

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE
XX CICLO

UNIVERSITÀ CONSORZiate DI PARMA E DELL'INSUBRIA
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELL'INSUBRIA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA STRUTTURALE E FUNZIONALE

**ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI BATTERI CAPACI DI
DEGRADARE COMPOSTI INQUINANTI E LORO IMPIEGO IN
SISTEMI BIOSLURRY**

Dottoranda
VALENTINA MASSA

COORDINATORE

Chiar.mo Prof. Nelson Marmioli

TUTOR

Chiar.ma Prof.ssa Paola Barbieri

ANNO ACCADEMICO 2006/2007

INDICE

	RIASSUNTO	4
1	INTRODUZIONE	6
1.1	Destino ambientale di composti aromatici	7
1.2	Degradazione dei composti aromatici	9
1.2.1	Gli IPA	10
1.2.2	Metabolismo batterico del naftalene, fenantrene e antracene	11
1.3	Geni catabolici di batteri degradanti gli IPA	13
1.3.1	Geni nah di ceppi di <i>Pseudomonas</i>	13
1.3.2	Geni per il catabolismo degli IPA in <i>Sphingomonas</i> e specie affini	15
1.3.3	Geni catabolici per la degradazione degli IPA in batteri Gram positivi	16
1.4	Degradazione dei cloro aromatici	17
1.4.1	Meccanismi di dealogenazione	18
1.4.2	Gli acidi clorobenzoici (CBA)	20
1.4.3	I geni che codificano per dealogenasi idrolitiche	24
1.5	Le potenzialità dei microrganismi geneticamente modificati nelle biotecnologie ambientali	25
2	MATERIALI E METODI	29
2.1	Condizioni colturali, ceppi batterici e plasmidi	30
2.2	Analisi dei metaboliti	32
2.2.1	High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC)	32
2.2.2	Determinazione della concentrazione dei cloruri	32
2.2.3	Analisi qualitativa dell'attività dealogenasica mediante saggio colorimetrico su piastra	33
2.3	Tecniche molecolari di base	33
2.4	Bioslurry	34
2.4.1	Preparazione dello slurry	34
2.4.2	Preparazione del campione	35
2.5	Ibridazione fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	35
2.5.1	Preparazione dei vetrini (gelatinatura)	36
2.5.2	Fissaggio dei campioni	36
2.5.3	Ibridazione	36
3	RISULTATI E DISCUSSIONE	38
3.1	Isolamento e identificazione di ceppi batterici capaci di crescere su IPA e cloroaromatici	39
3.1.1	Analisi filogenetica: sequenziamento 16S rDNA	40
3.2	Iniziale caratterizzazione dei ceppi batterici isolati su IPA	41
3.2.1	Test indolo e catecolo	44
3.2.2	Approccio preliminare per l'identificazione di ossigenasi periferiche	45
3.3	Caratterizzazione dell'isolato su acido 4-clorobenzoico	47

3.3.1	Identificazione e sequenziamento dei geni <i>fc</i> in <i>Arthrobacter</i> sp. FG1	49
3.3.2	Amplificazione delle sequenze omologhe ai geni <i>fc</i>	50
3.3.3	Sequenza ed analisi funzionale delle sequenze clonate in <i>E.coli</i>	51
3.3.4	Sequenziamento	51
3.3.5	Analisi funzionale delle sequenze clonate in <i>E. coli</i>	53
3.4	Costruzione di un ceppo ingegnerizzato e studio delle sue potenzialità nel risanamento di suoli contaminati	55
3.4.1	Clonaggio dei geni <i>fc</i> in <i>Pseudomonas putida</i> PaW340	55
3.4.2	Efficienza nella degradazione del 4-CBA da parte di <i>Arthrobacter</i> sp. FG1 e <i>P. putida</i> PaW340/pDH5	56
3.4.3	Interazione <i>Arthrobacter</i> sp. FG1- <i>P. putida</i> PaW340 nella degradazione del 4-CBA	59
3.4.4	Esperimenti preliminari per l'utilizzo della FISH	61
4	CONCLUSIONI	65
4.1	Isolamento e identificazione di microrganismi	66
4.2	Biochimica e genetica della degradazione dell'acido 4-clorobenzoico	68
4.3	Applicazione di microrganismi in studi di biorisanamento: prospettive	71
5	BIBLIOGRAFIA	75
	ALLEGATI	85

RIASSUNTO

Il progetto di dottorato di cui mi sono occupata prevedeva l'isolamento e la caratterizzazione di nuovi batteri di interesse ambientale. Da campioni di suolo proveniente da un'area industriale sono stati isolati diversi ceppi batterici capaci di crescere a spese di fenantrene o naftalene e uno capace di degradare l'acido 4-cloro-benzoico (4-CBA). Tutti i ceppi sono stati identificati e sottoposti ad un'indagine preliminare per individuare attività di interesse. Poiché la selezione del ceppo degradante il 4-CBA (*Arthrobacter* sp. FG1) è stata notevolmente più semplice e rapida di quella dei ceppi utilizzatori di idrocarburi aromatici policiclici, le successive indagini si sono concentrate su questo isolato. La via catabolica per il 4-CBA di *Arthrobacter* sp. FG1 è stata studiata e caratterizzata sia da un punto di vista biochimico che genetico, rendendo possibile la costruzione di ceppi ingegnerizzati. Infine, sono state allestite delle prove in bioslurry per paragonare l'efficienza di degradazione del 4-CBA da parte di *Arthrobacter* FG1 e dei ceppi ricombinanti ottenuti in un contesto più simile a una reale applicazione di biorisanamento di suolo contaminato.

INTRODUZIONE

1.1 Destino ambientale di composti aromatici

Lo smaltimento di composti organici di natura aromatica, sia esistenti in natura sia prodotti dall'uomo, è una problematica di interesse globale che coinvolge diversi aspetti: da quello ecologico a quello economico e politico.

L'industria chimica, con la produzione di polimeri, di combustibili, di solventi, di pesticidi e di farmaci, ha rilasciato, e continua a rilasciare nell'ambiente, enormi quantità di xenobiotici (estranei alla biosfera) cioè di composti di sintesi con struttura diversa da quella di molecole di origine naturale. In senso lato il termine può essere utilizzato anche per quei composti che, sebbene di origine naturale, normalmente non sono presenti in quantità apprezzabili nella biosfera, come, ad esempio, il petrolio.

I composti aromatici si accumulano spesso nei diversi comparti ambientali ed entrano nelle catene alimentari. Poiché queste molecole sono liposolubili si concentrano all'interno dei comparti lipidici (sono state ritrovate, ad esempio, in molluschi, pesci e in uova di uccelli) e da qui possono essere trasferite, all'interno della catena alimentare, da un livello trofico ad un altro concentrandosi ulteriormente e rappresentando un possibile pericolo per tutte le forme di vita, uomo incluso, soprattutto considerando che possono avere effetti carcinogeni e teratogeni (Allpress *et al*, 1998). Molti composti aromatici e alo-aromatici manifestano i loro effetti dannosi sull'uomo influenzandone il sistema ormonale, anche a piccole dosi. Per esempio i fenoli, alcuni PCB e congeneri del DDT, possono mimare gli estrogeni (Toppari *et al*, 1996) mentre i PBDEs (composti polibrominati) e i loro metaboliti hanno mostrato avere la capacità di alterare il sistema endocrino (Meerts *et al*, 2001; Van den Berg, 1990). Il benzene è un noto carcinogeno così come toluene e xylene (Lyngé *et al*, 1997) e diversi idrocarburi aromatici policiclici, IPA, (fenantrene, benzopirene e benzoantracene) (Samanta *et al*, 2002). È fondamentale, quindi, per la salvaguardia dell'ambiente e della salute umana, che i composti aromatici non si accumulino, ma che vengano degradati e possano così rientrare nei cicli della materia.

I composti aromatici e in particolare gli IPA si trovano di solito associati a contaminazioni dovute a versamenti di petrolio, nei suoli di vecchie stazioni di servizio e nei luoghi un tempo usati per la conservazione del legno trattato con impregnanti; la formazione degli IPA avviene nel corso di combustioni incomplete di composti organici come il carbone, il petrolio, il gas o i rifiuti urbani; molti vengono utilizzati a fini di ricerca e alcuni vengono sintetizzati artificialmente; in alcuni casi vengono impiegati per la sintesi di coloranti, plastiche, pesticidi e medicinali. Il destino di tali composti nell'ambiente dipende sia da fattori biotici che

abiotici, inclusa la volatilizzazione, la fotoossidazione, l'assorbimento a particelle di suolo, il bioaccumulo, l'ossidazione chimica e la biotrasformazione (Jong-Su Seo *et al*, 2007).

Il contributo della componente biotica dell'ecosistema alla rimozione di questi inquinanti dall'ambiente è essenzialmente costituito dalla biodegradazione degli inquinati stessi effettuata da microrganismi prevalentemente procarioti. I processi biodegradativi però, possono essere resi difficoltosi da una molteplicità di fattori fisico-chimici che influenzano l'attività batterica, come il pH dell'ambiente in cui avviene la reazione, la disponibilità di ossigeno molecolare, la temperatura, la presenza di altri nutrienti o l'accessibilità dei substrati dovuta, per esempio, alla loro solubilità.

Oltre ai fattori chimico-fisici importante è anche l'incapacità della maggior parte dei microrganismi presenti in natura di metabolizzare alcuni tipi di inquinanti perché non riconosciuti dai loro sistemi enzimatici (Van der Meer, 1992). Infatti, mentre gli idrocarburi aromatici monociclici sono riconosciuti e degradati da una molteplicità di microrganismi, dato che sono normalmente presenti nell'ambiente come risultato del "riciclo" di materiale derivante dalle piante, composti xenobiotici come i cloroaromatici, come pure diversi composti di origine naturale, ma particolarmente complessi come molti IPA, sono spesso recalcitranti alla biodegradazione, sia perché sono entrati in contatto con i microrganismi solo da un centinaio di anni, un periodo di tempo troppo breve per permettere l'evoluzione delle vie metaboliche atte a degradarli (Diaz E., 2004), sia per la complessità strutturale della molecola.

Fortunatamente, però, non sempre lo spettro dei substrati degli enzimi batterici risulta così ristretto, a volte infatti enzimi evolutisi per la trasformazione di determinati substrati sono dotati di una specificità di substrato sufficientemente rilassata da permettere loro di processare anche composti strutturalmente non correlati al loro substrato naturale (co-metabolismo), e pertanto possono fornire un contributo importante se non alla mineralizzazione quantomeno alla parziale degradazione di vari tipi di inquinanti organici. Per esempio l'enzima ammonio monoossigenasi, responsabile della prima reazione dell'ossidazione dell'ammonio in *Nitrosomonas europaea*, è in grado di riconoscere, come substrati, diversi alogenati alifatici e aromatici, molti dei quali sono inquinanti ambientali. Arp ha identificato ben 30 noti inquinanti ambientali trasformati dall'ammonio monoossigenasi, incluso il tricloroetilene (TCE), il cloro benzene (CB), il cloro vinile (VC) e il dibromocloropropano (Arp J., 2003).

Lo studio delle vie biochimiche microbiche attraverso le quali gli inquinanti aromatici vengono mineralizzati e dei geni che per esse codificano può quindi fornire un importante contributo allo sviluppo delle tecnologie volte al risanamento di ambienti contaminati.

1.2 Degradazione dei composti aromatici

Nel catabolismo aerobico di composti aromatici, la maggior parte delle vie converge verso un piccolo numero di intermedi che ha due gruppi idrossilici o su due carboni adiacenti o su due carboni opposti dell'anello aromatico. Il naftalene, il toluene, il benzene, il benzoato, per esempio, sono tutti trasformati in catecolo, un possibile substrato per enzimi che aprono l'anello aromatico. Il taglio dell'anello è un passaggio obbligatorio per la mineralizzazione aerobica di composti aromatici ed è quasi sempre eseguito da diossigenasi che incorporano due atomi di ossigeno nei substrati. Le reazioni iniziali delle vie cataboliche che incanalano composti aromatici strutturalmente differenti verso la formazione di un intermedio lineare, consistono, o comunque comprendono, l'addizione di uno o due gruppi idrossilici all'anello aromatico. Un tipo di idrossilazione è catalizzata da diossigenasi che incorporano due atomi di ossigeno molecolare a produrre un *cis*-diolo; alternativamente, una o, in alcuni casi, due reazioni sono catalizzate da monossigenasi che aggiungono un singolo gruppo idrossilico all'anello aromatico. In diversi casi, eventuali sostituenti presenti sull'anello aromatico possono venire processati durante le reazioni iniziali; i sostituenti alchilici, per esempio, sono in molti casi ossidati prima dell'ossidazione dell'anello aromatico. Le vie cataboliche di composti aromatici vengono suddivise in diversi segmenti funzionali: 1) eventuale processamento di gruppi sostituenti; 2) trasformazione del substrato aromatico in intermedi diidrossilati; 3) apertura dell'anello e 4) entrata dei prodotti nel ciclo di Krebs (Harayama and Timmis) (Fig. 1.1)

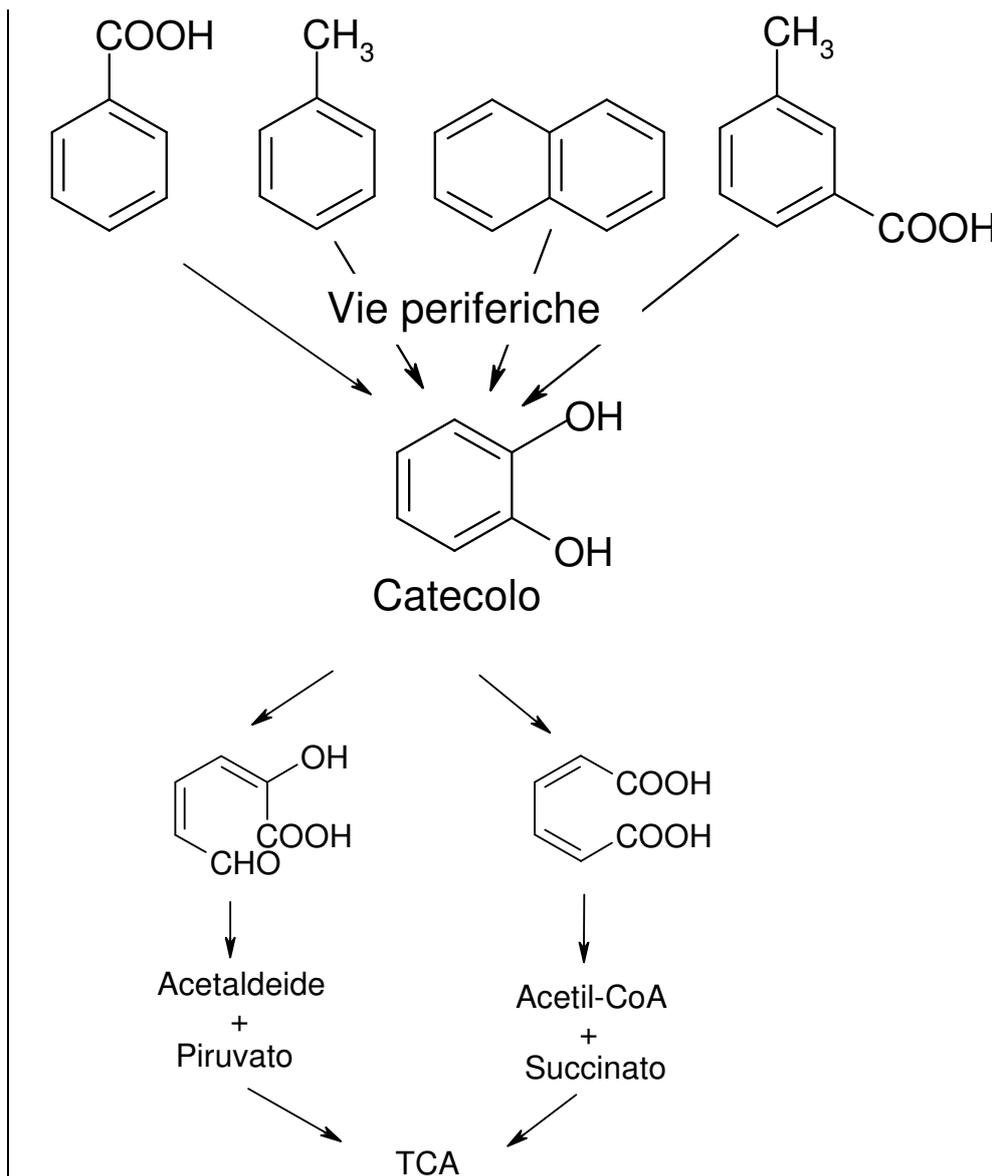


Fig. 1.1 Schema generale per la degradazione degli idrocarburi aromatici

1.2.1 Gli IPA

Gli IPA sono composti piuttosto recalcitranti alla biodegradazione e pertanto tendono a persistere per lungo tempo nell'ambiente. Sulla base della loro abbondanza e tossicità, l'EPA (Environmental Protection Agency, U.S.) ha indicato 16 IPA come maggiori inquinanti (Habe H., 2003), tra questi sono presenti il naftalene, l'antracene, il fenantrene e il fluorene spesso utilizzati come molecole modello per gli studi di biodegradazione.

Oltre che alle capacità degradative dei microrganismi e ai parametri ambientali che le influenzano, la persistenza degli IPA è dovuta anche alle loro caratteristiche molecolari che determinano una scarsa biodisponibilità. A causa del loro alto peso molecolare e della loro idrofobicità, la solubilità in acqua della maggior parte degli IPA è infatti dell'ordine delle

parti per milione e la loro biodisponibilità diminuisce quasi logaritmicamente con l'aumentare della massa molecolare (Johnsen A. *et al.*, 2005). Tale problema si riflette sia sugli studi *in vitro* che sulla loro effettiva degradazione nell'ambiente.

Ciò nonostante sono stati isolati diversi microrganismi capaci di degradare tali composti, come, ad esempio, ceppi di *Alcaligenes denitrificans*, *Mycobacterium sp.*, *Pseudomonas putida* e *Streptomyces sp.* capaci di degradare il naftalene o ceppi di *Aeromonas sp.*, *Alcaligenes faecalis*, *Arthobacter polychromogenes* e *Micrococcus sp.* capaci di degradare il fenantrene (Samanta S.K. *et al.*, 2002). La degradazione può avvenire sia attraverso processi metabolici che co-metabolici dai quali il microrganismo non ricava né energia né fonti di carbonio. Quest'ultimo processo pare essere particolarmente importante nella degradazione di miscele di composti aromatici e di IPA ad alto peso molecolare (Habe H. 2003).

Il passaggio iniziale del metabolismo aerobico degli IPA, di solito, avviene tramite l'incorporazione di ossigeno molecolare nel nucleo aromatico, attraverso un sistema enzimatico diossigenasico multicomponente a formare un *cis*-diidrodiole. Questi composti sono riaromatizzati attraverso una *cis*-diolo deidrogenasi a formare un intermedio diidrossilato. Tali substrati diidrossilati possono essere tagliati da diossigenasi *via* o un "ortho-cleavage pathway" o un "meta-cleavage pathway" portando, alla fine, agli intermedi del ciclo degli acidi tricarbossilici (Habe H., 2003).

1.2.2 Metabolismo batterico del naftalene, fenantrene e antracene

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. Nel primo passaggio una molecola di ossigeno è introdotta in posizione 1,2 nell'anello aromatico a formare il *cis*-(1R,2S)-diidrossi-1,2-diidrossinaftalene (*cis*-diidrodiole naftalene) ad opera di una naftalene diossigenasi (NDO) (Fig. 1.2, composto A-II). Questo sistema diossigenasico consiste di tre componenti: una ferredossina reduttasi, una ferredossina e una proteina ferro-zolfo (ISP) composta da due subunità non identiche, α e β . Il trasporto di elettroni comincia dal trasferimento singolo di due elettroni da NAD(P)H a FAD in una ferredossina reduttasi che genera una forma completamente ridotta del FAD. Il FAD ridotto fornisce un elettrone a ogni cluster [2Fe-2S] di una ferredossina. Questi elettroni sono alla fine trasferiti a una ISP e usati nel suo sito attivo per facilitare l'aggiunta di una molecola di ossigeno al naftalene (Fig. 1.3). La specificità della NDO è stata studiata in dettaglio e ne sono state identificate tre strutture tridimensionali. È stato osservato che esiste una conservazione tra le subunità di ISP

appartenenti a naftalene diossigenasi isolate da microrganismi diversi (Habe H., 2003).

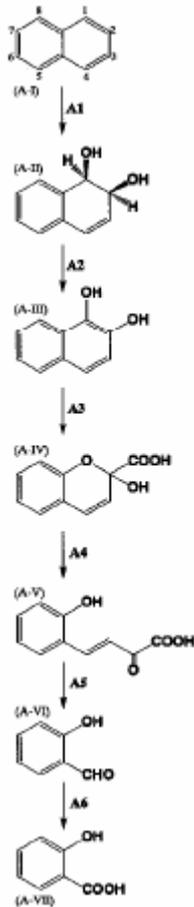


Fig. 1.2 Via periferica per il catabolismo del naftalene

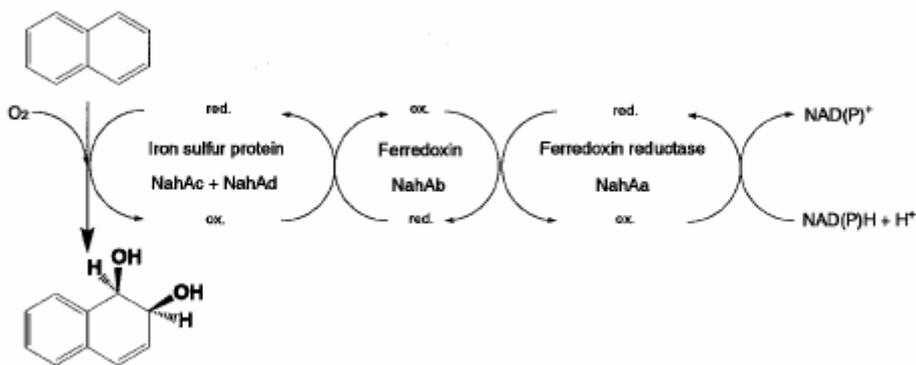


Fig. 1.3 Ossidazione iniziale del naftalene a *cis*-1,2-diidrossi-1,2-diidronaftalene ad opera di una Naftalene Diossigenasi

Il *cis*-diidrodiolo naftalene è quindi deidrogenato a 1,2-diidrossinaftalene (Fig. 1.2 A-III) da una *cis*-naftalene diidrodiolo deidrogenasi ed è poi aperto in posizione *meta* da una 1,2-diidrossinaftalene deidrogenasi; il prodotto risultante dal taglio dell'anello ricicizza

spontaneamente a formare il 2-idrossi-2*H*-cromene-2-carbossilasi (Fig. 1.2, A-IV). Le reazioni enzimatiche catalizzate da una isomerasi e di un'aldolasi-idratasi portano alla produzione di una salicilaldeide (Fig. 1.2, A-VI) che è quindi trasformata in salicilato (Fig. 1.2, A-VII), ulteriormente metabolizzato *via* catecolo o gentisato nel ciclo degli acidi tricarbossilici (Habe H., 2003).

In diversi casi è stato osservato che gli enzimi coinvolti nella conversione del naftalene a salicilato possono convertire il fenantrene e l'antracene, rispettivamente, a 1-idrossi-2-naftoato e a 2-idrossi-3-naftoato attraverso passaggi simili (Fig. 1.4, A e B)

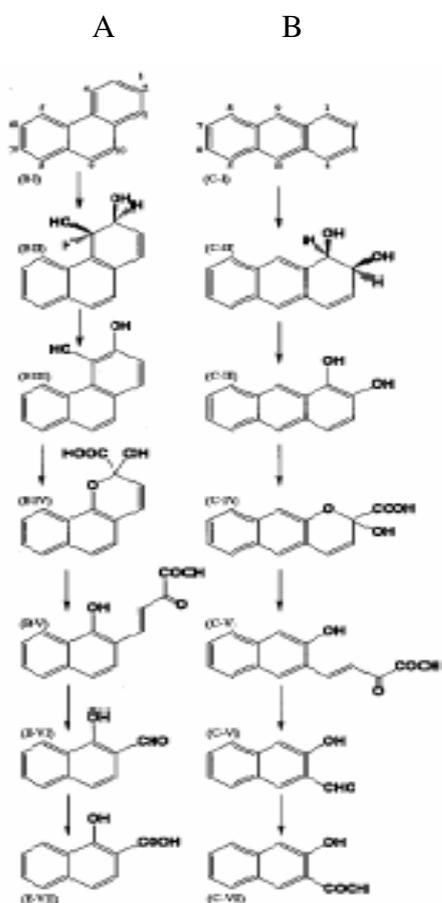


Fig. 1.4 Via periferica per il catabolismo del fenantrene (A) e dell'antracene (B)

1.3 Geni catabolici di batteri degradanti gli IPA

1.3.1 Geni nah di ceppi di *Pseudomonas*

Il metabolismo del naftalene è stato ben studiato dal punto di vista genetico in *Pseudomonas putida* G7 poiché Dunn e Gunsalus, nel 1973, avevano isolato un plasmide codificante per il catabolismo del naftalene. I geni catabolici sono organizzati in due operoni su un plasmide

NAH7 di 83 kb: uno codifica gli enzimi dell'upper pathway, coinvolti nella conversione del naftalene in salicilato, mentre il secondo codifica gli enzimi del lower pathway, coinvolti nella conversione del salicilato negli intermedi del ciclo degli acidi tricarbossilici, *via* taglio in *meta* dell'anello. Infine, un terzo gene (*nahR*), localizzato tra i due operoni, ma trascritto indipendentemente, codifica per 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 del salicilato (Schell and Wender, 1986).

I plasmidi per il catabolismo del naftalene (chiamati plasmidi NAH), così come i derivati di pWW60 da *Pseudomonas putida* NCIB 9816, pDTG1 da *P.putida* NCIB 9816-4 e pKA1 da *P.fluorescens* 5R, sono stati analizzati e si è visto che erano molto simili al plasmide NAH7 del ceppo G7. 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, i geni *nah* di *P. putida* G7 e NCIB 9816-4, i geni *dox* di *Pseudomonas* sp. C18, i geni *pah* di *P. putida* OUS82 e *P. aeruginosa* PaK1 e i geni *nah* di *P. stutzeri* AN10 (Habe H., 2003). 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; questi geni venivano utilizzati sia per la degradazione del loro substrato, ma anche per quella del naftalene. Tra questi geni, 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. L'organizzazione genica (Fig. 1.5) e la similarità di sequenza tra i geni catabolici dell'upper pathway di questi ceppi era simile a quella dei geni *nah* del plasmide NAH7 del ceppo G7.

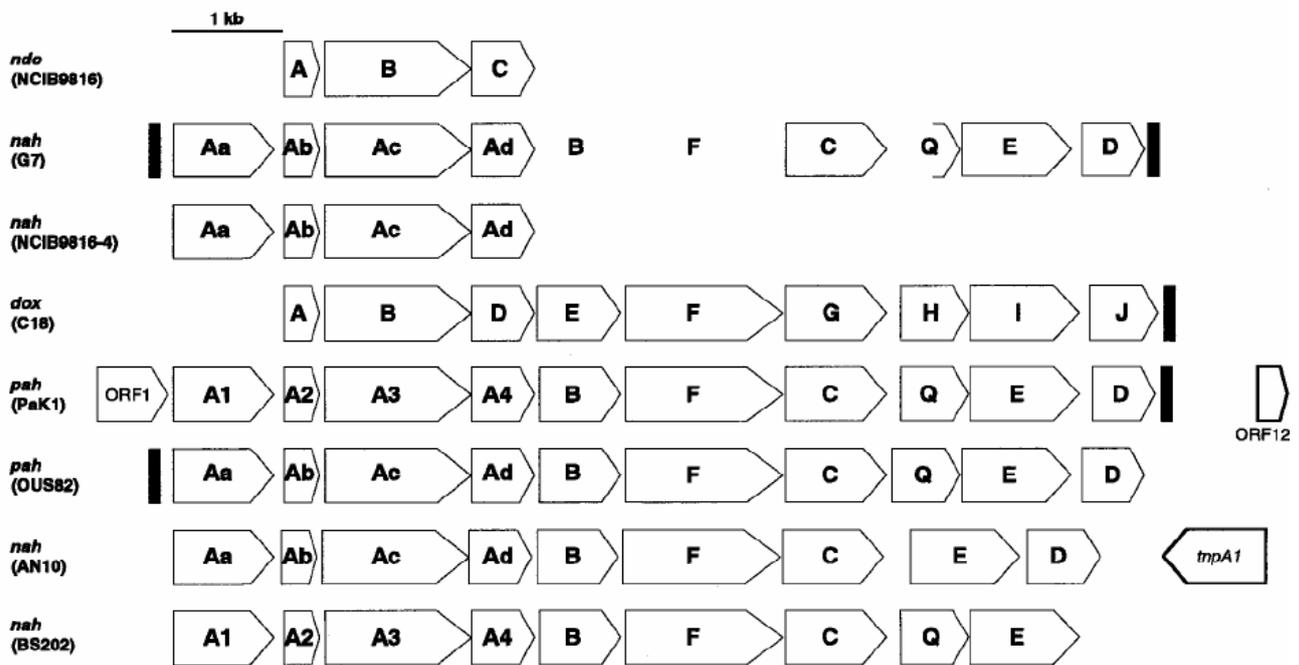


Fig. 1.5 Geni catabolici dell'upper pathway del naftalene in ceppi di *Pseudomonas*

La fig. 1.5 mostra l'ordine in cui sono disposti i geni dell'upper pathway per la degradazione del naftalene in diversi *Pseudomonas*: *nahAa*, codifica per la NDO ferredossina reduttasi, *nahAb*, codifica per la NDO ferredossina, *nahAc*, codifica per la subunità α della NDO, *nahAd*, codifica per la subunità β della NDO, *nahB*, codifica per la naftalene *cis*-diidrodiole deidrogenasi, *nahF*, codifica per la salicilaldeide deidrogenasi, *nahC*, codifica per la 1,2-diidrossinaftalene deidrogenasi, *nahQ*, una ORF di funzioni ignote, *nahE*, codifica per una *trans-o*-idrossibenzilidenepiruvato idratasi-aldolasi, e *nahD*, codifica per una 2-idrossicromene-2-carbossilato isomerasi.

1.3.2 Geni per il catabolismo degli IPA in *Sphingomonas* e specie affini

A differenza di altri ceppi batterici Gram negativi che solitamente presentano una specificità di substrato piuttosto ristretta, i membri del genere *Sphingomonas* e di specie affini, possono utilizzare una grande varietà di composti aromatici, inclusi gli IPA, come fonti di carbonio e di energia. Per esempio, *Novosphingobium aromaticivorans* F199 può crescere sul toluene, su tutti gli isomeri dello xilene, sul *p*-cresolo, sul bifenile, sul naftalene, sul dibenzotiofene, sul fluorene, sul salicilato e sul benzoato (Fredrickson *et al.*, 1995) e *S. yanoikuyae* B1 può crescere sul 1,2,4 trimetilbenzene, toluene, *p*-etiltoluene, *m* e *p*-xilene, bifenile, naftalene, fenantrene e antracene (Kim and Zylstra, 1999). *S. paucimobilis* EPA505 utilizza il fluorantene, il naftalene e il fenantrene come uniche fonti di carbonio e di energia (Mueller *et al.*, 1990). La capacità di questi microrganismi di degradare gli IPA è tutt'ora oggetto di

studio per cercare di spiegare come questi batteri possano utilizzare una tale varietà di composti aromatici.

Recentemente è stata identificata la sequenza completa del plasmide catabolico pNL1 (184 kb) di *Sphingomonas aromaticivorans* F199 (Romine *et al.*, 1999) e sono stati individuati almeno 13 geni, raggruppati in diversi cluster, che codificano per gli enzimi associati con la degradazione di composti aromatici. Sette set di componenti ossigenasiche sembrano interagire con un solo set di componenti ferredossiniche e reduttasiche. Molte parti delle sequenze di DNA nelle regioni di pNL1 codificanti i geni per il catabolismo degli aromatici erano simili a quelle di *S. yanoikuyae* B1, *S. paucimobilis* Q1, *Sphingomonas* sp. HV3, *Sphingomonas* sp. DJ77, *S. paucimobilis* TNE12 e *Sphingobium* sp. P2 (Pinyakong *et al.*, 2003). Questi risultati hanno suggerito che un arrangiamento inusuale di diversi geni, appartenenti a differenti vie cataboliche, sarebbe tipico delle specie di *Sphingomonas* e che tale organizzazione potrebbe contribuire alla loro elevata versatilità. Sebbene siano state riportate molte analisi funzionali dell'espressione di geni per la degradazione degli aromatici nelle sphingomonadacee, la funzione di ogni diossigenasi iniziale rimane tuttora poco chiara. (Romine *et al.*, 1999a)

1.3.3 Geni catabolici per la degradazione degli IPA in batteri Gram positivi

I generi *Rhodococcus* e *Nocardia* appartengono ai batteri Gram positivi ad alto contenuto in GC e comprendono molte specie comunemente diffuse nei suoli. Molti di essi sono capaci di degradare diversi tipi di composti aromatici. Il loro studio riveste particolare interesse in quanto gli attinomicetali sono solitamente i membri più stabili delle comunità batteriche dei suoli e pertanto potrebbero svolgere un ruolo significativo nel risanamento di suoli con contaminazioni di vecchia data.

Larkin *et al.* hanno riportato la purificazione e le caratteristiche di una nuova ISP di una naftalene diossigenasi di *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 e le sequenze nucleotidiche dei geni *narAa* e *narAb* codificanti, rispettivamente, per le subunità α e β di ISP. Analisi di similarità hanno mostrato che i prodotti di *narAa* e *narAb* sono identici al 31-39% alle subunità α e β di un certo numero di diossigenasi che agiscono sull'anello aromatico: entrambi hanno conservato il residuo catalitico e il centro Rieske [2Fe-2S] (Larkin *et al.*, 1999). Inoltre, in *Rhodococcus* sp. NCIMB12038, l'ordine dei geni coinvolti nella diossigenazione del naftalene, *narAaAbB*, è lo stesso dei geni *nah* nelle *Pseudomonas* (Habe H., 2003). Le componenti ferredossiniche e ferredossinoreduttasiche della naftalene diossigenasi di *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 non sono invece state caratterizzate.

I geni *phd* in *Nocardioides* sp. KP7 sono i più studiati geni catabolici per gli IPA in batteri Gram positivi. Il ceppo KP7 è stato isolato da un campione marino per la sua abilità a crescere sul fenantrene a 40°C e a degradarlo *via* ftalato. Gli studi condotti hanno permesso di purificare e caratterizzare tre enzimi che catalizzano i tre passaggi di conversione dell'1-idrossi-2-naftoato a ftalato: l'1-idrossi-2-naftoato deidrogenasi (*phdI*), la trans-2'-carbrossibenzalpiruvato idratasi aldolasi (*phdJ*) e la 2-carbossibenzaldeide deidrogenasi (*phdK*) (Iwabuchi T. *et al.*, 1997). Saito *et al.* hanno riportato le sequenze nucleotidiche del cluster genico *phdEFABGHCD* di 6,1 kb (Fig. 1.6) che codifica per gli enzimi responsabili della trasformazione del fenantrene in 1-idrossi-2-naftoato; il cluster è a valle del cluster genico *phdIJK*.



Fig. 1.6 Organizzazione genica dell' Upper Pathway per la degradazione del fenantrene in *Nocardioides* sp.KP7

I geni codificanti le componenti ferredossiniche e ferredossinoreduttasiche in *Nocardioides* sp. KP7 (*phdC* e *phdD*) sono state trovate 2,9 kb a valle del gene *phdB*. È stato osservato che PhdC presenta maggiori similarità con ferredossine tipo [3Fe-4S] o [4Fe-4S] che non con ferredossine tipo [2Fe-2S] tipiche delle diossigenasi degli IPA. Invece PhdD ha moderata identità di sequenza (meno del 40%) con la ferredossina reduttasi di altri enzimi che degradano gli stessi substrati Tutte e quattro le componenti (PhdABCD) sono necessarie per l'efficiente attività diossigenasica che converte il fenantrene nel corrispondente *cis*-diolo (Saito *et al.*, 2000). PhdE, PhdF, PhdG e PhdH hanno un'elevata similarità, rispettivamente, con diidrodiole deidrogenasi, extradiolo diossigenasi, idratasi aldolasi e aldeide deidrogenasi. È da notare che il cluster genico *phd* non contiene ORF codificanti isomerasi, trovate invece in tutti i cluster genici per il catabolismo degli IPA dei batteri Gram negativi descritti prima (Saito *et al.*, 1999). Le attività specifiche degli enzimi per il catabolismo del fenantrene non sono state ancora investigate.

1.4 Degradazione dei cloro aromatici

I composti aromatici clorurati vengono usati in agricoltura come erbicidi e pesticidi, o nell'industria come solventi, refrigeranti etc. Questi composti, come pure alcuni prodotti che

derivano da loro trasformazioni, come le diossine, sono altamente tossici e, a causa della loro persistenza, possono compromettere la qualità dell'ambiente e la salute umana (Ogawa *et al.*, 2003). I clorotolueni, ad esempio, vengono dispersi nell'ambiente come tali, ma si possono ritrovare anche come sottoprodotti della degradazione parziale di molecole più complesse come si deduce dal rilevamento di tali composti in aree agricole trattate con diversi pesticidi clorurati (Magara *et al.*, 1994).

La recalcitranza di questa classe di composti è dovuta sia alla componente aromatica, della cui degradazione si è discusso in precedenza, sia alla stabilità del legame carbonio-cloro. Nel clorotoluene, ad esempio, oltre alla presenza del cloro lo stato altamente ridotto del composto rende la molecola di difficile attivazione. Lo stesso toluene viene degradato con difficoltà nel terreno e possiede tempi di persistenza maggiori di molecole già parzialmente ossidate quali benzilalcol, benzaldeide e benzoato. I microrganismi capaci di mineralizzare il toluene, inoltre, hanno dato un esito negativo nella degradazione degli isomeri clorurati.

La rimozione del cloro è una tappa fondamentale per la mineralizzazione dei composti cloroaromatici. Le reazioni di dealogenazione permettono infatti di produrre composti che possono entrare nelle consuete vie cataboliche deputate alla degradazione dei composti aromatici o di loro derivati. Infatti, nonostante siano conosciuti solo un numero piuttosto limitato di microrganismi in grado di utilizzare composti cloroaromatici come unica fonte di carbonio ed energia, è noto che molti di tali composti possono essere degradati da consorzi microbici nei quali alcuni microrganismi provvedono alla dealogenazione della molecola grazie, ad esempio, a trasformazioni cometaboliche, rilasciando prodotti che possono essere poi attaccati da altri microrganismi.

1.4.1 Meccanismi di dealogenazione

L'eliminazione del cloro rappresenta il passaggio chiave nella degradazione dei composti cloroaromatici. Lo studio dei microrganismi capaci di degradare tali composti ha permesso di comprendere i meccanismi e le strategie grazie alle quali ciò avviene. La rimozione dell'alogeno può avvenire in fasi precoci o tardive della degradazione (fig. 1.7) e, in entrambi i casi, il legame carbonio-cloro può essere scisso spontaneamente, in seguito alla formazione di un intermedio instabile, o grazie a specifiche reazioni enzimatiche.

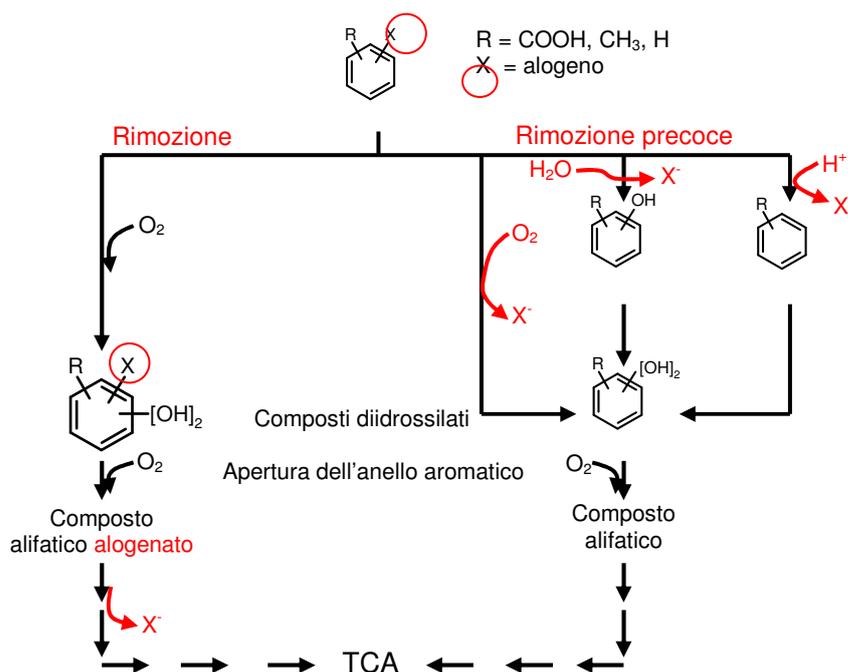


Fig. 1.7 Meccanismi di dealogenazione

La dealogenazione si dice spontanea o fortuita quando l'eliminazione dell'alogeno avviene durante la catalisi della molecola contestualmente ad una reazione enzimatica durante la quale si viene a formare un intermedio molto instabile. Il cloro non è direttamente attaccato dall'apparato enzimatico, ma è un buon gruppo uscente ed il suo allontanamento stabilizza l'intermedio. Un esempio è rappresentato dalla dealogenazione ossidativa (Commandeur & Parson, 1990) che avviene nelle fasi precoci del percorso degradativo. In questi casi l'alogeno viene perso in seguito all'ossidazione dell'anello aromatico da parte di una mono- o di una diossigenasi che presentano, come substrato naturale, la molecola non clorurata.

Nella reazione di dealogenazione riduttiva, invece, il cloro viene sostituito selettivamente con un idrogeno e ciò viene catalizzato da uno specifico sistema enzimatico. Durante la reazione vengono trasferiti due elettroni: uno è coinvolto nel rilascio del cloro sotto forma di ione e l'altro è trasferito al protone che sostituisce l'alogeno. Questa reazione può avvenire sia in anaerobiosi sia in aerobiosi. Nel primo caso la molecola cloro aromatica è utilizzata semplicemente come accettore finale di elettroni e viene successivamente rilasciata nell'ambiente. Il prodotto dealogenato, però, può essere mineralizzato da altre specie microbiche come evidenziato da studi su consorzi microbici (Horowitz *et al*, 1992). In presenza di ossigeno, invece, un esempio di dealogenazione riduttiva avviene in *Alcaligenes eutrophus* JMP 134 (Seibert *et al*, 1993). In seguito all'apertura intradiolica di 3-clorocatecoli, si forma il cloromaleilacetato. Il cloro presente su questa molecola viene sostituito con un

idrogeno grazie ad una specifica reazione di riduzione (Fig. 1.8):

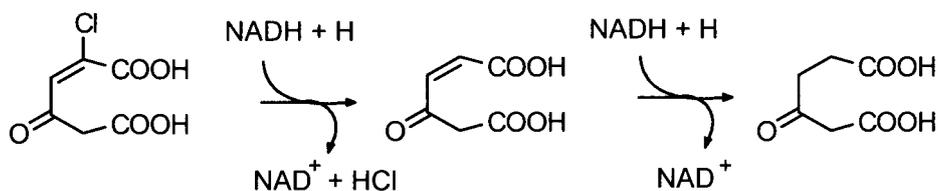


Fig. 1.8. Dealogenazione riduttiva in ambiente aerobico (da Janssen, 1994).

Nella dealogenazione idrolitica l'allontanamento del cloro da molecole aromatiche avviene in seguito ad una specifica reazione enzimatica di idrolisi durante la quale l'alogeno viene sostituito da un gruppo ossidrilico. Questa reazione si riscontra soprattutto quando l'alogeno è presente in posizione *para* (Fig. 1.9).

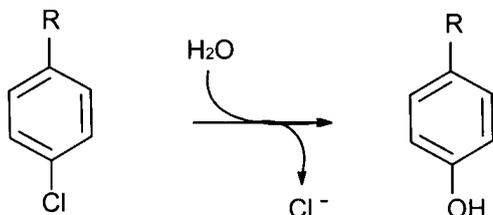


Fig. 1.9. Dealogenazione idrolitica: il cloro è sostituito da un gruppo idrossilico

La dealogenazione idrolitica avviene sia in ambiente aerobico che anaerobico e, generalmente, è la prima reazione della degradazione del composto. È stato dimostrato, grazie all'uso di isotopi, che l'ossigeno incorporato deriva dall'acqua e non dall'ossigeno molecolare (Muller *et al.*, 1984). Quest'ultimo, al contrario, ha un effetto inibente. Questa reazione è stata riscontrata soprattutto nel catabolismo di acidi clorobenzoici e di pentaclorofenoli (PCP) da parte di microrganismi anche molto distanti fra loro come *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas* e *Flavobacterium*.

1.4.2 Gli acidi clorobenzoici (CBA)

Gli acidi clorobenzoici rappresentano un ottimo modello per lo studio della degradazione di composti cloroaromatici poiché sono molecole relativamente semplici, e molto spesso rappresentano il prodotto di accumulo della degradazione parziale di composti più complessi, come i PCB (Ogawa *et al.*, 2003). E' stato osservato, ad esempio, che due microrganismi, *Achromobacter* sp. e *Bacillus brevis*, isolati per la capacità di crescere sul *para* clorobifenile (*p*-CB) sono in grado di ossidare l'anello aromatico non sostituito di questo composto,

portando alla formazione di acido 4-clorobenzoico che però non viene ulteriormente degradato e si accumula nel mezzo di coltura (Fig. 1.10) (Masse *et al.*, 1984).

Sebbene gli acidi clorobenzoici possano essere degradati sia in ambiente anaerobico che aerobico, la loro degradazione è stata prevalentemente studiata in ambiente aerobico sia in microrganismi come Gram negativi come *Acitenobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* e *Pseudomonas* sia in Gram positivi come *Arthrobacter* e *Corynebacterium*.

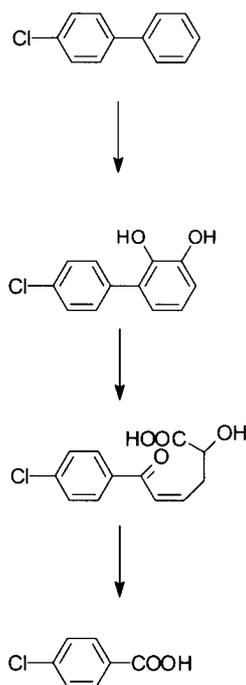


Fig.1.10. Gli acidi clorobenzoici possono originarsi anche dalla degradazione parziale di molecole clorurate più complesse come il *p*- clorobifenile.

Dallo studio delle differenti vie degradative degli acidi clorobenzoici è emerso che il cloro può venire rimosso o in fase precoce o in fase tardiva. Tutte le vie degradative che non presentano una preliminare dealogenazione della molecola convergono verso la formazione di un clorocatecolo (Reineke & Knackmuss, 1988). Questa molecola consente la successiva apertura dell' anello aromatico, ma la modalità con la quale avviene risulta determinante. Infatti, l'apertura extradiolica (*meta* pathway) catalizzata da una catecolo 2,3 diossigenasi, porta alla formazione di prodotti tossici che determinano la morte delle cellule (Fig. 1.11).

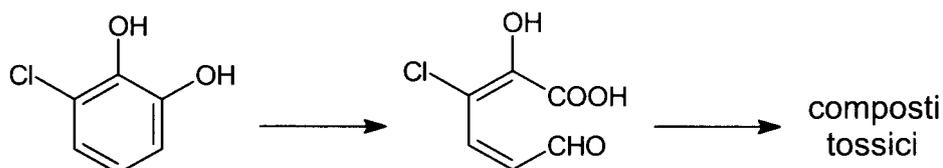


Fig. 1.11. L'apertura extradiolica, *meta* pathway, di clorocatecoli genera prodotti tossici e letali per la cellula.

L'apertura intradiolica catalizzata da una clorocatecolo 1,2 diossigenasi, consente invece di

formare l'acido 2- o 3-cloro *cis-cis*-muconico il quale viene trasformato nel rispettivo cloromuconolattone, un composto instabile che permette l'allontanamento spontaneo dell'alogeno sotto forma di acido cloridrico. Questa via, per la capacità di riconoscere anche molecole alogenate oltre ai substrati naturali non sostituiti, prende il nome di *ortho* pathway modificato. Il lattone formatosi viene successivamente convertito in composti che possono entrare nel ciclo di Krebs (Fig. 1.12).

La seconda modalità di degradazione degli acidi clorobenzoici prevede che la reazione di dealogenazione avvenga prima dell'apertura dell'anello aromatico e può avvenire sia con un meccanismo fortuito sia grazie ad una reazione di idrolisi.

Un esempio di liberazione fortuita del cloro durante la prima reazione della via degradativa dei CBA è fornito da *Burkholderia cepacia* 2CBS in grado di degradare l'acido 2-clorobenzoico (Fetzner *et al.*, 1992). La molecola subisce una diossigenazione, catalizzata dalla 2-clorobenzoato diossigenasi, e viene trasformata in catecolo (Fig. 1.13).

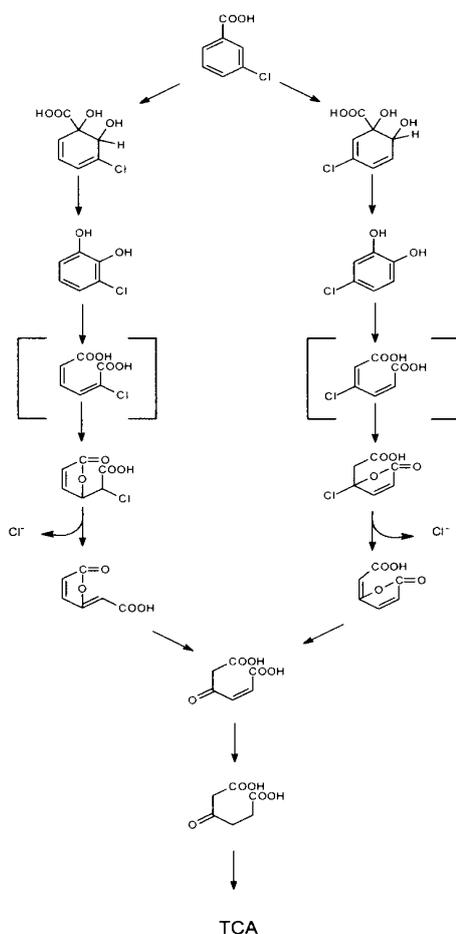


Fig. 1.12. *Ortho* pathway modificato per il catabolismo dell'acido 3-clorobenzoico in *Pseudomonas* sp. B13 (da Reineke, 1980).

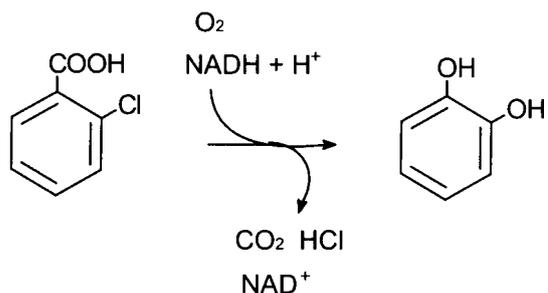


Fig. 1.13. Formazione di catecolo in seguito all'attività della 2-clorobenzoato diossigenasi

La dealogenazione può anche avvenire grazie ad una reazione di idrolisi, quando l'alogeno è presente in posizione *para*. Gli studi più approfonditi su questo sistema sono stati compiuti su *Pseudomonas* sp. CBS3. È stato osservato che la reazione richiede ATP, Mg^{++} e CoA (Löffler *et al.*, 1991a). La molecola viene attivata, grazie al consumo di una molecola di ATP in presenza di ioni magnesio, formando un legame tioesterico tra il gruppo carbossilico dell'acido 4-clorobenzoico ed il CoA. La formazione di questo intermedio permette la sostituzione elettrofila del cloro in posizione *para* con un gruppo idrossilico fornito dall'acqua. Ciò avviene senza la richiesta di ulteriori cofattori. Dal 4-idrossibenzoil-CoA, così formato, viene successivamente liberato l'acido 4-idrossibenzoico ed il CoA (Fig. 1.14).

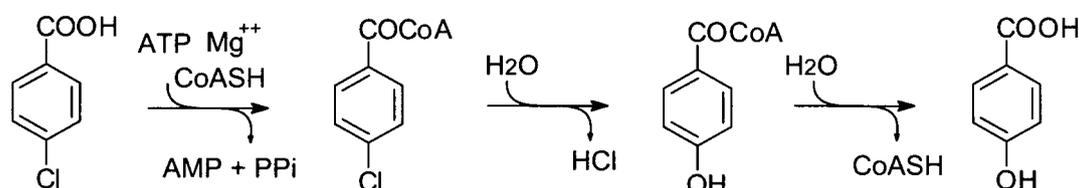


Fig.1.14. Dealogenazione idrolitica dell'acido 4-clorobenzoico in *Pseudomonas* sp. CBS3

In *Pseudomonas* sp. CBS3 sono state identificate tre proteine, rispettivamente di 57, 30 e 16 kDa, coinvolte nella reazione (Chang *et al.*, 1992). La proteina di 57 kDa è stata denominata 4CBA-CoA-ligasi ed è coinvolta nella formazione del primo intermedio ed agisce come omodimero. Quella di 30 kDa è la vera e propria dealogenasi ed agisce anch'essa come omodimero. Infine la più piccola è una tioesterasi responsabile del rilascio dell'acido 4-idrossibenzoico e del CoA ed è attiva in forma omotetramerica. L'acido 4-idrossibenzoico formato è di facile degradazione e viene generalmente ossidato a formare l'acido protocatechico che consente l'apertura dell'anello aromatico (Savard *et al.*, 1992).

Una via degradativa dell'acido 4-clorobenzoico, del tutto simile a quella conosciuta in *Pseudomonas* sp. CBS3, è stata osservata anche in membri del genere *Arthrobacter*. Sono

stati isolati, infatti, tre ceppi capaci di degradare il 4-CBA attraverso la formazione dell'acido 4idrossibenzoico e dell'acido protocatechico: *Arthrobacter* sp. SU (Schmitz, 1992), *Arthrobacter* sp.TM1 (Marks *et al*, 1984) e *Arthrobacter globiformis* KZT1 (Tsoi *et al*, 1991). L'attività dealogenasica è stata indagata sia in *Arthrobacter* sp. SU che in *Arthrobacter* sp. TM 1 ed in entrambi i casi la reazione enzimatica richiede ATP e CoA. Ciò suggerisce che il meccanismo di reazione preveda la formazione del legame tioesterico tra il 4CBA ed il CoA, come osservato in *Pseudomonas* sp. CBS3.

1.4.3 I geni che codificano per dealogenasi idrolitiche

Sia in *Arthrobacter* sp. SU che in *Arthrobacter globiformis* KZT1 i geni responsabili della reazione di dealogenazione sono localizzati su un plasmide, rispettivamente pASU 1, di 120 kb, e pBS150I di 110 kb, mentre in *Arthrobacter* sp.TM1 sono localizzati a livello del cromosoma come in *Pseudomonas* sp. CBS3 e in *Pseudomonas* sp. DJ 12.

I geni coinvolti nella dealogenazione in *Arthrobacter* sp. SU sono stati clonati e sequenziati: *fcba* che codifica per la 4-CBA-CoA-ligasi), *fcbb*, che codifica per la dealogenasi) e *fcbc*, che codifica per la tioesterasi, costituiscono un unico operone (Schmitz *et al.*, 1992).

L'analisi comparativa dei cluster *fcba* in *Pseudomonas* e in *Arthrobacter* ha evidenziato differenze nell'organizzazione genica: mentre in *Pseudomonas* sp. DJ 12 e *Pseudomonas* sp. CBS3 l'ordine dei geni è *fcba*BAC, in *Arthrobacter* sp. SU e *Arthrobacter* sp. TMI l'ordine è *fcba*ABC (Fig. 1.15). Un'ulteriore differenza rilevata tra i generi *Pseudomonas* e *Arthrobacter* riguarda la ripetizione del cluster *fcba*: infatti tale cluster genico risulta ripetuto in *Arthrobacter* sp. SU e in *Arthrobacter* sp. TM 1, ma non nei due ceppi di *Pseudomonas*. La presenza di un'ulteriore *orf*, denominata *fcba*T, che probabilmente codifica per un trasportatore del 4-CBA (Chae *et al.*, 2000), è stata osservata nei due ceppi di *Arthrobacter* e in *Pseudomonas* sp. DJ12, ma non in *Pseudomonas* sp. CBS3.

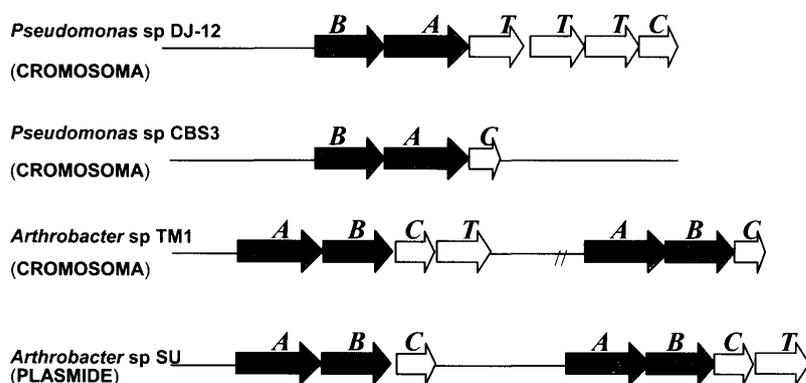


Fig. 1.15. Ordine dei geni *fcba* responsabili dell'attività dealogenasica in ceppi di *Arthrobacter* e *Pseudomonas*: *fcba* codifica per una 4-CBA-CoA-ligasi, *fcba*B codifica per una 4-CBA-CoA-dealogenasi e *fcba*C codifica per una 4CBA-tioesterasi.

1.5 Le potenzialità dei microrganismi geneticamente modificati nelle biotecnologie ambientali

L'enorme versatilità metabolica dei microrganismi offre una strategia semplice, poco costosa e a bassissimo impatto ambientale per ridurre l'inquinamento ambientale rispetto alle opzioni non-biologiche e pertanto ha spinto la comunità scientifica a sviluppare tecnologie volte a sfruttarne tali potenzialità per risanare siti contaminati. I trattamenti biologici sono spesso risultati più economici di alternative come l'incenerimento, il lavaggio del suolo o il suo deposito in discariche ed inoltre, poiché offrono la possibilità di trattamenti *in situ* e sono meno invasivi di altre tecnologie, spesso godono del favore dell'opinione pubblica (Sayler and Ripp, 2000). Tuttavia, il lento tasso di degradazione che spesso si osserva nel risanamento di siti contaminati da composti particolarmente recalcitranti come gli IPA o i composti cloroaromatici, costituisce un importante fattore limitante nell'uso di queste tecniche (Dua *et al.*, 2002).

Per rendere più efficaci le tecniche di biorisanamento sono state proposte diverse modalità di intervento, come, ad esempio, l'uso di surfattanti che permetterebbe di aumentare la solubilità degli IPA, ma che in alcuni casi sono risultati tossici per i microrganismi. Anche la bioaugmentation, l'addizione, cioè, di microrganismi specializzati, è stata tentata sia con successo che con fallimenti e non è ancora chiaro perché, alcune volte, l'inoculo fallisca (Eriksson *et al.*, 2003).

Di fronte a questo problema i microbiologi molecolari che si occupano di bioremediation hanno spesso suggerito l'uso di microrganismi geneticamente modificati (MGM) per la degradazione di xenobiotici recalcitranti come un potenziale strumento per migliorare e accelerare il risanamento di siti inquinati. I progressi nelle tecniche di ingegneria genetica e proteica hanno infatti aperto nuove vie verso la creazione di microrganismi geneticamente modificati (MGM), in modo da combinare vie degradative, o enzimi di organismi diversi, in un unico ospite con lo scopo di migliorare specifiche reazioni (Dua *et al.*, 2002). Tecniche molecolari possono essere utilizzate per aumentare il livello di una particolare proteina o enzima o serie di enzimi in batteri per aumentarne il tasso di reazione (Chakrabarty, 1986). Per esempio, ceppi resistenti ai solventi possono essere ospiti ideali per la costruzione di ceppi geneticamente modificati per la rimozione di rifiuti ricchi in solventi; microrganismi ricombinanti sono stati sviluppati per accumulare e/o immobilizzare metalli pesanti presenti nel suolo e nell'acqua; batteri resistenti alle radiazioni sono stati geneticamente modificati utilizzando specifici geni catabolici per renderli adatti al trattamento con misture di rifiuti

organici, metalli pesanti e radionuclidi ad alta energia (Diaz E., 2004). Anche l'ingegneria proteica può essere un utile mezzo per la creazione di enzimi più stabili o per modificare la specificità di substrato e le proprietà cinetiche dei complessi enzimatici. Una metodica interessante, per esempio, è quella che prevede lo scambio di intere subunità, o porzioni di subunità, fra enzimi in modo da combinarne gli attributi migliori. A questo proposito sono stati creati degli ibridi tra la toluene e la bifenile diossigenasi ottenendo enzimi dalle migliori prestazioni nella degradazione di composti clorurati, come, ad esempio il tricloroetilene, uno tra i più diffusi e preoccupanti inquinanti ambientali (Furukawa *et al.*, 1991).

Tuttavia, i risultati soddisfacenti spesso ottenuti in laboratorio utilizzando MGM non sono di solito supportate da prove in campo: il timore di un potenziale rischio ecologico, rappresentato da un rilascio incontrollato nell'ambiente di combinazioni genetiche non desiderate, ha infatti portato a confinare il loro utilizzo in sistemi controllati come misura precauzionale (Sayler and Ripp, 2000; Cases and de Lorenzo, 2005). Il rilascio nell'ambiente di MGM richiederebbe quindi una chiara comprensione del loro comportamento, dispersione, sopravvivenza e la possibilità di scoprire e monitorare il destino dei geni e degli organismi all'interno della comunità microbica (Samanta *et al.*, 2002).

Inoltre è stato obiettato che esperimenti condotti in beuta utilizzando terreni di crescita sintetici e sistemi sterili, non riescano a riprodurre in maniera soddisfacente l'ambiente naturale. A tale obiezione è stato risposto introducendo sperimentazioni in microcosmi, che forniscono un modo per studiare le interazioni microbiche con i contaminanti in un contesto pur sempre controllato e riproducibile, ma più vicino alle possibili condizioni reali, conservando comunque la complessità della matrice e rimanendo, in ogni caso, discretamente rappresentativo dei processi che avvengono in campo. I microcosmi permettono di misurare la biodegradazione, intesa come tasso di mineralizzazione (produzione di CO₂), e possono essere usati per studiare l'effetto dei trattamenti di biorisanamento, inclusa la bioaugmentation (Cavalca *et al.*, 2002). I microcosmi, inoltre, possono essere usati in esperimenti con i MGI, in condizioni controllate, per poter analizzare l'attività della via ingegnerizzata per e misurare i possibili effetti dei MGI sull'ecosistema (Pipke *et al.*, 1992).

Tra le varie tipologie di microcosmi utilizzabili per questi scopi i reattori in fase slurry sono particolarmente utilizzati per studiare le potenzialità degradative dei MGM, in quanto sistemi chiusi che possono essere realmente impiegati nel biorisanamento di suoli inquinati. Nei bioreattori è possibile utilizzare colture pure, o coculture semplici, e si possono disegnare un bioreattori specifici per un determinato processo. I bioreattori evitano la dispersione nell'ambiente sia degli inquinanti che dei batteri geneticamente modificati, garantiscono il

contatto tra il microrganismo e l'inquinante, e offrono tutti i vantaggi dei sistemi controllati. Infatti, oltre a poter monitorare i parametri ambientali, quali temperatura, pH e ossigenazione, è anche possibile intervenire con eventuali aggiunte di nutrienti inorganici, co-metaboliti od induttori per migliorare la resa di degradazione ed il processo può essere agevolmente monitorato nel tempo.

McClure *et al.*, ad esempio, nel 1989 hanno studiato la sopravvivenza, in diverse unità di fanghi attivi riprodotte in laboratorio, del batterio *P. putida* UWC1 che, ingegnerizzato con il plasmide pD10, è stato reso capace di utilizzare l'acido 3-clorobenzoico come unica fonte di carbonio e di energia.

Gli inquinanti recalcitranti, di solito, si accumulano nei sedimenti di fiumi e laghi ed è per questo motivo che Pipke *et al* hanno studiato, con campioni di sedimenti del fiume Rhine e del lago Plussee, la degradazione di inquinanti alo- e alchil-aromatici da parte del ceppo ingegnerizzato di *Pseudomonas* B13 FR1(pFRC20P). Il ceppo utilizzato è stato ottenuto mediante l'assemblaggio di geni codificanti enzimi catabolici di tre diversi ceppi batterici per formare una nuova via catabolica che rende il ceppo ricombinante capace di degradare contemporaneamente cloro- e metilaromatici (Rojo *et al.*, 1987). Nei microcosmi allestiti, il ceppo ha dimostrato di poter proliferare, diventando un temporaneo componente della comunità microbica, di esprimere il suo potenziale catabolico e di aumentare il tasso di degradazione del 3-clorobenzoato e 4-metilbenzoato (Pipke *et al.*, 1992).

Anche Eichner *et al.* hanno affrontato il problema della degradazione simultanea di composti aromatici metil- e cloro-sostituiti. Infatti mentre i composti metilaromatici vengono processati tramite un'apertura extradiolo, il processamento produttivo dei composti cloroaromatici avviene tramite un'apertura intradiolo. Quando nella comunità microbica sono presenti entrambe le vie cataboliche, i composti cloroaromatici possono venire erroneamente incanalati verso un'apertura dell'anello in posizione extradiolo, che produce l'accumulo di prodotti tossici e quindi l'autodistruzione della comunità microbica. Il problema è stato superato con la costruzione di un ceppo, *Pseudomonas* sp. B13 SN45RE, capace di degradare simultaneamente i composto aromatici sia clorurati che mutilati. In un impianto di liquami riprodotto in scala in laboratorio e alimentato da una miscela di clorofenoli e di 4-metilfenoli il ceppo ingegnerizzato mostrava, rispetto al parentale selvatico, una maggiore velocità di degradazione della mistura di fenoli (Eichner *et al.*, 1999).

Quindi, nonostante negli ultimi anni le tecniche del DNA ricombinante abbiano permesso di ottenere ceppi microbici sempre più efficienti, il loro utilizzo rimane limitato ad ambienti confinati in quanto la normativa italiana non permette l'introduzione di tali microrganismi

nell'ambiente (Menn *et al.*, 1999). Ceppi batterici ottenuti mediante manipolazione del DNA *in vitro* possono comunque essere utilizzati all'interno di bioreattori per il trattamento di rifiuti industriali o di suoli pesantemente contaminati da inquinanti particolarmente tossici e/o recalcitranti.

MATERIALI E METODI

2.1 Condizioni colturali, ceppi batterici e plasmidi

Le colture di arricchimento sono state allestite a partire da un grammo di suolo, derivante da un'area industriale inquinata da lungo tempo da idrocarburi aromatici policiclici e cloroaromatici, inoculato in terreno minerale M9 con l'aggiunta di acido nalidixico e fungizone per cercare di evitare la crescita di batteri Gram negativi e favorire quella di Gram positivi. Antracene, fluorene, fenantrene, naftalene, i tre isomeri dell'acido clorobenzoico e del clorotoluene erano i composti presenti nel suolo in concentrazioni maggiori rispetto ad altri e sono, così, stati scelti come unica fonte di carbonio ed energia per l'arricchimento delle colture. Le colture sono state incubate a 30°C e in agitazione.

I ceppi batterici utilizzati in questo lavoro sono elencati in Tab. 2.1. *Arthrobacter*, *Pseudomonas* e *Sphingobium* sono stati cresciuti a 30°C, *Escherichia coli* a 37°C. Quando necessario, gli antibiotici ampicillina e kanamicina sono stati aggiunti ai terreni di crescita a una concentrazione pari a 100 e 50 µg/ml rispettivamente. Per la crescita in terreno ricco è stato utilizzato terreno Luria Bertani (LB) mentre per la crescita selettiva sull'acido 4-clorobenzoico (4-CBA) e sugli IPA i ceppi sono stati cresciuti su terreno minerale M9 (Kahn *et al*, 1979) e quando necessario è stato aggiunto malato 20 mM, triptofano 0.05 mM e gli antibiotici opportuni. Il 4-CBA viene solitamente fornito alla concentrazione di 3 mM mentre i substrati aromatici policiclici, scarsamente solubili in acqua, vengono forniti o direttamente in granuli o sciolti in acetone prima dell'aggiunta dell' M9, in questo modo l'acetone evapora e la quantità di substrato fornito è nota e di solito è di 25mg/L.

Le colture utilizzate per inoculare gli slurry sono state lasciate a incubare a 30°C in terreno minerale M9 con *Arthrobacter* sp. FG1, *P. putida* PaW340/pDH5 o *P.putida* PaW340 in presenza di acido-4-cloro benzoico 3 mM o acido-4-idrossi benzoico 3 mM o, per ottenere una biomassa paragonabile, ma in un tempo più breve, in un terreno ricco, LB, ma diluito 1:10, sempre in presenza di acido-4-cloro benzoico 3 mM o acido-4-idrossi benzoico 3 mM per indurre i geni catabolici. Per la crescita di *P. putida* PaW340/pDH5 e di *P.putida* PaW340 in terreno minerale era necessaria l'aggiunta di triptofano (50µM). La crescita veniva monitorata misurando la Densità Ottica a 600 nm (OD_{600nm}). I ceppi batterici sono stati fatti crescere fino al raggiungimento della fase esponenziale, quindi centrifugati e il pellet risospeso in terreno fresco M9 2X per ottenere una OD_{600nm} finale di 2, in modo che la concentrazione nello slurry fosse circa di 10⁸ cfu/ml. La concentrazione batterica negli slurry è stata monitorata seminando diluizioni dello slurry su terreni appropriati; se necessario

venivano aggiunti streptomicina (500 µg/ml) e kanamicina (50 µg/ml) per selezionare, rispettivamente, *P. putida* PaW340 e *P. putida* PaW340/pDH5.

Tab. 2.1: Ceppi batterici e plasmidi utilizzati in questo lavoro

CEPPO/PLASMIDE	CARATTERISTICHE RILEVANTI	REFERENZA
<i>Arthrobacter</i> sp. FG 1	4-CBA ⁺	Questo lavoro
<i>P. putida</i> Paw340	4-CBA ⁻ , Str ^R , trp, hsdR	Franklin, F.C.H. <i>et al.</i> , 1981
<i>P.putida</i> KT2442 upper TOL	Derivato da KT2442. Inserzione upper TOL (<i>xyIR/xyIUWCMABN</i>) da pWWO	Panke <i>et al.</i> , 1997
<i>Escherichia coli</i> JM 109	<i>reeA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁺ <i>m_k</i> ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> λ ⁻ Δ(lac-proAB), F' [traD36, proAB ⁺ , lacI ^q ZΔM15]	Yamish-Perron <i>et al.</i> 1985
<i>Pseudomonas</i> sp. PILH1	Naftalene ⁺	Questo lavoro
<i>Pseudomonas</i> sp.A	Naftalene ⁺	Questo lavoro
<i>Sphingobium</i> col.4	Fenantrene ⁺	Questo lavoro
<i>Sphingobium</i> col.x	Fenantrene ⁺	Questo lavoro
pGEM-T	<i>Ap'</i> ; <i>fl ori</i> ; <i>lac Z</i>	Promega
pUC18	<i>bla</i> (<i>Ap'</i>); <i>lac Z</i> ; <i>rep</i> (<i>pMB1</i>); vettore di clonaggio	1982
pJB3KmD	<i>Km'</i> ; <i>Ap'</i> ; <i>ori V</i> ; <i>ori T</i> ; P _{lac} ;	Blatny J. M. <i>et al.</i> 1997
pAS5	Derivato da pUC13 <i>Ap'</i> contiene il frammento di 6.6 kb isolato da <i>Arthrobacter</i> sp. SU	Schmitz <i>et al.</i> 1992
pDH4	<i>Ap'</i> , derivato di pUC18 contiene il frammento di 4.7 kb isolato da <i>Arthrobacter</i> sp. FG 1 ed exciso con digestione <i>EcoRI</i> da pDH3	Questo lavoro
pDH5	<i>Ap'</i> , <i>Km'</i> derivato di pJB3KmD contiene il frammento di 4.7 kb isolato da <i>Arthrobacter</i> sp. FG 1 ed exciso con digestione <i>EcoRI</i> da pDH4	Questo lavoro

2.2 Analisi dei metaboliti

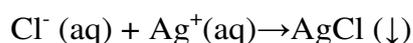
2.2.1 High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

Le analisi HPLC dei metaboliti per la determinazione del primo intermedio di degradazione del 4CBA, sono state eseguite con un sistema Waters 600E dotato di un detector Waters 486 ed integratore Waters 746. Le cromatografie in fase inversa sono state condotte con una colonna Waters IIBondapak TM 3.9x300 mm C18 monitorando l'assorbanza a 254 nm. I campioni prelevati dai brodi di coltura vengono filtrati, dopo acidificazione, per allontanare le cellule attraverso filtri per HPLC Millex-HV 0.45 µm (Millipore). Come eluente si è utilizzata la miscela acetonitrile-tampone fosfato 2 mM (30:70) con velocità di flusso pari a 1 ml/min.

Per le analisi condotte sui campioni prelevati dagli slurry si è utilizzata l'RP-HPLC (reverse phase high performance liquid chromatography) usando un HPLC Shimadzu con una Low Pressure Gradient FCV-10AL (mixer), LC-10AD (pompa), DGU-3° (degaser), UV-VIS SPD-M10A (diode array detector), SCL-10 (controller), CTO-10AS (column oven), equipaggiata con un loop da 20µl. La colonna utilizzata è stata una RP-18 Merck LichroCART 250-4 Purospher START endcapped (5µm); per il processamento dei dati è stato utilizzato il software cromatografico Shimadzu Class VP 6.1 per Microsoft Windows 2000. La composizione della fase mobile (velocità del flusso, 1 ml/min) è stata metanolo-acqua-% acido orto fosforico 70:30:1 v/v. I picchi dei campioni sono stati identificati paragonando i tempi di ritenzione e lo spettro UV con quelli degli standard. La variabilità analitica è stata testata iniettando tre volte gli stessi set di campioni e risultava, di solito, inferiore al 3%. La variabilità del campionamento è stata testata iniettando gli estratti dei set di tre campioni presi indipendentemente ed era generalmente più bassa del 5%. Il limite di detenzione era 0,0025 mM sia per il 4CBA che per il 4HBA (rispettivamente 0,39 mg/L e 0,35 mg/L)

2.2.2 Determinazione della concentrazione dei cloruri

La concentrazione di cloruri è misurata sui brodi ottenuti da una coltura allestita in terreno minerale M9. Il rilascio del cloro è misurato dopo combinazione con ioni Ag⁺ secondo la seguente reazione:



800 µl di surnatante centrifugato proveniente dalla coltura batterica vengono aggiunti a 100 µl di HNO₃ concentrato e fatti reagire direttamente in cuvetta con 100 µl di AgNO₃ (100 mM). La formazione di AgCl viene monitorata spettrofotometricamente a 546 nm

(Freier,1974).

2.2.3 Analisi qualitativa dell'attività dealogenasica mediante saggio colorimetrico su piastra (Holloway *et al.*, 1998)

Il saggio colorimetrico viene utilizzato per valutare l'attività dealogenasica batterica in quanto durante una reazione di dealogenazione di tipo idrolitico vengono liberati ioni Cl^- e H^+ e questo comporta un abbassamento di pH del mezzo di coltura. Le piastre indicatrici vengono preparate diluendo cinque volte il terreno LB, portando il pH ad un valore di 8.2 con NaOH 1 M, aggiungendo 15 g/l di Bacto agar, 13 g/ml di rosso fenolo (indicatore che vira da rosso a giallo quando il pH scende sotto il valore di 5.6) e infine il substrato. Il terreno viene autoclavato alla temperatura di 120°C per 30 min e lasciato raffreddare. Se gli enzimi indotti sono sotto il controllo del promotore P_{lac} si addiziona IPTG alla concentrazione finale di 0,5 mM.

2.3 Tecniche molecolari di base

Per le tecniche di biologia molecolare di base utilizzate in questo lavoro (impiego di enzimi per il clonaggio, estrazione di DNA genomico e plasmidico, PCR, Southern blot, trasformazione) sono state seguite procedure standard riportate su manuali di laboratorio o, nel caso siano stati utilizzati kit commerciali, sono state seguite le istruzioni riportate dalla casa produttrice.

Le sequenze del 16S rDNA di alcuni microrganismi isolati e del cluster *fcb* di *Arthrobacter* sp. FG 1 sono state depositate presso GenBank (*vedi* tab.3.1 Risultati).

In tabella 2.2 sono riportati i diversi oligonucleotidi usati per l'amplificazione del 16S rDNA, dei geni *fcb* di *Arthrobacter* sp. FG1 e per il loro sequenziamento, nonché per l'amplificazione delle regioni conservate della naftalene- e della fenantrene diossigenasi.

Per l'analisi e la manipolazione delle sequenze sono stati utilizzati i programmi: Clustal W 1.8 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) per l'allineamento di sequenze multiple, Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) e BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) per l'assemblaggio e l'analisi di sequenze nucleotidiche. L'utilizzo di tools informatici online è segnalato nel testo.

Tab. 2 Elenco dei primers utilizzati in questo lavoro:

16Sf	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	Amplificazione 16S rDNA
16Sr	5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3'	
MFI	5' - TCT CGA ACA CGT CGC CCA GGA ACT- 3'	Amplificazione cluster <i>fc</i> b (4.7 kb)
MF3	5' - CGA CCC TGT CCT AAC AGA CAT CCG - 3'	
M13 for	5' - TTG GGC ACC GGT GTTCATCAT- 3'	Sequenziamento del cluster <i>fc</i> b
M13 rev	5' - AGG GTG TTG CGA CTG TAC TTG - 3'	
516 for	5' - ACC CGT TGC GTG AGA GCC GTT - 3'	
579 rev	5' - CGA GCC CA T CCA TCA GAC AAC -3'	
1095 for	5' - TCA CGG C A T GGT AGT ACA GCG - 3'	
1213 rev	5' - CAG GTC TCG AA T TAC AAA TGA - 3'	
1723 for	5' - TTC GGC ACC GGT GTT GAT CAT - 3'	
1800 rev	5' - AGG GTG TTG CGA CTG TAC TTG - 3'	
Phn321F	5' - TTC TCG GTC GGG ACT TTC CAA - 3'	Amplificazione gene per la subunità grande della 3,4 fenantrene diossigenasi
Phn671R	5' - GGC AAC CAG ATC TGT CAT G - 3'	
NahAcF	5' – TGG CGA TGA AGA ACT TTT CC - 3'	Amplificazione gene per la subunità grande della naftalene diossigenasi
NahAcR	5' – AAC GTA CGC TGA ACC GAG TC - 3'	

2.4 Bioslurry

2.4.1 Preparazione dello slurry

Il suolo utilizzato è stato asciugato, setacciato con maglie da 2 mm e flottato in un becker per eliminare eventuali residui di materia organica che potessero ostacolare la lettura dei campioni all'HPLC. Lo slurry (1 L) è stato preparato utilizzando 100 g di suolo e 500 ml di acqua deionizzata ai quali sono stati poi aggiunti 500 ml di M9 2X che contenevano, o meno, l'appropriato ceppo batterico (concentrazione finale ca. 10^8 cfu/ml) e l'acido-4-cloro benzoico (concentrazione finale 3 mM). Quando richiesto, la sospensione di suolo in acqua veniva sterilizzata in autoclave (121°C, 20 minuti). I reattori bioslurry consistevano in vasi di vetro da 5 L con 1 L di slurry che venivano sistemati, al massimo 5 alla volta, in una macchina rotante (foto 1) che garantiva una miscelazione continua (100 rpm) e che operava a temperatura ambiente.



Foto 2.1: macchina rotante utilizzata per garantire la miscelazione dei bioslurry

2.4.2 Preparazione del campione

I campioni sono stati raccolti dagli slurry a intervalli di tempo diversi. Le concentrazioni batteriche sono state immediatamente valutate mediante conta vitale. Per monitorare le concentrazioni del 4-CBA e del 4-HBA, le aliquote di slurry sono state centrifugate e il surnatante conservato a -20°C fino alle analisi chimiche prima delle quali i campioni sono stati filtrati con un filtro PVDF \varnothing 25 mm con pori da $0,2\ \mu\text{m}$.

Le analisi venivano condotte come descritto al punto 2.2.1.

2.5 Ibridazione fluorescente *in situ* (FISH)

MATERIALI

- Vetrini portaoggetti gelatinati
- EtOH a diverse concentrazioni (50%, 70%, 96%)
- Soluzione di fissaggio
- Soluzione di lavaggio
- DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole)
- Vetrini coprioggetto
- Sonde marcate fluorescenti:
 - GAM42a (Gram negativi) 5'- GCCTTCCCACATCGTT-3'
 - diluita 1:10 per avere la sonda 50 ng/ml
 - HGC69a (Gram positivi) 5'- TATAGTTACCACCGCCGT-3'
 - diluita 1:10 per avere la sonda 50 ng/ml
- sonda competitiva:
 - BET42a competitor 5'- GCCTTCCCACATCGTT-3'
 - diluita 1:10 per avere la sonda 50 ng/ml

2.5.1 Preparazione dei vetrini (gelatinatura)

Ai vetrini portaoggetti utilizzati viene applicata una gelatina preparata ad una concentrazione dello 0.1% in presenza di $KCr(SO_4)$ allo 0.01%.

2.5.2 Fissaggio dei campioni

TAMPONE DI FISSAGGIO

H₂O distillata ml 40

Parafolmaldeide g 2

NaOH μ l 15

PBS 10X ml 5

Correggere il pH con HCl a 7-7.2

H₂O portare a volume di 50 ml

Per fissare 1 ml di campione lo si deve dividere in 5 parti da 200 μ l ad ognuna delle quali si aggiungono 600 μ l del tampone di fissaggio (1:3 v/v), quindi si lascia a 4°C per 3-16 ore. Si lava 2 volte con PBS 1X e si risospende in 60 μ l di PBS ognuno dei 5 sottocampioni, a questo punto è possibile riunirli (totale 300 μ l) e aggiungere 300 μ l di etanolo. I campioni vanno conservati a -20°C.

2.5.3 Ibridazione

1 μ l di campione viene depositato al centro di ogni vetrino portaoggetti e viene lasciato asciugare a 46°C per 20 minuti dopo i quali ogni vetrino viene messo in soluzione di EtOH a concentrazioni crescenti (50%, 70%, 96%) per 3 minuti, in modo da disidratare ulteriormente i campioni. A questo punto si procede a preparare il tampone di ibridazione secondo la tabella 2.3:

Tabella 2.3: TAMPONE DI IBRIDAZIONE

	Concentrazione Formamide									
	0%	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%	45%
Solution (μ l)										
NaCl 5M	180	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TRIS 1M pH 7	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Formamide	0	50	100	150	200	250	300	350	400	450
H ₂ O	800	750	700	650	600	550	500	450	400	350
SDS 10%	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Sul vetrino vanno 10 µl di miscela sonda-tampone, in proporzione 1:9 per i Gram positivi e in proporzione 2 (1 sonda + 1 competitore):8 per i Gram negativi. Per quanto riguarda i Gram negativi, quindi, sono state utilizzate due sonde molto simili che differiscono per un solo nucleotide, ma capaci di ibridare specificamente: una i γ proteobatteri e l'altra, non fluorescente, i β , in modo da eliminare ibridazioni aspecifiche. Si prepara una camera umida per ciascun vetrino utilizzando il tampone di ibridazione rimanente, corrispondente alla percentuale di formamide del vetrino: al 30% per Gam42a e al 25% per HGC69a. Vetrini e rispettive camere umide vendono poste in stufa a 46°C per almeno 90 minuti, periodo durante il quale avviene l'ibridazione. Nel frattempo si procede alla preparazione del tampone di lavaggio come spiegato in tabella 2.4

Tabella 2.4: TAMPONE DI LAVAGGIO

	Concentrazione Formamide									
	0%	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%	45%
Solution (µl)										
EDTA 0.5M	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TRIS 1M pH 7	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 5M	8900	6260	4400	3080	2150	1490	1020	700	460	300
H2O	Fino a 50ml									
SDS 10%	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Una volta trascorso il tempo necessario per l'ibridazione, i vetrini vengono posti nei rispettivi tamponi di lavaggio, preriscaldati, a 48 °C per 20 minuti dopo i quali vengono sciacquati con acqua deionizzata e lasciati asciugare per qualche minuto in stufa. Si procede, quindi, alla colorazione degli acidi nucleici con DAPI: con una pipetta pasteur si pone una goccia di DAPI su ogni vetrino e si lascia agire per 5 minuti al buio a temperatura ambiente, si sciacquano con acqua deionizzata e si asciugano in stufa per alcuni minuti. Il vetrino è così pronto per l'osservazione al microscopio a fluorescenza (Leica DM4000 B).

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Isolamento e identificazione di ceppi batterici capaci di crescere su IPA e cloroaromatici

Al fine di isolare microrganismi capaci di degradare, parzialmente o totalmente, idrocarburi aromatici policiclici e cloroaromatici, sono state allestite colture di arricchimento a partire da un campione di suolo derivante da un'area industriale inquinata da lungo tempo da idrocarburi aromatici policiclici e cloroaromatici. Antracene, fluorene, fenantrene, naftalene e acidi clorobenzoici erano i composti presenti in concentrazioni maggiori rispetto ad altri e sono, quindi, stati scelti come unica fonte di carbonio ed energia per l'arricchimento. Sono anche state allestite colture di arricchimento con i tre isomeri del clorotoluene, che pur non essendo stato rilevato nel suolo, poteva rappresentare un interessante composto modello. Un grammo di suolo è stato inoculato in terreno minerale M9 con l'aggiunta anche di acido nalidixico e fungizone per cercare di evitare la crescita, rispettivamente, di batteri Gram negativi e funghi e favorire, invece, quella di Gram positivi, per i quali è scarsa la letteratura relativa alla degradazione di composti poli e cloroaromatici.

Le colture allestite in presenza di IPA hanno richiesto dei tempi di crescita più lunghi rispetto a quelle con i substrati clorurati coi quali è relativamente più semplice selezionare nuovi microrganismi: per le prime era necessario almeno un mese affinché le colture mostrassero intorbidimento. Gli IPA, infatti, possiedono una bassissima solubilità in acqua, nell'ordine di grandezza delle parti per milione: la solubilità in acqua e, di conseguenza, la biodisponibilità diminuiscono quasi logaritmicamente con l'aumentare della massa molecolare, così composti con 2 o più anelli aromatici risultano di difficile biodegradazione. Una volta che le colture hanno mostrato incremento della biomassa, valutata come aumento della torbidità, sono state allestite semine di diluizioni seriali per ottenere colonie singole su terreno minerale in presenza dei substrati utilizzati per la selezione. Le colonie singole ottenute sono state prelevate e strisciate in terreno ricco per visualizzarne la morfologia di colonia. Nel corso del tempo, è stato così possibile isolare in coltura pura circa 75 ceppi la maggior parte dei quali, però, già al secondo inoculo in terreno selettivo non presentava crescita: soltanto una quindicina, per i quali è stata effettuata la colorazione di Gram ed è stata determinata la sequenza del 16S rDNA, sembrava all'apparenza utilizzare i substrati di isolamento (Tab. 1). Tuttavia, al termine di successivi passaggi in terreno selettivo, solo due ceppi capaci di crescere a spese del fenantrene e altri due capaci di sfruttare il naftalene come unica fonte di carbonio e di energia, hanno continuato a mostrare una crescita rilevabile, mentre per gli altri la capacità di produrre nuova biomassa sembrava diminuire nel tempo (vedi § 3.2).

Dalle colture di arricchimento allestite con i composti cloroaromatici è stato possibile isolare in coltura pura, nel giro di una ventina di giorni, un ceppo capace di degradare l'acido-4-Cl-benzoico, mentre dalle colture allestite con i tre isomeri del clorotoluene non è stato possibile ottenere alcun isolato.

I tempi necessari per selezionare e isolare in coltura pura i nuovi ceppi hanno permesso uno studio approfondito solo del ceppo isolato su acido-4-Cl-benzoico (sezione 3.3) mentre per quelli isolati su IPA è stata possibile solo una parziale caratterizzazione (sezione 3.2).

3.1.1 Analisi filogenetica: sequenziamento 16S rDNA

L'approccio oggi preferito nella tassonomia batterica è quello di analizzare il genotipo di un ceppo mediante l'analisi dei suoi acidi nucleici. Il metodo più usato prevede l'amplificazione e il sequenziamento del 16S rDNA; la sequenza ottenuta viene, poi, analizzata con il programma BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov) per verificare a quali sequenze presenti in banca dati risulti omologa e successivamente ricostruirne l'intorno filogenetico; ciò è stato fatto, per esempio per *Pseudomonas* sp. (in precedenza classificato come *P. stutzeri*) OX1 (Radice *et al.*, 2006) alla cui genotipizzazione ho collaborato.

In base alle sequenze ottenute, i microrganismi sono stati attribuiti ai generi presentati in tabella 3.1.

Tabella 3.1: sequenziamento del 16S rDNA dei ceppi che inizialmente mostravano crescita sui substrati di isolamento

Genere	Note	Numero d'accesso	Fonte di carbonio e di energia
<i>Kocuria</i>	High GC Gram ⁺	DQ238835	FENANTRENE
<i>Sphingobium</i>	a-proteobacteria	DQ238831	
<i>Staphylococcus</i>	Eubacteria	DQ238832	
<i>Kocuria</i>	High GC Gram ⁺	DQ238833	
<i>Staphylococcus</i>	Eubacteria	DQ238834	
<i>Sphingobium</i>	a-proteobacteria		
<i>Micrococcus</i>	High GC Gram ⁺	DQ238827	FLUORENE
<i>Dermacoccus</i>	High GC Gram ⁺	DQ238836	
<i>Staphylococcus</i>	Eubacteria	DQ238828	
<i>Lactobacillus</i>	Eubacteria	DQ238829	
<i>Micrococcus</i>	High GC Gram ⁺	DQ238837	
<i>Curtobacterium</i>	High GC Gram ⁺	DQ238838	ANTRACENE
<i>Microbacterium</i>	High GC Gram ⁺	DQ238830	
<i>Micrococcus</i>	High GC Gram ⁺	DQ238839	
<i>Pseudomonas</i> sp. PILH1	Gram ⁻		NAFTALENE
<i>Pseudomonas</i> sp.A	Gram ⁻		
<i>Arthrobacter</i> sp. FG 1	High GC Gram ⁺	AM113544	4-CBA

Il sequenziamento del 16S rDNA ha permesso, così, di attribuire al genere *Arthrobacter* il ceppo, denominato in seguito FG1, capace di crescere su acido-4-Cl-benzoico. Gli isolati su fenantrene sono stati attribuiti al genere *Sphingobium*, mentre quelli isolati su naftalene al genere *Pseudomonas*.

Come si può notare, nonostante l'utilizzo di inibitori dei Gram⁻ e delle muffe nelle colture di arricchimento, i microrganismi isolati sono risultati appartenere sia ai Gram positivi che ai Gram negativi, suggerendo che le condizioni di arricchimento da noi adottate non fossero sufficientemente selettive.

3.2 Iniziale caratterizzazione dei ceppi batterici isolati su IPA

Per tutti i ceppi isolati in coltura pura sono state allestite prove di crescita in terreno minerale M9, sia solido sia liquido, in presenza dei substrati di isolamento forniti come unica fonte di carbonio e di energia. La maggior parte degli isolati ha mostrato, nei successivi passaggi in terreno selettivo, una crescita sempre più scarsa fino ad avere, in solido, colonie puntiformi simili a quelle ottenute nei controlli privi di substrato. Situazione analoga si è verificata nelle prove in terreno liquido, nelle quali, nonostante l'aggiunta di estratto di lievito come suggerito in alcuni articoli, l'incremento della biomassa era scarso o addirittura nullo.

Questi risultati sembrano suggerire che gli isolati identificati come *Kocuria*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Dermacoccus*, *Lactobacillus*, *Curtobacterium* e *Microbacterium* non siano realmente in grado di crescere, almeno nelle condizioni colturali adottate, a spese dei substrati forniti. È quindi possibile che questi ceppi fossero semplicemente resistenti agli inquinanti e nei primi passaggi degli arricchimenti crescessero a spese dei prodotti di lisi di altre cellule. Alternativamente, è possibile pensare che, in natura, i microrganismi sopra citati trovassero nel suolo elementi necessari per la loro crescita che non erano invece presenti nelle nostre colture, o, alternativamente, che vivessero in consorzi microbici che non siamo riusciti a ricreare in laboratorio nei quali svolgessero solo una o poche tappe del processo degradativo, instaurando rapporti sinergici con gli altri membri della comunità. Per verificare se questi microrganismi abbiano o meno una qualche capacità catabolica nei confronti dei composti utilizzati potrebbe essere interessante cercare, nel loro genoma, la presenza di sequenze omologhe a geni catabolici.

I microrganismi che invece hanno mostrato crescita significativa sul loro substrato di isolamento erano i due ceppi isolati su fenantrene e appartenenti al genere *Sphingobium*, e i due isolati su naftalene appartenenti al genere *Pseudomonas*. La loro crescita in condizioni selettive era comunque piuttosto lenta e, pertanto, dopo l'isolamento e l'identificazione, è stato possibile effettuare solo un numero limitato di test, che hanno permesso una caratterizzazione molto preliminare.

I due ceppi di *Sphingobium*, chiamati 4 e X per differenziarli, sono stati seminati in terreno minerale agarizzato in presenza di glucosio o di fenantrene. Le colonie cresciute sulle piastre con glucosio risultavano simili a quelle che si avevano normalmente dalla crescita in terreno ricco LD e cioè grosse, dal colore giallo/arancione e dai bordi netti. In presenza di fenantrene, invece, le colonie apparivano medio-grandi e brune, colore tipico dell'ossidazione di composti aromatici; mentre in assenza di substrato le colonie apparivano puntiformi (Tab 3.2):

Tabella 3.2: confronto delle morfologie di colonia dei due *Sphingobium* su diversi substrati

Substrato	Morfologia Col.4	Morfologia Col.X	Tempo di crescita
Glucosio	Colonie giallo/arancioni coi bordi netti da 3-4 mm	Colonie giallo/arancioni coi bordi netti da 3-4 mm	1-2 giorni
Fenantrene	Colonie brune da 5-6 mm	Colonie brune da 5-6 mm	1 mese
Nessuno	Colonie puntiformi	Colonie puntiformi	più di 1 mese

I due ceppi di *Pseudomonas*, in terreno solido e, in presenza di naftalene, hanno prodotto colonie di colore bruno ben visibili a occhio nudo dopo 10 giorni di incubazione. Inoltre per il

ceppo PILH1 non è stata osservata alcuna crescita in presenza di toluene, fluorene, fenantrene o antracene come uniche fonti di carbonio e di energia, anche se in presenza di fluorene si è osservato l'accumulo di un composto di colore giallo nel terreno (Tabella 3.3). Anche il ceppo A non presentava crescita su toluene, fenantrene o antracene, ma su fluorene formava colonie medio-piccole trasparenti, ma con un alone giallo verosimilmente dovuto all'accumulo di prodotto parzialmente ossidato come era stato osservato per il ceppo prima descritto.

Tabella 3.3: Prove di crescita delle due *Pseudomonas* su diversi substrati e in terreno solido

CEPPO	SUBSTRATO				
	Antracene	Fenantrene	Fluorene	Naftalene	Toluene
<i>Pseudomonas</i> sp. PILH1	-	-	-	Colonie di 3-4 mm	-
<i>Pseudomonas</i> sp.A	-	-	Colonie trasparenti da 3-4 mm	Crescita massiva	-

Ulteriori prove di crescita sono state condotte in terreno liquido. In presenza di fenantrene, i due ceppi di *Sphingobium* hanno mostrato un incremento di biomassa, misurata come Densità Ottica, dopo non più di una settimana di incubazione; l'incremento della biomassa era accompagnato dall'accumulo di un composto di colore arancione che potrebbe essere un intermedio parzialmente ossidato della degradazione del substrato. Nelle colture allestite in presenza di antracene e naftalene, che pure non mostravano un aumento della biomassa, è invece stato osservato l'accumulo, rispettivamente, di un composto di colore bruno e di un composto di colore arancione, suggerendo che tali substrati, pur non essendo in grado di sostenere la crescita dei microrganismi in esame possano comunque subire una parziale ossidazione. In presenza di fluorene o toluene le colture non hanno invece mostrato alcuna crescita, né è stato possibile dedurre l'accumulo di intermedi parzialmente ossidati.

Per quanto riguarda i due ceppi di *Pseudomonas*, una sola notte di incubazione a 30°C in presenza di naftalene, è sufficiente per ottenere un'abbondante biomassa, mentre anche dopo dieci giorni di incubazione in presenza di toluene, fluorene, fenantrene o antracene, non è stata osservata crescita, anche se in presenza di fluorene e di fenantrene si è avuto accumulo di un composto giallo (Tab. 3.4):

Tabella 3.4: prove crescita dei due *Sphingobium* e delle due *Pseudomonas* in liquido e con diversi substrati

CEPPO	SUBSTRATO									
	Antracene		Fenantrene		Fluorene		Naftalene		Toluene	
	Aspetto coltura	OD ₆₀₀ nm	Aspetto coltura	OD ₆₀₀ nm	Aspetto coltura	OD ₆₀₀ nm	Aspetto coltura	OD ₆ 00nm	Aspetto coltura	OD ₆₀₀ nm
<i>Sphingobium</i> Col.4	Bruna	<0,1	Arancione	0,3	Incolore	<0,1	Arancione chiaro	<0,1	Incolore	<0,1
<i>Sphingobium</i> Col.X	Bruna	<0,1	Arancione	0,5	Incolore	<0,1	Arancione chiaro	<0,1	Incolore	<0,1
<i>Pseudomonas</i> sp. PILH1	Incolore	<0,1	Giallo chiaro	<0,1	Incolore	<0,1	Incolore	1,14	Incolore	<0,1
<i>Pseudomonas</i> sp.A	Incolore	<0,1	Giallo chiaro	<0,1	Giallo chiaro	<0,1	Incolore	1,57	Incolore	<0,1

I dati sopra illustrati suggeriscono che alcuni dei substrati saggiati, pur non sostenendo la crescita, possano almeno venire parzialmente ossidati. Ciò potrebbe essere dovuto allo spettro di substrato degli enzimi implicati nell'ossidazione del substrato di isolamento o di altri substrati analoghi. Mentre in colture di laboratorio l'accumulo di tali composti potrebbe determinare tossicità cellulare, all'interno della comunità microbica naturale questi intermedi potrebbero venire ulteriormente degradati da altri membri della comunità, che contribuirebbero quindi ad evitarne l'accumulo e gli eventuali effetti tossici.

3.2.1 Test indolo e catecolo

Nella degradazione degli IPA intervengono ossigenasi che idrossilano e aprono, una alla volta, gli anelli aromatici fino alla completa degradazione del composto stesso. Le reazioni iniziali delle vie cataboliche che incanalano composti aromatici strutturalmente diversi verso uno dei substrati che possono venire linearizzati consistono nell'introduzione di uno o due gruppi idrossilici sul substrato aromatico. Di solito, l'iniziale idrossilazione di composti aromatici policiclici è catalizzata da diossigenasi che incorporano due atomi di ossigeno molecolare a produrre un *cis*-diidrodiole. La progressiva demolizione degli anelli porta in seguito alla formazione di un composto diidrossilato che funge da substrato per gli enzimi che aprono l'anello aromatico: questo è un passaggio obbligatorio per la mineralizzazione aerobica di composti aromatici ed è quasi sempre eseguito da ossigenasi che incorporano due atomi di ossigeno nei substrati (Harayama and Timmis). In molti casi il composto monoaromatico diidrossilato che si forma nella degradazione degli IPA è il catecolo.

Abbiamo voluto verificare se nei ceppi isolati fossero presenti ossigenasi di vie periferiche e di apertura dell'anello. A tal fine sono stati effettuati dei semplici test colorimetrici: il test dell'indolo, che permette di verificare la presenza di ossigenasi periferiche e il test del catecolo, per verificare la presenza di diossigenasi capaci di aprire l'anello aromatico in

posizione extra-diolo, una modalità di apertura piuttosto comune nella degradazione degli IPA.

Il test dell'indolo si basa sulla capacità di molte ossigenasi implicate nelle reazioni iniziali della via catabolica di ossidare un composto generico, l'indolo, producendo indaco, facilmente rilevabile per la sua caratteristica colorazione blu. A sospensioni di cellule non proliferanti dei diversi microrganismi è quindi stato aggiunto indolo e dopo un'ora è stato osservato, in tutti i casi, accumulo di indaco.

Per il secondo test ad una coltura ben cresciuta e risospesa in tampone fosfato è stato aggiunto del catecolo: pressoché immediatamente la coltura ha virato al giallo, colorazione tipica della semialdeide idrossimuconica, prodotto di apertura in posizione extra-diolo dell'anello aromatico.

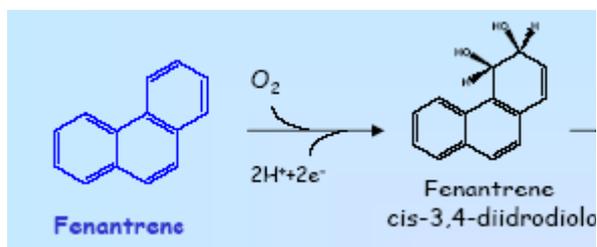
Nei microrganismi da noi isolati sono quindi presenti sia ossigenasi periferiche che diossigenasi capaci di aprire l'anello aromatico che potrebbero essere implicate nella degradazione degli IPA.

3.2.2 Approccio preliminare per l'identificazione di ossigenasi periferiche

Come approccio preliminare all'identificazioni e all'isolamento di ossigenasi periferiche coinvolte nel catabolismo degli IPA, abbiamo scelto di ricercare, mediante amplificazione, sequenze geniche codificanti per le parti maggiormente conservate di questi enzimi.

Per i ceppi di *Sphingobium* è stato scelto uno dei geni del cluster che codificano per la 3,4 fenantrene diossigenasi, l'enzima coinvolto nel passaggio iniziale della degradazione del fenantrene (Demanèche *et al.*, 2004) (Fig. 3.1).

Figura 3.1: primo passaggio nella degradazione del fenantrene



L'amplificazione per PCR è stata condotta sul DNA genomico dei microrganismi oggetto di studio utilizzando i primer Phn321F e Phn671R, disegnati su una regione di 350 pb di *phnA1* che codifica per la subunità grande del complesso diossigenasico e ha prodotto un frammento di circa 350 bp, cioè di dimensioni coerenti con quanto riportato in letteratura (Cavalca *et al.*, 2006).

Il sequenziamento del prodotto di amplificazione e il successivo confronto con le sequenze nucleotidiche riportate nelle banche dati (www.ncbi.nlm.nih.gov) ha evidenziato un livello di omologia molto elevato con almeno tre delle sequenze presenti nel data base (Tab. 3.5).

Tabella 3.5: confronto delle sequenze amplificate dai due *Sphingobium* coi primer per il geni della subunità grande della 3,4-fenantrene diossigenasi

Numero d'accesso	Descrizione	Query coverage
CP000676.1	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444 plasmid pNL1, complete sequence	99%
AF079317.1	<i>Sphingomonas aromaticivorans</i> plasmid pNL1, complete plasmid sequence	99%
DQ345316.1	<i>Novosphingobium</i> sp. phe-8 PAH ringhydroxylating dioxygenase alpha subunit (PhnAc) gene, partial cds	88%

Le due sequenze che presentano maggiore omologia sono localizzate sul plasmide pNL1 (ca. 180 kbp) di *Novosphingobium aromaticivorans* e di *Sphingomonas aromaticivorans* F199, di cui si conosce la sequenza completa. Su pNL1 sono state trovate 186 ORF che codificano per proteine, 79 delle quali sono direttamente associate con il catabolismo o il trasporto di composti aromatici. In particolare sono stati identificati sette set di componenti ossigenasiche che sembrano interagire con un solo set di componenti ferredossiniche e reduttasiche. Questo insolito arrangiamento di geni associati a diverse vie degradative sembrerebbe contribuire alla versatilità di questi microrganismi e si ipotizza che si sia evoluto in risposta a meccanismi biochimici simili richiesti per la degradazione di intermedi presenti in vie diverse (Romine *et al.* 1999).

Per quanto riguarda i due ceppi di *Pseudomonas*, è stata eseguita un'analisi molecolare per verificare la presenza della naftalene diossigenasi. Nella reazione di PCR si sono utilizzati i primer NahAcF e NahAcR che amplificano i geni per la subunità grande, α , della naftalene diossigenasi di *P. putida* G7 nella quale è presente un centro Rieske [2Fe-2S] (Simmon M.J. et al., 1993). La reazione di amplificazione ha prodotto ampliconi della dimensione attesa e cioè di circa 1000 pb (Allegato 1 e 2). Il successivo sequenziamento e il confronto con le sequenze nucleotidiche riportate in banca dati (www.ncbi.nlm.nih.gov), ha permesso di verificare che gli amplificati avevano un'alta omologia con naftalene diossigenasi isolate da diverse *Pseudomonas* (Tab.3.6):

Tabella 3.6: confronto delle sequenze amplificate dalle due *Pseudomonas* coi primer per il geni della subunità grande della naftalene diossigenasi

Numero d'accesso	Descrizione	Query coverage
D84146.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> pah genes for 12 ORFs (components of naphthalene dioxygenase, dehydrogenase, hydratase-aldolase, isomerase)	99%
AF039533.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> naphthalene degradation upper-pathway gene cluster (nahAa, nahAb, nahAc, nahAd, nahB, nahF, nahC, nahE, and nahD) and transposon-like protein (tnpA1) gene, complete cds	99%
AY196829.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> isolate 67 naphthalene dioxygenase iron sulfur protein (nahAc) gene, partial cds	95%

Poiché i primer utilizzati per l'analisi sopra descritta sono stati disegnati sulle regioni più conservate di ossigenasi periferiche implicate nella degradazione del fenantrene o del naftalene, i dati ottenuti non ci permettono di trarre conclusioni sulle caratteristiche biochimiche delle ossigenasi presenti nei microrganismi da noi analizzati. A questo scopo sarebbe utile clonare i geni codificanti ed esprimerli in un ospite eterologo. Questo progetto potrebbe pertanto proseguire con la costruzione di librerie genomiche dei ceppi in esame, librerie dalle quali si potrebbero isolare i cloni contenenti i geni di interesse mediante ibridazione su colonia, utilizzando come sonde i prodotti di amplificazione caratterizzati in questo lavoro.

3.3 Caratterizzazione dell'isolato su acido 4-clorobenzoico

Il ceppo isolato dalle colture di arricchimento su 4-CBA e identificato come *Arthrobacter* cresce in modo più abbondante e molto più rapidamente dei ceppi isolati su IPA. In terreno minerale addizionato di 4-CBA 3 mM, dopo una iniziale fase di latenza di ca. 25 ore si raggiungeva, in poco più di un giorno, la fase stazionaria, a una OD 540 nm di circa 0.45 (fig. 3.2) Queste sue caratteristiche hanno reso possibile studiarne in maggior dettaglio le caratteristiche biochimiche e genetiche.

In collaborazione con la Dott.ssa Orlandi e con la Dott.ssa Radice, del mio stesso laboratorio, e con il Prof. Reineke dell'Università di Wuppertal, che si sono occupati soprattutto degli aspetti biochimici, è stato possibile individuare, mediante analisi HPLC, il primo intermedio di degradazione del 4CBA che è risultato essere l'acido 4-idrossibenzoico (4-HBA). Inoltre, la scomparsa del substrato coincideva con l'incremento della concentrazione di cloruri nel

mezzo (fig. 3.2). Non è invece stato possibile isolare gli intermedi successivi a causa della loro alta velocità di scomparsa.

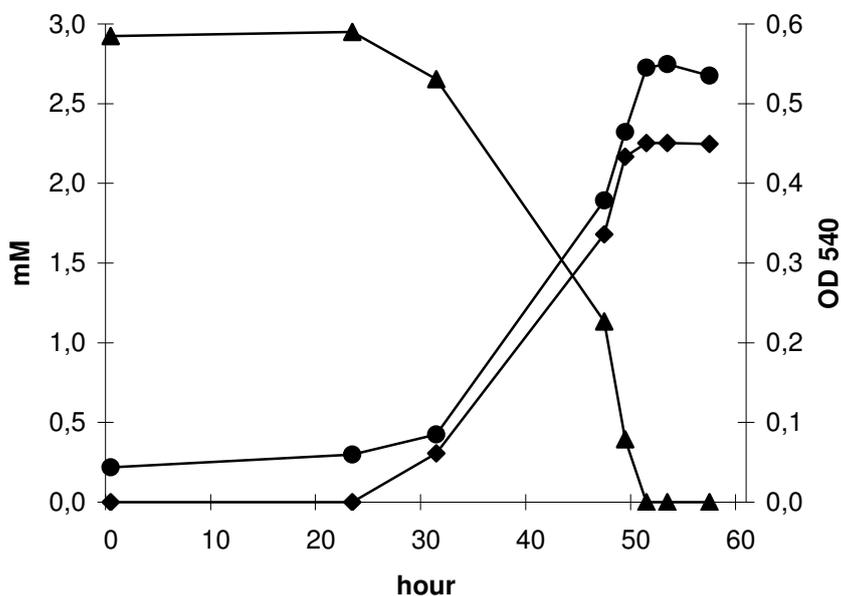


Fig. 3.2: Scomparsa di 4-CBA (triangolo) e liberazione di cloruri (pallino) durante la crescita di *Arthrobacter* sp. FG I (rombo)

L'identificazione del 4-HBA come intermedio e il rilascio stechiometrico di cloro ha suggerito che la dealogenazione avvenisse durante la prima reazione della degradazione del 4-CBA attraverso l'inserimento di un gruppo ossidrilico. In diversi casi, le vie degradative di acidi clorobenzoici non sono dotate di un sistema enzimatico specifico per la liberazione del cloro. In questi casi, le molecole clorurate seguono la via degradativa dell'acido benzoico, che prevede l'allontanamento del gruppo carbossilico con una reazione che non viene disturbata dalla presenza dell'alogeno. Queste vie convergono, quindi, verso il 3- o il 4-clorocatecolo che viene successivamente aperto, grazie ad una catecolo 1,2 diossigenasi, formando come intermedio il 2- o il 3-cloro-*cis,cis*-muconato. Questo intermedio è molto instabile e spontaneamente elimina Cl⁻ sfruttando le caratteristiche dello stesso come buon gruppo uscente. Al contrario *Arthrobacter* sp. FG1 è in grado di dealogenare la molecola durante le prime reazioni della via catabolica. Dai dati presenti in letteratura sembra possibile ritenere che anche in *Arthrobacter* sp. FG1 questa reazione sia catalizzata da uno specifico sistema enzimatico che idrolizza il composto (Fetzner *et al*, 1994).

3.3.1 Identificazione e sequenziamento dei geni *fc*b in *Arthrobacter* sp. FG1

Analisi Southern

Per verificare se in *Arthrobacter* FG1 fossero presenti geni codificanti per una dealogenasi idrolitica è stata allestita un'analisi Southern utilizzando come sonda l'intero operone *fc*b di *Arthrobacter* sp. SU, contenuto nel frammento *Sac*I di 6,6 kb, derivante dal plasmide pAS5 (Schmitz *et al*, 1992). Il DNA genomico di *Arthrobacter* sp. FG1 è stato, quindi, estratto, digerito con diversi enzimi di restrizione e sottoposto ad ibridazione durante la quale sono state utilizzate condizioni di stringenza intermedia in quanto la sonda e il DNA impiegati appartengono a microrganismi dello stesso genere e si ritiene quindi che presentino omologia piuttosto elevata.

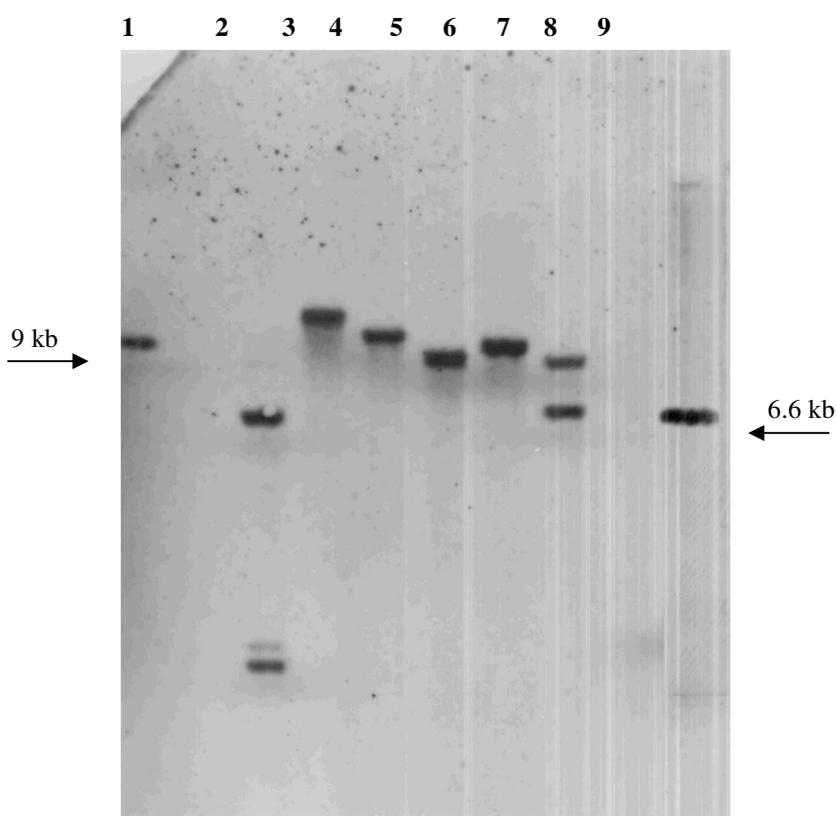


Figura 3.3: Ibridazione Southern: come sonda è stato utilizzato il frammento *Sac*I di 6.6 kb exciso da pAS5. Tale frammento contiene l'intero operone *fc*b di *Arthrobacter* sp. SU.

1: pAS5 digerito *Xba*I (9 kb) DNA genomico di *Arthrobacter* sp. FG1 digerito con: 2- *Bam*HI 3- *Eco*RI 4- *Sac*I 5-*Xmn*I 6- *Pst*I 7- *Kpn*I 8- DNA genomico di *Pseudomonas* sp. OX1 9- sonda: frammento *Sac*I (6.6 kb) derivante da pAS5.

Analizzando la lastra (fig. 3.3) si possono osservare segnali di ibridazione a livello di tutte le digestioni del DNA genomico di *Arthrobacter* sp. FG1 e, come atteso, un singolo segnale d'ibridazione è presente sia in corrispondenza del frammento *Sac*I di 6.6 kb utilizzato come sonda (corsia 9), sia a livello del plasmide pAS5 linearizzato con *Xba*I (9 kb, corsia 1); il controllo negativo non mostra alcun segnale (corsia 8). Dai risultati ottenuti con questa

ibridazione è possibile non soltanto confermare l'esistenza in *Arthrobacter* sp. FG1 di sequenze omologhe ai geni *fcB* di *Arthrobacter* sp. SU, ma anche ipotizzare una buona similarità di sequenza nucleotidica tra i geni di questi due microrganismi.

3.3.2 Amplificazione delle sequenze omologhe ai geni *fcB*

Dopo aver confermato l'esistenza, in *Arthrobacter* sp. FG1, di sequenze omologhe ai geni *fcB*, si è proceduto alla loro amplificazione e isolamento. Per la reazione di amplificazione sono stati utilizzati primer disegnati fedelmente sulla base dell'allineamento delle sequenze nucleotidiche note dei geni per la dealogenasi di altri due ceppi di *Arthrobacter*: *Arthrobacter* sp. TM1, in cui il cluster *fcB* è stato localizzato a livello cromosomico (GenBank Accession number: AF042490), e *Arthrobacter* sp. SU che presenta invece questi geni a livello plasmidico (GenBank Accession number: AF030397). L'allineamento è stato effettuato utilizzando il programma ClustalW (<http://ebi.ac.uk/clustalW/>). L'oligonucleotide MF1 è stato disegnato in corrispondenza del primo nucleotide della sequenza clonata da *Arthrobacter* sp. SU in modo da comprendere nel prodotto di amplificazione le tre ORF del cluster genico *fcB*, che sono ritenute fondamentali per l'espressione dell'attività dealogenasica (Fig. 3.4) (Schmitz *et al.*, 1992). L'oligonucleotide MF3 è stato disegnato 25 bp a valle del codone di stop del gene *fcBC* in modo che l'amplificazione con il primer MF1 potesse portare all'amplificazione dell'intero operone *fcB* (Fig. 3.4). L'amplificazione con i primer MF1 e MF3 ha prodotto un frammento di circa 4.7 kb, in accordo con le lunghezze attese sulla base delle sequenze utilizzate per l'allineamento.

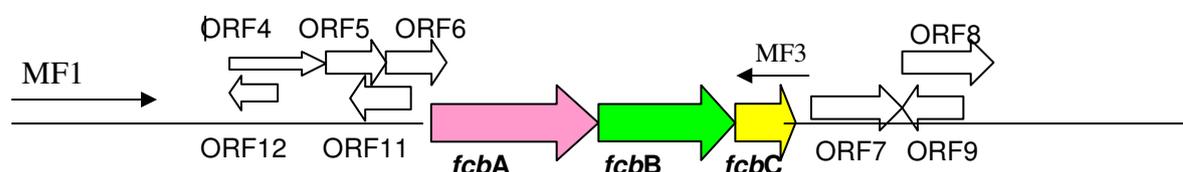


Figura 3.4: organizzazione dei geni *fcB* in ceppi di *Arthrobacter*

- (a) Regione a monte delle ORF5, ORF6, ORF 11
- (b) Regione centrale contenente *fcBA*, *fcBB* e *fcBC*
- (c) Regione a valle delle ORF8, ORF9 e ORF7

La mappa non è in scala.

3.3.3 Sequenza ed analisi funzionale delle sequenze clonate in *E.coli*

Il prodotto di amplificazione di 4.7 kb è stato clonato in pGEMT easy (Promega) e in seguito trasferito, come frammento EcoRI, nel vettore ad alto numero di copie pUC18, sotto il controllo del promotore Plac, originando il costrutto pDH4 (Fig. 3.5b). Questo costrutto è stato usato per trasformare cellule elettrocompetenti di *E.coli* JM109. La bontà del clonaggio è stata verificata testando la presenza del frammento di interesse nei cloni ricombinanti sia mediante PCR da colonia sia mediante analisi di restrizione del DNA plasmidico.

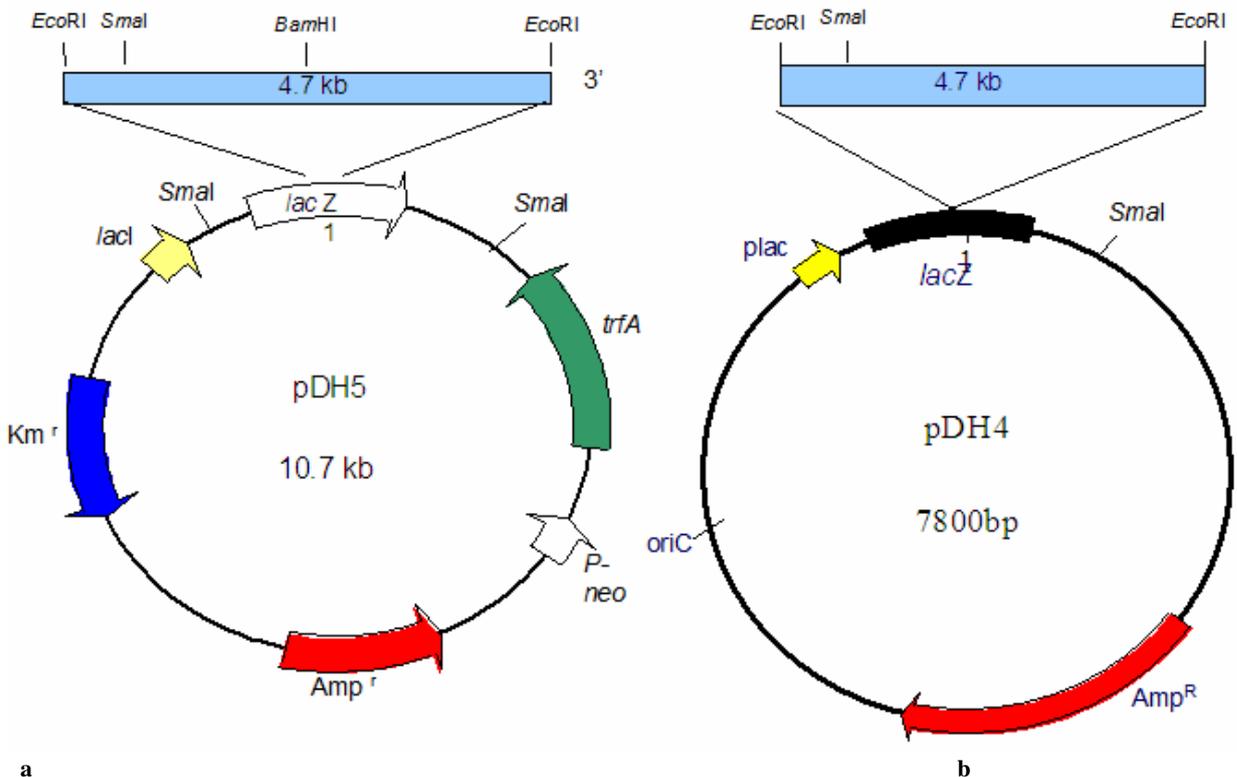


Figura 3.5: (a) costrutto pDH5: frammento amplificato di 4.7 kb clonato nel sito *EcoRI* del vettore pJB3KmD (b) costrutto pDH4: frammento amplificato di 4.7 kb clonato nel sito *EcoRI* del vettore pUC18.

3.3.4 Sequenziamento

Il costrutto pDH4 è stato utilizzato per il sequenziamento della regione clonata. A tale scopo sono stati utilizzati inizialmente i primer universali M13for e M13rev che si appaiano alle due estremità del polylinker del vettore pUC18. Sulla base delle sequenze parziali ottenute sono stati disegnati dei primer più interni (Tab 2, Materiali e Metodi), utilizzati per proseguire il sequenziamento, in modo da coprire interamente la regione di interesse. Le sequenze parziali sono state assemblate fino ad ottenere l'intera sequenza di 4781 bp, depositata in GenBank (accession number AM231748). Tale sequenza è stata quindi confrontata successivamente con le sequenze presenti in banca dati utilizzando il programma Blastn (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). La sequenza ottenuta ha mostrato elevata omologia

con sequenze nucleotidiche codificanti per il complesso della dealogenasi, appartenenti ad altri ceppi di microrganismi del genere *Arthrobacter*. Utilizzando il programma ORF Finder disponibile on-line (<http://ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), è stato possibile identificare sequenze potenzialmente codificanti per proteine evidenziando le diverse *orf*. Le ipotetiche *orf* sono state comparate tramite il programma Blastx che compara la sequenza nucleotidica immessa, tradotta in tutti i frame di lettura, con le sequenze aminoacidiche depositate in banca dati (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Questo procedimento è stato effettuato per tutte le *orf* identificate. L'analisi della sequenza ha rivelato la presenza di tre grandi ORF (ORFIV, ORF1, ORF2 e ORF3), trascritte nella stessa direzione. ORFIV (316-1005) codifica per una ipotetica proteina di 229 aminoacidi e mostra un'identità di sequenza del 99% con ORFA di *Arthrobacter* sp. SU e ORF IV di *Arthrobacter* sp.TM1, la cui funzione è tutt'ora sconosciuta. ORF1 (2411-3427) codifica per una proteina di 468 aminoacidi, con un peso molecolare dedotto di 50,900. Il codone di inizio ATG è preceduto da una sequenza di Shine Dalgarno (AGAA) e da una sequenza riconducibile a un ipotetico promotore (regioni -35 e -10, localizzate rispettivamente 186 e 237 nucleotidi a monte dal codone di inizio). ORF2 (3424-4254) codifica per una proteina di 276 aminoacidi con un peso molecolare di 29,800. ORF3 (4254-4709) codifica per una proteina di 151 aa con un peso molecolare dedotto di 16,400. I codoni di inizio sia di ORF2 che di ORF3 risultano sovrapposti al codone di stop della ORF che li precede. A monte della ORF IV sono state trovate inoltre sequenze parziali, riconducibili a una ipotetica trasposasi (*tnpA*) e una sequenza ripetuta invertita, che potrebbero essere coinvolte in meccanismi di trasferimento genico orizzontale. Il confronto della sequenza nucleotidica e di quella aminoacidica dedotta di ORF1, ORF2 e ORF3, ha rivelato un'elevata percentuale di identità (99-100%) rispettivamente con i geni *fcxA*, *fcxB* e *fcxC* e con i relativi prodotti genici (4-CBA-CoA ligasi; 4-CBA-CoA dealogenasi, 4-HBA-CoA-tioesterasi) di altri ceppi di *Arthrobacter* in grado di utilizzare il 4-CBA. Considerate le elevate omologie di sequenza nucleotidica ed aminoacidica delle *orf* individuate con i geni *fcx* degli altri ceppi di *Arthrobacter*, si è ritenuto di poter affermare che tali ORF effettivamente corrispondano ai geni codificanti per l'attività dealogenasica di *Arthrobacter* sp. FG1 e sono stati quindi condotti esperimenti volti a valutarne la funzionalità, saggiandone in primo luogo l'espressione in *E. coli*.

3.3.5 Analisi funzionale delle sequenze clonate in *E. coli*

a) Saggio colorimetrico:

I cloni di *E.coli* JMI09/pDH4 sono stati utilizzati per allestire un saggio colorimetrico volto a valutare l'attività dealogenasica imputabile all'espressione dei putativi geni *fcB* di *Arthrobacter* sp. FG1. Seguendo la metodica suggerita da Holloway *et al.* (1998) alcuni cloni trasformati con pDH4 sono stati replicati su un filtro di nitrocellulosa sterile e fatti crescere o.n. su piastre di terreno ricco (LB). Successivamente il filtro è stato posizionato su una piastra indicatrice, contenente 4-CBA, IPTG e rosso fenolo come indicatore di pH. Le piastre sono state incubate a 37°C per un periodo variabile tra 10 min e 2 ore. Poiché l'attività dealogenasica comporta il rilascio di ioni H⁺ e Cl⁻, e un conseguente abbassamento di pH del mezzo, si osserva viraggio di colore da rosso a giallo intorno alle colonie trasformanti che esprimono tale attività. Il viraggio dell'indicatore è stato osservato sia con le cellule di *E.coli* JM109 trasformate con pAS5 (controllo positivo) che con quelle trasformate con pDH4, mentre non è stato osservato alcun cambiamento di colore con le cellule trasformate con il solo vettore pUC 18 (controllo negativo) (Fig. 3.6). Questo dato dimostra che il frammento di 4.7 kb clonato da *Arthrobacter* sp. FGI effettivamente codifica per un'attività dealogenasica e che tale attività può essere espressa in un ospite eterologo.

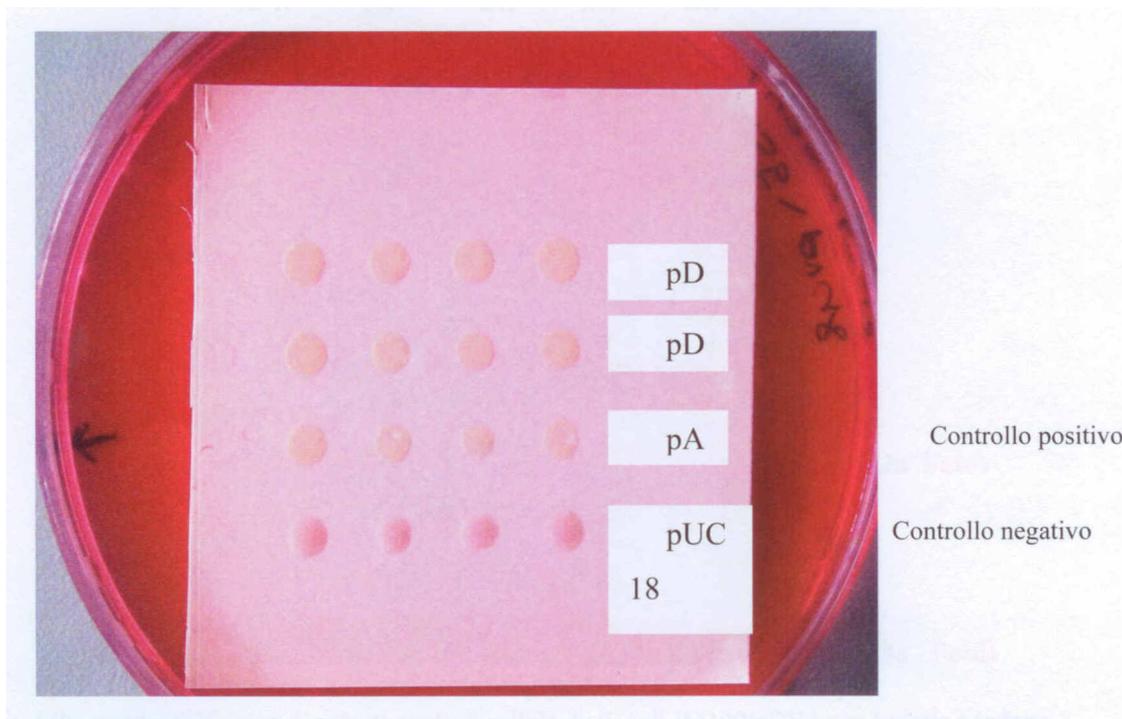


Figura 3.6: Saggio colorimetrico su piastra, si nota il viraggio di colore dei cloni di *E. coli* JM 109 (pDH4) e *E.coli* JM109 (pAS5) che esprimono attività dealogenasica; *E. coli* JM 109 (pUC 18), controllo negativo

b) Analisi dei prodotti genici:

Per verificare quali e quante proteine vengono codificate dal frammento clonato nel vettore

pUC18 è stata eseguita un'analisi SDS-PAGE. Sono state analizzate le proteine solubili in cellule non indotte e indotte con IPTG per tempi crescenti. Il pattern proteico è stato controllato mediante SDS-PAGE di campioni prelevati prima e dopo l'induzione. Come si può osservare (Fig. 3.7), già dopo 3 ore di induzione con IPTG (corsia 4), sono visibili due bande con un peso molecolare stimato di circa 50 e 30 kDa, che non sono invece presenti nel campione non indotto (corsia 2). Tali dimensioni sono in accordo sia con le dimensioni teoriche calcolate in base alla sequenza aminoacidica dedotta di ORF1 e ORF2 che con le dimensioni stimate per le proteine FcbA e FcbB dei ceppi di *Arthrobacter* sp. SU e sp. TM1. Non si riscontrano bande significative che attestino la presenza di una terza proteina corrispondente al prodotto di ORF3. Questo dato è in accordo con quanto riportato in letteratura per la proteina FcbC di *Arthrobacter* sp. SU che risulta essere insolubile. Questo risultato, unitamente a quello ottenuto con il saggio colorimetrico, conferma che le *orf* individuate mediante l'analisi della sequenza corrispondono ai geni *fcb* isolati da altri ceppi di *Arthrobacter*.

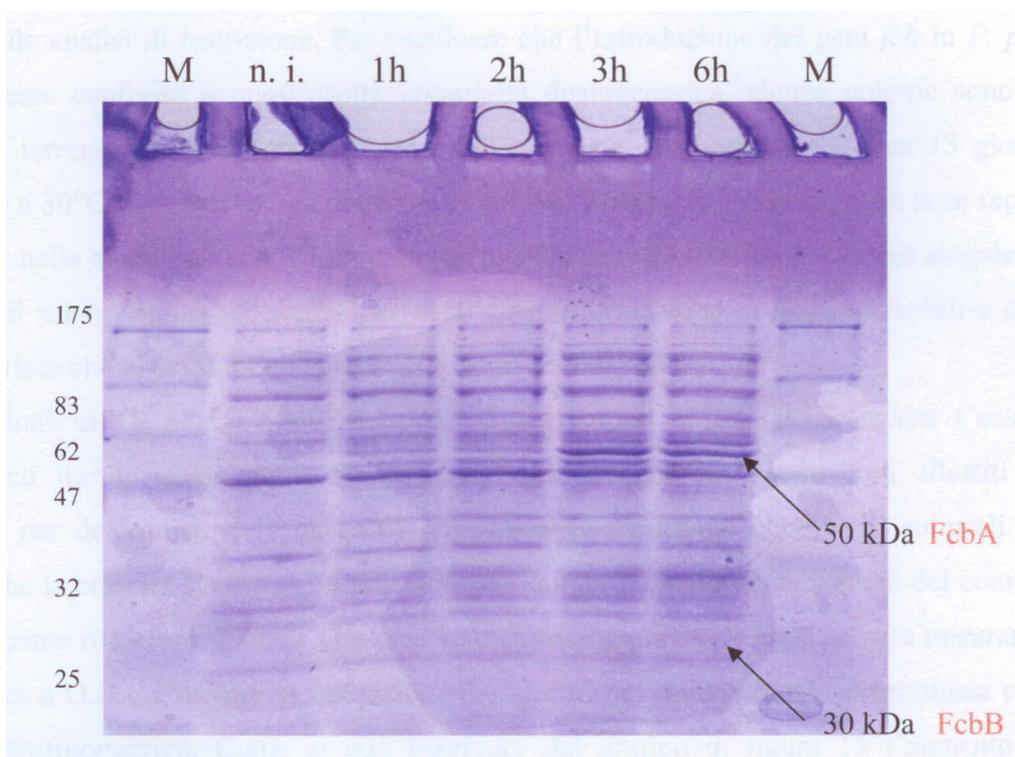


Fig. 3.7: Analisi SDS-page di estratti crudi di cellule di *E. coli* JM 109/pDH4 non indotte e indotte con IPTG per 1h, 2h, 3h, 6h.

3.4 Costruzione di un ceppo ingegnerizzato e studio delle sue potenzialità nel risanamento di suoli contaminati

3.4.1 Clonaggio dei geni *fcb* in *Pseudomonas putida* PaW340

Al fine di valutare la possibilità di ottenere ceppi ricombinanti con più ampie capacità cataboliche, i geni di *Arthrobacter sp.* FG1 coinvolti nella reazione di dealogenazione sono stati clonati in *Pseudomonas putida* utilizzando il vettore shuttle *E.coli-Pseudomonas* pJB3KmD (Blatny *et al.*, 1997).

Il frammento contenente i geni *fcB* di *Arthrobacter sp.* FG1 è stato exciso dal costrutto pDH4 tramite digestione *EcoRI* e clonato nel plasmide pJB3KmD. Questo vettore di circa 6 kb deriva dal replicone ad ampio spettro d'ospite RK2 e porta i marcatori di resistenza all'ampicillina e alla kanamicina; la presenza del promotore P_{lac} permette una buona espressione sia in ospiti Gram positivi che in Gram negativi e il polylinker posizionato all'interno del gene *lacZ* permette lo screening blu-bianco dei trasformanti (Blatny *et al.*, 1997). Il costrutto ottenuto è stato denominato pDH5 (Fig. 3.5a) ed è stato utilizzato per trasformare cellule elettrocompetenti di *P. putida* PaW340, ceppo auxotrofo per il triptofano e capace di crescere sull'acido-4-idrossibenzoico.

I cloni ricombinanti sono stati quindi analizzati per controllare la bontà del clonaggio attraverso convenzionale analisi di restrizione. Per verificare che l'introduzione dei geni *fcB* in *P.putida* PaW340 avesse conferito a quest'ospite un'attività dealogenasica, alcune colonie sono state replicate su terreno minerale M9 con solo 4-CBA come substrato; dopo circa 15 giorni di incubazione a 30°C si è osservata la presenza di colonie isolate. Tali colonie sono state replicate nuovamente nelle medesime condizioni colturali e si è osservata crescita di colonie singole dopo 3-4 giorni; il minor tempo necessario per osservare la formazione di colonie visibili a occhio nudo suggerisce che vi sia stato un adattamento al mezzo di coltura.

Poiché i cloni di *P.putida* PaW340/pDH5 sono risultati capaci di utilizzare l'acido-4-clorobenzoico come unica fonte di carbonio ed energia, sono stati allestiti degli esperimenti per determinarne l'andamento della crescita a spese di questo substrato e verificare che fosse sostenuta dalla degradazione del composto, con conseguente rilascio di ioni Cl⁻. La crescita del microrganismo è stata seguita misurando la densità ottica a O.D.₅₄₀, mentre la liberazione dei cloruri nel mezzo è stata determinata con il saggio spettrofotometrico descritto in Materiali e Metodi. Come si può osservare dal grafico in figura 3.8 l'aumento della torbidità della coltura è accompagnata dalla scomparsa del 4-CBA, monitorata mediante analisi HPLC dei brodi colturali, e da un concomitante, stechiometrico rilascio di cloruri. Dopo 16 ore di incubazione il 4-CBA risulta totalmente esaurito.

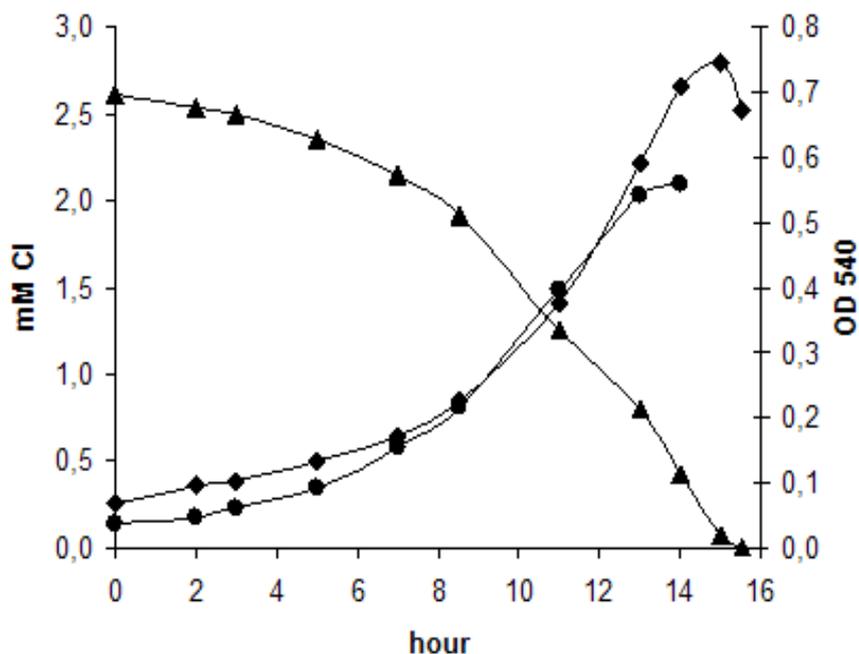


Fig 3.8: Curva di crescita di *P.putida* PaW340/pDH5 (rombi), concomitante consumo di 4CBA (triangoli) e liberazione di Cl⁻ (pallino).

3.4.2 Efficienza nella degradazione del 4-CBA da parte di *Arthrobacter* sp. FG1 e *P. putida* PaW340/pDH5

In collaborazione con il prof. Conti, del Dipartimento Ambiente-Salute-Sicurezza, e con il laboratorio del prof. Di Guardo, del Dipartimento Di Scienze Chimiche e Ambientali, entrambi dell'Università dell'Insubria, si è proceduti a confrontare il comportamento nella degradazione del 4-CBA di *Arthrobacter* sp.FG1 e di *P.putida* ingegnerizzato PaW340/pDH5, nella matrice suolo allestendo degli esperimenti in bioslurry.

La scelta di utilizzare sistemi bioslurry è giustificata dalla necessità di condurre il confronto in modo il più vicino possibile a un caso reale di biorisanamento, durante il quale l'uso di MGM (Microrganismi Geneticamente Modificati) è consentito solo in sistemi confinati, che ne evitino la dispersione nell'ambiente. Questa tecnologia fornisce inoltre il vantaggio di garantire un contatto ottimale tra microrganismi e inquinanti e di poter monitorare i parametri di processo.

Gli slurry sono stati allestiti con suolo setacciato a 2 mm e "flottato", in modo da eliminare residui di particelle organiche che avrebbero potuto interferire con le successive analisi chimiche. Inizialmente sono stati allestiti alcuni esperimenti pilota in beuta, utilizzando piccoli volumi (200 ml) di slurry allo scopo di calibrare parametri quali la percentuale di suolo per l'allestimento della miscela, la densità cellulare dell'inoculo batterico, la

concentrazione del contaminante e i tempi di prelievo dei campioni. Questi esperimenti preliminari sono stati condotti a una temperatura di 30°C. Sono inoltre stati allestiti una serie di controlli che hanno permesso di verificare che il 4-CBA non andava incontro a degradazione spontanea negli slurry allestiti con i soli nutrienti minerali (terreno M9) o acqua sterili. Monitorando, mediante analisi HPLC, la velocità di scomparsa del 4-CBA e di comparsa del 4-HBA, abbiamo stabilito le condizioni da utilizzare negli esperimenti successivi che sarebbe stati condotti in slurry al 10% di suolo contenenti 4-CBA 3 mM e inoculati in modo da ottenere una concentrazione cellulare pari a ca. 10^8 cfu/ml. Abbiamo inoltre verificato che gli intervalli di tempo migliori per effettuare i prelievi si sarebbero dovuti concentrare nelle prime 10 ore di esperimento e a distanza ravvicinata. Per gli esperimenti successivi abbiamo stabilito di utilizzare un volume di reazione pari a 1 L, in modo che il prelievo di molti campioni non influenzasse in maniera significativa il volume finale della reazione. Si è inoltre deciso di condurre le prove a temperatura ambiente, che nel periodo durante il quale sono stati condotti gli esperimenti è sempre stata compresa tra 20 e i 22°C.

Dopo aver determinato i parametri sperimentali sopra illustrati, è stato stabilito il disegno sperimentale. Sono stati allestiti tre set di esperimenti: nel primo si è voluto paragonare l'attività degradativa di *Arthrobacter* sp. FG1 e di *P. putida* PaW340/pDH5 in uno slurry sterile; nel secondo si è voluto verificare la possibile interazione degli stessi due ceppi con microrganismi indigeni, utilizzando quindi slurry non sterili. Gli inoculi batterici usati per questi due primi set di esperimenti sono stati cresciuti in terreno selettivo (M9 addizionato di 4-CBA) o in LB diluito 10 volte, ma comunque addizionato di 4-CBA (3 mM) come induttore, in modo da ottenere una cospicua quantità di biomassa, ma in un tempo minore a quello necessario alla crescita in condizioni selettive. Nel terzo set di esperimenti gli slurry sono stati inoculati con *Arthrobacter* sp. FG1 da solo o con una miscela di *Arthrobacter* sp. FG1 e *P. putida* PaW340 per verificare se la degradazione del 4-CBA potesse essere migliorata grazie ad una sinergia tra i due microrganismi. Per ogni condizione descritta sono state condotte dalle due alle tre ripetizioni. I controlli consistevano in slurry sterili o non sterili con la sola aggiunta dei nutrienti (M9).

Nel primo set di esperimenti è stato osservato che negli slurry inoculati con *Arthrobacter* sp. FG1 cresciuto in terreno minerale, la concentrazione del 4-CBA diminuiva con lo stesso andamento sia nel suolo sterile che in quello non sterile; dopo circa 10 ore di trattamento il substrato non era più rilevabile. Negli slurry inoculati con cellule di *Arthrobacter* cresciute in

LB diluito, la degradazione del 4-CBA appariva solo leggermente meno efficiente e l'emivita aumentava da 5.2 a 6 h (Fig. 3.9, A e B).

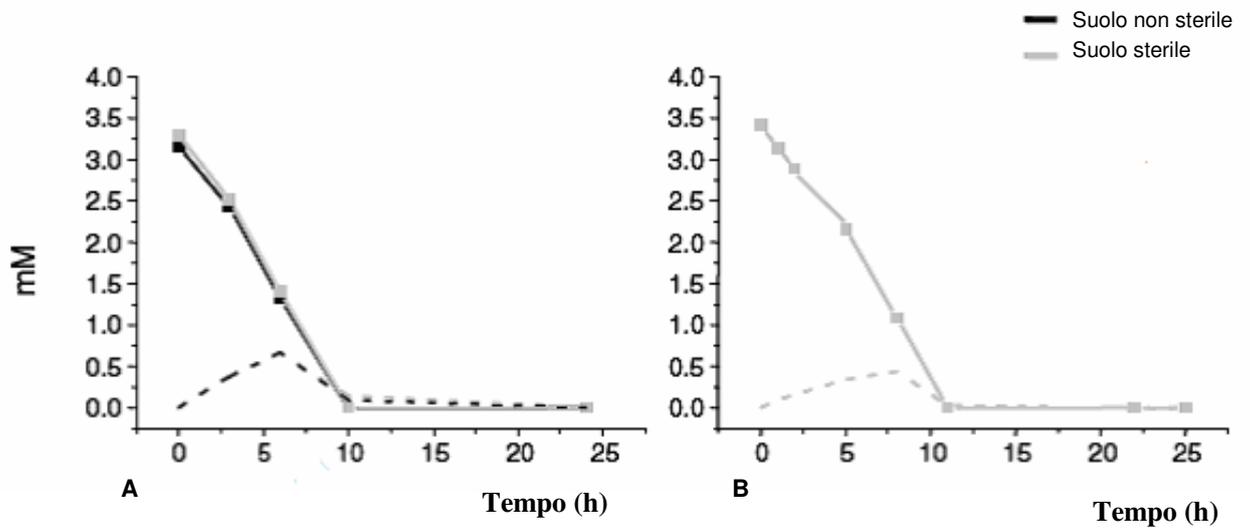


Fig. 3.9. Andamento della concentrazione del 4-CBA (quadrato) e del 4-HBA (linea tratteggiata) in suolo sterile (linea grigia) o non sterile (linea nera) inoculati con *Arthrobacter* sp. FG1. Le colture batteriche sono state cresciute in condizioni selettive (A) o in LB diluito con l'aggiunta di 4-CBA come induttore (B).

Negli slurry inoculati con il ceppo ingegnerizzato *P. putida* PaW340/pDH5, l'emivita era più corta di quella dei campioni inoculati con *Arthrobacter*: in particolare è stata calcolata un'emivita di circa di 3.7 h quando il ceppo era stato cresciuto in selettivo e di 5.5 h quando il ceppo era stato cresciuto in LB diluito (Fig. 3.10, C e D). Non sono state osservate sostanziali differenze tra le prove condotte con il suolo sterile e quelle con il suolo non sterile (Fig. 3.10 C).

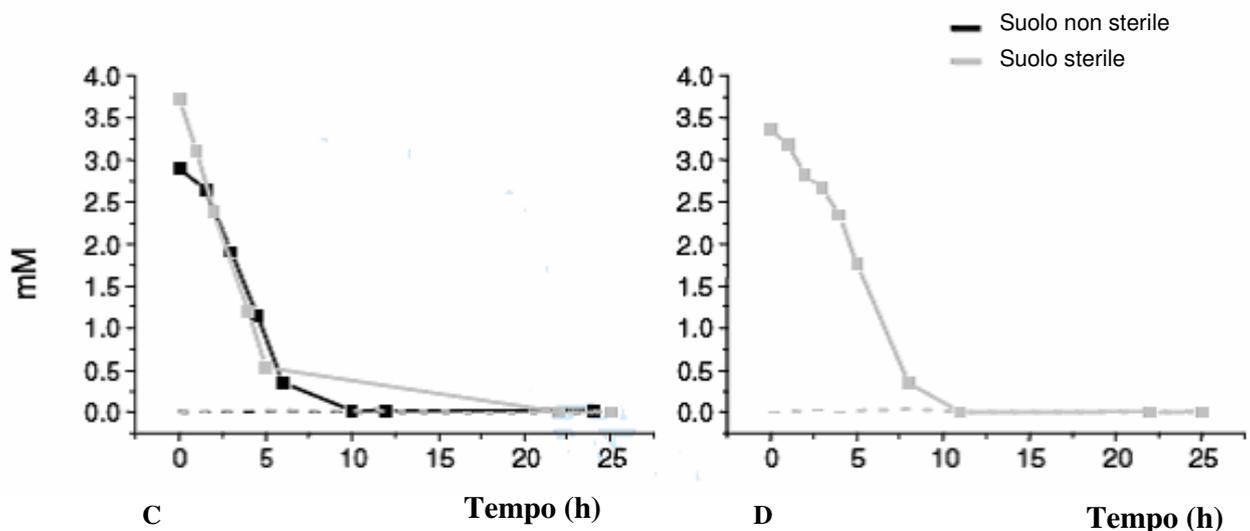


Fig. 3.10. Andamento della concentrazione del 4-CBA (quadrato) e del 4-HBA (linea tratteggiata) in suolo sterile (linea grigia) o non sterile (linea nera) inoculati con *P. putida* PaW340/pDH5. Le colture batteriche sono state cresciute in condizioni selettive (C) o in LB diluito con l'aggiunta di 4-CBA come induttore (D).

Negli slurry di controllo la concentrazione del 4-CBA non subiva alcuna diminuzione né in suolo sterile, indicando che 4-CBA non va incontro a nessun tipo di degradazione spontanea, né in suolo non sterile, suggerendo che non fossero presenti microrganismi capaci di degradare il contaminante, per lo meno nei tempi in cui sono stati condotti gli esperimenti.

Negli slurry sterili, la densità cellulare sia di *Arthrobacter* sp.FG1 che di *P.putida* PaW340/pDH5 aumentava da 10^8 cfu/ml, al tempo 0, fino a 10^9 cfu/ml alla fine dell'esperimento. Nel suolo non sterile il totale di batteri aerobi eterotrofi era di 10^4 cfu/g_{dw}. Quando i campioni di suolo non sterile venivano seminati in terreno M9 in presenza di 4-CBA, si potevano osservare delle microcolonie (10^2 cfu/g_{dw}) solo dopo 7 giorni di incubazione: la loro capacità di degradare il 4-CBA non è stata ulteriormente indagata. Comunque, negli slurry privi di inoculo la concentrazione dei batteri indigeni non cambiava durante il corso dell'esperimento, così come rimaneva invariata la concentrazione del 4-CBA, mentre negli slurry di suolo non sterile inoculati con *Arthrobacter* o con *Pseudomonas* le concentrazioni batteriche al termine dell'esperimento erano paragonabili a quelle osservate negli esperimenti condotti con suolo sterile e quindi imputabili alla crescita, a spese del 4-CBA, dei batteri inoculati.

Differenze tra gli slurry inoculati con i due microrganismi sono state osservate solo per quanto riguarda l'intermedio di degradazione 4-HBA. Infatti, solo negli slurry inoculati con *Arthrobacter* sp. FG1 (Fig. 3.9, A e B) è stato osservato un accumulo transiente di 4-HBA, mentre in presenza di *P. putida* PaW340/pDH5 non è stato possibile rilevare alcuna traccia di questo composto.

3.4.3 Interazione *Arthrobacter* sp. FG1-*P. putida* PaW340 nella degradazione del 4-CBA

L'accumulo transiente del 4-HBA negli slurry inoculati con *Arthrobacter* sp. FG1 ha suggerito che, in questo ceppo, l'ulteriore ossidazione dell'acido-idrossibenzoico potesse costituire un passaggio limitante nella degradazione del 4-CBA. Per verificare se la degradazione del 4-CBA potesse essere migliorata grazie ad una sinergia, sono stati allestiti esperimenti con miscele di *Arthrobacter* sp.FG1 e *P. putida* PaW340, microrganismo capace di degradare il 4-HBA, ma non il 4-CBA. I due ceppi batterici sono stati cresciuti separatamente in terreno minerale in presenza, rispettivamente, di 4-CBA o di 4-HBA e aggiunti allo slurry ad una concentrazione finale di circa 5×10^7 cfu/ml ciascuno. Quindi, rispetto all'esperimento mostrato in figura 3.9 A e B, era presente metà della biomassa di *Arthrobacter* sp. FG1. Tale scelta è stata fatta per mantenere una quantità di biomassa totale

paragonabile a quella degli esperimenti precedenti. La degradazione del 4-CBA negli slurry inoculati con la miscela di *Arthrobacter* sp.FG1 e *P. putida* PaW340 era più lenta di quella osservata negli slurry inoculati solo con *Arthrobacter* sp.FG1 (Fig. 3.11), come ci si aspettava, data l'inferiore quantità di cellule iniziale, mostrando un aumento nell'emivita da 5.2 a 8.4 ore e non è stato osservato alcun accumulo di 4-HBA.

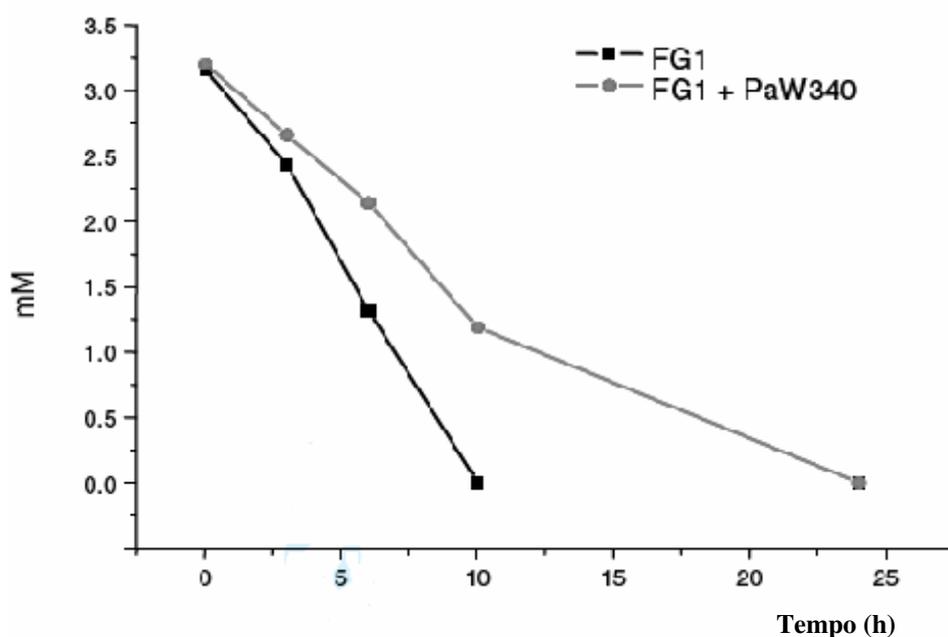


Fig. 3.11. Andamento della degradazione del 4-CBA negli slurry inoculati con *Arthrobacter* sp. FG1 da solo (10^8 cfu/ml) o con una miscela di *Arthrobacter* sp. FG1-*P. putida* PaW340 (5×10^7 cfu/ml ognuno).

Anche nel corso di questi ultimi esperimenti è stata monitorata la crescita microbica mediante conta vitale. Nello slurry inoculato con il solo *Arthrobacter* è stato osservato un incremento della concentrazione cellulare da 5×10^7 cfu/ml a 10^9 al termine dell'esperimento. Nello slurry inoculato con entrambi i ceppi, invece, non è possibile discriminare i due microrganismi, poiché le colonie di *P. putida* PaW340/pDH5, caratterizzate da una crescita veloce, prendono il sopravvento e si sovrappongono fisicamente a quelle di *Arthrobacter* sp.FG1, caratterizzate da crescita più lenta.

Per poter discriminare i due ceppi si potrebbe ricorrere alla FISH (Ibridazione Fluorescente in Situ). Abbiamo quindi effettuato alcuni esperimenti preliminari volti a individuare sonde commerciali che permettessero di distinguere i due microrganismi, le loro condizioni di utilizzo e la loro specificità.

3.4.4 Esperimenti preliminari per l'utilizzo della FISH

La tecnica della FISH consente di rilevare la presenza di un determinato gruppo di microrganismi in un campione ambientale attraverso l'utilizzo di sonde fluorescenti capaci di ibridare con una specifica sequenza del 16S rRNA.

Inizialmente, per verificare l'applicabilità della tecnica alle nostre esigenze, si è deciso di utilizzare delle sonde che semplicemente discriminassero tra batteri Gram positivi e negativi, poichè in questo caso non era necessaria una maggiore specificità. Sono state quindi utilizzate due sonde, una, HGC69a, che riconosce il 16S rRNA dei Gram positivi (per *Arthrobacter* sp.FG1) e l'altra, GAM42a, che riconosce il 16S rRNA dei Gram negativi (per *P.putida* PaW340/pDH5) (Buckley D.H. and Schmidt T.M.). Per la messa a punto della metodica, inizialmente sono state utilizzate colture pure di *Arthrobacter* sp.FG1 o di *P.putida* PaW340 (foto 1A e 1B) cresciute in condizioni selettive e ibridate singolarmente. Dopo l'ibridazione, i vetrini venivano colorati con DAPI e osservati al microscopio a fluorescenza utilizzando le lunghezze d'onda opportune. Come si può osservare (Foto 1A e 1B), ciascuno dei due microrganismi è facilmente evidenziabile con la sonda specifica. La distinzione dei due microrganismi in miscela dovrebbe venire effettuata per sottrazione, cioè confrontando i dati raccolti dallo stesso preparato dopo la colorazione con DAPI (che si lega ad entrambi) e ibridazione con la sonda specifica. Le due sonde infatti non possono venire utilizzate contemporaneamente dato che richiedono condizioni di ibridazione diverse e, inoltre, emettono alla stessa lunghezza d'onda.

Successivamente abbiamo voluto, in via preliminare, testare il sistema su campioni provenienti da bioslurry, nei quali, oltre al microrganismo, era presente anche il suolo. In questi campioni, indipendentemente dal fatto che fosse presente un solo microrganismo (Foto 2A e 2B), o entrambi (Foto 2C, 2D e 2E), non è invece stato possibile ottenere una qualità accettabile e non è stato pertanto possibile raccogliere dati quantitativi. Abbiamo infatti verificato che è presente un alto rumore di fondo, verosimilmente provocato dal legame aspecifico del DAPI e delle sonde alle particelle di suolo che interferisce con la visualizzazione al microscopio.

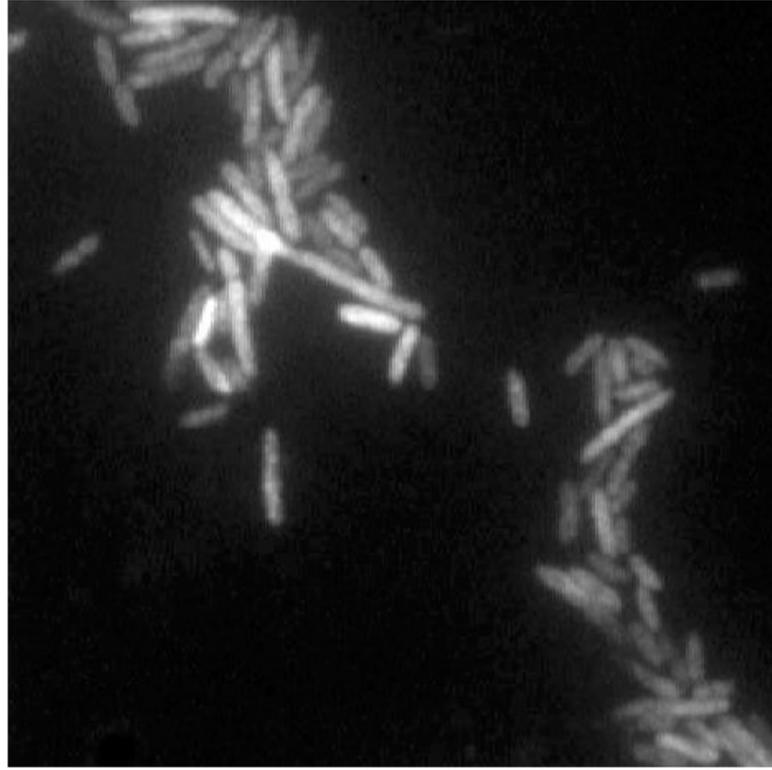
Per poter utilizzare la FISH su campioni di bioslurry sarebbe quindi necessario separare le cellule dalle particelle di suolo, utilizzando, ad esempio, un gradiente di densità, come viene proposta da alcuni lavori presenti nella letteratura (Caracciolo *et al.*2005). Va però ricordato che la metodica suggerita è piuttosto costosa e laboriosa, e quindi poco adatta all'applicazione in casi reali di biorisanamento che richiedono invece di utilizzare sistemi economici e operatori anche non estremamente specializzati.

COLTURE PURE

Foto 1A: coltura di *Arthrobacter* sp. FG1
- sonda: HGC69a -



Foto 1B: coltura di *Pseudomonas putida* PaW340
- sonda: GAM42a -



CAMPIONI DI BIOSLURRY

Foto 2A: *Arthrobacter* sp. FG1
- sonda: HGC69a -

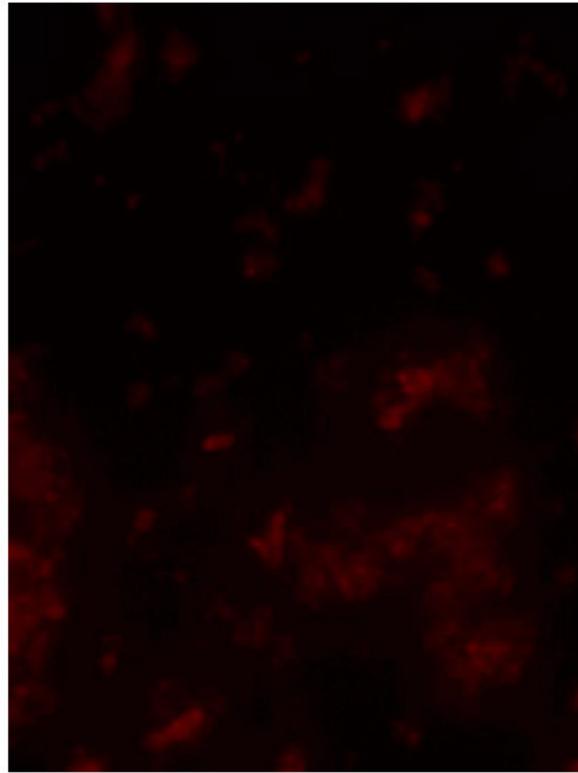


Foto 2B: *Pseudomonas putida* PaW340
- sonda: GAM42a -

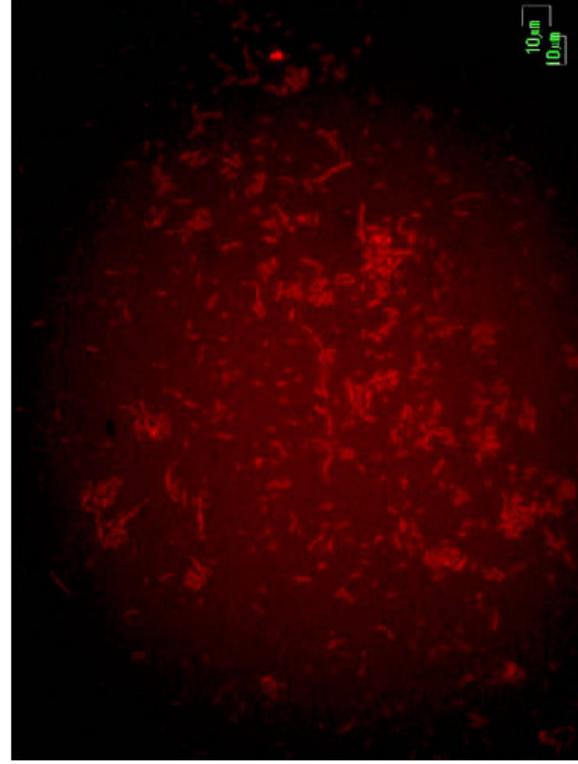


Foto 2C: *Arthrobacter* sp. FG1 + *Pseudomonas putida* PaW340
- sonda: DAPI -

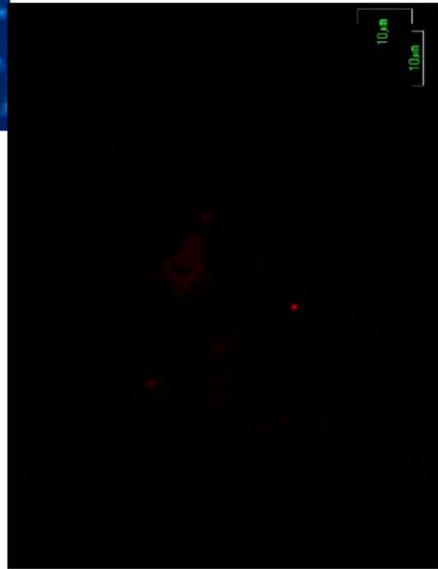
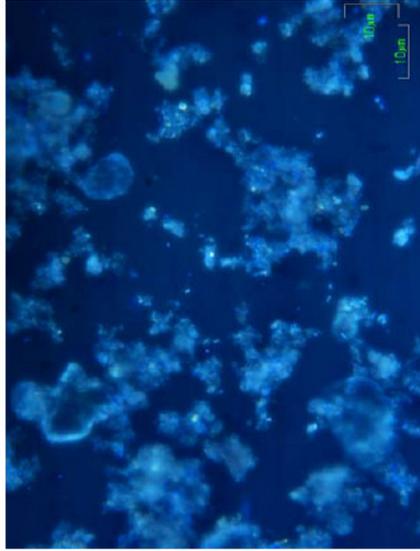


Foto 2D: *Arthrobacter* sp. FG1 + *Pseudomonas putida* PaW340
- sonda: HGC69a -

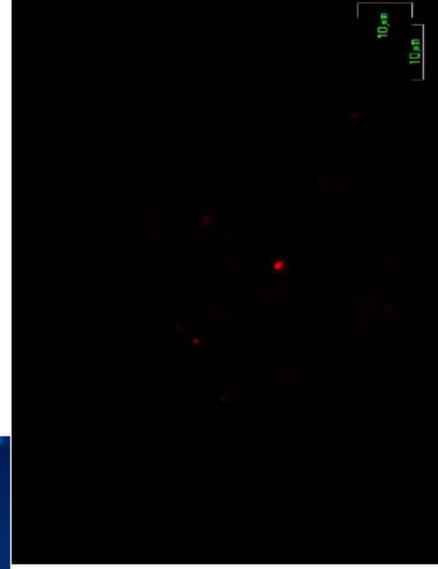


Foto 2E: *Arthrobacter* sp. FG1 + *Pseudomonas putida* PaW340
- sonda: GAM42a -

CONCLUSIONI

4.1 Isolamento e identificazione di microrganismi

La diversità microbica è stata esplorata e compresa soltanto in parte, ma costituisce una straordinaria riserva di biodiversità nella biosfera. Questa ricchezza si rispecchia nella versatilità metabolica dei microrganismi, che, nel corso della loro evoluzione, si sono adattati alle più svariate condizioni ambientali come pure hanno sviluppato vie metaboliche adatte alla degradazione di composti recalcitranti, contribuendo così alla loro re-immissione nel ciclo del carbonio. Tra i contaminanti più recalcitranti alla biodegradazione vi sono i composti aromatici alogenati o policiclici (Jain *et al.*, 2005). Nonostante in questi ultimi decenni le tecniche di analisi delle comunità microbiche che non prevedono metodi colturali abbiamo fatto enormi progressi, lo studio della degradazione microbica degli inquinanti organici recalcitranti, volto anche a sviluppare tecnologie mirate al ripristino di siti contaminati, non può prescindere dalla coltivazione dei microrganismi che ne sono responsabili.

Questo studio è pertanto iniziato con l'allestimento di colture di arricchimento mirate all'isolamento di batteri, soprattutto Gram positivi, capaci di degradare IPA o composti cloroaromatici. L'interesse verso i Gram positivi era giustificato dal fatto che le informazioni sul catabolismo dei composti aromatici sopra citati in questi batteri sono ancora scarse, sebbene si ritenga che, essendo spesso questi batteri membri più stabili delle comunità microbiche del suolo, possano svolgere un ruolo importante nella decontaminazione, soprattutto quando l'inquinamento è di vecchia data, e i composti possono aver subito trasformazioni chimiche o fisiche di svariata natura o quando i livelli dei contaminanti scendono al di sotto di una determinata soglia.

A partire da una settantina circa di ceppi inizialmente isolati, circa 15 sono stati considerati come buoni candidati per gli studi sopra citati. Per tutti questi microrganismi si è proceduto al sequenziamento del 16S rDNA per classificarli a livello di genere.

L'approccio oggi preferito nella tassonomia batterica è infatti quello di analizzare il genotipo di un ceppo mediante l'analisi dei suoi acidi nucleici. Il metodo più usato consiste nel sequenziamento del gene che codifica per l'RNA ribosomale 16S (16S rDNA). Gli RNA 16S possono essere utilizzati come cronometro molecolare e sfruttati a fini tassonomici. Infatti, a causa dei loro obblighi strutturali e funzionali, queste molecole contengono regioni altamente conservate che vengono usate come base per la costruzione di primer da utilizzare per amplificare questi geni codificanti, ma anche sequenze variabili che permettono di stabilire i rapporti filogenetici tra le diverse specie (Weisburg *et al.*, 1991). Le sequenze del 16S rDNA di un gran numero di batteri sono oggi disponibili nei database pubblici così che un nuovo ceppo può essere facilmente comparato con microrganismi già noti.

Il confronto della sequenza del 16S rDNA dei ceppi isolati in questo studio con quelle riportate in banca dati ha mostrato che il ceppo isolato su 4-CBA mostra la più alta omologia di sequenza (99% identità) con un ceppo non coltivabile isolato da un campione ambientale, ad oggi non ancora classificato, mentre i ceppi ufficialmente classificati ad esso più vicini appartengono tutti al genere *Arthrobacter*.

I ceppi isolati dalle colture di arricchimento su IPA appartengono a diversi generi sia di Proteobatteri (Gram negativi) che di Gram positivi a basso o alto contenuto in GC. Tuttavia, i Gram positivi isolati su IPA si sono ben presto rivelati insoddisfacenti per i nostri scopi, in quanto in breve tempo non hanno più mostrato crescita sul substrato utilizzato nella coltura primaria. I ceppi sui quali si è ritenuto opportuno proseguire gli studi, nonostante i lunghi tempi necessari per la crescita in condizioni selettive, sono quelli dei Proteobatteri, in particolare gli *Sphingomonas* isolati su fenantrene e gli *Pseudomonas* isolati su naftalene. L'identificazione degli isolati e la loro assegnazione a un dato genere permette di predirne alcune caratteristiche di rilevanza medica o ecologica: il genere di *Arthrobacter*, per esempio, è rappresentativo di microrganismi caratterizzati da una spiccata versatilità metabolica. Ceppi di *Arthrobacter* risultano coinvolti nel metabolismo del naftalene (Dore *et al* 2003), del fenantrene (Seo *et al*, 2006) e di vari composti clorurati (Havel & Reineke, 1993). I membri del genere *Arthrobacter* sono in grado di utilizzare un'ampia gamma di composti organici naturali e di sintesi giocando quindi un ruolo importante nella mineralizzazione della sostanza organica nell'ambiente (Cacciari & Lippi, 1987). Insieme al genere *Rhodococcus*, *Arthrobacter* può essere considerato, tra i batteri Gram positivi, la controparte dei Gram negativi appartenenti alla famiglia delle *Pseudomonadaceae*. I batteri appartenenti al genere *Arthrobacter* sono ubiquitari nel suolo e sono tra i membri predominanti nelle comunità microbiche coltivabili di diversi ambienti superficiali terrestri (Crocker *et al.*, 2000). Tra i motivi che spiegano la loro ubiquità nel suolo ci sono la resistenza alla dessicazione e alla carenza di nutrienti e la loro versatilità nutrizionale.

Il genere *Sphingomonas* è piuttosto recente, infatti è stato creato nel 1990 da Yabuuchi *et al.* per accogliere bacilli Gram negativi, strettamente aerobi, chemoeterotrofi e pigmentati di giallo che contenessero glicosfingolipidi come componente della parete. Molti, come *S. adhaesiva*, *S. capsulata*, *S. parapaucimobilis*, *S. paucimobilis* e *S. yanoikuyae*, sono considerati ceppi di origine clinica (Takeuchi *et al.*, 2001), ma altri sono stati isolati da ambienti diversi come la superficie del suolo, i sedimenti, le acque marine, le acque di scolo o in quelle di falda e hanno mostrato possedere abilità uniche nella degradazione di una grande varietà di inquinanti come i fenoli clorurati, i dibenzofurani, gli insetticidi e gli erbicidi.

Diversi ceppi di *Sphingomonas* sono anche stati isolati da suoli contaminati come degradatori di IPA (Leys *et al.*, 2004) e recentemente è stato osservato che molti di essi sono particolarmente versatili nella degradazione di composti aromatici poiché capaci di utilizzare composti aromatici sia a basso che ad alto peso molecolare (Story *et al.*, 2000).

Pseudomonas è un genere piuttosto eterogeneo che comprende bacilli gram-negativi dotati di flagelli polari, ossidasi positivi, incapaci di fermentare. Alcune specie si comportano da patogeni opportunisti, ma per la maggior parte sono diffusi nel terreno e nelle acque e sono noti per la capacità di degradare inquinanti appartenenti a varie classi chimiche. Ad esempio, sono stati isolati ceppi di *Pseudomonas* capaci di mineralizzare il 2-Cl-benzoato (Fetzner *et al.*, 1992), il fluorantene (Mueller *et al.*, 1990) e il tetradeciltrimetilammonio (Lifforurrena *et al.*, 2008). Attualmente è disponibile una quantità significativa di informazioni sulla fisiologia, biochimica e genetica di diverse specie di questo genere, nonché una serie di strumenti molecolari che permettono di utilizzarli come ospiti per l'espressione di geni eterologhi che conferiscono loro nuove capacità cataboliche (Radice *et al.*, 2007; Grund and Gunsalus, 1983; Erb *et al.*, 1997).

L'isolamento di Proteobatteri da colture di arricchimento che avrebbero dovuto essere maggiormente selettive per i Gram positivi riflette la loro strategia di crescita di tipo r: rapida crescita e consumo dei nutrienti disponibili. È possibile che per favorire ulteriormente l'isolamento di degradatori Gram positivi, soprattutto quelli alto contenuto in GC, che sono più orientati ad una strategia di tipo K, si debbano adottare condizioni ancora più restrittive, come, ad esempio, concentrazioni di substrato ancora più basse di quelle utilizzate e tempi di incubazione ancora più lunghi.

4.2 Biochimica e genetica della degradazione dell'acido 4-clorobenzoico

Le vie per il catabolismo aerobico degli acidi clorobenzoici descritte in letteratura indicano che il cloro può essere allontanato secondo due modalità (Commandeur & Parson, 1990; Chaudhry & Chapalamadugu, 1991; Fetzner *et al.*, 1994):1) nelle fasi avanzate della degradazione, dopo l'apertura dell'anello aromatico, contestualmente ad una reazione enzimatica durante la quale si forma un intermedio instabile che spontaneamente rilascia l'alogeno; 2) durante le prime reazioni della via degradativa grazie ad reazione enzimatica specifica che prevede la sostituzione del cloro con un gruppo ossidrilico.

In letteratura sono stati descritti tre ceppi di *Arthrobacter* in grado di utilizzare l'acido-4-clorobenzoico come fonte di carbonio ed energia secondo quest'ultima via: *Arthrobacter* sp. SU (Schmitz *et al.*, 1992), *Arthrobacter* sp. TM1 (Marks *et al.*, 1984) e *A. globiformis* KZT1

(Tsoi *et al*, 1991). Sono riportati, inoltre, anche due ceppi di *Pseudomonas*: *Pseudomonas* sp. CBS3 (Savard *et al*, 1992) e *Pseudomonas* sp. DJ-12 (Chae *et al*, 2000).

Nello studio della degradazione del 4-CBA in *Arthrobacter* sp. FG1 è stato identificato l'acido 4-idrossibenzoico (4-HBA) come primo intermedio della via catabolica che si forma in seguito all'allontanamento del cloro e alla sua sostituzione con un gruppo idrossilico. La formazione del 4-HBA è stata descritta anche in tutti i ceppi sopra riportati. Nei ceppi di *Arthrobacter* sopra citati il 4-HBA viene poi convertito in acido protocatechico, il substrato per l'apertura dell'anello aromatico, un aspetto che non è stato indagato in questo lavoro.

Da *Arthrobacter* sp. FG1 sono stati isolati e sequenziati i geni *fcB* che codificano per la dealogenasi idrolitica responsabile della conversione del 4-CBA in 4-HBA e, come in *Arthrobacter* sp. SU e sp. TM1, il loro ordine risulta essere *fcBABC* (ligasi-dealogenasi-tioesterasi), mentre nei due ceppi di *Pseudomonas* sp. CBS3 e sp. DJ12 l'ordine risulta essere invertito ovvero *fcBAC* (dealogenasi-ligasi-tioesterasi) (Fig. 1.15 Introduzione) (Chae *et al*, 2000). Questa differenza nell'ordine genico suggerisce che l'operone per il 4-CBA sia stato soggetto a una riorganizzazione.

Pur non essendo disponibili le sequenze nucleotidiche per tutti i ceppi in esame, l'analisi comparativa delle sequenze proteiche permette tuttavia di dedurre che questi geni siano andati incontro a una divergenza di sequenza oltre che a un riarrangiamento del loro ordine. La divergenza che emerge dal confronto della sequenza di 4-CBA-CoA-dealogenasi e 4-CBA-CoA-ligasi dei generi *Arthrobacter* e *Pseudomonas* risulta essere piuttosto elevata (50% identità per le dealogenasi, 38% per le ligasi and ca. 10% per le tioesterasi) confermando che le proteine dei complessi dealogenasica dei due generi raggruppano in due rami distinti dell'albero filogenetico (Chae *et al*, 2000). Inoltre, mentre le sequenze aminoacidiche delle proteine FcbABC dei ceppi di *Arthrobacter* sono sostanzialmente le stesse, quelle dei due ceppi di *Pseudomonas* non lo sono: infatti il confronto di sequenza tra gli enzimi omologhi dei due vie degradative dei ceppi *Pseudomonas* mostra che l'identità di sequenza tra le ligasi è del 58%, quello tra le dealogenasi 86% e quello tra le tioesterasi soltanto il 65% (Chae *et al*, 2000). Nel caso di *Arthrobacter* sp. FG 1 la proteina FcbA mostra il 40% di identità di sequenza con la proteina FcbA di *Pseudomonas* sp. strain CBS3, così come le proteine FcbA degli altri due ceppi di *Arthrobacter* SU e TM1 (38%). La proteina FcbB mostra il 50% di identità di sequenza con FcbB *Pseudomonas* sp. CBS3 in tutti e tre i ceppi sopra citati. Queste divergenze indicano che i geni del pathway per la degradazione del 4-CBA non sono il risultato di un adattamento recente. E' quindi improbabile che l'evoluzione della via di dealogenazione sia stata stimolata dal rilascio nell'ambiente di 4-CBA e 4-policlorobifenili in

seguito all'attività industriale, come originariamente ipotizzato (Bennings *et al*, 1996). Infatti, enzimi come l'atrazina cloroidrolasi, noti per essersi evoluti in risposta all'inquinamento globale causato da questa nuova sostanza, non mostrano variazioni rilevanti nella sequenza aminoacidica indipendentemente dal ceppo batterico ospite. Inoltre, quando un enzima si è evoluto recentemente dovrebbe mostrare un'omologia di sequenza elevata (> 90%) con l'enzima progenitore che catalizza una diversa funzione in un pathway metabolico preesistente (Seffemick *et al*, 2001). Questo non sembra essere il caso di nessuna delle tre proteine codificate dai tre geni *fcABC*. Considerando la varietà di composti alogenati prodotti sia dai batteri che dai funghi (de Jong *et al*, 1997; van Pee *et al*, 1996) si pensa che esistano fonti naturali di 4-CBA (Niedan & Scholer, 1997). Il pathway di degradazione del 4-CBA potrebbe essere emerso in batteri opportunisti una volta che queste fonti siano diventate stabili: i geni per la dealogenazione del 4CBA potrebbero quindi aver avuto la possibilità di divergere nell'arco di un lungo periodo di tempo attraverso processi di mutazioni casuali e selezione naturale (Zhuang *et al*, 2003).

Come per altri operoni che offrono vantaggi per la sopravvivenza dei batteri in particolari nicchie, l'operone per la dealogenazione del 4-CBA sembra essere stato trasmesso da un ceppo batterico all'altro. La presenza di sequenze trasponibili che affiancano l'operone codificante per la degradazione del 4-CBA in *Alcaligenes* sp. strain AL3007 (un ceppo in grado di degradare il 4-clorobifenile attraverso la formazione di 4-CBA) (Layton *et al*, 1992) così come il ritrovamento di elementi di inserzione (IS) identificati sul cromosoma di *Arthrobacter* sp. TM1 e a livello plasmidico in *Arthrobacter* sp. SU fanno ipotizzare un trasferimento genico orizzontale anche nel caso dell'operone *fcB*.

Diversi lavori in letteratura suggeriscono che l'adattamento microbico a composti xenobiotici e l'acquisizione di nuove capacità cataboliche sia spesso legato ad eventi di ricombinazione genetica mediata da elementi mobili come i trasposoni (van Der Meer, 1992), e diversi trasposoni recanti geni per il catabolismo di clorobenzeni, clorobenzoati e composti aromatici sono già stati isolati e sequenziati (Top and Springael, 2003).

In *Arthrobacter* SU e TM1, così come in *Arthrobacter* sp. FG1, a monte di una Orf (Orf IV) di funzioni incognite, sono state ritrovate sequenze, identificate come un parziale gene *tnpA* e una sequenza ripetuta invertita correlata a quella della famiglia IS30, che possono essere ricondotte a un elemento di inserzione vestigiale. Nel ceppo TM1 i geni *fcB* sono associati all'elemento di inserzione IS1409 che si suppone essere coinvolto nel trasferimento genico orizzontale degli stessi geni (Gartemann *et al*. 2001). In *Arthrobacter* sp. SU il plasmide pSU che contiene l'operone *fcB* (Schmitz *et al*, 1992) non ha l'elemento IS1409, tuttavia una copia

dell'elemento IS è stato ritrovato sul suo cromosoma (Gartemann *et al.* 2001).

La presenza di tali elementi trasponibili e l'evidenza che il cluster genico *fcb* risulta ripetuto nel genoma in *Arthrobacter* sp. SU e in *Arthrobacter* sp. TM1, ma non nei due ceppi di *Pseudomonas*, supporterebbe l'ipotesi che questi geni siano stati soggetti a riarrangiamenti mediati da trasposoni. Probabilmente questi riarrangiamenti sono stati accompagnati da eventi di trasferimento genico tra cromosoma e plasmidi, come dimostrerebbe il fatto che l'operone *fcb* è localizzato sul DNA cromosomiale in alcuni ceppi (*Arthrobacter* sp. TM1 e *Pseudomonas* sp. CBS3) mentre è localizzato a livello plasmidico in altri, come nel caso di *Arthrobacter* sp. SU e del ceppo in esame *Arthrobacter* sp. FG1 (Quatrini P. comunicazione personale). Infine l'elevata percentuale di identità riscontrata tra IS1409 con l'elemento genico IS1411 di *P.putida*, ha portato a ipotizzare anche un trasferimento genico orizzontale da gram-positivi a gram-negativi (Gartemann *et al.*, 2001).

Sebbene in questo lavoro non sia stata esaminata la localizzazione genica dei geni *fcb* né la presenza di un IS1409 in *Arthrobacter* sp. FG1, l'elevato grado di omologia tra i geni *fcb* e le sequenze a monte di essi in isolati indipendenti provenienti da aree geografiche distinte, suggerisce che i geni codificanti per la dealogenasi derivino, almeno per quanto riguarda i ceppi appartenenti al genere *Arthrobacter*, da un progenitore comune e siano andati incontro a diffusione orizzontale.

4.3 Applicazione di microrganismi in studi di biorisanamento: prospettive

Il termine biorisanamento viene utilizzato per descrivere i processi che sfruttano le capacità cataboliche dei microrganismi per la rimozione di inquinanti dall'ambiente. Si tratta di una tecnologia promettente in quanto i contaminanti organici possono venire metabolizzati dai microrganismi fino a prodotti finali non tossici. I processi di biorisanamento sono basati sulla stimolazione delle attività metaboliche dei microrganismi mediante l'ottimizzazione delle condizioni ambientali (soprattutto la concentrazione di O₂, il pH, la disponibilità di acqua e, quando possibile, la temperatura) e del corretto rapporto carbonio: nutrienti inorganici (N, P). Sfortunatamente non sempre la microflora indigena è dotata delle capacità cataboliche appropriate per la degradazione di determinanti contaminanti. In questo caso l'aggiunta di microrganismi (bioaugmentation), isolati dal sito stesso o da altri siti, e dotati di specifiche capacità cataboliche, può favorire la biodegradazione (Vogel *et al.*, 1996). I recenti avanzamenti nelle biotecnologie molecolari hanno permesso di manipolare geneticamente diversi batteri per produrre nuovi ceppi (GEM) dotati di nuove vie cataboliche e capaci di degradare un'ampia gamma di composti chimici altrimenti non degradabili. Nonostante le

capacità cataboliche dei GEM siano state ampiamente dimostrate in vitro, i dati relativi alle applicazioni in campo sono relativamente scarsi (Sayler & Ripp, 2000). Si ritiene che molti degli insuccessi siano dovuti alla nostra scarsa conoscenza del comportamento *in situ* di ceppi "adattati" alle condizioni di laboratorio e che questi abbiano, ad esempio, perso nel tempo la capacità di integrarsi e/o competere con la microflora autoctona. Un aspetto molto importante da considerare nella scelta dei ceppi inoculanti è il fatto che tipi differenti di microrganismi hanno differenti strategie di sopravvivenza (strategie "r" e "k") che determinano quindi una diversa modalità di biodegradazione. Già nel 1924 Winogradsky coniò il termine di batteri "zimogeni" (riferendosi per esempio al genere *Pseudomonas*) per quei microrganismi che si ritrovano principalmente in fase stazionaria di crescita, che dimostrano un periodo di attività breve stimolato dalla comparsa di un substrato disponibile e ritorno alla quiescenza quando le risorse sono esaurite. Per contro i batteri "autoctoni" furono definiti come quei microrganismi che mostrano un'attività lenta, ma continua.

Hirsh *et al* (1979) hanno utilizzato il termine "r-strateghi" per riferirsi a microrganismi caratterizzati da una elevata velocità di crescita e da un alto tasso metabolico con conseguente bisogno di abbondanti quantità di nutrienti. Questi batteri, sebbene a vita breve, danno origine a popolazioni consistenti. I batteri "k-strateghi" sono invece caratterizzati da basse velocità di reazione e di crescita e mostrano la stessa risposta nella crescita della popolazione e nel metabolismo in seguito all'introduzione sia di grandi che piccole quantità di nutrienti. Considerando che il requisito per una bioaugmentation efficace è l'utilizzo di un ceppo in grado di sopravvivere a lungo termine nell'habitat in cui verrà inoculato, degradando lentamente e continuamente un contaminante, un ceppo "autoctono" dovrebbe essere un candidato più adatto a situazioni in cui sono presenti concentrazioni relativamente basse di contaminanti, mentre le forme zimogene dovrebbero essere considerate invece ideali quando si è in presenza di episodi occasionali che determinano concentrazioni temporaneamente molto elevate di inquinanti. In effetti, in uno studio sulla persistenza a lungo termine di due inoculanti batterici, *Arthrobacter* sp. A109 e *Flavobacterium* P25, si è notato che dopo 87 giorni la carica batterica del ceppo considerato zimogeno (*Flavobacterium*) è risultata al di sotto dei limiti rilevabili, mentre quella del ceppo autoctono (*Arthrobacter*) è stata rilevata fino a 300 giorni dopo l'introduzione (Young *et al*, 1995).

Nel caso specifico di biorisanamento di suoli contaminati da composti aromatici, cloroaromatici e policiclici solitamente si utilizzano condizioni che favoriscono i microrganismi r- strateghi ben adattati a sfruttare i substrati presenti nell'ambiente in concentrazioni relativamente elevate. Per questo motivo abbiamo scelto di trasferire i geni *pcb*

da *Arthrobacter* a *Pseudomonas*, un organismo più “r-orientato” dell’ospite originale.

Gli esperimenti di biorisanamento in bioslurry effettuati con *Arthrobacter* sp. FG1 e con il ceppo ricombinante di *P.putida* PaW340/pDH5 hanno permesso di trarre alcune considerazioni. In accordo con le attività specifiche della dealogenasi già determinate (Radice *et al.*, 2007), nel sistema bioslurry *P.putida* PaW340/pDH5 era significativamente più efficiente nella degradazione del 4-CBA di *Arthrobacter* sp.FG1, riducendo il tempo di dimezzamento di circa il 30%, indipendentemente dalla presenza o l’assenza di batteri indigeni che non influivano sulla degradazione.

Le condizioni nelle quali vengono cresciuti i batteri da utilizzare come inoculo possono influenzare l’andamento della degradazione. La crescita di *P.putida* PaW340/pDH5 in terreno ricco (fonti di carbonio addizionali oltre al 4-CBA), elimina la differenza tra il microrganismo ingegnerizzato e il ceppo di *Arthrobacter* suggerendo che, in questo caso, un completo pre-adattamento al substrato è fondamentale per raggiungere un miglior tasso di degradazione nel tempo a disposizione. Si potrebbe ipotizzare che, in *P.putida*, un controllo fisiologico, come, ad esempio, un fenomeno di repressione da carbonio o di “exponential silencing” (Cases *et al.*, 1999; Sze and Shingler, 1999) prevalga sull’induzione mediata dal 4-CBA. Al contrario, la velocità di degradazione non era significativamente diversa negli slurry inoculati con cellule di *Arthrobacter* cresciute in terreno selettivo o arricchito con fonti di carbonio addizionali. Questo risultato sembrerebbe suggerire che in *Arthrobacter* l’espressione della 4-CBA dealogenasi non sia repressa dalla presenza di altre fonti di carbonio, un aspetto che potrebbe rivelarsi molto utile per scopi applicativi. Purtroppo non sono disponibili informazioni relative al controllo fisiologico dell’espressione genica in questi batteri, un tema che sarebbe quindi importante sviluppare.

Negli slurry inoculati con una miscela di *Arthrobacter* sp. FG1 e *P.putida* PaW340 la degradazione del 4-CBA era apparentemente più lenta, se paragonata a quella osservata inoculando il solo *Arthrobacter* sp.FG1, ma ciò può essere riconducibile alla più bassa concentrazione cellulare iniziale (circa la metà). Considerando ciò, le velocità di degradazione appaiono paragonabili, suggerendo quindi l’assenza di un’interazione misurabile tra *P.putida* PaW340 e *Arthrobacter* sp.FG1. Poiché *P.putida* PaW340 è capace di utilizzare 4-HBA, ma non 4-CBA, la sua attività, limitata al consumo di 4-HBA accumulato da *Arthrobacter*, non influenza la velocità alla quale *Arthrobacter* sp.FG1 converte 4-CBA in 4-HBA. Pertanto, in termini di velocità di degradazione di 4-CBA, non si ottiene alcun miglioramento aggiungendo un consumatore di 4-HBA alla coltura di *Arthrobacter* a meno che non si desideri una degradazione simultanea di 4-HBA. D’altra parte questo tipo di comportamento

si può ottenere tramite *P.putida* PaW340/pDH5 che è capace di degradare 4-CBA e 4-HBA a velocità paragonabili.

- Allpress J. D., Gowland P.C. (1998) Dehalogenases: environmental defence mechanism and model of enzyme evolution. *Biochem. Edu.* **26**: 267-276

- Arp D.J., L.A. Sayavedro-Soto, N.G. Hommes (2003) Molecular Biology and Biochemistry of ammonia oxidation. by Nitro Microbiology, **178**: 250-255.
- Benning M.M., Taylor K.L., Liu R. Q., Yang G., Xiang H., Wesenberg G., Dunaway-Mariano D. and Holden H. M. (1996) Structure of 4-chlorobenzoyl coenzyme A dehalogenase determined to 1.8 Å resolution: an enzyme catalyst generated via adaptive mutation. Biochemistry **35**:8103-8109.
- Blatny J.M., Brautaset T., Winter-Larsen H.C., Haugan K. and Valla S. (1997) Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. Appl.Environ.Microbiol. **63**:370-379.
- Buckley D.H. and Schmidt T.M. (2000) The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. Microbial ecology **42**(1): 11-21.
- Cacciari I. and Lippi D. (1987) *Arthrobacters*: successful arid soil bacteria. A review. Arid Soil Research and Rehabilitation **1**:1-30.
- Cases I, Perez-Martin J. and de Lorenzo V. (1999) The IANtr (PtsN) protein of *Pseudomonas putida* mediates the C source inhibition of the σ 54-dependent Pu promoter of the TOL plasmid. J.Biol.Chem. **274**:15562-15568.
- Cases I. and de Lorenzo V. (2005) Genetically modified organisms for the environment: stories of success and failure and what we have learned from them. Int.Microbiol. **8**:213-222.
- Cavalca L., Colombo M., Larcher S., Gigliotti C., Collina E. and Andreoni V. (2002) Survival and naphthalene-degrading activity of *Rhodococcus* sp. Strain 1BN in soil microcosms. J.Appl.Microbiol. **92**:1058-1065.
- Cavalca L., Guerrieri N., Colombo M., Pagani S. and Andreoni V. (2006) Enzymatic and genetic profiles in environmental strains grown on polycyclic aromatic hydrocarbons. Ant van Leeuw **91**(4): 315-325.
- Chae J.C., Kim Y., Kim Y.C., Zilstra G.J. and Kim C.K. (2000) Genetic structure and functional implication of the fcb gene cluster for hydrolytic dechlorination of 4-chlorobenzoate from *Pseudomonas* sp. DJ-12. GENE **258**(1-2):109-16.
- Chae J.-C., Kim Y., Kim Y.-C., Zylstra G. J. and Kim C.-K. 2000. Genetic structure and functional implication of the fcb gene cluster for hydrolytic dechlorination of 4-chlorobenzoate from *Pseudomonas* sp. DJ-12. Gene **258**:109-116
- Chakrabarty A.M. (1986) Genetic engineering and problems of environmental pollution. Bio/Technology **8**:515-530.

- Chang K.H., Liang P.H., Beck W., Scholten J.D., and Dunaway-Mariano D. (1992). Isolation and characterization of the three polypeptide components of 4-chlorobenzoate dehalogenase from *Pseudomonas* sp. strain CBS-3. *Biochemistry*; 31 :5605-5610
- Chaudhry G.R. and Chapalamadugu S. (1991) Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiol. Rev.* **55**(1):59-79.
- Commandeur L.C. and Parsons J.R.. 1990. Degradation of halogenated aromatic compounds *Biodegradation* **1**(2-3):207-20.
- Crocker F.H., Fredrickson J.K., White D.e., Ringelberg O.B. and Balkwill O.L. (2000) Phylogenetic and physiological diversity of *Arthrobacter* strains isolated from unconsolidated subsurface sediments. *Microbiology.* **146**: 1295-310.
- de Jong E. and Field J.A. (1997) Sulfur tuft and turkey tail: biosynthesis and biodegradation organohalogens by *Basidiomycetes*. *Annu.Rev.Microbiol.* **51**:375-414.
- Diaz E. (2004) Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology* **7**:173-180.
- Dore S.Y., Clancy Q.E., Rylee S.M. and Kulpa F. (2003) Naphthalene-utilizing and mercury-resistant bacteria isolated from an acidic environment. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **63**(2): 194-9.
- Dua M., Singh A., Sethunathan n. and Johri A.K. (2002) Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **59**:143-152.
- Dunn N.W. and Gunsalus I.C. (1973) Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *J.Bacteriol.* **144**:974-979
- Eichner C.A., Erb R.W., Timmis K.N. and Wagner-Dobler I. (1999) Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(1): 102-109.
- Erb R.W., Eichner C.A., Wagner-Docler I. and Timmis K.N. (1997) Bioprotection of microbial communities from toxic phenol mixtures by a genetically designed pseudomonad. *Nature Biotechnology* **15**:378-382.
- Eriksson M., Sodersten E., Yu Z., Dalhammar G. And W.Mohn 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**(1):275-284.
- Fetzner S., and Lingens F. (1994) Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiol. Rev.* **58**(4):641-85.

- Fetzner S., Muller R. and Lingens F. (1992) Purification and some properties of 2-halobenzoate 1,2-dioxygenase, a two-component enzyme system from *Pseudomonas cepacia* 2CBS. J. Bacteriol. **174**(1):279-290.
- Franklin F. C., Bagdasarian M., Bagdasarian M.M. and Timmis K.N. (1981) Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **78**(12):7458-62.
- Fredrickson J.K., Balkwill D.L., Drake G.R., Romine M.F., Ringelberg D.B. and White D.C. (1995) Aromatic-degrading *Sphingomonas* isolates from the deep subsurface. Appl. Environ. Microbiol. **61**:1917-1922.
- Freier R. K. (1974) Wasseranalyse, 2nd ed. Walter de Gruyter, Berlin, Germany
- Furukawa K., Hayashida S., Taira K. (1991) Gene specific transposon mutagenesis of the biphenyl/polychlorinated biphenyl-degradation-controlling bph operon in soil bacteria. Gene **98**: 21-28.
- Gartemann K.H., Eichenlaub R (2001) Isolation and characterization of IS 1409, an insertion element of 4-chlorobenzoate-degrading *Arthrobacter* sp. strain TM 1 and development of a system for transposon mutagenesis. J. Bacteriol. **183**(12):3729-36.
- Grund A.D. and Gunsalus I.C. (1983) Cloning of genes for naphthalene metabolism in *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. **156**:89-94.
- Habe H., Omori T. (2003) Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. Biosci. Biotechnol. Biochem. **67**(2): 225-243.
- Harayama and Timmis "Metal ions in biological systems" Vol 28.
- Havel J. and Reineke W. (1993) Microbial degradation of chlorinated acetophenones. Appl. Environ. Microbiol. **59**(8):2706-12.
- Hirsch P., Bernhard M., Cohen S.S., Ensign J.C., Jannasch H.W., Koch A.L. (1979) Life under conditions of low nutrient concentrations: group report. Strategies of microbial life in extreme environments. In *Dahlem Konferenzen Life Sciences Research Report 13*. Shilo, M. (ed.). Weinheim, Germany: Verlag Chemie, pp. 357-372.
- Holloway P., Trevors J.T. and Hung L. (1998) A colorimetric assay for detecting haloalkane dehalogenase activity. J. of Microbiol. Meth. **32**:31-36.
- Horowitz A., Shelton D.R., Comell C.P., and Tiedje M. 1992. Anaerobic degradation of aromatic compounds in sediments and digested sludge. Dev. Ind. Microbiol. **23**:435-444.

- Iwabuchi T. and Harayama S. (1997) Biochemical and genetic characterization of 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase, an enzyme involved in phenanthrene degradation by *Nocardioides* sp. Strain KP7. *J.Mol.Biol.* **179**:6488-6494.
- Jain R.K., Kapur M., Labana S., Lal B., Sarma P.M., Bhattacharya D. and Thakur I.S. (2005). Microbial diversity: Application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. *Current Science* **89**(1):101-112.
- Johnsen A.R., Wick L.Y. and Harms H. (2005) Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution* **133**: 71-84.
- Jong-Su Seo, Young-Soo Keum, Renee M.Harada and Qing X.Li (2007) Isolation and characterization of bacteria capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organophosphorus pesticides from PAH-contaminated soil in Hilo, Hawaii. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 5383-5389.
- Kahn M., Kolter R., Thomas C. M, Figurski D., Meyer R., Remaut E. and Helinski D. R. (1979) Plasmid cloning vehicles derived from plasmid ColE1, R6K and RK2. *Methods Enzymol.* **68**:268-280.
- Kim E. and Zylstra G.J. (1999) Functional analysis of gene involved in biphenyl, naphthalene, phenanthrene and *m*-xylene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* B1. *J.Industrial Microbiology and Biotechnology* **23**:294-302.
- Larkin M.J., Allen C.C.R., Kulakov L.A. and Lipscomb D.A. (1999) Purification and characterization of a novel naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus* sp.strain NCIMB12038. *J.Bacteriol.* **181**:6200-6204.
- Layton A C., Sanseverin J., Wallace W., Corcoran C. and Sayler G. S. (1992) Evidence for 4-chlorobenzoic acid dehalogenation mediated by plasmids related to pSS50. *Appl.Environ.Microbiol.* **58**:399-402.
- Leys N.M.E., Ryngaert A., Bastiaens L., Verstraete W., Top E.M. and Springael D. (2004) Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strain in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(4): 1944-1955.
- Liffourrena AS, López FG, Salvano MA, Domenech CE, Lucchesi GI. (2008) Degradation of tetradecyltrimethylammonium by *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 restricted by accumulation of trimethylamine is alleviated by addition of Al(3+) ions. *J Appl Microbiol.* **104**(2):396-402.
- Löffler, F. and Müller R. (1991) Identification of 4-chlorobenzoyl-coenzyme A as intermediate in the dehalogenation catalyzed by 4-chlorobenzoate dehalogenase from

Pseudomonas sp. CBS3. FEBS Lett. 23;290(1-2):224-6.

- Lynge E., Anttila A. and Hemminki K. (1997) Organic solvents and cancer. *Cancer Causes and Control* **8**:406-419.
- Magara Y., Aizawa T., Matumoto N., and Souna F. (1994). Degradation of pesticides by chlorination during water purification. *Water Science & Technology* **30(7)**: 119-128.
- Marks T.S., Wait R., Smith A.R. and Quirk A.V. (1984) Degradation of 4-chlorobenzoic acid by *Arthrobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 1020-1025.
- Masse R., Messier F., Peloquin L., Ayotte C. and Sylvestre M. (1984) Microbial biodegradation of 4-chlorobiphenyl, a model compound of chlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* **47(5)**:947-51.
- McClure N.C., Weightman A.J. and Fry J.C. (1989) Survival of *Pseudomonas putida* UWC1 containing cloned catabolic genes in a model activated-sludge unit. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2627-2634.
- Meerts I.A.T.M., Letcher R. J., Hoving S., Marsh G., Bergman A., Lemmen J G., van der Burg B. and Brouwer A. (2001) In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PBDEs, and polybrominated bisphenol a compounds. *Environmental Health Perspectives* **109**:399-407.
- Menn F.M., Easter J.P. and Sayler G.S. (1999) 21 Genetically engineered microorganisms and bioremediation. Knoxville, TN 37996-1605, USA *Microbiol.* **50**:375-399.
- Mueller J.G., Chapman P.J., Blattmann B.O. and Pritchard P.H. (1990) Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1079-1086.
- Muller R., Thiele I, Klages U., Lingens F. (1984) Incorporation of [18O]water into 4-hydroxybenzoic acid in the reaction of 4-chlorobenzoate dehalogenase from *Pseudomonas* spec. CBS 3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15; **124(1)**: 178-82.
- Niedan V. and Scholer H. F. (1997) Natural formation of chlorobenzoic acids (CBA) and distinction between PCB-degraded CBA. *Chemosphere* **35**:1233-1241.
- Ogawa Naoto, Miyashita Kiyotaka, Chakrabarty A. M. (2003) Microbial genes and enzymes in the degradation of chlorinated compounds. *The Chemical Record* **3**:158-171

- Panke S., Sanchez-Rornero J.M., and de Lorenzo V. (1998) Engineering of quasi-natural *Pseudomonas putida* strains for toluene metabolism through an *ortho*-cleavage degradation pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(2):748-51.
 - Parales R.E., Parales J.V. and Gibson D.T. (1999) Aspartate 205 in the catalytic domain of naphthalene dioxygenase is essential for activity. *J. Bacteriol.* **181**: 1831-1837.
- Phylogenetic and physiological diversity of *Arthrobacter* strains isolated from unconsolidated subsurface sediments. *Microbiology.* **146**: 1295-310.
- Pinyakong O., Habe H. and Omori T. (2003) The unique aromatic catabolic genes in sphingomonads degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J.Gen.Appl.Microbiol.* **49**:1-19.
 - Pipke R., Wagner-Dobler I., Timmis K.N. and Dwyer D.F. (1992) Survival and function of a genetically engineered *Pseudomonad* in aquatic sediment microcosm. *Appl.Environ.Microbiol.* **58**: 1259-1265.
 - Radice F., Orlandi V., Massa V., Battini V., Bertoni G., Reineke W. and Barbieri P. (2007) Cloning of the *Arthrobacter* sp. FG1 dehalogenase genes and construction of hybrid pathways in *Pseudomonas putida* strains. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **75**:1111-1118.
 - Radice F., Orlandi V., Massa V., Cavalca L., Demarca A., Wood T.K. and Barbieri P. (2006) Genotypic Characterization and Phylogenetic Relations of *Pseudomonas* sp. (Formerly *P. stutzeri*) OX1. *Curr.Microbiol.* **52**: 395-399.
 - Reineke W. and Knackmuss H.L. (1988) Microbial degradation of haloaromatics. *Ann. Rev. Microbiol.* **42**:263-287
 - Rojo F., Pieper D.H., Engesser K.-H., Knackmuss H.-J. And Timmis K.N. (1987) Assemblage of *ortho* cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics. *Science* **238**:1395-1397.
 - Romine M.F., Fredrickson J.K. and Li S.M.W. (1999a) Induction of aromatic catabolic activity in *Sphingomonas aromaticivorans* strain F199. *J.Ind.Microbiol.Biotechnol.* **23**:303-313.
 - Romine M.F., Stillwell L.C., Wong K.K., Thurston S.J., Sisk E.C., Sensen C., Gaasterland T., Fredrickson J.K. and Saffer J.D. (1999) Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *J.Bacteriol.* **181**: 1585-1602.

- Saito A., Iwabuchi T. and Harayama S. (1999) Characterization of genes for enzymes involved in the phenanthrene degradation in *Nocardioides* sp. KP7. *Chemosphere* **38**:1331-1337.
- Saito A., Iwabuchi T. and Harayama S. (2000) A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp. KP7: expression in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **182**:2134-2141.
- Samanta, S. K., O. V. Singh, and R. K. Jain. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology* **20**:243-248.
- Savard, P., Charest H., Sylvestre M., Shareck F., Scholten J.D., and Dunaway-Mariano D. (1992) Expression of the 4-chlorobenzoate dehalogenase genes from *Pseudomonas* sp. CBS3 in *Escherichia coli* and identification of the gene translation products. *Can.J. Microbiol.* **38**:1074-1083.
- Saylor G.S. and Ripp S. (2000) Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. *Curr.Op.Biotechnol.* **11**:286-289.
- Schell M.A. and 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
- Schmitz A., Gartemann K.H., Fiedler I., Ground E. and Eichenlaub R. (1992) Cloning and sequences analysis of genes for dehalogenation of 4-chlorobenzoate from *Arthrobacter* sp. strain SU. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(12):4068-4071.
- Seffemick L. and Wackett L. P. (2001) Rapid evolution of bacterial catabolic enzymes: a case study with atrazine chlorohydrolase. *Biochemistry* **40**: 12747-12753.
- Seibert V., Stadler-Fritzsche K. and Schlomann M. (1993) Purification and characterization of maleylacetate reductase from *Alcaligenes eutrophus* JMP134(pJP4). *J. Bacteriol.* **175**(21): 6745-54.
- Seo J.S., Keum Y.S., Hu Y., Lee S.E. and Li Q.X. (2006) Phenanthrene degradation in *Arthrobacter* sp. P 1-1: Initial 1,2-, 3,4- and 9,10-dioxygenation, and meta- and ortho-cleavages of naphthalene-1,2-diol after its formation from naphthalene-1,2-dicarboxylic acid and hydroxyl naphthoic acids. *Chemosphere.* **65**:2388-2394.
- Story S.P., Parker S.H., Kline J.D., Tzeng T.-R. J., Mueller J.G. and Kline E.L. (2000) Identification of four structural genes and two putative promoters necessary for utilization of naphthalene, phenanthrene, and fluoranthene by *Sphingomonas paucimobilis* var.EPA505. *Gene* **260**: 155-169.

- Sze C.C. and Shingler V. (1999) The alarmone (p)ppGpp mediates physiological-responsive control at the σ_{54} -dependent Po promoter. *Mol.Microbiol.* **31**:1217-1228.
- Takeuchi M., Hamana K and Hiraishi A. (2001) Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **51**:1405-1417.
- Top E.M. and Springael D. (2003) The role of mobile genetic elements in bacteria adaptation to xenobiotic organic compounds. *Curr.Opinion.in Biotech.* **14**:262-269
- Toppari, J., Larsen J. C., Christiansen P., Giwercman A., Grandjean P., Guillette L.J., Jégou B., Jensen T. K., Jouanner P., Keiding N., Leffers H., McLachlan J. A., Meyer O., Muller J., Rajpert de-Meyts E., Scheike T., Sharpe R., Sumpter J., and Skakkebeek N. E. (1996) Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives* **104**: 741-803.
- Tsoi T.V., Zaitsev G.M., Plotnikova E.G., Kosheleva L.A. and Boronin A.M. (1991) Cloning and expression of the *Arthrobacter globiformis* KZT1 fcbA gene encoding dehalogenase (4-chlorobenzoate-4-hydroxylase) in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **65**(2): 165-9.
- Van den Berg K. L. (1990) Interaction of chlorinated phenols with thyroxine binding sites of human transthyretin, albumin and thyroid binding globulin *Chemico-Biological Interactions* **76**:63- 75.
- Van der Meer, Willem M. de vos, Harayama S., Zehnder A.J.B. (1992) Molecular mechanism of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* **56**: 677-694.
- van Pee K. H. (1996) Biosynthesis of halogenated metabolites by bacteria. *Annu.Rev.*
- Vogel T.M. and Walter M.V. (2001) Bioaugmentation. In *Manual of Environmental Microbiology*, Hurst, C.J., Crawford, R.L., Knudsen, G.R., McInemey, M.J., and Stetzenbach, L.D. (eds). Washington, DC, USA: American Society for Microbiology Press, pp. 952-959.
- Weisburg W.G., Bams S.M., Pelletier D.A. and Lane DJ. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J.Bacteriol.* **173**(2):697-703.
- Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC 19 vectors. *Gene* **33**:103-119.
- Young C.S., Lethbridge G., Shaw L., Burns R.G. (1995) Survival of inoculated

Bacillus cereus spores and vegetative cells in non-planted and rhizosphere soil. Soil Biology & Biochemistry **27**(8) 1017-1026

- Zhuang Z., Gartemann K.H., Eichenlaub R., Dunaway-Mariano D. (2003) Characterization of the 4-hydroxybenzoyl-coenzyme A thioesterase from *Arthrobacter* sp. strain SU. Appl. Environ. Microbiol. **69**(5):2707-11.

ALLEGATI

TCGGACTGGCTTTTCCTGACTCATGACAGCCTGATTCCGTCCCCTGGCGACTATGTTACGGCAAAAA
TGGGGTTGATGAGGTTATCGTCTCCAGGCAGAACGACGGTTCGATTCTGTGCTTTTCTGAACGTTTG
TCGTACCGTGGCAAGACGCTGGTACACGCAGAAGCAGGTAATGCTAAAGGTTTCGTTTGCAGCTA
TCACGGCTGGGGCTTCGGCGCTAACGGTGAAGTGCAGAGCGTCCCCTTTGAAAAAGAACTGTATGG
CGAGGCGCTCGACAAGAAATGTATGGGATTGAAAGAAGTCGCTCGTGTAGAGAGCTTCCATGGCTT
CATCTATGGTTGCTTCGATGAGGAAGCCCCTTCTCTCAAAGACTACATGGGGGACGCTGGCTGGTA
CCTGGAGCCTATGTTTAAGCATTCCGGAGGGCTAGAAGTATCGGTCCTCCAGGAAAGGTCATAAT
CAAGGCTAACTGGAAAGCGCCCGCGGAAAACCTTTACGGGGGATGCGTACCACGTGGGTTGGACGC
ATGCGTCTTCGCTTCGCTCAGGGCAGTCGGTCTTCTCGTTCGTTAGCTGGCAACGCAGCTTTGCCCC
AGAAGGTGCAGGTCTGCAAATGACCTCAAATACGGCAGCGGCATGGGTGTGTTGTGGGACGGAT
ATTCAGGCGTGCACAGCGCAGACCTGGTTCGGGAATTGATGGCCTTCGGCGGTGCTAAGCAGGAAC
GGCTGAACAAAGAAATTGGCGAGGTTTCGCGCACGAATCTATCGCAGCCACCTCAACTGCACCGTTT
TCCCGAACACAGTTTTCTGACCTGCTCGGGTGTCTTCAAGGTATGGCACCCGATCGACGCAAATA
CCTGAGGTATGGACCTACGCCATGGTCGAA

Allegato 1: Sequenza naftalene diossigenasi amplificata da *Pseudomonas* sp. PILH1

GACTGGCTTTTCCTGACTCATGACAGCCTGATTCCGTCCCCTGGCGACTATGTTACGGCAAAAAATG
GGGGTTGATGAGGTTATCGTCTCCAGGCAGAACGACGGTTCGATTCTGTGCTTTTCTGAACGTTTGTC
GTCACCGTGGCAAGACGCTGGTACACGCAGAAGCAGGTAATGCTAAAGGTTTCGTTTGCAGCTATC
ACGGCTGGGGCTTCGGCGCTAACGGTGAAGTGCAGAGCGTCCCCTTTGAAAAAGAACTGTATGGC
GAGGCGCTCGACAAGAAATGTATGGGATTGAAAGAAGTCGCTCGTGTAGAGAGCTTCCATGGCTTC
ATCTATGGTTGCTTCGATGAGGAAGCCCCTTCTCTCAAAGACTACATGGGGGACGCTGGCTGGTAC
CTGGAGCCTATGTTTAAGCATTCCGGAGGGCTAGAAGTATCGGTCCTCCAGGAAAGGTCATAATC
AAGGCTAACTGGAAATCGCCCGCGGAAAACCTTTGCGGGGGATGCGTACCACGTGGGTTGGACGCA
TGCGTCTTCGCTTCGCTCAGGGCAGTCGGTCTTCTCGTTCGTTAGCTGGCAACGCAGCTTTGCCCCCA
GAAGGTGCAGGTCTGCAAATGACCTCAAATACGGCAGCGGCATGGGTGTGTTGTGGGACGGATA
TTCAGGCGTGCACAGCGCAGACCTGGTTCGGGAATTGATGGCCTTCGGCGGTGCTAAGCAGGAACG
GCTGAACAAAGAAATTGGCGAGGTTTCGCGCACGAATCTATCGTAGCCACCTCAACGGCACCGTTTT
CCCGAACACAGTTTTCTGACCTGCTCGGGTGTCTTCAAGGTATGGCACCCGATCGACGCAAATAC
CACTGAGGTATGG

Allegato 2: Sequenza naftalene diossigenasi da *Pseudomonas* sp. A.