

L'uso dei batteri idrocarburo-degradanti per il recupero di aree contaminate (monitoraggio nei siti di Messina, Milazzo e Augusta)

The use of hydrocarbonoclastic bacteria for the recovery of polluted areas (monitoring of Messina, Milazzo and Augusta sites)

Maria Genovese, Simone Cappello, Lucrezia Genovese, Renata Denaro

Istituto ambiente marino costiero (IAMC) sezione di Messina, CNR, Spianata S. Raineri 86, 98122 Messina

Corrispondenza: Maria Genovese, e-mail: maria.genovese@iamc.cnr.it

Introduzione

L'ultimo decennio di studi sulla composizione microbica di aree marine contaminate da petrolio ha rivelato che la presenza degli idrocarburi (petrolio) in mare altera la struttura microbica, selezionando, quali membri dominanti, batteri capaci non solo di sopravvivere alla tossicità del petrolio, ma anche di degradare il contaminante. Tra questi, si sono distinti per l'elevata specializzazione nel consumo delle componenti del petrolio i batteri idrocarburoclastici, o BIC;¹⁻⁴ si tratta di batteri marini obbligati, capaci di consumare gli idrocarburi come unica fonte di carbonio degradandoli e trasformandoli in biomassa anidride carbonica e acqua.

In accordo con le indagini tassonomiche effettuate presso l'IAMC-CNR Messina, i BIC fino a oggi isolati sono batteri Gram-negativi appartenenti ai γ -proteobatteri, caratterizzati da un'alta affinità per i substrati idrocarburi che usano come unica fonte di sostentamento, insieme ad alcuni composti a basso peso molecolare (come piruvato o acetato). L'origine marina rende questi batteri strettamente dipendenti dalla presenza di sodio. In linea di massima sono aerobi, anche se in condizioni anaerobiche alcuni ceppi possono usare nitrato come accettore di elettroni al posto dell'ossigeno.

La tabella 1 riporta i ceppi idrocarburoclastici isolati fino a oggi. I BIC sono largamente diffusi: infatti, la comune discendenza filogenetica dei ceppi ritrovati in località diverse e geograficamente distanti tra loro suggerisce che essi siano addirittura cosmopoliti.

L'isolamento di nuove specie da aree marine con caratteristiche

fisico-chimiche differenti (Oceano Atlantico, Mar Mediterraneo, Antartide, Mar del Giappone e Mare del Nord) lascia ipotizzare che i BIC godano di speciali capacità di adattamento a diversi parametri ambientali (temperatura, pressione, salinità). Inoltre, ricerche parallele hanno dimostrato che la percentuale relativa dei BIC aumenta nelle acque contaminate da petrolio e diminuisce nelle zone di mare non inquinate.⁵

La presenza ubiquitaria dei BIC allo stato quiescente fa sì che quando si verifica un input di petrolio in mare venga stimolata la loro crescita: nell'arco di pochi giorni proliferano diventando la popolazione dominante della comunità microbica. Condizione limitante la crescita è la concentrazione dei nutrienti, azoto e fosforo, la cui presenza in specifiche concentrazioni favorisce il *bloom* dei batteri idrocarburoclastici con la corrispondente diminuzione della concentrazione degli idrocarburi. Tale processo è reso possibile da due fondamentali proprietà dei batteri idrocarburoclastici:

- metabolismo fortemente orientato alla degradazione degli idrocarburi (presenza di geni ed enzimi specifici);
- produzione di biosurfattanti, sostanze con proprietà emulsionanti che rendono aggredibili le parti idrofobiche del petrolio.

Il monitoraggio delle aree portuali di Messina, Milazzo e Augusta

Nell'ambito di diversi progetti di ricerca europei e nazionali l'IAMC-CNR di Messina ha effettuato il monitoraggio di aree marine contaminate da idrocarburi con l'obiettivo di scegliere e validare i batteri idrocarburoclastici come indicatori batte-

| Ceppo | Caratteristiche | Bibliografia |
|-----------------------|---|---|
| <i>Cycloclasticus</i> | consuma composti aromatici semplici e policromatici | Dyksterhouse et al., 1995 ¹¹ |
| <i>Alcanivorax</i> | trovato in ambienti contaminati, consuma alcani a catena semplice o ramificata | Yakimov et al., 1998 ¹ |
| <i>Thalassolituus</i> | consuma idrocarburi alifatici; largamente diffuso, esibisce particolari capacità di adattamento a varie temperature | Yakimov et al., 2004 ² |
| <i>Oleispira</i> | cresce a temperature comprese tra 2 e 4°C, isolato in Antartide | Yakimov et al., 2003 ¹² |
| <i>Oleiphilus</i> | cresce solo su coltura solida; consuma idrocarburi alifatici | Golyshin et al., 2002 ¹³ |

Tabella 1. I ceppi di batteri idrocarburoclastici isolati fino a oggi.

Table 1. Hydrocarbonoclastic bacteria isolated to date.

riologici proponendo l'uso di tecniche biomolecolari che permettono di accelerare i tempi di misura, ovviando in tal modo a una delle condizioni indispensabili per una strategia di intervento efficace.

I batteri idrocarburoclastici consumano con elevata selettività gli idrocarburi; la composizione del petrolio è dunque uno dei fattori che guida lo *shift* della comunità microbica verso una nuova struttura dominata dai BIC.

Le stazioni scelte per il monitoraggio erano le aree portuali di Messina, Milazzo e Augusta.

Il porto di Milazzo è situato in corrispondenza di una baia naturale caratterizzata da un basso turn-over di acqua, alta industrializzazione dovuta alla presenza di uno stabilimento industriale per la raffinazione del petrolio, elevata urbanizzazione e intenso traffico di navi cisterna con petrolio greggio e raffinato.

Il porto di Messina è formato da una penisola articolata che racchiude un vasto specchio acqueo che si sviluppa in una sorta di ellisse. I fondali variano da 7 a 70 metri e consentono l'attracco diretto alle banchine anche a navi di grosso tonnellaggio.

La rada di Augusta, situata nel Mar Jonio, al centro delle coste orientali siciliane, negli ultimi anni è stata soggetta a frequenti problemi di inquinamento dovuti a intensa attività antropica (insediamento urbano della città di Augusta), alla presenza di un agglomerato industriale e ad attività portuali (traffico di navi cisterna adibite al trasporto di prodotti petroliferi).

L'oggetto del monitoraggio era la biodiversità delle comunità microbiche associate ad ambienti contaminati da idrocarburi effettuata tramite tecniche biomolecolari e la ricerca di batteri idrocarburoclastici da isolare in coltura pura.

Isolamento dei batteri idrocarburoclastici

La tecnica delle colture diluite in acqua di mare (SW) è largamente usata per la selezione dei batteri marini autoctoni, la maggior parte dei quali è adattata ad ambienti oligotrofici e di conseguenza è inibita da elevate concentrazioni di sostanza organica tipiche soprattutto dei terreni agarizzati.⁶ Tale tecnica potrebbe avvantaggiare i batteri oligotrofi, favorendo quindi quelli che sono i batteri più abbondanti nell'ambiente marino, anziché quelli più tolleranti nei confronti delle elevate concentrazioni di sostanza organica. Infatti, è risaputo che la frazione di batteri in grado di crescere sui terreni di coltura classici rappresenta solo lo 0,01-0,1% del totale dei batteri marini.^{7,8}

In alternativa alla SW, ottimi risultati sono stati ottenuti in un terreno minimo (ONR7a) che simula la composizione salina dell'acqua di mare e in aggiunta contiene nutrienti e microelementi; inoltre, associando a questo la tecnica delle diluizioni seriali,^{9,10} è possibile realizzare degli arricchimenti naturali dei batteri idrocarburoclastici predominanti nell'ambiente naturale, riducendo la pressione dovuta alla presenza di specie competitive.

Dal sito di Messina è stato isolato per la prima volta *Oleiph-*

lus messinensis, insieme a ceppi già isolati in altri siti, come *Alcanivorax sp.*, *Cycloclasticus sp.* I campioni di sedimento prelevati nella zona antistante la raffineria di Milazzo, arricchiti in ONR7a e tetradecano, hanno fornito un nuovo genere: *Thalassolituus sp.*, che è stato successivamente isolato in altre aree marine: Mar di Barents, Mare del Nord.

Struttura delle comunità microbiche dominanti

La composizione delle comunità microbiche dominanti è stata analizzata attraverso tecniche molecolari basate sullo studio del 16SrDNA, gene ribosomale recante informazioni tassonomiche. La tecnica usata, T-RFLP (terminal restriction fragments polymorphism), consente l'analisi contemporanea di diversi campioni comparandoli in base ai pattern di diversità e alle *signature* (firme caratteristiche di un genere batterico).

I dati T-RFLP ottenuti hanno consentito la scelta di alcuni gruppi che risultavano più frequenti e/o abbondanti. Questi ultimi sono stati analizzati mediante l'uso del software Ribosomal database project II per il riconoscimento virtuale dei gruppi tassonomici. I risultati hanno confermato l'ipotesi della dominanza dei batteri idrocarburoclastici. I gruppi più abbondanti trovati nei siti di Messina, Milazzo e Augusta sono: *Sphingomonas sp.*, *Cycloclasticus sp.*, *Thalassolituus sp.*, *Pseudomonas oleovorans sp.*, *Alcanivorax sp.*

L'analisi della biodiversità dei campioni effettuate sui campioni naturali, in particolare il calcolo degli indici di diversità Shannon-Weiner (diversità), Jaccard (presenza/assenza), Pielou (*evenness*), Berger-Parker (dominanza) e la clusterizzazione basata sulla presenza/assenza, hanno rivelato una significativa somiglianza tra i campioni.

Inoltre, la stessa tecnica condotta sugli arricchimenti del campione naturale di Milazzo ha mostrato in microscala sia gli effetti della pressione selettiva degli idrocarburi, sia l'importanza delle interazioni intra-interspecifiche nello studio della dinamica delle popolazioni microbiche guidata dalla forzante «petrolio». Infatti, l'aggiunta di nutrienti aveva effetti marcatamente visibili nei pattern di biodiversità nei quali era possibile rilevare la presenza di pochi abbondanti gruppi associabili a batteri idrocarburo-degradanti. Tale diversità riflette presumibilmente la necessità di specifiche interazioni a livelli trofico e funzionale nelle comunità microbiche idrocarburo-degradanti da accoppiare con la complessità dei composti chimici, il range di solubilità e la tossicità dei composti organici.

Nell'ottica dell'uso di tali batteri come indicatori di contaminazione bisogna inoltre tenere conto dei tempi di reazione dei bioindicatori. Nel nostro caso sembra che i BIC (batteri idrocarburoclastici) intervengano repentinamente nelle prime fasi della degradazione, lasciando ipotizzare una loro correlazione con un inquinamento recente o cronico.

Prospettive future

L'applicazione dei batteri idrocarburoclastici può essere rappresentata in fenomeni di inquinamento:

- sistematico (acque di sentina o di zavorra da trattare direttamente in nave);
- cronico (aree portuali che subiscono l'effetto di manovre navali di carico e scarico di greggio, operazioni responsabili del 34% dell'inquinamento marino da petrolio);
- accidentale (caratterizzato da emissione di massicce quantità di inquinante).

In tutti i casi citati l'intervento deve essere immediato e l'efficacia garantita in tempi brevissimi. Ciò richiede il riconoscimento di un consorzio microbico addizionato di nutrienti e sostanze con proprietà surfattanti o emulsionanti che accelerino la degradazione.

Lo studio della biogeografia dei batteri idrocarburoclastici e, quindi, della loro distribuzione, costituisce un'informazione preziosa da utilizzare per la loro applicazione nel recupero di ambienti contaminati da idrocarburi.

Gli obiettivi raggiunti hanno consentito di confermare la loro presenza ubiquitaria in ambienti inquinati e la diretta correlazione tra la presenza degli idrocarburi e il numero di batteri idrocarburo-degradanti.

Visto che l'efficacia del monitoraggio quale strumento informativo dipende dalla capacità di ottenere dati in tempo reale, le tecniche molecolari (in particolare real-time PCR) possono rivelarsi come strumenti utili sia per fornire dati quantitativi relativi al target scelto come bioindicatore, sia per una analisi rapida della struttura della comunità microbica e, quindi, un'altrettanto rapida misura della biodiversità del campione.

Le prospettive future sono quindi quelle di utilizzare le tecniche molecolari suddette in ambienti particolarmente impattati (suolo, sedimento, acqua) come si presenta l'area di Gela. Inoltre, ove possibile (in relazione al tipo di inquinante), è auspicabile la realizzazione di sistemi pilota che consentano di sperimentare processi di *bioremediation* sul campo.

Conflitti di interesse: nessuno.

Bibliografia

1. Yakimov MM, Golyshin PN, Lang S et al. *Alcanivorax borkumensis* gen. no., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 1998; 48: 339-48.
2. Yakimov MM, Giuliano L, Denaro R et al. *Thalassolituus oleivorans* gen. nov., sp. nov., a new marine bacterium confined to the utilization of hydrocarbons. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; 54: 141-48.
3. Yakimov MM, Denaro R, Genovese M et al. Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons. *Environ Microbiol* 2005; 7: 1426-41.
4. Yakimov MM, Timmis KN, Golyshin PN. Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr Opin Biotechnol* 2007; 18: 257-66.
5. Denaro R, D'Auria G, Di Marco G et al. Assessing T-RFLP suitability for the description of bacterial community structure and dynamics in hydrocarbon-polluted marine environment. *Environ Microbiol* 2005; 7 (1): 78-87.
6. Eguchi M, Ispida Y. Oligotrophic heterotrophic bacteria and in situ heterotrophic activity in pelagic seawaters. *FEMS Microbiol Ecol* 1990; 73: 23-30.
7. Ferguson RL, Buckley EN, Palumbo AV. Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Appl Environ Microbiol* 1984; 47: 49-55.
8. Kogure K, Simdu U, Taga N. Distribution of viable marine bacteria in neritic seawater around Japan. *Can J Microbiol* 1980; 26: 318-23.
9. Bianchi A, Giuliano L. Enumeration of Viable Bacteria in the Marine Pelagic Environment. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 174-77.
10. Giuliano L, De Domenico M, De Domenico E, Höfle MG, Yakimov MM. Identification of culturable oligotrophic bacteria within naturally occurring bacterioplankton communities of the Ligurian sea by 16S rRNA sequencing and probing. *Microb Ecol* 1999; 37(2): 77-85.
11. Dyksterhouse SE, Gray JP, Herwig RP, Lara JC, Staley JT. *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *Int J Syst Bacteriol* 1995; 45: 116-23.
12. Yakimov M.M, Giuliano L, Gentile G et al. *Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; 53: 779-85.
13. Golyshin PN, Chernikova TN, Abraham WR, Linsdorf H, Timmis KN, Yakimov MM. *Oleiphilaceae* fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002; 52: 901-11.