UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

Dipartimento Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali

Scuola di Dottorato in Biologia

DOTTORATO DI RICERCA BIOLOGIA APPLICATA E MEDICINA SPERIMENTALE

(XXIX Ciclo)

STUDIO SULLA DIVERSITÀ E FUNZIONE DI COMUNITÀ BATTERICHE ASSOCIATE A SEDIMENTI MARINI CONTAMINATI DA IDROCARBURI ED IDENTIFICAZIONE DELLE PRINCIPALI VIE METABOLICHE RELATIVE ALLA DEGRADAZIONE DELL'INQUINANTE

Tesi di

Rosario CALOGERO

Coordinatore:

Prof. **Salvatore Cuzzocrea**

Tutore:

Prof. **Emilio De Domenico**

Co-Tutore:

Dott. **Michail M. Yakimov**

Sommario

1.INTRODUZIONE 4
1.1 Il petrolio nell'ambiente marino 4
1.2 L'inquinamento nei sedimenti marini 5
1.3 Gradienti biogeochimici in sedimenti marini- diversità delle nicchie ecologiche .. 7
1.4 Principali metabolismi microbici chemiorganotrofi nei sedimenti marini 8
1.4.1 Respirazione aerobica 8
1.4.2 Denitrificazione 9
1.4.3 Ferro riduzione 9
1.4.4Solfato riduzione 10
1.5 Degradazione anaerobica 11
1.5.1 Degradazione anaerobica degli idrocarburi: meccanismi di attivazione del legame C-H in assenza di ossigeno 11
1.5.2 Idrossilazione 12
1.5.3 Addizione di fumarato 13
1.5.4 Metilazione e carbossilazione 14
1.6 Vie metaboliche anaerobiche per la degradazione di PAH 16
1.6.1 Degradazione del naphtalene 16
1.6.2 Methylnaphtalene 17
1.6.3 Phenantrene 17
1.7 BIBLIOGRAFIA 19
Outline della tesi. 27
2. Materiali e Metodi 29
2.1 Estrazione degli acidi nucleici, trascrizione inversa PCR e librerie di cloni. 29
2.2 Pyrosequencing 30
2.3 Analisi statistica 31
2.4 Colture arricchite da campioni naturali contaminati 31
2.5 Analisi degli idrocarburi 32
2.6 Misura della produzione di H_2S 32
2.7 Saggio Ecotossicologico. 33
2.8 Analisi dei metaboliti 33
2.9 BIBLIOGRAFIA 36
3. Studio della comunità microbica in sedimenti marini accidentalmente contaminati da idrocarburi: caso studio Gela 38

3.1 Evoluzione del contaminante nell'area di Gela 38
3.1.2 Proprietà geochimiche dei sedimenti 42
3.1.3 Evoluzione del petrolio nei sedimenti impattati. 44
3.1.3 Dinamica della comunità batterica. 45
3.1.4 Diversità. 49
3.1.5 Potenziale di self-cleaning aerobico - indagini in microcosmi. 50
3.1.6 Efficienza di degradazione, struttura della comunità microbica associata e isolamento di batteri idrocarburo degradanti da colture arricchite di Gela. 51
3.2 Conclusioni 53
3.3 BIBLIOGRAFIA 55
4 Strategia sperimentale con trattamento di ossigenazione di *clean-up* in mesocosmi. 58
4.1 Il sistema sperimentale 58
4.2 Risultati. 59
4.2.1 Degradazione del petrolio all'interno e all'esterno del sistema modulare. 59
4.2.2 Analisi ecotossicologiche. 60
4.2.3 Dinamica della comunità batterica durante il trattamento di bioremediation nei sedimenti contaminati. 61
4.2.4. Diversità batterica. 64
4.3 DISCUSSIONI. 65
4.4 CONCLUSIONI 68
4.5 BIBLIOGRAFIA 69
5. Strategia sperimentale per il *clean-up* di sedimenti anossici contaminati in mesocosmi. 73
5.1 Il sistema sperimentale. 73
5.2 Set-up dell'esperimento 73
5.2.1 Allestimento di meso- e microcosmi. 73
5.2.2 Contaminazione artificiale dei sedimenti 74
5.2.3. Realizzazione prototipo. 74
5.2.4 Raccolta dei campioni 75
5.3 Proprietà geochimica dei sedimenti 75
5.4 Degradazione dei composti aromatici durante i trattamenti sperimentali 75
5.5 Dinamica comunità microbica durante la sperimentazione 81
5.6 Analisi dei metaboliti durante la sperimentazione 84
5.7 CONCLUSIONI 87

5.8 BIBLIOGRAFIA 88
6. CONCLUSIONI GENERALI 89
7. RINGRAZIAMENTI 90

1.INTRODUZIONE

1.1 Il petrolio nell'ambiente marino

Nonostante gli enormi sforzi impiegati a livello globale per implementare le energie rinnovabili, le tecnologie a supporto del loro uso non sono ancora mature per garantire il totale fabbisogno della popolazione mondiale. Infatti, le proiezioni al 2040 riportano che 1/3 dell'energia mondiale proverrà ancora dal petrolio (*The Outlook for Energy: a view to 2040,* 2016). Purtroppo ciò non è privo di gravi conseguenze per l'ambiente come storicamente dimostrano il numero e le entità degli incidenti che si sono verificati negli ultimi 30 anni. Il principale ricettore della contaminazione da idrocarburi è l'ambiente marino, che si stima riceva 2,4 tonnellate l'anno di petrolio. Sebbene, la pubblica percezione focalizzi l'attenzione sui grandi disastri, in realtà questi costituiscono solo il 10% del totale input degli idrocarburi in mare. La maggior parte del contaminante proviene da scarichi urbani, industriali, operazioni relative a esplorazione, estrazione e raffinazione del petrolio e operazioni navali di carico e scarico. Tali eventi impattano non solo la salute umana e animale ma anche la biodiversità, le industrie marine come la pesca, l'acquacoltura e dissalatori, attività ricreative e infine, beni culturali e naturali, traducendosi in pesanti perdite economiche. I sedimenti marini costieri sono sede di importanti processi biologici e forniscono importanti servizi ecosistemici. Allo stesso tempo rappresentano le aree più a rischio essendo comprese tra i due principali vettori di idrocarburi: terra (scarichi industriali e urbani) e mare (trasporto e piattaforme offshore). In particolare, data la natura fortemente idrofobica degli idrocarburi in ambienti acquatici essi tendono rapidamente ad associarsi a materiale particolato, raggiungono i sedimenti e ne costituiscono la memoria dell'inquinamento locale (Fig.1). I sedimenti costieri dunque non sono sempre la destinazione finale dell'inquinante ma possono divenirne una fonte secondaria attraverso processi fisici, chimici e biologici (Baumard et al. 1998; De Luca et al. 2004, 2005; Laflamme and Hites. 1978).

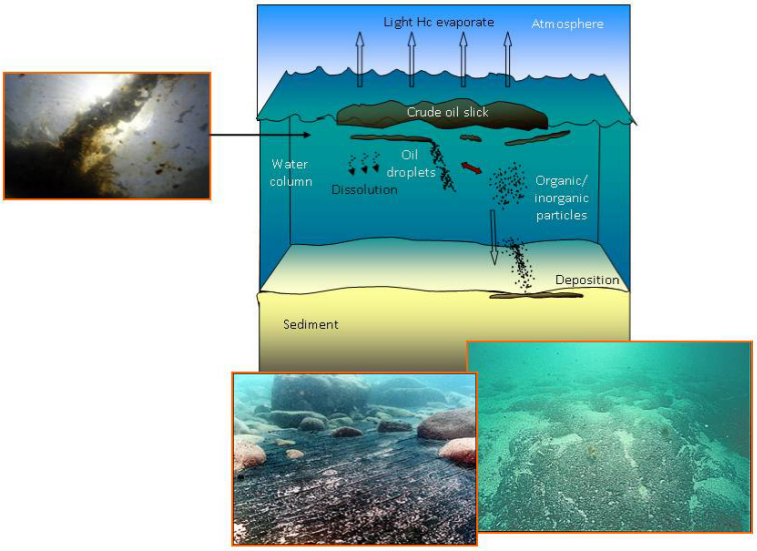


Fig.1: Rappresentazione della distribuzione del petrolio in mare inclusa la sedimentazione

1.2 L'inquinamento nei sedimenti marini

I sedimenti marini ricoprono circa il 70% della superficie terrestre (Parkes et al., 1994; Rochelle et al., 1994) e sono composti da due fasi: i) una fase acquosa, costituita dalle acque interstiziali, in cui si verificano la maggior parte delle reazioni biogeochimiche, e ii) una fase solida, inerte. Le proprietà fisiche e chimiche dei sedimenti (dimensioni, qualità del particellato, variazioni dei tassi di sedimentazione, ecc) sono notevolmente influenzate dai parametri ambientali (stagionalità, temperatura, contenuto di ossigeno, flussi di nutrienti, produzione primaria, salinità, presenza di materia organica, ecc) che li rendono habitat altamente variabili. Questa variabilità comporta un'elevata diversificazione delle nicchie ecologiche e delle relative comunità microbiche che le occupano (Fenchel et al., 1998;. Llobet-Brossa et al., 1998; Rosselló-Mora et al., 1999; Holmer et al., 2004), ed il verificarsi di una complessità di processi biogeochimici (Danovaro et al., 2001; Tankéré et al., 2002). In sedimenti di acque poco profonde, soprattutto in quelli con alti tassi di produzione primaria e di sostanza organica, generalmente, la disponibilità di ossigeno utilizzabile per i processi di mineralizzazione si esaurisce dopo i primi millimetri di profondità (Llobet-Brossa et al., 1998) e l' ulteriore decomposizione della sostanza organica è mediata dai consorzi microbici chemiorganotrofi (Kristensen et al., 1995) che ricavano energia ossidando i composti organici. Inoltre, all'aumentare della profondità, si osserva una diminuzione significativa del potenziale redox (O_2> NO_3-> Mn (IV)> Fe (III)> SO_4^{2-}), della qualità della sostanza organica e dell'attività

metabolica totale (Fenchel et al., 1998;. Kristensen and Holmer, 2001; Llobet-Brossa et al., 2002).

Nelle aree costiere il materiale organico è costituito altresì da una grande quantità di idrocarburi sia naturali che di origine antropica (Duran et al. 2008; Gillan et al. 2005; Iannelli et al. 2012; Kaci et al. 2014; Sabadini-Santos et al. 2014; Wang and Tam 2012).

Sebbene la letteratura fornisca molte informazioni sul problema dei sedimenti marini contaminati da petrolio, non c'è chiarezza sul problema della redistribuzione, biodisponibilità e tossicità dei prodotti petroliferi. Nasce, quindi, l'esigenza di sviluppare idonee ed efficienti tecnologie di bonifica *in situ* che siano in grado di ridurre i rischi di diffusione del contaminante ed i costi di gestione del trattamento. L'uso della biodegradazione microbica mediata da comunità microbiche autoctone per il recupero ambientale rappresenta un'affascinante alternativa al dragaggio (esportazione di sedimenti per trattamenti ex situ) o all'uso di prodotti chimici (la cui applicazione può aumentare notevolmente il rischio) (Zeng and Hong, 2002).

Il tema della degradazione microbica degli idrocarburi in ambiente marino risulta molto complesso infatti essi sono sottoposti a condizioni di ossigenazione fluttuanti che si alternano a stati di anossia dovuti ai cicli delle maree, all'apporto di nuovi sedimenti ed anche alle attività di *borrowing* della macrofauna (Fig.2) (Cravo-Laureau and Duran, 2014).

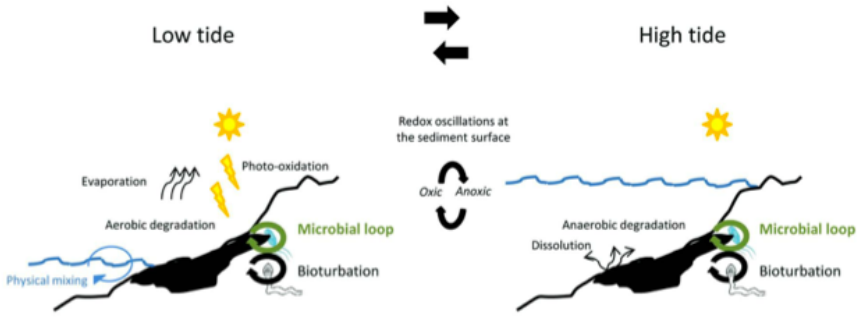


Fig.2: Rappresentazione schematica dei principali fattori biotici e abiotici che determinano il destino del petrolio nei sedimenti marini (Da Cravo-Laureau and Duran *Frontiers in Microbiology* 2014)

Se, le attuali conoscenze sui naturali processi di degradazione aerobica, insieme ai fattori che ne limitano l'efficacia, hanno dato il via a numerose tecnologie che consentono di sfruttare i trattamenti di *bioremediation* con risultati soddisfacenti , al

contrario, i processi di degradazione anaerobica che si realizzano nei sedimenti marini presentano ad oggi numerosi punti oscuri sia sui principali attori che sui loro cruciali pathways metabolici (Cravo-Laureau et al., 2011; Cuny et al., 2011; Vitte et al., 2013; Vitte et al., 2011). La comprensione di tali microrganismi, la loro ecologia, genetica, capacità enzimatica , la loro interazione e funzione durante i cambiamenti delle condizioni redox risulta dunque determinante per la pianificazione di strategie di *bioremediation* efficienti (Goñi-Urriza et al., 2013; McGenity, 2014).

La presente sezione tratterà specificatamente i processi di degradazione anaerobica poiché la matrice studiata è costituita da sedimenti marini anossici.

1.3 Gradienti biogeochimici in sedimenti marini- diversità delle nicchie ecologiche

Entrambe le proprietà, sia fisiche che chimiche dei sedimenti (ad esempio, dimensioni, qualità di materia organica particellata, variazioni del tasso di sedimentazione, etc.) sono influenzati da parametri ambientali (ad esempio variazioni stagionali della temperatura, contenuto di ossigeno, flussi di nutrienti, produzione primaria, concentrazione salina, d'acqua dolce o ingressi biologici, l'esistenza di radici delle piante o tana macrofauna) che li rendono habitat altamente variabili. Questa variabilità si riflette nella vasta gamma di nicchie ecologiche e dalle diverse comunità microbiche (Fenchel et al., 1998;. Llobet-Brossa et al, 1998;. Rosselló-Mora et al, 1999;.. Holmer et al., 2004) e soprattutto una grande diversità di processi biogeochimici (Danovaro et al., 2001;.Tankéré et al., 2002). Nei sedimenti superficiali, specialmente in quelli con alti tassi di produzione primaria, la produzione e la decomposizione di materia organica di solito supera la disponibilità di ossigeno durante i processi di mineralizzazione, facendo in modo che quest'ultimo sia già esaurito entro i primi millimetri sotto la superficie (Llobet-Brossa et al., 1998). L' ulteriore decomposizione della sostanza organica in strati sub-ossici e anossici è generalmente mediato da consorzi microbici mutualistici chemiorganotrofi (Kristensen et al., 1995), essi svolgono processi di respirazione basati su diversi accettori di elettroni inorganici. I microrganismi anaerobi che utilizzato gli idrocarburi come fonte di carbonio organico presentano un metabolismo chemiorganotrofo e utilizzato accettori di elettroni diversi dall'ossigeno.

Dato che i sedimenti presentano condizioni redox estremamente variabili in essi vi si svolgono attività relative sia a metabolismo aerobico che anaerobico.

1.4 Principali metabolismi microbici chemiorganotrofi nei sedimenti marini

1.4.1 Respirazione aerobica

La respirazione aerobica è, in termini di energia acquisita per mole di carbonio ossidato, il processo metabolico più efficiente. In questo processo, l'ossigeno funge contemporaneamente da accettore finale di elettroni e da reagente durante la sua incorporazione, catalizzata dall'ossigenasi, in molecole di substrato. La funzione di accettore di elettroni (in assenza di O_2) può essere svolta anche da altri composti ossidati (come il solfato o nitrato), ma non esiste un equivalente dell' ossigeno che può svolgere la sua funzione di reagente (Wakeham and Canue, 2006). Il metabolismo aerobico è generalmente più diretto rispetto a quello anaerobico a causa del coinvolgimento di diversi enzimi, molti dei quali sono specifici per i singoli tipi di gruppi funzionali organici. I diversi substrati sono, infatti, spesso rapidamente e completamente metabolizzati a CO_2 e biomassa da un unico microrganismo (Canfield, 1994).

Il metabolismo aerobico è svolto principalmente da microorganismi eterotrofi. Alcuni di loro sono anaerobi facoltativi, in grado di utilizzare per la loro sopravvivenza e la fermentazione percorsi alternativi a quello aerobico, come la riduzione dei nitrati o dei metalli (Nealson and Stahl, 1997). Nel metabolismo fermentativo, attraverso il disproporzionamento di carbonio organico, si formano acidi e alcoli grassi volatili (acetato, lattato, butirrato, etanolo, butanolo, etc.), CO_2 e H_2.

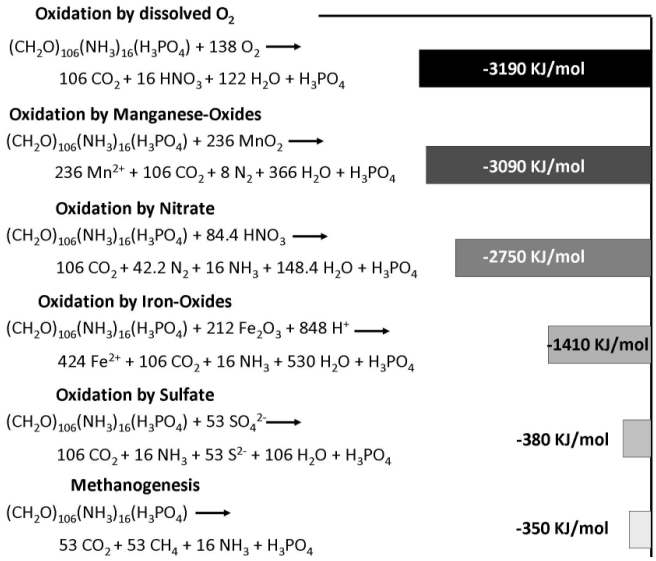


Fig 3: rappresentazione schematica delle reazioni redox durante la decomposizione biogeochimica della materia organica di sostanze organiche nei sedimenti marini. Le reazioni sono mostrate in ordine decrescente di energia (modificata da Schulz, 1999).

1.4.2 Denitrificazione

Come detto precedentemente, la concentrazione dell'ossigeno diminuisce all'aumentare della profondità, e di contro la concentrazione del nitrato aumenta. Il nitrato è l'accettore principale di elettroni durante il processo di denitrificazione operata dai batteri denitrificanti. Tuttavia, nella maggior parte degli ambienti marini, la denitrificazione rappresenta meno del 4% dell'ossidazione totale del carbonio (Jørgensen, 1982). Questo può dipendere dalla bassa concentrazione del nitrato nell'acqua di mare, dai processi di assimilazione (Sørensen, 1987; Koike and Sørensen, 1988; Fenchel et al., 1998;. Burdige, 2006) o ancora dall'inibizione del processo di denitrificazione determinata dalle alte concentrazioni di solfuro (An and Gardner, 2002; Burdige, 2006). Il processo di denitrificazione coinvolge trasversalmente vari livelli procariotici; infatti è stato studiato in organismi anaerobi facoltativi appartenenti ai molti generi di *Eubacteria* ma si estende anche ad varie membri alofili e ipertermofili di superkingdom *Archaea* (Zumft, 1997).

1.4.3 Ferro riduzione

I processi di Ferro riduzione iniziano in termini di energia subito dopo che vengono consumati l'ossigeno e il nitrato proprio come viene illustrato nella maggior parte delle immagini della sequenza dei processi redox (Fig. 3). Questi processi possono essere mediati sia chimicamente che microbiologicamente (Thamdrup et al., 2000). A differenza degli altri processi respiratori sopra descritti, la riduzione del Ferro

utilizza accettori di elettroni ridotti piuttosto che ossidati (forme ridotte sono di solito solubili mentre le forme ossidate sono altamente insolubili) (Burdige, 2006). In questo modo l'organismo ha bisogno di una coppia di elettroni per il trasporto per la riduzione dell'ossido di metallo. In molti casi questo viene ottenuto per contatto diretto con gli ossidi solidi (Nealson e Saffarini, 1994), composti di elettroni spola o Fe (III) chelanti (Nevin e Lovley, 2002). Queste vie metaboliche si ritiene siano di secondaria importanza nell' ossidazione globale del carbonio organico sedimentato (Canfield et al., 1993b).

1.4.4Solfato riduzione

Il Solfato è uno dei più abbondanti accettori di elettroni nei sedimenti marini (Thauer et al., 2007). E' stato stimato che la solfato riduzione produce energia sufficiente per la mineralizzazione di circa il 50% del materiale organico depositato nelle piattaforme continentali (Jørgensen, 1982). Nei sedimenti ricchi di sostanza organica, è stato evidenziato che il solfato viene utilizzato da circa il 70-100% dei microrganismi (Kristensen, 2000; Holmer et al., 2003). Questo dato conferma l'importanza dei batteri solfato-riduttori (SRB) nel ciclo dello zolfo e del carbonio (Ravenschlag et al., 2001; Knoblauch et al., 1999). Inoltre, gli SRB costituiscono un gruppo fisiologico di microrganismi anaerobi ben diversificato capace di degradare un ampio spettro di substrati organici, inclusi i prodotti del petrolio come gli alcani (Rueter et al., 1994; So and Young, 1999), il toluene (Beller et al., 1996; Rabus et al., 1993), il benzene (Phelps et al., 1998) e gli idrocarburi policiclici aromatici (Galushko et al., 1999; Zhang and Young, 1997). La maggior parte dei SRB descritti appartengono a quattro gruppi principali: i) Deltaproteobacteria mesofili (ad esempio *Desulfovibrio*, *Desulfobacterium*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*); ii) batteri Gram-negativi termofili; iii) i batteri Gram-positivi (es *Desulfotomaculum*) e iv) Euryarchaeota (ad esempio *Archaeoglobus*) (Thauer et al., 2007). Molti SRB possono utilizzare accettori di elettroni diversi dal solfato per la respirazione anaerobica (S^0, fumarato, nitrati, dimetilsolfossido, Mn (IV) e Fe (III)). Il primo esperimento in cui è stata evidenziata la riduzione dello zolfo come unica fonte di energia per la crescita microbica è stato realizzato quasi 80 anni fa da Pelsh (1936). Questi, realizzò un arricchimento dal fango utilizzando come unici substrati definiti lo zolfo e l'H_2. Le prime colture pure con acetato come donatore di elettroni furono realizzate con *Desulfuromonas acetoxidans*, un batterio anaerobico mesofilo (Pfennig and Biebl, 1976). E' stato dimostrato come la solfato riduzione venga inibita dalla presenza di O_2, tuttavia

alcuni SRB sono capaci anche di respirazione aerobica (Thauer et al., 2007). I batteri solfato riduttori acquistano energia per la sintesi e la crescita cellulare accoppiando l'ossidazione di composti organici o idrogeno molecolare (H_2) alla riduzione del solfato (SO_4^{2-}) a solfuro (H_2S).

1.5 Degradazione anaerobica

1.5.1 Degradazione anaerobica degli idrocarburi: meccanismi di attivazione del legame C-H in assenza di ossigeno

Le reazioni enzimatiche coinvolte nella degradazione aerobica degli idrocarburi ad opera dei funghi e batteri, sono state ampiamente studiate per diversi anni. Sotto condizioni ossiche, il metabolismo degli idrocarburi inizia spesso con reazioni enzimatiche svolte da mono e diossigenasi. La degradazione anaerobica degli idrocarburi gioca in natura un ruolo estremamente importante; per esempio, i sedimenti marini, rappresentano un ambiente naturale in cui l'ossigeno è l'accettore finale di elettroni il quale tende facilmente a diminuire, così che gli idrocarburi vengano degradati anaerobicamente. A partire dagli ultimi due decenni il numero di batteri anaerobi conosciuti che degradano gli idrocarburi è aumentato in maniera esponenziale. Recentemente è stato mostrato che i primi genomi disponibili di questi batteri possiedono un accesso facilitato ai geni ed enzimi coinvolti nei cicli di degradazione. Così, studiando la degradazione anaerobica degli idrocarburi, è stata mostrata un' incredibile reazione enzimatica di attivazione del legame C-H, che è facilmente comprensibile in casi come l'idrossilazione dell'etilbenzene. Un importante numero di *reviews* hanno focalizzato la loro attenzione su differenti aspetti di metabolismi di degradazione anaerobica degli idrocarburi (Boll et al., 2002; Thauer and Shima, 2008; Chakraborty and Coates, 2004; Heider, 2007; Heider and Rabus, 2008; Widdel and Rabus, 2001). Questi *reviews* hanno rivisto ampiamente le reazioni enzimatiche coinvolte nell'attacco iniziale al legame C-H da parte dei batteri idrocarburo degradanti. Alcune generali considerazioni relative all'energia di attivazione del legame C-H di idrocarburi differenti, dipendono dalle reazioni enzimatiche coinvolte.

1.5.2 Idrossilazione

L'idrossilazione del gruppo metilico di p-cresol (4-methylphenol) dall'acqua, è stato studiato solo in condizioni di aerobiosi. L'enzima capace di fare ciò è un flavocitocromo sconosciuto, un idruro ottenuto dal gruppo metilico e un intermedio catione stabile. Una simile reazione di idrossilazione anaerobica avviene per gli idrocarburi aromatici alchilati. In ogni caso, un idruro non può essere facilmente estratto dal toluene. Questo può derivare dal fatto che vi è una più alta energia di dissociazione del toluene comparata con l'analogo p-cresol fenolico. In ogni caso, sono richiesti differenti tipologie di enzimi per l'attivazione alkilbenzeni non-fenolici. L'energia di dissociazione del legame C-H in posizione C2 dell'etilbenzene, si trova tra i valori di p-cresol e il toluene. È stato dimostrato come l'etilbenzene è inizialmente attaccato tramite idrossilazione, con cedimento dell'(S)-phenylethanol e di due elettroni equivalenti. Il corrispondente ethylbenzene deidrogenasi è stato studiato in due differenti batteri denitrificanti, l'enzima ottenuto da *Aromatoleum aromaticum*, che rappresenta il miglior enzima studiato fino a questo momento nella degradazione anaerobica degli idrocarburi (Johnson and Spormann, 1999; Johnson et al., 2001; Kneiemeyer et al., 2003). L'etilbenzene deidrogenasi è un molibdeno-cofattore (MoCo) contenente un enzima della famiglia delle dimethylsulfoxide reduttasi.

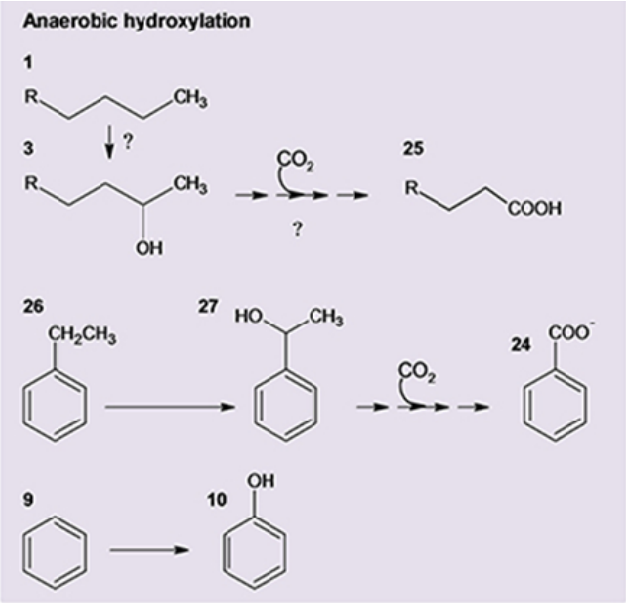


Fig.4: Reazione di idrossilazione anaerobica per la degradazione di idrocarburi aromatici.

1.5.3 Addizione di fumarato

La scoperta del benzilsuccinato come intermedio iniziale della degradazione anaerobica del toluene (Beller et al., 1992; Evans et al., 1992; Biegert et al., 1996), guida un nuovo tipo di reazione biochimica che spesso sembra essere coinvolto nell'attivazione anaerobica del legame C-H. Prove di tale reazione, sono state dimostrate per l'attivazione iniziale del toluene, xylene, ehylbenzene, p-cresol, methylnaphtalene, cyclohexane, n-hexane e piccole catene di alcani. In aggiunta, una simile reazione è stata affrontata ampiamente per l'ossidazione anaerobica del metano, accoppiato alla denitrificazione (Thauer and Shima, 2008). I principi di attivazione del legame C-H dall'addizione di fumarato, sono visibili per il benzylsuccinato sintasi (BSS), che è il prototipo di questa classe di enzimi. Il BSS è stato inizialmente isolato e caratterizzato dal batterio denitrificante *Thauera aromatica* (Leuthner et al., 1998). Questo enzima catalizza il primo step nel catabolismo anaerobico del toluene, lo stereospecifico *syn-addition* al fumarato (Biegert et al., 1996; Qiao and Marsh,2005). Questo appartiene alla classe di enzimi che comprendono piruvato e formato liasi o *anaerobic ribonucleotide reductase* (Selmer et al., 2005). Tutti i membri di questa classe di enzimi sono estremamente sensibili alla presenza di ossigeno a causa della presenza di un radicale glicile nella catena peptidica che può essere identificata da un tipico spettro di risonanza paramagnetico (Krieger et al., 2001; Duboc-Toia et al., 2003; Verfurth et al., 2004). Il radicale glicile non sembra essere coinvolto direttamente nella catalisi; a volte rappresenta semplicemente una forma relativamente stabile di un enzima che inizia il ciclo catalitico estraendo un protone da un residuo di cisteina, formando un tiolo molto più reattivo (Boll et al., 2002; Himo, 2005). Il BSS di *T. aromatica* è composta da tre sub-unità: una subunità grande che porta un radicale glicile stabile e due subunità più piccole che portano il cluster Fe-S. La catalisi della BSS inizia con la sottrazione di un atomo di idrogeno dal gruppo metilico del toluene, ottenendo un radicale benzilico. Il radicale benzilico poi aggiunge fumarato, producendo un radicale benzylsuccinico, che estrae un atomo di idrogeno dall'enzima (molto probabilmente la cisteina conservata), cedendo così il benzylsuccinato e il radicale glicile rigenerato.

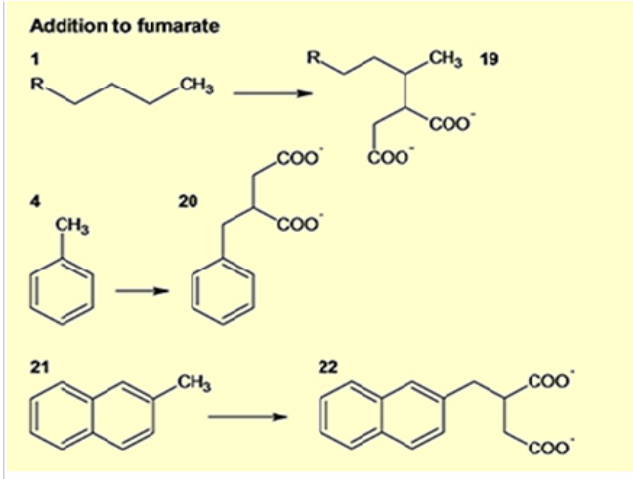


Fig.5: Meccanismi di attivazione tramite aggiunta di fumarato per la degradazione anaerobica di idrocarburi aromatici.

1.5.4 Metilazione e carbossilazione

Vi è in corso un dibattito riguardo le reazioni inziali coinvolte nella degradazione anaerobica del benzene e del naftalene. Nel caso della degradazione del naftalene, una prima convincente evidenza, è fornita dalla metilazione iniziale a 2-methylnaphtalene ottenuta nelle colture arricchite di batteri solfato riduttori (Annweiler et al., 2002; Safinowski and Meckenstock, 2006). L'intermedio metilato è successivamente convertito dall'addizione al fumarato, in analogia alla degradazione anaerobica del toluene in acido 2-naftoico (Safinowski and Meckenstock, 2004). Gli enzimi coinvolti in tali reazioni di metilazione sono ancora sconosciuti; un candidato probabile, potrebbe essere una metiltrasferasi contenente B_{12}. Come reazione alternativa, la carbossilazione diretta del naftalene ad acido naftoico è stato ampiamente discusso, basandosi su studi di carbonio marcato (bicarbonato C^{13}/C^{14}) (Zhang and Young, 1997; Zhang et al., 2000). L'attivazione del naftalene mediante carbossilazione diretta, è stata studiata in due solfato riduttori marini e batteri che degradano il naftalene (Musat et al., 2008). Quando i microrganismi crescono su naftalene, questi, metabolizzano il 2-methylnaphtalene solo dopo una *lag* fase e il radicale glicile, coinvolto nell'attivazione del gruppo metilico sembra essere espresso solo durante la crescita su 2-methylnaphtalene e non durante la crescita su naftalene. La degradazione anaerobica del benzene è stata mostrata nei colture di solfato, Fe (III)- e nitrato riducenti e anche nei consorzi metanogenici (Kunapuli et al., 2008; Musat and Widdel, 2008). L'energia di dissociazione del legame C-H del

benzene è spesso più elevata rispetto a quella del metano, che tra l'altro implica delle razioni enzimatiche ancora sconosciute. Infine, il benzene e il naftalene non possono essere attivati direttamente da una fosforilazione ATP-dipendente, che è invece necessaria per la carbossilazione del fenolo. Così, se la carbossilazione rappresenta il primo step della degradazione del benzene o del naftalene, le carbossilasi, devono operare attraverso un meccanismo diverso. La carbossilazione anaerobica degli idrocarburi è stato considerato come step iniziale della degradazione degli alcano da alcuni solfato riduttori (Callaghan et al., 2006; So et al., 2003), ma tali associazioni devono essere interpretate con cautela in quanto l'incorporazione di anidride carbonica marcata non è una reale prova delle reazioni di carbossilazione.

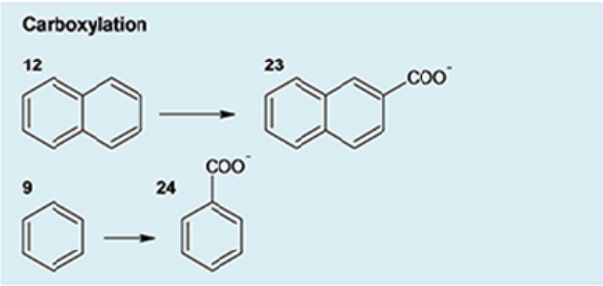


Fig.6: Meccanismi di attivazione tramite carbossilazione per la degradazione anaerobica di idrocarburi aromatici.

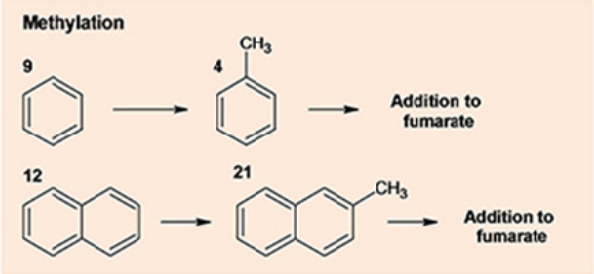


Fig.7: Meccanismi di attivazione tramite metilazione per la degradazione anaerobica di idrocarburi aromatici.

1.6 Vie metaboliche anaerobiche per la degradazione di PAH

1.6.1 Degradazione del naphtalene

I meccanismi che sono stati proposti per l'attivazione del naftalene ad opera di batteri sulfidogenici sono tre: idrossilazione, carbossilazione e metilazione (Bedessem et al., 1997; Safinowski and Meckenstock, 2006; Zhang and Young, 1997). Nel 1997, Bedessem et al. proposero che l'idrossilazione è il primo passo nella degradazione anaerobica del naftalene (Bedessem et al., 1997). Sempre nel 1997 Zhang and Young proposero la carbossilazione come reazione iniziale del catabolismo del naftalene (Zhang and Young, 1997). Esperimenti di marcatura con isotopi mostrano che il carbonio derivato dal bicarbonato marcato con ^{13}C, è direttamente integrato sul nucleo aromatico. Hanno quindi proposto la carbossilazione come un meccanismo per attivare il naftalene e formare acido 2-naphthoic (Zhang and Young, 1997) Safinowski and Meckenstock (2006) hanno trovato prove di una strategia di degradazione analoga al metabolismo anaerobico degli idrocarburi monoaromatici (Safinowski and Meckenstock, 2006). Essi propongono che il naftalene viene prima metilato per facilitare una reazione successiva con il fumarato. In accordo con i dati pubblicati da Zhang and Young (1997), la metilazione può essere facilitata da CO-deidrogenasi, un enzima prodotto dall' ossidazione dell' acetato, che può generare a sua volta un gruppo metilico dal bicarbonato. Dopo la metilazione il fumarato aggiunto al gruppo metilico, genera l'acido intermedio naftil-2-metil-succinico. Questo acido naftil-2-metil-succinico viene poi ossidato a naftil-2-metilen-acido succinico (Safinowski and Meckenstock, 2006). Una serie di reazioni di ossidazione portano alla formazione di acido 2-naftoico, un metabolita centrale della degradazione anaerobica PAH (McNally et al., 1999;. Safinowski and Meckenstock, 2006). Zhang and Young (1997) quindi hanno dimostrato che il naftalene viene trasformato in acido 2-naftoico. In uno studio più recente, Zhang et al. (2000) identificarono un percorso più breve per la degradazione del naftalene (Zhang et al., 2000). Il sistema di anelli è notevolmente ridotto, generando metaboliti come, acido esaidro-2-naftoico, e l'acido deca-idro-2-naftoico tetraidro-2-naphthoic (Aitken et al., 2004;. Annweiler et al., 2002;. Zhanget al., 2000).

1.6.2 Methylnaphtalene

Nel metabolismo del 2-metilnaftalene, viene osservato un meccanismo simile a quello del toluene (Annweiler et al., 2000;. Meckenstock et al., 2004). Il fumarato viene aggiunto al gruppo metilico, conseguentemente si sviluppa il intermedio acido, naphthyl-2-metil-succinato. Acido naftil-2-metil-succinico viene poi ossidato a naftil-2-metilene-succinato (Annweiler et al., 2000). Una serie di reazioni che formano acido 2-naftoico, un metabolita centrale proposto nella degradazione PAH (Meckenstock et al., 2004). Questo meccanismo riprende il metabolismo osservato per la degradazione del naftalene (Zhang et al., 2000).

1.6.3 Phenantrene

Gli studi di Zhang e Young (1997) su un arricchimento di organismi solfato-riduttori coltivati su fenantrene marcato con ^{13}C genera isotopi come l'acido phenanthroico. Ciò ha dimostrato come la carbossilazione fosse il meccanismo di attivazione per la degradazione del phenantrene (Zhang and Young, 1997). I dati ottenuti da Davidova et al. (2007) derivanti da una coltura sulfidogenica, sostengono ulteriormente le osservazioni di Zhang e Young (Davidova et al., 2007). Il Fenantrene-carboxaldehyde è stato ritrovato anche in coltura con organismi nitrato riduttori. Questo suggerisce che i meccanismi per attivare il fenantrene possono essere utilizzati da organismi che crescono in diverse condizioni redox (Eriksson et al., 2003;. Zhang and Young, 1997).

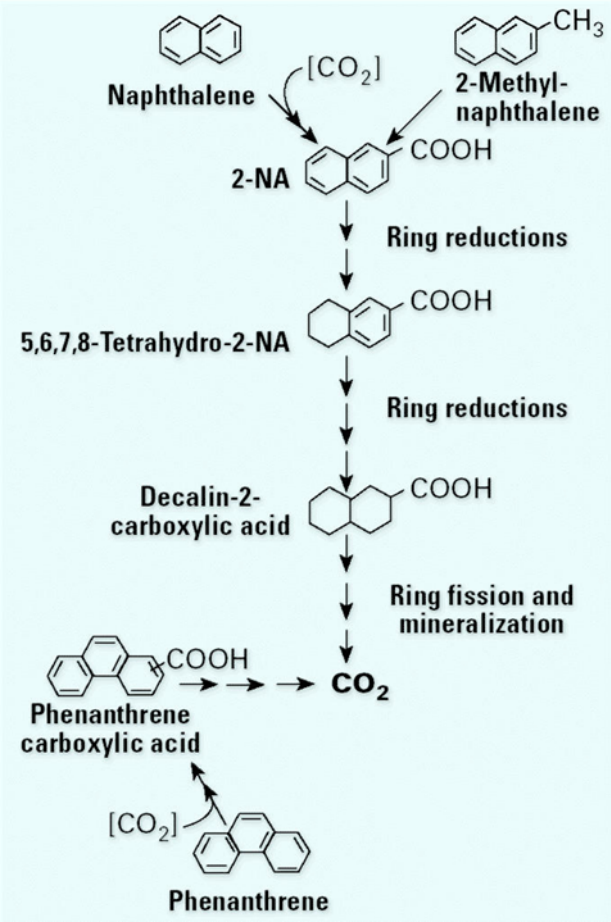


Fig 8: Meccanismi di degradazione in anaerobiosi per il Naphtalene,2-Methylnaphtalene e Phenanthrene.

Per quanto riguarda la degradazione anaerobica di idrocarburi policiclici aromatici queste ultime sono le uniche vie conosciute per adesso e proprio per questo la ricerca in questo campo ha ancora molto da dire.

1.7 BIBLIOGRAFIA

Alain, K., and Querellou, J. (2009) Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles* **13**: 583-594.

Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Review* **59**: 143-169.

An, A., and Gardner, W.S. (2002) Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) as a nitrogen link, versus denitrification as a sink in a shalow estuary (Laguna madre/Baffin Bay, Texas). *Marine Ecology Progress Series* **237**: 41-50.

Atlas, R.M., and Bartha, R. (1997) Microbial ecology-fundamentals and applications. Benjamin-Cummings Science Publishing, Menlo Park, California, US.

Azam, F. (2001) Introduction, history, and overview: the 'methods' to our madness. *In* Methods in Microbiology, Marine Microbiology (vol 30). Paul, J.H. (ed.), Academic Press, London, UK, pp.1-12.

Bailly, J., Fraissinet-Tachet, L., Verner, M.C., Debaud, J.C., Lemaire, M., Wesolowski- Louvel, M., and Marmeisse, R. (2007) Soil eukaryotic functional diversity, a metatranscriptomic approach. *ISME Journal.* **1**: 632-642.

Bragg, J.R., Prince, R.G., Harner, E.J., and Atlas, R.M. (1994) Effectiveness of bioremediation for the Exxon-Valdez oil-spill. *Nature* **368**: 413-418.

Burdige, D.J. (2006) Geochemistry of Marine Sediments. Princeton University Press, US.

Canfield, D.E. (1994) Factors influencing organic carbon preservation in marine sediments. *Chemical Geology Journal* **114**: 315-329.

Coates, J.D., Woodward, J., Allen, J., Philp, P., and Lovley, D.R. (1997) Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-

contaminated marine harbor sediments. *Applied Environmental Microbiology* **63**: 3589-3593.

Danovaro R., Armeni M., Dell'Anno A., Fabiano M., Manini E., Marrale D.,Pusceddu A., Vanucci S. (2001) Small-scale distribution of bacteria enzymatic activities, and organic matter in coastal sediments. *Microbial Ecology* **42**: 177-185.

DeLong, E.F., Wickham, G.S., and Pace, N.R. (1989) Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**: 1360-1363.

DeLong, E.F. (2009) The microbial ocean from genomes to biomes. *Nature* **459**: 200-206.

Eilers, H., Pernthaler, J., Glöckner, F.O., and Amann, R. (2000) Culturability and *in situ* abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Applied Environmental Microbiology* **66**: 3044-3051.

Fenchel, T. (1998) Artificial cyanobacterial mats:structure and composition of the biota. *Aquatic Microbiology Ecology* **14**:241-251.

Foght, J. (2008) Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospects. *Journal of Molecular Microbiology Biotechnology* **15**: 93-120.

Francisco, D.E., Mah, R.A., and Rabin, A.C. (1973) Acridine oange-epifluorescence technique for counting bacteria in natural waters. *Transactions of the American Microscopical Society* **92**: 416-421.

Galperin, M.Y., and Koonin, E.V. (2010) From complete genome sequence to 'complete' understanding? *Trends Biotechnology* **28**: 398-406.

Gertler, C., Yakimov, M.M., Malpass, M.C., and Golyshin, P.N. (2010) Shipping-related accidental and deliberated release into the environment. *In Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology* (Vol 1). Timmis, K.N. (ed.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, DE, pp. 244-256.

Glöckner, F.O., Fuchs, B.M., and Amann, R. (1999) Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization. *Applied Environmental Microbioogy.* **65**: 3721-3726.

Hayes, L.A., Nevin, K.P., and Lovley, D.R. (1999) Role of prior exposure on anaerobic degradation of naphthalene and phenanthrene in marine harbor sediments. *Organic Geochemistry* **30**: 937-945.

Hobbie, J.E., Daley, R.J., and Jasper, S. (1977) Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied Environmental Microbiology* **33**: 1225-1228.

Holmer, M., Duarte, C.M., and Marbà, N. (2003) Sulfur cycling and seagrass (*Posidonia oceanica*) status in carbonate sediments. *Biogeochemistry* **66**: 223-239.

Jørgensen, B.B. (1982) Mineralization of organic matter in the sea bed n role of sulfate reduction. *Nature* **296**: 643-645.

Zengler, K., Richnow, H.H., Rosselló-Mora, R., Michaelis, W., and Widdel F. (1999) Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature* **401**: 266-269.

Knoblauch, C., Sahm. K., and Jorgensen, B.B. (1999) Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold Arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp. nov., *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfofaba gelida* gen. nov., sp. nov., *Desulfotalea psychrophila*gen. nov., sp. nov. and *Desulfotalea arctica* sp. nov. *International Journal Systematic Bacteriology* **49**: 1631-1643.

Koike, I., and Sørensen, J. (1988) Nitrate reduction and denitrification in marine sediments. *In* Nitrogen cycling in coastal marine sediments. Balckburn, T.H. and J. Sørensen (eds.), John Wiley and Sons, US, pp. 251-274.

Kristensen, E., Ahmed, S.I., and Devol, A.H. (1995) Aerobic and anaerobic decomposition of organic matter in marine sediment: which is fastest? *Limnology Oceanography* **40**:1430–1437.

Kristensen, E., and Holmer, M. (2001) Decomposition of plant materials in marine sediments exposed to different electron acceptors (O_2.,NO_3, and SO_4^{2-}) with emphasis on substrate origin,degradation kinetics,and the role of bioturbation. *Geochimica et cosmochimica acta* **65**:419-433.

Kristensen, E. (2000). Organic matter diagenesis at the oxic/anoxic interface in coastal marine sediments, with emphasis on the role of burrowing animals. *Hydrobiology* **426**: 1–24.

Llobet-Brossa, E., Rossellò-Mora, R., and Amann R. (1998) Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 2691-2696.

Llobet-Brossa, E., Rabus, R., Bottcher, M.E., Konneke, M., Finke, N., Schramm, A., Meyer, R.L., Grotzschel, S., Rossello-Mora, R. and Amann, R. (2002) Community structure and activity of sulfate-reducing bacteria in an intertidal surface sediment: a multimethod approach. *Aquatic Microbial Ecology* **29**: 211-226.

Ludwig, W., and Klenk, H.P. (2001) Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. *In Bergey Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Boone, D.R., Castenholz, R.W. and G.M. Garrity (eds.), Springer, N Y, pp. 49-65.

Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., and Verstraete, W. (2008) How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology* **10**: 1571-1581.

Meyerdierks, A., and Glöckner, F.O. (2010) Metagenome analyses. *In* Introduction to Marine Genomics, *Advances in Marine Genomics*. Cock, J.M., Tessmar-Raibler, K., Boyen, C., and F. Viard, (eds.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, DE, pp. 33-71.

Miralles, G., Nerini, D., Mante, C., Acquaviva, M., Doumenq, P., Michotey, V., Nazaret, S., Bertrand, J.C., and Cuny, P. (2007) Effects of spilled oil on bacterial communities of mediterranean coastal anoxic sediments chronically subjected to oil hydrocarbon contamination. *Microbiology Ecology* **54**: 646-661.

Muyzer, G., and Smalla, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**: 127-141.

Muyzer, G., Teske, A., Wirsen, C.O., and Jannasch, H.W. (1995) Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives Microbiology* **164**: 165-172.

Nealson, K.H., and Stahl, D.A. (1997) Microorganisms and biogeochemical cycles: What can we learn from layered microbial communities? In: J. F. Banfield and K. H. Nelson (Eds), P. H. Ribbe (Series Ed.) "Geomicrobiology: Interactions between microbes and minerals." Reviews in Mineralogy Vol. 35. *Mineralogical Society of American*. Washington D. C.

Nichols, D. (2007) Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbiology Ecology* **60**: 351-357.

Paissé, S., Coulon, F., Goñi-Urriza, M., Peperzak, L., McGenity, T.J., and Duran, R. (2008) Structure of bacterial communities along a hydrocarbon contamination gradient in a coastal sediment. *FEMS Microbiology Ecology*. **66**: 295-305.

Parkes, R.J., Cragg, B.A., Bale, S.J., Getliff, J.M., Goodman, K., Rochelle, P., Fry, J.C., Weightman, A.J., and Harvey, S.M. (1994) Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments. *Nature* **371**: 410-413.;

Peplies, J., Kottmann, R., Ludwig, W., and Glockner, F.O. (2008) A standard operating procedure for phylogenetic inference (SOPPI) using (rRNA) marker genes.

Systematyc Applied Microbiology **31**: 251-257.

Pernthaler, A., Pernthaler, J., and Amann, R. (2002) Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied Environmental Microbiology.* **68**: 3094-3101

Poretsky, R.S., Bano, N., Buchan, A., LeCleir, G., Kleikemper, J., Pickering, M., Pate, W.M., Moran, M.A., and Hollibaugh, J.T. (2005) Analysis of microbial gene transcripts in environmental samples. *Applied Environmental Microbiology* **71**: 4121-4126.

Psarros, G., Skjong, R., and Vanem, E. (2010) Risk acceptance criterion for tanker oil spill risk reduction measures. *Marine Pollution Bulletin* **62**: 116-127.

Rabus R, Nordhaus R, Ludwig W, Widdel F (1993). Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Applied Environmental Microbiology* **59**: 1444-1451.

Ram, R.J., Verberkmoes, N.C., Thelen, M.P., Tyson, G.W., Baker, B.J., Blake, R.C., 2nd, Shah, M., Hettich, R.L., and Banfield, J.F. (2005) Community proteomics of a natural microbial biofilm. *Science* **308**: 1915-1920.

Ritz, K. (2007) The plate debate: cultivable communities have no utility in contemporary environmental microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* **60**: 358-362.

Rochelle, P.A., Cragg, B.A., Fry, C.J., Parkes, R.J., and Weightman, A.J. (1994) Effect of sample handling on estimation of bacterial diversity in marine sediments by 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiology Ecology* **15**: 215-226.

Rosselló-Móra, R., Thamdrup, B., Schafer, H., Weller, R., and Amann, R. (1999) The response of the microbial community of marine sediments to organic carbon input under anaerobic conditions. *Systematic Applied Microbiology* **22**: 237-248.

Röling, W.F.M., and Head, I.M. (2005) Prokaryotic systematics: PCR and sequence

analysis of amplified 16S rRNA genes. In *Molecular Microbial Ecology*. Osborn A.M. and C.J. Smith (eds.). Taylor and Francis group, UK, pp. 25-63.

Rosselló-Móra, R. (2005) Updating prokaryotic taxonomy. *Journal Bacteriology* **187**: 6255-6257.

Rueter, P., Rabus,R., Wilkest, H., Aeckersberg, F., Rainey, F., Jannasch, H., and Widdel, F. (1994) Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria *Nature* **372**: 455-458.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.

Sørensen, J. (1987) Nitrate reduction in marine sediments: pathways and interactions with iron and sulfur cycling. *Geomicrobiology Journal* **5**: 401-421.

Stach, J.E., and Bull, A.T. (2005) Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **87**: 3-9.

Bourne D.G., Muller F.L., and Torsvik V. (2002) Microenvironments and microbial community structure in sediments. *Environmental Microbiology* **4**: 97-105.

Thauer, R.K., Stackebrandt, E., and Hamilton, W.A. (2007) Energy metabolism and phylogenetic diversity of sulphate-reducing bacteria. In *Sulphate-reducing bacteria: environmental and enfineered systems*. L.L. Barton and W.A. Hamilton (eds.), *Cambridge University Press,* UK, pp. 1-37.

Widdel, F. and Rabus, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* **12**: 259-276.

Widdel, F., Knittel, K., and Galushko, A. (2010) Anaerobic hydrocarbon-degrading microorganisms: an overview. *In Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Timmis, K.N. (ed). Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, pp. 1997-2021.

Wilmes, P., and Bond, P.L. (2006) Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. *Trends in Microbiol*ogy **14**: 92-97.

Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiology Review* **51**: 221-271.

Wakeham, S.G., and Canue, E.A. (2006) Degradation and preservation of organic matter in marine sediments. *Handbook Environmental Chemistry.* **2**: 295-321.

ZoBell, C. (1946) Marine microbiology, a monograph on hydrobacteriology. Chronica Botanica Company, US.

Zumft, W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology Molecular Biology Review* **61**: 533-616.

Outline della tesi.

Il principale scopo della tesi è:

Lo studio e la caratterizzazione della comunità microbica in sedimenti marini anossici contaminati con particolare attenzione allo studio dei principali vie metabolici associati alla degradazione di composti aromatici presenti in petrolio grezzo. Implementazione di biotecnologie per il recupero/risanamento di sedimenti marini anossici attraverso la stimolazione dei processi di biodegradazione *in situ.*

Il terzo capitolo descrive lo studio sull'evoluzione del petrolio nell'area costiera di Gela (Sicilia) a seguito di un reale incidente di sversamento di petrolio causato dalla rottura di una condotta del Polo Petrolchimico di Gela in Giugno 2013.

I capitoli successivi descrivono due differenti trattamenti ottimizzati per sedimenti marini anossici contaminati da idrocarburi policiclici aromatici. Entrambi i trattamenti sono stati progettati per applicazione *in situ*.

In particolare, il capitolo 4 riporta l'applicazione della campana di biodegradazione (Brevetto PN2012A000012 B12-082IT) come sistema di confinamento e ossigenazione dei sedimenti. Tale tecnologia favorisce i naturali processi di biodegradazione del contaminante utilizzando un intervento meccanico che risospende i sedimenti ossigenandoli e rendendo disponibili i nutrienti in essi intrappolati.

Il capitolo 5 descrive un trattamento di bio-stimolazione basato sull'aggiunta di accettori di elettroni alternativi all'ossigeno in condizioni di anossia.

Il modello di studio applicato per la presente tesi è descritto nella Fig. 9. L'osservazione di un ambiente marino costiero affetto da un severo impatto antropico (Gela) aggravato da un evento di sversamento di petrolio (oil spill), ha consentito di estrapolare interessanti informazioni sull'evoluzione del petrolio nell'ambiente naturale con particolare riguardo all'azione dei microrganismi autoctoni.

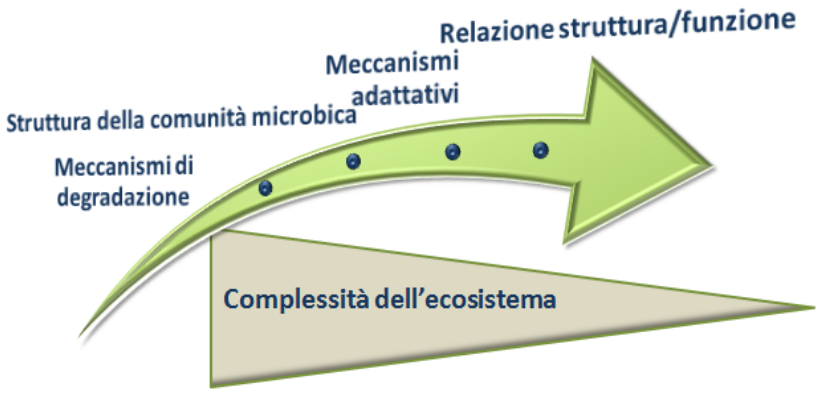
In particolare, sono stati eseguiti:

- identificazione dei principali membri della comunità microbica autoctona che operano la degradazione degli idrocarburi *in situ*;

- individuazione *in situ* delle principali vie di degradazione tramite analisi dei metaboliti intermedi;

- applicazione del trattamento di bio-stimulazione mediante aggiunta di accettori di elettroni alternativi all'ossigeno al fine di promuovere la degradazione anaerobica *in situ.*

Ciò è stato possibile mediante la semplificazione del sistema naturale complesso in uno studio pilota in mesoscala al fine di monitorare i parametri funzionali all'interpretazione dei dati.



	Sperimentazioni in-situ	Sperimentazioni in mesocosmi
Condizioni controllate	✗	✓
Replicabilità	✗	✓
Estrapolazione dei dati	✓	✓
Scala ambientale	✓	✓

Fig. 9: Modello di studio applicato per il lavoro seguente di tesi.

2. Materiali e Metodi

2.1 Estrazione degli acidi nucleici, trascrizione inversa PCR e librerie di cloni.

Gli acidi nucleici sono stati estratti dal campione di sedimento (5g) usando *FastRNA® Kit* per il suolo (MP Biomedicals™) (Roussel et al., 2008). L'RNA estratto è stato ulteriormente convertito in cDNA utilizzando *First-Strand cDNA Synthesis SuperScript TMII* Reverse Transcriptase (RT), (Life Technologies). Le miscele di reazione RT (20 µl) contenevano 1 µl della miscela di esamero random primer (Bioline), 30 ng di RNA, 1 µl di dNTP 10 mM (Gibco, Invitrogen Co., Carlsbad, CA) e acqua sterile distillata (14 ml). Dopo riscaldamento a 65°C per 5 min, ed incubata in ghiaccio per 1 minuto, la miscela è stata completata con 4 ml di 5x First Strand Buffer, 1 ml di DTT e 1 ml di SuperScript TM. La miscela è stata agitata ed incubata a 50°C per 30 minuti. Infine, l'enzima SuperScript TM è stato inattivato mediante riscaldamento a 70°C per 15 min. I geni 16S rRNA sono stati amplificati dal cDNA totale utilizzando i numeri primi universali (530F [5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3'] e 1492R [5'-TACGGYTACCTTGTTACGACT-3']), (Lane, 1991). La PCR è stata eseguita in una miscela di 50 µl (volume totale) contenente 1x di Q solution (Qiagen), 1x Qiagen reaction buffer, 1 µM di ogni primer forward e reverse, 10 µM di dNTP (Gibco, Invitrogen Co.), 2,0 ml (50-100 ng) di campione e 2.0 U di Taq polimerasi Qiagen (Qiagen). La reazione (3 minuti a 95°C, 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C, 2 minuti a 72°C, 30 cicli; estensione finale per 10 minuti a 72°C) è stata eseguita con *GeneAmp 5700* (PE Applied Biosystems). La qualità dei prodotti di amplificazione è stata controllata mediante elettroforesi di agarosio e purificata usando *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). Gli ampliconi purificati del 16S crDNA stati ulteriormente clonati nel *pGEM®-T Easy Vector II,* (Promega), trasformati in cellule di *E. coli* DH10β e successivamente amplificati con primers specifici per il pGEM T-easy vector (M13F, (5'-TGTAAAACGACGGCCAGT-3') e M13R (5'TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'). I campioni positivi sono stati purificati e sequenziati da *Macrogen* (Amsterdam, Olanda). Le sequenze sono state analizzate per la possibile origine chimerica utilizzando il software *Pintail 1.1* (Ashelford et al., 2005). Per le sequenze del gene 16S rRNA, l'allineamento iniziale delle sequenze amplificate e le sequenze strettamente correlate identificate con *BLAST* (Altschul et al., 1997) sono state eseguite utilizzando lo strumento di allineamento *SILVA*

(Pruesse et al., 2007) ed allineate manualmente con *ARB* (Ludwig et al., 2004). Dopo l'allineamento, l'algoritmo vicino di giunzione del pacchetto *ARB* è stato usato per generare alberi filogenetici basati sull'analisi della distanza per geni 16S rRNA. La veridicità delle topologie dedotte è stata verificata mediante l'analisi del bootstrap, utilizzando lo stesso modello distanza (1000 repliche).

2.2 Pyrosequencing

Tutte le sequenze grezze sono state elaborate con l'analisi condotta con next generation sequencing (NGS) del progetto di database gene SILVA rRNA (SILVAngs 1.3) (Quast et al., 2013). Ogni sequenza è stata allineata con il (v1.2.10 SINA SINA per ARB SVN (revisione 21008) SILVA incrementale Aligner (Pruesse et al., 2012) contro il SEED SILVA SSU rRNA e qualità controllata (Quast et al., 2013). Le sequenze brevi di 50 nucleotidi allineati con più del 2% di ambiguità o 2% di omopolimeri, rispettivamente, sono stati esclusi dalla ulteriore elaborazione. Anche le contaminazioni, che vengono lette con una bassa qualità di allineamento (50 identità allineamento, 40 allineamento punteggio riportato dalla SINA), sono stati identificati ed esclusi dall'analisi. Dopo questi passaggi iniziali di controllo della qualità, sono state identificate delle sequenze uguali (Dereplication), e sono state raggruppate (otus), e il riferimento di ogni OTU è stato classificato per singolo operatore tassonomico. Dereplication e clustering sono stati fatti usando cd-hit-est (versione 3.1.2; http: // www. bioinformatics.org/cd-hit) (Li and Godzik, 2006) in esecuzione applicando criteri di identità di 1,00 e 0,98, rispettivamente. La classificazione è stata effettuata da una ricerca del nucleotide su BLAST locale contro la versione non ridondante del set di dati SILVA SSU Ref (rilascio 123,1; http://www.arb-silva.de) utilizzando BLASTN (versione 2.2.30+; http: / /blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) con le impostazioni standard (Camacho et al., 2009). La classificazione di ogni lettura di riferimento OTU è stato mappato su tutte le sequenze che sono state assegnate al rispettivo OTU.Sequenze senza BLAST o sequenze con BLAST con risultato basso, in cui alla funzione (% di identità della sequenza + % di copertura di allineamento) / 2 non hanno superato il valore di 93, rimangono non classificati. Queste sequenze sono stati assegnate ad un meta-gruppo meta nel SILVAngs (Ondov et al., 2011). Questo metodo è stato impiegato nelle pubblicazioni di Klindworth et al. (2013) e Ionescu et al. (2012).

2.3 Analisi statistica

Per le analisi statistiche i cloni derivanti da ciascuna libreria 16S crDNA sono stati considerati separatamente per definire i filotipi, o unità tassonomiche operative (OTUs). Il clustering delle sequenze è stato effettuato utilizzando il programma *Dotur* (Schloss et al., 2005). Sono stati calcolati vari parametri per ogni libreria di cloni, come l'indice di diversità, l'analisi di rarefazione, i taxa, i cloni totali, singoli, dominanza di Shannon, equità, Simpson e chao2 utilizzando il programma *PAST* (http://folk.uio.no/ohammer/past, Hammer et al., 2001). I valori di copertura indicati come C = 1-(n1/N), sono stati calcolati per determinare l'efficienza delle librerie di cloni descrivendo la complessità della comunità batterica originale, dove n1 è il numero di cloni che si sono presentati una sola volta nella libreria di cloni N (Good, 1953).

2.4 Colture arricchite da campioni naturali contaminati

Gli arricchimenti sono stati realizzati utilizzando acqua e sedimento campionato a Gela nel Giugno del 2013. Per la realizzazione delle colture è stata preparata una mix di idrocarburi policiclici aromatici costituita da 1000 ppm di naftalene, pirene, bifenile e fenantrene e 10000 ppm di metilnaftalene disciolti in acetone. 100 µl della mix sono stati inoculati in beute sterili e lasciati evaporare per un ora sotto cappa chimica. Dopo la completa evaporazione dell'acetone, in ciascuna beuta sono stati aggiunti 75 ml di terreno minimo ONR7a ((Dyksterhouse et al., 1995). Le beute sono state lasciate in agitazione a 30°C per 48 ore al fine dissolvere completamente gli idrocarburi aggiunti nel terreno di coltura. A questo punto ai 75 ml di terreno sono stati aggiunti 25 ml di campione costituito da un mix di acqua e sedimenti prelevati da Gela. Gli arricchimenti così preparati sono stati incubati a 28°C sotto agitazione per 30 giorni. Alla fine della sperimentazione aliquote degli arricchimenti sono stati inoculati su piastre di ONR7a con l'aggiunta di metilnaftalene e senza alcun substrato come controllo, al fine di isolare microrganismi idrocarburo degradanti. Una volta ottenuto l'isolamento delle singole colonie su piastra si è proceduto con l'analisi molecolare del gene 16SrDNA per caratterizzare i microorganismi selezionati. Inoltre, una porzione degli arricchimenti che mostravano torbidità è stata trattata per le

analisi chimiche al fine di determinare l'efficienza di degradazione rispetto agli idrocarburi aggiunti e per le analisi molecolari al fine di caratterizzare la comunità microbica sviluppatasi.

2.5 Analisi degli idrocarburi

Gli idrocarburi totali estratti e loro derivati sono stati estratti dai campioni di sedimento seguendo la procedura 3550C EPA (US Environmental Protection Agency). Brevemente, sono stati aggiunti sodio solfato anidro, Na_2SO_4 e il mix di solventi Diclorometano:Acetone, CH_2Cl_2:CH_3COCH_3, (1:1, v/v), direttamente ai sedimenti essiccati; da qui, i sedimenti sono stati soggetti a sonicazione ad ultrasuoni (Branson 1200 Ultrasonic Cleaner*,* Branson USA) per 10 min. Successivamente, i campioni sono stati shakerati a 150 rpm per 30 min, centrifugati per 10 min a 5.000 rpm, ed infine filtrati mediante un filtro da 0.22 *µ*m (Sartorius, Germany). I sedimenti sono stati lavati con CH_2Cl_2, il solvente è stato volatilizzato portato a volume di 1ml e prima di effettuare l'analisi, l'estratto è stato risospeso con una ulteriore mix di solventi Diclorometano:esano (1:1, v/v), detta soluzione di estrazione. Solo a questo punto gli idrocarburi totali estratti e loro derivati sono stati analizzati mediante gascromatografo Master GC DANI Instruments (Development ANalytical Instruments) con detector FID. L'iniezione è avvenuta tramite l'ausilio di un autocampionatore, ovvero un iniettore di tipo SSL ad una temperatura di 290°C. è stato iniettato 1 µL di campione, utilizzando la tecnica splitless per 0,5 min, sotto un flusso di gas carrier Elio (flusso carrier 45 cm/s a velocità lineare, iniezione pulsata 3.5 bar per 0.5 min, flusso purge 5 ml/min). La temperatura del FID è stata regolata a 340°C. E' stata inoltre utilizzata la colonna analitica Zebron Semivolatiles Guardian, di 30 m di lunghezza, 0.25 mm di diametro interno e spessore fase stazionaria di 0.25 mm di seguito sono inoltre riportati i parametri della rampa di temperatura: 50°C per 4min; rampa 7°C/min fino a 155°C; rampa 6°C/min fino a 325°C per 8 min; rampa 6°C/min fino a 340°C per 1,5 min; tempo totale di corsa analitica 59,33 min.

2.6 Misura della produzione di H_2S

Il risultato più evidente dell'attività di solfato-riduzione risulta essere la produzione di H_2S. Per poterne monitorare la crescita e l'attività delle colture arricchite e dei sedimenti campionati, sono stati monitorati attraverso la produzione di H_2S

utilizzando il metodo Blu di metilene (Truper and Schlegel, 1964). Questo metodo è usato per determinarne la quantità di solfuri prodotti durante la crescita (respirazione) batterica. Tale saggio si basa sulla precipitazione degli stessi solfuri con acetato di zinco e successiva conversione di dimetilparafenildiamina solfato ad idrogeno solforato mostrando una visibile colorazione blu.

2.7 Saggio eco-tossicologico.

Per valutare l'eventuale tossicità e risospensione di contaminanti tossici dai sedimenti è stato condotto il saggio ecotossicologico sull'anfipode *Corophium orientale* fornito dal CIBM (Livorno, Italia). Gli esemplari sono stati utilizzati seguendo la procedura riportata da (Onorati et al., 1999). Gli esemplari giovani ed adulti che passavano attraverso un setaccio con maglie di 1000 µm e trattenuti da 710 µm, sono stati selezionati per gli esperimenti ecotossicologici. Il test è stato effettuato all'interno di beute di vetro da 2,5 litri contenenti uno strato di circa 2 cm di sedimento e riempito con 1L di acqua di mare filtrata. L'acqua di mare è stata ossigenata e le beute sono state mantenute ad una temperatura costante (16±2°C). Le beute sono state illuminate da un sistema di lampade costituite da sei tubi (36W, 120 cm) che fornivano 12 ore di luce e buio in continuo. Sono stati selezionati casualmente un centinaio di anfipodi ed introdotti in ogni beuta. Il tempo di esposizione degli organismi ai sedimenti testati è stato di 10 giorni. Alla fine di questo periodo è stata monitorata la quantità di sopravvissuti. Gli anfipodi mancanti sono stati assunti come morti. La risposta delle popolazioni è stata espressa in percentuale di organismi vivi e morti. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in doppio.

2.8 Analisi dei metaboliti

Prima delle analisi, gli estratti metabolici sono stati filtrati attraverso filtri 0,22 µm e subito analizzati mediante analisi di cromatografia liquida (LC)-Mass Spettrometria (MS). Per effettuare questo studio, sono stati utilizzati i seguenti reagenti e standard: acetonitrile (grado LC-MS, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania), acido formico (FA) (grado MS, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania) e acqua MilliQ® (Millipore, Billerica, MA, USA). Per masse di riferimento delle purine, sono stati utilizzati esakis (^{1}H, ^{1}H, ^{3}H-tetrafluoropropoxy) phosphazine (HP) e trifluoroacetato di ammonio (TFA (NH_4)) da Agilent (API-TOF kit soluzione di massa di riferimento). Il profilo metabolico

è stato ottenuto utilizzando un sistema di cromatografia liquida costituito da un sistema di degasaggio, una pompa binaria e un autocampionatore (1290 Infinity II, Agilent). I campioni (0,5 mL) sono stati inseriti in una colonna a fase inversa (Zorbax estensione C_{18} 50 x 2,1 mm, 1,8 µm; Agilent), che è stata mantenuta a 60 °C durante l'analisi. Il sistema è stato fatto funzionare a una velocità di flusso di 0,6 mL / min con solvente A (acqua contenente 0,1% di acido formico) e solvente B (acetonitrile contenente 0,1% di acido formico). Il gradiente era 5% B (0-1 min), 5 a 80% B (1-7 min), dall' 80 al 100% B (7-11,5 min), e 100 per 5% B (11,5-12 min). Il sistema è stato infine mantenuto a 5% B per 3 min per riequilibrare il sistema (15 min di tempo di analisi totale). I dati sono stati raccolti in modalità ESI positiva e negativa in cicli separati utilizzando QTOF (Agilent 6550 iFunnel). Le analisi sono state eseguite in entrambe le modalità di ioni positivi e negativi in full-scan da m / z 50 a 1000. La tensione capillare era 3000 V e la tensione dell'ugello è 1000 V con una velocità di scansione di 1,0 spettro al secondo. La temperatura del gas era di 250 ° C, il flusso di gas di essiccamento era 12 L / min, il nebulizzatore era 52 psi, la temperatura del gas guaina 370° C e il flusso di gas guaina 11 L / min. Per la modalità positiva, i parametri MS-TOF sono stati i seguenti: Fragmentor 175 V e la tensione a radiofrequenza ottapolo 750 V. Per modalità negativa, i parametri MS-TOF comprendevano: V. Fragmentor 250 V e ottapolo tensione a radiofrequenza 750. Durante le analisi, due masse di riferimento sono state utilizzate: 121,0509 (purine, rilevati m / z $[C_5H_4N_4 + H]^+$) e 922,0098 (HP, rilevato m / z $[C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24} + H]^+$) in modalità positiva e 112,9856 (TFA (NH_4), rilevato m / z $[C_2O_2F_3$ (NH_4) $-H]^-$) e 966,0007 (HP + FA, rilevato m / z $[C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24} + FA-H]^-$) in modalità negativa. I campioni sono stati analizzati in piste randomizzate, nel quale sono stati incubati in un autocampionatore a 4° C. Le piste di analisi per entrambe le polarità sono stati istituiti a partire dall'analisi di dieci iniezioni di equilibrio, seguiti dai campioni; sono stati fatte cinque repliche tecniche per campione. Sulla base di una lista di candidati, sono stati cercati accuratamente i metaboliti in base alle loro masse monoisotopiche nei cromatogrammi MS (± 10 ppm) utilizzando MassHunter Quantitative Analysis (B.06.00, Agilent). Secondo la loro distribuzione modello isotopica, una certa percentuale è stata assegnata per ogni formula molecolare, così come l'ordine di eluizione è stata calcolata confrontando un registro P (ACD / ChemSketch v. 12.01) con i corrispondenti tempi di ritenzione (RT) di ogni molecola (un aumento del log P è

associata con una maggiore RT in una colonna C_{18}). Poi, le aree dei picchi corrispondenti sono state integrate con lo stesso software.

2.9 BIBLIOGRAFIA

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J.(1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**:3389-3402.

Ashelford, K.E., Chuzhanova, N.A., Fry, J.C., Jones, A.J., and Weightman, A.J. (2005) At least 1 in 20 16S rRNA sequence records cur- rently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Applied Environmental Microbiology* **71**: 7724 – 7736

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., and Madden, T.L. (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**: 1.

Good, I.J. (1953**)** The population frequencies of species and the estimation of population parameters*. Biometrika* **40**: 237-264.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., and Ryan, P.D. 2001**.** PAST: Palaeontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontolia Electronica* **4**.

Ionescu, D., Siebert, C., Polerecky, L., Munwes, Y.Y., Lott, C., Häusler, S., et al. (2012). Microbial and chemical characterization of underwater fresh water springs in the Dead Sea. *PLoS One* **7**: e38319.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., and Glöckner, F.O. (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next- generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*. 41, e1.

Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackerbrandt E, Goodfellow M (eds), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Wiley, New York, pp 125-175.

Li, W., and Godzik, A. (2006) Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* **22**: 1658–1659.

Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Buchner, A., et al. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32**: 1363-1371.

Ondov, B., Bergman, N., and Phillippy, A. (2011) Interactive metagenomic visualization in a web browser. BMC *Bioinformatics* **12**: 385.

Pruesse, E., Peplies, J., and Glöckner, F.O. (2012) SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes *Bioinformatics*, **28**: 1823–1829

Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J. et al. (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* **35**: 7188–7196.

Quast, C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., and Glockner F.O. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* **41.D1**: D590-D596.

Roussel, E.G., Bonavita, M.A.C., Querellou, J., Cragg, B.A., Webster, G., Prieur, D. and Parkes, R.J. (2008) Extending the deep sub-seafloor biosphere. *Science* **320**: 1046.

Schloss, P.D., and Handelsman, J. (2005**)** Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied Environmental Microbiology* **71**: 1501-1506.

Trüper, H.G., and Schlegel, H.G. (1964) Sulfur metabolism in *Thiorhodaceae*. I. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii*. *Antonie van Leeuwenhoek* **30**: 225–238.

3. Studio della comunità microbica in sedimenti marini accidentalmente contaminati da idrocarburi: caso studio Gela

3.1 Evoluzione del contaminante nell'area di Gela

Gela è un comune italiano che si trova a sud ovest dell'isola siciliana in provincia di Caltanissetta. Il territorio di Gela dal punto di vista ambientale è molto variegato e risente fortemente dell'impatto antropico poiché sulla stessa insiste uno dei più importanti centri industriali siciliani che ne costituisce la principale realtà produttiva. Il Polo petrolchimico di Gela attivato nel 1963 dall'ENI, è uno dei più grandi d'Europa. La Raffineria svolge attività di raffinazione di oli minerali e semilavorati, da cui vengono ottenuti carburanti, combustibili, GPL e prodotti chimici.

L'area di Gela è tristemente nota per le gravi conseguenze dell'inquinamento sulla salute dell'uomo e degli animali, tanto da ricadere tra i siti di osservazione della Organizzazione Mondiale di Sanità (OMS).

Nel dicembre del 1990 l'area è stata dichiarata ad alto rischio di crisi ambientale e con Dpr del 17 gennaio 1995 è stato approvato il Piano di disinquinamento per il risanamento ambientale. Con la legge 426/98 Gela diventa uno dei primi quindici siti di interesse nazionale del Programma nazionale di bonifica. Le indagini di caratterizzazione hanno messo in evidenza la necessità di avviare la messa in sicurezza d'emergenza soprattutto per eliminare il prodotto petrolifero presente come surnatante nella falda ed impedire il deflusso dalla falda inquinata al mare con barriere impermeabili in cemento e bentonite o idrauliche, che si estendono dal petrolchimico verso il mare.

Sfortunatamente, sebbene gli sforzi delle aziende legate al petrolchimico sulla revisione di serbatoti e trattamento di acque di falda, recentemente si è verificato l'ennesimo sversamento che ha interessato ancora una volta l'area marina.

Il 4 giugno del 2013 a seguito di un improvviso guasto all'impianto Topping 1 dello stabilimento petrolchimico di Gela (37°03'31.58"N; 14°15'27.32"E), si è verificata una fuoriuscita di petrolio. Circa 3.000 kg di greggio pesante si sono riversate in poche ore lungo la costa attraverso il fiume Gela (Fig. 10). In seguito a questo evento, grazie ai permessi concessi dalle autorità locali, è stata delimitata un'area di 9 mt^2 per un periodo di 12 mesi (Giugno 2013 – Giugno 2014) (Fig. 11) al fine di disporre di un sito di indagine entro il quale osservare l'evoluzione del contaminante in

condizioni reali. Il focus dello studio era anche centrato sulla risposta della comunità microbica autoctona all'input di petrolio e sulle potenzialità di *self-cleaning* del sito.

Fig.10: Immagine del tratto costiero interessato dallo sversamento di idrocarburi (Giugno 2013).

Date le condizioni in cui versava l'area, sono stati pianificati i primi campionamenti secondo il transetto indicato nella figura 11 al fine di selezionare l'area di monitoraggio.

Fig.11: Area di campionamento

Dai risultati ottenuti mediante GC-FID dei tre campioni analizzati (ESTERNA, TARGET e FOCE), si è potuto constatare come l'unico campione che esibiva la presenza di idrocarburi risultava trovarsi nella stazione "TARGET" (Fig. 11). Questo è

in accordo con i dati territoriali e sedimentologici, mostrando in conclusione, come lungo tutto il litorale interessato, l'inquinante sotto l'azione di venti e maree sia stato trasportato dalla foce alla stazione TARGET depositandosi in gran parte sulla battigia.

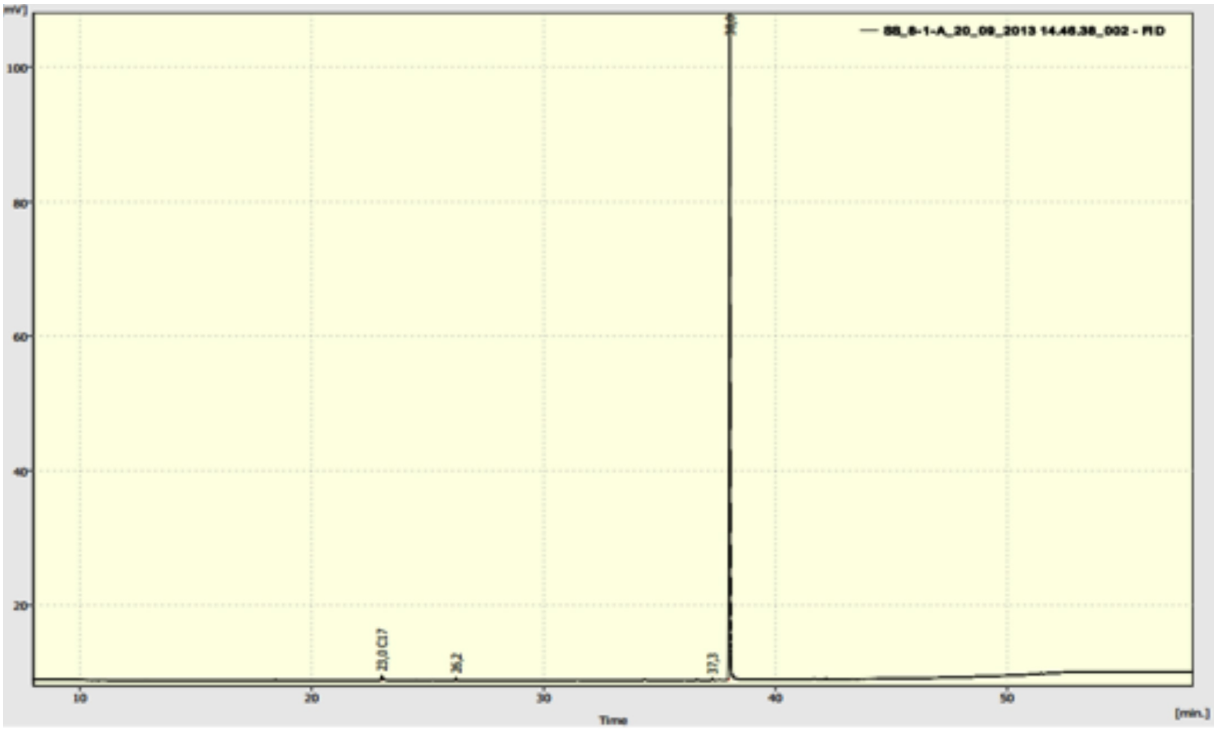


Fig.12: Cromatogramma di idrocarburi estratti dai sedimenti di campione ESTERNO

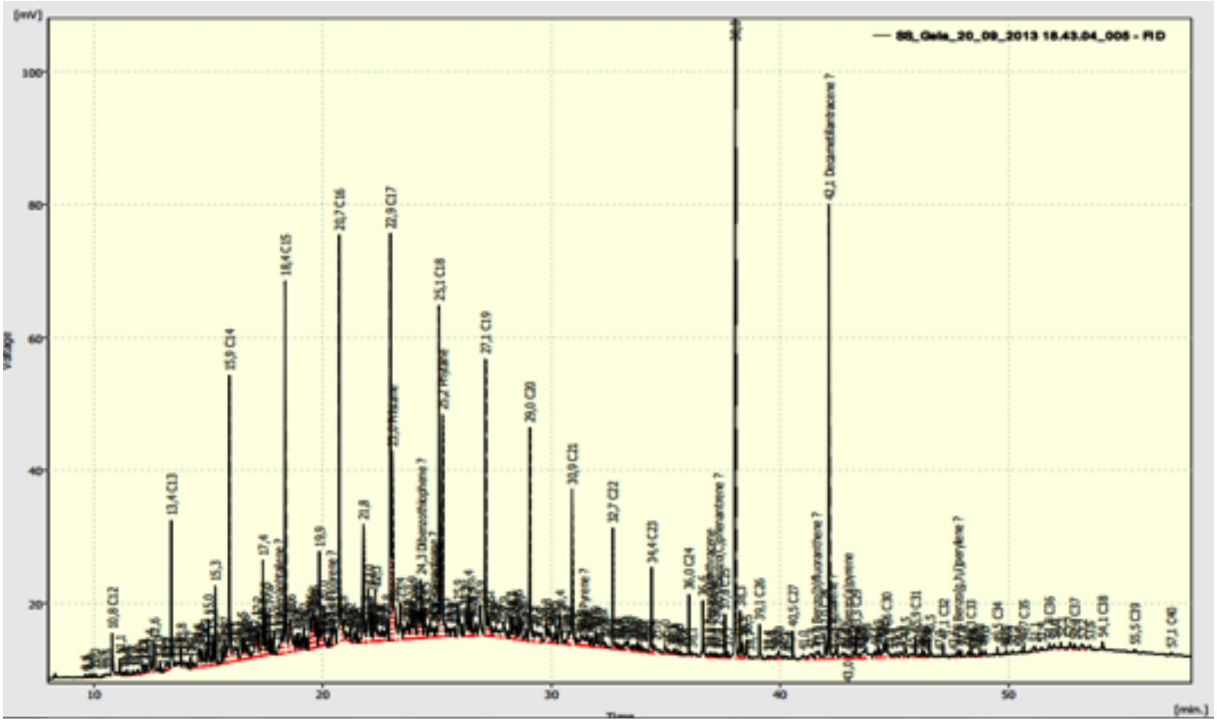


Fig 13: Cromatogramma di idrocarburi estratti dai sedimenti di campione TARGET

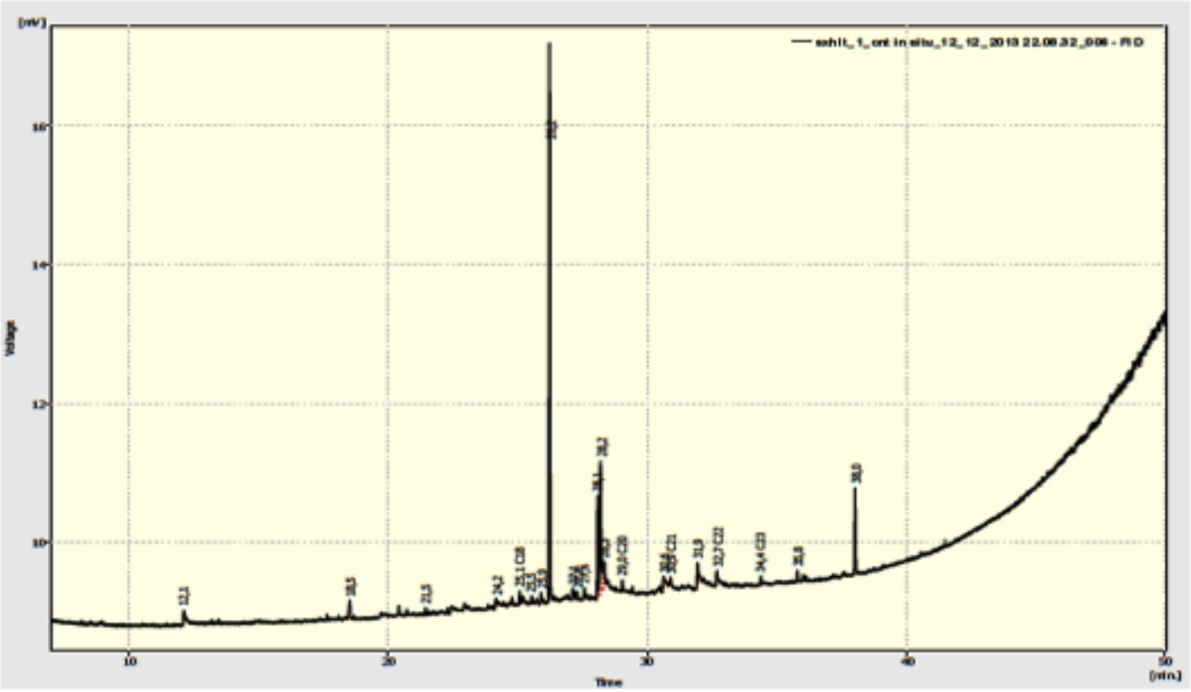


Fig 14: Cromatogramma di idrocarburi estratti dai sedimenti di campione FOCE

Si è dunque stabilito di delimitare una porzione della stazione TARGET come sito di monitoraggio (Fig. 15).

Fig. 15: Sito di monitoraggio (Gela)

I campionamenti sono stati programmati dopo 24 ore e a 30, 90, 150 giorni dallo sversamento di idrocarburi. Il primo campionamento è stato eseguito mediante la raccolta dei sedimenti superficiali, i successivi hanno richiesto l'uso del carotaggio in quanto l'apporto di nuovi sedimenti ha causato la stratificazione del contaminante a circa 20 cm di profondità. Il potenziale di riduzione (Eh) è stato misurato utilizzando una sonda multiparametrica Waterproof CyberScan PCD 650. La stessa porzione di sedimento è stata suddivisa in più aliquote per analisi chimiche, microbiologiche e molecolari.

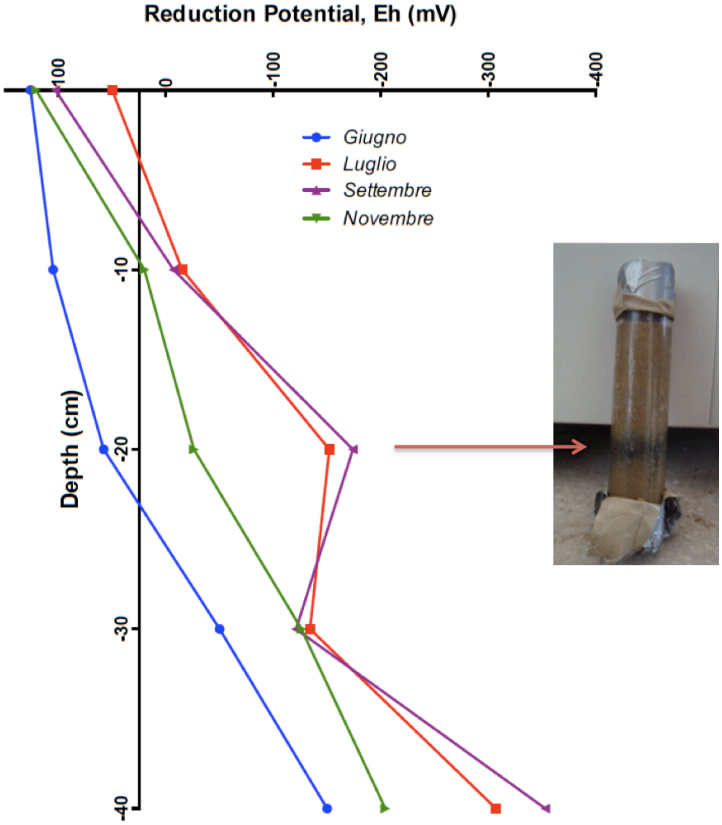
3.1.2 Proprietà geochimiche dei sedimenti

Il potenziale redox (Eh) è stato misurato ad intervalli di 10 cm per i primi 40 cm di profondità del sedimento prelevato all'interno dell'area di studio. La figura 16 mostra il profilo del potenziale redox (Eh). In generale, sui sedimenti analizzati, sono state registrate condizioni riducenti a 20 cm di profondità. Le misure effettuate immediatamente dopo l'incidente (Giugno 2013 indicato con T_0) hanno mostrato un potenziale redox con valori positivi nei primi 20 cm del sedimento, con l'aumentare della profondità il potenziale di riduzione decresceva a valori negativi fino -150mV a 40 cm di profondità. Le carote prelevate a Luglio 2013 (T_{30}) e Settembre 2013 (T_{90}) mostravano un profilo di potenziale di riduzione, rispetto alla profondità, totalmente diverso. I valori registrati diventavano negativi già a 10 cm di profondità raggiungendo valori di -152 e -174mV per Luglio e Settembre 2013 rispettivamente a 20cm. Tale condizione riducente corrispondeva al sub-campione in cui il petrolio si era stratificato. Alla profondità di 40 cm sono stati registrati i valori più bassi di Eh con misure al di sotto dei -300mV. La tabella 1 e figura 16 mostrano il dettaglio dei valori di Eh riscontrati.

I campionamenti effettuati a Novembre 2013 (T_{150}) hanno mostrato un'ulteriore modificazione delle condizioni geochimiche del sedimento: al di sotto dei 10 cm è stata registrata una graduale diminuzione del potenziale redox in accordo con la profondità. Questa nuova condizione del sito potrebbe essere stata determinata dalle intense mareggiate che hanno visibilmente modificato la linea di costa con l'apporto di nuovo sedimento nell'area studio.

Tabella 1 Parametri misurati *in situ* nei 6 mesi di monitoraggio

Mese	Profondità (cm)	Potenziale Redox (E_h)	Temperatura (°C)
Giugno	0	126	21.1
	-10	105	20.7
	- 20	58	20.4
	- 30	-50	20.4
	- 40	- 150	20.4
Luglio	0	50	23.8
	-10	-15	23.6
	- 20	-152	23.6
	- 30	-134	23.3
	- 40	-307	22.1
Settembre	0	103	23,9
	-10	-7	23.8
	- 20	-174	23.8
	- 30	-121	23.4
	- 40	-353	22.9
Novembre	0	121	19.4
	-10	20	19.2
	- 20	-26	18.9
	- 30	-126	18.4
	- 40	-204	18.4



.

Fig.16: Potenziale redox (Eh) misurato nei sedimenti di Gela durante il periodo di monitoraggio e dettaglio della carota campionata a Luglio nell'area di studio.

3.1.3 Evoluzione del petrolio nei sedimenti impattati.

La quantità totale di idrocarburi determinata a 24 ore dall'incidente nei sedimenti superficiali mediante GC-FID era di 2400 ppm frazionata in 750 ppm di composti alifatici, 1600 ppm di UCM (Unresolved Complex Mixture) e 50 ppm di aromatici. Il cromatogramma relativo al sedimento al T_0 è mostrato nella figura 17.

L'analisi degli idrocarburi condotti sui sedimenti campionati all'interno dell'area di studio nel tempo ha permesso di descrivere l'evoluzione del contaminante *in situ*.

L'analisi GC-FID del petrolio ha mostrato che a T_{30} il petrolio viene degradato solo per il 5,5%, dopo 3 mesi (T_{90}) pur essendo in condizioni di anossia la degradazione registrata risulta essere pari a 77,5% (Fig.17-20). La tabella 2 mostra la degradazione registrata sulla base della gravimetria e sull'indice (nC_{17}/Phytane + nC_{18}/Pristane) / 2.

A Novembre 2013 le condizioni naturali avevano significativamente modificato il sito, l'apporto di nuovi sedimenti e la bassa marea hanno condizionato il ritrovamento dello strato del petrolio, anche con carotaggi effettuati a 1,5 mt di profondità (Fig. 16). L'ulteriore sprofondamento dello strato di petrolio o fenomeni di dilavamento naturale del contaminante, uniti alla degradazione microbica possono essere due delle spiegazioni degli ultimi risultati.

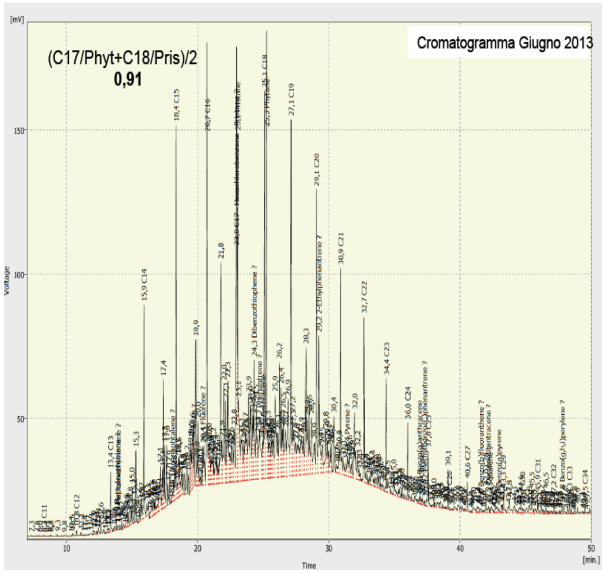


Fig.17: Cromatogramma T_0 (Giugno 2013)

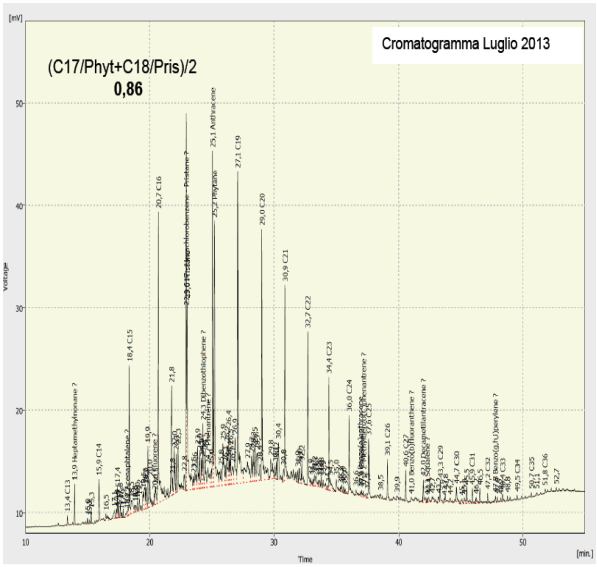


Fig.18: Cromatogramma T_{30} (Luglio 2013)

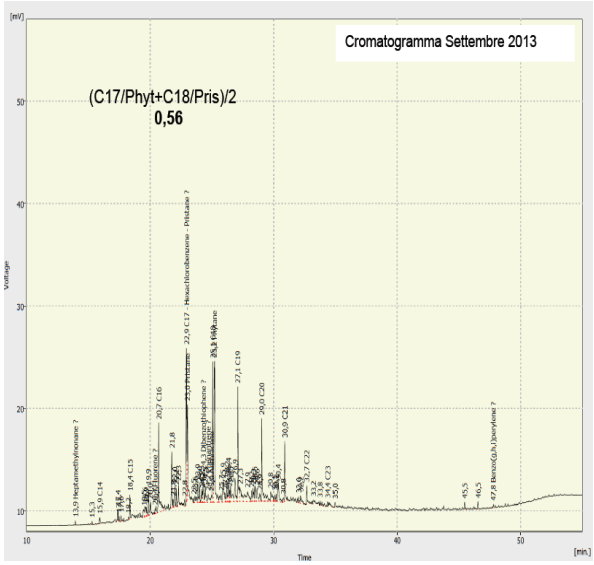


Fig.19: Cromatogramma T_{90} (Settembre 2013)

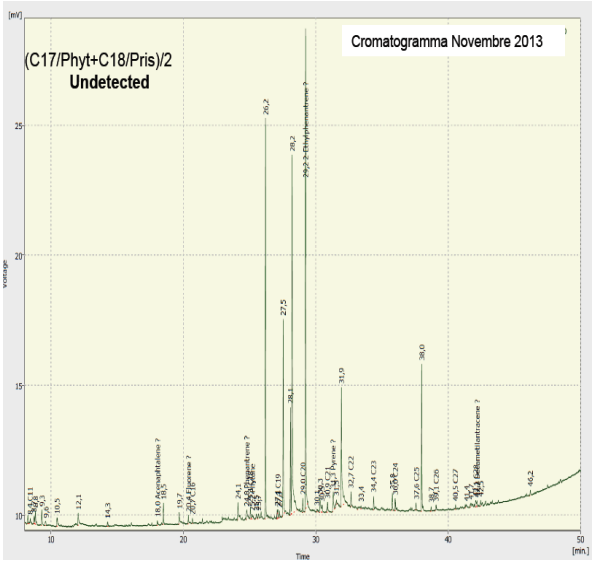


Fig.20: Cromatogramma T_{150} (Novembre 2013)

Tabella 2 Valori di degradazione riferiti a gravimetria e indice (nC$_{17}$/Phytane + nC$_{18}$/Pristane) / 2

	Gravimetria (ppm)	Quantità attesa di HC alifatici	(C17/Phy+C18/Pris)/2	% di petrolio degradata
T_0 (sup)	2400	750	0,91	00,00
T_{30}	2268	709	0,86	05,50
T_{90}	540	288	0,56	77,50
T_{150}	nd*	nd	nd	nd

* nd, not detected

3.1.3 Dinamica della comunità batterica.

Parallelamente alle indagini chimiche sono state condotte analisi molecolari al fine di valutare la risposta della comunità microbica alla presenza del petrolio in sedimenti marini in condizioni di microaerofilia e anossia. Le indagini filogenetiche sono state effettuate mediante lo studio del gene tassonomico 16S rDNA. Il sito è stato monitorato per 5 mesi in 4 occasioni: T_0, a 24 ore dall'evento, e nei successivi cinque mesi (T_{30}, T_{90}, T_{150}).

24 ore dopo l'input di petrolio la maggioranza dei cloni analizzati dalla libreria T_0 era affiliata alla classe dei *Gammaproteobacteria* (83%), seguiti dagli *Alphaproteobacteria* (15%). In particolare, all'interno del gruppo dei

Gammaproteobacteria sono state identificate sequenze affiliate a microorganismi idrocarburo-degradanti: a livello di genere oltre il 40% della popolazione microbica è stata attribuita al genere *Glaciecola* che sembra essere associata ad ambienti contaminati da idrocarburi ma solitamente isolata in aree antartiche e artiche (Yakimov et al., 2004; Prabagaran *et* al., 2007; Brakstad et al., 2008; Røberg et al., 2011), il 23% di cloni mostrava similarità verso *Alteromonas*, il 6% era associato al genere *Marinobacter* mentre il 2% di cloni mostrava similarità verso il genere *Cycloclasticus* (Yakimov et al., 2007) (Fig. 21-22). La struttura della comunità microbica nei sedimenti 30 giorni dopo lo sversamento ha mostrato una composizione completamente diversa registrando una drastica riduzione dei *Gammaproteobacteria* (dal 83% al 5%) e degli *Alphaproteobacteria* (dal 15% al 2%) mentre la maggioranza dei cloni era associata al gruppo dei *Deltaproteobacteria* (24%) e *Betaproteobacteria* (7%) caratteristici di ambienti microaerofili e anossici. La restante frazione della comunità microbica era caratterizzata da membri di *Bacteroidia* (17%), *Actinobacteria (*8%), *Clostridia* (5%) ed altri gruppi meno rappresentati (Fig. 21-22). Entrando nel dettaglio del gruppo dei *Deltaproteobacteria*, il 33% di cloni appartenente a questa classe era affiliato al clone *Desulfuromonadales BTEX1-2°* che sembra essere coinvolto nella produzione di metano a partire da idrocarburi in sabbia bituminose (Siddique et al., 2012), più del 30% di *Deltaproteobacteria* ha mostrato alta similarità verso un microrganismo metano-ossidante (Aoki et al., 2014) mentre il 22% dei cloni era correlato al ceppo solfato-riduttore *Desulfospira joergensenii* (Jinster et al., 1997) isolato da sedimenti marini anossici, infine più del 10% dei *Deltaproteobacteria* mostrava similarità verso il clone PET-088 ritrovato in sedimenti contaminati anossici dopo lo sversamento di petrolio dal Prestige (Acosta Gonzàlez et al., 2013). Il totale dei cloni affiliati ai *Betaproteobacteria (7%)* è stato associato al genere *Cupriavidus* che da bibliografia sembra stimolare la biodegradazione in sedimenti contaminati grazie alla capacità di fissare azoto (Chen and Chang, 2005). Interessante è stato osservare che gli 50% di cloni affiliati ai *Gammaproteobacteria* sono associati al genere *Cycloclasticus*, microrganismo idrocarburo degradante coinvolto nella degradazione di composti aromatici (Messina et al., 2015) (Fig 22). L'analisi della comunità microbica sui sedimenti prelevati dal sito a Settembre, ovvero 90 giorni dopo lo sversamento, continua a mostrare la predominanza di cloni associati alla classe dei *Deltaproteobacteria* che ricoprono il 27% del totale della popolazione e dei

Betaproteobacteria che ricoprono il 12% ma è apprezzabile anche un nuovo incremento delle classi dei *Gamma* e *Alphaproteobacteria* che raggiungono le percentuali del 13 e 15% rispettivamente. Nel dettaglio, all'interno dei *Deltaproteobacteria*, più del 30% di cloni appartenenti a questa classe, erano affiliati al clone Er-LAYS-66 già identificato in sedimenti estuarini anaerobici impattati da PCBs, il 20% mostrava similarità rispetto al microrganismo solfato-riduttore PL12 (Higashioka et al., 2009) che è in grado di utilizzare *n*-esano e *n*-decano come substrati, il 19% di cloni affiliati è stato associato al ceppo metano-ossidante già precedentemente identificato nella libreria al T_{30} (Aoki et al., 2014), infine il 6% dei cloni affiliati ai *Deltaproteobacteria* mostrava similarità verso un ceppo incoltivabile identificato in sedimenti salini e alcalini (Keshri et al 2013). Considerando invece la classe dei *Gammaproteobacteria*, il 6% dei cloni mostrava similarità verso il genere *Cycloclasticus*, già presente nei sedimenti a T_{30}, mentre il 4% dei cloni erano associati ai generi *Marinoacter* e *Polycyclovorans,* microorganismi specializzati nella degradazione di composti aromatici (Gauthier et al., 1992; Gutierrez et al., 2013). Il 12% di cloni appartenenti ai *Betaproteobacteria* continuano ad essere affiliati alla famiglia delle *Burkholderiaceae* come già osservato nella libreria T_{30} (Fig. 22).

L'analisi del 16S rDNA condotta nei sedimenti prelevati dal sito di studio a Novembre 2013 (T_{150}) ha rilevato un ulteriore shift nella composizione della comunità microbica: in questo caso la maggioranza dei cloni era affiliata agli *Alphapoteobacteria* che raggiungono un'abbondanza relativa di più del 60% della popolazione seguiti dai *Deltaproteobacteria* che comunque mostrano una diminuzione rispetto la libreria precedente (da 27% al 18%). La restante porzione della comunità microbica era rappresentata dagli *Actinobacteria* (5%), *Holophagae* (5%), *Betaproteobacteria* (2%), *Gammaproteobacteria* (2%). Come precedentemente descritto, i sedimenti a questo punto della sperimentazione mostravano una condizione completamente diversa dal punto di vista chimico non mostrando più traccia di contaminante. Questa nuova condizione è determinata dalla predisposizione dell'area verso mareggiate che modificano rapidamente la linea di costa a causa dell'apporto di sedimenti nuovi dal fondo. La risposta della comunità microbica conferma la nuova condizione del sedimento: il 57% dei cloni mostrava similarità verso il ceppo *Paracoccus sediminis* (98%) isolato dai sedimenti marini non impattati da idrocarburi (Pan et al 2014). Interessante è comunque all'interno del gruppo dei *Deltaproteobacteria*,la presenza del gruppo *SEEP-SRB1* e alti membri della famiglia delle *Desulfobacteriaceae (*14*%),*

batteri solfato riduttori già osservati tra le comunità microbiche di sedimenti profondi contaminati da idrocarburi nel Golfo del Messico (Orcutt et al., 2010).

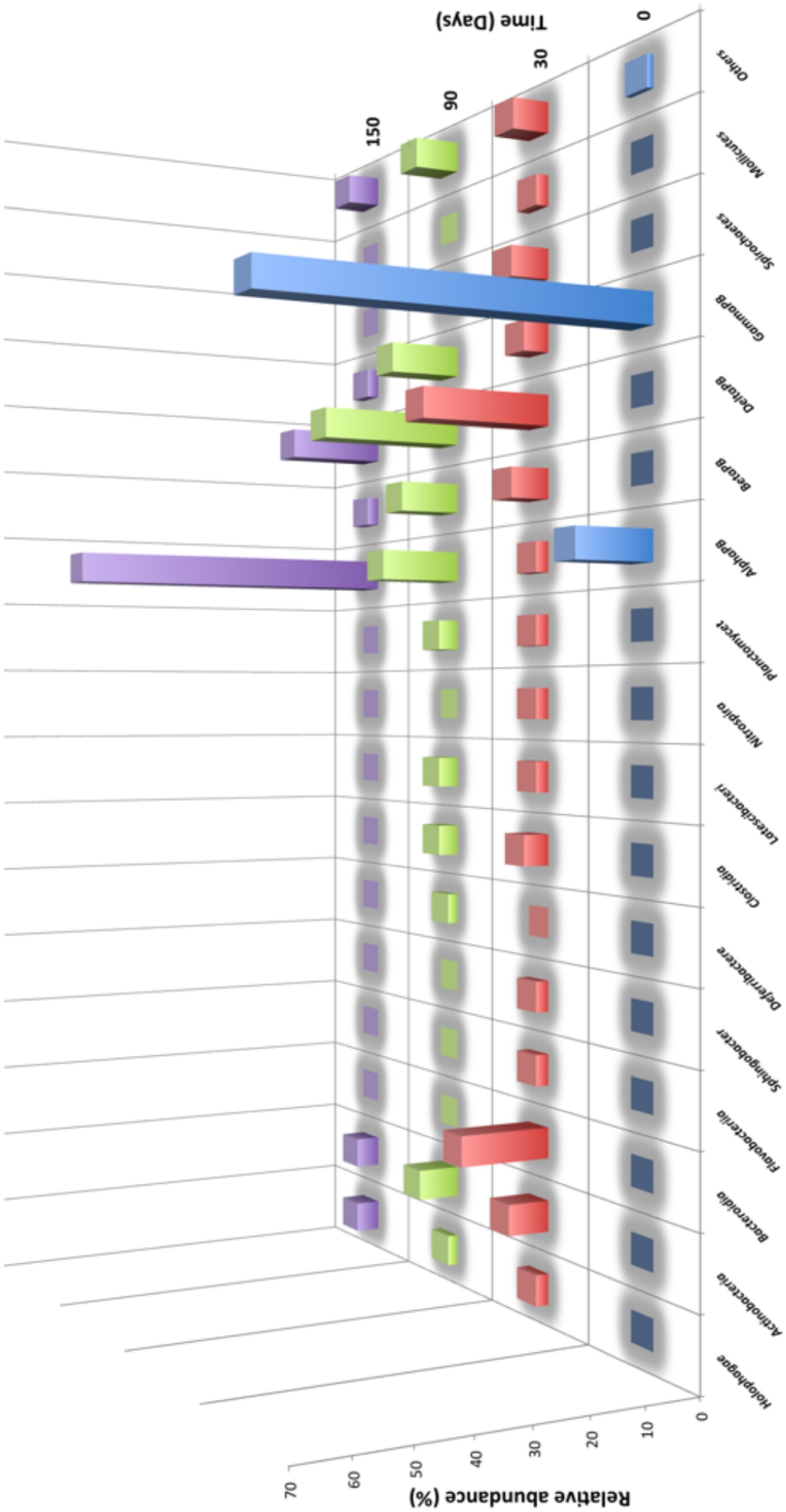


Fig. 21: Dendogramma dell'analisi tassonomica dei cloni del 16S rDNA a livello di classe.

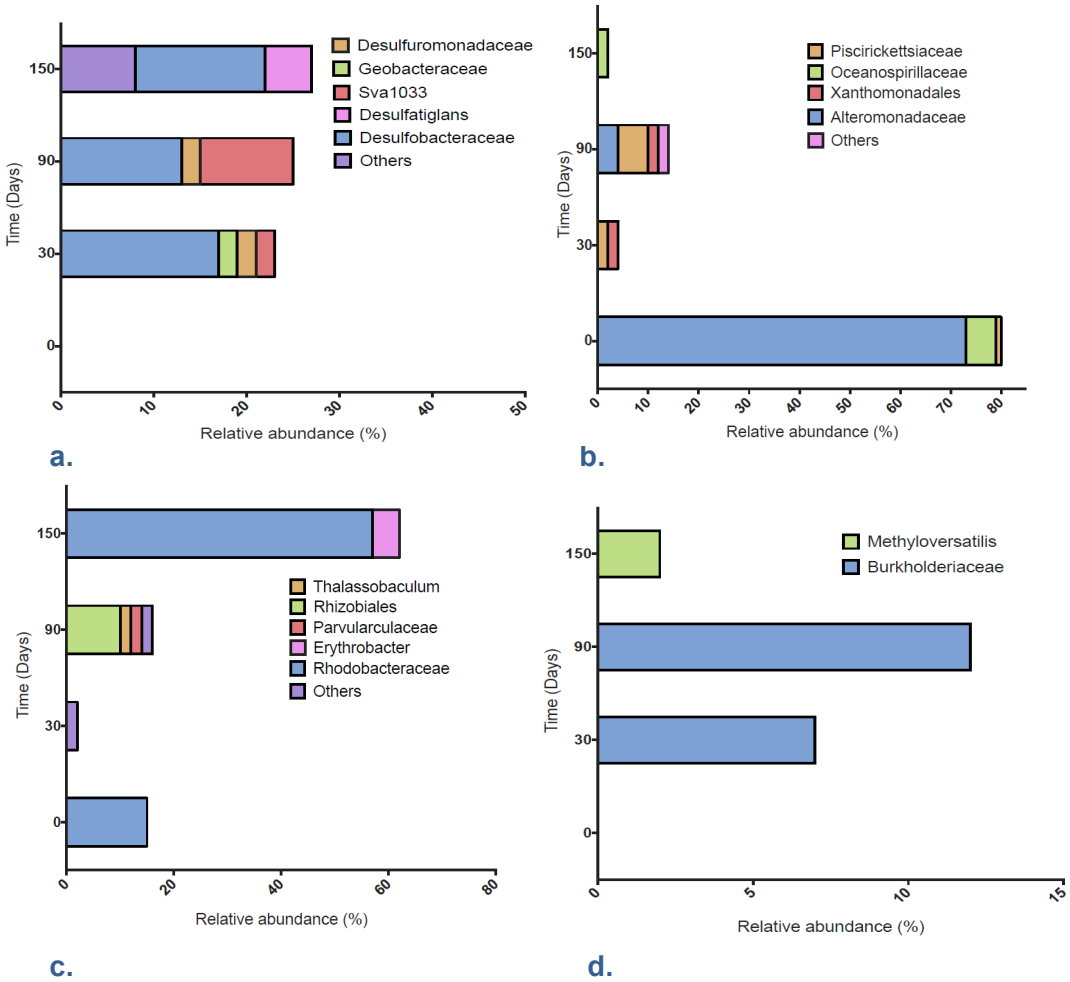


Fig.22: Distribuzione delle famiglie all'interno della classe dei Delta (a) Gamma (b), Alpha (c) e Betaproteobacteria (d) determinati all'interno delle librerie di cloni dai sedimenti di Gela a T_0, T_{30}, T_{90} e T_{150}.

3.1.4 Diversità.

Come mostrato nella tabella 3, i valori di diversità sono stati calcolati per ogni libreria del 16S rDNA. Sulla base della definizione che ogni fenotipo (OTU) è costituito da un clone unico o da un gruppo di cloni che hanno sequenza con similarità > 97% (Rossello-Mora and Amann, 2001), sono stati identificati un totale di 92 diversi OTUs. I valori calcolati di Simpson e Shannon e dominanza mostrano una minore diversità e massima dominanza nei sedimenti T_0 (24 ore dopo lo sversamento) e T_{150} rispettivamente corrispondenti all'immediato dopo l'incidente, quando probabilmente la comunità microbica non era ancora adattata alla presenza del petrolio, e al

campione che non mostrava tracce di idrocarburi, lasciando ipotizzare un ritorno alla comunità microbica precedente alla contaminazione. I valori di diversità massima registrata sono relativi a T_{30} e T_{90} relativi ai campioni fortemente contaminati, anche l'indice di *equitability* negli stessi campioni risulta elevato e, insieme al basso indice di dominanza, suggerisce un'abbondanza equamente distribuita tra i gruppi (dato confermato dalle analisi molecolari).

Tabella 3. Indici di diversità calcoli nelle quattro librerie di cloni in tempi diversi

Indici di diversità	**T_0**	**T_{30}**	**T_{90}**	**T_{150}**
Taxa (OTUs)	20	26	34	12
Dominance_D	0,23	0,05	0,04	0,34
Simpson_1 D	0,76	0,94	0,95	0,65
Shannon H	2,00	3,10	3,37	1,6
Equitability_J	0,67	0,95	0,95	0,67
Chao_2	65,5	77	65,63	13,67
Singletons	13	18	23	4
Doubletons	1	2	7	5

3.1.5 Potenziale di self-cleaning aerobico - indagini in microcosmi.

Le condizioni di anossia riscontrate *in situ* sono subito apparse come il primo fattore limitante la degradazione. Al fine di studiare il potenziale di self-cleaning intrinseco al sito in condizioni aerobiche, sono stati allestiti dei microcosmi con le matrici ambientali (slurry sedimenti-acqua raccolti a 24h dall'incidente) e mantenuti in condizioni ottimali di ossigenazione e temperatura. Data la nota problematica sulla persistenza degli idrocarburi policiclici aromatici nei sedimenti marini, dovuta alla recalcitranza alla degradazione, abbiamo stabilito di utilizzarli come unica fonte di carbonio aggiunta al sistema. L'obiettivo era quello di identificare i principali batteri idrocarburo-degradanti e verificarne l'efficacia.

3.1.6 Efficienza di degradazione, struttura della comunità microbica associata e isolamento di batteri idrocarburo degradanti da colture arricchite di Gela.

Dopo trenta giorni d'incubazione, le colture arricchite con il campione di Gela e la mix di idrocarburi policiclici aromatici che mostravano crescita sulla base della torbidità, sono state trattate per valutare l'efficienza di degradazione, la struttura della comunità microbica e per l'isolamento di ceppi idrocarburi degradanti.

Le analisi chimiche hanno mostrato che la quantità di idrocarburi si era ridotta del >95% nel caso del naftalene, metilnaftalene, bifenile e fenantrene, anche della quantità di pirene si determinava solo per il 10% di quantità iniziale, come mostrato in figura 23.

La figura 24 mostra la struttura della comunità microbica associata agli arricchimenti positivi, evidenziando una forte predominanza di cloni associati agli *Alphaproteobacteria* (71%) seguiti dai *Gammaproteobacteria* (25%). Nel dettaglio i gruppi di cloni, tra gli alphaproteobacteria, maggiormente rappresentati sono risultati essere quelli associati agli ordini dei *Rhodobacterales* e *Sphingomonadales* (76 e 10% del totale della comunità alphaproteobacterica) che sembrano giocare un ruolo chiave durante le ultime fasi del processo di degradazione (Crisafi et al., 2016). I cloni più rappresentati all'interno del gruppo dei *Gammaproteobacteria* sono associati ai generi *Alcanivorax* e *Marinobacter* (19% e 16%) e cloni ascrivibili all'ordine *Alteromonadales* (Fig. 24). Negli arricchimenti si sono create le condizioni per lo sviluppo di membri della comunità microbica già riscontrati nel campione naturale, in particolare *Alteromonadales* e *Rhodobacterales*. Cloni appartenenti al genere *Cycloclasticus* già identificati nel campione naturale erano osservabili anche negli arricchimenti. Al contrario cloni appartenenti alla famiglia delle *Sphingomonadales* erano identificabili solo negli arricchimenti.

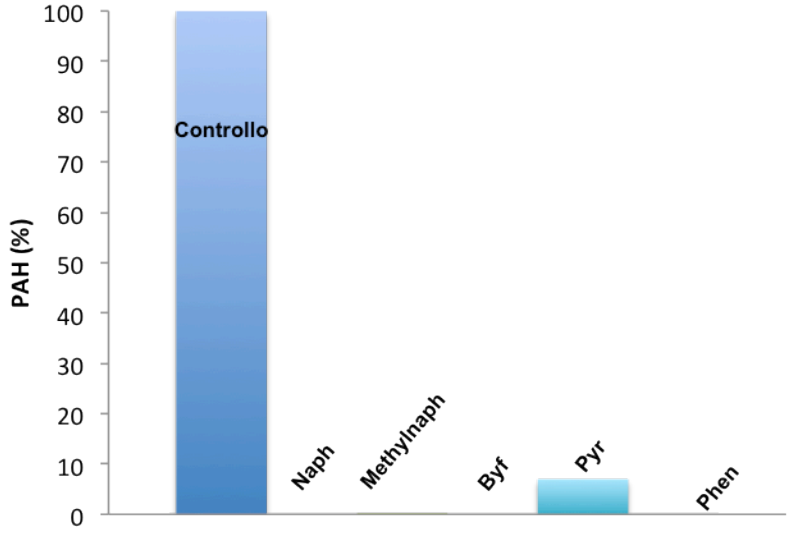


Fig. 23: Percentuale d'idrocarburi policiclici aromatici misurata negli arricchimenti dopo 30 giorni di incubazione a 38°C. Abbreviazioni: Naph, naftalene; Methylnaph, metilnaftalene; Byf, bifenile; Pyr, pirene; Phen, fenantrene.

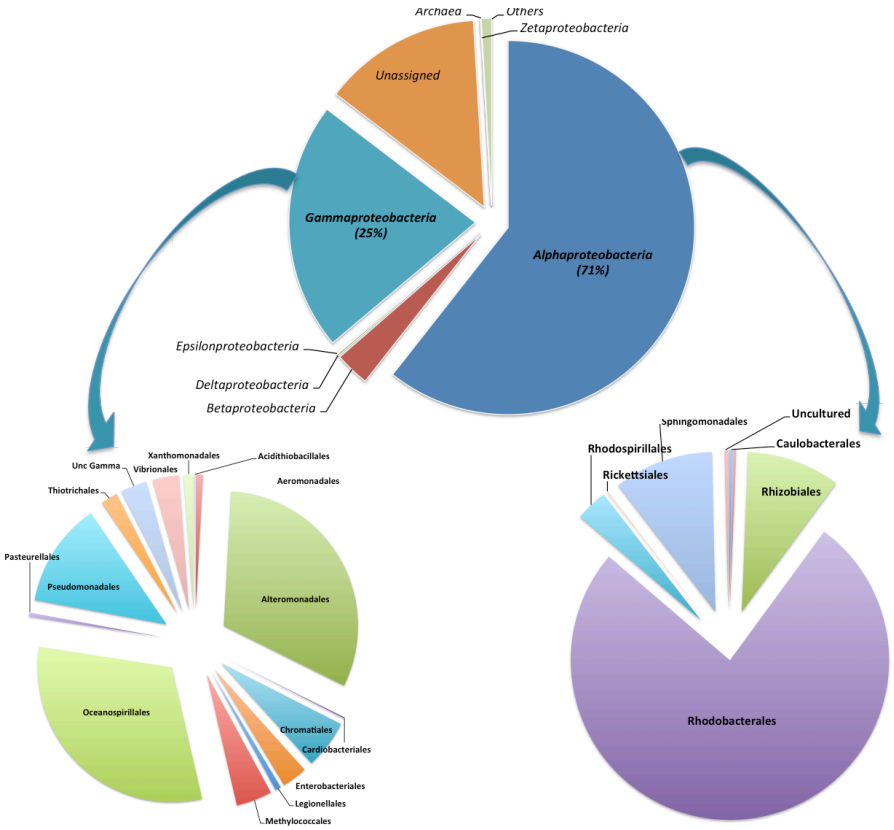


Fig. 24: Comunità microbica in arricchimenti di Gela.

Per l'isolamento di batteri idrocarburo-degradanti, aliquote degli arricchimenti sono stati inoculati su piastre di ONR7a supplementati con petrolio grezzo o con la mix di policiclici aromatici utilizzata in precedenza. Nella tabella 4 sono riportati i risultati. Sulla base della coltivabilità a noi nota, è risultato rilevante il ceppo *Sphingopyxis* sp isolato su ONR7a utilizzando fenantrene come unica fonte di carbonio, così come *Altererythrobacter* sp. entrambi appartenenti alla classe degli *Alphaproteobacteria* che in azioni concertate contribuiscono alla totale degradazione degli idrocarburi.

Tabella 4 Ceppi isolati con relativi substrati.

Isolato	Substrato
Alcanivorax borkumensis SK2	Petrolio
Marinobacter hydrocarbonoclasticus	Petrolio
Halomonas taeanensis	PAH mix
Sphingopyxis sp.	PAH mix (Phe)
Altererythrobacter sp.	PAH mix (Phe)
Citreicella thiooxidans	PAH mix
Marinobacter bryozoorum	PAH mix

3.2 Conclusioni

L'osservazione dei campioni di sedimento raccolti a 24h dall'incidente (sedimenti superficiali) dimostra uno scenario tipico di un inquinamento recente, in cui il petrolio appena sversato non sembra essere interessato da processi degradativi significativi. Tuttavia, allo stesso tempo, è stato possibile rilevare una struttura microbica associabile ad ambienti contaminati. All'interno delle classi più abbondanti, alfa e gamma-proteobatteri, risultano infatti già distinguibili cloni affiliati con generi idrocarburo-degradanti generalisti: *Glaciecola, Alteromonas, Marinobacter. Glaciecola* è stata frequentemente descritta in campioni marini raccolti in aree polari arricchiti con tetradecano (Yakimov et al., 2004b). Chronopoulou e co-autori (2014) descrivono lo stesso genere nel mare del Nord in campioni mesocosmi addizionati con pristano come principale substrato e in campioni di acqua di mare in prossimità di sversamenti di petrolio accidentali da una piattaforma petrolifera. Misure di degradazione in microcosmi hanno dimostrato la preferenza di *Glaciecola* per gli *n*-alcani (C_{24}-C_{31}). *Alteromonas* è un genere generalmente associato a bloom di fitoplankton che mostra peculiari abilità nel crescere rapidamente in presenza di elevate quantità di materiale organico. Inaspettatamente, non sono stati riscontrati cloni associabili a generi idrocarbonoclastici obbligati come *Alcanivorax o*

Thalassolituus. La spiegazione di ciò potrebbe derivare dalla matrice investigata (sedimenti e non acqua di mare) o la ridotta disponibilità dei nutrienti nelle condizioni naturali o ancora a processi di interazione/inibizione da parte di altri membri della comunità microbica più competitivi a quelle specifiche condizioni ambientali. L'unico HCB ritrovato (1% dei cloni) era affiliato al genere *Cycloclasticus* specialista nella degradazione di PAH e dato il tempestivo campionamento potrebbe essere indice di una comunità microbica già adattata alla presenza pregressa di PAH.

A 30 giorni dallo Gela spill, la morfologia del sito era totalmente cambiata, tanto da causare la stratificazione del petrolio a 20 cm di profondità, le indagini chimiche hanno mostrato un cromatogramma quasi inalterato rispetto al mese precedente che mostrava segni moderati di degradazione a causa delle forti condizioni riducenti. Le stesse hanno causato un considerevole shift nella composizione della comunità microbica, tanto da generare una significativa abbondanza di deltaproteobatteri, tipicamente indicatori di uno stato di anossia. Il profilo di diversità era evidentemente caratterizzato dalla presenza di delta- e betaproteobatteri. I primi per lo più zolfo-riducenti, coinvolti nei processi di degradazione anaerobica degli idrocarburi. Una parte di questi, *Geoalkalibacter* e *Desulfotignum* sembrano essere coinvolti in processi di degradazione anaerobica degli idrocarburi (alifatici ed aromatici) che portano alla produzione di acetato. I membri di *Gamma*- e *Alphaproteobacteria*, se pur in numero ridotto, continuano ad essere rappresentati caratterizzandosi in gruppi specializzati nella degradazione degli idrocarburi ma in condizioni di microaerofilia.

Dopo 60 giorni la comunità microbica mostra una più elevata biodiversità all'interno di ciascuna classe. Anche gli *Gamma*- e *Alphaproteobacteria* continuano ad essere rappresentati, caratterizzandosi in gruppi specializzati nella degradazione degli idrocarburi ma in condizioni di microaerofilia. In particolare, si sviluppa un cospicuo gruppo di deltaproteobatteri specializzati nella degradazione degli idrocarburi, cloni affiliati al gruppo Sva1033 frequentemente descritti come ferro-riducenti in sedimenti anossici. Allo stesso tempo corrisponde la massima degradazione registrata. A novembre si osserva un drastico cambiamento sia nel profilo chimico che microbiologico: non sono visibili idrocarburi e la comunità microbica torna mostra una dominanza di Alfaproteobatteri. In conclusione, la figura 25 mostra i membri della comunità microbica identificati con metodi molecolari, come candidati nei processi di degradazione registrati *in situ.* Inoltre, sulla base della letteratura, è possibile ipotizzare i processi relativi alla nitrato-riduzione (*Rhodobacteraceae*), ferro-riduzione

(clone SVA1033 e *Geobacteraceae*), infine *Desulfomonadaceae* per la solfato-riduzione.

Questo studio conferma la validità degli studi sulla struttura microbica di un sito contaminato da petrolio quale indicatore del potenziale di self-cleaning e indice di monitoraggio sulla degradazione in essere nei sedimenti marini. Inoltre, emerge un'elevata potenzialità nella degradazione del contaminante in condizioni di anossia rivelando nuove prospettive sull'applicazione della bioremediation *in situ*. I capitoli successivi saranno dedicati all'approfondimento dello studio su tale potenziale.

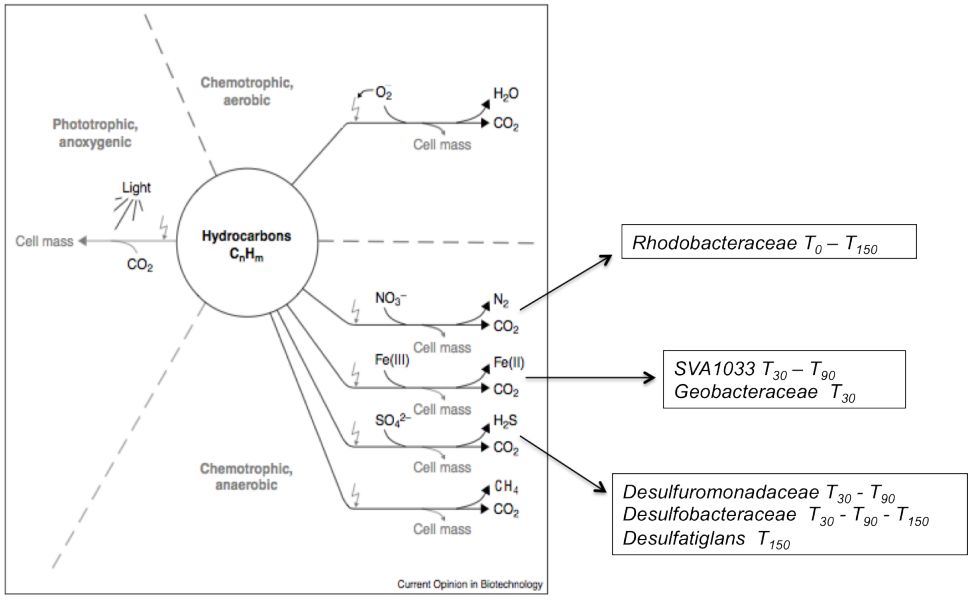


Fig. 25: Membri della comunità microbica identificati con metodi molecolari candidati per l'espletamento dei processi metabolici descritti nella figura

3.3 BIBLIOGRAFIA

Acosta-González A., Rosselló-Móra R., and Marqués S. (2013) Characterization of the anaerobic microbial community in oil-polluted subtidal sediments: aromatic biodegradation potential after the Prestige oil spill. *Environmental. Microbiology*. **15**: 77-92.

Nonstad, I., and Brandvik, P.J. (2008) Responses of microbial communities in Arctic sea ice after contamination by crude petroleum oil. *Microbial Ecology* **55**: 540-552.

Crisafi, F., Genovese, M., Smedile, F., Russo, D., Catalfamo, M., Yakimov, M.M., Giuliano, L., and Denaro, R. (2016) Bioremediation technologies for polluted seawater sampled after an oil-spill in Taranto Gulf (Italy): Acomparison of

biostimulation and use of a washing agent in microcosm studies. *Marine Pollution Bulletin* **106:** 119-126.

Chronopoulou, P.M., Sanni, G.O., Silas-Olu, D.I., Meer, J.R., Timmis K.N., Brussaard, C.P., and McGenity, T.J. (2015) Generalist hydrocarbon-degrading bacterial communities in the oil-polluted water column of the North Sea. *Microbial Biotechnology* **8**: 434-447.

Gauthier, M.J., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P., and Bertrand. J.C. (1992) *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen.nov., sp. nov., a new extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *International Journal Systematic Bacteriology* **42:** 568-576.

Gutierrez, T., Rhodes, G., Mishamandani, S., Berry, D., Whitman, W.B., Nichols, P.D., Semple, K.T., and Aitken, M.D. (2014) Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation of phytoplankton-associated *Arenibacter* spp. and description of *Arenibacter algicola* sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium. *Applied Environmental Microbiology* **80**: 618-628.

Higashioka, Y., Kojima, H., Sato, S., and Fukui M.J. (2009) Microbial community analysis at crude oil-contaminated soils targeting the 16S ribosomal RNA, *xylM*, C230, and *bcr* genes. *Journal of Applied Microbiology* **107**: 126-135.

Keshri, J., Mishra, A., and Jha B. (2013) Micobial population index and community structure in saline-alkaline soil using gene targeted metagenomics. *Microbiological Research* 168: 165-173.

Orcutt, B.N., Bach, W., Becker K., Fisher A.T., Hentscher M., Toner B.M., Wheat C.G., and Edwards K.J. (2011) Colonization of subsurface microbial observatories deployed in young ocean crust. *ISME Journal* **5**, 692-703.

Prabagaran, S.R., Manorama, R., Delille, D., and Shivaji S. (2007) Predominance of *Roseobacter*, *Sulfitobacter*, *Glaciecola* and *Psychrobacter* in seawater collected off Ushuaia, Argentina, Sub-Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology* **59**: 342-355.

Rosselló-Mora, R. and Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology* Review **25**: 39-67

Yakimov, M.M., Gentile, G., Bruni, V., Cappello, S., D'Auria, G., Golyshin, P.N., and Giuliano, L. (2004) Crude oil-induced structural shift of coastal bacterial communities of rod bay (Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica) and characterization of cultured cold-adapted hydrocarbonoclastic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* **49**: 419-432.

Yakimov, M.M., Giuliano, L., Denaro, R., Crisafi, E., Chernikova, T.N., Abraham, W.R., Luensdorf, H., Timmis, K.N., and Golyshin, P.N. (2004) *Thalassolituus oleivorans* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 54: 141-148.

Yakimov, M.M., Timmis K.N., and Golyshin, P.N. (2007) Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion Biotechnology* **18**: 257-266.

4 Strategia sperimentale con trattamento di ossigenazione di *clean-up* in mesocosmi.

4.1 Il sistema sperimentale

L'esperimento è stato eseguito nei mesocosmi presso l'Istituto per l'Ambiente Marino Costiero (IAMC)-CNR, utilizzando una vasca rettangolare di 3.75 m^3 di capacità (lunga 166 cm, a 150 cm di profondità, 150 cm ampia). Questa vasca è stata riempita con ca. 2.000 litri di acqua di mare prelevata direttamente dal porto di Messina, (38° 11'42.58"N 15° 34'25.19"E). Prima di entrare nel mesocosmo, l'acqua di mare è stata filtrata attraverso una maglia di 200 μm di nylon per rimuovere metazoi e detriti. 1000kg di sedimenti sono stati aggiunti al sistema. La temperatura all'interno del mesocosmo è stata mantenuta a 20±1° C per tutta la durata della sperimentazione (tre mesi). Il sistema modulare è stato sviluppato appositamente per ottenere un' aerazione *in situ* (20L min^{-1}) dei sedimenti inquinati, senza la rimozione della parte contaminata per evitare la ricontaminazione della falda adiacente. Il "sistema modulare" (*Modular slurry system*) utilizzato in questa sperimentazione è mostrato in Figura 26.

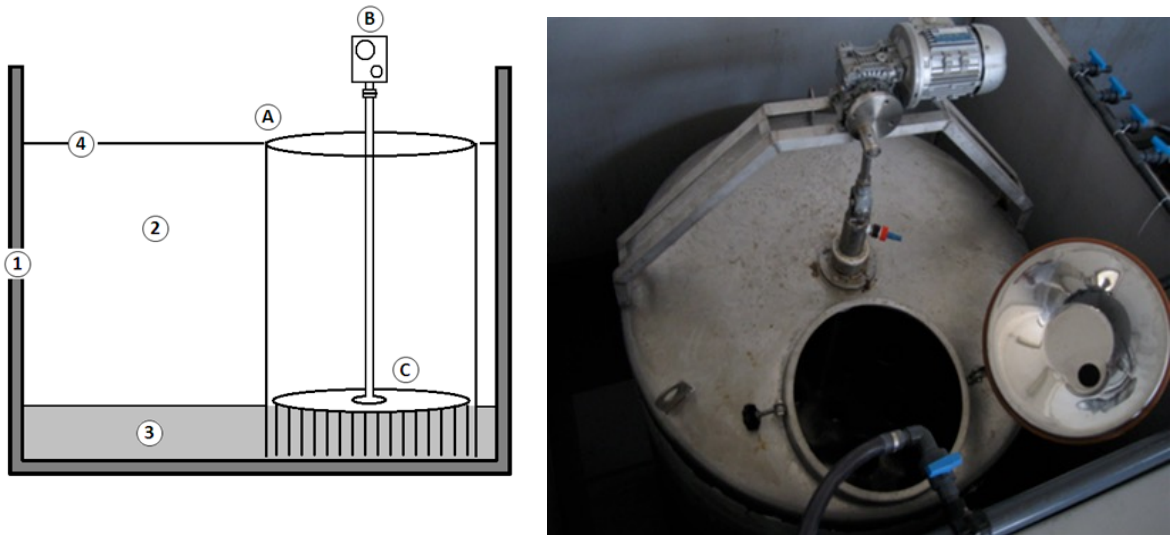


Fig. 26: Rappresentazione schematica del sistema sperimentale utilizzato in questo studio. 1, vasca-mesocosmo; 2, acqua di mare; 3, sedimenti contaminati; 4, livello dell'acqua di mare; A, sistema modulare; B, motore esterno con pompa ad aria; C, lamiera di acciaio con aghi per fornire ossigeno ai sedimenti; (b) Sistema modulare utilizzato.

La parte esterna al sistema, interna alla stessa vasca, è stata utilizzata come controllo per monitorare l'invecchiamento dei sedimenti e per convalidare l'efficienza del trattamento. La durata della sperimentazione è stata di tre mesi. Sono stati prelevati fino a 10 kg di campioni di sedimento all'interno (area ossigenata, OX) e all'esterno (area anossica, AN) del sistema a tempi stabiliti (T_0, T_1, T_{29} e T_{90}) per monitorare la successione della popolazione microbica e la percentuale di idrocarburi presenti nei sistemi. Inoltre, sui sedimenti sono stati effettuati saggi ecotossicologici con prove di mortalità sull'anfipode *Corophium orientale*.

4.2 Risultati.

4.2.1 Degradazione del petrolio all'interno e all'esterno del sistema modulare.

Prima dell'aggiunta nei mesocosmi di 6.500 ppm dell'olio combustibile Bunker C, la concentrazione totale degli idrocarburi presenti nei sedimenti originali di Messina è stata stimata essere 120 ppm di peso secco. L'analisi degli idrocarburi del petrolio ha mostrato una netta prevalenza di derivati alcyl-naftalene (97%) oltre ad idrocarburi alifatici (3%). Una volta che l'olio combustibile Bunker C è stato aggiunto ai sedimenti, la frazione dei total extracted and resolved hydrocarbons (TERHC) è stata ripristinata con una predominanza di idrocarburi alifatici (70%) oltre ad aromatici e naftenici (30%). Il grado di degradazione delle componenti TERHC dell'olio combustibile Bunker C è stato determinato alla fine della sperimentazione (T_{90}) in entrambi i sistemi (sistema aerato MSS e sedimenti anossici non trattati). In Figura 27 è rappresentata la percentuale di idrocarburi presenti nei sedimenti utilizzati in questo studio. La concentrazione degli idrocarburi, specialmente idrocarburi alifatici, è stata normalizzata utilizzando il rapporto (nC_{17}/Pristane + nC_{18}/Phytane) / 2., e i valori ottenuti sono stati calcolati a partire da sottocampioni in triplicato. In corrispondenza al trattamento applicato, la degradazione totale della frazione TERHC dell'olio combustibile Bunker C nei sedimenti aerati nel sistema MSS era di 97,7±0,9%. Al contrario, i sedimenti anossici esterni e non trattati (Eh =-345 mV) contenevano più di 81,8±1,2% di olio combustibile inizialmente aggiunto. Inoltre, è stata effettuata l'analisi gravimetrica della frazione totale idrofoba dell'estratto (total extracted hydrocarbons fraction, TEHF) nei sedimenti. Le TEHF estratti nei sedimenti all'interno del sistema MSS erano pari a 780 ± 80 mg kg^{-1} di peso secco, mentre, in

conformità al basso livello di degradazione, i sedimenti esterni mostravano ancora più di 5.400±120 mg kg^{-1} di materiale idrofobo.

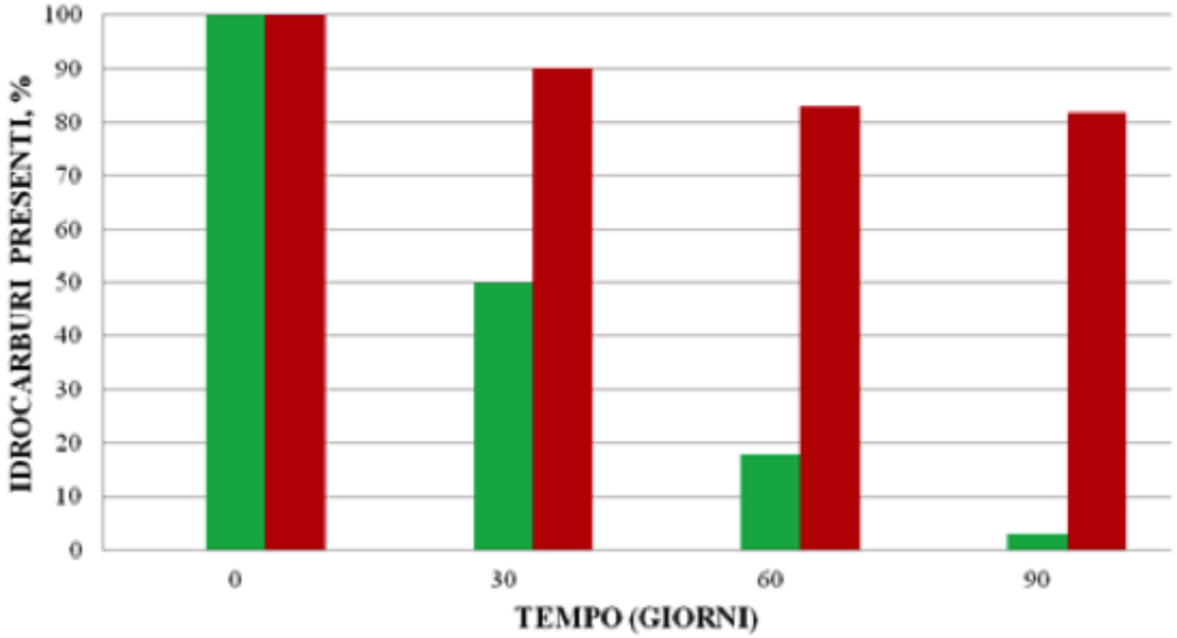


Fig.27: Percentuale di idrocarburi presenti nei sedimenti utilizzati in questo studio: sedimenti anossici (rosso) e sedimenti ossigenati (verde).

4.2.2 Analisi ecotossicologiche.

Le analisi ecotossicologiche dei sedimenti contaminati da idrocarburi sono state effettuate utilizzando il saggio sull'anfipode *Corophium orientale*. Un improvviso carico di petrolio nei sedimenti costieri (T_0) ha causato la mortalità di quasi tutti gli organismi (98±2%). I sedimenti contaminati dal petrolio fuori dal sistema sono rimasti altamente tossici durante i tre mesi di sperimentazione con indici di mortalità superiore al 90% (T_{29}). Allo stesso tempo, la tossicità dei sedimenti contaminati presi dal sistema MSS dopo un mese di aereazione ha mostrato una vitalità del 62% degli anfipodi esposti ai sedimenti (T_{90}). Questo dimostra che i sedimenti del sistema MSS erano significativamente meno tossici di quelli esterni,(Fig. 28).

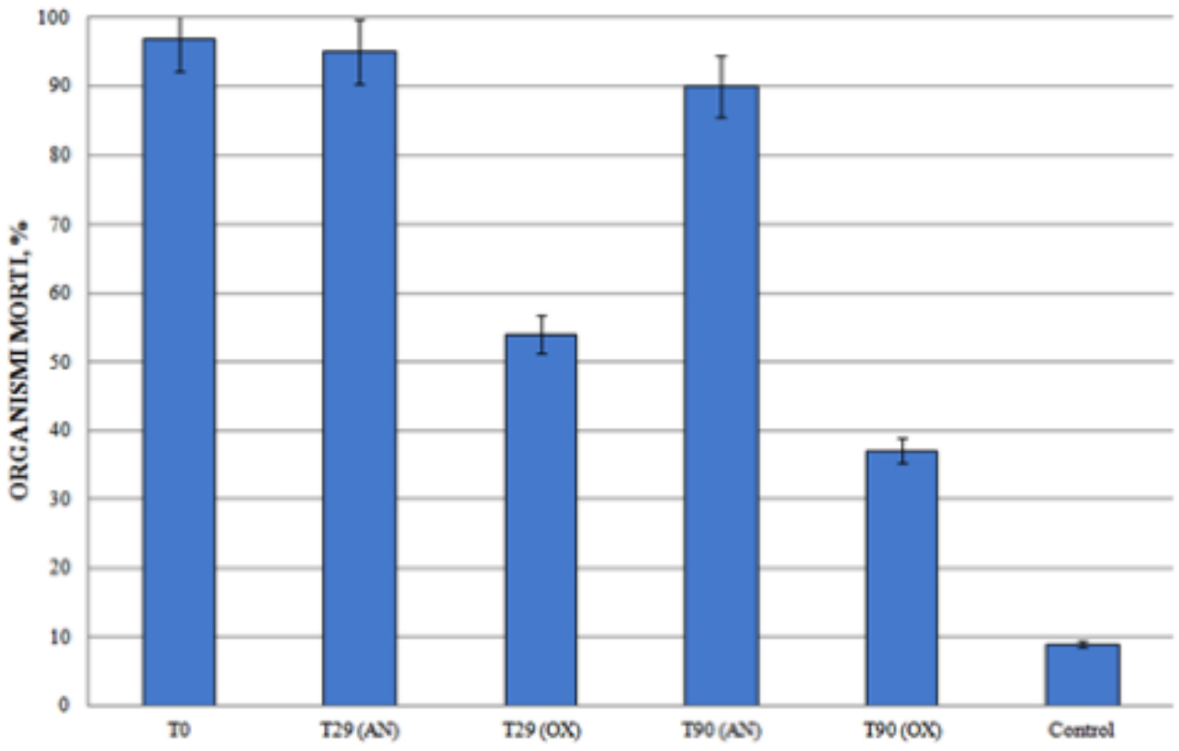


Fig.28 Mortalità di *Corophium orientale* in sedimenti contaminati (anossici, AN), ossigenati (OX) e di controllo (invecchiati). La barra di errore indica la deviazione standard dei campioni in doppio.

4.2.3 Dinamica della comunità batterica durante il trattamento di bioremediation nei sedimenti contaminati.

Durante la sperimentazione sono state realizzate quattro librerie di cloni sul 16S rRNA per monitorare la successione delle comunità microbiche metabolicamente attive durante il processo di biodegradazione nel sistema (T_1, 83 cloni, T_{29}, 80 cloni, e T_{90}, 90 cloni) e nei sedimenti invecchiati fuori dal sistema (T_{90OUT}, 62 cloni). Tutte queste librerie sono state confrontate con la popolazione microbica indigena presente nei sedimenti portuali di Messina prima della sperimentazione di simulazione di *oil spill* (T_0). La maggioranza dei 96 cloni scelti e analizzati dalla libreria T_0 erano affiliati ai *Gammaproteobacteria* (51%), seguiti dagli *Alphaproteobacteria* (22%). Tra la comunità microbica al T_0 erano presenti altri proteobatteri, microaerofili e anaerobi appartenenti alle classi degli *Epsilon-* e *Deltaproteobacteria*, anche se in minime quantità (6.2 e 2% di tutti i cloni analizzati). La restante frazione della comunità era caratterizzata da membri di *Cyanobacteria* (7%), *Chloroflexi* (5%), *Verrucomicrobia* (3%) e *Bacteroidetes* (2%) (Figura 29). A livello di classe, in tutti i sedimenti ossigenati dal sistema le sequenze degli organismi

appartenenti ai *Gammaproteobacteria* erano dominanti, con una percentuale di abbondanza relativa che andava dal 73% al 88%. Durante il primo mese di sperimentazione è stata osservata una riduzione nell'abbondanza relativa degli *Alphaproteobacteria* (dal 22% al 11%) che è poi aumentata al T_{90} fino a diventare paragonabile alle quantità registrate al T_0. Nei sedimenti ossigenati non sono stati rilevati organismi appartenenti ai *Deltaproteobacteria* durante tutto il periodo della sperimentazione. E' stato inoltre osservato uno scenario completamente diverso per quanto riguarda la successione delle comunità microbiche nei sedimenti esterni-anossici. Come è stato descritto in precedenza, in breve tempo, dopo l'aggiunta del petrolio, questi sedimenti sono diventati fortemente anossici, mostrando una comunità microbica rappresentata quasi esclusivamente dai *Deltaproteobacteria* (96,8% con pochi restanti cloni appartenenti ai *Bacteroidetes*. In risposta al tipo di contaminazione, più della metà di tutti i 411 cloni analizzati erano associati a batteri idrocarburo degradanti altamente specializzati appartenenti ai *Gamma*-, *Alpha*- e *Deltaproteobacteria.* In particolare, le sequenze relative ai *Gammaproteobacteria* idrocarburo degradanti rappresentano il 25%, 72%,64% e 12% rispettivamente nelle librerie del T_0, T_1, T_{29} e T_{90}. A livello di genere, oltre il 10% della popolazione microbica iniziale è stata attribuita a batteri marini obbligati come *Thalassolituus oleivorans* (Yakimov et al., 2004). Questo microorganismo sembra essere sensibile ad elevate concentrazioni di idrocarburi, dal momento che la sua presenza è diminuita al 2% nella libreria del T_1 per poi scomparire nelle altre librerie analizzate. Altri tre batteri idrocarburoclastici marini obbligati appartenenti ai generi *Alcanivorax*, *Cycloclasticus* e *Marinobacter* hanno mostrato una variazione dell'abbondanza relativa simile durante la sperimentazione: in minoranza al T_0 sono diventati gruppi dominanti al T_{29} (38,5 e 18%, rispettivamente) per poi scomparire nella libreria del T_{90}. L'aggiunta nel sistema del Bunker oil ha cambiato drasticamente la struttura della comunità microbica al T_1 causando una diminuizione del gruppo dei batteri marini obbligati idrocarburo clastici e mostrando la comparsa di altri cluster non coltivabili di *Gammaproteobacteria* già osservati tra le comunità microbiche di altri sedimenti contaminati da idrocarburi. Avendo analizzato solo l'abbondanza del gene 16S rRNA non abbiamo a disposizione dati effettivi sull'attività di biodegradazione di questi microrganismi incoltivabili, ma è chiaro, dalla loro presenza, che esiste un'elevata resistenza alla tossicità degli idrocarburi presenti nel Bunker oil (Païssé et al., 2010). L'analisi del 16S rRNA condotta nei sedimenti contaminati anossici ha

rivelato una notevole prevalenza di *Deltaproteobacteria* idrocarburodegradanti (90,3%). In particolare, quasi i due terzi di tutti i cloni T_{90OUT} (40 su 62) sono stati strettamente legati al microorganismo uncultured *RII-AN044* già caratterizzato in sedimenti anossici dopo la fuoriuscita di petrolio dal Prestige (Acosta-Gonzales et al., 2013). Inoltre, più del 16% dei cloni rilevati avevano una % di similarità >98% relativa al *Proteobacterium delta NaphS6* coinvolto nella degradazione di naftalene e 2-metilnaftalene (Wilkes et al., 2008), mentre il 10% dei cloni del T_{90OUT} erano strettamente connessi al ceppo *Desulfatibacillum aliphaticivorans* capace di degradare *n*-alcani e n-alcheni in condizioni di solfato-riduzione (Cravo-Laureau et al., 2004).

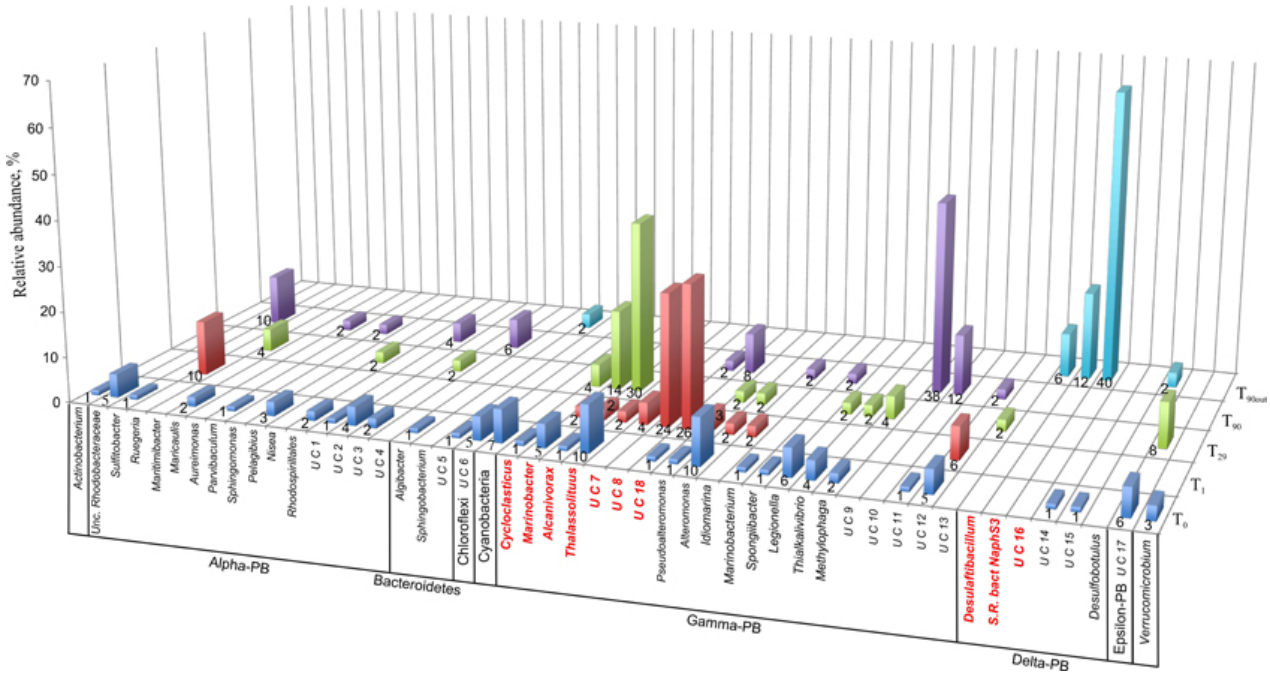


Fig. 29: Dendrogramma dell'analisi tassonomica dei cloni del 16S cDNA. I numeri alla base delle colonne rappresentano la percentuale dei cloni nelle corrispondenti librerie. Abbreviazioni utilizzate: PB, divisione proteobatteri, UC, cluster non affiliati. I gruppi di batteri coinvolti o associati alla degradazione degli idrocarburi sono indicati in rosso e in grassetto.

4.2.4. Diversità batterica.

Come mostrato in Tabella 5, i valori degli indici di diversità e di coverage sono stati calcolati per ogni libreria del 16S rRNA.

Tabella 5. Indici di diversità calcoli nelle cinque librerie di cloni in tempi diversi

Indici di diversità	T_0	T_1	T_{29}	T_{90}	T_{90OUT}
Taxa (OTUs)	46	16	14	12	5
Number of clones	96	83	80	90	62
Dominance_D	0,04	0,15	0,22	0,24	0,44
Simpson_1 D	0,96	0,85	0,78	0,76	0,55
Shannon H	3,50	2,31	2,08	1,89	1,09
Equitability_J	0,91	0,84	0,78	0,76	0,68
Chao_2	104,1	16	14	12	5
Singletons	31	1	0	0	0
Doubletons	7	10	8	6	2
Coverage	0,64	0,74	0,77	0,87	0,92

Sulla base della definizione che ogni filotipo (OTU) è costituito da un clone unico o da un gruppo di cloni che hanno sequenza con similarità >97% (Rossello-Mora e Amann, 2001) sono stati identificati un totale di 93 diversi OTU. I valori di copertura, che variano tra 0.64 (libreria T_0) e 0.92 (libreria T_{90OUT}), hanno indicato che è stato ottenuto un quadro soddisfacente della comunità batterica. Come mostrato dai valori elevati di Simpson, Shanon e il numero di specie mancanti fornite da Chao-2, la diversità batterica più alta è stata osservata nei sedimenti originali (T_0). La biodiversità batterica è stata drasticamente influenzata dalla contaminazione dell'olio combustibile Bunker C, diminuendo i valori di Simpson, Shanon ed uguaglianza, a causa della forte selezione dovuta agli idrocarburi del petrolio e dai batteri degradanti (Harayama et al., 1999; Kasai et al., 2001; Syutsubo et al., 2001). L'indice di dominanza ha così raggiunto il valore più alto al T_{29} e T_{90}. Dopo un mese di ossigenazione, la popolazione microbica dei sedimenti presenti nel sistema mostra la dominanza di batteri marini idrocarburo-degradanti, mentre alla fine dell'esperimento, il cluster dominante è costituito da microorganismi collegati a comunità microbiche presenti in sedimenti marini incontaminati (42% dei *Gammaproteobacteria*). Come è stato accennato in precedenza, la comunità microbica dei sedimenti anaerobici

presente T_{90OUT} era totalmente diversa rispetto a quella dei sedimenti ossigenati. Sia la contaminazione che la trasformazione dei sedimenti ossigenati in condizioni di anaerobiosi hanno selezionato una popolazione altamente specializzata e hanno fatto registrare una bassa diversità della popolazione microbica (5 OTU, Dominanza 0,44, copertura 92%). Sorprendentemente, la struttura della comunità microbica del T_{90} risulta essere simile alle comunità microbiche recuperate nelle prime fasi dell'esperimento (sia le librerie del T_0 e che del T_1) rispetto alla popolazione di batteri marini obbligati idrocarburo degradanti ritrovati al T_{29}. Questo risultato suggerisce indirettamente il processo di auto-recupero dei sedimenti contaminati dal petrolio, che è stato confermato mediante l'analisi GC dei sedimenti.

4.3 DISCUSSIONI.

Il Mar Mediterraneo è un ambiente tra i più ricchi e biologicamente diversi al mondo, ma allo stesso tempo è anche uno dei più vulnerabili. Lungo la costa è esposto a pressioni antropiche dovute alla sovrappopolazione ed a una vasta gamma di attività economiche, molte delle quali sono sostenute dal traffico marittimo. Come è noto, sia fenomeni accidentali (oil spill) che operazioni effettuate dalle navi (scarichi illegali di residui oleosi e delle acque di zavorra oleosa) sono diventati un grave problema nella regione del Mediterraneo (Ferraro et al., 2007). La popolazione microbica che abita i sedimenti marini contaminati da petrolio viene significativamente influenzata dalla presenza di idrocarburi, tanto da divenire essa stessa bioindicatrice di inquinamento (Yakimov et al., 2005; Kostka et al., 2011; Allen et al., 2007; Maso et al., 2014). La scelta dei sedimenti cronicamente inquinati, alcyl-naftaleni (120 ppm), era motivata dall'obiettivo di simulare un' ulteriore incidente in un sito che periodicamente sperimenta input di petrolio (Paissé et al., 2008; 2010). L'attesa era quella di trovare comunità microbiche già adattate alla presenza di idrocarburi petroliferi. Infatti, il campione raccolto dal porto di Messina mostrava all'incirca il 30% di batteri marini idrocarburodegradanti obbligati e strettamente legata ai generi di *Alcanivorax*, *Cycloclasticus, Thalassolutuus.* Per simulare una fuoriuscita accidentale di petrolio si sono contaminati 1.000 kg di sedimenti sabbiosi con olio combustibile Bunker C (6.500 mg kg^{-1}). Questo tipo di olio pesante è utilizzato dalle navi da carico, petroliere e la sua composizione è generalmente più complessa e carica di impurità rispetto ai carburanti distillati. Dati limitati sulla composizione di tale olio di combustione

indicano che comprende circa il 25% (poly)aromatici, 15% alifatici, 45% naftenici e 15% di composti non idrocarburici (Clark et al., 1990). Come è noto, dopo un fenomeno di oil spill che colpisce il litorale, l'azione dinamica della spiaggia è il principale meccanismo di dispersione dei sedimenti inquinati (Hua, 2004). Ciò si traduce in un'intensa oleatura dei sedimenti del sottosuolo e la conseguente diminuzione della concentrazione di ossigeno a causa dell'attivazione iniziale di organismi aerobi organotrofi (Albaigés et al., 2006). Una volta che la concentrazione di questo accettore di elettroni è arrivata a zero, i tassi di degradazione sia di degli idrocarburi alifatici che aromatici è significativamente diminuita. Di conseguenza, questi contaminanti tendono ad accumularsi nello strato anaerobico dei sedimenti creando un potenziale rischio prolungato nel tempo sia per il biota marino che per la salute umana. Analisi microbiologiche di sedimenti invecchiati di Messina eseguiti alla fine della sperimentazione, hanno rivelato un'elevata predomininanza di *Deltaproteobacteria*. Sebbene sono stati recentemente isolati e studiati microorganismi solfato riduttori idrocarburo degradanti (Widdel and Rabus, 2001), la biodegradazione anaerobica degli idrocarburi in condizioni estremamente ridotte è un processo estremamente lento e difficilmente può essere applicato in strategie di biorisanamento. Infatti, al termine del nostro esperimento, dopo i tre mesi di simulazione di un fenomeno di oil spill, è stato estratto dai sedimenti anaerobici di Messina oltre l'80% dell'olio combustibile Bunker C aggiunto da noi. L'uso di batteri autoctoni per ripristinare i siti contaminati è una tecnologia innovativa, ampiamente utilizzata per la bonifica di siti aerobici (Harayama et al., 2004). Tuttavia, essa è difficilmente applicabile ai sedimenti marini estremamente ridotti e senza ossigeno. Inoltre, a causa dell' elevata probabilità di diffusione di contaminanti durante la rimozione (Bamforth and Singleton, 2005), l'applicazione delle tecnologie di bonifica *ex-situ* a sedimenti anaerobici contaminati da petrolio è severamente sconsigliata. Pertanto abbiamo voluto simulare l'aerazione *in situ* di sedimenti inquinati in un apposito Modular Slurry System (MSS). Precedenti studi hanno indicato che dopo un importante periodo di latenza, la contaminazione da petrolio ha indotto drastici cambiamenti nella struttura delle comunità batteriche associate ad una diminuzione della diversità (Bordenave et al., 2007; Grötzschel et al., 2002; Röling et al., 2002; Yakimov et al., 2005, 2007). Queste modifiche sono state attribuite sia ad un effetto tossico del petrolio sulla crescita di alcuni microrganismi e sia ad una forte selezione per tali batteri idrocarburo degradanti obbligati (Harayama et al., 1999, Kasai et al.,

2001; Grötzschel et al., 2002). La simulazione di oil spill ha inizialmente sfavorito tali microorganismi nei sedimenti di Messina e la loro popolazione è diminuita dal 13% al 3% nel primo giorno di contaminazione. Il cambiamento drastico nella comunità batterica è stato osservato dopo 29 giorni dalla fuoriuscita di petrolio: il consorzio autoctono ha iniziato a svilupparsi e più della metà della popolazione microbica del sistema MSS analizzata a T_{29} apparteneva ad *Alcanivorax* (43%), *Cycloclasticus* (7%) e *Marinobacter* (5%), microorganismi marini obbligati, già conosciuti per svolgere un ruolo chiave nella degradazione del petrolio in ambienti marini (Harayama et al., 1999; Röling et al., 2002; Yakimov et al., 2007). Degno di nota è la struttura della comunità microbica osservata nel sedimento ossigenato alla fine del trattamento (T_{90}). A questo punto, il livello degli idrocarburi era quasi del 98%, mentre la comunità microbica non presentava membri del gruppo di microorganismi marini obbligati idrocarburodegradanti. Le quantità relative di *Alphaproteobacteria* erano diminuite durante il primo mese di sperimentazione ritornando a condizioni naturali normali. Questo, è in accordo con altri studi che suggeriscono che i batteri di questa classe sostituiscono il gruppo dei *Gammaproteobacteria* durante i processi di bioremediation (Röling et al., 2002; Head et al., 2006). Le analisi dei cluster di tutti gli OTU hanno rilevato che la struttura della comunità microbica al T_{90} era più simile alla struttura della comunità microbica osservata nelle prime fasi dell'esperimento (T_0 e T_1). Il saggio eco-tossicologico eseguito con l'anfipode *Corophium orientale* ha rivelato che la tossicità dei sedimenti ossigenati nel sistema MSS è stata sostanzialmente ridotta alla fine del trattamento rispetto ai sedimenti non trattati. Infine, i nostri studi, hanno mostrato per la prima volta che i sedimenti marini anaerobici contaminati da petrolio potrebbero essere efficacemente recuperati *in situ* attraverso un'ossigenazione dei sedimenti e con la stimolazione della loro capacità di self-cleaning a causa della presenza di batteri idrocarburoclastici aerobi.

4.4 CONCLUSIONI

Le conclusioni del nostro lavoro sono state:

Lo slurry system ha favorito la degradazione del petrolio mediante la sola risospensione dei sedimenti fornendo ossigeno e rendendo disponibili i nutrienti già presenti nei sedimenti. I principali attori della biodegradazione si sono rivelati i batteri idrocarburoclastici (BIC) che a T_{29} rappresentavano il 55% delle abbondanze relative.

A tre mesi dal trattamento più del 90% del contaminante è stato abbattuto. Mentre i sedimenti indisturbati allo stesso tempo presentavano ancora il 70% del contaminante.

La tossicità del mezzo è significativamente diminuita a seguito del trattamento. Il trattamento non ha turbato significativamente la struttura della comunità microbica autoctona.

4.5 BIBLIOGRAFIA

Acosta-González, A., Rosselló-Móra, R., and Marqués, S. (2013**)** Characterization of the anaerobic microbial community in oil-polluted subtidal sediments: aromatic biodegradation potential after the Prestige oil spill. *Environmental Microbiology*. **15**: 77-92.

Allen, J.P., Atekwana, E.A., Atekwana, E.A., Duris, J.W., D. Dale Werkema, D.D., and Rossbach, S (2007) The microbial community structure in petroleum-contaminated sediments corresponds to geophysical signature. *Applied Environmental Microbiology* **73**: 2860-2870.

Albaigés, J., Morales-Nin, B., and Villas, F. (2006) The Prestige oil spill: a scientific response. *Marine Pollution Bull*etin **53**: 205-207.

Bamforth, S.M., and Singleton, I. (2005) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology Biotechnology* **8**0: 723-736.

Bordenave, S., Goñi-Urriza, M.S., Caumette, P. and Duran, R. (2007) Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. Applied *Environmental Microbiology* **73**: 6089–6097.

Clark, R.N., King, T.V.V., Klejwa, M., Swayze, G., and Vergo, N. (1990) High spectral resolution reflectance spectroscopy of minerals. *Journal Geophysical Research* **95**: 12653-12680.

Cravo-Laureau, C., Matheron, R., Cayol, J. L., Joulian, C., and Hirschler-Réa, A.2004. *Desulfatibacillum aliphaticivorans* gen. nov., sp. nov., an n-alkane-and n-alkenedegrading,sulfate-reducing bacterium. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiol*ogy **54**, 77-83.

Ferraro, G., Bernardini, A., David, M., Meyer-Roux, S., Muellenhoff, O., Perkovic, M., Tarchi, K., and Topouzelis, K. (2007) Towards an operational use of space imagery

for oil pollution monitoring in the Mediterranean basin: A demonstration in the Adriatic Sea. *Marine Pollution Bull*etin **54**: 403-422.

Grötzschel, S., Köster, J., Abed, R.M.M., and De Beer, D. (2002) Degradation of petroleum model compounds immobilized on clay by a hypersaline microbial mat. *Biodegradation* **13**: 273–283.

Harayama, S., Kasai, Y., and Hara, A. (2004) Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Current Opinion Biotechnology*. **15**: 205-14.

Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y., and Shutsubo, K. (1999) Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal Molecular Microbiology Biotechnol*ogy **1**: 63-70.

Head, I.M., Jones, D.M., and Röling, W.F.M. (2006) Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Review Microbiol*ogy **4**,173–182.

Hua, J. (2004) Fate of dispersed marine fuel oil in sediment under pre-spill application strategy. *Ocean Engineering* **31**: 943–956.

Kasai, Y., Kishira, H., Syutsubo, K., and Harayama, S. (2001) Molecular detection of marine bacterial populations on beaches contaminated by the Nakhodka tanker oil-spill accident. *Environmental Microbiol*ogy **3**: 246-255.

Kostka, J.E., Prakash, O., Overholt, W.A., Green, S.J., Freyer, G., Canion, A., Delgardio, J., Norton, N., Hazen, T.C. and Huettel, M. (2011) Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands

impacted by the Deepwater Horizon oil spill. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 7962-7974.

Païssé, S., Coulon, F., Goñi-Urriza, M., Peperzak, L., McGenity, T.J., and Durand, R. (2008) Structure of bacterial communities along a hydrocarbon contamination gradient in a coastal sediment. *FEMS Microbiology Ecol*ogy **66**: 295-305.

Païssé, S., Goñi-Urriza, M., Coulon, F., and Duran, R. (2010) How a bacterial community originating from a contaminated coastal sediment responds to an oil input. *Microbial Ecol*ogy **60**: 394-405.

Röling, W.F.M., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J.P., and Head, I.M. (2002) Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Applied Environmental Microbiol*ogy **68**: 5537–5548.

Rosselló-Mora, R. and Amann, R. (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol*ogy Review **25**: 39-67.

Sunda, W.G. (2001) Bioavailability and bioaccumulation of iron in the sea. In *The Biogeochemistry of Iron in Seawater*", D.R. Turner, and K.Hunter (eds.), Wiley, *Chinester*,UK.

Widdel, F., and Rabus, R. (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion Biotech*nology **12**: 259-276.

Wilkes, H., Vieth, A., and Elias, R. (2008) Constraints on the quantitative assessment of in-reservoir biodegradation using compound-specific stable carbon isotopes. *Organic Geochem*istry **39**: 1215-1221.

Yakimov, M. M., Denaro, R., Genovese, M., Cappello, S., D'Auria, G., Chernikova, T. N., Timmis, K. N., Golyshin, P. N., and Giuliano, L. (2005) Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons. *Environmental Microbiol*ogy **7**: 1426–1441.

5. Strategia sperimentale per il *clean-up* di sedimenti anossici contaminati in mesocosmi.

5.1 Il sistema sperimentale.

L'esperimento è stato eseguito nei mesocosmi presso l'Istituto per l'Ambiente Marino Costiero (IAMC)-CNR, utilizzando una vasca rettangolare di 3.75 m^3 di capacità (lunga 166 cm, a 150 cm di profondità, 150 cm ampia). La vasca è per la sperimentazione è stata allestita come precedentemente descritto nella sezione 4.1.

5.2 Set-up dell'esperimento

5.2.1 Allestimento di meso- e microcosmi.

Il mesocosmo allestito, è stato suddiviso in tre microcosmi mediante l'utilizzo di cilindri in plexiglass di diametro di 50 cm al fine di delimitarne tre aree del sedimento indipendenti. Due microcosmi (A e B) sono stati utilizzati per testare i trattamenti sperimentali mentre un microcosmo (C) è stato utilizzato come controllo (Fig. 30). Al microcosmo A è stata aggiunta una soluzione di sodio fumarato ad una concentrazione finale di 10mM mentre al sedimento del microcosmo B è stata aggiunta una soluzione di cloruro di ferro (III) $FeCl_3$ ad una concentrazione finale di 10 mM.

Fig. 30: Mesocosmo con all'interno i tre microcosmi.

5.2.2 Contaminazione artificiale dei sedimenti.

Per la contaminazione artificiale dei sedimenti, è stata preparata in laboratorio una mix composta da metilnaftalene, fenantrene, eptametilnonano e antracene (10,000ppm ciascuno) disciolti in esano. A questo punto, 300 g di sedimento sono stati prelevati dalla spiaggia di Messina (38°11'42.58''N; 15°34'25.19''E), lavati con esano per tre volte e sterilizzati via autoclavaggio. I sedimenti cosi preparati sono stati lasciati asciugare in stufa a 60°C per 48 ore per eliminare ogni traccia di acqua. Ai sedimenti sterili è stata aggiunta la mix d' idrocarburi per avere un concentrazione finale di 1000 ppm di ciascun composto. Dopo un'attenta omogenizzazione i sedimenti contaminati sono stati lasciati asciugare per 48 ore sotto cappa chimica per eliminare ogni traccia di esano.

5.2.3. Realizzazione prototipo.

Il prototipo è stato realizzato mediante l'utilizzo di tubi in polietilene da 50ml forati lateralmente solo nella parte superiore e suddivisi idealmente in tre porzioni. Nella porzione inferiore sono stati aggiunti 10 gr di sedimento artificialmente contaminati (1000 ppm di ciascun contaminante), nella porzione intermedi è stato aggiunto uno strato di lana perlon (materiale utilizzato per consentire la comunicazione tra lo strato superiore e quello inferiore) e nella porzione del tubo superiore sono stati aggiunti i sedimenti prelevati direttamente dal mesocosmo (Fig 31).

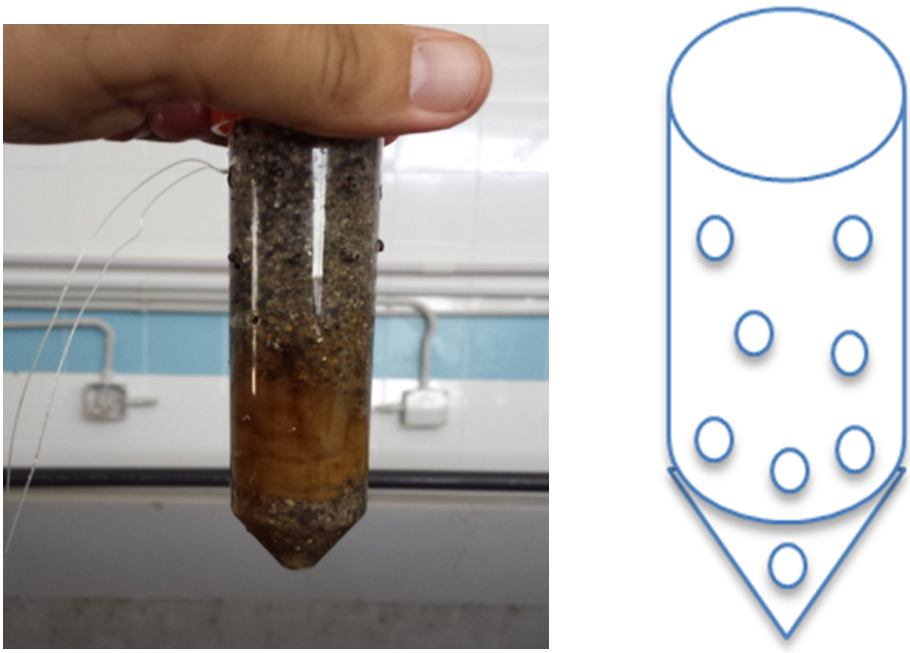


Fig. 31 Foto e rappresentazione grafica del prototipo utilizzato durante la sperimentazione.

5.2.4 Raccolta dei campioni

Per monitorare l'efficienza di degradazione nei tre microcosmi e la dinamica della comunità microbica, 3 prototipi sono stati prelevati da ciascun microcosmo a T_0 e dopo 180 (T_{180}) e 330 (T_{330}) giorni. I sedimenti prelevati dalla base dai 3 prototipi per ciascun microcosmo sono stati mixati e conservati per le successive analisi chimiche e molecolari. Nel momento in cui sono stati effettuati i campionamenti è stato anche possibile rilevare i valori di potenziale redox.

5.3 Proprietà geochimica dei sedimenti

Il potenziale redox (Eh) è stato misurato nei primi 10 cm del sedimento in corrispondenza alla profondità in cui i sedimenti contaminati sono stati posizionati. La tabella 6 riassume i risultati ottenuti. In linea generale, i valori di potenziale redox misurati nei sedimenti all'inizio della sperimentazione erano inferiori ai -300 mV. In tutti i microcosmi è stato registrato un leggero incremento dei valori del potenziale redox nei primi 180 giorni. I valori più bassi sono registrati a 330 giorni nel microcosmo C (-220 mV) mentre nel microcosmi A e B i valori misurati alla fine della sperimentazione sono stati di -135 mV e –189mV, rispettivamente.

Tabella 6. Potenziale redox (Eh) misurato nei microcosmi sperimentali

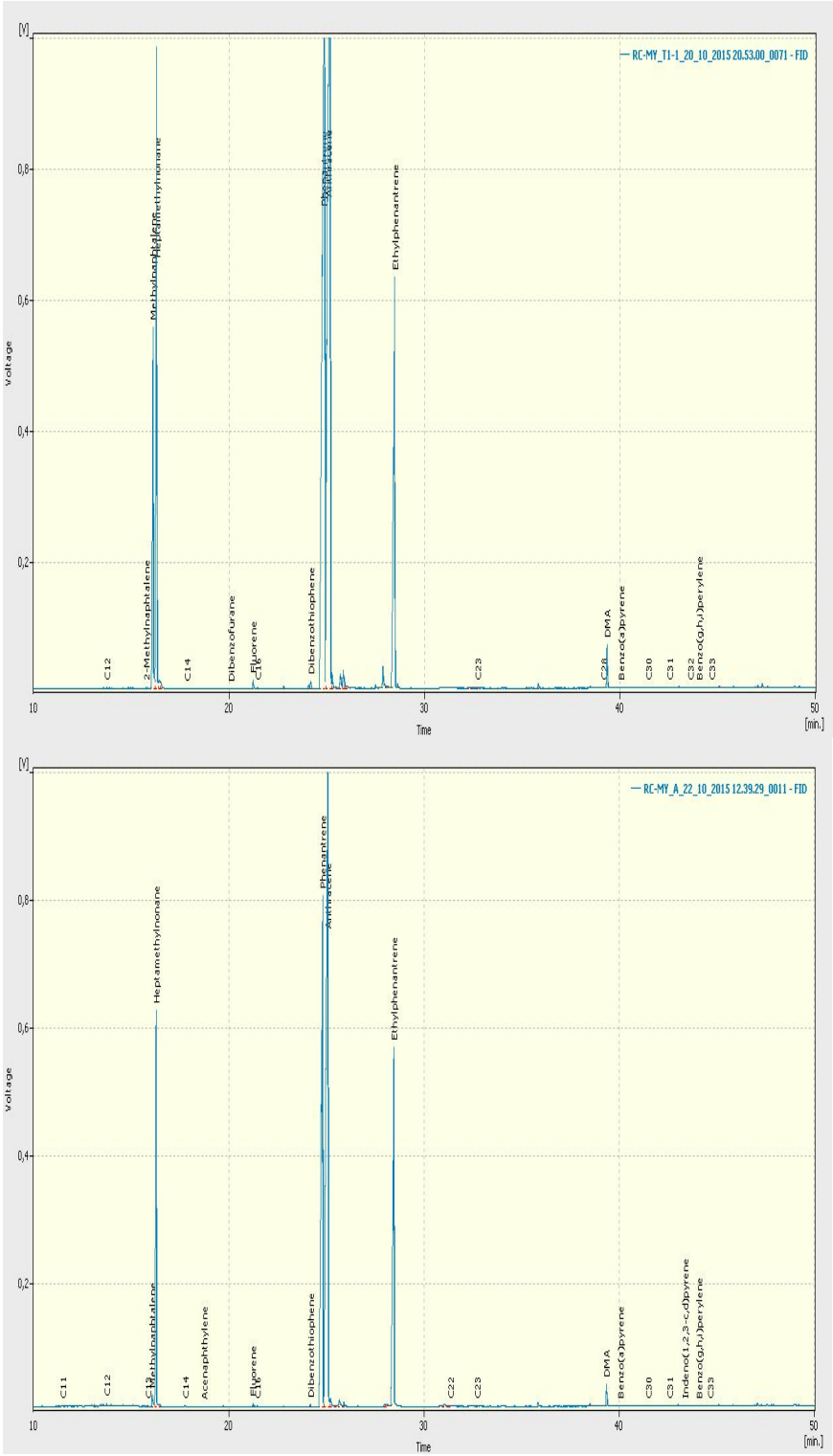
	Microcosmo A (Fe^{3+})	**Microcosmo B (Fumarato)**	**Microcosmo C (Controllo)**
T_0	-346 ± 23.5	-349 ± 43.5	-328 ± 43.5
T_{180}	-148.3 ± 21.15	-171.6 ± 23.05	-283.6 ± 24.05
T_{330}	-135 ± 25.56	-189.6 ± 33.05	-220.6 ± 27.06

5.4 Degradazione dei composti aromatici durante i trattamenti sperimentali

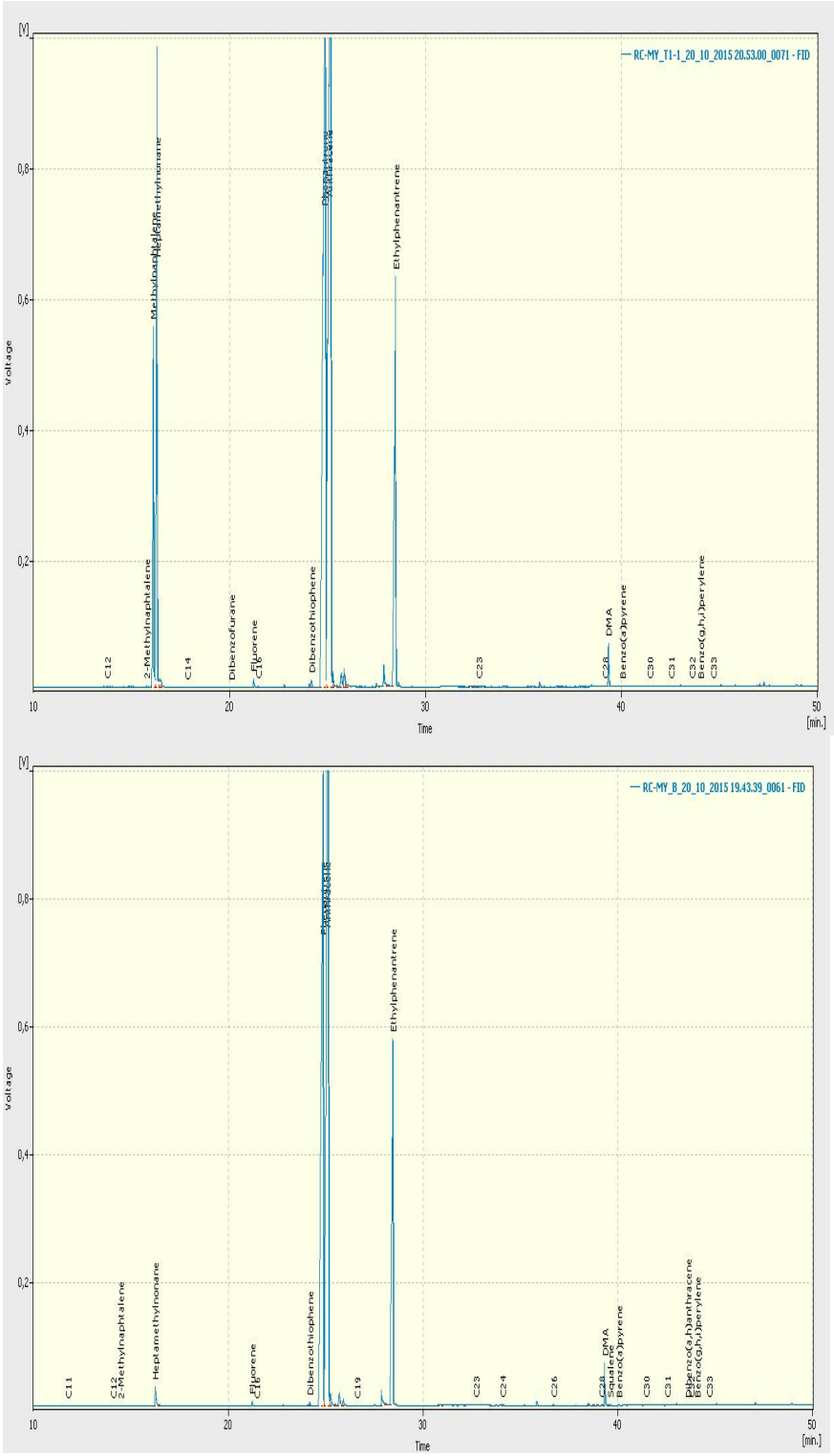
Le analisi degli idrocarburi condotti sui sedimenti campionati all'interno dei prototipi hanno permesso di valutare i tassi di degradazione per ogni singolo composto dopo 330 giorni d'incubazione. La figura 32 mostra i cromatogrammi ottenuti per ogni microcosmo all'inizio della sperimentazione (T_0) e dopo 11 mesi di incubazione (T_{330}).

I tassi di degradazione calcolati dalle analisi chimiche, hanno mostrato che il composto maggiormente degradato, sia nei microcosmi “biostimolati” che nel microcosmo di controllo, è stato il metilnaftalene con una percentuale di degradazione superiore al 90% nel microcosmo stimolato con l’aggiunta di Fe^{3+} e superiore all’80% nei sedimenti stimolati con l’aggiunta del fumarato e nel sedimento non trattato. Interessante è stato inoltre osservare la degradazione dell’eptametilnonano che ha mostrato una percentuale di abbattimento del 92% nel microcosmo B (fumarato), in confronto di circa il 40% nel microcosmo A (Fe^{3+}) e del 50% nel microcosmo controllo (Fig. 33). Per quanto riguarda il fenantrene e l’antracene, i tassi di degradazione più alti sono stati registrati nei sedimenti stimolati con l’aggiunta di Fe^{3+} mostrando un tasso di abbattimento di 66 e 72% per fenantrene e antracene rispettivamente. Nel microcosmo B (con l’aggiunta del fumarato) è stato registrato un abbattimento del 17% di fenantrene e 8% di antracene. Infine nel sedimento in anaerobiosi senza nessun trattamento il tasso di degradazione di fenantrene e antracene è stata molto bassa con percentuali del 9 e 6% rispettivamente (Fig.33).

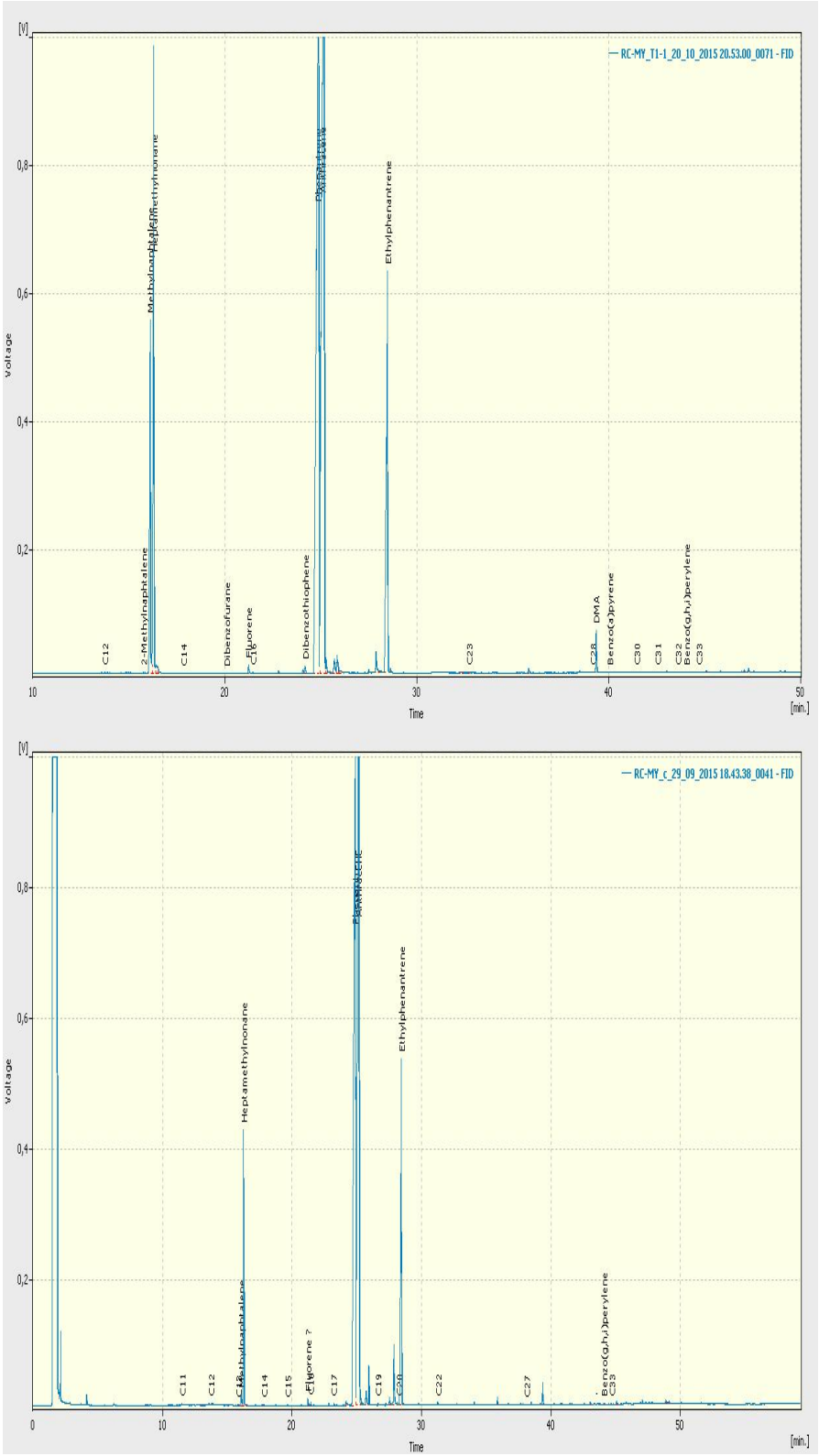
Tali risultati dimostrano perfettamente che la comunità microbica autoctona associata a sedimenti cronicamente contaminati del porto di Messina possiede un potenziale intrinseco per la degradazione di idrocarburi policiclici aromatici a basso peso molecolare (come metilnaftalene) e anche di alcuni alcani altamente ramificati (terpenoidi). I nostri studi hanno evidenziato che l'aggiunta di fumarato stimolava la degradazione del metilnaftalene, mentre l'attivazione degli idrocarburi policiclici aromatici più pesanti, come fenantrene e antracene, veniva stimolata in condizioni ferro-riducenti. Questi dati supportano indirettamente l'ipotesi che si possano realizzare due meccanismi di degradazione anaerobica degli idrocarburi poliaromatici (IPA), ovvero la succinilazione del metilnaftalene e la carbossilazione del fenantrene e dell antracene. Da notare inoltre che l'addizione di fumarato porta alla formazione di un intermedio rappresentato dall'acido 2-naftilmetilsuccinico, che successivamente viene trasformato in acido 2- naftoico da cui si arriva alla formazione di CO_2 (Fig.34).



Microcosmo A: T_0 (sopra) e T_{330} (sotto)



Microcosmo B: T_0 (sopra) e T_{330} (sotto)



Microcosmo C: T_0 (sopra) e T_{330} (sotto)

Fig.32: Cromatogrammi relativi alle tre condizioni sperimentali: Microcosmo A (Fe3+ aggiunto), B (fumarato aggiunto) e C (controllo), rispettivamente.

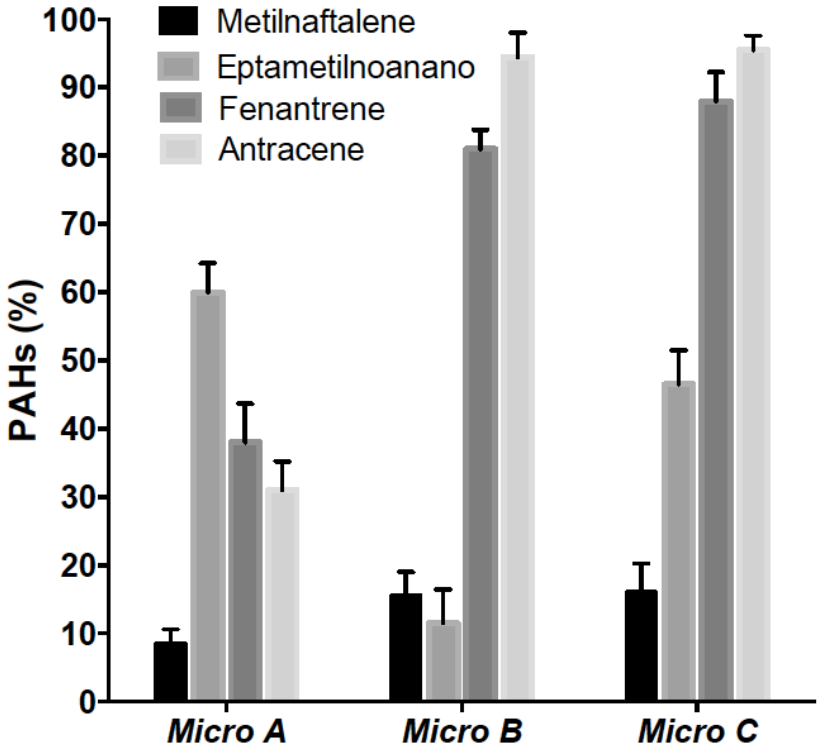


Fig 33: Quantità d'idrocarburi rimasti nei sedimenti dopo 330 giorni di incubazione, riferito ai microcosmi A (Fe^{3+}), B (Fumarato), C (controllo).

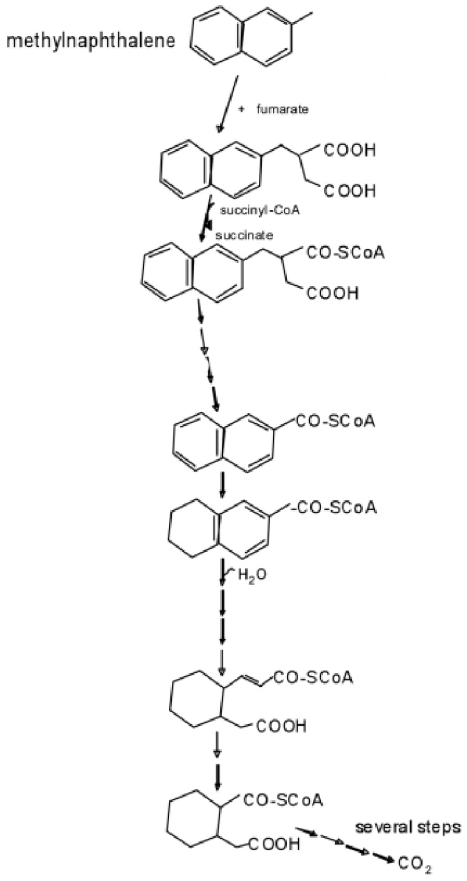


Fig 34. Meccanismi di degradazione anaerobica di metilnaftalene verificato con aggiunta di fumarato in mesocosmo B.

5.5 Dinamica comunità microbica durante la sperimentazione

Durante la sperimentazione sono state realizzate quattro librerie di cloni sul 16S rRNA per monitorare la struttura delle comunità microbiche metabolicamente attive alla fine dei trattamenti testati e nel microcosmo controllo. L'analisi della comunità microbica del sedimento all'inizio dei trattamenti è già stata commentata e corrisponde al tempo finale dell'esperimento descritto nel capitolo 4. In sintesi, la maggioranza dei cloni analizzati in libreria T_0 (Fig. 29) ha mostrato similarità verso la classe dei *Deltaproteobacteria* (90,3%). In particolare, quasi i due terzi di tutti i cloni erano strettamente correlati al microrganismo incoltivabile RII-AN044 già caratterizzato in sedimenti anossici dopo la fuoriuscita di petrolio dal Prestige (Acosta-Gonzales et al., 2013). Inoltre, più del 16% dei cloni ha mostrato una elevata percentuale di similarità (>98%) verso al ceppo *NaphS6* coinvolto nella degradazione di naftalene e 2-metilnaftalene (Wilkes et al., 2008), mentre il 10% dei cloni erano strettamente connessi al ceppo *Desulfatibacillum aliphaticivorans* capace di degradare *n*-alcani e n-alcheni in condizioni di solfato-riduzione (Cravo-Laureau et al., 2004).

A T_{330}, l'analisi della libreria del sedimento nel microcosmo C ha evidenziato che la maggioranza di cloni analizzati mostrava affinità verso il phylum dei *Tenericutes* di gruppo *Terrabacteria* (36%) seguiti dalle classi dei *Gammaproteobacteria* (15%), *Deltaproteobacteria* che subiscono una drastica diminuzione rispetto al T_0 (da 90% a 11%) e *Firmicutes* (11%) (Fig. 35). Inoltre è stata registrata la presenza del gruppo *WS6* (Dojka et al., 2000) con la percentuale dell'11%. Questo gruppo di microrganismi non è stato ancora classificato metabolicamente ma è stato già identificato in numerosi sedimenti anossici ricchi di nutrienti e composti organici.

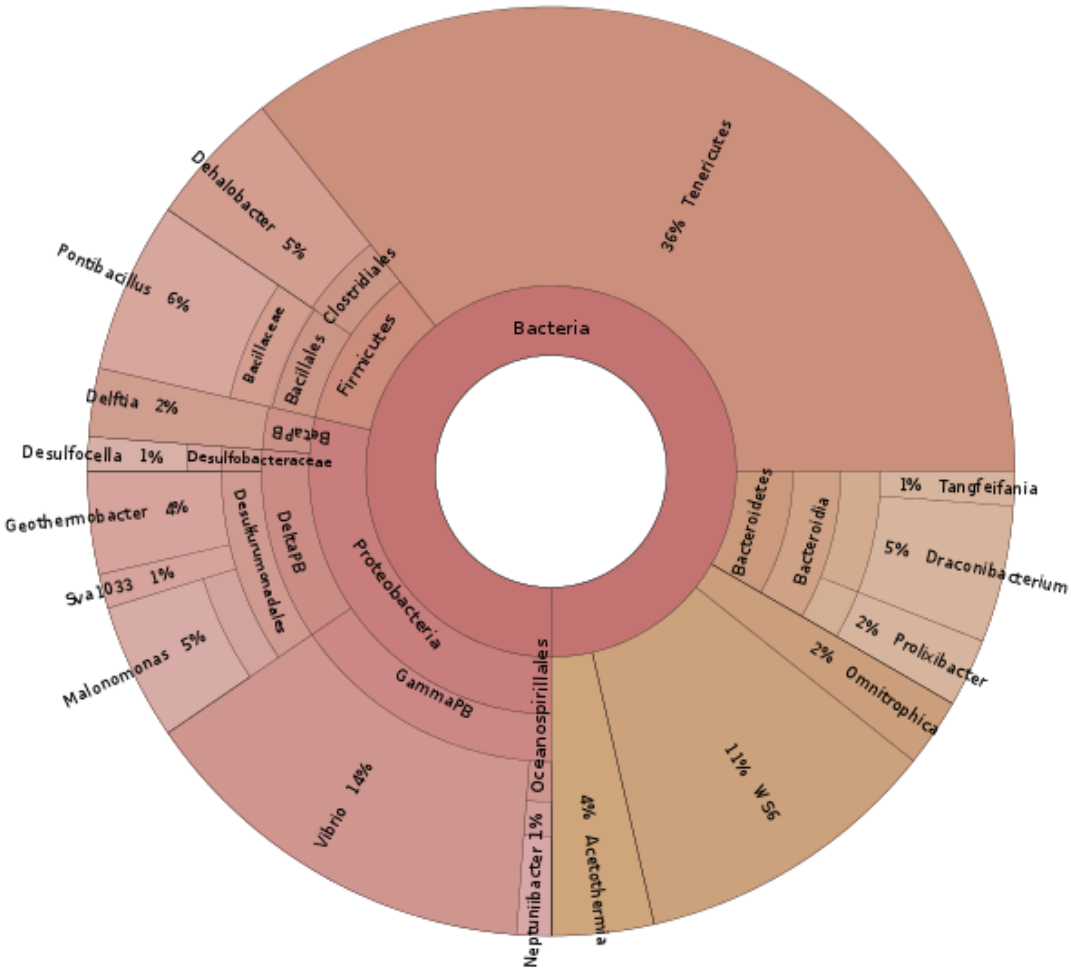


Fig.35 Struttura della comunità nei sedimenti del microcosmo C a T_{330}.

L'analisi della comunità microbica nel microcosmo A (Fig. 36), dove è stata stimolata la degradazione tramite l'aggiunta di Fe^{3+}, ha mostrato che la maggioranza dei cloni analizzati erano affiliati ai *Gammaproteobacteria* (26%) seguiti dai *Firmicutes* (19%), *Deltaproteobacteria* (11%) e *Tenericutes* (10%). La restante frazione della comunità era caratterizzata da membri affiliati a gruppi meno rappresentati come *Alphaproteobacteria* (6%), *Cyanobacteria* (6%), *Bacteroidetes* (4%), *Flavobacteria* (4%). Nel dettaglio, rispetto ai cloni affiliati alla classe *Gammaproteobacteria,* è stata osservata una significativa predominanza di cloni associati ai generi *Pseudomonas* e *Marinobacter,* rispettivamente il 11% e il 7%, già indicati da bibliografia come microrganismi coinvolti nella degradazione di composti aromatici in anaerobiosi (Chen et al., 2011; Wei et al., 2013). Anche la presenza di cloni affiliati alla classe dei *Firmicutes* (17%), individuati nella libreria del microcosmo C a T_{330}, può indicare un'effettiva attività nella degradazione di aromatici in anaerobiosi come documentato da Leemann e altri autori (2011) (Fig. 35).

L'analisi della comunità microbica associata al sedimento del microcosmo B (Fig. 37), dove è stata stimolata la degradazione tramite l'aggiunta di fumarato, dopo la sperimentazione ha mostrato un aumento dell'abbondanza relativa dei *Gammaproteobacteria* rispetto al microcosmo A, che copre il 61% della comunità microbica, seguiti *dai Tenericutes (14%).* Al contrario del microcosmo A, diminuisce la percentuale di cloni associati ai *Firmicutes* che coprono solo il 4% della popolazione. In particolare tra i *Gammaproteobacteria* presenti, più del 33% dei cloni ha mostrato similarità verso il genere *Methylophaga* mentre il 16% dei cloni è stato affiliato al genere *Cycloclasticus*. Entrambi i microrganismi sono stati indicati come membri chiave per la degradazione di composti aromatici (Vila et al., 2010; Kappell et al., 2015).

Fig.36 Struttura della comunità microbica del sedimento del Microcosmo A analizzato a tempo T_{330}.

Fig.37 Struttura della comunità microbica del sedimento del Microcosmo B analizzato a tempo T_{330}.

5.6 Analisi dei metaboliti durante la sperimentazione

Abbiamo identificato i picchi ottenuti mediante massa, relativi a ciascuno dei 15 intermedi di degradazione previsti (vedi figura 38). La tabella 7 riassume l'abbondanza del picco per ciascuno degli intermedi all'interno dei tre campioni (A,B e C). Per ciascuna misurazione sono state condotte cinque repliche tecniche. In questa fase l'identità totale dei metaboliti non può essere certa a causa del logP che non si adatta perfettamente con un tempo di ritenzione e una bassa percentuale di probabilità di identificazione per alcuni picchi, per questo indagini MS/MS andrebbero effettuate. Inoltre, alcuni intermedi hanno la stessa formula e massa mono-isotopica così da non rendere i picchi distinguibili. L'assenza di specifici picchi per gli intermedi

6/9 (entrambi con la stessa formula e massa) e 12, suggerisce molto probabilmente che tutti questi intermedi non sono prodotti di degradazione.

Tabella 7. La lista di 15 intermedi di degradazione previsti di antracene, fenantrene (Lista 1) e eptametilnonano (Lista2con sue masse monoisotopiche.

Compound	List	Formula	Monoisotopic Mass	LC-MS polarity	A average	B average	C average
1	List 1	C15H10O2	222	+	48190	46221	49727
2	List 1	C15H10O2					
3	List 1	C15H12O2	224	+	11135	5646	13426
7	List 1	C15H12O2					
4	List 1	C15H18O2	230	+	2530	1848	1171
8	List 1	C15H18O2					
6	List 1	C15H20O2	232	±	ND*	ND	ND
9	List 1	C15H20O2					
5	List 1	C15H24O2	236	+	46703	43695	46944
13	List 2	C19H36O2	296	+	2473	1383	7736
12	List 2	C19H38O2	298	±	ND	ND	ND
15	List 2	C19H36O3	312	+	82538	71970	50170
14	List 2	C19H38O3	314	-	7168	4505	6635
10	List 2	C20H38O4	342	-	17798	17693	15407
11	List 2	C20H38O4					

* Not determined

D'altra parte, potrebbero essere presenti gli intermedi di degradazione di fenantrene e antracene 1/2 (entrambi con la stessa formula e massa), 3/7 (con stessa formula e massa), 4/8 (con stessa formula e massa) e 5. Riguardo gli intermedi della degradazione di alcani potrebbero invece essere presenti 10/11 (con stessa formula e massa) 13, 14 e 15. È inoltre evidente che in alcuni casi a causa della bassa specificità non è possibile distinguere molecole con le stesse masse. Ovviamente, sarà necessario condurre ulteriori indagini per la loro identificazione attraverso la frammentazione delle molecole ed effettuando analisi MS/MS, anche se alcuni degli intermedi sono difficilmente frammentabili.

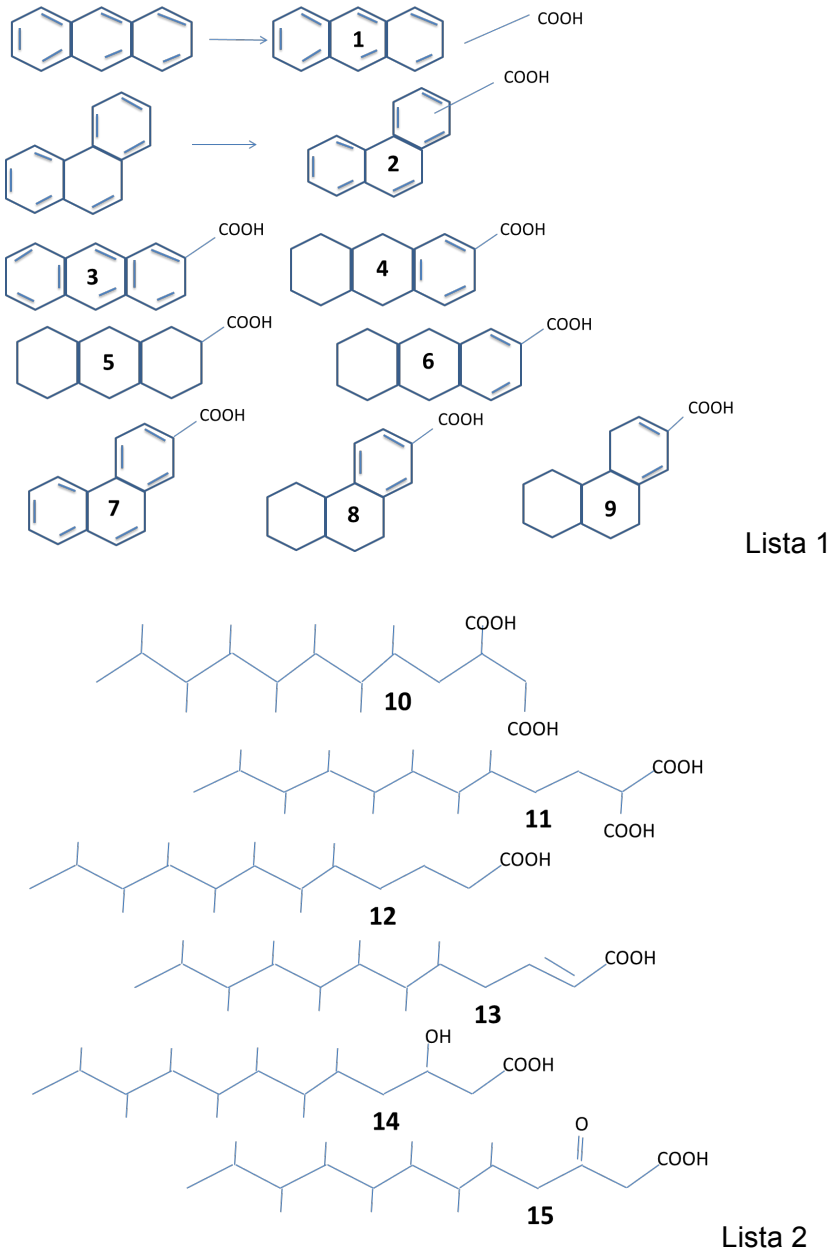


Fig. 38 La lista di 15 intermedi di degradazione previsti di antracene, fenantrene (Lista 1) e eptametilnonano (Lista2).

5.7 CONCLUSIONI

Le informazioni acquisite finora sulla degradazione anaerobica di idrocarburi policiclici aromatici nei sedimenti marini dimostra definitivamente che almeno alcuni idrocarburi policiclici aromatici possono essere utilizzati come unica fonte di carbonio ed energia in condizioni solfato-, ferro-, e fumarato-riducenti. Non è chiaro se tre o più anelli IPA sono utilizzati come substrati di crescita o sono solo co-metabolizzati. Tuttavia, la spiegazione delle prime vie di degradazione di naftalene, metilnaftalene e fenanatrene, e l'identificazione di metaboliti associati importanti, hanno fornito la base per identificare la presenza di biodegradazione di IPA *in situ* in ambienti naturali come sedimenti marini contaminati.

Rimane la necessità di studiare le potenzialità e le caratteristiche dei singoli ceppi isolati in coltura pura e quindi intensificare gli sforzi per metodi e tecnologie per la coltivazione anaerobica dei microrganismi. Inoltre, una nuova sfida per la ricerca futura è probabilmente quella di individuare i limiti di biodegradazione in ambienti marini contaminati. Certamente la comprensione delle vie metaboliche adattate alle condizioni di anossia può fornire nuove informazioni utili a migliorare notevolmente biorisanamento o valutazione del rischio delle aree marine costiere in futuro.

5.8 BIBLIOGRAFIA

Acosta-González, A., Rosselló-Móra R., and Marqués S. (2013) Characterization of the anaerobic microbial community in oil-polluted subtidal sediments: aromatic biodegradation potential after the Prestige oil spill. *Environmental Microbiology* **15**: 77-92.

Cravo-Laureau, C., Matheron, R., Joulian, C., Cayol, J.L., and Hirschler-Réa, A. (2004) *Desulfatibacillum alkenivorans* sp. nov., a novel n-alkene-degrading, sulfate-reducing bacterium, and emended description of the genus *Desulfatibacillum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 1639-1642.

Dojka, M.A., Harris, J.K., and Pace, N.R. (2000) Expanding the known diversity and environmental distribution of an uncultured phylogenetic division of bacteria. *Applied Environmental Microbiology* **66**: 1617-1621.

Vila, Joaquim, et al. (2010). Microbial community structure of a heavy fuel oil-degrading marine consortium: linking microbial dynamics with polycyclic aromatic hydrocarbon utilization. FEMS microbiology ecology **73.2** 349-362.

Vila, J., Nieto, J.M., Mertens, J., Springael, D. and Grifoll, M., (2010) Microbial community structure of a heavy fuel oil-degrading marine consortium: linking microbial dynamics with polycyclic aromatic hydrocarbon utilization. *FEMS Microbiology Ecology* **73**: 349-362.

Kappell, A.D., Wei, Y., Newton, R.J., Van Nostrand, J.D., Zhou, J., McLellan, S.L. and Hristova, K.R. (2015) The polycyclic aromatic hydrocarbon degradation potential of Gulf of Mexico native coastal microbial communities after the Deepwater Horizon oil spill. *The metabolic pathways and environmental controls of hydrocarbon biodegradation in marine ecosystems*, p.56.

6. CONCLUSIONI GENERALI

Come conclusione generale di questa tesi, possiamo affermare che tutti gli obiettivi dello studio, evidenziati nell'outline del lavoro (pagina 29, Fig. 9), sono stati raggiunti con successo. I nostri studi, hanno mostrato ***per la prima volta*** che i sedimenti marini anaerobici contaminati da petrolio e IPA potrebbero essere efficacemente recuperati *in situ* attraverso la stimolazione della loro capacità di self-cleaning grazie alla presenza di batteri idrocarburoclastici.

Sulla base dei nostri risultati, il lavoro svolto descrive in dettaglio ***per la prima volta***:

- la successione della comunità microbica bentonica del Mar Mediterraneo in seguito ad un reale sversamento da idrocarburi. Oltre all'evoluzione della contaminazione del petrolio, la dinamica della comunità microbica è stata monitorata per sei mesi;

- la successione della comunità microbica bentonica del Mar Mediterraneo in seguito alla contaminazione con idrocarburi policiclici aromatici a 2-3 anelli benzenici fusi;

- la stimolazione e accelerazione del potenziale di biodegradazione di IPA nella comunità microbica anaerobica indigena attraverso la creazione di condizioni energeticamente favorevoli in sedimenti marini (ossigenazione, aggiunta di ferro ferrico o fumarato) paragonati alla solfato riduzione che è nota per avere un basso potenziale.

Infine, siamo assolutamente certi che tutti i risultati descritti in questa tesi saranno al più presto pubblicati su riviste con significativo Impact Factor.

7. RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato finanziato dai progetti della comunità europea ULIXES (FP7-KBBE-2010-4 Project 266473 "*Unravelling and exploiting Mediterranean Sea microbial diversity and ecology for xenobiotics' and pollutants' clean-up*") e KILL-SPILL (FP7-KBBE-2012.3.5-01-4 Project 312139 "*Integrated Biotechnological Solutions for Combating Marine Oil Spills*").

Al termine di questi "lunghi" e "faticosi" 3 anni desidero ringraziare tutte le persone che a vario titolo mi hanno accompagnato in questo percorso e senza le quali questo lavoro di tesi non sarebbe stato possibile realizzare. Ovviamente le persone di seguito riportate non saranno riportate in ordine di importanza.

Desidero ringraziare il Professore Salvatore Cuzzocrea coordinatore del dottorato in Biologia Applicata e Medicina Sperimentale

Il Professore Emilio De Domenico per avermi assistito in questo mio percorso e per aver accettato il ruolo di Relatore di questo lavoro.

Un ringraziamento per il Dottore Michail Yakimov (responsabile scientifico del laboratorio di Marine Molecular Microbiology and Biotecnology) per avermi accettato nel suo gruppo di lavoro e per aver accettato successivamente il ruolo di Tutor di questa tesi. (Scusami per tutto quello che ti ho fatto passare in questi 3 anni).

Ringrazio la Dottoressa Lucrezia Genovese in qualità di responsabile dell'U.O.S. del CNR-IAMC per avermi ospitato nei laboratori del suddetto istituto.

Vorrei inoltre ringraziare tutti i partner dei progetti coinvolti nelle analisi dei metaboliti e in altri studi descritti nella tesi.

Un ringraziamento speciale va alla Dott.ssa Renata Denaro e alla Dott.ssa Francesca Crisafi per il loro inestimabile aiuto nella definizione del disegno sperimentale e discussione dei risultati che hanno portato alla stesura del lavoro siete state veramente fondamentali e il vostro aiuto in un momento particolare come questo non verrà da me mai dimenticato. GRAZIEEEE.

Grazie a tutti i ragazzi che in questi anni hanno condiviso con me il laboratorio facendo di esso un ambiente familiare e piacevole in cui passare le giornate lavorative: Francesco, Nello, Enzo, Violetta; Gino, Erika, Gina, Daniela, Mariella, Simone e Sanny spero di non essermi dimenticato nessuno.

Un particolare ringraziamento:

A mia moglie Erika con cui in questi anni di dottorato ho costruito una “Favola” prima rendendomi il marito di una moglie eccezionale e per aver coronato il sogno della mia vita regalandomi una fantastica bambina di nome Lucrezia.

A mia Mamma per essermi stata sempre accanto e a mia sorella Stefania senza la quale non avrei potuto affrontare questo percorso, in parte questo dottorato è anche TUO. Grazie!!

E infine ma non per ultimo per ordine di importanza un ringraziamento particolare ad una persona che ha sempre creduto in me e creduto in questo dottorato……mi dispiace non averti reso partecipe fisicamente di questo percorso ma so che sarai da qualche parte che orgogliosamente mi guarderai….GRAZIE PAPA’ sarai sempre nel mio cuore.

Grazie a chiunque leggerà questa tesi.