

Soluzioni microbiologiche per la bonifica di sedimenti contaminati

Edoardo Puglisi, *PhD*

Facoltà di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali

Università Cattolica del Sacro Cuore

Piacenza, Italy

edoardo.puglisi@unicatt.it

“Risanamento delle aree lacuali all’interno di siti contaminati”. Mantova, 17 Ottobre 2018



- I **servizi ecosistemici** sono i benefici multipli forniti dagli ecosistemi al genere umano. Li distinguiamo in:
 - **Servizi di approvvigionamento:** forniscono beni quali cibo, acqua, legname, fibre
 - **Servizi di regolazione:** regolano il clima e le precipitazioni, i cicli idrici, i rifiuti
 - **Servizi culturali:** relativi alla bellezza, all'ispirazione ed allo svago che contribuiscono al nostro benessere spirituale
 - **Servizi di supporto:** formazione del suolo, fotosintesi, cicli nutritivi



SEDIMENTI E SERVIZI ECOSISTEMICI



Table 1 - Examples of ecosystem services potentially provided by the broad ecosystem types ⁵⁴

Category	TYPE OF SERVICE	ECOSYSTEM TYPE					
		Rivers	Riparian Zones ⁵⁵	Wet-lands	Lakes	Estuaries	Ground-water
PROVISIONING	Food (e.g. fish, game, fruit)	X	X	X	X	X	
	Water (e.g. for drinking, irrigation, cooling)	X	X	X	X	X	X
	Raw Materials (e.g. fibre, timber, fuelwood, fodder, fertilizer)	X	X	X			
	Genetic resources (e.g. for crop-improvement and medicinal purposes)	X	X	X	X	X	
	Medicinal resources (e.g. biochemical products, models and test-organisms)	X	X	X	X	X	
REGULATING	Air quality regulation (e.g. capturing (fine) dust, chemicals, etc.)	X	X	X	X	X	
	Climate regulation (incl. C-sequestration, influence of vegetation on rainfall)		X	X	X		
	Moderation of extreme events (eg. storm protection and flood prevention)	X	X	X	X	X	
	Regulation of water flows (e.g. natural drainage, irrigation and drought prevention)	X	X	X	X	X	X
	Wastewater treatment (especially water purification)	X	X	X	X	X	
	Erosion prevention		X	X		X	
	Maintenance of soil fertility (incl. soil formation)	X	X	X			
	Pollination		X	X	X	X	
	Biological control (e.g. seed dispersal, pest and disease control)	X	X	X	X	X	
	HABITAT	Maintenance of life cycles of species (incl. nursery service)	X	X	X	X	X
Maintenance of genetic diversity (especially in gene pool protection)		X	X	X	X	X	X
CULTURAL	Recreation and mental and physical health	X	X	X	X	X	X
	Tourism	X	X	X	X	X	X
	Aesthetic appreciation and inspiration for culture, art and design	X	X	X	X	X	
	Spiritual experience and sense of place	X	X	X	X	X	X

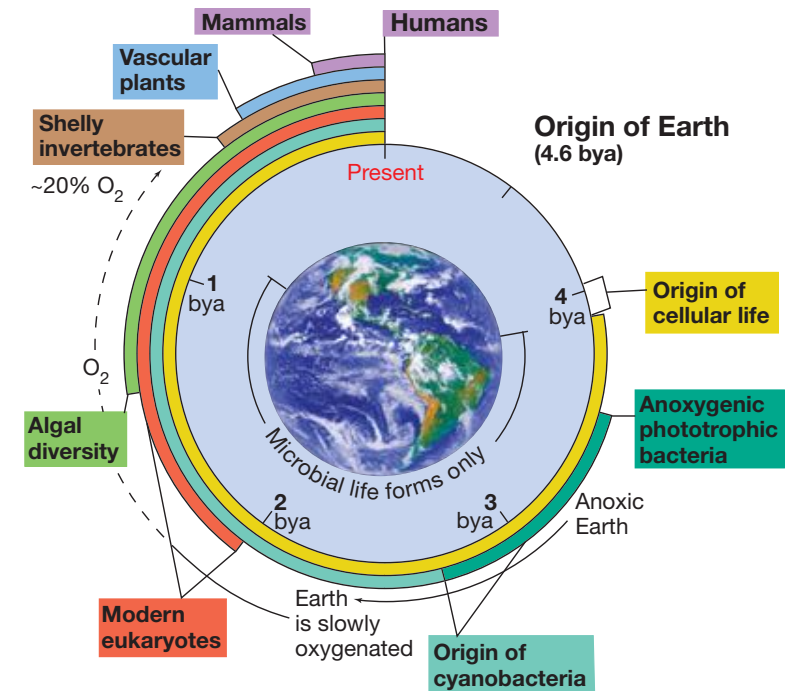


Servizi ecosistemici dei laghi garantiti dalla presenza ed attività dei microrganismi

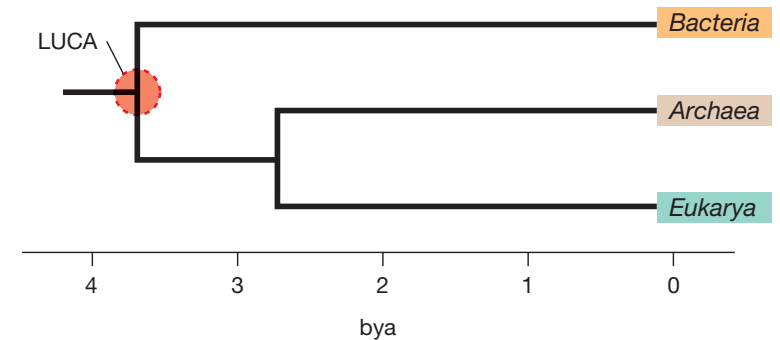


PERCHE' I MICROORGANISMI?

- Più antichi organismi sulla Terra
- Alto rapporto superficie/volume
- La più alta biodiversità
- Unicellulari, piccoli, semplici ma estremamente versatili (“small but not stupid”)
- Costante, interminabile adattamento a nuove condizioni (xenobiosi come condizione temporanea)
- Tutti i possibili metabolismi sono rappresentati nel mondo microbico, inclusi i metabolismi degradativi degli inquinanti

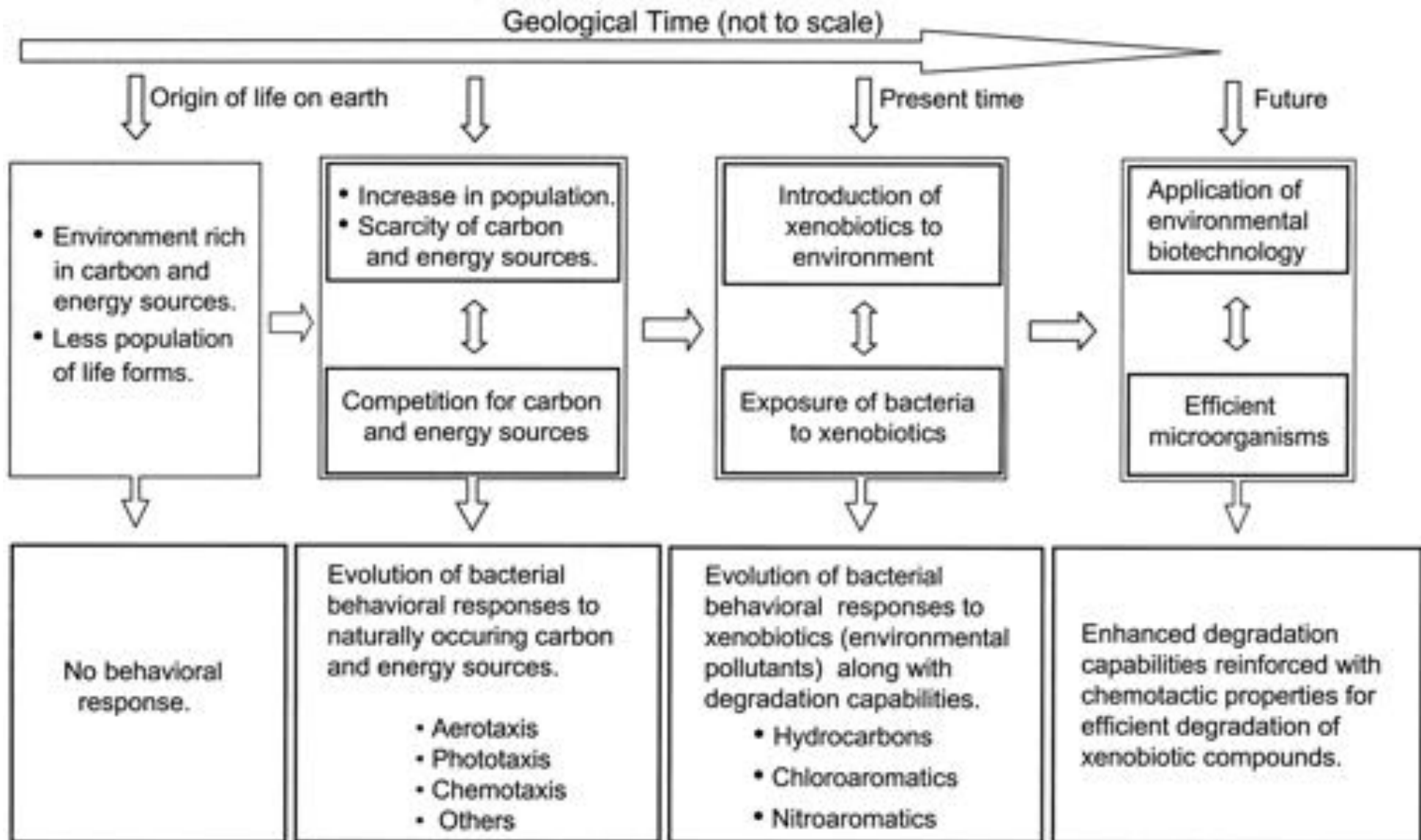


(a)





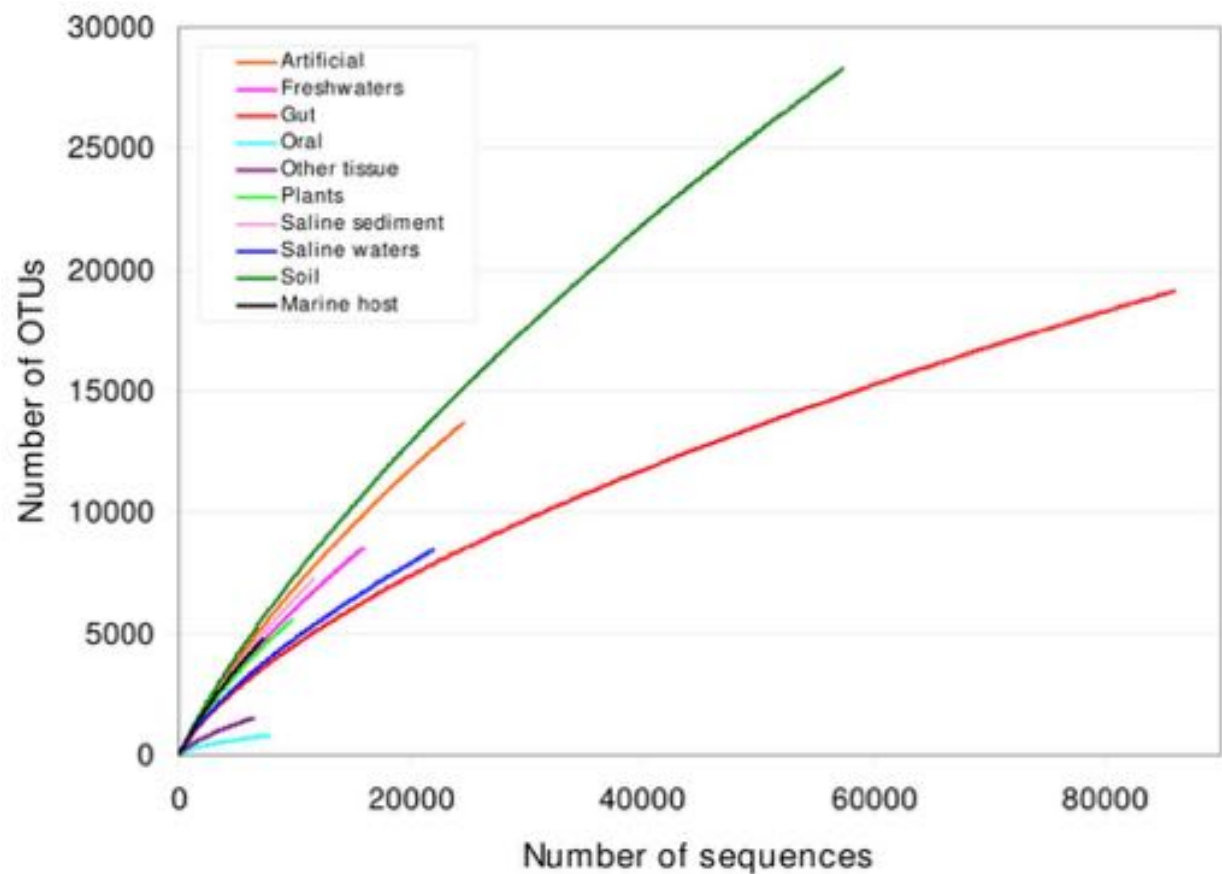
XENOBIOTICI E MICROORGANISMI





Processi che dipendono dall'attività dei microorganismi:

- Decomposizione della sostanza organica
- Riciclo e rilascio dei nutrienti
- Fissazione di azoto e gas serra
- Degradazione e mitigazione degli inquinanti
- Struttura dei sedimenti
- Qualità delle acque
- Emissione e stoccaggio di gas serra



➡ sino ed oltre milioni di cellule per grammo, appartenenti a decine di migliaia di specie



Table 2
Cost [\$] per m³ of remediated sediment treated by dredging, capping and bioremediation.

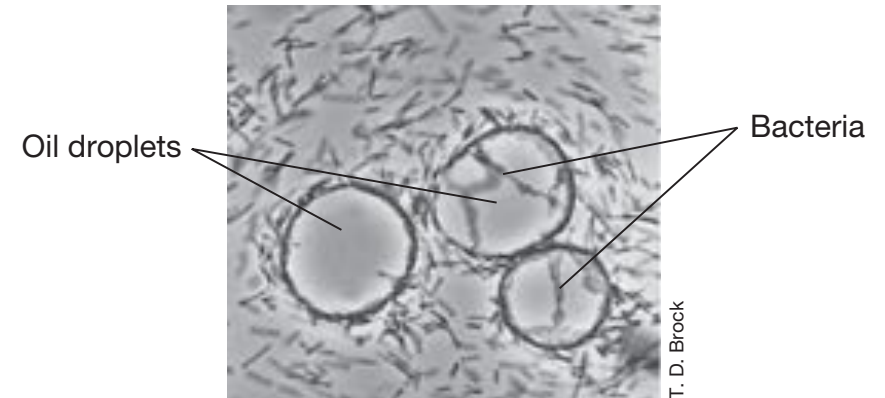
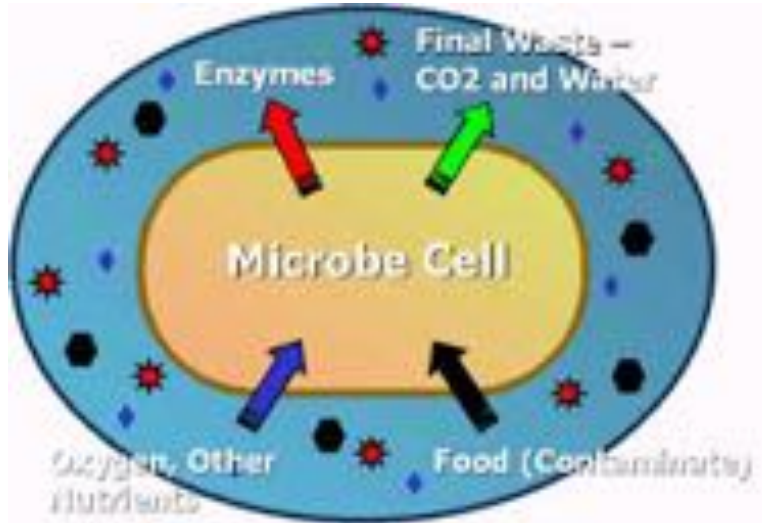
Site	Technique	Area [m ²]	Pollutant	Cost [\$]	Material	Cost [\$] per m ³
Thunder Bay ^a	Dredging	13,000	Creosote	9,300,000		715.00
St. Louis River ^a	Dredging	1892	Murphy oil	250,000		132.00
Manistique River ^a	Dredging	44,100	PCB	25,000,000		567.00
Kalamazoo River ^a	Dredging	3700	PAH, mercury, lead	900,000		243.00
Shiawassee River ^a	Dredging	35,600	PCB	13,558,000		381.00
River Raisin ^a	Dredging	20,000	PCB	6,000,000		300.00
Maumee River ^a	Dredging	6100	PCB	5,000,000		820.00
St Clair River ^a	Dredging	200	Pentachlorophenol	350,000		1750.00
Niagara River ^a	Dredging	13,000	Dioxin	14,000,000		1077.00
Minamata Bay, Japan ^b	Capping	582,000		388,000,000	1.5 mio m ³ of clean sediment	667.00
Little Lake Butte des Morts ^b	Capping	170,000		7,565,000	Two 30-cm layers of fill and cobbles and two geotextile layers	44.50
New Bedford Harbor ^b	Capping	760,000		32,832,000	1-m layer of sand on top of a geotextile	43.20
Hamilton Harbor ^{a, b}	Capping	10,000	Heavy metals, PCB, PAH	650,000	50-cm layer of sand	65.00
Hamilton Harbor ^{a, b}	Bioremediation	414,103		323,000	Injection of oxygen, iron oxide, calcium nitrate	0.78



- **Bioremediation:** degradazione dei contaminanti ambientali tramite metodi biologici che sfruttano il potenziale metabolico di microorganismi o piante capaci di degradare diversi inquinanti organici
 - **Attenuazione naturale:** sfrutta la innata capacità degli organismi autoctoni, in combinazione con processi chimici e fisici
 - **Biostimolazione:** l'attività dei microorganismi degradanti autoctoni viene stimolata agendo sulle condizioni ambientali (e.g., rapporto C/N, elettrostimolazione)
 - **Bioaugmentazione:** ceppi con alta efficienza degradativa vengono selezionati ed introdotti in alte dosi
 - **Fitorimedia:** utilizzo di piante ed alghe in grado di degradare e/o rimuovere gli inquinanti



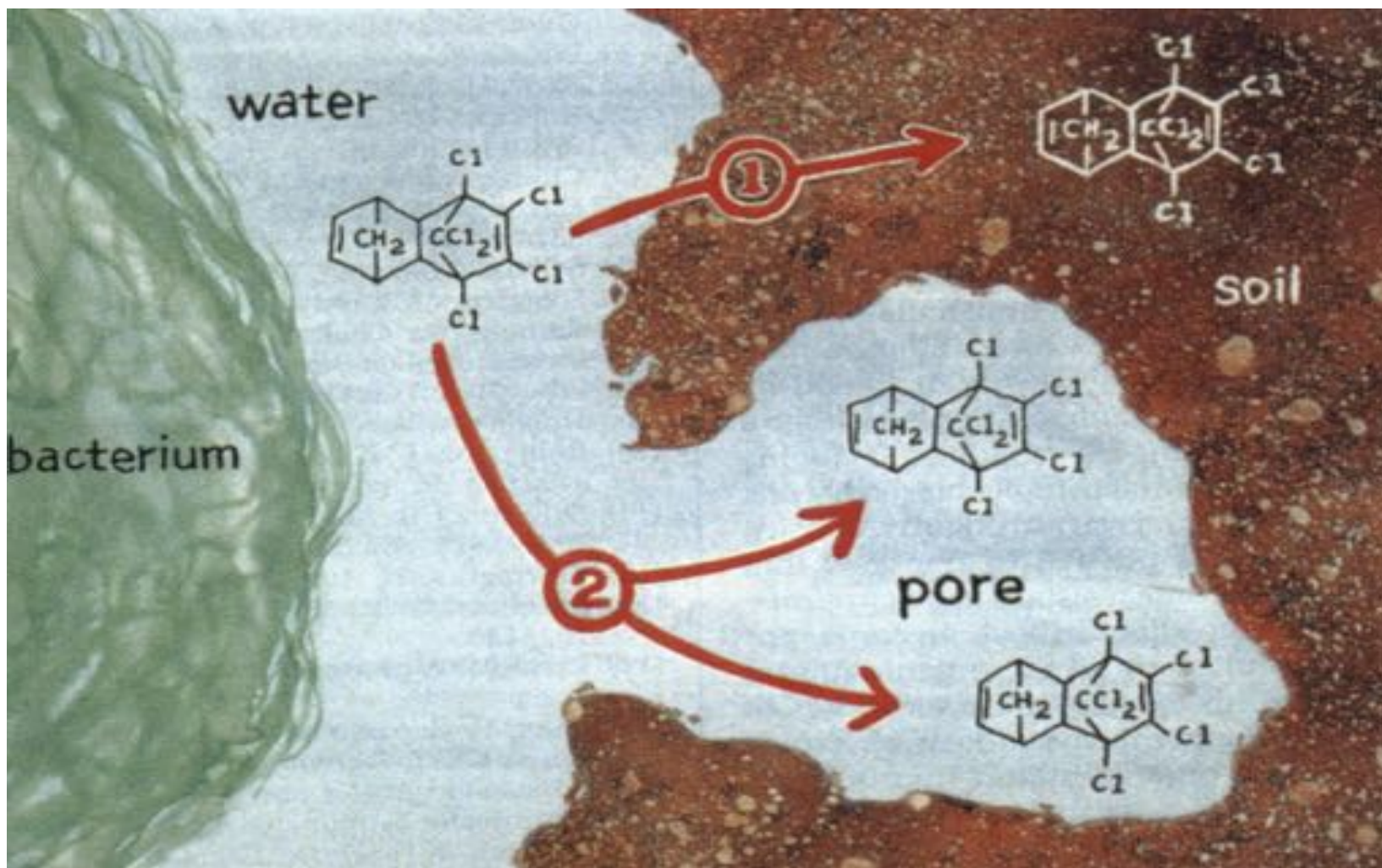
BATTERI E BIOREMEDIATION



- **Xenobiotico:** una sostanza chimica estranea agli organismi viventi
- **Mineralizzazione:** gli inquinanti sono usati come sorgente di C e totalmente metabolizzati a CO₂
- **Co-metabolismo:** I contaminanti sono trasformati in intermedi, possibilmente meno tossici
- **Immobilizzazione / mobilizzazione:** agire sulla biodisponibilità degli inquinanti, tramite substrati adsorbenti o molecole biosurfattanti



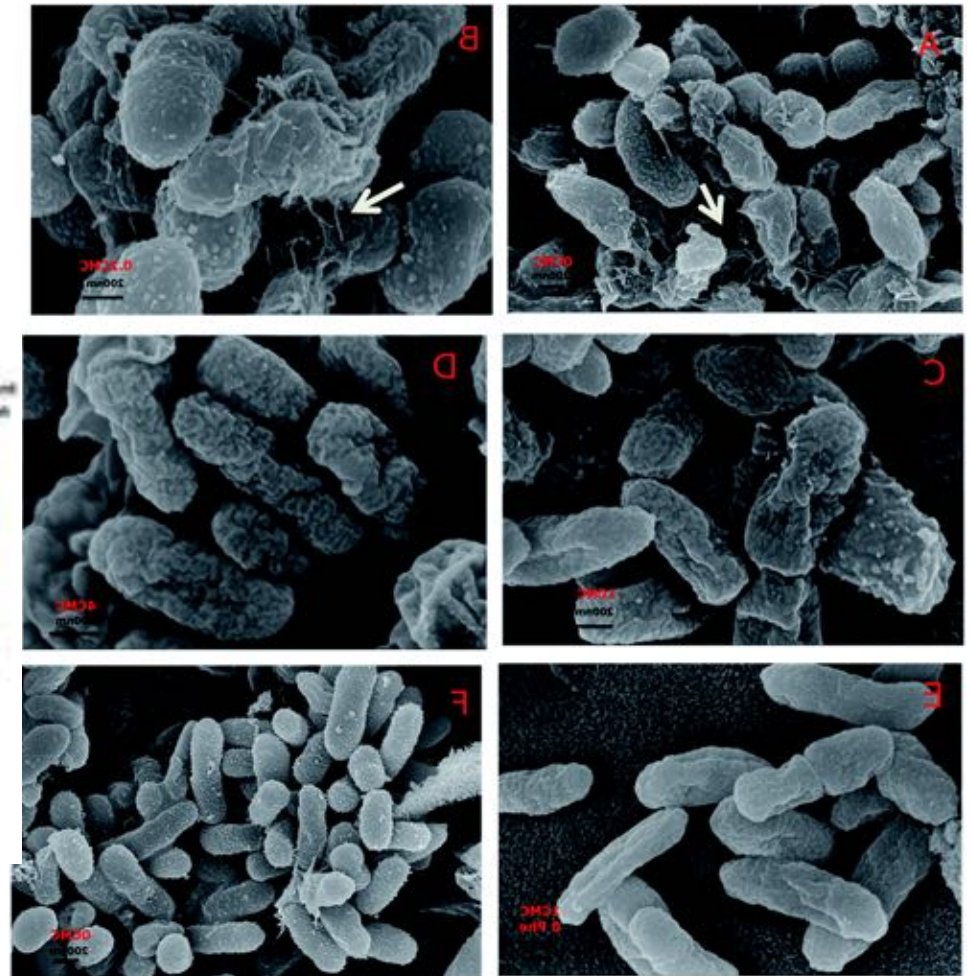
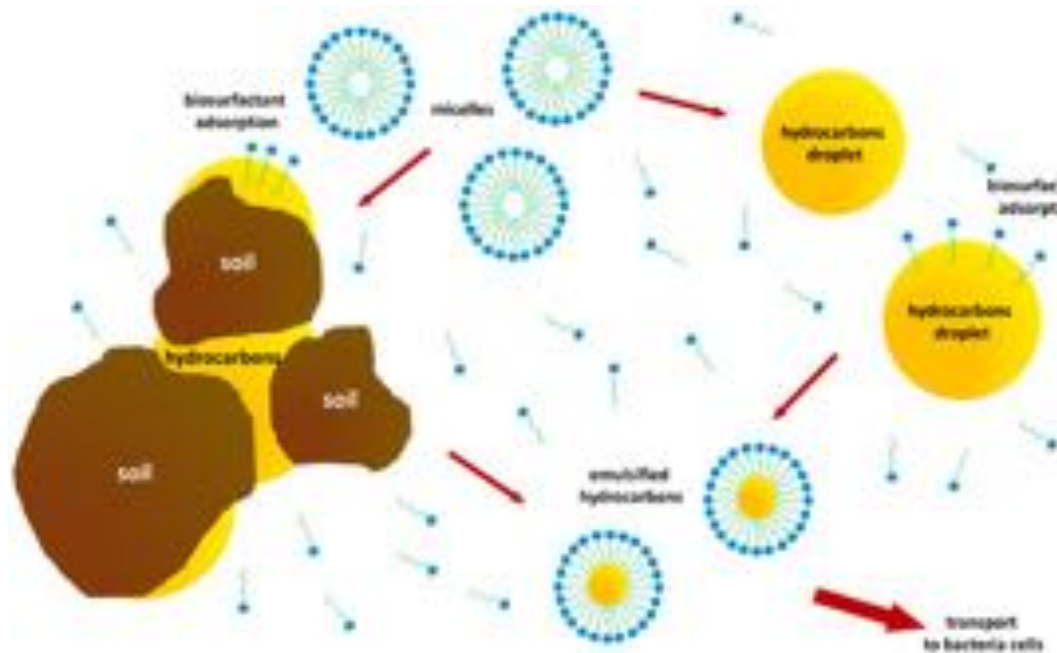
BIODISPONIBILITA' ED INQUINANTI



Reid, B.J., Jones, K.C., Semple, K.T. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments-a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environmental Pollution* **2000a**, *108*, 103-112.



BIODISPONIBILITÀ E BIOSURFATTANTI





- Indipendentemente dalla tecnica selezionata (*in situ* o *ex situ*, biostimolazione o bioaugmentazione), l'approccio microbiologico è imprescindibile al fine di:
 - valutare preliminarmente il potenziale di bioremediation (quanti, quali MO presenti e potenzialmente efficaci)
 - selezionare i ceppi migliori per una eventuale bioaugmentazione
 - monitorare la presenza e l'attività dei MO degradanti durante il processo
 - sfruttare eventualmente attività biosurfattanti (vedasi biodisponibilità e limiti di legge)
 - valutare l'efficacia dell'intervento in termini di ripristino dell'ecologia microbica e delle relative funzioni ecosistemiche



Table 1
Degrading activity of some simple bacteria, and in mixture [1,12].

Organism	PAH degradation (%), standard deviation it is $\leq 3\%$				
	Naphthalene	Acenaphthene	Fluorene	Anthracene	Pyrene
<i>Pseudomonas</i> sp.	15.5	28.0	24.4	25.4	92.3
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	12.0	7.0	17.6	15.6	4.4
<i>Coriolus versicolor</i>	27.4	2.0	23.0	22.4	42.0
<i>Pleurotus ostreatus</i>	29.4	20.6	20.6	19.0	32.0
<i>Fomitopsis pelustris</i>	19.5	7.5	7.0	31.7	7.3
<i>Daedalea elegans</i>	35.8	5.9	5.9	2.4	26.1
<i>Pycnoporus sanguineus</i> mixed with <i>Pseudomonas</i> sp.	13.5	29	24.2	11.4	17.4
<i>Coriolus versicolor</i> mixed with <i>Pseudomonas</i> sp.	15.5	27	24	25.0	93.7
<i>Pleurotus ostreatus</i> mixed with <i>Pseudomonas</i> sp.	13	25	19	20.0	17.0
<i>Fomitopsis pelustris</i> mixed with <i>Pseudomonas</i> sp.	13.1	16.3	16.3	12.0	93.7
<i>Daedalea elegans</i> mixed with <i>Pseudomonas</i> sp.	23	14.9	14.9	3.4	46.4
Aerated soil at 40% WHC in presence of <i>Sphingomonas</i> and <i>Azospirillum</i>		100	100	84	87
Aerated soil at 40% WHC; KNO_3 and K_2HPO_4 in presence of <i>Sphingomonas</i> and <i>Azospirillum</i>		100	100	81	90
Aerated soil at 40% WHC; nutrients: biosurfactant MAT10		100	100	79	90
Aerated soil at 40% WHC; nutrients: ferric ion added as ferric octoate		100	100	87	88



EVIDENZE E DOMANDE APERTE

- I microorganismi possono essere utilissimi alleati per le bonifiche ambientali. Dobbiamo però affrontare alcune domande:
 - Come possiamo individuare e trovare i migliori degradanti ?
 - Quali metodi per selezionarli ?
 - Come produrli su larga scala ?
 - Come fare con i composti più recalcitranti ?





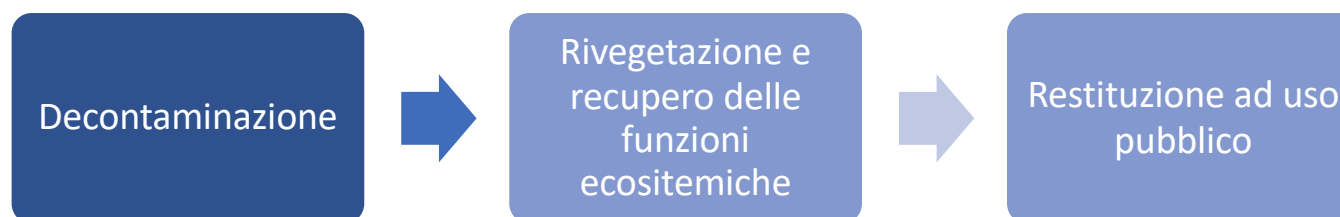
UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore

IL PROGETTO LIFE-BIOREST: ISOLAMENTO, SELEZIONE ED APPLICAZIONE DI MICROORGANISMI PER LA BIOREMEDIATION DA PETROLIO



IL PROGETTO EUROPEO LIFE-BIOREST

LIFE BIOREST sta implementando un approccio biologico per la bonifica in situ di suoli contaminati da idrocarburi



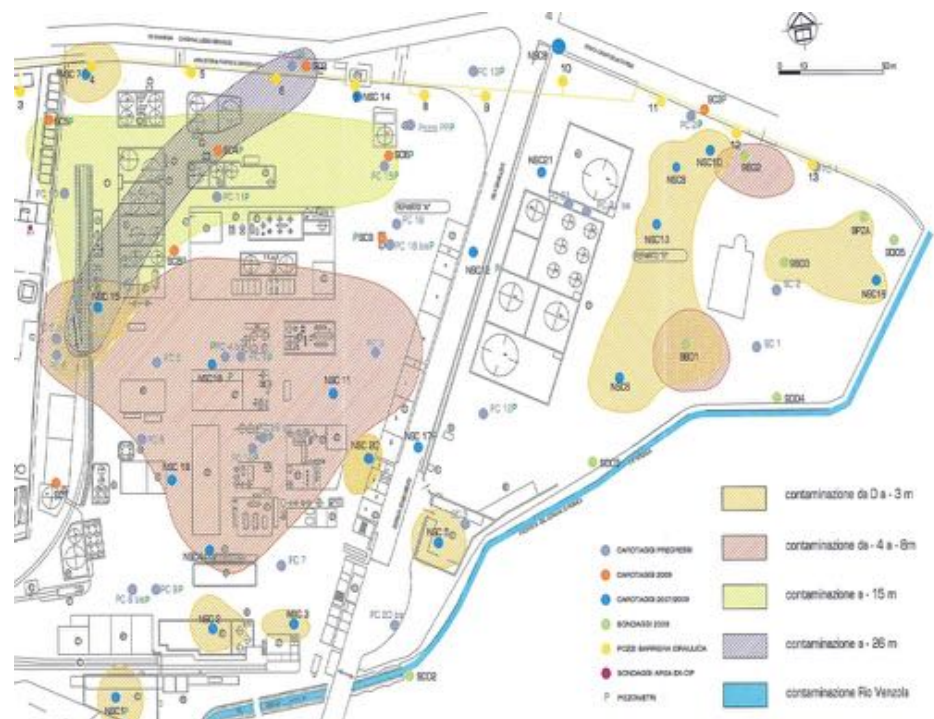
1. Dimostrare l'efficienza di un approccio di biorisanamento per suoli inquinati basato sulla BIOAUGMENTATION con BATTERI e FUNGHI autoctoni, adattati ecologicamente
2. Dimostrare la fattibilità di SCALARE la produzione di microrganismi attivi nel biorisanamento.
3. Sviluppare protocolli e LINEE GUIDA PER IL BIORIMEDIO che possono essere applicati con successo in altri scenari.
4. Diffondere a livello europeo i chiari vantaggi sociali di affrontare il problema della CONTAMINAZIONE.



LIFE-BIOREST TEST SITE

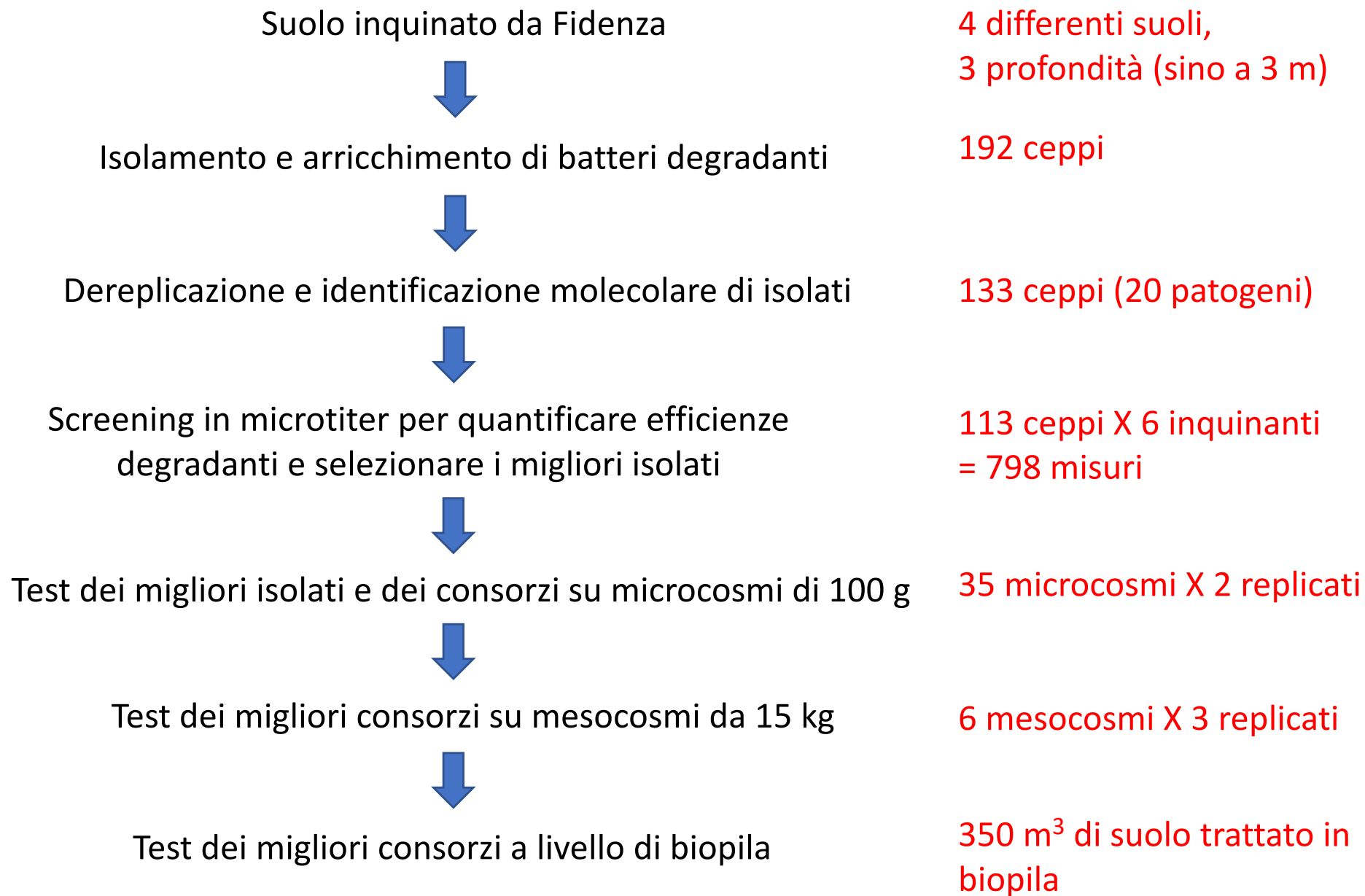
Fidenza, Emilia Romagna

Sito di interesse nazionale ex-Carbochimica ed ex-CIP, Fidenza



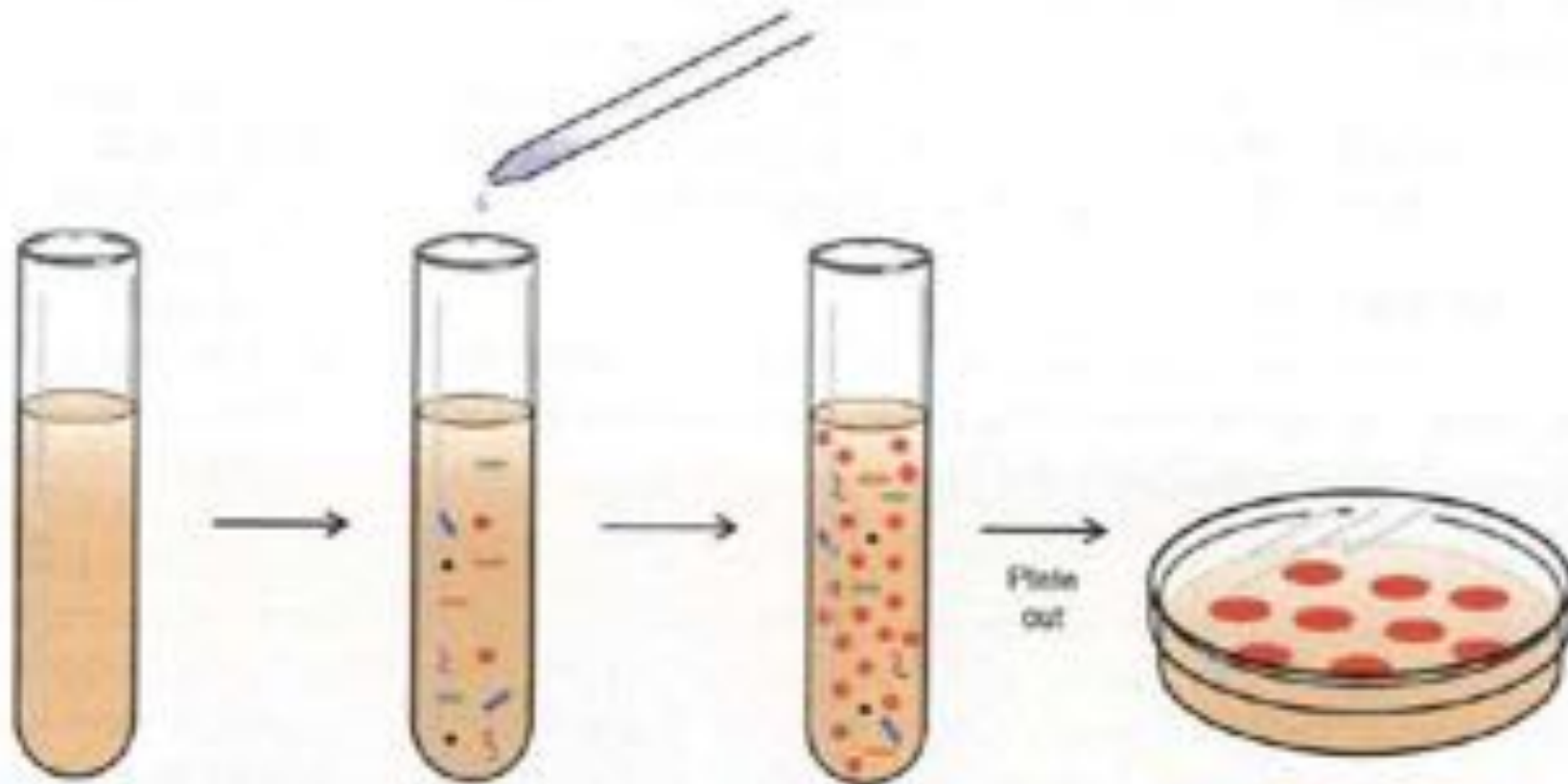


LIFE-BIOREST: NUMERI E SCHEMI





METODI CULTURALI: ARRICCHIMENTI



Medium contains select nutrient sources chosen because few bacteria, other than the organism of interest, can use them.

Sample that contains a wide variety of organisms, including the organism of interest, is added to the medium.

Organism of interest can multiply, whereas most others cannot.

Enriched sample is plated onto appropriate agar medium. A pure culture is obtained by selecting a single colony of the organism of interest.



METODI CULTURALI: ARRICCHIMENTI

10g suolo contaminato + terreno minerale (M9) contenente inquinanti come sola sorgente di C

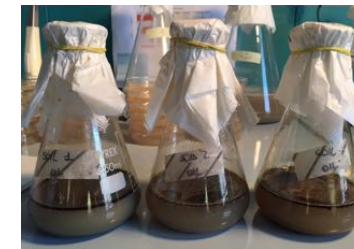
BENZENE



PARAFFIN OIL



CRUDE OIL



Tre sottocolture di arricchimento consecutive eseguite nelle stesse condizioni



28 isolati



55 isoalti



9 isolati



ARRICCHIMENTI

BENZENE



28 bacterial isolates

PARAFFIN OIL

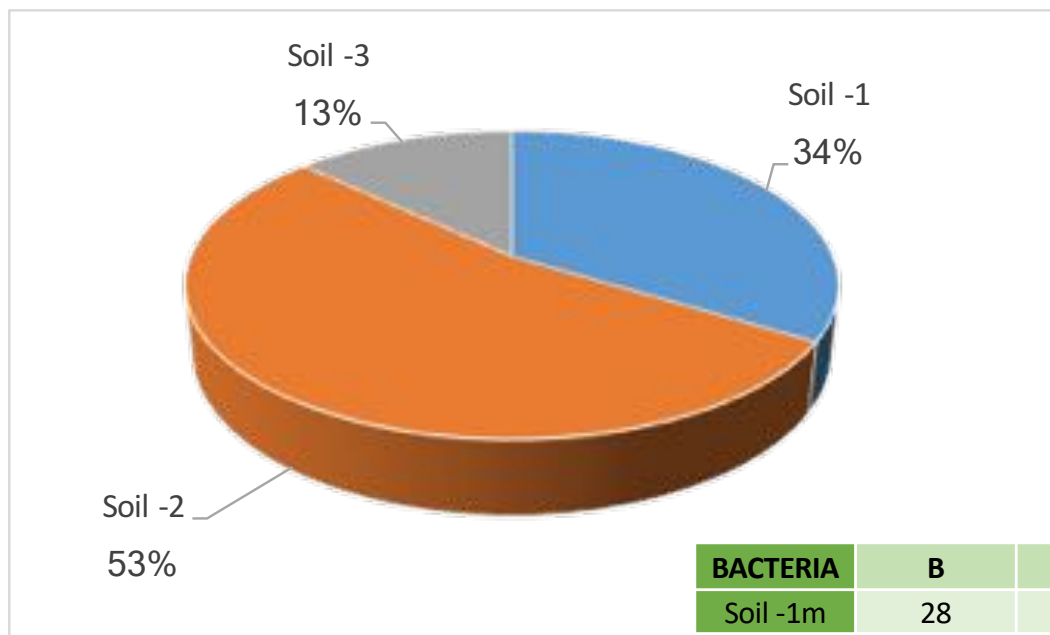


55 bacterial isolates

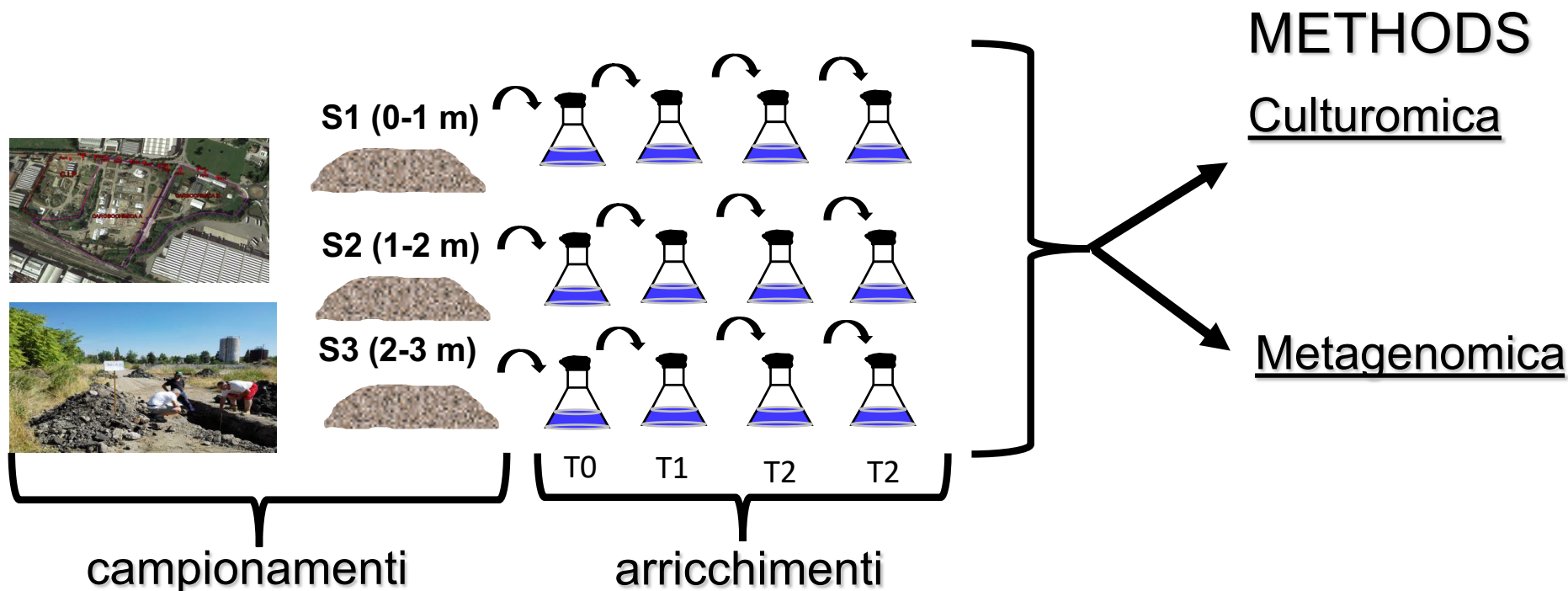
CRUDE OIL



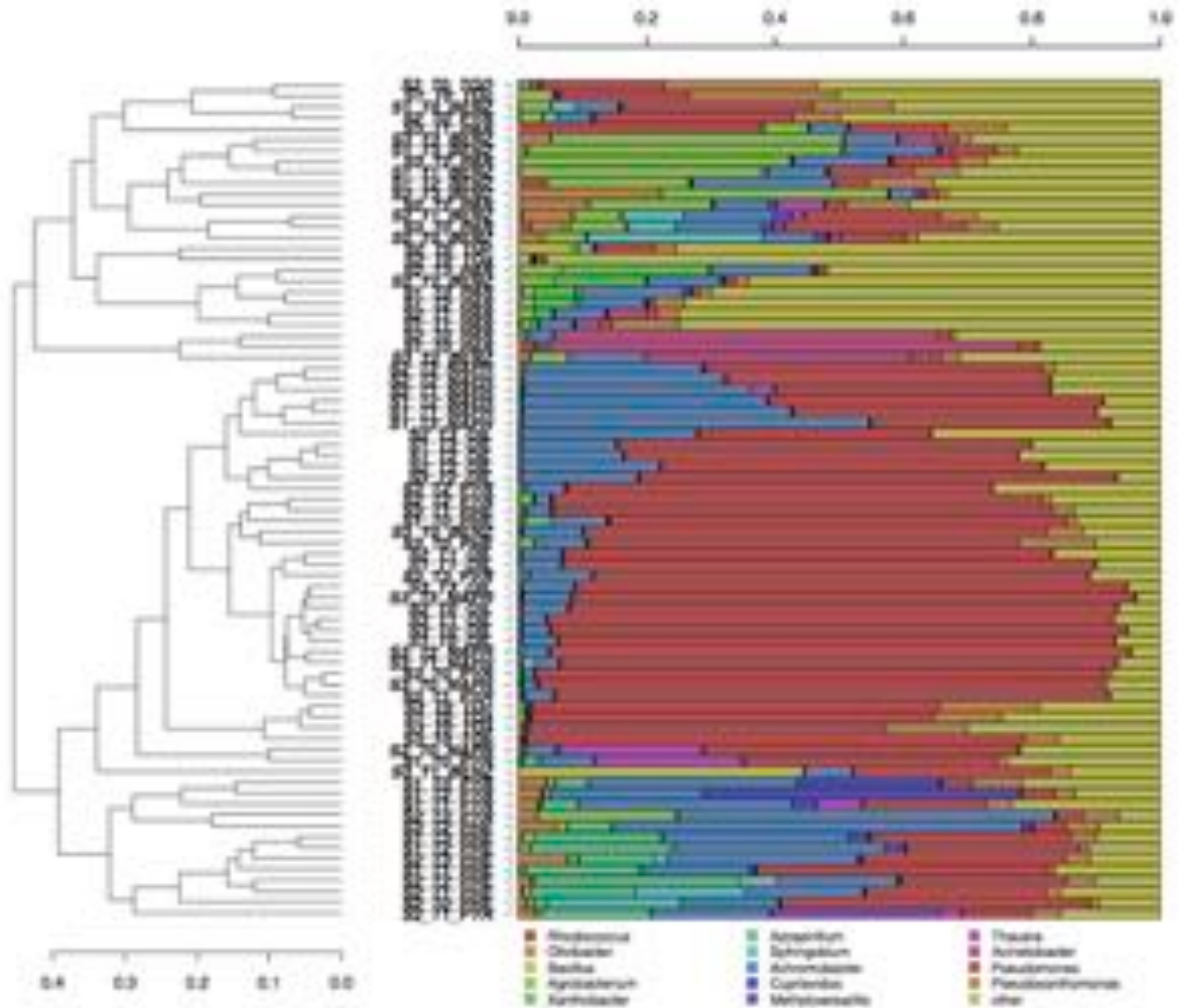
9 bacterial isolates



BACTERIA	B	N	P	Phe	Pa	O	total
Soil -1m	28	12	7	15	15	4	81
Soil -2m	18	14	6	12	34	9	93
Soil -3m	9	9	5	7	14	1	45
	25%	16%	10%	15%	29%	7%	219



- Campioni prelevati a 3 profondità del suolo (1, 2 e 3 m)
- Arricchimenti sequenziali su inquinanti bersaglio M9 + 7 come unica fonte C
- Campioni per metagenomica prelevati dal terreno originale e ogni fase di arricchimento (1, 2 e 3 settimane)
- Isolamento dei ceppi alla fine dell'arricchimento (3 settimane)

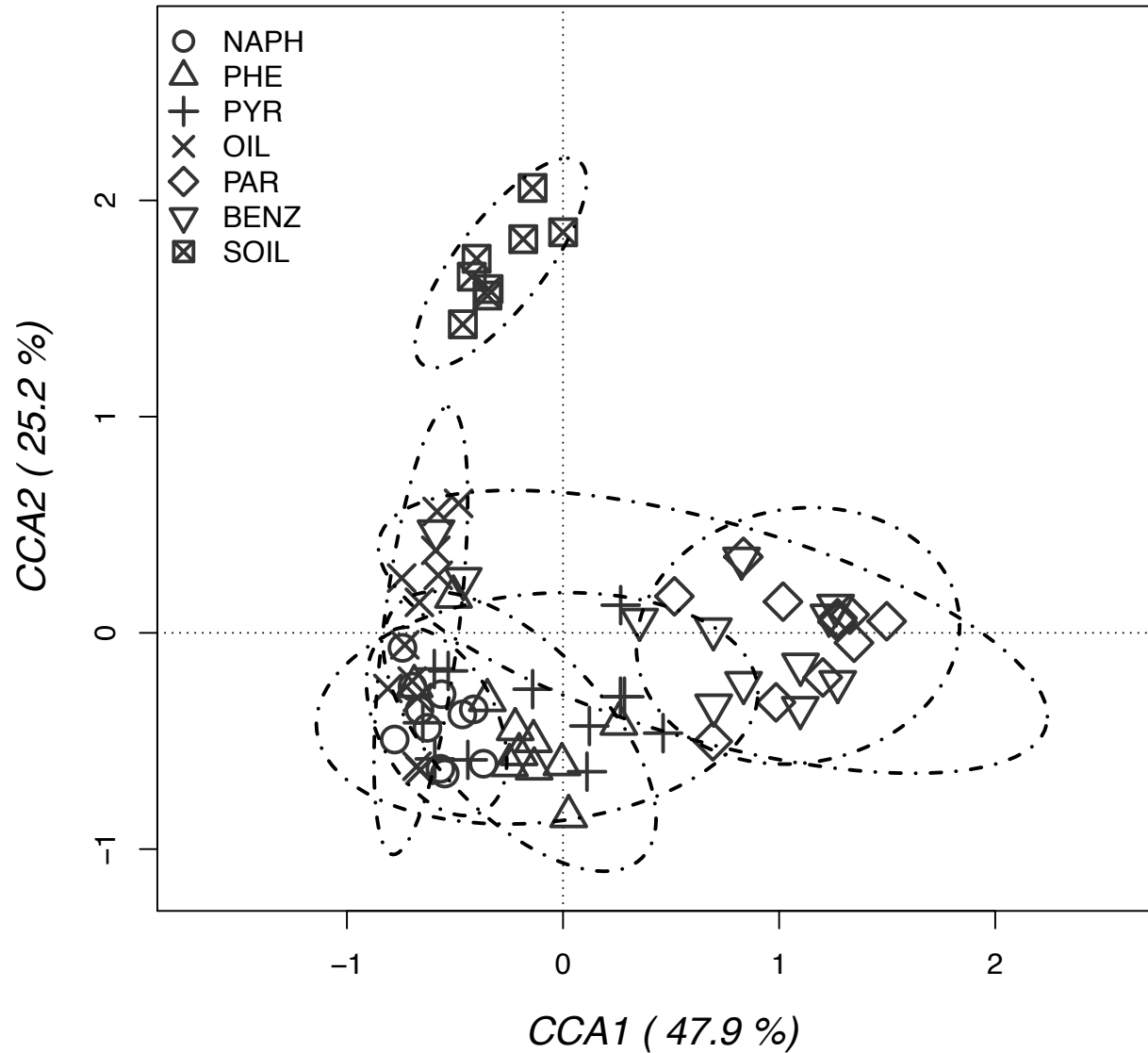


Spini et al. (2018) **Molecular and microbiological insights on the enrichment procedures for the isolation of petroleum degrading bacteria and fungi.** *Frontiers in Microbiology*, in press.



EFFETTO DELL'INQUINANTE

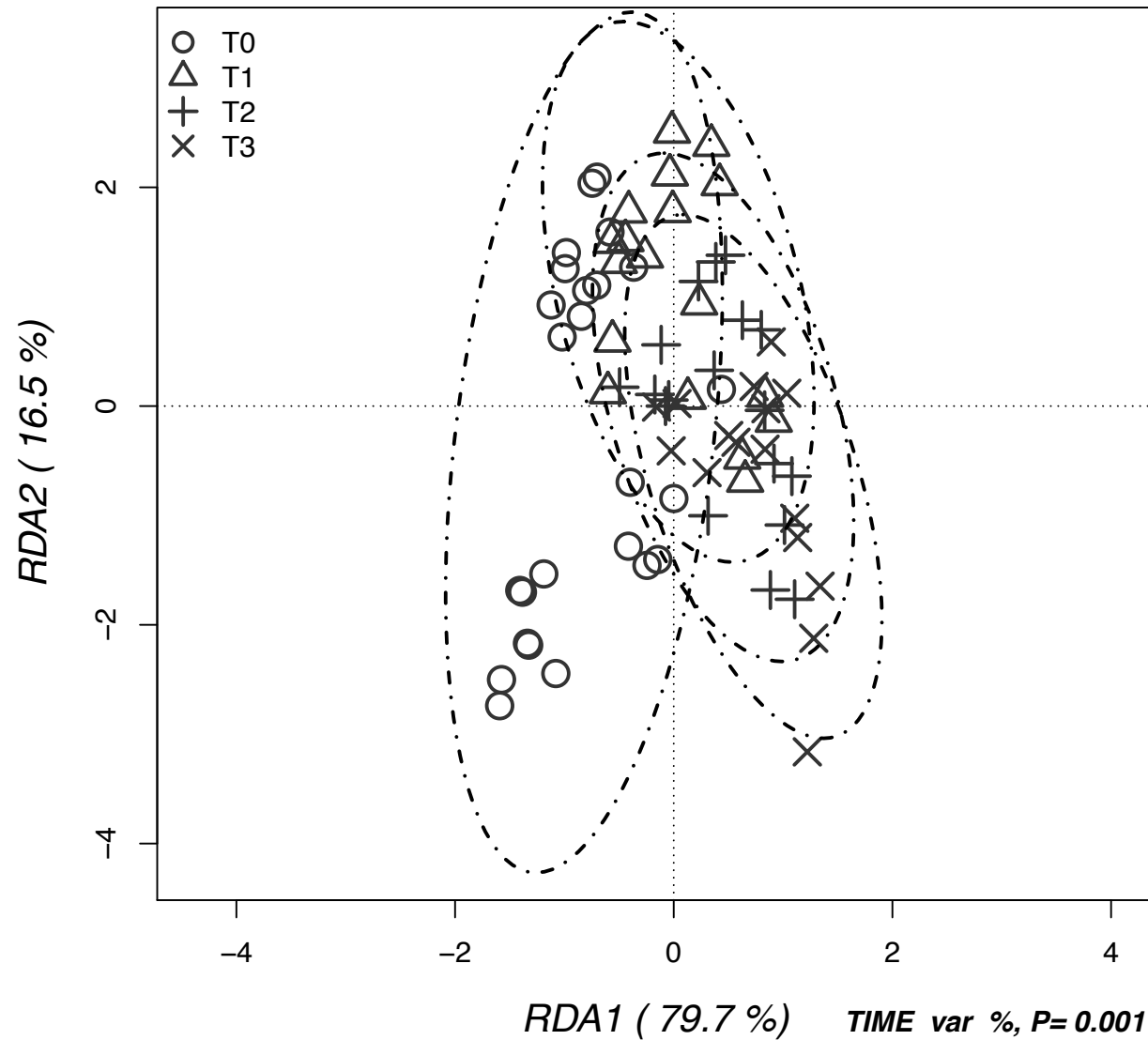
Constrained Variance 36.1 %
model P= 0.001





EFFETTO DEL TEMPO

*Constrained Variance 8.3 %
model P= 0.002*





IDENTIFICAZIONE DEGLI ISOLATI

- Estrazione del DNA dagli isolati
- Amplificazione con PCR del gene 16S



Sequenziamento dei prodotti di PCR

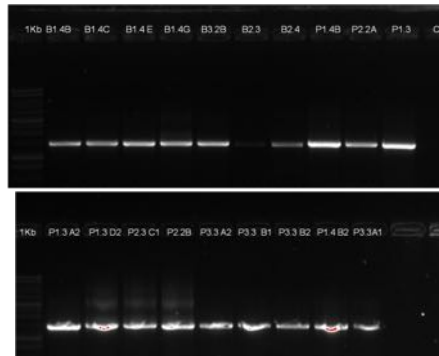


Figure. P1-P6 PCR products visualized on agarose gel (expected length 1500bp)

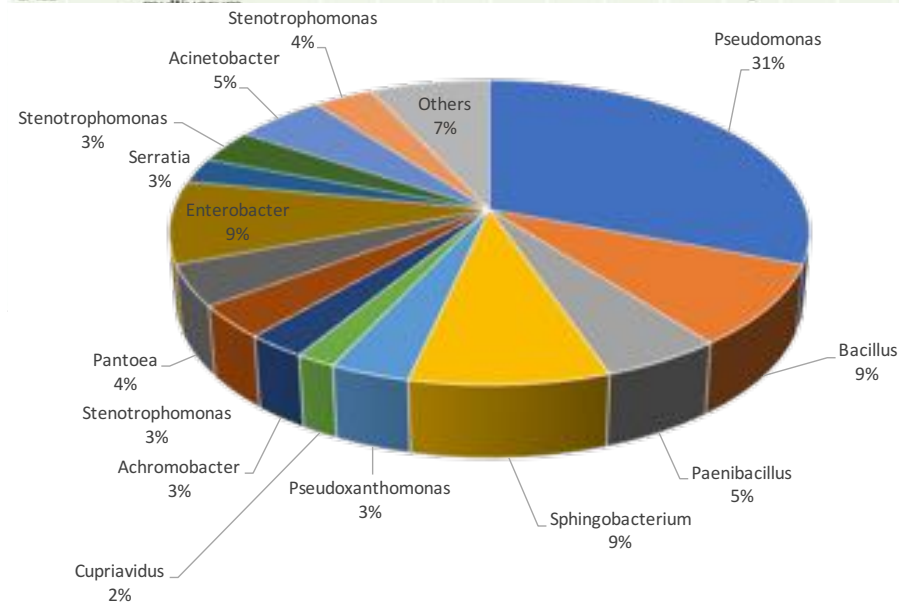


RDP Sequence match

Isolate number	RAPD best match-list of isolates	Solid Screening			Liquid Enrichment								
		Isolated from these cultural lines	Isolated from these soils			Isolated from these cultural lines			Isolated from these soils				
		B	Pa	O	s1	s2	s3	B	Pa	O	s1	s2	s3
EC2	Helicobacter												
EC1	Gordonia rubripertincus								x				
EC9	Pseudomonas putida										x		
EC6	Bacillus sp.								x			x	
EC5	Paenibacillus spp.								x				x
EC18	Sphingobacterium multivorum								x				x
EC17	Pseudomonas putida								x				x
EC12	Pseudoxanthomonas spp.												x
EC28	Pseudomonas putida								x				
EC26	Achromobacter spp.								x			x	
EC22	Sphingobacterium multivorum								x			x	
EC30	Pseudomonas putida								x				x
EC29	Pseudoxanthomonas mexicana								x			x	
EC34	Pseudoxanthomonas mexicana								x			x	
EC33	Achromobacter xylooxidans								x				x
CP1	Bacillus Subtilis								x			x	
EC62	Stenotrophomonas acidaminiphila								x				x
CP14	Bacillus xiamenensis								x				x
CP136	Sphingobacterium								x				x

Generi

- *Pseudomonas*
- *Bacillus/Paenibacillus*
- *Sphingobacterium*
- *Pseudoxanthomonas*
 - *Enterobacter*
 - *Acinetobacter*



n° 20 patogeni scartati (in accordo con il Dr.L 81/2008)





UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore

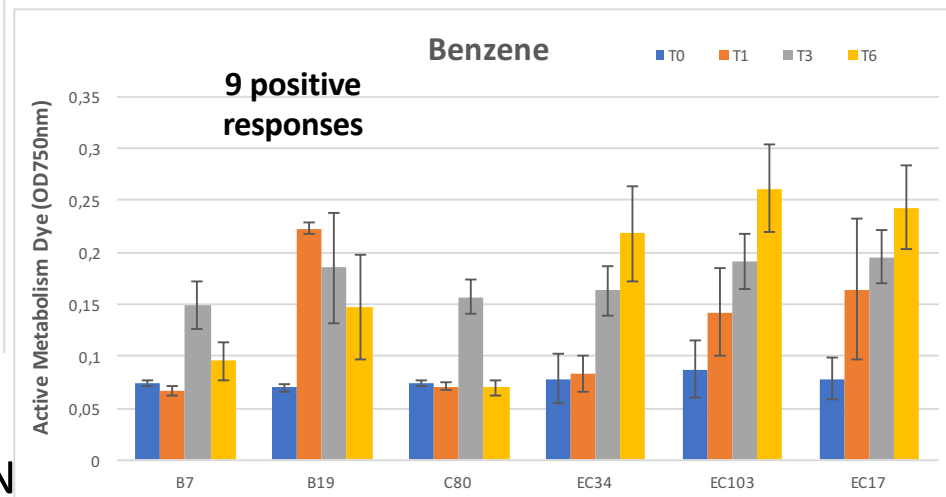
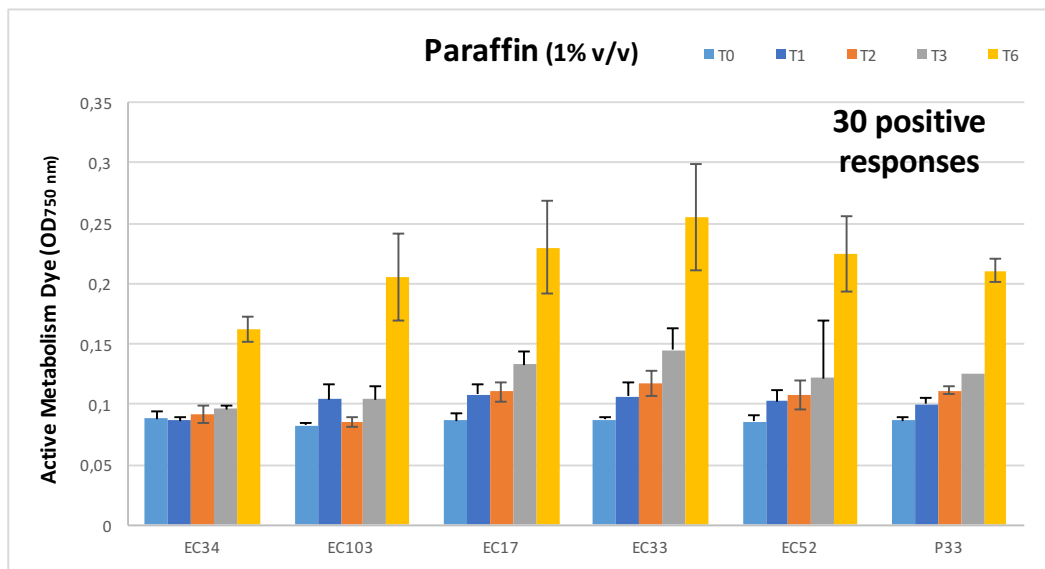
SCREENING MASSIVO DEGLI ISOLATI

6 substrati

Pyrene
Phenanthrene
Heptadecane
Paraffin
Benzene
Naphtalene



ISOLATI
BATTERICI



LIFE15 EN



SCREENING MASSIVO DEGLI ISOLATI

Isolate ID	Genus/Species	Isolation approach	Isolation (°C)	Substrate		Substrate		Substrate		Substrate	
EC1	Gordonia rubripertincus	enrichment culture	30°C	Naphtalene	(++) *	Paraffin	(++)				
EC33	Achromobacter xylosoxidans	enrichment culture	30°C	Heptadecane	(+)	Naphtalene	(++)	Benzene	(+++)	Paraffin	(++)
EC17	Pseudomonas putida	enrichment culture	30°C	Paraffin	(++)	Benzene	(+++)	Naphtalene	(++)		
EC34	Pseudoxanthomonas mexicana	enrichment culture	30°C	Naphtalene	(+++)	Benzene	(++)	Paraffin	(+)		
O7	Pseudomonas putida	solid screening	24°C	Paraffin	(+)						
O6	Pseudomonas putida	solid screening	24°C	Paraffin	(+)						
O2	Pseudomonas sp.	solid screening	24°C	Paraffin	(+)						
EC52	Sphingobacterium sp.	enrichment culture	30°C	Benzene	(+++)	Paraffin	(++)	Naphtalene	(++)		
B7	Bacillus idriensis	solid screening	24°C	Naphtalene	(++)	Benzene	(++)				
EC43	Pseudomonas fluorescens	enrichment culture	30°C	Paraffin	(+)						
B17	Pseudomonas chlororaphis	solid screening	24°C	Paraffin	(+)						
EC47	Pseudomonas fluorescens	enrichment culture	30°C	Paraffin	(++)						
EC103	Serratia marcescens	enrichment culture	30°C	Benzene	(+++)	Naphtalene	(+)	Paraffin	(++)		
EC80	Bacillus subtilis	enrichment culture	30°C	Benzene	(++)	Paraffin	(++)				
P31	Agrobacterium sp. SCAU685	solid screening	24°C	Paraffin	(+)						
P32b	Rhizobium sp.	solid screening	24°C	Paraffin	(++)						
P33	Rhizobium sp.	solid screening	24°C	Naphtalene	(++)	Benzene	(++)	Paraffin	(++)		
P37	biocide-degrading bacterium	solid screening	24°C	Paraffin	(+)						
B19	denitrifying bacterium SN230	solid screening	24°C	Benzene	(++)						
B20	Ochrobactrum sp.	solid screening	24°C	Paraffin	(+)						
P36	Agrobacterium sp.	solid screening	24°C	Paraffin	(+)						
EC42	Serratia marcescens	enrichment culture	30°C	Paraffin	(+)						
P34	Pseudomonas plecoglossicida	solid screening	24°C	Paraffin	(+)						
B11	Pseudomonas putida	solid screening	24°C	Pyrene	(+)	Phenanthrene	(++)	Paraffin	(++)		
O5	Pantoea agglomerans	solid screening	24°C	Paraffin	(++)						
P26	Pseudomonas putida	solid screening	24°C	Paraffin	(+)						
B10	Pseudomonas putida	solid screening	24°C	Paraffin	(++)						
P34B	Pseudomonas putida	solid screening	24°C	Benzene	(++)	Paraffin	**	Phenanthrene	(++)		
P27	Pseudomonas putida	solid screening	24°C	Paraffin	(++++)	Phenanthrene	(+)				
P30	Pseudomonas chlororaphis	solid screening	24°C	Paraffin	(++++)						
P28	Pseudomonas putida	solid screening	24°C	Paraffin	(+++)						
P29	Acinetobacter calcoaceticus	solid screening	24°C	Paraffin	(+++)						
B13	Pseudomonas putida	solid screening	24°C	Phenanthrene	(++)						

*percentage increase of the OD at 750nm after six days (t6) compared to the zero time (t0), normalized to the abiotic controls

(+) more than 150% (++) greater than 300%

(++) between 200% and 300%

(++++) greater than 400%

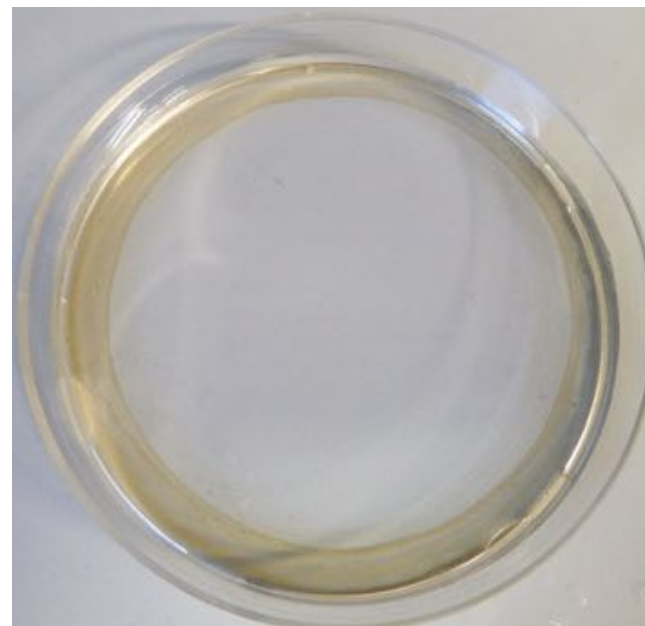
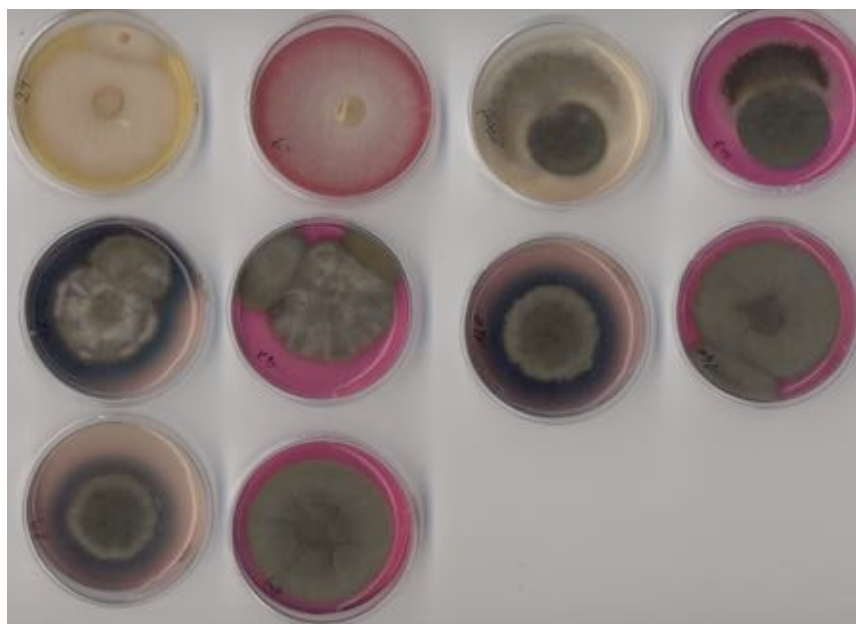
(**) greater than 700%



UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore

SCREENING DEGLI ISOLATI PER ATTIVITA' BIOSURFATTANTI

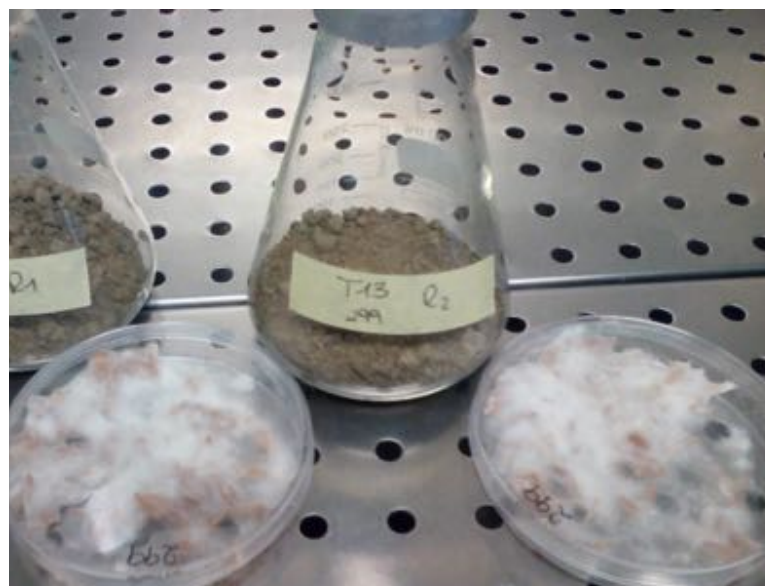
- ❖ Test colorimetrici (ABTS, Poly R478)
- ❖ Test su piastra (Oil spread test, emulsification test, etc.)
- ❖ Identificazioni chimiche metabolomiche





UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore

SELEZIONE IN MICROCOSMO





SELEZIONE IN MICROCOSMO

	Micro cosm/ thesis	strains	Rationale
bacteria	1	CP7	1st best degrader
	2	B11	2nd best degrader
	3	EC77	3rd best degrader
	4	CP7+B11+EC77	first best 3
	5	CP7+B11+EC77+P34-24	first best 3 + biosurfactant producer
	6	O3	good pyr degrader (isolated from oil)
	7	O3+P34-24	good pyr degrader + biosurf (bioavailability issue)
	8	O6	degrader isolated from oil
	9	EC31	versatile on different pollutants
	10	CP122	versatile on different pollutants
fungi	11	127	first best fungus
	12	71	second best fungus
	13	299	third best fungus
	14	127 + 71 + 299	3 best fungi
	15	219 + 15 + 304 + 117	best mitosporic fungi
	16	219 + 15 + 304 + 117 + 127	best mitosporic fungi + basidiomycete
	17	219 + 15 + 304 + 117 + 127 + 71 + 299	best mitosporic fungi + 3 best fungi
	18	51 + 203	among the best tens, different growth, biosurfactant producers
	19	304 + 117 + 307 + 308	isolated from oil
	20	304 + 117 + 307 + 308 + 127	isolated from oil + basidiomycete

	Microcosm/thesis	strains	Rationale
fungi+bacteria	21	127 + 71 + 299 + EC77 + B11 + CP7 + P37	3 best fungi and bacteria
	22	219 + 15 + 304 + 117 + 127 + 299 + EC77 + B11 + CP7 + P37	T17 + 3 best bacteria
	23	304 + 117 + O3 + O6	isolated from oil
	24	304 + 117 + O3 + O6 + 127 + 299	isolated from oil + basidiomycete
	25	304 + 51 + 299 + CP7 + EC77 + P37	those that seem to grow on soil + basidiomycete + best bacteria
	26	219+15+304+117+148+06+EC31+CP122+ CP7+EC77	best fungi and bacteria according to 20d data of microcosms
	27	304+117+307+308+299+148 + 06+EC31+CP122+EC77+B11+P37	best fungi and bacteria according to 20d data of microcosms+ best biosurfactant bacterial producers
	28	143 + 131 + 307 + 188 + 177 + 06+EC31+CP122+P29+EC30+EC101	fungi with high growth in microplate + best bacteria in microcosm+ alkanes bacterial degraders
	29	245 + 239 + 203+307 + 131 + 188 + 299 + B24+ EC101+EC77+P36+EC31	fungi isolated in enrich + pyr/phe growing fungi + versatile bacteria on different pollutants
	30	203 + 274 + 177+51+148 + 299 + P29+EC30+03+B19+B20+B10	pyr or phe or alkanes growing fungi + basidiomycete + pyr/phe and alkanes bacteria degraders
fungi+bacteria +biosurfactant	31	Thesis 21 + biosurfactants	Thesis 21 + biosurfactant (bioavailability issue)
	32	Thesis 22 + biosurfactants	Thesis 22 + biosurfactant (bioavailability issue)
	33	Thesis 26+ biosurfactants	Thesis 26+ biosurfactant (bioavailability issue)
	34	Thesis 27+ biosurfactants	Thesis 27+ biosurfactants (bioavailability issue)
	35	Thesis 29+ biosurfactants	Thesis 29+ biosurfactants (bioavailability issue)



theses	2ringsPAHs	3ringsPAHs	4,5,6PAHs	C>12	final_score
T1	0	1	1	0	2
T2	0	1	1	0	2
T3	0	1	1	0	2
T4	0	1	1	0	2
T4R	1	1	0	1	3
T5	1	1	0	0	2
T6	1	1	1	0	3
T7	0	1	0	0	1
T8	0	0	0	0	0
T9	0	1	1	0	2
T10	0	1	1	0	2
T11	1	1	1	0	3
T12	0	1	1	0	2
T13	0	1	0	0	1
T14	1	1	1	0	3
T15	0	1	0	0	1
T16	0	1	1	0	2
T17	1	0	0	0	1
T18	1	1	0	0	2
T19	1	0	0	0	1
T20	1	0	0	0	1
T21	0	1	0	0	1
T22	0	1	1	1	3
T23	1	1	0	0	2
T24	0	1	0	1	2
T25	0	1	1	1	3
T26	1	1	0	1	3
T27	1	1	0	0	2
T28	1	1	0	0	2
T29	1	1	0	0	2
T30	1	1	0	0	2
T31	1	0	0	0	1
T32	0	0	0	0	0
T33	1	1	0	0	2
T34	1	1	0	0	2
T35	1	1	0	0	2





UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore

MESOCOSMI



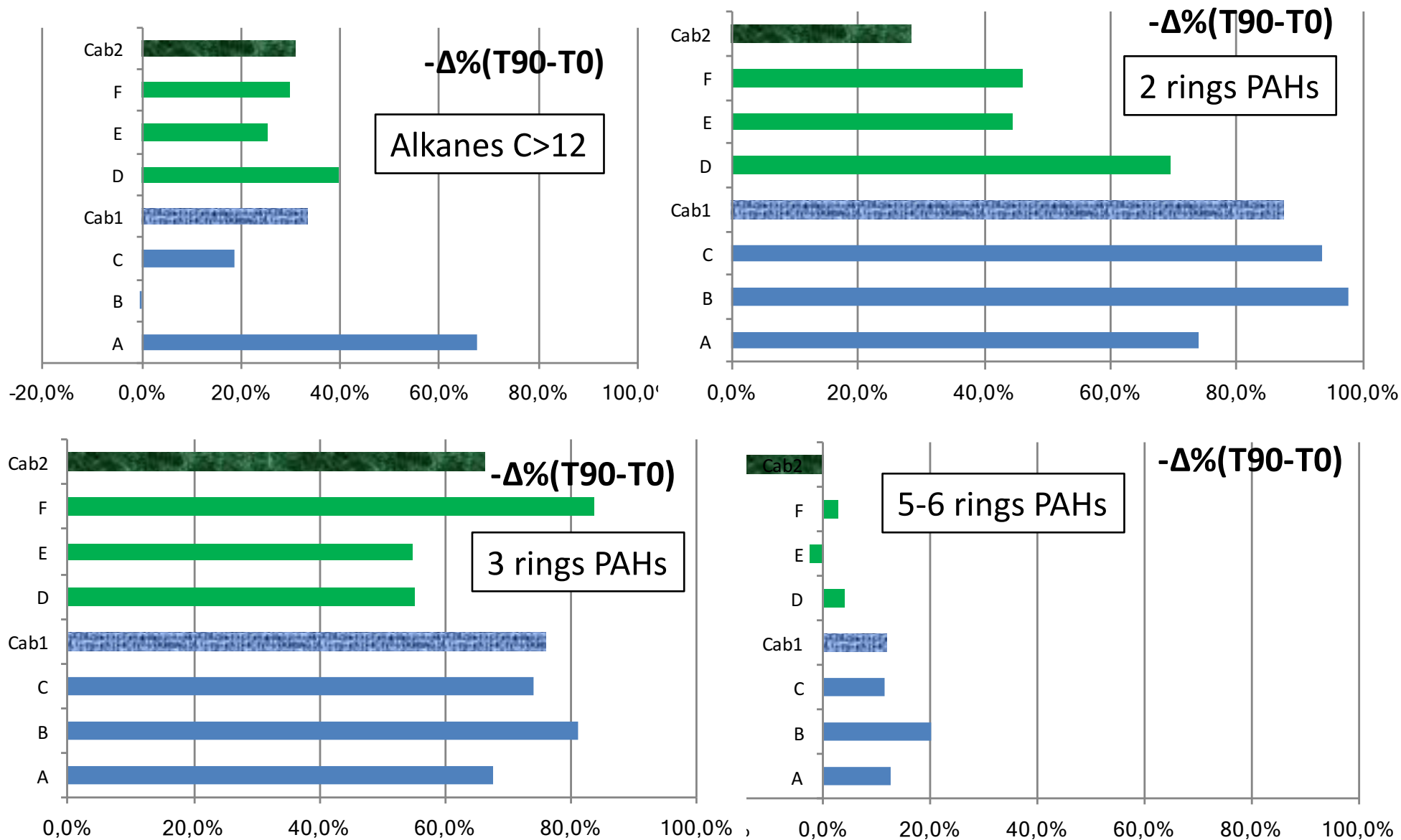


SELEZIONE IN MESOCOSMI

Mesocosms theses	Corresponding microcosms	Composition
A	22	219 + 15 + 304 + 117 + 127 + 299 + EC77 + B11 + CP7 + P37
B	32	219 + 15 + 304 + 117 + 127 + 299 + EC77 + B11 + CP7 + P37
C	27	304+117+307+308+299+148 + 06+EC31+CP122+EC77+B11+P37
D	28+biosurfact	143 + 131 + 307 + 188 + 177 + 06+EC31+CP122+P29+EC30+EC101
E	29	245 + 239 + 203+307 + 131 + 188 + 299 + B24+ EC101+EC77+P36+EC31
F	35	203 + 274 + 177+51+148 + 299 + P29+EC30+03+B19+B20+B10



RISULTATI DEI MESOCOSMI





UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore

STUDIO DELLE COMUNITA' MICROBICHE IN SEDIMENTI CONTAMINATI DA PETROLIO A MONASTIR, TUNISIA



- Le comunità microbiche degradanti il petrolio sono state arricchite da 4 diversi ambienti:

Sample label	Sample description	Grain size distribution (%)			pH	MO (%)	Organic C (%)	N _t (%)	H (%)	TPH content (mg/g)
		Sand	Silt	Clay						
R	Refinery reservoir soil	53.17	4.65	11.95	6.97	5.40	3.14	0.14	1.21	207.54
K	Petroleum station soil	63.6	11.7	17.6	7.79	6.07	3.53	0.11	5.11	141.49
S	Sediment from Teboulba harbor	91.3	0.5	1.7	7.96	1.77	1.03	0.11	24.08	4,67

Sample label	Sample description	pH	CE mmh/cm	RS g/L	% of su ma
E	Seawater from Teboulba harbor	7.56	53	37	1.

Abbreviations: N_t total Nitrogen; C carbon; MO organic matter; H water content in %, TPH total petroleum hydrocarbon



- I consorzi arricchiti sono stati testati per la loro capacità di degradare il petrolio greggio.
- Il campionamento è stato effettuato a 0, 1 2, 4 e 8 settimane
- Su ciascun campione sono state eseguite le seguenti analisi:
 - Degradazione chimica (idrocarburi totali, aromatici, alifatici)
 - PCR dei geni di degradazione
 - analisi molecolari per valutare la struttura della comunità batterica



Percentages of biodegradation of TPH (total petroleum hydrocarbons), NAH (non-aromatic Hydrocarbons) and AH (aromatic hydrocarbons)

Of ZCO by the bacterial consortia K,R,S and E at various incubation periods.

Values followed by the same letter are not significantly different according to HSD test for comparison of means

Sample		W1	W2	W3	W4	W8	F value
R	TPH	63.4 ±0.8 c	69.4 ±8.8 bc	84.8 ±2.1 ab	88.4 ±0.9 a	92.0 ±1.7 a	18.288**
	NAH	28.1 ±2.3 c	36.0 ±4.4 bc	48.4 ±3.6 ab	57.8 ±4.2 a	63.7 ±5.8 a	24.601**
	AH	39.8 ±2.2 b	63.7 ±2.8 a	68.1 ±0.2 a	72.8 ±5.7 a	80.9 ±7.4 a	23.93**
K	TPH	67.4 ±14.1 a	75.7 ±12.0 a	83.8 ±3.4 a	86.3 ±2.1 a	88.0 ±0.1 a	2.055 ^{ns}
	NAH	13.0 ±2.3 b	37.4 ±8.4 a	45.9 ±4.2 a	52.9 ±7.3 a	54.9 ±5.6 a	16.269**
	AH	27.2 ±0.0 e	38.6 ±0.9 d	48.8 ±0.0 c	55.6 ±0.4 b	69.4 ±0.4 a	2275.6***
S	TPH	57.9 ±1.0 c	74.5 ±2.1 b	83.4 ±3.2 a	88.3 ±1.7 a	91.2 ±0.7 a	95.01***
	NAH	18.6 ±0.6 b	21.4 ±4.2 b	33.8 ±7.5 b	57.2 ±0.4 a	64.3 ±2.1 a	54.312***
	AH	31.8 ±1.7 c	38.3 ±4.8 c	47.2 ±9.6 bc	64.0 ±3.7 ab	71.6 ±0.4 a	21.531**
E	TPH	61.3 ±9.6 a	68.8 ±15.2 a	86.5 ±2.0 a	87.2 ±1.7 a	89.1 ±1.9 a	4.797 ^{ns}
	NAH	15.1 ±6.5 b	28.7 ±8.6 ab	40.8 ±7.7 ab	47.4 ±7.1 a	55.8 ±4.8 a	10.326*
	AH	34.9 ±21.0 a	46.6 ±13.5 a	55.7 ±11.1 a	58.0 ±9.6 a	67.0 ±6.1 a	1.701 ^{ns}

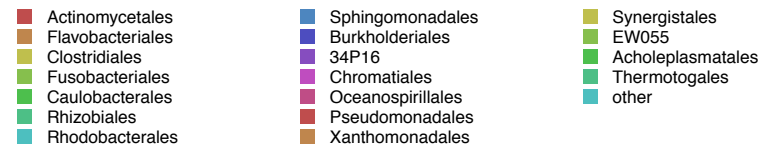
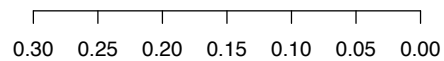
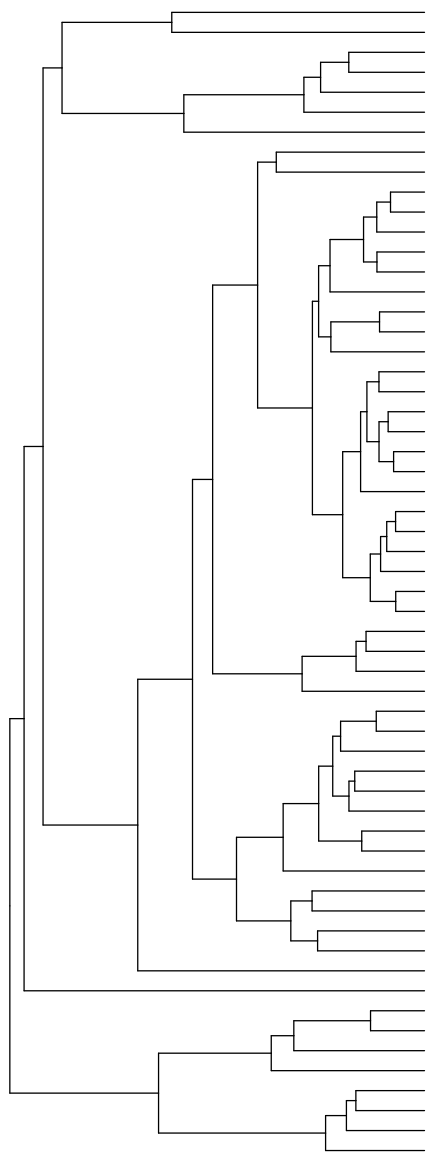
^{ns} not significant; * <0.05; ** <0.01; *** < 0.001

Table 3. Detection of catabolic genes in soil samples before and during biodegradation assays

gene	week 0		week 1			week 8	
	inoculum	treat	treat	control	treat	treat	control
Consortium R							
AlkB	+	+	+	+	+	+	-
NdoB	+	+	+	-	-	-	-
Cat23	+	+	+	+	+	-	-
XylA	-	+	+	-	+	-	-
NidA1	-	-	-	-	-	-	-
Consortium K							
AlkB	+	+	+	+	+	+	+
NdoB	-	+	+	-	-	-	-
Cat23	+	+	+	-	+	+	+
XylA	-	+	+	+	+	+	+
NidA1	-	-	-	-	-	-	-
Consortium S							
AlkB	+	+	+	-	+	-	+
NdoB	-	-	-	-	-	-	-
Cat23	+	+	+	-	+	-	+
XylA	-	+	-	-	+	-	+
NidA1	-	-	-	-	-	-	-
Consortium E							
AlkB	+	+	+	+	+	+	+
NdoB	+	-	-	-	-	-	-
Cat23	+	-	+	+	-	-	-
XylA	-	-	-	-	-	-	-
NidA1	-	-	-	-	-	-	-

(+) fragments of the same size of the reference; (-) no bands of the expected size were detected

PCR





FIORITURE DI BATTERI DURANTE LA BIOREMEDIATION





CONCLUSIONI E SUGGERIMENTI

- I microorganismi sono i nostri migliori alleati per il biorisanamento
- Esiste una biodiversità ampia e in parte sconosciuta da studiare e poi sfruttare
- I processi di scaling-up sono necessari per minimizzare i problemi
- Passaggi chiave:
 - Seguire con appropriati indicatori le attività ed il destino dei ceppi degradanti, siano essi stimolati o bioaugmentati
 - Valutare il biorisanamento di composti fortemente recalcitranti
 - Identificare e superare vincoli fisici (biodisponibilità) e legali (limiti di legge, risk assessment, ecotossicologia)
 - **INTERDISCIPLINARIETA' !!**



UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore

ACKNOWLEDGEMENTS

- Giulia Spini
- Simona Zangrillo
- Rahma Omrani



UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore



LIFE15ENV/IT/000396