

Al Consiglio Nazionale delle Ricerche
Ufficio Accordi e Relazioni Internazionali
P.le Aldo Moro, 7 – 00185 Roma.

Oggetto: relazione scientifica – Programma Short Term Mobility 2010

L'attività di ricerca nell'ambito del programma Short Term Mobility 2010, si è svolta presso la *School of Civil and Environmental Engineering (Cornell University – Ithaca, NY)* nel periodo 15 Novembre – 10 Dicembre.

Il programma di ricerca proposto ha avuto come obiettivo l'applicazione di tecniche biomolecolari quali *Real time-PCR* (qPCR) e *Reverse Transcriptase Real time-PCR* (RT-qPCR) per l'analisi quantitativa di specie microbiche coinvolte nei processi di dealogenazione riduttiva in acquiferi contaminati da solventi clorurati. Il microorganismo oggetto del presente studio è il *Dehalococcoides* sp., l'unico genere finora conosciuto in grado di completare il processo di degradazione dei composti clorurati ad alto tenore fino all'innocuo etilene, partendo dal percloroetilene (PCE) e tetracloroetilene (TCE) e dagli intermedi *cis/trans-DCE* e VC, alcuni dei quali sono risultati altamente cancerogeni. Tale processo, la declorazione riduttiva (RD), è mediato dal *Dehalococcoides* sp. attraverso una forma di respirazione anaerobica in cui i solventi clorurati sono usati come accettori finali di elettroni durante la loro graduale trasformazione ad etilene. Grazie al suo metabolismo, questo microorganismo ha mostrato un ruolo significativo nei processi di biorisanamento sia in scala di laboratorio che in applicazioni di campo in cui il processo di declorazione riduttiva di eteni clorurati è stato positivamente correlato alla sua presenza; pertanto, l'individuazione e la quantificazione del *Dehalococcoides* sp., e del suo livello di attività metabolica, può consentire un accurato monitoraggio dei siti contaminati da solventi clorurati, nonché un controllo dei processi biodegradativi in atto.

Nell'ambito di questo programma di ricerca, particolare attenzione è stata rivolta alla quantificazione di diversi ceppi di *Dehalococcoides* sp. coinvolti in modo specifico in diverse fasi del processo biodegradativo, nonché alla metodologia per quantificarne l'espressione genica; a tale scopo sono state adottate le tecniche di quantificazione genica qPCR ed RT-qPCR. I geni di interesse analizzati sono stati il *tceA*, *bvcA* e *vcrA*, ognuno dei quali codifica per un enzima di

Dehalococcoides sp. coinvolto nella trasformazione sequenziale dei composti clorurati fino all'innocuo etilene.

In particolare, lo svolgimento del programma di ricerca ha previsto le seguenti fasi:

1. Estrazione di acidi nucleici – DNA ed RNA – da colture decloranti e da campioni ambientali provenienti da acquiferi contaminati;
2. Allestimento di *standards* di riferimento per la quantificazione assoluta della presenza dei singoli geni bersaglio e del loro livello di espressione;
3. Validazione degli *standards* con le chimiche adottate per la quantificazione, SYBRGreen e TaqMan;
4. qPCR: quantificazione dei geni funzionali *tceA*, *bvcA*, *vcrA*;
5. Metodologia per la quantificazione dell'espressione genica: RT-qPCR.

Estrazione di acidi nucleici – DNA ed RNA – da colture decloranti e da campioni ambientali provenienti da acquiferi contaminati.

Il DNA e l'RNA utilizzati in questo studio sono stati estratti sia da colture decloranti in scala di laboratorio che da campioni ambientali prelevati da un acquifero contaminato.

Il DNA è stato estratto con il kit *Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit (MoBio)* e quantificato usando sia la spettrofluorimetria (*Fluoroskan, Thermo Scientific*), che la spettrofotometria (*Nanodrop, Thermo Scientific*). Nel primo caso la quantificazione è stata eseguita mediante l'uso del colorante fluorescente PicoGreen, in grado di quantificare il DNA presente in concentrazioni < 1ng/μl, mentre nel caso del Nanodrop è possibile quantificare il DNA fino a 1ng/μl con informazioni aggiuntive circa la purezza dello stesso. Entrambi i metodi hanno fornito valori confrontabili di concentrazione di DNA maggiori di 1ng/μl.

L'estrazione dell'RNA – la quale richiede livelli di sterilità ed attenzione maggiori a causa della sua bassa stabilità – è stata eseguita con il kit commerciale DNA/RNA Minikit Extraction (*Qiagen*) che consente la contemporanea estrazione di DNA ed RNA dallo stesso campione. Nella fase iniziale dell'estrazione dell'RNA è stata aggiunta una quantità nota di mRNA del gene luciferasi, al fine di controllare la perdita di RNA durante l'estrazione; l'utilizzo della luciferasi come controllo interno è importante per stimare la reale quantità iniziale di trascritti rispetto a quelli stimati con la RT – qPCR (dopo la fase di estrazione dell'RNA e dopo la retrotrascrizione dell'RNA in cDNA, come verrà descritto in seguito). In questo caso la quantificazione è stata eseguita con il Nanodrop (*Thermo Scientific*) e con il BioAnalyzer2100 (*Agilent*). Nel primo caso, come per la quantificazione del DNA, si ottengono informazioni circa la concentrazione (ng/μl) e la purezza

dell'RNA estratto; nel caso del BioAnalyzer2100, poiché si tratta di un'elettroforesi capillare, oltre al dato di concentrazione si hanno anche informazioni qualitative rispetto all'integrità dell'RNA.

Anche nel caso dell'RNA, le concentrazioni in termini di ng/μl misurate con i due strumenti sono confrontabili.

Allestimento di *standards* di riferimento per la quantificazione assoluta della presenza dei singoli geni bersaglio e del loro livello di espressione. Il DNA e l'RNA estratto sono stati utilizzati rispettivamente per la quantificazione dei geni funzionali mediante quantificazione assoluta qPCR (dato espresso come numero di copie di gene) e per la quantificazione dell'espressione genica mediante RT – qPCR (dato espresso come numero di trascritti del gene). In entrambi i casi si tratta dell'amplificazione di un gene bersaglio (secondo il principio della PCR tradizionale) e della simultanea quantificazione del numero di copie inizialmente presenti nella reazione. Il dato quantitativo viene rilevato in fase esponenziale grazie all'impiego di una molecola fluorescente che intercala il DNA (SYBRGreen) o di sonde oligonucleotidiche sequenza-specifiche (TaqMan®) che emettono fluorescenza in seguito all'appaiamento con la sequenza bersaglio; in entrambi i casi, durante la fase esponenziale di amplificazione, l'intensità di fluorescenza aumenta proporzionalmente alla quantità di DNA amplificato, che dipende a sua volta dalla quantità di DNA inizialmente presente nella reazione.

Questo è il meccanismo di base della qPCR, che consente pertanto di quantificare il numero di copie dei geni bersaglio usando DNA genomico come “templato” per la reazione. La quantificazione dell'espressione genica si basa invece sul numero di trascritti di RNA presenti nella cellula provenienti dal DNA genomico ed impiegati per la successiva sintesi proteica. Per quantificare il numero di trascritti è necessario retrotrascrivere l'RNA in DNA, in quanto l'enzima polimerasi coinvolto nella reazione di amplificazione non è in grado agire sull'acido ribonucleico; si rende pertanto necessaria una fase di retrotrascrizione (*Reverse Transcriptase*) in cui dalla sequenza di RNA si ottiene la complementare sequenza di DNA (cDNA) da impiegare per quantificare il numero di trascritti: l'insieme della fase di retrotrascrizione e della qPCR è detta Reverse Transcription Real time – PCR (RT – qPCR). La quantificazione può avvenire mediante due approcci principali: la quantificazione relativa e la quantificazione assoluta. Nel primo caso si usa un riferimento endogeno della cellula in questione per stimare la presenza dei geni oggetto di studio, sia in termini di numero di copie di gene che di trascritti; nel caso della quantificazione assoluta si utilizza come riferimento una nota quantità di gene definita dall'allestimento di apposite rette di calibrazione.

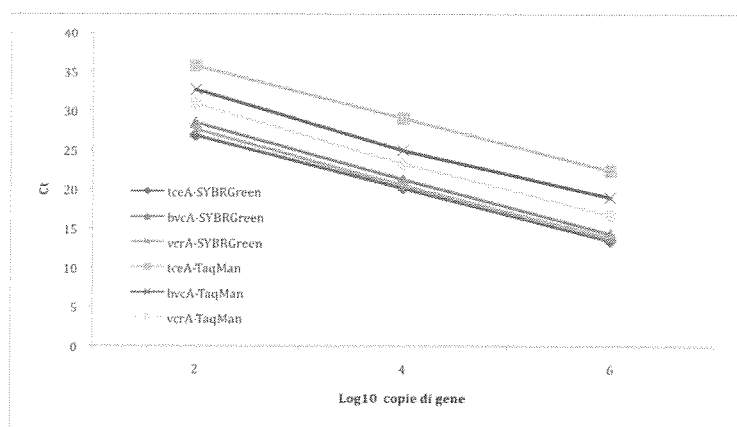
Poiché in questo studio è stata adottata la quantificazione assoluta, si è reso necessario allestire rette di calibrazione per ogni gene bersaglio (*tceA*, *bvcA*, *vcrA*), scegliendo di usare *standards* alternativi ai più comunemente usati plasmidi i quali, pur consentendo una maggiore stabilità nella conservazione degli stessi, possono talvolta creare problemi durante le reazioni di amplificazione, probabilmente a causa della topologia del loro DNA (ad es. superavvolgimento del DNA circolare). Gli *standards*, e le corrispondenti rette di calibrazione, sono stati allestiti usando DNA genomico estratto da colture decloranti di cui è nota la composizione in ceppi di *Dehalococcoides* sp. che esprimono in modo specifico i geni funzionali *tceA*, *bvcA*, *vcrA*; sono state pertanto allestite reazioni di PCR per ottenere prodotti (*long amplicons*) la cui lunghezza è tale da comprendere la regione di sequenza specifica per i *primers* e la sonda utilizzati per la quantificazione dei suddetti geni (tab.1). Il numero di copie di *long amplicons*, è calcolato in base alla concentrazione [ng/μl] e alla lunghezza in termini di paia di basi; da ogni prodotto sono pertanto allestite diluizioni seriali, da 10⁸ a 10² copie gene/μl, successivamente testate con le due principali chimiche di rilevamento usate nei saggi qPCR ossia SYBRGreen e TaqMan®.

Tab. 1 – Primer usati per ottenere i long amplicons. In tabella sono inoltre indicati i ceppi presenti nelle colture decloranti da cui è stato estratto il DNA per la PCR

Primers	Sequenze	Gene bersaglio	Ceppo	Riferimento
Dhc1F Dhc1377R	5'-GATGAACGCTAGCGGCG-3' 5'-GGTTGGCACATCGACTTCAA-3'	16S rDNA	DET195 VS BAV1 FL2 GT	Hendrickson et al., 2002
tceA797F tceA2490R	5'-ACGCCAAAGTGCGAAAAGC-3' 5'-TAATCTATTCCATCCTTTCTC-3'	tceA	DET195 FL2	He et al., 2003
bvcA450F bvcA1288R	5'-TGCCTCAAGTACAGGTGGT-3' 5'-ATTGTGGAGGACCTACCT-3'	bvcA	BAV1	Muller et al., 2004
vcrA F vcrA R	5'-CTATGAAGGCCCTCCAGATGC-3' 5'-GTAACAGCCCCAATATGCAAGTA-3'	vcrA	VS GT	Muller et al., 2004

Validazione degli *standards* con le chimiche adottate, SYBRGreen e TaqMan.

Per l'allestimento delle rette di taratura di ciascun gene, sono state utilizzate le diluizioni con 10⁶, 10⁴ e 10² copie di gene, eseguendo reazioni in triplicato. Dalle curve di amplificazione ottenute usando i *long amplicons* come *standard*, è evidente emerge la loro validità nell'allestimento delle rette di tarature per la quantificazione assoluta del numero di copie di geni (qPCR) e di trascritti (RT – qPCR). In base alla pendenza (*slope*) delle rette ottenute, sono stati calcolati i valori di efficienza di reazione (*E*), compresi tra il 91.64% e 98.74% per il SYBRGreen e il 91.46% e 99.25% per la chimica TaqMan® (fig.1, tab.1).



	Slope	Efficienza
tceA-SYBRGreen	-3.35	98.74%
bvcA-SYBRGreen	-3.54	91.64%
vcrA-SYBRGreen	-3.47	94.26%
tceA-TaqMan	-3.34	99.25%
bvcA-TaqMan	-3.43	95.58%
vcrA-TaqMan	-3.55	91.46%

Fig. 1 – Rette di taratura per la quantificazione assoluta (qPCR ed RT – qPCR) dei geni funzionali *tceA*, *bvcA* e *vcrA* di *Dehalococcoides* sp. Gli *standards* utilizzati per la quantificazione assoluta sono prodotti di PCR purificati di cui sono note la concentrazione e la lunghezza (v. testo). Il range di linearità testato va da 10^6 a 10^2 copie di gene. Nella tabella sono indicati i valori di pendenza delle rette, e le rispettive efficienze di amplificazione, ottenute testando gli *standards* per ciascun gene, sia con la chimica SYBRGreen che TaqMan®.

Basandosi sul parametro fondamentale della qPCR (C_t), indicativo il ciclo di amplificazione oltre il quale inizia la quantificazione del gene bersaglio, sono state confrontate le due chimiche utilizzate; l'utilizzo della chimica TaqMan® ha reso valori di C_t per i geni *tceA*, *bvcA* e *vcrA* maggiori in media di 8.92, 4.17 e 2.94 unità, rispetto a quelli ottenuti usando il SYBRGreen (tab.2), evidenziandone la maggiore specificità a parità di efficienza di reazione. La differenza dei valori di C_t è dovuta al meccanismo insito nelle due diverse chimiche, nonché al metodo di quantificazione proprio della qPCR la quale fornisce il numero di copie di gene inizialmente presenti nella reazione solo in seguito all'emissione di un segnale di fluorescenza proporzionalmente al numero di copie inizialmente presenti. Di fatto, mentre il SYBRGreen emette un segnale di fluorescenza quando la reazione di amplificazione ha inizio, la sonda TaqMan® emette il segnale di fluorescenza al termine di ogni ciclo di amplificazione, ossia quando l'appaiamento con la sequenza bersaglio è completo; tale meccanismo si traduce in una maggiore specificità di quest'ultima chimica che evita dunque segnali di fluorescenza aspecifici, connessi ad esempio ad amplificati parziali. Il raggiungimento del ciclo soglia C_t , e i diversi valori che ne derivano, possono dunque essere spiegati dai diversi meccanismi di emissione di fluorescenza delle due chimiche testate.

Tab. 2 – Valori di C_t ottenuti con le chimiche SYBRGreen e TaqMan® testate. Il ΔC_t si riferisce alla differenza del valore di C_t ottenuto con la TaqMan® e con il SYBRGreen per ogni diluizione testata sui tre diversi *standards* per i geni funzionali.

Log10 copie gene	ΔC_t (<i>tceA</i>)	ΔC_t (<i>bvcA</i>)	ΔC_t (<i>vcrA</i>)
2	8.89	4.2	3.21
4	8.92	3.7	2.72
6	8.94	4.6	2.90
ΔC_t medio	8.92	4.17	2.94

qPCR: quantificazione dei geni funzionali *tceA*, *bvcA*, *vcrA* mediante qPCR.

Per la quantificazione di ogni gene funzionale sono state allestite reazioni in triplicato con le coppie di *primers* testate sia con il SYBRGreen che con le sonde TaqMan (tab.3).

Tab. 3 – Primers e sonde utilizzate per la quantificazione dei geni funzionali mediante qPCR.

Primers/sonda	Sequenze	Gene bersaglio	Chimica	Riferimento
<i>tceA1270F</i> <i>tceA1294P</i> <i>tceA1336R</i>	5'-ATCCAGATTATGACCCTGGTGAA-3' 5'-FAM-TGGGCTATGGCGACCGCAGG-TAMRA 5'-GCGGCATATATTAGGGCATCTT-3'	<i>tceA</i>	TaqMan	Ritalahti et al., 2006
<i>bvcA925F</i> <i>bvcA977P</i> <i>bvcA1017R</i>	5'-AAAAGCACTTGGCTATCAAGGAC-3' 5'-FAM-TGGTGGCGACGTGGCTATGTGG-TAMRA-3' 5'-CCAAAAGCACCACCAGGTC-3'	<i>bvcA</i>	TaqMan	Ritalahti et al., 2006
<i>vcrA1022F</i> <i>vcrA1042P</i> <i>vcrA1093R</i>	5'-CGGGCGGATGCACTATTTT-3' 5'-FAM-CGCAGTAACTCAACCATTTCCTGGTAGTGG-TAMRA-3' 5'-GAATAGTCCGTGCCCTTCCTC-3'	<i>vcrA</i>	TaqMan	Ritalahti et al., 2006
<i>tceA1270F</i> <i>tceA1336R</i>	5'-ATCCAGATTATGACCCTGGTGAA-3' 5'-GCGGCATATATTAGGGCATCTT-3'	<i>tceA</i>	SYBRGreen	Ritalahti et al., 2006
<i>bvcA925F</i> <i>bvcA1017R</i>	5'-AAAAGCACTTGGCTATCAAGGAC-3' 5'-CCAAAAGCACCACCAGGTC-3'	<i>bvcA</i>	SYBRGreen	Ritalahti et al., 2006
<i>vcrA1022F</i> <i>vcrA1093R</i>	5'-CGGGCGGATGCACTATTTT-3' 5'-GAATAGTCCGTGCCCTTCCTC-3'	<i>vcrA</i>	SYBRGreen	Ritalahti et al., 2006

La quantificazione è stata eseguita sulle colture dechloranti D2 (contenente il ceppo *Dehalococcoides* sp. 195 che esprime il gene *tceA* per metabolizzare i composti clorurati) e KB1 (coltura mista contenente diversi ceppi di *Dehalococcoides* sp. che specificamente esprimono il *tceA*, il *bvcA* ed il *vcrA*) e sul campione ambientale (tab.4).

Con le due chimiche SYBRGreen e TaqMan, nella coltura D2 sono state rilevate rispettivamente 7.55×10^8 e 1.65×10^9 copie di *tceA* mL⁻¹ di campione iniziale; come atteso, il *bvcA* e il *vcrA* non sono stati trovati nella coltura D2 in quanto caratterizzata dal ceppo *Dehalococcoides* sp. 195.

Nella coltura KB-1 il SYBRGreen e la TaqMan hanno evidenziato rispettivamente 3.70×10^5 e 5.5×10^5 copie di *tceA* mL⁻¹, 8.5×10^5 e 1.5×10^6 copie di *bvcA* mL⁻¹; del gene *bvcA* sono state quantificate 5.5×10^4 copie mL⁻¹ con il SYBRGreen, a differenza della chimica TaqMan la quale non ha evidenziato la presenza del gene *bvcA* nella coltura KB-1. Inoltre, dalla quantificazione eseguita sul campione ambientale, emerge che con il SYBRGreen sono state quantificate 1.18×10^3 copie di *tceA* mL⁻¹ che con la TaqMan non vengono riscontrate; i valori ottenuti per i geni *bvcA* e *vcrA* nel campione ambientale risultano invece concordi tra le due chimiche, che forniscono dati confrontabili (3.32×10^4 e 1.09×10^4 copie di *bvcA* mL⁻¹ e 8.81×10^5 e 1.50×10^6 copie di *vcrA* mL⁻¹). Poiché la qPCR è una tecnica molto sensibile alle contaminazioni durante la fase di estrazione di DNA, nonché alla stabilità dello stesso, è molto probabile che il numero di copie di *tceA* rilevate

con il SYBRGreen nel campione ambientale, ma non riscontrate con la più specifica chimica TaqMan, possa essere correlata alla presenza di DNA degradato che emette pertanto un segnale fluorescente rilevabile con l'intercalante aspecifico che lega il DNA appena inizia la fase di amplificazione, ma non quando si utilizza una sonda specifica che necessita la completa amplificazione dell'intero gene.

Tab. 4 – Quantificazione geni funzionali in colture di arricchimento e campioni ambientali.

Primers	Campione	Chimica	Copie gene/ml
tceA	D2	SYBRgreen	7.55E+08
	D2	TaqMan	1.65E+09
	KB-1	SYBRgreen	3.70E+05
	KB-1	TaqMan	5.50E+05
	Campione ambientale	SYBRgreen	1.18E+03
	Campione ambientale	TaqMan	ND
bvcA	KB-1	SYBRgreen	5.55E+04
	KB-1	TaqMan	ND
	Campione ambientale	SYBRgreen	3.32E+04
	Campione ambientale	TaqMan	1.09E+04
vcrA	KB-1	SYBRgreen	8.50E+05
	KB-1	TaqMan	1.58E+06
	Campione ambientale	SYBRgreen	8.81E+05
	Campione ambientale	TaqMan	1.50E+06

Metodologia per la quantificazione dell'espressione genica: RT-qPCR.

La quantificazione dell'espressione genica si basa sulla variazione del numero di trascritti di un gene (mRNA) nel tempo, in seguito a diverse condizioni metaboliche; nel caso del *Dehalococcoides* sp., l'analisi dell'espressione genica prevede lo studio della variazione dell'mRNA dei geni funzionali (tceA, bvcA e vcrA) che codificano per gli enzimi direttamente coinvolti nel processo metabolico di respirazione anaerobica dei solventi clorurati. In questo studio non è stato possibile seguire l'andamento dell'espressione genica del *Dehalococcoides* sp. per un periodo di tempo compatibile con i processi di degradazione dei solventi clorurati, ma ne è stata approfondita la procedura metodologica, la quale verrà riprodotta nei successivi esperimenti che saranno allestiti nel laboratorio dell'istituto italiano di afferenza.

La quantificazione dei trascritti è eseguita con un approccio basato sulla PCR, previa estrazione dell'RNA, quantificazione e retrotrascrizione in DNA, o meglio in una copia complementare di DNA che riporta fedelmente la sequenza nucleotidica dell'mRNA; inoltre nella fase che precede la retrotrascrizione è di fondamentale importanza il trattamento con l'enzima DNasi, per eliminare la presenza di eventuali molecole di DNA dall'RNA purificato in seguito all'estrazione. Il DNA ottenuto mediante tale reazione è chiamato cDNA e viene impiegato direttamente nelle reazioni di qPCR, come precedentemente descritto, per quantificare il numero di copie di geni, i quali corrispondono esattamente al numero di copie di trascritti inizialmente presenti nell'RNA estratto. Poiché l'RNA è una molecola altamente instabile e facilmente degradabile, è importante controllarne la perdita durante le fasi analitiche che vanno dall'estrazione, alla retrotrascrizione fino alla qPCR. Per stimare la perdita di RNA, durante la fase di estrazione viene aggiunta una quantità nota di mRNA che codifica per l'enzima luciferasi, il quale verrà anch'esso retrotrascritto a cDNA e quantificato nella fase di amplificazione quantitativa qPCR. La differenza tra il numero di copie di mRNA inizialmente aggiunte durante l'estrazione dell'RNA e il numero di copie rilevate con la qPCR finale, fornisce una stima della perdita di RNA durante le fasi sperimentali; questo aspetto è molto rilevante ai fini della quantificazione in quanto si perde mediamente una quantità di mRNA rispetto a quello inizialmente presente pari al 16% durante la lisi cellulare, al 44% durante l'estrazione e al 7% durante il trattamento con l'enzima DNasi. Limitare questi valori, adoperando ambienti e materiali dedicati, può ridurre la perdita di mRNA che si ripercuote direttamente sulla stima del reale numero di trascritti presenti nei campioni che vengono analizzati; si considera ottimale una quantificazione in cui la perdita di mRNA non superi il 40%.

Conclusioni

Il lavoro svolto nell'ambito del programma ShortTermMobility2010 ha permesso l'ottimizzazione di tecniche d'indagine molecolare per il monitoraggio di specie microbiche (*Dehalococcoides* sp.) coinvolte nei processi di biodegradazione di composti clorurati tossici. Le tecniche oggetto del programma di ricerca di breve durata sono state la *Real time-PCR* (qPCR) e la *Reverse Transcriptase Real time-PCR* (RT-qPCR), impiegate rispettivamente nella quantificazione genica e nell'analisi dell'espressione dei geni di interesse.

In questo studio sono stati analizzati i tre principali geni funzionali (*tceA*, *bvcA* e il *vrA*) di *Dehalococcoides* sp. che codificano per enzimi che svolgono un ruolo chiave nel processo di dechlorazione riduttiva dei solventi clorurati, indicativi inoltre della presenza di diversi ceppi selettivamente coinvolti nelle diverse fasi del processo. Nel dettaglio, l'utilizzo delle due tecniche è stato ottimizzato mediante la messa a punto di una nuova tipologia di *standards*, ossia di sequenze

di lunghezza e concentrazione note dei geni di interesse, ottenute mediante PCR tradizionale, da impiegare nell'allestimento di rette di calibrazione per la quantificazione dei geni funzionali. Essi sono stati testati e validati con successo su colture dechloranti in scala di laboratorio e su campioni di acqua prelevati da un sito contaminato da solventi clorurati, usando le due principali metodologie di rilevamento (SYBRGreen e TaqMan) impiegate sia nella qPCR che nella RT-qPCR. L'utilizzo delle due tecniche fornisce informazioni complementari circa la presenza del *Dehalococcoides* sp., considerato come "*biomarker*" di contaminazione, e del livello di espressione di geni funzionali; questo consente pertanto di quantificare lo stato di attività metabolica dei ceppi del microorganismo dechlorante e di correlarlo al livello di degradazione dei solventi clorurati in colture e/o microcosmi in scala di laboratorio nonché al livello di biodegradazione naturale presente nei siti contaminati. Questo programma si integra negli studi condotti presso l'IRSA-CNR per definire la migliore metodologia per il monitoraggio *in situ* e la quantificazione di microrganismi dechloranti mediante l'utilizzo di tecniche molecolari, al fine di adoperare tali informazioni nei protocolli di valutazione ed attuazione nell'ambito del risanamento di siti contaminati da solventi clorurati.

Roma, 23 Gennaio 2011

Proponente: Dott.ssa Simona Rossetti

Firma 

Fruitore: Dott.ssa Bruna Matturro

Firma 