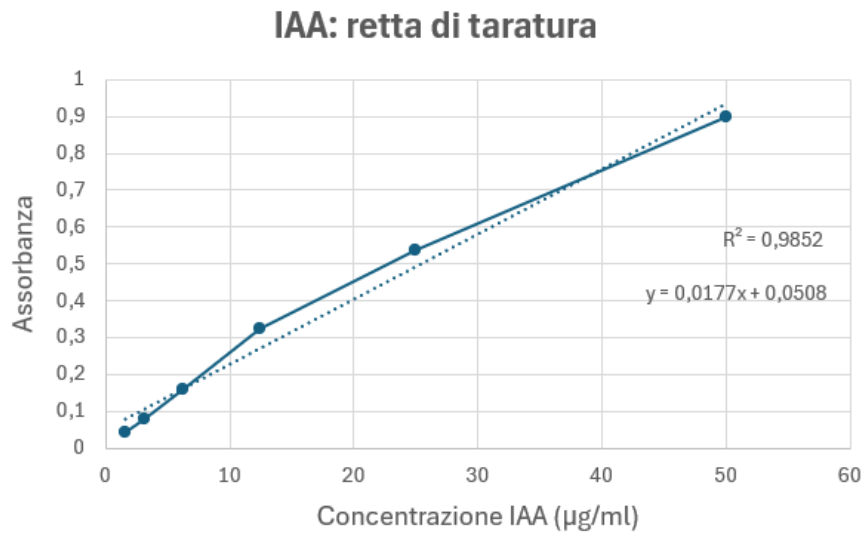


Figura 13. Retta di taratura per analisi quantitativa di IAA

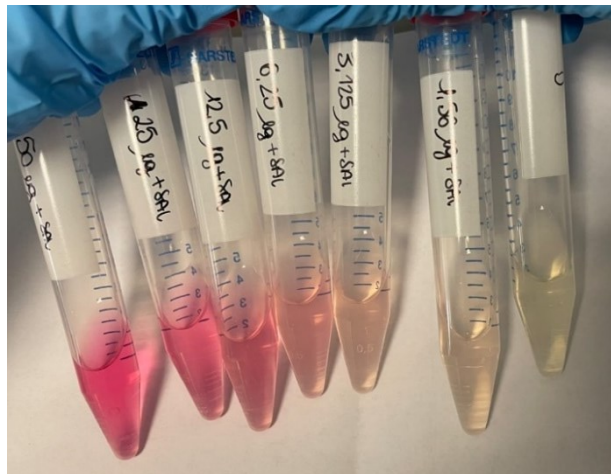


Figura 14. Concentrazioni standard IAA+ reagente di Salkowski per retta di taratura

3.5.5 Test per la valutazione dell'attività 1-amminociclopropano-1carbossilato (ACC) deaminasi

Per identificare l'attività dell'ACC deaminasi, viene adoperato il terreno DF (Dworkin and Foster) salt modified medium (Tab.17). Questo si compone di due soluzioni precedentemente preparate e aggiunte al DF prima di essere sterilizzato in autoclave (Tab. 15 e Tab. 16).

Soluzione 1

Reagenti	Quantità
H ₃ BO ₃	10 mg
MnSO ₄ ·5 H ₂ O	11,19 mg
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	124,6 mg
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	78,22 mg
MoO ₃	10 mg
H ₂ O	100 ml

Tabella 15. Composizione soluzione 1 (elementi in tracce)

Soluzione 2

Reagenti	Quantità
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	100 mg
H ₂ O	10 ml

Tabella 16. Composizione soluzione 2

Terreno DF (Dworkin e Forester, 1958)

Reagenti	Quantità
KH ₂ PO ₄	4 g/L
Na ₂ HPO ₄	6 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g/L
Glucosio	2 g/L
Fruttosio	1 g/L
Mannitolo	1 g/L
Acido gluconico	2 g/L
Acido citrico	2 g/L
Sol. 1	0,1 ml
Sol. 2	0,1 ml

H ₂ O	1 L
------------------	-----

Tabella 17. *Composizione terreno DF salt modified medium*

Il test è stato eseguito in duplicato, in tubini da inoculo secondo quanto riportato da Penrose e Glick (2003).

I ceppi sono stati inoculati in 5 ml di R2A liquido e lasciati crescere per 48 ore. Le cellule sono state raccolte per centrifugazione a 4500 rpm per 10 minuti, lavate con soluzione fisiologica (0.9% NaCl) per essere inoculate nel mezzo DF in seguito alla lettura allo spettrofotometro, ad una concentrazione finale di OD₆₀₀ pari a 0.01. Ciascun ceppo è stato quindi inoculato in : i) mezzo DF tal quale, privo di fonte di N (controllo negativo); ii) mezzo DF addizionato di 2 g/L solfato di ammonio (controllo positivo) (Tab. 19); iii) mezzo DF addizionato della soluzione ACC 0.5 M (30 µL in 5 ml di DF) nel singolo tubino da inoculo. Il test è stato condotto in tubini in un volume di 5 ml di DF. E' previsto che la soluzione di ACC 0,5 M, sia filtrata con filtri 0,25 µM, prima di essere addizionata al singolo tubino da inoculi (Tab. 18). I tubini vengono quindi incubati a 27°C in agitazione costante a 150 rpm, per 7 giorni.

Il mezzo DF addizionato di solfato d'ammonio, permette di verificare la crescita batterica, rappresentando il controllo positivo. L'assenza di crescita nel controllo negativo (DF tal quale), permette di verificare la capacità di utilizzare l'ACC come fonte di azoto da parte dei batteri, per la loro crescita. Il test viene ritenuto positivo quando si riscontra una crescita nel mezzo DF addizionato dell'ACC. La crescita batterica è stata valutata mediante la misurazione della densità ottica a 600 nm (OD₆₀₀) dopo 7 giorni di incubazione a 27 °C in agitazione costante a 150 rpm.

Soluzione ACC

La soluzione ACC (1-Amino-1-ciclopropanecarboxylic acid) è stata preparata per essere successivamente addizionata al DF per verificare la capacità dei batteri di crescere metabolizzando ACC. È stata preparata una soluzione 0,5 M di ACC (1-Amino-1-ciclopropanocarbossilico) (Tab. 18). Prima di essere addizionata ad un terreno DF, la soluzione è stata filtrata con filtro 0,25µM.

Reagenti	Quantità
ACC	0,25 g
H ₂ O	5 mL

Tabella 18. Composizione soluzione ACC

Soluzione (NH₄)₂SO₄ (Solfato di ammonio)

La soluzione di solfato di ammonio è stata preparata per essere addizionata ad una delle parti di DF, come controllo positivo, consentendo di identificare l'avvenuta crescita dei ceppi batterici sfruttando il solfato di ammonio come fonte di azoto. Prima di essere addizionata al DF, la soluzione è stata filtrata con filtro 0,25µM (Tab. 19).

Reagenti	Quantità
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
H ₂ O	10 mL

Tabella 19. Composizione soluzione solfato di ammonio

3.6 Metodiche molecolari per identificazione isolati batterici

Sulla base dei risultati ottenuti nei test per la valutazione della presenza dei tratti di PGP e della resistenza ad As III e As V, sono stati identificati gli isolati batterici di maggiore interesse. La selezione è stata fatta escludendo gli isolati che non manifestavano alcun tratto di PGP o che presentavano tratti PGP estremamente deboli, ritenuti poco interessanti. Sono stati quindi selezionati 44 ceppi batterici da quelli di partenza, sulla base dei risultati ottimali emersi dai test per i tratti specifici. I ceppi batterici selezionati sono stati successivamente analizzati mediante tecnica BOX-PCR per identificare la presenza di diverse unità tassonomica (OTU).

3.6.1 Estrazione e quantificazione del DNA genomico

I ceppi di interesse sono stati inoculati in 5 ml di terreno R2A liquido, in un tubino da inoculo da 13 mL. Sono stati posti in agitazione, in incubatore a 27°C per 2 giorni. Al termine di questi, 4 ml di terreno sono stati trasferiti in tubini da 2 ml e centrifugati a 13'000 rpm per 2 minuti, al fine di ottenere un pellet per ciascun

campione.

In seguito è stata eseguita l'estrazione del DNA genomico utilizzando il Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) secondo il seguente protocollo. Al pellet di ciascun campione vengono aggiunti 250 µl del Wizard SV Lysis Buffer e 300 mg di glass-beads, i campioni sono vortexati per 2 minuti al fine di indurre la lisi meccanica. Il lisato viene trasferito nella colonnina Wizard SV e centrifugato a 13000 rpm per 3 minuti, al termine del quale sono aggiunti 650 µl di Wizard SV Wash Solution (etanolo) a ciascuna colonnina e centrifugato nuovamente a 13000 rpm per 1 minuti. Gli ultimi due passaggi vengono ripetuti nuovamente. Dopo l'ultima centrifugazione, svuotato il tubo sottostante, la colonnina è centrifugata a 13000 rpm per 2 minuti, al fine di asciugare la resina. Trasferita la colonnina in un eppendorf da 1,5 ml, vengono aggiunti 50 µl di acqua sterile (65°C). I campioni vengono incubati per 2 minuti a temperatura ambiente, a seguito del quale sono centrifugati a 13000 rpm per 1 minuto, al fine di consentire l'eluizione del DNA dalla resina.

Il DNA ottenuto da ciascun campione, è stato analizzato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio 1,5% con intercalante Atlas Clear Sight DNA stain (Bioatlas) e tampone TAE 1X. La corsa elettroforetica è stata condotta a 100 V per 20 minuti, utilizzando come marker 1 Kb DNA Ladder (Promega, Italia). Successivamente il DNA estratto per ogni campione è stato quantificato al NanoDropTM One/One^C Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (ThermoScientific, USA). Per ogni campione sono stati analizzati 2 µL di DNA estratto, quantificato e valutato qualitativamente mediante rapporti di assorbanza A260/A280 (contaminazioni da proteine) e A260/A230 (contaminazioni da fenoli e carboidrati).

3.6.2 BOX-PCR

La BOX-PCR rappresenta una tecnica di tipizzazione molecolare. Attraverso l'amplificazione di regioni di DNA conservate, ripetute e disposte in maniera random all'interno del genoma del singolo ceppo batterico è possibile ottenere dopo

separazione elettroforetica degli ampliconi ottenuti, un profilo (fingerprinting) tipico per ciascun isolato batterico. Questa tecnica consente di discriminare ceppi diversi all'interno della stessa specie (Marques et al., 2008).

La reazione viene allestita come riportato di seguito (Tab. 20):

Reagenti	Stock	Volume
Buffer 1X	5X	5 μ L
Primer A1R BOX	10 pmol/ul	20 pmol , 2 μ L
dNTPs (0,4 mM)	10 mM	0.4 mM 1 μ L
Taq polimerasi (1U)	5U/ μ L	1 U 0,2 μ L
Templato		1 μ L (20-40 ng)
H₂O	Fino a 25 μ L	14,8 μ L
Volume finale		25 μ L

Tabella 20. Allestimento reazione PCR

La reazione viene condotta adoperato il primer A1R (Van Belkum et al., 1996) (Tab.21).

Primer	Sequenza
A1R	5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'

Tabella 21 Sequenza del primer A1R utilizzato nell'amplificazione

Il ciclo della reazione prevede:

94°C x 5 min.

94°C x 1 min.

52 °C x 1 min.

72 °C x 5 min.

72 °C x 2 min.

} 30 cicli

I prodotti della PCR sono stati fatti correre su gel di agarosio 1,5% a 100 V per 30 minuti, in TAE 1X, adoperando due marker: 1 Kb DNA Ladder (Promega, Italia) e il 100 bp DNA Ladder (Promega, Italia). A seguito della corsa elettroforetica, il gel è stato visualizzato al transilluminatore UV.

La BOX- PCR ha consentito di visualizzare differenti profili, sulla base dei quali è stato possibile raggruppare gli isolati, in unità tassonomiche (OTU). Profili simili sono stati considerati parte della stessa OTU, e per ognuna di queste è stato selezionato un rappresentante dell'OTU stessa (ceppo capostipite) per le successive analisi di sequenziamento.

3.6.3 Amplificazione del gene rRNA 16S

Il gene rRNA 16S (1500 bp) rappresenta il marcatore genetico utilizzato per gli studi tassonomici nei procarioti. Confrontando la sequenza di questo gene con altre sequenze precedentemente depositate in banche dati, è possibile identificare l'isolato a livello di genere e/o specie (Marchesi et al., 1998).

La reazione è stata allestita per i ceppi rappresentanti di ciascuna OTU, come segue (Tab.22):

Reagente	Stock	Volume
Buffer 1X	5X	5 µL
Primer F1	10 mM	1 µL
Primer R12	10 mM	1 µL
dNTPs	10 mM	0,4 mM 1 µL
Taq Polimerasi (1U)	5U/ µL	1 U 0,2 µL
Templato		1 µL (20-40 ng)
H ₂ O	Fino a 25 µL	15,8 µL
Volume finale		25 µL

Tabella 22. Allestimento reazione PCR per amplificazione gene rRNA 16S

L'amplificazione del gene rRNA 16S è stata effettuata mediante l'utilizzo dei primer F1 e il primer R12 (Weisbur et al., 1991) (Tab. 23).

Primer	Sequenza
F1	5'- GAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'
R12	5'- ACGGCTACCTTGTTACGACT- 3'

Tabella 23. Sequenze dei primer F1 e R12 utilizzati per l'amplificazione

Il ciclo della reazione prevede:

94 °C x 4 min.

94 °C x 1 min.

42 °C x 1 min.

72 °C x 2 min.

72 °C x 5 min.

} 30 cicli

I prodotti della PCR sono fatti correre su gel di agarosio 1% in tampone TAE 1X, a 100 V per 30 minuti, in presenza del marker 1Kb DNA Ladder.

3.6.4 Purificazione dei prodotti di PCR

I prodotti della PCR sono stati purificati secondo il seguente protocollo:

- Il prodotto di PCR (circa 50 µL) è trasferito in un eppendorf da 2 mL;
- Portare ad un volume finale di 200 µL con Buffer TE pH 8;
- Aggiungere 1/10 di volume di Na Acetato 3 M (20 µL);
- Aggiungere 2 volumi di Etanolo 100% freddo (440 µL);
- Lasciare i campioni a -80 °C per almeno 1 ora;
- Centrifugare a 14000 rpm per 10 minuti;
- Eliminare il surnatante per versamento;
- Aggiungere 400 µL di etanolo 70% freddo;
- Centrifugare a 14000 rpm per 10 minuti;
- Eliminare il surnatante per versamento;
- Centrifugare per qualche secondo ed eliminare l'etanolo residuo con una pipetta;
- Asciugare il pellet in speedvac per 30 minuti;
- Aggiungere 30 µL di acqua;
- Quantificare i campioni al NanoDrop.™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (ThermoScientific, USA). Per ogni campione sono stati analizzati 2 µL di DNA estratto, quantificato e valutato qualitativamente mediante rapporti di assorbanza A260/A280 (contaminazioni da proteine) e A260/A230 (contaminazioni da fenoli e carboidrati).

3.6.5 Sequenziamento e analisi tassonomica

I frammenti ottenuti sono stati preparati tramite kit Mix2Seq (Eurofins), per essere inviati e sequenziati presso Eurofins Genomics (Germania).

Per il sequenziamento è stato utilizzato il primer F1, utilizzato precedentemente per l'amplificazione. Le sequenze ottenute, in una prima fase sono state analizzate ed affinate mediante il software BioEdit Sequence Alignment Editor, per poi essere analizzate mediante BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide), algoritmo di due database, NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) ed EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) (Yoon et al., 2017; Schoch et al., 2020). In seguito, le sequenze sono state allineate con il programma di allineamento multiplo CLUSTAL_X (Thompson et al., 1997). È stato inoltre generato un albero filogenetico con il software MEGA 7.0, utilizzando il metodo del neighbor-joining (Tamura et al., 2011).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Verifica della purezza degli isolati batterici oggetto del presente studio

I ceppi batterici oggetto del presente lavoro di tesi sono stati precedentemente ottenuti mediante arricchimenti selettivi condotti in mezzi di crescita addizionati di sali di arsenito e arsenato a partire da suoli raccolti in siti industriali inquinati da metalli e metalloidi.

I ceppi erano stati conservati attraverso crioconservazione a -80°C presso il laboratorio di Microbiologia ambientale del Dip. di Biotecnologie dell'Università di Verona.

Per poter procedere con la realizzazione delle analisi oggetto del presente studio è stato necessario, nella fase iniziale del lavoro, rivitalizzare i ceppi microbici in mezzo di crescita agarizzato al fine di verificarne la vitalità e la purezza (assenza di contaminazione). I ceppi batterici sono stati quindi sottoposti a cicli ripetuti di subcoltura, al fine di promuovere la crescita attiva ed il mantenimento del loro stato di purezza. Durante l'arco del presente lavoro sono stati conservati in mezzo di crescita agarizzato alla temperatura di $+4^{\circ}\text{C}$.

4.2 Valutazione della resistenza ad arsenito e arsenato mediante analisi della concentrazione minima inibente (MIC) la crescita.

Al fine di valutare la resistenza ad arsenito ed arsenato dei ceppi batterici in studio, è stato condotto un test per la determinazione dei valori di MIC. L'analisi è stata effettuata su tutti gli isolati batterici, coltivati in R2A agar in presenza di concentrazioni crescenti di arsenito di sodio (Na_2AsO_3): 0, 5, 10 e 20 mM, o di arsenato di sodio (Na_2AsO_4): 0, 50, 130 mM. Il range di concentrazioni di arsenico considerato per questa analisi è correlato alle concentrazioni di arsenico riscontrate nei campioni di suolo utilizzati per l'ottenimento degli isolati stessi. Questo approccio è stato adottato al fine di garantire le condizioni sperimentali.

In figura 15, vengono riportati a titolo esemplificativo i risultati della crescita su piastra di alcuni ceppi appartenenti al sito 1. Si riscontra come il ceppo CTW400 03 resista e riesca a crescere fino ad una concentrazione di 10 mM di arsenito. Il ceppo ASVI400 09 invece mostra crescita fino a concentrazioni di 5 mM di arsenito, ed è invece inibito alla concentrazione di 10 mM, quest'ultima corrispondente al valore di MIC. Si può inoltre notare come la crescita dei ceppi CTSA400 01 e CTW400 06, sia inibita alla concentrazione di 5 mM (MIC).

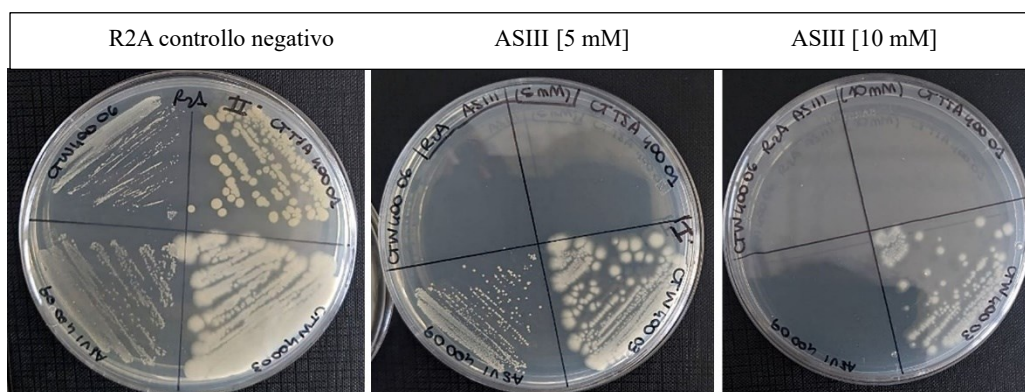


Figura 25. Determinazione della concentrazione minima inibente (MIC) per ceppi sito 1

I dati ottenuti circa la capacità dei ceppi batterici di crescere in presenza di arsenito ed arsenato sono riportati nelle Tabelle 24 e 25. Come si può osservare, tutti i ceppi in studio risultano capaci di crescere anche alle concentrazioni più elevate di arsenato analizzate. D'altra parte, invece, l'arsenito esercita un effetto di maggiore tossicità sugli isolati. È possibile riscontrare nel sito 1 una significativa presenza di isolati capaci di crescere alla concentrazione maggiore testata in questo studio, 20 mM, tra cui ASIII I 400 03, CTW 400 03, ASIII I 400 01, ASIII I B 400 03, ASVI 400 03 (a), ASVI 400 03 (b), CTW8000 04 e CTR2A400 09. Nel sito 2 si riscontra una tendenza simile, i valori più alti di MIC (20 mM) si sono riscontrati in ASIII M, ASIII O, ASV H, ASIII G e ASV 18GR.

	AsIII 5 mM	AsIII 10 mM	AsIII 20 mM	AsV 50 mM	AsV 130 mM
<i>CTR2A400 02</i>	-			+++	-
<i>CTR2A400 04BIS</i>	-			+++	-

<i>CT TSA400 01</i>	-			-	
<i>CTR2A 400 01</i>	-			+++	-
<i>CTR2A 400 08</i>	-			-	
<i>CTLB 400 06</i>	-			-	
<i>CTR2A400 13</i>	+ -	-		-	
<i>CTR2A400 15</i>	+ -	-		-	
<i>CTR2A400 04</i>	-			+++	-
<i>CTR2A400 13 BIS</i>	-			++	-
<i>CTR2A400 14 BIS</i>	-			+++	-
<i>ASIII I 400 04</i>	-			+++	-
<i>ASVI I 400 05</i>	-			-	
<i>ASIII I 400 01</i>	+++	++	-	-	
<i>ASIII I B 400 02</i>	-			-	
<i>ASVI 400 09</i>	+++	-		+++	-
<i>ASVI 400 10</i>	+++	-		+++	-
<i>CTN 400 05 BIS</i>	-			-	
<i>ASVI 400 08</i>	+++	-		+++	-
<i>ASVI 400 03(A)</i>	+++	+++	-	-	
<i>ASVI 400 03 (B)</i>	+++	+++	-	-	
<i>ASIII I 400 03</i>	+++	++	-	-	
<i>CTW 400 06</i>	+ -	-		+++	-
<i>CTR2A400 09</i>	+++	+++	-	++	-
<i>ASIII I B 400 03</i>	+++	++	-	-	
<i>ASVI 400 04 BIS</i>	-			-	
<i>CTW 8000 03</i>	+++	-		-	
<i>CTW 400 03</i>	+++	++	-	+++	-
<i>CTLB 400 02</i>	-			++	-
<i>CTLB 400 03 G</i>	+++	-		+++	-
<i>CTW 8000 02</i>	+ -	-		-	
<i>CTLB 400 05</i>	+ -	-		++	-
<i>CTR2A 400 12</i>	-			-	
<i>ASIII I 400 05</i>	+++	-		++	-

CTW 8000 04

+++	+++	-	-	
-----	-----	---	---	--

Tabella 24. Risultati dell'analisi di MIC per arsenito ed arsenato riferiti agli isolati ottenuti dal sito 1. Le caselle verdi indicano il valore di MIC. La crescita degli isolati viene contrassegnata nel seguente modo +++ (crescita ottimale), ++ (buona crescita), +- (poca crescita), - (crescita inibita).

	AsIII	AsIII	AsIII	AsV	AsV
	5 mM	10 mM	20 mM	50 mM	130 mM
<i>ASIII F1</i>	+++	-		-	
<i>ASIII M2</i>	+++	++	-	+++	-
<i>ASIII N</i>	+++	-		-	
<i>ASIII O</i>	+++	++	-	+	-
<i>ASV B</i>	-			+	-
<i>ASV C</i>	+++	-		+++	-
<i>ASIII H</i>	-			++	-
<i>ASV I 1 (A)</i>	-			++	-
<i>ASV I 1 (B)</i>	-			++	-
<i>ASV E</i>	+++	-		+	-
<i>ASV L</i>	++	-		++	-
<i>ASV K (A)</i>	+	-		-	
<i>ASV K (B)</i>	+++	-		-	
<i>ASV M3</i>	+++	-		-	
<i>ASIII F2</i>	+++	-		++	-
<i>ASIII F</i>	++	-		++	-
<i>ASIII I</i>	+++	-		-	
<i>ASV H</i>	+++	+-	-	-	
<i>ASV 18 GR</i>	+++	+-	-	+++	-
<i>ASIII G</i>	+++	+-	-	-	
<i>ASV A</i>	+++	-		-	
<i>ASV 18 PK2</i>	++	-		++	-
<i>ASV A1</i>	+++	-		++	-

Tabella 25. Risultati dell'analisi di MIC per arsenito ed arsenato riferiti agli isolati ottenuti dal sito 2. Le

caselle verdi indicano il valore di MIC. La crescita degli isolati viene contrassegnata nel seguente modo +++ (crescita ottimale), ++ (buona crescita), +- (poca crescita), - (crescita inibita)

4.3 Analisi dei tratti di promozione della crescita delle piante (PGP) sui ceppi batterici in studio

La possibilità di sfruttare ceppi batterici con tratti promotori della crescita della piante come inoculi microbici per applicazioni nei contesti del fitorimedio, è di grande interesse per la bonifica biologica di suoli inquinati da metalli. Questi microrganismi oltre a promuovere la crescita delle piante agevolando l'assorbimento di alcuni nutrienti, possono contribuire alla rimozione dei contaminanti presenti nel suolo, migliorando la capacità delle piante di tollerare ed accumulare metalli pesanti o metalloidi come l'arsenico, per esempio andando a modificare lo stato di ossidazione dei metalli influenzandone di conseguenza biodisponibilità e mobilità (Wang et al., 2022; Zhang et al., 2022).

Tutti gli isolati batterici sono stati analizzati per la presenza dei seguenti tratti di PGP (*Plant Growth Promotion*): i) ammonificazione, ii) solubilizzazione del fosfato, iii) produzione di siderofori, iv) produzione di IAA e v) attività dell'ACC-deaminasi.

4.3.1 Analisi circa la capacità di produzione dell'ammoniaca

Il processo di ammonificazione rappresenta il processo mediante il quale i batteri decompositori scindono le proteine e gli amminoacidi, liberando azoto sottoforma di ammoniaca (NH₃) o ione ammonio (NH₄⁺).

Diverse ricerche hanno confermato che molti rizobatteri (batteri presenti nella rizosfera) producono ammoniaca tramite il catabolismo delle proteine, rappresentando un processo importante per la fertilità del suolo, portando alla mineralizzazione dei residui organici in molecole di ammonio, diventando una fonte di azoto disponibile per le piante. I batteri produttori di ammoniaca, possono agire come biofertilizzanti in suoli impoveriti come quelli contaminati da metalli pesanti (Abdelwahed et al., 2022).

Il test è stato condotto in modo qualitativo, in duplicato, valutando la produzione di

ammoniaca in acqua peptonata dopo un periodo di incubazione di 5 giorni a 27 °C, al trascorrere dei quali è stato verificato un cambiamento di colore a seguito dell'aggiunta del reagente di Nessler.

Il reagente di Nessler è composto da una soluzione alcalina contenente ioduro di potassio e mercurio, quest'ultimo reagendo con l'ammoniaca prodotta e presente in soluzione, forma un complesso colorato che può variare da giallo a marrone, a seconda della concentrazione presente. Il cambiamento di colore rappresenta quindi un indicatore visivo della presenza di ammoniaca, associata alla capacità dei batteri di produrla a partire da peptone presente nel mezzo (Utomo et al., 2023; Abdelwahed et al., 2022).

Nella figura 16, è riportato l'esempio di due ceppi: ASIII I 500 05 risultato positivo al test con conseguente produzione di colore marrone, e CTW 400 06, che al contrario non riporta alcuna variazione di colore, indice di un risultato negativo al test.

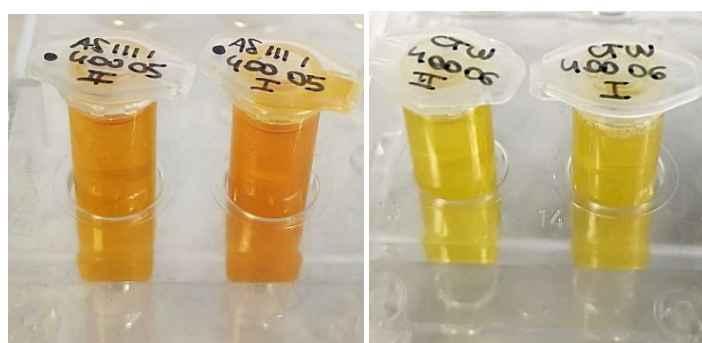


Figura 16. Test per la rilevazione della produzione di ammoniaca.

Di seguito (Tab. 26 e Tab. 27) vengono riportati i risultati qualitativi del test, per il quale vengono assegnati i valori di + (esito positivo), - (esito negativo) e + - indicativo di una leggera variazione nel colore. In verde sono evidenziati i ceppi risultati positivi al test.

<i>ISOLATI</i>	<i>RISULTATI</i>
<i>CTR2A 400 02</i>	-
<i>CTR2A 400 04 BIS</i>	++
<i>CT TSA 400 01</i>	-

<i>CT R2A 400 01</i>	+
<i>CT R2A 400 08</i>	++
<i>CTLB 400 06</i>	++
<i>CT R2A 400 13</i>	-
<i>CT R2A 400 15</i>	-
<i>CT R2A 400 04</i>	-
<i>CT R2A 400 13 BIS</i>	++
<i>CT R2A 400 14 BIS</i>	-
<i>ASIII I 400 04</i>	-
<i>ASV I 400 05</i>	+
<i>ASIII I 400 01</i>	+ -
<i>ASIII I B 400 02</i>	+ -
<i>ASV I 400 09</i>	++
<i>ASV I 400 10</i>	-
<i>CTN 400 05 BIS</i>	-
<i>ASV I 400 08</i>	++
<i>ASV I 400 03 (a)</i>	+
<i>ASV I 400 03 (b)</i>	++
<i>ASIII I 400 03</i>	++
<i>CTW 400 06</i>	-
<i>CT R2A 400 09</i>	++
<i>ASIII I B 400 03</i>	++
<i>ASV I 400 04 BIS</i>	+
<i>CTW 8000 03</i>	-
<i>CTW 400 03</i>	++
<i>CTLB 400 02</i>	+
<i>CTLB 400 03 G</i>	-
<i>CTW 8000 02</i>	-
<i>CTLB 400 05</i>	+ -
<i>CT R2A 400 12</i>	++
<i>ASIII I 400 05</i>	++
<i>CTW 8000 04</i>	++

Tabella 26. Risultati qualitativi per il test di produzione dell'ammoniaca riferiti ai ceppi isolati dal Sito 1.

Le caselle di colore verde indicano i ceppi risultati positivi al test. ++ (ottima produzione ammoniacca), + (buona produzione ammoniacca), +- (scarsa produzione ammoniacca), - (nessuna produzione di ammoniacca)

<i>ISOLATI</i>	<i>RISULTATI</i>
<i>ASIII F1</i>	++
<i>ASIII M2</i>	+
<i>ASIII N</i>	-
<i>ASIII O</i>	++
<i>ASV B</i>	-
<i>ASV C</i>	++
<i>ASIII H</i>	-
<i>ASV I 1(A)</i>	+
<i>ASV I 1(B)</i>	-
<i>ASV E</i>	-
<i>ASV L</i>	++
<i>ASV K (A)</i>	+ -
<i>ASV K (B)</i>	-
<i>ASV M3</i>	++
<i>ASIII F2</i>	++
<i>ASIII F</i>	++
<i>ASIII I</i>	++
<i>ASV H</i>	++
<i>ASV 18 GR</i>	++
<i>ASIII G</i>	++
<i>ASV A</i>	-
<i>ASV 18 PK2</i>	-
<i>ASV A 1</i>	-

Tabella 27. Risultati del test per la produzione di ammoniacca riferiti ai ceppi isolati dal sito 2.

Le caselle di colore verde indicano i ceppi risultati positivi al test. ++ (ottima produzione ammoniacca), + (buona produzione ammoniacca), +- (scarsa produzione ammoniacca), - (nessuna produzione di ammoniacca)

Relativamente al sito 1, i risultati più significativi si riscontrano in 14 ceppi batterici su 35 testati. Per quanto riguarda il sito 2, 13 ceppi su 23 sono risultati positivi al

test. Considerando entrambi i siti, dai risultati ottenuti emerge chiaramente che circa il 50% degli isolati batterici manifesta caratteristiche per la produzione di ammoniaca.

4.3.2 Determinazione della capacità di solubilizzare il fosforo

Il fosforo costituisce un nutriente essenziale per le piante, tuttavia è spesso presente nel suolo in forma insolubile, limitando la sua disponibilità per le specie vegetali. Pertanto, valutare la capacità dei batteri di solubilizzare il fosfato, può fornire informazioni utili a migliorare la capacità di assorbimento dei nutrienti da parte delle piante, favorendone la crescita (Bhattacharyya e Jha, 2012; Sharma et al., 2013).

Per valutare la capacità dei batteri di solubilizzare il fosfato, il test è stato effettuato considerando due diversi terreni di coltura (PVK e NBRIP), entrambi in combinazione con due fonti di fosfato inorganico quali CaHPO_4 e $\text{Ca}_3(\text{HPO}_4)_2$. I risultati sono stati osservati dopo 10 giorni di incubazione delle piastre, e in una seconda fase è stata eseguita un'analisi semi-quantitativa, basata sulla misurazione dello spessore dell'alone formatosi intorno alla colonia, indice dell'avvenuta solubilizzazione.

Il test è stato condotto in duplicato, analizzando per ciascun isolato le due diverse forme di fosfato inorganico, associate a ciascuno dei due terreni.

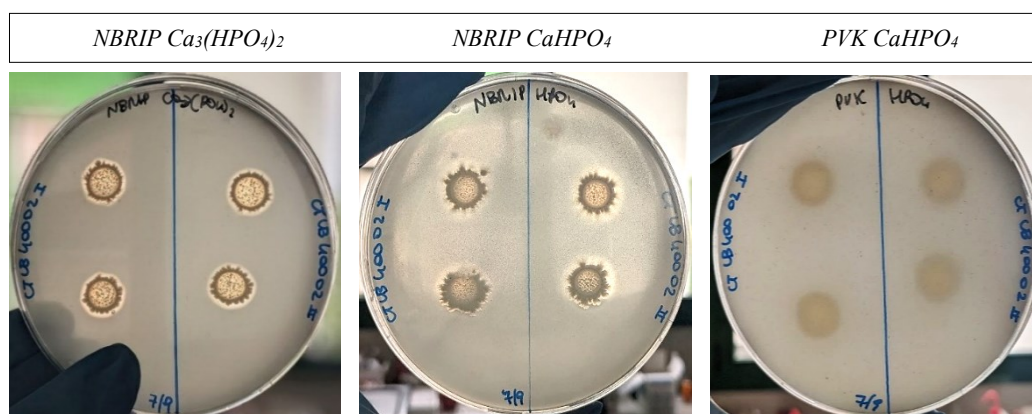


Figura 17. Test solubilizzazione fosfato inorganico per CTLB 400 02, terreni NBRIP e PVK con fonti di CaHPO_4 e $\text{Ca}_3(\text{HPO}_4)_2$

Nella figura 17, si può osservare il caso di CTLB 400 02, in grado di solubilizzare

due fonti di fosfato inorganico differenti, in presenza del terreno NBRIP. Non è riscontrabile lo stesso risultato nel mezzo PVK, dove si osservano risultati negativi per entrambe le forme di fosfato, manifestandosi opaco e privo di alone intorno alla colonia, indicativo del fatto che non è stato in grado di solubilizzare il fosfato in quel mezzo.

Nella Tabella 28 e 29, vengono riportati i risultati relativi al test. La formazione dell'alone intorno alla colonia è stata contrassegnata con un + (esito positivo) e con un - (esito negativo), in base alla capacità dei ceppi di solubilizzare il fosfato. Al fine di un'analisi qualitativa più dettagliata, è stato inoltre misurato e riportato nella tabella lo spessore dell'alone formatosi intorno alla colonia.

CEPPI	NBRIP	NBRIP	PVK	PVK
	CaHPO ₄	Ca ₃ (PO ₄) ₂	CaHPO ₄	Ca ₃ (PO ₄) ₂
<i>CTR2A400 02</i>	-	+ - (0,5mm)	-	-
<i>CTR2A 400 04 BIS</i>	-	+ - (0,5 mm)	-	-
<i>CT TSA 400 01</i>	+ (1 mm)	+ - (0,5 mm)	-	+ (1 mm)
<i>CTR2A 400 01</i>	+ (1 mm)	+ (1,5 mm)	+ (1,5 mm)	+ (1,5 mm)
<i>CTR2A 400 08</i>	-	+ (1 mm)	-	+ (1,5 mm)
<i>CTLB 400 06</i>	-	++ (2 mm)	-	+ (1,5 mm)
<i>CTR2A 400 13</i>	-	+ - (1 mm)	-	-
<i>CTR2A 400 15</i>	-	+ - (1 mm)	-	-
<i>CTR2A 400 04</i>	-	-	-	-
<i>CTR2A 400 13 BIS</i>	-	+ - (0,5 mm)	-	-
<i>CTR2A 400 14 BIS</i>	-	-	-	-
<i>ASIII I 400 04</i>	+ (1 mm)	+ (1 mm)	-	-
<i>ASVI I 400 05</i>	+ - (1 mm)	+ - (1 mm)	-	-
<i>ASIII I 400 01</i>	+ (1 mm)	+ (1,5 mm)	-	-
<i>ASIII I B 400 02</i>	-	-	-	-
<i>ASVI I 400 09</i>	-	-	-	-
<i>ASVI I 400 10</i>	-	-	-	-

<i>CTN 400 05 BIS</i>	-	-	-	-
<i>ASVI 400 08</i>	+ (1,5 mm)	+ (1 mm)	-	-
<i>ASVI 400 03 (a)</i>	-	+ (1 mm)	-	-
<i>ASVI 400 03 (b)</i>	-	++ (3 mm)	-	-
<i>ASIII 400 03</i>	+ (1 mm)	+ (2 mm)	-	-
<i>CTW 400 06</i>	+ - (1 mm)	+ (1 mm)	-	-
<i>CTR2A 400 09</i>	++ (2,5 mm)	++ (2,5 mm)	-	+ (1,5 mm)
<i>ASIII B 400 03</i>	-	-	-	-
<i>ASVI 400 04 BIS</i>	-	+ (1 mm)	-	-
<i>CTW 8000 03</i>	-	-	-	-
<i>CTW 400 03</i>	-	+ (2 mm)	-	+ (0,5 mm)
<i>CTLB 400 02</i>	+ (3 mm)	+ (2 mm)	-	-
<i>CTLB 400 03 G</i>	-	-	-	+ - (0,5 mm)
<i>CTW 8000 02</i>	-	-	-	-
<i>CTLB 400 05</i>	-	+ (1,5 mm)	-	+ (1 mm)
<i>CTR2A 400 12</i>	-	-	-	-
<i>ASIII 400 05</i>	-	-	-	-
<i>CTW 8000 04</i>	-	-	-	-

Tabella 28. Esito del test per la solubilizzazione del fosfato e misurazione dello spessore dell'alone di solubilizzazione, riferito a ceppi isolati dal sito 1. Evidenziati in verde i ceppi con esito positivo. ++/+ (buona capacità di solubilizzare il fosfato), + - (scarsa capacità di solubilizzare il fosfato), - (nessuna capacità di solubilizzare il fosfato)

CEPPI	NBRIP	NBRIP	PVK	PVK
	CaHPO₄	Ca₃(PO₄)₂	CaHPO₄	Ca₃(PO₄)₂
<i>ASIII F1</i>	-	-	-	-
<i>ASIII M2</i>	++ (2 mm)	+ (1 mm)	-	-
<i>ASIII N</i>	+ (1 mm)	-	-	-
<i>ASIII O</i>	-	-	-	-
<i>ASV B</i>	-	-	-	-
<i>ASV C</i>	+ (2 mm)	+ - (1 mm)	-	-

<i>ASIII H</i>	-	-	-	-
<i>ASVI I(A)</i>	-	-	+ -(1,5 mm)	+ (2 mm)
<i>ASVI I(B)</i>	+ - (1 mm)	++ (1,5 mm)	+ - (0,5 mm)	++ (1 mm)
<i>ASV E</i>	-	-	-	-
<i>ASV L</i>	-	-	-	-
<i>ASV K (A)</i>	-	-	-	-
<i>ASV K (B)</i>	-	-	-	-
<i>ASV M3</i>	-	-	-	-
<i>ASIII F2</i>	-	+ (1 mm)	-	-
<i>ASIII F</i>	-	+ (1 mm)	-	-
<i>ASIII I</i>	++ (3 mm)	++ (2,5 mm)	-	-
<i>ASV H</i>	-	-	-	-
<i>ASV 18 GR</i>	-	+ (1 mm)	-	+ (1 mm)
<i>ASIII G</i>	-	-	-	-
<i>ASV A</i>	-	-	-	-
<i>ASV 18 PK2</i>	-	-	-	-
<i>ASV A 1</i>	-	+ (1 mm)	-	+ - (0,5 mm)

Tabella 29. Esito del test per la solubilizzazione del fosfato e misurazione dello spessore dell'alone di solubilizzazione, riferito a ceppi isolati dal sito 2. Evidenziati in verde i ceppi con esito positivo. ++/+ (buona capacità di solubilizzare il fosfato), +- (scarsa capacità di solubilizzare il fosfato), - (nessuna capacità di solubilizzare il fosfato)

Dai dati ottenuti si riscontrano ceppi ottenuti sia dal sito 1 che dal sito 2 con caratteristiche associate al tratto di interesse. Nello specifico, risultati ottimali si riscontrano in 15 ceppi del sito 1 e 10 ceppi del sito 2, i quali manifestano buoni risultati nei confronti del terreno NBRIP, con la capacità di solubilizzare entrambe le fonti di fosfato inorganico; ne sono un esempio CT R2A 400 09, ASIII I 400 03, ASVI 400 08, ASIII I 400 01, ASIII I, ASV C, ASIII I 400 04, ASIII M2.

Questa preferenza per il mezzo NBRIP potrebbe essere associata alla capacità dei ceppi di prosperare in un determinato terreno rispetto all'altro, influenzati dalle componenti costituenti il terreno stesso.

Tra i diversi ceppi, solamente ASV II (B) e CTR2A400 01 hanno dimostrato di essere in grado di solubilizzare entrambe le forme inorganiche di fosfato, nei due

differenti terreni.

Considerando i risultati dell'analisi semi-quantitativa, lo spessore dell'alone intorno alla colonia batterica è un indicatore visivo della capacità del ceppo di solubilizzare il fosfato. Un alone con spessore maggiore, indica che il ceppo in questione ha maggiori capacità di solubilizzare il fosfato rispetto ad un ceppo che presenta un alone più sottile o assente.

Risultati significativi si riscontrano per CTR2A400 09, CTLB 400 02, ASVI 400 03 (B), CTLB 400 06, ASIII I 400 03 e ASII I 400 01, ASIII I, ASIII M2, ASV C e ASVI 1(A) i quali riportano valori più alti nello spessore nell'alone.

4.3.3 Determinazione della produzione di siderofori

I siderofori sono composti a basso peso molecolare che possono essere prodotti da diversi microorganismi, tra cui i batteri (Timofeeva et al., 2022). Questi composti svolgono un ruolo fondamentale nella mobilizzazione e nell'assorbimento del ferro, nutriente essenziale per le piante, nonché nella gestione della disponibilità di altri metalli. La capacità di legare altri metalli oltre al ferro, ha implicazioni significative anche nella fitoestrazione dei contaminanti presenti nel suolo, consentendo la riduzione dei loro effetti dannosi sulle piante.

Per verificare la presenza di questo tratto nei batteri, è stata condotta un'analisi di tipo qualitativo, utilizzando il terreno O-CAS (Ovarlaid-Chrome Azurol S) addizionato a piastre con colture batteriche cresciute precedentemente. In seguito, per un'analisi semi-quantitativa, la produzione di siderofori è stata stimata sulla base delle dimensioni dell'alone formatosi attorno alla colonia su terreno CAS.

La rilevazione dell'alone colorato in ceppi batterici produttori di siderofori avviene per mezzo della formazione del complesso ternario CAS/Ferro III/CTAB il quale funge da indicatore nel test. In questo processo, si verifica competizione per l'assorbimento del ferro tra il sideroforo prodotto dai batteri e il colorante CAS. La presenza di un chelante forte come il sideroforo consente la rimozione del ferro dal colorante (CAS), consentendo la manifestazione del colore che si può riscontrare come un alone colorato intorno alle colonie batteriche. Il colore può variare dal blu al viola, all'arancione, indicativo di una differente tipologia di siderofori prodotta

(Yu et al., 2011).

Per uno screening dei batteri produttori di siderofori, il test è stato condotto in duplicato. La produzione dei siderofori è stata successivamente stimata mediante misurazione dello spessore dell'alone formatosi intorno alla colonia.

In figura 18, viene riportato come esempio ASV B, uno dei ceppi batterici risultati positivi al test, il quale ha manifestato un alone di colore blu/azzurro, confrontato con il ceppo CTW 8000 02, invece risultato negativo al test in quanto privo di formazione dell'alone intorno alle colonie.

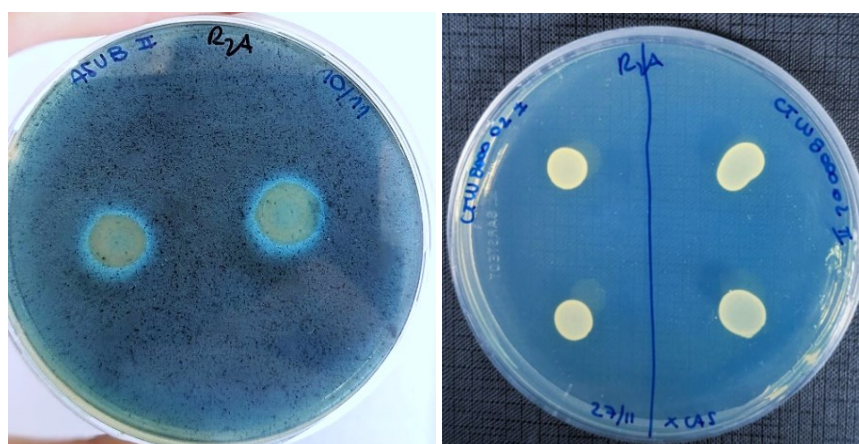


Figura 18. Rilevazione produzione siderofori su terreno O-CAS. Ceppo ASV B positivo al test confrontato con ceppo CTW 8000 02 negativo al test. La comparsa dell'alone intorno alla colonia è indicativo della produzione dei siderofori.

Di seguito sono riportati i risultati dell'analisi qualitativa e semi-quantitativa dei ceppi risultati positivi al test (Tab. 30 e Tab. 31).

<i>CEPPI</i>		<i>Alone (mm)</i>
<i>CTR2A 400 02</i>	+ -	0,5 mm
<i>ASIII I 400 04</i>	++	1 mm
<i>ASIII I 400 01</i>	+	0,5 mm
<i>CTN 400 05 BIS</i>	+	0,5 mm

Tabella 30. Esiti positivi al test produzione dei siderofori per gli isolati appartenenti al sito 1, con misurazione in mm dell'alone formatosi intorno alla colonia. Evidenziati in verde i risultati più significativi

<i>CEPPI</i>		<i>Alone (mm)</i>
<i>ASIII O</i>	+	1 mm
<i>ASV B</i>	++	2,5 mm

<i>ASIII H</i>	++	2 mm
ASV E	+	2 mm

Tabella 31. Esiti positivi al test produzione dei siderofori per gli isolati appartenenti al sito 2, con misurazione in mm dell'alone formatosi intorno alla colonia.
Evidenziati in verde i risultati più significativi

Dalle analisi condotte, la produzione di siderofori è emersa in particolar modo in 8 ceppi, con risultati particolarmente promettenti soprattutto per gli isolati del sito 2, dove è stato riscontrato un alone evidente rispetto agli isolati del sito 1.

Dai risultati ottenuti è stata riscontrata una presenza limitata di ceppi batterici produttori di siderofori, nonostante sia un tratto diffuso tra i batteri (Braud et al., 2010). Nello specifico, gli isolati in esame non provengono dalla rizosfera (dove questo tratto svolge un ruolo fondamentale per la competizione dei nutrienti), ma rappresentano una variegata selezione di isolati provenienti dal suolo.

La rizosfera infatti rappresenta una zona altamente influenzata dalle interazioni pianta-batterio, zona caratterizzata da una maggiore concentrazione di sostanze nutritive ed esudati radicali rispetto al suolo circostante; proprio per questo motivo è ragionevole aspettarsi che i ceppi batterici presenti a livello della rizosfera, siano più propensi a produrre siderofori come strategia adattativa per ottenere nutrienti essenziali come il ferro. Questa potrebbe essere una delle ipotesi che potrebbero spiegare la mancata diffusione di questo tratto nei ceppi analizzati in questo studio, in quanto i campioni analizzati, provenienti da altre aree del suolo, potrebbero utilizzare strategie metaboliche alternative per garantirsi nutrienti come il ferro. Un'ulteriore spiegazione sarebbe da ricercare nella composizione genetica dei batteri e nel loro metabolismo, in quanto alcuni potrebbero semplicemente non produrre siderofori.

4.3.4 Valutazione della produzione di acido indolacetico (IAA)

La produzione di acido indolacetico (IAA) da parte dei batteri riveste un ruolo importante come tratto PGP. L'IAA è un fitormone chiave coinvolto nella regolazione della crescita e nello sviluppo delle piante, influenzando processi come l'allungamento e la divisione cellulare (Khiangam et al., 2023).

La presenza di batteri in grado di sintetizzare IAA, può contribuire stimolando la crescita delle piante, favorendo di conseguenza l'assorbimento dei nutrienti e contribuendo inoltre alla difesa della pianta stessa.

Per determinare la produzione di IAA da parte dei batteri, è stato impiegato il reagente di Salkowski, addizionato alla coltura batterica cresciuta in presenza di triptofano, precursore della sintesi di IAA. La produzione di IAA è stata esaminata a due intervalli di tempo: a 48 e 120 ore di incubazione, al termine dei quali, il test viene considerato positivo allo sviluppo del colore rosa nel mezzo (a seguito dell'aggiunta del reagente di Salkowski), indicativo della presenza dell'acido indolacetico prodotto dai batteri. Infatti, il reagente di Salkowski (miscela di FeCl_3 e H_2SO_4), reagendo con l'acido indolacetico presente nel mezzo, produce una colorazione rosa a seguito della formazione del complesso di IAA con riduzione di Fe^{3+} (Kamnev et al., 2001).

Per un'analisi qualitativa, l'intensità del colore è stata valutata su una scala da 1 a 4, intensità proporzionale alla quantità di IAA prodotto dai batteri, presente in soluzione (Ahmad et al., 2006).

Dalla figura 19, riportata a titolo esemplificativo, si evince un cambiamento di intensità di colore di ASVI400 04 BIS maggiore dopo 120 h di incubazione rispetto alle 48 h di incubazione; indicativo di una maggiore produzione di IAA al trascorrere delle 120 h. In figura 19, vengono riportati il tubino al quale è stato aggiunto il reagente di Salkowski per rilevare la presenza di IAA (IAA 48h e IAA 120h), comparati con i tubini della coltura batterica senza aggiunta del reagente di Salkowski.

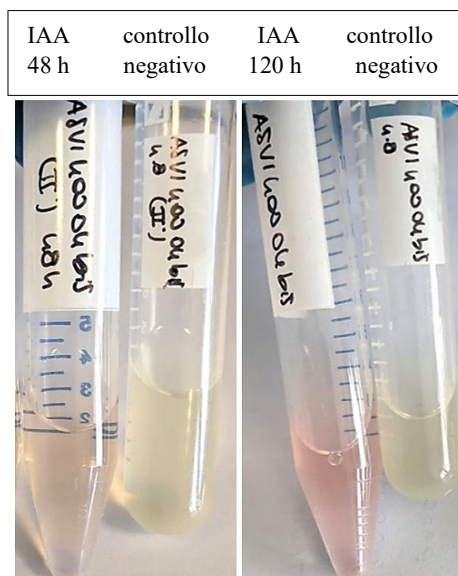


Figura 19. Saggio quantitativo per determinazione presenza di IAA. ASVI 400 04 BIS a 48 h e 120 h a seguito di aggiunta del reagente di Salkowski

Nella Tab. 32 e Tab. 33, sono riportati i risultati dell'analisi qualitativa. I ceppi che manifestano una leggera tonalità di rosa, poco evidente, sono stati contrassegnati con il simbolo + - .

<i>CEPPI</i>	<i>48 h</i>	<i>120 h</i>
<i>CTR2A400 02</i>	3	4
<i>CT R2A 400 04 BIS</i>	2	3
<i>CT TSA 400 01</i>	-	+ -
<i>CT R2A 400 01</i>	-	-
<i>CT R2A 400 08</i>	-	-
<i>CTLB 400 06</i>	-	-
<i>CT R2A 400 13</i>	2	2
<i>CT R2A 400 15</i>	2	2
<i>CT R2A 400 04</i>	2	3
<i>CT R2A 400 13 BIS</i>	2	2
<i>CT R2A 400 14 BIS</i>	2	3
<i>ASIII I 400 04</i>	2	2
<i>ASV I 400 05</i>	2	+ -

<i>ASIII I 400 01</i>	-	1
<i>ASIII I B 400 02</i>	2	+ -
<i>ASV I 400 09</i>	1	2
<i>ASV I 400 10</i>	1	1
<i>CTN 400 05 BIS</i>	1	1
<i>ASV I 400 08</i>	-	1
<i>ASV I 400 03 (a)</i>	-	1
<i>ASV I 400 03 (b)</i>	-	1
<i>ASIII I 400 03</i>	+ -	2
<i>CTW 400 06</i>	-	-
<i>CTR2A 400 09</i>	-	-
<i>ASIII I B 400 03</i>	-	+ -
<i>ASV I 400 04 BIS</i>	2	3
<i>CTW 8000 03</i>	1	2
<i>CTW 400 03</i>	-	1
<i>CTLB 400 02</i>	-	1
<i>CTLB 400 03 G</i>	-	-
<i>CTW 8000 02</i>	-	2
<i>CTLB 400 05</i>	-	1
<i>CTR2A 400 12</i>	2	3
<i>ASIII I 400 05</i>	-	1
<i>CTW 8000 04</i>	-	-

Tabella 32. Esito dell'analisi qualitativa per la produzione di IAA a 48 h e 120 h, per gli isolati appartenenti al sito 1. L'intensità del colore rosa prodotto è stata valutata su una scala da 1 (bassa produzione di IAA) a 4 (alta produzione di IAA). – isolati che hanno dato esito negativo e + - ceppi con scarsa capacità di produrre IAA

CEPPI	48 h	120 h
<i>ASIII F1</i>	-	-
<i>ASIII M2</i>	+ -	+ -
<i>ASIII N</i>	-	-
<i>ASIII O</i>	1	1
<i>ASV B</i>	1	+ -

<i>ASV C</i>	1	3
<i>ASIII H</i>	1	1
<i>ASV I 1(A)</i>	1	2
<i>ASV I 1(B)</i>	-	1
<i>ASV E</i>	-	-
<i>ASV L</i>	1	+ -
<i>ASV K (A)</i>	+ -	1
<i>ASV K (B)</i>	1	1
<i>ASV M3</i>	-	1
<i>ASIII F2</i>	-	-
<i>ASIII F</i>	-	-
<i>ASIII I</i>	1	2
<i>ASV H</i>	-	+ -
<i>ASV 18 GR</i>	-	-
<i>ASIII G</i>	-	-
<i>ASV A</i>	-	-
<i>ASV 18 PK2</i>	-	-
<i>ASV A 1</i>	-	-

Tabella 33. Esito dell'analisi qualitativa per la produzione di IAA a 48 h e 120 h, per gli isolati appartenenti al sito 2. L'intensità del colore rosa prodotto è stata valutata su una scala da 1 (bassa produzione di IAA) a 4 (alta produzione di IAA). – isolati che hanno dato esito negativo e + - ceppi con scarsa capacità di produrre IAA

Da questi risultati è stata riscontrata la capacità di produrre IAA in più del 50% dei ceppi appartenenti al sito 1 (26 ceppi) e al 50% dei ceppi appartenenti al sito 2 (11 ceppi). Gli isolati manifestano il tratto in forme diverse, infatti alcuni ceppi producono IAA a 48 h, mentre altri solamente a 120 h. È possibile inoltre riscontrare anche la presenza di ceppi che al trascorrere delle 120 h, hanno un calo di produzione di IAA ed altri ceppi che non ne producono a nessuno dei due intervalli testati. Una spiegazione all'assenza di produzione di IAA in alcuni ceppi potrebbe essere attribuibile a differenti fattori, tra cui la possibilità che alcuni di questi ceppi utilizzino vie metaboliche alternative indipendenti dal triptofano, che alcune condizioni sperimentali non siano ottimali per stimolare la produzione di IAA o che alcuni ceppi non ne producano proprio.

Analisi quantitativa

Successivamente, sulla base dei risultati qualitativi ottenuti si è proceduto alla determinazione della concentrazione di IAA prodotta dai ceppi batterici risultati positivi al test.

L'intensità del colore, indicativa della presenza di IAA, ha permesso di quantificare la concentrazione del fitormone per mezzo di misurazione spettrofotometrica. E' stata quindi misurata l'assorbanza ad una lunghezza d'onda specifica, a 530 nm, dove l'IAA assorbe. La concentrazione di IAA prodotta da ciascun isolato a 48 h e 120 h, è stata ricavata sulla base di una retta di taratura a concentrazioni note di IAA; le assorbanze ottenute dalla misurazione spettrofotometrica sono state inserite nella funzione ricavata dalla linea di calibrazione. E' stato quindi creato un istogramma per comparare i risultati ottenuti (Fig. 20).

Quindici sono i ceppi utilizzati per questa analisi, i cui risultati sono riportati in Fig. 20: CT R2A 400 04 , CT R2A400 02, CT R2A 400 15, CT R2A 400 04 BIS, CT R2A 400 13, CT R2A 400 12, CTW 8000 02, ASVI 400 04 BIS, ASIII I 400 04, CTR2A 400 14 BIS, CTR2A 400 13 BIS, CTW 8000 03, ASV C, ASIII I, ASVI 1 (b).

I risultati (Fig. 20) mostrano un aumento nella produzione di IAA dopo 120 h di incubazione per tutti i ceppi analizzati. Questo dato suggerisce una progressiva sintesi di IAA da parte dei batteri, probabilmente correlata direttamente alla crescita batterica degli stessi, osservazione perfettamente in linea con quanto osservato nell'analisi qualitativa. Ciononostante, alcune differenze si possono riscontrare in alcuni campioni che non mostravano significativa produzione a 120 h rispetto alle 48 h (CTR2A400 15, CTR2A 40013, CTR2A400 13BIS), così come alcuni ceppi

non manifestano produzione di IAA a 48 h come invece si riscontrava dall'analisi qualitativa, ne è un esempio il ceppo CTR2A 400 04.

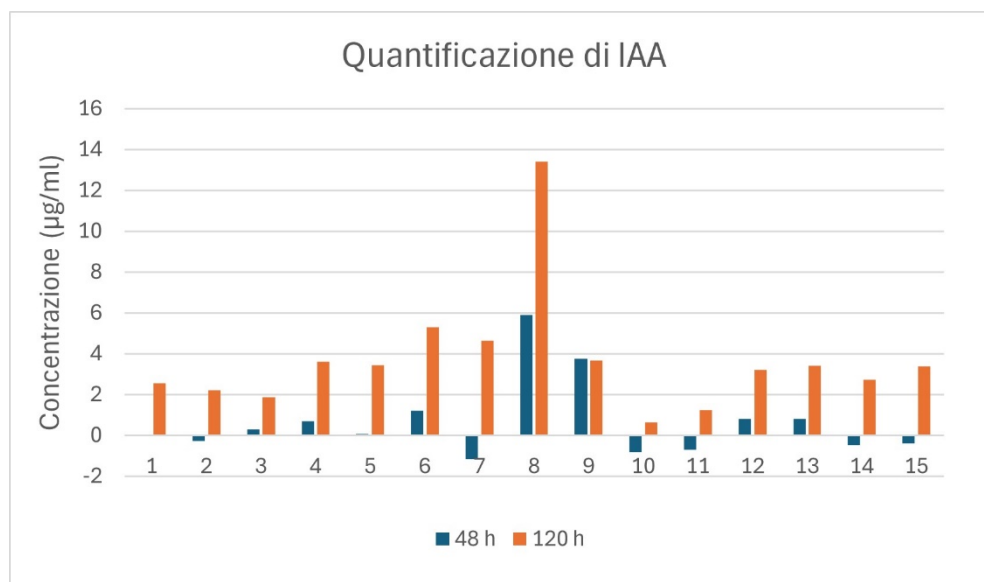


Figura 30. Quantificazione di IAA a 48 h (in blu) e 120 h (in arancione) per 15 ceppi selezionati: **1)** CTR2A 400 04, **2)** CTR2A 400 02, **3)** CT R2A 400 15, **4)** CTR2A 400 04 BIS, **5)** CT R2A 400 13, **6)** CT R2A 400 12, **7)** CTW 8000 02, **8)** ASVI 400 04 BIS, **9)** ASIII I 400 04, **10)** CT R2A 400 14 BIS, **11)** CTR2A 400 13 BIS, **12)** CTW 8000 03, **13)** ASV C, **14)** ASIII I, **15)** ASV I 1 (B)

4.3.5 Determinazione della presenza di attività di ACC deaminasi

Le specie vegetali sono frequentemente soggette a stress ambientali, (biotici e abiotici), come anche la presenza di metalli pesanti, i quali possono alterare la fisiologia e la biochimica delle piante. Lo stress indotto può accelerare la produzione di etilene, ormone associato allo stress, il quale può agire inibendo la crescita vegetale (Shahid et al., 2023). In questo contesto, svolge un ruolo fondamentale la presenza di batteri con attività di ACC deaminasi, i quali contribuiscono ad abbassare i livelli di etilene, idrolizzando il suo precursore ACC, in ammoniaca e alfa-chetobutirrato (Mosqueda et al., 2020).

La presenza di attività di ACC deaminasi è stata determinata confrontando la crescita degli isolati batterici in un mezzo di crescita minimo DF addizionato di ACC come unica fonte di N, a fronte di un controllo positivo in cui il medesimo ceppo veniva fatto crescere in presenza di DF addizionato con solfato di ammonio.

Il controllo negativo era invece costituito dalla prova condotta in presenza di DF privo di qualsiasi fonte di azoto.

Il test è stato condotto in duplicato, in tubini contenenti 5 ml di mezzo di crescita, incubati a 27 °C per 10 giorni. Il risultato del test è stato considerato positivo quando si è osservata la comparsa di torbidità nei tubini di coltura DF addizionati di ACC. Questa torbidità è indicativa della presenza di crescita batterica e dimostra la capacità dei ceppi di deaminare l'ACC producendo NH₃, utilizzabile come fonte di azoto per la loro crescita. E' stata quindi eseguita una misurazione dell'assorbanza (OD₆₀₀) per identificare e validare la crescita batterica dei ceppi che manifestavano torbidità.

In Tab. 34, sono riportati i ceppi che hanno manifestato dei risultati positivi al test.

<i>CEPPI</i>	<i>DF + N</i>	<i>DF + ACC</i>	<i>DF</i>
<i>ASIII B 400 03</i>	0,61	0,69	0,03
<i>CTR2A 400 14 BIS</i>	0,5	0,12	0,07
<i>CTR2A 400 15</i>	1,81	0,11	0,03

Tabella 34. Esiti positivi analisi qualitativa per determinazione attività ACC deaminasi. Misurazione dell'assorbanza (OD₆₀₀). DF+N (fonte di azoto), DF + ACC, DF (controllo negativo)

Dai risultati ottenuti è possibile riscontrare crescita batterica in 3 diversi ceppi appartenenti al sito 1, con una maggiore crescita nel mezzo arricchito di ACC per il ceppo ASIII I B 400 03.

4.4 Selezione dei ceppi batterici più promettenti di interesse

Sulla base dei risultati ottenuti dalle analisi condotte circa la valutazione della resistenza all'arsenico e alla presenza di tratti di promozione della crescita delle piante, sono stati selezionati i ceppi batterici di maggiore interesse perché in possesso di più tratti funzionali.

Tra il pool di isolati batterici di partenza, sono stati quindi selezionati 44 ceppi, di cui 29 ottenuti dal sito 1 e 15 ottenuti dal sito 2 (Tab. 35).

I ceppi selezionati sono quindi stati ulteriormente caratterizzati per ottenere una preliminare identificazione tassonomica, necessaria per il loro inserimento nella collezione di biorisorse microbiche VUCC-DBT.

<i>CEPPI</i>	MIC (mM)		IAA	FOSFATO		AMMONIACA	SIDEROFORI	ACC
	As III	As V	48 h, 120 h	NBRIP	PVK			
<i>CTW 400 03</i>	20 mM	130 mM	- , 1	- , +	- , +	++		
<i>CT TSA 400 01</i>	5 mM	50 mM		+ , + -	- , +			
<i>CT R2A 400 15</i>	~10 mM	50 mM	2 , 2					+
<i>ASV I 400 08</i>	10 mM	130 mM	- , 1	+ , +		++		
<i>CT R2A 400 13 BIS</i>	5 mM	130 mM	2 , 2			++		
<i>ASIII I 400 01</i>	20 mM	50 mM	- , 1	++ , +			+	
<i>CT LB 400 05</i>	~ 10 mM	130 mM	- , 1	- , +	- , +			
<i>ASV I 400 04 BIS</i>	5 mM	50 mM	2 , 3	- , +		+		
<i>ASIII I 400 03</i>	20 mM	50 mM	+ - , 2	+ , +		++		
<i>CTW 8000 04</i>	20 mM	50 mM				++		
<i>CT R2A 400 12</i>	5 mM	50 mM	2 , 3			++		
<i>CTW 8000 03</i>	10 mM	50 mM	1 , 2					
<i>CT R2A 400 02</i>	5 mM	130 mM	3 , 4				+ -	
<i>ASV I 400 03 A</i>	20 mM	50 mM	- , 1	- , +		+		
<i>CT LB 400 06</i>	5 mM	50 mM		- , ++	- , +	++		
<i>ASIII I 400 05</i>	10 mM	130 mM	- , 1			++		

<i>CTR2A 400 01</i>	5 mM	130 mM		+,+	+, +	+		
<i>CTLB 400 02</i>	5 mM	130 mM	-, 1	+,++		+		
<i>ASVI 400 09</i>	10 mM	130 mM	1, 2			++		
<i>CTR2A 400 04 BIS</i>	5 mM	130 mM	2, 3			++		
<i>ASVI 400 03 B</i>	20 mM	50 mM	-, 1	-, ++		++		
<i>CTR2A 400 08</i>	5 mM	50 mM		-,+	-,+	++		
<i>CTR2A 400 13</i>	~10 mM	50 mM	2, 2					
<i>CTR2A 400 04</i>	5 mM	130 mM	2, 3					
<i>CTR2A 400 09</i>	20 mM	130 mM		++,++	-,+	++		
<i>CTN 400 05 BIS</i>	5 mM	50 mM	1, 1				+	
<i>ASIII I 400 04</i>	5 mM	130 mM	3, 1	+,+			++	
<i>ASIII I B 400 03</i>	20 mM	50 mM				++		++
<i>CTR2A 400 14 BIS</i>	5 mM	130 mM	3, 2					+
<i>ASIII M2</i>	20 mM	130 mM		++,+		+		
<i>ASV C</i>	10 mM	130 mM	1, 3	+,+ -		++		
<i>ASIII H</i>	5 mM	130 mM	1, 1				+	
<i>ASIII F</i>	10 mM	130 mM		-,+		++		
<i>ASIII G</i>	~20 mM	50 mM				++		
<i>ASV M3</i>	10 mM	50 mM	-, 1			++		
<i>ASIII F 1</i>	10 mM	50 mM				++		

<i>ASV L</i>	10 mM	130 mM	1, 1		++		
<i>ASV B</i>	5 mM	130 mM	1, + -			+	
<i>ASV I 1 (A)</i>	5 mM	130 mM	1, 2	+ -, +	+		
<i>ASV I 1 (B)</i>	5 mM	130 mM	- , 1	+ -, ++ + -, ++			
<i>ASIII I</i>	10 mM	50 mM	1, 2	++, ++			
<i>ASV 18 GR</i>	20 mM	130 mM		-, + - , +	++		
<i>ASIII F2</i>	10 mM	130 mM		-, +	++		
<i>ASIII O</i>	20 mM	130 mM	1, 1		++	+	

Tabella 35. Selezione dei ceppi di maggior interesse (44 ceppi) e caratteristiche funzionali a loro associate. Sono riportati i valori di MIC nei confronti di *AsIII* e *AsV*; la capacità di produrre IAA ai due intervalli di tempo (48 h e 120 h) con valori da 1 a 4 in base all'intensità di colore rosa (1= poca produzione di IAA e 4= alta produzione di IAA); la capacità di solubilizzare nei due diversi terreni (NBRIP e PVK) le due diverse fonti di fosfato inorganico, nel seguente ordine (CaHPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) indicando con + (buona capacità di solubilizzare fosfato) e + - (scarsa capacità di solubilizzare fosfato); capacità di produrre ammoniaca; capacità di produrre siderofori; attività dell'ACC deaminasi.
++ (ottima capacità di produrre il tratto in esame), + (buona capacità di produrre il tratto in esame).

4.5 Analisi BOX-PCR e definizione dei profili BOX

4.5.1 Estrazione del DNA totale dalle colture batteriche

L'estrazione del DNA totale, è stata eseguita sui 44 isolati batterici che hanno manifestato i migliori risultati considerando tutti i test condotti. L'estrazione è stata eseguita utilizzando il kit di estrazione del DNA genomico, Wizard® genomic DNA purification kit (QIAGEN, Italia). Il DNA estratto è stato successivamente analizzato tramite lo strumento NanoDrop per la sua quantificazione, utilizzando 260/280 e 260/230 come rapporti di assorbanza per determinare la qualità del DNA estratto in base alla presenza di proteine o carboidrati e fenoli (Tab. 36).

<i>CEPPI</i>	<i>ng/μl</i>	<i>A 260/280</i>	<i>A 260/230</i>
<i>CTW400 03</i>	158,7	2,23	1,8
<i>CTTSA 400 01</i>	43,6	2,10	1,37
<i>CTR2A 400 15</i>	26,4	1,90	0,05
<i>ASVI 400 08</i>	70,3	2,18	1,68
<i>CTR2A400 13 BIS</i>	55,9	2,11	1,67
<i>ASIII I 400 01</i>	125,5	2,18	1,93
<i>CTLB 400 05</i>	49	2,12	1,81
<i>ASVI 400 04 BIS</i>	50,2	2,02	1,67
<i>ASIII I 400 03</i>	113,4	2,19	1,59
<i>CTW 8000 04</i>	58,2	1,55	0,57
<i>CTR2A 400 12</i>	89,2	2,04	1,79
<i>CTW 8000 03</i>	427,9	2,01	2,05
<i>CTR2A 400 02</i>	43,4	2,21	1,63
<i>ASVI I 400 03 (a)</i>	109,3	2,21	1,64
<i>CTLB400 06</i>	50	2,04	1,78
<i>ASIII I 400 05</i>	108,7	2,19	2,06
<i>CTR2A 400 01</i>	88,4	2,08	1,75
<i>CTLB 400 02</i>	22,5	2,06	1,01
<i>ASVI I 400 09</i>	45,1	2,22	1,58

<i>CTR2A400 04 BIS</i>	49,4	2,26	1,48
<i>ASVI 400 03 (b)</i>	118,1	2,22	2,03
<i>CTR2A 400 08</i>	53,6	1,97	1,72
<i>CTR2A 400 13</i>	60,1	2,15	1,30
<i>CTR2A 400 0 4</i>	42,6	1,53	1,14
<i>CTR2A 400 09</i>	56,5	2,13	1,35
<i>CTN 400 05 BIS</i>	114,2	1,99	0,95
<i>ASIII I 400 04</i>	180,2	1,93	1,70
<i>ASIII I B 400 03</i>	108,6	2,12	1,67
<i>ASIII M2</i>	57,5	1,78	1,14
<i>ASV C</i>	51,6	2,10	1,26
<i>CTR2A400 14 BIS</i>	219,9	1,66	0,66
<i>ASIII H</i>	52,2	2,12	1,36
<i>ASIII F</i>	48	2,15	1,35
<i>ASIII G</i>	54,5	2,22	1,88
<i>ASV M3</i>	88,8	2,24	2,07
<i>ASIII F1</i>	140,4	2,19	2,01
<i>ASV L</i>	147,8	2,22	2,05
<i>ASV B</i>	128,2	2,01	1,95
<i>ASVI 1(a)</i>	19,8	2,26	1,49
<i>ASVI 1(b)</i>	199,1	2,10	2,09
<i>ASIII I</i>	115	2,21	1,82
<i>ASV 18 GR</i>	129,7	2,07	1,82
<i>ASIII F2</i>	57,6	2,09	1,31
<i>ASIII O</i>	31,8	2,13	1,44

Tabella 36. Quantificazione mediante NanoDrop. Valori della concentrazione di DNA e rapporti di assorbanza A260/280 e A260/230

Sulla base dei dati raccolti, è possibile affermare che tutti i campioni presentano una concentrazione di DNA ottimale o comunque sufficiente ai fini dell'amplificazione. Relativamente ai rapporti di assorbanza, questi forniscono un'indicazione relativa alla purezza del DNA estratto. Un rapporto 260/280 viene ritenuto ottimale quando presenta valori di circa 1,8, indicando una bassa presenza

di contaminanti proteici nel campione di DNA. Al contempo, il rapporto 260/230 fornisce un'indicazione sulla possibile presenza di fenoli o carboidrati. Per questo rapporto viene ritenuto un valore ideale intorno a 2 (Desjardins e Conklin., 2010).

4.5.2 BOX-PCR

La BOX-PCR è una tecnica di tipizzazione molecolare basata sul motivo BOX, ripetuto e disperso lungo il genoma di alcuni microrganismi (Brusetti et al., 2008). L'amplificazione di queste regioni ripetute all'interno del genoma di microrganismi differenti, consente l'ottenimento di profili elettroforetici tipici di ciascun isolato microbico, costituendo quindi un fingerprinting molecolare. Questa tecnica, che è in grado di discriminare i microrganismi a livello di ceppo, è stata utilizzata per identificare all'interno del gruppo di ceppi batterici in studio, diversi profili BOX, consentendo quindi di raggruppare all'interno di un medesimo profilo quei ceppi che presentavano un profilo elettroforetico BOX uguale.

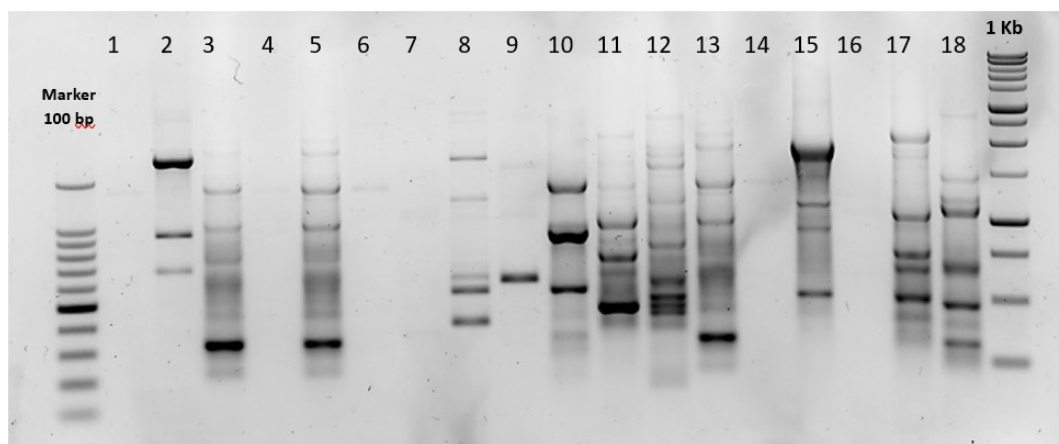


Figura 21. Profili BOX- PCR

CTW400 03, CT TSA 400 01,CTR2A400 15,ASVI 400 08,CT R2A 40013 BIS, ASIII I 400 01, CTLB 400 05, ASVI 400 04 BIS, ASIII I 400 03, CTW8000 04, CTR2A 400 12, CTW 8000 03, CT R2A 400 02, ASV I 400 03 A, CT LB 400 06, ASIII I 400 05, CT R2A 400 01, CT LB 400 02.

Dall'analisi dei risultati della BOX-PCR (Fig. 21) è stato possibile suddividere i ceppi batterici in studio in 26 profili BOX (Tab. 37).

N° PROFILO	OTU
1.	ASIII I 400 01 CTW 400 03 ASV I 400 08 ASVI 400 03 (a)
2.	CT LB 400 05 ASIII I 400 05
3.	CT TSA 400 01
4.	CT R2A 400 02 CTR2A 400 15 CT R2A 400 13 BIS CT R2A 400 04 BIS CT R2A 400 13 CT R2A 400 04 CT R2A 400 14 BIS
5.	ASV I 400 04 BIS
6.	ASIII I 400 03
7.	CTW 8000 04
8.	CT R2A 400 01 CT R2A 400 12
9.	CTW 8000 03
10.	CT LB 400 06 CT R2A 400 08
11.	ASIII H CT LB 400 02
12.	ASVI 400 03 (b) ASV I 400 09 ASIII F2 ASV M3
13.	ASV 18 GR
14.	CT R2A 400 09
15.	CTN 400 05 BIS

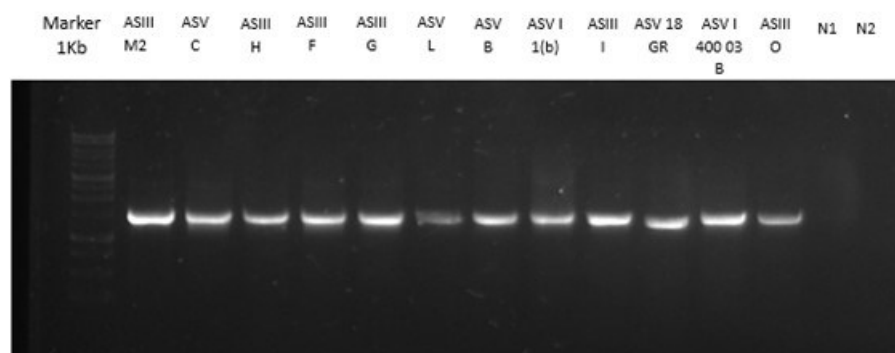
16.	ASIII I 400 04
17.	ASIII I B 400 03
18.	ASIII M2
19.	ASV C
20.	ASIII F
21.	ASIII G
22.	ASV L ASIII F1
23.	ASV B
24.	ASV I 1 (b) ASV I 1 (a)
25.	ASIII I
26.	ASIII O

Tabella 37. Esito dei risultati ottenuti dall'analisi dei profili BOX. Ceppi batterici organizzati in 26 profili BOX, in grassetto viene evidenziato il ceppo selezionato per il sequenziamento (rappresentante del profilo).

4.6 Amplificazione del gene per il 16S rRNA e identificazione tassonomica degli isolati

I ceppi scelti per ciascun profilo BOX, sono stati quindi analizzati mediante sequenziamento parziale del gene 16S rRNA. Il confronto delle sequenze del gene per il 16S rRNA è il marcatore tassonomico utilizzato per l'identificazione di isolati batterici a livello di genere e specie (Clarridge, 2004).

Vengono riportati (Fig. 22) i risultati relativi all'amplificazione del gene rRNA 16S partendo dal DNA totale estratto da ciascun ceppo in esame.



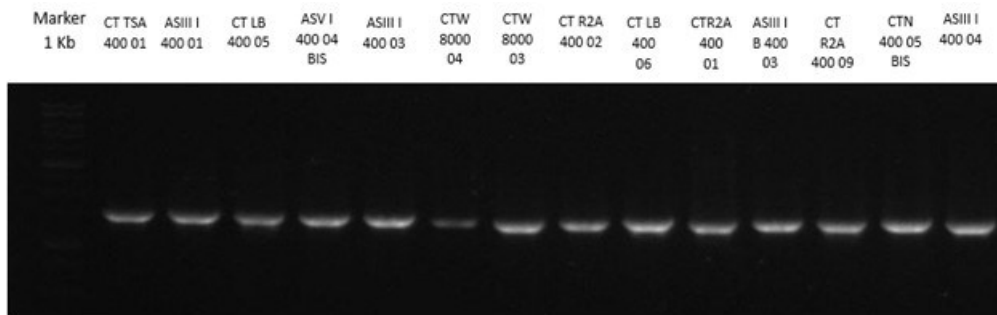


Figura 22. Analisi elettroforetica dei prodotti di PCR del gene 16S rRNA per i ceppi in studio

I risultati ottenuti a seguito della corsa elettroforetica del gene rRNA 16S, non evidenziano alcuna presenza di contaminazioni, le bande di tutti i campioni sono chiaramente visibili e posizionate alla stessa altezza, indicativamente di 1500 bp. Successivamente si è proseguito con la purificazione dei prodotti di PCR e quantificazione ai fini del sequenziamento (Tab. 38).

CAPOSTIPITI	ng/μl	A 260/280	A260/230
<i>ASIII I 400 01</i>	246,9	1,89	2,20
<i>CT LB 400 05</i>	222,8	1,89	2,17
<i>CT TSA400 01</i>	219,1	1,89	2,11
<i>CT R2A 400 02</i>	107,1	1,86	2,10
<i>ASV I 400 04 BIS</i>	201,5	1,87	2,06
<i>ASIII I 400 03</i>	127,1	1,85	1,90
<i>CTW 8000 04</i>	65,9	1,86	1,76
<i>CT R2A 400 01</i>	167,1	1,85	2,04
<i>CTW 8000 03</i>	228,8	1,85	1,99
<i>CT LB 400 06</i>	213,5	1,88	2,07
<i>.ASIII H</i>	181,2	1,88	2,07
<i>ASV I 400 03 (b)</i>	219,3	1,89	2,10
<i>ASV I 8 GR</i>	40,7	1,94	1,80
<i>CT R2A 400 09</i>	77	1,86	1,93
<i>CTN 400 05 BIS</i>	193	1,85	1,95

<i>ASIII I 400 04</i>	282,4	1,89	2,12
<i>ASIII I B 400 03</i>	219	1,88	2,10
<i>ASIII M2</i>	71	1,92	2,24
<i>ASV C</i>	219,1	1,88	2,15
<i>ASIII F</i>	220,8	1,88	2,09
<i>ASIII G</i>	209,3	1,86	1,98
<i>ASVL</i>	113,8	1,89	2,14
<i>ASV B</i>	184	1,87	2,06
<i>ASV I 1 (b)</i>	288,9	1,87	2,07
<i>ASIII I</i>	432,2	1,89	2,11
<i>ASIII O</i>	69,9	1,86	1,93

Tabella 38. Quantificazione al NanoDrop dei prodotti di PCR ottenuti per il gene 16S rRNA

I valori dei rapporti di assorbanza (A260/280 e A260/230) riscontrati dalla quantificazione, rientrano tutti nei range previsti, indicando che tutti gli ampliconi ottenuti risultano quindi di buona qualità ai fini del processo di sequenziamento. A tal fine, gli isolati sono stati diluiti per ottenere una concentrazione finale di DNA di 10 ng/μl, mediante l'apposito kit Mix2Seq (Eurofins, Italia).

I dati di sequenziamento ottenuti sono stati successivamente analizzati, affinando le singole sequenze ottenute mediante il software BioEdit Sequence Alignment Editor, per poi essere analizzate mediante l'algoritmo BLASTN in due database differenti: NCBI ed EzBioCloud (Yoon et al., 2017; Schoch et al., 2020).

In Tab. 40 e nella Fig. 23, sono riportati i risultati ottenuti dall'identificazione tassonomica e l'albero filogenetico costruito con il software MEGA 7.0, esplicitativo delle relazioni tra le diverse specie batteriche.

OTU	CEPPO	bp	NCBI		EZBIO		Tassonomia
			Taxon	Identità	Taxon	Identità	
	AsIII I 400-04	1019	<i>Brevibacillus schisleri</i> ATCC 35690(T)	99.71%	<i>Brevibacillus reutzeri</i> DSM 9887(T)	99.80 %	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacilla ceae; Brevibacillus
			<i>Brevibacillus reutzeri</i> NBRC 15719	99,71%	<i>Brevibacillus schisleri</i> ATCC 35690(T)	99.80%	
	AsV B	1019	<i>Stenotrophomonas bentonitica</i> BII-R7(T)	99.90%	<i>Stenotrophomonas bentonitica</i> BII-R7(T)	100%	Proteobacteria; Gamma- proteobacteria; Lysobacterales; Lysobacteraceae; Stenotrophomonas
	CT TSA 400-01	707	<i>Prestia megaterium</i> ATCC 14581	100%	<i>Prestia megaterium</i> NBRC 15308(T)	97.56%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Priestia
CTW400 03, ASVI400 08, ASVI400 03A	AsIII I 400 01	939	<i>Bacillus pacificus</i> MCCC 1A06182	100%	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579(T)	100%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus
			<i>Bacillus cereus</i> IAM 12605	100%	<i>Bacillus pacificus</i> EB422(T)	100%	
	AsIII O	629	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> NBRC 15717(T)	99.36%	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> NBRC 15717(T)	99.36%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Planococcaceae; Metasolibacillus
	AsV C	940	<i>Bacillus zanthoxyli</i> 1433	100%	<i>Prestia aryabattai</i> B8W22(T)	100%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Priestia
			<i>Prestia aryabhattai</i> B8W22	100%	<i>Bacillus zanthoxyli</i> 1433(T)	100%	
	AsIII I 400 03	940	<i>Bacillus mobilis</i> MCCC 1A05942	100%	<i>Bacillus proteolyticus</i> TD42(T)	100%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus
			<i>Bacillus paramobilis</i> BML-BC017	100%	<i>Bacillus paramobilis</i> BML-BC017(T)	100%	
ASIII I 400 05	CT LB 400-05	780	<i>Staphylococcus warneri</i> AW 25	100%	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836(T)	100%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales;

			<i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129	100%			Staphylococcaceae; Staphylococcus
	AsIII I B 400- 03	859	<i>Bacillus tropicus</i> MCCC 1A01406	100%	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579(T)	100%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus
<i>Bacillus paramycooides</i> MCCC 1A04098			100%	<i>Bacillus paramycooides</i> NH24A2(T)	100%		
<i>Bacillus nitratireducens</i> MCCC 1A00732			100%	<i>Bacillus pacificus</i> EB422(T)	100%		
<i>Bacillus cereus</i> IAM 12605			100%	<i>Bacillus nitratireducens</i> 4049(T)	100%		
	CTR2A 400-09	1018	<i>Bacillus pacificus</i> MCCC 1A06182	100%	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579(T)	100%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus
			<i>Bacillus cereus</i> IAM 12605	100%	<i>Bacillus pacificus</i> EB422(T)	100%	
	AsIII M2	1094	<i>Paenibacillus lautus</i> AB236d	99.82%	<i>Paenibacillus lautus</i> NBRC 15380(T)	99,40%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae; Paenibacillus
	CTW 8000- 04	1015	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> LMG 19861	100%	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> LMG 19861(T)	100%	Actinobacteria; Actinomycetia; Dermabacterales; Dermabacteraceae; Brachybacterium
			<i>Brachybacterium conglomeratum</i> J 1015	100%	<i>Brachybacterium conglomeratum</i> NCIB 9859(T)	99,61%	
ASIII F1	AsV L	1017	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169	100%	<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112(T)	100%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus
			<i>Bacillus thuringiensis</i> IAM 12077	100%	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8- 0169(T)	100%	
			<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	100%	<i>Bacillus mobilis</i> 0711P9-1(T)	100%	
			<i>Bacillus fungorum</i> 17-SMS- 01(T)	100%	<i>Bacillus fungorum</i> 17-SMS-01(T)	100%	
		864	<i>Sphingopyxix chilensis</i> S37(T)	99,77%	<i>Sphingopyxix chilensis</i> S37(T)	99,77%	Proteobacteria; Alphaproteobacteria

	CT W 8000- 03		<i>Sphingopyxix panaciterrae</i> Gsoil 124(T)	99,54%	<i>Sphingopyxix panaciterrae</i> Gsoil 124(T)	99,54%	; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; Sphingopyxis
	As V I 8 GR	942	<i>Brevundimonas intermedia</i> ATCC 15262(T)	99,58%	<i>Brevundimonas intermedia</i> ATCC 15262(T)	99,58%	Proteobacteria; Alphaproteobacteria ; Caulobacterales; Caulobacteraceae; Brevundimonas
			<i>Brevundimonas vesicularis</i> NBRC 12165(T)	99,36%	<i>Brevundimonas vesicularis</i> NBRC 12165(T)	99,36%	
	CTN 400-05 bis	1018	<i>Paenibacillus dendritiformis</i> T168	99,80%	<i>Paenibacillus dendritiformis</i> CIP 105967(T)	99,80%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae; Paenibacillus
			<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i> strain IFO 15656	99,61%	<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i> NBRC 15656(T)	99,61%	
	AsIII G	1018	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169	100%	<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112(T)	100%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus
			<i>Bacillus thuringiensis</i> IAM 12077	100%	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8- 0169(T)	100%	
			<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	100%	<i>Bacillus fungorum</i> 17-SMS-01(T)	100%	
			<i>Bacillus fungorum</i> 17-SMS- 01(T)	100%			
CTLB 400 02	AsIII H	1023	<i>Staphylococcus warneri</i> AW25	100%	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836(T)	100%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae; Staphylococcus
	AsIII I	1020	<i>Bacillus mycoides</i> NBRC 101238	100%	<i>Bacillus mycoides</i> DSM 2048(T)	100%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus
	AsIII F	783	<i>Bacillus pseudomycooides</i> NBRC 101232	99,87%	<i>Bacillus pseudomycooides</i> DSM 12442(T)	99,87%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus
			<i>Bacillus tropicus</i> MCCC 1A01406	99,87%	<i>Bacillus arachidis</i> SY8(T)	99,87%	

			<i>Bacillus paramycooides</i> MCCC 1A04098	99,87%	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579(T)	99,74%	
CTR2A 400 15, CTR2A40013 BIS, CTR2A400 04BIS, CTR2A40013, CTR2A400 04, CTR2A400 14 BIS	CTR2A 400-02	937	<i>Pseudoarthrobacter sulfonivorans</i> ALL(T)	99,57%	<i>Pseudoarthrobacter sulfonivorans</i> ALL(T)	99,79%	Actinobacteria; Actinomycetia; Micrococcales; Micrococcaceae; Pseudarthrobacter
			<i>Pseudarthrobacter psychrotolerans</i> YJ56(T)	99,47%	<i>Arthrobacter ginsengisoli</i> DCY81(T)	99,57%	
			<i>Arthrobacter ginsengisoli</i> DCY81(T)	99,47%	<i>Pseudarthrobacter psychrotolerans</i> YJ56(T)	99,57%	
CTR2A 400 08	CT LB 400-06	1023	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13, BCRC 11702	99,80%	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580(T)	99,80%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus
			<i>Bacillus haynesii</i> NRRL B-41327	99,61%	<i>Bacillus paralicheniformis</i> KJ-16(T)	99,71%	
					<i>Bacillus haynesii</i> NRRL B-41327(T)	99,71%	
ASVI 400 09, ASIII F2, ASV M3	AsV I 400- 03b	922	<i>Bacillus mycooides</i> NBRC 101238	100%	<i>Bacillus mycooides</i> DSM 2048(T)	100%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus
	AsV I 400- 04BIS	862	<i>Prestia megaterium</i> ATCC 14581= NBRC 15308(T)	100%	<i>Prestia megaterium</i> NBRC 15308(T)	100%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Priestia
			<i>Prestia aryabhatai</i> B8W22(T)	99,77%	<i>Prestia aryabhatai</i> B8W22(T)	99,77%	
			<i>Bacillus zanthoxyli</i> 1433(T)	99,77%	<i>Bacillus zanthoxyli</i> 1433(T)	99,77%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus
ASV I 1 (a)	AsV I1b	860	<i>Paenibacillus lautus</i> NBRC 15380(T)	99,77%	<i>Paenibacillus lautus</i> NBRC 15380(T)	99,77%	Firmicutes; Bacilli; Bacillales;

							Paenibacillaceae; Paenibacillus
CTR2A 400 12	CTR2A 400-01	880	<i>Microbacterium oleivorans</i> BAS69	99.77%	<i>Microbacterium oleivorans</i> NBRC 103075(T)	99.89%	Actinobacteria; Actinomycetia; Microbacteriales; Microbacteriaceae; Microbacterium

Tabella 40. Esiti del sequenziamento e dell'analisi tassonomica dei ceppi rappresentanti dei profili BOX.

Sono riportate le OTU con il corrispettivo rappresentante, il numero di paia di basi (bp) considerate per identificare il ceppo a livello tassonomico, il Taxon e la percentuale di identità (%) corrispondente, identificate mediante NCBI ed EZBIO

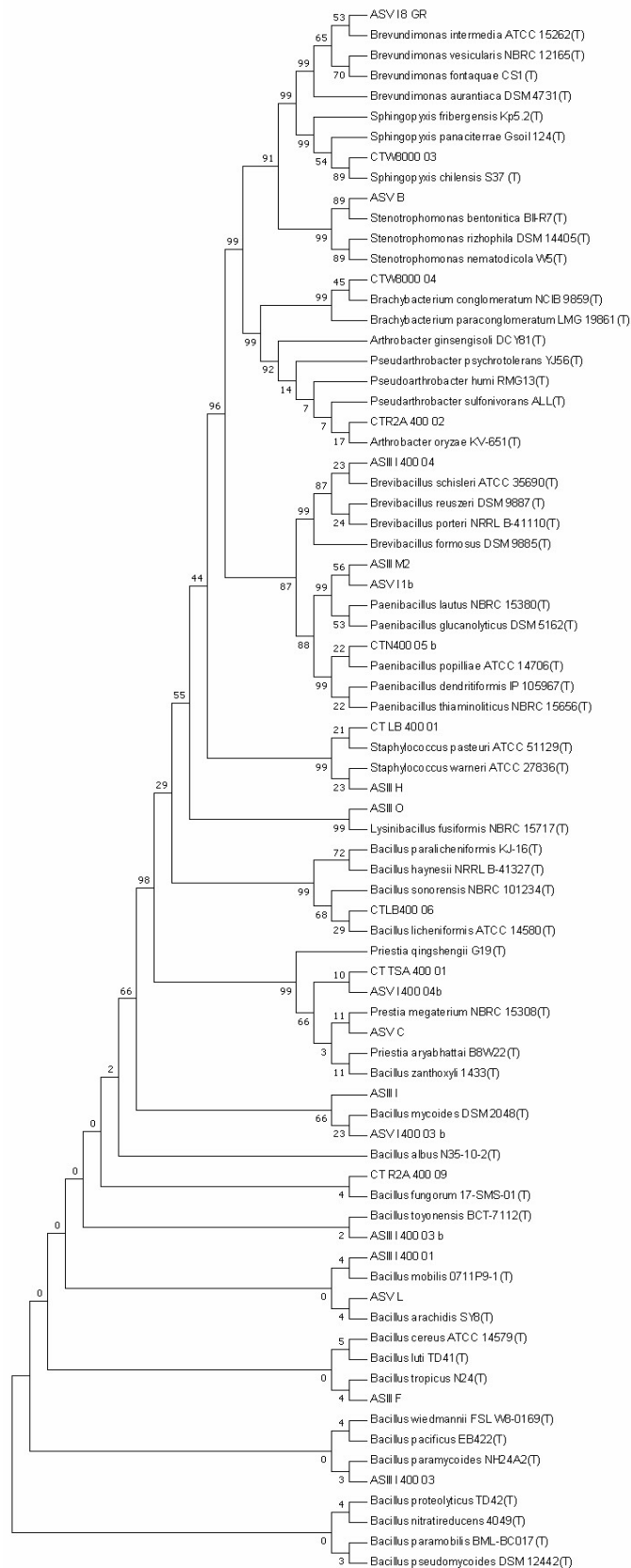


Figura 23. Albero filogenetico ottenuto con il metodo del neighbor-joining, basato sulla sequenza parziale del gene 16S rRNA per gli eubatteri, che riporta le relazioni tra gli isolati batterici ottenuti in questo studio e i type strains di riferimento delle diverse specie batteriche filogeneticamente vicine.

4.6.1 Caratterizzazione tassonomica

Il sequenziamento del gene rRNA 16S, ha permesso di identificare i generi e i phyla corrispondenti agli isolati batterici analizzati nel corso dello studio (Tabella 40). I principali phyla riscontrati sono: *Proteobacteria* (*Gamma-proteobacteria* e *Alpha-proteobacteria*), *Actinobacteria* e *Firmicutes*, per i quali sono stati evidenziati diversi generi di appartenenza (Fig.24).

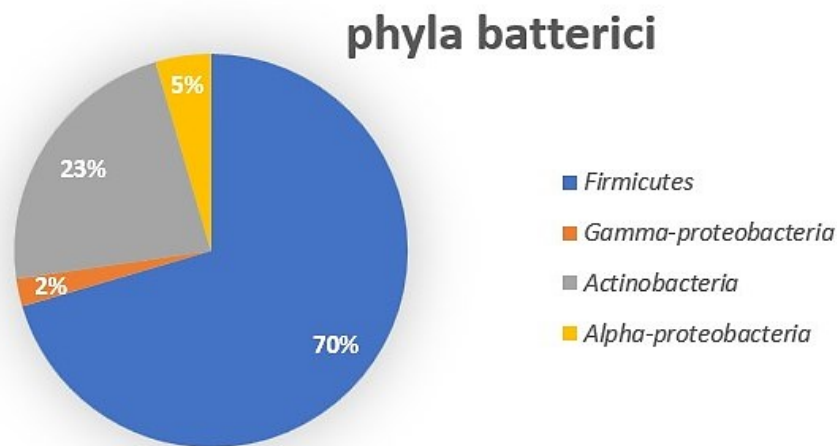


Figura 24. Phyla di appartenenza degli isolati batterici

In generale, nella Figura 24, si può constatare una predominanza del phylum *Firmicutes* (70%), seguito da *Actinobacteria* (23%) e *Proteobacteria* (7%).

Nonostante le elevate concentrazioni di arsenico a cui i batteri erano esposti nei siti da cui provengono, sono stati individuati una vasta gamma di generi batterici per entrambi i siti presi in esame.

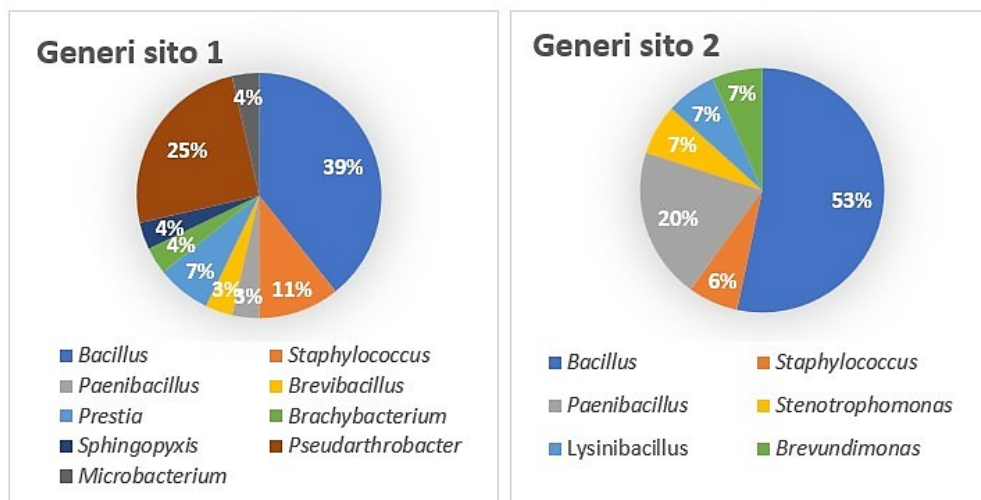


Figura 25. Generi batterici riscontrati nel sito 1 e nel sito 2

Dai risultati riportati nel grafico, si può riscontrare una diffusa presenza di ceppi appartenenti al phyla dei *Firmicutes*, in entrambi i siti. Tuttavia, nel sito 1 si può osservare una più ampia varietà di generi batterici rispetto a quanto riscontrato nel sito 2 (Fig. 25). Questa discrepanza potrebbe essere attribuita ai differenti approcci utilizzati per il campionamento e l'isolamento dei batteri, oltre che alle diverse caratteristiche dei due suoli presi in esame.

Uno studio condotto da Aksornchu et al., (2008), ha identificato diversi generi batterici in un campione di suolo prelevato a una profondità compresa tra 0 e 15 cm. Il campione, caratterizzato da un pH neutro, presentava una concentrazione di arsenico variabile tra 73 e 1010 mg/Kg. Tra i generi batterici individuati vi sono *Microbacterium*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* ed altri. Quanto riscontrato in questo studio, risulta essere in parte in linea con i risultati ottenuti. Ad esempio, generi come *Microbacterium* e *Staphylococcus* sono stati individuati anche nel sito 1, sebbene ad una profondità di campionamento differente (0,5-1,5 m) e ad una concentrazione di arsenico maggiore (400-8000 mg/Kg).

-Firmicutes

Firmicutes rappresenta uno dei phyla batterici riscontrati maggiormente nel suolo, al quale vengono associati differenti tratti benefici di promozione della crescita della pianta oltre che la capacità di resistere e biotrasformare differenti metalli e metalloidi e di biodegradare composti organici tossici (Hashmi et al., 2020). I generi maggiormente rappresentati negli isolati in studio appartenenti al phylum dei *Firmicutes* sono: *Brevibacillus*, *Prestia*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus* e *Staphylococcus*, con prevalenza del genere *Bacillus* in entrambi i siti contaminati di provenienza.

Diversi studi presenti in letteratura riportano elevata presenza del phylum *Firmicutes* (*Bacillus* spp.) in siti contaminati da arsenico. Secondo quanto riportato da Valverde et al. (2011), si presume che la predominanza di *Bacillus* possa essere correlata alla capacità di questo genere di resistere a condizioni di stress o di cambiamenti ambientali di difficile adattabilità, resistendo nella forma sporulata. Questa caratteristica suggerisce la possibilità di impiegare alcune specie del genere

Bacillus in protocolli associati al biorisanamento dell'arsenico o come batteri promotori della crescita delle piante (PGP), avendo caratteristiche a questi associate (Magar et al., 2020).

Dai risultati ottenuti per la valutazione dell'arsenico resistenza, è stato possibile riscontrare che gli isolati che manifestavano alti valori di MIC, appartenevano principalmente al genere *Bacillus* per entrambi i siti in esame, questa predominanza suggerisce una buona adattabilità di questo genere ad ambienti contaminati da arsenico e si può ritenere in linea con quanto riscontrato in letteratura. In ogni caso, nonostante *Bacillus* sia stato identificato come il genere maggiormente resistente ai valori di MIC testati, è possibile riscontrare anche una sua inibizione a valori di MIC inferiori (5 mM), ne possono essere un esempio i ceppi CTLB400 06, ASIII I 400 04, CTR2A 400 08. Questo fenomeno, potrebbe trovare spiegazione in una diversa presenza e configurazione dei geni di resistenza all'arsenico (*ars*), i quali possono variare notevolmente all'interno di uno stesso genere (Yan et al., 2019).

Per quanto riguarda la valutazione dei tratti PGP, il genere *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus* hanno mostrato risultati migliori nella maggior parte dei test eseguiti. Molti ceppi di *Bacillus* hanno dimostrato vari tratti PGP, quali una buona produzione di ammoniaca come nel caso di ASVI 400 08, ASVI 400 09, ASV M3, capacità di solubilizzare il fosfato inorganico (ASIII I 400 03, ASVI 400 08, ASIII I), attività ACC deaminasi (ASIII I B 400 03) e in misura minore capacità di produrre siderofori e IAA; rispetto invece a *Brevibacillus*, *Paenibacillus* e *Lysinibacillus*, che in alcuni test sono stati riscontrati risultati più ottimali, come nella produzione di IAA e dei siderofori per *Brevibacillus* (ASIII I 400 04) o la capacità di solubilizzare il fosfato inorganico per *Paenibacillus* (ASIII M2, ASVI 1 (b)). I risultati ottenuti hanno inoltre consentito di evidenziare attività dell'ACC deaminasi associata soprattutto al genere *Bacillus* (ASIII I B 400 03) e . *Pseudoarthrobacter* (*Actinobacteria*). In letteratura vengono riportati diversi casi documentati di entrambi i generi con attività ACC deaminasi, in particolar modo associati al genere *Bacillus*. Molti studi sono stati condotti in condizioni di alotolleranza, identificando l'attività dell'ACC deaminasi nei *Bacillus*, per promuovere la crescita delle piante in condizioni di stress salino (Santoyo et al., 2019).

Ulteriori studi presenti in letteratura, attribuiscono al genere *Bacillus*, differenti

ruoli e tratti importanti nella promozione della crescita delle piante. Ne è un esempio lo studio condotto da Joseph et al (2017), il quale ha identificato diversi generi produttori di ammoniaca, quali: *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* e *Bacillus*. Allo stesso modo, diversi studi identificano in questo genere la capacità di solubilizzare il fosfato (Mohamed et al., 2018; Abdelmoteleb et al., 2020) o di produrre IAA (Wagi e Ahmed, 2019).

Nello studio condotto da Magar et al (2022), è stata valutata l'attività PGP delle specie di *Bacillus* isolate in Nepal, resistenti all'arsenico, ciò che ne è stato ricavato è la capacità di *Bacillus subtilis*, *B.flexus*, *B.licheniformis*, *B.cereus* di essere in grado di produrre IAA e solubilizzare fosfato.

Inoltre, in letteratura sono stati riscontrati tratti PGP e di fitorimedio anche nel genere *Lysinibacillus*, ne è un esempio quanto riportato nello studio condotto da la Martínez e Dussàn (2018), nel quale viene evidenziata l'efficacia di alcuni ceppi di *Lysinibacillus sphaericus* nella fitodepurazione dei terreni contaminati da metalli pesanti. In questi ceppi è stato inoltre possibile individuare alcuni dei tratti PGP come la produzione di IAA e la fissazione dell'azoto, caratteristiche fondamentali per favorire la risposta delle piante quando esposte a stress derivante dalla contaminazione da metalli pesanti. Allo stesso modo, sono stati identificati tratti PGP anche in *Brevibacillus* e *Staphylococcus*, capaci di stimolare la crescita delle piante tramite produzione di IAA, formazione di biofilm e solubilizzazione del fosfato (Hashmi et al., 2020).

Ceppi batterici che mostrano questi tratti benefici, possono essere utilizzati come biofertilizzanti per ridurre al minimo il costo e l'uso dei fertilizzanti inorganici in agricoltura (Ali, 2019).

Pochi lavori sono stati fatti sul genere *Staphylococcus*, in quanto i membri di questo genere sono spesso segnalati come potenziali patogeni, un rischio per la salute umana. Tuttavia, sono stati anche osservati dei tratti benefici associati a ceppi che appartengono a questo genere. Un esempio è lo *Staphylococcus succinus* EN4, isolato da un terreno salino, ha manifestato alcuni tratti PGP come la produzione di ammoniaca e la solubilizzazione del fosfato, migliorando inoltre anche la crescita del frumento in terreni altamente salini (Orhan., 2016). Ma non solo, in uno studio condotto da Agarwal et al., (2020) sono stati individuati tratti PGP anche *Staphylococcus warneri* GS1 e GL1, quali produzione di ammoniaca, produzione

di IAA, produzione di siderofori ferro-chelanti, solubilizzazione del fosfato, segnalando inoltre attività di antagonismo contro fitopatogeni.

Il genere *Staphylococcus* inoltre è noto per la sua resistenza ad elevate concentrazioni di metalli pesanti come rame, zinco, cadmio ed arsenico (Lawal et al., 2021).

Dai risultati ottenuti nelle prove per testare l'arsenico resistenza, è stato infatti possibile riscontrare che tutti i ceppi testati appartenenti al genere *Staphylococcus* manifestavano resistenza ad una concentrazione 5 mM o 10 mM di arsenito di sodio (AsIII) e valori di MIC più alti (50 mM) nei confronti dell'arsenato di sodio (AsV). I differenti test eseguiti per caratterizzare i tratti PGP hanno evidenziato tra i generi appartenenti al phylum *Firmicutes*, *Staphylococcus* come produttore di ammoniaca (CTLB400 02, ASIII I 400 05), manifestando anche risultati positivi per la produzione di siderofori (ASIII H). Ciononostante, il genere *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus* hanno mostrato risultati migliori nella maggior parte dei test eseguiti.

Per quanto riguarda il tratto PGP relativo alla produzione di IAA, tra i ceppi che hanno manifestato risultati ottimali, si possono identificare ASVI 400 04 BIS (*Prestia*), con una concentrazione di IAA a 120 h intorno a 20 µg/ml, seguito dal ceppo ASIII I 400 04 (*Brevibacillus*) con una produzione di IAA a 120 h pari a 7 µg/ml. Uno studio condotto da Bilkay et al., (2010) mostra che il picco di produzione di IAA avviene intorno al dodicesimo giorno, quindi si potrebbe condurre i test considerando tempi più lunghi.

-Actinobacteria

Gli *Actinobacteria* sono batteri Gram-positivi filamentosi.

Diversi studi attribuiscono a questo phylum tratti di promozione della crescita delle piante (PGP), agendo anche come agenti di biocontrollo nei confronti di patogeni vegetali. Tra i generi appartenenti a questo phylum, sono stati riscontrati nel sito 1: *Brachy bacterium*, *Pseudarthrobacter* e *Microbacterium*, con una maggiore prevalenza per il genere *Pseudarthrobacter* (25%).

Uno studio condotto da Issifu et al., 2022, su *Pseudarthrobacter chlorophenolicus* BF2P4-5, ha riscontrato differenti tratti PGP come la capacità di fissazione

dell'azoto, la solubilizzazione del fosfato e la produzione di IAA. A seguito di inoculo di tale ceppo in piante di pomodoro, è stata riscontrata una significativa crescita delle piante, migliorando la lunghezza e la circonferenza dello stelo e l'altezza della pianta stessa.

In diversi studi, i generi *Microbacterium* e *Brachybacterium* sono stati descritti per le loro proprietà legate ai tratti PGP e per la loro resistenza ad un ampio spettro di metalli pesanti quali cromo, nichel, cadmio ed arsenico (Mandal et al., 2022; Kaushik et al., 2012). Nello specifico, è stata riscontrata per alcune specie di *Microbacterium*, la capacità di tollerare una concentrazione pari a 80 mM di arsenito (Chen e Shao, 2009). Queste caratteristiche rendono questo genere particolarmente interessante per applicazioni in protocolli di biorisanamento (Passari et al., 2019).

Quanto riportato in letteratura sembra essere in linea con alcuni dati riscontrati nei risultati ottenuti. Nello specifico, i ceppi appartenenti al genere *Pseudarthrobacter* hanno manifestato arsenico resistenza nei confronti sia di arsenito (5 mM), ma in particolar modo nei confronti di arsenato di sodio (> 50 mM), ne sono un esempio CT R2A 400 02, CT R2A 400 04 BIS. Allo stesso modo anche i ceppi appartenenti al genere *Microbacterium* e *Brachybacterium* hanno manifestato valori di MIC elevati; nello specifico il ceppo CTW 8000 04 (*Brachybacterium*) manifesta arsenico resistenza più elevata nei confronti dell'arsenito di sodio (20 mM), specie chimica più tossica.

Relativamente ai tratti PGP, i ceppi appartenenti al genere *Pseudarthrobacter* sono risultati tutti buoni produttori di IAA se comparati agli altri phyla e generi batterici, ne sono un esempio i ceppi CTR2A 400 02, CT R2A 400 04, CT R2A 400 15, CT R2A 400 14 BIS. Questi ultimi ceppi batterici (CTR2A 400 15 e CTR2A 400 14 BIS) inoltre, sono stati gli unici oltre a *Bacillus* a manifestare attività ACC deaminasi, seppur il risultato migliore è stato identificato in ASIII I B 400 03 (*Bacillus*).

Sempre il genere *Pseudarthrobacter* ha manifestato risultati positivi nei confronti della capacità di solubilizzare il fosfato inorganico; tutti i ceppi appartenenti a questo genere hanno manifestato la capacità di solubilizzare soprattutto $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ in terreno NBRIP, a differenza del ceppo CTR2A 400 01 (*Microbacterium*), il quale ha mostrato di essere in grado di solubilizzare entrambe le forme inorganiche

di fosfato, nei due differenti terreni (NBRIP e PVK).

I risultati ottenuti sembrano essere in linea con quanto riscontrato in letteratura, a differenza della capacità di solubilizzare fosfato da parte del genere *Microbacterium*, di cui non è stata identificata alcuna proprietà associata al tratto di interesse (Singh e Singh, 2019).

-Proteobacteria

Il phylum di batteri Gram- negativi, *Proteobacteria* costituisce solo il 7% rispetto ai phyla riscontrati per i ceppi batterici in studio, con due principali classi individuate: *Gamma-proteobacteria* (2%) ed *Alpha-proteobacteria*. (5%).

Nello specifico, appartenente alla classe dei *Gamma-proteobacteria*, è stato individuato il genere *Stenotrophomonas*, mentre per la classe degli *Alpha-proteobacteria* sono stati identificati i generi *Sphingopyxis* e *Brevundimonas*.

Il genere *Stenotrophomonas* è considerato di estrema importanza a livello biotecnologico, grazie alle sue potenziali caratteristiche di promozione della crescita delle piante, presentando tratti come la solubilizzazione del fosfato, la fissazione dell'azoto, la produzione di IAA, la produzione di siderofori e la presenza di proprietà antagoniste contro diversi microorganismi fitopatogeni (Nakayama et al., 1999). Le specie appartenenti al genere *Stenotrophomonas* sono state identificate in una vasta gamma di habitat differenti, tra cui ambienti estremi. Alcuni studi condotti su *S. maltophilia*, hanno evidenziato in questa specie tratti di resistenza a diversi metalli pesanti, tra cui anche l'arsenico (Botes et al., 2007).

Le evidenze della letteratura sembrano confermare i risultati ottenuti, in quanto il ceppo ASV B (*Stenotrophomonas*) ha manifestato risultati positivi (insieme ad altri generi appartenenti al phylum *Firmicutes*) circa la produzione di siderofori, ed una resistenza nei confronti dell'arsenato di sodio (50 mM). Inoltre in letteratura, la produzione di siderofori viene riportata come caratteristica dominante per diversi ceppi appartenenti al genere *Stenotrophomonas*; uno studio condotto da Singh e Jha, (2017) ha osservato la produzione di un alone arancione su piastre di CAS agar per *Stenotrophomonas maltophilia* SPB-9. Ulteriori studi hanno identificato la produzione dei siderofori della classe dei idrossammati, associata al genere *Stenotrophomonas* (Patel e Saraf., 2017).

Relativamente alla classe degli *Alpha-proteobacteria*, diverse specie del genere *Sphingopyxis* sono state riscontrate in differenti ambienti contaminati, sviluppando in questo modo la capacità di degradare composti xenobiotici ed inquinanti di diversa natura (Sharma et al., 2021). Uno studio condotto da Okazaki et al., (2021) che analizzava diversi generi batterici, ha identificato in *Sphingopyxis* alcune proprietà associate a tratti PGP.

Inoltre, è stato verificato per il genere *Brevundimonas* la capacità di resistere e crescere in presenza di arsenico, cadmio e zinco (Singh et al., 2016). In letteratura sono stati riscontrati alcuni tratti promotori della crescita delle piante, associati ad alcune specie di *Brevundimonas*: ne è un esempio lo studio condotto da Naggash et al, (2021), dove tutti i ceppi testati, sono stati in grado di solubilizzare il fosfato tricalcico, e fissare l'azoto, ma nessuna attività di produzione di IAA. Dai risultati ottenuti, è stato possibile riscontrare arsenico resistenza da parte del ceppo ASVI8GR (*Brevundimonas*) nei confronti sia di arsenito di sodio (20 mM) che arsenato di sodio (50 mM), inoltre il medesimo ceppo ha manifestato capacità di produzione di ammoniaca, e capacità di solubilizzare il fosfato inorganico tricalcico. Questi risultati sono concordi con quanto riscontrato precedentemente in letteratura.

5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

L'obiettivo principale del presente progetto di tesi è stato quello di identificare a livello tassonomico e caratterizzare a livello funzionale ceppi batterici precedentemente isolati da due suoli industriali contaminati da arsenico, presenti in Toscana (Italia). La loro caratterizzazione prevedeva lo studio dell'arsenico resistenza e l'identificazione di determinate caratteristiche associate a tratti di promozione della crescita delle piante (tratti PGP), per una loro futura applicazione in protocolli di fitorisanamento come la fitodepurazione.

Gli isolati batterici sono stati analizzati mediante saggi qualitativi ed alcuni quantitativi, per identificare la presenza di tratti PGP come la produzione di acido indol-3 acetico, la produzione di ammoniaca, la capacità di solubilizzare fosfato inorganico (altrimenti di difficile accesso per le piante), la produzione di siderofori e l'attività di ACC deaminasi.

I risultati ottenuti da tutte queste analisi hanno permesso di selezionare i ceppi di maggiore interesse in termini di arsenico resistenza e di presenza di tratti PGP. La successiva analisi molecolare con sequenziamento parziale del gene per il 16S rRNA e l'analisi dei dati di sequenza ottenuti ha permesso di evidenziare la predominanza di generi appartenenti ai *phyla Firmicutes*, *Actinobacteria* ed in misura minore, *Proteobacteria*.

Confronti con la letteratura hanno evidenziato come i ceppi appartenenti a questi generi siano predominanti in suoli contaminati da metalli pesanti (per i quali hanno dovuto sviluppare differenti meccanismi di resistenza) e che presentino svariati tratti di PGP.

Questi ceppi batterici verranno quindi inseriti come "nuovi depositi" all'interno della collezione VUCC-DBT (Verona University Culture Collection-Department of Biotechnology), contribuendo così ad arricchire le risorse microbiche disponibili, per future ricerche nel campo del biorisanamento e del fitorisanamento.

In termini di prospettive future, ulteriori studi potrebbero essere condotti per approfondire ulteriormente alcuni aspetti. In primo luogo, potrebbero essere eseguite ulteriori indagini per approfondire i meccanismi di resistenza all'arsenico mediante applicazioni di approcci molecolari e genomici, al fine di identificare i

geni associati e responsabili dell'arsenico resistenza, nei differenti ceppi. Questo consentirebbe una selezione più accurata dei ceppi maggiormente promettenti, potenziandone ulteriormente l'efficacia in un contesto di biorisanamento.

Inoltre, sarebbe interessante condurre esperimenti *in situ*, per valutare l'efficacia dei ceppi batterici su suoli contaminati da arsenico nelle reali condizioni ambientali. Questo approccio sperimentale potrebbe inoltre contribuire all'ottimizzazione dei protocolli di fitodepurazione, considerando anche le complesse interazioni tra i ceppi batterici selezionati per i tratti PGP e le piante iperaccumulatrici di metalli pesanti, come *Pteris vittata* (Alka et al., 2020) o altre specie vegetali (Das e Barthai., 2023).

Relativamente ai tratti PGP, un futuro approfondimento potrebbe inoltre includere la realizzazione di saggi quantitativi, per meglio caratterizzare tali abilità nei diversi ceppi. Un ulteriore aspetto potrebbe essere quello di investigare sulla capacità di fissazione dell'azoto da parte dei ceppi *free-living* (ceppi non simbiotici), verificando quindi la propria abilità nel fissare l'azoto atmosferico.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abdelmoteleb, A., & Gonzalez-Mendoza, D. (2020). Isolation and identification of phosphate solubilizing *Bacillus* spp. from *Tamarix ramosissima* rhizosphere and their effect on growth of *Phaseolus vulgaris* under salinity stress. *Geomicrobiology Journal*, 37(10), 901-908.
- Abdelwahed, S., Trabelsi, E., Saadouli, I., Kouidhi, S., Masmoudi, A. S., Cherif, A., Mnif, W., & Mosbah, A. (2022). A new pioneer colorimetric micro-plate method for the estimation of ammonia production by plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). 55-68
- Abeles, F. B., Morgan, P. W., & Saltveit Jr, M. E. (2012). *Ethylene in plant biology*. Academic press. 1-13.
- Adriano, D.C. (2001). *Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals* (Vol. 860). New York: Springer.
- Afkar E, Lisak J, Saltikov C, Basu P, Oremland RS, Stolz JF (2003). The respiratory arsenate reductase from *Bacillus selenitireducens* strain MLS10. *FEMS Microbiol Lett* 226:107–112.
- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., & Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, 221, 36-49.
- Agarwal, H., Dowarah, B., Baruah, P. M., Bordoloi, K. S., Krishnatreya, D. B., & Agarwala, N. (2020). Endophytes from *Gnetum gnemon* L. can protect seedlings against the infection of phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* as well as promote plant growth in tomato. *Microbiological research*, 238, 126503.
- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, 163(2), 173-181.
- Aksornchu, P., Prasertsan, P., & Sobhon, V. (2008). Isolation of arsenic-tolerant bacteria from arsenic-contaminated soil. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30(Suppl. 1), 95-102.
- Albelda-Berenguer, M., Monachon, M., & Joseph, E. (2019). Siderophores: From natural roles to potential applications. *Advances in applied microbiology*, 106, 193–225.

- Ali, B. (2019). Functional and genetic diversity of bacteria associated with the surfaces of agronomic plants. *Plants*, 8(4), 91.
- Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals – concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869-881.
- Alka, S., Shahir, S., Ibrahim, N., Chai, T.-T., Bahari, Z. M., & Manan, F. A. (2020). The role of plant growth promoting bacteria on arsenic removal: A review of existing perspectives. *Environmental Technology & Innovation*, 17, 100602
- Andreolli, M., et al. (2016). Diversity of bacterial endophytes in 3 and 15 year-old grapevines of *Vitis vinifera* cv. Corvina and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. *Microbiological Research*, 183, 42-52.
- ARPAT. (2001). Contributo del dipartimento ARPAT di Grosseto allo studio delle anomalie da metalli, con particolare riferimento all'arsenico, nei terreni agricoli del Comune di Scarlino – Primi risultati del monitoraggio dei suoli agricoli del Comune di Scarlino, Maggio 2000 – Maggio 2001.
- Belton, J. C., Benson, N. C., Hanna, M. L., & Taylor, R. T. (1985). Growth inhibitory and cytotoxic effects of three arsenic compounds on cultured Chinese hamster ovary cells. *Journal of Environmental Science and Health . Part A: Environmental Science and Engineering*, 20(1), 37–72.
- Beni C., Pennelli B., Ronchi B., Marconi S. (2007). Xenobiotics concentration and mobility in bovine milk from Italian farms. *Prog. Nutr.* 9(1), 39-45.
- Bernhard, A. (2010). The nitrogen cycle: Processes, players, and human impact. *Nature Education Knowledge*, 2(2), 12.
- Bhardwaj, A. Understanding the diversified microbial operon framework coupled to arsenic transformation and expulsion. *Biologia* 77, 3531–3544 (2022).
- Bhattacharya, P., Jacks, G., Ahmed, K. M., Routh, J., & Khan, A. A. (2002). Arsenic in groundwater of the Bengal Delta Plain aquifers in Bangladesh. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 69(4), 538-545.
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1327-1350.
- Bhattacharya, P., Welch, A. H., Stollenwerk, K. G., McLaughlin, M. J., Bundschuh, J., & Panaullah, G. (2007). Arsenic in the environment: Biology and Chemistry. *Science of the Total Environment*, 379(2-3), 109-120.

- Bilkay, I. S., Karakoç, Ş., & Aksöz, N. (2010). Indole-3-acetic acid and gibberellic acid production in *Aspergillus niger*. *Turkish Journal of Biology*, 34(3), 313-318.
- Boopathi, T., Balamurugan, V., Gopinath, S., et al. (2013). Characterization of IAA production by the mangrove cyanobacterium *Phormidium sp.* MI405019 and its influence on tobacco seed germination and organogenesis. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(4), 758-766.
- Botes, E., Van Heerden, E., & Litthauer, D. (2007). Hyper-resistance to arsenic in bacteria isolated from an antimony mine in South Africa. *South African Journal of Science*, 103(7-8), 279-281. Retrieved May 29th, 2024.
- Braud, A., Geoffroy, V., Hoegy, F., Mislin, G. L., & Schalk, I. J. (2010). Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the extracellular medium reduces toxic metal accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and increases bacterial metal tolerance. *Environmental Microbiology Reports*, 2(3), 419-425.
- Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T., & Schalk, I. J. (2009). New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environmental Microbiology*, 11(5), 1079-1091.
- Bris, L. (2003). Hormones in Growth and Development. 364-369. *Encyclopedia of Rose Sciences*.
- Brusetti, L., Malkhazova, I., Gtari, M., Tamagnini, I., Borin, S., Merabishvili, M., Chanishvili, N., Mora, D., Cappitelli, F., & Daffonchio, D. (2008). Fluorescent-BOX-PCR for resolving bacterial genetic diversity, endemism and biogeography. *BMC microbiology*, 8, 220.
- Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (1992). *Microbiology: A laboratory manual*. Addison-Wesley, New York.
- Chen, H., Bullock Jr, D. A., Alonso, J. M., & Stepanova, A. N. (2021). To fight or to grow: The balancing role of ethylene in plant abiotic stress responses. *Plants*, 11(1), 33.
- Chen, S., & Shao, Z. (2009). Isolation and diversity analysis of arsenite-resistant bacteria in communities enriched from deep-sea sediments of the Southwest Indian Ocean Ridge. *Extremophiles*, 13, 39-48.
- Clarridge III, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 840-862.

- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of advanced research*, 19, 29-37.
- Dall'Aglio, M. (1996). Problemi emergenti di geochimica ambientale e salute in Italia con particolare riferimento all'arsenico. In Atti del II° Convegno Nazionale sulla protezione e gestione delle acque sotterranee. Metodologie, tecnologie e obiettivi. Modena, 17/19 maggio 1995, (Vol. 4, pp. 85-95). Pitagora Editrice.
- Dannenmann, M., Simon, J., Gasche, R., Holst, J., Naumann, P. S., Kögel-Knabner, I., Knicker, H., Mayer, H., Schloter, M., Pena, R., & altri. (2009). Tree girdling provides insight on the role of labile carbon in nitrogen partitioning between soil microorganisms and adult European beech. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(8), 1622-1631.
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (45), e2565
- Dixon, H. B. (1996). The biochemical action of arsonic acids especially as phosphate analogues. In *Advances in inorganic chemistry* (Vol. 44, pp. 191-227). Academic press.
- Elahi, A., Ajaz, M., Rehman, A., Vuilleumier, S., Khan, Z., & Hussain, S. Z. (2019). Isolation, characterization, and multiple heavy metal-resistant and hexavalent chromium-reducing Microbacterium testaceum B-HS2 from tannery effluent. *Journal of King Saud University-Science*, 31(4), 1437-1444.
- Fitz W.J., Wenzel W.W., Zhang H., Nurmi J., Štípek K., Fischerová Z., Schweiger P., Köllensperger G., Ma L.Q., Stingeder G. (2003). Rhizosphere characteristics of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and monitoring of phytoremoval efficiency. *Environmental science & technology*, 37(21), 5008-5014.
- Ghori, Z., Iftikhar, H., Bhatti, M. F., Sharma, I., Kazi, A. G., & Ahmad, P. (2016). Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soil. In *Plant metal interaction* (pp. 385-409).
- Ghosh, S., Chowdhury, R., & Bhattacharya, P. (2015). Role of siderophores in metal bioremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(4), 3467-3483.
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, 963401.
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*, 169(1), 30-39 Goldberg, S.

- (2002). Competitive adsorption of arsenate and arsenite on oxides and clay minerals. *Soil Science Society of America Journal*, 66(2), 413-421.
- Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology*, 26(1), 192.
 - Hao, D., Sun, X., Ma, B., Zhang, J.-S., & Guo, H. (2017). Ethylene. In *Hormone metabolism and signaling in plants* (pp. 203-241).
 - Hashmi, I., Bindschedler, S., & Junier, P. (2020). Firmicutes. In *Beneficial microbes in agro-ecology: Bacteria and fungi* (pp. 363-396).
 - Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Beneficial soil bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Annals of Microbiology*, 60, 579-598.
 - Herath, I., Vithanage, M., Bundschuh, J., Maity, J. P., & Bhattacharya, P. (2016). Natural arsenic in global groundwaters: distribution and geochemical triggers for mobilization. *Current Pollution Reports*, 2, 68-89.
 - Hughes, M. F. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology letters*, 133(1), 1-16.
 - Hughes, M. F., Beck, B. D., Chen, Y., Lewis, A. S., & Thomas, D. J. (2011). Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 123(2), 305-332.
 - IARC. (2004). Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 84, 1-477.
 - Issifu, M., Songoro, E. K., Onguso, J., Ateka, E. M., & Ngumi, V. W. (2022). Potential of Pseudarthrobacter chlorophenicus BF2P4-5 as a Biofertilizer for the Growth Promotion of Tomato Plants. *Bacteria*, 1(4), 191-206.
 - Jain, A., & Loeppert, R. H. (2000). *Effect of competing anions on the adsorption of arsenate and arsenite by ferrihydrite* (Vol. 29, No. 5, pp. 1422-1430). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America.
 - Kamnev, A. A., Shchelochkov, A. G., Perfiliev, Y. D., Tarantilis, P. A., & Polissiou, M. G. (2001). Spectroscopic investigation of indole-3-acetic acid interaction with iron (III). *Journal of molecular structure*, 563, 565-572.
 - Kaushik, P., Rawat, N., Mathur, M., Raghuvanshi, P., Bhatnagar, P., Swarnkar, H., & Flora, S. (2012). Arsenic hyper-tolerance in four Microbacterium species

- isolated from soil contaminated with textile effluent. *Toxicology International*, 19(2), 188-194.
- Kapahi, M., & Sachdeva, S. (2019). Bioremediation Options for Heavy Metal Pollution. *Journal of health & pollution*, 9(24), 191203.
 - Khan, M. I., Ahmad, M. F., Ahmad, I., Ashfaq, F., Wahab, S., Alsayegh, A. A., Kumar, S., & Hakeem, K. R. (2022). Arsenic exposure through dietary intake and associated health hazards in the Middle East. *Nutrients*, 14(10), 2136.
 - Khianggam, S., Meetum, P., Chiangmai, P. N., & Tanasupawat, S. (2023). Identification and optimisation of indole-3-acetic acid production of endophytic bacteria and their effects on plant growth. *Tropical Life Sciences Research*, 34(1), 219-239.
 - Kong, Z., & Glick, B. R. (2017). The role of plant growth-promoting bacteria in metal phyto remediation. *Advances in Microbial Physiology*, 71, 97-132.
 - Krafft, T., & Macy, J. M. (1998). Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. *European Journal of Biochemistry*, 255(3), 647–653.
 - Kruger, M. C., Bertin, P. N., Heipieper, H. J., & Arsène-Ploetze, F. (2013). Bacterial metabolism of environmental arsenic mechanisms and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(9), 3827–3841.
 - Kumar, M., Yadav, A., & Al, R. I. (2020). Arsenic contamination in environment, ecotoxicological and health effects, and bioremediation strategies for its detoxification.
 - Kumar, A., Kumar, A., Devi, S., Patil, S., Payal, C., & Negi, S. (2012). Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: An in vitro study. *Science and Technology*, 4(1), 01-05.
 - Lawal, O. U., Fraqueza, M. J., Worning, P., Bouchami, O., Bartels, M. D., Goncalves, L., & Miragaia, M. (2021). *Staphylococcus saprophyticus* causing infections in humans are associated with high resistance to heavy metals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, AAC-02685.
 - Li, X., & Thornton, I. (1993). Arsenic, antimony and bismuth in soil and pasture herbage in some old metalliferous mining areas in England. *Environmental geochemistry and health*, 15(2), 135-144.
 - Lu, P., & Zhu, C. (2011). Arsenic Eh–pH diagrams at 25 C and 1 bar. *Environmental Earth Sciences*, 62(8), 1673-1683.

- Lynch, H. N., Greenberg, G. I., Pollock, M. C., & Lewis, A. S. (2014). A comprehensive evaluation of inorganic arsenic in food and considerations for dietary intake analyses. *The Science of the total environment*, 496, 299–313.
- Ma, L. Q., Komar, K. M., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y., & Kennelley, E. D. (2001). A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature*, 409(6820), 579.
- Magar, L. B., Rayamajhee, B., Khadka, S., Karki, G., Thapa, A., Yasir, M., Thapa, S., Panta, O. P., Sharma, S., & Poudel, P. (2022). Detection of *Bacillus* species with arsenic resistance and plant growth promoting efficacy from agricultural soils of Nepal. *Scientifica*, 2022(1), 9675041.
- Mandal, B. K., & Suzuki, K. T. (2002). Arsenic round the world: a review. *Talanta*, 58(1), 201-235.
- Mandal, D., Aghababaei, M., Das, S. K., Majumder, S., Chatterjee, D., & Basu, A. (2022). Isolation and identification of arsenic hyper-tolerant bacterium with potential plant growth promoting properties from soil. *Minerals*, 12(11), 1452.
- Mandal, P. (2017). An insight of environmental contamination of arsenic on animal health. *Emerging contaminants*, 3(1), 17-22.
- Mara, L., Palagi, M., & Tognoni, G. (1995). *Da Bhopal alla Farmoplant crimini e chimica di morte*. Ecoapuano editore.
- Marchesi, J. R., et al. (1998). Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 795-799.
- Marques, A. S. A., Marchaison, A., Gardan, L., & Samson, R. (2008). BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae*: *P. viridiflava* group. *Genetics and Molecular Biology*, 31, 106-115.
- Martínez, S. A., & Dussán, J. (2018). *Lysinibacillus sphaericus* plant growth promoter bacteria and lead phytoremediation enhancer with *Canavalia ensiformis*. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 37, 276-282.
- Minichilli, F., Bartolacci, S., Buiatti, E., Pierini, A., Rossi, G., & Bianchi, F. (2006). Mortalità nell'area di Massa-Carrara nel decennio successivo alla chiusura degli impianti ANIC-Agricoltura e Farmoplant. *Epidemiologia e Prevenzione*, 30(2), 120-128.
- Mitra, A., Chatterjee, S., & Gupta, D. K. (2020). Environmental arsenic exposure and human health risk. In A. Fares & S. Singh (Eds.), *Arsenic water resources contamination* (Advances in Water Security). Springer, Cham.

- Mohamed, E. A., Farag, A. G., & Youssef, S. A. (2018). Phosphate solubilization by *Bacillus subtilis* and *Serratia marcescens* isolated from tomato plant rhizosphere. *Journal of Environmental Protection*, 9(03), 266.
- Munir, N., Hanif, M., Abideen, Z., Sohail, M., El-Keblawy, A., Radicetti, E., Mancinelli, R., & Haider, G. (2022). *Mechanisms and strategies of plant microbiome interactions to mitigate abiotic stresses*. *Agronomy*, 12(9), 2069.
- Nadeem, S. M., Ahmad, M., Zahir, Z. A., Javaid, A., & Ashraf, M. (2014). The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances*, 32(2), 429-448.
- Nakayama, T., Homma, Y., Hashidoko, Y., Mizutani, J., & Tahara, S. (1999). Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4334-4339.
- Nanda, M., Kumar, V., & Sharma, D. K. (2019). Multimetal tolerance mechanisms in bacteria: The resistance strategies acquired by bacteria that can be exploited to 'clean-up' heavy metal contaminants from water. *Aquatic Toxicology*, 212, 1-10.
- Naqqash, T., Imran, A., Hameed, S., Shahid, M., Majeed, A., Iqbal, J., Hanif, M. K., Ejaz, S., & Malik, K. A. (2020). First report of diazotrophic *Brevundimonas* spp. as growth enhancer and root colonizer of potato. *Scientific Reports*, 10(1), 12893
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265-270,
- Nriagu, J., & Pacyna, J. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 333(6169), 134–139.
- Okazaki, K., Tsurumaru, H., Hashimoto, M., Takahashi, H., Okubo, T., Ohwada, T., Minamisawa, K., & Ikeda, S. (2021). Community analysis-based screening of plant growth-promoting bacteria for sugar beet. *Microbes and environments*, 36(2), ME20137.
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 197.

- Orhan, F. (2016). Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(3), 621-627.
- Orozco-Mosqueda, M. D. C., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2020). ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops. *Microbiological Research*, 235, 126439.
- Ospino, M. C., Kojima, H., & Fukui, M. (2019). Arsenite oxidation by a newly isolated Betaproteobacterium possessing arx genes and diversity of the arx gene cluster in bacterial genomes. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1210.
- Páez-Espino, D., Tamames, J., de Lorenzo, V., & Cánovas, D. (2009). Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals*, 22(1), 117-130.
- Passari, A. K., Upadhyaya, K., Singh, G., Abdel-Azeem, A. M., Thankappan, S., Uthandi, S., ... & Singh, B. P. (2019). Enhancement of disease resistance, growth potential, and photosynthesis in tomato (*Solanum lycopersicum*) by inoculation with an endophytic actinobacterium, *Streptomyces thermocarboxydus* strain BPSAC147. *PloS one*, 14(7), e0219014.
- Patel, T., & Saraf, M. (2017). Exploration of novel plant growth promoting bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* MTP42 isolated from the rhizospheric soil of *Coleus forskohlii*. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 6, 944-955.
- Patra, D. K., Pradhan, C., & Patra, H. K. (2020). Toxic metal decontamination by phytoremediation approach: Concept, challenges, opportunities and future perspectives. *Environmental Technology & Innovation*, 18, 100672.
- Penrose, D. M., & Glick, B. R. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia plantarum*, 118(1), 10-15.
- Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S., & Fernández, F. J. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of microbiological methods*, 70(1), 127-131.
- Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of phosphorous in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, 362-370.
- Rascio, N., & Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting?. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 180(2), 169-181.
- Rebi, A., Kashif, H. M., Chaudhry, U. F., Zaib, M., Shahid, M. Z., Safdar, M., et al. (2022). Phosphorus availability in soil and uptake by maize from rock

phosphate inoculated with PGPR: A review. *NVEO-NATURAL VOLATILES & ESSENTIAL OILS Journal*. NVEO, 341-355.

- Rosen, B. B. (1996). Bacterial resistance to heavy metals and metalloids. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 1(3), 273-277.
- Rosen B. P. (2002). Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS letters*, 529(1), 86–92.
- Rosen, B. P., & Liu, Z. (2009). Transport pathways for arsenic and selenium: a minireview. *Environment International*, 35(3), 512-515.
- Saha, R., Saha, N., Donofrio, R. S., & Bestervelt, L. L. (2013). Microbial siderophores: a mini review. *Journal of basic microbiology*, 53(4), 303–317.
- Santini, J. M., & vanden Hoven, R. N. (2004). Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26. *Journal of bacteriology*, 186(6), 1614–1619.
- Santoyo, G., Equihua, A., Flores, A., Sepulveda, E., Valencia-Cantero, E., Sanchez-Yañez, J. M., et al. (2019). Plant growth promotion by ACC deaminase-producing Bacilli under salt stress conditions. In *Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol* (pp. 81-95). Springer Nature Switzerland AG.
- Satyapal, G. K., Rani, S., Kumar, M., & Kumar, N. (2016). Potential role of arsenic resistant bacteria in bioremediation: current status and future prospects. *J Microb Biochem Technol*, 8(3), 256-258.
- Scavino, A. F., & Pedraza, R. (2013). The role of siderophores in plant growth-promoting bacteria. *Environmental Science, Biology*.
- Schoch CL, Ciufu S, Domrachev M, Hotton CL, Kannan S, Khovanskaya R, Leipe D, Mcveigh R, O'Neill K, Robbertse B, Sharma S, Soussov V, Sullivan JP, Sun L, Turner S, Karsch-Mizrachi I.(2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, 2020.
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), 47-56.
- Shahid, M., Singh, U. B., Khan, M. S., Singh, P., Kumar, R., Singh, R. N., ... & Singh, H. V. (2023). Bacterial ACC deaminase: Insights into enzymology, biochemistry, genetics, and potential role in amelioration of environmental stress in crop plants. *Frontiers in microbiology*, 14, 1132770.
- Sharma, M., Khurana, H., Singh, D. N., & Negi, R. K. (2021). The genus *Sphingopyxis*: Systematics, ecology, and bioremediation potential-A review. *Journal of Environmental Management*, 280, 111744.

- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2, 1-14.
- Singh, R. P., & Jha, P. N. (2017). The PGPR *Stenotrophomonas maltophilia* SBP-9 Augments Resistance against Biotic and Abiotic Stress in Wheat Plants. *Frontiers in microbiology*, 8, 1945.
- Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Arsenic contamination, consequences and remediation techniques: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 112, 247-270.
- Singh, N., Marwa, N., Mishra, S. K., Mishra, J., Verma, P. C., Rathaur, S., & Singh, N. (2016). *Brevundimonas diminuta* mediated alleviation of arsenic toxicity and plant growth promotion in *Oryza sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 125, 25-34.
- Singh, T., & Singh, D. K. (2019). Rhizospheric Microbacterium sp. P27 showing potential of lindane degradation and plant growth promoting traits. *Current Microbiology*, 76, 888-895.
- Smedley, P. L., & Kinniburgh, D. G. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, 17(5), 517-568.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425-448.
- Suhadolnik, M.L.S., Salgado, A.P.C., Scholte, L.L.S. *et al.* (2017). Novel arsenic-transforming bacteria and the diversity of their arsenic-related genes and enzymes arising from arsenic-polluted freshwater sediment. *Scientific reports*, 7(1), 11231.
- Suleimanova A, Bulmakova D, Sokolnikova L, Egorova E, Itkina D, Kuzminova O, Gizatullina A, Sharipova M. (2023). Phosphate solubilization and plant growth promotion by *Pantoea brenneri* soil isolates. *Microorganisms*, 11(5), 1136.
- Szyttenholm, J., Chaspoul, F., Bauzan, M., Ducluzeau, A. L., Chehade, M. H., Pierrel, F., Denis, Y., Nitschke, W., & Schoepp-Cothenet, B. (2020). The controversy on the ancestral arsenite oxidizing enzyme; deducing evolutionary histories with phylogeny and thermodynamics. *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics*, 1861(10), 148252.
- Takahashi, Y., Minamikawa, R., Hattori, K. H., Kurishima, K., Kihou, N., & Yuita, K. (2004). Arsenic behavior in paddy fields during the cycle of flooded

- and non-flooded periods. *Environmental Science & Technology*, 38(4), 1038-1044.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731-2739.
 - Tang, D., Liu, M. Y., Zhang, Q., Ma, L., Shi, Y., & Ruan, J. (2020). Preferential assimilation of NH₄⁺ over NO₃⁻ in tea plant associated with genes involved in nitrogen transportation, utilization and catechins biosynthesis. *Plant Science*, 291, 110369.
 - Tang, J., Li, Y., Zhang, L., Mu, J., Jiang, Y., Fu, H., Zhang, Y., Cui, H., Yu, X., & Ye, Z. (2023). Biosynthetic pathways and functions of indole-3-acetic acid in microorganisms. *Microorganisms*, 11(8), 2077.
 - Tang, J., Zhang, H., Yang, L., Chen, X., & Zhou, W. (2023). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Mechanisms and applications in plant-microbe interaction. *Frontiers in Microbiology*, 14, 106789
 - Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876-4882.
 - Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2022). Bacterial siderophores: Classification, biosynthesis, perspectives of use in agriculture. *Plants*, 11(22), 3065.
 - Tsai, S. L., Singh, S., & Chen, W. (2009). Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(6), 659-667.
 - Utomo, W. P., Wu, H., & Ng, Y. H. (2022). Quantification methodology of ammonia produced from electrocatalytic and photocatalytic nitrogen/nitrate reduction. *Energies*, 16(1), 27.
 - Valverde, A., González-Tirante, M., Medina-Sierra, M., Santa-Regina, I., García-Sánchez, A., & Igual, J. M. (2011). Diversity and community structure of culturable arsenic-resistant bacteria across a soil arsenic gradient at an abandoned tungsten-tin mining area. *Chemosphere*, 85(1), 129-134.
 - Van Belkum, A. L. E. X., Sluijter, M., de Groot, R. O. N. A. L. D., Verbrugh, H., & Hermans, P. W. (1996). Novel BOX repeat PCR assay for high-resolution typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(5), 1176-1179.

- Van Lis, R., Nitschke, W., Duval, S., & Schoepp-Cothenet, B. (2013). Arsenics as bioenergetic substrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(2), 176-188.
- Vaughan, G. T. (1993). Investigation Report CET/LHIR148: The environmental chemistry and fate of arsenical pesticides in cattle tick dip sites and banana plantations. *CSIRO, Division of Coal and Energy Technology, Centre for Advances Analytical Chemistry*.
- Vega, L., Styblo, M., Patterson, R., Cullen, W., Wang, C., & Germolec, D. (2001). Differential effects of trivalent and pentavalent arsenicals on cell proliferation and cytokine secretion in normal human epidermal keratinocytes. *Toxicology and applied pharmacology*, 172(3), 225–232.
- Wagi, S., & Ahmed, A. (2019). *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. *PeerJ*, 7, e7258.
- Wang, L., Ji, B., Hu, Y., Liu, R., & Sun, W. (2017). A review on in situ phytoremediation of mine tailings. *Chemosphere*, 184, 594-600.
- Wang, Y., Narayanan, M., Shi, X., Chen, X., Li, Z., Natarajan, D., & Ma, Y. (2022). Plant growth-promoting bacteria in metal-contaminated soil: Current perspectives on remediation mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 13, 966226.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.
- WHO (2001). Arsenic and Arsenic Compounds (Environmental Health Criteria 224), 2nd ed. Geneva: World Health Organization, International Programme on Chemical Safety
- WHO Regional Office for Europe (2000). Air Quality Guidelines Second Edition, Copenhagen, Denmark.
- FAO/WHO (2011). Report of the joint FAO/WHO expert consultation on the risks and benefits of fish consumption. WHO/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Geneva/ Rome, p 50
- Yadav, J., et al. (2022). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRS) and their mechanisms of action. *Biotica Research Today*, 4(2), 103–105.
- Yang, C. H., & Crowley, D. E. (2000). Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and environmental microbiology*, 66(1), 345-351.

- Yan, G., Chen, X., Du, S., Deng, Z., Wang, L., & Chen, S. (2019). Genetic mechanisms of arsenic detoxification and metabolism in bacteria. *Current genetics*, 65, 329-338.
- Yan, H., Gao, Y., Wu, L., Wang, L., Zhang, T., Dai, C., Xu, W., Feng, L., Ma, M., Zhu, Y. G., & He, Z. (2019). Potential use of the *Pteris vittata* arsenic hyperaccumulation-regulation network for phytoremediation. *Journal of hazardous materials*, 368, 386–396.
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(5), 1613-1617.
- Yu, X., Ai, C., Xin, L., & Zhou, G. (2011). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47(2), 138-145.
- Zaidi, A., Khan, M. S., Ahemad, M., & Oves, M. (2009). Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 56(3), 263-284.
- Zhang, B. X., Li, P. S., Wang, Y. Y., Wang, J. J., Liu, X. L., Wang, X. Y., & Hu, X. M. (2021). Characterization and synthesis of indole-3-acetic acid in plant growth promoting *Enterobacter* sp. *RSC Advances*, 11(50), 31601-31607.
- Zhang Y, Zhao S, Liu S, Peng J, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Chen Y, Shen Z, Xu X, Chen C.(2022). Enhancing the phytoremediation of heavy metals by combining hyperaccumulator and heavy metal-resistant plant growth-promoting bacteria. *Frontiers in Plant Science*, 13, 912350.
- Zhao, F., Han, Y., Shi, H., Wang, G., Zhou, M., & Chen, Y. (2023). Arsenic in the hyperaccumulator *Pteris vittata*: A review of benefits, toxicity, and metabolism. *Science of The Total Environment*, 165232.
- Zuzolo, D., Cicchella, D., Albanese, S., Dinelli, E., Giaccio, L., Lima, A., & De Vivo, B. (2020). Arsenic: Geochemical distribution and age-related health risk in Italy. *Environmental Research*, 182.