

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO



Dipartimento di Scienze Ambientali
Corso di Dottorato di Ricerca in
Evoluzione Biologica e Biochimica XXI Ciclo
(BIO/19)

“Struttura e funzione delle comunità microbiche in suoli contaminati: effetto degli interventi di micorisanamento.”

Coordinatore e Tutor
Prof. Federico Federici

Dottoranda
Dott. Maria Angela Giubilei

UNIVERSITY OF TUSCIA, VITERBO



Department of Environmental Sciences

PhD Course in

Biological and Biochemical Evolution Cycle XXI

(BIO/19)

“Structure and Function of the microbial communities in polluted soils: effect of mycoremediation.”

Course Coordinator

and Tutor

Prof. Federico Federici

PhD Student

Dott. Maria Angela Giubilei

*Ai miei genitori
ad Emanuele
e alle due gioie più
grandi della mia vita
Daniele e Davide*

INDICE

RIASSUNTO	I
ABSTRACT	VI
1. INTRODUZIONE	1
PREMESSA	1
1.1. QUADRO NORMATIVO CHE REGOLA LA BONIFICA DEI SITI CONTAMINATI	2
1.2. PRINCIPALI TECNICHE DI BONIFICA DEI SITI CONTAMINATI	3
1.2.1. Trattamenti termici	5
<i>1.2.1.1. Trattamenti di desorbimento termico</i>	5
<i>1.2.1.2. Trattamenti di termodistruzione</i>	7
1.2.2. Trattamenti chimico-fisici	8
1.2.3. Trattamenti Biologici	10
<i>1.2.3.1. Trattamenti di biorisanamento in situ</i>	12
<i>1.2.3.2. Trattamenti di biorisanamento ex situ</i>	15
<i>1.2.3.3. Micorisanamento</i>	17
<i>1.2.3.4. I funghi “white-rot”</i>	18
<i>1.2.3.5. Enzimi ligninolitici prodotti dai funghi white-rot</i>	19
<i>1.2.3.6. Crescita dei funghi ligninolitici nel suolo</i>	22
1.3. ORIGINE E TIPOLOGIA DI CONTAMINAZIONE DEL SUOLO	24
1.3.1. Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)	25
<i>1.3.1.1. Generalità e fonti principali</i>	25
<i>1.3.1.2. Caratteristiche fisico-chimiche degli IPA</i>	26
<i>1.3.1.3. Tossicità degli IPA</i>	27
<i>1.3.1.4. IPA nel suolo</i>	29
<i>1.3.1.5. Degradazione microbica degli IPA</i>	31
<i>1.3.1.6. Degradazione del naftalene in Pseudomonas sp.</i>	32

1.3.1.7. <i>Organizzazione dei geni codificanti gli enzimi degradativi in diversi ceppi di Pseudomonas</i>	34
1.3.1.8. <i>Esempi di vie metaboliche per la degradazione batterica di IPA più complessi</i>	35
1.3.2. Clorobenzeni: generalità, tossicità e possibili vie biodegradative	36
1.3.3. Cloroaniline: generalità, tossicità e possibili vie biodegradative	38
1.3.4. Bifenili policlorurati (PCB)	40
1.3.4.1. <i>Definizione e principali usi dei PCB</i>	40
1.3.4.2. <i>Proprietà chimico-fisiche</i>	41
1.3.4.3. <i>Fonti principali dei PCB</i>	41
1.3.4.4. <i>Tossicità dei PCB</i>	42
1.3.4.5. <i>Trasformazione biologica dei PCB</i>	43
1.3.4.6. <i>Trasformazione anaerobica dei PCB</i>	44
1.3.4.7. <i>Trasformazione aerobica dei PCB</i>	46
1.3.4.8. <i>Organizzazione genica di alcuni pathway degradativi in condizioni aerobiche</i>	49
1.3.4.9. <i>Degradazione dei PCB operata dai funghi white-rot</i>	50
1.3.5. Metalli pesanti: Definizione, tossicità e fonti principali	51
1.4. IL PROBLEMA DELLA BIODISPONIBILITÀ	54
1.4.1. <i>Adsorbimento e Assorbimento</i>	56
1.4.2. <i>Liquidi in fase non-acquosa e composti con bassa solubilità in acqua</i>	57
1.4.3. <i>Aging</i>	58
1.4.4. <i>Caratteristiche e ruolo degli agenti mobilizzanti</i>	59
1.4.5. <i>Classificazione degli agenti mobilizzanti</i>	61
1.4.5.1. <i>Surfactanti sintetici</i>	61
1.4.5.2. <i>Surfactanti biogeni</i>	62
1.4.5.3. <i>Surfactanti di origine microbica (Biosurfactanti)</i>	65
1.5. ANALISI DELLE COMUNITA' MICROBICHE	67
1.5.1. Metodi convenzionali applicati nello studio di comunità microbiche	69
1.5.1.1. <i>Profili delle fonti di carbonio utilizzate (Sole Source Carbon utilization: SSCU)</i>	69
1.5.1.2. <i>Tecniche per la conta dei batteri</i>	71

1.5.2. Metodi molecolari applicati nello studio di comunità microbiche	72
<i>1.5.2.1. Tecniche biochimiche (PLFA e FAME)</i>	72
1.5.3. Tecniche che permettono di relazionare l'identità dei microrganismi alle loro funzioni ecologiche	74
<i>1.5.3.1. Stable isotope probing (SIP)</i>	74
1.5.4. Tecniche molecolari basate sull'amplificazione PCR	75
<i>1.5.4.1. DNA ribosomiali ed altri geni marcatori utilizzati in ecologia microbica per la differenziazione tassonomica delle popolazioni</i>	75
<i>1.5.4.2. Reazione a catena della polimerasi (PCR)</i>	80
<i>1.5.4.3. PCR Quantitativa (Real Time PCR)</i>	81
<i>1.5.4.4. Elettroforesi su gel a gradiente denaturante (DGGE: Denaturing, TGGE: Temperature Gradient Gel Electrophoresis)</i>	84
<i>1.5.4.5. Single strand conformation polymorphism (SSCP)</i>	86
<i>1.5.4.6. Polimorfismo dei frammenti di restrizione (ARDRA; RFLP/T-RFLP)</i>	88
<i>1.5.4.7. Analisi dello spaziatore intergenico (RISA/ARISA)</i>	89
<i>1.5.4.8. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)</i>	91
<i>1.5.4.9. Sequenziamento casuale di cloni derivati da librerie di clonaggio</i>	92
1.5.5. Tecniche molecolari indipendenti dall'amplificazione PCR	94
<i>1.5.5.1. Cinetica di riassociazione del DNA</i>	94
<i>1.5.5.2. Analisi del contenuto percentuale di Guanina (G) e Citosina (C)</i>	95
<i>1.5.5.3. Ibridizzazione DNA-DNA (Community DNA hybridization)</i>	96
<i>1.5.5.4. Ibridazione degli acidi nucleici (Slot/dot-blot hybridization) ed ibridazione in-situ con sonde fluorescenti (Fluorescence in-situ hybridization: FISH)</i>	97
<i>1.5.5.5. DNA microarray</i>	98
2. SCOPO DEL LAVORO	101
3. MATERIALI E METODI	103
3.1 Suoli utilizzati nelle prove di micorisanamento	103
<i>3.1.1. Suolo modello</i>	103
<i>3.1.2. Contaminazione del suolo modello</i>	104
<i>3.1.3. Suolo storicamente contaminato da idrocarburi aromatici</i>	104

3.1.4. Suolo storicamente contaminato da bifenili policlorurati	106
3.2. Allestimento dei processi di micorisanamento	107
3.2.1. Microrganismi impiegati nelle diverse prove di micorisanamento	107
3.2.2. Preparazione dell'inoculo	108
3.2.3. Micorisanamento del suolo modello	108
3.2.4. Micorisanamento del suolo storicamente contaminato da idrocarburi aromatici (Prova condotta con <i>P. pulmonarius</i> e <i>B. rhodina</i>)	109
3.2.5. Micorisanamento del suolo storicamente contaminato da idrocarburi aromatici (Prova condotta con <i>P. tigrinus</i>)	110
3.2.6. Micorisanamento del suolo storicamente contaminato da bifenili policlorurati	111
3.3. Carica microbica del suolo	112
3.3.1. Conte dei batteri eterotrofi totali	112
3.3.2. Conte dei batteri degradatori di Acidi Benzoici Monoclorurati (CBA) e di Bifenile	112
3.4. Metodi analitici:	113
3.4.1. Estrazione e quantificazione dell'ergosterolo	113
3.4.2. Preparazione degli estratti acquosi	114
3.4.3. Determinazione delle proteine solubili	114
3.4.4. Determinazione degli zuccheri totali	115
3.4.5. Determinazione degli amminoacidi liberi	115
3.4.6. Determinazione delle attività idrolasiche	116
3.4.7. Determinazione delle attività ossidasiche	118
3.4.8. Determinazione del carbonio organico totale (TOC) e del carbonio estraibile totale (TEC)	119
3.5. Determinazione della concentrazione dei contaminati	120
3.5.1. Determinazione della concentrazione residua dei contaminati nel suolo ACNA	120
3.5.2. Determinazione della concentrazione residua degli IPA nel suolo modello	121
3.5.3. Determinazione della concentrazione residua dei PCB	122
3.6. Prove ecotossicologiche	122
3.6.1. Test di mortalità	122
3.6.2. Determinazione dell'attività deidrogenasica	122

3.7. Analisi statistica dei dati	123
3.8. Analisi molecolari	123
3.8.1. Estrazione ed analisi degli acidi grassi derivati dai fosfolipidi	123
3.8.2. Estrazione del DNA dai campioni di suolo	124
3.8.3. Amplificazione del gene ribosomiale 16S ed analisi DGGE	124
3.8.4. Amplificazione del gene ribosomiale 18S ed analisi DGGE	125
3.8.5. Analisi digitale e statistica dei profili DGGE	126
3.8.6. Costruzione e screening di librerie di clonaggio del gene ribosomiale 16S	126
3.8.7. Estrazione del DNA plasmidico, sequenziamento, editing ed allineamento delle sequenze	128
3.8.8. PCR Quantitativa	128
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	130
4.1. Effetto combinato di agenti mobilizzanti e micorisanamento sulle popolazioni microbiche autoctone in suolo contaminato “ad hoc” con miscela di IPA	130
4.1.1. Degradazione degli IPA nel suolo biottrattato con <i>Allescheriella sp.</i> e <i>Phlebia sp.</i>	130
4.1.2. Detossificazione del suolo biottrattato con <i>Allescheriella sp.</i> e <i>Phlebia sp.</i>	132
4.1.3. Concentrazione dei batteri eterotrofi coltivabili nel suolo biottrattato con <i>Allescheriella sp.</i> e <i>Phlebia sp.</i>	134
4.1.4. Effetto degli agenti mobilizzanti e del micorisanamento con <i>Allescheriella sp.</i> e <i>Phlebia sp.</i> sulla struttura delle popolazioni batteriche autoctone	135
4.1.5. Degradazione degli IPA nel suolo biottrattato con <i>I. lacteus</i> e <i>P. ostreatus</i>	139
4.1.6. Detossificazione del suolo biottrattato con <i>I. lacteus</i> e <i>P. ostreatus</i>	140
4.1.7. Concentrazione dei batteri eterotrofi coltivabili nel suolo biottrattato con <i>I. lacteus</i> e <i>P. ostreatus</i>	142
4.1.8. Effetto degli agenti mobilizzanti e del micorisanamento con <i>I. lacteus</i> e <i>P. ostreatus</i> sulla struttura delle popolazioni batteriche autoctone	144
4.2. Biottrattamento di un suolo storicamente contaminato con <i>Botryosphaeria rhodina</i> DABAC P82 e <i>Pleurotus pulmonarius</i> CBS 664.97	150
4.2.1. Crescita fungina	150
4.2.2. Degradazione dei contaminanti e detossificazione del suolo	151

4.2.3. Concentrazione dei batteri eterotrofi totali	155
4.2.4. Analisi delle popolazioni batteriche mediante DGGE	156
4.3. Micorisanamento di un suolo storicamente contaminato da idrocarburi aromatici con il fungo <i>white-rot Panus tigrinus</i>: effetto sulla struttura e funzione delle popolazioni batteriche autoctone	160
4.3.1. Crescita fungina	160
4.3.2. Attività ossidasiche fungine	164
4.3.3. Attività idrolasiche fungine	166
4.3.4. Attività degradative del carbonio e dell'azoto	168
4.3.5. Decontaminazione e detossificazione del suolo	171
4.3.6. Effetto del micorisanamento del suolo ACNA con <i>P. tigrinus</i> sulla struttura delle popolazioni batteriche autoctone	174
4.3.7. Studio della composizione microbica del suolo ACNA e valutazione della dinamica delle specie in seguito al processo di micorisanamento	179
4.3.8. Analisi degli acidi grassi derivati dai fosfolipidi (PLFA)	182
4.3.9. Effetto del micorisanamento sul numero di copie dei geni <i>nahAc</i> , <i>C230</i> e <i>16S</i>	186
4.4. Micorisanamento di un suolo storicamente contaminato da bifenili policlorurati con il fungo <i>white-rot Panus tigrinus</i>: effetto sulla struttura e funzione delle popolazioni batteriche autoctone	190
4.4.1. Crescita fungina	191
4.4.2. Attività ossidasiche fungine	193
4.4.3. Attività idrolasiche fungine	196
4.4.4. Attività degradative del carbonio e dell'azoto	198
4.4.5. Decontaminazione del suolo	201
4.4.6. Detossificazione del suolo	210
4.4.7. Effetto dell'inoculo fungino e dell'olio di soia sulla crescita dei batteri eterotrofi totali e specializzati nella degradazione di acidi benzoici monoclorurati (CBA) e bifenile	211
4.4.8. Effetto dell'inoculo fungino e dell'olio di soia sulla struttura delle popolazioni batteriche autoctone	214
4.4.9. Effetto dell'inoculo fungino e dell'olio di soia sulla struttura delle popolazioni fungine autoctone	217
4.4.10. Quantificazione del numero di copie dei geni <i>bph</i> , <i>C230</i> e <i>16S</i>	220

5. CONCLUSIONI	223
6. BIBLIOGRAFIA	225
APPENDICE	264

RIASSUNTO

La diffusa contaminazione di ecosistemi terrestri e acquatici dovuta all'immissione di composti di origine antropica ad elevata persistenza è un problema che sta assumendo una rilevanza sempre maggiore. Date le quantità prodotte e i potenziali effetti negativi sull'ambiente e sulla salute umana il gruppo di composti più importante è quello dei cosiddetti "xenobiotici", molecole di sintesi ad elevata persistenza ed estranee ai processi biologici.

Le tecnologie che, sfruttando la capacità dei microrganismi, batteri, alghe o funghi, di degradare i contaminanti, sono in grado di accelerare i fenomeni naturali di detossificazione dell'ambiente stanno attirando sempre maggiore attenzione (Šašek *et al.*, 2003). In questo senso, i funghi Basidiomiceti appartenenti al gruppo dei *white-rot* sembrano i più interessanti. Nel biorisanamento è anche fondamentale il ruolo della microflora endogena e fondamentali appaiono le eventuali interazioni con le specie esogene usate per il bioarricchimento.

Negli ultimi venti anni, è profondamente cambiato l'approccio metodologico allo studio delle comunità microbiche naturali: sempre più frequente, infatti, è l'utilizzo di metodi indipendenti dalla coltivazione al fine di superare il problema della non coltivabilità della maggior parte dei batteri ambientali. Tranne che nella diretta ibridazione del DNA con sonde specifiche, la maggior parte di tali metodi (DGGE/TGGE, ARDRA, RFLP/T-RFLP, RISA/ARISA, qRT-PCR) si basano sulla analisi di marcatori genetici amplificati con *primers* "universali" a partire dal metagenoma estratto direttamente da campioni di suolo, acqua o sedimenti.

Il *target* maggiormente impiegato nello studio della diversità microbica è il gene codificante l'rRNA 16S, ma anche molti geni funzionali sono base per lo studio di subpopolazioni con capacità metaboliche e fisiologiche specifiche (*amoA*, *rpoB*, *PmoA*, *nifH*).

I principali obiettivi della presente tesi di dottorato sono stati lo studio della dinamica della struttura e funzione delle comunità microbiche autoctone in seguito a processi di micorisanamento su scala di laboratorio condotti su due suoli storicamente contaminati, uno da idrocarburi aromatici e l'altro da PCB, ed un suolo modello contaminato "*ad hoc*" in laboratorio con una miscela di IPA.

Sul suolo modello, contaminato in laboratorio con una miscela di ognuno (50 µg/g) dei seguenti di IPA: fenatrene, antracene, fluorantene, pirene, crisene, benzo[k]fluorantene e benzo[a]pirene, è stato valutato l'effetto combinato di agenti

mobilizzanti (AM) e micorisanamento (*Irpex lacteus* 617/93, *Pleurotus ostreatus* 3004, *Allescheriella* sp. DABAC 1 e *Phlebia* sp. DABAC 9) sulla struttura delle comunità batteriche indigene. Con *Allescheriella* sp. e *Phlebia* sp. sono stati utilizzati gli AM Tween20 (TW20), Tween 80 (TW80) e olio di soia (OS). Con *I. lacteus* e *P. ostreatus* sono stati usati come AM anche RAMEB (β -ciclodestrine metilate) ed acque di vegetazione delle olive (AV).

Con *Phlebia* sp., l'unico AM in grado di provocare un aumento significativo della deplezione degli IPA, espressa come peso totale dei contaminati residui (TWOC: *Total Weight of Organic Contaminants*), e valutata sia nei controlli di incubazione che nei suoli sottoposti a micorisanamento dopo 45 giorni di incubazione, era l'OS. Con *Allescheriella* sp., invece, le migliori *performance* degradative si ottenevano, nel suolo trattato con TW20 ove si raggiungeva una diminuzione del TWOC pari al 21,6% rispetto al biotattamento fungino senza aggiunta di AM.

La detossificazione dei suoli è stata valutata quantificando l'attività deidrogenasica; *Phlebia* sp. induceva un livello significativo di detossificazione solo in presenza di TW80, mentre nel caso di *Allescheriella* sp. il livello più elevato era raggiunto quando non erano presenti AM.

La microflora batterica coltivabile endogena era diversamente influenzata con effetto negativo di OS e TW80 sia nel controllo di incubazione che nel suolo inoculato con *Phlebia* sp. mentre con *Allescheriella* sp. non si osservavano differenze significative in nessuno dei campioni, indipendentemente dall'AM impiegato. In ogni caso, era evidente un generale effetto positivo esercitato dai funghi sullo sviluppo della microflora residente coltivabile.

L'analisi DGGE dimostrava che nel controllo di incubazione in assenza di AM, entrambi gli indici di biodiversità stimati, *richness* e *Shannon-Weaver*, non differivano significativamente dagli stessi nel suolo pristino. Entrambi questi parametri risultavano comunque aumentati nei controlli di incubazione trattati con gli AM e i valori più elevati erano osservabili nei suoli sottoposti a micorisanamento.

In base alla *cluster analysis*, infine, era evidente come i funghi esercitavano un'influenza decisiva sulla similarità tra le specie batteriche. Tra gli AM impiegati, il maggior impatto era dovuto a TW20 e TW80.

Con *I. lacteus* e *P. ostreatus* era riscontrabile un'azione diversa degli AM sulle *performance* degradative: l'OS risultava il migliore ma un effetto positivo sulle potenzialità degradative di *I. lacteus* e *P. ostreatus* era esercitato, rispettivamente, anche da TW20 e TW80.

Anche in questo caso, l'OS esercitava il maggior effetto negativo sullo sviluppo della microflora residente, dimostrato anche mediante analisi DGGE: più bassi indici di biodiversità si riscontravano, infatti, nel controllo di incubazione e nel suolo con *I. lacteus* in presenza di tale surfactante.

L'analisi DGGE mostrava, inoltre, che la biodiversità, con *P. ostreatus*, non aumentava ma era influenzata dal tipo di AM utilizzato. La *cluster analysis* indicava come l'inoculo del suolo con *P. ostreatus* esercitava la maggiore influenza sulla similarità tra le popolazioni batteriche; con *I. lacteus*, invece, il maggior effetto era esercitato dai surfactanti.

Il sequenziamento di alcuni cloni, corrispondenti a particolari bande DGGE, mostrava la presenza di specie batteriche, note per le loro capacità di degradare IPA, appartenenti a generi come *Bacillus* e *Burkholderia*.

P. pulmonarius CBS 664.97 e *B. rhodina* DABAC P82 sono stati testati su suolo storicamente contaminato sia come tale che fumigato con cloroformio per valutare il contributo della microflora endogena sull'intero processo. Inaspettatamente, *B. rhodina* colonizzava meglio il non fumigato mentre era vero il contrario con *P. pulmonarius*. Le *performance* degradative di entrambi i funghi erano nettamente superiori nei suoli non fumigati rispetto ai fumigati.

Per valutare l'effetto del micorisanamento sulla microflora endogena sono state anche effettuate conte dei batteri eterotrofi totali ed analisi DGGE del gene dell'rRNA 16S. Il numero degli eterotrofi totali era superiore nei suoli non fumigati rispetto ai fumigati, soprattutto biottrattati. L'analisi DGGE evidenziava minore biodiversità nel suolo come tale ($t_0 - t_f$), rispetto al controllo e ai suoli sottoposti ai trattamenti fungini. I due ceppi sembravano, quindi, aver avuto un significativo effetto sulla struttura della comunità batterica: le specie stimolate a crescere appartenevano infatti a generi noti per l'abilità di degradare idrocarburi aromatici.

Un'ulteriore prova di micorisanamento del suolo ACNA è stata condotta con *P. tigrinus* con prelievi all'inizio della prova (t_0) e dopo 7, 15, 30, 60 giorni ($t_7, t_{15}, t_{30}, t_{60}$) di incubazione.

Sia da ispezione visiva che da dosaggio dell'ergosterolo (743 $\mu\text{g/g}$ suolo dopo 60 giorni di incubazione) si rilevava veloce colonizzazione del suolo ammendato con la paglia di mais; venivano, inoltre prodotte Laccasi e Mn-perossidasi (6,54 U/g e 182 mU/g suolo, rispettivamente, dopo 30 giorni di incubazione).

L'analisi GC-MS del suolo trattato con *P. tigrinus* mostrava abbattimento di molti dei contaminanti prioritari presenti nel suolo quali: naftalene (57,3%), 1,2,3,4-

tetraclorobenzene (73,5%), 2,4- e 2,6-dicloroaniline (100 e 82.8%, rispettivamente) e difenil etero (78%). Conte vitali e analisi DGGE mostravano che, nel tempo, si aveva sia aumento del numero dei batteri eterotrofi totali, che incremento della biodiversità.

Gli indici di biodiversità subivano infatti un aumento, nel caso del controllo di incubazione, ed in modo più evidente nel suolo biottrattato con il fungo, già dopo 7-15 giorni di incubazione. L'effetto del trattamento fungino, sulla diversità delle popolazioni batteriche, come emerso dalla *cluster analysis* era invece riscontrabile dopo 30 giorni di incubazione: si ottenevano infatti due sotto-*cluster* separati che comprendevano, uno i controlli di incubazione t_{30} e t_{60} e l'altro i suoli biottrattati con *P. tigrinus* t_{30} e t_{60} .

Infine, per valutare se vi fossero effetti, in seguito al micorisanamento, anche su alcune funzioni metaboliche espletate dalle popolazioni batteriche, sono state effettuate *real-time* PCR sui geni codificanti enzimi chiave (naftalene-diossigenasi e catecolo 2,3-diossigenasi) nella degradazione di alcuni IPA al fine di stimare le variazioni nel numero di copie dei geni stessi. Sia nel caso del gene *nahAc* che del gene C230 si assisteva ad una diminuzione del numero di copie dei geni stessi in seguito al trattamento fungino.

P. tigrinus e OS sono stati infine impiegati in un suolo storicamente contaminato da PCB monitorandone nel tempo gli effetti con prelievi all'inizio della prova (t_0) e dopo 30 e 60 giorni di incubazione (t_{30} e t_{60}).

Nei suoli biottrattati la crescita fungina era visibile microscopicamente; quantificando l'ergosterolo, veniva rilevata, seppur in esigue quantità, anche nei controlli di incubazione, indicando quindi crescita di specie fungine autoctone.

Nei suoli sottoposti a micorisanamento erano inoltre riscontrabili sia attività enzimatiche idrolasiche che ossidasiche. Le prime raggiungevano i livelli più elevati dopo 30 giorni soprattutto in assenza di OS. L'andamento delle attività ossidasiche era sostanzialmente simile alle idrolasi, ma in questo caso l'OS mostrava pesante influenza negativa sulla laccasi e positiva sulla perossidasi Mn-dipendente.

Dall'analisi dei dati relativi alle percentuali di deplezione dei congeneri di PCB estratti dai campioni derivati dalle diverse tesi dopo 60 giorni di incubazione e quantificati attraverso GC-MS, erano evidenti differenti tipi di effetti dovuti all'azione della microflora indigena e del fungo esogeno oppure all'aggiunta di OS o stocchi di mais. L'effetto positivo della microflora residente era evidenziato dalla deplezione dei diversi congeneri nei microcosmi; emergeva tuttavia un effetto negativo esercitato dall'OS. Simile effetto sembrava esercitato anche dagli stocchi di mais sulla deplezione

dei PCB da parte delle comunità microbiche autoctone. Infine, l'effetto del fungo, valutato confrontando il controllo d'incubazione ed il suolo bistrattato (con e senza OS), risultava trascurabile.

L'impatto del micorisanamento sulla composizione delle popolazioni batteriche autoctone è stato valutato con conte vitali e analisi DGGE. Inoltre, vista la presenza di funghi autoctoni l'analisi è stata condotta anche sui prodotti di amplificazione del gene codificante il 18S rRNA eucariotico.

Attraverso le conte si è osservato un graduale aumento del numero di batteri durante i 60 giorni di incubazione: i maggiori livelli di crescita si avevano nei campioni trattati con fungo e OS dimostrandosi così un loro effetto positivo sulla componente coltivabile della microflora endogena.

Dalle analisi DGGE dei geni 16S e 18S rDNA si è evidenziato come sia il biotattamento che l'uso di OS avevano effetto significativo sulla biodiversità sia dei batteri che dei funghi autoctoni, anche non coltivabili.

In base ad analisi qRT-PCR dei geni C230 e *bph* codificante la bifenil-diossigenasi, enzima chiave *dell'upper pathway* della degradazione aerobica dei PCB, non si osservavano differenze notevoli nel numero di copie; ciò farebbe supporre che a livello funzionale, il fungo non abbia avuto effetti rilevanti sulle popolazioni batteriche coinvolte nella degradazione degli inquinanti presenti.

In conclusione, sia la concentrazione che la biodiversità delle popolazioni batteriche endogene mostrano incrementi in seguito ai processi di micorisanamento ad eccezione dei casi in cui si utilizza OS con *Phlebia* sp. e, indipendentemente dall'AM impiegato, con *P. ostreatus*. Tutti i funghi utilizzati risultavano efficaci nella decontaminazione e nella detossificazione dei suoli trattati tranne nel caso di *P. tigrinus* utilizzato su suolo storicamente contaminato da PCB. Le attività degradative batteriche si mostravano coerenti con i risultati di decontaminazione: se il fungo provocava una diminuzione dei livelli di contaminazione, anche i geni catabolici batterici ne erano influenzati, se il fungo non aveva effetti, anche i livelli dei geni catabolici batterici non subivano cambiamenti durante il trattamento.

ABSTRACT

In the recent years, several polluting compounds have been released into the environment because of industrial and agricultural activities and represent a threat to humans and other living organisms. These contaminants are either natural compounds that have been mobilized to a bioavailable form that is toxic to organisms, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) present in fossil fuels and heavy metals present in minerals, or compounds of industrial origin that present chemical structures alien to the biosphere (xenobiotics), such as polychlorobiphenyls (PCBs). To address the challenge of cleaning up contaminated sites, there has been an increasing interest in biological methodologies, collectively indicated as bioremediation, that take advantage of the astonishing catabolic versatility of microorganisms to degrade or transform contaminants to less toxic or nontoxic products. A promising bioremediation approach is represented by the use of white-rot fungi, due to their unspecific, radical-based degradation machinery that mainly operates in the extracellular environment (mycoremediation).

A better understanding of the structure and functions of the microbial communities of a given contaminated site and how they are affected by biotechnological interventions, such as bioaugmentation with fungi and/or addition of mobilizing agents, may assist in the design of more appropriate remediation strategies. In these respects, the increased development of molecular-based techniques, mainly based on the isolation and analysis of the genome of the entire microbial community in an environmental sample (the so called 'metagenome'), has allowed the direct investigation of microorganisms in their natural environment without laboratory culturing and thus allowing to mine the whole microbial diversity, including the vast uncultivable majority.

Considering that white-rot fungi have been successfully employed in several bioremediation trials but that little is known about whether and how the indigenous microflora is affected by the massive inoculation with the allochthonous fungi, the aim of the present Ph.D. thesis project was to investigate the structural and functional modifications of the microbial communities in contaminated soils following mycoremediation. In particular, several laboratory-scale trials have been implemented on historically contaminated soils and model soils (*ad hoc* contamination) applying different white-rot fungi, alone or in combination with mobilizing agents.

Combined use of white-rot fungi and mobilizing agents for the remediation of a model soil artificially contaminated with PAHs:

Bioremediation efficacy by microorganisms is strongly affected by the low water solubility and bioavailability of PAHs and so the use of additives capable of mobilizing these contaminants from the soil organic phase to the aqueous one has been shown to positively influence their degradation. The first part of this thesis work was thus aimed to evaluate the effect of mobilizing agents (MA) on mycoremediation efficiency and to better understand the impact of this remediation strategy on the composition and diversity of the indigenous bacterial community. The study was conducted in a model system where a pristine soil was spiked with a mixture of seven PAHs (50 mg/g each of phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, chrysene, benzo[k]fluoranthene and benzo[a]pyrene), to simulate a recent contamination, and subsequently incubated with white-rot fungi (*Irpex lacteus* 617/93, *Pleurotus ostreatus* 3004, *Allescheriella* sp. DABAC 1 and *Phlebia* sp. DABAC 9) and/or mobilizing agents, namely two polyoxyethylenepolysorbates (Tween-20 and Tween-80), a plant seed oil characterized by high concentration of polyunsaturated fatty acid (soybean oil, SO), olive-oil mill wastewaters (OMW) and randomly methylated β -cyclodextrins (RAMEB).

In the first part of this study *Phlebia* sp. and *Allescheriella* sp. have been used with or without the addition of Tween 20, Tween 80 and SO. The two fungal strains markedly differ for their growth capabilities under non-sterile conditions and without MAs (3.0 vs. 0.1 μg ergosterol g^{-1} soil, for *Phlebia* sp. and *Allescheriella* sp., respectively). However, SO led to a 35-fold increase of *Allescheriella* sp. growth. Contaminant degradations by *Phlebia* sp. and *Allescheriella* sp. were best supported by SO and Tween 20, respectively. Interestingly, the highest level of soil detoxification, as evaluated by assessing dehydrogenase activity, was reached following incubation with *Allescheriella* sp. without the addition of any MA. In accordance with these findings, enumeration of cultivable bacteria and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of PCR-amplified 16S rRNA showed that microbial growth and biodiversity were positively affected by remediation with white-rot fungi, and especially when *Allescheriella* sp. was used.

In the second part of the study two white-rot fungi, namely *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus*, were tested alone or in combination with five MAs (Tween-20, Tween-80, SO, OMW, and RAMEB). Among the different MAs, SO best supported fungal growth and positively affected PAH degradation and soil detoxification but,

interestingly, showed a negative effect on both bacterial biomass and biodiversity when either one of the two fungi was used. It is worth noticing that even if both fungi showed a general decrease of the total weight of contaminants and an increase of soil detoxification in combinations with all MAs, their impact on endogenous bacteria was different. Indeed, when the soil was incubated with *P. ostreatus* bacterial biodiversity decreased and the type of MA used did not significantly affect the composition of the indigenous microflora. By contrast, when *I. lacteus* was used as inoculum, the diversity of the bacterial community increased and its structure was influenced by the type of MA used. Finally, cloning-sequencing of PCR-amplified 16S rRNA genes suggested the presence of well known PAH-degrading bacterial species belonging to the *Bacillus* e *Burkholderia* genera.

Bioremediation of a historically contaminated soil with Botryosphaeria rhodina and Pleurotus pulmonarius:

Two white-rot fungi, namely *Botryosphaeria rhodina* DABAC P82 and *Pleurotus pulmonarius* CBS 664.97 were tested for their ability to grow and to degrade aromatic hydrocarbons in an aged contaminated soil from the ACNA site (Cengio, SV, Italy), a former industrial area, decommissioned in 1994, where large-scale production of a wide array of organic chemicals had taken place for more than 100 years. The soil was characterized by the concomitant presence of both aromatic hydrocarbons, including chlorinated benzenes and anilines, thiophenes and polyaromatic hydrocarbons, and heavy metals (mainly Hg, Cu and As). Previous studies had demonstrated the unfeasibility of biostimulating the indigenous microflora to bioremediate this soil and thus mycoremediation with white-rot fungi was attempted. To evaluate the role of the indigenous microflora on the overall process, incubations were performed on both fumigated and non-fumigated soils.

Fungal colonization by *B. rhodina* was unexpectedly lower in the fumigated than in the non-fumigated soil while the growth of *P. pulmonarius* showed an opposite response. Interestingly, degradation performances and detoxification by both fungi were markedly higher in the non-fumigated soil than those observed in the fumigated one suggesting an apparent synergistic effect occurring between the bioaugmented fungi and indigenous soil microflora. Heterotrophic bacterial counts in nonfumigated soil inoculated with either *B. rhodina* or *P. pulmonarius* were significantly higher than those of the corresponding incubation control. To evaluate the effects of fungal

bioremediation on the bacterial community structure, numerical analysis of DGGE profiles of PCR-amplified 16S rRNA genes was performed. The bacterial community in the original non-amended ACNA soil was characterized by a low biodiversity. The amendment with sterilized maize stalks led to an augmentation of species richness and to marked changes in the community structure. Bioaugmentation with both fungi further increased the community diversity and resulted either in the appearance or in the enrichment of dominant hydrocarbon-degrading species as suggested by cloning and sequencing of 16S rRNA genes.

*Structural and functional modifications of the indigenous bacterial community during bioremediation of a historically contaminated soil with *Panus tigrinus*:*

Bioremediation of the aged contaminated soil ACNA was further investigated using the white-rot fungus *Panus tigrinus*. In this part of the thesis project a laboratory-scale trial was setup to monitor the structural and functional modifications of the indigenous bacterial community during mycoremediation. Analyses were performed at the beginning of the experiment (t_0) and after 7, 15, 30 and 60 days of incubation (t_7 , t_{15} , t_{30} and t_{60}).

Amendment of contaminated soil with milled maize stalks proved to be valuable for the fungus growth under non-sterile conditions: the matrix was rapidly colonized within the first two weeks, thus indicating good tolerance towards both organic contaminants and heavy metals and capability to compete with the autochthonous microflora. Moreover, and in spite of the non-favorable pH (around 7.4) and the presence of heavy metals, *P. tigrinus* produced interesting lignin-modifying enzyme activities such as laccase and Mn-peroxidase. Although bioremediation experiments were prolonged for only 60 days, GC-MS analysis of the soil treated with *P. tigrinus* indicated removal or strong reduction of several contaminants such as naphthalene, 1,2,3,4-tetrachlorobenzene, 2,4- and 2,6-dichloroaniline, 2,3,4,5,6-pentachloroaniline, diphenylether and 1,1'-binaphtalene. Heterotrophic bacterial counts and DGGE analysis showed that the size and the diversity of the endogenous bacterial populations increased during fungal bioaugmentation. Cluster analysis of DGGE fingerprints indicated that bacterial populations in the incubation control and in the fungal-augmented soil during the first fifteen days of incubation remained quite similar. On the contrary, after 30 and 60 days of incubation, a higher degree of diversification between incubation controls and fungal treatments was evident suggesting a specific effect of *P. tigrinus* inoculation

on the endogenous bacterial community. Finally, to evaluate the impact of mycoremediation on the bacterial community function, Real-Time PCR experiments were performed targeting genes involved in the degradation of aromatic contaminants. In particular, it was found that the copy number of both naphthalene dioxygenase and catechol 2,3-dioxygenase genes tended to decrease over time in soils incubated with *P. tigrinus*. This finding suggested the occurrence of a functional shift in soil microbial populations, probably as a consequence of aromatic contaminant degradation, and thus leading to a reduction in the relative abundance of specialized bacterial groups. Cloning and sequencing of 16S rRNA genes further confirmed this hypothesis showing that following remediation both specialized and opportunistic bacteria belonging to several different *genera* were present.

Combined use of Panus tigrinus and soybean oil for the bioremediation of a soil historically contaminated with polychlorinated biphenyls:

Based on the encouraging results obtained with the use of white-rot fungi for the remediation of PAH-contaminated soils, the aim of the last part of the thesis work was to evaluate a similar mycoremediation approach for the reclamation of a soil historically contaminated with polychlorinated biphenyl (PCB). Indeed, PCBs are toxic xenobiotics of great ecological concern present in large amounts throughout the environment, and in particular in soils and sediments. A laboratory-scale mycoremediation trial with *P. tigrinus*, alone or in combination with SO as mobilizing agent, was established and analyses were performed at the beginning of the experiment (t_0) and after 30 (t_{30}) and 60 (t_{60}) days of incubation. Colonization of *P. tigrinus* was clearly visible and also confirmed by ergosterol quantification. Interestingly, ergosterol slightly increased in non-inoculated incubation controls as well, suggesting the presence of a viable indigenous fungal community. Extracellular enzymatic activities were detected in soil inoculated with *P. tigrinus*. In particular, hydrolase activities peaked after 30 days of incubation especially in the absence of SO. On the contrary, the use of the MA had opposite effects on lignin-modifying enzyme activities: SO inhibited the production of laccase but stimulated that of Mn-peroxidase. GC-MS analysis of PCB concentration in the different soil samples showed that, as expected, there was a significant degradation activity carried on by the endogenous microflora but that, interestingly, the addition of the mobilizing agent negatively affected this activity. On the contrary, mycoremediation with *P. tigrinus* did not lead to a significant PCB depletion. Nevertheless, heterotrophic

bacterial counts and DGGE analysis of both 16S and 18S rRNA genes showed that the size and the diversity of the bacterial and fungal communities increased following incubation with the fungus and the mobilizing agents, suggesting a significant effect of these biological interventions on the endogenous microflora. Real-Time PCR quantification of catabolic genes, namely biphenyl dioxygenase and catechol 2,3-dioxygenase, showed that the number of gene copies remained unchanged during the incubation period, suggesting that treatment with *P. tigrinus* and/or SO did not affect the function of the endogenous microbial community.

In conclusion, the results obtained during this thesis project confirmed the importance of using white-rot fungi, alone or in combination with mobilizing agents, to decontaminate and detoxify PAH-contaminated soils. On the contrary, more investigations are needed to assess the validity of a similar strategy for the bioremediation of soils polluted with PCBs. The detailed, culture-independent, molecular-based analyses of soil microflora revealed that mycoremediation, both with and without the use of mobilizing agents, had a profound effect on the structure and function of the endogenous microbial communities. In particular, and with the only exception of the use of *Phlebia* sp. in combination with SO, all fungi and all mobilizing agents stimulated bacterial growth and enhanced bacterial biodiversity. Furthermore, when the mycoremediation of the soil was successful, also the function of the bacterial community seemed to undergo a shift toward a less specialized role. Taken together these results point out the importance of gaining insights about the ecological effects of biotechnological interventions, particularly those involving bioaugmentation with fungi, on the endogenous microbial populations in order to design more integrated, successful bioremediation strategies.

1. INTRODUZIONE

PREMESSA:

La rivoluzione industriale e, in particolare, il grande sviluppo dell'industria chimica a partire dal secondo dopoguerra hanno condotto alla produzione e all'utilizzo su larga scala di prodotti chimici di sintesi, detti xenobiotici, quali materie plastiche, fertilizzanti, combustibili e solventi che sono divenuti in breve tempo indispensabili allo sviluppo sociale ed economico dei paesi industrializzati. Tali composti tendono ad accumularsi nell'ambiente dato che contengono elementi strutturali generalmente non presenti nei composti di origine naturale e per questo non riconoscibili dagli enzimi degradatori (Stenuit *et al.*, 2005).

L'assenza di adeguate leggi di tutela ambientale ha consentito il rilascio nell'ambiente di grandi quantità di tali sostanze inquinanti, anche molto tossiche, che si sono quindi diffuse e accumulate in matrici naturali come suolo, sottosuolo, atmosfera, acque superficiali e sotterranee fino a giungere agli organismi viventi.

Tutte le aree nelle quali si possa presupporre sia in atto un'alterazione puntuale delle caratteristiche naturali del suolo da parte di agenti inquinanti rappresentano siti potenzialmente contaminati: possono presentare queste caratteristiche le aree che sono state sfruttate in passato, o che lo sono tuttora, per attività produttive industriali e artigianali, o per attività estrattive, o perché utilizzate come aree di stoccaggio e trattamento di rifiuti.

Ad oggi il problema della salvaguardia dell'ambiente è certamente uno dei temi più rilevanti che il mondo industrializzato ha affrontato e dovrà, sempre più, continuare ad affrontare. La sua soluzione richiede lo studio di nuove e più adeguate tecnologie sia per produrre tassi di inquinamento sempre minori, sia per trovare rimedio ai danni recati all'ambiente nel passato. Il censimento effettuato sul territorio nazionale ha portato ad annoverare oltre 10.000 aree potenzialmente inquinate, per le quali è necessario un intervento di bonifica. Fra queste più di 50 sono definite in base alla normativa aree di "interesse nazionale" poiché l'estensione del sito, il suo grado di contaminazione, le ripercussioni sulle popolazioni e le delicate condizioni giuridico amministrative richiedono l'adozione di criteri specifici di bonifica e di finanziamento (Canepa, 2003).

Con il termine "bonifica" si intende l'insieme degli interventi atti ad eliminare le fonti di inquinamento e le sostanze inquinanti o a ridurre le concentrazioni presenti nel

suolo, nel sottosuolo e nelle acque superficiali e sotterranee ad un livello uguale o inferiore agli standard fissati dalla normativa.

1.1. QUADRO NORMATIVO CHE REGOLA LA BONIFICA DEI SITI CONTAMINATI:

Fino agli inizi degli anni '80 la percezione della contaminazione dell'ambiente e del territorio nei paesi maggiormente industrializzati era generalmente associata ad incidenti relativamente rari, con conseguenze difficilmente valutabili, ma potenzialmente catastrofiche per la salute e per l'ambiente.

Attualmente i siti contaminati, il cui numero nei paesi più industrializzati è cresciuto esponenzialmente nell'ultimo decennio, non sono più percepiti in termini di pochi e gravi incidenti, ma piuttosto come un problema infrastrutturale e produttivo di varia intensità e importanza e soprattutto molto più diffuso di quanto si potesse inizialmente stimare.

Il problema della bonifica di aree contaminate, nella normativa italiana, venne affrontato per la prima volta con la Legge n. 441 del 29/10/1987 ("Disposizioni urgenti in materia di smaltimento dei rifiuti"), in cui si stabiliva che le Regioni individuassero le aree inquinate presenti sul territorio di propria competenza e predisponessero un Piano Regionale di Bonifica (P.R.B) secondo un ordine di priorità definito sulla base di un criterio di gravità della situazione di contaminazione, anche mediante l'utilizzo di strumenti quali l'analisi di rischio. Comunque, la non uniformità dei pochi P.R.B. trasmessi al Ministero dell'Ambiente portò lo stesso a stabilire, mediante il Decreto Ministeriale (D.M.) del 16/05/1989, i criteri e le linee guida per la predisposizione dei suddetti Piani anche se erano ancora molti gli aspetti non definiti in modo esaustivo e univoco dalla normativa stessa (Dotti, 2004).

L'emanazione del Decreto legislativo (D.lgs) n. 22 del 05/02/1997 (art.17 "Bonifica e ripristino dei siti contaminati") ha dettato regole complessivamente più organiche per la risoluzione del problema dei siti contaminati anche se con un forte ritardo rispetto agli altri paesi membri dell'Unione Europea.

Successivamente sono stati quindi emanati tutta una serie di provvedimenti legislativi, tra cui il D.lgs. n. 152/99 e il D.M. n. 471/99, che hanno fornito strumenti normativi omogenei sul territorio nazionale per fronteggiare il problema della gestione dei rifiuti, della tutela delle risorse idriche e quello, ad essi connesso, della bonifica dei siti contaminati.

In particolare, con il D.M. 471/99 viene stabilito l'obbligo di procedere al risanamento ambientale di un sito ogni volta si verificasse il “*superamento o il pericolo concreto e attuale di superamento dei valori di concentrazione limite accettabili*”. La normativa sottolinea che per gli interventi di bonifica e ripristino ambientale devono essere privilegiate tutte le soluzioni tecniche che “favoriscano la riduzione della movimentazione, il trattamento nel sito ed il riutilizzo del suolo, del sottosuolo e dei materiali di riporto sottoposti a bonifica”. Specifica inoltre che per ogni sostanza i valori di concentrazione da raggiungere con gli interventi di bonifica sono da riferirsi “ai valori del fondo naturale” con condizioni ancor più restrittive in prossimità di corpi idrici recettori classificati, ai sensi del D.lgs 152/99, come aree sensibili. Lo stesso decreto, regola infine, i criteri generali per gli interventi di bonifica in cui si faccia ricorso a batteri o ceppi batterici mutanti. Stabilisce infatti, che l'uso di inoculi costituiti da microrganismi geneticamente modificati (MGM) nei processi di bonifica biologica di suolo, sottosuolo, acque sotterranee o superficiali è consentito limitatamente ai bioreattori. Una volta terminato il ciclo di trattamento in bioreattore, le matrici, prima di una eventuale ricollocazione nella giacitura originaria, devono essere sottoposte a procedure atte a favorire una diffusa ricolonizzazione da parte di comunità microbiche naturali, in modo da ricondurre il numero dei MGM inoculati a valori minori di 10^3 UFC (unità formanti colonie) per grammo di suolo o millilitro di acqua sottoposti a trattamento di bonifica. Non sono invece soggetti a limitazioni gli interventi di *bioaugmentation* effettuati attraverso l'utilizzo di comunità microbiche degradatrici autoctone.

1.2. PRINCIPALI TECNICHE DI BONIFICA DEI SITI CONTAMINATI:

Le tecniche convenzionali di bonifica dei suoli contaminati sono state per anni quelle dell'escavazione del suolo stesso e del suo trasferimento in discarica oppure della copertura ed isolamento dell'area inquinata. Entrambi questi metodi presentano evidenti svantaggi: il primo sposta semplicemente il problema, con rischi elevati durante le fasi di escavazione, movimentazione e trasporto dei materiali pericolosi o inquinati ed è inoltre molto difficile e sempre più costoso trovare nuovi siti per realizzare discariche per il conferimento dei materiali. Il metodo del contenimento, invece, rappresenta soltanto una soluzione temporanea: l'inquinamento rimane nel terreno, richiede monitoraggio costante e successiva manutenzione delle barriere isolanti con relativi costi e problemi di affidabilità.

Un approccio preferibile ai due sopra descritti è rappresentato, invece, dalla completa, per quanto possibile, distruzione degli inquinanti o dalla loro trasformazione in sostanze innocue. A tal fine, sono stati sviluppati una serie di processi che possono essere complessivamente suddivisi, in base al luogo nel quale il trattamento depurativo viene svolto, in due categorie:

- trattamenti *ex situ*: il terreno viene escavato ed avviato al trattamento di bonifica che può essere effettuato in un impianto mobile o semimobile/trasportabile in loco (*on site*), ovvero in un impianto fisso localizzato altrove (*off site*). Il terreno decontaminato viene poi generalmente rideposto nel sito originario o riutilizzato.
- trattamenti *in situ*: il terreno viene trattato direttamente nella sede naturale con notevoli vantaggi rispetto ai processi di bonifica *ex situ*. Infatti, in questo caso si ha un maggior controllo diretto sul sistema e sull'evoluzione del processo di risanamento, una maggiore gamma di processi disponibili, la possibilità di variare le condizioni operative senza pericoli per l'esterno, tempi più ridotti di applicazione e la garanzia di una maggiore uniformità nell'abbattimento degli inquinanti.

A questa prima suddivisione, basata essenzialmente sul luogo nel quale viene effettuato il trattamento, le diverse tecnologie applicate alla bonifica dei siti contaminati possono essere ulteriormente classificate, in base al tipo di trattamento eseguito, in:

- Trattamenti termici: realizzati mediante processi che inducono la separazione dell'inquinante per volatilizzazione, desorbimento, fusione con la matrice solida o ancora distruzione termica dell'inquinante stesso;
- Trattamenti chimici: realizzati mediante processi chimici che trasformano gli inquinanti in composti meno tossici o meno mobili;
- Trattamenti fisici: realizzati mediante sistemi idonei a separare il contaminante dalla matrice sia essa solida che liquida;
- Trattamenti biologici (Bioremediation): realizzati sfruttando le capacità degradative di diverse classi di microrganismi (batteri, funghi, alghe) nell'abbattimento dei contaminati.

1.2.1. Trattamenti termici:

I trattamenti di tipo termico consentono principalmente il risanamento di terreni contaminati da sostanze organiche e, in alcune tipologie di processo, anche di rimuovere o immobilizzare efficacemente sostanze inorganiche, nel caso in cui siano vaporizzabili e quindi ossidabili a basse temperature. Tali trattamenti possono essere effettuati direttamente *in situ*, attraverso l'energizzazione del suolo con appositi elettrodi, in impianti fissi (*off site*) oppure in impianti mobili o trasportabili (*on site*). A seconda dello schema di processo e delle modalità operative, questi tipi di intervento possono essere classificati in due distinte categorie:

1. trattamenti di desorbimento termico: consistono nella evaporazione o pirolisi dei composti semivolatili del suolo con temperature variabili dai 90°C ai 650°C.
2. trattamenti di termodistruzione o incenerimento: vengono realizzati con temperature da 600 ad oltre 2000°C ed hanno lo scopo di volatilizzare ed ossidare termicamente i contaminanti organici del suolo. L'incenerimento risulta particolarmente idoneo per idrocarburi clorurati, bifenili policlorurati, diossine ed esplosivi.

1.2.1.1. Trattamenti di desorbimento termico:

Esistono diverse tipologie di trattamenti di desorbimento termico tra le quali ricordiamo:

- a. Soil Vapor Extraction (SVE): si tratta di una tecnologia applicata *in situ* per la bonifica della cosiddetta zona insatura del suolo contaminata con composti organici volatili (VOCs) o semivolatili (SVOCs) (Zhan & Park, 2002; Halmemies *et al.*, 2003). La SVE è generalmente molto efficace nel caso venga applicata alla rimozione di prodotti petroliferi altamente volatili come il gasolio mentre non risulta idonea nella rimozione di combustibili pesanti come, ad esempio, il cherosene. La rimozione dell'inquinante viene realizzata tramite l'iniezione di vapore nel terreno a temperature variabili tra 150 e 230°C, attraverso una serie di pozzi tenuti sotto vuoto con apposite pompe. Il vapore iniettato, venuto a contatto con il suolo condensa, mentre il suolo stesso si riscalda fino a raggiungere la temperatura del vapore. Si genera quindi, il fronte di vapore che, avanzando orizzontalmente nel sottosuolo, volatilizza i contaminanti incontrati lungo il percorso e li veicola verso un pozzo d'estrazione installato all'interno della zona

inquinata. La miscela di vapori ed inquinanti gassosi estratta, viene preliminarmente raffreddata in un condensatore ed i vapori non condensabili vengono trattati con filtri a carbone attivo, con trappole a freddo o in certi casi con sistemi di termodistruzione prima di essere rilasciati nell'atmosfera. L'iniezione del vapore aumenta sicuramente la volatilità dei composti organici che vengono trattati ma spesso risulta economicamente poco praticabile data la grande quantità di energia richiesta per l'attuazione del processo (Barnes *et al.*, 2000).

- b. Riscaldamento a radio frequenze: Viene praticato *in situ* mediante energizzazione del suolo con onde elettromagnetiche nel campo delle frequenze radio. L'energia elettromagnetica è trasmessa mediante una serie di elettrodi infissi in pozzetti trivellati nel terreno e connessi ad un trasmettitore di onde radio. I vapori contaminati prodotti possono essere direttamente aspirati tramite gli elettrodi stessi, oppure migrare liberamente fino ad essere captati e contenuti da una cappa posta a protezione della zona di trattamento. La miscela estratta viene inviata quindi ad un condensatore ed il condensato liquido, così come i vapori non condensabili, vengono opportunamente trattati, prima del rilascio in atmosfera. La temperatura di processo varia fra 100°C e 300°C (Dev *et al.*, 1986).
- c. Desorbimento termico *ex situ*: Consiste nella vaporizzazione dei contaminanti organici in gas inerte. La temperatura del ciclo di bonifica (100-600°C) è assicurata tramite riscaldamento diretto (il terreno viene riscaldato attraverso il contatto diretto con un vettore di calore che comunemente è un combustibile ausiliario bruciato all'interno di un tamburo rotante) o indiretto (il terreno viene posto a contatto con delle superfici metalliche, le quali vengono riscaldate). I fattori che determinano l'efficacia di questa tecnologia sono la temperatura, il livello di depressione del desorbitore e il tempo di permanenza del terreno nell'impianto. In questo modo si ottiene la separazione dell'acqua e degli inquinanti senza ossidazione termica. Gli inquinanti devono poi essere convogliati verso impianti di trattamento. Il desorbimento termico è spesso adottato in combinazione con altre tecnologie: *soil washing*, incenerimento, stabilizzazione e solidificazione. Se si opera a bassa temperatura è idoneo per composti organici volatili non alogenati, ad alta temperatura è applicabile per componenti organici semivolatili, policiclici aromatici, policlorobifenili, pesticidi e metalli volatili (Khan *et al.*, 2004).

1.2.1.2. Trattamenti di termodistruzione:

Questo tipo di metodologie di trattamento termico è rappresentato essenzialmente dai processi descritti di seguito:

- a. Vetrificazione *in situ*: è un metodo di stabilizzazione/solidificazione che consiste nel riscaldamento del suolo ad una temperatura compresa tra 1600 e 2000°C che comporta l'iniziale fusione del suolo, seguita poi da un rapido raffreddamento che porta alla formazione di un monolite amorfo e non cristallino (Asante-Duah, 1996). Le temperature di fusione vengono generalmente raggiunte attraverso l'applicazione al suolo contaminato di una corrente elettrica. Il riscaldamento del terreno determina inizialmente la volatilizzazione e la successiva pirolisi dei composti organici originariamente presenti. I prodotti della pirolisi migrano lentamente verso l'alto: alcuni si dissolvono nella massa fusa di terreno, mentre gli altri raggiungono la superficie, dove, a contatto con l'ossigeno, vengono ossidati. Le emissioni gassose vengono quindi raccolte da un'ampia cappa cilindrica e quindi avviate ad una linea di depurazione dei fumi. Alcune osservazioni vanno comunque sollevate: I) la profondità dei contaminanti può limitare il processo; II) è spesso necessario un monitoraggio a lungo termine per essere sicuri che l'inquinante rimanga immobilizzato; III) i composti organici non vengono generalmente immobilizzati ed inoltre, le alte temperature necessarie alla loro distruzione, ne provocano spesso la migrazione; IV) si può verificare un notevole aumento di volume degli inquinanti; V) non tutti i tipi di contaminanti possono essere trattati con questa procedura (Khan *et al.*, 2004).
- b. Termodistruzione *ex situ*: il suolo viene inizialmente vagliato, mescolato e preriscaldato, qualora il contenuto di umidità iniziale sia troppo elevato. In alcune tipologie impiantistiche proprie di questo genere di trattamento (inceneritore a tamburo rotante, a letto fluido, ad infrarosso, reattore a parete fluida), la decontaminazione per via termica avviene attraverso le seguenti fasi: I) l'iniziale riscaldamento del terreno determina l'evaporazione dell'umidità e degli idrocarburi volatili; II) l'innalzamento della temperatura fino a valori superiori a 300°C provoca poi la volatilizzazione degli idrocarburi più pesanti o la loro degradazione per pirolisi; III) a temperature superiori (400-600°C), infine, alcuni composti inorganici possono essere decomposti in prodotti volatili sia per effetto del riscaldamento che per ossidazione. Altre tipologie impiantistiche (sistema al plasma, vetrificazione in focolare a ciclone, pirolizzatore elettrico) determinano

oltre all'evaporazione la successiva termodistruzione degli inquinanti organici, la fusione del terreno, che assume, una volta raffreddato, la consistenza di materiale vetrificato, con immobilizzati al suo interno i contaminanti inorganici ad elevato punto di ebollizione (Andreottola e Tatàno, 1997).

1.2.2. Trattamenti chimico-fisici:

Le tecniche di risanamento di tipo chimico-fisico di suoli contaminati possono essere distinte principalmente in tre categorie, in funzione dell'effetto del trattamento sulla contaminazione, e cioè:

1. processi di estrazione: i contaminanti vengono rimossi mediante un agente estrattivo (areazione, *soil washing* e *soil flushing*);
2. processi di detossificazione: i contaminanti sono soggetti a reazioni di ossidoriduzione che danno luogo ad un prodotto finale non pericoloso (dealogenazione);
3. processi di immobilizzazione: la mobilità dei contaminanti viene sostanzialmente ridotta mediante un processo di confinamento in una matrice solida (solidificazione/ stabilizzazione).

Tra i diversi trattamenti di tipo chimico-fisico ricordiamo:

- a. Areazione (*Soil Venting*): Si tratta di una tecnica applicata generalmente *in situ*, relativamente efficace per la rimozione dei contaminanti organici volatili presenti nella zona insatura del terreno. In seguito alla ventilazione indotta da uno o più pozzi di immissione, si ha lo strappaggio dei composti presenti in fase gassosa ed un aumento della volatilizzazione dei composti volatili. Un sistema di ventilazione *in situ* è costituito da pozzi d'immissione d'aria, pozzi di estrazione vapori e pozzi di monitoraggio. I gas liberati vengono quindi estratti accoppiando un sistema di SVE per evitare migrazioni degli inquinanti al di fuori della zona da trattare e l'aria estratta viene avviata ad una linea di trattamento, in genere costituita da un'unità di combustione o di adsorbimento su carboni attivi (Andreottola & Tatàno, 1997). Lo svantaggio principale legato all'impiego di tale tecnologia di bonifica è il fatto che non è applicabile in aree urbane o in qualsiasi altro luogo nel quale i vapori possano causare danni alla salute umana. Diversi tipi di contaminanti possono essere rimossi attraverso questo processo come ad esempio: composti organici semivolatili, pesticidi e carburanti. I composti organici altamente volatili, possono essere rimossi in tal modo ma, il

processo di areazione deve essere necessariamente seguito da un trattamento dei gas in uscita (Boyle, 2002).

- b. *Soil washing*: E' una tecnica applicata *ex situ* nella quale si utilizzano liquidi, generalmente acqua, occasionalmente combinata con solventi, per la decontaminazione di suoli. I solventi vengono selezionati sia in base alla loro abilità di solubilizzazione dei contaminanti da trattare che in base ai loro effetti sull'ambiente (Asante-Duah, 1996; Feng *et al.*, 2001; Urum *et al.*, 2003). Il processo di *soil washing* causa la separazione della porzione fine del suolo (argilla e limo) da quella più grossolana (sabbia e ghiaia) che vengono poi trattate separatamente. Infatti, dato che i contaminanti organici tendono a legarsi o assorbirsi alle particelle di suolo più fini, separandole da quelle più grossolane si ha una riduzione del volume di suolo contaminato che viene poi ulteriormente trattato con altre tecnologie come ad esempio incenerimento o *bioremediation*. Diversi tipi di contaminanti possono essere trattati con questa tecnologia come ad esempio: composti organici semivolatili, residui petroliferi o carburanti, metalli pesanti, bifenili policlorurati, idrocarburi policiclici aromatici e pesticidi (Asante-Duah, 1996; Feng *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2002; Juhasz *et al.*, 2003). Il processo di *soil washing* risulta comunque economicamente poco conveniente dato che richiede ulteriori trattamenti della matrice contaminata per la completa rimozione degli inquinanti. Anche in questo caso va comunque osservato che: I) il trattamento di suoli contaminati da miscele complesse di inquinanti richiede l'utilizzo di una combinazione di più solventi; II) è necessario un pretrattamento per suoli che contengono acidi umici; III) composti organici adsorbiti nelle particelle di argilla sono difficili da rimuovere; IV) le acque di lavaggio devono essere trattate prima del loro smaltimento; V) il processo risulta molto efficace solo se applicato a suoli che non contengono grandi quantità di argilla o limo (Khan *et al.*, 2004).
- c. *Soil flushing*: E' una tecnica innovativa di bonifica, applicata *in situ* che consiste nell'estrazione dei contaminanti attraverso la dissoluzione in un fluido acquoso che viene immesso nel suolo attraverso una serie di pozzi ubicati a monte dell'area contaminata ed estratto a valle di essa, tramite pozzi di captazione, per essere poi depurato ed eventualmente riciclato. Generalmente come fluido estraente viene utilizzata acqua con l'aggiunta di detersivi o composti acidi o basici per migliorare eventualmente l'efficacia del trattamento (Otterpohl, 2002; Di Palma *et al.*, 2003). Il *soil flushing* può essere applicato a tutti i tipi di

contaminanti ed è generalmente utilizzato in combinazione con altre tecnologie di bonifica come ad esempio l'utilizzo di carboni attivi o processi di *bioremediation* (Juhasz *et al.*, 2003).

- d. Inertizzazione: solidificazione e stabilizzazione: L'obiettivo di questo tipo di trattamenti è quello di ridurre la mobilità dei contaminanti riducendo la superficie disponibile alla percolazione, attraverso la creazione di una matrice solida compatta (solidificazione) e/o di un legame chimico tra il contaminante e la matrice solida (stabilizzazione). In tutti i processi di inertizzazione il terreno contaminato viene miscelato con leganti o altri agenti chimici organici ed inorganici come ad esempio: sostanze termoplastiche, polimeri organici, composti macroincapsulanti, cemento a base neutra o acida, calce, argilla. Le apparecchiature utilizzate nei processi di inertizzazione *ex situ* a base cementizia non si discostano molto da quelle comunemente adoperate per la preparazione del cemento. Il processo *in situ* consiste invece, nel miscelare il terreno con gli additivi senza escavazione, ma utilizzando macchine perforatrici il cui diametro può raggiungere anche i 2 metri. La miscelazione, è l'aspetto cruciale dell'applicazione *in situ* di questo tipo di tecnologia. I contaminanti prevalentemente trattati con questo tipo di trattamento sono i metalli pesanti e i composti inorganici (Bishop, 1990).
- e. Dealogenazione: Si tratta di un processo di tipo chimico applicato *ex situ* e basato sulla reazione tra composti glicolati e composti alogenati, in particolare bifenili policlorurati e policlorodibenzodiossine/policlorodibenzofurani (PCDD/PCDF), da cui segue la liberazione di cloro e la conseguente detossificazione, parziale o totale, dei composti di partenza. Il processo si articola in cinque stadi: I) preparazione del terreno; II) reazione; III) separazione; IV) lavaggio; V) eliminazione della fase acquosa. Il trattamento di dealogenazione è applicabile a terreni, fanghi, sedimenti contaminati da composti organici semivolatili alogenati, pesticidi, diossine, furani e PCB (Andreottola & Tatano, 1997).

1.2.3. Trattamenti Biologici:

Fino a relativamente pochi anni fa, nel descrivere i possibili trattamenti di risanamento di suoli contaminati, i processi biologici venivano citati solo marginalmente, come tecnologie adatte a pochi casi particolari. Oggi, per alcuni tipi di

contaminazione, e grazie alla possibilità di ottenere un terreno biologicamente vivo in tempi accettabili e con costi sensibilmente inferiori rispetto a quelli necessari per l'applicazione di altre tecniche, è nato un considerevole interesse nei confronti della loro applicazione.

Il risanamento biologico (biorisanamento o *bioremediation*) di siti inquinati sta quindi acquisendo un crescente interesse in quanto l'impiego di microrganismi si è rivelato vantaggioso sia da un punto di vista tecnico che economico (Šašek *et al.*, 2003). La *bioremediation* rappresenta quindi una valida alternativa alle tecnologie convenzionali di bonifica e la ricerca in questo settore è in continua espansione, in tutto il mondo ed in particolare negli Stati Uniti.

Con il termine biorisanamento ci si riferisce a tutto l'insieme di tecnologie che, sfruttando la capacità dei microrganismi di degradare i contaminanti, sono capaci di accelerare i fenomeni naturali di detossificazione dell'ambiente. Si tratta di processi che coinvolgono la microflora indigena o microrganismi esogeni capaci di degradare e metabolizzare i composti inquinanti il suolo.

Fin dagli anni '70 si è riconosciuto a batteri, funghi ed alghe la capacità di mineralizzare gli inquinanti presenti sia nei suoli che nelle acque. Il ruolo di maggiori responsabili della degradazione della sostanza organica spetta ai batteri in virtù della loro capacità di attacco unitamente ad una velocità di crescita superiore a quella degli altri microrganismi, i quali in ogni caso concorrono a formare con i primi un vero e proprio "consorzio" responsabile del processo di bonifica. Questo consorzio esplica la sua attività attraverso una sequenza di eventi che porta ad una continua trasformazione delle molecole e della microflora presente, per cui ogni fase è diversa dalla precedente e dalla successiva.

Il principio cardine su cui si basa il processo di biorisanamento è quindi l'accelerazione dei processi degradativi che normalmente avverrebbero in natura. Tale accelerazione si ottiene migliorando le condizioni per lo sviluppo e la crescita dei microrganismi stessi, aumentando, ad esempio, l'ossigenazione del suolo e la concentrazione delle sostanze limitanti la crescita.

Come qualsiasi altra tecnologia, anche la *bioremediation* presenta dei limiti: alcuni inquinanti, come i composti organici clorurati o gli idrocarburi aromatici più pesanti, sono spesso resistenti agli attacchi microbici: non riescono ad essere degradati oppure lo sono ma a ritmi lentissimi. Proprio per questo, a volte risulta difficile prevedere i tempi necessari per il completamento di un intervento di biorisanamento: non esistono regole certe per prevedere se un inquinante venga o meno degradato e se sì a che velocità.

Tutto ciò risulta ancor più vero se si considera il fatto che, nella quasi totalità dei casi i siti risultano contaminati da miscele di inquinanti.

1.2.3.1. Trattamenti di biorisanamento in situ:

I trattamenti di biorisanamento *in situ* si propongono di aumentare l'attività microbica indigena, in modo che i contaminanti vengano rimossi ad una velocità e un'efficienza superiori rispetto a quelle ottenibili senza interventi. Le principali tecniche di biorisanamento *in situ* sono:

- a. Bioventilazione (Bioventing): Viene applicata nella bonifica della zona insatura del suolo e consiste nel fornire O₂ ai microrganismi presenti in detta zona attraverso l'immissione di aria, che è un mezzo ottimo per il trasporto dell'O₂ poiché sono sufficienti appena 4,5 g di aria per trasferire 1 g di O₂ ai microrganismi. Il sistema prevede l'impianto *in situ* di uno o più pozzi d'estrazione, collegati a pompe del vuoto, che garantiscono la circolazione dell'aria nel terreno insaturo contaminato. L'obiettivo dell'intervento è la stimolazione della biodegradazione aerobica degli inquinanti, e non il loro strippaggio o volatilizzazione. Per questo motivo è fondamentale ottimizzare la fornitura di O₂ minimizzando allo stesso tempo i rischi di volatilizzazione dei contaminanti, e questo obiettivo può essere raggiunto insufflando nella zona vadosa portate d'aria basse e massimizzando, attraverso un'attenta disposizione dei pozzi di estrazione, il tempo di residenza delle stesse entro il volume di terreno inquinato. In qualche caso l'impianto può comprendere anche un sistema d'irrigazione superficiale dell'area contaminata per la fornitura di acqua necessaria al mantenimento dell'umidità ottimale (75% della capacità di campo del suolo), che durante il processo tende a diminuire per effetto del passaggio dell'aria, e degli eventuali nutrienti assenti o carenti. Con il processo di bioventilazione è quindi possibile la rimozione di tutte le sostanze aereobicamente degradabili e tale tecnologia può essere applicata con successo nella degradazione di molti prodotti petroliferi soprattutto quelli a basso o medio peso. Importanti osservazioni, sia riguardo i vantaggi che gli svantaggi, possono essere fatte sull'impiego di tale tecnologia di biorisanamento: I) sono richiesti tempi relativamente corti per la bonifica di siti contaminati (6-24 mesi); II) è una tecnologia facilmente combinabile con altre; III) non richiede quasi mai il trattamento successivo dei gas in uscita; IV) non può essere applicata in siti

caratterizzati da bassa permeabilità, alto contenuto di argilla ecc.; V) risulta effettivamente efficace solo nel trattamento della zona insatura del terreno (Khan *et al.*, 2004).

- b. Ricircolazione d'acqua in terreno saturo: La bonifica eseguita secondo questa tecnologia si presta molto bene al trattamento di terreni saturi contaminati da idrocarburi semplici (1-15 atomi di carbonio), alcoli, fenoli, ammine, acidi, esteri e idrocarburi alifatici basso-clorurati, ossia inquinanti solubili in acqua e poco predisposti ad adsorbirsi sulle particelle di suolo. L'acquifero deve mostrare un'ottima permeabilità, una granulometria uniforme e di geologia ben definita e infine uno spessore e una soggiacenza di falda di almeno 3 metri. Questo tipo di tecnologia può essere applicato seguendo tre diverse procedure. Il processo convenzionale: consiste nell'estrarre l'acqua contaminata a valle del sito tramite pozzi di estrazione, trattarla in superficie, arricchirla con un accettore di elettroni e nutrienti e quindi re-immetterla a monte del pennacchio contaminato mediante pozzi di iniezione. L'arricchimento in nutrienti dell'acqua di ricircolo viene eseguita in modo tale che il rapporto C:N:P sia variabile tra 100:10:1 e 350:10:1. L'acqua di ricircolo può essere arricchita di ossigeno, insufflando aria (8-10 mg/l di O₂ disciolto), ossigeno puro (40-50 mg/l di O₂ disciolto), oppure aggiungendo perossido di idrogeno (H₂O₂). In quest'ultimo caso non vanno impiegate comunque concentrazioni maggiori di 100-500 mg/l in quanto il H₂O₂ può esercitare effetti tossici sui batteri, può dare origine a precipitati che vanno ad intasare i pozzi oppure può causare la formazione di bolle di O₂ che vanno a ridurre la conducibilità idraulica dell'acquifero. Nel caso del processo a doppia zona di trattamento è prevista una zona di trattamento anaerobico nella porzione conclusiva del pennacchio contaminato che è costituita da una batteria di pozzi di iniezione e di estrazione alternati. Il processo biologico che si sviluppa è la dealogenazione di solventi altamente clorurati ad opera dell'attività co-metabolica di batteri metanigeni. Con l'acqua di ricircolo si provvede ad immettere nel pennacchio contaminato substrato primario (glucosio) e nutrienti. La seconda zona di trattamento aerobico è posta a valle del pennacchio ed è costituita anch'essa da una batteria di pozzi paralleli alla prima schiera. In questa zona la somministrazione di O₂, nutrienti e CH₄ aggiuntivo favorisce l'attività degradativa co-metabolica aerobica di batteri metanotrofici, i quali, utilizzando il CH₄ prodotto dai batteri metanigeni come substrato primario, determinano la completa dealogenazione dei metaboliti prodotti dal processo di parziale dechlorurazione

avvenuto nella prima zona e la mineralizzazione dei solventi non alogenati. Infine, nel processo UVB: il cuore dell'impianto è costituito da un pozzo suddiviso idraulicamente in due zone, una in sommità e l'altra sul fondo. Una pompa all'intero del pozzo richiama acqua di falda verso il fondo e la solleva fin dentro la porzione in sommità dove vengono introdotti ossigeno, nutrienti e substrati primari. L'acqua così arricchita si reimmette in falda.

- c. Biosparging e Bioventing: è un processo combinato che tratta contemporaneamente la zona satura e quella insatura del suolo. Viene immessa aria compressa (*Biosparging*) nella zona satura contaminata mediante pozzi, determinando un aumento dell'ossigeno nell'acquifero e la conseguente stimolazione dell'attività biodegradativa. L'iniezione d'aria agisce con meccanismi differenti sui contaminanti in falda: gli inquinanti altamente volatili, adsorbiti alle particelle di suolo, ovvero disciolti in fase liquida, al passaggio dell'aria si trasferiscono (rispettivamente per volatilizzazione e strippaggio) in fase vapore e migrano verso l'alto raggiungendo la zona vadosa sovrastante, dove possono essere biodegradati direttamente nel terreno insaturo oppure raccolti e captati, tramite un sistema d'estrazione sottovuoto, e quindi trattati prima di essere scaricati in atmosfera assieme all'aria d'estrazione. Gli inquinanti poco volatili vengono invece biodegradati nella zona satura grazie all'O₂ fornito con l'aria. Tale tecnica si presta bene per la bonifica di siti abbastanza permeabili, di un buono spessore e contaminati da sostanze volatili e solubili in acqua. Inoltre, affinché risulti applicabile, l'acquifero deve essere del tipo a falde freatiche, dove è resa possibile la fuoriuscita dell'aria insufflata nella zona satura (Brown *et al.*, 1994).
- d. Ricircolazione d'acqua in zona vadosa + terreno saturo: In questo tipo di processo l'acqua di falda contaminata viene recuperata tramite pozzi di estrazione, trattata in una colonna di strippaggio, arricchita con ossigeno e nutrienti e contemporaneamente ricircolata nell'acquifero, attraverso un sistema di pozzi di iniezione, realizzando in tal modo il processo a "ricircolazione convenzionale in terreno saturo", e nella zona insatura mediante gallerie subsuperficiali, trincee drenanti o sistemi di irrigazione a pioggia. Le condizioni di applicabilità ottimale di questa tecnica prevedono il trattamento di acquiferi ad alta permeabilità contaminati da inquinanti molto solubili in acqua (solventi clorurati, alcoli, fenoli, acidi ecc.) e presenti in elevata concentrazione.

1.2.3.2. Trattamenti di biorisanamento ex situ:

Tali trattamenti comportano l'escavazione del terreno contaminato, che viene successivamente trattato biologicamente *on site* oppure *off site*. Prima di operare il trattamento di bonifica occorre raccogliere campioni significativi del terreno contaminato e verificare sperimentalmente la loro trattabilità biologica. In caso di risposta positiva, il primo passaggio nella preparazione del suolo consiste nella separazione, dalla matrice pedologica contaminata vera e propria, tramite vagliatura, delle componenti più grossolane, quali ghiaia, pietre ed eventuali altre frazioni inerti con granulometria >50 mm. Questa operazione serve a ridurre drasticamente il volume del materiale da sottoporre al trattamento, tenuto conto del fatto che, nella maggior parte dei casi, ghiaia e pietre non sono contaminate come la frazione fine, più ricca di materiale organico adsorbente e poroso. Le frazioni grossolane separate dal terreno possono essere riutilizzate direttamente, ovvero a seguito di opportuno lavaggio in grado di rimuovere gli inquinanti eventualmente adesi sulla superficie. Il terreno vagliato viene di norma sottoposto a un'efficace omogeneizzazione al fine di raggiungere un grado di contaminazione medio in tutta la matrice. In qualche caso la frazione fine inviata al trattamento viene ammendata con i nutrienti e cofattori necessari per l'attività microbica.

Le tecniche principalmente impiegate possono essere descritte come segue:

- a. Bioreattori: vengono classificati in due categorie: reattori in fase semisolida (*slurry*), operanti con sospensioni di suolo in acqua al 10-40% in peso, e reattori in fase solida (*dry matter reactor*) operanti con suolo insaturo con un contenuto d'acqua compreso nell'intervallo 10-20%. I bioreattori trovano applicazione nella biorimozione di composti difficilmente degradabili con gli altri processi biologici ovvero nei casi urgenti di decontaminazione. Questa tecnica di bonifica offre infatti la possibilità di massimizzare la velocità e la resa di *bioremediation* di un terreno contaminato consentendo di: controllare e gestire finemente i principali parametri di processo; avere un elevato grado di miscelazione e di omogeneità all'interno della matrice; poter aggiungere microrganismi esogeni specializzati ed eventuali tensioattivi; di monitorare la produzione e di contenere eventuali metaboliti della degradazione degli inquinanti. Questo fa sì che i bioreattori vengano impiegati frequentemente nella bonifica di suoli con inquinanti organici molto recalcitranti, quali IPA, PCB. Nei reattori *slurry* la massa fangosa è mantenuta in costante agitazione da pale rotanti oppure

insufflando aria o ossigeno. L'utilizzo dell'ossigeno aumenta l'efficienza del processo di biodegradazione, ma implica costi maggiori e introduce problemi di esplosività. Questi reattori possono essere di tipo *batch* o continui a seconda delle modalità di carico e scarico. I primi hanno il vantaggio di consentire un controllo di processo più efficace, non essendo presenti correnti in entrata, ma implicano tempi di trattamento più lunghi e stoccaggi di grandi quantità di materiale. I reattori funzionanti in modalità continua permettono di trattare maggiori quantità di matrice contaminata, ma risultano difficilmente controllabili nel tempo, a causa dei parametri variabili delle correnti in entrata. Una parte del liquame in uscita viene riciclata per mantenere una buona concentrazione microbica, evitando così il *wash out*, ed una parte inviato ad inspessitori per ridurre il contenuto d'acqua in modo da abbattere i costi di trasporto e di stoccaggio. I reattori *slurry* possono essere aperti all'atmosfera o chiusi; in questi ultimi si possono creare condizioni anaerobiche e si può sfruttare la biomassa anaerobica per la degradazione degli inquinanti. La digestione anaerobica di suoli molto inquinati da materiale organico porta alla produzione di biogas, composto da CH₄, CO₂, H₂O e H₂S ed utilizzabile come combustibile (Khan *et al.*, 2004). I reattori in fase solida sono caratterizzati da un'attività microbica minore rispetto ai reattori *slurry*, dovuta a condizioni di omogeneità e biodisponibilità nettamente inferiori. Sono utilizzati quando il suolo non è particolarmente inquinato o quando la granulometria del terreno non consente trattamenti in fase *slurry*. Sono generalmente reattori discontinui, nei quali il terreno viene depositato al loro interno, dopo aver rimosso i frammenti più grossolani di pietre e radici e nei quali l'aerazione è garantita insufflando aria arricchita con ossigeno.

b. Landfarming e compostaggio: Il *landfarming* consiste nel porre uno strato di 20-60 cm di terreno in fase solida sopra ad uno strato di 20-30 cm di sabbia, a sua volta delimitato inferiormente da uno strato impermeabile, costituito di argilla o materiale plastico, al fine di evitare percolamento. Il terreno viene periodicamente dissodato, per miscelarlo ed arearlo, e l'umidità è regolata mediante aggiunta di acqua, la quale è raccolta in tubi perforati posti nello strato di sabbia, e di seguito ricircolata e trattata separatamente. Il compostaggio, che rappresenta una versione ingegnerizzata del *landfarming*, è una tecnologia più dispendiosa in termini energetici, ma richiede superfici inferiori per poter essere applicata. Il suolo viene disposto in cumuli o in strati sovrapposti, fornendo

ossigeno mediante movimentazione con mezzi meccanici (variante “a cumuli rivoltati”) o insufflando aria tramite tubi fessurati posti all’interno del cumulo (variante “ad aerazione forzata”). In entrambi i trattamenti il terreno viene mescolato con materiale di origine vegetale a basso peso specifico (*bulking agent*) in grado di aumentare la porosità dell’ammasso di terreno. Durante qualsiasi trattamento mediante compostaggio, l’umidità del suolo da trattare deve essere mantenuta al di sotto della capacità di campo in modo che l’acqua non occluda completamente i pori, lasciando all’O₂ la possibilità di diffondere attraverso la matrice contaminata. Per quanto riguarda le potenzialità del processo, il compostaggio è stato applicato con successo nel trattamento di terreni contaminati da composti aromatici volatili, fenoli, idrocarburi policiclici aromatici fino a quattro anelli benzenici e nitro-composti esplosivi (TNT e RDX), con rendimenti di rimozione superiori al 90% (Jorgensen *et al.*, 2000).

1.2.3.3. Micorisanamento:

Il “micorisanamento”, ossia il trattamento biologico basato sull’utilizzo di funghi, soprattutto appartenenti alla classe dei “*white-rot*”, è considerato attualmente di grande interesse nella bonifica di suoli contaminati da inquinanti organici. I funghi “*white-rot*”, infatti, si sono dimostrati particolarmente abili nel metabolizzare e mineralizzare molti contaminanti organici, quali oli ed affini, prodotti petroliferi, clorofenoli e idrocarburi policiclici aromatici (Alexander, 1994; Juhasz & Naidu, 2000). I funghi filamentosi hanno inoltre delle peculiarità che li distinguono dai batteri dal punto di vista della possibile applicabilità al biorisanamento di suoli inquinati e alla rimozione dei contaminanti. Le loro ife, infatti, hanno ottima capacità di penetrazione nella matrice contaminata; producono, inoltre, enzimi esocellulari quali laccasi, Mn-perossidasi e lignina-perossidasi in grado di raggiungere ed attaccare i composti inquinanti, anche a basse biodisponibilità. Le ossidasi che producono, inoltre, hanno bassa specificità del substrato e quindi sono capaci di ossidare (anche attraverso mediatori) un’ampia gamma di composti aromatici. Un altro aspetto che rende interessante l’impiego dei funghi filamentosi nel biorisanamento è il fatto che essi partecipano anche ai processi di umificazione del suolo. Un loro intervento nel biorisanamento può, quindi, dare avvio all’umificazione così da restituire il suolo risanato ad un eventuale uso agricolo.

I meccanismi che governano la degradazione di molti composti xenobiotici, in particolare gli idrocarburi policiclici aromatici, sono stati ampiamente studiati ed è stato

evidenziato che la maggior parte sono processi co-metabolici, in cui il fungo è sì in grado di mineralizzare l'inquinante, ma è incapace di crescere su di esso in quanto ha bisogno di una fonte alternativa di carbonio per la produzione di energia.

1.2.3.4. I funghi “white-rot”

I funghi *white-rot*, appartenenti generalmente al gruppo dei Basidiomiceti, colonizzano in natura il legno e preferenzialmente decompongono lignina e materiali ligneocellulosici causandone la cosiddetta carie bianca. Il nome deriva appunto dall'aspetto del legno attaccato da questi funghi, nel quale l'eliminazione della lignina porta ad uno scolorimento del substrato.

L'elevata resistenza alla degradazione microbica esibita dai materiali ligneocellulosici è dovuta proprio alla presenza della lignina, una macromolecola della parete cellulare vegetale, che conferisce ai tessuti legnosi una notevole stabilità strutturale. La lignina è un etero-polimero complesso costituito da subunità a scheletro fenilpropanoidico interconnesse attraverso una grande varietà di legami eteri e carbonio-carbonio. L'estrema eterogeneità strutturale, ma soprattutto le dimensioni macromolecolari della lignina, rende questa molecola resistente alla degradazione da parte di sistemi enzimatici intracellulari.

E' per questo, che i funghi *white-rot*, hanno sviluppato nel corso dell'evoluzione un sistema degradativo aspecifico basato sulla produzione e l'escrezione di un gruppo di enzimi che sono normalmente sintetizzati in risposta ad una riduzione o ad una limitazione delle fonti azotate e/o carboniose. Gli enzimi prodotti, che agiscono sui loro substrati generando radicali liberi (Tour *et al.*, 1995), includono ossidasi a rame (Laccasi e Tirosinasi), ossidasi generanti perossido di idrogeno (Glucosio-ossidasi, Gliossal-ossidasi, Aril-alcool ossidasi) e perossidasi (Ligninasi e Perossidasi manganese dipendenti).

Oltre alla decomposizione della lignina, il potenziale degradativo dei funghi *white-rot* nei confronti di vari inquinanti, sia in suolo sterile che non, è stato ben documentato (Davies *et al.*, 1993; Sasek *et al.*, 1993; D'annibale *et al.*, 2005).

Infatti, l'aspecificità di questi sistemi enzimatici permette a tali organismi di degradare un'ampia varietà di substrati organici fra cui numerosi composti xenobiotici. Ad esempio, composti recalcitranti come i pesticidi clorurati (Kennedy *et al.*, 1990), gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) (Bumpus, 1989), i bifenili policlorurati (PCB) e gli esplosivi a base nitro-aromatica (Fernando *et al.*, 1990) sono mineralizzati con alto

grado di efficienza dai funghi *white-rot*. Questa estrema aspecificità degradativa rende quindi interessante l'uso potenziale di questi agenti biologici in procedure di biorisanamento.

1.2.3.5. Enzimi ligninolitici prodotti dai funghi *white-rot*:

Il corredo di enzimi ligninolitici prodotti dai funghi *white-rot*, consiste principalmente di perossidasi (Mn-perossidasi e lignina-perossidasi), fenolossidasi (laccasi) ed un insieme ad enzimi di supporto (ossidasi che producono H₂O₂) quali, ad esempio, glucosio ossidasi e arilalcol-ossidasi (Fakoussa & Hofrichter, 1999).

La lignina perossidasi (LiP; EC 1.11.1.14, Diarilpropano, ossigeno, perossido di idrogeno ossidoreduttasi) è l'enzima ligninolitico più studiato. Fu scoperto per la prima volta nel fungo *Phanerochaete chrysosporium* (Glenn *et al.*, 1983); in seguito fu anche trovato in molti altri basidiomiceti come *Phlebia radiata* (Hatakka *et al.*, 1987), *Trametes (Coriolus) versicolor* (Dodson *et al.*, 1987), *Bjerkandera adusta* (Kimura *et al.*, 1991), *Nematoloma frowardii* (Hofrichter & Fritsche, 1997) e anche nell'ascomicete *Chrysonilia sitophila* (Duran *et al.*, 1987).

La LiP è una glicoproteina che contiene come gruppo prostetico un gruppo eme (ferro protoporfirico IX) e richiede il perossido d'idrogeno per esprimere la sua attività catalitica (Gold *et al.*, 1984; Tien & Kirk, 1984). La LiP è espressa in forme enzimatiche multiple, isoenzimi, con peso molecolare compreso tra 38 e 47 kDa e punti isoelettrici tra 3.2 e 4.7 (Hatakka, 1994).

Il ciclo catalitico della LiP consiste nell'ossidazione monoelettronica dell'enzima nativo da parte del perossido d'idrogeno, con formazione di un intermedio catalitico denominato Composto I. Questo viene, a sua volta, ridotto in Composto II, attraverso un elettrone fornito da un composto aromatico (alcol veratrilico), che conseguentemente dà origine ad un catione radicalico aromatico. La LiP ha una bassa specificità di substrato per i composti aromatici e ossida sia strutture fenoliche che non-fenoliche, preferendo quelle metossi-sostituite, grazie al suo alto potenziale redox (> +1.5V) (Kersten *et al.*, 1990). I composti fenolici sono ossidati a fenossiradicali che, vengono trasformati in chinoni (Odier *et al.*, 1988), i quali, a loro volta, possono anche polimerizzare (Higuchi, 1986; Odier *et al.*, 1988); i composti aromatici non fenolici sono invece ossidati a cationi radicalici arilici (Shoemaker *et al.*, 1985).

La LiP è un enzima estremamente sensibile, che può essere inattivato dal suo stesso co-substrato, il perossido d'idrogeno, e da sostanze fenoliche (Chung & Aust, 1995). Per questo motivo un suo utilizzo applicativo sembra essere poco praticabile.

La manganese perossidasi (MnP, EC 1.11.1.13., Mn(II): perossido d'idrogeno ossidoreduttasi), scoperta anch'essa in *P. chrysosporium* (Kuwara *et al.*, 1984), ha un ciclo catalitico simile alla LiP. Tuttavia, al contrario della LiP, la MnP agisce preferenzialmente sui substrati fenolici, utilizzando la coppia redox Mn(II)/Mn(III), come intermediario.

Diversi studi evidenziano la capacità della MnP di ossidare, sia pure con efficienza inferiore rispetto alla LiP, anche substrati non fenolici caratterizzati da un alto potenziale redox (Buswell *et al.*, 1995; D'Annibale *et al.*, 1996). La capacità catalitica della MnP è incrementata dalla presenza di appropriati mediatori, quali tioli (Forrester *et al.*, 1988; Hofrichter *et al.*, 1998), lipidi, acidi grassi insaturi e loro derivati (Bogan *et al.*, 1996; Kapich *et al.*, 1999), acidi organici (malico, ossalico, tartarico etc.), che agiscono da agenti chelanti del Mn(III) (Warishii *et al.* 1992) e facilitano l'ossidazione di vari composti aromatici (Martinez *et al.*, 1996; Hofrichter *et al.*, 1998) e acidi organici (Perez & Jeffries, 1992; Hofrichter *et al.*, 1998).

Anche la MnP è un enzima extracellulare glicosilato, che contiene un gruppo eme (Glenn & Gold, 1985; Schneega *et al.*, 1997), ed è presente in diverse forme isoenzimatiche, con pesi molecolari compresi tra 38 e 50 kDa e punti isoelettrici tra 2.9 e 7 (Fakoussa & Hofrichter, 1999). Oltre che in *P. chrysosporium* la MnP è stata anche trovata in altri funghi *white-rot* degradatori della lettiera come, ad esempio, *T. versicolor* (Johansson & Nyman, 1987), *P. radiata* (Nikku-Pavola *et al.*, 1990), *Panus tigrinus* (Maltseva *et al.*, 1991), *Lentinula edodes* (Forrester *et al.*, 1988), *Ceriporiopsis subvermisporea* (Ruttiman *et al.*, 1992), *Pleurotus ostreatus* (Becker & Sinitsyn, 1993), *Agaricus bisporus* (Bonnen *et al.*, 1994), *N. frowardii* (Schneega *et al.*, 1997), *Stropharia rugosoannulata* (Sheibner & Hofrichter, 1998), *Clytocybula dusenii* (Ziegenhagen & Hofrichter, 1998).

Il ciclo catalitico della MnP include la forma nativa dell'enzima (Fe(III)), il Composto I e il Composto II (Warishii *et al.*, 1992). Il Mn(II) è richiesto come donatore di un elettrone e riduce entrambi i composti I e II, mentre si ossida a Mn(III) (Fakoussa & Hofrichter, 1999). Nel ciclo catalitico di quest'enzima è stata riscontrata anche la presenza di un intermedio cataliticamente inattivo (Composto III), che si genera in presenza di un eccesso di perossido d'idrogeno ed è una forma irreversibile. Questo spiega la sua notevole instabilità e le limitazioni a un suo eventuale utilizzo applicativo

(Neto & Kling, 1993; Khazaal *et al.*, 1993). Tuttavia, la capacità della MnP di intervenire nel processo di umificazione nel suolo (Hofrichter, 1998) suggerisce il suo utilizzo in applicazioni ambientali.

La laccasi (EC 1.10.3.2., p-benzenediolo: O₂ ossidoreduttasi) è una fenolossidasi con una bassa specificità di substrato, ma non è in grado di ossidare substrati con un potenziale redox maggiore di 0.8-0.9V, quali unità non fenoliche metossi-sostituite (Brown, 1967; D'Annibale *et al.*, 1996).

E' una proteina che contiene rame e per questo è conosciuta anche come "ossidasi a rame blu" (Reinhammar & Malström, 1981). Questo enzima è prodotto da quasi tutti i funghi ligninolitici quali, *T. versicolor* (Fahereus & Reinhammar, 1967), *P. radiata* (Kantelinen *et al.*, 1989), *Pycnoporus cinnabarinus* (Eggert *et al.*, 1996), *N. frowardii* (Hofrichter & Fritsche, 1997) e anche da molti altri funghi, come *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* (Thurston, 1994), e piante superiori, quali *Nicotiana tabaccum*, *Acer pseudoplatanus* (O'Malley *et al.*, 1993).

Recentemente, è stata osservata anche in alcuni batteri, tra cui il più studiato è *Azospirillum lipoferum* (Givaudan *et al.*, 1993; Faure *et al.*, 1996; Alexander *et al.*, 1996), molto diffuso nel suolo. Alcune fenolossidasi con caratteristiche laccasiche sono state purificate dalle larve e dalla cuticola degli adulti di alcuni insetti, tra cui *Drosophila melanogaster* (Miessner *et al.* 1991).

La laccasi è una proteina glicosilata, espressa in diverse isoforme, con pesi molecolari (59-110 kDa) e potenziali redox (0.4-0.8V) molto variabili (Xu, 1997).

Il centro catalitico della laccasi contiene, generalmente, quattro ioni rame Cu(II) che trasferiscono gli elettroni dal substrato all'ossigeno. La forma enzimatica attiva è generalmente un monomero, anche se sono stati osservati omodimeri e omotetrameri (Gianfreda *et al.*, 1999). Essa contiene quattro atomi di rame per monomero, legati a tre siti redox, tipo I, tipo II e tipo III, quest'ultimo contenente una coppia di atomi di rame saldamente legati (Farver & Pecht, 1984).

La catalisi enzimatica della laccasi comporta l'ossidazione dei composti fenolici, tramite la sottrazione di un elettrone e la formazione di un fenossiradicale o di un radicale cationico, che può promuovere reazioni di depolimerizzazione (Brown, 1967; Higuchi, 1989) oppure subire reazioni non enzimatiche, come idratazioni o ripolimerizzazioni (Higuchi, 1989), dovute ad un accoppiamento ossidativo con formazione di oligomeri e polimeri (Brown, 1967; Bollag *et al.*, 1988). Si pensa che questa funzione sia utile, a livello fisiologico, per allontanare composti altamente

reattivi e tossici per il micelio fungino, che si formano durante il processo ligninolitico (Haars & Hüttermann, 1981).

Oltre alle note attività di polimerizzazione e depolimerizzazione, la laccasi catalizza anche reazioni di de-metilazione delle unità fenoliche terminali, funzione molto importante per un'eventuale utilizzo della laccasi in processi di de-lignificazione biologica della pasta di cellulosa, durante la lavorazione della carta (Reid & Paice, 1994). La competenza catalitica della laccasi si estende anche ad ammine e diammine aromatiche, a vari composti azotati, quali benzotriazoli, promazine, indoli idrossilati e triazine (Bourbonnais & Paice, 1992).

Il ciclo catalitico della laccasi si pensa coinvolga tre passaggi consecutivi:

1. riduzione del rame di tipo I da parte di un substrato riduttore;
2. trasferimento degli elettroni interni dal tipo I al tipo II e al tipo III, che costituiscono "un aggregato trinucleare" (Zaitseva *et al.*, 1996);
3. riduzione dell'ossigeno molecolare ad acqua (Thurston, 1994).

La dipendenza della laccasi dall'ossigeno piuttosto che dal perossido d'idrogeno, la sua intrinseca stabilità, nonché la capacità di utilizzare un maggior numero di substrati attraverso mediatori redox, rende tale enzima estremamente interessante dal punto di vista applicativo. Inoltre, la capacità di questa fenolossidasi di intervenire nella sintesi delle sostanze umiche del suolo (Stevenson, 1994) aumenta le sue potenziali applicazioni ambientali.

1.2.3.6. Crescita dei funghi ligninolitici nel suolo:

Quando vengono introdotti nel suolo, i funghi *white-rot* si trovano a dover colonizzare un ambiente totalmente differente rispetto alle matrici legnose che tipicamente abitano. Il suolo contiene, infatti, minori quantità di nutrienti che sono presenti in forme diverse e, inoltre, il suolo stesso è sicuramente una matrice molto più eterogenea rispetto al legno. Differenti tipi di suolo differiscono in modo notevole tra loro anche rispetto alle loro proprietà chimico-fisiche, al loro contenuto in materiale organico ed inorganico, alla loro tessitura ed al loro contenuto in biomassa microbica.

La crescita dei funghi *white-rot* nel suolo è, ad esempio, limitata dalla scarsa disponibilità di Azoto e Carbonio (Boyle, 1995). Inoltre, sebbene suoli ricchi in composti organici contengano quantità sufficienti di nutrienti, è generalmente necessaria l'aggiunta di substrati esterni, sotto forma di materiali lignocellulosici, per supportare la crescita fungina (Lamar & Dietrich, 1990; Morgan *et al.*, 1993; Liang & McFarland,

1994; Boyle, 1995; Andersson *et al.*, 2000). In suoli sterili la colonizzazione è in più influenzata da fattori fisici quali la tessitura del suolo, il contenuto relativo di sabbia, argilla e limo (Tucker *et al.*, 1995), il pH (Okeke *et al.*, 1996) e la temperatura che generalmente aumenta la velocità di crescita ma può portare a rallentamenti notevoli o inibire la crescita stessa a valori inferiori a 10°C. (Ali & Wainwright, 1994; Okeke *et al.*, 1996). Per quanto riguarda la presenza di inquinanti, questa può essere un problema ma molti funghi *white-rot* sono tolleranti ad elevate concentrazioni di metalli pesanti (Baldrian, 1993), idrocarburi policiclici aromatici (Wolter *et al.*, 1997), pentaclorofenolo (Okeke *et al.*, 1994; Machado *et al.*, 2005) ed altri inquinanti organici (Spiker *et al.*, 1992) presenti in suoli contaminati.

Il fattore principale che influenza la colonizzazione del suolo da parte dei funghi *white-rot* è comunque la presenza della microflora indigena. Sono state infatti mostrate notevoli differenze di colonizzazione di uno stesso suolo sterile e non sterile (Liang & McFarland 1994, Lang *et al.*, 1997a). Risultati di esperimenti di *screening* dimostrano infatti che differenti specie di funghi *white-rot* differiscono notevolmente nelle loro capacità di colonizzare suoli non sterili: pertanto, il *range* di risposta riguardo la loro crescita può essere molto vasto (Lang *et al.*, 1997b; Martens & Zadrazil 1998; Gramss *et al.*, 1999; Tornberg *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2005; Steffen *et al.*, 2007). L'abilità di colonizzazione è infatti dipendente dalle capacità competitive delle singole specie fungine che possono essere classificate come “forti” (*Pleurotus* sp., *Phanerochaete* sp., *Trametes versicolor*) e “deboli” competitori (*Ganoderma applanatum*, *Dichomitus squalens*) (Lang *et al.*, 1998; Martens & Zadrazil 1998).

1.3. ORIGINE E TIPOLOGIA DI CONTAMINAZIONE DEL SUOLO:

Le sostanze chimiche presenti nell'ambiente possono essere suddivise principalmente in due categorie:

1. Composti biogeni: sono prodotti da organismi viventi o si formano in seguito a fenomeni naturali. Essendo tali composti presenti nell'ambiente da tantissimo tempo, i microrganismi si sono adattati alla loro presenza e sono in grado di utilizzarli quali fonti di carbonio e di energia;
2. Composti xenobiotici: con questo termine si indicano i composti estranei (dal greco "xenos") alla biosfera (dal greco "bios") che possono essere composti chimici prodotti dall'uomo e poi sverzati nell'ambiente oppure composti di origine naturale che vengono a trovarsi in comparti ambientali a loro estranei come nel caso degli svernamenti accidentali di petrolio in mare. Il problema comune a queste due circostanze è l'assenza di microrganismi che abbiano evoluto vie degradative che gli permettano di sfruttare queste sostanze quali fonti di carbonio e di energia (Alexander, 1994).

La maggior parte delle sostanze biogene risulta biodegradabile e quindi in grado di rientrare nel ciclo degli elementi senza turbare gli equilibri della biosfera.

I composti xenobiotici vengono considerati inquinanti solo se portano ad una alterazione delle caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche di aria, acqua e suolo, provocando effetti negativi misurabili, come deterioramento delle risorse naturali e danni alla biosfera. La gravità degli effetti dipende da molteplici fattori: oltre alla tossicità della sostanza stessa, è fondamentale anche la sua capacità di permanere nella matrice ambientale o di diffondere attraverso di essa propagandosi. Queste sostanze risultano spesso non biodegradabili: i microrganismi non sono in grado di utilizzarle come fonte di carbonio, azoto, fosforo, zolfo e come fonte di energia e si determina pertanto un'interruzione del riciclo continuo degli elementi con conseguente accumulo di sostanze nell'ambiente (Alexander, 1994).

In generale, la presenza di xenobiotici induce la crescita di ceppi batterici specializzati in grado di metabolizzarli; esistono però sostanze particolarmente recalcitranti come i policlorobifenili (PCB) e gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) che tendono a persistere nell'ambiente. Queste due categorie di composti sono infatti degli idrocarburi sostituiti ed il loro metabolismo interessa le vie degradative di idrocarburi alifatici, aliciclici, e aromatici. Alcuni dei loro sostituenti come molecole con gruppi nitro o solfonici, atomi di cloro, catene ramificate di atomi di carbonio, sono

però di grandi dimensioni e complessità e bloccano quindi queste vie metaboliche rendendo gli IPA e i PCB difficilmente biodegradabili.

In questo lavoro sono stati considerati gli effetti del micorisanamento, sulle popolazioni batteriche autoctone, di un suolo storicamente contaminato da IPA, metalli pesanti, clorobenzeni e cloroaniline; un suolo storicamente contaminato da PCB ed un suolo modello contaminato “*ad hoc*” con una miscela di IPA.

Di seguito quindi parleremo delle caratteristiche generali delle varie classi di contaminanti citati sopra, della loro tossicità e delle possibili strategie di risanamento di siti contaminati da tali sostanze.

1.3.1. Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

1.3.1.1. Generalità e fonti principali:

Gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) sono una classe di oltre 200 composti organici costituiti da due o più anelli aromatici condensati. Essi sono caratterizzati da un basso grado di solubilità in acqua, un'elevata persistenza e capacità di aderire al materiale organico, una buona solubilità nei lipidi e in molti solventi organici, ed una bassa volatilità, ad eccezione dei composti più leggeri.

Divenuti ormai ubiquitari nell'ambiente, le fonti da cui derivano gli IPA possono essere principalmente di due tipi: naturali ed antropiche.

Per quanto riguarda le fonti naturali gli IPA si possono formare in tre modi (Neff, 1979): pirolisi ad alta temperatura di materiali organici (incendi di foreste e pratiche di incenerimento agricolo), diagenesi a bassa temperatura di materiali organici sedimentari, che portano alla formazione di combustibili fossili, e biosintesi diretta da parte di microrganismi e piante.

Tra le fonti antropiche la combustione incompleta ad alta temperatura di materiale organico è una delle principali sorgenti di IPA nell'ambiente. La produzione di IPA durante la pirolisi, la parziale rottura di molecole organiche complesse in radicali liberi a basso peso molecolare, e la pirosintesi, combinazione di radicali liberi contenenti uno o più atomi di carbonio, sono funzione della temperatura. Le sorgenti ambientali di IPA da processi pirolitici sono diverse (Neff, 1979): cibi affumicati, fumo di sigarette, raffinerie di petrolio, produzione di asfalto, produzione di *carbon coke*, inceneritori di rifiuti, combustione di combustibili fossili, centrali termoelettriche che hanno come prodotti di scarto sostanze solide, liquide e gassose in cui possono essere presenti IPA.

Comunque, qualunque attività industriale o domestica in cui materiali organici vengono portati ad alte temperature risulteranno nella produzione di alcuni di questi composti.

1.3.1.2. Caratteristiche fisico-chimiche degli IPA:

Le proprietà chimico-fisiche sono di estrema importanza poiché danno informazioni circa la distribuzione e la reattività di una certa sostanza nell'ambiente.

Gli IPA sono composti idrofobici solidi a temperatura ambiente e con punti di ebollizione e di fusione elevati. La loro persistenza nell'ambiente è dovuta principalmente alla scarsa solubilità in acqua (Cerniglia, 1992). In generale, solubilità e volatilità decrescono con l'aumentare del numero di anelli benzenici fusi, mentre la idrofobicità si comporta in modo opposto (Wilson & Jones, 1993).

La solubilità diminuisce ulteriormente se in soluzione sono presenti soluti ionici e questo effetto si misura mediante una costante, K_s , definita come segue:

$$K_s = \log[C^{\circ}w/C^{\circ} w, \text{sal}] / [\text{SALI}]_{\text{TOT}}$$

Dove:

- $C^{\circ} w$ = concentrazione della sostanza in acqua pura
- $C^{\circ} w, \text{sal}$ = concentrazione in acqua contenente i soluti ionici
- $[\text{SALI}]_{\text{TOT}}$ = concentrazione degli ioni totale

Tanto maggiore è il valore di K_s , tanto più idrofilo sarà il comportamento della sostanza in soluzione.

Estremamente importante da definire è il concetto di ripartizione acqua/materiale solido. Le sostanze idrofobiche tendono a raggiungere un equilibrio tra la fase solida e quella acquosa, e le proporzioni di tale ripartizione dipendono da innumerevoli fattori tra cui la temperatura, la concentrazione dei contaminanti, la quantità di soluti, la quantità di sostanza organica e le caratteristiche del contaminante. Il coefficiente di ripartizione tra acqua e materiale solido si esprime come segue:

$$K_p = C_s / C_w$$

Dove:

- C_s è la concentrazione della sostanza nella fase solida
- C_w è la concentrazione della sostanza nella fase acquosa.

Poiché la tendenza di una sostanza idrofobica a ripartirsi tra acqua e solidi dipende in maniera preponderante dalla quantità totale di carbonio organico (TOC), si introduce

un nuovo coefficiente che tiene conto di ciò: il coefficiente di ripartizione tra acqua e sostanza organica (K_{om}) con cui si può ridefinire il K_p come segue:

$$K_p = K_{om} * TOC$$

Poiché K_{om} è di difficile determinazione sperimentale, si sostituisce con il $K_{o/w}$, vale a dire il coefficiente di ripartizione tra acqua e n-ottanolo, un solvente organico con comportamento abbastanza simile a quello della sostanza organica. Esso è definito come:

$$K_{o/w} = C^o_o / C^o_w$$

Dove:

- C^o_o è la solubilità del composto in n-ottanolo
- C^o_w è la solubilità in acqua.

Dato che $K_{o/w}$ è in genere molto elevato, si esprime attraverso il suo corrispettivo valore logaritmico. Quindi K_{om} può essere calcolato mediante l'espressione:

$$K_{om} = A \log K_{o/w} + B$$

Dove A e B sono costanti

Il coefficiente di ripartizione acqua materiale solido sarà quindi espresso come:

$$K_p = (A \log K_{o/w} + B) * TOC$$

1.3.1.3. Tossicità degli IPA

L'interesse scientifico per questa classe di composti è legato soprattutto alla loro genotossicità provata o ipotizzata. Per questo motivo la *United States Environmental Protection Agency* (EPA) e la *World Health Organization* (WHO) hanno identificato, all'interno di questa classe, 16 composti definiti "inquinanti prioritari" (Figura 1.1): naftalene, acenaftilene, acenaftene, fluorene, fenantrene, antracene, fluorantene, pirene, crisene, benzo[a]antracene, benzo[b]fluorantene, benzo[k]fluorantene, benzo[a]pirene, dibenzo[a,h]antracene, benzo[g,h,i]perilene, indeno[1,2,3-cd]pirene, (Neff, 1979; Harvey, 1997).

Gli IPA sono composti lipofili e tendono ad accumularsi nei tessuti degli organismi esposti. La loro eliminazione quindi dipende dalla capacità dell'organismo stesso di trasformarli in metaboliti idrosolubili, eliminabili attraverso l'escrezione.

Molti IPA sono cancerogeni e sono quindi di particolare interesse come contaminanti ambientali (Sims & Overcash, 1983). Numerosi studi hanno indicato che i composti a uno, due e tre anelli sono estremamente tossici (Sims & Overcash, 1983), mentre gli IPA a più alto peso molecolare sono considerati genotossici (Phillips, 1983; Lijinsky, 1991; Mersch-Sundermann *et al.*, 1992).

Gli IPA possono manifestare il loro effetto tossico principalmente attraverso due tipi di interazione con le strutture cellulari: in primo luogo possono formare dei legami reversibili con siti lipofili che possono impedire i normali processi della cellula (tossicità acuta); secondariamente possono portare alla formazione di metaboliti idrofili, reattivi ed elettrofili, che si legano alle strutture cellulari, provocando danni a lungo termine (tossicità cronica).

Uno dei meccanismi più importanti che rende gli IPA tossici per gli organismi è la fotoinduzione, che si verifica quando una molecola assorbe radiazioni solari nel campo dei raggi ultravioletti. Le molecole eccitate, reagendo con l'ossigeno, possono produrre ossigeno singoletto o altre specie ossidanti, pericolose per i tessuti biologici. Il meccanismo viene definito di *Energy-transfer*. Le molecole di IPA foto-attivate potrebbero interagire con i substrati organici generando radicali liberi altamente reattivi e tossici per l'organismo. Oltre alla fotoinduzione e alla provata cancerogenicità, l'esposizione prolungata agli IPA può indurre anche fenomeni mutazionali (mutagenicità) o effetti sul feto (teratogenicità).

Fra i numerosi effetti tossici indotti dagli IPA sugli animali di laboratorio possono essere inoltre ricordati:

- distruzione di ghiandole sebacee, ipercheratosi, ulcerazioni cutanee;
- danni al sistema emopoietico e linfoide con degenerazione ed arresto della maturazione delle cellule progenitrici;
- immunosoppressione;
- reazioni infiammatorie delle vie aeree;
- polmoniti acute e croniche;

Sono stati, inoltre, riscontrati effetti antiestrogenici, con meccanismi che comprendono competizione per il recettore estrogenico (ER) e induzione dell'aumento della velocità di metabolizzazione degli estrogeni. Per questo motivo, gli IPA vengono inclusi nell'elenco dei distruttori endocrini (Arcaro *et al.*, 1999).

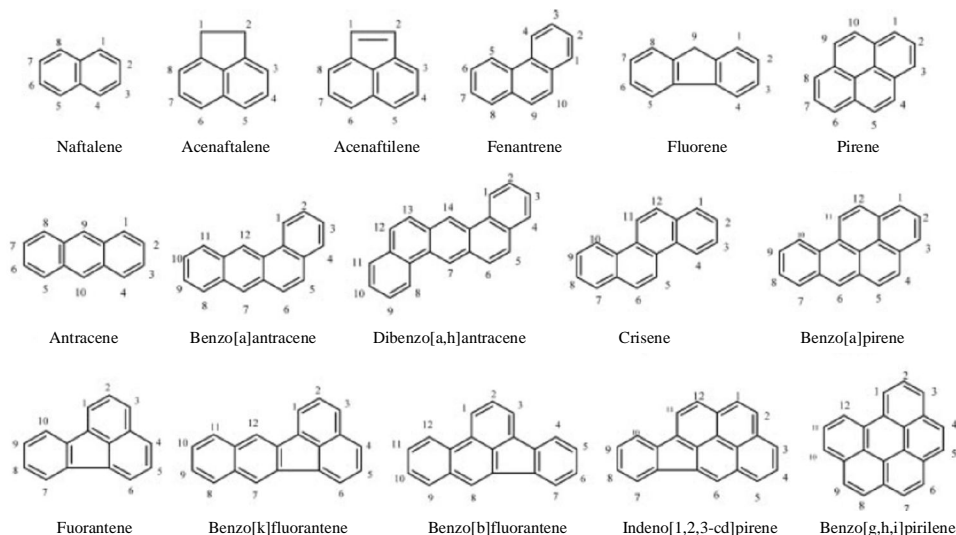


Figura 1.1. Strutture chimiche dei 16 IPA definiti “inquinanti prioritari” dalla *United States Environmental Protection Agency* (EPA) e dalla *World Health Organization* (WHO).

1.3.1.4. IPA nel suolo:

Il rilascio degli IPA nell’ambiente è un fenomeno frequentissimo essendo tali composti prodotti onnipresenti della combustione incompleta di sostanze organiche.

Gli IPA sono stati infatti individuati in una grande varietà di comparti ambientali, tra cui aria (Freeman & Cotel, 1990), acqua (Cerniglia e Heitkamp, 1989), oli, catrame (Nishioka *et al.*, 1986), cibo (Dipple & Bigger, 1991), suolo (Jones *et al.*, 1989) e sedimenti (Youngblood & Blumer, 1975). Dal punto di vista ambientale è di particolare importanza la presenza di tali inquinanti nel suolo e nei sedimenti dove tendono ad accumularsi maggiormente, data la loro scarsa solubilità in acqua e la loro natura idrofobica.

I sedimenti, così come la sostanza organica del suolo, per la loro tessitura molto fine, possono essere infatti considerati un *reservoir* per l’accumulo degli IPA (Meador *et al.*, 1995). La concentrazione di tali composti nei sedimenti può variare di diversi ordini di grandezza (da pochi $\mu\text{g}/\text{kg}$ fino a g/kg) a seconda della vicinanza dei corsi d’acqua alle attività industriali.

Gli inquinanti rilasciati nel suolo vanno incontro a una serie di fenomeni di ripartizione tra le varie fasi del suolo stesso (gas interstiziale, particelle solide, acqua), generando di conseguenza fenomeni di migrazione e trasformazione degli inquinanti che determinano sia l’estensione spaziale e temporale della contaminazione, sia la

possibilità che essi vengano in contatto con l'uomo e con gli altri organismi dell'ambiente.

L'entità ed i fenomeni di trasporto e trasformazione sono in genere complessi e dipendono sia dalle proprietà chimico-fisiche delle sostanze coinvolte nell'inquinamento, sia dalle caratteristiche geologiche, idro-geologiche ed ecologiche del sito. Questi fenomeni sono particolarmente complicati nel caso di inquinanti costituiti da miscele complesse e poco idrosolubili, come i prodotti petroliferi, che, insieme all'acqua ed agli altri componenti del suolo, costituiscono un sistema a molte fasi e molte componenti.

In generale, le sostanze inquinanti possono diffondersi dal luogo del rilascio muovendosi in tre direzioni principali:

1. verso il sottosuolo, con dinamiche complesse legate alla mobilità dell'inquinante, ce è funzione della ripartizione dello stesso nelle tre fasi: solida, liquida o gassosa;
2. in superficie trasportate dall'acqua piovana, disciolte (o meno se sono idrofobiche) in essa o trascinate insieme ai detriti perché adsorbite ad essi;
3. verso l'atmosfera, per volatilizzazione diretta o portate dal vento con la polvere.

Nel suolo, quindi, le sostanze tossiche possono essere dilavate dall'acqua piovana o, se in forma fluida e permeabile con l'acqua, percolare direttamente verso il basso, spesso fino alla falda acquifera, trascinate o disciolte in essa; adsorbite alle particelle di suolo; assorbite dalla flora e quindi trasportate ai più alti livelli della catena alimentare, fino all'uomo.

La via sotterranea è sicuramente la più complessa per la varietà dei fenomeni che possono avvenire nel sottosuolo sia durante il cammino verso la falda sia nel successivo trasporto nella zona satura. In genere, è anche la più importante sia per l'estensione spaziale che può assumere l'inquinamento quando viene trasportato che per la persistenza temporale che si può verificare in seguito al percolamento di molte sostanze nel sottosuolo (Grillo, 2001).

Nella migrazione degli inquinanti intervengono, in generale, due tipi di fenomeni microscopici e macroscopici. Tra i primi si hanno:

- fenomeni fisici riguardanti la diffusione e ripartizione delle specie fra le varie fasi, quali solvatazione/precipitazione ed evaporazione/condensazione;
- fenomeni chimico-fisici come l'adsorbimento;
- fenomeni chimici quali le reazioni di idrolisi, ossidazione, ecc.

Quelli macroscopici, regolati dalle leggi della dinamica dei fluidi, includono invece scorrimento, percolazione, adesione al terreno e capillarità.

I principali meccanismi che regolano la migrazione sono l'advezione e la diffusione. La diffusione è il trasferimento di molecole da una zona a più alta ad una a più bassa concentrazione, dovuto al loro movimento termico casuale. È un fenomeno importante su brevi distanze ed è responsabile, su scala microscopica, del raggiungimento degli equilibri locali di partizione delle specie fra le varie fasi. L'advezione, invece, è il movimento che avviene in risposta a forze macroscopiche come il potenziale idrico.

Mentre la diffusione produce un movimento indipendente dei singoli componenti di una miscela, nell'advezione è l'intero fluido che si muove. L'advezione nel sottosuolo dipende dalle proprietà del fluido (viscosità, densità, tensione superficiale) e da quelle del suolo (morfologia, composizione, porosità, contenuto d'acqua, temperatura ecc.). Il movimento per advezione che avviene nella falda è responsabile della propagazione dell'inquinamento su grandi distanze.

1.3.1.5. Degradazione microbica degli IPA:

Gli IPA possono essere degradati sia in condizioni aerobiche (Gibson & Parales, 2000; Habe & Omori, 2003) che anaerobiche (Gibson & Harwood, 2002; Chakraborty & Coates, 2004). In condizioni aerobiche i batteri utilizzano ossigeno sia per l'attivazione e la rottura dell'anello aromatico che come accettore di elettroni per la sua completa degradazione. La degradazione batterica degli IPA risulta più veloce ed efficiente nel caso di molecole a basso peso molecolare; inoltre, singoli ceppi batterici degradano difficilmente miscele complesse di IPA. Si utilizzano a tale scopo "consorzi" batterici così da sfruttare le capacità degradative complementari dei singoli organismi (Bouchez *et al.*, 1995).

La degradazione del naftalene, l'IPA più semplice e più solubile, è quella più studiata ed è stato relativamente facile, nel corso degli anni, isolare, principalmente dal suolo, microrganismi in grado di degradare questa molecola. Le specie maggiormente efficienti nella degradazione del naftalene appartengono generalmente al gruppo dei batteri Gram negativi in particolare al genere *Pseudomonas* anche se *pathways* degradativi simili sono state ritrovate in batteri dei generi *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Aeromonas*, *Rhodococcus* e *Bacillus* (Cerniglia, 1984; Smith, 1994; Annweiler *et al.*, 2000).

1.3.1.6. Degradazione del naftalene in *Pseudomonas sp.*:

Il naftalene è un idrocarburo aromatico biciclico che si trova comunemente nell'ambiente ed è spesso usato come molecola modello per la degradazione degli IPA. La sequenza biochimica delle reazioni enzimatiche coinvolte nella degradazione del naftalene sono state descritte per la prima volta da Davies ed Evans (1964) (Figura 1.2).

Ulteriori studi, condotti principalmente su specie del genere *Pseudomonas*, hanno indicato che l'iniziale ossidazione del naftalene, in queste specie, avviene attraverso l'introduzione in posizione 1 e 2 dell'anello aromatico di due atomi di ossigeno, portando alla formazione del cis-1,2-diidrossi-diidronaftalene. Questa reazione è catalizzata dalla naftalene-1,2-diossigenasi (NDO), un sistema multienzimatico formato da tre componenti: I) ferrodossina reduttasi; II) ferrodossina; III) una proteina ferrozolfo composta da tre copie di ciascuna delle due subunità α e β .

Il secondo *step* della degradazione del naftalene è la conversione del cis-1,2-diidrossi-diidronaftalene in 1,2-diidrossinaftalene, una reazione catalizzata dalla naftalene-cis-diidrodiolo deidrogenasi che richiede NAD^+ come accettore di elettroni.

In *Pseudomonas sp.* il 1,2-diidrossinaftalene subisce poi la rottura dell'anello benzenico e viene convertito in cis-2-idrossibenzilpiruvato che viene infine trasformato in acido salicilico e piruvato attraverso una serie di reazioni catalizzate anch'esse da diversi enzimi con attività diossigenasica. Tutta la serie di enzimi che catalizzano queste reazioni iniziali vanno a costituire quello che viene generalmente detto *upper pathway* degradativo.

Nelle reazioni successive, alle quali prendono parte gli enzimi del *lower pathway*, l'acido salicilico viene ossidato, dall'enzima silicato ossidasi, a catecolo che subisce quindi una rottura dell'anello aromatico o in posizione *para* oppure in posizione *orto*, a seconda della specie batterica. Tale trasformazione è infatti catalizzata da due diversi enzimi, catecolo 1,2-diossigenasi oppure catecolo 2,3-diossigenasi a seconda del punto di rottura dell'anello aromatico.

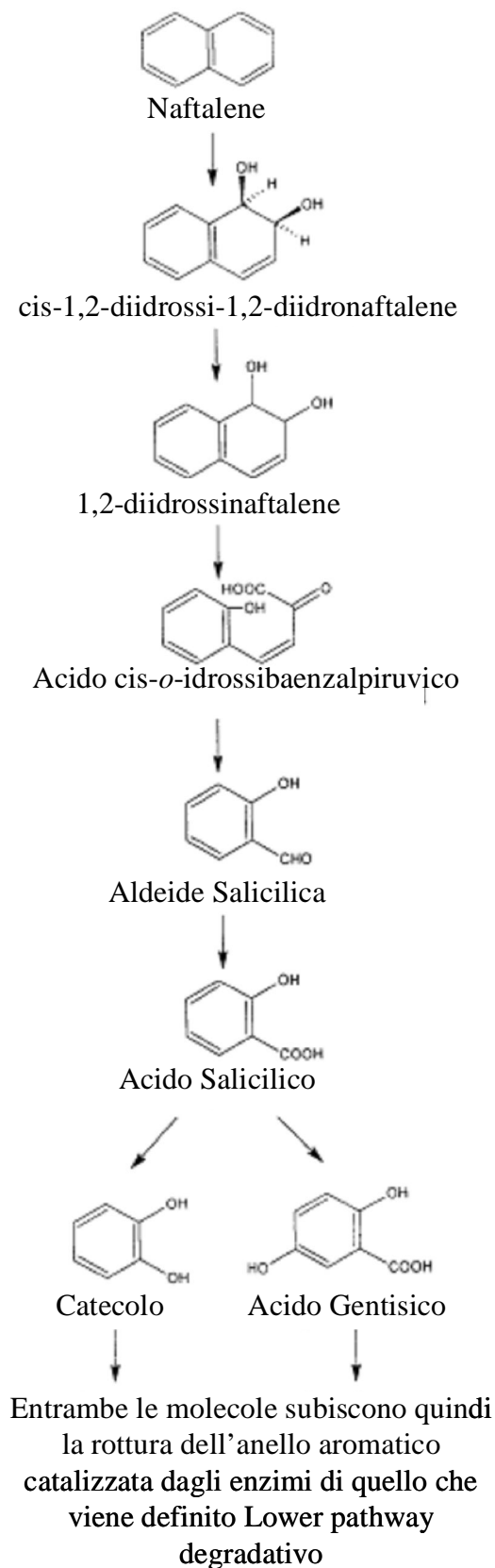


Figura 1.2. *Upper pathway* proposto per la degradazione del naftalene da parte di diversi ceppi batterici del genere *Pseudomonas* (Davies & Evans 1964).

1.3.1.7. Organizzazione dei geni codificanti gli enzimi degradativi in diversi ceppi di *Pseudomonas*:

Molti lavori hanno indicato che i geni codificanti gli enzimi coinvolti nella degradazione del naftalene in *Pseudomonas* sp. sono localizzati a livello di plasmidi e se ne conoscono in particolare tre: NAH7, NPL1 e pND.

Il plasmide più studiato è sicuramente l'NAH7 che è stato isolato nel 1973 da Dunn e Gunsalus in *Pseudomonas putida* G7 (Dunn & Gunsalus, 1973). I geni catabolici sono organizzati su questo plasmide in due operoni: *nah1* che include i geni *nahA-F* che codificano gli enzimi dell'*upper pathway* e *nah2* nel quale si ritrovano i geni *nahG-M* codificanti gli enzimi del *lower pathway*. Inoltre, un terzo gene (*nahR*), localizzato tra i due operoni, ma trascritto indipendentemente, codifica una proteina regolatrice (NahR) che agisce da attivatore trascrizionale per entrambi gli operoni (Grund *et al.*, 1983). NahR è necessario per l'alto livello di espressione dei geni *nah* e per la loro induzione da parte dell'acido salicilico (Schell & Wender, 1986).

Oltre al plasmide NAH7, sono stati analizzati anche altri plasmidi per il catabolismo del naftalene come: pWW60 derivato da *P. putida* NCIB 9816 (Cane *et al.*, 1986), pDTG1 da *P. putida* NCIB 9816-4 (Serdar & Gibson, 1989) e pKA1 da *P. fluorescens* 5R (Menn *et al.*, 1993) ed emersa una notevole similarità di sequenza con il plasmide NAH7 stesso.

Più tardi sono state riportate le sequenze nucleotidiche dei geni codificanti gli enzimi catabolici dell'*upper pathway* del naftalene, isolati da diversi ceppi di *Pseudomonas*: i geni *ndo* di *P. putida* NCIB 9816 (Kurkela *et al.*, 1988), i geni *nah* di *P. putida* G7 e NCIB 9816-4 (Simon *et al.*, 1993), i geni *dox* di *Pseudomonas* sp. C18, i geni *pah* di *P. putida* OUS82 e *P. aeruginosa* PaK1 (Demon *et al.*, 1993) e i geni *nah* di *P. stutzeri* AN10 (Habe & Omori, 2003).

In figura 1.3 viene riportata una schematizzazione dell'organizzazione degli operoni, contenenti i geni catabolici, in diversi ceppi di *Pseudomonas*. Il nome di ogni gene è stato scelto secondo il substrato utilizzato dal ceppo: *nah* per la degradazione del naftalene, *ndo* per la diossigenazione del naftalene, *dox* per l'ossidazione del dibenzotiofene e *pah* per la degradazione degli idrocarburi policiclici aromatici utilizzati sia per la degradazione del loro substrato, ma anche per quella del naftalene. Tra questi, le sequenze geniche dell'*upper pathway* sono state completamente sequenziate per i ceppi OUS82, PaK1 e AN10, ma sono state analizzate solo sequenze parziali in altri ceppi. Anche in questi casi, l'organizzazione genica e la similarità di sequenza tra i geni

catabolici dell'*upper pathway* erano simili a quella dei geni *nah* del plasmide NAH7 del ceppo G7 e per questo vengono generalmente denominati “*nah-like genes*” .

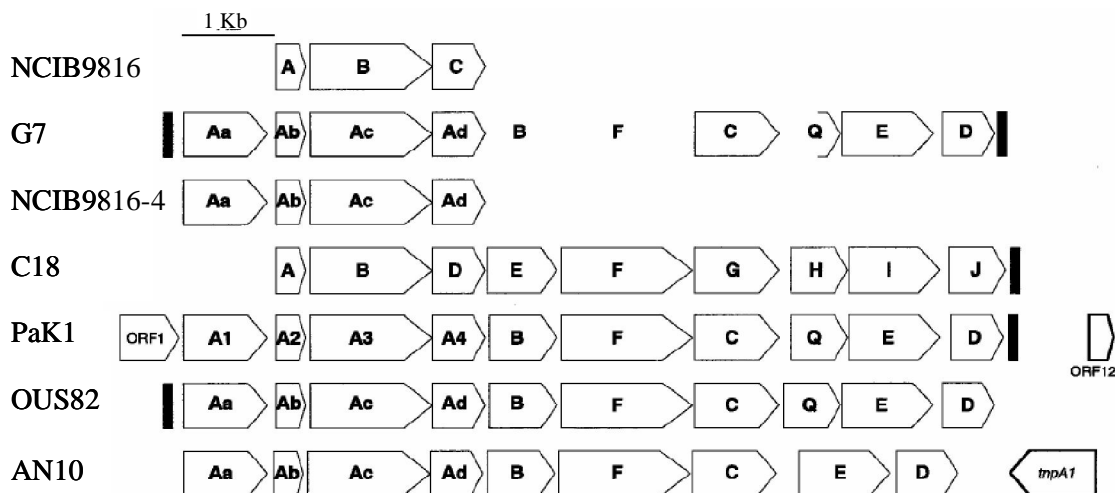


Figura 1.3. Organizzazione dei geni catabolici dell'*Upper pathway* del naftalene in alcuni ceppi di *Pseudomonas* (Habe & Omori, 2003).

1.3.1.8. Esempi di vie metaboliche per la degradazione batterica di IPA più complessi:

Anche il fenantrene e l'antracene sono stati utilizzati come composti modello in vari studi di biodegradazione degli IPA. In diversi casi è stato infatti osservato, che gli enzimi coinvolti nella conversione del naftalene a salicilato possono anche trasformare il fenantrene e l'antracene, rispettivamente, a 1-idrossi-2-naftoato e a 2-idrossi-3-naftoato attraverso passaggi simili (Menn *et al.*, 1993; Sanseverino *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1994).

Nella degradazione del fenantrene, l'1-idrossi-2-naftoato può essere successivamente metabolizzato attraverso due diverse vie cataboliche e cioè: può essere idrossilato a 1,2-diidrossinaftale che entra quindi nel *pathway* degradativo del naftalene oppure l'anello aromatico dell'1-idrossi-2-naftoato può essere direttamente aperto dall'azione della 1-idrossi-2-naftoato deidrogenasi. Ulteriori reazioni enzimatiche portano alla produzione di ftalato che viene successivamente metabolizzato e convertito in intermedi del ciclo degli acidi tricarbossilici.

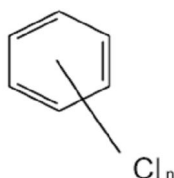
Per quanto riguarda invece la degradazione dell'antracene, il 2-idrossi-3-naftoato viene convertito a 2,3-diidrossinaftalene che è successivamente metabolizzato ad acido salicilico e catecolo.

Anche i meccanismi catabolici coinvolti nella degradazione degli IPA costituiti da più di tre anelli aromatici sono stati oggetto di studio ed in tal caso è stato utilizzato il pirene come IPA modello. Heitkamp e collaboratori (1998) hanno isolato per la prima volta un batterio in grado di mineralizzare il pirene e, ad oggi, molti batteri in grado di degradare tale composto sono stati descritti (Heitkamp *et al.*, 1988; Walter *et al.*, 1991). In *Mycobacterium* sp. PYR-1, ad esempio, il pirene viene inizialmente diossigenato in posizione 1 e 2 con conseguente formazione di *cis*- o *trans*-4,5-pirene-diidrodiole. Questo subisce quindi una ri-aromatizzazione e successiva rottura dell'anello aromatico che portano alla formazione dell'acido 4,5-fenantrene dicarbossilico a sua volta metabolizzato ad acido fenantronico.

Lo *step* successivo porta alla sua diossigenazione generando l'intermedio *cis*-3,4-diidrossifenantrene comune anche alla degradazione del fenantrene e per questo metabolizzato attraverso le stesse vie cataboliche.

1.3.2. Clorobenzeni: generalità, tossicità e possibili vie biodegradative

I clorobenzeni sono composti organici aromatici ottenuti dalla clorurazione del benzene la cui struttura generale è riportata nella figura seguente:



Il numero di atomi di cloro presenti nell'anello viene indicato generalmente con *n* e può variare da 1, nel clorobenzene, a 6, nell'esaclorobenzene.

Tali composti sono spesso apolari e quindi caratterizzati da una scarsa solubilità in acqua. Il sostituente $-Cl$ funge da blando disattivante dell'anello aromatico e ciò causa il fatto che un clorobenzene è meno reattivo del benzene ed ha un effetto *orto*- e *para*-orientante, ovvero i sostituenti tendono ad entrare in tali posizioni rispetto all'atomo di cloro.

I clorobenzeni sono composti tossici, irritanti per l'uomo e fortemente sospettati di cancerogenicità a livello di fegato, reni, e polmoni, accertata comunque solo nel caso del clorobenzene, del 1,2-diclorobenzene, del 1,4-diclorobenzene e dell'esaclorobenzene (Gustafson *et al.*, 2000).

I clorobenzeni, fortemente idrofobi, presentano scarsa solubilità in acqua e persistono per lunghi tempi nel terreno, essendo esigue le quantità di tali composti dilavate dalle piogge e la concentrazione degli stessi in fase acquosa in cui si può realizzare la loro biodegradazione (Brunsbach & Reineke, 1994). La biodegradabilità di tali composti, come riportato in letteratura, è ritenuta possibile, sebbene le condizioni chimico-fisiche dei microcosmi condizionino pesantemente tale processo.

Un possibile percorso biodegradativo aerobico a partire dal clorobenzene può essere descritto come segue: la molecola del benzene subisce una prima ossidazione passando (in due stadi) a 3-clorocatecolo; segue la rottura del sistema aromatico con apertura dell'anello tra le posizioni 1 e 2, formando l'acido 2-cloro-2,4-esadien-dioico. Quest'ultimo subisce una cicloisomerizzazione con la successiva eliminazione di uno ione cloruro. Tale molecola ciclica viene quindi convertita in acido 4-oxo-2-esendioico, un acido dicarbossilico che viene ulteriormente ridotto in una reazione che coinvolge il NAD e che porta alla formazione di acido 3-oxo-esandioico (o 3-oxo-adipico).

Studi effettuati, in aerobiosi, su un suolo contenente clorobenzene e tricloroetilene hanno dimostrato che la biomassa indigena può utilizzare il clorobenzene come substrato primario per la metabolizzazione del tricloroetilene (Kao & Prosser, 1998).

Altri studi hanno evidenziato come, utilizzando il batterio *Pseudomonas* sp. P51 e il substrato 1,2,4-triclorobenzene in bioreattori in fase acquosa, si noti un crollo della biomassa specializzata, mentre in colonne di terreno sabbioso saturato in acqua si abbia crescita microbica (Tchelet *et al.*, 1998). Questi comportamenti trovano diverse giustificazioni: una prima, molto plausibile, riguarda la possibilità da parte dei protozoi di predare i microrganismi, tanto più esposti e vulnerabili se liberi nel mezzo acquoso.

Un altro fattore da considerare è che in un mezzo acquoso ad alta concentrazione microbica vi è competizione tra le varie specie di microrganismi per i microelementi mentre in un sistema saturato di H₂O i batteri degradanti i clorobenzeni possono situarsi direttamente su tale substrato (presente in maggiore concentrazione nella fase solida), e quindi la competizione risulterebbe solo quella tra individui della stessa specie (Tchelet *et al.*, 1998).

In una miscela complessa di clorobenzeni ogni composto può presentare una propria attitudine ad essere degradato e tale caratteristica può differire molto tra i vari tipi di molecole. Come riportato da Brunsbach e Reineke (1994), in un substrato costituito da una miscela di clorobenzeni, formata da clorobenzene, 1,2-diclorobenzene, 1,4diclorobenzene e 1,2,4-triclorobenzene, trattato in bioreattore *slurry* al 29% w/v ed a 27°C, solo il clorobenzene risulti apprezzabilmente degradato dalla biomassa indigena,

mentre gli altri clorurati vengono abbattuti solamente dopo l'aggiunta di *P. aeruginosa* RHO1 (Brunsbach & Reineke, 1994).

Un ulteriore studio di adattabilità della biomassa indigena e di biodegradabilità condotto sul 1,2,4-tricloro-benzene ha evidenziato scarsissima degradazione dell'inquinante (~0.3%) in un periodo di trattamento di 8 mesi (Aelion *et al.*, 1987).

Per i policlorobenzene una sperimentazione condotta su terreno argilloso ammendato con esaclorobenzene, pentaclorobenzene, tetraclorobenzene ed 1,2,4-triclorobenzene ha evidenziato la completa trasformazione in ambiente anaerobico dei suddetti composti in clorobenzene, per dechlorurazione riduttiva (Ramanand *et al.*, 1993).

1.3.3. Cloroaniline: generalità, tossicità e possibili vie biodegradative

Le cloroaniline sono derivati clorurati dell'anilina un composto aromatico avente formula bruta C_6H_7N , nota anche come fenilammina o amminobenzene. L'anilina è un'ammina primaria la cui struttura è quella di un benzene in cui un atomo di idrogeno è sostituito da un gruppo NH_2 .

Nella Figura 1.4, sono riportate le strutture chimiche di anilina, 4-cloroanilina e 2,4-dicloroanilina (la numerazione relativa all'anello ha inizio in corrispondenza del gruppo amminico).

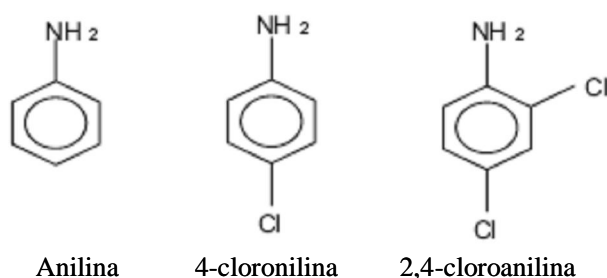


Figura 1.4. Struttura chimica di anilina, 4-cloroanilina e 2,4-dicloroanilina.

Le cloroaniline sono solubili sia in solventi polari che in solventi apolari. L'affinità per i solventi polari deriva in massima parte dalla loro basicità, conferitagli dal doppietto elettronico libero localizzato sull'atomo di azoto ed influenzata però dalla quantità e posizione degli atomi di cloro sull'anello.

Essendo gli atomi di cloro stessi dei sostituenti elettronegativi attraggono a sé il doppietto dell'azoto, delocalizzandolo parzialmente e riducendo in tal modo la basicità, la polarità e la solubilità in acqua di queste molecole (Valitutti *et al.*, 1989).

Riguardo la loro tossicità, le cloroaniline sono composti molto pericolosi per l'uomo, poiché vengono facilmente assorbiti attraverso la pelle. In particolare sono composti tossici per sangue, fegato, rene, milza, irritanti per gli occhi e sospetti cancerogeni e mutageni, soprattutto a carico del sangue. L'anilina, capostipite non sostituito di questa classe, presenta le stesse caratteristiche, alle quali si aggiungono la presunta cancerogenicità nei confronti del sistema nervoso e dell'apparato urinario (Dial *et al.*, 1998).

Nonostante le cloroaniline abbiano una certa polarità ed un'elevata solubilità in acqua rispetto ad altri composti aromatici clorurati, tendono a formare legami covalenti con alcune componenti della frazione organica del suolo, come gli acidi umici (Saxena & Bartha, 1983; Verstraete & Devliegher, 1996). In particolare è stata dimostrata un'analogia tra il comportamento delle cloroaniline nei confronti degli acidi umici e del toluenchinone (2-metil-benzo-1,4-chinone) (Saxena & Bartha, 1983), evidenziando due diversi meccanismi secondo i quali le ammine aromatiche si legano ad anelli fortemente attivati come quello del toluenchinone; nel caso di reazione della 3,4-dicloroanilina con il toluenchinone si forma la molecola 2-(3,4-dicloroanilina)-5-metil-benzo-1,4-chinone (TQ-CDA) (Verstraete & Devliegher, 1996). Tali ammine vengono rilasciate attraverso reazioni di interscambio con altre ammine aromatiche e con l'urea: l'efficacia di questo scambio è proporzionale alla basicità dell'agente rimpiazzante (Saxena & Bartha, 1983).

Per le caratteristiche chimiche descritte in precedenza si distingue la biodegradabilità delle cloroaniline tal quali da quella del complesso acido umico-cloroanilina. In ambiente aerobico i microrganismi indigeni, seppur lentamente, riescono a degradare le cloroaniline (Saxena & Bartha, 1983); la degradazione biologica del complesso acido umico-cloroanilina è invece molto più lenta e diventa più veloce in presenza di anilina.

Infatti, essendo molto più basica di qualsiasi cloroanilina, l'anilina si presta bene come agente sostituito, permettendo di liberare le cloroaniline dalla matrice organica del terreno (Saxena & Bartha, 1983).

Le cloroaniline possono essere mineralizzate attraverso una serie di reazioni enzimatiche descritte, brevemente, come segue: l'enzima 1,2-diossigenasi catalizza l'ossigenazione in posizione 1 e 2 dell'anello aromatico, dando il corrispondente 1,2-diolo della cloroanilina di partenza; una monossigenasi lo trasforma poi a clorocatecolo,

da cui può evolvere in un prodotto tossico, un acido carbossilico clorurato con un gruppo alcolico in posizione 2 ed uno aldeidico in posizione 6, attraverso la catecolo-2,3- diossigenasi, oppure a cloromuconato, attraverso la catecolo-1,2- diossigenasi, e infine essere mineralizzato.

1.3.4. Bifenili policlorurati (PCB):

1.3.4.1. Definizione e principali usi dei PCB:

I PCB sono una classe di organoclorurati, sintetizzati per la prima volta negli USA nei primi anni del secolo scorso, la cui formula generale è $C_{12}H_xCl_y$ dove x è compreso tra 0 e 9 ed y è uguale a $10-x$. In base alla posizione degli atomi di cloro nella molecola del bifenile si possono ottenere 209 congeneri differenti fra loro per il numero (omologhi) e la disposizione (isomeri) nella molecola degli atomi di cloro (Figura 1.5). Tali differenze di composizione e struttura comportano apprezzabili differenze di comportamento chimico, fisico, e anche biologico di ogni possibile congenere.

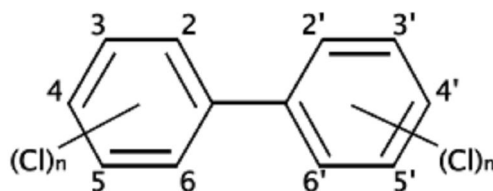


Figura 1.5. Struttura chimica generale dei PCB

La sintesi dei PCB risale al 1881 ma il loro impiego su scala industriale è iniziato nel 1929 ad opera della Monsanto negli Stati Uniti ed in breve tempo si è estesa a tutti i paesi del mondo industrializzato. Sul mercato sono state immesse delle miscele di PCB, contenenti generalmente dai 20 ai 60 congeneri e contraddistinte da diversi marchi di fabbrica che identificano anche il paese di provenienza (Aroclor, Chlorextol e altri negli USA, Fenclor in Italia, Clophen in Germania). La nomenclatura IUPAC assegna ad ogni congenere un numero compreso tra 1 e 209 ma, poiché le proprietà di maggiore interesse applicativo sono correlabili al grado medio di clorurazione espresso come percentuale di cloro, tale parametro è stato preso come riferimento per classificare i vari prodotti in uso. Per questo motivo le denominazioni commerciali fanno spesso

riferimento a tale parametro, così Aroclor 1242, si riferisce ad una miscela di bifenili clorurati che mediamente contiene circa il 42% di cloro.

1.3.4.2. Proprietà chimico-fisiche:

I PCB sono composti chimici molto stabili, resistenti ad acidi ed alcali ed alla fotodegradazione, non sono ossidabili, non attaccano i metalli, sono poco solubili in acqua (la loro solubilità diminuisce all'aumentare del grado di clorazione e varia anche in base alla disposizione degli atomi di cloro in molecole omologhe) ma lo sono in olio e solventi organici quali alcol e acetone ed inoltre sciolgono facilmente le materie plastiche allo stato fuso. Non sono incendiabili, quando la loro molecola contiene più di quattro atomi di cloro, evaporano ad oltre 800°C e si decompongono solo oltre i 1000°C. Sono poco volatili, si possono spandere su superfici formando sottili pellicole, hanno bassa costante dielettrica, densità maggiore dell'acqua, elevata lipoaffinità e sono scarsamente biodegradabili.

La maggior parte dei PCB presenti in commercio si presentano come liquidi oleosi, trasparenti, con densità crescente in rapporto alla percentuale di cloro; i composti bassoclorurati (Aroclor 1221 contiene circa il 20% di cloro) (Safe, 1990) sono liquidi poco viscosi; mentre quelli a più alto grado di clorazione (da 7 atomi di cloro) si presentano sotto forma di resine (Aroclor 1260) o di polvere (Aroclor 1268).

Le caratteristiche descritte, in particolare la stabilità chimica e termica, hanno fatto sì che i PCB trovassero fin dall'inizio della loro produzione una grande varietà di impieghi. Tra i principali: fluidi isolanti per trasformatori e condensatori, pesticidi, ritardatori di fiamma, oli lubrificanti, vernici, coloranti, vari tipi di plastiche, tra cui quelle per l'isolamento dei cavi elettrici, sostanze adesive o sigillanti e molto altro (Borja *et al.*, 2005).

La produzione, che si aggirava attorno alle 1000 tonnellate nei primi anni '30, è aumentata esponenzialmente man mano che si trovavano nuovi utilizzi ed ha raggiunto un picco di 200000 tonnellate nel 1975 (Abraham *et al.*, 2002).

1.3.4.3. Fonti principali dei PCB:

Gli anni della massima produzione sono stati anche quelli in cui i paesi produttori si sono resi conto che le stesse proprietà che rendevano i PCB industrialmente interessanti li rendevano anche degli inquinanti altamente tossici e persistenti nell'ambiente con

accumulo nelle catene alimentari. Tra la fine degli anni '70 e l'inizio degli anni '80, infatti, la quasi totalità dei paesi produttori di PCB ha bandito la produzione e l'impiego di queste sostanze.

A tutt'oggi non si conoscono fonti naturali di PCB ma tali sostanze entrano generalmente nei diversi comparti ambientali durante la loro produzione ed utilizzo e, a causa di perdite accidentali, durante il loro trasporto o durante incendi di prodotti in cui sono presenti.

La maggior parte dei PCB dispersi nella biosfera è, comunque, contenuta nel suolo e nei sedimenti vicini ai luoghi della loro iniziale produzione o applicazione, dove possono raggiungere concentrazioni di 10-104 mg/kg. Questi valori sono di gran lunga superiori alla soglia limite, che varia da 0,01 a 50 mg/kg di suolo a seconda del paese e dell'utilizzo del terreno (Mackova *et al.*, 2006).

Tuttavia, a causa della loro grande resistenza e stabilità, i PCB possono essere trasportati per grandi distanze (ad esempio tramite le correnti marine), specialmente le forme con un minor grado di clorurazione e quindi più leggere. Sembra che i PCB siano ormai distribuiti in ogni parte del pianeta, visto che se ne sono trovate tracce anche negli angoli più remoti, comprese alcune zone dell'Antartide (Abraham *et al.*, 2002).

1.3.4.4. Tossicità dei PCB:

È stato dimostrato che i policlorobifenili sono altamente dannosi sia per l'uomo che per gli animali anche se molti degli effetti sono dovuti ad esposizioni ripetute e prolungate. La tossicità di queste molecole dipende non solo dal numero di atomi di cloro presenti, ma anche dalla loro posizione. Particolarmente tossici sono, ad esempio, i congeneri che presentano clorurazioni in entrambe le posizioni *para* (4 e 4') o almeno due atomi di cloro nelle posizioni *meta* (3, 5, 3', 5'). Questo tipo di PCB ha infatti una tossicità paragonabile a quella della diossina, tanto da essere definiti "*dioxin like*". La pericolosità dei PCB "*dioxin like*" è da ricondurre anche all'assenza di sostituzioni in posizione *orto*, condizione, questa, che consente agli atomi della molecola di assumere una configurazione planare, altamente tossica.

I PCB vengono assorbiti attraverso la pelle, per via aerea e gastrointestinale (Clark, 1997). Una volta all'interno del corpo queste molecole vengono trasportate, attraverso il circolo sanguigno, al fegato, a vari muscoli e tessuti adiposi dove si accumulano.

Numerose ricerche hanno evidenziato che i PCB possono causare diversi effetti sulla salute umana, tra i quali il cancro, dipendenti dal tempo di esposizione, l'età, il

nesso e l'area del corpo dove tali molecole vanno a concentrarsi. Gli effetti finora descritti sono quelli riscontrati sull'uomo, ma esistono anche moltissime indagini condotte sugli animali che hanno messo in luce una grande varietà di patologie causate dai PCB, quali ad esempio il cancro al fegato nel topo, problemi al sistema endocrino e riproduttivo nel ratto, alterazioni neurocomportamentali nelle scimmie (dato, quest'ultimo, che supporta gli studi effettuati sull'uomo) (Supriyo *et al.*, 2004).

Numerosi studi sulla tossicità dei PCB sono tutt'ora in corso, mentre molti altri ricercatori si stanno adoperando per trovare al più presto un sistema efficace, economico e facilmente applicabile per rimuovere i PCB dall'ambiente, in particolare dal suolo.

1.3.4.5. Trasformazione biologica dei PCB:

La degradazione biologica di sostanze altamente recalcitranti, come i PCB, è strettamente dipendente da diversi fattori sia ambientali che legati alle proprietà fisico-chimiche della stesse molecole da degradare. In particolare tali fattori includono: struttura del composto, presenza di sostituenti e loro posizione, solubilità e concentrazione dell'inquinante stesso.

Nel caso di composti aromatici alogenati inoltre, un alto grado di clorurazione richiede un elevato consumo di energia da parte dei microrganismi per la rottura dei legami altamente stabili tra carbonio e cloro. Il cloro, come sostituente, altera anche le proprietà di risonanza delle sostanze aromatiche così come la densità degli elettroni in specifici siti della molecola ed inoltre provoca effetti stereochimici sull'affinità tra gli enzimi degradatori e i loro substrati. L'insieme di tutti questi effetti può portare ad una diminuzione dell'azione ossidativa operata dai microrganismi.

Un'altro aspetto cruciale che condiziona la degradazione dei policlorobifenili è la loro scarsa solubilità tanto da rendere quasi impossibile la degradazione microbica dei PCB più complessi ed altamente clorurati.

Infine, la concentrazione di tali inquinanti, può influenzarne la loro degradazione biologica. Concentrazioni troppo basse infatti, possono non essere sufficienti per l'induzione degli enzimi degradativi o per la crescita di microrganismi competenti, mentre, concentrazioni troppo elevate possono rendere tali composti altamente tossici per i microrganismi stessi (Sylvestre *et al.*, 1994).

Tra i fattori ambientali che influenzano principalmente la degradazione batterica dei PCB ricordiamo: pH, presenza di sostanze tossiche, inibitori o sostanze competitive, disponibilità di accettori di elettroni, interazione tra diversi microrganismi.

L'uso di microrganismi, siano essi aerobi che anaerobi è il solo processo conosciuto per la degradazione dei PCB nel suolo, nei sedimenti o negli ambienti acquatici.

1.3.4.6. *Trasformazione anaerobica dei PCB:*

In generale, congeneri altamente clorurati sono substrati preferenziali per la degradazione anaerobica dei PCB. Tale processo, che avviene principalmente nel suolo o nei sedimenti, coinvolge una dealogenazione riduttiva che consiste nella sostituzione sequenziale di un atomo di cloro, della molecola di PCB, con uno di idrogeno (Figura 1.6). La molecola tossica funziona pertanto come accettore di elettroni (Quensen *et al.*, 1990; Morris *et al.*, 1992) secondo la seguente reazione: $R-Cl + 2e^- + H^+ \rightarrow R-H + Cl$.

La prima evidenza sperimentale di questo meccanismo fu ottenuta da Brown e collaboratori (1987) in studi condotti sulla trasformazione di questi inquinanti in campioni di sedimenti derivati dal fiume Hudson. I PCB principalmente presenti erano rappresentati da congeneri mono- e difenilclorurati a dimostrazione del fatto che la reazione di dealogenazione riduttiva porta generalmente all'accumulo di congeneri con basso grado di clorurazione (Brown *et al.*, 1987).

Successivamente, Quensen e collaboratori (1988) confermarono tali risultati riproducendo in laboratorio un microcosmo derivato dall'incubazione degli stessi sedimenti. Dopo 16 settimane il 53% dei clori totali nell'Aroclor 1242, erano stati rimossi e la proporzione di mono- e diclorobifenili era passata dal 9 all'88%. Questo studio confermò inoltre lo schema degradativo seguito preferenzialmente dai batteri in condizioni anaerobiche secondo il quale la rimozione del cloro avviene preferibilmente in posizione *meta* e *para*.

Ulteriori studi identificarono inoltre le variabili chiave che influenzano positivamente l'attività degradativa dei batteri, in condizioni anaerobiche, nei confronti dei PCB: l'esposizione dei microrganismi indigeni ad un particolare PCB contaminante, presente in un dato campione, aumenta l'efficacia biodegradativa dei batteri stessi nei confronti del PCB a cui vengono esposti (Bedard *et al.*, 1996; Klasson *et al.*, 1996) e l'uso di elevate concentrazioni di un appropriato substrato (ad esempio 2,6-dibromobifenile) che è realmente suscettibile alla dealogenazione microbica può promuovere la crescita di microrganismi capaci di utilizzare PCB come accettori di elettroni (Wu *et al.*, 1999; Bedard *et al.*, 2003).

Il coinvolgimento di diverse specie microbiche nella degradazione dei PCB fu inizialmente suggerito da studi in cui erano evidenti diversi comportamenti, in colture di arricchimento, di batteri derivati dagli stessi campioni di sedimenti.

Ad esempio, colture derivate da sedimenti del fiume Hudson dopo pastorizzazione, erano in grado di catalizzare principalmente *meta*-dealogenazione mentre colture derivate dai sedimenti originali, non trattati, mantenevano la capacità di dealogenare PCB sia in posizione *meta* che *para* (Ye *et al.*, 1992). Questi risultati dimostravano chiaramente il coinvolgimento di più popolazioni batteriche in grado di dealogenare i diversi congeneri.

In base all'esame dei PCB persi durante reazioni di dealogenazione e ai prodotti di accumulo delle reazioni stesse, otto diversi processi degradativi sono stati identificati in differenti campioni di sedimenti (Wiegel & Wu, 2000; Bedard, 2003). Questi *patterns* includevano solo *meta* e *para*-dealogenazioni in molti dei sedimenti inizialmente studiati (Brown *et al.*, 1987; Quensen *et al.*, 1988, 1990; Nies & Vogen, 1990; Alder *et al.*, 1993; Ofjord *et al.*, 1994) o in colture sviluppate successivamente dagli stessi campioni (Bedard *et al.*, 2005). Nel caso di studi condotti sul campo erano invece evidenti solo pochi casi di *orto*-dealogenazione. Mentre numerosi esempi di dealogenazione di bifenili *orto*-sostituiti si sono avuti in studi condotti sia con colture di arricchimento che con campioni di sedimenti in cui venivano aggiunti definiti congeneri di PCB (Van Dort & Bedard, 1991; Williams, 1994; Hartkamp-Commandeur *et al.*, 1996; Natarajan *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1997; Quensen *et al.*, 1998; Wiegel & Wu, 2000).

Microrganismi in grado di catalizzare dealogenazione riduttiva di PCB non sono stati però mai isolati in coltura pura (Field & Sierra-Alvarez, 2007) ma le attuali conoscenze relative ai batteri coinvolti nella degradazione anaerobica di queste molecole derivano principalmente da studi di tipo molecolare. L'elettroforesi a gradiente denaturante (DGGE) dei geni per l'rRNA 16S è stata ad esempio utilizzata per identificare microrganismi in una coltura di arricchimento in cui veniva catalizzata la *orto*-dealogenazione del 2,3,5,6-tetraclorobifenile a 2,3,5-triclorobifenile e 3,5-diclorobifenile con acetato come accettore di elettroni. Una delle bande predominanti era altamente dipendente dalla presenza degli inquinanti ed è stata identificata come "batterio o-17" appartenente al *phylum Chloroflexi* e con un'identità di sequenza di circa il 90% con il batterio *Dealococcoides ethenogens* (Cutter *et al.*, 2001).

In studi successivi, in cui veniva dimostrata effettivamente la dealogenazione di diversi congeneri di PCB, sono state ritrovate ulteriori sequenze altamente simili a

quelle del gene per l'rRNA16S di batteri appartenenti ai gruppi *Deallococoides* e *Dealobacter* (Wu *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2006; Fagervold *et al.*, 2007).

Oltre a questi due generi, altamente ricorrenti in processi di degradazione anaerobica di PCB, sono stati ritrovati, in colture di arricchimento, anche nove ceppi appartenenti al gruppo dei *Clostridium* ma in tal caso non è stato provato il loro diretto coinvolgimento nell'effettiva reazione di dealogenazione (Hou & Dutta, 2000).

Tuttavia, al di là di studi molecolari sulle specie batteriche principalmente coinvolte in questo processo, attualmente non si hanno conoscenze riguardo le dealogenasi coinvolte nella degradazione dei PCB. In due lavori (Assafanid *et al.*, 1992; Woods *et al.*, 1999), viene comunque evidenziato il fatto che la vitamina B12 è un coenzima ricorrente nella degradazione di alcuni PCB. Ad esempio, utilizzando il ditiotreitolo come riducente, la vitamina B12 catalizza la dechlorurazione in posizione *para* e *meta* del 2,3,4,5,6-pentaclorobifenile.

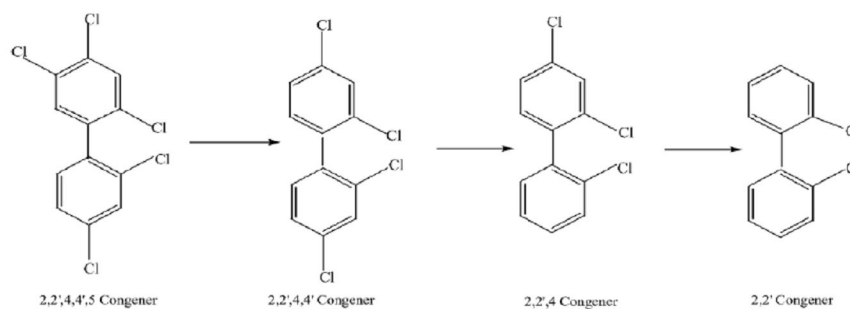


Figura 1.6. Potenziale *pathway* per la dealogenazione anaerobica di congeneri altamente clorurati.

1.3.4.7. Trasformazione aerobica dei PCB:

In generale, i congeneri altamente clorurati sono substrati preferenziali per la degradazione anaerobica. A causa della formazione di metaboliti tossici (diidrossibifenili clorurati e clorocatecoli), infatti, i batteri aerobi difficilmente riescono a degradare i PCB altamente clorurati. L'estrema idrofobicità di queste molecole, inoltre, ne determina il loro accumulo nelle membrane rendendoli inaccessibili agli enzimi e capaci, ad elevate concentrazioni, di distruggere le membrane stesse, portando quindi alla morte cellulare (Ohtsubo *et al.*, 2004).

Solo i congeneri con un minor grado di clorurazione vengono quindi degradati in presenza di ossigeno. Batteri con questa capacità degradativa, si trovano sia tra i Gram-negativi appartenenti ad esempio ai generi *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*,

Alcaligenes, *Achromobacter*, *Comamonas*, *Ralstonia*, *Sphingomonas* che tra i Gram-positivi come *Rhodococcus*, *Bacillus* e *Corynebacterium* (Furukawa, 2000; Borja *et al.*, 2005; Pieper *et al.*, 2005). Ogni microrganismo mostra comunque un particolare spettro di attività riguardo il tipo di PCB che può metabolizzare con alcuni ceppi in grado di degradare un ristretto numero di congeneri ed altri, come ad esempio *Burkholderia* sp. LB400 e *Rhodococcus globerulus* P6, in grado, invece, di trasformarne un ampio *range* (Fain *et al.*, 2001).

La specificità di attacco rispetto ad un determinato congenere dipende dal tipo di bifenil 2,3-diossigenasi, l'enzima che catalizza il primo *step* degradativo dei PCB, di ogni microrganismo. Studi su varie bifenil-diossigenasi hanno infatti messo in evidenza considerevoli differenze nella loro selettività sia rispetto ai congeneri che attaccano che riguardo la preferenza di attacco di uno dei due anelli aromatici del bifenile (Kimura *et al.*, 1997; McKay *et al.*, 1997; Zielinski *et al.*, 2002).

Comunque, solo alcuni degli isolati che degradano PCB in condizioni aerobiche possono metabolizzare completamente questi substrati, cioè degradare entrambi gli anelli aromatici del bifenile. Nella maggior parte dei casi, invece, solo l'anello meno clorurato viene degradato mentre l'altro viene rilasciato sotto forma di clorobenzoato.

In particolare, in condizioni aerobiche, i PCB possono essere sia co-metabolizzati che utilizzati come fonte di carbonio per la crescita degli stessi batteri degradatori. Nel caso del co-metabolismo aerobio, i batteri coinvolti in questo processo sono in grado di co-metabolizzare i PCB utilizzando bifenile come substrato primario.

In uno studio estensivo di *screening*, batteri in grado di co-metabolizzare PCB con basso grado di alogenazione, sono stati isolati in quasi tutti i campioni di suolo contaminato analizzati dimostrando quindi un'ubiquitaria presenza di batteri con queste capacità degradative. Tutti questi isolati erano in grado di degradare congeneri con solo 2 atomi di cloro ma, all'aumentare del numero di sostituenti, sempre meno ceppi mostravano capacità degradative (Bedard *et al.*, 1986). Come nel caso della dealogenazione riduttiva anaerobica, PCB *orto*-sostituiti venivano degradati meno frequentemente rispetto a quelli *para*- e *meta*-sostituiti (Fukurawa, 2000).

Il co-metabolismo aerobico consiste nell'ossidazione dell'anello aromatico a minor grado di clorurazione e prevede quattro reazioni successive (Figura 1.7):

1. l'enzima 2,3-bifenil diossigenasi (BphA) catalizza l'idrossilazione dell'anello aromatico con la formazione di un bifenildiidrodiolo
2. l'enzima 2,3-diidrodioldeidrogenasi (BphB) promuove la deidrogenazione del bifenildiidrodiolo in 2,3-diidrossibifenile;

3. l'enzima 2,3-diidrossibifenildiossigenasi (BphC) determina la rottura in posizione *orto* dell'anello aromatico con formazione dell'acido 2-idrossi-6-oxo-6-fenil-2,4-esadienoico (HOPDA). Se ci sono atomi di cloro su entrambi gli anelli, l'HOPDA sarà clorurato anche nella ramificazione alifatica. Tali clorurazioni possono essere sostituite da atomi di idrogeno mediante una glutatione S-tranferasi (BphK) (Fortin *et al.*, 2006)
4. un enzima idrolasico (BphD) scinde quest'ultimo composto in acido clorobenzoico (CBA) e acido 2-idrossi-2-pentadienoico.

L'acido 2-idrossi-2-pentadienoico viene quindi convertito in 4-idrossi-2-ossovalerato dall'idratasi BphE, ed infine convertito in piruvato ed acetaldeide dall'aldolasi BphF. L'acetaldeide viene convertita dall'acetaldeide deidrogenasi BphG in acetil-CoA che entra nel ciclo di Krebs dove viene poi trasformato in CO₂.

L'acido clorobenzoico non viene generalmente metabolizzato dagli stessi batteri degradatori ma da batteri specializzati nella sua degradazione spesso presenti in coltura (Fava *et al.*, 1994; Potrawfke *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2001).

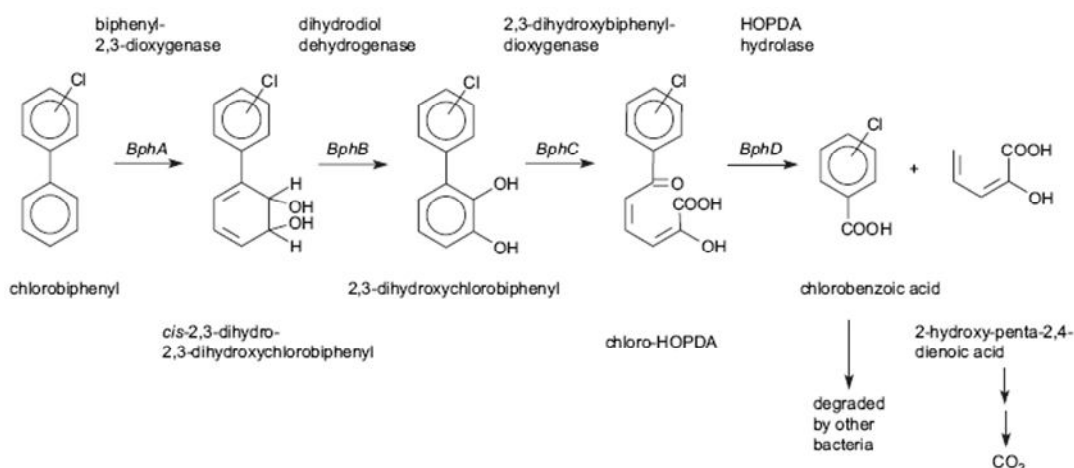


Figura 1.7. Pathway proposto per la degradazione aerobica dei PCB operata da batteri attraverso co-metabolismo del bifenile (Furukawa, 2000; Pieper *et al.*, 2005).

Come già detto, alcuni batteri sono in grado di utilizzare PCB mono- o diclorurati come unica fonte di carbonio per la crescita (Masse *et al.*, 1984; Ahmad *et al.*, 1990). *Burkholderia cepacia*, per esempio, utilizza il 4-clorobifenile, il 3-clorobifenile ed il 2-clorobifenile come substrati per il suo sviluppo. Comunque, la crescita su 2-clorobifenile e 3-clorobifenile risulta essere in molti casi limitante data la formazione, in seguito alla attività metabolica, di intermedi altamente tossici per la cellula come ad esempio il 2- ed il 3-clorocatecolo che subiscono una rottura dell'anello aromatico con

conseguente formazione di un alogenuro acilico altamente reattivo con le macromolecole biologiche (Arensdorf & Focht, 1994). La crescita su 4-clorobifenile è invece molto più frequente dato che molti ceppi batterici riescono a metabolizzare completamente questo congenere senza la formazione di alcun intermedio tossico. *B. cepacia* ad esempio, metabolizza questa molecola accumulando come intermedio 4-clorobenzoato che attraverso una serie di reazioni enzimatiche viene convertito in cloroacetato (Arensdorf & Focht, 1995).

1.3.4.8. Organizzazione genica di alcuni pathway degradativi in condizioni aerobiche:

I geni codificanti gli enzimi dell'*upper pathway* coinvolti nella degradazione di PCB in condizioni aerobiche sono stati per la prima volta clonati da *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 (Furukawa & Miyazaki, 1986) e successivamente da *Burkholderia* sp. LB400 (Mondello, 1989). Studi ulteriori hanno inoltre evidenziato lo stesso tipo di organizzazione genica anche in altre specie come *Ralstonia eutropha* H850 (Bedard *et al.*, 1987) *P. putida* KF715 (Hayase *et al.*, 1990) ed altri isolati (Bartels *et al.*, 1999). In tutti questi organismi i geni codificanti la bifenil 2,3-diossigenasi (*bphA1 A2 A3 A4*), la 2,3-diidrodioaldeidrogenasi (*bphB*), la 2,3-diidrossibifenildiossigenasi (*bphC*) e la HOPDA idrolasi (*bphD*) sono organizzati in un unico operone con i geni codificanti la glutatione S-transferasi (*bphK*) e quelli (*bphH*, *bphJ*, *bphI*) per gli enzimi coinvolti nella trasformazione del 2-idrossipenta-2,4-dienoato, rilasciato durante l'idrolisi dell'HOPDA a benzoato, localizzati tra il gene *bphC* ed il gene *bphD* (Figura X). I geni catabolici in LB400, KF707 e KF715 sono preceduti da quello che viene detto *ofr0* il cui prodotto regola positivamente la loro espressione in presenza di bifenile in tutti e tre i ceppi, ed anche quella dei geni *bphKHIIJ*, in KF707 (Watanabe *et al.*, 2000, 2003).

Un secondo tipo di organizzazione del *cluster* genico è stato osservato in *Pseudomonas* sp. KKS102 (Kikuchi *et al.*, 1994) e *Wautersia oxalatica* A5 (Merlin *et al.*, 1997; Mouz *et al.*, 1999). In questo caso l'ordine dei geni differisce significativamente da quello descritto in precedenza. In particolare i geni codificanti gli enzimi 2-idrossipenta-2,4-dienoato, acetaldeide deidrogenasi e 4-idrossi-2-osso-valerato idratasi (*bphEGF*) sono localizzati, nell'operone, prima di quelli codificanti gli enzimi dell'*upper pathway* degradativo vero e proprio. Inoltre, il gene della subunità reduttasica della bifenildiossigenasi (*bphA4*) è localizzato alla fine del *cluster* genico, separato dal gene *bphD* attraverso un *orf1* la cui funzione è tuttora sconosciuta.

Nel ceppo KKS102, infine, è stato dimostrato come la regolazione dei geni *bph* dipenda dal prodotto del gene *bphS* localizzato a monte di *bphE* (Figura 1.8).

Oltre ai due tipi di organizzazione già citati, un terzo tipo di *cluster* è stato osservato in alcuni ceppi di *Rhodococcus* quali M5 (Peloquin & Greer, 1993), RHA1 (Masai *et al.*, 1995) e TA421 (Arai *et al.*, 1998). Tra i vari ceppi l'arrangiamento del *cluster* differisce leggermente ed, in particolare, mentre in RHA1 il gene dell'enzima diidrodiole deidrogenasi (*bphB*) segue quello della 2,3-diidrossi-bifenil diossigenasi (*bphC*) in TA421 ed in M5 l'ordine di questi due geni risulta essere invertito. Comunque in tutti e tre il *cluster* dei geni catabolici è seguito dai geni *bphS* e *bphT* i cui prodotti sono coinvolti nella regolazione degli stessi. (Figura 1.8) (Arai *et al.*, 1998; Takeda *et al.*, 2004).

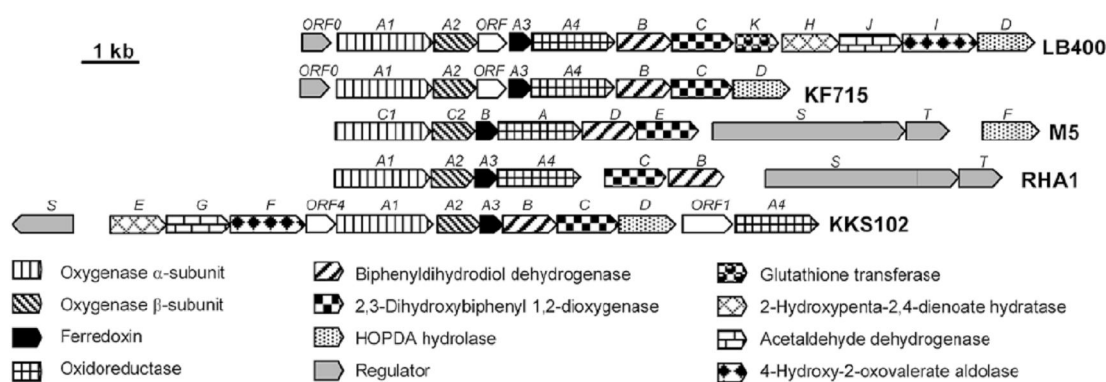


Figura 1.8. Organizzazione dell'operone *bph* di *Burkholderia* sp. LB400 (Erickson & Mondello 1992), *Pseudomonas putida* KF715 (Hayase *et al.*, 1990), *Rhodococcus* sp. M5 (Peloquin & Greer, 1993), *Rhodococcus* sp. HA1 (Masai *et al.*, 1995; Takeda *et al.*, 2004) e *Achromobacter georgiopolitanum* KKS102 (Kikuchi *et al.*, 1994).

1.3.4.9. Degradazione dei PCB operata dai funghi white-rot:

Nel suolo i funghi *white-rot* giocano un ruolo importante nella degradazione dei PCB e dei loro metaboliti. Come nel caso del metabolismo di altri xenobiotici, il ruolo principale è svolto dal sistema enzimatico (laccasi, manganese e lignina-perossidasi) di tali organismi.

In linea generale, come avviene anche nel caso della degradazione batterica, l'efficienza di mineralizzazione dei PCB da parte dei funghi diminuisce all'aumentare del loro grado di clorurazione e capacità degradative nei confronti di tali sostanze sono

state evidenziate in diversi ceppi fungini appartenenti ai generi: *Phanerochaete*, *Bjerkandera*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Rhizobium*.

Tra i funghi più studiati vi è sicuramente *Phanerochaete chrysosporium* che manifesta la stessa selettività verso i congeneri *orto*, *meta* e *para* sostituiti. La mancanza di selettività comporta un vantaggio nella biodegradazione fungina rispetto alla degradazione operata dalle diossigenasi batteriche.

In colture liquide, ed in condizioni favorevoli al loro sviluppo (azoto limitante), comunque, diversi ceppi di funghi *white-rot* sono in grado di degradare molti PCB, fino a quelli esa-clorurati, anche se quelli mono- e diclorurati vengono mineralizzati con maggiore efficienza e velocità (Novotný *et al.*, 1997; Kubatova *et al.*, 2001; Kamei *et al.*, 2006). Le stesse capacità degradative sono state inoltre dimostrate in suoli contaminati da miscele commerciali di PCB. Ad esempio, Yadav e collaboratori (1995) hanno mostrato come *P. chrysosporium* fosse in grado di provocare una diminuzione della concentrazione di Aroclor 1242, 1254 e 1260 rispettivamente del 60,9%, 30,5% e 17,6%.

Poche informazioni si hanno invece riguardo al tipo di metaboliti rilasciati da questi funghi durante la degradazione dei PCB. Il rilascio di due metaboliti: l'acido 4-clorobenzoico e il 4-clorobenzil alcol è stato evidenziato solo nel caso della degradazione del 4-4'-diclorobifenile da parte di *P. chrysosporium* (Dietrich *et al.*, 1995).

1.3.5. Metalli pesanti: Definizione, tossicità e fonti principali

Migliaia di tonnellate l'anno di metalli sono introdotte nell'ambiente dalle attività minerarie ed industriali alle quali si aggiunge la lisciviazione naturale dei depositi minerali, delle rocce e le emissioni vulcaniche. Nelle aree minerarie ed industriali abbandonate il rischio di contaminazione è alto e ciò a causa del fatto che gli interventi di prevenzione non sono più attivi o hanno ridotto la loro efficacia nel tempo.

Con la definizione di "metalli pesanti" vengono identificati quegli elementi che presentano le seguenti caratteristiche comuni:

- hanno una densità superiore ai 5 g/cm³;
- si comportano in genere come cationi;
- presentano una bassa solubilità dei loro idrati;
- hanno una spiccata attitudine a formare complessi;

- hanno diversi stati di ossidazione a seconda delle condizioni di pH.

Generalmente vengono considerati metalli pesanti l'Ag, il Ba, il Cd, il Co, il Cr, il Mn, il Hg, il Mo, il Ni, il Pb, il Cu, lo Sn, il Tl, il Ti, il V, lo Zn ed alcuni metalloidi, con proprietà simili, quali l'As, l'Sb, il Bi ed il Se. Tra questi, gli elementi che determinano più spesso fenomeni d'inquinamento sono: Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sn, Zn e Se (Salomon & Förstner, 1984; Adriano, 1986; Alloway, 1995).

Il pericolo dovuto alla presenza nel suolo di metalli pesanti è rappresentato dal possibile trasporto alle acque superficiali mediante fenomeni di erosione e ruscellamento superficiale, dalla possibilità di percolazione e inquinamento delle acque profonde in terreni con scarsa capacità di ritenzione e dall'assimilazione dell'inquinante da parte dei vegetali e il conseguente ingresso della sostanza tossica nella catena alimentare (bioaccumulazione). Le concentrazioni di metalli pesanti aumentano progressivamente nel passaggio attraverso i diversi anelli della catena biologica alimentare (biomagnificazione). Sotto il profilo biochimico, la tossicità dei metalli è causata dalla forte affinità dei cationi metallici per lo zolfo. Infatti i gruppi "sulfidrilici" (SH^-), normalmente presenti negli enzimi, si legano facilmente ai cationi dei metalli pesanti ingeriti o alle molecole che contengono tali metalli. Dato che il complesso metallo-zolfo che ne risulta interessa tutto l'enzima, questo non può funzionare normalmente con conseguente danno per la salute.

Il potere tossico esercitato dai metalli pesanti dipende anche dalla struttura chimica di ciascun elemento, vale a dire dalla sua speciazione. Per esempio esiste una notevole differenza fra la tossicità del piombo metallico, quella dello ione Pb^{2+} e quella del piombo sotto forma di composto covalente. Le forme insolubili transitano nel corpo umano senza causare danni significativi.

I metalli pesanti a differenza dei composti organici non sono biodegradabili, non possono cioè essere trasformati in acqua e anidride carbonica.

Alcuni metalli pesanti (Hg, Cd, Pb, ecc.) sono tossici per lo sviluppo della biomassa batterica, altri a basse concentrazioni risultano essenziali alla vita microbica (Ni, Cu, Zn), mentre a dosi più elevate risultano nocivi. Vi sono però batteri che, vivendo in aree contaminate da metalli pesanti, hanno evoluto caratteristiche di metallo-resistenza e/o metallo-tolleranza, (Baldi, 2003). Il meccanismo di metallo-resistenza più studiato è quello della mercurio-resistenza. Esistono dei batteri che per disintossicarsi da mercurio adottano una tecnica di riduzione del Hg^{2+} che viene trasformato da una mercurio-riduttasi a mercurio elementare Hg^0 . Si passa così da una specie del metallo molto tossica ad una meno tossica. Il Hg^{2+} tramite due proteine viene legato nello spazio

periplasmatico e poi pompato nel citoplasma per raggiungere così la mercurio-riduttasi. Il Hg^0 prodotto lascia spontaneamente per diffusione la parete cellulare e vaporizza nell'aria (Nies & Silver, 1995).

Altri batteri invece sono metallo-tolleranti come ad esempio i solfato-riduttori che producono, durante la respirazione anaerobica dei solfati, notevoli quantità di H_2S che reagendo istantaneamente con molti ioni metallici, produce solfuri o forme cationiche più ridotte e quindi meno tossiche.

1.4. IL PROBLEMA DELLA BIODISPONIBILITÀ:

Uno dei fattori di maggiore rilevanza che regola la degradazione e l'ecotossicità degli inquinanti organici idrofobici all'interno dei suoli è rappresentato dalla loro biodisponibilità. Studi sulla biodegradazione di diversi composti nel suolo hanno infatti dimostrato che il loro basso rilascio nella fase acquosa è spesso il passaggio che limita tale processo (Weissenfels *et al.*, 1992; Erickson *et al.*, 1993; Würdemann *et al.*, 1995; Beck & Jones, 1995).

Il termine biodisponibilità, viene spesso usato con differenti significati da parte dei tossicologi anche se la definizione più idonea in questo ambito è la seguente: “Un inquinante ha una biodisponibilità limitata quando il suo tasso di assorbimento da parte di un organismo è limitato da barriere fisico-chimiche tra l'inquinante e l'organismo stesso”. Per capire meglio il processo che regola la biodisponibilità è necessario conoscere le interazioni tra la matrice suolo, l'inquinante ed i microrganismi. Queste dipendono da diversi fattori, come:

- il tipo e lo stato chimico/fisico dell'inquinante;
- il tipo e lo stato chimico/fisico del suolo;
- il tipo e lo stato del microrganismo;
- fattori esterni come temperatura e presenza di nutrienti e ossigeno.

Il primo fattore descrive in quale forma il contaminante arriva nel suolo, infatti esso può essere disciolto nell'acqua che occupa i pori del suolo stesso, assorbito dalle o adsorbito sulle particelle che lo costituiscono o essere presente come una fase separata, cioè, in fase solida o liquida. Un altro fattore chiave che regola la biodisponibilità di un dato inquinante è il suo tasso di diffusione, ovvero il livello con il quale esso passa alla fase acquosa.

Tra le possibili soluzioni tecnologiche al problema della limitata biodisponibilità, molto promettente è l'uso di tensioattivi denominati anche surfactanti (Morris & Pritchard, 1993), espressione derivante dalla terminologia inglese “*Surface Active Agents*”. Queste sostanze agiscono diminuendo la tensione superficiale e interfacciale della fase liquida (Christofi & Ivshina, 2002), svolgendo un'azione mobilizzante e di trasporto sulle molecole adsorbite al suolo ed aumentandone quindi la loro biodisponibilità (Almgren *et al.*, 1979; Deitsch & Smith, 1995; Fava & Di Gioia, 1998).

La prima ricerca circa l'applicazione di surfactanti nel suolo è stata eseguita nell'industria petrolifera usando l'azione dispersiva e superficiale/attiva dei surfactanti con l'obiettivo di aumentare il recupero di petrolio dai pozzi petroliferi tramite lavaggio

con soluzioni di agenti mobilizzanti. Questi studi furono condotti dall'*American Petroleum Institute* (1979) e furono quindi le prime prove eseguite sull'uso di questi additivi per la decontaminazione di suoli contaminati.

Altre soluzioni tecnologiche, applicabili allo scopo di aumentare la biodisponibilità dei contaminanti, vengono comunque messe in atto principalmente nel recupero *ex situ* dato che nel caso del recupero *in situ* sono considerate spesso eccessivamente costose. Tra queste, molte delle quali ancora in fase di sviluppo, si possono menzionare: l'aumento della temperatura del suolo, l'applicazione di tecniche acustiche e l'uso di solventi organici, ossidanti chimici, o enzimi fungini (Volkering *et al.*, 1998).

Alcune sostanze, poi, sembrano essere non-biodegradabili in ogni condizione come accade, ad esempio, nel caso di vari polimeri sintetici. Molti composti, poi, potenzialmente attaccabili dai microrganismi non vengono in realtà distrutti. E' quindi necessario distinguere tra una molecola biodegradabile e una che, sotto particolari condizioni, non viene biodegradata. Il primo termine indica una potenzialità mentre il secondo descrive ciò che realmente accade quando si verificano una serie di condizioni.

Ci sono varie giustificazioni che si possono addurre per spiegare la non biodegradazione di una data molecola:

1. la concentrazione delle sostanze tossiche può essere tanto alta da inibire la proliferazione microbica ed il metabolismo;
2. uno o più nutrienti essenziali per la crescita possono essere presenti ad un livello troppo basso;
3. il substrato stesso può essere a concentrazioni troppo basse per permettere una replicazione apprezzabile degli organismi che posseggono i giusti enzimi catabolici;
4. il substrato può trovarsi in una forma non prontamente disponibile per il microrganismo.

In particolare, l'ultimo punto riguarda proprio la scarsa "biodisponibilità" di una molecola organica che può derivare principalmente da tre diversi fenomeni e cioè dal fatto che essa risulti adsorbita o assorbita sulle particelle solide del suolo, oppure che sia presente nei liquidi in fase non-acquosa (NAPL), o intrappolata nella matrice fisica del suolo e dei sedimenti.

1.4.1. Adsorbimento e Assorbimento:

Le superfici solide in molti ambienti possono influenzare in modo drammatico l'attività dei microrganismi indigeni. Possono infatti alterare la disponibilità degli inquinanti organici, cambiare i livelli di vari nutrienti sia organici che inorganici, modificare il pH e i livelli di O₂, rendere gli inibitori meno tossici, deprimere l'attività degli enzimi extracellulari. Le superfici attive possono essere costituite da minerali argillosi, dalla frazione organica (o sostanze umiche) del suolo o dei sedimenti, da ossidi o idrossidi amorfi di Fe e Al ed agiscono mediante adsorbimento, ossia attraverso la ritenzione dei soluti originariamente presenti in soluzione.

Per assorbimento si intende, invece, la ritenzione del soluto all'interno della massa del solido piuttosto che sulle sue superfici.

Una grande varietà di composti organici vengono adsorbiti o assorbiti dai costituenti dei suoli e dei sedimenti. Alcune di queste molecole vengono adsorbite principalmente dai minerali argillosi, mentre altre si legano maggiormente o interamente alla sostanza organica. Non solo le sostanze organiche, ma anche alcuni nutrienti inorganici, essenziali per la crescita dei microrganismi, possono subire processi di adsorbimento.

Una serie di fattori influenzano l'adsorbimento e l'assorbimento dei composti organici tra cui:

- il tipo e la concentrazione dei soluti;
- il tipo e la quantità dei minerali argillosi;
- la quantità della sostanza organica nel suolo o nei sedimenti;
- il pH;
- la temperatura;
- la natura del composto in questione.

L'adsorbimento può implicare forze di Van der Waals, legami idrogeno, scambio ionico, o chemioadsorbimento. Le molecole di grandi dimensioni possono essere ritenute dalle superfici dei minerali argillosi per mezzo di legami idrogeno, ma per i composti organici a basso peso molecolare, come gli inquinanti, è particolarmente importante lo scambio ionico, in cui uno ione di un certo tipo in soluzione viene scambiato con uno ione di un altro tipo che si trova adsorbito. I minerali argillosi e i materiali organici colloidali hanno una carica netta negativa, e quindi tendono ad attrarre principalmente molecole cariche positivamente. Una particella di argilla può avere cationi come H, Ca, K o Mg sulla sua superficie ed una molecola anionica può

sostituirsi ad uno di questi cationi adsorbiti, così da risultare essa stessa adsorbita sul minerale. Poiché le sostanze umiche posseggono cariche negative, anche esse possono scambiare composti carichi positivamente. Le molecole organiche anioniche, invece, vengono tendenzialmente repulse a causa delle cariche negative sulle superfici di cui sopra (Morris *et al.*, 1982).

La frazione organica dei suoli e dei sedimenti è responsabile dell'adsorbimento di molti composti, particolarmente di quelli idrofobici. Molti IPA e altri inquinanti non polari vengono adsorbiti prevalentemente dalla sostanza organica piuttosto che dai minerali argillosi. La proporzione di questa ritenzione è direttamente correlata con il coefficiente di partizione ottanolo-acqua, che viene espresso come il valore K_o/w (misura della idrofobicità di una sostanza), e dalla percentuale di carbonio organico nel suolo o nei sedimenti; maggiore è la quantità di sostanza organica presente nella fase solida, e maggiore sarà il numero di molecole idrofobiche adsorbite.

1.4.2. Liquidi in fase non-acquosa e composti con bassa solubilità in acqua:

In alcuni siti contaminati, molti inquinanti non si trovano in fase acquosa o adsorbiti ai solidi, ma piuttosto in liquidi immiscibili con l'acqua. Come tali, la disponibilità dei contaminanti per la biodegradazione o il biorisanamento può essere drasticamente ridotta dato che i microrganismi agiscono generalmente solo su sostanze che si trovano in fase acquosa. Questi liquidi in fase non-acquosa (NAPL) che contengono gli inquinanti ambientali si ritrovano in acquiferi, sottosuoli, sedimenti, suoli, nella parte superficiale della colonna d'acqua in corpi idrici marini e d'acqua dolce. I NAPL generalmente contengono una serie di molecole organiche piuttosto che una sola sostanza, come avviene nel caso di uno sversamento accidentale, e sono composti da molecole che hanno una bassa solubilità in acqua e un'alta solubilità nei solventi organici.

Vari sono i fattori che influenzano la biodegradazione dei singoli costituenti dei NAPL ed includono:

- l'abilità intrinseca della microflora presente nel sito di trasformare i diversi costituenti;
- il tasso di ripartizione del costituente dal liquido non-acquoso verso la fase acquosa;
- la viscosità del NAPL;
- la tossicità del liquido non-acquoso;

- l'area dell'interfaccia tra il NAPL e la fase acquosa;
- la presenza di altri costituenti che sono degradati più velocemente dello specifico composto in esame;
- una concentrazione di equilibrio nella fase acquosa troppo bassa per permettere ai microrganismi di crescere.

1.4.3. Aging:

La rimozione degli inquinanti dal suolo viene illustrata mediante una curva di decadimento bifasica, in cui ad un breve periodo di rapida perdita ne segue uno più lungo, in cui la perdita è più lenta (Jones *et al.*, 1996). L'importanza relativa di ciascuna fase è determinata dalla volatilità e dall'idrofobicità del composto e non va trascurato il fatto che entra in gioco anche il processo di *aging* (invecchiamento), che determina una riduzione della biodisponibilità dei composti e la formazione di residui non biodisponibili con il passare del tempo (Hatzinger & Alexander, 1995).

Questo processo è stato proposto per spiegare le differenze nelle velocità di biodegradazione tra un suolo di recente contaminazione ed un suolo storicamente contaminato. La biodisponibilità si riduce nel tempo poiché una molecola, pur rimanendo inalterata dal punto di vista chimico, può migrare nel suolo, così da ritrovarsi in una o più delle seguenti categorie:

1. composti non adsorbiti che si trovano in micropori ad una certa distanza (nell'ordine di micrometri) dalle cellule che posseggono i sistemi enzimatici adatti;
2. composti che si trovano nei nanopori i quali, avendo dimensioni di gran lunga inferiori ai micropori, rendono del tutto inaccessibili a qualunque organismo le molecole che si trovano al loro interno;
3. sostanze chimiche che formano complessi con i materiali umici o altre sostanze per formare specie molecolari che, sebbene contengano la molecola di partenza inalterata, sono di fatto specie chimiche nuove.

Un suolo che ha subito un processo di invecchiamento risulterà quindi estremamente difficile da trattare, anche utilizzando tecniche di micorisanamento. In tali casi, quindi, uno degli approcci che sta riscuotendo particolare successo è quello di utilizzare sostanze mobilizzanti che siano in grado di trasportare l'inquinante dalla fase organica a quella acquosa.

1.4.4. Caratteristiche e ruolo degli agenti mobilizzanti:

Gli agenti mobilizzanti (AM) sono sostanze costituite da molecole o strutture sovramolecolari, aventi una componente polare idrofila ed una apolare idrofoba. L'azione solubilizzante viene svolta con un meccanismo analogo a quello della deterzione. Essi, se presenti a basse concentrazioni, in fase acquosa, formano una soluzione, mentre formano una dispersione colloidale stabile al di sopra di una certa concentrazione, definita “*critical micelle concentration*” (CMC). Questo fenomeno si verifica poiché tali molecole si organizzano in aggregati sferici, ovvero in micelle, orientando verso il centro di queste strutture le parti idrofobe e verso la fase acquosa quelle idrofile, le quali andranno a formare le superfici delle micelle stesse. Gli agenti solubilizzanti tendono quindi a circondare e ad emulsionare le sostanze inquinanti apolari eventualmente presenti, ed in questo modo le molecole idrofobe adsorbite vengono prelevate dalla fase solida del suolo e stabilizzate in soluzione acquosa.

La CMC dipende dalla temperatura e dal tipo di surfattante; alla temperatura del suolo, il valore tipico della CMC è compreso nell'intervallo 0,1-1 mM.

Gli agenti mobilizzanti più efficienti sono quelli con una bassa CMC dato che in tal caso sono necessarie concentrazioni più basse per diminuire la tensione superficiale. Ad elevate concentrazioni, i surfactanti inducono, infatti, la formazione di singoli (emicelle) o doppi strati (admicelle) di molecole intorno alle superfici. La concentrazione alla quale avviene questo secondo fenomeno viene detta “*critical admicelle concentration*” ed è di solito minore rispetto alla CMC (Figura 1.9) (West & Harwell, 1992; Nayyar *et al.*, 1994).

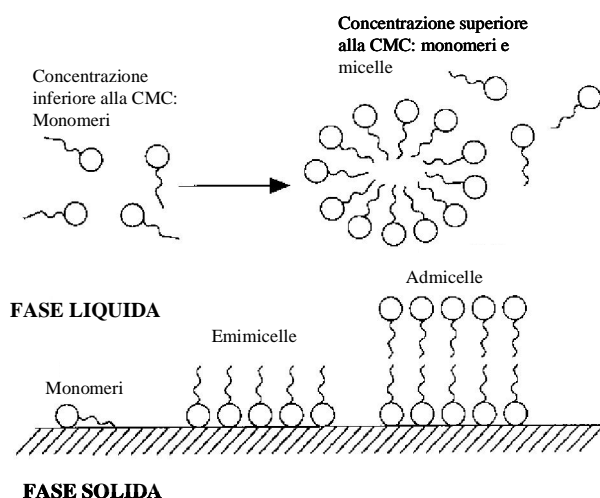


Figura 1.9. Esempi di diversi tipi di forme micellari dei surfactanti nel suolo (adattato da West & Harwell, 1992).

La solubilizzazione degli inquinanti dipende, comunque, da diversi fattori tra i quali: la natura stessa dell'agente mobilizzante, dal soluto, dalla temperatura, dalla forza ionica, dalla concentrazione, dalle interazioni suolo/agente solubilizzante e dal tempo di contatto tra contaminante e suolo (Guha & Jaffé, 1996).

Il surfattante, affinché svolga efficacemente la sua azione, deve inoltre possedere determinate caratteristiche come ad esempio:

- ottime capacità “mobilizzanti” verso gli inquinanti adsorbiti o assorbiti;
- lenta biodegradabilità nel suolo ammendato;
- assente o ridotta tossicità nel suolo;
- disponibilità su scala industriale a basso costo (Volkering *et al.*, 1998; Rouse *et al.*, 1994).

In figura 1.10 sono riportate le complesse interazioni tra il suolo, i microrganismi in esso presenti, gli inquinanti e gli agenti mobilizzanti.

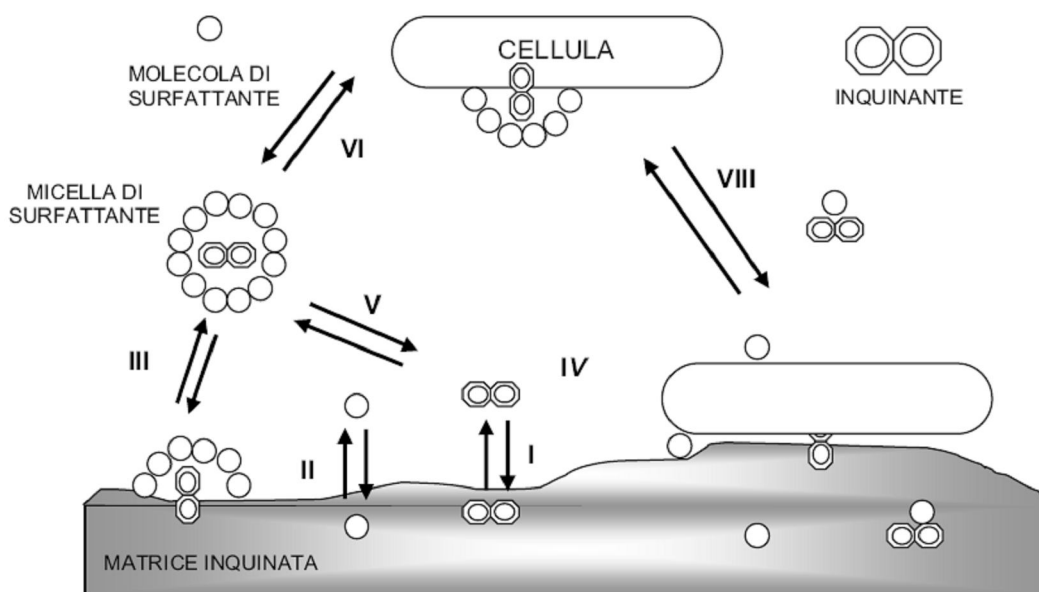


Figura 1.10: Possibili interazioni tra microrganismi, suolo, inquinanti ed agenti solubilizzanti. I: Adsorbimento e assorbimento dell'inquinante nel suolo; II: Adsorbimento e assorbimento del surfattante nel suolo; III: Solubilizzazione dell'inquinante; IV: Ingresso dell'inquinante presente in fase acquosa nei microrganismi; V: Partizione dell'inquinante tra fase acquosa e micelle; VI: Adsorbimento delle micelle sulla superficie dei microrganismi; VII: Ingresso nei microrganismi dell'inquinante presente nel solido; VIII: Adesione dei microrganismi sulla superficie del solido (Volkering *et al.*, 1998).

1.4.5. Classificazione degli agenti mobilizzanti:

Una prima classificazione degli agenti solubilizzanti o tensioattivi è basata sul loro comportamento in soluzione e cioè sulla natura del loro gruppo idrofilo secondo la quale vengono distinti in (Volkering *et al.*, 1998):

1. Cationici: vengono impiegati principalmente come battericidi; appartengono a questa categoria principalmente i composti di ammonio quaternario;
2. Anionici: usati principalmente come detergenti, sono incompatibili con gli acidi, con tensioattivi cationici e con quei cationi con i quali formano sali insolubili; a tale gruppo appartengono oltre a molti detergenti, i sali degli acidi grassi;
3. Zwitterionici: contengono sia gruppi cationici che gruppi anionici; fra questi ricordiamo vari prodotti naturali come le lecitine e la caseina;
4. Non ionici: hanno il vantaggio di essere stabili sia ambiente acido che alcalino.

Affinché un tensioattivo svolga la sua funzione deve esserci un adatto equilibrio tra le sue proprietà idrofile e lipofile; se una delle due prevale nettamente esso diventa troppo solubile in acqua o troppo affine verso le fasi idrofobe per poter esercitare una buona attività interfacciale. L'attività di un tensioattivo verso la fase acquosa si può esprimere quindi, in termini quantitativi, mediante il parametro *Hydrophile Liphophile Balance* (HLB) che aumenta all'aumentare dell'idrofobicità del tensioattivo stesso.

Una seconda classificazione degli agenti mobilizzanti è basata sulla loro origine secondo la quale vengono distinti in:

1. Sintetici;
2. Biogeni;
3. Di origine microbica: biosurfactanti.

1.4.5.1. Surfactanti sintetici:

Molti surfactanti prodotti artificialmente, tramite processi chimici di sintesi, riescono a svolgere un'ottima azione solubilizzante. I surfactanti sintetici pur avendo un'ottima efficienza nel deadsorbimento e nel *washing* degli inquinanti, risultano essi stessi dei contaminanti, essendo recalcitranti alla biodegradazione e tossici per la biomassa coinvolta nella degradazione degli inquinanti (Lajoie *et al.*, 1994; Rouse *et al.*, 1994; Volkering *et al.*, 1998). Appartengono a questa categoria, ad esempio, i Triton X, Igepal (Viney & Bewley, 1990), i Tween (Aronstein *et al.*, 1991) e Brij (Volkering *et al.*, 1995). La tossicità di questi composti può essere determinata da reazioni con

proteine essenziali per la cellula, come quelle di membrana, oppure dalla rottura delle membrane stesse causata dall'interazione tra il tensioattivo e i componenti lipidici come nel caso del Triton X-100, ampiamente utilizzato nel trattamento di suoli contaminati (Withworth *et al.*, 1973).

La serie dei surfactanti Tween (Tabella 1.1) (Tween 20, 40, 60 e 80), trova applicazioni in vari campi. Questa classe di agenti mobilizzanti è costituita da surfactanti non-ionici caratterizzati dall'avere come gruppo idrofilo poliessietilene o polipeptide, hanno un valore di HLB simile ma hanno diverse porzioni idrofobiche.

In generale, comunque, i gruppi idrofobi più comuni dei surfactanti sintetici sono paraffine, olefine, alchilbenzeni, alchilfenoli e alcoli; i gruppi idrofili sono generalmente gruppi solfato, solforato o carbossilato (surfactanti anionici), ammonio quaternario (surfactanti cationici), poliossietilene o polipeptide (surfactanti non-ionici).

Tabella 1.1 Caratteristiche principali dei Tween (Kim *et al.*, 2005)

Nome commerciale	Tween 20 ^a	Tween 40 ^a	Tween 60 ^a	Tween 80 ^a
Nome Chimico	Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate	Polyoxyethylene (20) sorbitan monopalmitate	Polyoxyethylene (20) sorbitan monostealate	Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate
Peso molecolare	1227,5	1283,6	1311,7	1309,7
Densità	1,11	1,10	1,07	1,06
CMC ^b	0,05	0,04	0,02	0,04
HLB ^c	16,7	15,6	14,9	15,0
Tipo	Non-ionico	Non-ionico	Non-ionico	Non-ionico
Fase	Liquido	Liquido	Gel	Liquido

^a Dati da MSDS (*Material Safety Data Sheets*)

^b CMC: Concentrazione critica micellare (mM)

^c HLB: Bilancio idrofilico/lipofilico

1.4.5.2. *Surfactanti biogeni:*

Sono prodotti naturali e possono essere di origine animale o vegetale; svolgono una buona azione solubilizzante e hanno il fondamentale vantaggio, essendo biodegradabili, di non permanere nell'ambiente e quindi di non causare problemi di contaminazione. Oltre a non avere effetti tossici sulla biomassa, favoriscono la crescita dei microrganismi indigeni fungendo da fonti di carbonio ed energia, esercitano un effetto

stimolante sul risanamento ed infine, il loro utilizzo risulta molto promettente dato il loro basso costo. Recentemente Fava e collaboratori (2002) hanno studiato l'effetto di alcuni agenti "solubilizzanti" commerciali biogeni, sostanze umiche, ciclodestrine, saponine, lecitine di soia nella *bioremediation* aerobica di suoli storicamente contaminati da PCB.

Le **ciclodestrine** sono una classe di surfactanti biogeni costituita da molecole a base di glucosio, oligosaccaridi ciclici con superficie esterna idrofila ed una cavità centrale lipofila, prodotte dalla degradazione enzimatica di amido da parte dei batteri.

Questi oligomopolisaccaridi anulari sono caratterizzati da una struttura molecolare a forma di anello e costituiti da 6-8 unità di glucosio congiunte tra loro con legami $\alpha(1\rightarrow4)$. Le più diffuse sono l' α -ciclodestrina, la β -ciclodestrina e la γ -ciclodestrina, costituite rispettivamente da 6, 7 e 8 unità di glucosio (Frank, 1975; Saenger, 1980); e idrossipropil- β -ciclodestrina (HP- β -ciclodestrina), formata da 7 unità e contenente anche 4-6 gruppi idrossipropilici, di solito in corrispondenza del C-6 delle molecole di glucosio. In tabella 1.2 vengono riportate le principali caratteristiche delle ciclodestrine.

Tabella 1.2. Principali caratteristiche delle ciclodestrine (Saenger, 1980).

Ciclodestrina	Unità di Glucosio	Massa Molare	Diametro della cavità (nm)	Diametro Esterno (nm)
α	6	972	47-52	142-150
β	7	1135	60-64	150-158
γ	8	1297	78-83	171-179

La peculiarità delle ciclodestrine risiede nella loro particolare struttura, a forma di anello leggermente tronco-conico, la cui parte esterna è idrofila, mentre la cavità risulta idrofoba. Questo gli consente di avere una buona solubilità in acqua (variabile tra 145 g/l dell' α -ciclodestrina e i 450 g/l dell'HP- β -ciclodestrina a temperatura ambiente) e di poter contemporaneamente accogliere all'interno della propria cavità molecole con scarsa affinità con il mezzo acquoso, legandole in modo non covalente e dando origine a complessi detti composti di inclusione (Saenger, 1980).

In assenza di molecole lipofile nel mezzo acquoso, la cavità delle ciclodestrine è occupata da molecole d'acqua, che fuoriescono dalla cavità stessa, nel momento in cui una molecola di substrato idrofobo si avvicina alla ciclodestrina. In questo modo, grazie all'interazione con i gruppi all'esterno o all'interno della ciclodestrina, la molecola

idrofoba può entrare nella cavità stessa; portando così alla ricostruzione dello strato di idratazione attorno al complesso che viene a formarsi e che prende, appunto, il nome di composto d'inclusione.

La molecola ospite risulta legata alla ciclodestrina principalmente per mezzo di forze di Van der Waals, talvolta legami idrogeno (se il substrato lipofilo presenta sostituenti polari) o altre interazioni di tipo idrofobico (Saenger, 1980).

Basandosi sulle dimensioni, le α -ciclodestrine tipicamente possono complessare molecole a basso peso molecolare o composti con catene alifatiche, le β -ciclodestrine possono formare complessi con composti aromatici ed eterociclici e le γ -ciclodestrine possono ospitare molte molecole macrocicliche e steroidi. Tra queste classi, le β -ciclodestrine sono le più usate dato che non mostrano tossicità nei confronti dei microrganismi, hanno buona biodegradabilità, rispetto agli altri surfactanti sono meno inclini a formare emulsioni ed infine, sono meno costose.

Il grande interesse scientifico per le ciclodestrine dipende quindi da questa loro abilità nel formare complessi di inclusione con una grande varietà di molecole organiche.

Recenti studi hanno permesso di osservare che alcune ciclodestrine, quali la dell'HP- β -ciclodestrina, la β -ciclodestrina e la γ -ciclodestrina, sono in grado di favorire significativamente la biodisponibilità degli inquinanti e la *bioremediation* di suoli "storicamente" contaminati da IPA e PCB senza persistere negli stessi od incrementarne la tossicità (Wang & Brusseau, 1993; Gao *et al.*, 1998).

Un esempio di una miscela di ciclodestrine metilate, denominata RAMEB viene prodotta industrialmente ed ha eccellenti proprietà "solubilizzanti" nei confronti di un'ampia gamma di molecole (Fava *et al.*, 2002; 2003). L'effetto delle RAMEB è attribuito in parte al loro impatto sulle proprietà delle superfici ed alla porosità del suolo (Jozefaciuk *et al.*, 2003).

Oltre alle ciclodestrine, un'altra classe di surfactanti biogeni utilizzati in questo lavoro è rappresentato dagli **oli vegetali**, in particolare olio di soia, la cui efficienza nella solubilizzazione degli IPA è stata dimostrata essere simile a quella dell'uso dei surfactanti sintetici (Grimberg *et al.*, 1995; Pannu *et al.*, 2004). Inoltre, l'utilizzo di olio vegetale è stato sperimentato per velocizzare la crescita di alcuni ceppi fungini (Dijkstra *et al.*, 1972).

L'olio vegetale, attraverso un processo di saponificazione, può essere separato in due frazioni, una insaponificabile ed una costituita da gliceridi che in seguito alla stessa

reazione, vengono convertiti in sapone o sali di acidi grassi e glicerolo. La frazione insaponificabile, che contiene invece steroli, viene estratta con dietiletere.

L'olio di soia, ad esempio, contiene un gran numero di saponine che si sono dimostrate inibire la crescita di alcuni funghi (Pedersen *et al.*, 1966; Olsen, 1971) anche se, gli steroli liberati durante la sua saponificazione invertono l'azione inibitrice delle saponine stesse (Gestetner *et al.*, 1971).

Un'ulteriore fonte di olio vegetale a basso costo, impiegato in questo lavoro, è rappresentata dalle acque di vegetazione (AV), prodotto di scarto dei frantoi oleari il cui quantitativo in olio può arrivare fino all'1%.

La composizione chimica delle AV, infatti, presenta un'elevata variabilità dipendente dalle condizioni climatiche, geografiche, podologiche del terreno dove si trova l'oliveto, dalla varietà di olive, dall'impiego e dal tipo di fertilizzanti, dal grado di maturazione delle olive al momento della frangitura e dal sistema di estrazione dell'olio. Mediamente le AV contengono comunque, l'83% di acqua, il 15% di sostanza secca ed il 2% di sali minerali (Amat di San Filippo *et al.*, 1986). Fra i componenti organici della AV prevalgono quantitativamente i carboidrati; sono presenti sia zuccheri semplici, come glucosio, fruttosio e xilosio sia polisaccaridi come la cellulosa e le pectine derivate dalla polpa delle olive e dai costituenti solidi totali in sospensione.

Grazie alla presenza di tali composti carboniosi, che rappresentano anche una fonte di energia e di carbonio per i funghi, le AV possono essere potenzialmente impiegate come additivi in processi di micorisanamento. Si è inoltre rilevata la presenza di acidi organici (acetico, tartarico, glicemico, lattico e malico), i quali rendono il pH della AV leggermente acido (4,9-6,5) e quindi adatto alla crescita dei funghi (Montedoro *et al.*, 1986).

1.4.5.3. *Surfactanti di origine microbica (Biosurfactanti):*

Risultati interessanti sono stati ottenuti impiegando ammendanti di origine microbica, i quali, comunque, non sono ancora disponibili su scala industriale precludendone attualmente il loro impiego nella *bioremediation*, di suoli contaminati, su larga scala (Dohse & Lion, 1994; Rouse *et al.*, 1994; Rosemberg & Ron, 1999).

I biosurfactanti sono surfactanti prodotti extracellularmente o sono parte della membrana cellulare di batteri, lieviti e funghi.

Vengono prodotti da vari tipi di substrato come zuccheri, oli, alcani e *wastes* (Lin, 1996) ed includono classi di strutture molecolari abbastanza differenti rispetto ai

surfactanti sintetici come ad esempio: glicolipidi, fosfolipidi, acidi grassi, lipopeptidi/lipoproteine e surfactanti biopolimerici.

La maggior parte di questi composti sono principalmente anionici o neutri mentre solo pochi sono cationici come quelli contenenti gruppi amminici. La parte idrofobica è formata da una lunga catena di acidi grassi, mentre la porzione idrofila può essere un carboidrato, un amminoacido, un peptide ciclico, un fosfato, un acido carbossilico o un alcool.

Tra i vantaggi dell'uso dei biosurfactanti rispetto ai surfactanti sintetici troviamo l'alta specificità, la bassa tossicità, l'alta biodegradabilità, la migliore compatibilità ambientale (Mulligan *et al.*, 2001) ed il fatto di essere sintetizzati da una fonte rinnovabile.

I biosurfactanti vengono divisi in due gruppi principali: quelli a basso peso molecolare e quelli ad alto peso molecolare; questi ultimi sono meno efficienti nel ridurre la tensione interfacciale, ma sono efficienti nel rivestire la goccioline di petrolio prevenendone la fusione. Inoltre i biosurfactanti ad alto peso molecolare presentano una persistenza prolungata dovuta alla loro bassa solubilità, che aumenta il loro assorbimento sulle superfici e limita la loro disponibilità alla degradazione microbica. Sono eteropolisaccaridi i cui componenti attivi sono lipidi e proteine ed esplicano la loro azione come biodispersanti, prevenendo la fusione di goccioline di olio in acqua. I biosurfactanti a basso peso molecolare, invece, sono dotati di bassa concentrazione critica micellare (CMC), aumentando la solubilità apparente degli idrocarburi tramite la loro incorporazione nelle cavità idrofobiche delle micelle e diminuiscono la tensione interfacciale tra olio ed acqua.

Concludendo, i biosurfactanti, possono aumentare la crescita microbica su substrati legati con il loro desorbimento dalla superficie o tramite l'aumento della loro solubilità apparente in acqua. Inoltre, l'aggiunta di questi particolari agenti solubilizzanti è vantaggiosa quando la crescita microbica è bassa (ad esempio a bassa temperatura o in presenza di alte concentrazioni di inquinanti) o quando gli inquinanti sono costituiti da componenti difficili da degradare, come gli IPA o i PCB.

1.5. ANALISI DELLE COMUNITA' MICROBICHE:

Per definire una comunità microbica occorre innanzitutto soffermarsi su quella che è una caratteristica comune alle problematiche ecologiche, e cioè il livello di indagine. L'indagine biologica può infatti essere svolta su più livelli: da quello molecolare a quello cellulare, dal livello dell'organismo (multicellulare), a quello di popolazione, per poi finire al livello di comunità. Ognuno dipende, per molte delle sue proprietà, da quelli sottostanti; ad esempio, una cellula manifesterà l'insieme delle caratteristiche date dai suoi componenti molecolari, un organismo quelle date dalle sue cellule e una comunità quelle date dalle popolazioni che la compongono.

Tuttavia ogni livello presenta anche caratteristiche peculiari che non vengono rivelate dall'analisi delle singole componenti dato che sono dovute alle interazioni tra le stesse. Queste caratteristiche sono spesso biologicamente molto importanti per il funzionamento del sistema, in alcuni casi, ad esempio, la degradazione di sostanze organiche viene svolta da "consorzi" di popolazioni microbiche diverse in cui le singole specie non possono, da sole, portare avanti l'intero processo e quindi, sono necessari degli strumenti di analisi specifici per il livello di complessità biologica che si vuole indagare.

Tuttavia, nonostante l'importanza che rivestono, molto poco si conosce sulle specie microbiche che compongono le diverse comunità, soprattutto perché per lungo tempo il loro studio si è basato su metodi dipendenti dalla coltivazione, mentre è ora noto che la maggior parte dei microrganismi ambientali non sono coltivabili con i metodi tradizionalmente utilizzati in laboratorio. Si calcola, infatti, che un grammo di suolo contenga almeno 4000 specie batteriche, ma solamente una percentuale molto bassa, circa l'1%, è coltivabile in condizioni standard (Aman *et al.*, 1995). Conseguentemente, qualunque metodo di analisi che preveda la coltivazione dei microrganismi opera di fatto una selezione e pertanto permette di analizzare solo quella frazione in grado di svilupparsi nelle condizioni adottate.

Per questo motivo negli ultimi 15 anni sono stati introdotti numerosi metodi molecolari, principalmente indipendenti dalla coltivazione dei microrganismi, per lo studio della diversità delle comunità microbiche ambientali. Questi nuovi metodi hanno affiancato le metodologie più tradizionali, quali la coltivazione su piastra e l'analisi delle caratteristiche metaboliche dei ceppi microbici in coltura consentendo così di superare i limiti imposti dalla coltivazione dei microrganismi.

In generale, quindi, i metodi per l'analisi delle comunità microbiche possono essere suddivisi in due grandi sottoinsiemi:

1. **metodi convenzionali**, che analizzano le caratteristiche fenotipiche dei microrganismi grazie a tecniche basate sulla loro coltivazione, quali l'arricchimento per specifiche attività metaboliche o l'isolamento basato su terreni di coltura selettivi (per esempio resistenza ad antibiotici o capacità degradative di particolari fonti di carbonio);
2. **metodi molecolari**, che permettono di analizzare le caratteristiche biochimiche e metaboliche (SIP, PLFA) o genetiche (*Random Sequencing in clone libraries*, ARDRA, RISA, ARISA, RFLP, T-RFLP, DGGE, TGGE, Microarray, SSCP, RAPD, FISH, DNA *re-association*) delle popolazioni costituenti le comunità prese in esame (Figura 1.11). In particolare, nel caso degli studi genetici, si ricorre all'analisi di appositi geni "marcatori" che consentono di distinguere tassonomicamente i membri delle comunità stesse, o ancora, di evidenziare la presenza di particolari attività metaboliche. In tal caso, è possibile inoltre dividere tutte queste tecniche in due grandi gruppi, ossia:
 - tecniche basate sull'amplificazione PCR;
 - tecniche biochimiche, indipendenti dall'amplificazione PCR.

Un problema di difficile soluzione quando si studia la diversità microbica in un suolo, oltre alla non coltivabilità della maggior parte dei microrganismi che costituiscono le comunità, è rappresentato dall'eterogeneità della matrice analizzata. Le cellule batteriche non sono ugualmente distribuite nella matrice stessa ma, possono raccogliersi in micro colonie o aggregati, in relazione alla sua composizione, spesso molto variabile. È perciò intuitivo che gli studi di diversità microbica devono essere effettuati su numerosi replicati del campione in esame prelevati generalmente in punti diversi al fine di raggiungere il maggior grado possibile di rappresentatività (Franklin & Mills, 2003).

Una volta prelevato il campione, inoltre, è necessaria la sua completa omogeneizzazione ed il distacco delle cellule microbiche dalla matrice generalmente effettuato mediante lavaggi con soluzioni saline (soluzione fisiologica, tamponi fosfato o altro) che alterando le interazioni elettrostatiche tra la parete batterica e la matrice provocano appunto il rilascio delle cellule stesse.

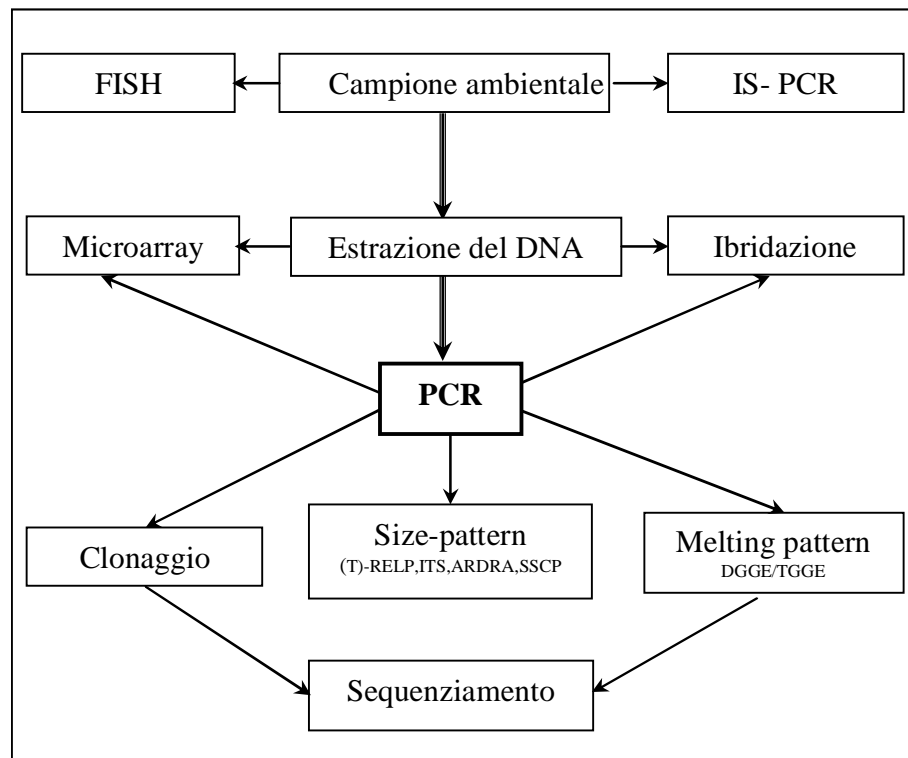


Figura 1.11. Comuni approcci per lo studio della diversità genetica delle comunità microbiche: *PCR*: Polymerase Chain Reaction; *IS-PCR*: In Situ-Polymerase Chain Reaction; *FISH*: Fluorescence In Situ Hybridisation; *T-RFLP*: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism; *ITS*: Internal Transcribed Spacer; *ARDRA*: Amplified rDNA Restriction Analysis; *SSCP*: Single-Stranded Conformation Polymorphism; *DGGE*: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; *TGGE*: Temperature Gradient Gel Electrophoresis (Dahllöf, 2002).).

1.5.1. Metodi convenzionali applicati nello studio di comunità microbiche:

1.5.1.1. Profili delle fonti di carbonio utilizzate (Sole Source Carbon utilization: SSCU):

Questa tecnica è stata sviluppata da Garland e Mills (1991) e si basa sull'utilizzo di sistemi in grado di fornire un profilo metabolico dei microrganismi esaminati. Tra questi quello maggiormente utilizzato è il sistema Biolog (Hayward, CA, USA, www.biolog.com) costituito da tre diversi tipi di piastre a 96 pozzetti, che permettono di ottenere un *pattern* delle fonti di carbonio utilizzate dalle specie batteriche che vengono analizzate. Ogni piastra contiene 95 differenti substrati e un controllo negativo senza

alcuna fonte di carbonio. In ogni pozzetto è inoltre presente il tetrazolio che viene ossidato in concomitanza con il substrato svolgendo quindi la funzione di indicatore.

Attualmente sono disponibili piastre per l'analisi di batteri Gram-negativi, Gram-positivi ed una "Eco-plate", studiata appositamente per batteri ambientali. In essa sono infatti presenti tre repliche di 31 differenti fonti di carbonio, rilevanti in campo ambientale, ed un pozzetto di controllo per ogni replica (Choi & Dobbs, 1999).

Anche se questa tecnica era stata originariamente sviluppata per l'analisi di ceppi batterici isolati, principalmente in campo clinico, viene sempre più applicata anche nello studio della dinamica di comunità batteriche più complesse ed in questo caso, l'inoculo è costituito appunto, da una coltura mista di microrganismi derivati dal campione originale. Le piastre vengono quindi incubate per 2-7 giorni e monitorate periodicamente misurando, attraverso appositi dispositivi, la riduzione del tetrazolio. I risultati ottenuti vengono generalmente analizzati con sistemi statistici, come l'analisi multivariata che permette di stabilire le differenze tra i vari campioni analizzati.

Questo metodo è stato applicato con buoni risultati in vari studi nel campo dell'ecologia microbica, al fine di comprendere quali fossero i profili metabolici di comunità derivate, ad esempio, da siti contaminati (Derry *et al.*, 1998; Konopka *et al.*, 1998), da suoli arlici (Derry *et al.*, 1999) oppure da suoli trattati con erbicidi (el Fantroussi *et al.*, 1999).

Sono inoltre noti in letteratura diversi lavori in cui questa metodica viene applicata in concomitanza con altre di tipo molecolare al fine di ampliare i livelli di comprensione di comunità batteriche complesse. Roling e collaboratori (2000) hanno, ad esempio, utilizzato il sistema Biolog insieme all'elettroforesi su gel a gradiente denaturante (DGGE) per studiare la comunità microbica anaerobica derivata da una falda acquifera contaminata. Il loro studio ha dimostrato che entrambe le tecniche erano in grado di discriminare le comunità microbiche derivate dalla falda stessa da quelle derivate invece della zona sovrastante o sottostante lo strato fangoso.

el Fantroussi e collaboratori (1999) hanno invece impiegato Biolog e DGGE per capire quale fosse l'impatto di tre differenti erbicidi sulle comunità microbiche del suolo sul quale erano stati applicati. Questi autori hanno mostrato come l'applicazione degli erbicidi provocasse una diminuzione della biodiversità e attraverso l'analisi delle componenti principali (PCA) fosse inoltre possibile distinguere tra le comunità derivate dal suolo trattato e non trattato.

Simile al Biolog, nel principio base, è il sistema API (Merieux, Francia) ed anche in questo caso sono disponibili in commercio “API strips” con una notevole varietà di fonti di carbonio usate per misurare le diversità funzionali dei microrganismi analizzati.

Le principali limitazioni nell'utilizzo di queste metodiche risiedono principalmente nel fatto che sono applicabili solo a batteri e lieviti escludendo quindi i funghi filamentosi, ed inoltre, possono essere sottoposti a questo tipo di analisi solo quei microrganismi in grado di crescere in condizioni sperimentali. Inoltre, sono sensibili alla quantità di inoculo utilizzata e riflettono solo le potenziali capacità metaboliche, e non quelle *in-situ*, dei microrganismi analizzati (Garland & Mills, 1991). Quindi, una particolare specie, che *in-situ* può non essere attiva o comunque essere poco rappresentativa, nelle condizioni di crescita utilizzate per questo tipo di analisi può avere dei vantaggi competitivi e quindi nell'elaborazione finale dei risultati si avrà una sovrastima del reale contributo della stessa all'interno della comunità.

1.5.1.2. Tecniche per la conta dei batteri:

Le tecniche di conta dei batteri, derivati da campioni ambientali, non rappresentano metodi di caratterizzazione delle comunità microbiche, dato che non forniscono informazioni riguardo le relazioni filogenetiche, la diversità e la fisiologia dei diversi componenti delle stesse. Questi metodi, che si dividono in conta diretta ed indiretta, rappresentano comunque un punto di partenza per una caratterizzazione il più completa possibile, delle comunità, siano esse batteriche che fungine, derivate da campioni ambientali.

La conta diretta ha il principale vantaggio, rispetto ai metodi indiretti, di includere ogni cellula presente nel campione, non coltivabile, vitale e non vitale. Essa si basa sul legame di coloranti fluorescenti al DNA delle cellule, evitando in tal modo gli errori dovuti, nella conta indiretta, ai fenomeni legati alla vitalità delle stesse come, la selettività dei terreni colturali, l'inibizione della crescita esercitata da alcune colonie su di altre, la bassa velocità di crescita.

I coloranti maggiormente utilizzati sono l'*Acridine Orange* (Ludvigsen *et al.*, 1999; Reed *et al.*, 2002) che intercala nel DNA emettendo fluorescenza nel verde (525nm) e il DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindole), un fluorocromo blu che si lega al DNA a doppio filamento ed ha un massimo di emissione a 461nm (Lee *et al.*, 2002; Sigler & Zeyer, 2002).

Le metodiche di conta indiretta prevedono invece, uno *step* di coltivazione che restringe notevolmente il *range* delle cellule realmente contate rispetto a quelle totali di un campione ambientale. Quindi, attraverso la conta indiretta si ottiene solo una stima proporzionale alla diversità microbica ma non una completa caratterizzazione della comunità (Amann *et al.*, 1995). La semina su terreni selettivi, oltre che fornire un metodo per la conta indiretta, viene spesso utilizzata come tecnica per l'isolamento di ceppi batterici coltivabili, principalmente nel caso in cui essi derivino da ambienti particolari come, ad esempio, siti contaminati o ambienti estremi al fine di poterne poi sfruttare le loro particolari capacità metaboliche.

La conta indiretta oltre che su piastra può essere effettuata anche su terreno liquido esprimendo il numero di batteri come "*Most Probable Number*". Questo viene stimato sulla base di algoritmi probabilistici in cui viene considerato, nel calcolo, il numero di repliche di ogni diluizione seriale in cui è evidente la crescita batterica (Koch, 1994). Anche in questo caso, comunque, il tipo di terreno utilizzato influenzerà la crescita batterica ed i batteri non coltivabili non apporteranno in tal modo il loro contributo alla stima finale.

1.5.2. Metodi molecolari applicati nello studio di comunità microbiche:

1.5.2.1. Tecniche biochimiche (PLFA e FAME):

Le tecniche appartenenti a questa categoria si basano principalmente sulla caratterizzazione dei lipidi di membrana dei diversi microrganismi nelle comunità ambientali e quelle maggiormente impiegate sono due tipi di analisi dette *Phospholipids fatty acids* (PLFA), e *Fatty acids methyl esters* (FAME).

I principi operativi su cui si basano entrambe le tecniche sono gli stessi; i lipidi di membrana vengono estratti dai campioni microbici per essere poi sottoposti a gascromatografia (GC) o spettrometria di massa (MS) che permettono l'identificazione degli acidi grassi che li compongono. La risultante analisi produce quindi un profilo delle diverse specie di acidi grassi che saranno presenti in quantità variabili. Le differenze tra le due metodiche risiedono nella natura dei lipidi che vengono estratti e nei metodi di estrazione. In PLFA vengono evidenziati solo i fosfolipidi di membrana intatti (Zelles *et al.*, 1997, 1999) mentre, nel caso dell'analisi FAME, vengono rilevate tutte le lunghe catene degli acidi grassi dopo essere state convertite in esteri metilici (Buyer *et al.*, 2002).

Entrambi sono dei saggi in cui la natura e la distribuzione dei vari lipidi di membrana vengono utilizzate come variabili nella costruzione di profili filogenetici e delle attività metaboliche dei microrganismi.

I lipidi di membrana possono infatti fornire molte informazioni riguardo gli organismi dai quali derivano. Essi, infatti, alterano la composizione delle loro membrane in risposta a differenti condizioni ambientali per aumentarne, per esempio, la fluidità nel caso siano sottoposti ad abbassamenti di temperatura, aumentano la proporzione di acidi grassi insaturi nelle membrane stesse (Bartlett *et al.*, 1999). Come tali, quindi, i lipidi ci possono fornire informazioni sullo stato fisiologico in cui si trova un dato microrganismo all'interno di una comunità (Misko & Germida, 2002).

Informazioni tassonomiche possono inoltre derivare da particolari caratteristiche di alcune specie di lipidi che differiscono tra microrganismi appartenenti a specie o generi diversi e che hanno permesso, negli anni, di generare banche dati di riferimento attraverso le quali è possibile l'identificazione di singoli isolati.

Mentre questi metodi possono essere usati per ottenere informazioni tassonomiche abbastanza precise da colture microbiche di organismi isolati, la loro applicazione nell'analisi di intere comunità è spesso molto limitata dato che molti acidi grassi sono comuni a differenti microrganismi e molti di essi sono estratti da ogni campione (Cavigelli *et al.*, 1995). Sebbene molti acidi grassi, estratti da una comunità, possono essere indicativi della presenza di vari gruppi di microrganismi, l'applicazione generale della PLFA e della FAME ha lo scopo di creare un loro profilo, unico per ogni campione (Zelles *et al.*, 1999). La caratterizzazione successiva, può essere ottenuta in questo caso attraverso studi statistici dei risultati come, ad esempio, l'analisi delle componenti principali (PCA) che semplifica notevolmente i profili riducendoli ad un singolo dato in grafico bi- o tridimensionale. Le coordinate relative ai punti rappresentano, in questo caso, l'abbondanza relativa di 2 o 3 specie molecolari dominanti (Zelles *et al.*, 1999).

Nonostante, le limitazioni nell'identificazione tassonomica diretta dei componenti di una comunità microbica, sia la FAME che la PLFA si sono dimostrate molto utili nella comparazione di campioni diversi o nello studio della struttura e della dinamica di comunità microbiche (Lei & VanderGheynst, 2000).

Comunque, come riportato da vari autori l'associazione dei risultati ottenuti attraverso queste analisi con quelli derivati da metodiche molecolari di *fingerprinting* può sicuramente superare il problema e fornire una conferma dei risultati stessi (Miethling *et al.*, 2000; Ritchie *et al.*, 2000).

1.5.3. Tecniche che permettono di relazionare l'identità dei microrganismi alle loro funzioni ecologiche:

1.5.3.1. Stable isotope probing (SIP):

La SIP è una tecnica che viene utilizzata per identificare i microrganismi che, all'interno di un campione ambientale, utilizzano per la loro crescita un particolare substrato. Il metodo si basa sull'incorporazione di un substrato arricchito con un isotopo stabile, quale ad esempio il ^{13}C al posto del comune ^{12}C , e nella successiva identificazione dei microrganismi che hanno assorbito il substrato stesso e mostrano perciò componenti cellulari quali DNA, RNA, lipidi, proteine e polisaccaridi, particolarmente arricchiti con l'isotopo (Boschker & Middelburn, 2000).

Inizialmente la SIP è stata applicata all'analisi dei fosfolipidi (PFLA), che possono essere direttamente estratti dal campione ambientale e sottoposti ad analisi mediante tecniche di spettrometria di massa in cui vengono considerati i rapporti isotopici (IRMS, *isotope-ratio mass spectrometry*).

L'applicazione più comune è comunque, oggi, quella legata all'analisi del DNA o dell'RNA contenenti l'isotopo "pesante" e questo metodo, pur essendo meno sensibile dell'analisi PFLA, consente di identificare i gruppi microbici legati al consumo del substrato marcato in modo estremamente più accurato. L'analisi SIP del DNA ha oggi un'ampia diffusione negli studi di ecologia microbica che cercano di relazionare un'attività metabolica presente nell'ambiente (suolo, acque, sedimenti, bioreattori ecc.) con il gruppo microbico che la promuove (Radajewski *et al.*, 2000).

La DNA-SIP è stata ad esempio applicata nella caratterizzazione ed identificazione di popolazioni metanotrofiche attive in sedimenti derivati da un lago altamente alcalino (Lin *et al.*, 2004), di comunità microbiche in fanghi attivi (Kasai *et al.*, 2006) e di batteri non coltivabili derivati da campioni di suolo contaminato da idrocarburi policiclici aromatici (Singleton *et al.*, 2006). Oltre che nell'identificazione delle specie microbiche, la DNA-SIP può essere applicata anche all'isolamento di frammenti di DNA da comunità microbiche non coltivabili piuttosto grandi per analisi metagenomiche (Dumont *et al.*, 2006).

La SIP, così come altre tecniche usate per la caratterizzazione microbica, presenta delle limitazioni legate principalmente alla sensibilità richiesta per non introdurre errori nell'analisi per cui, i metodi utilizzati nell'estrazione del DNA/RNA e le successive analisi dei prodotti marcati sono *step* fondamentali.

La quantità di substrato marcato incorporato ed il tempo di incubazione dell'isotopo con le cellule sono due parametri fondamentali per arrivare ad una giusta interpretazione del reale metabolismo delle cellule nell'ambiente naturale (Neufeld *et al.*, 2007).

1.5.4. Tecniche molecolari basate sull'amplificazione PCR:

L'elemento comune fra queste procedure è il fatto che tutte si basano sulla separazione di prodotti di PCR derivati dall'amplificazione di geni marcatori presenti in tutti i membri della comunità microbica studiata.

Vengono quindi prodotti una varietà di profili, chiamati comunemente “*fingerprint*” che rappresentano la diversità dei geni polimorfici di interesse, ossia la diversità delle specie microbiche della comunità esaminata.

Tutte queste tecniche hanno diversi vantaggi quali:

- rapidità e possibilità di processare molti campioni contemporaneamente;
- affidabilità ed alta riproducibilità;
- possibilità di ottenere sia informazioni qualitative che quantitative;
- possibilità di comprensione delle relazioni filogenetiche tra i membri della comunità che si sta analizzando.

1.5.4.1. DNA ribosomiali ed altri geni marcatori utilizzati in ecologia microbica per la differenziazione tassonomica delle popolazioni:

Il marcatore molecolare maggiormente utilizzato in microbiologia ambientale è sicuramente il gene codificante l'rRNA 16S batterico.

Gli rRNA rappresentano infatti, molecole essenziali per la vita delle cellule poiché costituiscono la parte non proteica dei ribosomi e rappresentano un elemento chiave della sintesi proteica. La loro funzione è quella di fornire un meccanismo per la decodifica del RNA messaggero in amminoacidi e di interagire con l'rRNA transferasi, provvedendo all'attività della peptidil-transferasi. Queste molecole sono perciò presenti, nelle loro varianti, in tutte le cellule di tutti gli esseri viventi, tanto da considerarsi molecole “universali” e di origine antichissima.

Negli organismi procariotici gli rRNA vengono distinti, in base al loro coefficiente di sedimentazione, in 5S, 16S e 23S e i relativi geni vengono indicati come 16S-, 23S- e 5S- rDNA. Negli eucarioti si distinguono invece gli rRNA, 18S, 28S e 5,8S.

I geni che codificano gli rRNA sono organizzati in entrambe le classi di organismi in operoni che consistono di una regione promotrice seguita dalla sequenza codificante per l'rRNA 16S/18S, una regione spaziatrice (*intergenic spacer region*, ITS), che può contenere un numero variabile di geni per l'rRNA transfer, la sequenza dell'rRNA 23S/28S e, dopo un secondo breve spaziatore, quella per il 5S/5,8S.

Il gene codificante l'rRNA 16S (16S rDNA) subisce mutazioni molto lentamente durante l'evoluzione e solo in rarissimi casi è soggetto ad eventi di trasferimento genico orizzontale. Per questo motivo l'analisi comparativa della sequenza del 16S rDNA permette di costruire alberi filogenetici e di stabilire quindi, le relazioni esistenti tra gli organismi viventi. Il 16S DNA è diventato quindi, negli ultimi anni il marcatore genico di elezione per gli studi tassonomici e filogenetici nei procarioti. Un secondo fattore determinante per la preferenza di questo gene, rispetto ad altri potenziali marcatori molecolari, risiede nel fatto che la sua dimensione è compatibile con l'amplificazione PCR e con uno sforzo di sequenziamento non eccessivo.

Questo fatto ha spinto i ricercatori a depositare nelle banche dati un numero enorme di sequenze del rDNA 16S, rendendo perciò questo gene un marcatore ideale per il confronto tra un ceppo incognito e la banca dati di tutti i microrganismi noti. Non esiste infatti, a tutt'oggi, alcun altro gene per il quale sia disponibile una paragonabile mole di dati.

In particolare, il gene codificante il 16S rRNA (Figura 1.12), è costituito da circa 1550bp e contiene regioni altamente conservate interspaziate da regioni ipervariabili che assumono un'importante rilevanza filogenetica e tassonomica dato che sono quelle che possono accettare delle mutazioni e che differiscono perciò tra organismi diversi. Inoltre, la presenza di regioni del gene altamente conservate permettono la sua amplificazione *in vitro* mediante PCR, attraverso l'utilizzo di diverse coppie di *primers* "universali" che sono stati sviluppati ed ampiamente utilizzati negli ultimi anni (Giovannoni *et al.*, 1990; Lane, 1991; Muyzer *et al.*, 1993, 1995; Amann *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1997; Marchesi *et al.*, 1998).

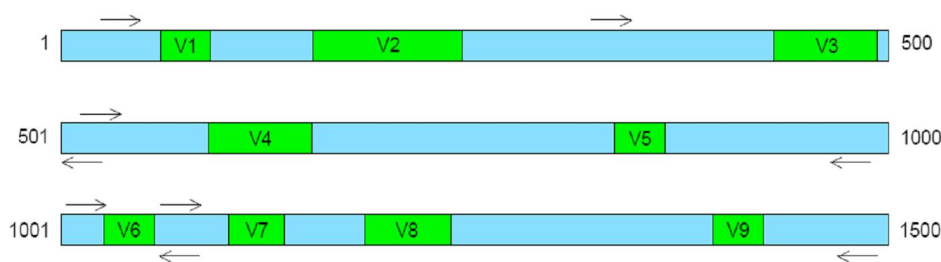


Figura 1.12. Rappresentazione schematica della sequenza del gene codificante l'rRNA 16S dei batteri. Le regioni in verde rappresentano le sequenze "ipervariabili" mentre quelle in azzurro le sequenze conservate a cui sono complementari i *primers* "universali" indicati dalle frecce.

Uno dei possibili errori che però si può compiere nell'uso del rDNA 16S, come marcatore molecolare nello studio delle comunità microbiche, è quello di una sovrastima della biodiversità dovuta al fatto che praticamente tutti i microrganismi posseggono copie multiple dei geni ribosomiali. L'eterogeneità, spesso superiore al 5%, nelle sequenze geniche dei diversi rDNA 16S di uno stesso organismo, è stata infatti riportata da vari autori (Amann, 2000; Klappenbach *et al.*, 2001; Shimizu *et al.*, 2001).

Un'ulteriore rischio potenziale nell'amplificazione PCR di questo gene direttamente dal DNA metagenomico, estratto da campioni ambientali, deriva dal fatto che spesso si ha la formazione di sequenze "chimeriche" dovute all'associazione di sequenze derivate da specie diverse (Liesack *et al.*, 1991). Due fattori principali possono incrementare la probabilità di formazione di questo tipo di strutture:

1. la disponibilità di molecole altamente frammentate di rDNA 16S che possono essere generate sia durante l'estrazione del DNA che da una loro parziale elongazione durante la reazione di amplificazione PCR;
2. la presenza di un'alta percentuale di regioni conservate nel rDNA 16S che dopo la denaturazione, durante la reazione di PCR, possono appaiarsi tra loro.

L'amplificazione delle sequenze chimeriche, una volta originatesi, procede con la stessa efficienza delle altre sequenze di rDNA 16S presenti nel DNA metagenomico iniziale e quindi, anche in tal caso, si ha una sovrastima della reale biodiversità di un campione oltre ad essere, comunque, difficile il confronto di queste sequenze con quelle depositate nelle banche dati. Una sequenza chimerica può essere riconosciuta, in ogni caso, sia controllando la complementarità di alcune regioni della sequenza stessa oppure effettuando un'analisi comparativa di differenti sezioni del prodotto di amplificazione dell'rDNA 16S.

Il gene per il 16S rRNA pur essendo il marcatore molecolare principalmente utilizzato; possiede un basso potere risolutivo nel caso di specie strettamente correlate, ed in alcuni casi, anche la distinzione a livello di genere risulta difficile (Fox *et al.*, 1992; Hill *et al.*, 2004; Forney *et al.*, 2004).

Per questo motivo, nello studio delle comunità batteriche, in alcuni casi si ricorre all'utilizzo di marcatori molecolari alternativi al 16S rDNA. Questi sono ad esempio lo spaziatore intergenico tra i geni 16S e 23S (Fisher & Triplett, 1999; Ranjard *et al.*, 2000; Coppola *et al.*, 2001; Alain *et al.*, 2002; Cardinale *et al.*, 2004), la sequenza codificante, negli Eubatteri, la chaperonina 60 (*cpn60*) (Goh *et al.* 2000; Brousseau *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2002), la sequenza codificante la subunità β dell'RNA polimerasi (*rpoB*) (Dahllöf *et al.*, 2000) e quella della Topoisomerasi II (*gyrB*) (Kasai *et al.*, 1998). Tuttavia, anche se è possibile l'utilizzo di tali marcatori molecolari alternativi, le banche dati per questi geni anche se in continua espansione sono, al momento, veramente limitate.

Infine, nel caso in cui si vogliano studiare sub-popolazioni con capacità metaboliche e fisiologiche specifiche, possono essere impiegati come marcatori diversi tipi di geni funzionali come ad esempio: il gene *amoA* che codifica l'ammonio monoossigenasi nei batteri nitrificanti (Rotthauwe *et al.*, 1997; Sakano & Kerkhof, 1998), il gene *pmoA* codificante la metano monoossigenasi nei batteri metanotrofici (Olsen *et al.*, 1998; Knief *et al.*, 2005) o il gene *nifH* che codifica la nitrato reductasi nei batteri denitrificanti (Widmer *et al.*, 1999).

Mentre variazioni nelle sequenze del rDNA 16S hanno, comunque, permesso di aumentare notevolmente le conoscenze sulla diversità e l'ecologia delle comunità batteriche nel suolo, l'identificazione tassonomica dei funghi, basata sulla sequenza del rDNA 18S, risulta più problematica e limitata generalmente a livello di genere o famiglia. Questo è dovuto principalmente all'assenza di variazioni nelle sequenze del rDNA 18S di specie strettamente correlate come conseguenza dell'evoluzione temporalmente più corta dei funghi rispetto ai batteri. Come risultato, vi è quindi, anche la mancanza di banche dati di rDNA 18S esaustive. Comunque, mentre questo è principalmente vero per gli organismi appartenenti ai *phyla* degli Ascomiceti e Basidiomiceti, nel caso dei Glomeromiceti si hanno maggiori informazioni (Schüßler *et al.*, 2001).

Un'ulteriore limitazione nello studio della diversità fungina in campioni di suolo è dovuta alla mancanza di *primers* altamente specifici, in grado di amplificare solo l'rDNA fungino discriminando, nel DNA metagenomico estratto direttamente dal suolo,

sequenze ribosomiali derivate da altri organismi procariotici o eucariotici. La sfida dei ricercatori, in questi anni, è stata quindi quella di costruire dei *primers* in grado di amplificare il maggior *range* tassonomico possibile di specie fungine ma, allo stesso tempo, in grado di prevenire la co-amplificazione di sequenze derivate da altri organismi eucariotici strettamente correlati.

Come nel caso del rDNA 16S procariotico, anche l'rDNA 18S (circa 1870bp) eucariotico presenta delle regioni ipervariabili e delle regioni altamente conservate sulla base delle quali sono stati sviluppati *primers* piuttosto specifici (Figura 1.13) (White *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1999; Borneman *et al.*, 2000; Vainio & Hantula, 2000).

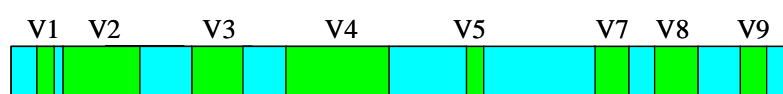


Figura 1.13. Rappresentazione schematica dell'organizzazione delle regioni conservate (azzurro) e delle regione ipervariabili (verde) del gene 18S eucariotico. In particolare nello schema viene riportata l'organizzazione del gene in *Saccharomyces cerevisiae* (Borneman *et al.*, 2000).

Un'ulteriore regione *target*, ampiamente utilizzata in studi tassonomici nell'ambito della biodiversità fungina, è quella compresa tra il gene dell'rRNA 18S e quello dell'rRNA 23S, che comprende anche l'rDNA 5,8S e che viene detta *Internal Transcribed spacer* (ITS).

Tale regione, così come altre sequenze non codificanti dell'rDNA, ha subito il maggior grado di mutazione durante l'evoluzione e quindi notevoli variazioni di sequenza sono riscontrabili anche in specie strettamente correlate. Per questo motivo, la regione ITS è quella che fornisce, generalmente, la maggiore risoluzione tassonomica rispetto a sequenze derivate, invece, da regioni codificanti (Lord *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2003). In tabella 1.3 vengono riportate le sequenze dei diversi *primers* disegnati ed utilizzati da diversi gruppi di ricercatori nello studio della biodiversità fungina in campioni di suolo.

Tabella 1.3. Sommario di *primers* disegnati ed ampiamente utilizzati nello studio della diversità fungina in campioni di suolo.

PCR primer	Sequenza (5'-3')	Sequenza <i>targhet</i>	Riferimenti bibliografici
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	18S rDNA	White <i>et al.</i> , 1990
NS2	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC	18S rDNA	
NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	18S rDNA	
NS8	TCCGCAGGTTACACTACGGA	18S rDNA	
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS	
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	ITS	
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS	
ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	ITS	Gardes & Bruns, 1993
ITS4B	CAGGAGACTTGACACGGTCCAG	ITS	
2234C	GTTTCCGTAGGTGAACCTGC	ITS	Sequera <i>et al.</i> , 1997
3126T	ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT	ITS	
ITS4A	CGCCGTTACTGGGGCAATCCCTG	ITS	Larena <i>et al.</i> , 1999
EF3	TCCTCTAAATGACCAAGTTTG	18S rDNA	Smit <i>et al.</i> , 1999
EF4	GGAAGGGRTGTATTATTAG	18S rDNA	
Fung5	GTAAAAGTCCTGGTTCCCC	18S rDNA	
nu-SSU-0817	TTAGCATGGAATAATRRATAGGA	18S rDNA	Bomeman & Hartin, 2000
nu-SSU-1196	TCTGGACCTGGTGAGTTTCC	18S rDNA	
nu-SSU-1536	ATTGCAATGCYCTATCCCCA	18S rDNA	
FR1	AICCATTC AATCGGTAIT	18S rDNA	Vainio & Hantula, 2000
FF390	CGATAACGAACGAGACCT	18S rDNA	
PN3	CCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATC	ITS	Viaud <i>et al.</i> , 2000
PN34	TTGCCGCTTCACTCGCCGTT	ITS	
Fun18S1	CCATGCATGTCTAAGTWTAA	18S rDNA	Lord <i>et al.</i> , 2002
Fun18S2	GCTGGCACCAGACTGCCCTCC	18S rDNA	

1.5.4.2. Reazione a catena della polimerasi (PCR):

La reazione a catena della Polimerasi (PCR) è in grado di produrre milioni di copie di una porzione di un dato gene di interesse, di un intero gene o di *cluster* genici con alta fedeltà in breve tempo. In ambito ambientale è sicuramente il metodo più impiegato per l'amplificazione del gene codificante l'RNA ribosomiale (rRNA) 16S ma viene anche applicato per l'analisi dei geni catabolici coinvolti nella biodegradazione dei contaminanti organici (Wilson *et al.*, 1999).

Nonostante la PCR sia alla base della maggior parte degli studi molecolari condotti al fine di comprendere sia la struttura che la funzione di comunità microbiche in

campioni ambientali, presenta delle limitazioni, derivate principalmente dall'estrazione diretta del DNA totale (metagenoma) dal campione stesso.

Il punto iniziale nell'analisi del DNA metagenomico è, appunto, l'efficienza di estrazione e la purezza con la quale esso viene estratto e quindi la possibilità di poterlo utilizzare nelle successive applicazioni.

I metodi utilizzati per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni prima dell'estrazione degli acidi nucleici rappresentano alcune delle fonti principali di errori che possono essere introdotti nell'estrazione del DNA e ripercuotersi nelle successive analisi. Di particolare interesse è ad esempio la temperatura alla quale il campione viene conservato e la sua esposizione all'ossigeno. In campioni conservati per tempi lunghi, entrambi questi fattori possono, infatti, alterare la composizione microbica ed è quindi necessario estrarre gli acidi nucleici subito dopo la raccolta del campione per non modificare la composizione delle comunità microbiche originariamente presenti (Wintzingerode *et al.*, 1997). Oltre alla raccolta e conservazione dei campioni, anche i metodi di estrazione diretta del DNA possono essere fonte di errore: infatti, un'insufficiente lisi cellulare può portare alla preferenziale estrazione del DNA da batteri Gram-negativi mentre trattamenti troppo aggressivi possono provocare un'eccessiva frammentazione del DNA estratto (Wintzingerode *et al.*, 1997).

L'efficienza di amplificazione può essere anche compromessa dal fatto che sostanze inibitrici, come acidi umici e fulvici, che vengono generalmente estratte con il DNA, possono interferire con la *Taq* polimerasi o altri enzimi di modificazione. Questo problema è stato comunque largamente superato negli anni con la messa a punto di diversi protocolli di estrazione e purificazione del DNA utilizzato poi come *template* per le successive reazioni di amplificazione (Tsai & Olson, 1992; Smalla *et al.*, 1993; Tebbe & Vahjen, 1993).

1.5.4.3. PCR Quantitativa (Real Time PCR):

La Real-Time PCR, detta anche PCR quantitativa è un metodo di amplificazione attraverso la reazione a catena della polimerasi, e quantificazione simultanea del DNA (Kubista *et al.*, 2006).

Ci si avvale sempre più della Real Time PCR per i suoi numerosi aspetti positivi, tra cui l'elevata riproducibilità e specificità, il basso limite minimo di rilevazione dei prodotti di amplificazione e la possibilità di misurare quantità di *template* variabili lungo un *range* di circa sei ordini di grandezza (Sharma *et al.*, 2007).

L'amplificazione del DNA avviene come in una normale reazione di PCR, costituita dalle tre classiche fasi: denaturazione, appaiamento (*annealing*) ed elongazione ma la caratteristica fondamentale che distingue la qRT-PCR risiede nel fatto che il DNA prodotto ad ogni ciclo di amplificazione viene quantificato in tempo reale grazie all'uso di reagenti fluorescenti che si legano ad esso senza crearne alcun danneggiamento.

Nella Real Time PCR l'intensità della fluorescenza emessa ad ogni ciclo è quindi proporzionale alla concentrazione del prodotto di PCR ottenendo come risultato finale delle curve sigmoidali, come quelle mostrate in figura 1.14, che rispecchiano perfettamente l'andamento della stessa reazione di amplificazione. Il primo ciclo al quale lo strumento riesce a rilevare un valore di fluorescenza significativamente più alto rispetto al rumore di fondo (*background*) è definito ciclo soglia (CT), e rappresenta l'inizio della fase esponenziale della reazione. Il valore del CT dipende dalla concentrazione iniziale del gene che si sta quantificando per cui più alta è la concentrazione iniziale del gene più basso sarà il relativo CT.

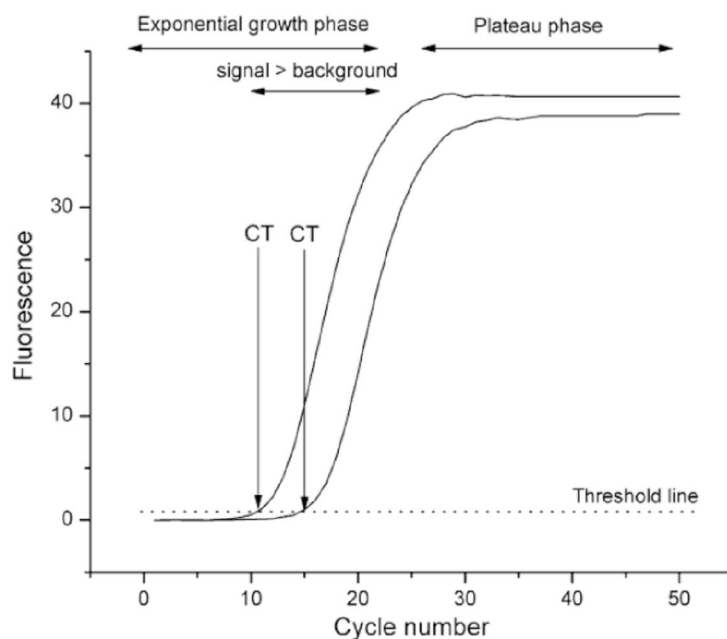


Figura 1.14. Esempio di curve classiche ottenute in qRT-PCR. La linea di *threshold* (ciclo soglia) è posizionata al di sopra del rumore di fondo e su di essa sono indicati i valori di CT di due ipotetici campioni.

Esistono due metodologie di quantificazione in Real Time PCR, ciascuna adatta ad una diversa applicazione: la quantificazione assoluta e la quantificazione relativa.

Nel primo caso, la quantità assoluta, incognita, del *template* da misurare viene dedotta per interpolazione con i valori di una curva “standard” ottenuta dai CT relativi all’amplificazione di un *template*, a concentrazione nota, diluito serialmente.

Nella quantificazione relativa invece, vengono paragonati i valori di CT ottenuti nell’amplificazione del gene di interesse, con quelli ottenuti dall’amplificazione di un gene di riferimento detto “*housekeeping gene*”. Il confronto può essere fatto, ad esempio, anche tra i CT relativi ad un dato gene in un campione sottoposto ad un trattamento e quelli dello stesso gene in un campione non trattato.

I reagenti fluorescenti usati per la Real Time PCR possono essere distinti in tre classi:

- reagenti che legano il DNA a doppio filamento (dsDNA);
- sonde sequenza-specifiche (TaqMan);
- *primers* sequenza-specifici (Molecular Beacon).

Tra i composti fluorescenti che legano il dsDNA uno dei più usati è il SYBR GreenI (Morrison *et al.*, 1998) per i numerosi vantaggi derivanti, appunto, dal suo impiego. Quando si utilizza questo tipo di colorante infatti non è richiesto lo sviluppo di sonde, e quindi la conoscenza di porzioni interne del gene da amplificare; inoltre, è possibile utilizzarlo insieme a *primers* di diverso tipo, ed il costo, rispetto ad altri metodi di marcatura dei prodotti di PCR in *real-time*, è sicuramente più basso.

Vi è comunque un notevole svantaggio nel suo utilizzo che consiste nella sua incapacità di discriminare molecole di dsDNA di diversa sequenza e quindi si lega, in maniera del tutto aspecifica, ad ogni dsDNA che si genera durante la reazione. Questo crea spesso problemi nella reale quantificazione dei prodotti di PCR desiderati; si rende necessaria, quindi, un’attenta ottimizzazione delle condizioni della reazione, tra cui: la scelta della coppia di *primers* più affine al *template* da amplificare, la loro giusta temperatura di *annealing*, la loro adeguata concentrazione, l’utilizzo di *template* sufficientemente puri ecc. Ciò al fine di evitare la formazione di prodotti aspecifici e dimeri di *primers* che vanno a interferire con la quantificazione stessa.

La PCR quantitativa sta diventando un importante strumento per quantificare geni funzionali in campioni ambientali. Sono note più di 14000 sequenze di DNA corrispondenti a più di 100 geni funzionali (Zhang & Fang, 2005), fra i quali quelli coinvolti nei processi di nitrificazione/denitrificazione (Purkhold *et al.*, 2000; Lopez-Gutierrez *et al.*, 2004; Okano *et al.*, 2004) degradazione dei polimeri (Wu *et al.*, 2001), degli idrocarburi policiclici aromatici (Baldwin *et al.*, 2003; 2007; Park & Crowley 2006; Nyyssönen *et al.*, 2006; Powell *et al.*, 2006; Dominguez *et al.*, 2007).

Oltre all'applicazione nella quantificazione dei geni funzionali, principalmente in termini di numero di copie degli stessi, data la difficoltà nell'estrazione dell'RNA direttamente da campioni ambientali come il suolo, la PCR quantitativa è stata anche largamente impiegata nella quantificazione del numero di batteri utilizzando come gene marcatore quello del 16S rRNA, sia nel caso di ceppi batterici puri che di comunità, avvalendosi dell'amplificazione diretta del DNA metagenomico. In studi di questo tipo, la Real Time PCR è stata applicata sia nella quantificazione dei batteri totali, facendo uso di *primers* "universali" (Stubner *et al.*, 2000; Nadkarni *et al.*, 2002; Park & Crowley, 2006; Smith *et al.*, 2006) che di batteri appartenenti a specifici gruppi tassonomici attraverso l'utilizzo di *primers* gruppo-specifici (Takai *et al.*, 2000; Layton *et al.*, 2006; Singleton *et al.*, 2006).

La quantificazione assoluta del numero di copie del gene dell'RNA 16S, non è comunque diretta: ogni organismo ne possiede, infatti, copie multiple (1-15 copie) e, soprattutto nel caso di amplificazioni del DNA metagenomico, non si è in grado di sapere, con certezza, il numero di copie corrispondenti ad ogni specie. Per questo, molto spesso ci si basa su un numero medio di copie, generalmente sette, come fattore di divisione del numero totale di copie del gene stesso, che viene stimato per Real Time PCR. Per ovviare a tale problema, può essere utilizzato come marcatore genico nella quantificazione del numero di batteri in un campione ambientale, in alternativa al 16S rDNA, il gene codificante la subunità β della RNA-polimerasi, anch'esso presente in tutti gli organismi, ma in singola copia (Powell *et al.*, 2006).

1.5.4.4. Elettroforesi su gel a gradiente denaturante (DGGE: Denaturing, TGGE: Temperature Gradient Gel Electrophoresis):

L'elettroforesi su gel a gradiente denaturante è una delle tecniche comunemente utilizzate in microbiologia molecolare per la caratterizzazione della struttura e lo studio della dinamica di popolazioni microbiche in campioni ambientali. La DGGE, in particolare, è stata largamente utilizzata in diversi studi di caratterizzazione della struttura di comunità batteriche sia in campioni di suolo che di acque (Muyzer *et al.*, 1993; Heure & Smalla, 1997; Muyzer & Smalla, 1998; Macnaughton *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2000; Nakatsu *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2000; Kleikemper *et al.*, 2002; El-Latif Hesham *et al.*, 2006).

Nelle analisi condotte mediante DGGE o TGGE si ottiene la separazione di piccoli frammenti di DNA (200-700 bp), amplificati tramite PCR, della stessa lunghezza ma di

differente sequenza. La separazione avviene su gel di poliacrilammide e si basa sulla diminuzione della mobilità elettroforetica dei prodotti di PCR a doppio filamento che vengono parzialmente denaturati dal gradiente chimico (una miscela di urea e formamide), nel caso della DGGE, o termico, nel caso della TGGE.

Inizialmente gli *amplicons* vengono separati in base al loro peso molecolare, determinato principalmente dal loro contenuto in Guanina e Citosina, ma procedendo lungo il gel essi sono soggetti a condizioni denaturanti sempre più forti che provocano la progressiva separazione dei due filamenti di DNA ritardando in tal modo sempre più il loro procedere lungo il gel. L'arresto dei frammenti in un particolare punto del gel si avrà quando essi raggiungono condizioni denaturanti tali da separare quasi completamente i due filamenti. Il punto di arresto di ogni frammento dipende quindi dalla sua composizione nucleotidica per cui, il numero di bande prodotte durante questo tipo di corse elettroforetiche sarà proporzionale al numero di specie dominanti nel campione. I frammenti, comunque, non vengono mai completamente denaturati grazie al fatto che una sequenza ricca in Guanina e Citosina, legata covalentemente al *primer forward*, detta *GC-clamp*, viene aggiunta ai frammenti stessi durante la loro amplificazione.

I vantaggi connessi all'utilizzo di queste tecniche possono essere riassunti in tre punti principali:

1. la possibilità di monitorare cambiamenti sia strutturali che funzionali, dovuti a qualsiasi tipo di perturbazione, nelle comunità batteriche analizzate;
2. la possibilità di ottenere in modo rapido un profilo delle popolazioni principalmente rappresentative delle comunità stesse;
3. la possibilità di identificare popolazioni microbiche attraverso l'escissione ed il sequenziamento delle bande. Questo è particolarmente utile, ad esempio, nel caso di campioni ambientali particolari o derivati da siti contaminati, dove la maggior parte delle specie microbiche presenti sono scarsamente conosciute (Forney et al., 2004).

Oltre ai vantaggi, anche diverse limitazioni sono legate all'impiego di tali procedure come ad esempio la scelta della coppia dei *primers* utilizzati per l'amplificazione del gene per l'rRNA 16S e l'ottimizzazione del gradiente. Il profilo ottenuto, infatti, dipende strettamente dalla coppia di *primers* utilizzati.

Heure e collaboratori (2001) hanno utilizzato ad esempio 14 diverse regioni ipervariabili del gene dell'rRNA 16S per generare profili DGGE dimostrando che la regione V6 è quella che fornisce una migliore risoluzione dei profili da campioni di

suolo. Nel caso, invece, si voglia distinguere diversi gruppi filogenetici, devono essere impiegate coppie di *primers* disegnate sulla base di ulteriori regioni ipervariabili (Gomes *et al.*, 2001).

Oltre alla scelta della più adeguata coppia di *primers*, queste metodiche mostrano una notevole difficoltà nel poter fare comparazioni tra gel diversi, soprattutto nel caso di profili complessi ed inoltre, le informazioni derivate dal sequenziamento delle bande escisse sono limitate a frammenti di 500-700bp del gene analizzato che possono portare alla mancanza della specificità richiesta per l'identificazione filogenetica di molti organismi.

Come tutte le tecniche legate all'amplificazione dei geni ribosomiali, anche in questi casi, una singola banda non corrisponde necessariamente ad una singola specie batterica e ciò è dovuto a due motivi principali: bande derivate da specie diverse possono avere la stessa mobilità elettroforetica oppure, una singola specie può essere rappresentata da bande multiple, dato che praticamente tutti gli organismi possiedono più operoni per i geni ribosomiali (Nubel *et al.*, 1997);

Infine, l'intensità delle bande può non riflettere la reale abbondanza delle varie popolazioni all'interno della comunità; questi metodi sono difficilmente applicabili allo studio di comunità estremamente complesse che producono profili con centinaia di bande, e diventano quindi praticamente impossibili da distinguere. Il limite di risoluzione è circa l'1%, quindi, solo DNA derivati da organismi che rappresentano più dell'1% nella comunità studiata possono essere visualizzati (Muyzer *et al.*, 1993; Murray *et al.*, 1998)

1.5.4.5. *Single strand conformation polymorphism (SSCP):*

Questa tecnica fu descritta per la prima volta da Orita e collaboratori (1989) che l'applicarono nell'individuazione di polimorfismi e mutazioni in geni umani e solo successivamente è stata adattata ed applicata allo studio della biodiversità di comunità ambientali (Lee *et al.*, 1996). La SSCP è stata ad esempio utilizzata nello *screening* di batteri isolati da campioni di suolo così come nello studio di profili molecolari ottenuti da comunità batteriche associate ai rizobi di diverse piante (Schwieger & Tebbe, 1998; Schmalenberger & Tebbe, 2002).

Anche attraverso l'utilizzo della SSCP si ottiene la separazione di molecole di DNA della stessa lunghezza ma di differente sequenza nucleotidica. A differenza della DGGE/TGGE, in questo caso, però, si ha la separazione, su un gel di poliacrilammide in

condizioni non denaturanti, di filamenti singoli di DNA (*Single strand* DNA, ssDNA) ottenuti per denaturazione termica o chimica di molecole a dsDNA. A basse temperature, molecole di ssDNA possono adottare conformazioni tridimensionali, determinate da interazioni intramolecolari e che ne influenzano quindi la loro mobilità elettroforetica.

Rispetto alla DGGE/TGGE questa tecnica ha il principale vantaggio di non richiedere per l'amplificazione del gene di interesse *primers* con il *GC-clamp* e di poter essere facilmente automatizzabile utilizzando per la separazione gel capillari e per l'identificazione dei prodotti, *primers* fluorescenti che legando il fluorocromo ai prodotti stessi ne permettono la rilevazione attraverso un laser. Come nel caso della DGGE/TGGE, le bande di interesse possono essere escisse dal gel e sequenziate, ma in questo caso, dato che si lavora con filamenti singoli di DNA, è necessario prima ri-amplificarli tramite PCR e quindi clonarli in un vettore opportuno per poi passare al loro sequenziamento.

Diverse limitazioni sono associate all'utilizzo di questa metodica quali ad esempio:

- l'alta velocità di ri-appaiamento dei ssDNA durante la corsa elettroforetica. Le bande derivate da questo fenomeno vanno ad addizionarsi a quelle derivate dai singoli filamenti portando ad una sovrastima della reale biodiversità del campione analizzato. Questo problema può comunque essere superato utilizzando, in PCR un *primer* fosforilato in posizione 5' con produzione, quindi, di *amplicons* nei quali uno dei due filamenti, avrà legato un gruppo fosfato. Sottoponendo poi i prodotti di PCR ad una digestione con Exonucleasi λ , il filamento fosforilato sarà degradato ottenendo così solo molecole di ssDNA da caricare su gel;
- come nel caso della DGGE/TGGE, una singola banda non corrisponde necessariamente ad una sola specie batterica così come più bande possono derivare dalla stessa specie;
- dato che non esistono banche dati per il confronto delle sequenze ottenute direttamente dall'escissione delle bande da gel di questo tipo; è necessario applicare questo metodo in concomitanza con altre tecniche molecolari per ottenere informazioni filogenetiche sulla comunità esaminata (Peters *et al.*, 2000; Schmalenberger & Tebbe, 2003);
- quanto più aumenta la lunghezza, tanto più diventa difficile evidenziare le differenze di mobilità elettroforetica dei frammenti. L'efficienza di risoluzione passa infatti, dall'80% per frammenti minori di 200bp al 60% per frammenti di 300-400bp (Lee *et al.*, 1996)

1.5.4.6. Polimorfismo dei frammenti di restrizione (ARDRA; RFLP/T-RFLP):

L'ARDRA (*Amplified ribosomal DNA restriction analysis*) è una semplice procedura in cui un'analisi di restrizione viene condotta su prodotti di PCR dei geni codificanti gli rRNA. Si tratta quindi di una variante della RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) o della T-RFLP (*terminal restriction fragment length polymorphism*) che possono essere invece applicate anche allo studio di altri tipi di geni.

Tutte queste metodiche si basano comunque sulla digestione dei prodotti di PCR seguita dalla separazione elettroforetica dei frammenti ottenuti, su un gel ad alta concentrazione di agarosio, su un gel di poliacrilammide oppure, nel caso si utilizzino *primers* marcati con fluorocromi, attraverso l'utilizzo di gel capillari collegati a rilevatori laser. In tal caso i dati vengono convertiti in un elettroferogramma nel quale ogni picco rappresenterà un frammento, e quindi una singola specie, e l'area sottostante ogni picco indicherà, invece, l'abbondanza relativa di ogni specie nell'intera comunità analizzata.

L'utilizzo di *primers* marcati, pur limitando le analisi ai soli frammenti terminali derivati dalla digestione, semplifica notevolmente l'esame dei profili ottenuti da comunità microbiche particolarmente complesse (Marsh, 1999; Tiedje *et al.*, 1999).

Generalmente è necessario eseguire le digestioni utilizzando più enzimi di restrizione contemporaneamente al fine di ottenere la migliore risoluzione del profilo genotipico della popolazione che si intende analizzare. Infatti, enzimi differenti possono produrre profili diversi e l'incompleta digestione può portare ad una sovrastima della biodiversità (Dunbar *et al.*, 2000; Osborne *et al.*, 2000).

Come nel caso di altre tecniche basate sull'amplificazione dei geni ribosomiali, anche in questo caso singole specie possono generare profili di restrizione diversi data la presenza di copie multiple degli operoni per gli rRNA.

Infine, una sovrastima della reale biodiversità del campione analizzato può derivare anche dalla formazione di "pseudo-T-RFs" derivanti da prodotti di PCR a singolo filamento generati durante la reazione di amplificazione e che si pensa formino delle strutture transienti a doppio filamento che possono essere accessibili agli enzimi di restrizione (Egert *et al.*, 2005).

Oltre alla scelta del numero e del tipo di enzimi di restrizione utilizzati (Engebretson & Moyer, 2003), un'importanza notevole è rivestita anche dalla scelta della giusta coppia di *primers* al fine di ottenere un'accurata valutazione della diversità microbica. E' stato infatti dimostrato che l'utilizzo di diverse coppie di *primers* per l'amplificazione

di DNA genomici estratti dagli stessi campioni, genera profili di restrizioni differenti (Lueders & Friedrich, 2003).

Nonostante il limite di risoluzione di questa tecnica sia maggiore rispetto a quello di altre metodiche (0,5%), Engebretson e Moyer (2003) hanno dimostrato che la T-RFLP risulta particolarmente efficace nella stima della biodiversità di comunità microbiche caratterizzate da una bassa o media *richness* mentre non è adatta per lo studio di comunità molto complesse.

Nonostante queste limitazioni, la T-RFLP è diventata, ormai, un metodo valido per comparare rapidamente comunità batteriche ambientali data anche la possibilità di confronto simultaneo di molti campioni e l'ottenimento di risultati in modo piuttosto veloce e senza la necessità di informazioni dirette derivate dal sequenziamento.

Dumbar e collaboratori (2000) hanno, ad esempio, applicato questa tecnica nel confronto dei profili ottenuti da quattro diversi suoli dimostrando inoltre la consistenza dell'analisi con i risultati ottenuti dal sequenziamento di librerie di clonaggio.

Questa tecnica è stata applicata, inoltre, nella caratterizzazione di popolazioni batteriche derivate da un suolo inquinato da PCB (Fedi *et al.*, 2005) e di comunità in grado di dealogenare il tricloroetene (TCE) trasformandolo in etene (Richardson *et al.*, 2002).

1.5.4.7. Analisi dello spaziatore intergenico (RISA/ARISA):

L'analisi dello spaziatore intergenico (*Ribosomal RNA intergenic spacer analysis*, RISA) è stata sviluppata da Bornerman e Triplett (1997) che la applicarono per la prima volta allo studio della diversità microbica in un suolo derivato dall'Amazzonia.

Questo tipo di analisi implica l'amplificazione della regione dell'operone dell'rRNA compresa tra i geni ribosomiali 16S e 23S detta regione spaziatrice (*Internal spacer region*, ITS). I *primers* utilizzati in questo caso sono stati quindi disegnati in corrispondenza delle regioni conservate su questi due geni. Sono disponibili sia *primers* "universali" (Fisher & Triplett, 1999; Cardinale *et al.*, 2004), impiegati ad esempio nel caso si vogliano confrontare popolazioni derivate da diverse campioni, oppure *primers* specifici che permettono, invece, di amplificare la regione ITS di specifici gruppi filogenetici e quindi di focalizzare l'analisi solo su particolari popolazioni batteriche all'interno di una comunità (Ranjard *et al.*, 2000; Salles *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2003).

La regione ITS è estremamente variabile per quanto riguarda sia la lunghezza (da 50bp a 1,5Kb) che la sequenza olinucleotidica ed entrambi questi tipi di variazioni la rendono utile nella tipizzazione di ceppi batterici o specie batteriche strettamente correlate nel caso in cui altre tecniche non forniscano un'adeguata risoluzione del *fingerprint* molecolare (Fisher & Triplett, 1999).

A questo scopo, la RISA è stata ad esempio utilizzata per distinguere differenti ceppi o specie strettamente correlate di *Staphylococcus* (Mendoza *et al.*, 1998; Bes *et al.*, 2002), *Bacillus* (Bourque *et al.*, 1995; Daffonchio *et al.*, 2003), *Vibrio* (Chun *et al.*, 2002; Ghatak *et al.*, 2005) ed altri microrganismi importanti in microbiologia clinica.

In ambito ambientale, questa metodica è stata impiegata ad esempio per individuare popolazioni microbiche coinvolte nella degradazione di idrocarburi policiclici aromatici direttamente da campioni di suolo (Eriksson *et al.*, 2003) e batteri nitrato-riduttori in colture di arricchimento (Fisher & Triplett, 1999).

La caratterizzazione di specie fungine con questa metodica risulta invece più problematica dato che i *primers* utilizzati in questo caso per l'amplificazione PCR, possono co-amplificare anche DNA derivati da altri organismi eucariotici come piante, alghe e nematodi (Kowalchuk *et al.*, 1997).

La versione automatizzata di questo tipo di analisi, detta appunto *Automated Ribosomal RNA intergenic spacer analysis* (ARISA), è stata sviluppata utilizzando, per l'amplificazione della regione ITS, *primers* marcati con fluorocromi (Fisher & Triplett, 1999). I frammenti generati vengono quindi separati, in base alla loro dimensione, attraverso un sistema elettroforetico automatizzato su capillare, collegato ad un rilevatore laser.

Come nel caso delle tecniche precedentemente descritte, anche in questo, l'utilizzo di questa metodica presenta sia vantaggi che svantaggi. Sicuramente, si tratta di una tecnica semplice (non richiede ad esempio l'utilizzo di gel denaturanti), rapida (non sono necessari tempi lunghi per le corse elettroforetiche e non prevede digestioni enzimatiche) ed altamente riproducibile.

D'altro canto però, ci sono problemi legati all'impiego di questa analisi. Ad esempio è stato dimostrato che spesso si ha la preferenziale amplificazione dei frammenti di DNA di dimensioni minori: le regioni ITS più lunghe vengono amplificate con minore efficienza portando ad una sottostima della reale biodiversità del campione analizzato (Fisher & Triplett, 1999).

Inoltre, anche in questo caso, come in altre tecniche che prevedono lo studio dei geni ribosomiali, la presenza di operoni multipli, nei diversi organismi, causa problemi

di sovrastima della biodiversità dato che ogni organismo può contribuire con più bande (RISA) o picchi (ARISA) a seconda della variante di analisi utilizzata. Jensen e collaboratori (1993) hanno infatti riportato che circa l'85% delle specie da loro esaminate produceva, in ARISA, due o tre picchi.

Infine, anche se questi due tipi di analisi, forniscono un metodo semplice e rapido per ottenere profili di comunità microbiche derivate da siti contaminati il loro uso è molto più limitato, rispetto ad altre metodologie, principalmente per il fatto che non sono disponibili a tutt'oggi anche dati di sequenze di ITS sufficientemente aggiornate per permettere il riconoscimento di specie poco conosciute o non coltivabili.

1.5.4.8. *Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD):*

La RARD è un'ulteriore metodica basata su una variante della PCR che non richiede però la conoscenza della sequenza di nessun gene particolare dato che nella reazione viene utilizzato un singolo oligonucleotide come innesco. In particolare, i *primers* utilizzati sono generalmente formati da poche paia di basi, circa 10, e possono legarsi in più posizioni lungo una singola molecola di DNA come ad esempio, il genoma derivato da una singola specie (Williams *et al.*, 1990).

Dato che il *primers random* impiegato, andrà a legarsi a differenti DNA genomici, in diverse posizioni, ogni genoma può produrre un set di ampliconi, ottenendone da ogni diverso DNA da 5 a 15 diversi (Franklin *et al.*, 1999) e generando così, dei profili derivati dalla loro separazione su gel di agarosio o di poliacrilammide.

Per questo motivo, la RAPD viene generalmente applicata nella differenziazione di specie strettamente correlate (Yost & Nattress, 2000), nella caratterizzazione di isolati (Morea *et al.*, 1998; Tripathi *et al.*, 2002) oppure di comunità batteriche poco complesse (Franklin *et al.*, 1999). Non è invece applicabile a casi in cui le comunità siano strutturalmente troppo vaste dato che i profili prodotti saranno eccessivamente densi di bande e quindi di difficile lettura ed interpretazione.

In particolare, questa tecnica risulta adatta nel confronto di diverse comunità o nel monitoraggio di cambiamenti temporali di una stessa popolazione dato che ogni *primer random* utilizzato genera un profilo caratteristico.

Per effettuare dei confronti statisticamente significativi, è necessario comunque amplificare gli stessi DNA genomici utilizzando più *primers random* in reazioni multiple di PCR implicandone anche l'utilizzo di più di 15 contemporaneamente (Xia *et al.*, 1995).

Nonostante la rapidità, la semplicità ed il basso costo di questa tecnica, nel caso sia applicata allo studio di comunità batteriche non fornisce informazioni riguardo la loro composizione dato che non implica l'amplificazione di geni marcatori particolari ma quella dell'intero genoma.

1.5.4.9. Sequenziamento casuale di cloni derivati da librerie di clonaggio:

Si tratta sicuramente della tecnica più efficace nell'identificazione delle specie microbiche derivate da campioni ambientali permettendo anche di determinare il grado di similarità con specie note attraverso l'uso di banche dati (come ad esempio RDP: *Ribosomal Database Project*; BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*) sempre più aggiornate.

Il primo passo di questo approccio prevede il clonaggio di prodotti di PCR e quindi il sequenziamento *random* all'interno della libreria di clonaggio ottenuta.

Nel caso si utilizzi il gene per gli rRNA, l'analisi delle sequenze rende possibile l'identificazione delle copie dominanti presenti nel prodotto di PCR.

Le informazioni ottenute su queste sequenze possono essere utilizzate sia per comparare l'abbondanza (*richness*) o la diversità delle specie batteriche tra più campioni, che come base per lo sviluppo di specifiche sequenze oligonucleotidiche (in particolare sonde) utilizzabili per altri approcci molecolari. L'allineamento di sequenze ottenute in questo modo ha ad esempio fornito informazioni necessarie per lo sviluppo di sonde utilizzate nell'ibridazione *in-situ* (FISH) o di *primers* utilizzati in analisi DGGE.

L'approccio del clonaggio-sequenziamento del 16S rDNA è stato per la prima volta utilizzato da Giovannoni e collaboratori (1990) allo scopo di stimare la diversità delle specie di batteri planctonici derivati dal mar dei Sargassi e successivamente impiegato in numerosi studi dello stesso tipo applicati agli ambienti più svariati quali suoli, acque dolci, cibi, campioni di tessuti umani ecc. (Giovannoni *et al.*, 1990; Fuhrman *et al.*, 1993; Mullins *et al.*, 1995; Rondon *et al.*, 2000; Wilkinson *et al.*, 2002; Dorigo *et al.*, 2002; Roest *et al.*, 2004).

In acqua dolce, ad esempio, questo approccio è stato utilizzato per studiare la biodiversità in vari laghi dimostrando la predominanza di alcuni gruppi batterici come: *Proteobacteria* (particolarmente β -*Proteobacteria*), *Bacteroides* e *Actinobacteria* (Hiorns *et al.*, 1997; Gloëckner *et al.*, 2000; Eiler & Bertilsson, 2004).

A parte gli errori che possono verificarsi durante la reazione di PCR ed i problemi legati allo *step* di clonaggio, la difficoltà principale di questo metodo è come ottenere una corretta descrizione della reale diversità dei campioni analizzati.

Diversi autori hanno proposto metodi sia parametrici sia non-parametrici per stimare nel migliore modo possibile la *richness* dei campioni esaminati e valutare la diversità in differenti campioni ambientali (Colwell & Coddington, 1994; Singleton *et al.*, 2001; Hughes *et al.*, 2001; Bohannan and Hughes, 2003; Colwell *et al.*, 2004). Curve di rarefazione o altri parametri possono essere utilizzati al fine di valutare il numero totale di sequenze da analizzare per avere una stima corretta della diversità.

Il sequenziamento *random* risulta comunque un approccio piuttosto laborioso ed economicamente poco conveniente. Al fine di evitare la ridondanza delle sequenze ottenute, le librerie di clonaggio possono essere preventivamente sottoposte a *screening* così da identificare i cloni realmente diversi da sottoporre al sequenziamento. Lo *screening* può essere effettuato sia con l'ausilio delle tecniche molecolari precedentemente descritte, come ad esempio l'ARDRA (Sandaa *et al.*, 2001), che attraverso l'ibridizzazione dei cloni con sonde specifiche (Manz *et al.*, 1992; Amann *et al.*, 1995).

Dopo il sequenziamento, le sequenze vengono generalmente comparate con quelle depositate nelle diverse banche dati a tutt'oggi disponibili. Nel caso di cloni ottenuti da campioni ambientali la banca dati che contiene il maggior numero di sequenze di rRNA 16S derivate da questi organismi è sicuramente RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) che fornisce inoltre un'eccellente gamma di strumenti analitici che includono anche quelli che rendono fattibili analisi filogenetiche tra le sequenze inserite e quelle già depositate nella stessa banca dati.

Allo stesso modo anche BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) rappresenta un'ulteriore mezzo per la comparazione delle sequenze depositate *on-line* in diverse banche dati come: EMBL (*European molecular biology laboratory*), NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*).

1.5.5. Tecniche molecolari indipendenti dall'amplificazione PCR:

A differenza delle procedure sinora descritte, le tecniche facenti parte di questo raggruppamento, utilizzano frazioni teoricamente rappresentative degli acidi nucleici nelle comunità microbiche e sono rappresentate da: analisi della cinetica di riassociazione del DNA, analisi del contenuto percentuale di Guanina e Citosina, ibridizzazione DNA-DNA ed ibridazione *in-situ* con sonde fluorescenti (FISH).

1.5.5.1. Cinetica di riassociazione del DNA:

Questo tipo di studio si basa sulle proprietà biochimiche delle molecole di DNA per misurare la complessità e la diversità delle stesse in un campione.

Nell'analisi delle comunità batteriche ad esempio, questo metodo si basa sul principio che la complessità di un campione di DNA è proporzionale al numero totale dei differenti genomi presenti.

In particolare, in questo metodo, il DNA metagenomico viene prima digerito per ottenere frammenti di circa 1 Kb (Ritz *et al.*, 1997), viene poi completamente denaturato e quindi si procede con la sua riassociazione ad una temperatura fissa che generalmente è di 25°C (Chatzinotas *et al.*, 1998).

La cinetica di riassociazione del DNA viene quindi seguita attraverso lettura spettrofotometrica; dato che il DNA a doppio filamento assorbe più radiazioni ultraviolette rispetto a quello a singolo filamento si avrà un aumento continuo dell'assorbanza fino a quando tutte le molecole di DNA presenti nel campione non hanno subito la rinaturazione. In specifiche condizioni, il tempo necessario affinché la metà del DNA presente nel campione rinaturi, $C_{0t_{1/2}}$, può essere utilizzato come indice di diversità dato che è considerato proporzionale alla complessità del DNA in un campione (Torsvik *et al.*, 1998). Ad esempio, nel caso si voglia stimare il numero di genomi presenti in un dato campione, il suo $C_{0t_{1/2}}$ può essere comparato con quello di una specie batterica di riferimento, generalmente *E. coli*, di cui si conosce la grandezza del genoma e che si assume essere quella media. Molto spesso comunque, in estratti di DNA metagenomico sono presenti sia genomi molto più grandi che molto più piccoli rispetto a quello di riferimento quindi, il confronto con quest'ultimo, può alterare la relazione esistente tra la complessità che viene in tal modo valutata ed il reale numero di genomi presenti nel campione.

Quando vengono invece comparate due diverse comunità, il DNA di una di esse viene marcato radioattivamente ed utilizzato come *template*. Attraverso l'ibridizzazione incrociata dei due campioni di DNA è possibile quindi monitorare il loro grado di similarità, infatti, tanto più sono simili, tanto più veloce sarà la cinetica di riassociazione e viceversa.

La maggiore limitazione legata all'utilizzo di questa metodica risiede nel fatto che il DNA estratto direttamente da campioni complessi, come possono essere quelli ambientali, necessita di una raffinata purificazione prima di poter essere analizzato in questo modo. Impurità come acidi umici, fulvici o ioni metallici, presenti nel suolo, possono infatti interferire con la riassociazione del DNA portando generalmente ad un aumento del $C_{0t_{1/2}}$ e quindi ad una sovrastima della reale diversità genetica.

Questa tecnica è stata comunque applicata con successo nella valutazione della biodiversità in comunità derivate da campioni acquatici (Torsvik et al., 1998) ed un recente lavoro pubblicato da Øvreås e collaboratori (2003) ha presentato inoltre risultati congruenti usando la T-RFLP e la riassociazione del DNA nella stima della *richness* in campioni derivati da ambienti ipersalini (Øvreås et al., 2003).

1.5.5.2. Analisi del contenuto percentuale di Guanina (G) e Citosina (C):

Anche le differenze nel contenuto di Guanina e Citosina in diversi campioni di DNA possono essere sfruttate per studiare la diversità batterica delle comunità. Questa tecnica si basa proprio sul fatto che, microorganismi diversi differiscono nel contenuto di G+C mentre gruppi tassonomicamente correlati mostrano differenze in tale contenuto che possono variare dal 3 al 5%.

In questo tipo di analisi il DNA metagenomico viene esposto al bis-benzimidazolo, un colorante non intercalante che lega preferenzialmente regioni di DNA ricche in Adenina (A) e Timina (T). Questo legame altera la densità del DNA proporzionalmente alla quantità di colorante legato così da rendere possibile, attraverso centrifugazione dei campioni in gradiente di Cloruro di Cesio, una separazione fisica della porzione di DNA ricca in A+T da quella ricca in G+C.

Il bis-benzimidazolo emette fluorescenza se irradiato con raggi ultravioletti quindi, analizzando tutti i vari strati in cui si deposita il DNA lungo il gradiente, è possibile ricavare i parametri relativi alla composizione in basi di ogni campione analizzato (Holben & Harris, 1995; Gsell et al., 1997; Nusslein & Tiedje, 1998).

Notevoli sono i vantaggi legati all'utilizzo di questa metodica come ad esempio, il fatto che non è influenzata da errori che possono verificarsi durante la reazione di PCR, che tutti i DNA estratti vengono inclusi nell'analisi e che permette una valutazione quantitativa evidenziando anche membri poco frequenti in una intera comunità.

Infine, dato che questo metodo prevede la separazione fisica di DNA con proprietà differenti, queste frazioni possono essere recuperate dal gradiente e quindi analizzate separatamente ad esempio attraverso il loro clonaggio e caratterizzazione oppure la loro ibridizzazione con sonde specifiche (Holben *et al.*, 1993).

1.5.5.3. Ibridizzazione DNA-DNA (*Community DNA hybridization*):

In questo caso il DNA metagenomico estratto da un campione viene fatto ibridizzare con quello derivato da un altro per valutare il livello di similarità tra i campioni stessi. A tale scopo, i due DNA metagenomici vengono dapprima digeriti ed i frammenti relativi ad uno dei due campioni, vengono marcati per produrre un set di sonde; mentre quelli derivati dall'altro vengono caricati su un gel e quindi trasferiti su di una membrana per produrre il set dei *target*.

Il set di sonde viene quindi ibridizzato con il set dei *target* per valutarne così la similarità (Lee & Fuhrman, 1990; Griffiths *et al.*, 1996, 1997). Il vantaggio principale di questa tecnica risiede nel fatto che DNA dissimili raramente ibridizzano e quindi il segnale di ibridizzazione osservato riflette la reale similarità tra le specie batteriche dei due campioni confrontati.

Allo stesso tempo però vi è lo svantaggio che non è possibile confrontare più di due campioni contemporaneamente e quindi analisi di questo tipo applicate a numerosi campioni risultano molto lunghe e sfavorevoli dal punto di vista economico.

Inoltre, il saggio stesso non fornisce informazioni filogenetiche dirette sulla composizione delle comunità batteriche esaminate; è necessario, quindi, utilizzarlo in concomitanza con altri studi molecolari nel caso vi sia interesse nell'effettuare anche delle valutazioni tassonomiche.

1.5.5.4. Ibridazione degli acidi nucleici (*Slot/dot-blot hybridization*) ed ibridazione *in-situ* con sonde fluorescenti (*Fluorescence in-situ hybridization: FISH*):

L'ibridazione degli acidi nucleici con sonde specifiche, marcate con fluorocromi, è uno dei metodi più importanti ed utilizzati in ecologia microbica per effettuare analisi sia quantitative che qualitative (Guo *et al.*, 1997; Griffiths *et al.*, 1999; Clegg *et al.*, 2000). Queste tecniche di ibridazione possono essere applicate sia su estratti di DNA o RNA (*Slot/dot-blot hybridization*) che direttamente su campioni di cellule (FISH) trattate adeguatamente prima dell'analisi al fine di rendere gli acidi nucleici delle stesse accessibili alle sonde. I marcatori fluorescenti maggiormente utilizzati sono generalmente derivati della fluorescina o della rodamina.

La metodica denominata *dot-blot hybridization* è stata largamente utilizzata, ad esempio, per misurare l'abbondanza relativa di determinati gruppi di microrganismi eseguendo l'ibridazione su estratti di acidi nucleici. A tale scopo, i campioni vengono lisati per favorire il rilascio degli acidi nucleici e quindi gli rRNA di interesse vengono quantificati, attraverso la misurazione del segnale fluorescente emesso da sonde gruppo-specifiche, rispetto all'rRNA totale ottenuto attraverso l'amplificazione con *primers* "universali" (Theron & Cloete, 2000).

L'ibridazione può essere condotta anche direttamente sulle cellule (FISH) nel caso in cui si vogliano ottenere, ad esempio, informazioni relative alla distribuzione dei diversi microrganismi in un campione ambientale.

I campioni, in questo caso, vengono sottoposti a dei trattamenti al fine di aumentare la permeabilità delle cellule che mantengono comunque la loro struttura ed integrità, vengono poi fissati su vetrini da microscopio e quindi fatti ibridizzare con le sonde, dirette contro specifici *target*, generalmente rappresentati dai geni per gli rRNA.

Le sonde vengono normalmente utilizzate in eccesso che viene poi rimosso, attraverso dei lavaggi dei vetrini, prima della loro lettura attraverso microscopio a fluorescenza (Head *et al.*, 1998).

La FISH è stata utilizzata ad esempio, nello studio della distribuzione spaziale dei batteri in *biofilms* (Schramm *et al.*, 1996) e spesso risulta utile nella conta di batteri non coltivabili che possono essere anche distinti, attraverso questa tecnica, a livello tassonomico nei diversi gruppi filogenetici a cui appartengono, nel caso si utilizzino sonde dirette contro porzioni del gene per l'rRNA gruppo-specifiche.

Diversi studi riportano inoltre l'applicazione di questa tecnica nello studio di comunità batteriche sia in campioni pristini che contaminati, di fanghi attivi, ambienti

marini o di acqua dolce, suoli e falde acquifere (Wagner *et al.*, 1993; Snaidr *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1999; Cottrell & Kirchman, 2000).

Nonostante i numerosi vantaggi della FISH, l'applicazione di questa tecnica nello studio diretto di campioni naturali, può portare all'ottenimento sia di risultati falsi positivi che falsi negativi dato che fattori metodologici e ambientali possono influenzarne. Tra questi ricordiamo ad esempio: la scelta delle sonde e dei relativi fluorocromi, la stringenza delle condizioni di ibridazione, la temperatura di ibridazione, il fatto che molti microrganismi sono autofluorescenti, il tipo di ecosistema analizzato e lo stato fisiologico delle cellule bersaglio (Daims *et al.*, 1999; Moter & Göbel, 2000; Bouvier & Del Giorgio, 2003).

Recentemente un miglioramento alla FISH è stato proposto con lo sviluppo di una tecnica modificata detta TSA-FISH (*Tyramide Signal Amplification*) che permette di aumentare il segnale di fluorescenza derivato dalle cellule ibridizzate di 20-40 volte rispetto al *background*. Questa è stata ad esempio usata con successo, nello studio di picoeucarioti nella baia di Morlaix, ma risulta molto complessa nella sua applicazione quindi non permette l'analisi contemporanea di molti campioni (Biegala *et al.*, 2003).

Una combinazione delle due tecniche, *slot blot hybridization* e FISH, è stata inoltre utilizzata, per distinguere le popolazioni batteriche derivate da campioni di suolo contaminati da diversi livelli di metalli pesanti (Chatzinotas *et al.*, 1998; Sandaa *et al.*, 1999).

Analisi a livello tassonomico sono state condotte anche, combinando queste tecniche di ibridazione a tecniche di *fingerprinting* molecolare. In particolare, i prodotti di PCR separati su gel, ad esempio quelli derivati da DGGE, RISA, RFLP, ARDRA, vengono trasferiti su membrane di nitrocellulosa e quindi fatti ibridizzare con le sonde marcate dirette contro specifiche porzioni dei geni per gli rRNA (Lovell & Hui, 1991; Hugenholtz & Pace, 1996).

1.5.5.5. DNA microarray:

L'utilizzo di *microarray* a DNA nello studio di comunità batteriche ambientali sta emergendo come tecnica, impiegata a tale scopo, negli ultimi anni. Si tratta sicuramente di un metodo molto promettente principalmente per il fatto che permette il riconoscimento contemporaneo di un grandissimo numero di microrganismi tassonomicamente differenti.

Originariamente *microarray* a DNA sono stati sviluppati per studi di interi genomi, derivati da singoli microrganismi, in ambito biomedico, ma negli ultimi tempi la loro applicazione in ecologia microbica sta riscuotendo un crescente interesse (Greer *et al.*, 2001).

Questa tecnica prevede, lo “*spotting*” e l’immobilizzazione su particolari vetrini di un molteplice numero (fino a 250000) di sequenze oligonucleotidiche, generalmente frammenti di 16S rDNA che costituiscono il *target* per l’ibridazione con il DNA estratto direttamente dal campione ambientale e quindi marcato con fluorocromi (Wilson *et al.*, 2002). Il risultante profilo di ibridizzazione viene quindi microscopicamente visualizzato e elettronicamente rilevato attraverso l’uso di un laser. I dati ottenuti vengono, infine, analizzati attraverso appositi *software* informatici.

I *microarray* a DNA vengono quindi utilizzati per creare un complesso profilo qualitativo e quantitativo dei vari gruppi e sotto-gruppi tassonomici presenti in comunità batteriche derivate da campioni ambientali ed, a tale scopo, Loy e collaboratori (2002) hanno, ad esempio, sviluppato un sistema *microarray* per l’identificazione di tutti i gruppi di batteri solfato-riduttori in campioni derivati dal lago Solar (Sinai, Egitto) (Loy *et al.*, 2002).

Numerosi sono i vantaggi legati all’utilizzo di questa metodica in studi di comunità batteriche molto complesse come ad esempio:

- fornisce informazioni riguardo un notevole numero di microrganismi contemporaneamente. Questo è sicuramente il vantaggio più grande rispetto ad altre tecniche che richiedono la successiva analisi delle singole sequenze di interesse;
- mentre con l’ausilio di altri metodi molecolari, come quelli discussi in precedenza, si ottengono informazioni riguardo i singoli microrganismi di una comunità, in questo caso si ottiene un profilo generale che può essere utilizzato per comparare tra loro diverse comunità microbiche;
- benché siano richieste notevoli risorse tecnologiche per sviluppare e produrre sistemi *microarray* realmente applicabili, lo sforzo sperimentale richiesto per l’ibridazione e la successiva analisi dei dati è minimo (Peplies *et al.*, 2003).

Nonostante, le grandi potenzialità di questa tecnica rimangono notevoli gli ostacoli tecnici che rendono complicata l’applicazione dei risultati ottenuti. La specificità dell’interazione tra la sonda ed il *target* può essere compromessa da fenomeni di *cross-hybridization* ossia dall’ibridazione di più sonde con un unico *target* o viceversa

(Voordouw *et al.*, 1998). Conseguentemente popolazioni miste con alta similarità di microrganismi vengono difficilmente differenziate (Wilson *et al.*, 2002).

Inoltre, certe proprietà fisiche e biochimiche dei “*chip*” e gli stessi oligonucleotidi legati possono generare dei segnali sia falso positivi che falso negativi. Strutture secondarie dei *target* che creando ingombro sterico e *spot* troppi densi possono ad esempio creare segnali falsi positivi ma, in tal caso applicando condizioni maggiormente stringenti di ibridazione questi problemi possono essere compensati (Peplies *et al.*, 2003).

Infine, un problema altrettanto serio è legato alla sensibilità di ibridazione, infatti se la quantità del materiale genetico di partenza è limitata spesso è necessario amplificarlo prima del suo utilizzo.

L'utilizzo della PCR, a tale scopo, introduce però spesso degli errori che possono provocare l'insorgenza di segnali falso negativi. Recentemente, uno studio condotto da Vora e collaboratori (2004) ha dimostrato comunque, che una strategia di amplificazione non basata sulla PCR, ma sull'amplificazione lineare eseguita con particolari DNA-polimerasi, può portare ad un aumento della sensibilità senza l'introduzione di errori, comparabili a quelli derivati dalla PCR.

2. SCOPO DEL LAVORO

La diffusa contaminazione di ecosistemi terrestri e acquatici dovuta all'immissione di composti inquinanti di origine antropica ad elevata persistenza è un problema che sta assumendo una rilevanza sempre maggiore. Tra le diverse tecnologie disponibili per la bonifica dei siti contaminati quelle biologiche (biorisanamento) risultano le più favorevoli sia dal punto di vista economico che applicativo. Esse sfruttano, infatti, la capacità dei microrganismi, batteri, alghe o funghi, di degradare i contaminanti, accelerando i fenomeni naturali di detossificazione dell'ambiente. Per quanto riguarda il biorisanamento che prevede l'utilizzo dei funghi, quelli appartenenti al gruppo dei *white-rot* sembrano i più interessanti.

Nello studio dei processi di biorisanamento appare fondamentale capire il ruolo della microflora endogena presente nell'ambiente e studiare le eventuali interazioni di questa con le specie microbiche esogene utilizzate a tale proposito. Negli ultimi venti anni, è profondamente cambiato l'approccio metodologico allo studio delle popolazioni microbiche naturali: sempre più frequente, infatti, è l'utilizzo di metodi indipendenti dalla coltivazione basati su analisi molecolari, rivolte principalmente al genoma dell'intera comunità microbica (metagenoma), e questo ha permesso di superare il problema della non coltivabilità della maggior parte dei microrganismi ambientali.

Sulla base dello stato dell'arte riportato nel capitolo precedente, l'obiettivo principale di questo lavoro di tesi è stato quello di studiare gli effetti del micorisanamento con funghi *white-rot* sulla struttura e sulla funzione delle comunità microbiche presenti in suoli contaminati da inquinanti prioritari (IPA, cloro-benzeni, cloro-aniline e PCB). In particolare, sono state condotte diverse prove su scala di laboratorio organizzate come segue:

- Due prove nelle quali venivano utilizzate combinazioni diverse di agenti mobilizzanti e ceppi fungini sono state condotte su un suolo modello contaminato "ad hoc" in laboratorio al fine di valutare quali fossero gli effetti di entrambi i fattori sia sulla deplezione dei contaminati che sulla struttura delle popolazioni microbiche autoctone. Si è scelto di prendere in esame nella prima parte del lavoro un suolo modello così da poter affrontare le diverse problematiche su un sistema meno complesso rispetto a quello di un suolo storicamente contaminato (Sezione 4.1 Risultati e Discussione);

- Due prove di micorisanamento, presentate nelle sezioni successive (4.2 – 4.3), sono state invece condotte su un suolo storicamente contaminato da idrocarburi aromatici, cloro-benzeni e cloro-aniline (Suolo ACNA). Anche in questi casi si è voluto approfondire l'effetto degli inoculi fungini sulla decontaminazione del suolo e sulla struttura della microflora batterica residente. In particolare, l'esperimento condotto con *Panus tigrinus* è stato seguito in cinetica, effettuando prelievi durante la prova, a differenza delle prove precedenti protratte per 45 giorni ed analizzate solo al termine del periodo di incubazione. Inoltre, in questo esperimento, è stata effettuata anche un'analisi dell'effetto del fungo su alcune funzioni metaboliche batteriche attraverso *Real-Time* PCR, al fine di valutare come il numero di copie di due geni chiave nella degradazione di IPA variasse in seguito all'inoculo del suolo con il fungo stesso.
- L'ultima prova (Sezione 4.4. Risultati e Discussione) è stata infine effettuata su un suolo storicamente contaminato da bifenili policlorurati seguendo comunque lo stesso approccio già riportato per il processo condotto con *P. tigrinus* sul suolo ACNA. In particolare, in questo caso, vista l'elevato grado di tossicità e insolubilità dei PCB si è scelto di allestire in parallelo tesi sperimentali in cui il suolo veniva sia pretrattato con olio di soia, come agente mobilizzante, che utilizzato come tale.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Suoli utilizzati nelle prove di micorisanamento

3.1.1. Suolo modello:

Il suolo di riferimento, utilizzato per la prova di micorisanamento del suolo contaminato “*ad hoc*” in laboratorio, è stato prelevato da uno strato superficiale (0-30 cm) di un terreno ad uso agricolo biologico (Pian di Ciliano, Soriano del Cimino, Viterbo). Il campione, dopo setacciatura a 2 mm, veniva essiccato all’aria e conservato a 2°C, in modo da consentirne la stabilizzazione e da ridurre al minimo lo stress da campionamento.

Le principali caratteristiche chimico-fisiche di tale suolo vengono riportate in Tabella 3.1.

Tabella 3.1. Principali caratteristiche chimico-fisiche del suolo di riferimento.

Umidità relativa	4,47%	
PH	Reale	6,4
	Potenziale (in 1N KCl)	5,1
Tessitura	Sabbia (%)	65
	limo (%)	23
	Argilla (%)	13
Capacità di Ritenzione Idrica (%)	25,5	
Azoto totale (%)	0,15	
Carbonio Organico (%)	1,5	
Fosforo disponibile (mg/kg come P ₂ O ₅)	16	

3.1.2. Contaminazione del suolo modello:

260 µl di una soluzione stock, in acetone, contenente 1,6 mg/ml di ognuno dei sette idrocarburi policiclici aromatici (IPA) selezionati per la contaminazione del suolo modello, fenantrene, antracene, fluorantene, pirene, crisene, benzo[a]pirene, benzo[k]fluorantene (Fluka), sono stati miscelati con 2 g di sabbia di silice sterile (J.T. Baker sea sand); la miscela risultante è stata lasciata essiccare per 24h a temperatura ambiente, al fine di far evaporare il solvente, e quindi unita al suolo fino a raggiungere una concentrazione finale di ogni IPA pari a 50 mg/g suolo (Löser *et al.*, 1999).

Gli agenti mobilizzanti, precedentemente sterilizzati (121°C per 15 min) sono stati aggiunti al suolo attraverso un diffusore spray fino a ottenere una concentrazione del 2,5% (p/p) nel caso del Tween20, Tween80 e dell'olio di soia; dell'1% nel caso del RAMEB e fino al raggiungimento di una concentrazione finale in lipidi dello 0,1% nel caso dell'aggiunta delle acque di vegetazione delle olive.

Il suolo è stato incubato a 4°C al buio per 6 giorni e quindi utilizzato nelle prove di micorisanamento.

Le acque di vegetazione, prelevate da un frantoio locale che opera mediante un processo di estrazione a tre fasi, avevano la seguente composizione: pH 5,3, solidi sospesi 15 g/l, domanda chimica di ossigeno (COD) 43,000 mg/l, azoto totale 0,41 g/l, fosforo solubile 0,19 g/l, zuccheri totali 4,8 g/l, lipidi totali 8,5 g/l, fenoli totali 3,7 g/l, orto-difenoli 1,2 g/l.

Prima del loro utilizzo le acque di vegetazione venivano centrifugate ad 11000g/min per 30 min, sterilizzate (121°C per 15 min) e quindi conservate a -20°C.

3.1.3. Suolo storicamente contaminato da idrocarburi aromatici:

Il campione di suolo storicamente contaminato da idrocarburi aromatici e metalli pesanti, utilizzato nelle prove di micorisanamento in questo lavoro di tesi, è stato prelevato da un sito inquinato situato nel comune di Cengio (Savona, Italia) dove per più di un secolo è stata attiva l'industria chimica ACNA (Azienda Colori Nazionali Affini). Inizialmente nata come industria in cui venivano fabbricati materiali esplosivi (polvere pirica, nitroglicerina, dinamite, ecc.), nel corso degli anni è stata trasformata per la produzione di acido solforico, oleum, tritolo, acido nitrico, fenolo e i primi intermedi organici industriali.

Dalla sua fondazione, fino alla prima metà degli anni '60, la fabbrica ha riversato indiscriminatamente nel territorio circostante tonnellate di rifiuti tossici, tanto da far inserire, la zona in cui è ubicata, tra le sedici aree nazionali a rischio ambientale per le quali la legge 426 del dicembre 1998 prevede un programma di bonifica e ripristino.

Attualmente il sito ACNA, dismesso dal 1999, copre una superficie di 55 ettari, inglobando parte del bacino idrografico del fiume Bormida.

Il campione utilizzato in questo lavoro di tesi è stato prelevato da uno strato superficiale (0-30 cm) e, dopo setacciatura a 2 mm, è stato essiccato all'aria e conservato a 2°C, in modo da consentirne la stabilizzazione e da ridurre al minimo lo stress da campionamento.

Di seguito vengono elencate le principali caratteristiche fisico-chimiche:

- pH: 7,43 in acqua;
- pH: 7,35 in 1N KCl;
- Carbonio Organico Totale: 38,6 g/kg;
- Azoto Totale: 1,2 g/kg;
- Fosforo Totale: 4,8 g/kg;
- Sabbia: 19,36 %;
- Limo: 77,14%;
- Argilla: 3,5%.

Il suolo era caratterizzato dalla presenza sia di idrocarburi aromatici (Tabella 3.2), comprendenti benzeni clorurati, cloroaniline, tiofeni e idrocarburi policromati, che metalli pesanti.

Tabella 3.2. Contaminanti organici presenti nel campione di suolo ACNA utilizzato per le prove di micorisanamento:

Contaminanti	Concentrazioni (mg/kg di suolo)
Triclorobenzene (1,3,5 o 1,2,3)	1.0 ± 0.08
Naftalene	12.9 ± 0.3
Tetraclorotiofene	1.3 ± 0.07
1,2,4,5-tetraclorobenzene	10.3 ± 0.6
2,6-dicloroanilina	77.2 ± 1.6
2,4-dicloroanilina	35.1 ± 1.5
1,2,3,4-tetraclorobenzene	17.4 ± 0.7
Difeniletere	31.7 ± 1.3
2,6-dicloro-3-metilnilina	3.0 ± 0.3
Pentaclorobenzene	1.0 ± 0.03
Fenantrene	13.9 ± 0.1
2,3,4,5,6-pentacloroanilina	11.3 ± 0.1
Difenilsulfone	18.1 ± 1.3
9,10-antracenedione	461.0 ± 45.0
1-cloro-9,10-antracenedione	3.3 ± 0.1
N-fenil-1-naftalenenammina	5.8 ± 0.01
1-amino-9,10-antracenedione	9.0 ± 1.0
1,1'-binaftalene	13.6 ± 0.2
1,2-binaftalene	12.7 ± 0.01
7H-benz[DE]antracene-7-one	918.0 ± 19.0
1-(2-naftalenilmetil)-naftalene	4.3 ± 0.02
2-fenilnafta[2,1]-tiofene	30.5 ± 1.5

3.1.4. Suolo storicamente contaminato da bifenili policlorurati:

Il suolo storicamente contaminato da bifenili policlorurati (PCB), qui sottoposto a processo di micorisanamento, è stato prelevato da una discarica nei pressi di Ravenna (Area SpA; Ravenna) dove è stato stoccato per circa 10 anni e conteneva 86 congeneri di PCB (Tabella 3.3), ad una concentrazione complessiva di 890 mg/kg.

Le principali caratteristiche fisico-chimiche del suolo erano le seguenti:

- pH: 7;
- Sabbia: 88%;
- Limo: 11%;
- Argilla: 1%.

Il campione, dopo setacciatura a 2 mm è stato essiccato all'aria e conservato a 2°C, in modo da consentirne la stabilizzazione e da ridurre al minimo lo stress da campionamento.

Tabella 3.3. Concentrazioni dei diversi congeneri presenti nel campione di suolo utilizzato per le prove di micorisanamento:

Tipo di Congenere	Concentrazione iniziale (mg/kg suolo)	Tipo di Congenere	Concentrazione iniziale (mg/kg suolo)
2,6-/2,2'-CB	2,770 ± 0,012	2,2',3,4,5'/2,3,4,4',6-CB	10,784 ± 0,021
2,4-/2,5'-CB	0,220 ± 0,001	2,2',3,4,4'-CB	2,705 ± 0,034
2,3'-CB	0,609 ± 0,003	2,2',3,3',6,6'-CB	7,613 ± 0,025
2,4'-/2,3'-CB	0,170 ± 0,002	2,3,3',4',6'-CB	17,755 ± 0,039
2,2',6-CB	3,352 ± 0,003	2,2',3,5,5',6-CB	10,742 ± 0,026
2,2',5-/2,2',4-/4,4'-CB	44,142 ± 0,083	2,2',3,3',5,6'-CB	8,032 ± 0,020
2,3,6-/2,3',6-CB	3,305 ± 0,005	2,3,3',4',5-CB	0,791 ± 0,001
2,2',3-/2,4',6-CB	17,221 ± 0,034	2,2',3,4',5',6/2,3',4,4',5-CB	31,487 ± 0,077
2',3,5-CB	0,226 ± 0,001	2,2',3,3',5,6-CB	2,627 ± 0,006
2,4,5-CB	0,214 ± 0,001	2,2',3,3',4,6/2',3,3',4,5-CB	2,317 ± 0,004
2,3',5-CB	7,146 ± 0,003	2,2',3,4',5,5'-CB	5,009 ± 0,013
2,3',4-CB	2,256 ± 0,009	2,2',3,3',4,6'/2,2',4,4',5,5'/2,3,3',4,4'-CB	55,208 ± 0,154
2,4',5-/2,4,4'-CB	58,749 ± 0,088	2,2',3,4,5,5'/2,2',3,3',5,6,6'-CB	12,300 ± 0,027
2,3,3'-/2',3,4-/2,2',5,6'-CB	7,201 ± 0,007	2,2',3,3',4,5'+2,2',3,3',4,6,6'/2,2',3,4,4',5-CB	3,561 ± 0,010
2,2',4,6'-/2,3,4'-CB	26,683 ± 0,045	2,3,3',4,5,6/2,2',3,4,4',5'/2,3,3',4,4',6-CB	31,129 ± 0,090
2,2',3,6-CB	6,372 ± 0,007	2,2',3,3',4,5/2,2',3,3',5,5',6-CB	6,161 ± 0,009
2,2',3,6'-CB	2,947 ± 0,005	2,2',3,3',4,5',6+2,2',3,4',5,5',6-CB	9,680 ± 0,025
2,2',5,5'-CB	24,352 ± 0,042	2,2',3,4,4',5',6-CB	4,470 ± 0,011
2,2',4,5'-CB	17,294 ± 0,033	2,2',3,4,4',5',6+2,2',3,3',4',4'+2,3',4,4',5,5'-CB	8,780 ± 0,024
2,2',4,4'-/2,2',4,5-/2,4,4',6-CB	8,861 ± 0,013	2,2',3,4,5,5',6-CB	2,877 ± 0,005
3,3',4-CB	0,754 ± 0,002	2,2',3,3',4,5,6'-CB	9,450 ± 0,032
2,2',3,5'-CB	17,323 ± 0,048	2,2',3,3',4',5,6-CB	5,401 ± 0,015
3,4,4'-/2,3,3',6-/2,2',3,4'-CB	9,484 ± 0,010	2,2',3,3',5,5',6,6'/2,2',3,3',4,4',6/2,3,3',4,4',5-CB	9,869 ± 0,042
2,2',3,4-/2,3,4',6-CB	19,165 ± 0,032	2,2',3,3',5,5',6,6'/2,3,3',4,4',5'/2,2',3,3',4,5',6,6'-CB	3,395 ± 0,001
2,2',3,3'-CB	5,458 ± 0,007	2,2',3,3',4,5,5'+2,2',3,3',4,4',6,6'-CB	1,941 ± 0,002
2,3',4,5-CB	2,189 ± 0,001	2,2',3,4,4',5,5'+2,3,3',4',5,5',6-CB	20,587 ± 0,068
2,3,4',5-CB	1,096 ± 0,001	2,3,3',4,4',5',6-CB	0,755 ± 0,005
2,4,4',5-CB	11,491 ± 0,020	2,2',3,3',4,5,6,6'-CB	0,849 ± 0,001
2,3',4',5-CB	19,619 ± 0,042	3,3',4,4',5,5'-CB	0,065 ± 0,001
2,2',3,5',6-CB	23,202 ± 0,048	2,2',3,3',4,4',5/2,3,3',4,4',5,6-CB	12,907 ± 0,045
2,2',3,4',6-CB	1,076 ± 0,003	2,2',3,3',4,5,5',6-CB	0,198 ± 0,000
2,3,4,4'-/2,3,3',4'-CB	16,708 ± 0,040	2,2',3,3',4,5,5',6+2,2',3,3',4,5,5',6'	2,600 ± 0,006
2,2',3,5,5'-CB	4,004 ± 0,011	2,2',3,4,4',5,5',6/2,2',3,3',4,4',5',6-CB	3,503 ± 0,008
2,2',3,3',6-CB	7,568 ± 0,042	2,3,3',4,4',5,5'-CB	0,306 ± 0,001
2,2',3,4',5/2,2',4,5,5'-CB	27,915 ± 0,047	2,2',3,3',4,5,5',6,6'/2,2',3,3',4,4',5,6-CB	1,665 ± 0,005
2,2',4,4',5-CB	6,688 ± 0,027	2,2',3,3',4,4',5,6,6'-CB	0,099 ± 0,000
2,3',4,4',6-CB	0,303 ± 0,026	2,2',3,3',4,4',5,5'-CB	2,706 ± 0,008
2,2',3,3',5-CB	1,132 ± 0,013	2,3,3',4,4',5,5',6-CB	0,273 ± 0,000
2,2',3',4,5-CB	5,974 ± 0,003	2,2',3,3',4,4',5,5',6-CB	0,821 ± 0,038

3.2. Allestimento dei processi di micorisanamento:

3.2.1. Microrganismi impiegati nelle diverse prove di micorisanamento:

I ceppi fungini *Allescheriella* sp. DABAC 1 e *Phlebia* sp. DABAC 9 usati nella prima prova di micorisanamento del suolo modello erano stati precedentemente isolati, nel nostro laboratorio, dal sito ACNA (D'Annibale *et al.*, 2006).

Irpex lacteus 617/93 e *Pleurotus ostreatus* 3004, sono stati ottenuti dalla collezione di Basidiomiceti dell'istituto di Microbiologia dell'Accademia delle Scienze della Repubblica Ceca, (CCBAS) (Praga, Repubblica Ceca).

Pleurotus pulmonarius CBS 664.97 e *Panus tigrinus* CBS 577.79 sono stati acquistati presso la collezione di microrganismi CBS (Baarn, Olanda); *Botryosphaeria*

rhodina DABAC P82 proveniva dalla collezione di microrganismi del Dipartimento di Agrobiologia ed Agrochimica dell'Università della Tuscia (Viterbo, Italia).

I ceppi utilizzati sono stati mantenuti a 4°C, in *slant* contenenti Potato Dextrose Agar (PDA, Oxoid), e periodicamente rinnovati.

3.2.2. Preparazione dell'inoculo:

La biomassa miceliare, necessaria a fornire l'inoculo per le prove di biorisanamento, veniva prodotta in coltura agitata, sospendendo in terreno liquido la biomassa fungina ottenuta dagli *slant* incubati a 28°C per 7-10 giorni.

Il micelio veniva omogeneizzato in sospensione acquosa con miscelatore Ultra-Turrax (Ika-Werk, Germania); la pre-coltura veniva condotta in terreno liquido contenente glucosio (10g/l) ed estratto di lievito (YE 5g/l), in beute Erlenmeyer da 500ml (contenenti 95ml di terreno e 5ml di sospensione miceliare), incubate a 28 °C in agitatore orbitale (B: Braun, Biotech. International, Germania), a 180 rpm, per 96h.

Le *pellets* ottenute venivano sottoposte a lavaggi con acqua deionizzata sterile e nuovamente frammentate con Ultra-Turrax in condizioni di asepsi, per moltiplicarne i centri di crescita e per omogeneizzare la sospensione poi utilizzata come inoculo nei processi di micorisanamento.

3.2.3. Micorisanamento del suolo modello:

Il suolo modello, contaminato in laboratorio secondo la procedura sopra descritta, è stato sottoposto a due diverse prove di micorisanamento nelle quali sono state utilizzate due diverse combinazioni di agenti mobilizzanti e ceppi fungini.

Nella prima prova, sono stati utilizzati i funghi *white-rot Allescheriella* sp. DABAC1 e *Phlebia* sp. DABAC9 in concomitanza con i seguenti agenti mobilizzanti: Tween20, Tween80 e olio di soia.

La seconda prova è stata condotta utilizzando i due ceppi fungini *Irpex lacteus* 617/93 e *Pleurotus ostreatus* 3004 e Tween20, Tween80, olio di soia, RAMEB ed acque di vegetazione delle olive, come agenti mobilizzanti.

Entrambe le prove di micorisanamento sono state allestite come segue: 5 ml delle pre-culture fungine (concentrazione di biomassa di circa 10 g/l) venivano impiegati come inoculo per stocchi di mais sterili (5 g), utilizzati come ammendanti per lo sviluppo miceliare, contenuti in beute Erlenmeyer da 250 ml.

In base all'umidità residua degli stocchi di mais e al volume di inoculo, è stata quindi calcolata l'umidità totale ed è stata aggiunta acqua sterile così da ottenere un'umidità ad inizio prova del 75% (p/p). I funghi sono stati fatti sviluppare su tale matrice incubando le beute a 28° C per 15 giorni e quindi venivano aggiunti 20 g di suolo precedentemente trattato con i surfactanti. Le beute, dopo aggiunta del suolo, sono state incubate nuovamente per 6 settimane a 28°C.

Ogni prova è stata condotta in triplicato e, per ognuna delle tesi sperimentali, sono state allestite in parallelo delle beute di controllo utilizzando il suolo trattato e non con gli agenti mobilizzanti, ammendate con gli stocchi di mais ma non inoculate con i funghi (Controllo di incubazione).

3.2.4. Micorisanamento del suolo storicamente contaminato da idrocarburi aromatici (Prova condotta con P. pulmonarius e B. rhodina):

Metà del suolo utilizzato in questo esperimento è stato sottoposto a fumigazione utilizzando cloroformio secondo la procedura descritta da Trevors (1996) mentre la restante metà è stata trattata seguendo lo stesso procedimento, ma in assenza di cloroformio (suolo non fumigato).

Successivamente, 32 g di suolo, sottoposto ai due diversi trattamenti, sono stati miscelati con 8 g di paglia di mais sterile, posti in beute Erlenmeyer da 500 ml e quindi inoculati con 20 ml di sospensione miceliare, come sopra descritto.

L'umidità finale è stata aggiustata fino ad ottenere un valore iniziale di circa il 37%; le beute sono state incubate per 45 giorni insufflando al loro interno aria umida non sterile (3- 5ml/min) per tutta la durata del processo.

Ogni prova è stata condotta in duplicato e, per ogni tesi sperimentale, sono state allestite in parallelo beute di controllo utilizzando suolo sottoposto o meno a fumigazione, ammendato con stocchi di mais, ma non inoculato con i funghi (Controllo di incubazione).

3.2.5. *Micorisanamento del suolo storicamente contaminato da idrocarburi aromatici*
(Prova condotta con *P. tigrinus*):

Beute Erlenmeyer da 500 ml venivano riempite con 32 g di suolo, ammendato con 8 g [20% (p/p)] di stocchi di mais preventivamente sterilizzati (121°C - 20 min), ed inoculate con 20 ml di sospensione miceliare, preparata come sopra.

L'umidità finale è stata aggiustata fino ad ottenere un valore di circa il 37% ed è stata mantenuta per tutta la durata della prova aggiungendo acqua sterile in quantità tale da compensare quella eventualmente persa in seguito ad evaporazione.

Ogni prova è stata condotta in duplicato allestendo, oltre alle prove di biottrattamento, altre due tesi sperimentali di controllo (Tabella 3.4):

- Microcosmo: beute contenenti 40 g di suolo come tale;
- Controllo di incubazione: beute contenenti 32 g di suolo ammendato con 8 g di stocchi di mais sterili.

La prova è stata seguita nel tempo effettuando prelievi dei campioni diversamente trattati all'inizio (t_0) e dopo 7, 15, 30 e 60 giorni di incubazione (t_7 , t_{15} , t_{30} , t_{60}). I campioni ad ogni prelievo venivano omogeneizzati, aliquotati in falcon sterili, congelati in azoto liquido e quindi mantenuti a -80°C sino al momento delle successive analisi.

Tabella 3.4: Schema riassuntivo delle tesi sperimentali allestite nella prova di biottrattamento

Nome del campione	Tipo di campione
Microcosmo	40 g di suolo come tale
Controllo di incubazione	32 g di suolo come tale + 8 g di stocchi di mais sterili
Suolo biottrattato con <i>P. tigrinus</i>	32 g di suolo come tale + 8 g di stocchi di mais sterili + 20ml di sospensione miceliare

3.2.6. Micorisanamento del suolo storicamente contaminato da bifenili policlorurati:

La prova è stata effettuata in parallelo utilizzando sia suolo tal quale che sottoposto a pretrattamento con olio di soia (OS), aggiunto con dispersore spray sotto forma di emulsione (5%, p/p) acqua:olio (1:1); il suolo è stato mantenuto a 4°C al buio, per 6 giorni prima del suo utilizzo.

Il processo di micorisanamento è stato condotto in beute Erlenmeyer da 500 ml ed allestito come segue: 7,5 ml di sospensione miceliare, preparata come sopra, venivano utilizzati come inoculo per stocchi di mais sterili (7,5 g) sui quali, dopo aver fatto crescere il fungo per 15 giorni, venivano aggiunti come *upper layer* 30 g di suolo precedentemente trattato o meno con il surfactante.

In base all'umidità residua degli stocchi e al volume di inoculo, è stata quindi calcolata l'umidità totale ed è stata aggiunta acqua sterile così da ottenere un'umidità ad inizio prova del 10-15% (p/p).

Ogni prova è stata condotta in duplicato allestendo in parallelo ai processi di micorisanamento, altre due tesi sperimentali di controllo utilizzando sia suolo tal quale che pretrattato con olio di soia. Sono state, quindi, predisposte le seguenti tesi sperimentali:

- Microcosmo: 30g di suolo come tale;
- Microcosmo OS: 30g di suolo pretrattato con OS
- Controllo di incubazione (Cont. Incub.): 30g suolo aggiunti come *upper layer* su 7,5g di stocchi di mais sterili non inoculati con il fungo;
- Controllo di incubazione OS (Cont. Incub. OS): 30g suolo, pretrattato con OS, aggiunti come *upper layer* su 7,5g di stocchi di mais sterili non inoculati con il fungo;
- Biotrattato con *P. tigrinus*: 30g suolo aggiunti come *upper layer* su 7,5g di stocchi di mais precedentemente colonizzati dal fungo;
- Biotrattato con *P. tigrinus* OS: 30g suolo, pretrattato con OS, aggiunti come *upper layer* su 7,5g di stocchi di mais precedentemente colonizzati dal fungo;

La prova è stata seguita nel tempo effettuando prelievi dai campioni diversamente trattati all'inizio (t_0) e dopo 30 e 60 giorni di incubazione (t_{30} , t_{60}).

Le beute prelevate sono state preventivamente poste in camera fredda per 3-4 ore al fine di favorire la condensazione dei vapori in cui potevano essere presenti PCB. I campioni sono stati quindi omogeneizzati, aliquotati in falcon sterili, congelati in azoto liquido e mantenuti a -80°C fino alle successive analisi.

3.3. Carica microbica del suolo

3.3.1. Conte dei batteri eterotrofi totali:

1 g di suolo è stato sospeso in 99 ml di acqua deionizzata sterile e quindi mantenuto in agitazione, mediante agitatore magnetico, per 30 min. Tale sospensione è stata diluita serialmente ed 1 ml di ogni diluizione è stato seminato, per inclusione, in piastre Petri alle quali è stato aggiunto TSA (Trypticase Soy Agar, Oxoid) a 50°C. Per evitare la crescita di funghi è stata aggiunta al terreno Cicloheximide (Sigma) alla concentrazione di 0,5 mg/ml.

Le piastre sono state incubate a 28°C per 72-96h e quindi si è proceduto alla conta delle colonie formatesi (CFU/ml).

3.3.2. Conte dei batteri degradatori di Acidi Benzoici Monoclorurati (CBA) e di Bifenile:

La determinazione del numero di batteri specializzati è stata effettuata sulla stessa sospensione impiegata per la conta dei batteri eterotrofi totali.

Il terreno utilizzato per la crescita, *Minimum Mineral Medium* (MMM), non includeva alcuna fonte di carbonio se non quella fornita dai CBA o dal bifenile ed aveva la seguente composizione espressa in g/l:

- Na₂HPO₄: 2,77;
- KH₂PO₄: 1,00;
- Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O: 0,03;
- Fe(NH₄)citrato: 0,01;
- (NH₄)SO₄: 1,00;
- MgSO₄ x 7 H₂O: 0,20;

Il pH dello stesso è stato corretto a 7.2 e, per evitare la crescita fungina veniva aggiunta al terreno Cicloheximide (Sigma) alla concentrazione di 0,5 mg/ml.

Al terreno MMM così formulato veniva inoltre aggiunta, per la conta dei degradatori di CBA, una miscela di acido 2-clorobenzoico, acido 3-clorobenzoico e acido 4-clorobenzoico (Sigma) alla concentrazione di 200 mg/l ciascuno.

1 ml di ogni diluizione veniva seminato, per inclusione, in piastre Petri alle quali si aggiungeva MMM a 50°C.

Nel caso della conta dei batteri degradatori di bifenile, le piastre, precedentemente preparate con MMM agarizzato, sono state seminate tramite spatolamento superficiale con 100 µl di sospensione batterica.

Il bifenile è stato fornito sotto forma di vapori derivati dalla deposizione di cristalli dello stesso, sul coperchio delle piastre Petrie inoculate con la sospensione batterica.

In entrambi i casi, le piastre venivano incubate per 30 giorni contando periodicamente le colonie formatesi.

3.4. Metodi analitici:

3.4.1. Estrazione e quantificazione dell'ergosterolo:

La determinazione dell'ergosterolo è stata effettuata seguendo il metodo riportato da Davis e Lamar (1992).

In particolare, 2,5 g di suolo (peso secco) sono stati estratti con 10 ml di una miscela di esano/metanolo (1:4 v/v) per 16 h in agitazione orbitale (150 rpm) a temperatura ambiente.

Dopo aver centrifugato l'estratto a 8000g/min per 10 min, il surnatante è stato filtrato sotto vuoto con filtri per solventi organici da 47 µm e i filtri sono stati lavati con ulteriori 10 ml della miscela di esano/metanolo.

Gli estratti sono stati quindi sottoposti a saponificazione a 70°C per 1 h aggiungendo 2,25 g di KOH.

Dopo raffreddamento, sono stati aggiunti 4 ml di acqua deionizzata e 5 ml di esano e la miscela è stata agitata vigorosamente, in imbuto separatore, al fine di chiarificare la fase organica. Prelevata la stessa, la fase acquosa è stata sottoposta a 5 ulteriori estrazioni con esano.

Le fasi organiche, recuperate da ogni estrazione, sono state filtrate con filtro Wathman n°42 e, al fine di catturare l'eventuale fase acquosa ancora presente nell'estratto è stata posta una punta di Sodio-Solfato anidro all'interno del filtro, che è stato infine lavato con ulteriori 5 ml di esano.

Gli estratti sono stati quindi portati a secco in Rotavapor a 35°C e di seguito sospesi in 1-1,5 ml di metanolo, centrifugati a 12000g/min per 10 min e quindi analizzati mediante HPLC secondo il metodo riportato da Novotný e collaboratori (1999).

In particolare, per le analisi HPLC è stata utilizzata una pompa Waters 1525 ed un rilevatore di assorbanza Waters 2487. Gli estratti dei vari campioni sono stati analizzati con una colonna Luna 5u C18, dimensioni 125 x 3.2 mm, 5 micron (Phenomenex), ad un flusso costante di 1 ml/min, con eluzione in isocratica in 95% metanolo - 5% acqua rilevando l'assorbanza del prodotto a 282nm.

3.4.2. Preparazione degli estratti acquosi:

Le varie determinazioni descritte di seguito sono state effettuate su estratti acquosi ottenuti come descritto da Criquet e collaboratori (Criquet *et al.*, 1999).

Il tampone di estrazione era costituito da: 100 ml di tampone acetato 0.1 M, 3 g di polivinilpolipirrolidone (Sigma), 0.1 ml di Tween 80 (Sigma) e 1.47 g di CaCl₂ (Sigma).

I campioni sono stati estratti in ghiaccio in agitazione orbitale a 180 rpm per 2h in falcon sterili da 50 ml in cui si aggiungevano 3 g di suolo e 30 ml del tampone di estrazione.

3.4.3. Determinazione delle proteine solubili:

Per la determinazione delle proteine totali è stato seguito il metodo proposto da Bradford (1976) utilizzando Coomassie Brilliant Blue G (Biorad, USA). Ogni saggio è stato effettuato in doppio miscelando nell'ordine:

- X µl di campione;
- (800-X) µl di H₂O;
- 200 µl di reattivo Coomassie Brilliant Blue G.

In parallelo venivano preparati due bianchi di reazione miscelando:

- 200 µl di reattivo Coomassie Brilliant Blue G;
- 800 µl di H₂O.

I campioni venivano agitati, incubati per 15 min a temperatura ambiente e quindi si effettuava lettura spettrofotometrica della assorbanza a 595 nm contro bianco. La retta di taratura era costruita utilizzando Albumina di Siero Bovino (BSA, Biorad) come standard nel range 0-0,1 mg/ml.

3.4.4. Determinazione degli zuccheri totali:

Per la determinazione degli zuccheri totali veniva utilizzato il metodo proposto da Hodge e Hofreiter (1962), basato sull'idrolisi dei legami glicosidici da parte dell'acido solforico concentrato e sulla successiva deidratazione dei monosaccaridi. I prodotti deidratati reagendo con il fenolo originano un composto dal colore arancio misurabile spettrofotometricamente.

I reagenti utilizzati per il saggio erano i seguenti:

- Fenolo in cristalli 50 g/l;
- H₂SO₄ concentrato al 98 % (Sigma).

Ogni saggio veniva condotto come di seguito: in provetta venivano miscelati nell'ordine 200 µl di campione opportunamente diluito, 200 µl della soluzione di fenolo ed 1 ml di acido solforico concentrato. I campioni si lasciavano reagire per 30 min e quindi si procedeva alla lettura spettrofotometrica dell'assorbanza a 490 nm contro bianco (200 µl di acqua, 200 µl di soluzione di fenolo e 1 ml di acido solforico). La retta di taratura era ottenuta utilizzando come standard glucosio nel *range* di 0-200 µg/ml.

3.4.5 Determinazione degli amminoacidi liberi:

Tale determinazione è stata effettuata, seguendo il protocollo proposto da Voergsen e Brooks (1990), mediante impiego di ninidrina che, reagendo con gli amminoacidi, forma un diazocomposto che assorbe nella lunghezza d'onda del rosso (570 nm).

Per la preparazione del reattivo sono stati sciolti 1 g di ninidrina (Sigma) e 70 mg di idrinantina (Sigma) in 50 ml di dimetil-solfossido (DMSO, Sigma) precedentemente degasati sotto vuoto. Dopo aver aggiunto 25ml di tampone sodio acetato 4M a pH 5,5 e 25 ml di acqua deionizzata, la soluzione è stata nuovamente degasata e ad essa sono stati aggiunti 80 mg di cloruro di stagno (Sigma, SnCl₂ x 2H₂O).

La retta di taratura è stata costruita utilizzando Leucina come standard nel *range* 10-100mg/l.

Il saggio è stato effettuato in tubi di vetro miscelando nell'ordine 0,6 ml di estratto, 1,4ml di tampone citrato 1M a pH 4,5 e 1ml del reattivo preparato come precedentemente descritto.

Dopo aver incubato i tubi per 25 min a 100°C sono stati aggiunti 4 ml di una soluzione 1:1 (v/v) etanolo:acqua e si è proceduto alla lettura spettrofotometrica dell'assorbanza, dei diversi campioni, alla lunghezza d'onda di 570 nm.

3.4.6. Determinazione delle attività idrolasiche:

Per la determinazione delle attività idrolasiche (endo-1,4- β -glucanasi, cellobioidrolasi ed endo-1,4- β -xilanasi) è stata seguita la metodica di proposta da Hope e Burns (1987) che prevedeva comunque la quantificazione degli zuccheri riducenti effettuata seguendo il metodo descritto da Nelson (1944).

In particolare sono stati inizialmente quantificati gli zuccheri riducenti intrinseci totali di ogni campione usando le soluzioni descritte di seguito:

Soluzione A:

E' stata ottenuta miscelando i seguenti reagenti:

- Na₂CO₃ anidro: 25g/l;
- Na-K tartrato x 4H₂O: 25g/l;
- NaHCO₃ anidro: 20g/l;
- Na₂SO₄ anidro: 200g/l.

La soluzione è stata mantenuta a 37°C durante l'utilizzo per evitare la precipitazione dei sali in essa contenuti.

Soluzione B:

In 200ml di acqua deionizzata sono stati sciolti 30g di CuSO₄ ed a tale soluzione sono state quindi aggiunte 4 gocce di H₂SO₄ concentrato.

Soluzione C:

In 25 ml di H₂O deionizzata sono stati sciolti 3 g di Na-arseniato ed in ulteriori 450 ml di H₂O, ai quali sono stati aggiunti 21 ml di H₂SO₄, sono stati sciolti 25 g di ammonio molibdato. Le due soluzioni sono state quindi miscelate, portate a 500 ml con H₂O e tenute a 55°C per 30 min.

Soluzione D:

È stata ottenuta miscelando 1 ml della soluzione B e 25 ml della soluzione A.

Il saggio è stato effettuato miscelando in tubi di vetro 1 ml di campione, opportunamente diluito, ed 1 ml della soluzione D.

I tubi sono stati incubati per 20 min a 100°C e successivamente fatti raffreddare per 5 min. Dopo aver aggiunto 1 ml della soluzione C i tubi sono stati "vortexati" ed in ognuno sono stati aggiunti 20 ml di H₂O deionizzata. Infine, dopo aver agitato

manualmente i tubi e centrifugato i campioni a 12000g per 10 min si è proceduto alla lettura spettrofotometrica dell'assorbanza a 520 nm.

Per la determinazione delle attività idrolasiche, i campioni sono stati incubati con i substrati specifici dei tre enzimi saggiati. In particolare, per il saggio dell'attività cellobioidrolasica è stata utilizzata come substrato una soluzione all'1% (p/v) di cellulosa cristallina carbossi-metilata (Fluka); per le endo-1,4- β -xilanasasi una sospensione di xilano (Sigma) allo 0,25% (p/v) e per le endo-1,4- β -glucanasi una sospensione allo 0,5% (p/v) di Avicel (cellulosa amorfa, Fluka). Tutti i substrati sono stati sospesi in tampone Sodio-acetato 50 mM a pH 5.

I substrati così preparati sono stati incubati con i campioni seguendo la procedura descritta di seguito: (2-X) ml di substrato sono stati aggiunti in provetta ad X ml di campione e incubati per 30 min a 37°C.

Le reazioni enzimatiche sono state quindi interrotte incubando le miscele a 100°C per 5 min.

I campioni sono stati centrifugati e, da 1ml di miscela, sono stati determinati nuovamente gli zuccheri riducenti secondo la metodica sopra descritta.

La retta di taratura è stata costruita, nel *range* 0-1 mg/ml, utilizzando, come standard, glucosio per il dosaggio dell'attività delle endo-1,4- β -glucanasi e delle cellobioidrolasi e xilosio per il dosaggio dell'attività delle endo-1,4- β -xilanasasi.

Il calcolo delle attività enzimatiche è stato effettuato valutando, innanzitutto, la differenza tra gli zuccheri riducenti intrinseci totali presenti nel campione prima (ZrA) e dopo (ZrB) l'incubazione con i substrati, tenendo conto del fattore di diluizione del campione con il substrato stesso.

Tale differenza ($\Delta Zr = ZrB - ZrA$) è stata poi divisa per il tempo d'incubazione, ricavando così l'incremento dell'attività enzimatica al minuto. Dato che le unità enzimatiche internazionali (UI) sono definite come μmol di prodotto che si formano in 1 min, è necessario moltiplicare ΔZr mg/min per 1000 così da ottenere ΔZr $\mu\text{g}/\text{min}$.

Per ottenere quindi le attività enzimatiche (UI/ml di estratto) si è diviso per 180 nel caso dell'attività cellobioidrolasica ed endo-1,4- β -glucanasica e per 150 nel caso dell'attività endo-1,4- β -xilanasica. Infine, tenendo conto del rapporto iniziale tra suolo ed estraente sono state calcolate le UI/g suolo secco.

3.4.7. Determinazione delle attività ossidasiche

L'attività laccasica è stata saggiata utilizzando come substrato il 2,6-dimetossifenolo 2 mM (DMOP, $\epsilon_{477}=14600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Slomczynsky *et al.*, 1995) sospeso in tampone Walpole-Acetato 0,1 M, a pH 4. Dopo aver aggiunto in cuvetta X μl di campione e 1000-X μl di reattivo, si è effettuata una lettura spettrofotometrica in cinetica a 477 nm.

L'attività perossidasi manganese-dipendente è stata determinata utilizzando una miscela di DMAB (p-dimetilamminobenzaldeide)/MBTH (3-metil-2-benzotiazolinone idrazone).

In particolare il dosaggio veniva effettuato miscelando nell'ordine i seguenti reagenti:

- X μl di campione;
- (770-X) μl di tampone Soda-malonato 100 mM pH 4,5;
- 240 μL di DMAB 0,5 mM;
- 120 μL di MBTH 1,5 mM;
- 60 μL di MnSO_4 0,5 mM;
- 9.1 μL di H_2O_2 0,1% (v/v);

L'attività enzimatica è stata seguita in cinetica leggendo l'assorbanza dei campioni a 590 nm ($\epsilon_{590} = 53000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Questo saggio non discrimina però l'attività laccasica da quella perossidasi manganese dipendente, quindi è stato necessario effettuarne anche uno di controllo mancante di H_2O_2 e MnSO_4 per valutare il contributo dell'attività laccasica sull'attività totale saggiata incrementando il volume del tampone nella miscela di reazione fino a 839 μl .

Le attività enzimatiche sono state misurate come Unità Internazionali (UI) definite come la quantità di enzima che catalizza la formazione di 1 μmol di prodotto nell'unità di tempo nelle condizioni di dosaggio impiegate.

3.4.8. Determinazione del carbonio organico totale (TOC) e del carbonio estraibile totale (TEC):

Le determinazioni del TOC e del TEC sono state effettuate mediante retrotitolazione del bicromato di potassio con solfato ferroso ammonico. Entrambi i saggi sono stato condotto utilizzando i seguenti reagenti:

- Soluzione di bicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) 0,25 N (Carlo Erba);
- Solfato di mercurio (Sigma);
- Soluzione di H_2SO_4 concentrato al 98% (v/v) contenente solfato di argento (0,07% v/v) (Carlo Erba);
- Soluzione 0,1 N di sale di Mohr [$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$], solfato ferroso ammonico (Carlo Erba), contenente 20 ml/l di H_2SO_4 concentrato;
- Indicatore, ferroina.

Per la determinazione del TEC il campione è stato estratto in una soluzione contenente 0,1M di sodio pirofosfato e 0,1M di NaOH, lasciandolo in agitazione a 200 rpm per 24 h a temperatura ambiente mantenendo il rapporto suolo/soluzione estraente di 1:50. Gli estratti sono stati quindi recuperati centrifugando i campioni a 8000g per 10 min e filtrando successivamente il surnatante con filtri da 0,45 μm . Dopo aver eseguito opportune diluizioni 10 ml di campione sono stati aggiunti in appositi “provettoni” di vetro.

Per la determinazione del TOC quantità opportune di suolo secco (15-70mg) e 10 ml di H_2O , sono stati posti direttamente nei provettoni.

Successivamente, sono stati miscelati ad ogni campione 5 ml della soluzione di bicromato di potassio, una punta di spatola di solfato di mercurio e 15 ml di acido solforico concentrato contenente solfato di Argento.

Dopo aver posto i refrigeranti a ricadere su ogni provettone, questi venivano incubati per 2h a 160°C in un digestore ad alta temperatura modello ECO 6 con programma automatico (Velp Scientifica s.r.l., Milano). Al termine dell'incubazione, previo raffreddamento, sono stati aggiunti 40 ml di acqua deionizzata e 3-4 gocce di ferroina e l'eccesso di bicromato è stato retrotitolato con la soluzione di solfato ferroso ammonico (viraggio dal verde all'arancio).

Per ogni serie di campioni posti in ognuno dei digestori è stata effettuata una prova in bianco utilizzando acqua deionizzata al posto del campione.

La quantità di carbonio presente in ogni campione è stata quindi ricavata dalla seguente relazione:

$$\text{mg C/g suolo secco} = [(V_a - V_b) \times N \times D \times 3] / m$$

dove:

- V_a : volume di sale di Mohr usato per la titolazione del bianco;
- V_b : volume usato per la titolazione del campione;
- N : normalità del titolante;
- D : fattore di diluizione;
- 3: peso equivalente del carbonio;
- m : grammi di suolo in 10 ml di estratto ossia il volume del campione analizzato.

Titolazione del sale di Mohr:

La normalità del titolante deve essere controllata periodicamente e ciò viene fatto mediante retrotitolazione della soluzione di bicromato di potassio, che ha invece titolo noto.

La retrotitolazione è stata effettuata nel modo seguente: 5 ml della soluzione di bicromato di potassio venivano posti in un baker da 100 ml e ad essa si aggiungevano 45 ml di H_2O deionizzata e 15 ml di H_2SO_4 concentrato (senza solfato di argento). Dopo il raffreddamento della miscela si aggiungevano 2-3 gocce di ferroina e si eseguiva la retrotitolazione con la soluzione di Sale di Mohr (viraggio dal verde al rosso).

3.5. Determinazione della concentrazione dei contaminati

3.5.1. Determinazione della concentrazione residua dei contaminati nel suolo ACNA:

I campioni di suolo sono stati sottoposti ad estrazione mediante Soxhlet dotato di refrigerante a bolle, con una miscela esano-acetone (3:1 v/v) per 12 h, seguendo la procedura descritta da Novotný e collaboratori (1999). Prima dell'estrazione sono stati aggiunti ai campioni due standard interni: 2,4,6-tricloroanilina ed antracene.

Gli estratti sono stati deidratati con Na_2SO_4 e il solvente è stato eliminato mediante distillazione a pressione ridotta (Rotavapor). I residui solidi ottenuti sono stati pesati, sospesi in etil-acetato fino a raggiungere una concentrazione finale di 4 mg/ml e quindi analizzati mediante gas cromatografia associata alla spettrometria di massa (GC-MS).

Le analisi venivano condotte utilizzando uno spettrometro di massa, QP-5050 (Shimadzu, Japan) equipaggiato con una colonna capillare anAT20 (0.25mmi.d., 25m; Alltech, Deerfield, IL) utilizzando un gradiente di temperatura: T_i 100°C per 5 min, seguiti da un incremento di temperatura pari a 10°C/min fino al raggiungimento di 280°C e quindi, T_f di 280°C per 30 min. Come gas *carrier* veniva impiegato elio al flusso di 27 cm/s.

L'identificazione dei contaminati era basata sul confronto tra gli spettri ed i tempi di ritenzione relativi ai diversi campioni e quelli degli standard.

3.5.2. Determinazione della concentrazione residua degli IPA nel suolo modello:

I campioni di suolo sono stati sottoposti ad estrazione mediante Soxhlet dotato di refrigerante a bolle. Aliquote di 4 g di ciascuno dei campioni sono state estratte, per 12 h, con 200 ml di una miscela esano/acetone (3:1 v/v), assicurando la minima temperatura di ebollizione, e l'estratto è stato quindi portato a secco in Rotavapor.

Per le analisi HPLC è stata utilizzata una pompa Waters 1525 ed un rivelatore di assorbanza Waters 2487. Gli estratti secchi dei vari campioni sono stati analizzati con una colonna Envirosep-PP (Phenomenex), dimensioni 125x3,2 mm a flusso costante di 0,5 ml/min, con eluizione a gradiente (tabella 3.5) utilizzando acqua MilliQ grade e acetonitrile, Ultra Gradient 99,8% (BDH).

Tabella 3.5. Programma utilizzato durante l'analisi HPLC degli IPA

Acqua (%)	Acetonitrile (%)	Tempo (min)
50	50	0,00
48	52	2,00
48	52	8,00
30	70	20,00
30	70	27,00
0	100	36,00
0	100	40,00

3.5.3. Determinazione della concentrazione residua dei PCB:

I PCB residui sono stati estratti dai campioni di suolo utilizzando una miscela di esano/acetone (9:1 v/v) come riportato da Fava e Di Gioia (2001).

Gli estratti sono stati analizzati mediante gas cromatografia associata alla spettrometria di massa (GC-MS) utilizzando un gas cromatografo 5890 II (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA) equipaggiato con un capillare Superchem PTE-5 (0.25mmi.d., 30m, Supelco, Inc. Bellefonte, PA).

L'identificazione dei diversi congeneri di PCB era basata sul confronto, tra gli spettri ed i tempi di ritenzione relativi ai diversi campioni e quelli degli standard.

3.6. Prove ecotossicologiche

3.6.1. Test di mortalità:

La tossicità dei campioni di suolo diversamente trattati in questo lavoro di tesi è stata valutata attraverso il test di mortalità degli insetti apterigoti ubiquitari del suolo, i Collemboli, appartenenti alla specie *Folsomia candida*.

Il test veniva eseguito nel modo seguente: 20 g di suolo, come tale oppure miscelato secondo percentuali stabilite con suolo non contaminato, venivano posti in contenitori di vetro da 50 ml, umidificati con l'aggiunta di H₂O deionizzata ed inoculati con Collemboli di circa 10 giorni.

I contenitori venivano chiusi con Parafilm, forato per permettere il passaggio dell'aria, ed incubati al buio, a temperatura ambiente per 14 giorni.

L'effetto tossico è stato valutato calcolando la percentuale di mortalità dei Colemboli come riportato da D'Annibale e collaboratori (2006).

3.6.2. Determinazione dell'attività deidrogenasica:

L'attività deidrogenasica è stata determinata secondo la procedura di Dawson e collaboratori (2007).

In particolare 1g di suolo è stato miscelato ad 1ml di una soluzione all'1,5%, in tampone Tris-HCl a pH 7,5, di trifeniltetrazolio cloruro (TTC, Sigma) ed incubati a 30°C per 24h al buio.

Successivamente, il trifenilformazano (TPF), che si forma dalla riduzione del TCC, veniva estratto con 8 ml di acetone (Sigma) mantenendo i campioni in agitazione orbitale a 180 rpm per 2h.

Gli estratti sono stati quindi centrifugati ad 8000g/min per 20min, filtrati e l'assorbanza degli stessi è stata determinata attraverso letture spettrofotometriche alla lunghezza d'onda di 546 nm ($\epsilon_{546}=15,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) contro bianco (Trevors, 1984).

Come bianchi di reazione venivano utilizzati gli stessi campioni di suolo sottoposti però a sterilizzazione (121°C - 30 min) e quindi incubati ed estratti come descritto.

3.7. Analisi statistica dei dati

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante l'analisi della varianza ad una via (ANOVA). La comparazione multipla delle coppie di dati è stata eseguita, ove necessario, mediante test di Tukey. Entrambe le procedure sono state effettuate tramite il software SigmaStat 3.5.

Per l'analisi multivariata dei dati, effettuata mediante la metodica delle componenti principali (PCA), è stato invece utilizzato il software Simca-P 8.0 (Umetrics, Umea, Svezia).

3.8. Analisi molecolari

3.8.1. Estrazione ed analisi degli acidi grassi derivati dai fosfolipidi:

L'analisi degli acidi grassi derivanti dai fosfolipidi (PLFA: *Phospholipid Fatty Acid Analysis*) è stata effettuata al fine di valutare sia da un punto di vista qualitativo che semiquantitativo le comunità microbiche residenti del suolo ACNA.

L'analisi è stata condotta seguendo il metodo riportato da White e collaboratori (1979) con alcune modifiche. Gli esteri metilici degli acidi grassi presenti nei fosfolipidi (FAME), derivati dalla metanolisi condotta in ambiente alcalino e presenti nella frazione metanolica, sono stati estratti con n-esano ed analizzati mediante gas cromatografia associata a spettrometria di massa (GC-MS), come descritto da Byss e collaboratori (2007). L'analisi GC-MS è stata condotta con il sistema GCQ (Finningan, Austin, USA) dotato di una trappola ionica collegata ad uno ionizzatore esterno.

Gli standard FAME sono stati ottenuti dalla Supelco (USA) e, in particolare, sono stati utilizzati come *marker* i lipidi di membrana (Elsas *et al.*, 2007), che permettono sia il riconoscimento di gruppi batterici specifici che la distinzione tra batteri e funghi.

In particolare, i *marker* utilizzati erano i seguenti: acidi grassi ramificati terminalmente (a, i), usati per il riconoscimento dei batteri Gram positivi; acidi grassi metilati nella porzione centrale della molecola (10Me18:0), utilizzati per la discriminazione degli Actinomiceti; acidi grassi con ramificazioni ciclopropiliche, impiegati per l'individuazione dei batteri Gram negativi; acidi grassi insaturi, in particolare acidi linoleico (18:2 ω 6,9) per la differenziazione dei funghi totali.

I batteri totali venivano quantificati dalla somma dei seguenti acidi grassi: i-15:0, a-15:0, 15:0, 16:1 ω 7c, i-17:0, cy17:0, cy19:0.

3.8.2. Estrazione del DNA dai campioni di suolo:

Il DNA è stato estratto dai campioni utilizzando “PowerSoil DNA Extraction Kit” (MoBio Laboratories, USA) seguendo le istruzioni fornite dal produttore, con la sola modifica di un'ulteriore fase di lisi cellulare, oltre a quella prevista, riscaldando il campione a 70°C per 10 min. Il DNA è stato quantificato spettrofotometricamente misurando l'assorbanza dei campioni alla lunghezza d'onda di 260nm.

3.8.3. Amplificazione del gene ribosomiale 16S ed analisi DGGE:

Dal DNA metagenomico è stata amplificata la regione ipervariabile V3 del gene ribosomiale 16S utilizzando i *primers*: 341F (ATTACCGCGGCTGCTGG) e 534R (ATTACCGCGGCTGCTGG) (Muyzer *et al.*, 1993) ottenendo un frammento di circa 200bp. All'estremità 5' del *primer* 341F era legata una sequenza di circa 40 pb ricca in G e C detta *GC-clamp* necessaria a stabilizzare gli *amplicons* durante la separazione in DGGE.

Per ogni campione si utilizzava il seguente mix di reazione:

- DNA *template*: 10 ng;
- illustra™ HotStart Master Mix (GE Healthcare, UK): 1X;
- *Forward primer*: 0,4 μ M;
- *Reverse primer*: 0,4 μ M.

Le reazioni venivano condotte con un programma termico *Touch-Down* (Muyzer *et al.*, 1993): la denaturazione del *template* effettuata a 95°C per 2 min era seguita dalla

fase di *annealing* durante la quale la temperatura veniva ridotta di 0,5°C ad ogni ciclo partendo da 65°C fino a scendere a 55°C, temperatura alla quale venivano effettuati ulteriori 10 cicli.

Per ogni campione venivano effettuate reazioni di amplificazione in triplicato e i prodotti ottenuti venivano uniti e quindi concentrati con filtri Microcon Y-100 (Millipore, Bedford, MA) e separati su gel d'agarosio all'1,5% contenente etidio bromuro.

L'analisi DGGE dei frammenti è stata effettuata con il sistema INGENY phorU-2. (Ingeny International BV, Goes, NL). In particolare, per la corsa elettroforetica, è stato utilizzato un gel di poliacrilammide al 6% in TAE 0,5X (20mM Tris, 10 mM acetato, 0.5 mM Na₂EDTA; pH 7.8) contenente un gradiente lineare di urea-formamide da 40 a 60% [dove: 100% corrisponde ad urea 7 M e formamide deionizzata 40% (v/v)].

La corsa elettroforetica è stata condotta per 16 ore a 100 V alla temperatura costante di 60°C. Il gel è stato colorato con SYBR Gold (Invitrogen) in TAE 1X a temperatura ambiente per 45 min e l'immagine è stata rilevata per mezzo di un transilluminatore UV dotato di macchina fotografica (ChemIDoc, BioRad).

3.8.4. Amplificazione del gene ribosomiale 18S ed analisi DGGE:

Il gene ribosomiale 18S è stato amplificato utilizzando la coppia di primers GCfungF(CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGGCCCGCCGCCCCCGCCCCATTCCC CGTTACCCGTTG) (May *et al.*, 2001) e NS1R (GTAGTCATATGCTTGCTC) (White *et al.*, 1990). All'estremità 5' del *forward* era legata la sequenza *GC-clamp* (sottolineata) necessaria a stabilizzare gli *amplicons* durante la separazione in DGGE.

Per ogni campione si utilizzava il seguente mix di reazione:

- DNA *template*: 10 ng;
- illustra™ HotStart Master Mix (GE Healthcare, UK): 1X;
- *Forward primer*: 0,8 µM;
- *Reverse primer*: 0,8 µM.

Le reazioni venivano condotte seguendo il programma termico riportato di seguito: l'iniziale denaturazione a 95°C per 3 min, era seguita da 35 cicli a 94°C per 30 sec, 55°C per 30 sec e 72°C per 1 min con estensione finale a 72°C per 5 min.

L'analisi DGGE dei frammenti è stata effettuata utilizzando un gel di poliacrilammide all'8% in TAE 0,5X contenente un gradiente lineare di urea-formamide da 20 a 40%.

La corsa elettroforetica è stata condotta per 16 ore a 100 V alla temperatura costante di 60°C. Il gel è stato colorato con SYBR Gold (Invitrogen) in TAE 1X a temperatura ambiente per 45 min e l'immagine è stata rilevata per mezzo di un transilluminatore UV dotato di macchina fotografica (ChemiDoc, BioRad).

3.8.5. Analisi digitale e statistica dei profili DGGE:

L'analisi delle immagini relative alle corse elettroforetiche in DGGE veniva effettuata attraverso l'utilizzo del software Quantity-one image analysis (versione 4.2.5 Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) stimando la biodiversità delle specie batteriche o fungine nei diversi campioni attraverso i seguenti indici:

- *Richness* (S): numero di bande in ogni linea
- Indice di *Shannon-Weaver* (H) = $-\sum(n_i/N)\log(n_i/N)$,

dove:

n_i = altezza del picco relativo ad ogni banda;

N = somma di tutti i picchi relativi alle bande di una linea.

Inoltre, attraverso l'analisi dell'immagine era possibile generare dei dendrogrammi sulla base della matrice di similarità calcolata utilizzando l'indice di Dice.

3.8.6. Costruzione e screening di librerie di clonaggio del gene ribosomiale 16S:

Il gene ribosomiale 16S è stato amplificato, in questo caso, utilizzando la coppia di primers 8F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 1507R (TACCTTGTTACGACTT; Dunbar *et al.*, 2001).

Per ogni campione si utilizzava il seguente mix di reazione:

- DNA *template*: 10 ng;
- illustra™ HotStart Master Mix (GE Healthcare, UK): 1X;
- *Forward primer*: 0,8 μM;
- *Reverse primer*: 0,8 μM.

Le reazioni venivano condotte seguendo il programma termico riportato di seguito: l'iniziale denaturazione a 95°C per 3 min, era seguita da 30 cicli a 94°C per 1 min, 50°C per 45 sec e 72°C per 2 min con estensione finale a 72°C per 15 min.

I prodotti di PCR venivano clonati utilizzando TOPO-TA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguendo le istruzioni fornite dal kit stesso e lo *screening* dei cloni ottenuti è stato eseguito attraverso DGGE oppure RFLP.

Screening per DGGE: i cloni venivano vagliati al fine di identificare le sequenze corrispondenti a bande DGGE selezionate, seguendo il metodo proposto da Gonzalez e collaboratori (2003). In particolare, in una prima reazione di amplificazione si utilizzavano come *template* un *pool* di 5 colonie “picchettate” casualmente dalle piastre su cui venivano fatte sviluppare. Le colonie erano quindi sospese nel tampone utilizzato per la reazione di amplificazione, sottoposte a lisi a 95°C per 10 min ed, in seguito all’aggiunta dei *primers* (T3 e T7; 0,1 µM) dei dNTPs (0,25 mM) del MgCl₂ (2,5 mM) e della Taq-Polimerasi (0,02; Fermentas) venivano sottoposte ad amplificazione seguendo il profilo termico riportato di seguito: denaturazione iniziale a 95°C per 3 min, seguita da 30 cicli a 94°C per 1 min, 50°C per 45 sec e 72°C per 2 min con estensione finale a 72°C per 15 min. Questo primo *step* di amplificazione era effettuato al fine di estrarre l’insero dal plasmide contenuto nelle cellule ospiti, escludendo però dall’amplificazione il gene ribosomiale 16S delle stesse.

La regione V3 di questo *pool* di colonie veniva quindi amplificata attraverso una *nested* PCR in cui si utilizzava la coppia di *primers* 341F - 534R secondo le modalità descritte precedentemente. Una prima analisi DGGE veniva effettuata quindi sui prodotti di PCR ottenuti confrontando la loro migrazione con le bande originatesi dall’amplificazione del DNA metagenomico dei campioni originali, utilizzate come riferimento.

Da questa prima corsa venivano selezionati i *pool* di cloni contenenti il maggior numero di bande co-migranti con quelle di riferimento. Tali colonie venivano quindi sottoposte, separatamente ai due *step* di amplificazione, descritti sopra, e successivamente analizzati in DGGE al fine di confermare la similarità di migrazione con le bande derivate dai campioni originali.

Screening per RFLP: l’insero contenente il gene ribosomiale 16S veniva estratto dal plasmide attraverso una reazione di amplificazione in cui si utilizzava come *template* un una colonia “picchettata” casualmente dalle piastre su cui venivano fatti sviluppare i cloni derivati dalle librerie di clonaggio. La colonia era sospesa nel tampone utilizzato per la reazione di amplificazione, sottoposta a lisi a 95°C per 10 min e, quindi, la regione contenente l’insero veniva amplificata utilizzando i *primers* del vettore, T3 e T7 impiegando lo stesso mix di reazione e lo stesso profilo termico descritto precedentemente per il primo *step* di amplificazione.

I prodotti di PCR ottenuti venivano purificati utilizzando QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) e 15 µl degli stessi erano sottoposti a digestione con 5U dell'enzima di restrizione HaeII (Roche) a 37°C per 2h.

I frammenti ottenuti dalla digestione venivano separati su gel d'agarosio al 2,5% contenente etidio bromuro e quindi, i cloni da cui si ottenevano profili differenti venivano selezionati per il successivo sequenziamento.

3.8.7. Estrazione del DNA plasmidico, sequenziamento, editing ed allineamento delle sequenze:

Il DNA plasmidico dei cloni di nostro interesse è stato estratto utilizzando QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) seguendo le istruzioni fornite dal produttore del kit.

Gli inserti sono stati amplificati in entrambe le direzioni, utilizzando i *primers* T3 e T7 attraverso il servizio fornito da MWG.

Le sequenze ottenute sono state editate ed allineate attraverso le applicazione del software Lasergene e quindi confrontate con quelle depositate nelle banche dati GenBank ed RDP al fine di ottenere una loro assegnazione tassonomica.

3.8.8. PCR Quantitativa:

Attraverso qRT-PCR è stata effettuata una quantificazione relativa del gene ribosomiale 16S, e dei geni funzionali *nahAc*, NAH (codificanti 2 diverse classi di naftalene-diossigenasi), BPH (codificante la bifenil-diossigenasi) e C-230 (codificante la catecolo 2,3-diossigenasi). In tabella 3.6 vengono riportate le sequenze, le concentrazioni alle quali venivano utilizzati per ogni reazione, le temperature di *annealing* (Ta) e gli autori dai quali sono stati riportati i *primers* utilizzati nelle reazioni di Real Time-PCR.

Tabella 3.6. Principali caratteristiche dei primers utilizzati in qRT-PCR.

<i>Primers</i>	<i>Target</i>	<i>Sequenza</i>	<i>Concentrazione dei Primers utilizzata (μM)</i>	<i>Ta (°C)</i>	<i>References</i>
341F	regione V3 del 6S rDNA	CCTACGGGAGGCAGCAG	0,05	55	Muyzer <i>et al.</i> , 1993
534R		ATTACCGCGGCTGCTGG	0,9		
nahA_c_f	Naftale-diossigenasi	TGGCGATGAAGAACCTTTCC	0,2	55	Park & Crowley, 2006
nahA_c_r		AACGTACGCTGAACCGAGTC	0,2		
NAH-F	Naftale-diossigenasi	CAAAARCACCTGATTYATGG	0,3	47	Baldwin <i>et al.</i> , 2003
NAH-R		A YRCGRGSGACTTCTTTCAA	0,3		
BPH3-F	Bifenil-diossigenasi	CCGGGAGAACGGCAGGATC	0,4	60	Baldwin <i>et al.</i> , 2003
BPH3-R		TGCTCCGCTGCGAACTTC	0,4		
C230_f	Catecolo 2,3-diossigenasi	AAGAGGCATGGGGCGCACCGGTTCGATCA	0,2	57	Sei <i>et al.</i> , 1999
C230_r		CCAGCAAACACCTCGTTGCGGTTGCC	0,2		

Ogni reazione veniva condotta in un volume finale di 25 μ l contenente:

- 7,5 μ l di *template*;
- 12,5 μ l di 2X SYBR Green JumpStart Taq mix (Sigma).
- 7,5 μ l di ognuno dei primers opportunamente diluito al fine di raggiungere la concentrazione finale riportata in tabella 3.6.

Le reazioni venivano condotte seguendo il programma termico riportato di seguito: l'iniziale denaturazione del *template* a 95 °C per 5 min era seguita da 50 cicli a 94°C per 20 sec, Ta (riportata in tabella 3.6) per 20 sec e 72°C per 30 sec. L'analisi dei dati è stata effettuata attraverso il software iCycler (versione 3.0; BioRad); ogni risultato veniva espresso come “*fold*” rispetto al valore di Ct (Ciclo soglia) di ogni campione all'inizio dell'incubazione e riportato come logaritmo.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Effetto combinato di agenti mobilizzanti e micorisanamento sulle popolazioni microbiche autoctone in suolo contaminato “ad hoc” con miscela di IPA:

Per valutare quale fosse l'effetto combinato dell'uso di diversi agenti mobilizzanti (AM) e di processi di micorisanamento sulle popolazioni batteriche autoctone di un suolo modello, contaminato “ad hoc” in laboratorio con una miscela di sette Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA), sono state condotte due diverse prove nelle quali si utilizzavano combinazioni differenti di AM e ceppi fungini.

In particolare, nel primo esperimento sono stati impiegati come AM Tween 20 (TW20) ed 80 (TW80) ed olio di soia (OS); il processo di biorisanamento veniva condotto con due ceppi fungini, *Allescheriella* sp. DABAC 1 e *Phlebia* sp. DABAC 9, precedentemente isolati da un suolo storicamente contaminato (D'Annibale *et al.*, 2006).

Nella seconda prova, oltre ai tre precedenti AM venivano impiegati anche RAMEB (costituito da una miscela di β -ciclodestrine metilate) ed acque di vegetazione delle olive (AV); il biottrattamento veniva eseguito con i ceppi fungini *Irpex lacteus* 617/93 e *Pleurotus ostreatus* 3004.

4.1.1. Degradazione degli IPA nel suolo biottrattato con *Allescheriella* sp. e *Phlebia* sp.:

La degradazione degli IPA, dopo 45 giorni di incubazione, è stata determinata sia nei suoli sottoposti al biottrattamento con i due ceppi fungini, in assenza ed in presenza dei diversi AM, che nei rispettivi controlli di incubazione (suoli ammendati con paglia di mais e trattati con i vari AM) allo scopo di valutare il possibile contributo sulla deplezione degli stessi, di fattori abiotici o della microflora indigena.

In figura 4.1 viene riportata una visione complessiva dei livelli di degradazione degli IPA, espressa come peso totale dei contaminati (TWOC: *Total Weight of Organic Contaminants*), nei controlli di incubazione e nei suoli sottoposti al micorisanamento dopo 45 giorni di incubazione.

L'OS, nel controllo di incubazione, era l'unico AM in grado di provocare un aumento significativo di deplezione dei contaminanti. Tale effetto era riscontrabile anche nel caso del suolo sottoposto a biorisanamento con *Phlebia* sp. dove, in presenza

di OS si raggiungeva una percentuale di decontaminazione maggiore (31,4% in più) rispetto a quella ottenuta nel suolo biottrattato con il fungo ma in assenza di AM.

E' noto, infatti, che gli oli di semi, come l'OS, hanno un rapporto molare di solubilità per gli IPA simile a quello dei surfattanti sintetici e per questo, sono in grado di aumentare il desorbimento dei contaminanti idrofobici dalle particelle di suolo (Bogan & Lamar, 1999; Pannu *et al.*, 2004; Pizzul *et al.*, 2007). Inoltre, l'OS, per il suo alto contenuto in acidi grassi polinsaturi, è soggetto a perossidazione innescata dagli enzimi ligninolitici prodotti dai funghi *white-rot*, e tale meccanismo, sembra avere un ruolo rilevante nell'ossidazione degli IPA da parte di questo gruppo di funghi (Moen & Hammamel, 1994; Böhmer *et al.*, 1998).

Nel processo condotto con il ceppo *Allescheriella sp.* le migliori *performance* degradative si ottenevano, invece, nel suolo trattato con TW20 ove si raggiungeva una diminuzione del TWOC pari al 21,6% rispetto al biottrattamento fungino senza l'aggiunta di alcun AM.

Studi precedenti riportati in letteratura confermano l'efficacia dell'utilizzo di questa classe di surfattanti non-ionici, in combinazione con diversi ceppi fungini, nella rimozione di IPA sia in colture liquide (Kotterman *et al.*, 1998; Zheng & Obbard 2000) che in prove condotte direttamente su suolo (Marquez-Rocha *et al.*, 2000).

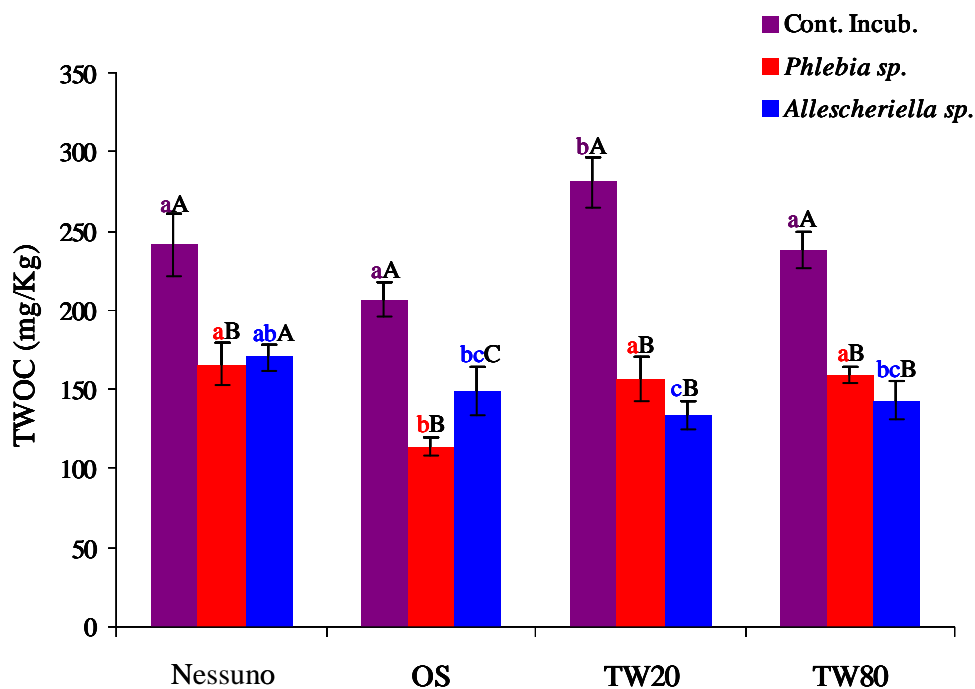


Figura 4.1. Peso totale dei contaminanti organici (TWOC) nel controllo di incubazione e nei suoli dopo biotattamento con *Allescheriella sp.* e *Phlebia sp.* in presenza ed in assenza di agenti mobilizzanti. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata attraverso il test di Tukey: le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali, e dello stesso colore delle barre nell'istogramma, indicano assenza di differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra suoli sottoposti allo stesso trattamento ma ammendati con diversi AM; lettere maiuscole uguali indicano, invece, assenza di differenze statisticamente significative tra i vari gruppi di campioni trattati con lo stesso AM. **Nessuno**: assenza di AM, **OS**: Olio di Soia, **TW20**: Tween 20, **TW80** Tween 80.

4.1.2. Detossificazione del suolo biotattato con *Allescheriella sp.* e *Phlebia sp.*:

Per valutare i livelli di detossificazione dei suoli sottoposti ai diversi trattamenti è stata quantificata l'attività deidrogenasica batterica, un indice ecologico indiretto piuttosto efficiente nell'analisi di suoli contaminati da idrocarburi aromatici (Dawson *et al.*, 2007).

Nel suolo biotattato con *Phlebia sp.* un livello statisticamente significativo di detossificazione del suolo era riscontrabile solo in presenza di TW80; mentre nel caso di *Allescheriella sp.* il maggior grado si raggiungeva nel suolo in cui non erano presenti AM. Livelli superiori rispetto a quelli raggiunti con *Phlebia sp.* erano comunque evidenti anche in presenza degli AM testati (Figura 4.2).

Questi risultati non erano, comunque, in linea con quelli relativi al grado di detossificazione del suolo sottoposto al micorisanamento fungino, dato che, la concentrazione minore di IPA dopo il trattamento veniva rilevata in seguito all'inoculo del suolo stesso con *Phlebia* sp. e non con *Allescheriella* sp.

Questo effetto era stato già riscontrato in un precedente lavoro svolto nel nostro laboratorio (D'Annibale et al., 2006) dal quale era emerso che, sebbene *Allescheriella* sp. svolgesse una minore azione decontaminante rispetto ad altri ceppi isolati da un suolo storicamente contaminato, il suo utilizzo portava comunque a livelli simili di detossificazione rispetto agli altri funghi.

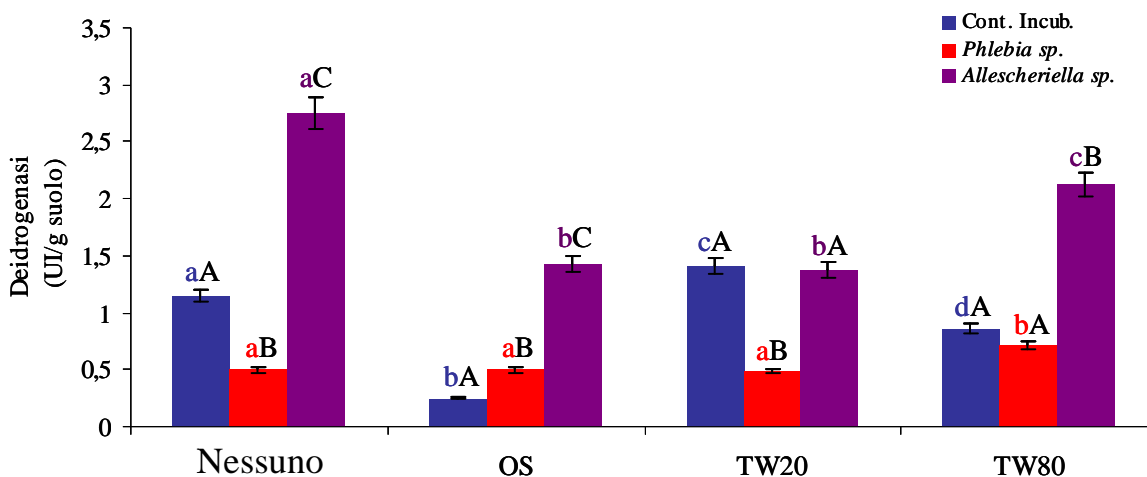


Figura 4.2. Attività deidrogenasica nel controllo di incubazione e nei suoli dopo il biottrattamento con *Allescheriella* sp. e *Phlebia* sp. in presenza ed in assenza di agenti mobilizzanti. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata attraverso il test di Tukey: le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali, e dello stesso colore delle barre nell'istogramma, indicano differenze statisticamente non significative ($P < 0,05$) tra suoli sottoposti allo stesso trattamento ma ammendati con diversi AM; lettere maiuscole uguali indicano invece, differenze statisticamente non significative tra i vari gruppi di campioni trattati con lo stesso AM. **Nessuno**: assenza di AM, **OS**: Olio di Soia, **TW20**: Tween 20, **TW80** Tween 80.

4.1.3. Concentrazione dei batteri eterotrofi coltivabili nel suolo biottrattato con *Allescheriella sp.* e *Phlebia sp.*:

La degradazione fungina degli idrocarburi aromatici porta in molti casi all'accumulo nel suolo di metaboliti (Vyas *et al.*, 1994; Andersson & Henrysoon 1996) o prodotti non mineralizzabili dal fungo stesso ed è proprio per questo motivo che, generalmente, l'azione della microflora batterica è richiesta al fine di completare tali processi metabolici (in der Wiesche *et al.*, 1996; Kotterman *et al.*, 1998).

Seguendo tale principio, in questo lavoro è stato valutato l'impatto degli AM e dei processi di micorisanamento sulla microflora residente, ponendo l'attenzione sia sulla frazione coltivabile che su quella totale comprendente anche la porzione non coltivabile, come verrà mostrato in seguito.

Nel suolo pristino dopo 45 giorni di incubazione, l'aggiunta dei diversi agenti mobilizzanti non provocava variazioni statisticamente significative, rispetto allo stesso suolo non ammendato con alcun AM, nella concentrazione della microflora coltivabile endogena (Figura 4.3). La densità microbica risultava invece drasticamente ridotta sia nel controllo di incubazione che nel suolo inoculato con *Phlebia sp.* in presenza di OS e TW80 (Figura 4.3). L'effetto negativo dell'OS sui batteri coltivabili è stato già riportato in precedenza da altri autori e nella maggior parte dei casi questo può essere dovuto sia allo sbilanciamento tra il carbonio, fornito attraverso la sua aggiunta, ed i nutrienti presenti nel suolo (Pizzul *et al.*, 2007), che dalla possibile formazione di una barriera fisica che impedisce gli scambi gassosi attraverso la matrice (Borden, 2007).

Nel suolo sottoposto a micorisanamento con *Allescheriella sp.*, la carica microbica non differiva significativamente in nessuno dei campioni, indipendentemente dall'aggiunta o meno di AM o dal tipo di AM impiegato (Figura 4.3).

Infine, dal confronto tra le concentrazioni di batteri coltivabili nei controlli di incubazione e nei suoli sottosti ai processi di biorisanamento fungino emergeva che i funghi stessi esercitavano, comunque, un generale effetto positivo sullo sviluppo della microflora residente (Figura 4.3).

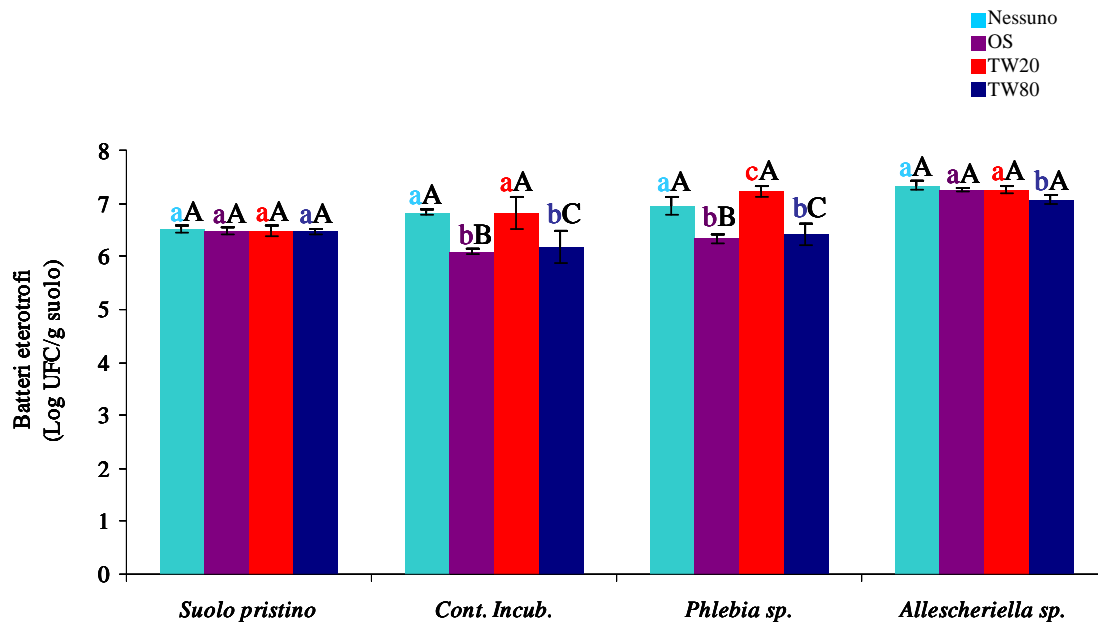


Figura 4.3. Concentrazione dei batteri eterotrofi nel suolo pristino, nel controllo di incubazione e nei suoli dopo biotratamento con *Allescheriella sp.* e *Phlebia sp.* in presenza ed in assenza di agenti mobilizzati. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata attraverso il test di Tukey: le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali, e dello stesso colore delle barre nell'istogramma, indicano assenza di differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra suoli sottoposti ai diversi trattamenti ed ammendati con lo stesso AM; lettere maiuscole uguali indicano, invece, assenza di differenze statisticamente significative tra i vari gruppi di campioni trattati allo stesso modo ma ammendati con AM diversi. **Nessuno**: assenza di AM, **OS**: Olio di Soia, **TW20**: Tween 20, **TW80** Tween 80.

4.1.4. Effetto degli agenti mobilizzanti e del micorisanamento con *Allescheriella sp.* e *Phlebia sp.* sulla struttura delle popolazioni batteriche autoctone:

E' noto che i batteri coltivabili rappresentano solo una frazione minoritaria rispetto alla reale biodiversità di un campione ambientale, ed è per questo, che in questo lavoro di tesi sono stati utilizzati anche degli approcci indipendenti da coltivazione per ottenere una visione il più completa possibile riguardo l'impatto di agenti esterni, quali AM e funghi, sulla struttura delle popolazioni batteriche autoctone.

In questo primo esperimento, l'analisi DGGE (Figura 4.4), condotta sui prodotti di amplificazione della regione V3 del gene ribosomiale 16S, dimostrava che nel controllo

di incubazione in assenza di AM, entrambi gli indici di biodiversità stimati, *richness* e *Shannon-Weaver*, non differivano significativamente dagli stessi nel suolo pristino. Entrambi questi parametri risultavano comunque aumentati nei controlli di incubazione trattati con gli AM e i valori più elevati erano osservabili nei suoli sottoposti al micorisanamento con entrambi i ceppi fungini (Tabella 4.1).

In particolare, nel caso di *Phlebia* sp., il grado maggiore di biodiversità batterica si otteneva in presenza di entrambi i surfactanti non-ionici utilizzati (TW20 - TW80) mentre non si riscontravano differenze tra la presenza, il tipo o l'assenza di AM, sulla biodiversità batterica nei suoli sottoposti a micorisanamento con *Allescheriella* sp.

Per quanto riguarda l'impatto di inoculi fungini sulla struttura delle popolazioni batteriche residenti di suoli contaminati, in letteratura sono riportati effetti variabili che possono essere sia l'instaurazione di rapporti di inibizione (Andersson *et al.*, 2003), che di stimolazione (Wu *et al.*, 2008) reciproca.

In figura 4.5 viene riportato il dendrogramma generato dalla matrice di similarità, basata sulla posizione comune delle bande, tra le linee corrispondenti ai diversi campioni, e costruito usando il metodo UPGMA (*Unweighed Pair Group Method with Arithmetic means*). E' interessante sottolineare il fatto che i diversi controlli di incubazione ed i suoli biottrattati con i due funghi costituiscono due *cluster* separati con una percentuale di similarità pari al 47%, con la sola eccezione del controllo di incubazione senza l'aggiunta di AM che entra a far parte dello stesso raggruppamento dei campioni relativi ai suoli micorisanati.

L'insorgenza di limitate modificazioni, sulla struttura delle popolazioni batteriche, in seguito alla sola incubazione del suolo per 45 giorni o all'aggiunta degli AM, era inoltre dimostrata dal fatto che tutti i controlli di incubazione ammendati con i diversi surfactanti generavano un unico *cluster* nel quale era presente anche il suolo pristino.

Infine, un'ulteriore aspetto rilevante era rappresentato dal fatto che, in tutti e tre le tipologie di trattamento a cui il suolo veniva sottoposto (aggiunta di paglia di mais, inoculo con *Phlebia* sp., inoculo con *Allescheriella* sp.), tutti i campioni in cui era presente TW20 e TW80 erano altamente simili (71%, 75%, 82%, rispettivamente) a dimostrazione del fatto che tali surfactanti avevano un impatto notevole sulla similarità tra le specie batteriche principalmente presenti in tali campioni.

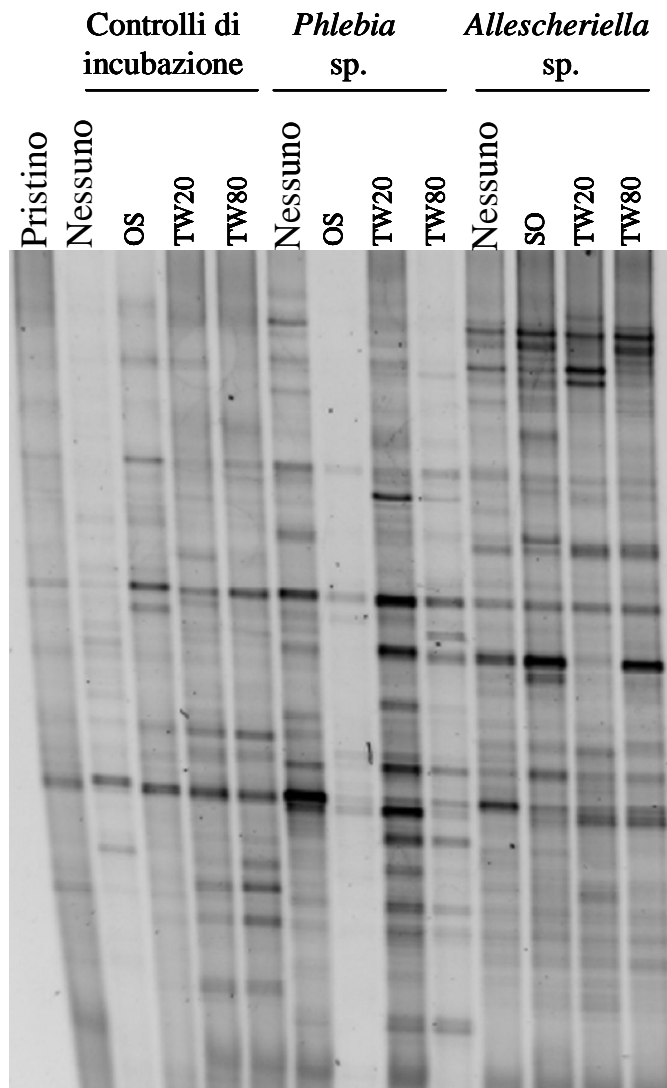


Figura 4.4. Profilo DGGE dei diversi campioni analizzati. **Pristino:** Suolo come tale dopo 45 giorni di incubazione, **Nessuno:** assenza di AM, **OS:** Olio di Soia, **TW20:** Tween 20, **TW80** Tween 80.

Tabella 4.1. Indici di biodiversità stimati nei campioni sottoposti ai vari trattamenti

Tipo di campione	Shannon-Weaver (H)	Richness (R)
Pristino	0,97	15
Nessuno/Contr.Incub.	0,98	17
OS/Contr.Incub.	1,03	20
TW20/Contr.Incub.	1,18	23
TW80/Contr.Incub.	1,11	19
Nessuno/ <i>Phlebia</i> sp.	1,26	28
OS/ <i>Phlebia</i> sp.	0,95	17
TW20/ <i>Phlebia</i> sp.	1,29	33
TW80/ <i>Phlebia</i> sp.	1,24	26
Nessuno/ <i>Allescheriella</i> sp.	1,3	31
OS/ <i>Allescheriella</i> sp.	1,25	27
TW20/ <i>Allescheriella</i> sp.	1,23	29
TW80/ <i>Allescheriella</i> sp.	1,27	32

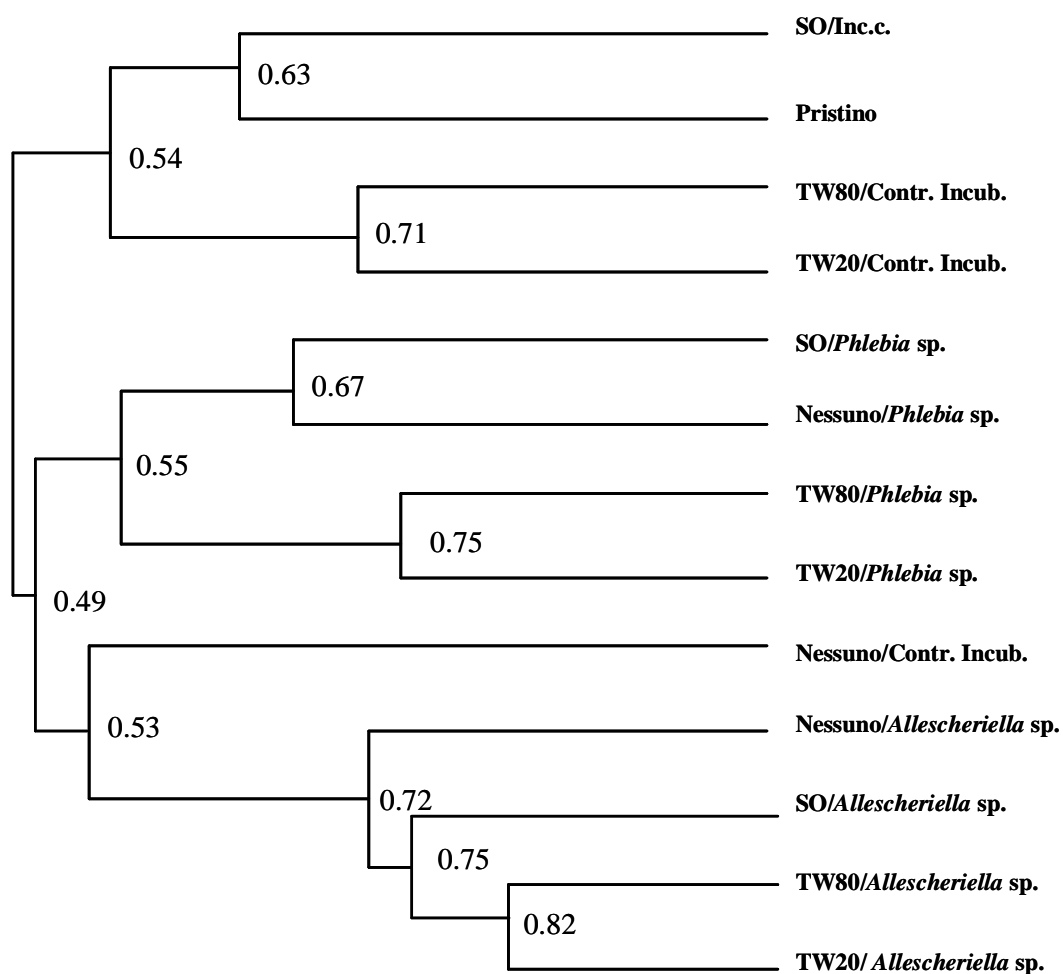


Figura 4.5. Dendrogramma generato dalla matrice di similarità, basata sulla posizione comune delle bande, tra le linee corrispondenti ai diversi campioni, e costruita usando il metodo WPGMA (*Unweighed Pair Group Method with Arithmetic means*). **Pristino:** Suolo come tale incubato per 45 giorni, **Nessuno:** assenza di AM, **OS:** Olio di Soia, **TW20:** Tween 20, **TW80** Tween 80.

4.1.5. Degradazione degli IPA nel suolo biottrattato con *I. lacteus* e *P. ostreatus*:

Il livello di degradazione degli IPA è stato determinato, nel suolo biottrattato con i due ceppi fungini, sia in assenza che in presenza dei diversi AM ed inoltre, per stabilire il possibile contributo degradativo di fattori abiotici e della microflora indigena, la stessa determinazione è stata effettuata anche nei rispettivi controlli di incubazione.

In figura 4.6 sono riportati i livelli di detossificazione, in termini di peso totale dei contaminanti (TOWC) dopo 45 giorni di incubazione, nei suoli biottrattati e nei controlli di incubazione. Per quanto riguarda l'effetto degli agenti mobilizzanti sulla *performance* degradativa dei due funghi, l'OS risultava essere il migliore AM nel micorisanamento con entrambi i ceppi. Oltre all'OS anche il TW20 ed il TW80 avevano un effetto positivo sulle potenzialità degradative di *I. lacteus* e *P. ostreatus*, rispettivamente. Questi risultati sono in linea con studi precedenti nei quali veniva riportato un marcato aumento della *performance* degradativa in colture liquide (Kotterman *et al.*, 1998), in bioreattori *slurry* (Zheng & Obbard, 2001) e in un suolo contaminato da IPA (Marquez-Rocha *et al.*, 2000) in seguito all'utilizzo dei due Tween.

La concentrazione residua dei contaminanti, rilevata nel suolo ammendato con RAMEB e biottrattato con *P. ostreatus*, non differiva significativamente da quella rilevata nel suolo senza AM, mentre era evidente la situazione contraria nel caso del biottrattamento con *I. lacteus*. Da quanto già riportato in letteratura, infatti, l'effetto dell'uso delle ciclodestrine come AM è controverso: mentre, come riportato da Boyle (2006), non si osservava un significativo aumento nella deplezione dei contaminanti da parte di *Trametes hirsute* in seguito all'aggiunta di tali surfattanti; la degradazione del fluorene operata da *Absidia cylindrospora* veniva notevolmente aumentata dall'aggiunta di maltosil-ciclodestrine in reattore *slurry* (Garon *et al.*, 2002).

L'aumento dell'attività degradativa è stata infine osservata, per entrambi i funghi, nel caso dell'utilizzo delle AV come AM. Rispetto ai relativi controlli di incubazione, infatti, si avevano valori di TWOC pari a 94,7 mg/kg contro 201,3 mg/kg nel caso di *I. lacteus* e 119,5 mg/kg contro 160,4 mg/kg nel biottrattamento con *P. ostreatus*. Questi risultati confermavano il possibile utilizzo delle AV come putativi AM in base al loro contenuto in lipidi, sostanze umiche (Capasso *et al.*, 2002) e fenoli monomerici, come gli acidi 4-idrossi benzoico e 4-idrossi benzilico che, agendo da mediatori redox nell'ossidazione degli IPA da parte delle laccasi fungine, ne aumentano la loro degradazione (Johannes & Majcherczyl, 2000).

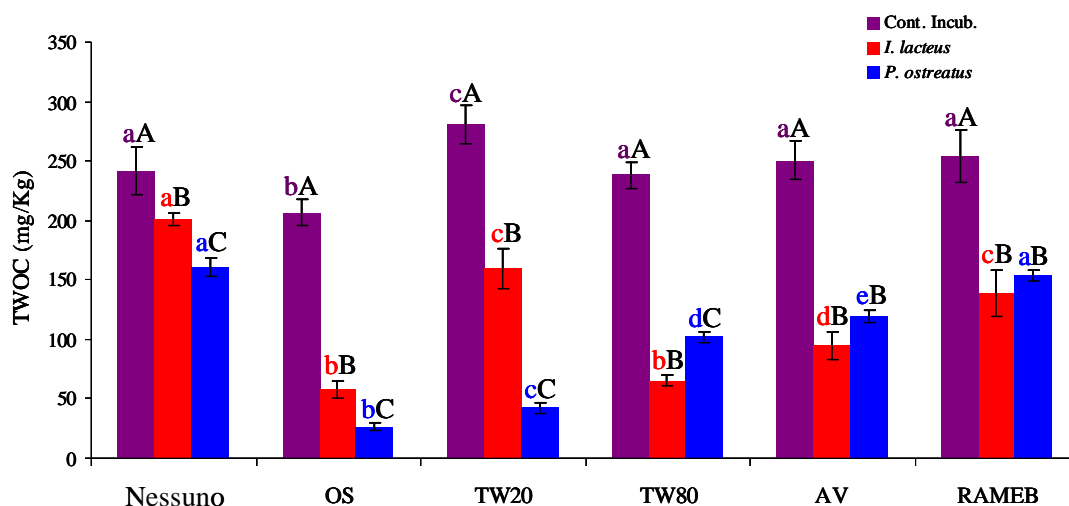


Figura 4.6. Peso totale dei contaminanti organici (TWOC) nei controlli di incubazione e nei suoli dopo biottrattamento con *I. lacteus* e *P. ostreatus* in presenza ed in assenza di agenti mobilizzanti. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata attraverso il test di Tukey: le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali, e dello stesso colore delle barre nell'istogramma, indicano assenza di differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra i suoli trattati allo stesso modo ma ammendati con i diversi AM; lettere maiuscole uguali indicano, invece, assenza di differenze statisticamente significative tra i gruppi di suoli trattati diversamente ma ammendati con lo stesso AM. **Nessuno:** assenza di agenti mobilizzanti, AM. **OS:** Olio di Soia, **TW20:** Tween 20, **TW80:** Tween 80, **AV:** Acque di vegetazione, **RAMEB:** β -ciclodestrine metilate.

4.1.6. Detossificazione del suolo biottrattato con *I. lacteus* e *P. ostreatus*:

Come indicatore biologico indiretto del livello di detossificazione del suolo, è stata quantificata l'attività deidrogenasica, indice ecologico piuttosto efficiente nell'analisi di suoli contaminati da idrocarburi (Dawson *et al.*, 2007).

Come riportato in figura 4.7, nel controllo di incubazione l'aggiunta di OS e delle AV portava ad una notevole diminuzione dell'attività deidrogenasica in confronto a quello che si osservava in assenza di AM. In molti casi, comunque, erano evidenti differenze statisticamente significative tra i suoli biottrattati con i funghi ed i relativi controlli di incubazione, particolarmente marcate nel micorisanamento con *I. lacteus*, indipendentemente dall'AM impiegato.

Non vi era, comunque, una diretta correlazione tra l'attività deidrogenasica ed i relativi valori di TWOC o di biodiversità batterica (mostrata di seguito) nelle diverse tipologie di trattamento.

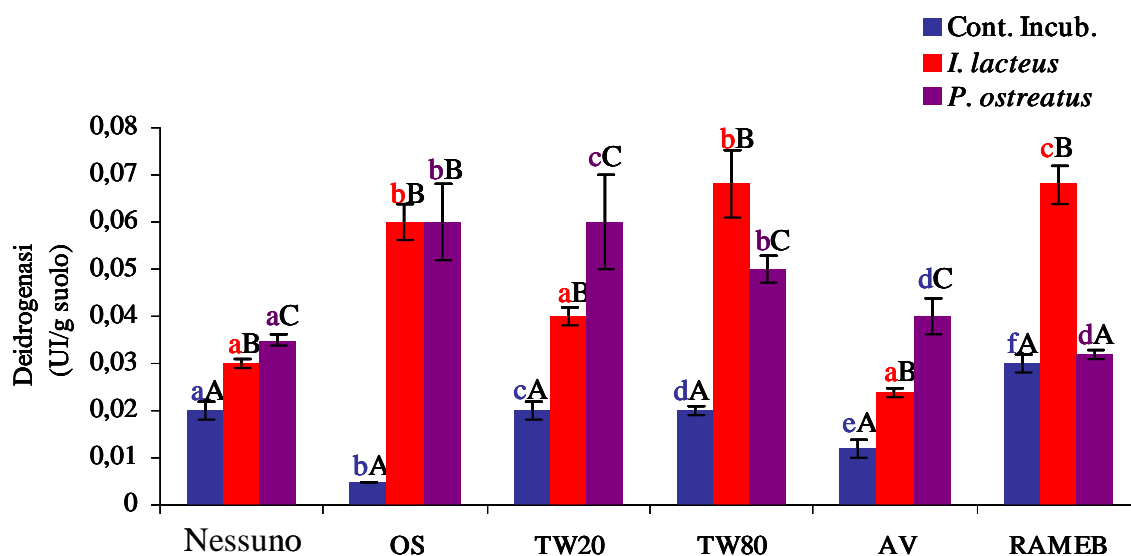


Figura 4.7. Attività deidrogenasica nei controlli di incubazione e nei suoli dopo biottrattamento con *I. lacteus* e *P. ostreatus* in presenza ed in assenza di agenti mobilizzanti. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata attraverso il test di Tukey: le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali, e dello stesso colore delle barre nell'istogramma, indicano assenza di differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra i suoli trattati allo stesso modo ma ammendati con i diversi AM; lettere maiuscole uguali indicano, invece, assenza di differenze statisticamente significative tra i gruppi di suoli trattati diversamente ma ammendati con lo stesso AM. **Nessuno:** assenza di agenti mobilizzanti, AM. **OS:** Olio di Soia, **TW20:** Tween 20, **TW80:** Tween 80, **AV:** Acque di vegetazione, **RAMEB:** β -ciclodestrine metilate.

4.1.7. Concentrazione dei batteri eterotrofi coltivabili nel suolo biottrattato con *I. lacteus* e *P. ostreatus*:

Per valutare quale fosse l'impatto dei diversi trattamenti del suolo sulla frazione coltivabile delle popolazioni batteriche autoctone, sono state effettuate delle conte vitali su piastra.

Come riportato in figura 4.8, con la sola eccezione nel caso in cui si utilizzavano le AV ($1,09 \times 10^6$ UFC/g suolo), l'aggiunta degli AM non provocava una riduzione nel numero di batteri eterotrofi coltivabili nel suolo pristino (tutti i dati rientravano nel range $2,95-3,32 \times 10^9$ UFC/g suolo) mentre si osservava una significativa diminuzione della carica microbica nel controllo di incubazione e nei suoli sottoposti a micorisanamento sia in presenza di OS che di AV.

L'effetto negativo dell'OS sui batteri coltivabili, come già riportato precedentemente, può essere imputabile allo sbilanciamento tra il carbonio fornito ed i nutrienti presenti nel suolo, cosa recentemente confermata da Pizzul e collaboratori (2007). Inoltre, in base alle sue proprietà chimico-fisiche, l'OS può creare una barriera per gli scambi gassosi; è, però, proprio la capacità di formare bio-barriere a rendere promettente l'utilizzo di oli vegetali su larga scala nel risanamento di suoli contaminati da composti alifatici clorurati (Borden, 2007). Sebbene gli scambi gassosi possono essere compromessi è difficile supporre un effetto marcato dell'OS in tal senso dato che, in queste prove, la concentrazione a cui veniva aggiunto era notevolmente più bassa (2,5% p/p) rispetto a quella riportata in studi precedenti, condotti con oli vegetali diversi, in cui si era dimostrata la necessità di utilizzarne concentrazioni maggiori per favorire il desorbimento ed il trasferimento alla fase acquosa degli IPA (Bogan & Lamar, 1999; Bogan *et al.*, 2003).

Anche se l'effetto negativo sulla crescita batterica dell'OS e delle AV era evidente nei suoli sottoposti al micorisanamento fungino, era possibile osservare, comunque, un generalizzato aumento del numero di batteri eterotrofi totali rispetto ai relativi controlli di incubazione (Figura 4.8) a dimostrazione, quindi, di un effetto non competitivo tra le specie batteriche coltivabili autoctone ed i ceppi fungini esogeni impiegati nel biottrattamento.

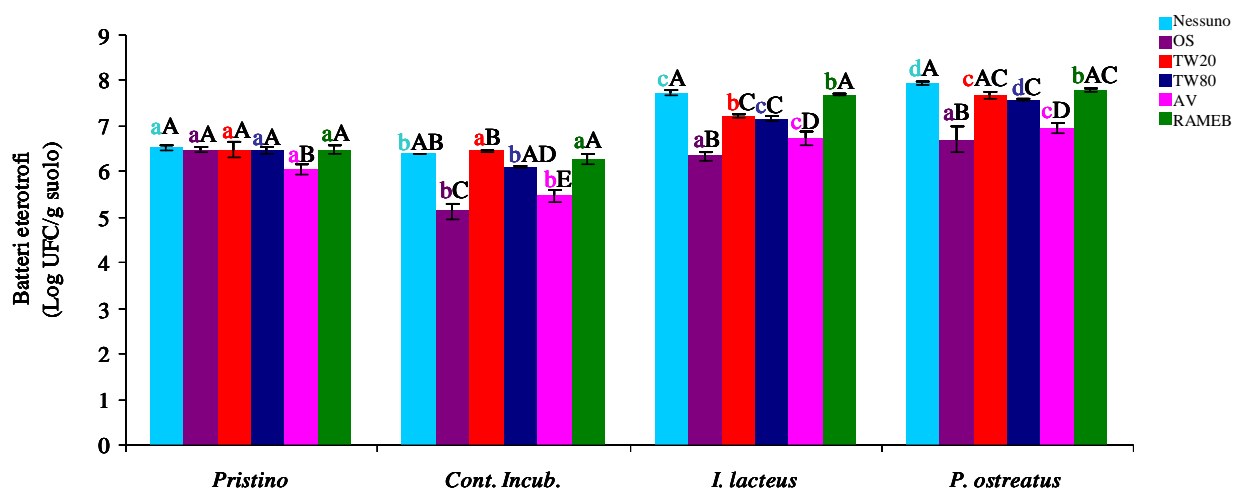


Figura 4.8. Concentrazione di batteri coltivabili nel suolo pristino, nei controlli di incubazione e nei suoli dopo biotattamento con *I. lacteus* e *P. ostreatus* in presenza ed in assenza di agenti mobilizzanti. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante test di Tukey: le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali, e dello stesso colore delle barre nell'istogramma, indicano assenza di differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra suoli trattati in modo differente ed ammendati con lo stesso AM, mentre lettere maiuscole uguali indicano assenza di differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi di suoli trattati allo stesso modo ma ammendati con AM diversi. **Pristino:** Suolo come tale incubato per 45 giorni, **Nessuno:** assenza di agenti mobilizzanti, AM. **OS:** Olio di Soia, **TW20:** Tween 20, **TW80:** Tween 80, **AV:** Acque di vegetazione, **RAMEB:** β -ciclodestrine metilate.

4.1.8. Effetto degli agenti mobilizzanti e del micorisanamento con *I. lacteus* e *P. ostreatus* sulla struttura delle popolazioni batteriche autoctone:

I batteri coltivabili costituiscono solo una frazione minoritaria (dall'1 al 5%) dell'intera comunità batterica presente in un campione ambientale (Amann *et al.*, 1995). Per questo motivo, è stato scelto un approccio indipendente dalla coltivazione, l'elettroforesi su gel a gradiente denaturante (DGGE), al fine di fornire una visione completa dell'impatto del micorisanamento e dell'aggiunta di AM sulla microflora indigena del suolo esaminato.

L'analisi DGGE (Figura 4.9) condotta sui prodotti di PCR, derivati dall'amplificazione della regione V3 del gene ribosomiale batterico 16S, confermava l'effetto negativo dell'OS anche sulla biodiversità delle popolazioni batteriche endogene comprendenti in tal caso anche la porzione non coltivabile delle stesse. L'indice di *Shannon-Weaver* e la *richness*, passavano infatti, da 1,18 e 22, rispettivamente, nel controllo di incubazione senza l'aggiunta di alcun AM, a 0,65 e 5 nel controllo di incubazione con OS (Tabella 4.2).

Lo stesso effetto, era riscontrabile anche nel suolo biottrattato con *P. ostreatus* mentre risultava meno evidente nel caso del micorisanamento con *I. lacteus*. Nel caso di *P. ostreatus*, comunque, si assisteva ad una generale diminuzione della biodiversità indipendentemente dall'AM utilizzato; quindi si può supporre, oltre ad una azione negativa dell'OS, anche l'instaurarsi di un rapporto competitivo tra fungo e microflora indigena comunque già noto in letteratura. Molti studi hanno infatti riportato tale fenomeno (Gramms *et al.*, 1999; Andersson *et al.*, 2003) giustificato dall'accumulo di intermedi tossici per i batteri, derivati dalla degradazione fungina degli IPA (Andersson *et al.*, 2003) anche se, nel nostro caso, dall'analisi RP-HPLC non si riscontrava accumulo di tali intermedi.

Mentre, l'OS esercitava un effetto negativo sulla biodiversità batterica, l'effetto opposto era evidente nel caso dell'utilizzo del RAMEB che portava ad ottenere indici di biodiversità molto elevati ($S=33$; $H=1,26$) rispetto al controllo di incubazione in cui erano assenti gli AM. A conferma di questo effetto positivo sulle popolazioni batteriche esercitato dalle β -ciclodestrine, in letteratura è riportata una generale e marcata stimolazione della crescita sia di batteri eterotrofi che di batteri specializzati in presenza di tali surfactanti (Fava *et al.*, 1998, 2003; Fedi *et al.*, 2005).

Rispetto a quanto osservato sul numero di batteri coltivabili, l'aggiunta delle AV non aveva un effetto negativo sulla biodiversità batterica nel controllo di incubazione

(Tabella 4.2) indicando, ancora una volta, la necessità di un'appropriata integrazione di metodi dipendenti ed indipendenti da coltivazione, per ottenere un quadro il più completo possibile della struttura di comunità microbiche in campioni ambientali.

Infine, confrontando la biodiversità delle comunità batteriche relative ai campioni sottoposti a micorisanamento con *I. lacteus* con i relativi controlli di incubazione, sia la *richness* che l'indice di *Shannon-Weaver* subivano un incremento, in particolare nei casi in cui si utilizzavano RAMEB, OS e TW80 come AM. Non sono comunque, a tutt'oggi, disponibili in letteratura informazioni relative alle possibili interazioni tra *I. lacteus* e la microflora batterica di suoli contaminati da IPA.

In figura 4.10 viene riportata l'analisi *cluster*, basata sulla matrice di similarità, costruita considerando la stessa posizione delle bande relative ai vari campioni, ed in particolare sono stati costruiti due diversi dendogrammi derivati dal confronto dei campioni trattati con i due ceppi fungini ed i relativi controlli di incubazione.

Nel caso del confronto tra i suoli sottoposti a micorisanamento con *P. ostreatus* ed i controlli di incubazione (Figura 4.10A) era evidente la formazione di due diversi *cluster* costituiti, l'uno dall'insieme di tutti i suoli micorisanati e l'altro, dai controlli di incubazione, simili tra loro per il 26%. La sola eccezione era rappresentata dal controllo di incubazione con OS che risultava molto più simile (44%) ai campioni biottrattati che non ai controlli di incubazione ammendati con gli altri tipi di AM.

Al contrario, nei suoli micorisanati con *I. lacteus*, la diminuzione di similarità tra i vari campioni non sembrava governata dal trattamento fungino ma, in molti casi in cui venivano impiegati gli AM, il suolo biottrattato con questo fungo ed i relativi controlli di incubazione formavano degli unici *cluster* (figura 4.10B). Il maggior valore di similarità è stato osservato tra i controlli di incubazione condotti con TW20 e TW80 e le corrispondenti controparti trattate con il fungo (85 e 78%, rispettivamente).

Infine, per effettuare un'analisi ancora più completa, sei bande DGGE, scelte sulla base della loro frequenza ed intensità e corrispondenti a cloni derivati da una libreria di 16S rDNA, sono state identificate tassonomicamente e le relative assegnazioni sono riportate in Tabella 4.3. Dal confronto delle sequenze dei cloni derivati dai nostri campioni, con quelle depositate in GenBank ed RDP, emergeva che la maggior parte delle specie ritrovate erano note per le loro capacità degradative nei confronti di contaminanti organici ed appartenevano ai generi *Bacillus* (Ojo, 2006) e *Bulkolderia* (Maltseva *et al.*, 1999).

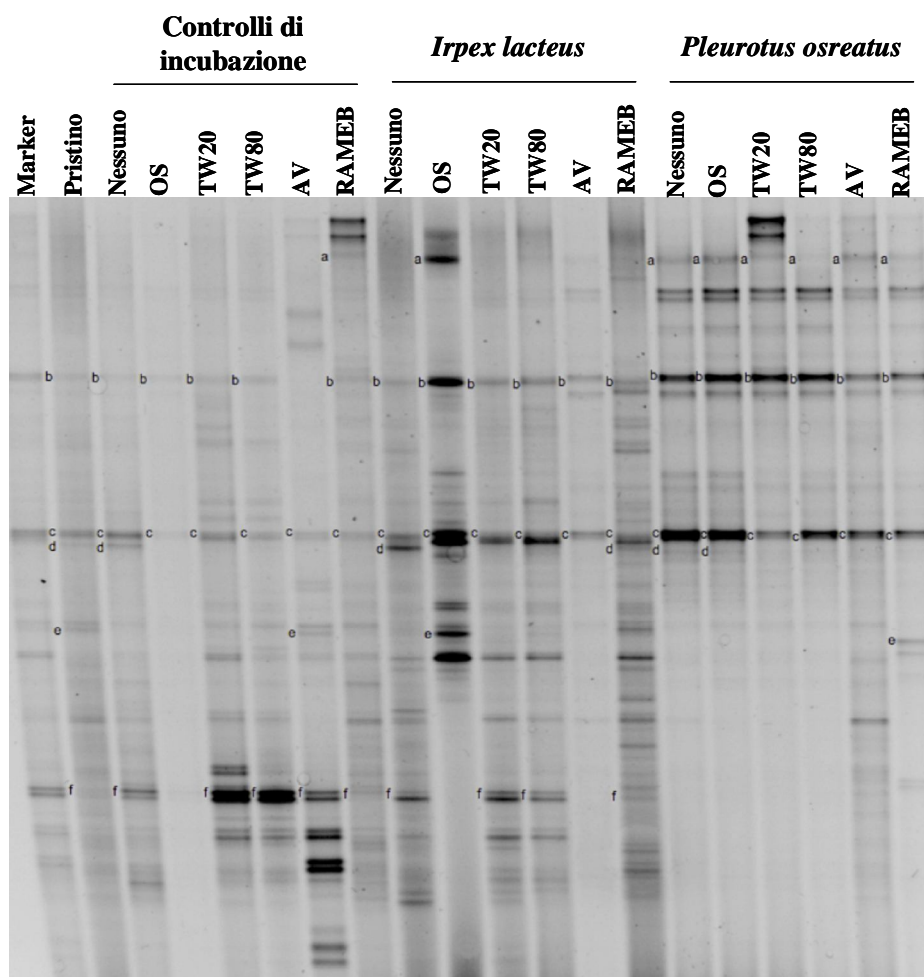


Figura 4.9. Profilo DGGE dei diversi campioni analizzati. Il marker era costituito da una miscela di *amplicon* derivati dai diversi campioni. **Pristino:** Suolo come tale incubato per 45 giorni, **Nessuno:** assenza di agenti mobilizzanti, AM. **OS:** Olio di Soia, **TW20:** Tween 20, **TW80:** Tween 80, **AV:** Acque di vegetazione, **RAMEB:** β -ciclodestrine metilate.

Tabella 4.2. Indici di biodiversità stimati nei campioni sottoposti ai diversi trattamenti. **Pristino:** Suolo come tale incubato per 45 giorni, **Nessuno:** assenza di agenti mobilizzanti, **AM. OS:** Olio di Soia, **TW20:** Tween 20, **TW80:** Tween 80, **AV:** Acque di vegetazione, **RAMEB:** β -ciclodestrine metilate.

	Tipo di campione	Shannon-Weaver (H)	Richness (S)
Controlli di incubazione	Pristino	1,16	20
	Nessuno	1,18	22
	OS	0,65	5
	TW 20	1,11	24
	TW80	0,97	24
	AV	1,17	25
	RAMEB	1,26	33
<i>Irpex lacteus</i>	Nessuno	1,15	21
	OS	1,01	19
	TW 20	1,14	21
	TW80	1,16	27
	AV	0,90	11
	RAMEB	1,43	39
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Nessuno	0,82	14
	OS	0,84	14
	TW 20	0,95	15
	TW80	0,81	13
	AV	1,09	22
	RAMEB	1,00	18

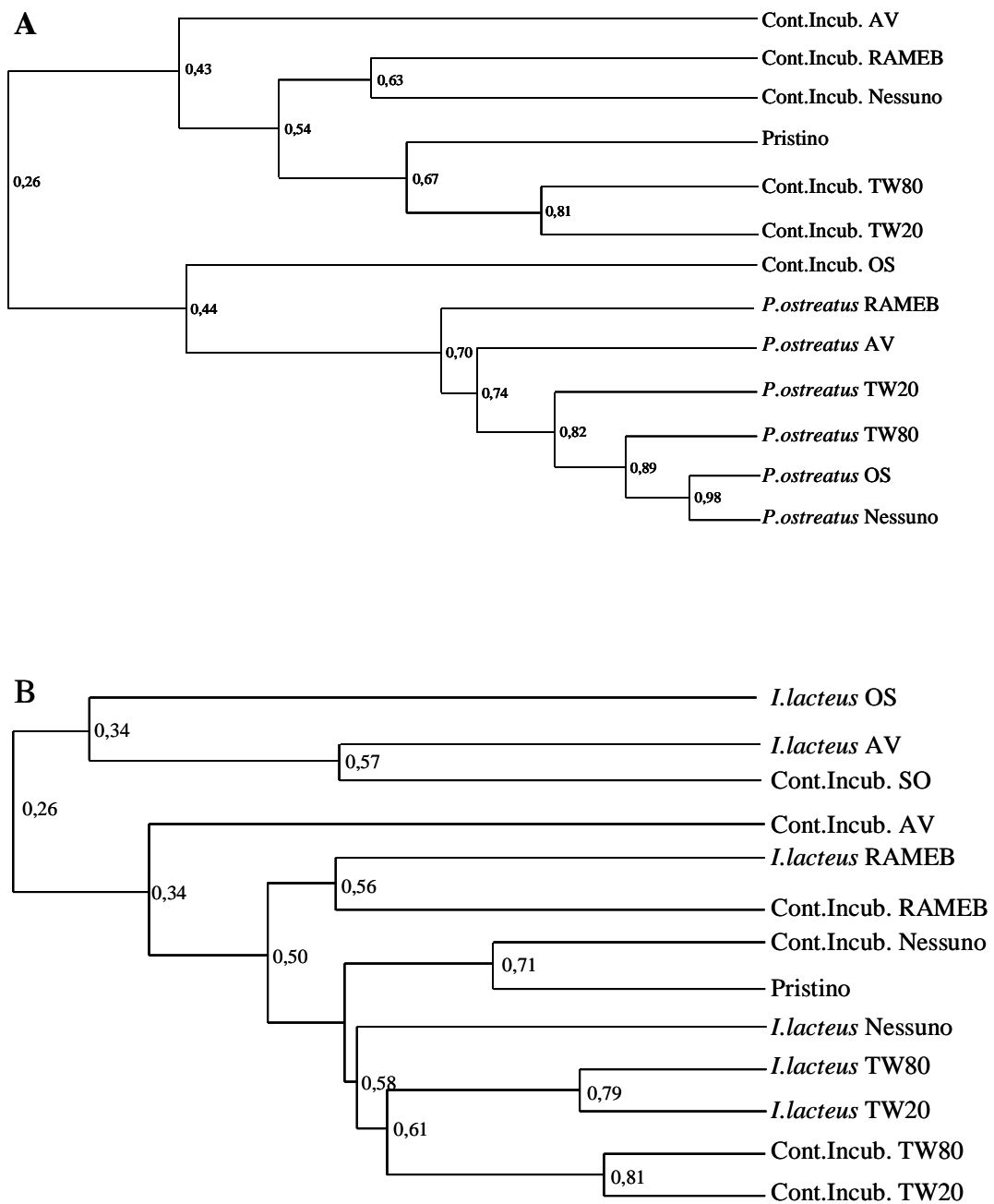


Figura 4.10. Dendrogrammi generati dalla matrice di similarità basata sulla posizione comune delle bande tra le linee usando il metodo UPGMA (*Unweighed Pair Group Method with Arithmetic means*). In **A** è riportato il confronto tra i campioni biottrattati con *P. pulmonarius* ed i relativi controlli di incubazione mentre in **B** il confronto tra questi ultimi ed i suoli biottrattati con *I. lacteus*. **Pristino:** Suolo come tale incubato per 45 giorni, **Nessuno:** assenza di agenti mobilizzanti, AM. **OS:** Olio di Soia, **TW20:** Tween 20, **TW80:** Tween 80, **AV:** Acque di vegetazione, **RAMEB:** β -ciclodestrine metilate.

Tabella 4.3. Assegnazione tassonomica dei cloni corrispondenti alle bande DGGE.

Clone (Acc. No.) ^a	Lunghezza (bp)	Banda DGGE corrispondente; linea ^b	% di Similarità	Organismi correlati depositati nella banca dati GeneBank
SMa248 (AM930505)	1508	a; 7,9,14-19	97	<i>Bacillus massiliensis</i> (AY677116)
SMa255 (AM930506)	1510	b; 1-5, 7-19	99	<i>Bacillus megaterium</i> (DQ660362)
SMa216 (AM930507)	1508	c; 1-19	98	<i>Bacillus senegalensis</i> (AF519466)
SMa210 (AM930508)	1503	d; 1, 2, 8, 13-15	98	<i>Luteibacter</i> sp. V87 (DQ778039)
SMa215 (AM930509)	1497	e; 1, 6, 9, 19	97	<i>Ammoniphilus oxalaticus</i> (Y14579)
SMa220 (AM930510)	1491	f; 1, 2, 4-8, 10, 11, 13	98	<i>Burkholderia graminis</i> (U96941)

Legenda (Lettere in apice della prima riga della tabella):

a: cloni corrispondenti alle bande DGGE selezionati con la procedura di screening riportata nella sezione Materiali e Metodi. In parentesi vengono riportati i numeri di accesso assegnati dalla banca dati GenBank.

b: le lettere indicano le bande DGGE mentre i numeri le linee in cui le bande erano presenti.

4.2. Biotrattamento di un suolo storicamente contaminato con *Botryosphaeria rhodina* DABAC P82 e *Pleurotus pulmonarius* CBS 664.97:

P. pulmonarius CBS 664.97 e *B. rhodina* DABAC P82 sono stati testati per le loro capacità di crescere e di degradare idrocarburi aromatici in suolo storicamente contaminato. Al fine di valutare quale fosse l'effetto della microflora endogena sull'intero processo, il suolo è stato sottoposto a fumigazione con cloroformio e le prove condotte sia sul suolo fumigato che non fumigato.

Per determinare quale fosse l'effetto del micorisanamento sulle comunità batteriche autoctone sono state effettuate sia conte vitali dei batteri eterotrofi che analisi DGGE del gene codificante l'rRNA 16S, direttamente sul DNA metagenomico estratto dai diversi campioni. Il numero dei batteri eterotrofi totali risultava superiore nei suoli non fumigati rispetto ai fumigati, soprattutto in quelli sottoposti a biotrattamento fungino: l'analisi DGGE è stata effettuata solo sui suoli non fumigati.

4.2.1. Crescita fungina:

Come era evidente dall'ispezione visiva, dopo 45 giorni di incubazione entrambi i funghi avevano colonizzato il suolo, fumigato e non, ammendato con paglia di mais. Per valutare l'entità della crescita di entrambi i ceppi fungini sia nel controllo di incubazione che nel suolo fumigato e non fumigato è stato estratto e quantificato l'ergosterolo: tale composto è ritenuto ottimo indicatore dello sviluppo fungino (Davis & Lamar, 1992).

Inaspettatamente, la crescita di *B. rhodina* era minore nel suolo fumigato rispetto al non fumigato in contrasto a quello che invece si riscontrava nel caso di *P. pulmonarius*. Non era invece rilevabile ergosterolo nei controlli di incubazione, siano essi fumigati che non fumigati.

Le indicazioni ottenute dalla determinazione dell'ergosterolo venivano confermate anche dalla quantificazione delle proteine solubili i cui livelli risultavano maggiori nel suolo non fumigato e biotrattato con *B. rhodina* e nel suolo fumigato e biotrattato con *P. pulmonarius* (Tabella 4.4).

Tabella 4.4. Ergosterolo, proteine solubili e pH finale nei controlli di incubazione e nei suoli biottrattati con *P. pulmonarius* e *B. rhodina* fumigati e non fumigati.

	Ergosterolo ($\mu\text{g/g}$ suolo)	Proteine solubili ($\mu\text{g/g}$ suolo)	pH finale (in acqua/in 1N KCl)
Controlli di incubazione			
Fumigato	0 ^a	14,4 \pm 1,6 ^a	7,67/7,51
Non fumigato	0 ^a	32,5 \pm 2,0 ^a	7,80/7,68
<i>B. rhodina</i> DABAC P82			
Fumigato	0,8 \pm 0,1 ^b	558,9 \pm 27,0 ^b	7,25/7,68
Non fumigato	1,7 \pm 0,3 ^c	677,2 \pm 56,2 ^c	6,89/7,29
<i>P. pulmonarius</i> CBS 644.97			
Fumigato	1,3 \pm 0,2 ^d	810,6 \pm 31,1 ^d	6,80/7,00
Non fumigato	0,2 \pm 0,0 ^a	410,2 \pm 46,7 ^e	7,48/7,84

I dati rappresentano la media \pm deviazione standard di quattro determinazioni (due repliche per due esperimenti indipendenti). L'analisi statistica veniva effettuata mediante test di Tukey: lettere uguali in apice indicano assenza di differenze statisticamente significative ($P < 0,05$).

4.2.2. Degradazione dei contaminanti e detossificazione del suolo:

A differenza di una diversa risposta di crescita dei due funghi in seguito alla fumigazione, l'efficienza del processo di micorisanamento, sia sulla degradazione dei contaminanti che sulla detossificazione del suolo, era comunque maggiore in presenza della microflora indigena. La maggior parte dei contaminanti veniva, infatti, degradata nei suoli non fumigati e biottrattati con entrambi i funghi e questo effetto era particolarmente marcato nel caso di molti dei contaminanti presenti in quantità maggiori come ad esempio il 9,10-antracenedione e il 7-[H]-benzo[DE]-antracene-7-one (Tabella 4.5). A conferma di ciò, anche il valore di TWOC (*Total Weight Organic Contaminants*) era decisamente minore nei suoli non fumigati e biottrattati con *P. pulmonarius* (1082 del non fumigato contro 1274 mg/kg di suolo del fumigato) e *B. rhodina* (939 del non fumigato contro 1235 mg/kg di suolo del fumigato) rispetto ai suoli fumigati (Figura 4.11).

Il test ecotossicologico che è stato condotto era basato sulla mortalità degli insetti apterigoti ubiquitari del suolo, i Collemboli, appartenenti alla specie *Folsomia candida*. Nel caso della fumigazione i livelli di tossicità risultavano significativamente ridotti nei suoli biottrattati rispetto al controllo di incubazione e tale effetto era maggiormente evidente nel caso di *B. rhodina*. Un significativo aumento nei livelli di detossificazione

era inoltre rilevabile nel caso dei suoli biottrattati non fumigati rispetto ai fumigati e, in particolare, nel caso di *B. rhodina* la tossicità era ridotta del 71,4% (Figura 4.12).

Studi precedenti hanno riportato la possibilità dell'instaurazione di effetti di tipo sinergico tra i funghi *white-rot* e la microflora indigena. Ad esempio, Mougín e collaboratori (1997) hanno dimostrato che la decontaminazione di un suolo, contaminato artificialmente da lindano, ed incubato con *Phanerochaete cryosporium* risultava sensibilmente maggiore nel suolo non sterile rispetto a quello sterile sebbene la crescita fungina era notevolmente ridotta nel primo caso. Il fungo era inoltre coinvolto nella modificazione del *pathway* degradativo del lindano dato che aumentava la degradazione degli intermedi chimici prodotti dalla microflora indigena durante la sua degradazione (Mougín *et al.*, 1997).

La presenza di effetti sinergici tra funghi esogeni e microflora endogena, è stata anche evidenziata nel caso di suoli contaminati da idrocarburi policiclici aromatici (IPA). In der Wiesche e collaboratori (2003) hanno riportato, infatti, che la mineralizzazione del pirene da parte di *Pleurotus ostreatus* e *Dichomitus squalens* risultava maggiore in presenza dei batteri autoctoni così come Boonchan e collaboratori (2000) hanno dimostrato che l'inoculo misto, fungino e batterico, di un suolo aumentava significativamente la degradazione di IPA ad alto peso molecolare.

Oltre ad interazioni sinergiche, sono noti in letteratura anche effetti di tipo antagonistico o competitivo tra batteri e funghi in siti contaminati. Ad esempio, l'accumulo di prodotti terminali della degradazione di IPA da parte di *P. ostreatus* aveva un impatto negativo sulla microflora indigena (Andersson *et al.*, 2003); precedentemente, era stato anche dimostrato il coinvolgimento di tale fungo nel ritardo e nella riduzione della deplezione di IPA in un suolo contaminato. In questo caso, molto probabilmente, tali effetti erano imputabili alla morte della maggior parte dei batteri che altrimenti avrebbero preso parte al processo degradativo (Gramss *et al.*, 1999).

Tabella 4.5. Concentrazione dei diversi contaminanti nei controlli di incubazione fumigati e non fumigati, presi come riferimento, e percentuali di deplezione degli stessi nei suoli biottrattati con *P. pulmonarius* e *B. rhodina*, fumigati e non fumigati.

Contaminante	Concentrazione nei controlli di incubazione (mg/kg suolo)		% di deplezione dei contaminanti			
			<i>B. rhodina</i> DABAC P82		<i>P. pulmonarius</i> CBS 644.97	
	Fumigato	Non fumigato	Fumigato	Non fumigato	Fumigato	Non fumigato
Naphtalene	1,2	0,3	9,6	0,0	0,0	0,0
1,2,4,5-tetraclorobenzene	3,6	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0
2,6-dicloroanilina	12,1	0,0	0,0	0,0	43,6	0,0
2,4-dicloroanilina	26,3	4,0	0,0	0,0	18,4	12,0
Difenil etero	7,2	10,6	0,0	28,0	0,0	0,0
o-idrossibifenile	9,8	18,5	0,0	51,7	80,0	97,5
2,6-dicloro-3-metilalanina	2,2	2,0	0,0	15,0	100,0	100,0
2,3,4,5,6-pentacloroanilina	12,3	11,1	5,2	53,2	11,5	20,0
1-chloro-9,10-antracenedione	3,3	3,1	0,0	42,6	13,9	32,9
1-ammin o-9,10-antracenedione	6,4	9,0	29,4	47,3	34,4	48,2
9,10-antracenedione	460,0	455,0	0,0	43,8	0,0	43,8
1,1'-binaftalene	0,0	7,8	0,0	48,1	0,0	100,0
7[H]-benzo[DE]-antracene-7-one	920,0	910,0	24,8	30,0	11,3	18,1

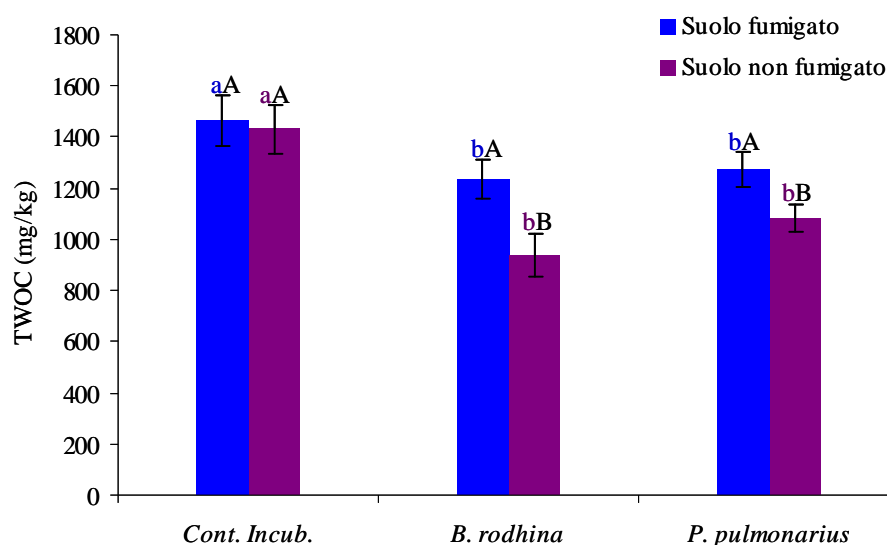


Figura 4.11. Peso totale dei contaminati organici (TWOC) nel controllo di incubazione e nei suoli biottrattati con *B. rhodina* e *P. pulmonarius*, fumigati e non fumigati. L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata mediante test di Tukey: le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali, e dello stesso colore delle barre nell'istogramma, indicano assenza di differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra i diversi trattamenti dei suoli fumigati e non fumigati, mentre lettere maiuscole uguali indicano assenza di differenze statisticamente significative tra i suoli fumigati e non fumigati, trattati allo stesso modo.

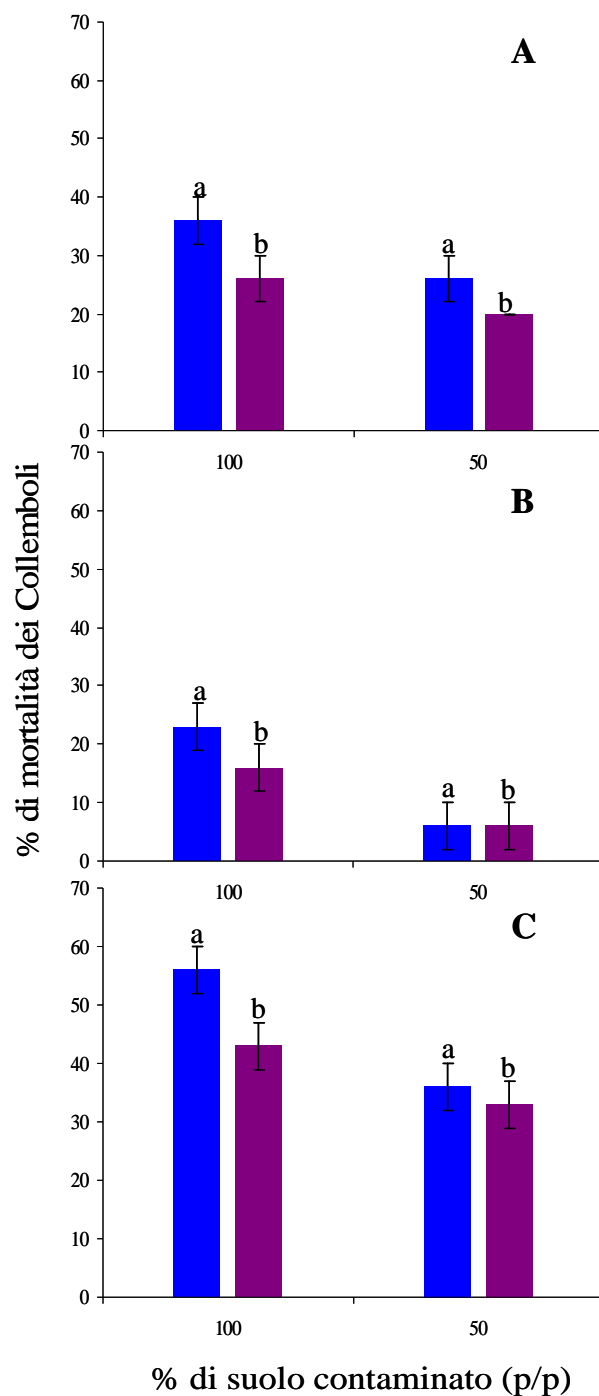


Figura 4.12. Percentuale di mortalità dei Collemboli in funzione della quantità di suolo contaminato (100 e 50% p/p) fumigato (barre azzurre) e non fumigato (barre viola) nel suolo biottrattato con *P. pulmonarius* (A), con *B. rhodina* (B) e nel controllo di incubazione (C). L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata mediante il test di Tukey: le barre di errore sovrastate da lettere uguali indicano assenza di differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra i vari trattamenti dei suoli fumigati e non fumigati.

4.2.3. Concentrazione dei batteri eterotrofi totali:

Il numero di batteri coltivabili risultava significativamente maggiore nei suoli non fumigati rispetto ai fumigati e tale effetto era notevolmente più evidente nel caso del biottrattamento con i due ceppi fungini.

In particolare, nel biottrattamento con *B. rhodina* il numero di batteri eterotrofi passava da $1,6 \pm 0,3 \times 10^6$ nel suolo fumigato, a $6,7 \pm 0,5 \times 10^8$ UFC/g nel suolo non fumigato mentre, nei suoli biottrattati con *P. pulmonarius* si avevano rispettivamente $8,5 \pm 1,8 \times 10^6$ e $8,3 \pm 0,6 \times 10^8$ UFC/g suolo. Inoltre, la concentrazione della microflora batterica era significativamente maggiore nei suoli biottrattati rispetto ai controlli di incubazione sia fumigati che non fumigati (Figura 4.13).

L'analisi di questi risultati ci ha spinto ad ottenere informazioni sulla struttura delle comunità batteriche nei suoli non fumigati attraverso l'uso di metodi molecolari.

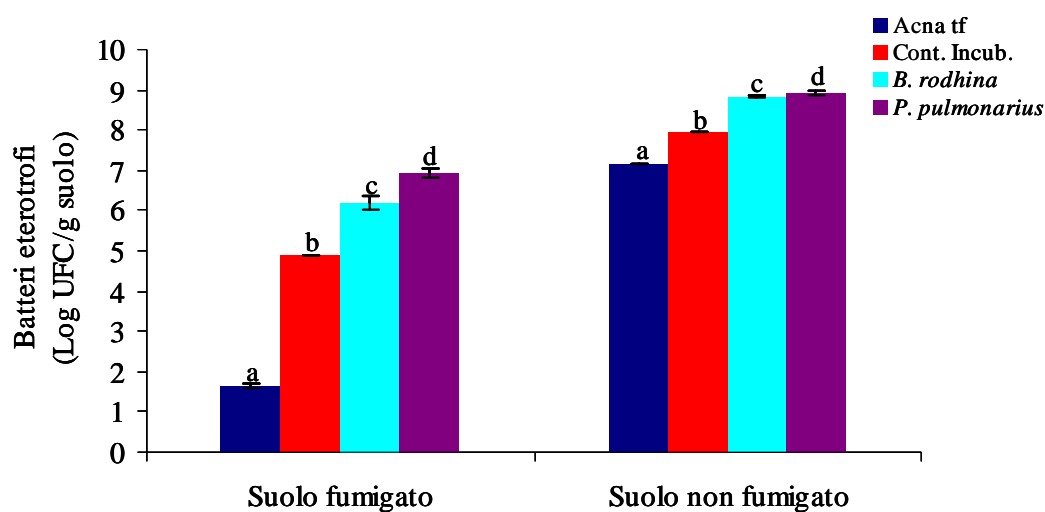


Figura 4.13. Concentrazione dei batteri autoctoni coltivabili nei suoli fumigati e non fumigati nel suolo pristino, nei controlli di incubazione e nei suoli biottrattati con *B. rhodina* e *P. pulmonarius*. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante il test di Tukey: le barre di errore sovrastate da lettere uguali indicano assenza di differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra i vari trattamenti nel gruppo dei suoli fumigati e non fumigati.

4.2.4. Analisi delle popolazioni batteriche mediante DGGE:

L'analisi DGGE dei suoli non fumigati e sottoposti ai diversi trattamenti (Figura 4.14) evidenziava il fatto che, sia l'aggiunta della paglia di mais al suolo (controllo di incubazione), che il biotattamento con i due ceppi fungini, causavano un notevole cambiamento nella struttura delle popolazioni batteriche autoctone, rispetto al suolo pristino all'inizio della prova (Acna t_0) e dopo 45 giorni di incubazione (Acna t_f).

La biodiversità nei diversi campioni è stata stimata attraverso due diversi indici: l'indice di *Shannon-Weaver* (H), e la *richness* (S).

In particolare il suolo Acna t_0 era caratterizzato da valori molto bassi di entrambi gli indici di biodiversità: $S=9$ ed $H=0,7\pm 0,02$ che comunque non subivano cambiamenti notevoli dopo incubazione del suolo stesso per 45 giorni ($S=10$; $H=0,83\pm 0,01$).

La biodiversità aumentava, invece, nel controllo di incubazione dove si osservava sia un aumento della *richness* che dell'indice di *Shannon-Weaver*, rispettivamente del 70 e del 21,5% rispetto al suolo Acna t_f . Sebbene l'aggiunta della paglia di mais al suolo portava ad un aumento della biodiversità, non si osservavano in questo caso livelli significativi di detossificazione e tali risultati sembravano confermare la non efficacia dei processi di biostimolazione nel risanamento del suolo ACNA, come riferito in studi precedenti (Berselli *et al.*, 2004; D'Annibale *et al.*, 2005).

Lo stesso effetto, ancora più marcato, era riscontrabile anche nei suoli sottoposti al biotattamento con i due ceppi fungini dove si raggiungevano valori di *richness* pari a 24 in entrambi i casi, e valori dell'indice di *Shannon-Weaver* pari a $1,07\pm 0,01$ nel suolo biotattato con *B. rhodina* e a $1,15\pm 0,02$ nel caso del biotattamento con *P. pulmonarius*. Questo aumento di biodiversità può essere dovuto, ad esempio, alla maggiore disponibilità di carbonio prontamente utilizzabile dalla microflora indigena, rilasciato dalla depolimerizzazione delle macromolecole delle pareti delle cellule vegetali, in seguito all'attività delle idrolasi fungine (Lang *et al.*, 2000). Alternativamente, la parziale riduzione della concentrazione dei contaminanti o la loro stessa conversione in intermedi meno tossici (Kotterman *et al.*, 1998; Juhasz & Naidu, 2000) potrebbero portare all'attivazione o all'arricchimento di specie microbiche non rilevabili nel suolo non inoculato.

Oltre ad un generale aumento della biodiversità nei suoli sottoposti al biotattamento fungino, lo stesso provocava anche considerevoli cambiamenti qualitativi in termini di specie batteriche predominanti nei campioni; i suoli biotattati con entrambi i funghi mostravano, infatti, sette bande caratteristiche non rilevabili negli

altri campioni. Sei di queste bande (a-f Figura 4.14), corrispondenti a cloni derivati da una libreria di 16S rDNA, sono stati identificati tassonomicamente mentre non è stato possibile recuperare dallo *screening* il clone corrispondente alla banda g. Le assegnazioni tassonomiche di questi cloni sono riportate in tabella 4.6.

Ogni banda DGGE corrispondeva a sequenze note derivate dalle banche dati GenBank e RDP con similarità superiori al 98% ed appartenenti al *phylum Firmicutes* (generi *Bacillus* e *Paenibacillus*) o al sottogruppo *Gamma* del *phylum Proteobacteria* (genere *Pseudomonas*). Per molte di queste specie è stato già riportato in letteratura il loro coinvolgimento nella degradazione di contaminati organici (Juhasz & Naidu, 2000; Habe & Omori, 2003). *Pseudomonas stutzeri*, ad esempio, è una delle specie più conosciute come ubiquitaria nella degradazione di contaminanti organici (Bosch *et al.*, 1999; Habe & Omori, 2003); *Paenibacillus lautus* è stato trovato come parte di un consorzio microbico cresciuto in un refluo contenente diesel e cromo (Vrdoljak *et al.*, 2005), ed infine molte specie del genere *Bacillus*, come *B. oleovorans*, sono note per le loro capacità di degradazione di idrocarburi (Calvo *et al.*, 2002; Feitkenhauer *et al.*, 2003).

La *cluster analysis* (Figura 4.15) effettuata sui campioni analizzati mediante DGGE e basata sulla matrice di similarità, mostrava che le comunità batteriche venivano separate principalmente in due gruppi, simili tra loro solo per il 52%.

In particolare un *cluster* era formato dal suolo pristino all'inizio della prova e dallo stesso dopo 45 giorni di incubazione (similarità pari al 95%) e l'altro dal suolo ammendato con paglia di mais e dai due suoli biottrattati. I suoli sottoposti ai biottrattamenti fungini mostravano tra loro una similarità del 96%, mentre questo *cluster* presentava un valore di similarità del 61% con il suolo ammendato con paglia di mais.

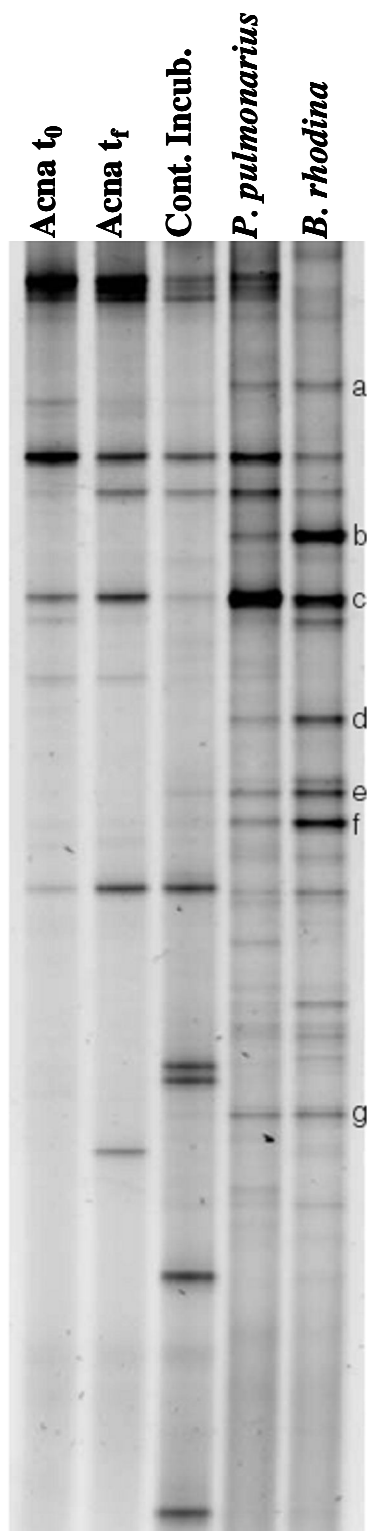


Figura 4.14. Analisi DGGE delle comunità batteriche nei campioni diversamente trattati. Le lettere a-g a destra dell'immagine indicano le bande predominanti nei suoli trattati con i due ceppi fungini.

Tabella 4.6. Assegnazione tassonomica delle sequenze dei cloni corrispondenti alle bande DGGE caratteristiche dei profili relativi ai campioni sottoposti ai trattamenti fungini.

Banda DGGE (n° Clone) ^a	Lunghezza (bp)	Accession number	Similarità (%) ^b	Identificazione tassonomica
a (ACf184)	1508	AM489493	99.8	<i>Bacillus massiliensis</i> (AY677116)
b (ACf101)	1509	AM489494	99.3	<i>Bacillus circulans</i> (AY043084)
c (ACf15)	1495	AM489495	99.9	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (DQ059546)
d (AC137)	1507	AM489496	99.5	<i>Bacillus benzoovorans</i> (AY043085)
e (ACf23)	1513	AM489497	99.3	<i>Paenibacillus lautus</i> (AB073188)
f (ACf125)	1511	AM489498	98.1	<i>Bacillus</i> sp. MB-9 (AF326365)

Legenda (lettere in apice nella prima riga della tabella):

a: i numeri riportati in parentesi indicano i nomi dei cloni corrispondenti selezionati con la procedura di screening riportata nei Materiali e Metodi

b: percentuale di similarità tra le sequenze depositate in GenBank e quelle dei cloni

c: organismi correlati le cui sequenze sono depositate in GenBank. I numeri in parentesi rappresentano i relativi numeri di accessione delle sequenze stesse.

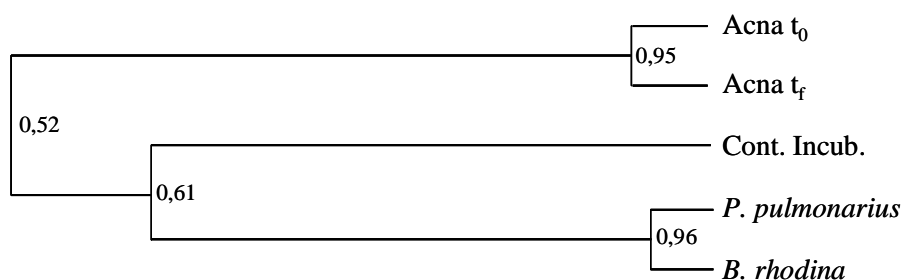


Figura 4.15. Dendrogramma delle comunità batteriche ottenuto dai profili DGGE e generato dalla matrice di similarità, calcolata usando l'indice di Dice, e basata sulla stessa posizione delle bande in ogni linea usando il metodo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means*).

4.3. Micorisanamento di un suolo storicamente contaminato da idrocarburi aromatici con il fungo *white-rot Panus tigrinus*: effetto sulla struttura e funzione delle popolazioni batteriche autoctone:

P. tigrinus, uno dei funghi maggiormente studiato nei nostri laboratori, è stato impiegato nel biotratamento del suolo storicamente contaminato utilizzato anche nella prova descritta precedentemente.

In questo caso, comunque, gli effetti del micorisanamento sono stati monitorati nel tempo effettuando prelievi all'inizio della prova (t_0) e dopo 7, 15, 30, 60 giorni (t_7 , t_{15} , t_{30} , t_{60}) di incubazione. Per ogni prelievo, come già riportato nella sezione Materiali e Metodi, sono state considerate tre diverse tesi sperimentali:

1. Microcosmo (Suolo come tale);
2. Controllo di incubazione (Cont. incub.: Suolo ammendato con paglia di mais);
3. Suolo sottoposto a micorisanamento con *P. tigrinus* (Biotratato *P. tigrinus*: Suolo ammendato con paglia di mais ed inoculato con il fungo).

4.3.1. Crescita fungina:

La colonizzazione della matrice contaminata da parte del fungo, evidente comunque da un'ispezione visiva (Figura 4.16), è stata quantificata attraverso la determinazione dell'ergosterolo (Figura 4.17), uno sterolo tipico della parete cellulare fungina. Inoltre, come indice indiretto dello sviluppo miceliare e dell'attività metabolica, sono state quantificate anche le proteine solubili totali (Figura 4.18), generalmente correlate in modo positivo con la crescita del fungo stesso (Okeke *et al.*, 1994). Tale rapporto è stata quindi, valutato riportando su uno stesso grafico (Figura 4.19) la quantità di ergosterolo (in ordinata) e di proteine solubili (in ascissa) rilevate nei diversi prelievi effettuati durante il biotratamento fungino del suolo: l'indice di correlazione tra i due parametri era eguale a 0.91.

Confrontando i grafici relativi alle due quantificazioni, era inoltre evidente un notevole aumento nel tempo sia della quantità di ergosterolo, che raggiungeva un valore di $743,01 \pm 40,02$ $\mu\text{g/g}$ suolo, che delle proteine solubili totali per le quali si ottenevano $2,09 \pm 0,04$ mg/g suolo, dopo 60 giorni di incubazione.

La diversa capacità di alcuni ceppi di funghi *white-rot* di colonizzare la stessa matrice contaminata era stata già dimostrata in un precedente lavoro condotto nel nostro laboratorio su ceppi fungini isolati dalla stessa matrice sulla quale venivano poi testati

in processi di micorisanamento (D'Annibale *et al.*, 2006). In particolare, i livelli di ergosterolo nel suolo incubato per 30 giorni con *Stachybotrys* sp. DABAC3, *Phlebia* sp. DABAC9 e *Allescheriella* sp. DABAC1 erano elevati solo con il primo ceppo. Nonostante le notevoli differenze di crescita di questi tre ceppi, i livelli di proteine solubili totali risultavano, in questo caso, tutti molto simili (D'Annibale *et al.*, 2006).

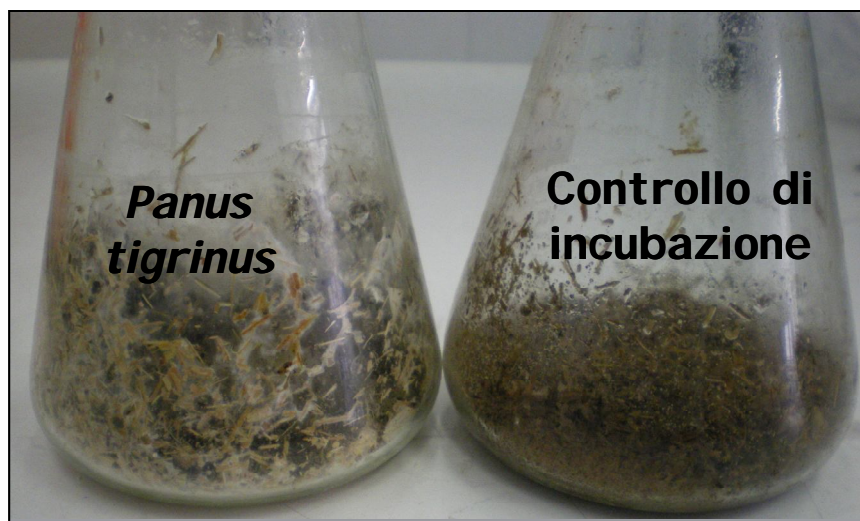


Figura 4.16. Crescita fungina evidente all'ispezione visiva, dopo 60 giorni di incubazione del suolo con il fungo, e confronto con l'assenza di sviluppo miceliare visibile nel relativo controllo di incubazione.

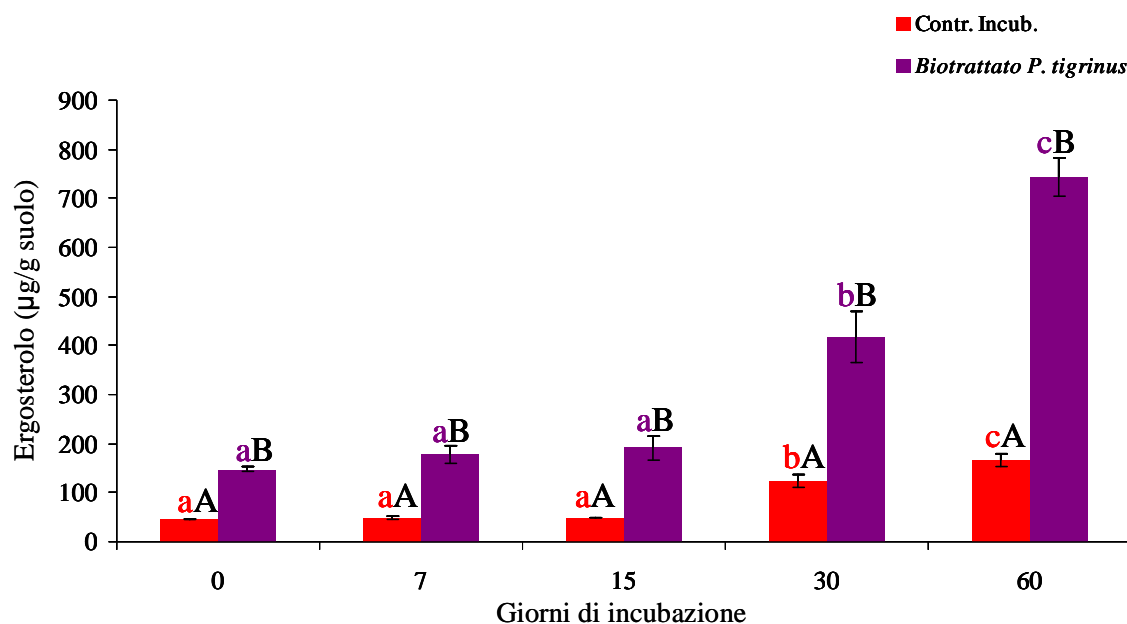


Figura 4.17. Quantità di ergosterolo nel controllo di incubazione e nel suolo biottrattato con il fungo, valutata per i diversi tempi di prelievo. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata attraverso il test di Tukey: le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali, e dello stesso colore delle barre nell'istogramma, indicano assenza di differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra i suoli trattati allo stesso modo ma prelevati a tempi diversi; lettere maiuscole uguali indicano, invece, assenza di differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi di suoli trattati diversamente ma incubati per lo stesso tempo.

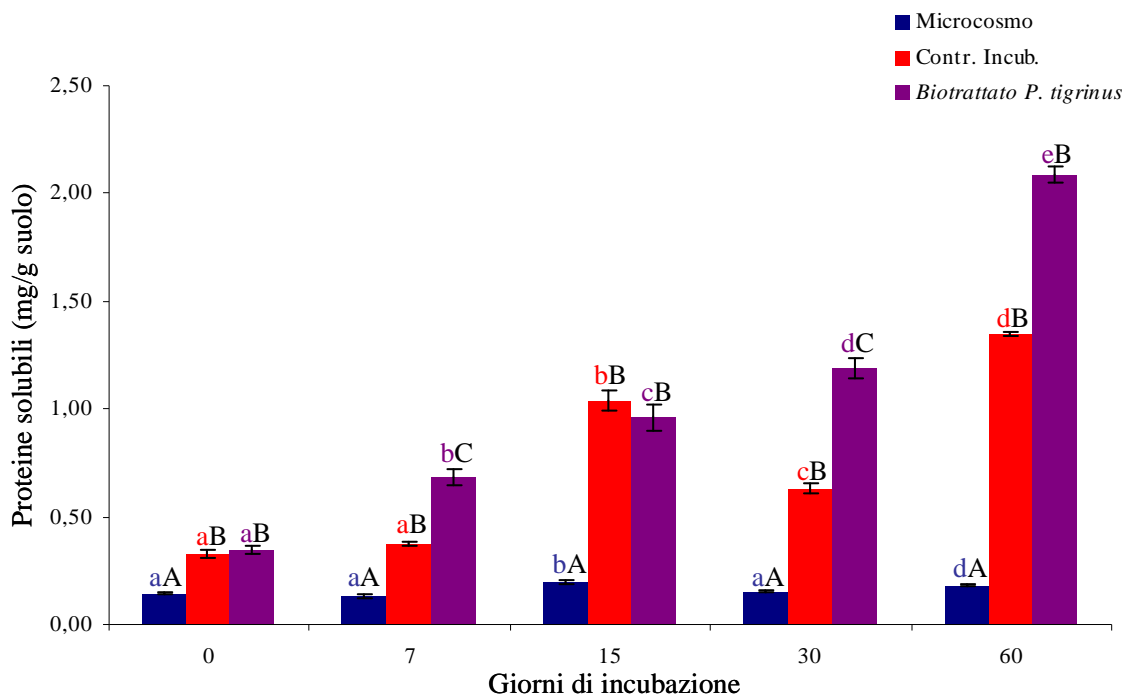


Figura 4.18. Quantità di proteine solubili nel microcosmo, nel controllo di incubazione e nel suolo biottrattato con il fungo, valutata per i diversi tempi di prelievo. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata attraverso il test di Tukey: le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali, e dello stesso colore delle barre nell'istogramma, indicano assenza di differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra i suoli trattati allo stesso modo ma prelevati a tempi diversi; lettere maiuscole uguali indicano, invece, assenza di differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi di suoli trattati diversamente ma incubati per lo stesso tempo.

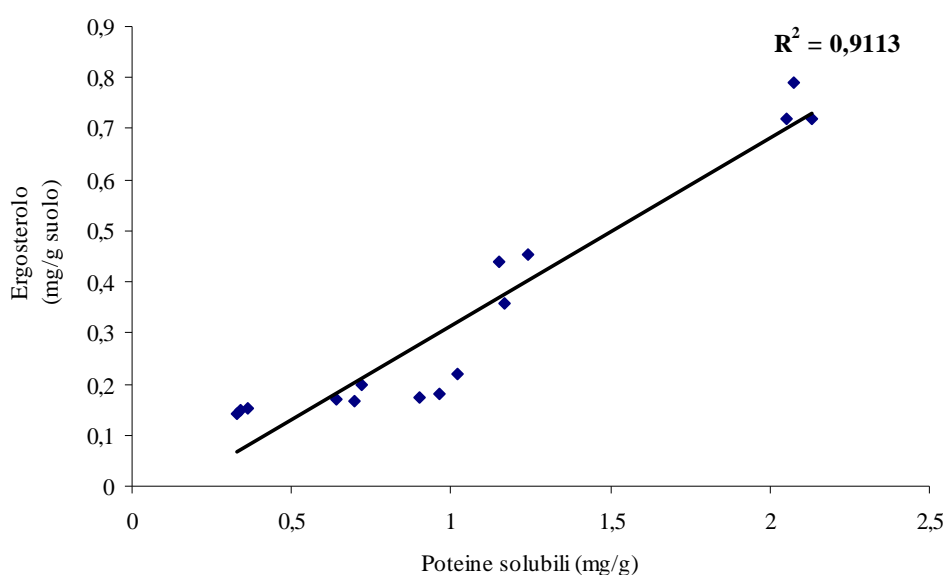


Figura 4.19. Correlazione tra la quantità di ergosterolo e di proteine solubili, quantificati nel suolo biottrattato con *P. tigrinus* nei diversi prelievi.

4.3.2. Attività ossidasiche fungine:

La determinazione di queste attività enzimatiche è di notevole importanza dato che tali enzimi sono coinvolti nella degradazione di molti tipi di contaminanti organici tra i quali gli IPA (Novotný *et al.*, 1997; 2004; D'Annibale *et al.*, 2006).

Nel nostro caso, in particolare, nel suolo biottrattato con il fungo è stato possibile rilevare sia attività Laccasica (Lac) che Perossidasi manganese dipendente (MnP), mentre era assente attività monofenolasica.

Nelle figure 4.20 e 4.21 vengono riportati i livelli delle due attività enzimatiche nel suolo sottoposto a micorisanamento, mentre le stesse non erano rilevabili nei controlli di incubazione.

Entrambi gli enzimi, Lac e MnP, raggiungevano un massimo di attività dopo 15 e 30 giorni, rispettivamente, dall'inoculo del suolo con il fungo, per poi subire un calo a tempi di incubazione più lunghi.

Dal confronto tra i livelli massimi di attività raggiunti da tali enzimi era evidente una netta superiorità della Lac ($6,55 \pm 0,29$ UI/g suolo) rispetto alla MnP il cui picco era pari a $0,29 \pm 0,07$ UI/g suolo. Tali differenze erano state già evidenziate nel nostro laboratorio in un precedente lavoro (D'Annibale *et al.*, 2006).

La minore attività rilevata nel caso dell'attività perossidasi Mn-dipendente ed il calo delle attività enzimatiche osservato per i tempi di prelievo più lunghi erano molto probabilmente imputabili al fatto che questi enzimi vengono generalmente prodotti dai funghi *white-rot* solo in condizioni particolari e strettamente controllate, ossia in situazioni nettamente diverse dalla matrice suolo su cui veniva fatto sviluppare il fungo in questo esperimento.

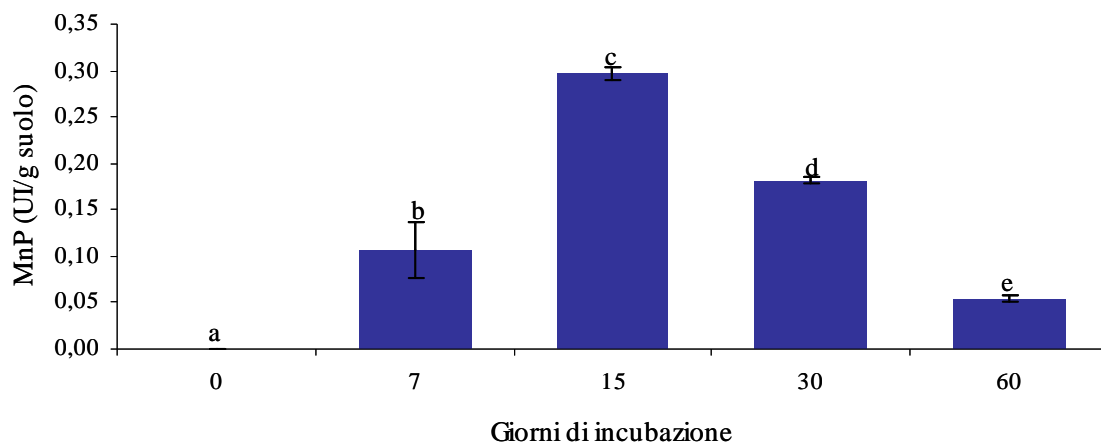


Figura 4.20. Cinetica dell'attività Perossidasi manganese-dipendente nel suolo sottoposto al biotattamento fungino. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante il test di Tukey: le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali indicano assenza di differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra le attività rilevate nei campioni prelevati a tempi diversi.

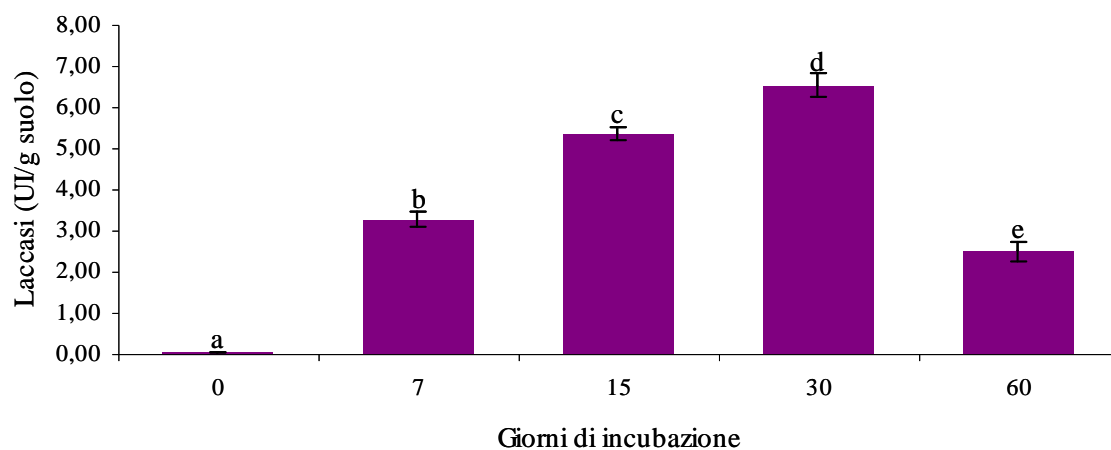


Figura 4.21. Cinetica dell'attività Laccasica nel suolo sottoposto a biotattamento fungino. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante il test di Tukey: le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali indicano assenza di differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra le attività rilevate nei campioni prelevati a tempi diversi.

4.3.3. Attività idrolasiche fungine:

La determinazione di tali attività permette di valutare l'utilizzo da parte del fungo del materiale lignocellulosico impiegato come ammendante nel processo di micorisanamento.

Le attività di idrolisi dei polisaccaridi vengono riportate in figura 4.22 e, come osservabile dai grafici, tali enzimi erano rilevabili solo nel suolo sottoposto al micorisanamento fungino mentre risultavano assenti nei controlli d'incubazione.

L'andamento cinetico delle attività enzimatiche idrolasiche seguiva, in linea di massima, quello descritto precedentemente per le attività ossidasiche con picchi massimi raggiunti tra il settimo ed il quindicesimo giorno di incubazione.

L'attività cellobioidrolasica (Figura 4.22C) mostrava un picco di attività dopo 15 giorni di incubazione pari a $9,13 \pm 0,3$ mU/g suolo ossia circa 10 volte più basso rispetto a quelli raggiunti dalla endo- β -1,4-xilanasi (Figura 4.22A) e dalla endo- β -1,4-glucanasi (Figura 4.22B) ($143,20 \pm 8,99$ e $93,25 \pm 1,31$ mU/g suolo, rispettivamente).

La minore attività riscontrata nel caso delle cellobioidrolasi è imputabile al fatto che il substrato utilizzato per il saggio, cellulosa cristallina carbossi-metilata, risulta più difficilmente degradabile rispetto alla cellulosa amorfa e allo xilano, utilizzati, rispettivamente, per la determinazione delle endo- β -1,4-glucanasi e delle endo- β -1,4-xilanasi.

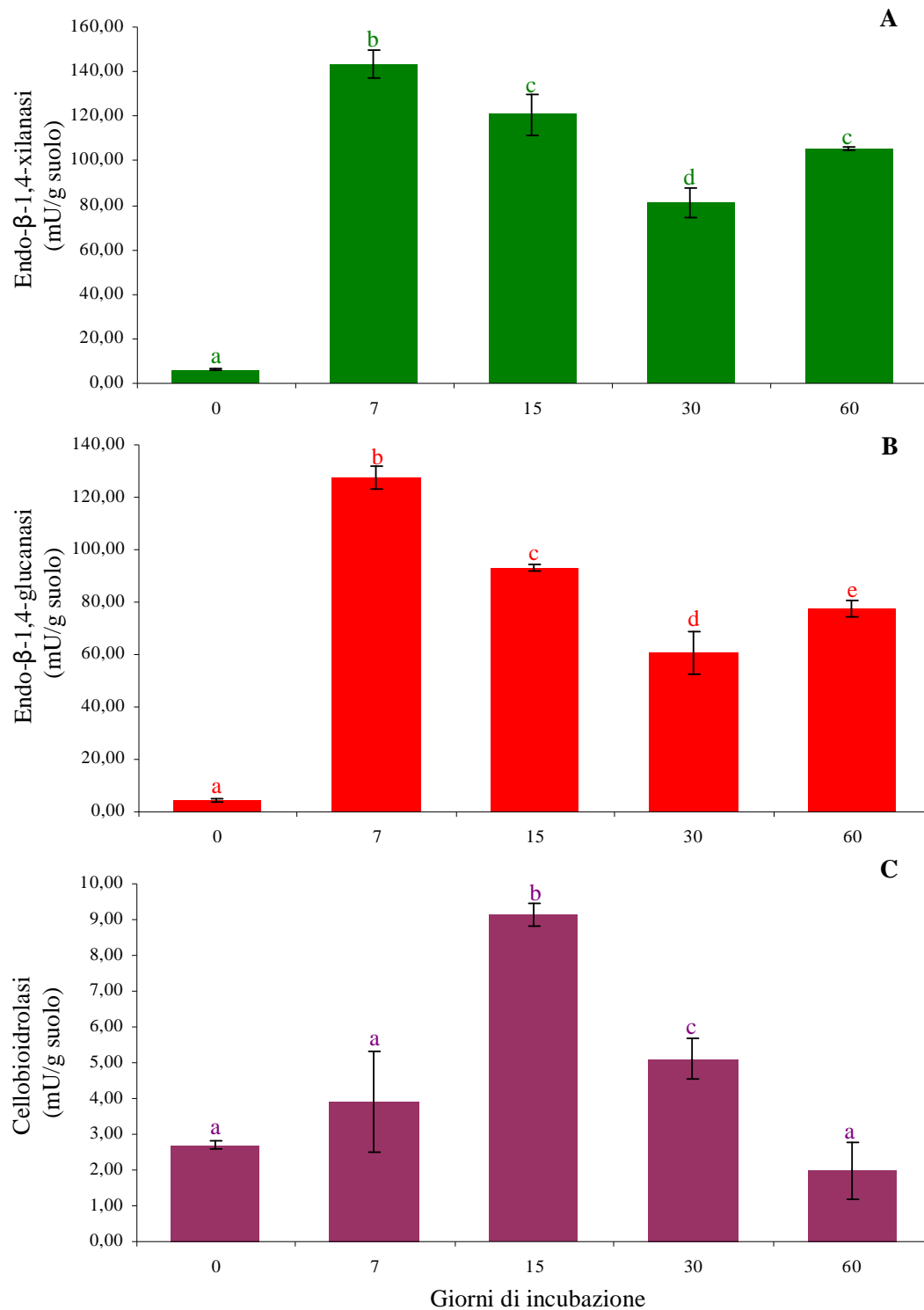


Figura 4.22. Cinetica delle attività idrolasiche: Endo-β-1,4-xilanasi (A), Endo-β-1,4-glucanasi (B) e Cellobioidrolasi (C) nel suolo sottoposto a biotattamento fungino. L'analisi statistica dei dati, per ogni diversa attività enzimatica saggiata, è stata effettuata mediante il test di Tukey: le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali, indicano assenza di differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra le attività rilevate nei campioni prelevati a tempi diversi.

4.3.4. Attività degradative del carbonio e dell'azoto:

Allo scopo di comprendere come le attività enzimatiche potessero aver modificato la componente carboniosa e azotata nei diversi trattamenti, rendendola disponibile per la crescita microbica, sono stati determinati i valori di carbonio organico libero, zuccheri totali ed amminoacidi liberi.

Il carbonio organico libero (Figura 4.23) rappresenta solo la frazione più facilmente assimilabile del carbonio organico totale (TOC) e deriva dalla trasformazione dello stesso.

In relazione alle attività idrolasiche riportate in precedenza, ci saremmo dovuti aspettare un aumento del carbonio libero ma, in realtà, si assisteva ad una sua diminuzione, indipendentemente dalla tipologia di trattamento, durante tutto il periodo di incubazione del suolo. E' verosimile quindi che, man mano che il carbonio viene reso maggiormente disponibile, i microrganismi lo consumino in seguito alle loro attività metaboliche.

Inoltre, nei microcosmi il carbonio presente è quasi esclusivamente unico, quindi inattaccabile. Il suo valore, sarebbe dovuto rimanere pressoché invariato nell'arco dei 60 giorni, mentre era evidente una sua diminuzione dovuta molto probabilmente all'attività metabolica della microflora residente del suolo ACNA.

Dall'analisi degli zuccheri totali, i cui risultati vengono riportati in figura 4.24, era possibile osservare una stabilità relativa agli andamenti cinetici degli stessi, indipendentemente dalla tipologia di trattamento, evidente dai 7 giorni fino alla fine del periodo di incubazione.

Nel caso degli amminoacidi liberi (Figura 4.25) si assisteva invece ad una diminuzione dei loro livelli in tutte le tipologie di trattamento a cui veniva sottoposto il suolo. Tale decremento era molto probabilmente determinato, nei controlli di incubazione e nel suolo biottrattato con il fungo, dalla paglia che rappresentava, oltre ad una fonte di carbonio, anche una fonte di azoto utilizzabile dalle comunità microbiche.

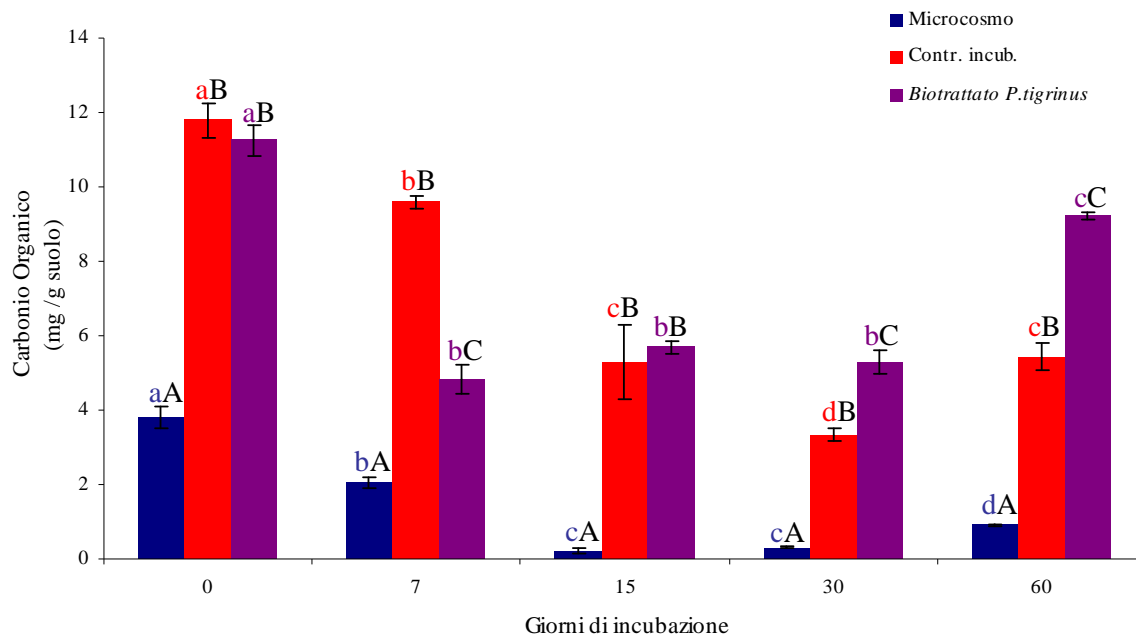


Figura 4.23. Carbonio organico libero determinato nei microcosmi, nei controlli di incubazione e nel suolo sottoposto a micorisanamento con *P. tigrinus* prelevati ai diversi tempi di incubazione. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante test di Tukey: le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali, e dello stesso colore delle barre nell'istogramma, indicano assenza di differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra suoli trattati allo stesso modo ma prelevati a tempi diversi; lettere maiuscole uguali indicano, invece, assenza di differenze statisticamente significative tra i vari gruppi di suoli trattati diversamente ma incubati per lo stesso tempo.

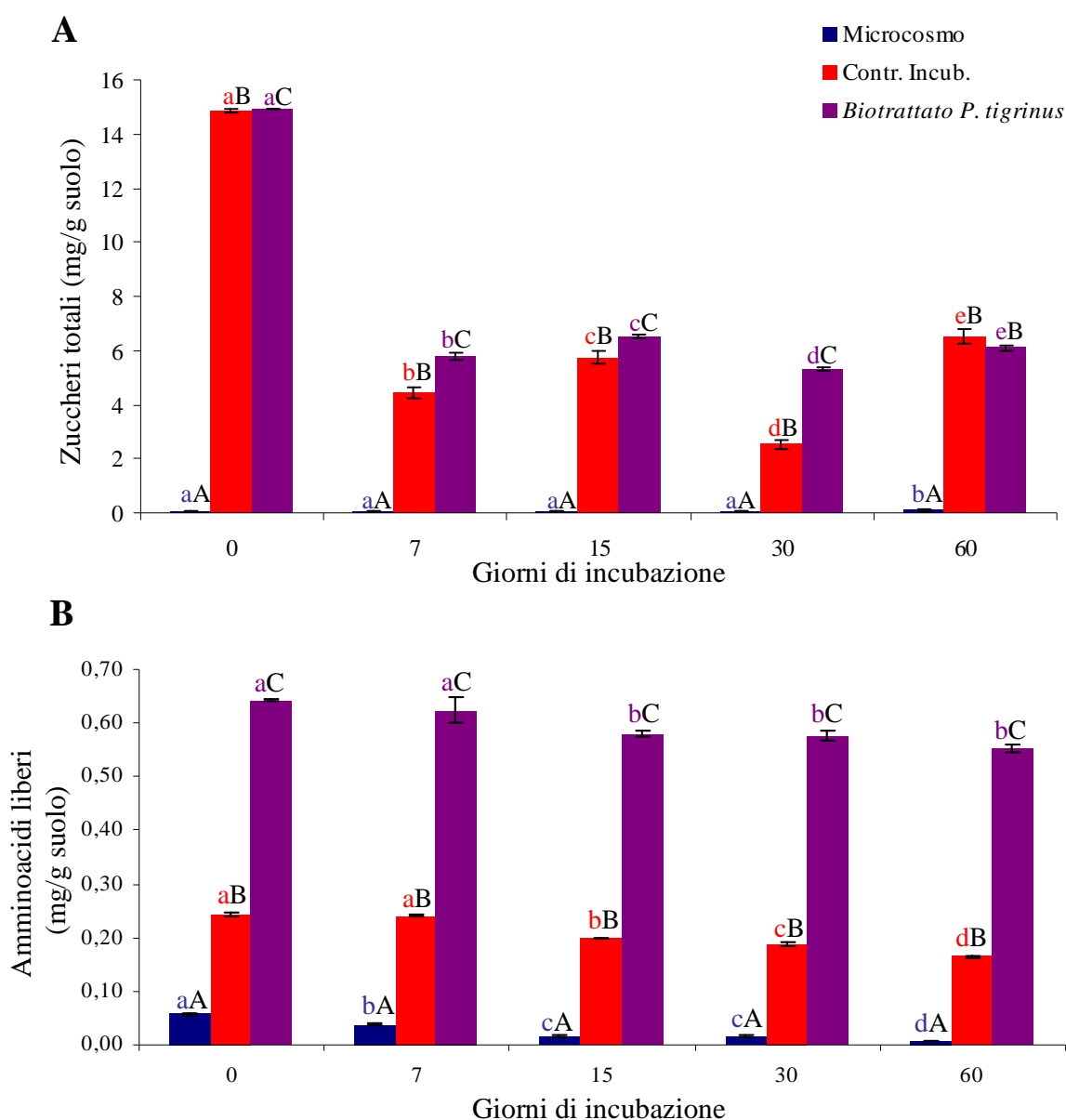


Figura 4.24. Zuccheri totali (A) ed amminoacidi liberi (B) determinati nei microcosmi, nei controlli di incubazione e nel suolo sottoposto a micorisanamento con *P. tigrinus* prelevati a tempi diversi di incubazione. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante il test di Tukey: le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali, e dello stesso colore delle barre nell'istogramma, indicano assenza di differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra suoli trattati allo stesso modo ma prelevati a tempi diversi; lettere maiuscole uguali indicano, invece, assenza di differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi di suoli trattati diversamente ma incubati per lo stesso tempo.

4.3.5. Decontaminazione e detossificazione del suolo:

In tabella 4.7 vengono riportati i livelli di decontaminazione del suolo ACNA in seguito al processo di micorisanamento fungino. I dati riportati, relativi al prelievo effettuato alla fine della prova, sono espressi come percentuale di riduzione dei diversi contaminanti, rispetto ai valori osservati nei controlli di incubazione.

Molti dei contaminanti presenti nel suolo pristino (Tabella 3.2. Materiali e Metodi) non venivano ritrovati nel controllo di incubazione dopo 60 giorni, e ciò era da imputare alla loro degradazione avvenuta a causa dell'effetto di fattori abiotici o della microflora residente, come già riportato da D'Annibale e collaboratori (2006) in un precedente lavoro inerente appunto, il micorisanamento del suolo ACNA con altri ceppi fungini.

Il fungo provocava, comunque, una significativa riduzione con percentuali superiori al 50%, nel caso del naftalene, degli isomeri delle cloroaniline, del tetraclorobenzene, del difenil-etere e degli isomeri del bifenile mentre non venivano attaccati i contaminanti predominanti, in termini di concentrazione, quali il 9,10-antracenedione ed il 7[H]-benz-[DE]-antracen-7-one. In particolare, i risultati ottenuti per questi due ultimi contaminanti erano differenti da quelli osservati nel biottrattamento dello stesso suolo con *B. rhodina* e *P. pulmonarius*, come riportato precedentemente nel presente lavoro di tesi, e con *Stachybotrys* sp. in cui si ottenevano percentuali di deplezione pari al 49,8% per il 9,10-antracenedione ed al 18,7% per 7[H]-benz-[DE]-antracen-7-one (D'Annibale *et al.*, 2006).

I livelli di detossificazione, nei controlli di incubazione (Figura 4.25A) e nei suoli sottoposti a micorisanamento (Figura 4.25B) sono stati valutati mediante il test di mortalità degli insetti ubiquitari del suolo, i Collemboli, appartenenti alla specie *Folsomia candida*.

Come evidente dai grafici, le maggiori percentuali di mortalità erano osservabili nei controlli di incubazione, indipendentemente dal tempo di prelievo e dalla percentuale di suolo non contaminato miscelato al suolo ACNA.

In particolare, in presenza di *P. tigrinus*, la percentuale di mortalità dei Collemboli passava dal 100% nel campione prelevato al t_0 al 27% nel campione incubato con lo stesso per 60 giorni. Livelli simili di detossificazione dello stesso suolo, erano stati osservati anche nel caso del micorisanamento con i funghi *Stachybotrys* sp. e *Phlebia* sp. che risultavano molto più efficaci rispetto ad *Allescheriella* sp. (D'Annibale *et al.*, 2006).

Tabella 4.7. Concentrazione dei contaminanti organici nel controllo di incubazione e nel suolo sottoposto a micorisanamento con *P. tigrinus*, espressa come percentuale di riduzione rispetto allo stesso controllo.

Tipo di contaminante	Concentrazione nel controllo di incubazione (mg/kg)	% di rimozione nel suolo biottrattato con <i>P. tigrinus</i>
Naftalene	7,19	57.3
2,6-dicloroanilina	49,52	82.8
2,4-dicloroanilina	29,53	100
1,2,4,5-tetraclorobenzene	5,19	73.5
Difeniletere	22,34	78.0
2,3,4,5,6-pentacloroanilina	8,81	37.2
Difenilsulfone	13,99	24.4
9,10-antracenedione	458,7	nd
1-cloro-9,10-antracenedione	2,67	6.5
1,1'-binaftalene	10,88	48.5
1-ammino-9,10-antracenedione	7,63	3.1
1,2-binaftalene	10,86	50.2
7[H]-benz[DE]-antracen-7-one	881,7	nd

I dati riportati sono la media di quattro corse cromatografiche separate (due repliche per due esperimenti indipendenti) e la deviazione standard tra i dati era <8%.

Legenda

nd: non degradato

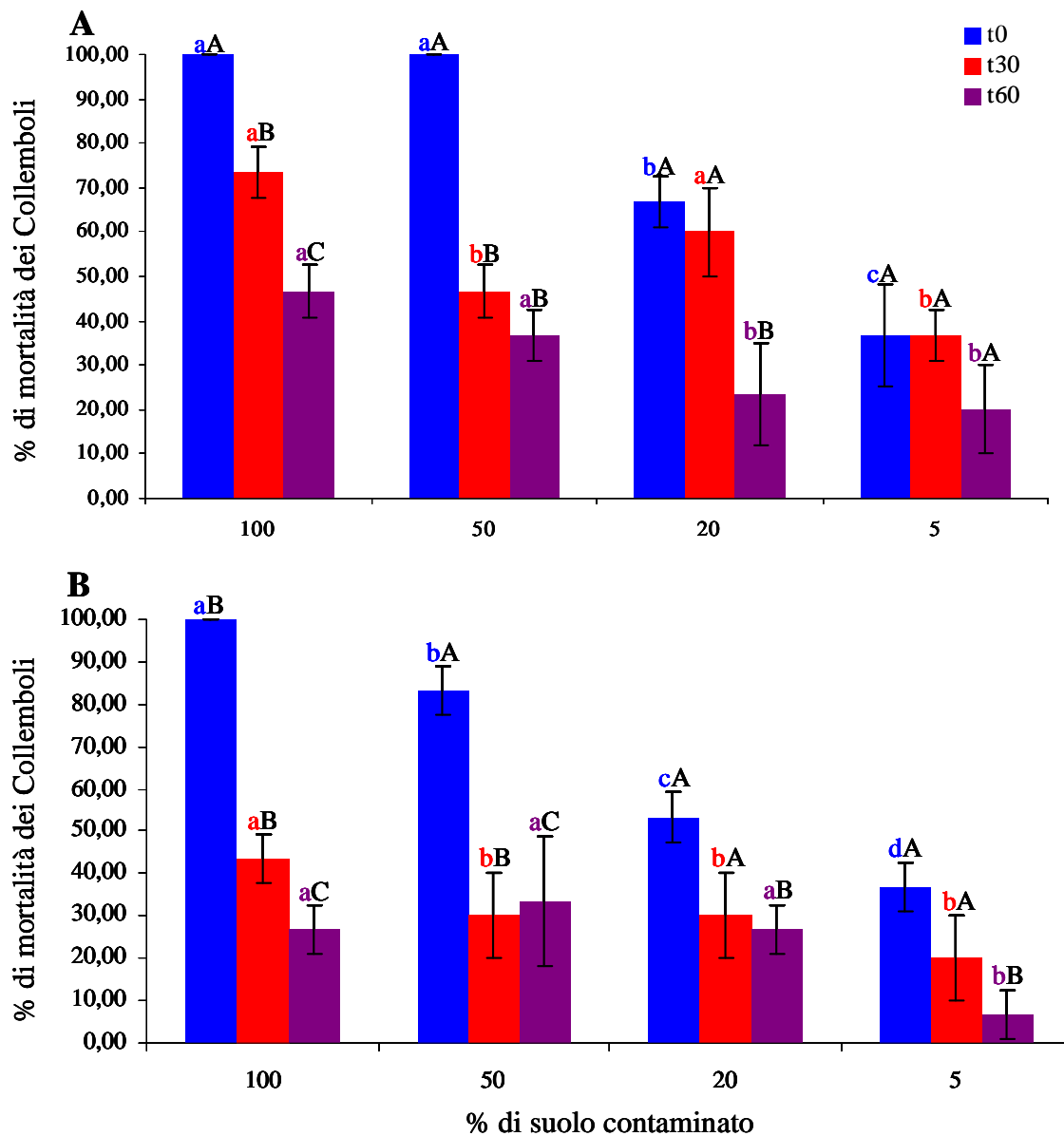


Figura 4.25. Percentuale di mortalità dei Collemboli in funzione della quantità di suolo contaminato miscelato al controllo di incubazione (A) e al suolo biottrattato con *P. tigrinus* (B). L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante test di Tukey: le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali, e dello stesso colore delle barre nell'istogramma, indicano assenza di differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra i campioni relativi allo stesso tempo di prelievo, ma miscelati con diverse quantità di suolo non contaminato. Lettere maiuscole uguali indicano, invece, assenza di differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi di campioni, prelevati a tempi diversi, ma miscelati con la stessa quantità di suolo non contaminato.

4.3.6. Effetto del micorisanamento del suolo ACNA con *P. tigrinus* sulla struttura delle popolazioni batteriche autoctone:

Per valutare quale fosse stato l'effetto dell'inoculo fungino sulla microflora batterica residente, del suolo ACNA, sono state effettuate sia delle conte batteriche totali che un'analisi DGGE, dei prodotti di PCR della regione V3 del gene ribosomiale 16S derivati dal DNA metagenomico estratto direttamente dagli stessi campioni. In questo modo è stato possibile ottenere un quadro completo dell'effetto del fungo sia sulla porzione coltivabile che non coltivabile delle popolazioni batteriche autoctone.

Il numero di batteri eterotrofi totali (Figura 4.26) rimaneva pressoché stabile nei microcosmi fino al quindicesimo giorno di incubazione per poi subire un lieve aumento nei campioni prelevati a 30 e 60 giorni.

Dal confronto tra la concentrazione di batteri coltivabili nei controlli di incubazione e nei suoli sottoposti a micorisanamento emergeva inoltre, un aspetto importante, ossia che, in questo caso, a differenza di quelli descritti precedentemente in questo lavoro di tesi, il fungo non sembrava influenzare direttamente lo sviluppo della microflora endogena. Infatti, come si può osservare dal grafico (Figura 4.26), differenze statisticamente significative tra il numero di batteri nel controllo di incubazione e nel suolo biotratato erano evidenti solo nei campioni relativi al prelievo effettuato dopo 60 giorni di incubazione; tali differenze erano, comunque, di minore entità rispetto a quelle osservabili con i microcosmi.

In questo caso è quindi possibile supporre che il maggior effetto di stimolazione per la crescita batterica sia esercitato dal materiale lignocellulosico aggiunto al suolo come ammendante e non dal fungo, come già riportato da altri autori (Zhang *et al.*, 2008).

L'azione del fungo era invece evidente se si andava ad effettuare un'analisi globale delle popolazioni batteriche attraverso l'uso di tecniche molecolari (Figura 4.27).

Come è possibile osservare dai valori degli indici di biodiversità riportati in tabella 4.8, l'effetto positivo dell'inoculo fungino sulle popolazioni batteriche residenti era evidente a partire dal quindicesimo giorno di incubazione. Nel suolo sottoposto a micorisanamento, infatti, sia il numero di specie batteriche rilevabili che la loro stessa diversità aumentavano notevolmente passando da valori dell'indice di *Shannon-Weaver* e di *richness* pari a 0,87 e 14, rispettivamente, nel campione prelevato al tempo zero, a valori di 1,31 e 37, rispettivamente, nel campione prelevato dopo 60 giorni di incubazione.

Indici di biodiversità comunque superiori a quelli osservati nei microcosmi erano riscontrabili anche nei controlli di incubazione, seppure tali valori si mantenevano più bassi rispetto a quelli relativi ai suoli sottoposti a biotratamento fungino.

L'effetto marcato del fungo sulla biodiversità delle specie batteriche indigene del suolo ACNA era evidenziato, inoltre, dall'analisi *cluster* effettuata sui profili DGGE. Dal dendogramma (Figura 4.28) era possibile osservare che, innanzi tutto, tutti i campioni prelevati al t_0 , indipendentemente dal tipo di trattamento a cui erano stati sottoposti, e tutti i microcosmi prelevati ai tempi successivi venivano raggruppati in un unico *cluster* caratterizzato da una similarità molto bassa (41%) con quello formato da tutti i controlli di incubazione ed i suolo biotratati con il fungo ai tempi t_7 , t_{15} , t_{30} e t_{60} .

L'effetto del fungo era ancor più evidente se si considera il fatto che i due campioni relativi ai controlli di incubazione (82% di similarità) e ai suoli inoculati con *P. tigrinus* (79% di similarità) prelevati dopo 30 e 60 giorni generavano due *cluster* separati, tra loro simili per il 65%.

Lo stesso effetto sinergico tra le specie batteriche autoctone e quelle fungine usate in processi di micorisanamento era stato già osservato in questo lavoro di tesi e risulta supportato da altri studi riportati in letteratura (Kotterman *et al.*, 1998; Lang *et al.*, 2000; Juhasz & Naidu, 2000).

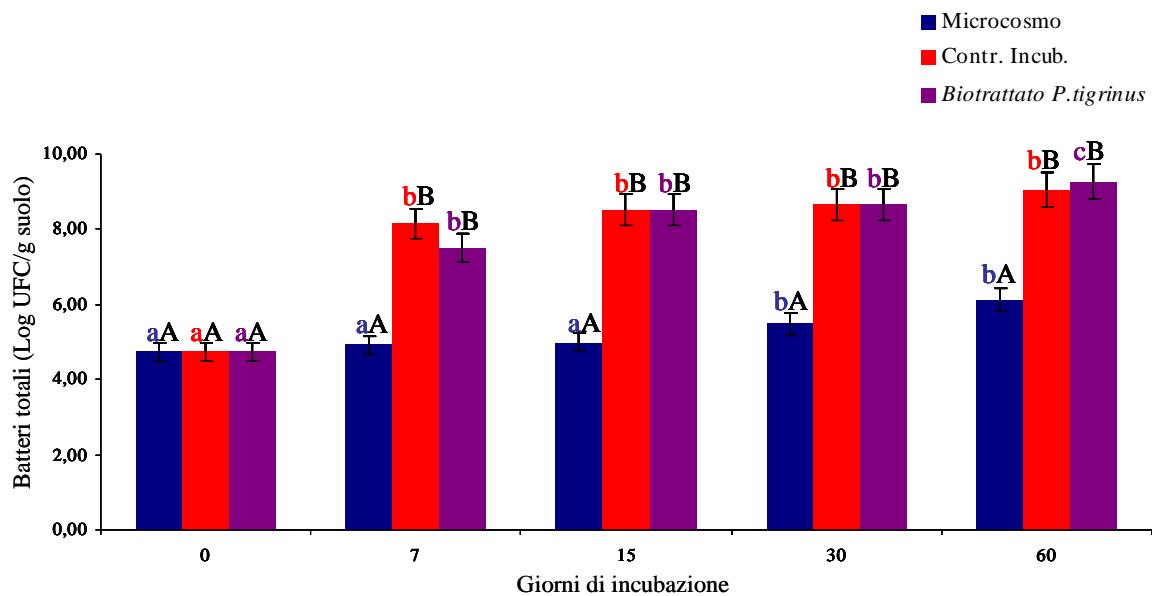


Figura 4.26. Concentrazione dei batteri eterotrofi totali nei microcosmi, nei controlli di incubazione e nel suolo sottoposto a micorisanamento con *P. tigrinus* determinata negli stessi campioni prelevati a diversi tempi di incubazione. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante test di Tukey: le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali, e dello stesso colore delle barre nell'istogramma, indicano assenza di differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra suoli trattati allo stesso modo ma prelevati a tempi diversi; lettere maiuscole uguali indicano, invece, assenza di differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi di suoli trattati diversamente ma incubati per lo stesso tempo.

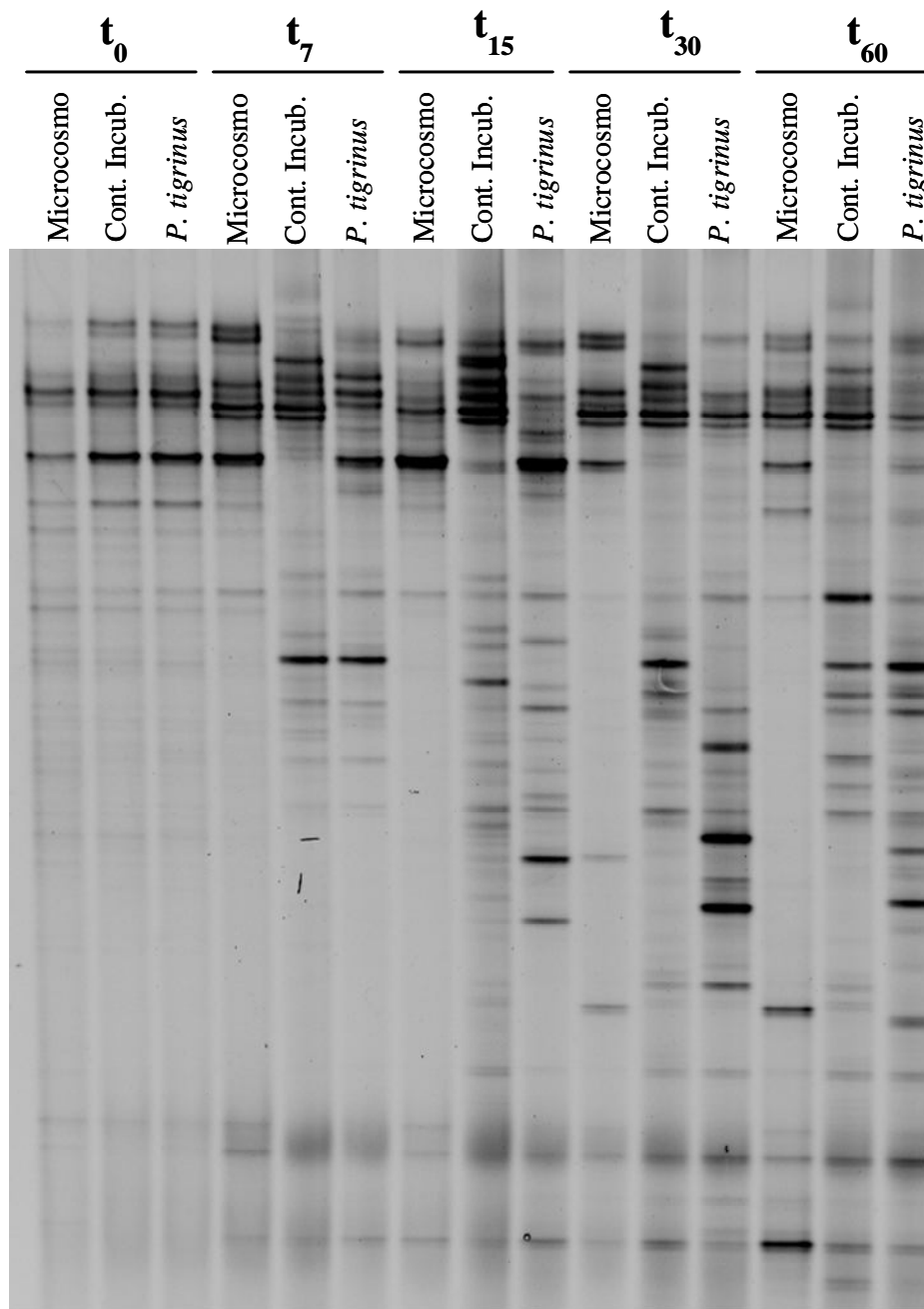


Figura 4.27. Profili DGGE delle comunità batteriche nei microcosmi, nei controlli di incubazione e nei suoli sottoposti a micorisanamento con *P. tigrinus* nei campioni prelevati a tempi diversi durante la prova.

Tabella 4.8. Indici di biodiversità calcolati per i microcosmi, i controlli di incubazione ed i suoli sottoposti a micorisanamento nei campioni prelevati a tempi diversi durante la prova.

Tipo di trattamento del campione	Shannon-Weaver (H)	Richness (R)
Microcosmo t ₀	0,87	14
Cont. Incub. t ₀	0,86	14
<i>P. tigrinus</i> t ₀	0,87	14
Microcosmo t ₇	0,85	14
Cont. Incub. t ₇	1,06	20
<i>P. tigrinus</i> t ₇	1,07	20
Microcosmo t ₁₅	0,84	14
Cont. Incub. t ₁₅	1,09	25
<i>P. tigrinus</i> t ₁₅	1,16	35
Microcosmo t ₃₀	0,98	14
Cont. Incub. t ₃₀	1,21	25
<i>P. tigrinus</i> t ₃₀	1,25	33
Microcosmo t ₆₀	1,00	16
Cont. Incub. t ₆₀	1,24	26
<i>P. tigrinus</i> t ₆₀	1,31	37

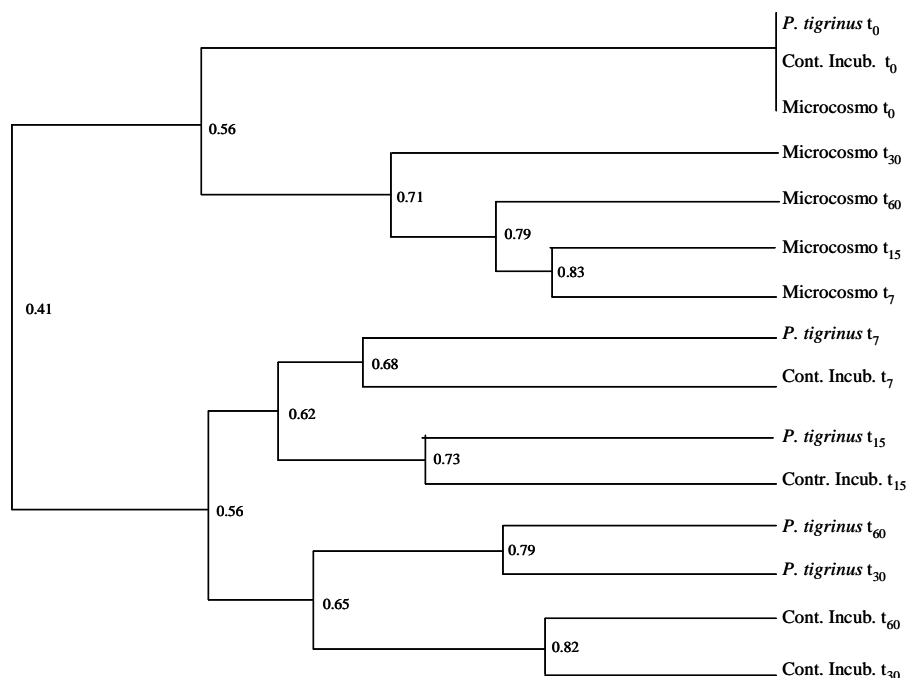


Figura 4.28. Dendrogramma delle comunità batteriche ottenuto dai profili DGGE e generato dalla matrice di similarità, calcolata usando l'indice di Dice, e basata sulla stessa posizione delle bande in ogni linea usando il metodo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means*).

4.3.7. Studio della composizione microbica del suolo ACNA e valutazione della dinamica delle specie in seguito al processo di micorisanamento:

Allo scopo di valutare quale fosse l'impatto dell'inoculo fungino sulle specie batteriche residenti del suolo ACNA e come la composizione microbica dello stesso, variasse in seguito al processo di micorisanamento, è stato effettuato uno studio delle sequenze dei geni 16S delle diverse specie presenti attraverso la generazione, lo *screening* per RFLP e il successivo sequenziamento di cloni derivati da quattro diverse librerie di clonaggio originate dal DNA metagenomico estratto dai campioni sottoposti ai tre differenti trattamenti ed incubati per 60 giorni (microcosmo t_{60} , controllo di incubazione t_{60} e suolo sottoposto a biotratamento con *P. tigrinus* t_{60}), e dal suolo come tale all'inizio della prova (microcosmo t_0).

Lo *screening* RFLP è stato effettuato su circa 150 cloni derivati da ogni libreria e, in base alla diversità dei profili ottenuti si è proceduto al sequenziamento dei frammenti dei geni 16S inseriti nei diversi cloni.

In seguito allo *screening* di tutte le librerie, si è scelto di sequenziare 57 frammenti dei geni 16S clonati e le sequenze risultanti sono state quindi processate e confrontate con quelle depositate nelle banche dati GenBank ed RDP al fine di effettuarne un'assegnazione tassonomica, e sottoposte ad allineamento reciproco attraverso l'applicazione informatica *ClustalW* per valutarne il grado di similarità.

Come evidenziato nel diagramma a torta riportato in figura 4.29A, le specie batteriche ritrovate dallo *screening* delle librerie appartenevano per il 67% al *phylum* dei *Proteobacteria*, per il 19% a quello dei *Firmicutes* e per il 4% a quello dei *Bacteroidetes*.

L'analisi a livello filogenetico superiore inoltre evidenziava la presenza nel *phylum* dei Proteobatteri del 13% di batteri appartenenti alla classe dei β -Proteobatteri e dell'87% a quella dei γ -Proteobatteri (Figura 4.29B); nel *phylum Firmicutes* del 91% di batteri appartenenti alla classe dei Bacilli e del 9% a quella dei Clostridi (Figura 4.29C) ed infine, nel *phylum Bacteroidetes* si ritrovavano nella stessa percentuale batteri facenti parte della classe dei Bacteroidi e dei Flavobatteri (Figura 4.29D).

Va infine sottolineato il fatto che la maggior parte delle specie identificate appartenevano a generi noti per le loro capacità degradative nei confronti di contaminati organici o comunque a specie ubiquitarie del suolo.

Per molte di esse è stato già riportato, infatti, in letteratura il loro coinvolgimento nella degradazione di inquinanti (Juhász & Naidu, 2000; Habe & Omori, 2003).

Pseudomonas stutzeri ad esempio, è una delle specie più conosciute come ubiquitaria nella degradazione di contaminanti organici (Bosch *et al.*, 1999; Habe & Omori, 2003); specie appartenenti al genere *Paenibacillus* sono state state trovate come parte di un consorzio microbico cresciuto in un refluo contenente diesel e cromo (Vrdoljak *et al.*, 2005) ed infine, molte specie del genere *Bacillus*, sono note per le loro capacità di degradazione di idrocarburi (Calvo *et al.*, 2002; Feitkenhauer *et al.*, 2003).

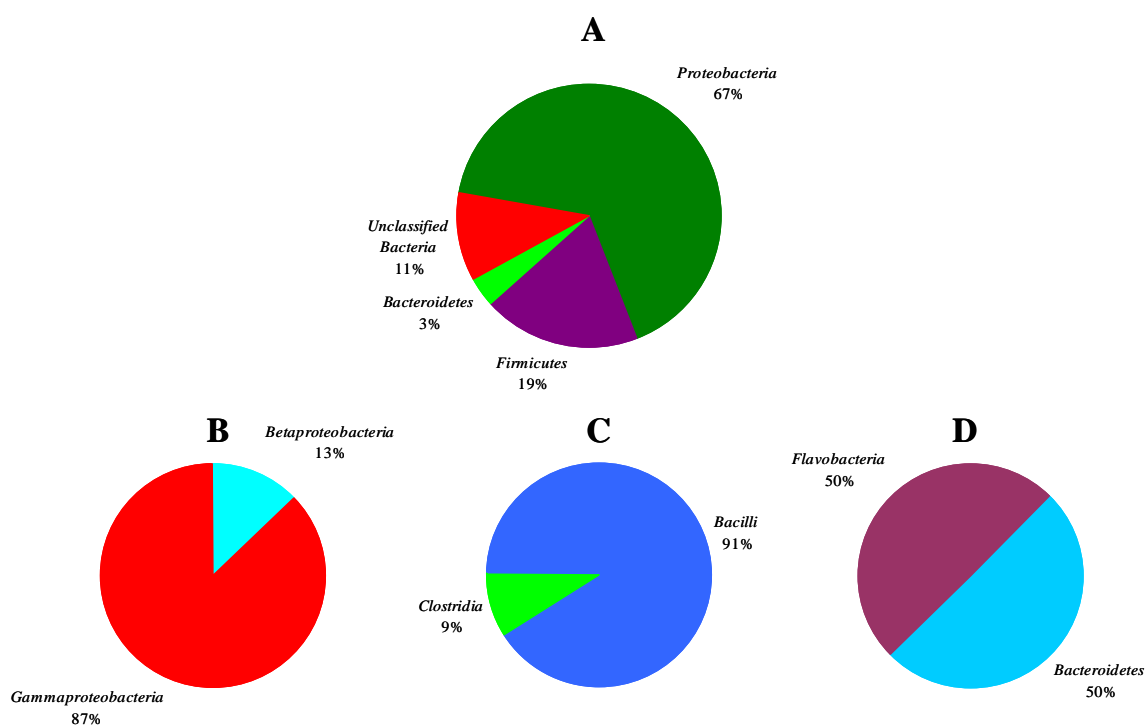


Figura 4.31. Percentuali dei batteri appartenenti ai diversi *phylum* (A) calcolata sulla base dell'assegnazione tassonomica riportata in Tabella 4.9. Per ogni *phylum* vengono quindi mostrate le percentuali dei batteri appartenenti alle diverse classi. **B**: classi appartenenti al *phylum* *Proteobacteria*; **C**: classi appartenenti al *phylum* *Firmicutes*; **D**: classi appartenenti al *phylum* *Bacteroidetes*.

Tabella 4.9. Assegnazioni tassonomiche dei cloni sequenziati in seguito allo *screening* delle librerie di clonaggio dei frammenti di 16S rDNA derivati dal DNA metagenomico estratto dai campioni di suolo ACNA diversamente trattati.

Libreria di clonaggio di provenienza del clone	n° del clone	Lunghezza (bp)	Assegnazione tassonomica (n° GenBank)	Similarità (%)	
Microcosmo t_0	1	1472	<i>Flexibacter</i> sp. IUB42 (AB058905.1)	92	
	2	1491	<i>Roseburia faecalis</i> (AY804150.1)	95	
	3	1479	<i>Uncultured bacterium</i> clone S079 (AF507685.1)	100	
	4	1496	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (DQ059546.1)	99	
	5	1496	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (DQ473439.1)	99	
	6	1498	<i>Pseudomonas putida</i> (AM921634.1)	98	
	7	673	<i>Pseudomonas stutzeri</i> DCP-Ps1 (EU331404.1)	99	
	8	617	<i>Pseudomonas borealis</i> (AJ012712.1)	99	
Microcosmo t_{60}	9	1488	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i> (AY742226.1)	95	
	10	1489	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (EU373389.1)	99	
	11	1496	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (EU373389.1)	96	
	12	946	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. BD-a59 (EF575561.1)	99	
	13	1491	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (DQ059546.1)	93	
Controllo di Incubazione t_{60}	14	1494	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (CP000304.1)	94	
	15	1499	<i>Pantoea agglomerans</i> (AY691543.1)	99	
	16	1498	<i>Pantoea agglomerans</i> (AY335552.1)	99	
	17	1494	<i>Eubacterium</i> sp. 23-2 (EU571186.1)	97	
	18	836	<i>Uncultured bacterium</i> clone 5RHF36 (AY863343.1)	91	
	19	1499	<i>Pantoea agglomerans</i> (AY335552.1)	94	
	20	1500	<i>Pantoea agglomerans</i> (AY335552.1)	99	
	21	926	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (AY538263.1)	99	
	22	1498	<i>Pantoea agglomerans</i> (AY335552.1)	99	
	23	1499	<i>Pantoea agglomerans</i> (AY691545.1)	99	
	24	699	<i>Pantoea agglomerans</i> (AY941833.1)	99	
	25	924	<i>Paenibacillus chitinolyticus</i> (EF452662.1)	94	
	26	1495	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (DQ059546.1)	98	
	27	941	<i>Paenibacillus campinasensis</i> (EU169230.1)	95	
	28	1493	<i>Paenibacillus chitinolyticus</i> (AB021183.1)	89	
	29	895	<i>Bacillus massiliensis</i> (DQ350816.1)	98	
	30	1494	<i>Massilia timonae</i> (U54470.1)	91	
	31	1520	<i>Paenibacillus campinasensis</i> (EU169230.1)	93	
	32	1510	<i>Pseudomonas stutzeri</i> LC2-8 (FJ345693.1)	97	
	33	955	<i>Cohnella phaseoli</i> (EU014872.1)	98	
	34	892	<i>Pseudomonas stutzeri</i> LC2-8 (FJ345693.1)	99	
	35	921	<i>Massilia timonae</i> (U54470.1)	99	
	36	1495	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (FJ345693.1)	99	
	37	1489	<i>Massilia timonae</i> (U54470.1)	99	
	38	1519	<i>Bacillus</i> sp. MB-9 16S (AF326365.1)	98	
	39	1511	<i>Cohnella hongkongensis</i> (AF433165.1)	99	
	Biotrattato <i>P. tigrinus</i> t_{60}	40	833	<i>Pantoea agglomerans</i> (AY335552.1)	99
		41	1495	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (EU855213.1)	99
		42	1498	<i>Pantoea agglomerans</i> (AY335552.1)	99
		43	1498	<i>Pantoea agglomerans</i> (AY691545.1)	99
		44	1498	<i>Pantoea agglomerans</i> (AY335552.1)	99
		45	1495	<i>Pseudomonas stutzeri</i> CTSP36 (EU855213.1)	99
		46	1523	<i>Virgibacillus marismortui</i> (DQ089674)	96
		47	1498	<i>Pantoea agglomerans</i> (AY335552.1)	99
		48	1507	<i>Aerococcus</i> sp. P3-2 (EU376006.1)	98
		49	1498	<i>Pantoea agglomerans</i> (AY691543.1)	97
		50	900	<i>Pantoea agglomerans</i> (AY691545.1)	99
		51	1523	<i>Uncultured Bacillus</i> sp. clone ACF125 (AM89496.1)	92
		52	925	<i>Pseudomonas putida</i> (AY277620.1)	100
53		1496	<i>Pseudomonas stutzeri</i> SA1 (DQ059546.1)	98	
54		1524	<i>Bacillus</i> sp. MB-9 (AF326365.1)	90	
55		1524	<i>Bacillus</i> sp. MB-9 (326365.1)	90	
56		676	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (AF237677.1)	98	
57		1498	<i>Pantoea agglomerans</i> (AY691543.1)	99	

Legenda:

a: (OTU) *Operational Taxonomic Units*

4.3.8. Analisi degli acidi grassi derivati dai fosfolipidi (PLFA):

Le concentrazioni percentuali, relative agli esteri metilici degli acidi grassi derivati dai fosfolipidi (FAME) presenti nei microcosmi, nei controlli di incubazione e nei campioni sottoposti a micorisanamento con *P. tigrinus* vengono riportate in tabella 4.10 dove i vari FAME sono stati raggruppati in funzione del tipo di organismo *target*.

Come è evidente dai dati riportati in tabella una prima osservazione importante riguarda l'aumento nel tempo, indipendentemente dal trattamento a cui veniva sottoposto il suolo, del *marker a-15:0*, uno dei più specifici per il riconoscimento dei batteri Gram positivi. Tuttavia, l'entità relativa all'aumento percentuale di questa classe di batteri risultava minore nei controlli di incubazione e nei campioni sottoposti al micorisanamento fungino se confrontata con quella evidenziata nei microcosmi.

Al contrario, indipendentemente dalla tipologia di trattamento, era possibile osservare delle fluttuazioni nel tempo delle quantità percentuali relative ai *marker* per i batteri Gram negativi.

Inoltre, sia nei controlli di incubazione che nei suoli sottoposti al trattamento fungino non era possibile rilevare *marker* attribuibili agli actinomiceti che erano invece presenti nel microcosmo dopo 60 giorni di incubazione.

Infine, non erano presenti in nessuno dei campioni funghi arbuscolo-micorizzici ma l'aggiunta di materiale lignocellulosico al suolo ACNA, provocava l'arricchimento nel suolo di specie fungine anche nei controlli di incubazione dove era, infatti, rilevabile il *marker 18:2 ω 6,9* utilizzato per il riconoscimento dei funghi.

I dati di PLFA sono stati sottoposti ad analisi multivariata mediante la metodica delle componenti principali (PCA) in modo da evidenziare statisticamente l'effetto dei diversi trattamenti sulla microflora del suolo e la prime due componenti principali spiegavano, secondo il calcolo effettuato dal modello statistico, il 45,2% ed il 32,3%, rispettivamente, della variabilità dei dati.

In figura 4.30 vengono mostrati i grafici relativi alle osservazioni (*score plot*, Figura 4.30A) e alle variabili (*loading plot*, Figura 4.30B) considerando le somme delle quantità percentuali dei FAME ascrivibili ai batteri Gram positivi, Gram negativi, batteri totali, actinomiceti e funghi totali. Dai grafici risulta evidente l'elevata similarità tra i campioni relativi ai controlli di incubazione e ai biottrattamenti fungini prelevati a 30 e 60 giorni confermando, così, quanto già riscontrato attraverso la *cluster analysis* condotta sui profili DGGE.

Un'ulteriore conferma dei risultati ottenuti dalla *cluster analysis* veniva anche dal fatto che i campioni relativi ai suoli biottrattati, si disponevano, nello *Score Plot*, nel quadrante opposto rispetto ai microcosmi che erano invece maggiormente simili ai controlli di incubazione.

Infine, dal confronto dei due grafici veniva confermata la stessa disposizione, nei diversi quadranti, dei vari gruppi di microrganismi marcati e delle differenti tipologie di trattamento. Ad esempio, tutti i campioni relativi ai microcosmi si localizzavano negli stessi quadranti dei batteri Gram positivi, Gram negativi e totali ma opposti a quello in cui si ritrovavano invece i funghi dimostrando, in tal modo, la presenza di batteri e l'assenza di specie fungine in tali campioni.

Tabella 4.10. Quantità percentuali relative ai diversi marker di acidi grassi, calcolate, per i diversi tempi di prelievo, nei microcosmi, nei controlli di incubazione e nei suoli sottoposti al micorisanamento fungino,

Acido grasso marker	Microcosmo						Controllo di Incubazione						Biotrattato <i>P. tigrinus</i>					
	t ₀	t ₇	t ₁₅	t ₃₀	t ₆₀	t ₉₀	t ₀	t ₇	t ₁₅	t ₃₀	t ₆₀	t ₉₀	t ₀	t ₇	t ₁₅	t ₃₀	t ₆₀	
<i>i</i> -14:0 (G+)	0,00	0,00	0,00	1,92	2,43	0,00	0,13	0,13	0,50	0,46	0,00	0,03	0,00	0,03	0,06	0,64	1,45	
<i>i</i> -15:0 (G+)	5,63	2,71	3,87	8,08	9,55	1,65	1,15	2,83	3,02	4,53	0,08	0,18	0,08	0,18	0,29	1,33	1,57	
<i>a</i> -15:0 (G+)	10,52	5,49	7,32	22,38	29,41	3,32	10,74	25,50	40,39	35,06	0,18	0,87	0,18	0,87	3,16	23,69	30,72	
<i>i</i> -16:0 (G+)	2,35	0,00	0,00	1,44	2,06	0,76	1,11	2,98	1,86	4,36	0,03	0,12	0,03	0,12	0,15	1,32	2,74	
<i>i</i> -17:0 (G+)	4,04	0,00	0,00	1,56	0,00	0,00	0,22	0,48	0,16	0,62	0,00	0,04	0,00	0,04	0,05	0,05	0,08	
<i>a</i> -17:0 (G+)	3,59	0,00	0,00	1,21	0,00	0,60	0,95	2,50	0,97	2,67	0,03	0,11	0,03	0,11	0,08	0,30	0,57	
<i>cy</i> 17:0 (G-)	17,43	26,62	28,59	19,52	16,86	6,25	38,42	19,60	7,96	7,96	0,14	0,81	0,14	0,81	5,04	2,61	2,41	
18:1 ω 7 (G-)	8,49	7,40	12,85	5,46	6,24	51,11	11,10	14,01	17,66	20,47	18,69	27,64	18,69	27,64	22,08	16,18	16,13	
<i>cy</i> 19:0 (G-)	2,25	17,53	11,98	5,92	3,81	0,76	11,55	5,01	1,00	0,68	0,03	0,17	0,03	0,17	1,02	0,12	0,40	
15:0 (TB)	4,61	1,85	0,00	3,10	3,02	1,68	0,50	0,77	0,79	1,43	0,20	0,56	0,20	0,56	0,90	1,99	1,71	
16:1 ω 9 (TB)	18,37	30,76	27,23	17,31	17,50	10,27	19,10	17,24	6,75	3,47	0,40	1,80	0,40	1,80	5,15	5,01	1,47	
16:1 ω 7 (TB)	4,52	5,23	3,57	10,19	4,21	1,22	0,30	0,34	0,00	0,20	0,11	1,06	0,11	1,06	1,27	0,98	0,48	
17:0 (TB)	18,20	2,34	4,46	2,02	2,57	4,89	0,67	0,68	0,35	0,33	0,19	0,21	0,19	0,21	0,39	0,24	0,28	
16:1 ω 5 (AMF)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
10Me-16:0 (ACT)	0,00	0,00	0,00	0,00	2,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	
10Me-17:0 (ACT)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
10Me-18:0 (ACT)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	
18:2 ω 6,9 (TF)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	17,52	4,06	7,92	18,59	18,87	79,90	66,40	79,90	66,40	60,35	45,53	39,98	

G+: marker per batteri Gram positivi; G-: marker per batteri Gram negativi, TB: marker per batteri totali, AFM: marker per funghi arbuscolo-micorizzici, ACT: marker per actinomiceti, TF: marker per funghi totali

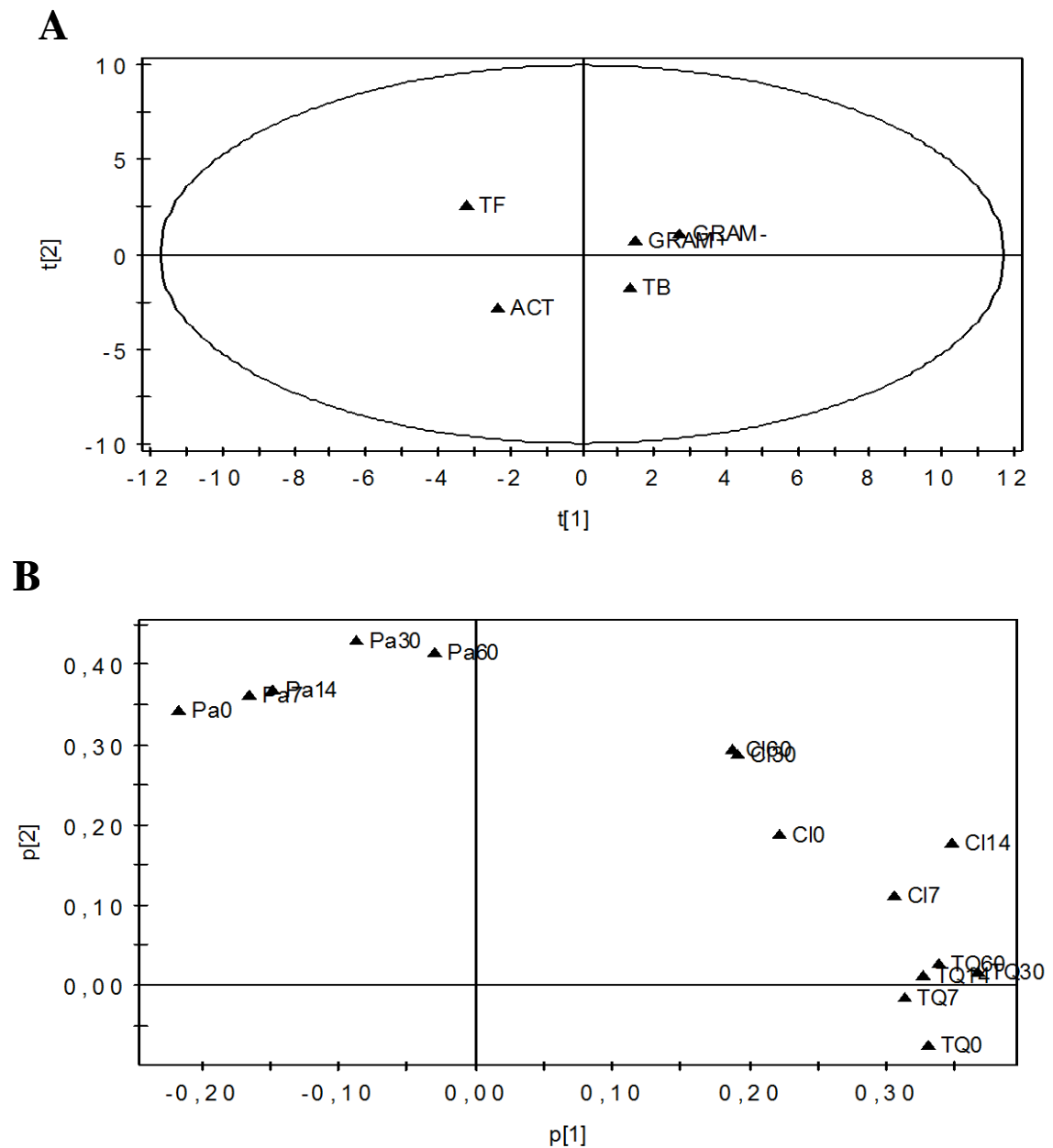


Figura 4.30. Score plot (A) e loading plot, (B) relativi alle somme delle quantità percentuali dei FAME testati nei campioni sottoposti alle diverse tipologia di trattamento. **GRAM +:** marker per batteri Gram positivi; **GRAM -:** marker per batteri Gram negativi, **ACT:** marker per actinomiceti, **TB:** marker per batteri totali, **TF:** marker per funghi totali. **TQ:** microcosmo, **CI:** Controllo di incubazione; **Pa:** Suolo sottoposto a micorisanamento con *P. tigrinus*. I numeri che seguono le didascalie nella figura B sono relativi ai giorni di incubazione dei campioni.

4.3.9. Effetto del micorisanamento sul numero di copie dei geni *nahAc*, *C230* e *16S*:

Molti batteri in grado di degradare idrocarburi aromatici posseggono, nel loro genoma, il gene *nahAc* che codifica uno dei componenti del sistema multienzimatico della naftalene diossigenasi, enzima chiave dell'*upper pathway* degradativo degli IPA.

Un altro gene chiave, nella degradazione batterica di molti tipi di contaminanti, facente parte del *lower pathway* degradativo, è il gene *C230* codificante la catecolo 2,3-diossigenasi, enzima che catalizza la rottura dell'anello aromatico del catecolo.

Come riportato da diversi autori (Sei *et al.*, 1999; 2004; Baldwin *et al.*, 2003; Park & Crowley, 2006; Nyssönen *et al.*, 2006; Dominguez *et al.*, 2008), tali geni sono altamente conservati e quindi possono essere utilizzati come potenziali marcatori per il monitoraggio della degradazione batterica di composti aromatici.

In particolare, in questo esperimento, si è voluto valutare quale fosse l'effetto dell'inoculo fungino sulla funzione delle popolazioni batteriche autoctone effettuando una quantificazione relativa del numero di copie dei due geni, attraverso reazioni di PCR quantitativa (qPCR).

La specificità delle diverse reazioni condotte, è stata valutata, oltre che dall'analisi della curva di *melting*, dalla separazione su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione ottenuti; in ogni caso si otteneva un'unica banda del peso molecolare atteso (dati non mostrati).

Inoltre, per dimostrare che le effettive differenze osservate nel numero di copie dei due geni marcatori non dipendessero in realtà da variazioni del numero di batteri totali nei campioni analizzati, veniva effettuato un saggio qPCR al fine di stimare anche il numero di copie del gene ribosomiale 16S.

Come risulta evidente dai grafici, sia il numero di copie del gene *NahAc* (Figura 4.31) che quello del gene *C230* (Figura 4.32) subiva una drastica riduzione nel tempo nei campioni sottoposti a micorisanamento mentre, il numero di copie del gene 16S rimaneva pressoché stabile (Figura 4.33).

In particolare, nel caso del gene della naftalene-diossigenasi sono stati effettuati due saggi impiegando due diverse coppie di *primers* già utilizzati da altri autori, per lo stesso tipo di quantificazione (Baldwin *et al.*, 2003; Park & Crowley, 2006).

In entrambi i casi si osservava una diminuzione notevole del numero di copie del gene *target* anche se, tale diminuzione era di entità diversa, in base alla coppia di *primers* impiegata, e molto più marcata nel caso dell'utilizzo dei *primers* disegnati da Baldwin e collaboratori (2003). Questa variazione era molto probabilmente imputabile

alla differente specificità dei *primers* per geni derivati da specie microbiche diverse. Infatti, mentre Balwin e collaboratori (2003) hanno dimostrato che i *primers* da loro disegnati erano in grado di riconoscere specificatamente tutti i geni codificanti la naftalene-diossigenasi appartenenti alla sub-famiglia N.2.A., i *primers* sviluppati da Park e Crowley (2006) riconoscevano principalmente geni della naftalene-diossigenasi derivati da specie del genere *Pseudomonas*.

Nel presente lavoro si sono quindi volute impiegare entrambe le coppie di *primers* per avere una visione il più completa possibile anche sulle specie maggiormente influenzate, dal punto di vista funzionale, dall'inoculo fungino.

Questa diminuzione dei livelli dei batteri portatori dei due geni *target* quantificati era, verosimilmente, imputabile alla diminuzione della concentrazione degli idrocarburi nel suolo, in seguito al processo di micorisanamento. Diversi autori hanno suggerito, infatti, una correlazione tra il numero di copie del gene della naftalene-diossigenasi ed il livello o il tipo dei contaminanti presenti nel suolo in cui viene effettuata la quantificazione. Nyssönen e collaboratori (2006) hanno, ad esempio, osservato che il maggior numero di copie di tale gene *target* era osservabile in un suolo contaminato dalla più alta concentrazione di IPA rispetto ad altri due nei quali i livelli di contaminazione erano più bassi o comunque la natura dei contaminanti era diversa.

Park e Crowley (2006) hanno, invece, dimostrato che, in seguito all'esposizione di un suolo pristino a vapori di naftalene, il numero di copie del gene *NahAc* aumentava di circa 100 volte dopo 6 giorni di esposizione per poi rimanere costante fino al sessantesimo giorno; anche nell'esperimento da loro condotto il numero di batteri totali, quantificati attraverso Real-Time PCR del gene 16S, rimaneva pressoché costante per tutto il periodo dimostrando, quindi, che il numero di copie del gene *target* era altamente dinamico e variava in risposta alla presenza del naftalene.

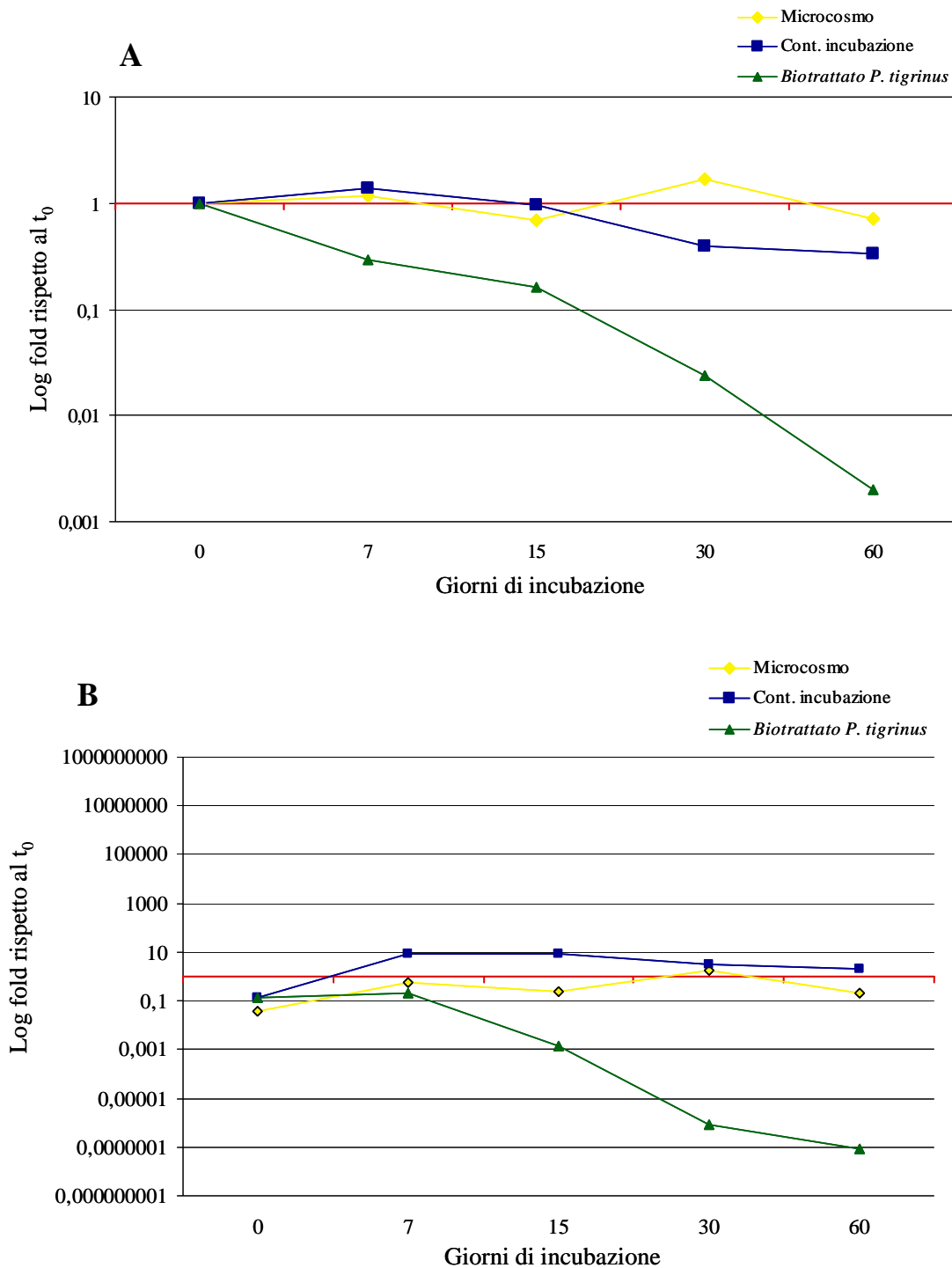


Figura 4.32. Numero di copie dei geni calcolato nei microcosmi, nei controlli di incubazione e nei suoli sottoposti a micorisanamento con *P. tigrinus*, ed espresso come logaritmo rispetto al valore osservato al tempo zero di ogni trattamento. In **A** viene riportata la quantificazione effettuata dalla reazione condotta utilizzando i primers sviluppati da Park e Crowley (2006) mentre in **B** quella relativa alla reazione di Real-Time PCR effettuata utilizzando i primers disegnati da Baldwin e collaboratori (2003).

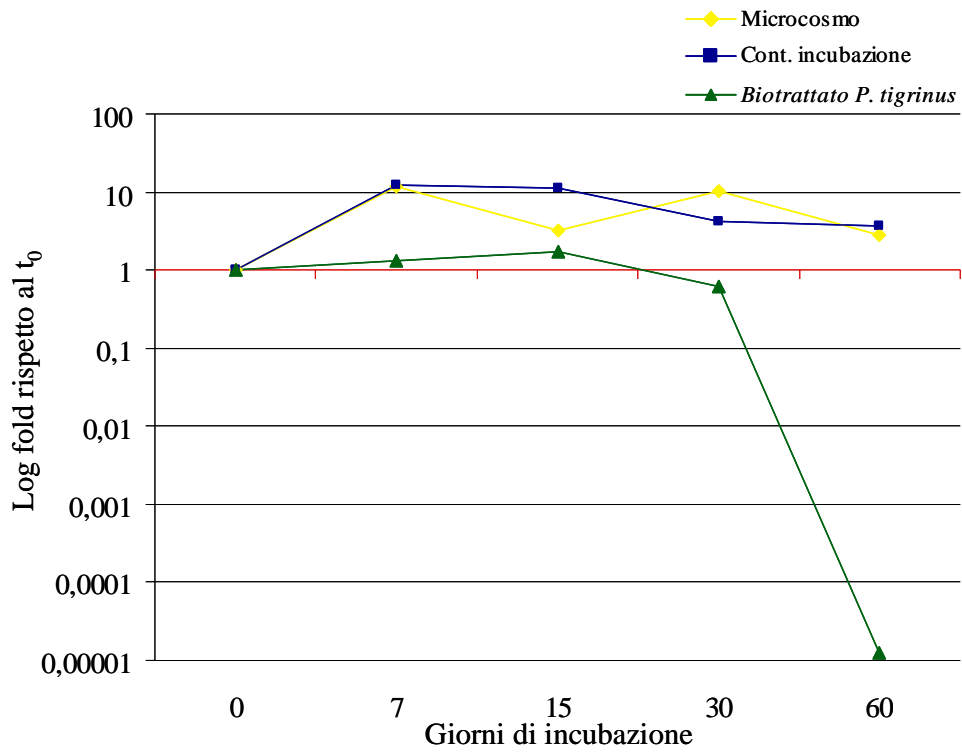


Figura 4.33. Numero di copie del gene C230 calcolato nei microcosmi, nei controlli di incubazione e nei suoli sottoposti a micorisanamento con *P. tigrinus*, ed espresso come logaritmo rispetto al valore osservato al tempo zero di ogni trattamento.

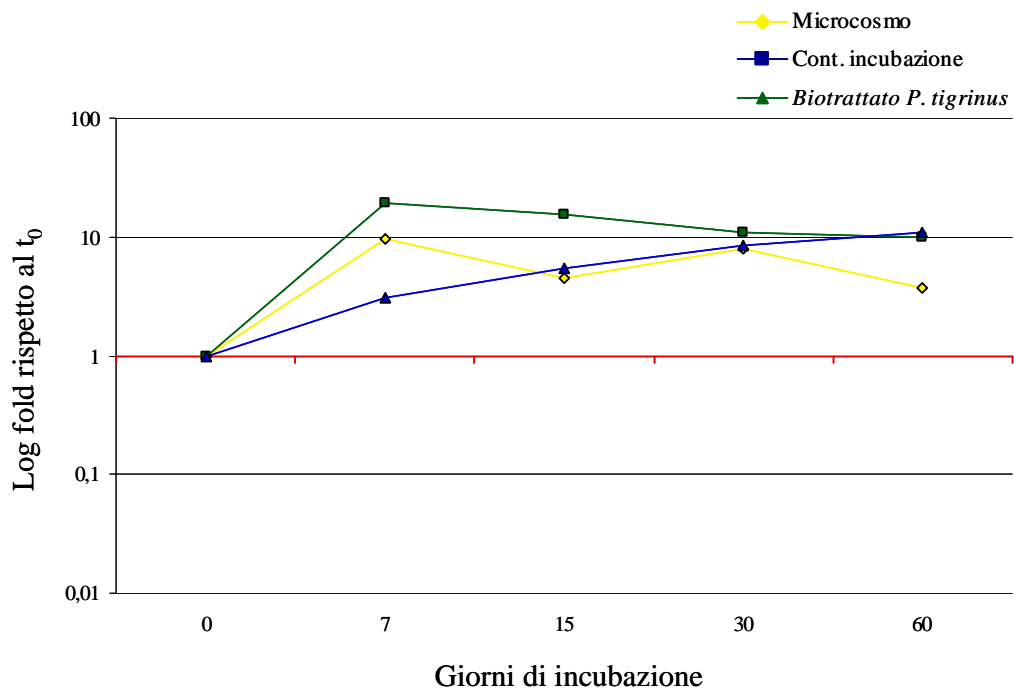


Figura 4.34. Numero di copie del gene 16S calcolato nei microcosmi, nei controlli di incubazione e nei suoli sottoposti a micorisanamento con *P. tigrinus*, ed espresso come logaritmo rispetto al valore osservato al tempo zero di ogni trattamento.

4.4. Micorisanamento di un suolo storicamente contaminato da bifenili policlorurati con il fungo *white-rot Panus tigrinus*: effetto sulla struttura e funzione delle popolazioni batteriche autoctone:

Il fungo *white-rot P. tigrinus*, è stato, infine, impiegato anche nel biottrattamento di un suolo storicamente contaminato da bifenili policlorurati (PCB). Anche in questo caso, gli effetti del micorisanamento sono stati monitorati nel tempo effettuando dei prelievi all'inizio della prova (t_0) e dopo 30 e 60 giorni di incubazione (t_{30} e t_{60}). A differenza della prova descritta precedentemente, in questo caso è stato utilizzato anche olio di soia (OS) come agente mobilizzante allo scopo di aumentare la biodisponibilità dei contaminanti presenti in questo suolo, che sono da considerarsi maggiormente recalcitranti e tossici rispetto agli IPA.

Come già riportato nella sezione Materiali e Metodi, per ogni prelievo sono state quindi considerate sei diverse tesi sperimentali:

- Microcosmo (Suolo come tale)
- Microcosmo OS (Suolo come tale con OS);
- Controllo di incubazione (Cont. incub.: Suolo ammendato con paglia di mais)
- Controllo di incubazione OS (Cont. incub. OS: Suolo ammendato con paglia di mais ed OS);
- Biottrattato con *P. tigrinus* (Suolo ammendato con paglia di mais ed inoculato con il fungo)
- Biottrattato con *P. tigrinus* OS (Suolo ammendato con paglia di mais ed OS ed inoculato con il fungo).

Anche in questo caso, al fine di ottenere una visione il più completa possibile degli effetti del processo di micorisanamento e dell'aggiunta del surfactante sulla struttura e funzione delle popolazioni batteriche indigene del suolo e per valutare i livelli di decontaminazione del suolo stesso, sono state effettuate una serie di analisi di tipo chimico, biochimico, microbiologico e molecolare che verranno di seguito mostrate e discusse.

4.4.1. Crescita fungina:

La colonizzazione della matrice contaminata da parte del fungo, evidente per ispezione visiva (Figura 4.35A), è stata quantificata attraverso la determinazione dell'ergosterolo (Figura 4.36), sterolo tipico della parete cellulare fungina. Inoltre, come indice indiretto dello sviluppo miceliare e dell'attività metabolica fungina, sono state quantificate anche le proteine solubili totali (Figura 4.37) che, come già riportato precedentemente in questo lavoro di tesi, e come noto in letteratura, sono generalmente correlate in modo positivo con la crescita del fungo stesso (Okeke *et al.*, 1994).

Come evidente dalla foto riportata di seguito (Figura 4.35A), dopo 60 giorni di incubazione era chiara la formazione di corpi fruttiferi, che tipicamente il fungo tende a sviluppare in condizioni di stress, determinate, in questo caso, dalla presenza di alte concentrazioni di PCB, mentre nei controlli (Figura 4.35B) di incubazione era visibile lo sviluppo di specie fungine autoctone che, molto probabilmente, sfruttavano gli stocchi di mais, utilizzati come ammendante, quale fonte di carbonio ed azoto per la loro crescita.

Attraverso la quantificazione dell'ergosterolo, era possibile dedurre come il maggiore sviluppo di *P. tigrinus* si avesse sostanzialmente nei primi 30 giorni sia in assenza che in presenza di OS; non erano, infatti, riscontrabili differenze statisticamente significative tra le determinazioni effettuate nei campioni trattati allo stesso modo e prelevati dopo 30 e 60 giorni di incubazione.

Confrontando i suoli trattati o meno con l'OS (Figura 4.36), i livelli di ergosterolo più elevati venivano rilevati nei campioni non trattati con OS; questo dato appare in contrasto con quanto riportato da altri autori che osservavano, invece, un aumento dello sviluppo, in colture liquide, di altri due basidiomiceti *Grifola frondosa* (Hsieh *et al.*, 2008) e *Pleurotus ostreatus* (Belinky *et al.*, 1994) in presenza di surfactanti dello stesso tipo.

Molto probabilmente, dato che la funzione propria degli agenti mobilizzanti è quella di aumentare la biodisponibilità dei contaminanti, l'OS, rendendo i contaminanti stessi maggiormente disponibili provocava anche un aumento della loro tossicità. Quindi, nel caso in cui si rende necessario l'utilizzo di surfactanti è essenziale bilanciare bene questi due effetti, in modo tale da ottimizzarne l'impiego, per evitare, come sembra essersi verificato in tale prova, uno sbilanciamento in favore di una maggiore tossicità dei contaminanti su cui agiscono.

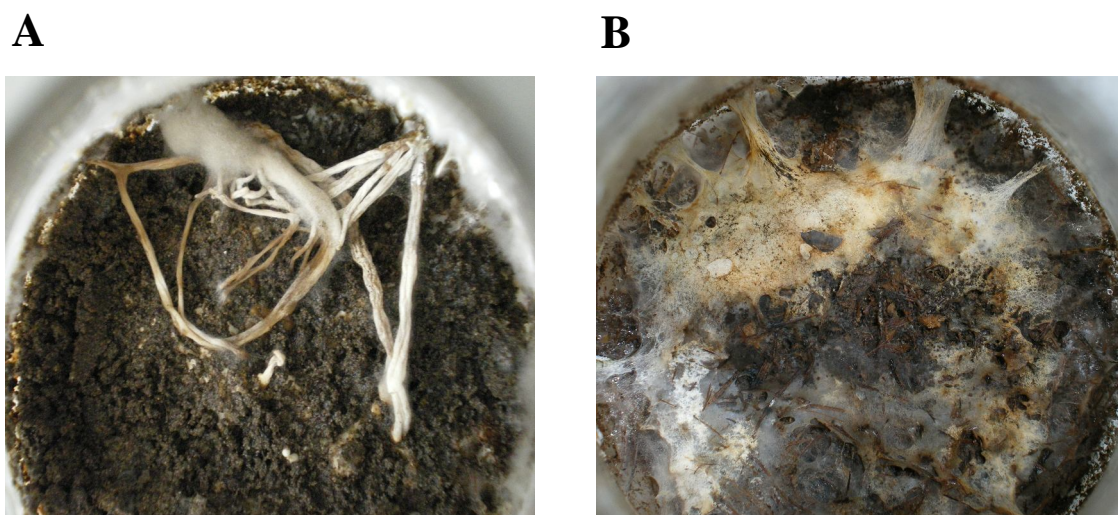


Figura 4.35. Foto relative ai campioni prelevati dopo 60 giorni di incubazione del suolo inoculato con *P. tigrinus* (A), dove sono evidenti i corpi fruttiferi fungini, e del controllo di incubazione (B), dove è possibile osservare lo sviluppo di specie fungine endogene.

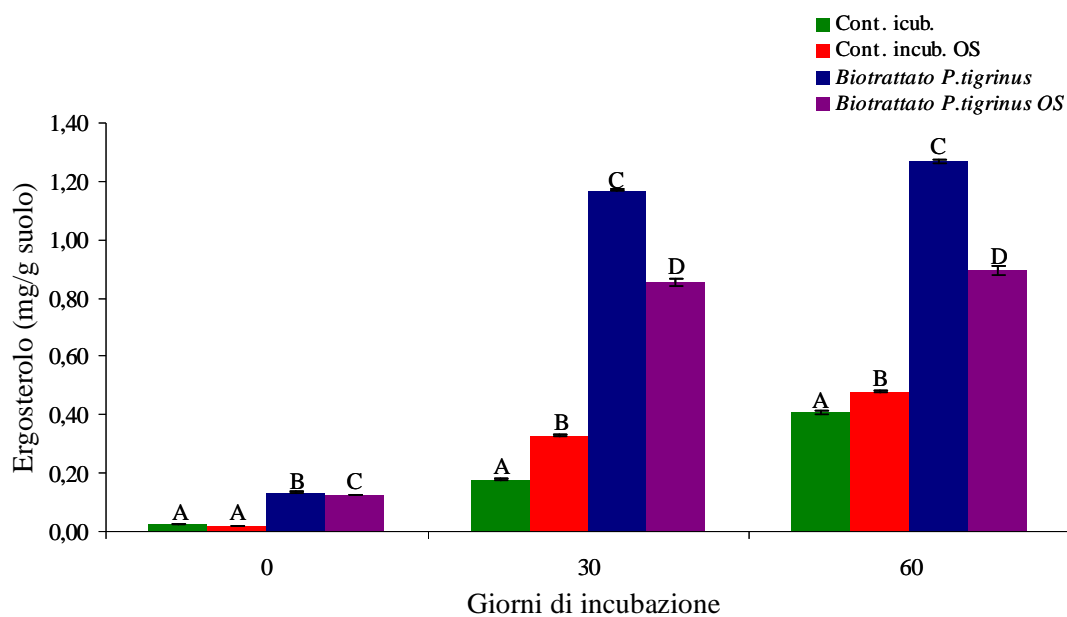


Figura 4.36. Contenuto di ergosterolo in campioni prelevati a tempi diversi, relativi ai controlli d'incubazione e suoli sottoposti a micorisanamento con *P. tigrinus*. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante test di Tukey: le barre d'errore sovrastate da lettere maiuscole uguali indicano assenza di differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra i suoli sottoposti ai diversi tipi di trattamento ma incubati per lo stesso tempo.

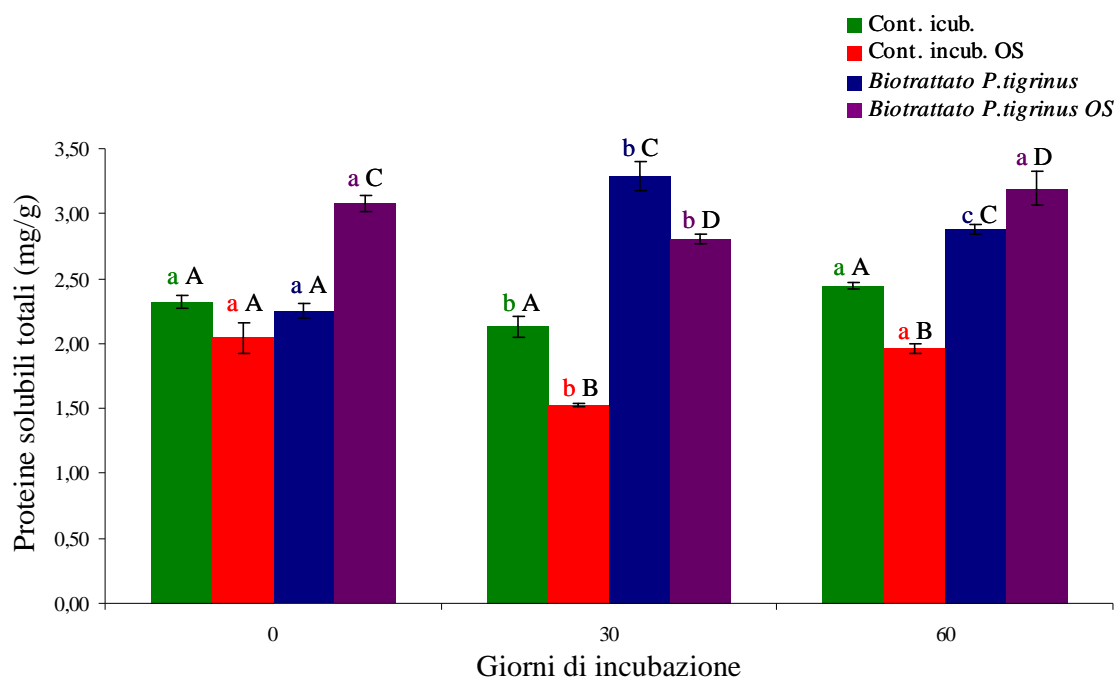


Figura 4.37. Contenuto di proteine solubili totali, quantificate nei campioni prelevati a tempi diversi, nei controlli d’incubazione e nei suoli sottoposti a micorisanamento con *P. tigrinus*. L’analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante test di Tukey: le barre d’errore sovrastate da lettere minuscole uguali, e dello stesso colore delle barre nell’istogramma, indicano assenza di differenze statisticamente significative tra i campioni sottoposti allo stesso tipo di trattamento ma prelevati a tempi diversi; lettere maiuscole uguali indicano, invece, assenza di differenze statisticamente significative tra le diverse tesi nell’ambito dello stesso tempo di prelievo.

4.4.2. Attività ossidasiche fungine:

La determinazione di questo tipo di attività enzimatiche, è di notevole importanza dato che tali enzimi sono generalmente coinvolti nella degradazione dei molti tipi di contaminanti (Novotný *et al.*, 1997; 2004; D’Annibale *et al.*, 2006).

Nel nostro caso, nel suolo biottrattato con il fungo, sia in presenza che in assenza di OS, è stato possibile rilevare sia attività Laccasica (Lac) (Figura 4.38A) che Perossidasi manganese-dipendente (MnP) (Figura 4.38B); tali attività, invece, non venivano rilevate nei controlli d’incubazione a dimostrazione del fatto che le specie fungine autoctone, sviluppatesi in tali campioni, non presentano tali attività ligninolitiche.

Nelle prove di biotattamento l'andamento di queste attività enzimatiche era simile: il picco massimo era raggiunto da entrambi gli enzimi nei campioni prelevati dopo 30 giorni di incubazione.

L'OS aveva una pesante influenza negativa sulla laccasi, tanto che dopo 30 giorni riduceva l'attività di oltre 500 mU/g di suolo rispetto al campione non trattato con il surfactante. Nel caso della Mn-perossidasi, invece, l'influenza dell'olio di soia appariva nettamente positiva: il valore massimo di attività (87,15 mU/g di suolo) si rilevava, infatti, proprio in presenza di tale olio vegetale.

Anche in questo caso, come in quello relativo alla prova di biotattamento del suolo ACNA con lo stesso ceppo fungino, era possibile osservare una attività perossidasi Mn-dipendente circa 10 volte inferiore rispetto all'attività laccasica e, molto probabilmente, ciò era da imputare alla minore stabilità del primo enzima e al fatto che generalmente i funghi *white-rot* lo producono in condizioni colturali controllate, molto diverse dalla matrice contaminata del presente esperimento.

L'abilità di funghi *white-rot* di produrre enzimi ligninolitici in presenza di PCB è stata riportata da altri autori. Novotný e collaboratori (2004) hanno dimostrato, ad esempio, che anche se in quantità diverse, *Phanerochaete chrysosporium*, *Corioloropsis polyzona*, *Trametes versicolor* e *Pleurotus ostreatus* producevano sia Lac che MnP in colture liquide stazionarie su terreno minimo addizionato di PCB alla concentrazione di 0,9 mg/l.

Krěmář e collaboratori (1999) hanno, invece, mostrato per la prima volta che la degradazione di una miscela di PCB non era direttamente ascrivibile alla Manganese-perossidasi e alla Lignina-perossidasi, prodotte dal fungo *white-rot P. chrysosporium*. Infatti, confrontando le percentuali di deplezione dei PCB dopo incubazione della stessa miscela di contaminati con il micelio fungino, con il terreno colturale su cui era stato fatto precedentemente crescere il fungo, o con i due enzimi da esso prodotti e quindi purificati, i PCB venivano degradati in percentuali notevoli solo nei primi due casi mentre gli enzimi purificati non sembravano avere nessuno effetto degradativo.

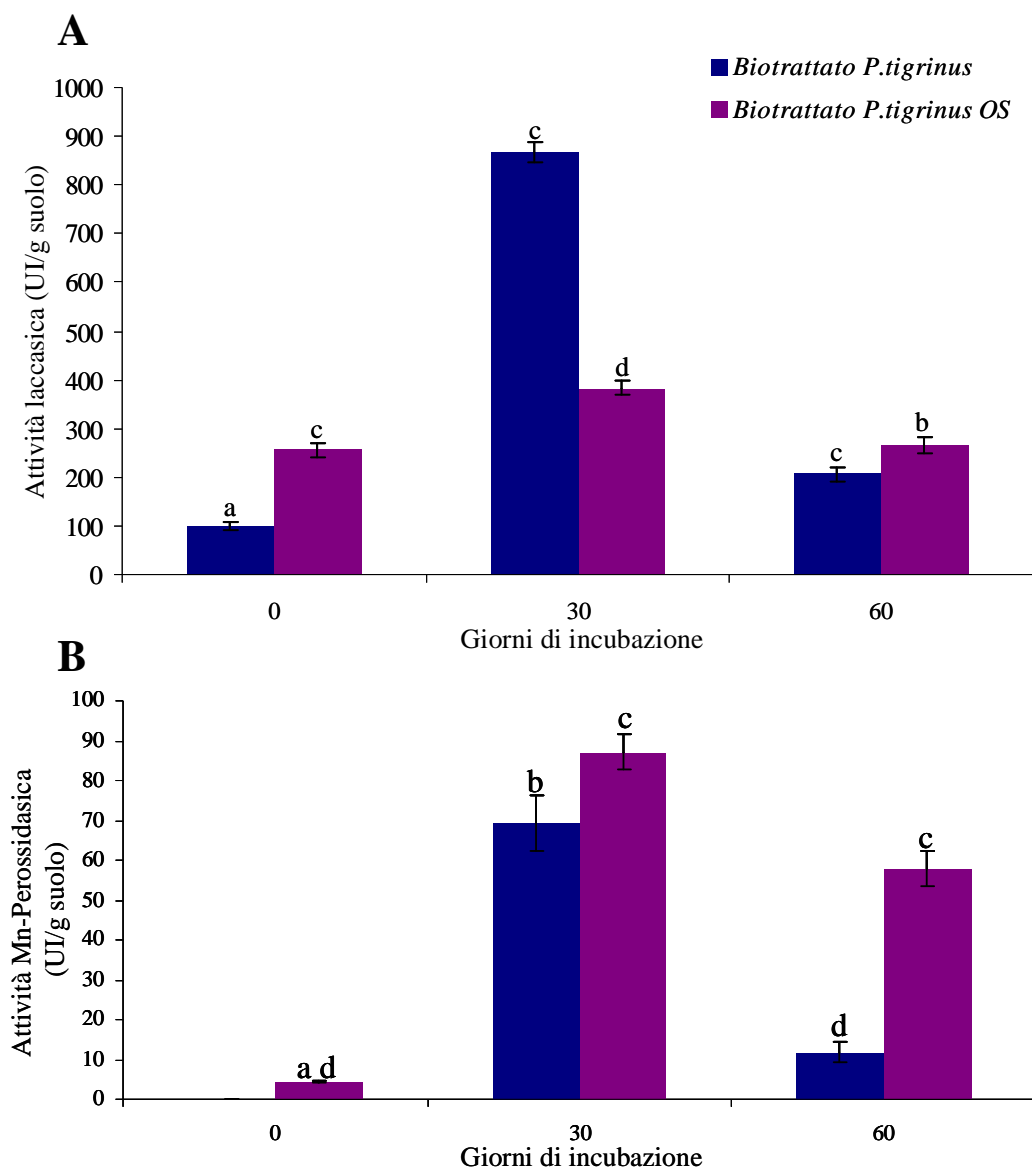


Figura 4.38. Cinetica delle attività ligninolitiche fungine, laccasi (A) e perossidasi Mn-dipendente (B) nel suolo sottoposto a micorisanamento con e senza l'aggiunta di olio di soia. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante test di Tukey: le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali indicano assenza di differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra le attività rilevate nei diversi campioni prelevati a tempi diversi.

4.4.3. Attività idrolasiche fungine:

Le attività di idrolisi dei polisaccaridi, pressoché assenti nei controlli d'incubazione, nel caso del suolo sottoposto a biotattamento fungino, seguivano lo stesso andamento delle attività ligninolitiche presentando i livelli più elevati dopo 30 giorni. I valori massimi, $0,601 \pm 0,067$ per l'attività endo- β -1,4-glucanasica, $0,072 \pm 0,09$ per l'attività cellobioidrolasica e $0,557 \pm 0,06$ UI/g suolo per quella endo- β -1,4-xilanasica, si raggiungevano in assenza di OS, che sembrava, quindi, influenzare negativamente tali attività (Figura 4.39).

E' infatti noto che gli agenti mobilizzanti possono avere effetti sull'efficienza di depolimerizzazione delle idrolasi; surfactanti non ionici come Tween20 e Tween 80 sono in grado di modificare le proprietà di superficie della cellulosa provocando una diminuzione della forza di legame tra l'enzima ed il substrato (Converse *et al.*, 1988; Wu & Ju, 1998).

La minore attività riscontrata nel caso della cellobioidrolasi, rispetto agli altri due enzimi saggiati, era dovuta al fatto che il substrato utilizzato per il saggio, la cellulosa cristallina carbossi-metilata, risultava più difficilmente degradabile rispetto alla cellulosa amorfa e allo xilano, utilizzati, rispettivamente, per la determinazione delle endo- β -1,4-glucanasi e delle endo- β -1,4-xilanasasi.

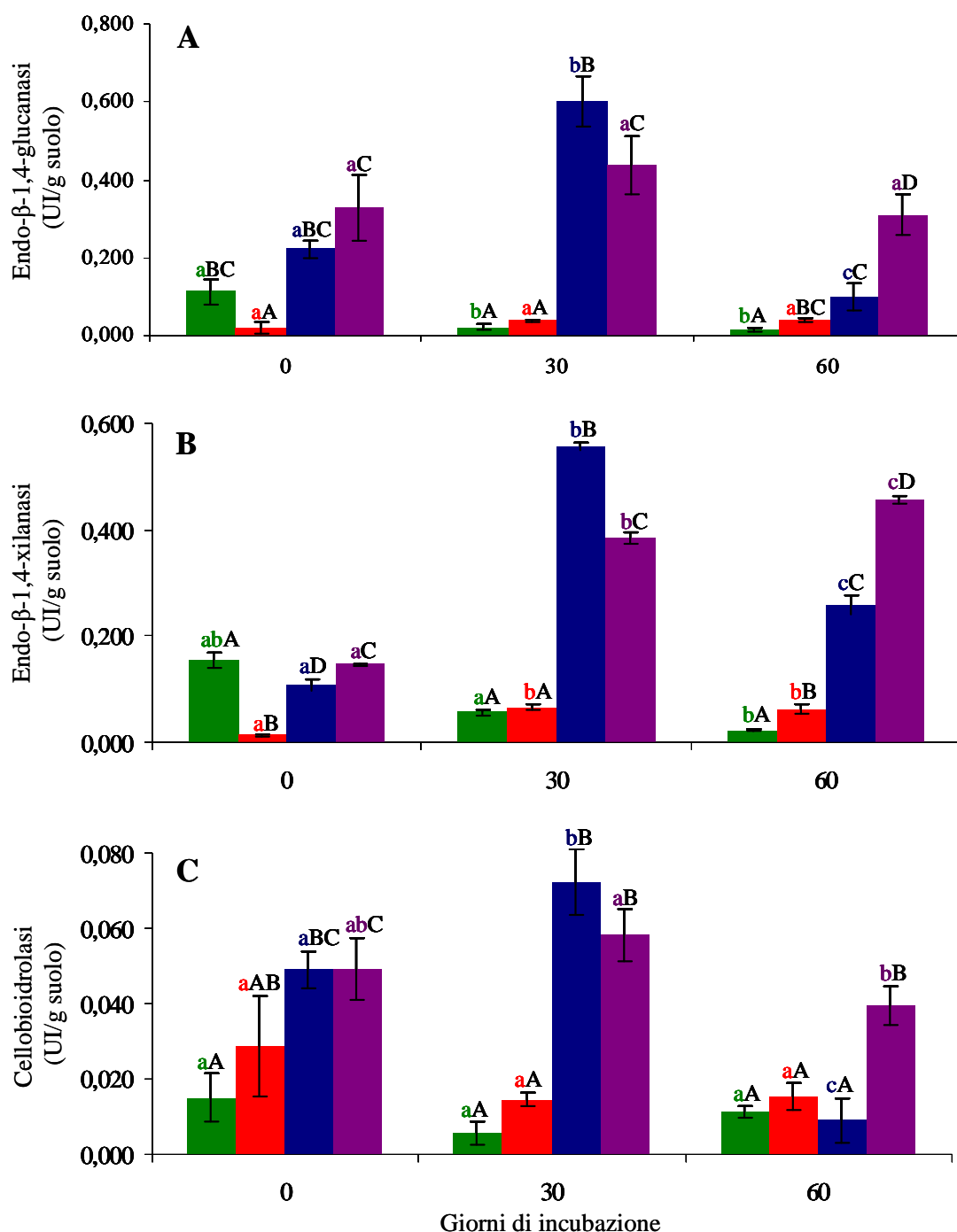


Figura 4.39. Cinetica delle attività idrolasiche Endo-β-1,4-glucanasi (A), Endo-β-1,4-xilanasi (B) e Cellobioidrolasi (C), nei controlli di incubazione e nei suoli sottoposti a micorisanamento, con e senza l'aggiunta di olio di soia. L'analisi statistica dei dati, per ogni diversa attività enzimatica saggiata, è stata effettuata mediante test di Tukey: le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali, e dello stesso colore delle barre nell'istogramma, indicano assenza di differenze statisticamente significative tra i campioni sottoposti allo stesso tipo di trattamento ma prelevati a tempi diversi; lettere maiuscole uguali indicano, invece, assenza di differenze statisticamente significative tra i campioni trattati diversamente ma incubati per lo stesso tempo.

4.4.4. Attività degradative del carbonio e dell'azoto

Allo scopo di comprendere come le attività enzimatiche potessero aver modificato la componente carboniosa e azotata nei suoli diversamente trattati, rendendole disponibili all'utilizzo della microflora, sono stati determinati i valori di carbonio organico totale (TOC), carbonio estraibile totale (TEC) e amminoacidi liberi.

Il TOC rappresenta la frazione di carbonio a disposizione per l'utilizzo microbico mentre il TEC la frazione estraibile del TOC, più facilmente assimilabile e risultante dalla trasformazione dello stesso.

Nei microcosmi il carbonio presente è quasi esclusivamente unico, quindi inattaccabile; il suo valore, infatti, restava pressoché invariato nell'arco dei 60 giorni. Nei controlli di incubazione e nei suoli sottoposti al biotattamento fungino, si assisteva invece ad una graduale riduzione del TOC, indice, appunto di mineralizzazione del carbonio organico (Figura 4.40A).

In relazione alle attività idrolasiche riportate in precedenza, che determinavano riduzione del TOC, si sarebbe dovuto assistere ad un aumento del TEC, ma questo non si è verificato. Si può quindi supporre che, man mano che il carbonio veniva reso disponibile, la microflora lo sfruttava per le sue attività metaboliche e, pertanto, l'andamento del TEC riproduceva in linea di massima quello del TOC, con una graduale diminuzione durante tutto il periodo di incubazione dei campioni (Figura 4.40B).

Nel caso degli amminoacidi liberi si assisteva ad una loro notevole diminuzione, sia nei controlli d'incubazione che nelle prove di biotattamento; tale decremento era molto probabilmente determinato dalla paglia che, rappresentando, oltre ad una fonte di carbonio, anche una fonte di azoto, lo forniva alle comunità microbiche che tendevano quindi a metabolizzarlo nel tempo. Tale fonte di azoto, assente nei microcosmi, dove appunto il contenuto iniziale di amminoacidi risultava nullo, aumentava durante l'incubazione seppur raggiungendo concentrazioni molto basse, dopo 60 giorni, imputabili allo sviluppo microbico (Figura 4.42).

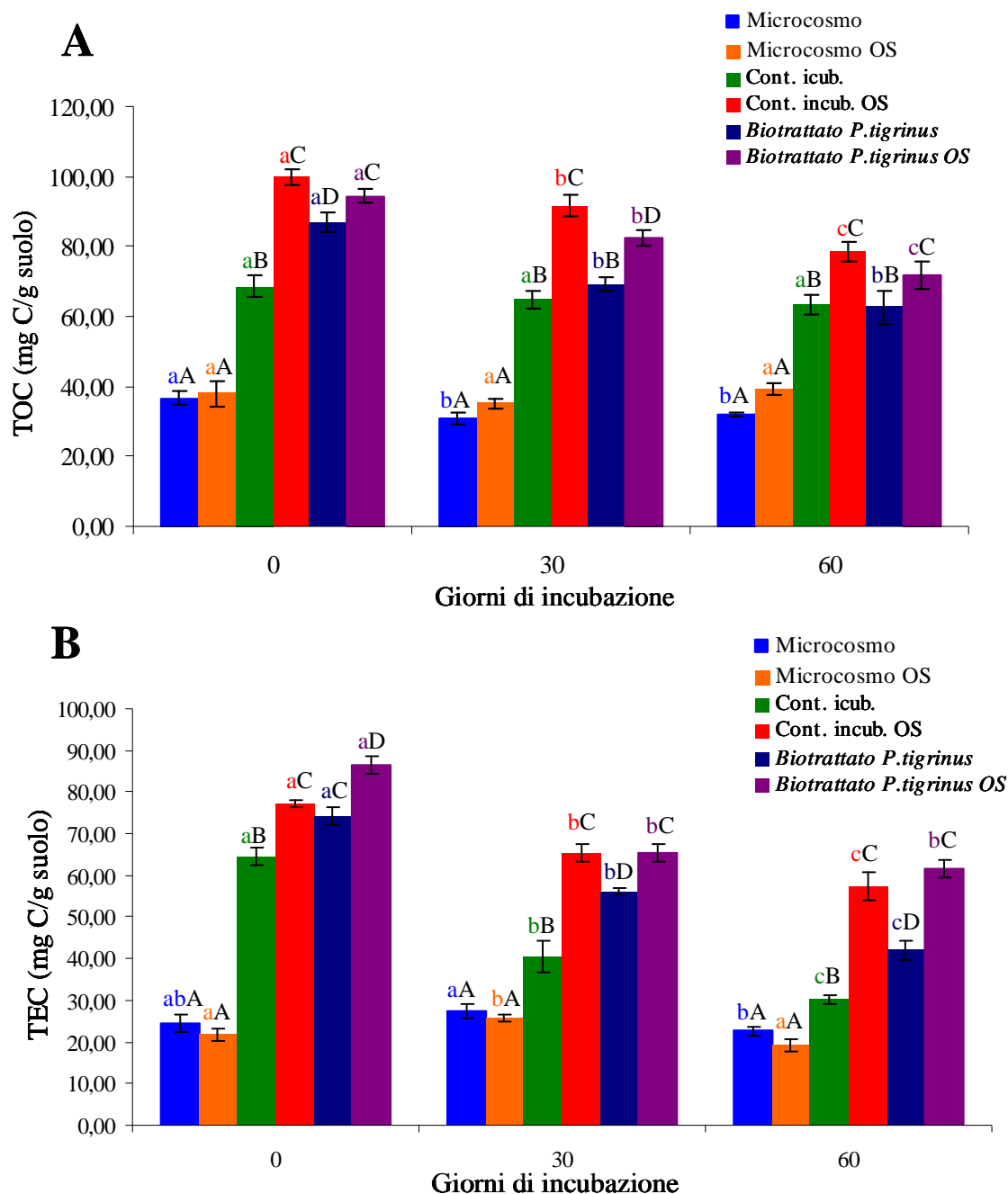


Figura 4.40. Carbonio Organico Totale (TOC) (A) e Carbonio Estraiibile Totale (TEC) (B) determinato nei microcosmi, nei controlli di incubazione e nei suoli sottoposti a micorisanamento, con e senza l'aggiunta di olio di soia. L'analisi statistica dei dati, è stata effettuata mediante il test di Tukey ($P < 0,05$). Le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali, e dello stesso colore delle barre nell'istogramma, indicano assenza di differenze statisticamente significative tra i campioni trattati allo stesso modo ma prelevati a tempi diversi. Lettere maiuscole uguali indicano, invece, assenza di differenze statisticamente significative tra i campioni trattati diversamente ma incubati per lo stesso tempo.

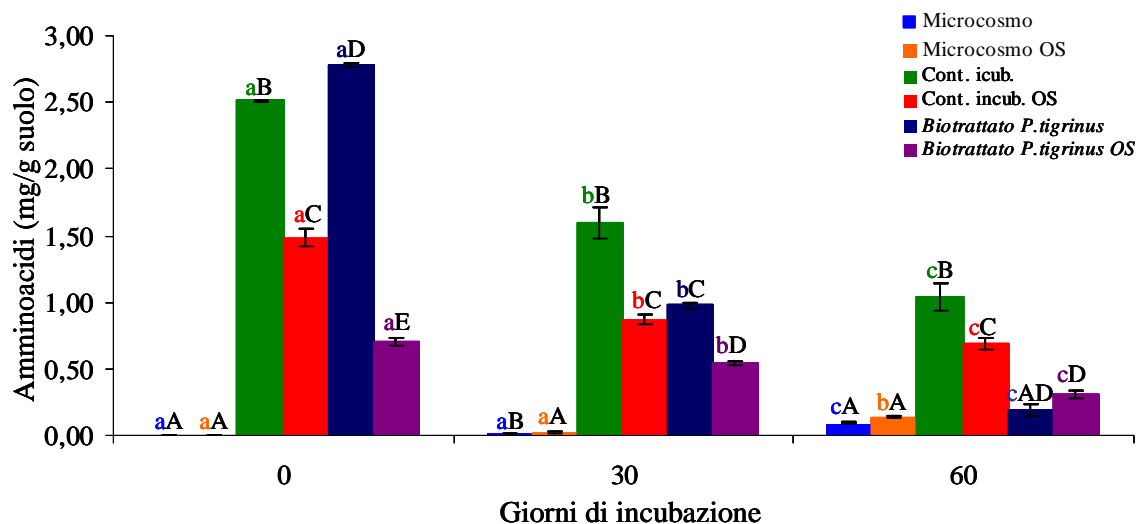


Figura 4.41. Concentrazione degli amminoacidi liberi nei microcosmi, nei controlli di incubazione e nei suoli sottoposti a micorisanamento, con e senza aggiunta di olio di soia. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante test di Tukey ($P < 0,05$). Le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali, e dello stesso colore delle barre nell'istogramma, indicano assenza di differenze statisticamente significative tra i campioni trattati allo stesso modo ma prelevati a tempi diversi. Lettere maiuscole uguali indicano, invece, assenza di differenze statisticamente significative tra i campioni trattati diversamente ma incubati per lo stesso tempo.

4.4.5. Decontaminazione del suolo:

Con lo scopo di valutare quale fosse stata l'azione, sulla eventuale deplezione dei contaminanti, del processo di micorisanamento e dell'aggiunta di olio di soia al suolo storicamente contaminato da PCB, sono state valutate le concentrazioni dei diversi congeneri presenti nel suolo stesso, nei campioni incubati per 60 giorni. Le analisi CG-MS hanno evidenziato diversi effetti sulla deplezione dei PCB dovuti ai vari agenti presenti nel suolo stesso: la microflora indigena, l'olio di soia, gli stocchi di mais aggiunti come ammendante, ed il fungo.

Di seguito vengono mostrati tre diversi grafici nei quali vengono messi a confronto i livelli dei contaminanti dopo 60 giorni di incubazione nei campioni sottoposti ai diversi tipi di trattamento al fine di evidenziare, appunto, l'effetto dei diversi fattori che provocavano o meno una riduzione della contaminazione del suolo stesso. In tabella 4.11 sono riportati, invece, i livelli di deplezione percentuale dei singoli congeneri, calcolati rispetto alla loro concentrazione nel suolo all'inizio del trattamento.

In particolare, la microflora batterica residente sembrava avere un effetto positivo sulla decontaminazione complessiva del suolo con percentuali di deplezione superiori al 50% nel caso di congeneri di-clorurati, al 30% nel caso di congeneri contenenti da tre a cinque atomi di cloro e del 20% nel caso di quelli maggiormente alogenati (Figura 4.42).

Inoltre dal confronto tra il microcosmo trattato e quello non trattato con olio di soia (Figura 4.42) emergeva un effetto negativo svolto dal surfactante sulla deplezione percentuale dei PCB. Il risultato ottenuto circa l'effetto negativo dell'agente mobilizzante non era in linea con quanto riportato da Fava e collaboratori (2003) in uno studio condotto in due diversi tipi di bioreattori in fase *shurry* sullo stesso suolo a cui venivano però aggiunti bifenile, come nutriente per favorire lo sviluppo della microflora batterica in grado di degradare i PCB e RAMEB, come surfactante per aumentarne la loro biodisponibilità. Nel caso illustrato da questi autori, infatti, l'agente mobilizzante risultava nettamente efficiente nel favorire la rimozione dei PCB che dipendeva, comunque, sia dal tipo di trattamento a cui veniva sottoposto il suolo che dalla quantità di RAMEB impiegato.

Effetti positivi sulla deplezione di PCB in un suolo modello contaminato in laboratorio con Fenclor 42 (1g/kg suolo) ed ammendato con lecitina di soia sono stati riportati in un altro lavoro (Fava e Di Gioia, 2001); i due autori hanno ottenuto, infatti, un notevole aumento dei livelli di detossificazione del suolo in seguito al trattamento

dello stesso in bioreattore *slurry*, con lecitina di soia e l'inoculo di un consorzio batterico (ECO3) in cui erano presenti specie in grado di degradare PCB.

Nel nostro caso, si è voluto testare l'OS come agente mobilizzante, dato che un suo possibile utilizzo su scala di pieno campo sarebbe economicamente favorevole, dato il suo basso costo, ed inoltre si è scelto di non aggiungere al suolo bifenile per non introdurre un ulteriore fattore in grado di modificare la struttura delle popolazioni batteriche residenti; il nostro scopo principale era, infatti, quello di valutare quale fosse stato l'effetto dell'inoculo fungino sulla microflora stessa.

Oltre a valutare l'azione delle popolazioni batteriche residenti sulla deplezione dei contaminanti, si è voluto stimare anche se l'aggiunta degli stocchi di mais potesse avere qualche effetto sulla deplezione dei PCB, magari attraverso il loro assorbimento allo stesso materiale lignocellulosico.

A tale scopo sono state confrontate le concentrazioni dei diversi congeneri nel microcosmo e nel controllo d'incubazione alla fine del trattamento (Figura 4.43) e come è possibile osservare nel grafico, gli stocchi di mais sembravano avere un effetto complessivamente negativo sulla deplezione dei vari congeneri da parte delle comunità microbiche autoctone. Le percentuali di deplezione per quasi tutti i congeneri risultavano infatti molto basse, si passava dal 30% per quelle relative ai congeneri a due atomi di cloro al 5% per quelle relative ai congeneri maggiormente clorurati.

Infine, paragonando le concentrazioni relative ai diversi congeneri nei controlli di incubazione e nel suolo sottoposto al biotattamento fungino (Figura 4.44), dopo 60 giorni di incubazione, si è evidenziato un effetto trascurabile del fungo stesso sulla deplezione dei PCB sia nel caso del suo impiego nel micorisanamento del suolo pretrattato con olio di soia che nel trattamento del suolo senza aggiunta dell'agente mobilizzante. Si ottenevano infatti percentuali di deplezione molto simili a quelle appena descritte per i controlli di incubazione, con una reale diminuzione della concentrazione dei soli congeneri a due o tre atomi di cloro.

Pochi sono, comunque, gli studi riportati a tutt'oggi riguardo i processi di micorisanamento condotti in suoli contaminati da PCB e, come osservato da diversi autori, le specie coinvolte sono principalmente funghi ligninolitici precedentemente selezionati per le loro abilità degradative nei confronti di altri contaminanti organici: *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Grifola frondosa*, *Coriolopsis polyzona* (Novotný *et al.*, 1997; Kubátová *et al.*, 2001; Ruiz-Aguilar *et al.*, 2002; Rabinovich *et al.*, 2004; Kamei *et al.*, 2006; Takagi *et al.*, 2007).

Inoltre, nella maggior parte degli studi, sono stata condotte prove di degradazione dei PCB in terreni di coltura liquidi contaminati con gli stessi, nelle quali le condizioni colturali erano strettamente controllate e quindi adeguate alla stimolazione delle attività degradative fungine generalmente condizionate, appunto, da diversi fattori quali la composizione del mezzo di coltura o l'iniziale concentrazione dei PCB nel mezzo stesso (Vasilyeva *et al.*, 2005).

Nelle condizioni sperimentali utilizzate nella prova di micorisanamento condotta nel nostro laboratorio con *P. tigrinus*, molto probabilmente il fungo non essendo posto in condizioni favorevoli non è riuscito ad attaccare e degradare adeguatamente i PCB presenti nel suolo.

Tabella 4.11. Concentrazione dei diversi congeneri di PCB nel suolo al t_0 (campione di riferimento) e nei campioni sottoposti ai diversi trattamenti prelevati dopo 60 giorni di incubazione, espresse come percentuale di riduzione rispetto allo stesso campione di riferimento.

Tipo di congenero	Deplezione % calcolata rispetto alla concentrazione dei diversi congeneri all'inizio del trattamento											
	Concentrazione all'inizio del trattamento (mg/kg suolo)					Microcosmo					Biotrattato	
	Microcosmo t_0		Cont. Incub. t_0		OS t_0		Cont. Incub. t_0		OS t_0		P. <i>tigrinus</i> t_0	
2,6-/2,2'-CB	1,828 ± 0,779	24,42	20,98	89,36	31,96	58,93	28,19					
2,4-/2,5-CB	0,119 ± 0,076	23,02	95,31	95,80	11,39	53,94	17,21					
2,3'-CB	0,483 ± 0,115	50,25	53,32	-5,22	53,70	90,28	51,97					
2,4-/2,3-CB	0,128 ± 0,041	72,22	100,00	100,00	62,56	84,99	67,39					
2,2',6-CB	2,988 ± 0,364	33,75	31,50	43,36	32,47	62,91	33,11					
2,2',5-/2,2',4-/4,4'-CB	40,305 ± 3,396	34,48	29,42	45,55	31,70	54,05	33,09					
2,3,6-/2,3',6-CB	3,122 ± 0,191	34,69	28,43	43,63	30,67	51,62	32,68					
2,2',3-/2,2',4',6-CB	16,194 ± 0,924	34,44	29,08	41,23	30,88	50,30	32,66					
2',3,5-CB	0,223 ± 0,007	37,47	28,00	47,38	32,31	44,98	34,89					
2,4,5-CB	0,203 ± 0,014	38,38	28,36	46,05	33,02	49,49	35,70					
2,3',5-CB	7,006 ± 0,276	35,68	27,65	36,70	28,81	40,74	32,24					
2,3',4-CB	2,169 ± 0,188	32,79	27,52	35,69	28,26	40,35	30,53					
2,4',5-/2,4,4'-CB	57,574 ± 2,215	35,25	27,35	35,00	28,93	38,23	32,09					
2,3,3-/2',3,4-/2,2',5,6'-CB	7,072 ± 0,311	32,69	25,06	33,28	26,90	39,88	29,79					
2,2',4,6'-/2,3,4'-CB	26,444 ± 1,050	34,61	27,63	31,45	28,42	38,54	31,52					
2,2',3,6-CB	6,312 ± 0,205	34,14	26,59	35,04	28,99	44,94	31,57					
2,2',3,6'-CB	2,945 ± 0,108	33,50	25,55	32,12	31,43	47,40	32,46					
2,2',5,5'-CB	24,580 ± 1,033	34,22	25,43	32,07	27,08	36,17	30,65					
2,2',4,5'-CB	17,423 ± 0,811	34,30	25,87	31,87	27,40	36,09	30,85					
2,2',4,4'-/2,2',4,5-/2,4,4',6-CB	8,922 ± 0,460	34,39	26,10	31,99	27,59	38,72	30,99					
3,3',4-CB	0,781 ± 0,052	39,68	99,65	24,56	26,70	31,20	33,19					
2,2',3,5'-CB	17,533 ± 0,573	33,49	24,88	29,33	25,65	33,72	29,57					
3,4,4'-/2,3,3',6-/2,2',3,4'-CB	9,602 ± 0,573	33,83	26,82	26,12	27,37	33,13	30,60					
2,2',3,4'-/2,3,4',6-CB	19,449 ± 1,119	36,04	26,64	27,97	28,10	35,06	32,07					
2,2',3,3'-CB	5,550 ± 0,346	32,82	26,05	25,37	26,45	35,67	29,64					
2,3',4,5-CB	2,286 ± 0,158	33,77	25,73	23,79	25,31	30,90	29,54					

Segue

Tabella 4.11. Concentrazione dei diversi congeneri di PCB nel suolo al t_0 (campione di riferimento) e nei campioni sottoposti ai diversi trattamenti prelevati dopo 60 giorni di incubazione, espresse come percentuale di riduzione rispetto allo stesso campione di riferimento.

(Continua)

Deplezione % calcolata rispetto alla concentrazione dei diversi congeneri all'inizio del trattamento

Tipo di congenerere	Concentrazione all'inizio del trattamento (mg/kg suolo)		Microcosmo		Cont. Incub.		Biotrattato	
	Concentrazione (mg/kg suolo)	t_{60}	OS	t_{60}	OS	t_{60}	<i>P.tigrinus</i>	t_{60}
2,3,4',5'-CB	1,127 ± 0,071	32,74	24,09	21,43	26,92	23,13	23,13	29,83
2,4,4',5'-CB	11,835 ± 0,808	32,95	26,05	24,31	26,16	27,71	27,71	29,55
2,3,4',5'-CB	20,211 ± 1,399	32,62	25,83	23,51	26,06	28,44	28,44	29,34
2,2,3,5',6'-CB	23,750 ± 1,453	29,59	23,34	22,65	24,39	27,95	27,95	26,99
2,2,3,4',6'-CB	1,121 ± 0,068	31,98	27,39	25,57	29,10	27,11	27,11	30,54
2,3,4,4',2,3,3',4'-CB	17,165 ± 1,287	31,66	26,07	21,49	26,29	28,00	28,00	28,97
2,2,3,5',5'-CB	4,110 ± 0,292	29,16	24,86	21,45	22,94	25,24	25,24	26,05
2,2,3,3',6'-CB	7,867 ± 0,444	32,17	28,59	25,70	27,50	32,03	32,03	29,83
2,2,3,4',5',2,2',4,5',5'-CB	28,658 ± 1,771	27,78	22,20	19,58	23,12	25,33	25,33	25,45
2,2,4,4',5'-CB	7,051 ± 0,426	31,39	27,87	24,14	27,18	27,93	27,93	29,29
2,3,4,4',6'-CB	0,394 ± 0,216	41,91	-162,64	38,94	40,02	15,35	15,35	40,96
2,2,3,3',5'-CB	1,281 ± 0,104	30,70	-19,27	27,96	24,43	15,61	15,61	27,57
2,2,3',4,5'-CB	6,265 ± 0,421	30,68	27,63	22,84	23,12	25,61	25,61	26,90
2,2,3,4,5',2,3,4,4',6'-CB	11,138 ± 0,793	31,09	27,39	20,84	25,30	25,80	25,80	28,20
2,2,3,4,4'-CB	2,889 ± 0,216	40,39	31,83	20,54	26,72	24,96	24,96	33,56
2,2,3,3',6',6'-CB	7,660 ± 0,790	23,15	19,74	15,72	18,82	21,08	21,08	20,98
2,3,3',4',6'-CB	18,316 ± 1,288	28,39	25,15	19,28	23,96	24,62	24,62	26,18
2,2,3,5,5',6'-CB	11,006 ± 0,711	23,60	20,39	15,46	20,01	21,04	21,04	21,81
2,2,3,3',5,6'-CB	8,234 ± 0,550	23,74	22,72	15,37	20,41	19,46	19,46	22,08
2,3,3',4',5'-CB	0,851 ± 0,066	31,74	27,96	21,22	21,41	50,89	50,89	26,57
2,2,3,4',5',6',2,3',4,4',5'-CB	32,328 ± 2,225	24,82	21,66	16,00	21,24	21,57	21,57	23,03
2,2,3,3',5,6'-CB	2,708 ± 0,199	24,82	21,58	15,91	21,19	22,06	22,06	23,01
2,2,3,3',4,6',2',3,3',4,5'-CB	2,408 ± 0,181	26,46	22,39	15,38	20,99	23,37	23,37	23,72
2,2,3,4',5,5'-CB	5,156 ± 0,360	24,79	21,07	14,63	20,94	21,64	21,64	22,87
2,2,3,3',4,6',2,4,4',5',5',2,3,3',4,4'-CB	56,572 ± 4,031	24,15	21,28	14,25	20,70	21,01	21,01	22,42
2,2,3,4,5',2,2',3,3',5,6,6'-CB	12,585 ± 0,859	22,46	19,81	12,87	19,07	19,18	19,18	20,77

Segue

Tabella 4.11. Concentrazione dei diversi congeneri di PCB nel suolo al t_0 (campione di riferimento) e nei campioni sottoposti ai diversi trattamenti prelevati dopo 60 giorni di incubazione, espresse come percentuale di riduzione rispetto allo stesso campione di riferimento. (Continua)

Tipo di congeneri	Concentrazione all'inizio del trattamento (mg/kg suolo)	Microcosmo		Cont. Incub.		Biotrattato	
		t_{60}	OS t_{60}	t_{60}	OS t_{60}	$P.tigrinus$ t_{60}	$P.tigrinus$ OS t_{60}
2,2',3,3',4,5'+2,2',3,3',4,6,6'/2,2',3,4,4',5'-CB	3,655 ± 0,258	22,29	19,35	12,33	18,68	19,36	20,49
2,3,3',4,5,6/2,2',3,4,4',5'/2,3,3',4,4',6'-CB	32,010 ± 2,371	24,54	21,72	14,27	21,00	20,98	22,77
2,2',3,3',4,5,6/2,2',3,3',5,5',6'-CB	6,294 ± 0,355	18,33	14,91	7,94	15,49	16,19	16,91
2,2',3,3',4,5',6+2,2',3,4',5,5',6'-CB	9,891 ± 0,633	19,84	17,12	9,91	16,99	17,17	18,42
2,2',3,4,4',5',6'-CB	4,579 ± 0,315	21,12	18,73	11,08	17,91	18,11	19,51
2,2',3,4,4',5',6+2,2',3,3',4',4'+2,3',4,4',5,5'-CB	9,119 ± 0,724	25,19	22,45	14,05	21,03	20,94	23,11
2,2',3,4,5',6'-CB	2,964 ± 0,188	19,71	16,52	9,43	16,35	15,92	18,03
2,2',3,3',4,5,6'-CB	9,682 ± 0,665	20,17	17,96	10,19	17,34	17,36	18,75
2,2',3,3',4',5,6'-CB	5,540 ± 0,374	20,47	17,92	10,26	17,58	17,51	19,03
2,2',3,3',5',6,6'/2,2',3,3',4,4',6/2,3,3',4,4',5'-CB	10,112 ± 0,674	22,36	20,82	11,82	18,70	18,20	20,53
2,2',3,3',5',6,6'/2,3,3',4,4',5'/2,3,3',4,5',6,6'-C	3,493 ± 0,237	17,57	13,71	6,02	14,30	14,83	15,94
2,2',3,3',4,5'+2,2',3,3',4,4',6,6'-CB	2,034 ± 0,203	20,96	17,64	9,78	17,69	18,20	19,33
2,2',3,4,4',5,5'+2,3,3',4',5',6'-CB	21,089 ± 1,511	21,08	18,64	10,18	17,75	18,10	19,41
2,2',3,4,4',5',6'-CB	0,788 ± 0,052	19,11	19,91	11,45	16,97	12,96	18,04
2,2',3,3',4,5,6,6'-CB	0,869 ± 0,045	14,80	10,26	3,54	12,13	12,26	13,47
3,3',4,4',5',5'-CB	0,079 ± 0,021	29,42	5,68	-2,27	28,10	16,06	28,76
2,2',3,3',4,4',5'/2,3,3',4,4',5,6'-CB	13,315 ± 0,906	21,01	17,86	9,90	17,51	17,69	19,26
2,2',3,3',4,5,5',6'-CB	0,186 ± 0,040	35,11	30,78	26,74	34,04	34,89	34,57
2,2',3,3',4,5,5',6+2,2',3,3',4,5,5',6'	2,666 ± 0,167	18,57	15,56	7,87	15,77	15,91	17,17
2,2',3,4,4',5,5',6/2,2',3,3',4,4',5',6'-CB	3,616 ± 0,228	18,82	15,67	7,98	15,50	15,28	17,16
2,3,3',4,4',5',5'-CB	0,322 ± 0,025	22,91	17,20	10,07	17,31	18,50	20,11
2,2',3,3',4,5,5',6,6'/2,2',3,3',4,4',5,6'-CB	1,706 ± 0,127	17,46	14,79	5,84	14,17	14,39	15,82
2,2',3,3',4,4',5,6,6'-CB	0,103 ± 0,007	12,23	15,79	9,24	8,90	6,21	10,57
2,2',3,3',4,4',5,5'-CB	2,805 ± 0,192	19,84	15,52	7,78	15,45	15,87	17,65
2,3,3',4,4',5,5',6'-CB	0,271 ± 0,016	10,66	11,51	10,11	16,64	15,03	13,65
2,2',3,3',4,4',5,5',6'-CB	0,864 ± 0,069	6,63	5,04	-123,03	-7,10	-46,96	-0,23

Deplezione % calcolata rispetto alla concentrazione dei diversi congeneri all'inizio del trattamento

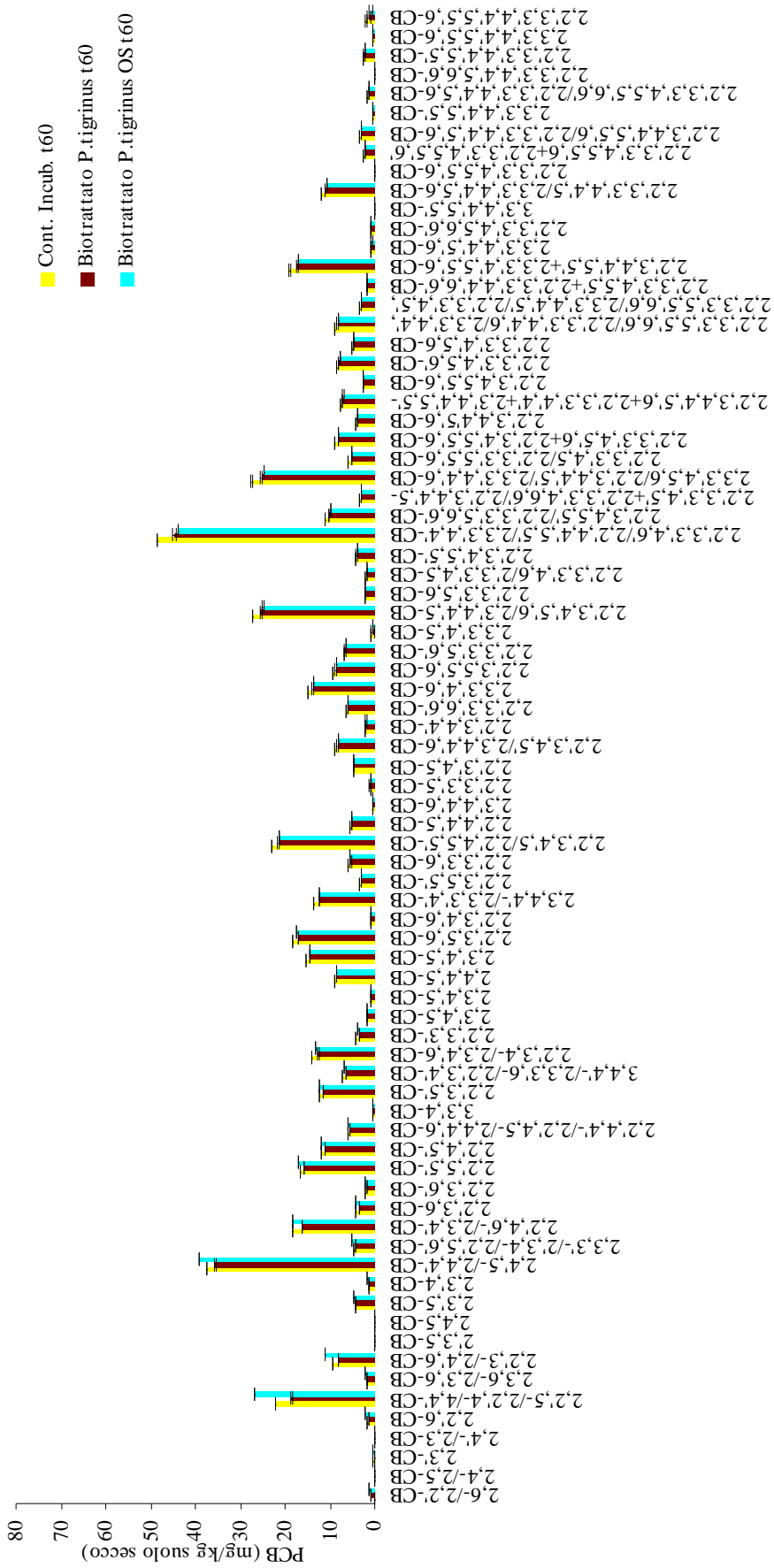


Figura 4.44. Effetto dell'inoculo fungino e dell'aggiunta di olio di soia, come agente mobilizzante, sulla deplezione dei diversi congeneri presenti nel suolo.

4.4.6. Detossificazione del suolo:

Come indicatore biologico indiretto dei livelli di detossificazione del suolo sottoposto ai diversi trattamenti è stata quantificata l'attività deidrogenasica.

Tale attività aumentava notevolmente nel suolo sottoposto a biottrattamento con *P. tigrinus* durante tutto il periodo di incubazione dimostrando quindi una riduzione notevole della tossicità del suolo stesso (Figura 4.45). Tale effetto positivo del fungo era molto probabilmente dovuto alla sua capacità di bioadsorbimento nei confronti dei contaminanti, che in questo modo venivano resi meno disponibili e di conseguenza meno tossici per la microflora batterica.

In particolare, dopo 60 giorni di incubazione in presenza di olio di soia si raggiungeva un valore molto più elevato (6,02 UI/g di suolo) rispetto a quello determinato nel suolo sottoposto al trattamento fungino senza l'aggiunta del surfactante (4,25 UI/g di suolo) (Figura 4.45).

Gli stessi effetti positivi sui livelli di detossificazione del suolo in seguito al micorisanamento e all'aggiunta di agenti mobilizzanti erano stati osservati anche nelle prove descritte precedentemente in questo lavoro di tesi condotte su suoli contaminati da idrocarburi aromatici.

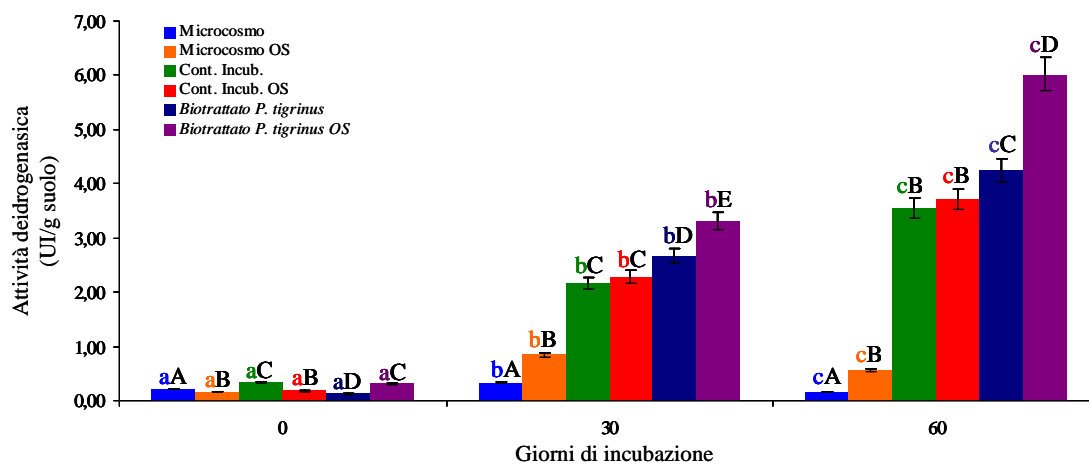


Figura 4.46. Attività deidrogenasica nei microcosmi, nei controlli d'incubazione e nei suoli sottoposti a micorisanamento con *P. tigrinus*, in presenza ed in assenza di olio di soia. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante test di Tukey: le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali, e dello stesso colore delle barre nell'istogramma, indicano assenza di differenze statisticamente significative tra i campioni sottoposti allo stesso tipo di trattamento ma prelevati a tempi diversi; lettere maiuscole uguali indicano, invece, assenza di differenze statisticamente significative tra le diverse tesi nell'ambito dello stesso tempo di prelievo.

4.4.7. Effetto dell'inoculo fungino e dell'olio di soia sulla crescita dei batteri eterotrofi totali e specializzati nella degradazione di acidi benzoici monoclorurati (CBA) e bifenile:

Allo scopo di valutare quale fosse stato l'effetto dell'inoculo fungino e dell'aggiunta dell'OS sulla microflora batterica coltivabile residente, sono state effettuate conte vitali dei batteri eterotrofi totali (Figura 4.46) e di quelli specializzati nella degradazione di acidi benzoici monoclorurati (CBA) (Figura 4.47A) e di bifenile (Figura 4.47B).

Sia nel caso dei batteri eterotrofi totali che degli specializzati, è stato possibile rilevare un aumento continuo del numero degli stessi durante i 60 giorni d'incubazione e dal confronto tra i controlli di incubazione ed i suoli sottoposti al micorisanamento è stato possibile osservare l'influenza positiva sia del fungo che dell'aggiunta di OS sullo sviluppo della microflora batterica coltivabile.

Questo risultato non era comunque in linea con quanto osservato nelle altre prove di micorisanamento condotte in presenza dello stesso agente mobilizzante dalle quali emergeva invece un effetto decisamente negativo svolto dall'olio di soia sulla crescita batterica.

L'effetto positivo sullo sviluppo microbico esercitato dalla lecitina di soia, altro surfactante biogeno, è stato osservato anche in uno studio di *bioremediation* condotto da Fava e Di Gioia (2000) su suolo contaminato da PCB e biotratato con un consorzio batterico in bioreattore *slurry*: la lecitina di soia favoriva sia la crescita dei batteri appartenenti al consorzio con il quale veniva inoculato il suolo che lo sviluppo della microflora batterica endogena.

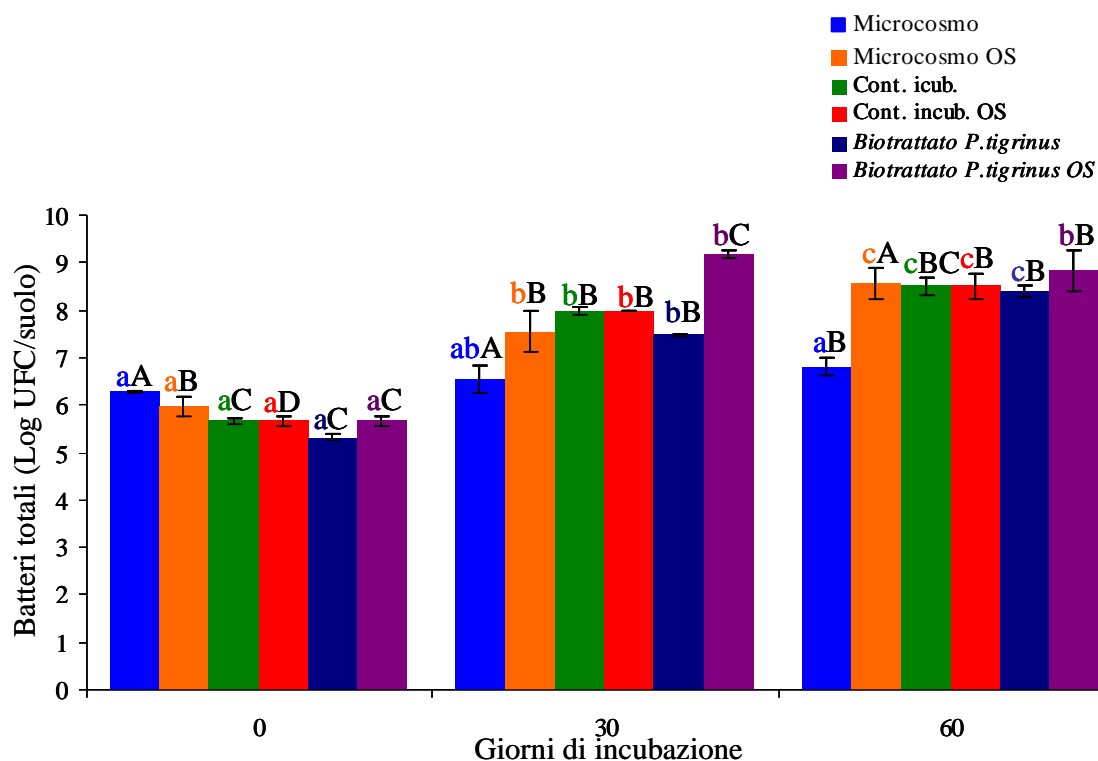


Figura 4.46. Numero di batteri eterotrofi totali, espresso come logaritmo delle unità formanti colonia (UFC), nei microcosmi, nei controlli d'incubazione e nei suoli sottoposti a micorisanamento con *P. tigrinus*, in presenza ed in assenza di olio di soia. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante test di Tukey: le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali, e dello stesso colore delle barre nell'istogramma, indicano assenza di differenze statisticamente significative tra i campioni sottoposti allo stesso tipo di trattamento ma prelevati a tempi diversi; lettere maiuscole uguali indicano, invece, assenza di differenze statisticamente significative tra le diverse tesi nell'ambito dello stesso tempo di prelievo.

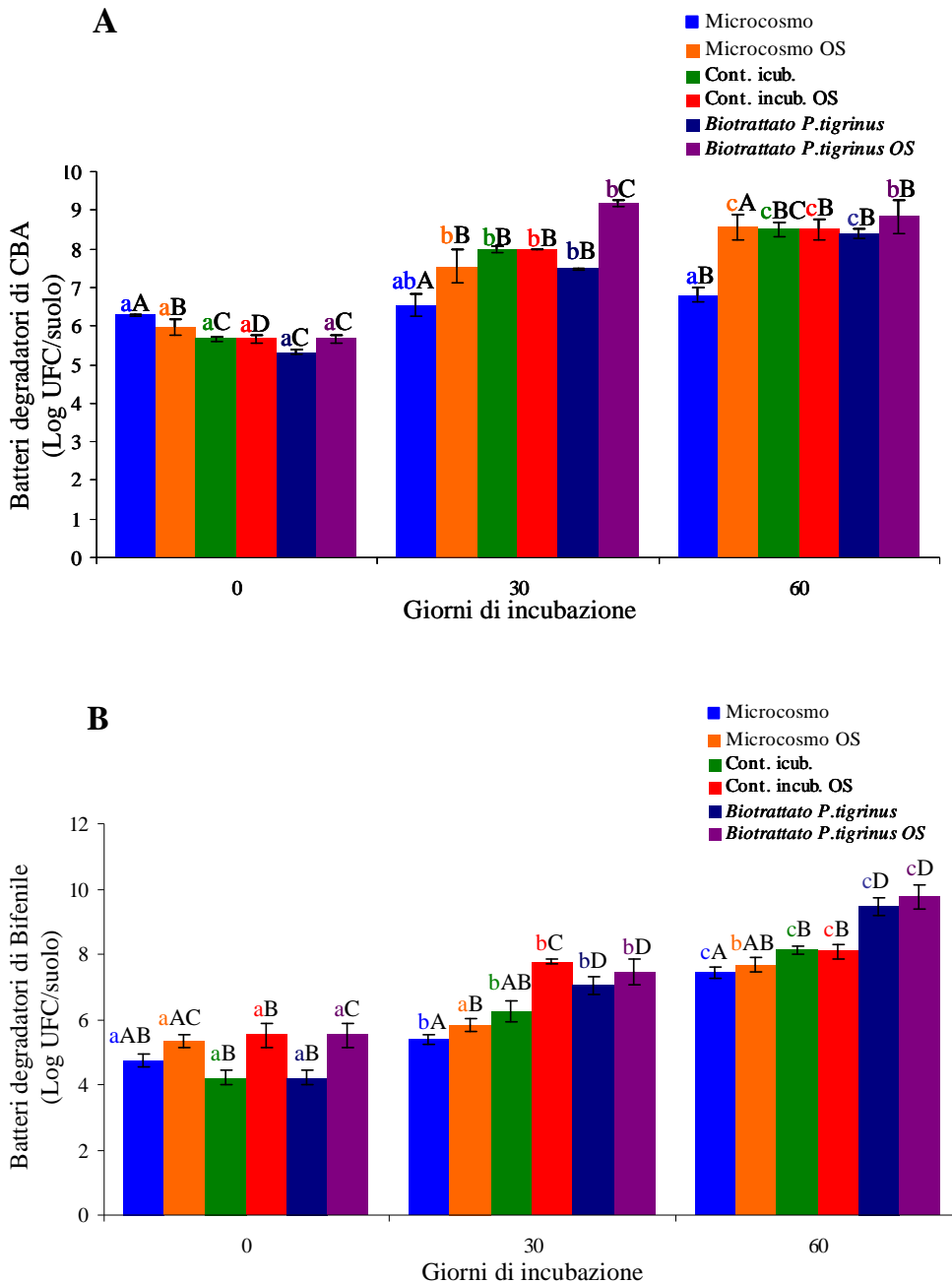


Figura 4.47. Numero di batteri specializzati nella degradazione di CBA (A) e di bifenile (B), espresso come logaritmo delle unità formanti colonia (UFC), nei microcosmi, nei controlli d'incubazione e nei suoli sottoposti a micorisanamento con *P. tigrinus*, in presenza ed in assenza di olio di soia. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante test di Tukey: le barre d'errore sovrastate da lettere minuscole uguali, e dello stesso colore delle barre nell'istogramma, indicano assenza di differenze statisticamente significative tra i campioni sottoposti allo stesso tipo di trattamento ma prelevati a tempi diversi; lettere maiuscole uguali indicano, invece, assenza di differenze statisticamente significative tra le diverse tesi nell'ambito dello stesso tempo di prelievo.

4.4.8. Effetto dell'inoculo fungino e dell'olio di soia sulla struttura delle popolazioni batteriche autoctone:

Dato che le popolazioni batteriche coltivabili rappresentano solo una frazione minoritaria della microflora presente in un campione ambientale, si è voluto valutare, anche in questo caso, con approccio molecolare, quale fosse stato l'effetto del processo di micorisanamento e dell'aggiunta del surfactante sulla struttura delle popolazioni batteriche indigene. L'analisi DGGE è stata condotta sui prodotti di amplificazione della regione V3 del gene ribosomiale batterico 16S, utilizzando come *template* il DNA metagenomico estratto dai campioni diversamente trattati (Figura 4.48).

Dall'analisi dell'immagine ottenuta e quindi dal calcolo degli indici di biodiversità, *Shannon-Weaver* e *richness* (Tabella 4.12) si poteva dedurre un effetto decisamente positivo sia dell'inoculo fungino che dell'aggiunta di olio di soia sulla microflora batterica residente, come rilevato anche con le conte batteriche.

In particolare dopo 60 giorni di incubazione, l'indice di *Shannon-Weaver* e *richness* raggiungevano valori di 1,34 e 30, rispettivamente, nel suolo sottoposto a micorisanamento e 1,38 e 28, rispettivamente, nel caso del suolo biotratato con il fungo e ammendato con olio di soia.

I valori degli indici di biodiversità si mantenevano, invece, stabili nei microcosmi durante tutto il periodo di incubazione mentre tendevano ad aumentare nei suoli ammendati con gli stocchi di mais (Cont. Incub.) sia in presenza che in assenza di OS; i valori massimi osservati dopo 60 non raggiungevano, tuttavia, quelli ottenuti nei suoli sottoposti a micorisanamento.

L'effetto del fungo era, inoltre, messo in evidenza dalla analisi *cluster* dalla quale è stato possibile generare il dendrogramma riportato in figura 4.49, costruito dalla matrice di similarità calcolata utilizzando l'indice di Dice, e basata sulla stessa posizione delle bande in ogni linea secondo il metodo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means*). I campioni sottoposti a micorisanamento ed incubati per 60 giorni, con o senza l'aggiunta di OS, formavano un unico *cluster* con una percentuale di similarità tra i due pari al 75%.

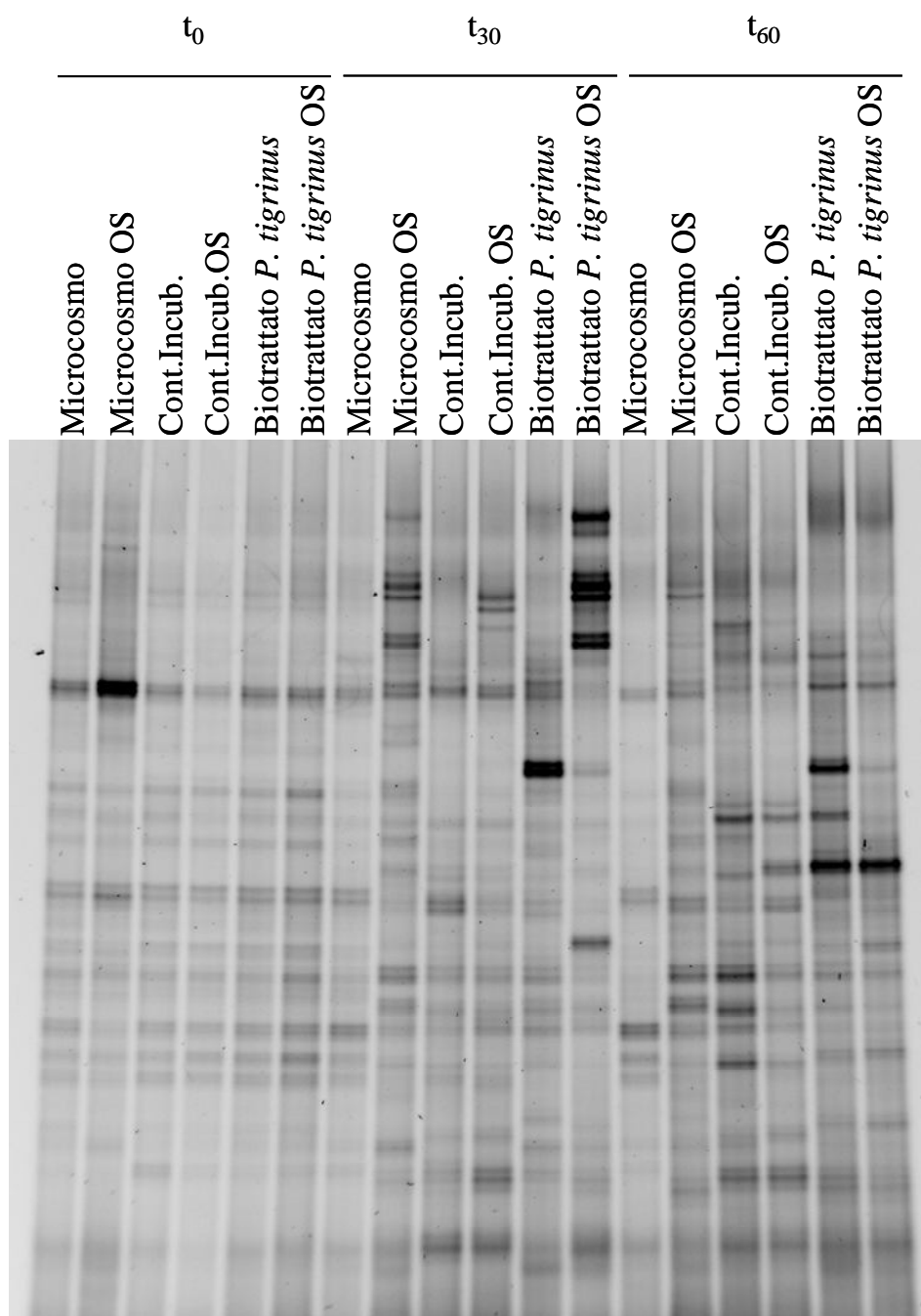


Figura 4.48. Profili DGGE delle comunità batteriche nei microcosmi, nei controlli di incubazione e nei suoli sottoposti a micorisanamento con *P. tigrinus*, con e senza aggiunta di olio di soia, relativi ai campioni prelevati all'inizio e dopo 30 e 60 giorni di incubazione.

4.4.9. Effetto dell'inoculo fungino e dell'olio di soia sulla struttura delle popolazioni fungine autoctone:

Data la presenza di specie fungine endogene, nel suolo utilizzato nel processo di micorisanamento, si è deciso di indagare quale fosse stato l'effetto dell'inoculo fungino e dell'aggiunta dell'agente mobilizzante, oltre che sulla struttura delle popolazioni batteriche, anche su quella delle popolazioni fungine residenti. L'analisi DGGE è stata condotta sui prodotti di amplificazione di una porzione del gene ribosomiale eucariotico 18S (Das *et al.*, 2007), utilizzando come *template* il DNA metagenomico estratto dai campioni diversamente trattati (Figura 4.50).

In tabella 4.13 vengono riportati gli indici di biodiversità, *Shannon-Weaver* e *richness* calcolati dall'analisi digitale dell'immagine relativa ai profili DGGE dei diversi campioni. Anche in questo caso, come già osservato per la microflora batterica, era evidente un effetto decisamente positivo sia del processo di micorisanamento che dell'aggiunta di OS sulle popolazioni fungine residenti già dopo 30 giorni di incubazione. L'indice di *Shannon-Weaver* e la *richness* passavano, infatti, da valori di 0,74 e 11, rispettivamente, nel suolo sottoposto a micorisanamento con e senza l'aggiunta di OS e prelevato all'inizio della prova, a 1,05 e 25, rispettivamente, nel suolo biottrattato con il fungo e 1,15 e 26, rispettivamente, nel suolo biottrattato con il fungo ed ammendato con olio di soia.

I valori degli indici di biodiversità si mantenevano, invece, più bassi nei microcosmi durante tutto il periodo di incubazione mentre tendevano ad aumentare nei suoli ammendati con gli stocchi di mais (Cont. Incub.), sia in presenza che in assenza di OS, anche se i valori massimi osservati dopo 60 giorni, soprattutto nel caso della *richness* (24 senza OS e 23 con OS), non raggiungevano comunque quelli ottenuti nei suoli sottoposti a micorisanamento.

L'effetto del fungo era inoltre messo in evidenza dalla analisi *cluster* dalla quale è stato possibile generare il dendogramma riportato in figura 4.51.

Come evidente dal dendogramma stesso, i campioni sottoposti a micorisanamento ed incubati per 30 e 60 giorni, con o senza aggiunta di OS, formavano due *cluster*, dipendenti dal tempo di incubazione, separati da tutti gli altri. Per il gruppo formato dai campioni sottoposti a micorisanamento ed incubati per 30 giorni era possibile osservare una percentuale di similarità del 65% con i microcosmi ed i controlli di incubazione prelevati dopo 60 giorni, mentre la percentuale di similarità tra gli stessi campioni ed i suoli sottoposti al micorisanamento ma incubati per 60 giorni scendeva al 51% a

dimostrazione dell'effetto più marcato di *P. tigrinus* sulle specie fungine endogene dopo un periodo più lungo di incubazione.

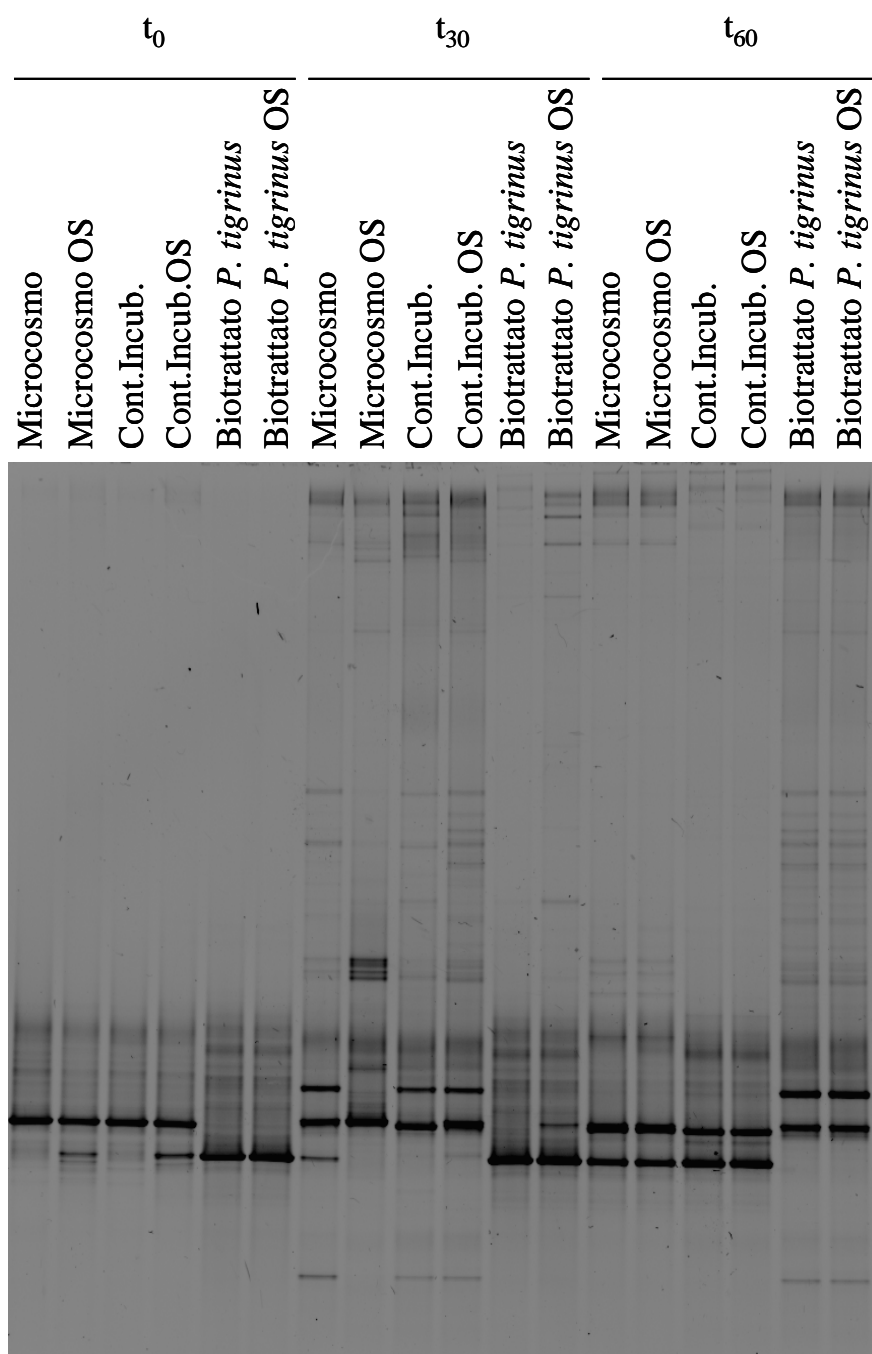


Figura 4.50. Profili DGGE delle comunità fungine autoctone nei microcosmi, nei controlli di incubazione e nei suoli sottoposti a micorisanamento con *P. tigrinus*, con e senza l'aggiunta di olio di soia, relativi ai campioni prelevati all'inizio e dopo 30 e 60 giorni di incubazione.

Tabella 4.13. Indici di biodiversità, relativi alle comunità fungine, calcolati nei microcosmi, nei controlli di incubazione e nei suoli sottoposti a micorisanamento, con o senza aggiunta di olio di soia, nei campioni prelevati a tempi diversi durante la prova.

Tipo di campione	Shannon Weaver (H)	Richness (R)
Microcosmo t ₀	0,54	10
Microcosmo OS t ₀	0,65	10
Cont. Incub. t ₀	0,48	10
Cont. Incub. OS t ₀	0,59	10
<i>P. tigrinus</i> t ₀	0,74	11
<i>P. tigrinus</i> OS t ₀	0,74	11
Microcosmo t ₃₀	0,95	17
Microcosmo OS t ₃₀	1,06	20
Cont. Incub. t ₃₀	1,01	22
Cont. Incub. OS t ₃₀	1,16	22
<i>P. tigrinus</i> t ₃₀	1,05	25
<i>P. tigrinus</i> OS t ₃₀	1,15	26
Microcosmo t ₆₀	0,97	19
Microcosmo OS t ₆₀	1,05	20
Cont. Incub. t ₆₀	1,09	24
Cont. Incub. OS t ₆₀	1,09	23
<i>P. tigrinus</i> t ₆₀	1,06	27
<i>P. tigrinus</i> OS t ₆₀	1,18	29

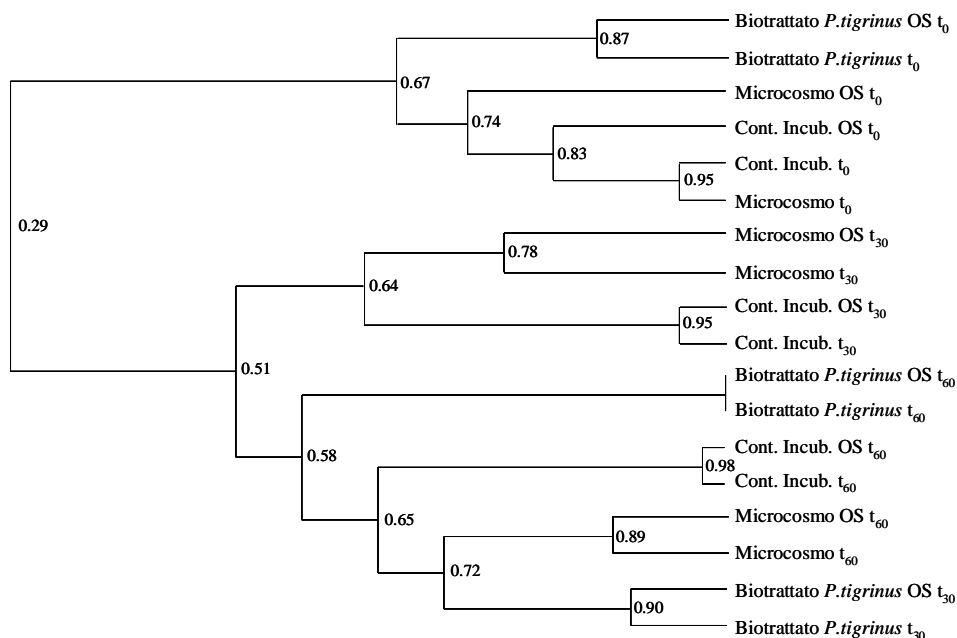


Figura 4.51. Dendrogramma delle comunità batteriche ottenuto dai profili DGGE e generato dalla matrice di similarità, calcolata usando l'indice di Dice, e basata sulla stessa posizione delle bande in ogni linea usando il metodo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means*).

4.4.10. Quantificazione del numero di copie dei geni *bph*, *C230* e *16S* :

Molte specie batteriche, sia di Gram positivi che Gram negativi, vengono considerate potenziali degradatrici di bifenili policlorurati. La degradazione batterica dei PCB può avvenire sia in condizioni aerobiche che anaerobiche oppure attraverso processi co-metabolici che utilizzano bifenile come substrato primario; tali processi avvengono generalmente a carico del sistema multienzimatico della bifenil-diossigenasi, appartenente all'*upper pathway* degradativo e codificato dal cluster genico *bph* (Abramowicz, 1990; Furukawa, 2000).

E' proprio seguendo questa indicazione che per valutare se l'inoculo fungino e l'aggiunta di OS avessero avuto effetti anche su tale funzione metabolica delle popolazioni batteriche indigene, è stata effettuata una quantificazione relativa del numero di copie del gene *bph* attraverso PCR quantitativa.

Lo stesso tipo di quantificazione è stata effettuata anche per il gene *C230* codificante la catecolo 2,3-diossigenasi, un enzima chiave del *lower pathway* degradativo di molti tipi di contaminanti (Sei *et al.*, 1999).

Come riportato da altri autori (Sei *et al.*, 1999; 2004; Baldwin *et al.*, 2003; Dominguez *et al.*, 2008), infatti, tali geni sono altamente conservati e quindi possono essere utilizzati come potenziali marcatori per il monitoraggio della degradazione batterica di PCB.

La specificità delle diverse reazioni condotte, è stata valutata, oltre che dall'analisi della curva di *melting*, dalla separazione su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione ottenuti: in tutti i casi, veniva osservata presenza di un'unica banda del peso molecolare atteso (dati non mostrati).

Inoltre, per dimostrare che le effettive differenze osservate nel numero di copie dei due geni marcatori non dipendessero in realtà da variazioni notevoli del numero di batteri totali, veniva effettuato un saggio Real-Time PCR anche sul gene ribosomiale *16S* nei diversi campioni durante la prova.

Come risulta evidente dai grafici, sia il numero di copie del gene *bph* (Figura 4.52A) che quello del gene *C230* (Figura 4.52B) non subivano notevoli variazioni nel tempo nei campioni diversamente trattati così come sembrava rimanere pressoché stabile anche il numero di copie del gene *16S* (Figura 4.53).

Studi di questo tipo, effettuati sul metagenoma, non sono a tutt'oggi disponibili in letteratura; si può supporre, comunque, che questa non variazione dei livelli dei batteri portatori dei due geni *target* quantificati sia molto probabilmente imputabile al fatto che

il fungo, avendo avuto un effetto trascurabile sulla degradazione dei contaminanti presenti nel suolo, non ha esercitato alcuna azione sull'arricchimento o meno, delle specie batteriche coinvolte nel metabolismo dei PCB.

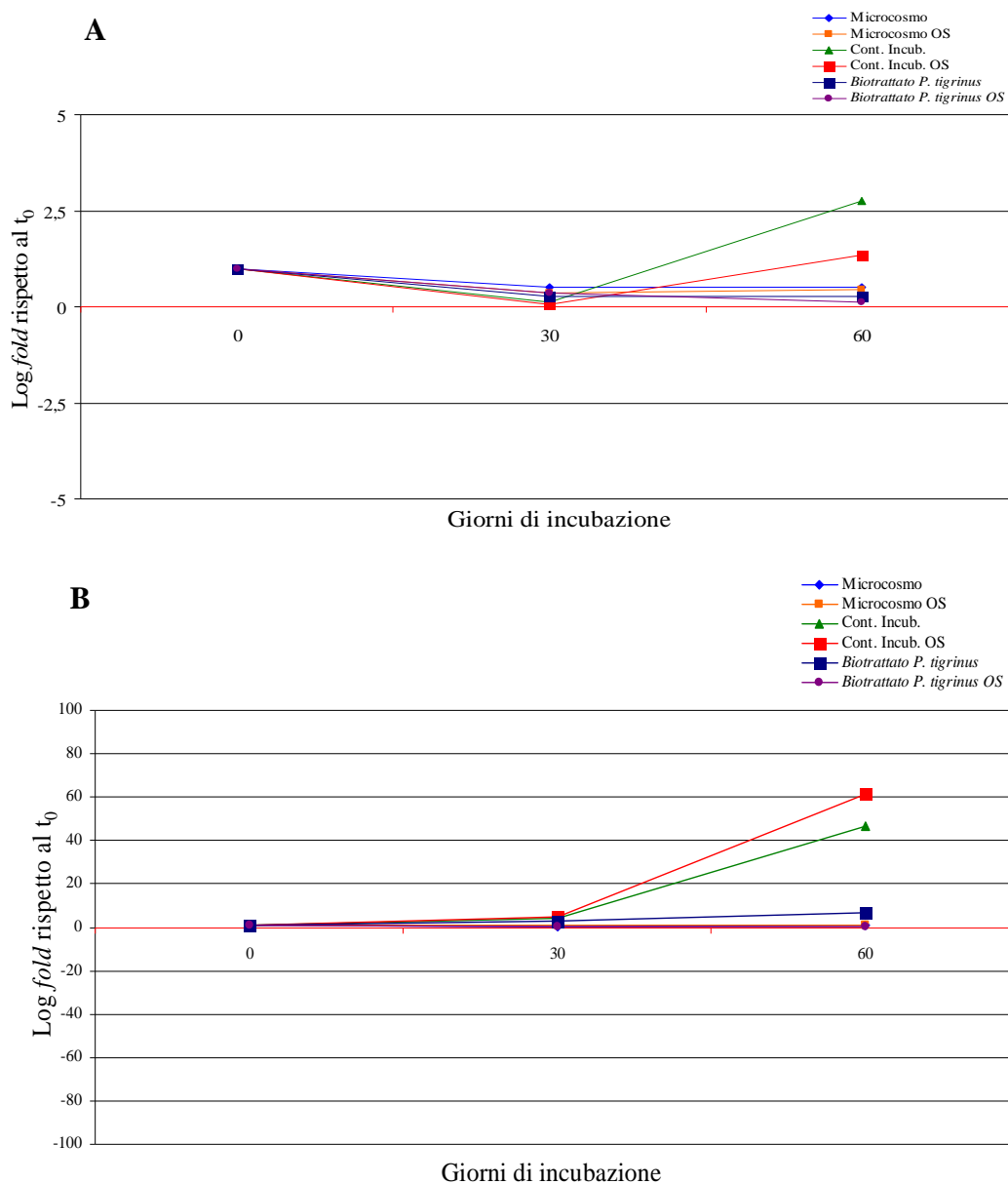


Figura 4.52. Numero di copie dei geni *bph* (A) e *C230* (B) calcolato nei microcosmi, nei controlli di incubazione e nei suoli sottoposti al micorisanamento con *P. tigrinus*, con e senza l'aggiunta di OS, ed espresso come logaritmo rispetto al valore osservato al tempo zero di ogni trattamento.

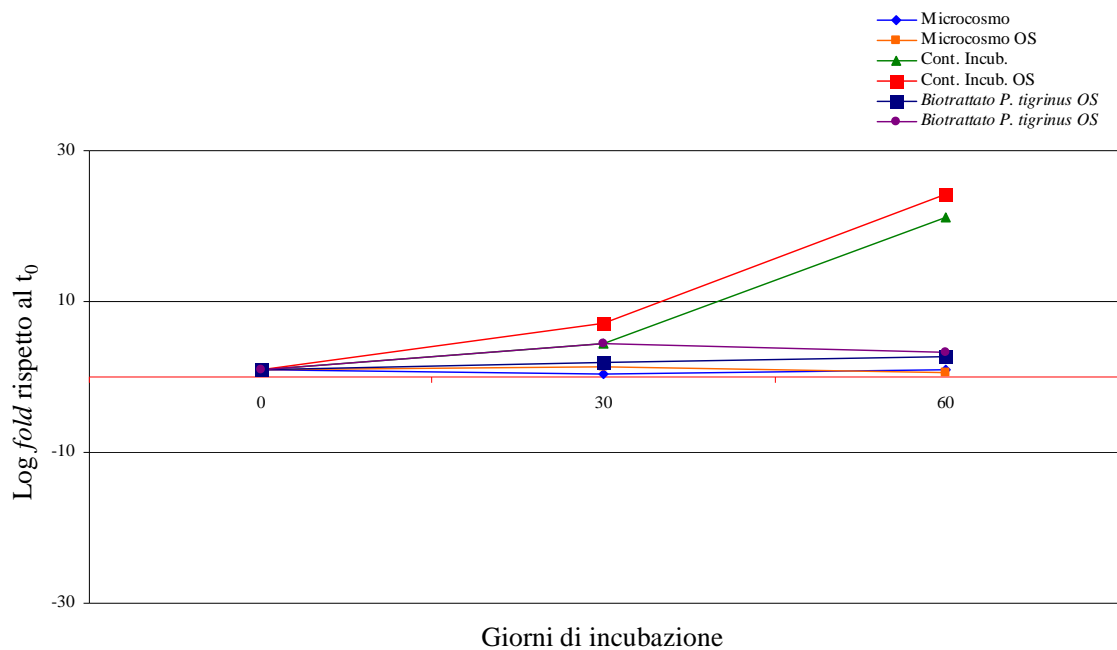


Figura 4.53. Numero di copie del gene 16S calcolato nei microcosmi, nei controlli di incubazione e nei suoli sottoposti al micorisanamento con *P. tigrinus*, ed espresso come logaritmo rispetto al valore osservato al tempo zero di ogni trattamento.

5. CONCLUSIONI

Molti studi sono attualmente rivolti, con interesse sempre maggiore, al biorisanamento ed, in particolare, al suo impiego nella rimozione da suoli contaminati di composti altamente recalcitranti come ad esempio Idrocarburi Policiclici Aromatici e Bifenili Policlorurati. Questa applicazione, infatti, può contribuire significativamente alla salvaguardia della salute del nostro pianeta.

In questo lavoro di tesi, l'attenzione è stata posta principalmente allo studio delle interazioni tra le specie batteriche autoctone di suoli contaminati e le specie fungine alloctone utilizzate in processi di micorisanamento.

Dai numerosi esperimenti condotti, considerando in particolare sette diversi ceppi di funghi *white-rot*, tre casi di contaminazione del suolo, e l'eventuale utilizzo di vari agenti mobilizzanti, è stato possibile trarre le seguenti conclusioni:

- tutti i ceppi fungini utilizzati risultavano efficaci nella decontaminazione e nella detossificazione dei suoli trattati tranne nel caso di *P. tigrinus* utilizzato sul suolo storicamente contaminato da bifenili policlorurati. Questo ultimo risultato non era poi così inaspettato dato l'elevato grado di resistenza agli attacchi di tipo biologico a tali contaminanti. Essi sono da considerarsi infatti, tra i più tossici e recalcitranti e quindi risultato in molti casi, come già osservato in altri studi riportati in letteratura, difficilmente degradabili. Nel caso di tutti gli altri suoli, contaminati principalmente da idrocarburi aromatici, anche se con entità diverse, in seguito ai processi di micorisanamento si ottenevano buone percentuali sia di decontaminazione che detossificazione.
- sia la concentrazione che la biodiversità delle popolazioni batteriche endogene mostravano incrementi in seguito ai processi di micorisanamento ad eccezione dei casi in cui si utilizzava olio di soia con *Phlebia* sp. e, indipendentemente dall'agente mobilizzante impiegato, con *P. ostreatus*. In particolare, gli indici di biodiversità stimati in seguito all'analisi DGGE subivano notevoli aumenti nel suolo modello inoculato con *Allescheriella* sp. indipendentemente dal surfactante impiegato; nel suolo modello inoculato con *I. lacteus* principalmente nel caso in cui si utilizzava RAMEB; e nel suolo ACNA biottrattato con *B. rhodina* e *P. pulmonarius*. Lo stesso effetto positivo era inoltre evidente nel micorisanamento condotto con *P. tigrinus* sia sul suolo ACNA che quello contaminato da PCB nei quali era possibile osservare un incremento nel tempo degli stessi indici di

biodiversità. E' possibile quindi supporre che, nei casi in cui era osservabile aumento di biodiversità delle specie batteriche residenti, tra queste popolazioni e le specie fungine esogene si fosse instaurato un rapporto di tipo sinergico;

- Nei casi in cui sono stati indagati anche gli effetti degli inoculi fungini sulle attività degradative batteriche, i risultati ottenuti si mostravano coerenti con quelli relativi ai livelli di decontaminazione: se il fungo provocava una diminuzione dei livelli di contaminazione del suolo, anche i geni catabolici batterici ne erano influenzati mentre, se il fungo non aveva effetti, anche i livelli dei geni catabolici batterici non subivano cambiamenti durante il trattamento. Nel suolo ACNA biotratato con *P. tigrinus*, ad esempio, i livelli dei geni codificanti enzimi catabolici batterici importanti nella degradazione di idrocarburi aromatici, subivano una notevole diminuzione spiegabile molto probabilmente con il concomitante decremento della contaminazione del suolo in seguito all'inoculo fungino. L'effetto detossificante del fungo provocava quindi l'arricchimento nel suolo di specie batteriche mancanti di tali geni, dato che le stesse, molto probabilmente, trovandosi a crescere su una matrice decontaminata, non necessitavano di tali funzioni metaboliche degradative.

Questo lavoro dimostra quindi, quanto siano complesse le interazioni che si determinano durante un processo di biotratamento; esse dipendono infatti da molti fattori: dal tipo di suolo e contaminante, dal fungo alloctono utilizzato, dalla eventuale presenza di agenti mobilizzanti o dall'aggiunta di ammendanti, il cui effetto combinato è difficilmente prevedibile. Al momento, sulla base del presente studio e della limitata letteratura sull'argomento è quindi quasi impossibile fornire delle conclusioni univoche. Probabilmente estendendo ad altri casi studi simili a questo, che sembra comunque rappresentare un valido approccio alla problematica, sarà possibile comprendere meglio le interazioni ed i meccanismi che governano l'ecosistema suolo durante i processi di biorisanamento.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abraham W.R., Nogales B., Golyshin P.N., Pieper D.H., Timmis K.N., 2002.** Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Curr Opin Microbiol*, 5: 246-253.
- Abramowicz D.A., 1990.** Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs e a review. *Critical Rev Biotech*, 10: 241-249.
- Adriano D.C., 1986.** Trace elements in the terrestrial environments. Springer-Verlag, New York, 533.
- Aelion C.M., Swindoll C.M., Pfaender F.K., 1987.** Adaption to and biodegradation of xenobiotic compounds by microbial communities from pristine aquifer. *Appl Environ Microbiol*, 53: 2212-2217.
- Ahmad D., Masse R., Sylvestre M., 1990.** Cloning and expression of genes involved in 4-chlorobiphenyl transformation by *Pseudomonas testosterone* and homology to polychlorobiphenyl-degrading genes in other bacteria. *Gene*, 86: 53-61.
- Alain K., Olagnon M., Desbruyères D., Pagé A., Barbier G., Juniper S.K., 2002.** Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis*. *FEMS Microbiol Ecol*, 42: 463-476.
- Alder A.C., Haggblom M.M., Oppenheimer S.R., Young L.Y., 1993.** Reductive dechlorination of polychlorinated-biphenyls in anaerobic sediments. *Environ Science Technol*, 27: 530-538.
- Alexander G., Jacond C., Faure D., Bally R., 1996.** Population dynamics of motile and non motile *Azospirillum lipoferum* strain during rice root colonization and motile variation in the rizosphere. *FEMS Microbiol Ecol*, 19: 271-278.
- Alexander M., 1994.** Biodegradation and bioremediation, Academic Press, Inc, San Diego, 248-250. Ali T.A. & Wainwright A.M, 1994. Growth of Phanerochaete chrysosporium in soil and its ability to degrade the fungicide benomyl. *Biores Technol*, 49: 197-201.
- Alloway B.J., 1995.** Soil processes and the behavior of heavy metals. Heavy metals in soils. In B.J. Alloway (Ed.) Blackie Academic and Professional Publ. New York.
- Almgren M., Grieser F., Thomas J.K., 1979.** Dynamic and static aspects of solubilization of neutral arenas in ionic micellar solutions. *J Am Chem Soc*, 101: 279-291.
- Amann R., 2000.** Who is out there? Microbial aspects of biodiversity. *Syst Appl Microbiol*, 23:1-8.
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H., 1995.** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 59:143-69.

- Amat di San Filippo P., Rinaldi A., Sanjust di Teulada E., Satt G., Viola A., 1984.** Vegetable material in water in the olive oil industry: raw material or pollution waste. *Rivista di Merceologia*, 25: 183-199.
- Anderson I.C., Campbell C.D., Prosser J.I., 2003.** Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environ Microbiol*, 5: 36-47.
- Andersson B.E., Henrysson T., 1996.** Accumulation and degradation of dead-end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 46: 647-652.
- Andersson B.E., Lundstedt S., Tornberg K., Schnuerer Y., Oeberg L.G., Mattiasson B., 2003.** Incomplete degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil inoculated with wood-rotting fungi and their effect on the indigenous soil bacteria. *Environ Toxicol Chem*, 22: 1238-1243.
- Andersson B.E., Lundstedt S., Tornberg K., Schnuerer Y., Oeberg L.G., Mattiasson B., 2003.** Incomplete degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil inoculated with wood-rotting fungi and their effect on the indigenous soil bacteria. *Environ Toxicol Chem*, 22: 1238-1243.
- Andersson B.E., Welinder L., Olsson P.A., Olsson S., Henrysson T., 2000.** Growth of inoculated white-rot fungi and their interactions with the bacterial community in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, as measured by phospholipid fatty acids. *Biores Technol*, 73: 29-36.
- Andreottola G. & Tatàno F., 1997.** Tecnologie di risanamento dei terreni contaminati, "Sezione Q-Ingegneria Ambientale". *Nuovo Colombo-Manuale dell'Ingegnere*, 83-esima Edizione, Editore Ulrico Hoepli, Milano.
- Anneweiler E., Richnow H.H., Antranikian G., Hebenbrock S., Garms C., Franke S., Francke W., Michaelis W., 2000.** Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by thermophilic *Bacillus thermoleovorans*. *Appl Environ Microbiol*, 66: 518-530.
- Arai H., Kosono S., Taguchi K., Maeda M., Song E., Fuji F., Chung S.Y., Kudo T., 1998.** Two sets of biphenyl and PCB degradation genes on a linear plasmid in *Rhodococcus erythropolis* TA421. *J Ferment Bioeng*, 86:595-599.
- Arcaro K.F., O'Keefe P.W., Yang Y., Clayton W., Gierthy., J.F., 1999.** Antiestrogenicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast cancer cells. *Toxicol*, 133: 115-127.
- Arendorf J.J. & Focht D.D., 1994.** Formation of chlorocatechol meta cleavage products by a *Pseudomonas* during metabolism of monochlorobiphenyls. *Appl Environ Microbiol*, 60: 2884-2889.
- Arendorf J.J. & Focht D.D., 1995.** A meta cleavage pathway for 4-chlorobenzoate, an intermediate in the metabolism of 4-chlorobiphenyl by *Pseudomonas cepacia*. *Appl Environ Microbiol*, 61: 443-447.

- Aronstein B.N., Calvillo Y.M., Alexander M., 1991.** Effect of surfactants at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. *Environ Sci Technol*, 25: 1728-1731.
- Asante-Duah D.K., 1996.** Managing contaminated sites: Problem diagnosis and development of site restoration, Wiley, New York, NY.
- Assafanid N., Nies L., Vogel T.M., 1992.** Reductive dechlorination of a polychlorinated biphenyl congener and hexachlorobenzene by vitamin B12. *Appl Environ Microb*, 58: 1057-1060.
- Baldi F., 2003.** Atti della I Summer School "Ricerca, sperimentazione e sviluppo di tecnologie di bonifica di siti contaminati. In Canepa P. e Fava F., (Eds.). Savona 8-13 Sett. 2002. Consorzio Interuniversitario Nazionale "La Chimica per l'Ambiente", Venezia p. 215.
- Baldrian P., 2003.** Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme Microb Technol*, 32: 78-91.
- Baldrian P., 2008.** Enzymes of saprotrophic basidiomycetes. In: Boddy L., Frankland J.C., van West P. (Eds), *Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes*. Academic Press, Amsterdam, pp. 19-41.
- Baldwin B.R., Nakatsu C.H., Nies L., 2003.** Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. *Appl Environ Microbiol*, 69 (6): 3350-3358.
- Bartels F., Backhaus S., Moore E.R.B., Timmis K.N., Hofer B., 1999.** Occurrence and expression of glutathione-S-transferase-encoding bphK genes in *Burkholderia* sp. strain LB400 and other biphenyl-utilizing bacteria. *Microbiol*, 145:2821-2834.
- Bartlett D.H., 1999.** Microbial adaptations to the psychrosphere/piezosphere. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 1: 93-100.
- Becker H.G. & Jones K.C., 1995.** Limitation to the in situ remediation of soils contaminated with organic chemicals in relation to the potential to achieve clean-up criteria. In: Van den Brink, W.J., Bosman R., Arendt F. (Eds), *Contaminated soil*, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 327-336.
- Becker H.G. & Sinitsyn A.P., 1993.** Mn-Peroxidase from *Pluerotus ostreatus*, the action on the lignin. *Biotechnol Lett*, 15: 289-294.
- Bedard D.L., 2003.** Polychlorinated biphenyls in aquatic sediments: environmental fate and outlook for biological treatment. In: Haggblom M.M., Bossert I.D. (Eds.), *Dehalogenation: microbial processes and environmental applications*. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, 443-465.
- Bedard D.L., Haberl M.L., May R.J., Brennan M.J., 1987.** Evidence for novel mechanisms of polychlorinated biphenyl metabolism in *Alcaligenes eutrophus* H850. *Appl Environ Microbiol*, 53:1103-1112.

- Bedard D.L., Unterman R., Bopp L.H., Brennan M.J., Haberl M.L., Johnson C., 1986.** Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated-biphenyls. *App Environ Microbiol*, 51: 761-768.
- Bedard, D.L., Pohl, E.A., Bailey, J.J., Murphy, A., 2005.** Characterization of the PCB substrate range of microbial dechlorination process LP. *Environ Sci Technol*, 39: 6831-6838.
- Belinky P.A., Masaphy S., Levanon D., Hadar Y., Dosoretz C.G., 1994.** Effect of medium composition on 1-octen-3-ol formation in submerged cultures of *Pleurotus pulmonarius*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 40: 629-633.
- Benner M.L., Mohtar R.H., Lee L.S., 2002.** Factors affecting air sparging remediation systems using field data and numerical simulations. *J Hazard Mater*, 95(3): 305-329.
- Berselli S., Milone G., Canepa P., Di Gioia D., Fava F., 2004.** Effect of cyclodextrins, humic substances and rhamnolipids on the washing of a historically contaminated soil and on the aerobic bioremediation of the resulting effluents. *Biotechnol Bioeng*, 88: 111-120.
- Bes M., Saidi Slim L., Becharnia F., Meugnier H., Vandenesch F., Etienne J., 2002.** Population diversity of *Staphylococcus intermedius* isolates from various host species: typing by 16S–23S intergenic ribosomal DNA spacer polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*, 40:2275-7.
- Biegala I., Not F., Vaultot D., Simon N., 2003.** Quantitative assessment of picoeukaryotes in the natural environment by using taxon-specific oligonucleotide probes in association with tyramide signal amplification-fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Appl Environ Microbiol*, 69: 5519-5529.
- Bishop P.L., 1990.** Solidification/stabilization of contaminated soils. An overview. In *Contaminated Soil '90*, kluwer Academic Publishers, Dordrecht (NL).
- Byss M., Elhottová D., Tríska J., Baldrian P., 2008.** Fungal bioremediation of the creosote-contaminated soil: Influence of *Pleurotus ostreatus* and *Irpex lacteus* on polycyclic aromatic hydrocarbons removal and soil microbial community composition in the laboratory-scale study. *Chemosphere*, 73: 1518–1523.
- Bogan B.W. & Lamar R.T., 1999.** Surfactant enhancement of the white-rot fungal PAH soil remediation. In: Leason A, Alleman BC, editors. *Bioremediation technologies for polycyclic aromatic hydrocarbons: in-situ and on-site bioremediation*. Columbus-Richland, Battelle Press, 81-86.
- Bogan B.W, Lamar R.T, Hammel K.E., 1996.** Fluorene oxidation in vivo by *Phanerochaete chrysosporium* and in vitro during manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation. *Appl Environ Microbiol*, 62: 1788-1792.
- Bogan B.W., Trbovic V., Paterek R.J., 2003.** Inclusion of vegetable oils in Fenton's chemistry for remediation of PAH-contaminated soils. *Chemosphere*, 50: 15-21.

- Bohannan B.J.M. & Hughes J., 2003.** New approaches to analyzing microbial biodiversity data. *Curr Opin Microbiol*, 6: 282-287.
- Bohmer S., Messner K., Srebotnik E., 1998.** Oxidation of phenanthrene by a fungal laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole and unsaturated lipids. *Biochem Biophys Res Commun*, 244: 233-238.
- Bollag J.M., Shuttleworth K.L., Anderson D.H., 1988.** Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *Appl Environ Microbiol*, 54: 3086-3091.
- Bonnen A.M., Anton L.H., Orth A.B., 1994.** Lignin-degrading enzymes of commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Appl Environ Microbiol*, 60: 960-965.
- Borja J., Taleon D.M., Auresenia J., Gallardo S., 2005.** Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *Process Biochem*, 40: 1999-2013.
- Borneman J. & Hartin, R.J. 2000.** PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Appl Environ Microbiol*, 66: 4356-4360.
- Borneman J., Triplett E.W., 1997.** Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl Environ Microbiol*, 63:2647-2653.
- Boschker H.T.S. & Middelburg J.J., 2002.** Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*, 40:85-95.
- Bouchez M., Blanchet D., Vandecasteele J.P., 1995.** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain association: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl Microbiol Biotechnol*, 43:156-164.
- Bourbonnais R. & Paice M.G., 1992.** Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in presence of 2-2-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Appl Microbiol Biotechnol*, 36: 823-827.
- Bourque S.N., Valero J.R., Lavoie M.C., Levesque R.C., 1995.** Comparative analysis of the 16S to 23S ribosomal intergenic spacer sequences of *Bacillus thuringiensis* strains and subspecies and of closely related species. *Appl Environ Microbiol*, 61:2811-2822.
- Bouvier T. & Del Giorgio P.A., 2003.** Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): a quantitative review of published reports. *FEMS Microbiol Ecol*, 44: 3-15.
- Boyle C.D., 1995.** Development of a practical method for inducing white-rot fungi to grow into and degrade organopollutants in soil. *Can J Microbiol*, 41: 345-353.
- Boyle C.D., 2006.** Effects of pH and cyclodextrins on pentachlorophenol degradation (mineralization) by white-rot fungi. *J Environ Manag*, 80: 380-386
- Boyle W.C., 2002.** A brief history of aeration of pastewater. In *Proceedings of the environmental and water resources history*, 3–7 Nov 2002, Washington, DC., 13-21.

- Borden R.C., 2007.** Effective distribution of emulsified edible oil for enhanced anaerobic bioremediation. *J Contam Hydrol*, 94: 1-12.
- Bosch R., Moore E.R.B., García-Valdés E., Pieper D.H., 1999.** NahW, a novel, inducible salicylate hydroxylase involved in mineralization of naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10. *J Bacteriol*, 181: 2315-2322.
- Bradford M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- Brett R., Baldwin B.R., Nakatsu C.H., Nies L., 2007.** Enumeration of aromatic oxygenase genes to evaluate monitored natural attenuation at gasoline-contaminated sites. *Water Res*, 42:723-731.
- Brousseau R., Hill J.E., Pre Fontaine G., Goh S.H., Harel J., Hemmingsen S.M., 2001.** *Streptococcus* serotypes characterized by analysis of chaperonin 60 gene sequences. *Appl Environ Microbiol*, 67: 4828-4833.
- Brown J., Bedard D.L., Brennan M.J., Carnahan J.C., Feng H., Wagner R.E., 1987.** Polychlorinated biphenyl dechlorination in aquatic sediments. *Science*, 236:709-712.
- Brown R.A., Hicks R.J., Hicks P.M., 1994.** Use of air sparging for in situ bioremediation. In Hinchee RE (Ed.) "Air sparging for site remediation" Lewis Publishers, Boca Raton (USA).
- Brown R.R., 1967.** Biochemical aspect of oxidative coupling of phenols. *Oxidative coupling of phenols*, New York, Marcel Dekker, 167-201.
- Brunsbach F.R. & Reineke W., 1994.** Degradation of chlorobenzenes in soil slurry by a specialized organism. *Appl Microbiol Biotechnol*, 42: 415-420.
- Bumpus J.A., 1989.** Biodegradation of polycyclic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, 54: 1143-1150.
- Buswell J.A., Cai Y., Chang S.T., 1995.** Effects of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula Edodes*. *FEMS Microbiol Lett*, 128: 81-88.
- Buyer J., 2002.** Rapid sample processing and fast gas chromatography for identification of bacteria by fatty acid analysis. *J Microbiol Methods*, 51: 209-215.
- Byss M., Tliska J., Elhottová D., 2007.** GC-MS-MS analysis of bacterial fatty acids in heavily creosote-contaminated soil samples. *Anal Bioanal Chem*, 387: 1573-1577.
- Calvo F., Martínez-Checa C., Toledo F., Porcel J., Quesa E., 2002.** Characteristics of bioemulsifiers synthesised in crude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60: 347-351.

- Cane P.A. & Williams P.A., 1990.** A restriction map of naphthalene catabolic pathway pWW60-1 and location of some of its catabolic genes. *J Gen Microbiol*, 15: 247-268.
- Canepa P., 2003.** Soil remediation series n°1. In Canepa (Ed.) Progetto Sisifo: risultati 1° anno di attività 2001-2002. Consorzio Interuniversitario Nazionale “La Chimica per l’Ambiente”, Venezia.
- Capasso R., De Martino A., Arienzo M., 2002.** Recovery and characterization of the metal polymeric organic fraction (polymerin) from olive oil mill waste waters. *J Agric Food Chem*, 50:2846-2855.
- Cardinale M., Brusetti L., Quatrini P., Borin S., Puglia A.M., Rizzi A., Zanardini E., Sorlini C., Corselli C., Daffonchio D., 2004.** Comparison of different primer sets for use in Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of complex bacterial communities. *Appl Environ Microbiol*, 70, 6147-6156.
- Cavigelli M.A, Robertson G.P., Klug M.J., 1995.** Fatty Acid Methyl Ester (FAME) profiles as measures of soil microbial community structure. In *The Significance and Regulation of Soil Biodiversity*. Edited by H.P. Collins, G.P. Robertson & M.J. Klug. Kluwer Academic, Netherlands. 99-114.
- Cerniglia C.E. & Heitkamp M.A., 1989.** Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment . In: Varanasi, U (Ed.), *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. CRC Press, Boca Raton, 42-64.
- Cerniglia C.E., 1984.** Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv Appl Microbiol*, 30: 31-55.
- Chakraborty R. & Coates J.D., 2004.** Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol*, 64:437-446.
- Chang Y.J., Stephen J.R., Richter A.P., Venosa A.D., Bruggemann J., Macnaughton S.J., 2000.** Phylogenetic analysis of aerobic freshwater and marine enrichment cultures efficient in hydrocarbon degradation: effect of profiling method. *J Microbiol Methods*, 40:19-31.
- Chatzinotas A., Sandaa R.A., Hahn D., Schönhuber W., Daae F.L., Torsvik V., Zeyer J., Amann R., 1998.** Studies on bacterial diversity in bulk soils using different molecular techniques. *Syst Appl Microbiol*, 21:588-592
- Chatzinotas A., Sandaa R.A., Schonhuber W., Amann R., Daae F.L., Tosvik V., 1998.** Analysis of broad-scale differences nucleotide-targeted recovery of 16S rRNA genes from bulk soil and rice roots of flooded rice microcosms. *Appl Environ Microbiol*, 67: 623-631.
- Choi K.H. & Dobbs F.C., 1999.** Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *J Microbiol Methods*, 36: 203-213.

- Christofi N. & Ivshina I.B., 2002.** Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J Appl Microbiol*, 93:915-929.
- Chun J., Rivera I.N., Colwell R.R., 2002.** Analysis of 16S–23S rRNA intergenic spacer of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* for detection of these species. *Methods Mol Biol*, 179:171-178.
- Chung N. & Aust D., 1995.** Inactivation of lignin peroxidase by hydrogen peroxidase during the oxidation of phenols. *Arch Biochem Biophys*, 316: 851-855.
- Clark M., 1997.** Health effects of polychlorinated biphenyls. EPA.
- Clegg C.D., Ritz K., Griffiths B.S., 2000.** % G+C profiling and cross hybridisation of microbial DNA reveals great variation in below-ground community structure in UK upland grasslands. *Appl Soil Ecol*, 14: 125-134.
- Colwell R.K. & Coddington J.A., 1994.** Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philos. Trans. R. Soc. London B*, 345: 101-118.
- Converse A.O., Matsuno R., Tanaka M., Taniguchi M., 1988.** A model for enzyme adsorption and hydrolysis of microcrystalline cellulose with low deactivation of the adsorbed enzyme. *Biotechnol Bioeng*, 32: 38-45.
- Coppola S., Blaiotta G., Ercolini D., Moschetti G., 2001.** Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *J Appl Microbiol*, 90: 414-420.
- Cottrell M.T. & Kirchman D., 2000.** Natural assemblages of marine Proteobacteria and members of the *Cytophaga - Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular weight dissolved organic matter. *Appl Environ Microbiol*, 66: 1692-1697.
- Criquet S., Tagger S., Vogt G., Iacazio G., Lepetit J., 1999.** Laccase activity of forest litter. *Soil Biol Biochem*, 31:1239-1244.
- Cutter L.A., Watts J.E.M., Sowers K.R., May H.D., 2001.** Identification of a microorganism that links its growth to the reductive dechlorination of 2,3,5,6-chlorobiphenyl. *Environ Microbiol*, 3: 699-709.
- D'Annibale A., Celletti D., Felici M., Di Mattia E., Giovannozzi Sermanni G., 1996.** Substrate specificity and properties of laccase from *Lentinus edodes*. *Acta Biotechnol*, 16: 257-270.
- D'Annibale A., Rosetto F., Leonardi V., Federici F., Petruccioli M., 2006.** Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. *Appl Env Microbiol* 72: 28-36.
- D'Annibale A., Ricci M., Leonardi V., Quaratino D., Mincione E., Petruccioli M., 2005.** Degradation of aromatic hydrocarbons by white-rot fungi in a historically contaminated soil. *Biotechnol Bioeng*, 90: 723-731.

- Da Silva K.R.A., Salles J.F., Seldin L., van Elsas J.D., 2003.** Application of a novel *Paenibacillus* specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. *J Microbiol Methods*, 54:213–23
- Daffonchio D., Cherif A., Brusetti L., Rizzi A., Mora D., Boudabous A., 2003.** Nature of polymorphisms in 16S–23S rRNA gene intergenic transcribed spacer fingerprinting of *Bacillus* and related genera. *Appl Environ Microbiol*, 69:5128–5137.
- Dahllöf I., Baillie H., Kjelleberg S. 2000.** rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl Environ Microbiol*, 66: 3376–3380.
- Daims H., Brühl A., Amann R., Schleifer K.H., Wagner M., 1999.** The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol*, 22: 434–444.
- Das M., Royer T.V., Leff L.G., 2007.** Diversity of fungi, bacteria, and actinomycetes on leaves decomposing in a stream. *Appl Environ Microbiol*, 73(3): 756–767.
- David R., Singleton D.R., Sangaiah R., Gold A., Ball L.M., Aitken M.D., 2006.** Identification and quantification of uncultivated Proteobacteria associated with pyrene degradation in a bioreactor treating PAH-contaminated soil. *Environ Microbiol*, 8: 1736–1745.
- Davies J.I. & Evans W.C. 1964.** Oxidative metabolism of naphthalene by soil *pseudomonas*. The ring fissioning mechanism. *Bioche J*, 91: 251–266.
- Davies M.V., Glaser J.A., Evans J.W., Lamar R.T., 1993.** Field evaluation of the lignin degrading fungus *Phanerochaete sordita* to treat creosote contaminated soil. *Environ Sci Technol*, 27: 2572–2576.
- de Boer W., Folman L.B., Summerbell R.C., Boddy L., 2005.** Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol Rev*, 29: 795–811.
- Davis M.W. & Lamar R.T. 1992.** Evaluation of methods to extract ergosterol for quantitation of soil fungal biomass. *Soil Biol Biochem*, 24: 189–198.
- Dawson JC et al., 2007.** Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soils. *Soil Biol Biochem*, 39: 164–177.
- De S., Pramanik S.K., Williams A.L., Dutta S.K., 2004.** Toxicity of polychlorobiphenyls and its bioremediation. *Int J Hum Genet*, 4: 281–290.
- DeBruyn J.M., Chewing C.S., Sayler G.S., 2007.** Comparative quantitative prevalence of *Mycobacteria* and functionally abundant *nidA*, *nahAc*, and *nagAc* dioxygenase genes in coal tar contaminated sediments. *Environ Sci Technol*, 41: 5426–5432.

- De Serres F.J. & Ashby J., 1981.** Evaluation of short term tests for carcinogens. Report of the international collaborative program. Progress in mutation research, vol.1. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- Deitsch J.J. & Smith J.A., 1995.** Effect of Triton X-100 on the rate of trichloroethene desorption from soil to water. *Environ Sci Technol*, 29: 1069-1080.
- Demone S.A., Stanley D.C., Olson E.S., Young K.D., 1993.** Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: complete DNA sequence of an upper naphthalene pathway. *J Bacteriol*, 175: 6890-6901.
- Derry A.M., Staddon W.J., Kevan P.G., Trevors J.T., 1999.** Functional diversity and community structure of microorganisms in three arctic soils as determined by sole carbon source utilization. *Biodivers Conserv*, 8: 205-221.
- Derry A.M., Staddon W.J., Trevors J.T., 1998.** Functional diversity and community structure of microorganisms in uncontaminated and creosote-contaminated soils as determined by sole carbon source utilization. *World J Microbiol Biotechnol*, 14: 571-578.
- Dev H., Condorelli P., Bridges J., Rogers C., Cowney D., 1986.** In situ radio frequency heating process for decontamination of soil. Proc. 19th Meeting of the American Chemical Society, New York, 13-18 April.
- Di Palma L., Ferrantelli P., Merli C., Biancifiori F., 2003.** Recovery of EDTA and metal precipitation from soil flushing solutions. *J Hazard Mater*, 103: 153-168.
- Dial L.D., Anestis D.K., Kennedy S.R., Rankin G.O., 1998.** Tissue distribution, subcellular localization and covalent binding of 2-chloroaniline and 4-chloroaniline in Fischer 344 rats. *Toxicol.*, 131: 109-119.
- Dietrich D., Hickey W.J., Lamar R., 1995.** Degradation of 4,4'-dichlorobiphenyl, 3,3',4,4' tetrachlorobiphenyl, and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, 61: 3904-3909.
- Dijkstra F.I.J., Scheffers W.A., Wilken T.O., 1972.** Submerged growth of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporum*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 38: 329-340.
- Dippler A., & Bigger C.A.H., 1991.** Mechanism of action of food associated polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens. *Mutation Research*, 259: 263-276.
- Dodson P.J., Evans C.S., Harvey P.J., Palmer J.M., 1987.** Production and properties of an extracellular peroxidase from *Coriolus versicolor* which catalyses C α -C β cleavage in a lignin model compound. *FEMS Microbiol Lett*, 42: 17-22.
- Dohse D.M. & Lion L.W., 1994.** Effect of microbial polymers on the sorption and transport of phenanthrene in a low-carbon sand. *Environ Sci Technol*, 28: 541-548.
- Dominguez R.F., da Silva M.L.B., McGuire T.M., Adamson D., Newell C.J., Alvarez P.J.J., 2007.** Aerobic bioremediation of chlorobenzene source-zone soil in flow-through columns: performance assessment using quantitative PCR. *Biodegradation*, 19:545-553

- Dorigo U., Béard A., Humbert J.F., 2002.** Comparison of eukaryotic phytobenthic community composition in a polluted river by partial 18S rRNA gene cloning and sequencing. *Microb Ecol*, 4: 372-380.
- Dotti N., 2004.** “Ricerca e sviluppo di tecnologie di bonifica di siti contaminati” In Canepa P. e Fava F. (eds.). *Atti della II Summer School, Savona 7-12 Settembre 2003.* Consorzio Interuniversitario Nazionale “La Chimica per l’Ambiente”, Venezia p. 67.
- Dunbar J., Lawrence O.T., Kuske C.R., 2001.** Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of Terminal Restriction Fragment Profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl Environ Microbiol*, 67(1): 190-197.
- Dumont M.G., Radajewski S.M., Miguez C.B., McDonald I.R., Murrell J.C., 2006.** Identification of a complete methane monooxygenase operon from soil by combining stable isotope probing and metagenomic analysis. *Environ Microbiol*, 8:1240-1250.
- Dunn N.W. & Gunsalus I.C., 1973.** Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol*, 144:974-979.
- Duran N., Ferrer I., Rodriguez J., 1987.** Ligninases from *Chrysonilia sitophyla* (TFB-27441). *Appl Biochem Biotechnol*, 16: 157-167.
- Egert M., Stingl U., Bruun L.D., Pommerenke B., Brune A., Friedrich M.W., 2005.** Structure and topology of microbial communities in the major gut compartments of *Melolontha melolontha* larvae (coleopteran: Scarabaeidae). *Appl Environ Microbiol*, 71: 4556-4566.
- Eggert C., Temp U., Dean J.F.D., Eriksson K.L., 1995.** Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid. *FEBS Lett*, 376: 202-206.
- Eiler A. & Bertilsson S., 2004.** Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environ Microbiol*, 6: 1228-1243.
- el Fantroussi S., Verschuere L., Verstraete W., Top E.M., 1999.** Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community level physiological profiles. *Appl Environ Microbiol*, 65: 982-988.
- El-Latif Hesham A., Khan S., Liu X., Zhang Y., Wang Z., Yang M., 2006.** Application of PCR-DGGE to analyse the yeast population dynamics in slurry reactors during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in weathered oil. *Yeast*, 23:879-887.
- Engebretson J.J. & Moyer C.L., 2003.** Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal restriction fragment length polymorphism. *Appl Environ Microbiol*, 69: 4823-4829.
- Eriksson D.C., Loehr R.C., Neuhauser E.F., 1993.** PAH loss during bioremediation of manufactured gas plant site soil. *Water Research*, 27: 911-919.

- Eriksson M., Sodersten E., Yu Z., Dalhammar G., Mohn W.W., 2003.** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from northern soils. *Appl Environ Microbiol*, 69:275-284.
- Fagervold S.K., May H.D., Sowers K.R., 2007.** Microbial reductive dechlorination of aroclor 1260 in Baltimore Harbor sediment microcosms is catalyzed by three phylotypes within the phylum *Chloroflexi*. *Appl Environ Microbiol*, 73: 3009-3018.
- Fahaereus G. & Reinhammar B., 1967.** Large-scale production and purification of laccase from cultures of *Polyporus versicolor* and some properties of laccase. *Acta Chem Scand*, 21:2367-2378.
- Fain M.G. & Haddock J.D., 2001.** Phenotypic and phylogenetic characterization of *Burkholderia Pseudomonas* sp. strain LB400. *Curr Microbiol*, 42:269-275.
- Fakoussa R.M. & Hofrichter M., 1999.** Biotechnology and microbiology of coal degradation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 52: 25-40.
- Farver O. & Pecht I., 1984.** The reactivity of copper sites in the blue copper proteins. In: R. Lontie (Ed), *Copper Proteins and Copper Enzymes*, 1, 183-214. CRC Press, Boca Raton,FL.
- Faure D., Bouillant M.L., Jacond C., Bally L., 1996.** Phenolic derivatives related to lignin metabolism as substrates for *Azospirillum* laccase activity. *Phytochem*, 42: 357-359.
- Fava F. & Di Gioia D., 1998.** Effects of Triton X-100 and quillaya saponin on the ex-situ bioremediation of chronically polychlorobiphenyl-contaminated soil. *Appl Microb Biotech*, 50: 623-630.
- Fava F. & Piccolo A., 2002.** Effects of humic substance on bioavailability and aerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls in a model soil. *Biotechnol Bioeng*, 77: 204-211.
- Fava F., Bertin L., Fedi S., Zannoni D., 2003.** Methyl- β -cyclodextrin enhanced solubilization and aerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls in two aged-contaminated soils. *Biotechnol Bioeng*, 81: 384-390.
- Fava F. & Di Gioia D., 2000.** Soya lecithin effects on the aerobic biodegradation of Polychlorinated Biphenyls in an artificially contaminated soil. *Biotechnol Bioeng*, 72: 177-184.
- Fava F., Di Gioia D., Cinti S., Marchetti L., Quattroni G., 1994.** Degradation and dechlorination of low-chlorinated biphenyls by a 3-membered bacterial coculture. *Appl Microb Biotech*, 41: 117-123.
- Fava F., Di Gioia D., Marchetti L., Fenyvesi E., Szejtli J., 2002.** Randomly methylated β -cyclodextrins (RAMEB) enhance the aerobic biodegradation of polychlorinated biphenyl in aged-contaminated soils. *J Inclu Phenom Macrocycl Chem*, 44: 417-421.

- Fedi S., Tremaroli V., Scala D., Perez-Jimenez J.R., Fava F., Young L., 2005.** T-RFLP analysis of bacterial communities in cyclodextrin-amended bioreactors developed for biodegradation of polychlorinated biphenyls. *Res Microbiol*, 156:201-210.
- Feitkenhauer H., Müller R., Märkl H., 2003.** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 60–70°C by *Thermus* and *Bacillus* spp. *Biodegradation*, 14: 367-372.
- Feng D., Lorenzen L., Aldrich C., Mare P.W., 2001.** Ex-situ diesel contaminated soil washing with mechanical methods. *Miner Engin*, 14(9): 1093-1100.
- Fernando T., Bumpus J.A., Aust S.D., 1990.** Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phaenerochaete cryosporium*. *Appl Environ Microbiol*, 56: 1666-1671.
- Field J.A. & Sierra-Alvarez R., 2007.** Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls. *Environ Pollut*, 155, 1-12.
- Fish K.M. & Principe J.M., 1994.** Biotransformations of Arochlor 1242 in Hudson River test tube microcosms. *Appl Environ Microbiol*, 60:4289-4296.
- Fisher M.M. & Triplett E.W., 1999.** Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl Environ Microbiol*, 65:4630-4636.
- Forney L.J., Zhou X., Brown C.J., 2004.** Molecular microbial ecology: land of the oneeyed king. *Curr Opin Microbiol*, 7:210-220.
- Forrester I.T., Grabsky M., Burgess R.R., Leatham G.F., 1988.** Manganese, Mn-dependent peroxidases and the degradation of lignin. *Biochem Biophys Res Comm*, 157: 992-999.
- Fortin P.D., Horsman G.P., Yang H.M., Eltis L.D., 2006.** A glutathione-S-transferase catalyzes the dehalogenation of inhibitory metabolites of polychlorinated biphenyls. *J Bacteriol*, 188: 4424-4430.
- Fox G.E., Wisotzkey J.D., Jurtschuk P., 1992.** How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *J Syst Bacteriol*, 42: 166-170.
- Frank S.G., 1975.** Inclusion Compounds. *J. Pharmaceutical Sci*, 64: 1596-1604.
- Franklin R.B. & Mills A.L., 2003.** Multi-scale variation in spatial heterogeneity for microbial community structure in an eastern Virginia agricultural field. *FEMS Microb Ecol*, 44:335-346.
- Franklin R.B., Taylor D.R., Mills A.L., 1999.** Characterization of microbial communities using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *J Microbiol Methods*, 35: 225-235.

- Freeman D.J. & Cotel F.C.R., 1990.** Woodburning as a source of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Sci Technol*, 24:1581-1585.
- Fuhrman J.A., McCallum T.B., Davis A.A., 1993.** Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. *Appl Environ Microbiol*, 59: 1294-1302.
- Furukawa K. & Miyazaki T., 1986.** Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J Bacteriol*, 166:392-398.
- Furukawa K., 2000.** Biochemical and genetic bases of microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs). *J Gener Appl Microbiol*, 46: 283-296.
- Gao S., Krivobok S., Seigle Murandi F., 2000.** Fungal degradation of fluorine. *Chemosphere*, 40: 91-97.
- García Falcón M. S., González Amigo S., Lage Yusty M.A., Simal Lozano J., 1999.** Determination of benzo(a)pyrene in some Spanish commercial smoked products by HPLC-FL. *Food Addit Contam*, 16: 9-14.
- Gardes M. & Bruns T.D., 1993.** ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhiza and rusts. *Mol Ecol*, 2: 113-118.
- Garland J.L. & Mills, A.L., 1991.** Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole carbon source utilization. *Appl Environ Microbiol*, 57: 2351-2359.
- Garon D., Krivobok S., Wouessidjewe F., Sigle-Murandi F., 2002.** Influence of surfactants on solubilization and degradation of fluorene. *Chemosphere*, 47:303-309.
- Gestetner B., Assa Y., Birk Y., Bondi I., 1971.** Lucerne saponin. Relationship between their chemical constitution and haemolytic and antifungal activities. *J Sci Food Agric*, 22:168-172.
- Ghatak A., Majumdar A., Ghosh R.K., 2005.** Molecular phylogenetic analysis of *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains isolated before, during and after the O139 outbreak based on the inter-genomic heterogeneity of the 16S–23S rRNA intergenic spacer regions. *J Biosci*, 30:619-625.
- Gianfreda L., Xu F., Bollag J.M., 1999.** Laccase: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremed J*, 3: 1-25.
- Gibson J. & Harwood C., 2002.** Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu Rev Microbiol*, 56:345-369.
- Gibson T.G. & Parales E.R., 2000.** Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 11:236-243.

- Giovannoni S.J., Britschgi T.B., Moyer C.L., Field K.G., 1990.** Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*, 345: 60-63.
- Glenn J.K. & Gold M.H., 1985.** Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys*, 242: 329-341.
- Glenn J.K., Morgan M.A., Mayfield M.B., Kuwahara M., Gold M.H., 1983.** An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys*, 242: 329-341.
- Glöckner F.O., Zaichikov E., Belkova N., Denissova L., Pernthaler J., Pernthaler A., 2000.** Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 66: 5053-5065.
- Goh S.H., Facklam R.R., Chang M., Hill J.E., Tyrrell G.J., Burns E.C.M., Chan D., He C., Rahim T., Shaw C., Hemmingsen S.M., 2000.** Identification of *Enterococcus* species and phenotypically similar *Lactococcus* and *Vagococcus* species by reverse checkerboard hybridization to chaperonin 60 gene sequences. *J Clin Microbiol*, 38: 3953-3959.
- Gold M.H., Kuwahara M., Chiu A.A., Glenn J.K., 1984.** Purification and characterization of an extracellular H₂O₂-requiring enzyme diarylpropane oxygenase from the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys*, 234: 353-362.
- Gomes N.C.M., Heuer H., Schonfeld J., Costa R., Mendonca Hagler L., Smalla K., 2001.** Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant and Soil*, 232: 167-180.
- Gonzalez J.M., Ortiz-Martinez A., Gonzalez-delValle M.A., Laiz L, Saiz-Jimenez C., 2003.** An efficient strategy for screening large cloned libraries of amplified 16S rDNA sequences from complex environmental communities. *J Microbiol Methods*, 55: 459-463.
- Gramss G., Voigt K.D., Kirsche B., 1999.** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with three to seven aromatic rings by higher fungi in sterile and unsterile soils. *Biodegradation*, 10: 51-62.
- Greer C.W., Whyte L.G., Lawrence J.R., Masson L., Brousseau R., 2001.** Genomics technologies for environmental science. *Environ Sci Technol*, 35: 360-366.
- Griffiths B.S., Diaz-Ravina M., Ritz K., McNicol J.W., Ebbelwhite N., Bååth E., 1997.** Community DNA hybridisation and %G + C profiles of microbial communities from heavy metal polluted soils. *FEMS Microb Ecol*, 24: 103-112.
- Griffiths B.S., Ritz K., Glover L.A., 1996.** Broad-scale approaches to the determination of soil microbial community structure: application of the community DNA hybridization technique. *Microb Ecol*, 31: 269-280.

- Grillo G., Robertiello A., Di Leo C., Molinari M., Nardella A., 2001.** La bonifica biologica dei siti inquinati da idrocarburi. Ulrico Hoepli (Ed), Milano.
- Grimberg S.J., Nagel J., Aitken M.D., 1995.** Kinetics of phenantrene dissolution into water in the presence of nonionic surfactants. *Environ Sci Technol*, 29: 1480-1487.
- Grund A.D. & Gunsalus I.C., 1983.** Cloning of genes for naphthalene metabolism in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol*, 156:89-94.
- Gsell T.C., Holben W.E., Ventullo R.M., 1997.** Characterization of the sediment bacterial community in groundwater discharge zones of an alkaline fen: a seasonal study. *Appl Environ Microbiol*, 63: 3111-3118.
- Guha S. & Jaffè P.R., 1996.** Biodegradation kinetic of phenathrene dissolution into water in the presence of nonionic surfactant. *Environ Sci Technol*, 30: 605-611.
- Guo C., Sun W., Harsh J.B., Ogram A., 1997.** Hybridization analysis of microbial DNA from fuel oil-contaminated and noncontaminated soil. *Microb Ecol*, 34: 178-187.
- Gustafson D.L., Long M.E., Thomas R.S., Benjamin S.A., Yang R.S.H., 2000.** Comparative hepato-carcinogenicity of hexachlorobenzene, pentachlorobenzene, 1,2,4,5-tetrachlorobenzene, and 1,4- dichlorobenzene: application of medium-term liver focus bioassay and molecular and cellular indices. *Toxicol Sci*, 2: 245-252.
- Haars A., Chet I., Hüttermann A., 1981.** Effects of phenolic compounds and tannin on growth and activity of *Fomes annosus*. *Environ J Forest Pathol*, 11: 67-76.
- Habe H. & Omori T., 2003.** Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67: 225-243.
- Halmemies S., Grondahl S., Arffman M., Nenonen K., Tuhkanen T., 2003.** Vacuum extraction based response equipment for recovery of fresh fuel spills from soil. *J Hazard Mater*, 97: 127-143.
- Hartkamp Commandeur L.C.M., Gerritse J., Govers H.A.J., Parsons J.R., 1996.** Reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls by anaerobic microorganisms enriched from Dutch sediments. *Chemosphere*, 32: 1275-1286.
- Hatakka A., 1994.** Lignin modifying enzymes from selected *white-rot* fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol Rev*, 13: 125-135.
- Hatakka A., Kantelin A., Tervilia-Wilo A., Viikari L., 1987.** Production of ligninases by *Phlebia radiata* in agitated cultures. In: Odier E. (Ed.), *Lignin Enzymic and microbiol. Degradation. Symp. Intern, INRA Paris*, 185-189.
- Hatzinger P.B. & Alexander M., 1995.** Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environ Sci Technol*, 29: 537-545.
- Havey R.G., 1997.** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Wiley-VCH inc.

- Hayase N., Taira K., Furukawa K., 1990.** *Pseudomonas putida* KF715 *bph*ABCD operon encoding biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation: cloning analysis, and expression in soil bacteria. *J Bacteriol*, 172: 1160-1164.
- Head I.M., Saundes J.R., Pickup R.W., 1998.** Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb Ecol*, 35: 1-21.
- Heuer H. & Smalla K., 1997.** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. In: van Elsas JD, Wellington EMH, Trevors JT (eds) *Modern soil microbiology*. Dekker, New York, 353-373.
- Heuer H., Wieland G., Schonfeld J., Schnwalder A., Gomes N.C.M. & Smalla K., 2001.** Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis. In: *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications* (ed. P.A. Rochelle), 177–190. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- Higuchi T., 1989.** Mechanism of lignin degradation by lignin peroxidase and laccase of *white-rot* fungi. In: Lewis, N.G., and Paice M.G., (Eds), *Biogenesis and Biodegradation of Plant Cell Polymers*. ACS Symposium Series, 399: 482-502.
- Hill J.E., Penny S.L., Crowell K.G., Goh S.H., Hemmingsen S.M., 2004.** CpnDB: a chaperonin sequence database. *Genome Res*, 14: 1669-1675.
- Hill J.E., Seipp R.P., Betts M., Hawkins L., Van Kessel A.G., Crosby W.L., Hemmingsen S.M., 2002.** Extensive profiling of a complex microbial community by high-throughput sequencing. *Appl Environ Microbiol*, 68: 3055-3066.
- Hiorns W.D., Methé B.A., Nierzwicki Bauer S.A., Zehr J.P., 1997.** Bacterial diversity in Adirondack Mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl Environ Microbiol*, 63: 2957-2960.
- Hodge J.E., Hofreiter B.T., 1962.** *Methods Carbohydr. Chem.* 1: 388-389.
- Hofer B., Backhaus S., Timmis K.N., 1994.** The biphenyl/polychlorinated biphenyl-degradation locus (*bph*) of *Pseudomonas* sp. LB400 encodes four additional metabolic enzymes. *Gene*, 144:9-16.
- Hofrichter M. & Fritsche W., 1997.** Depolymerization of low rank coal by extracellular fungal enzyme synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 47: 419-571.
- Hofrichter M., Scheibner K., Schneegab I., Fritsche W., 1998.** Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*. *Appl Environ Microbiol*, 64: 399-404.
- Holben W.E. & Harris D., 1995.** DNA-based monitoring of total bacterial community structure in environmental samples. *Mol Ecol*, 4: 627-631.
- Hollestein M., McCann J., Angelosanto F.A., Nichols W.W., 1979.** Short-term tests for carcinogens and mutagens. *Mutation Research*, 65: 133-226.

- Hope C.F.A. & Burns R.G., 1987.** Acidity, origins and location of cellulases in a silt loam soil. *Biol Fert Soil*, 5: 164-170.
- Hou L.H. & Dutta S.K., 2000.** Phylogenetic characterization of several paraand meta-PCB dechlorinating *Clostridium* species: 16s rDNA sequence analyses. *Lett Appl Microbiol*, 30: 238-243.
- Hsieh C., Wang H-L., Chen C-C., Hsu T-H., Tseng M.H., 2008.** Effect of plant oil and surfactant on the production of mycelial biomass and polysaccharides in submerged culture of *Grifola frondosa*. *Biochem Eng J* 38: 198-205.
- Hugenholtz P. & Pace N.R., 1996.** Identifying microbial diversity in the natural environment. *Trends Biotechnol*, 14: 190-197.
- Hughes J.B., Hellmann J.J., Ricketts T.H., Bohannon B.J.M., 2001.** Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl Environ Microbiol*, 67: 4399-4406.
- in der Wiesche C., Martens R., Zadrazil F., 1996.** Two-step degradation of pyrene by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 46: 653-659.
- Johannes C. & Majcherczyk A., 2000.** Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl Environ Microbiol*, 66: 524-528.
- Jensen M.A., Webster J.A., Straus N., 1993.** Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphism. *Appl Environ Microbiol*, 70: 2667-2677.
- Johansson T. & Nyman P.O., 1987.** A manganese(II)-dependent extracellular peroxidase from the *white-rot* fungus *Trametes versicolor*. *Acta Chem Scand*, 41: 762-765.
- Jones K.C., Alcock R.E., Johson D.L., Nothcott G.L., Semple K.T., Woolgar P.J., 1996.** Organic chemicals in contaminated land: analysis, significance and research priorities. *Land Contamin Reclam*, 3: 189-197.
- Jones K.C., Stratford J.A., Tridge P., Waterhouse K.S., Johnston A.E., 1989.** Polynuclear aromatic hydrocarbons in an agricultural soil: long-term changes in profile distribution. *Environ Pollut*, 56: 337-351.
- Jorgensen K.S., Puustinen J., Suortti A.M., 2000.** Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environ Pollut*, 107: 245-254.
- Jozefacijs G., Muranyi A., Fenyvesi E., 2003.** Effect of randomly methylated beta-cyclodextrin on physical properties of soils. *Enviro Sci Technol*, 37: 3012-3017.
- Juhasz A.L., Smith, E., Smith, J., Naidu, R., 2003.** In situ remediation of DDT-contaminated soil using a two-phase co-solvent flushingfungal biosorption process. *Water Air Soil Pollut*, 147: 263-274.

- Juhasz A.L. & Naidu R., 2000.** Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int Biodeter Biodegrad*, 45: 57-88.
- Kamei I., Kogura R., Kondo R., 2006.** Metabolism of 4,4'-Dichlorobiphenyl by *white-rot* fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Phanerochaete* sp. MZ142. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72: 566-575.
- Kantelinen A., Hatakka A., Viikari L., 1989.** Production of lignin peroxidase and laccase by *Phlaeobium radiatum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 31:234-239.
- Kao C.M. & Prosser J., 1998.** Intrinsic bioremediation of trichlorobenzene and chlorobenzene: field and laboratory studies. *J Hazard Material*, 69: 67-79.
- Kapich A., Hofrichter M., Vares T., Hattaka A., 1999.** Coupling of manganese peroxidase mediated lipid peroxidation with destruction of non phenolic lignin compounds and ¹⁴C-labelled lignin. *Biochem Biophys Res Comm*, 22:88-95.
- Kasai H., Watanabe K., Gasteiger E., Bairoch A., Isono K., Yamamoto S., Harayama S. 1998.** Construction of the *gyrB* database for the identification and classification of bacteria. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform*, 9: 13–21.
- Kasai Y., Takahata Y., Manefield M., Watanabe K., 2006.** RNA-based stable isotope probing and isolation of anaerobic benzene-degrading bacteria from gasolinecontaminated groundwater. *Appl Environ Microbiol*, 72:3586-3592.
- Kennedy D.W., Aust S.D., Bumpus J.A., 1990.** Comparative biodegradation of alkyl halide insecticide by the *white-rot* fungus, *Phanerochaete chrysosporium* (BKM-F-1767). *Appl Environ Microbiol*, 56: 2347-2353.
- Kersten P.J., Kalyanaraman B., Hammel K.E., Reinhammar B., Kirk T.K., 1990.** Comparison of lignin peroxidase and laccase in the oxidation of methoxy benzene. *Biochem J*, 268: 475-480.
- Khazaal K.A., Owen E., Dodson A.P., Palmer J.M., Harvey P.J., 1993.** Treatment of barley straw with ligninase: effect on activity and fate of the enzyme shortly after being added to straw. *Animal Feed Sci Technol*, 41: 15-21.
- Kikuchi Y., Yasukochi Y., Nagata Y., Fukuda M., Takagi M., 1994.** Nucleotide sequence and functional analysis of the metacleavage pathway involved in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J Bacteriol*, 176:4269-4276
- Kim E.S., Lee D.H., Yum B.W., Chang H.W., 2005.** The effect of ionic strength and hardness of water on the non-ionic surfactant-enhanced remediation of perchloroethylene contamination. *J Hazard Mater*, 119: 195-203.
- Kimura Y., Asada Y., Kuwahara M., 1991.** Molecular analysis of *Bjerkandera adusta* lignin peroxidase gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 35: 510-514.
- Klappenbach J.A., Saxman P.R., Cole J.R., Schmidt T.M., 2001.** rrnDB: The ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Res*, 29:181-184.

- Klasson K.T., Barton J.W., Evans B.S., Reeves M.E., 1996.** Reductive microbial dechlorination of indigenous polychlorinated biphenyls in soil using a sediment-free inoculum. *Biotechnol Progress*, 12: 310-315.
- Kleikemper J., Schroth M.H., Sigler W.V., Schmucki M., Bernasconi S.M., Zeyer J., 2002.** Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol*, 68:1516-1523.
- Koch A.L., 1994.** Growth measurement. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*. (Eds) Gerhardt P., Murray R.G.E., Wood W.A., Krieg N.R., American Society for Microbiology, Washington D.C. 256-257.
- Konopka A., Oliver J.L., Turco R.F., 1998.** The use of carbon source utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Microb Ecol*, 35: 103-115.
- Kotterman M.J.J., Rietberg H.J., Hage A., Field J.A., 1998.** Polycyclic aromatic hydrocarbon oxidation by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 in the presence of non-ionic surfactants. *Biotechnol Bioeng*, 57: 220-227.
- Kotterman M.J.J., Vis E.H., Field J.A., 1998.** Successive mineralization and detoxification of benzo[a]pyrene by the white-rot fungus *Bjerkandera* BOS55 and indigenous microflora. *Appl Environ Microbiol*, 64: 2853-2858.
- Kowalchuk G.A., Gerards S., Woldendorp J.W., 1997.** Detection and characterization of fungal infections of *Ammophila arenaria* (Marran grass) roots by denaturing gradient gel electrophoresis of specifically amplified 18S rDNA. *Appl Environ Microbiol*, 63:3858-3865.
- Krěmář P., Kubatova A., Votruba J., Erbanova P., Novotný A., Šašek V., 1999.** Degradation of polychlorinated biphenyls by extracellular enzymes of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a perforated plate bioreactor. *World J Microbiol Biotechnol*, 15: 269-276.
- Kubátová A., Erbanova P., Eichlerova I., Homolka L., Nerud F., Sasek V., 2001.** PCB Congener selective biodegradation by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil. *Chemosphere*, 43: 207-215.
- Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., Sindelka R., Sjoback R., Sjogreen B., Strombom L., Stahlberg A. Zoric N., 2006.** The real-time polymerase chain reaction. *Molec Aspects Medic*, 27: 95-125.
- Kurkela S., Lehvaslaiho H., Palva E.T., Teeri T.H., 1988.** Cloning, nucleotide sequence and characterization of gene encoding naphthalene dioxygenase of *Pseudomonas putida* strain NCIB9816. *Gene*, 73: 355-362.
- Kuwara M., Glenn J.K., Morgan M.A., Gold M.H., 1984.** Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Lett*, 169: 247-250.
- Lajoie C.A., Lajont A.C., Saylor G.S., 1994.** Cometabolic oxidation of polychlorinated biphenyls in soil with a surfactant-based field application vector. *Appl Environ Microbiol*, 60: 2826-2833.

- Lamar R.T. & Dietrich D.M., 1990.** In-situ depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete* spp. *Appl Environ Microb*, 56: 3093-3100.
- Lane D.J., Pace B., Olsen G.J., Stahl D.A., Sogin M.L., Pace N.R., 1985.** Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82: 6955-6959.
- Lang E., Eller G., Zadrazil F., 1997a.** Lignocellulose decomposition and production of ligninolytic enzymes during interaction of *white-rot* fungi with soil microorganisms. *Microb Ecol*, 34: 1-10.
- Lang E., Kleeberg I., Zadrazil F., 2000.** Extractable organic carbon and counts of bacteria near the lignocellulose-soil interface during the interaction of soil microbiota and *white-rot* fungi. *Bioresour Technol*, 75: 57-65.
- Lang E., Nerud F., Zadrazil F., 1998.** Production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus* sp. and *Dichomitus squalens* in soil and lignocellulose substrate as influenced by soil microorganisms. *FEMS Microb Lett*, 167: 239-244.
- Lang E.K., Kleeberg I., Zadrazil F., 1997b.** Competition of *Pleurotus* sp. and *Dichomitus squalens* with soil microorganisms during lignocellulose decomposition. *Biores Technol*, 60: 95-99.
- Larena I., Salazar O., González V., Julián M.C., Rubio V., 1999.** Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *J Biotechnol*, 75: 187-194.
- Layton A., McKay L., Williams D., Garrett V., Gentry R., Sayler G., 2006.** Development of *bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Appl Environ Microbiol*, 72: 4214-4224.
- Lee D.H., Zo Y.G., Kim S.J., 1996.** Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl Environ Microbiol*, 62: 3112-3120.
- Lee H.W., Lee S.Y., Lee J.W., Park J.B., Choi E.S., Park Y.K., 2002.** Molecular characterization of microbial community in nitrate-removing activated sludge. *FEMS Microbiol Ecol*, 41: 85-94.
- Lee S. & Fuhrman J.A., 1990.** DNA hybridization to compare species compositions of natural bacterioplankton assemblages. *Appl Environ Microbiol*, 56: 739-746.
- Lei F. & Vander Gheynst J.S. 2000.** The effect of microbial inoculation and pH on microbial community structure changes during composting. *Process Biochem*, 35: 923-929.
- Liang R.H. & McFarland M.J., 1994.** Biodegradation of pentachlorophenol in soil amended with the *white-rot* fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Hazard Waste Hazard Mater*, 11: 411-421.

- Liesack W. & Stackebrandt E., 1992.** Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J Bacteriol*, 174:5072-5078.
- Lijinsky W., 1991.** The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food. *Mutat Resear*, 259: 251-262.
- Lin J.L., Radajewski S., Eshinimaev B.T., Trotsenko Y.A., McDonald I.R., Murrell J.C., 2004.** Molecular diversity of methanotrophs in Transbaikal soda lake sediments and identification of potentially active populations by stable isotope probing. *Environ Microbiol*, 6:1049-1060.
- Lin S.C., 1996.** Biosurfactant: recent advantage. *J Chem Technol Biotechnol*, 63: 109-120.
- Lopez Gutierrez J.C., Henry S., Hallet S., Martin Laurent F., Catroux G., Philippot L., 2004.** Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. *J Microbiol Methods*, 57: 399-407.
- Lord N.S., Kaplan C.W., Shank P., Kitts C.L., Elrod S.L., 2002.** Assessment of fungal diversity using terminal restriction fragment (TRF) pattern analysis: comparison of 18S and ITS ribosomal regions. *FEMS Microbiol Ecol*, 42: 327-337.
- Löser C., Seidel H., Hoffman P., Zehnsdorf A., 1999.** Bioavailability of hydrocarbons during microbial remediation of a sandy soil. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51: 111-118.
- Lovell C.R. & Hui Y., 1991.** Design and testing of a functional group-specific DNA probe for the study of natural populations of acetogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 57: 2602-2609.
- Loy A., Lehner A., Lee N., Adamczyk J., Meier H., Ernst J., Schleifer K.H., Wagner M., 2002.** Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl Environ Microbiol*, 68:5064-5081.
- Ludvigsen L., Albrechtsen H.J., Ringelberg D.B., Ekelund F., Christensen T.H., 1999.** Distribution and composition of microbial populations in a landfill leachate contaminated aquifer (Grindsted, Denmark). *Microb Ecol*, 37: 197-207.
- Lueders T. & Friedrich M.W., 2003.** Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl Environ Microbiol*, 69: 320-326.
- Machado K.M.G., Matheus D.R., Monteiro R.T.R., Bononi V.L.R., 2005.** Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. *World J Microbiol Biotechnol*, 21: 297-301.

- Macnaughton S., Stephen J.R., Chang Y.J., Peacock A., Flemming C.A., Leung K.T., 1999.** Characterization of metal-resistant soil eubacteria by polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis with isolation of resistant strains. *Can J Microbiol*, 45:116-124.
- Maltseva O.V., Niku-Paavola M.L., Leontievsky A.A., Myasoedova N.M., Golovleva L.A., 1991.** Ligninolytic enzymes of the *white-rot* fungus *Panus tigrinus*. *Biotechnol Appl Biochem*, 13: 291-302.
- Maltseva O.V., Tsoi T.V., Quensen J.F., Fukuda M., Tiedje J.M., 1999.** Degradation of anaerobic reductive dechlorination products of Arochlor 1242 by four aerobic bacteria. *Biodegradation*, 10: 363-371
- Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., Schleifer K.H., 1992.** Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol*, 15:593-600.
- Marchesi J.R., Sato T., Weightman A.J., Martin T.A., Fry J.C., Hiom S.J., 1998.** Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 64: 795-799.
- Marquez-Rocha F.J., Hernandez-Rodriguez V.Z., Vazquez-Duhalt R., 2000.** Biodegradation of soil-adsorbed polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnol Lett*, 22: 469-472.
- Marsh T.L., 1999.** Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr Opin Microbiol*, 2:323-327.
- Martens R. & Zadrazil F., 1998.** Screening of *white-rot* fungi for their ability to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Folia Microbiologica*, 43: 97-103.
- Martinez M.J., Boeckle B., Camareno S., Guillen F.J., Martinez A.T., 1996.** Enzymes for pulp and paper processing. In: Jeffries T.W. & Viikari L. (Eds), *American Chemical Society, Washington*, 183-196.
- Masai E., Sugiyama K., Iwashita N., Shimizu S., Hauschild J.E., Hatta T., Kimbara K., Yano K., Fukuda M., 1997.** The *bphDEF* meta-cleavage pathway genes involved in biphenyl/polychlorinated biphenyl degradation are located on a linear plasmid and separated from the initial *bphACB* genes in *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Gene*, 187:141-149.
- Masse R., Messier F., Peloquin L., Ayotte C., Sylvestre M., 1984.** Microbial biodegradation of 4-chlorobiphenyl, a model-compound of chlorinated biphenyls. *Appl Environ Microbiol*, 47: 947-951.
- May L. A., Smiley B., Schmidt M.G., 2001.** Comparative denaturino gradient gel electrophoresis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Can J Microbiol*, 47: 829-841.

- Meador J.P., Stein J.E., Reichert W.L., Varanasi U., 1995.** Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Rev Environ Contamin Toxicol*, 143: 79-165.
- Mendoza M., Meugnier H., Bes M., Etienne J., Freney J., 1998.** Identification of *Staphylococcus* species by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. *Int J Syst Bacteriol*, 48:1049-1055.
- Menn F.M., Applegate B.M., Saylor G.S., 1993.** NAH plasmid-mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphthoic acid. *Appl Environ Microbiol*, 59: 1938-1942.
- Merlin C., Springael D., Mergeay M., Toussaint A., 1997.** Organization of the *bph* gene cluster of transposon Tn4371, encoding enzymes for the degradation of biphenyl and 4-chlorobiphenyl compounds. *Mol Gen Genet*, 253:499-506.
- Mersh-Sundermann V., Mochayed S., Kevekordes S., 1995.** Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon. *Rev Environ Contamin Toxicol*, 143: 79-165.
- Miessner M., Crescenzi O., Napoletano A., Porta G., Andersen S.O., Peter M.G., 1991.** Biphenyl-tetrols and dibenzofuranones from oxidative coupling of resorcinol with 4-alkylpyrocatechols: new clues to the mechanism of insect cuticle sclerotization. *Helvetica Chimica Acta*, 74: 1205-1212.
- Miethling R., Wieland G., Backhaus H., Tebbe C.C., 2000.** Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. *Microb Ecol*, 40: 43-56.
- Misko A.L. & Germida J.J., 2002.** Taxonomic and functional diversity of *Pseudomonads* isolated from the roots of field-grown canola. *FEMS Microbiol Ecol*, 42: 399-407.
- Moen MA. & Hammel K.E., 1994.** Lipid peroxidation by the manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* is the basis for phenanthrene oxidation by the intact fungus. *Appl Environ Microbiol*, 60: 1956-1961.
- Mondello F.J., 1989.** Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation. *J Bacteriol*, 171:1725-1732.
- Morea M., Baruzzi F., Cappa F., Cocconcelli P.S., 1998.** Molecular characterization of the *Lactobacillus* community in traditional processing of Mozzarella cheese. *Int J Food Microbiol*, 43: 53-60.
- Morgan P., Lee S.A., Lewis S.T., Sheppard A.N., Watkinson R.J., 1993.** Growth and biodegradation by *white-rot* fungi inoculated into soil. *Soil Biol Biochem*, 25: 279-287.
- Morris P.J. & Prichard P.H., 1993.** Concept in improving polychlorinated biphenyl bioavailability to bioremediation strategies. In Hinchee R.E., Eeson A., Semprini L., Ong S.K. (Eds), *Bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbon compounds*. Lewis Publishers, Raton, USA359-367.

- Morris P.J., Mohn W.W., Quensen J.F., Tiedje J.M., Boyd S.A., 1992.** Establishment of a PCB degrading enrichment culture with predominantly meta-dechlorination. *Appl Environ Microbiol*, 58:88-94.
- Morrison T.B., Weis J.J., Wittwer C.T., 1998.** Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 24:954-962.
- Moter A. & Göbel U.B., 2000.** Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods*, 41: 85-112.
- Mougin C., Pericaud C., Dubroca J., Asther M., 1997.** Enhanced mineralization of lindane in soils supplemented with the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Soil Biol Biochem*, 29: 1321-1324
- Mouz S., Merlin C., Springael D., Toussaint A., 1999.** A GntR-like negative regulator of the biphenyl degradation genes of the transposon Tn4371. *Mol Gen Gene*, 262:790-799.
- Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F., 2001.** Surfactant enhance remediation of contaminated soil: a review. *Engin Geol*, 60: 371-380.
- Mullins T.D., Britschgi T.B., Krest R.L., Giovannoni S.J., 1995.** Genetic comparison reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. *Limnol Oceanogr*, 40: 148-158.
- Murray A.E., Preston C.M., Massana R., Taylor L.T., Blakis A., Wu K., DeLong E.F., 1998.** Seasonal and spatial variability of bacteria and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Appl Environ Microbiol*, 64: 2585-2595.
- Muyzer G. & Smalla K., 1998.** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 127-141.
- Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G., 1993.** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 59:695-700.
- Muyzer G., Teske A., Wirsén C.O., 1995.** Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch Microbiol*, 164:165-172.
- Nadkarni M.A., Martin F.E., Jacques N.A., Hunter N., 2002.** Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiol*, 148: 257-266.
- Nakatsu C.H., Torsvik V., Øvreå L., 2000.** Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA chain reaction products. *Soil Sci Soc Am J*, 64: 1382-1388.

- Natarajan M.R., Wu W.M., Nye J., Wang H., Bhatnagar L., Jain M.K., 1996.** Dechlorination of polychlorinated biphenyl congeners by an anaerobic microbial consortium. *Appl Microbiol Biotechnol*, 46: 673-677.
- Nayyr S.P., Sabatini D.A., Harwell J.A., 1994.** Surfactant adsolubilization and modified admicellar nonpolar, polar, and ionisable organic contaminants. *Environ Sci Technol*, 28: 1874-1881.
- Neff J.M., (1979).** Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. sources, fates and biological effects. *Appl Sci Publishers*, pp.262.
- Nelson N.A., 1944.** Colorimetric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *J Biochem*, 153: 376-380.
- Neto J.S.A. & Kling S.H., 1993.** Stability of crude ligninases: effect of different hydrogen peroxide concentrations in the presence of aromatic alcohols. *Biotechnol Techniques*, 7:81-84.
- Neufeld J.D., Dumont M.G., Vohra J., Murrell J.C., 2007.** Methodological considerations for the use of stable isotope probing in microbial ecology. *Microb Ecol*, 53:435-442.
- Nies D. & Silver S., 1995.** Ion efflux system involved in bacterial metal resistance. *J Ind Microbiol*, 14: 186-199.
- Nies L. & Vogel T.M., 1990.** Effects of organic substrates on dechlorination of Aroclor-1242 in anaerobic sediments. *Appl Environ Microbiol*, 56: 2612-2617.
- Nikku-Pavola M.L., Karhunen E., Kantelinen A., Viikari L., Lundell T., Hatakka A., 1990.** The effect of culture on the production of lignin-modifying enzymes by the *white-rot* fungus *Phlebia radiata*. *J Biotechnol*, 13: 211-221.
- Nishioka M., Chang H.C., Lee V., 1986.** Structural characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbon isomers in coal tars and combustion products. *Environ Sci Technol*, 20:1023-1027.
- Novotný C., Erbanova P., Šašek V., Kubatova A., Cajthaml T., Lang E., Krahl J., Zadržil F., 1999.** Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. *Biodegradation*, 10:159-168
- Novotný C., Svobodová K., Erbanova P., Cajthaml T., Kasinatha A., Lang E., Šašek V., 2004.** Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biol Biochem* 36: 1545-1551.
- Novotný C., Vyas B.R.M., Erbanova P., Kubatova A., Šašek V., 1997.** Removal of PCBs by various *white-rot* fungi in liquid cultures. *Folia Microbiol*, 42: 136-140.
- Nubel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G., 1997.** PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 63:3327-3332.

- Nusslein K. & Tiedje J.M., 1998.** Characterization of the dominant and rare members of a young Hawaiian soil bacterial community with small-subunit ribosomal DNA amplified from DNA fractionated on the basis of its guanine and cytosine composition. *Appl Environ Microbiol*, 64: 1283-1289.
- Nyyssönen M., Piskonen R., Itävaara M., 2006.** A targeted real-time PCR assay for studying naphthalene degradation in the environment. *Microb Ecol*, 52: 533-543.
- O'Malley D.M., Whetten R., Bao W., Chem C., Sederoff R.R., 1993.** The role of laccase in lignification. *Plant J*, 4:451-757.
- Obana H., Hori S., Kashimoto T., Kunita N., 1981.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in human fat and liver. *Bulletin Environ Contamin Toxicol*, 27: 23-27.
- Odier E., Mozuch M.D., Kalyanaraman B., Kirk T.K., 1998.** Ligninase-mediated phenoxy radical formation and polymerization unaffected by cellobiose: quinone oxidoreductase. *Biochem*, 70: 847-852.
- Ofjord G.D., Puhakka J.A., Ferguson J.F., 1994.** Reductive dechlorination of aroclor 1254 by marine sediment cultures. *Environ Sci Technol*, 28: 2286-2294.
- Ohtsubo Y., Kudo T., Tsuda M., Nagata Y., 2004.** Strategies for bioremediation of polychlorinated biphenyls. *Appl Microbiol Biotechnol*, 65: 250-58.
- Ojo O.A., 2006.** Petroleum-hydrocarbon utilization by native bacterial population from a wastewater canal Southwest Nigeria. *African J Biotech*, 5: 333-337.
- Okano Y., Hristova K.R., Leuteneger C.M., Jackson L.E., Denison R.F., Gebreyesus B., Lebauer D., Scow K.M., 2004.** Applications of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Appl Environ Microbiol*, 70: 1008-1016.
- Okeke B.C., Paterson A., Smith J.E., Watson- Craik I.A., 1994a.** Relationships between ligninolytic activities of *Lentinula* spp. and biotransformation of pentachlorophenol in sterile soil. *Lett Appl Microbiol*, 19: 284-287.
- Okeke B.C., Paterson A., Smith J.E., Watson- Craik I.A., 1994b.** The relationship between phenol oxidase activity, soluble protein and ergosterol with growth of *Lentinus* species in oak sawdust logs. *Appl Microbiol Biotechnol*, 41: 28-31.
- Olsen J.B., Steppe T.F., Litaker R.W., Paerl H.W., 1998.** N₂-fixing microbial consortia associated with the ice cover of Lake Bonney, Antarctica *Microb Ecol*, 36: 231-238.
- Olsen R.A., 1971.** Triterpeneglycoside as inhibitor of fungal growth and metabolism. Effect on growth, endogenous respiration and leakage of UV-absorbing material from various fungi. *Plant Physiol*, 23: 715-727.
- Orita M., Suzuki Y., Sekiya Y., Hayashi K., 1989.** Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5: 874-879.

- Osborn A.M., Moore E.R., Timmis K.N., 2000.** An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol*, 2:39-50.
- Otterpohl R., 2002.** Options for alternative types of sewerage and treatment systems directed to improvement of the overall performance. *Water Sci Technol*, 45: 149-158.
- Øvreås L., Daae F.L., Torsvik V., Rodriguez-Valera F., 2003.** Characterization of microbial diversity hypersaline environments by melting profiles and reassociation kinetics in combination with terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). *Microb Ecol*, 46: 291-301.
- Pannu J.K., Singh A., Ward O.P., 2004.** Vegetable oil as a contaminated remediation amendment: application of peanut oil for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Process Biochem*, 39: 1211-1216.
- Pizzul L., del Pilar Castillo M., Stenström J., 2007.** Effect of rapeseed oil on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by *Rhodococcus wratislaviensis*. *Int Biodeterior Biodegrad*, 59: 111-118.
- Park J., Jung Y., Han M., Lee S., 2002.** Simultaneous removal of cadmium and turbidity in contaminated soil-washing water by DAF and electroflotation. *Water Sci Technol*, 46: 225-230.
- Park J.W. & Crowley D.E., 2006.** Dynamic changes in *nahAc* gene copy numbers during degradation of naphthalene in PAH-contaminated soils. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72: 1322-1329.
- Peloquin L. & Greer C.W., 1993.** Cloning and expression of the polychlorinated biphenyl-degradation gene cluster from *Arthrobacter* M5 and comparison to analogous genes from gram negative bacteria. *Gene*, 125: 35-40.
- Peplies J., Glöckner F.O., Amann R., 2003.** Optimization strategies for DNA microarray-based detection of bacteria with 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol*, 69: 1397-1407.
- Perez J. & Jefries T.W., 1992.** Role of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, 31: 495-502.
- Peters S., Koschinsky S., Schwieger F., Tebbe C.C., 2000.** Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Appl Environ Microbiol*, 66: 930-936.
- Pieper D.H., 2005.** Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67: 170-191.
- Pillips D.H., 1983.** Fifty years of benzo[a]pyrene. *Nature*, 303: 468-472.

- Powell S.M., Ferguson S.H., Bowman J.P., Snape I., 2006.** Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in antarctic soil during bioremediation. *Microb Ecol*, 52: 523-532.
- Purkhold U., Pommering-Roser A., Juretschko S., Schmid M.D., Koops H.P., Wagner M., 2000.** Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl Environ Microbiol*, 66: 5368-5382.
- Quensen J.F., Boyd S.A., Tiedje J.M., 1990.** Dechlorination of four commercial polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors) by anaerobic microorganisms from sediments. *Appl Environ Microbiol*, 56:2360-2369.
- Quensen J.F., Tiedje J.M., Boyd S.A., 1988.** Reductive dechlorination of polychlorinated-biphenyls by anaerobic microorganisms from sediments. *Science*, 242: 752-754.
- Rabinovich M.L., Bolobova A.V., Vasil'chenko L.G., 2004.** Fungal decomposition of natural aromatic structure and xenobiotics: a review. *Appl Biochem Microbiol*, 40: 1-17.
- Radajewski S., Ineson P., Parekh N.R., Murrell J.C., 2000.** Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, 403: 646-649.
- Ramanand K., Balba M.T., Duffy J., 1993.** Reductive dehalogenation of chlorinated benzenes and toluenes under methanogenic conditions. *Appl Environ Microbiol*, 59: 3266-3272.
- Ranjard L., Brothier E., Nazaret S., 2000.** Sequencing bands of RISA fingerprints for the characterization and the microscale distribution of soil bacterial populations responding to mercury spiking. *Appl Environ Microbiol*, 66: 5334-5339.
- Reed D.W., Fujita Y., Delwiche M.E., Blackwelder D.B., Sheridan P.P., Uchida T., Colwell F.S., 2002.** Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a forearc basin. *Appl Environ Microbiol*, 68: 3759-3770.
- Reid I.D. & Paice M.G., 1994.** Biological bleaching of kraft pulps by *white-rot* fungi and their enzymes. *FEMS Microbiol Rev*, 13: 369-376.
- Reinhammar B. & Malstrom B.G., 1981.** Blue copper containing oxidases. In: Spiro TG (Ed) copper proteins (Metal ions in biology 3) Wiley, New York, 109-149.
- Richardson R.E., Bhupathiraju V.K., Song D.L., Goulet T.A., Alvarez-Cohen L., 2002.** Phylogenetic characterization of microbial communities that reductively dechlorinate TCE based upon a combination of molecular techniques. *Environ Sci Technol*, 36:2652-2662.
- Ritchie N.J., Schutter M.E., Dick R.P., Myrold D.D., 2000.** Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. *Appl Environ Microbiol*, 66: 1668-1675.

- Ritz K., Griffiths B.S., Torsvik V.L., Hendriksen N.B., 1997.** Analysis of soil and bacterioplankton community DNA by melting profiles and reassociation kinetics. *FEMS Microbiol Lett*, 149: 151-156.
- Rodrigues J.L.M., Kachel C.A., Aiello M.R., Quensen J.F., Maltseva O.V., Tsoi T.V., Tiedje J.M., 2006.** Degradation of Aroclor 1242 dechlorination products in sediments by *Burkholderia xenovorans* LB400(ohb) and *Rhodococcus* sp. strain RHA1(fcb). *Appl Environ Microbiol*, 72: 2476-2482.
- Roest K., Heilig Hans G.H.J., Smidt H., de Vos W.M, Stams A.J.M., Akkermans A.D.L., 2005.** Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill wastewater. *Syst Appl Microbiol*, 28: 175-185.
- Roling W.F.M., van-Breukelen B.M., Braster M., Goeltom M.T., Groen J., 2000.** Analysis of microbial communities in a landfill leachate polluted aquifer using a new method for anaerobic physiological profiling and 16S rDNA based fingerprinting. *Microb Ecol*, 40: 177-188.
- Rondon M.R., August P.R., Bettermann A.D., Brady S.F., Grossman T.H., Liles M. R., Loiacono K.A., Berkley A.L., Mac Neil A., Minor C., Tiong C.L., Gilman M., Osburne M.S., Clardy J., Handelsman J., Goodman R.M., 2000.** Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 66: 2541-2547.
- Rosemberg E. & Ron E.Z., 1999.** High- and low-molecular mass microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol*, 52: 154-162.
- Rotthauwe J.H., Witzel K.P., Liesack W., 1997.** The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol*, 63: 4704-4712.
- Rouse J.D., Sabatini D.A., Suflita J.M., Harwell J.H., 1994.** Influence of surfactant on microbial degradation of organic compounds. *Crit Rev Environ Sci Technol*, 24: 325-370.
- Ruiz-Aguilar G.M.L., Fernández-Sánchez J.M., Rodríguez-Vázquez R., Poggi-Varaldo H., 2002.** Degradation by white-rot fungi of high concentrations of PCB extracted from a contaminated soil. *Adv Environ Res*, 6: 559-568.
- Ruttiman C., Schweber E., Salas L., Cullen D., Vicussã R., 1992.** Lygninolytic enzymes of the white-rot basidiomycete *Phlebia brevispora* and *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biotechnol Appl Biochem*, 16: 64-76.
- Saenger W., 1980.** Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. *Angew Chem Int Ed Engl*, 19: 344-362.
- Safe S., 1990.** Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit Rev Toxicol*, 21: 51-88.

- Sakano Y. & Kerkhof L., 1998.** Assessment of changes in microbial community structure during operation of an ammonia biofilter with molecular tools. *Appl Environ Microbiol*, 64: 4077-4082.
- Salles J.F., De Souza F.A., van Elsas J.D., 2002.** Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. *Appl Environ Microbiol*, 68: 1595-1603.
- Salomon W. & Förstner U., 1984.** Metals in the idrocycle. Springer-Verlag, Berlin.
- Sandaa R.A., Torsvik V., Enger Ø., 2001.** Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil. *Soil Biol Biochem*, 33: 287-295
- Sandaa R.A., Torsvik V., Enger Ø., Daae F.L., Castberg T., Hahn D., 1999.** Analysis of bacterial communities in heavy metal contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiol Ecol*, 30: 237-251
- Sanseverino J., Applegate B.M., King J.M.H., Sayer G.S., 1993.** Plasmid-mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene and anthracene. *Appl Environ Microbiol*, 59: 1931-1937.
- Šašek V., Volfová O., Erbanová P., Vyas B.R.M., Matucha M., 1993.** Degradation of PCBs by *white-rot* fungi, methylotrophic and hydrocarbon utilizing yeasts and bacteria. *Biotechnol Lett*, 15: 521-526.
- Saxena A. & Bartha R., 1983.** Modeling of covalent attachment of chloroaniline residues to quinoidal sites of soil humus. *Bull Environ Contam Toxicol*, 30: 485-491.
- Scheibner K. & Hofrichter M., 1998.** Conversion of aminonitrotoluenes by fungal manganese peroxidase. *J Basic Microbiol*, 38: 63-71.
- Schell M.A. & Wender P.E., 1986.** Identification of the *nahR* gene product and nucleotide sequences required for its activation of the sal operon. *J Bacteriol*, 166: 9-14.
- Schmalenberger A. & Tebbe C.C., 2003.** Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small unit rRNA genes in ecological studies. *Mol Ecol*, 12: 251-262.
- Schramm A., Larsen L.H., Revsbech N.P., Ramsing N.B., Amann R., Schleifer K.H., 1996.** Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl Environ Microbiol*, 62: 4641-4650.
- Schüßler A., Schwarzott D., Walker C. 2001.** A new phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycol Res*, 105: 1413-1421.

- Schwieger F. & Tebbe C.C., 2000.** Effect of field inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the composition of bacterial communities in rhizospheres of a target plant (*Medicago sativa*) and a non-target plant (*Chenopodium album*) linking of 16S rRNA gene-based single-strand conformation polymorphism community profiles to the diversity of cultivated bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 66: 3556-3565.
- Sedar C.M. & Gibson D.T., 1989.** Isolation and characterization of altered plasmids in mutant strains of *Pseudomonas putida* NCIB9816. *Biochem Biophys Res Commun*, 164: 764-771-
- Sei K., Asano K., Tateishi N., Mori K., Ike M., Fujita M., 1999.** Design of PCR primers and gene probes for the general detection of bacterial populations capable of degrading aromatic compounds via catechol cleavage pathways. *J Biosci Bioeng*, 88: 542-550.
- Sei K., Inoue D., Wada K., Mori K., Ike M., Kohno T., Fujita M., 2004.** Monitoring behaviour of catabolic genes and change of microbial community structures in seawater microcosms during aromatic compound degradation. *Water Research*, 38: 4405-4414.
- Sequerra J., Marmeisse R., Valla G., Normand P., Capellano A., Moiroud A., 1997.** Taxonomic position and intraspecific variability of the nodule forming *Penicillium nodositatum* inferred from RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer and random amplified polymorphic DNA. *Mycol Res*, 101: 465-472.
- Shi Y., Zwolinski M.D., Schreiber M.E., Bahr J.M., Sewell G.W., Hickey W.J., 1999.** Molecular analysis of microbial community structures in pristine and contaminated aquifers: field and laboratory microcosm experiments. *Appl Environ Microbiol*, 65: 2143-2150.
- Shimizu T., Ohshima S., Ohtani K., Hoshino K., Honjo K., Hayashi H., 2001.** Sequence heterogeneity of the ten rRNA operons in *Clostridium perfringens*. *Syst Appl Microbiol*, 24:149-156.
- Shneeega I., Hofrichter M., Scheinbener K., Frische W., 1997.** Purification of the main manganese peroxidase isoenzyme MnP₂ from the *white-rot* fungus *Nematoloma frowardii* b19. *Appl Microbiol Biotechnol*, 48: 602-605.
- Shoemaker H.E., Harvey P.J., Bowen R.M., Palmer J.M., 1985.** On the mechanism of enzymatic lignin breakdown. *FEBS Lett*, 187: 7-12.
- Sigler W.V. & Zeyer J., 2002.** Microbial diversity and activity along the forefields of two receding glaciers. *Microb Ecol*, 43: 397-407.
- Simon M.J., Osslund T.D., Saunders R., Ensley B.D., Suggs S., Harcourt A., Sues W., Cruden D.L., Gibson D.T., Zylstra G.J., 1993.** Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strain G7 and NCIB9816-4. *Gene*, 176, 31-37.

- Sims R.C. & Overcash M.R., 1983.** Fate of polynuclear aromatic compounds in soil-plant systems. *Res Rev*, 88: 1-68.
- Singleton D.R., Furlong M.R., Rathbun S.L., Whitman W.B., 2001.** Quantitative comparison of 16S rRNA gen sequence libraries from environmental samples. *Appl Environ Microbiol*, 67: 4374-4376.
- Singleton D.R., Sangaiah R., Gold A., Ball L.M., Aitken M.D., 2006.** Identification and quantification of uncultivated Proteobacteria associated with pyrene degradation in a bioreactor treating PAH-contaminated soil. *Environ Microbiol*, 8:1736-1745.
- Slomczynski D., Nakas J., Tanenbaum W., 1995.** Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea*. *Appl Environ Microbiol*, 61:907-912.
- Smalla K., Cresswell N., Mendonca-Hagler L.C., Wolters A., van Elsas J.D., 1993.** Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *J Appl Bacteriol*, 74: 78-85.
- Smit E., Leeflang P., Glandorf B., van Elsas J.D., Wernars K., 1999.** Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 65: 2614-2621.
- Smith C.J., Nedwell D.B., Dong L.F., Osborn A.M., 2006.** Evaluation of quantitative polymerase chain reaction based approaches for determining gene copy and gene transcript numbers in environmental samples. *Environ Microbiol*, 5: 804-815.
- Smith M.R., 1994.** The physiology of aromatic hydrocarbon degrading bacteria. In *Biochemistry of microbial degradation* (ed. C. Ratledge) Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 374-378.
- Snaird J., Amann R., Huber I., Ludwig W., Schleifer K.H., 1997.** Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol*, 63, 2884-2896.
- Spiker J.K., Crawford D.L., Crawford R.L., 1992.** Influence of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) concentration on the degradation of TNT in explosive-contaminated soils by the *white-rot* fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, 58: 3199-3202.
- Steffen K.T., Schubert S., Tuomela M., Hatakka A., Hofrichter M., 2007.** Enhancement of bioconversion of high-molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated non-sterile soil by litter-decomposing fungi. *Biodegradation*, 18: 359-369.
- Stenuit B., Eyers L., el Fantroussi S., Agathos S.N., 2005.** Promising strategies for the mineralisation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 4:39-60.
- Stevenson F.J., 1984.** Humus chemistry. Genesis, composition, reaction. Wiley, New York Chichester Brisbane.
- Stubner S. & Meuser K., 2000.** Detection of *Desulfotomaculum* in an Italian rice paddy soil by 16S ribosomal nucleic acid analyses. *Microbiol Ecol*, 34: 73-80.

- Sylvestre M. & Sandossi M., 1994.** Selection of enhanced PCB-degrading bacterial strains for bioremediation: consideration of branching pathways. In: Chaudhry GR, editor. Biological degradation and remediation of toxic chemicals. New York: Chapman and Hall; 1994.
- Sylvestre M., Masse R., Ayotte C., Messier F., Fauteux J., 1985.** Total biodegradation of 4-chlorobiphenyl (4-Cb) by a 2-membered bacterial culture. Appl Microbiol Biotechnol, 21: 192-195.
- Takagi S., Shirota C. Sakagushi K., Suzukia J., Suea T., Nagasakac H., Hisamatsua S., Sonokia S., 2007.** Exoenzymes of *Trametes versicolor* can metabolize coplanar PCB congeners and hydroxy PCB. Chemosphere, 67: S54-S57.
- Takai K. & Horikoshi K., 2000.** Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. Appl Environ Microbiol, 66: 5066-5072.
- Takeda H., Yamada A., Miyauchi K., Masai E., Fukuda M., 2004.** Characterization of transcriptional regulatory genes for biphenyl degradation in *Rhodococcus* sp. strain RHA1. J Bacteriol, 186: 2134-2146.
- Tchelet R., Meckenstock R., Steinle P., van der Meer J.R., 1998.** Population dynamics of an introduced bacterium degrading chlorinated benzenes in a soil column and in sewage sludge. Biodegradation, 10: 113-125.
- Tebbe C.C. & Vahjen W., 1993.** Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast. Appl Environ Microbiol, 59: 2657-2665.
- Theron J. & Cloete T.E., 2000.** Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. Crit Rev Microbiol, 26: 37-57.
- Thurston C.F., 1994.** The structure and function of fungal laccases. Microbiol, 140: 19-26.
- Tiedje J.M., Asuming-Brempong S., Nusslein K., Marsh T.L., Flynn S.J., 1991.** Opening the black box of soil microbial diversity. Appl Soil Ecol, 13: 109-122.
- Tien M. & Kirk T.K., 1984.** Lignin degrading enzymes from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. Proc Natl Acad Sci USA, 81: 2280-2286.
- Tornberg K., Baath E., Olsson S., 2003.** Fungal growth and effects of different wood decomposing fungi on the indigenous bacterial community of polluted and unpolluted soils. Biol Fert Soils, 37: 190-197.
- Torsvik V., Daae F.L., Sandaa R.A., Ovreas L., 1998.** Review article: novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. J Biotechnol, 64, 53-62.

- Trevors J.T., 1984.** Dehydrogenase in soil: a comparison between the INT and TTC assay. *Soil Biol Biochem*, 16: 673-674.
- Trevors J.T., 1996.** Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *J Microbiol Methods*, 26: 53-59.
- Tripathi A.K., Verma S.C., Ron E.Z. 2002.** Molecular characterization of a salt-tolerant bacterial community in the rice rhizosphere. *Res Microbiol*, 153: 579-584.
- Tsai Y.L. & Olson B.H., 1991.** Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl Environ Microbiol*, 57: 1070-1074.
- Tucker B., Radtke C., Kwon S.I., Anderson A.J., 1995.** Suppression of bioremediation by *Phanerochaete chrysosporium* by soil factors. *J Hazard Mater*, 41: 251-265.
- Tuor U., Winterhalter K., Fiechter A., 1995.** Enzyme of *white-rot* fungi involved in lignin degradation and ecological determination in wood decay. *J Biotechnol*, 41: 1-7.
- Urum K., Pekdemir T., Gopur M., 2003.** Optimum conditions for washing of crude oil-contaminated soil with biosurfactant solutions. *Process Safety and Environmental Protection: Transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part B* 81(3), 203–209.
- Vainio E.J. & Hantula J., 2000.** Direct analysis of wood inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol Res*, 104: 927-936.
- Valitutti G., Fornari G., Gando M.T., 1989.** *Chimica organica biochimica e laboratorio*: 89-97, 104-107, 171., Masson S.P.A, Milano.
- Van Dort H.M., Smullen L.A., May R.J., Bedard D.L., 1997.** Priming microbial meta-dechlorination of polychlorinated biphenyls that have persisted in Housatonic River sediments for decades. *Environ Sci Technol*, 31: 3300-3307.
- Vasilyeva G.K. & Strijakova E.R., 2007.** Bioremediation of soil and sediment contaminated by polychlorobiphenyls. *Microbiol*, 76: 639-653.
- Verstraete W. & Devliegher W., 1996.** Formation of non-available organic residues in soil: perspectives for site remediation. *Biodegradation*, 7: 471-485.
- Viaud M., Pasquier A., Brygoo Y., 2000.** Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS. *Mycol Res*, 104: 1027-1032.
- Viney I. & Bewley R.J., 1990.** Preliminary studies on the development of a microbial treatment for polychlorinated biphenyls. *Archive Environ Contamin Toxicol*, 19: 789-796.
- Vyas B.R.M., Bakowski S., Šašek V., Matucha M., 1994.** Degradation of anthracene by selected white- rot fungi. *FEMS Microbiol Ecol*, 14: 61-70.

- Volkering F., Breure A.M., Rulkens W.H., 1998.** Microbial aspect of surfactant use for biological soil remediation. *Biotechnol*, 36: 548-552.
- Volkering F., Breure A.M., van Andel G., Rulkens W.H., 1995.** Influence of non-ionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol*, 61: 1699-1705.
- Voordouw G., 1998.** Reverse sample genome probing of microbial community dynamics. *ASM News*, 64: 627-633.
- Vora G.J., Meador C.E., Stenger D.A., Andreadis J.D., 2004.** Nucleic acid amplification strategies for DNA microarray-based pathogen detection. *Appl Environ Microbiol*, 70: 3047-3054.
- Vos J.G. & Beems R.B., 1971.** Dermal toxicity studies of technical polychlorinated biphenyls and fractions thereof in rabbits. *Toxicol Appl Pharmacol*, 19: 617-633.
- Vrdoljak G., Feil W.S., Feil H., Detter J.C., Fields P., 2005.** Characterization of a diesel sludge microbial consortia for bioremediation. *Scanning*, 27: 8-14.
- Waarishi H., Valli K., Gold M.H., 1992.** Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biol Chem*, 267:23683-23695.
- Wagner M., Amann R.I., Lemmer H., Schleifer K.H., 1993.** Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl Environ Microbiol*, 59: 1520-1525.
- Wang X. & Brusseau M.L., 1993.** Solubilization of some low-polarity organic compounds by hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Environ Sci Technol*, 27: 2821-2825.
- Watanabe K., Kodama Y., Syutsubo K., Harayama S., 2000.** Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities. *Appl Environ Microbiol*, 66: 4803-4809.
- Watanabe T., Fujihara H., Furukawa K., 2003.** Characterization of the second LysR-type regulator in the biphenyl-catabolic gene cluster of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J Bacteriol*, 185: 3575-3582.
- Watanabe T., Inoue R., Kimura N., Furukawa K., 2000.** Versatile transcription of biphenyl catabolic *bph* operon in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J Biol Chem*, 275:31016-31023.
- Weissenfiels W.D., Klewer H.S., Langhoff J., 1992.** Adsorption of PAHs by soil particles: influence of biodegradability and biotoxicity. *Appl Microb Biotechnol*, 36: 689-696.
- West C.C. & Harwell J.H., 1992.** Surfactant and subsurface remediation. *Environ Sci Technol*, 26: 2324-2330.

- White D.C., Bobbie R.J., King J.D., Nickels J., Amoe P., 1979.** Lipid analysis of sediments for microbial biomass and community structure. In: Litchfield, .D., Seyfried, P.L. (Eds.), *Methodology for Biomass Determinations and Microbial Activities in Sediments*. American Society for Testing and Materials, STP 673, Philadelphia, USA, pp. 87-103.
- White T.J., Bruns T.D., Lee S., Taylor J., 1990.** Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. In *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. (eds). New York: Academic Press, 315-322.
- Widmer F., Shaffer B.T., Porteous L.A., Seidler R.J., 1999.** Analysis of nifH gene pool complexity in soil and litter at a Douglas Fir forest site in the Oregon cascade mountain range. *Appl Environ Microbiol*, 65: 374-380.
- Wiegel J. & Wu Q.Z., 2000.** Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls. *FEMS Microbiol Ecol*, 32: 1-15.
- Wilkinson D.E., Jeanicke T., Cowan D.A., 2002.** Efficient molecular cloning of environmental DNA from geothermal sediments. *Biotechnol Lett*, 24: 155-161.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V., 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 18: 6531-6535.
- Williams W.A., 1994.** Microbial reductive dechlorination of trichlorobiphenyls in anaerobic sediment slurries. *Environ Sci Technol*, 28: 630-635.
- Wilson J.W., Ramamurthy R., Porwollik S., McClelland M., Hammond T., Allen P., 2002.** Microarray analysis identifies *Salmonella* genes belonging to the low-shear modeled microgravity regulon. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 13807-13812.
- Wilson M.S., Bakermans C., Madsen E.L., 1999.** In situ, real-time catabolic gene expression: extraction and characterization of naphthalene dioxygenase mRNA transcripts from groundwater. *Appl Environ Microbiol*, 65: 80-87.
- Wilson S.C., Jones K.C., 1993.** Bioremediation of soils contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ Pollut*, 88: 229-249.
- Wintzingerode F.V., Gobel U.B., Stackebrandt E., 1997.** Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev*, 21:213-229.
- Withworth D.A., Moo-Young M., Viswanatha T., 1973.** Hydrocarbon fermentations: oxidation mechanism and nonionic surfactant effects in a culture of *Candida lipolitica*. *Biotechnol Bioeng*, 15: 649-656.
- Woods S.L., Trobaugh D.J., Carter K.J., 1999.** Polychlorinated biphenyl reductive dechlorination by vitamin B12: thermodynamics and regiospecificity. *Environ Sci Technol*, 33: 857-863.

- Wu L.Y., Thomson D.K., Li G.S., Hurt R.A., Tiedje J.M., Zhou J.Z., 2001.** Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Appl Environ Microbiol*, 67: 5780-5790.
- Wu Q.Z., Bedard D.L., Wiegel J., 1997.** Effect of incubation temperature on the route of microbial reductive dechlorination of 2,3,4,6-tetrachlorobiphenyl in polychlorinated biphenyl (PCB)-contaminated and PCB-free freshwater sediments. *Appl Environ Microbiol*, 63: 2836-2843.
- Wu Q.Z., Watts J.E.M., Sowers K.R., May H.D., 2002.** Identification of a bacterium that specifically catalyzes the reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls with doubly flanked chlorines. *Appl Environ Microbiol*, 68: 807-812.
- Wu Y., Luo Y., Zou D., Ni J., Liu W., Teng Y., Li Z., 2008.** Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil with *Monilinia* sp.: degradation and microbial community analysis. *Biodegradation*, 19: 247-257.
- WuJ, Ju LK. 1998.** Enhancing enzymatic saccharification of waste newsprint by surfactant addition. *Biotechnol Prog*, 14: 649-652.
- Wurdermann H., Lund N.C., Gudehus G., 1995.** Assessment of a biological in situ remediation. In: Hinchee R.E., Miller R.N. & Johnson P.C. (Eds) *In situ aeration: air sparging, bioventing and related processes*. Battelle Press Columbus, USA, 237-247.
- Xia X., Bollinger J., Ogram A., 1995.** Molecular genetic analysis of the response of three soil microbial communities to the application of 2,4-D. *Mol Ecol*, 4: 17-28.
- Xu F., 1997.** Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccase. *J Biol Chem*, 272: 924-928.
- Yadav J.S., Quensen J.F., Tiedje J.M., Reddy C.A., 1995.** Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclor-1242, Aroclor-1254, and Aroclor-1260) by the *white-rot* fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis. *Appl Environ Microbiol*, 61: 2560-2565.
- Yan T., LaPara T.M., Novak P.J., 2006.** The reductive dechlorination of 2,3,4,5-tetrachlorobiphenyl in three different sediment cultures: evidence for the involvement of phylogenetically similar *Dehalococcoides*-like bacterial populations. *FEMS Microbiol Ecol*, 55: 248-261.
- Yang Y., Chen R.F., Shiaris M.P., 1994.** Metabolism of naphthalene, fluorene and phenanthrene: preliminary characterization of a cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB 9816. *J Bacteriol*, 176: 2158-2164.
- Ye D.Y., Quensen J.F., Tiedje J.M., Boyd S.A., 1992.** Anaerobic dechlorination of polychlorobiphenyls (Aroclor-1242) by pasteurized and ethanol-treated microorganisms from sediments. *Appl Environ Microbiol*, 58: 1110-1114.
- Yoshida H., 1983.** Chemistry of lacquer (Urushi). *J Chem Soc*, 43: 472-486.

- Yost C.K. & Nattress F.M., 2002.** Molecular typing techniques to characterize the development of lactic acid bacteria community on vacuum-packaged beef. *Int J Food Microbiol*, 72: 97-105.
- Youngblood W.W. & Blumer M., 1975.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment: homologous series in soils and recent marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 39: 1303-1314.
- Yu Z. & Morrison M., 2004.** Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 70(8): 4800-4806.
- Zaitseva I., Zaitsev G., Card G., Moshkov K., Box B.B., Ralph A., Lindley P., 1996.** The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1: nature of the copper centres. *J Biotechnol*, 41: 243-248.
- Zelles L., 1997.** Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. *Chemosphere*, 35: 275-294.
- Zelles L., 1999.** Identification of single cultured micro-organisms based on their whole-community fatty acid profiles, using an extended extraction procedure. *Chemosphere*, 39: 665-682.
- Zheng Z.M. & Obbard J.P., 2000.** Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using surfactant and the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J Chem Technol Biotechnol*, 75: 1183-1189.
- Zheng Z.M. & Obbard J.P., 2001.** Effect of non-ionic surfactants on elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil-slurry by *Phanerochaete chrysosporium*. *J Chem Technol Biotechnol*, 76:423-429.
- Zhan H. & Park E., 2002.** Vapor flow to horizontal wells in unsaturated zones. *Soil Sci Society America J*, 66: 710-721.
- Zhang T. & Fang H.H.P., 2005.** 16S rDNA clone library screening of environmental samples using melting curve analysis. *J Chin Inst Chem Eng*, 28: 1153-1155.
- Zhang K., Hua X.F., Han H.L., Wang J., Miao C.C., Xu Y.Y., Huang Z.D., Zhang H., Yang J.M., Jin W.B., Liu Y.M., Liu Z., 2008.** Enhanced bioaugmentation of petroleum- and salt-contaminated soil using wheat straw. *Chemosphere*, 73: 1387-1392.
- Ziegenhagen D. & Hofrichter M., 2000.** A simple and rapid method to gain high amounts of manganese peroxidase with immobilized mycelium of the agaric *white-rot* fungus *Clitocybula dusenii*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53: 553-557.

APPENDICE

1. Lavori pubblicati su riviste scientifiche internazionali:

Federici E., Leonardi V., Giubilei M.A., Quarantino D., Spaccapelo R., D'Annibale A., Petruccioli M., 2007. Addition of allochthonous fungi to a historically contaminated soil affects both remediation efficiency and bacterial diversity. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:203–211.

Leonardi V., Šašek V., Novotný C., Federici E., Giubilei M.A., Petruccioli M., D'Annibale A., 2008. Mobilizing agents enhance fungal degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and strongly affect diversity of indigenous bacteria in soil. *Biotechnol Bioeng* 101: 273-285.

2. Lavori sottomessi:

Giubilei M.A., Leonardi V., Federici E., Šašek V., Novotný C., Federici F., D'Annibale A., Petruccioli M. Effect of mobilizing agents on mycoremediation and impact on the indigenous microflora. *J Chem Technol Biotechnol*.

3. Manoscritti in preparazione:

Giubilei M.A., Federici E., Leonardi V., Federici F., D'Annibale A., Petruccioli M. *Panus tigrinus* bioaugmentation of a hystorically contaminated soil enhances bioremediation and affects bacterial community structure and function.

Federici E., Giubilei M.A., Trotta F., Caldini G. and Cenci G. DGGE fingerprinting of the microbial biodiversity in natural mineral water.

Sampedro I., Giubilei M.A., Federici E., Petruccioli M., D'Annibale A., Federici F. Impact of incorporation of dry olive mill residue on composition and activity of soil microflora.

4. Poster e comunicazioni a convegni:

Leonardi V., Federici E., Giubilei A.M., Crisanti A., D'Annibale A. e Petruccioli M. Soil mycoremediation by *Botryosphaera rhodina* and possible interactions with indigenous microflora. Convegno Nazionale Società Italiana di Microbiologia Generale e Biotecnologie Microbiche. 8-10 Giugno 2006, Orvieto (TR), p98

Leonardi V., Federici E., Giubilei A.M., Crisanti A., D'Annibale A. e Petruccioli M. Interactions between autochthonous microflora and exogenously added *Botryosphaera rhodina* during soil reclamation. 75th Meeting of the Society for Applied Microbiology, 3-6 July 2006, Edinburgh, UK, p31

Federici E., Venanzi A., Giubilei M.A., Spaccapelo R., Crisanti A. Sviluppo e Validazione di Microarrays ad Oligonucleotidi per l'Identificazione di Specie Batteriche in Campioni Clinici ed Ambientali. Bertinoro Meeting di Microbiologia Ambientale, Bertinoro di Romagna (FO), 18-19 Maggio 2007.

Giubilei M.A., Federici E., Leonardi V., D'Annibale A., Petruccioli M. Mycoremediation of an Historically Contaminated Soil and Interactions with the Indigenous Microflora. Bertinoro Meeting di Microbiologia Ambientale, Bertinoro di Romagna (FO), 18-19 Maggio 2007.

Federici E., Giubilei M.A., Trotta F., Caldini G. and Cenci G. DGGE fingerprinting of the microbial biodiversity in natural mineral water. Proceedings of FISV 2007, Riva del Garda (Italy). 2007b. p. 08.06.

Federici E., Giubilei M.A., D'Annibale A., Cenci G., Petruccioli M. Real-Time PCR as a valuable tool for bench-scale and field-scale evaluation of catabolic genes.

Giubilei M.A., Federici E., Federici F., D'Annibale A., Petruccioli M. Effetti del Biotrattamento con *Panus tigrinus* CBS 577.79 su Struttura e Funzione della Comunità Batterica di un Suolo Storicamente Contaminato. Bertinoro Meeting di Microbiologia Ambientale, Bertinoro di Romagna (FO), 23-24 Maggio 2008, p. 12

Giubilei M.A., Federici E., Leonardi V., Federici F., D'Annibale A., Petruccioli M. *Panus tigrinus* Bioaugmentation of a Historically Contaminated Soil Enhances Bioremediation and Affects Bacterial Community Structure and Function. IV European BioRemediation Conference 3-6 Settembre 2008, Chania (Creta-Gracia). Book of Abstract p. 39.

Leonardi V., Giubilei M.A., Federici E., Šašek V., Novotný C., D'Annibale A., Petruccioli M. Effect of mobilizing agents on mycoremediation and impact on indigenous microflora. IV European BioRemediation Conference 3-6 Settembre 2008, Chania (Creta-Gracia). Book of Abstract p. 132.

E. Federici, A. Magini, L. Urbanelli, M. A. Giubilei, E. Fiordi, B. Tancini, G. Cenci, C. Emiliani. Metagenomic and Metaproteomic Characterization of Enrichment Cultures on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.

RINGRAZIAMENTI

Giunta ormai al termine vorrei ringraziare il Prof. Federico Federici ed il Prof. Maurizio Petruccioli che hanno sempre dato un grande supporto, al mio lavoro, in tutti questi anni.

Un ringraziamento particolare va inoltre al Dott. Ermanno Federici ed al Dott. Alessandro D'Annibale che hanno saputo guidarmi, dal punto di vista scientifico in modo più che adeguato, durante tutto il mio percorso.

Ringrazio inoltre, il Prof. Andrea Crisanti per avermi ospitato in questi tre anni presso i suoi laboratori dandomi la possibilità di svolgere al meglio le mie attività di ricerca.

Ed infine, non possono non includere tutte le persone che in qualche modo hanno saputo offrirmi sempre validi consigli e, soprattutto grandi dimostrazioni di amicizia.