

## Caratterizzazione morfologica e biochimica di due batteri alo-alcalofili

P. CASORIA<sup>1</sup>, A. GAMBACORTA<sup>2</sup>, M. P. ALFIERI<sup>1</sup>, M. PROVENZA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze per l'Ambiente, Università degli Studi di Napoli "Parthenope", Via De Gasperi 5, I-80133 Napoli, Italia; <sup>2</sup>Istituto di Chimica Biomolecolare del CNR, Comprensorio Olivetti, Edificio 70, Via Campi Flegrei 34, I-80078 Pozzuoli (Napoli), Italia  
paolo.casoria@libero.it

**Riassunto.** Vengono descritti l'isolamento, la modalità di crescita, la morfologia e vari aspetti della biochimica e fisiologia di due batteri alo-alcalofili raccolti in una sorgente sulfurea nei pressi di Caserta. I dati ottenuti hanno permesso di attribuire uno dei batteri al genere *Bacillus* e l'altro al genere *Halomonas*. Le indagini biochimiche e fisiologiche hanno dimostrato che il batterio attribuito a *Bacillus* produce esopolisaccaride, osmoliti e presenta attività  $\beta$ -glucosidasi e che il batterio attribuito ad *Halomonas* produce osmoliti e poli-idrossibutirrato. Tali composti ed attività fisiologiche sono noti per le loro applicazioni nel campo industriale e delle biotecnologie.

**Abstract.** The paper describes isolation, growth modality, morphology, and several features of biochemistry and physiology of two halo-alkalophilic bacteria from a sulphur spring near Caserta (Italy). Results allowed to attribute one of the two bacterium to *Bacillus* and the other one to *Halomonas*. Biochemical and physiological investigations showed that the bacterium attributed to *Bacillus* produces exopolysaccharides, osmolytes and presents  $\beta$ -glucosidase activity, whereas the bacterium attributed to *Halomonas* produces osmolytes and polyhydroxybutyrate. Such compounds and physiological activities are known for their interest in the fields of industry and biotechnology.

**Key words:** Alkalophilic bacteria, Biotechnology, Exopolysaccharides, Halophilic bacteria, Osmolytes, Polyhydroxybutyrate

### INTRODUZIONE

La biodiversità di batteri estremofili di ambienti alcalini o salini è molto ampia. In questi biotopi tali batteri sono in grado di sopportare alcalinità estrema e concentrazioni elevate di sali (TINDALL 1998). Essi hanno sviluppato meccanismi di resistenza e potenti strategie per adattarsi a tali ambienti; possiedono infatti proteine stabili ed una determinata composizione lipidica, che è alterata nelle catene di tipo alifatiche e nel numero delle cariche nette (KATES 1986). In particolare, gli alo-alcalofili, per conservare la turgidità cellulare, sintetizzano o accumulano soluti organici attraverso una sintesi *de novo* o mediante trasporto. Recentemente è stato dimostrato che questi soluti, appartenenti alla classe degli osmoliti, hanno un effetto generale di protezione sulle proteine con funzione enzimatica. Tale tipo di protezio-

ne è di grande importanza biotecnologica essendo utilizzata per stabilizzare gli enzimi nelle reazioni non propriamente fisiologiche (GALINSKI 1993; KNAPP *et al.* 1999).

In questo lavoro vengono presentati i risultati di uno studio su due batteri alo-alcalofili. Le indagini effettuate hanno riguardato la raccolta, isolamento e caratterizzazione morfologica dei due batteri, nonché varie analisi biochimiche e fisiologiche miranti, tra l'altro, alla ricerca di sostanze potenzialmente utili per una loro applicazione nel campo industriale o delle biotecnologie.

### MATERIALE E METODI

**Sito di campionamento.** Il campionamento è stato effettuato nell'estate 2003 prelevando acqua e fango circostanti una sorgente sulfurea, localmente nota come "Fonte Incaldana",

nei pressi di Mondragone (Provincia di Caserta, Campania, Italia). La sorgente presentava tra l'altro incrostazioni di alghe verdi. Il pH del sito di campionamento è risultato 8,0 e la temperatura di 27 °C. I campioni di fango ed acqua sono stati posti in contenitori sterili e trasferiti in laboratorio.

**Condizioni colturali per la crescita e l'isolamento.** I terreni di coltura utilizzati sono stati preparati secondo ROMANO *et al.* (1991, 1996) (Tab. 1). I mezzi di coltura solidi sono stati preparati con l'aggiunta di 1,8% agar.

L'isolamento è stato eseguito mediante

Tab. 1 – Composizione dei terreni di coltura utilizzati (da: ROMANO *et al.* 1991, 1996)

Terreno di Coltura I	
Yeast extract (Oxoid)	10,0 g/l
Na <sub>3</sub> -citrato (Carlo Erba)	3,0 g/l
KCl (J.T.Baker)	2,0 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Carlo Erba)	1,0 g/l
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O (Applichem)	0,36 mg/l
FeSO <sub>4</sub> (Carlo Erba)	50,0 mg/l
NaCl (Applichem)	100,0 g/l
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Applichem)	3,0 g/l
pH	9,0
Terreno di Coltura Minimo	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Carlo Erba)	0,1 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Applichem)	1,0 g/l
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Applichem)	3,0 g/l
NaCl (Applichem)	100,0 g/l
Tiamina o Biotina (Sigma)	500,0 µg/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma)	7,0 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma)	2,0 g/l
pH	9,0
Terreno di Coltura Arricchito	
NaCl (Applichem)	1,0 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Carlo Erba)	0,097 g/l
CaCl <sub>2</sub> (Sigma)	0,04 g/l
NaNO <sub>2</sub> (Applichem)	2,5 g/l
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Carlo Erba)	1,0 g/l
EDTA (Applichem)	0,08 g/l
FeSO <sub>4</sub> (Carlo Erba)	0,01 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma)	0,51 g/l
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Applichem)	4,0 g/l
NaHCO <sub>3</sub> (Applichem)	13,0 g/l
pH	10,0

diluizioni seriali e piastrazioni successive. La crescita è stata seguita sul terreno di coltura I liquido (Tab. 1) misurando l'assorbanza a 540 nm.

I campioni raccolti alla Fonte Incaldana, inclusa l'acqua sovrastante il fango, sono stati arricchiti in un mezzo selettivo per alo-alcalofili e sono state purificate varie colonie. Da queste sono stati isolati moltissimi microrganismi aerobici, due dei quali, particolarmente abbondanti, da noi denominati ceppo 20AG e ceppo 20bAG, sono stati scelti per un'ulteriore purificazione. Le colture sono state purificate attraverso ripetuti strisci su terreno di coltura arricchito (Tab. 1).

I due ceppi batterici sono stati coltivati a differenti percentuali di NaCl: 0,5, 10, 15, 20%. La temperatura ottimale per la crescita è stata verificata tra 5 e 50 °C. Il pH ottimale di crescita è stato verificato tra 7 e 10. Per tali tre prove è stato utilizzato il terreno di coltura I (Tab. 1).

Per la ricerca del substrato organico meglio utilizzato dai due batteri sono state effettuate prove di crescita su diverse fonti di carbonio utilizzando il terreno minimo (Tab. 1) addizionato, di volta in volta, di 0,1 g/9 ml dei singoli composti riportati nella Fig. 2. I test sono stati condotti inoculando 1 ml di coltura batterica fresca, incubando alle condizioni ottimali di crescita. La crescita veniva considerata positiva quando il valore dell'assorbanza a 540 nm risultava superiore a 0,500.

**Microscopia ottica ed elettronica.** Per l'esame della morfologia delle colonie si è fatto uso di uno stereomicroscopio Leica M8. La morfologia e le dimensioni cellulari sono state determinate con un microscopio in contrasto di fase (Zeiss), un microscopio ottico Nikon Eclipse TE200 e un microscopio elettronico a scansione (SEM) Philips XL20 S con risoluzione 200-300 Å.

**Prove fisiologiche.** La colorazione Gram è stata effettuata secondo DUSSAULT (1955).

I test relativi all'ossidasi e catalasi, della degradazione della tirosina, della sensibilità al lisozima e l'idrolisi della gelatina, della caseina e dell'amido sono stati effettuati utilizzando

il terreno di coltura I (Tab. 1); l'idrolisi dell'ippurato è stata testata nel terreno di coltura I addizionato di ippurato (1 %) (ROMANO *et al.* 1996). Lo stesso terreno di coltura, addizionato di 0,1 % KNO<sub>3</sub> a pH 7,2, è stato utilizzato per il test della riduzione del nitrito e del nitrito.

Per la verifica della produzione dell'esopolisaccaride (EPS) sono stati allestiti tre test, utilizzando il terreno di coltura I (Tab. 1), il mezzo di coltura I addizionato con la fonte di carbonio (1%) d'elezione del microrganismo ed il terreno MY (Yeast extract 10 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 g/l, NaCl 5 g/l, Maltosio 20 g/l, pH 8,0), tutti incubati con 10% di coltura batterica per 24 h. Dopo tale tempo è stato eseguito un secondo passaggio alle stesse condizioni ed incubato per altre 24 h. Dopo 24-48 h le cellule sono state sottoposte a centrifugazione a 8000 rpm per 20 min, il surnatante è stato trattato in imbuto separatore con EtOH 95% (v:v 1:1) e la precipitazione è stata completata a -18 °C overnight. Il precipitato è stato recuperato con centrifugazione a 8000 rpm per 40 min, disciolto in acqua distillata calda con un volume 1/10 del surnatante iniziale ed è stato poi incubato con lenta agitazione a 50 °C overnight. La sospensione è stata centrifugata a 8000 rpm per 20 min per separare l'EPS solubile dalla frazione insolubile, successivamente sottoposta a dialisi contro acqua corrente per 72 h per ottenere l'EPS grezzo, successivamente liofilizzato per determinarne il peso specifico.

L'estrazione del poliidrossibutirrato (PHB) è stata condotta utilizzando un centrifugato di cellule coltivate nel terreno di coltura I (Tab. 1) al 10% dopo 48 ore di incubazione, a cui è stato aggiunto SDS (1:1). Questa miscela è stata incubata per 1 h a 40 °C sotto lenta agitazione, successivamente sterilizzata a 121 °C per 15 min, lasciata a 4 °C overnight, centrifugata a 8000 rpm per 20 min ed il precipitato è stato lavato due volte con acqua distillata e portato a secco in stufa a 60 °C overnight. Il campione secco è stato ripreso con MeOH e sonicato per 10 min; è stato successivamente aggiunto CHCl<sub>3</sub> nella stessa quantità di MeOH e filtrato. È stato infine portato a secco con flusso di N<sub>2</sub> e ripreso con CDCl<sub>3</sub> per l'analisi

spettroscopica.

L'attività enzimatica è stata saggiata utilizzando un omogenato delle cellule precedentemente preparate utilizzando diversi substrati sintetici (10 mM in acqua distillata): β-D-glucopiranoside, β-D-xilopiranoside, β-D-galattopiranoside, α-D-maltoside, α-D-glucopiranoside, α-D-galattopiranoside, β-D-lattopiranoside, α-D-arabinoside. Le prove sono state eseguite utilizzando provette poste in ghiaccio riempite con 100 μl di omogenato, 100 ml di substrato e 800 ml di tampone glicina-NaOH 50 mM, pH 9,0. È stato anche preparato un bianco di riferimento con 100 μl di omogenato e 900 μl di tampone. Il dosaggio è stato effettuato allo spettrofotometro a 420 nm.

L'estrazione, purificazione e quantificazione dei soluti intracellulari (osmoliti) sono state eseguite secondo le procedure di ROMANO *et al.* (1996).

L'analisi dei lipidi è stata effettuata come riportato da ROMANO *et al.* (1996), con le modifiche di seguito indicate. Per la purificazione dei lipidi polari, 4 g delle cellule batteriche liofilizzate sono state coltivate nel terreno di coltura I (Tab. 1) a pH 9,0, a 37 °C, con NaCl 1,8 M, estratte due volte con CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (65:25:4). Gli estratti filtrati sono stati riuniti e concentrati a pressione ridotta. L'estratto grezzo è stato analizzato utilizzando una flash-chromatography su colonna a fase normale (Silica gel 60, 230-400 mesh, MERK) (dimensione della colonna: 20 x 700 mm). I composti sono stati eluiti con solventi a polarità crescente da CHCl<sub>3</sub>/MeOH (65:25) a CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (65:25:4). Le analisi dei lipidi su TLC sono state eseguite secondo il protocollo di ROMANO *et al.* (1996). L'idrolisi dei lipidi è stata realizzata con metanolisi alcalina secondo ROMANO *et al.* (1996). L'identificazione degli esteri metilici dell'acido grasso (FAME) è stata ottenuta mediante il confronto con gli standard e tramite spettrometria di massa. Il rapporto relativo dei lipidi totali, sia polari sia neutri, è stato valutato appesantendo la frazione purificata. L'identificazione degli esteri metilici dell'acido grasso e dei lipidi è stata effettuata secondo ROMANO *et al.* (1996).

La purificazione dei chinoni è stata effettuata partendo da 3 g di cellule batteriche liofi-

lizzate, estratte due volte con esano. Gli estratti filtrati sono stati riuniti e concentrati sotto pressione ridotta. L'estratto grezzo (2 mg) è stato purificato su colonna di Silica gel (230-400 mesh, MERK), utilizzando una miscela esano/AcOEt (96:4 v/v) come eluente. Le frazioni UV-visibili sono state analizzate con LC/MS su una colonna a fase inversa, utilizzando MeOH a 1,2 ml/min come eluente. Le analisi di GC/MS sono state effettuate con un HP5890 plus-5989B, dotato di colonna HP-V con flusso di 45 ml/min. Gli esteri metilici degli acidi grassi (FAME) sono stati rilevati usando il programma di temperatura descritto da NICOLAUS *et al.* (1995). L'analisi LC/MS dei chinoni è stata effettuata utilizzando uno SHIMADZU LC/MS-2010 equipaggiato con colonna 150 x 4,6 mm C<sub>18</sub> (5 µ) (MeOH; 1ml/min). Gli spettri di risonanza magnetica nucleare sono stati ottenuti utilizzando un Bruker AMX-500 (500,13 MHz per <sup>1</sup>H NMR e 125,75 MHz per <sup>13</sup>C NMR).

La sensibilità dei ceppi agli antibiotici è stata esaminata usando il terreno di coltura I (Tab. 1) solidificato e *sensidisc* (diam. 6 mm, Oxoid Italiana), incubando per 48 h secondo ROMANO *et al.* (1993). Sono stati utilizzati i seguenti antibiotici: tetraciclina (30 µg, 50 µg), cloramfenicolo (10 µg, 50 µg), eritromicina (5 µg, 30 µg), penicillina G (2 UI, 10 UI), ampicillina (10 µg, 25 µg), gentamicina (5 µg, 10 µg, 30 µg), novobiocina (30 µg), kanamicina (5 µg, 30 µg), streptomycin (25 µg), neomicina (5 µg, 30 µg), lincomicina (15 µg), vancomicina (30 µg), bacitracina (10 µg).

## RISULTATI

### *Ceppo 20AG*

Il ceppo da noi denominato 20AG è risultato un Gram+ (1,8 x 0,5 µ, SEM) di forma bastoncellare (Fig. 1) e le colonie sul terreno di coltura arricchito (Tab. 1) sono apparse solitamente circolari, giallo-aranciate. Non sporula, anche in presenza di MNCl<sub>2</sub> in eccesso fino a 100 mg/ml.

Questo ceppo vive ottimamente con NaCl al 10 %, ma si duplica fino al 20 % di NaCl; è da considerarsi pertanto un alofilo moderato.

La sua temperatura ottimale di crescita è 37 °C ed il pH ottimale è 9,0.

È risultato positivo all'ossidasi e alla catalasi; non degrada la tirosina; idrolizza l'ippurato, ma non gelatina, caseina e amido; riduce nitrito e nitrato ed è resistente al lisozima (Tab. 2).

Produce esopolisaccaride (EPS), sia su ter-

Tab. 2 – Caratteristiche morfologiche, biochimiche e fi-siologiche dei due ceppi batterici (20AG e 20bAG)

Caratteristiche	Ceppo 20AG	Ceppo 20bAG
Morfologia cellulare	Bastoncello	Bastoncello
Morfologia delle colonie	Circolare	Circolare
Colore delle colonie	Giallo arancio	Rosa
Sporulazione	–	–
Colorazione Gram	+	–
Intervallo temp. di crescita	10-40 °C	10-40 °C
Temperatura ottimale	37 °C	30 °C
Intervallo di pH di crescita	6,5-9,5	6,5-9,5
pH ottimale	9,0	9,0
NaCl tolleranza (%)	5-20	5-20
NaCl ottimale (%)	10	10
Ossidasi	+	+
Catalasi	+++	–
Degradazione della tirosina	–	++
Idrolisi dell'ippurato	+	+
Idrolisi della gelatina	–	–
Idrolisi della caseina	–	–
Idrolisi dell'amido	–	–
Riduzione del nitrito	+	+
Riduzione del nitrato	+	–
Sensibilità al lisozima	–	–
EPS	+	–
PHB	–	+
Saggi enzimatici (attività)	β-glucosidasi	–
Osmoliti	Glicina-betaina	Glicina-betaina
	Glutammato	Glutammato
		Ectoina

+: riportato -: non riportato

reno complesso sia su terreno MY, ma non polioidrossibutirrato (PHB); possiede attività β-glucosidasi ed accumula, come osmoliti, la glicina-betaina ed il glutammato (Tab. 2).

Si sviluppa bene su saccarosio, glicerolo, trealosio e maltosio e discretamente su fruttosio (Fig. 2).

Fra gli antibiotici esaminati, è risultato resistente alla neomicina (30 µg), kanamicina (30 µg), gentamicina (30 µg) e tetraciclina (30 µg).

In tutti gli stadi di sviluppo esaminati, le cellule presentano, come principali lipidi complessi, fosfatidilglicerolo (PG) e fosfocolina (PC) (Tab. 3). Le analisi LC/MS del contenuto in chinoni hanno mostrato un picco corrispon-

Tab 3 - Composizione lipidica dei due ceppi batterici (20AG e 20bAG)

	20 AG	20b AG
Lipidi complessi	PG, PC	PG, DPG
Chinoni	MK-7	UK
Esteri metilici		
i C <sub>13:0</sub>	NR	-
ai C <sub>13:0</sub>	NR	-
C <sub>13:0</sub>	NR	-
ai C <sub>14:0</sub>	21%	-
ai C <sub>14:0</sub>	0,4%	-
iso C <sub>15:0</sub>	22,8%	-
ai C <sub>15:0</sub>	46,5%	-
C <sub>15:0</sub>	0,5%	-
C <sub>16:0</sub>	6,3%	-
C <sub>16:1</sub>	0,5%	-
C <sub>16:0</sub>	8,3%	-
i C <sub>17:0</sub>	3,4%	-
ai C <sub>17:0</sub>	8,4%	-
C <sub>17:0</sub>	0,15%	-
i C <sub>18:1</sub>	3,2%	-
ai C <sub>18:0</sub>	0,1	-
C <sub>18:1</sub>	-	90,2%
C <sub>18:0</sub>	-	2,6%
cicloprop. C <sub>18:1</sub>	-	7,0%

dente al menachinone 7 (MK-7) (Tab. 3). La composizione in acidi grassi è caratterizzata da *ai* C<sub>15:0</sub> (46,5 %) più abbondante (Tab. 3).

Sulla base delle presenti analisi il batterio 20AG è risultato attribuibile al genere *Bacillus*.

#### Ceppo 20bAG

Il ceppo da noi denominato 20bAG è risultato un Gram- (2,4 x 0,6 µ, SEM) di forma

bastoncellare, leggermente affusolato all'estremità (Fig. 1); le colonie sul terreno di coltura arricchito sono apparse solitamente circolari, di color rosa. Non sporula, anche in presenza di MnCl<sub>2</sub> in eccesso fino 100 mg/ml.

Questo ceppo vive ottimamente con NaCl al 10 %. La sua temperatura ottimale di crescita è 30 °C ed il pH ottimale è 9,0.

È risultato positivo all'ossidasi e negativo alla catalasi; degrada la tirosina, idrolizza l'ip-purato, ma non gelatina, caseina e amido; riduce il nitrito ma non il nitrato; è resistente al lisozima (Tab. 2).

Produce polioidrossibutirrato (PHB), ma non esopolisaccaride (EPS); non possiede attività β-glucosidasi; accumula, come osmoliti, la glicina-betaina, il glutammato e l'ectoina (Tab. 2).

Si sviluppa su tutti i substrati organici testati, mostrando una crescita minore su raffinosa, xilosio e ribosio (Fig. 2).

Fra gli antibiotici esaminati è risultato resistente alla neomicina (30 µg), kanamicina (30 µg), novobiocina (30 µg), tetraciclina (30 µg), penicillina (2 µg) e bacitracina (10 µg).

In tutti gli stadi di sviluppo esaminati presenta, come principali lipidi complessi, fosfatidilglicerolo (PG) e difosfatidilglicerolo (DPG) (Tab. 3). Le analisi LC/MS del contenuto in chinoni hanno mostrato un picco corrispondente all'ubichinone (UK) (Tab. 3). La sua composizione in acidi grassi è caratterizzata da C<sub>18:1</sub> (90,2 %) (Tab. 3).

Sulla base delle nostre analisi il batterio 20bAG è risultato attribuibile al genere

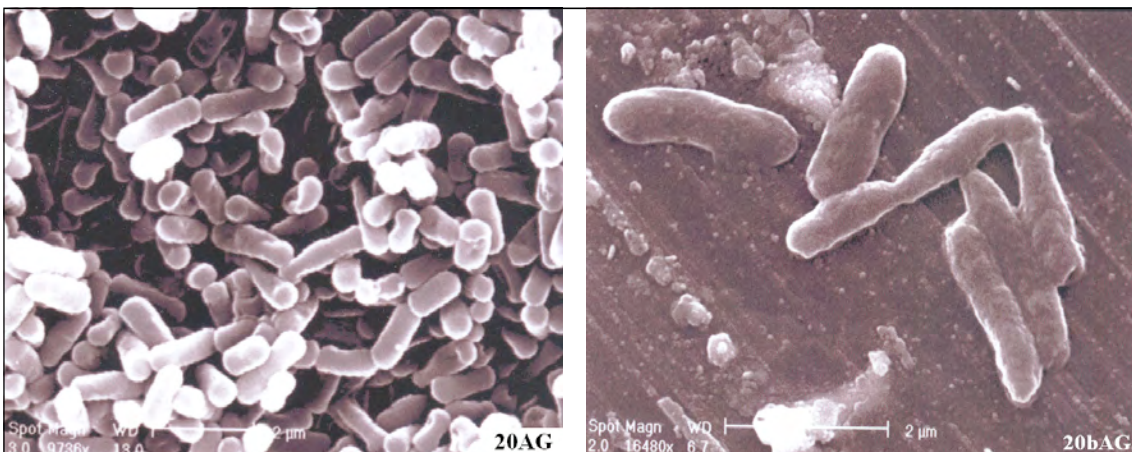


Fig. 1 – Micrografie al SEM dei due ceppi batterici (20AG e 20bAG)

*Halomonas*.

Dall'esame generale dei dati acquisiti si può dedurre che i due batteri, nel loro insieme, producono biomolecole e presentano attività fisiologiche di interesse applicativo.

Il ceppo attribuito a *Bacillus* produce esopolisaccaride, osmoliti e presenta attività  $\beta$ -glucosidasi; il ceppo attribuito ad *Halomonas* produce osmoliti e polioidrossibutirrato (Tab. 2).

Gli osmoliti e le  $\beta$ -glucosidasi, comunemente ottenute dai batteri, trovano vasti impieghi in molte applicazioni industriali e biotecnologiche, quali quelle relative ai detersivi (miglioramento dell'efficacia del lavaggio a freddo), allo sbiancamento della carta con sistemi non inquinanti, alla raffinazione dell'o-

lio, alla preparazione del pane che non indurisce, al recupero dell'olio e al ciclo dei rifiuti. L'esopolisaccaride ha svariate applicazioni biotecnologiche nel settore ambientale per la sua capacità di formare biofilm su superfici-substrato di tipo idrofobico e idrofilico, di natura sia biotica sia abiotica, e nell'industria farmaceutica per la sua capacità di favorire la produzione di sostanze difficili da ottenere da altre fonti. Il polioidrossibutirrato, un poliestere che si accumula come sostanza di riserva naturale in numerose specie batteriche, è prodotto a livello industriale dai batteri in grandi fermentatori e viene utilizzato come una fonte rinnovabile per fabbricare plastiche biodegradabili e biocompatibili.

#### LETTERATURA CITATA

- DUSSAULT H.P. 1955. An improved technique for staining red-halophilic bacteria. *J. Bacteriol.* 70: 484-485.
- GALINSKI E.A. 1993. Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interactions, stress protection. *Experientia* 49: 487-496.
- KATES M. 1986. Influence of salt concentration on membrane lipids of halophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 39: 95-101.
- KNAPP S., LANDENSTEIN R., GALINSKI E.A. 1999. Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes  $\beta$ -hydroxyectoine and betaine. *Extremophiles* 3: 191-198.
- NICOLAUS B., MANCA M.C., LAMA L., ESPOSITO E., GAMBACORTA A. 1995. Effect of growth temperature and on the polar lipid pattern and fatty acid composition of seven thermophilic isolates from the antarctic continent. *System. Appl. Microbiol.* 18: 32-36.
- ROMANO I., MANCA M.C., LAMA L., NICOLAUS B., GAMBACORTA A. 1993. A method for antibiotic assay on Sulfolobales. *Biotechnol. Techniques* 7: 439-440.
- ROMANO I., NICOLAUS B., LAMA L., MANCA M.C., GAMBACORTA A. 1996. Characterization of a haloalkaliphilic strictly aerobic bacterium, isolated from Pantelleria Island. *System. Appl. Microbiol.* 19: 326-333.
- ROMANO I., NICOLAUS B., LAMA L., TRINCONE A., GAMBACORTA A. 1991. Gelrite plate technique for culturing *Sulfolobus solfataricus*, a thermoacidophilic archaebacterium. *Biotechnology Techniques*, 5: 29-30.
- TINDALL B.J. 1988. Prokaryotic life in the alkaline, saline athalassic environment. In: Rodriguez-Viera F. (Ed.). *Halophilic Bacteria*. CRC Press Inc., USA, pp. 31-67.

Finito di stampare nel mese di ottobre 2007