

La tecnologia del *MicroArray* fenotipico

INTRODUZIONE

Il *fenotipo* è l'insieme dei caratteri che l'individuo manifesta: dipende dal suo genotipo, dalle interazioni fra geni e anche da fattori esterni. Lo studio dei caratteri fenotipici dei microrganismi viene tradizionalmente effettuato tramite esperimenti allestiti *ad hoc*, che hanno lo scopo di valutare la capacità del microrganismo di crescere in differenti condizioni e di rispondere a parametri ambientali. Il maggiore limite associato a questi approcci è la loro bassa "processività". Oggi grazie a un'evoluzione del sistema di identificazione microbica Biolog-ID, prodotto dall'azienda Biolog, è disponibile una tecnologia innovativa definita *MicroArray* fenotipico che offre la straordinaria possibilità di ottenere una rapida e ampia caratterizzazione fenotipica dei microrganismi permettendo di saggiare contemporaneamente fino a 2000 caratteri fenotipici quali l'utilizzazione di fonti di carbonio/energia, di fonti di azoto, di zolfo e di fosforo; la tolleranza al pH e agli osmoliti, la sensibilità a innumerevoli sostanze chimiche. Il *MicroArray* fenotipico fornisce quindi una descrizione fenotipica estremamente dettagliata delle caratteristiche funzionali di un microrganismo.

La tecnologia del *MicroArray* fenotipico, come l'approccio Biolog-ID, si basa sull'impiego di micropiastre a 96 pozzetti ciascuno dei quali rappresenta un saggio fenotipico. L'esito del saggio viene valutato mediante lo sviluppo del colore dovuto al viraggio di un indicatore di potenziale redox, il violetto di tetrazolio; cellule metabolicamente attive creano le condizioni affinché il violetto

* Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, sezione di Microbiologia e Laboratorio Genexpress, Università degli Studi di Firenze

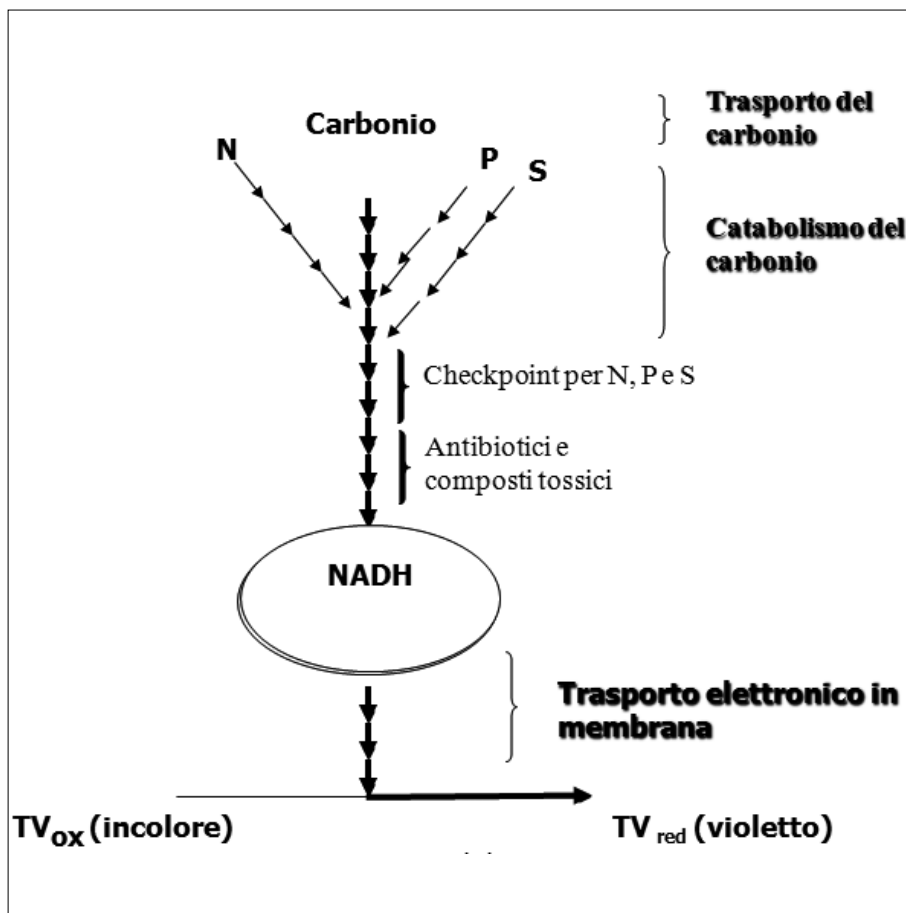


Fig. 1 Riduzione del violetto di tetrazolio. Il catabolismo di una fonte di carbonio volto alla produzione di NADH genera un flusso di elettroni che riducendo il violetto di tetrazolio (VT), determina lo sviluppo del colore viola. La velocità con cui si sviluppa il colore è direttamente correlata al metabolismo. Molte cellule riducono il catabolismo delle fonti di carbonio se non hanno sufficiente disponibilità di azoto (N), fosforo (P) e zolfo (S), consentendo di misurare il flusso del catabolismo delle fonti di azoto, fosforo e zolfo. Inoltre composti chimici che interferiscono con il metabolismo possono ridurre il flusso elettronico e quindi lo sviluppo di colore (da Bochner 2009, modificata)

di tetrazolio venga trasformato da una forma ossidata incolore in una forma ridotta di colore violetto (fig. 1).

Le micropiastre, una volta inoculate con una sospensione cellulare standardizzata, vengono incubate all'interno di un apparato denominato Omni-log che ha la duplice funzione di incubatore e di lettore di piastre. Lo stru-

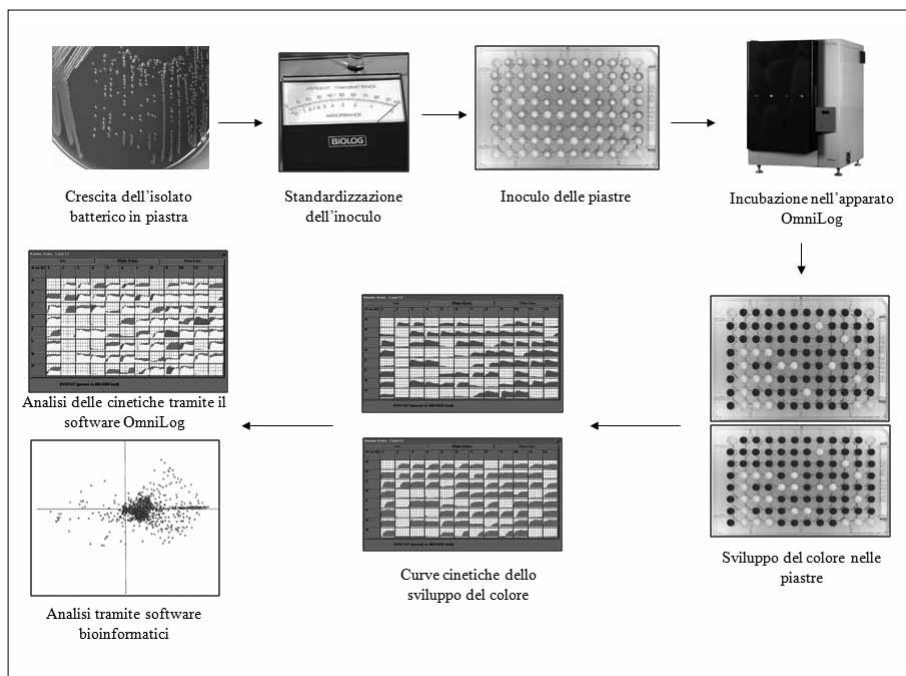


Fig. 2 Fasi sperimentali della tecnologia del MicroArray fenotipico. A partire dall'isolato batterico (o più in generale microbico) cresciuto in piastra, viene preparata una sospensione cellulare standardizzata da inoculare nei pozzetti delle micropiastre Biolog. Le micropiastre inoculate vengono incubate nell'apparato Omnilog che registra lo sviluppo del colore ogni 15 minuti tramite una fotocamera, il software associato trasforma i dati dello sviluppo del colore in curve cinetiche. Il software consente inoltre di paragonare le curve cinetiche ottenute da due esperimenti indipendenti. In alternativa i dati relativi alle cinetiche possono essere analizzati mediante software bioinformatici

mento acquisisce ogni 15 minuti l'immagine delle micropiastre e un software traduce i dati di intensità di colore ottenuti per ciascun pozzetto in curve cinetiche. Il software associato allo strumento Omnilog fornisce per ciascuna curva cinetica prodotta alcuni importanti parametri, come l'altezza media e l'area della curva, e permette di paragonare tra loro curve cinetiche ottenute in esperimenti diversi. Ad esempio volendo valutare l'effetto della temperatura sul fenotipo di un dato ceppo possono essere paragonate le curve cinetiche di due esperimenti condotti a temperatura diversa, o altrimenti volendo confrontare i fenotipi di due ceppi microbici si può procedere al confronto delle curve cinetiche ottenute per ciascun ceppo. In figura 2 è riportato uno schema delle fasi sperimentali della tecnologia del *MicroArray* fenotipico.

| MICROPIASTRE PM | SAGGIO FENOTIPICO | NUMERO DEI SAGGI |
|-----------------|--|--------------------------|
| PM01-PM02 | Utilizzazione di fonti di carbonio | 190 |
| PM03 | Utilizzazione di fonti di azoto | 95 |
| PM04 | Utilizzazione di fonti di fosforo e zolfo | 59 (fosforo), 35 (zolfo) |
| PM05-PM08 | Utilizzazione di peptidi come fonte di azoto | 285 |
| PM09 | Sensibilità agli osmoliti | 96 |
| PM10 | Sensibilità al pH | 96 |
| PM11-PM20 | Sensibilità a composti tossici | 960 |

Tab. 1 *Saggi fenotipici delle micropiastre del MicroArray fenotipico attualmente commercializzate per lo studio di batteri*

Le micropiastre per ottenere il *MicroArray* fenotipico batterico sono riportate in tabella 1. Una dettagliata descrizione dei composti contenuti nelle piastre del *MicroArray* fenotipico può essere ottenuta dal sito web dell'azienda Biolog alla pagina <http://www.biolog.com/pmMicrobialCells.html>.

I VANTAGGI DI MISURARE LA RESPIRAZIONE INVECE DELLA CRESCITA

La tecnologia del *MicroArray* fenotipico, come precedentemente descritto, usa un marcatore di potenziale redox per misurare la respirazione. Perché è stato scelto di misurare la respirazione invece della crescita? Ci sono almeno tre ragioni (Bochner 2009): la misurazione della respirazione è un metodo più sensibile rispetto alla crescita per misurare un fenotipo; la misurazione della respirazione consente la valutazione di più fenotipi, includendo anche quelli che non portano a crescita (ad esempio *E. coli* possiede una via per la utilizzazione del formiato, tramite una deidrogenasi, che può essere messa in evidenza mediante la misurazione della respirazione ma non attraverso la valutazione della crescita); tramite la misurazione della respirazione possono essere messi in evidenza fenotipi di cellule che non possono essere coltivate in axenicità (ad esempio ceppi appartenenti a *Coxiella burnetii* sono stati caratterizzati dopo recupero da cellule ospiti di mammifero rotte meccanicamente (Bochner et al., 2008).

Le principali limitazioni nell'impiego della tecnologia del *MicroArray* fenotipico sono legate allo studio di microrganismi che sono poco attivi o che crescono molto lentamente o che hanno esigenze colturali estreme. Tempi d'incubazione lunghi, specialmente in presenza di alte temperature, portano all'essiccamento dei pozzetti con cambiamento di concentrazione dei reagenti nei pozzetti e alterazione delle condizioni iniziali. Inoltre ad alte temperature il marcatore di potenziale redox può virare per cause abiotiche e a temperatu-

re superiori agli 80 °C la plastica delle piastre si può alterare. Elevate concentrazioni di sali nel mezzo, necessarie per la crescita di microrganismi alofili, possono interferire con la risposta del marcatore di potenziale redox portando a precipitazione dei reagenti. Anche alti o bassi valori di pH interferiscono con i saggi: nel primo caso si può avere la riduzione abiotica del marcatore di potenziale redox mentre nel secondo si può avere l'inibizione o anche il completo blocco della riduzione del marcatore di potenziale redox.

PERCHÉ DETERMINARE IL FENOTIPO IN MODO GLOBALE?

La tecnologia del *MicroArray* fenotipico, al pari delle tecnologie del DNA microarray e della proteomica che consentono di saggiare il livello di espressione di migliaia di geni o proteine, è l'unica tecnologia ad alta processività che permette di misurare quantitativamente migliaia di fenotipi cellulari tutti in una volta. Se l'analisi molecolare (genomica e proteomica) consente di speculare sulle funzioni di geni e proteine senza alcuna garanzia che i cambiamenti siano davvero significativi per la cellula, la tecnologia del *MicroArray* fenotipico, tecnologia complementare alle precedenti, fornisce informazioni a livello cellulare (fig. 3). Quindi al pari delle altre tecnologie "omiche" la caratterizzazione dei microrganismi tramite il *MicroArray* fenotipico può essere definita fenomica.

La fenomica è stata applicata con successo a differenti campi della ricerca: dallo studio della funzione dei geni a studi di patogenicità e di epidemiologia, dallo studio della diversità biologica e della tassonomia dei batteri allo sviluppo di processi bioindustriali e in "system biology". Recentemente è stata proposta per applicazioni di tipo ecologico.

Applicazioni nello studio della funzione dei geni

L'approccio classico per studiare la funzione di un gene è quello di inattivarlo per poi verificare l'effetto di tale inattivazione sul fenotipo del microrganismo. Attraverso la comparazione delle cinetiche ottenute mediante la tecnologia del *MicroArray* fenotipico è possibile evidenziare differenze del mutante verso il ceppo selvaggio (fig. 4). Sono stati pubblicati numerosi esempi che documentano il successo dell'uso della tecnologia del *MicroArray* fenotipico per valutare l'effetto di una mutazione sul fenotipo di un microrganismo. Molti dei geni indagati hanno funzioni regolatorie (Pruess et al., 2003; Ka-

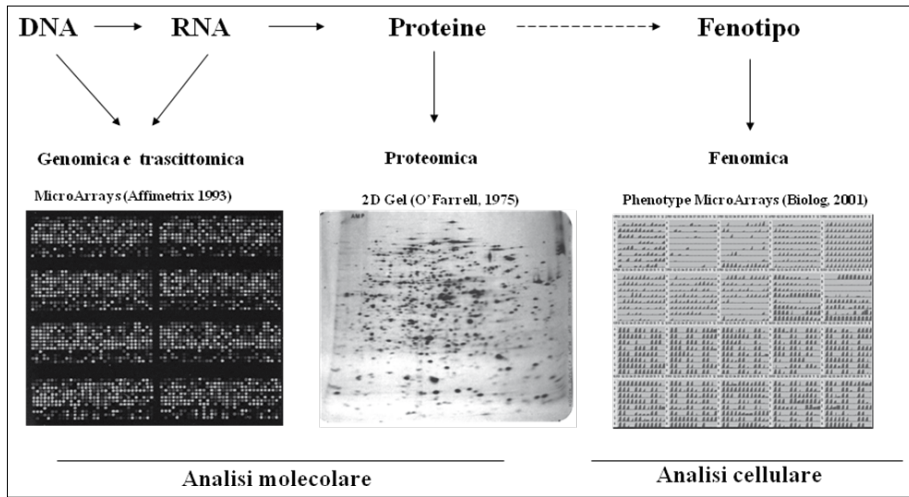


Fig. 3 La tecnologia dei DNA MicroArray e quella della proteomica, coadiuvate dalla crescente quantità di informazioni ottenute dall'attività di sequenziamento dei genomi, hanno permesso di approfondire le conoscenze sui meccanismi genetici coinvolti in molti processi cellulari in procarioti ed eucarioti. Queste tecnologie si basano sull'analisi globale di macromolecole fondamentali per la cellula quali DNA, RNA e proteine. Tuttavia in questo flusso di informazioni manca il passaggio finale che è la manifestazione fenotipica di variazioni evidenziate a livello genomico o proteomico. Vi è quindi la necessità di completare le informazioni ottenute dall'analisi molecolare con informazioni di tipo cellulare come quelle ottenute mediante l'applicazione della tecnologia del MicroArray fenotipico

patral et al., 2004; Shakarji et al., 2006; Jones et al., 2007; Li & Lu, 2007; Mascher et al., 2007; Bailey et al., 2008; Perkins & Nicholson, 2008; Zhang & Rainey, 2008,) o sono legati alla sintesi di enzimi (Koo et al., 2004; Van Dyk et al., 2004; Biswas & Biswas, 2005; Lee et al., 2005, 2007; von Eiff et al., 2006; Chen et al., 2007; Bailey et al., 2008). In alcuni casi tramite la tecnologia del *MicroArray* fenotipico è stato possibile attribuire un ruolo a geni a funzione sconosciuta (Chouikha et al., 2006; Erol et al., 2006; Loh et al., 2006; Viti et al., 2009).

Applicazioni nello studio della patogenicità e della epidemiologia

Lo studio del fenotipo dei microrganismi patogeni riveste un'importanza cruciale nella comprensione della loro epidemiologia perché molto spesso a fronte di una similarità genetica molto elevata corrispondono differenze importanti di patogenicità. Un esempio è quello relativo agli studi condotti

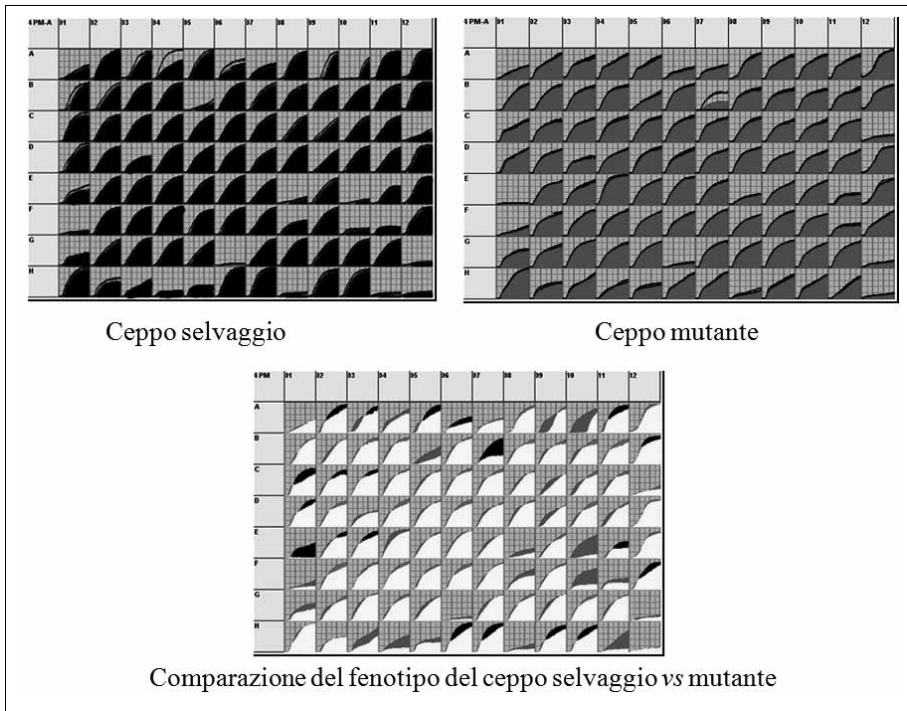


Fig. 4 *Profili fenomici di due ceppi (batterici ceppo selvaggio vs mutante). Ogni riquadro corrisponde a un saggio fenotipico. I colori nero e grigio indicano rispettivamente le curve cinetiche del ceppo selvaggio e del mutante. Il colore bianco indica sovrapposizione delle curve cinetiche dei due ceppi*

su due ceppi di *Salmonella enterica* serovar Enteritidis aventi un'identità genomica del 99,99 % ma peculiari proprietà patogenetiche: la tecnologia del *MicroArray* fenotipico ha mostrato, a fronte di mancanza di differenze rilevabili mediante metodi di tipizzazione genetica, differenze nei profili fenotipici che hanno fornito informazioni essenziali per individuare le basi genetiche di alcuni fattori di patogenicità (Guard-Boulin et al., 2004; Morale et al., 2005 e 2006). Oltre agli studi condotti su ceppi appartenenti al genere *Salmonella* molti altri gruppi di batteri patogeni sono stati analizzati mediante la tecnologia del *MicroArray* fenotipico tra i quali *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *P. syringae*, *Enterobacter* (adesso *Cronobacter*) *sakazakii*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium* sp., *Coxiella burnetii*, e *Legionella pneumophila* (Bochner et al., 2008; Viti et al., 2008; Bochner 2009).

Applicazioni nello studio della diversità e della tassonomia

La tecnologia del *MicroArray* fenotipico ha dato un importante contributo al miglioramento delle condizioni di coltivabilità di microrganismi recalcitranti alla crescita in laboratorio o che crescono lentamente. Tale tecnologia, infatti, permettendo di valutare l'attività di un microrganismo in 1920 condizioni differenti di crescita (ogni test può essere considerato una coltura di arricchimento differente), consente di individuare le condizioni migliori per la crescita di un microrganismo. La ditta Biolog, che commercializza il sistema del *MicroArray* fenotipico, ha sviluppato protocolli per l'analisi di più di 1000 specie batteriche. L'enorme quantità di dati fenotipici resi disponibili dalla messa a punto dei protocolli sono stati utilizzati a fini tassonomici per lo sviluppo del sistema di identificazione batterico universale per batteri Gram-positivi e Gram-negativi chiamato GEN III Micro-Plate. Il sistema consiste di 94 saggi selezionati sulla base delle risposte ottenute per tutti i gruppi batterici valutati sui 1920 saggi delle piastre del *MicroArray* fenotipico che sono risultati i più informativi ai fini tassonomici (Franco-Buff et al., 2008).

Applicazioni per il miglioramento di processi biotecnologici

L'approccio del *MicroArray* fenotipico, grazie all'elevata processività che lo contraddistingue, può fornire le informazioni necessarie per evidenziare le potenzialità di un microrganismo da applicare in processi biotecnologici. Per esempio il *MicroArray* fenotipico è stato utilizzato per migliorare la produzione di cellulasi, N-acetylglucosaminidasi, e chitinasi tramite funghi (Druzhi-nina et al., 2006; Seidl et al., 2006; Nagy et al., 2007) e proposto per la selezione di batteri da impiegare in processi di biorisanamento di ambienti contaminati (Viti et al., 2007).

Applicazione nella system biology

Lo sviluppo di sistemi ad alta processività per l'analisi dei fenomeni biologici ha permesso l'affermarsi di una nuova branca della biologia: la *system biology*. La *system biology* è una disciplina biologica che studia gli organismi viventi in quanto sistemi, in una ottica olistica anziché riduzionistica, unendo le conoscenze acquisibili tramite l'applicazione di approcci genomici, proteomici, trascrittomici e recentemente fenomici. Negli ultimi anni sono stati pubbli-

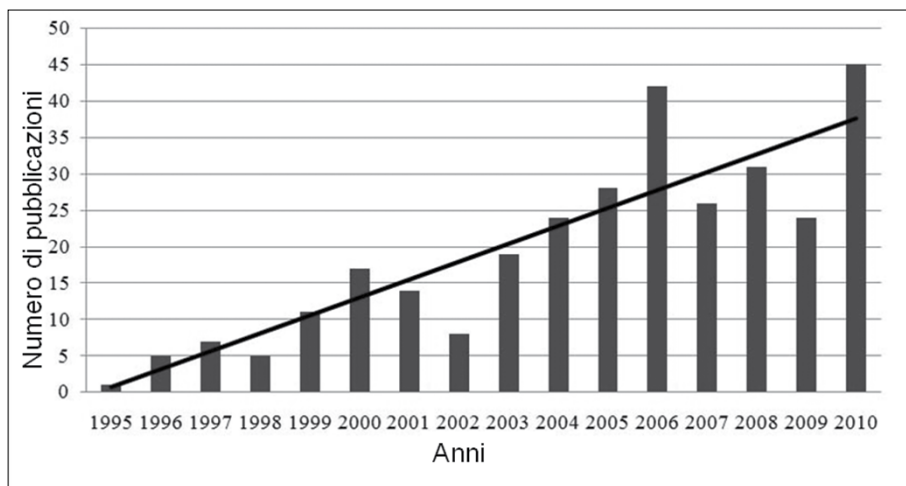


Fig. 5 Numero di pubblicazioni rilevate per gli anni 1995-2010 sulla banca dati Scopus impostando nella stringa di ricerca la parola "CLPP"

cati diversi lavori nei quali i dati ottenuti tramite l'approccio del *MicroArray* fenotipico sono stati utilizzati per valutare e migliorare i modelli elaborati per descrivere i sistemi biologici (Covert et al., 2004; Feist et al., 2007; Jones et al., 2007; Mols et al., 2007; Oh et al., 2007; Oberhardt et al., 2008).

Applicazione in studi di ecologia microbica

Un ampio ventaglio di tecnologie molecolari e non molecolari è stato utilizzato per lo studio dell'ecologia microbica, e l'approccio Community Level Physiological Profiling (CLPP), sistema che si basa sullo stesso principio del *MicroArray* fenotipico, è divenuto una delle più popolari tecniche non molecolari per la caratterizzazione e la rilevazione di alterazioni nelle comunità batteriche eterotrofe.

Il continuo incremento dell'uso della tecnologia CLPP per studi di tipo ambientale ed ecologico (fig. 5) è dato dalla possibilità di determinare in modo veloce ed efficiente l'utilizzo, da parte della comunità microbica del suolo, di fonti carbonio diverse (Garland, 1996a; Garland, 1996b; Insam et al., 1996; Hitzl et al., 1997; Glimm et al., 1997; Verschuere et al., 1997; Engelen et al., 1998; Konopka et al., 1998; Weber e Legge 2011).

La tecnica si basa sull'inoculazione, con sospensioni cellulari estratte dai suoli, di piastre a 96 pozzetti contenenti fonti di carbonio diverse e sulla successiva va-

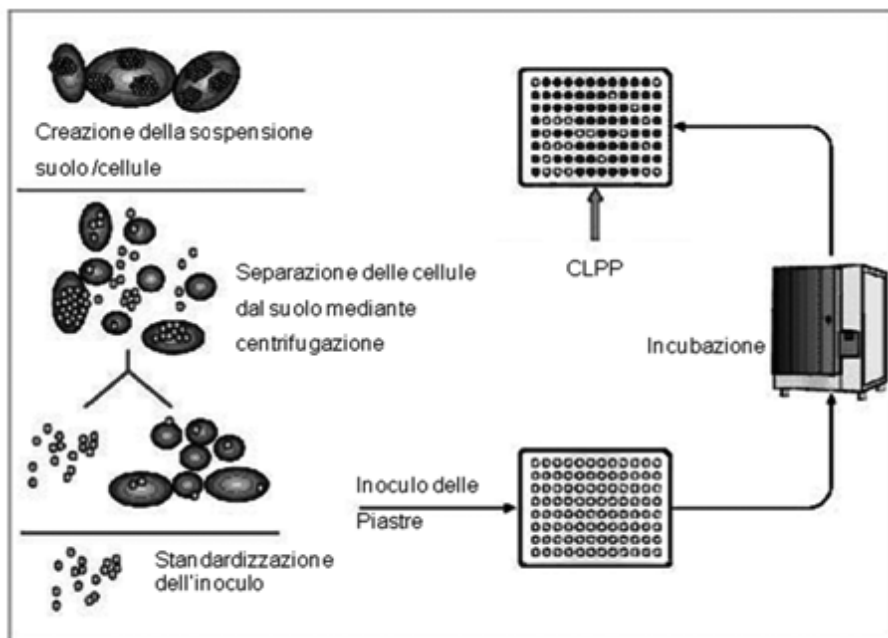


Fig. 6 Rappresentazione schematica delle fasi per l'ottenimento Community Level Physiological Profiling (CLPP)

lutazione, attraverso il controllo dello sviluppo del colore viola dovuto al viraggio dell'indicatore redox (fig. 6), dell'utilizzazione delle fonti di carbonio da parte dei microrganismi inoculati. Sebbene non sia chiaro come l'approccio CLPP possa essere utilizzato per ottenere informazioni sulla biodiversità e sulla funzionalità della microflora del suolo, questo approccio è considerato come uno dei più validi per stabilire se differenti campioni di suolo contengano comunità microbiche con profili metabolici uguali o distinti (Konopka et al., 1998).

Recentemente l'applicazione della tecnologia del *MicroArray* fenotipico è stata ipotizzata anche per lo studio dell'ecologia microbica (Salles et al., 2010). Fino ad oggi, per l'ottenimento dei CLPP sono state impiegate piastre che contengono un limitato numero di saggi fenotipici (da un minimo di 32 a un massimo di 95) basati esclusivamente sull'utilizzazione di fonti di carbonio. Pertanto la possibilità di aumentare in modo significativo i saggi fenotipici applicabili alla caratterizzazione delle comunità microbiche (oltre alle fonti di carbonio, include fonti di azoto, fonti di fosforo, fonti di zolfo, risposta a stress osmotici e di pH, sensibilità a centinaia di antibiotici, antimetaboliti, metalli pesanti etc.), procurerebbe un quadro molto più informativo sulle caratteristiche funzionali della

comunità microbiche rispetto alle tradizionali piastre fino ad oggi impiegate. Per raggiungere tale obiettivo uno sforzo importante dovrà essere fatto per stabilire le condizioni ottimali per l'applicazione della tecnologia del *MicroArray* fenotipico alla caratterizzazione delle comunità microbiche al fine di poter ottenere risultati riproducibili e poter sviluppare software statistici evoluti, così come è stato fatto per le analisi di tipo molecolare, che consentano l'analisi dell'enorme quantità di dati prodotti dalla tecnologia del *MicroArray* fenotipico. Inoltre, la possibilità di correlare i dati ottenuti dall'analisi fenomica con quelli ottenuti tramite approcci genomici e proteomici, consentirà la caratterizzazione di comunità microbiche complesse, come quelle del suolo, in un'ottica polifasica, così come oggi si rende necessario data la consapevolezza che ogni approccio utilizzato per studi di ecologia microbica presenta pregi e limiti.

RINGRAZIAMENTI

Gli Autori sono grati all'Ente Cassa di Risparmio di Firenze per il contributo dato per la realizzazione del laboratorio di Genomica, Proteomica e Fenomica Genexpress.

RIASSUNTO

La tecnologia del *MicroArray* fenotipico consente di ottenere un ampio quadro sulle capacità metaboliche di una cellula fornendo informazioni su circa 2000 caratteri fenotipici (permette di saggiare caratteri fenotipici legati al catabolismo e alla biosintesi di composti del carbonio, dell'azoto, del fosforo e dello zolfo; alla presenza di osmoliti; agli effetti degli ioni e di un vasto spettro di composti chimici quali antibiotici, antime-taboliti, inibitori della respirazione e metalli pesanti; all'influenza del pH sulla crescita). I dati conseguibili tramite la tecnologia del *MicroArray* fenotipo, dando informazioni a livello cellulare, integrano e completano quelle ottenute tramite analisi di tipo genomico e/o proteomico. Sebbene questo approccio sia stato utilizzato per studiare microrganismi isolati, oggi c'è una reale possibilità di applicarlo allo studio delle comunità microbiche dei suoli. Gli usi di questa tecnologia per la caratterizzazione fenotipica globale dei microrganismi nei campi della microbiologia di base e applicata sono descritti e discussi.

ABSTRACT

Phenotype MicroArray technology gives a comprehensive scan of the physiology of the cell, testing about 2000 phenotypic characters (the main catabolic pathways in cells for carbon, nitrogen, phosphorus and sulphur, as well as biosynthetic pathways; osmotic and

ions effects on the cell; pH growth range and pH regulation; the sensitivity of the cell to a wide range of chemicals, including antibiotics, antimetabolites, toxic metals). The phenomic data obtained by Phenotype MicroArray technology is a very useful form of information that complements the current information obtained from biochemical and molecular analysis. Although this approach has been used to study isolated microorganisms, today there is a real possibility of using the technology of Phenotype MicroArray to the study of soil communities. The uses of this global phenotyping technology in basic and applied microbiology research are described.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- BAILEY A.M., PAULSEN I.T. & PIDDOCK L.J. (2008): *RamA confers multidrug resistance in Salmonella enterica via increased expression of actB, which is inhibited by chlorpromazine*, «Antimicrob Agents Ch», 52, pp. 3604-3611.
- BISWAS S. & BISWAS I. (2005): *Role of HtrA in surface protein expression and biofilm formation by Streptococcus mutants*, «Infect Immun», 73, pp. 6923-6934.
- BOCHNER B.R. (2009): *Global phenotypic characterization of bacteria*, «FEMS Microbiol Rev», 33, pp. 1919-205.
- BOCHNER B.R., GIOVANNETTI L. & VITI C. (2008): *Important discoveries from analysing bacterial phenotypes*, «Mol Microbiol», 70, pp. 274-280.
- CHEN S., CUI S., McDERMOTT P.F., ZHAO S., WHITE D.G., PAULSEN I. & MENG J. (2007): *Contribution of target gene mutations and efflux to decreased susceptibility of Salmonella enterica Serovar Typhimurium to fluoroquinolones and other antimicrobials*, «Antimicrob Agents Ch», 51, pp. 535-542.
- CHOUIKHA I., GERMON P., BRÉE A., GILOT P., MOULIN-SCHOULEUR M. & SCHOULER C. (2006): *A selC-associated genomic island of the extraintestinal avian pathogenic Escherichia coli strain BEN2908 is involved in carbohydrate uptake and virulence*, «J Bacteriol», 188, pp. 977-987.
- COVERT M.W., KNIGHT E.M., REED J.L., HERRGARD M.J. & PALSSON B.O. (2004): *Integrating high-throughput and computational data elucidates bacterial networks*, «Nature», 429, pp. 92-96.
- DRUZHININA I.S., SCHMOLL M., SEIBOTH B. & KUBICEK C.P. (2006): *Global carbon utilization profiles of wild-type, mutant, and transformant strains of Hypocrea jecorina*, «Appl Environ Microb», 72, pp. 2126-2133.
- EROL I., JEONG K.-C., BAUMLER D.J., VYKHODETS B., CHOI S.H. & KASPAR C.W. (2006): *H-NS controls metabolism and stress tolerance in Escherichia coli O157:H7 that influence mouse passage*, «BMC Microbiol», 6, pp. 72-83.
- FEIST A.M., HENRY C.S., REED J.L., KRUMMENACKER M., JOYCE A.R., KARP P.D., BROADBELT L.J., HATZIMANIKATIS V. & PALSSON B.Ø. (2007): *A genome-scale metabolic reconstruction for Escherichia coli K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information*, «Mol Syst Biol», 3, pp. 121-138.
- FRANCO-BUFF A., GOMEZ V., OLENDER E., GADZINSKI G. & BOCHNER B.R. (2008): *Development of a new test panel for identification of both Gram-negative and Gram-positive bacteria*, ECCMID 2008, Barcelona.
- GARLAND J.L. (1996a): *Analytical approaches to the characterization of samples of microbial*

- communities using patterns of potential C source utilization*, «Soil Biol Biochem», 28, pp. 213-221.
- GARLAND J.L. (1996b): *Patterns of potential C source utilization by rhizosphere communities*, «Soil Biol Biochem», 28, pp. 213-221.
- GLIMM E., HEUER H., ENGELN B., SMALLA K., BACKHAUS H. (1997): *Statistical comparison of community catabolic profiles*, «J. Microbiol Meth», 30, pp. 71-80.
- GUARD-BOULDIN J., GAST R.K., HUMPHREY T.J., HENZLER D.J., MORALES C. & COLES K. (2004): *Subpopulation characteristics of egg contaminating Salmonella enterica serovar Enteritidis as defined by the lipopolysaccharide O chain*, «Appl Environ Microb», 70, pp. 2756-2763.
- HITZL W., RANGGERS R., SHARMA S., INSAM H. (1997): *Separation power of the 95 substrates of the BIOLOG determined in various soils*, «FEMS Microbiol Ecol», 22, pp. 166-174.
- INSAM H., AMOR K., RENNER M., CREPAZ C. (1996): *Changes in functional abilities of microbial community during composting of manure*, «Microb Ecol», 31, pp. 77-87.
- JONES J., STUDHOLME D.J., KNIGHT C.G. & PRESTON G.M. (2007): *Integrated bioinformatic and phenotypic analysis of RpoN-dependent traits in the plant growth-promoting bacterium Pseudomonas fluorescens SBW25*, «Environ Microbiol», 9, pp. 3046-3064.
- KAPATRAL V., CAMPBELL J.W., MINNICH S.A., THOMSON N.R., MATSUMURA P. & PRUESS B.M. (2004): *Gene array analysis of Yersinia enterocolitica FlhD and FlhC: regulation of enzymes affecting synthesis and degradation of carbamoylphosphate*, «Microbiology», 150, pp. 2289-2300.
- KONOPKA A., OLIVER L., TURCO R.F. (1998): *The use of sole carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology*, «Microb Ecol», 35, pp. 103-115.
- KOO B.M., YOON M.J., LEE C.R., NAM T.W., CHOE Y.J., JAFFE H., PETERKOFKY A. & SEOK Y.J. (2004): *A Novel fermentation/respiration switch protein regulated by enzyme IIAGlc in Escherichia coli*, «J Biol Chem», 279, pp. 31613-31621.
- LEE C.-R., KOO B.-M., CHO S.-H., KIM Y.-J., YOON M.-J., PETERKOFKY A. & SEOK Y.-J. (2005): *Requirements of the dephospho-form of enzyme IIANtr for derepression of Escherichia coli K-12 ilvBN expression*, «Mol Microbiol», 58, pp. 334-344.
- LEE C.-R., CHO S.-H., YOON M.-J., PETERKOFKY A. & SEOK Y.-J. (2007): *Escherichia coli enzyme IIANtr regulates the K1 transporter TrkA*, «P Natl Acad Sci USA», 104, pp. 4124-4129.
- LI W. & LU C.-D. (2007): *Regulation of carbon and nitrogen utilization by CbrAB and NtrBC two-component systems in Pseudomonas aeruginosa*, «J Bacteriol», 189, pp. 5413-5420.
- LOH K.D., GYANESHWAR P., PAPADIMITRIOU E.M., FONG R., KIM K.-S., PARALES R., ZHOU Z., INWOOD W. & KUSTU S. (2006): *A previously undescribed pathway for pyrimidine catabolism*, «P Natl Acad Sci USA», 103, pp. 5114-5119.
- MASCHER T., HACHMANN A.-B. & HELMANN J.D. (2007): *Regulatory overlap and functional redundancy among Bacillus subtilis extracytoplasmic function s factors*, «J Bacteriol», 189, pp. 7500-7511.
- MOLS M., DE BEEN M., ZWIETERING M.H., MOEZELAAR R. & ABE E. (2007): *Metabolic capacity of Bacillus cereus strains ATCC 14579 and ATCC 10987 interlinked with comparative genomics*, «Environ Microbiol», 9, pp. 2933-2944.
- MORALES C.A., PORWOLLIK S., FRYE J.G., KINDE H., MCCLELLAND M. & GUARD-BOULDIN J. (2005): *Correlation of phenotype with the genotype of egg-contaminating Salmonella enterica serovar Enteritidis*, «Appl Environ Microb», 71, pp. 4388-4399.

- MORALES C.A., GAST R. & GUARD-BOULDIN J. (2006): *Linkage of avian and reproductive tract tropism with sequence divergence adjacent to the 5S ribosomal subunit rrfH of Salmonella enterica*, «FEMS Microbiol Lett», 264, pp. 48-58.
- NAGY V., SEIDL V., SZAKACS G., KOMON-ZELAZOWSKA M., KUBICEK C.P. & DRUZHININA I.S. (2007): *Application of DNA bar codes for screening of industrially important fungi: the haplotype of Trichoderma harzianum sensu stricto indicates superior chitinase formation*, «Appl Environ Microb», 73, pp. 7048-7058.
- OBERHARDT M.A., PUCHALKA J., FRYER K.E., MARTINS DOS SANTOS V.A. & PAPIN J.A. (2008): *Genome-scale metabolic network analysis of the opportunistic pathogen Pseudomonas aeruginosa PAO1*, «J Bacteriol», 190, pp. 2790-2803.
- OH Y.K., PALSSON B.O., PARK S.M., SCHILLING C.H. & MAHADEVAN R. (2007): *Genome-scale reconstruction of metabolic network in Bacillus subtilis based on high-throughput phenotyping and gene essentiality data*, «J Biol Chem», 282, pp. 28791-28799.
- PERKINS A.E. & NICHOLSON W.L. (2008): *Uncovering new metabolic capabilities of Bacillus subtilis using phenotype profiling of rifampin-resistant rpoB mutants*, «J Bacteriol», 190, pp. 807-814.
- PRUESS B.M., CAMPBELL J.W., VAN DYK T.K., ZHU C., KOGAN Y. & MATSUMURA P. (2003): *FlhD/FlhC is a regulator of anaerobic respiration and the Entner-Doudoroff pathway through induction of the methyl-accepting chemotaxis protein aer*, «J Bacteriol», 185, pp. 534-543.
- SALLES J.F., MALLON C.A., İNCEOĞLU Ö., VAN ELSA J.D. (2010): *Ecological significance of resource utilization in microbial ecology*, in 2nd Florence Conference on Phenotype MicroArray Analysis of Microorganisms The Environment, Agriculture, and Human Health, Firenze-Italy, September 13-15, p. 35.
- SEIDL V., DRUZHININA I.S. & KUBICEK C.P. (2006): *A screening system for C-sources enhancing beta-N-acetylglucosaminidase formation in Hypocrea atroviridis (Trichoderma atroviride)*, «Microbiology», 152, pp. 2003-2012.
- SHAKARJI L., MIKAEL L.G., SRIKUMAR R., KOBISCH M., COULTON J.W. & JACQUES M. (2006): *FhuA and HgbA, outer membrane proteins of Actinobacillus pleuropneumoniae: their role as virulence determinants*, «Can J Microbiol», 52, pp. 391-396.
- VAN DYK T.K., TEMPLETON L.J., CANTERA K.A., SHARPE P.L. & SARIASLANI F.S. (2004): *Characterization of the Escherichia coli AaeAB efflux pump: a metabolic relief valve?*, «J Bacteriol», 186, pp. 7196-7204.
- VERSCHURE L., FIEVEZ L., VAN VOOREN L., VERSTRAETE W. (1997): *The contribution of individual population to the Biolog pattern of model microbial communities*, «FEMS Microbiol», 24, pp. 353-362.
- VITI C., BOCHNER B.R., GIOVANNETTI L. (2008): *Florence conference on phenotype microarray analysis of microorganisms - The environment, agriculture, and human health*, «Ann Microbiol», 58, pp. 347-349.
- VITI C., DECOROSI F., TATTI E. & GIOVANNETTI L. (2007): *Characterization of chromate-resistant and -reducing bacteria by traditional means and by a high-throughput phenomic technique for bioremediation purposes*, «Biotechnol Progr», 23, pp. 553-559.
- VITI C., DECOROSI F., MINI A., TATTI E., & GIOVANNETTI L. (2009): *Involvement of the oscA gene in the sulphur starvation response and in Cr(VI) resistance in Pseudomonas corrugata* 28, «Microbiology», 155, pp. 95-105.
- VON EIFF C., McNAMARA P., BECKER K., BATES D., LEI X.-H., ZIMAN M., BOCHNER B.R., PETERS G. & PROCTOR R.A. (2006): *Phenotype MicroArray profiling of Staphylo-*

- coccus aureus *menD* and *hemB* mutants with the small-colony-variant phenotype, «J Bacteriol», 188, pp. 687-693.
- WEBER K.P. & LEGGE R.L. (2011): *Dynamics in the bacterial community-level physiological profiles and hydrological characteristics of constructed wetland mesocosms during start-up*, «Ecol Engin» 37, pp. 666-677.
- ZHANG X.-X. & RAINEY P.B. (2008): *Dual Involvement of CbrAB and NtrBC in the regulation of histidine utilization in Pseudomonas fluorescens SBW25*, «Genetics», 178, pp. 185-195.

Finito di stampare in Firenze
presso la tipografia editrice Polistampa
nell'ottobre 2011