



AMIIGA

INTEGRATED APPROACH TO MANAGEMENT
OF GROUNDWATER QUALITY IN FUNCTIONAL URBAN AREAS



SOLVENTI CLORURATI NELLE FALDE ACQUIFERE:
IL PROGETTO "AMIIGA" INTERREG CENTRAL EUROPE E ALTRE ESPERIENZE REGIONALI

VENERDÌ 4 MAGGIO 2018

Sala conferenze Centro S. Elisabetta,
Parco Area delle Scienze, 95 - Campus Universitario Parma

Valutazione, attraverso l'analisi delle comunità microbiche, del potenziale di **attenuazione** **naturale** nelle falde inquinate da solventi clorurati

Prof.ssa Anna Maria Sanangelantoni (UNIPR-Dipartimento SCVSA)

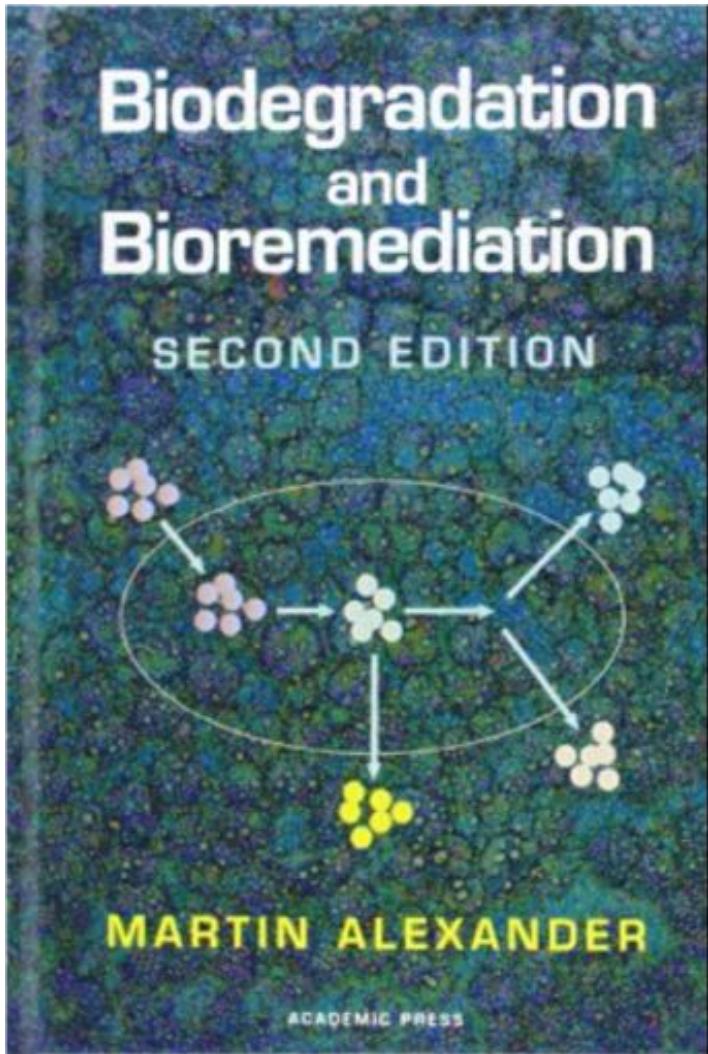
Il lavoro è stato svolto nell'ambito del progetto di tesi Magistrale in
SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AMBIENTE E LE RISORSE
della Dott.ssa **Beatrice Ventosi**

Hanno collaborato a questa ricerca i professori:

Fulvio Celico, Emma Petrella (Dipartimento SCVSA)

Andrea Zanini (Dipartimento Ingegneria e Architettura) che ringrazio.





Negli anni '70 **Martin Alexander** (1930-2017) professore alla Cornell University (Facoltà di Agraria) fino al 2000 e membro dell'*advisory board* di *E.P.A. e dell'Esercito US* suggerì il

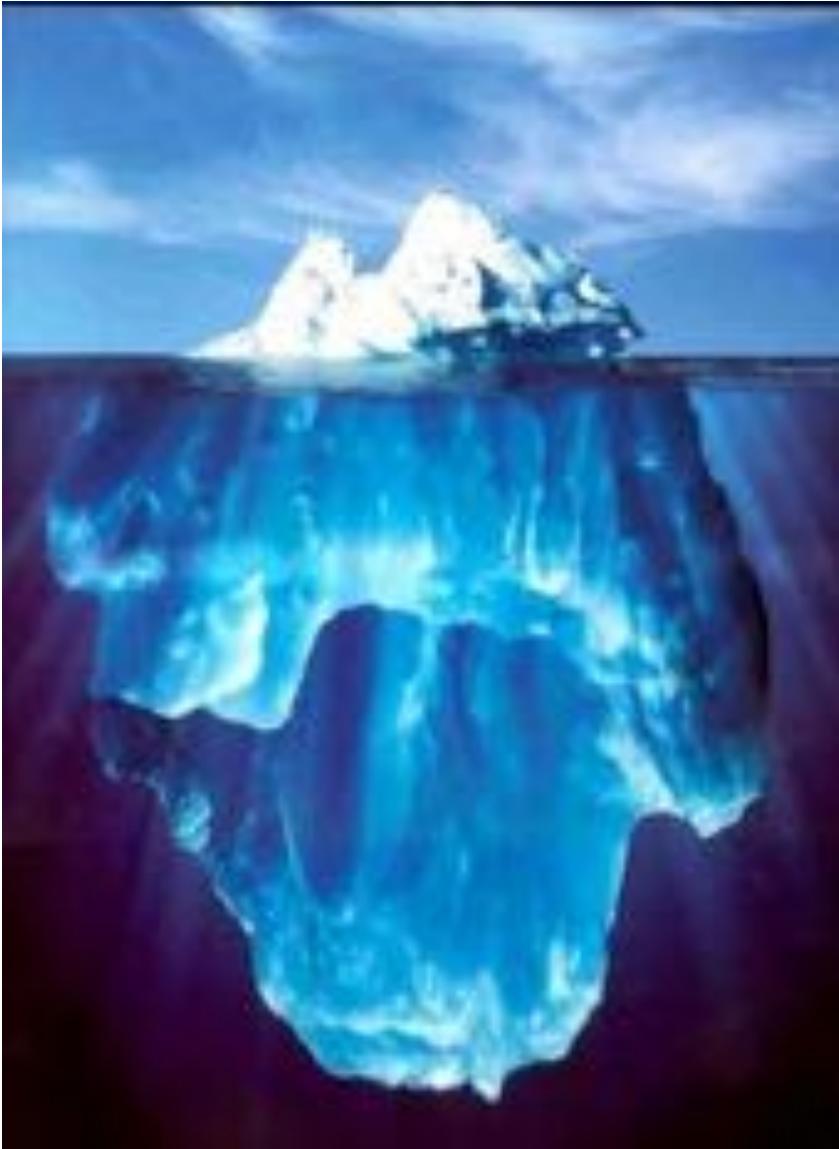
“principio della infallibilità microbica”

che esprimeva un'osservazione empirica:

“non esistono composti organici naturali che siano totalmente resistenti alla biodegradazione posto che le condizioni ambientali siano favorevoli”

I microrganismi hanno avuto 3,8 miliardi di anni per evolversi e sicuramente hanno avuto tutto il tempo di sviluppare processi metabolici per ricavare energia e carbonio da ogni molecola organica presente in natura





ICEBERG della BIODIVERSITA' MICROBICA

Il 99,9% delle specie microbiche viventi è sconosciuta e incoltivabile, ma esiste ed è attiva nell'ambiente.

Oggi, con lo sviluppo delle tecniche di sequenziamento NGS (Next Generation Sequencing), possiamo mettere in luce tutta questa biodiversità nascosta

ATTENUAZIONE NATURALE

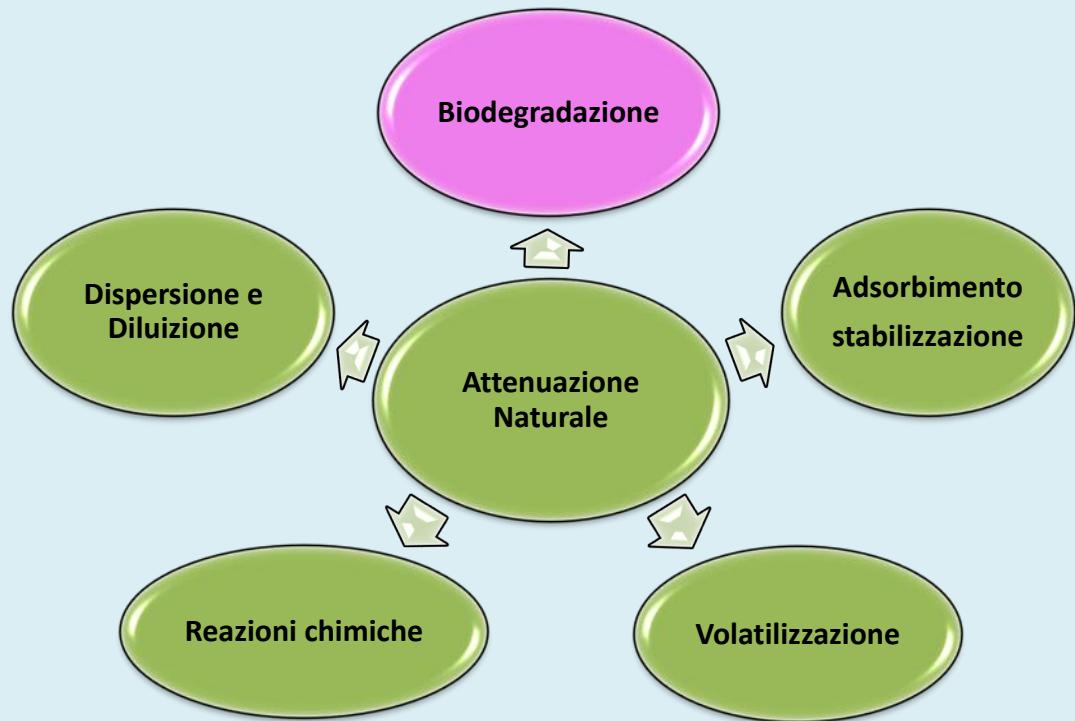
L'Environmental Protection Agency (EPA) definisce l'Attenuazione Naturale come

"il risultato di un insieme di processi fisici, chimici o biologici che si verificano senza nessun intervento umano e riducono, nel tempo, la massa, la tossicità, la mobilità, il volume e la concentrazione di un inquinante nel suolo e nelle acque sotterranee.



Questi processi includono fenomeni fisici e chimici come :

- **dispersione**
- **diluizione**
- **adsorbimento**
- **volatilizzazione**
- **stabilizzazione**
- **distruzione**



ma anche processi di **BIODEGRADAZIONE** compiuti da organismi viventi che, nella maggior parte dei casi, sono microrganismi (batteri e funghi)



I processi biologici naturali (mediati dei batteri) che permettono la degradazione di **solventi clorurati**, possono essere attuati in condizioni

- aerobie
- anaerobie

ed essere di tipo

- metabolico (diretto)
- cometabolico (indiretto).

Un passaggio indispensabile affinchè la degradazione sia attuata è la rimozione dei sostituenti cloro dalla molecola e questo avviene tramite **DEALOGENAZIONE**



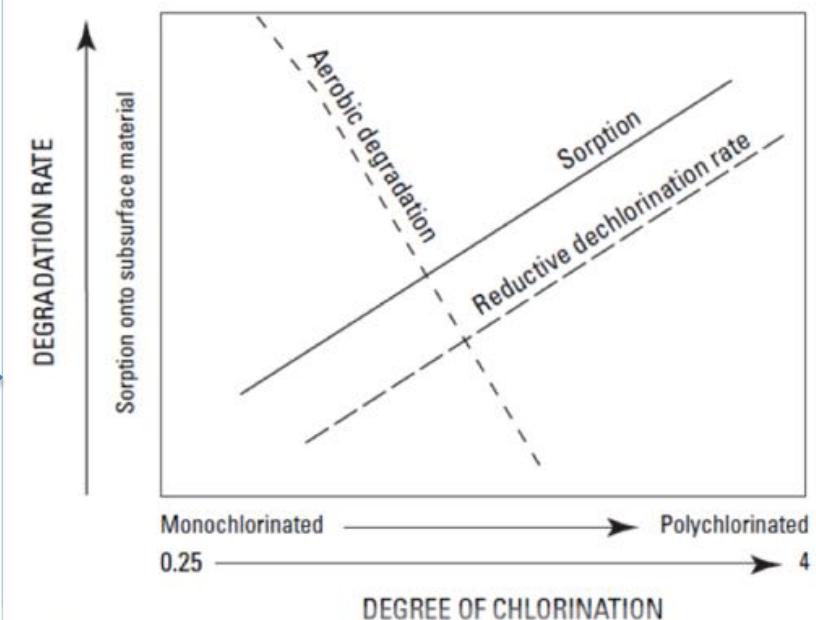
La deaogenazione avviene in reazioni di ossidazione o di riduzione nelle quali il composto alogenato può essere usato come:

1. **donatore** di elettroni e l'ossigeno (in aerobiosi) o i nitrati (in anaerobiosi) come accettori finali.
2. **accettore** di elettroni nel processo anaerobio di *alorespirazione*

Si può inoltre avere una trasformazione co-metabolica dove un enzima non specifico provoca fortuitamente la dealogenazione (in aerobiosi)

la possibilità di degradare in maniera efficiente i composti clorurati, in aerobiosi o anaerobiosi dipende fortemente dal grado di alogenazione della molecola

Relazione tra grado di clorurazione e la dealogenazione riduttiva anaerobica, la dealogenazione aerobica e i fenomeni di adsorbimento (Lawrence et al., 2006).

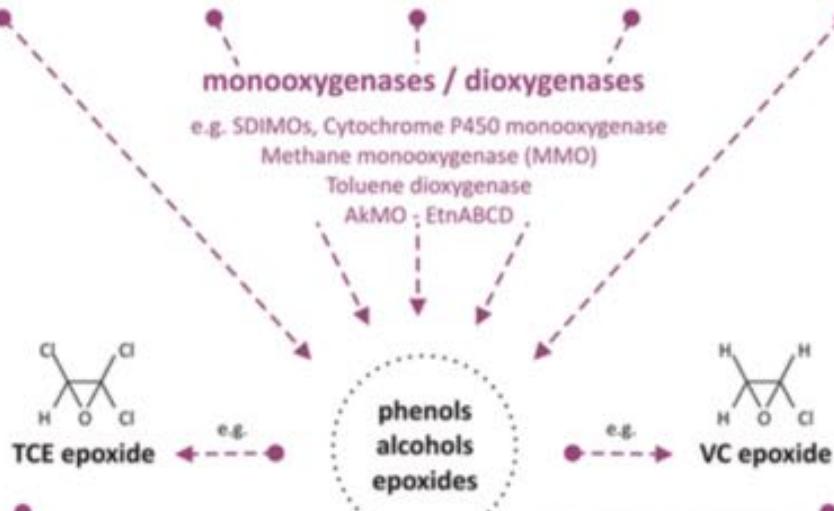
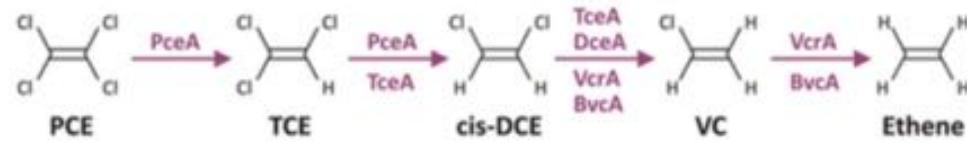


Il grado di clorurazione è il numero di atomi di cloruro diviso per il numero di atomi di carbonio.

I principali meccanismi di degradazione che coinvolgono i microrganismi nella biodegradazione del PCE sono:

- Dealogenazione riduttiva anaerobia
- Dealogenazione ossidativa

La dealogenazione riduttiva si verifica in ambienti anossici mentre la dealogenazione ossidativa in ambienti ossici.



\rightarrow anaerobic reductive dehalogenation
 \rightarrow aerobic metabolic and cometabolic oxidation

Dehalogenazione riduttiva anaerobia

Dehalobacter restrictus strain PER-K23

Dehalobacter restrictus strain TEA

Dehalococcoides sp. strain CBDB1

Dehalococcoides sp. strain FL2

Dehalococcoides sp. strain GT

Dehalococcoides sp. strain UCH007

Dehalococcoides like bacterium VS

Dehalococcoides sp. strain BAV1

Dehalococcoides mccartyi^a strain 11a

Dehalococcoides mccartyi strain 11a5

Dehalococcoides mccartyi strain 195

Dehalococcoides mccartyi strains ANAS1

Dehalococcoides mccartyi strain ANAS2

Dehalococcoides mccartyi strain BTF08

Dehalococcoides mccartyi strain DCMB5

Dehalococcoides mccartyi strain MB

Dehalospirillum multivorans gen. nov., sp. nov

Dehalogenazione ossidativa

Methylobacter sp. strain BB5.1

Methylococcus capsulatus

Methylocystis sp. strain M

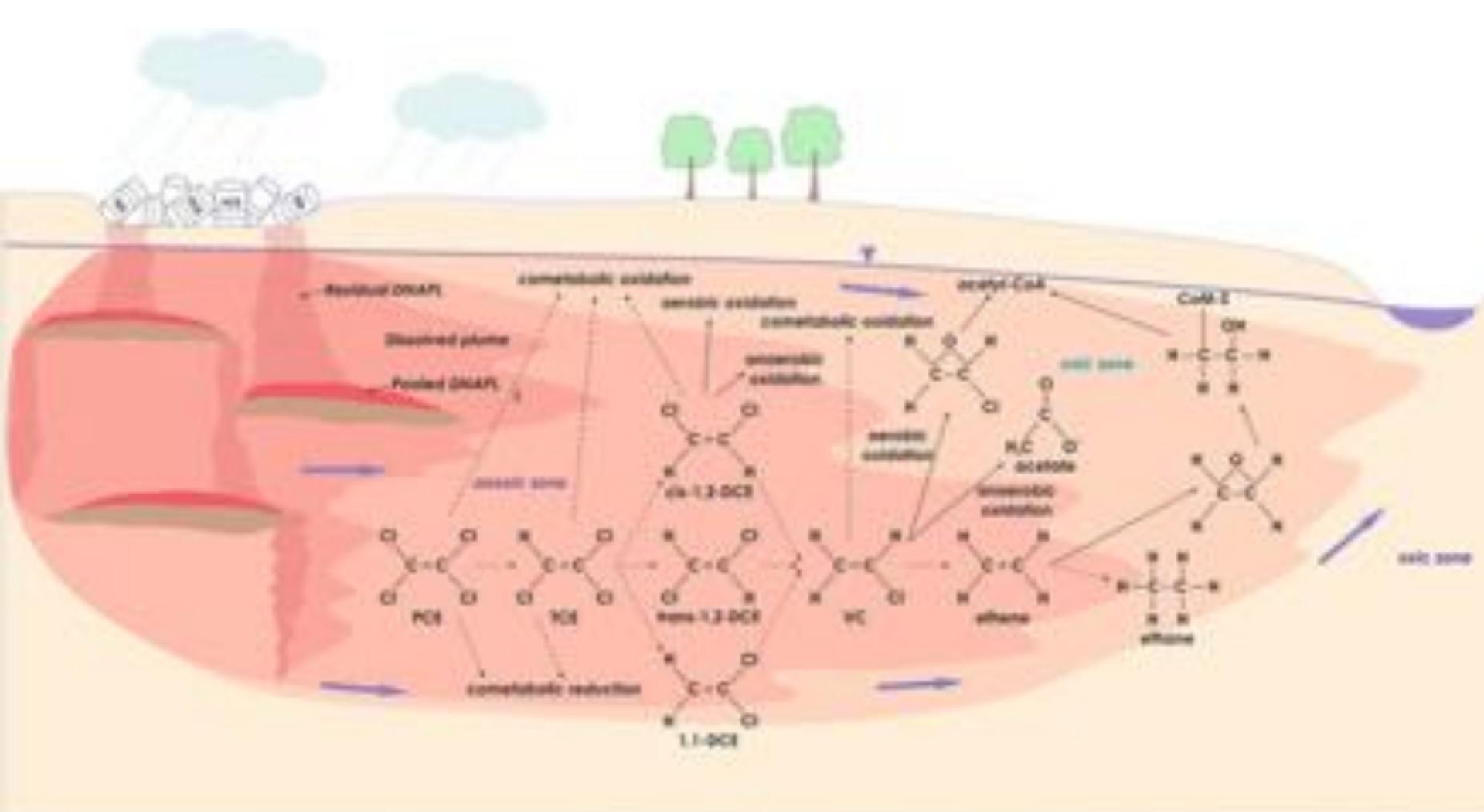
Methylomonas methanica strains KSWIII, KSPIII and KSPII

Methylomonas methanica strain 68-1

Methylosinus sporium strain 27

Methylosinus trichosporium strain OB3b

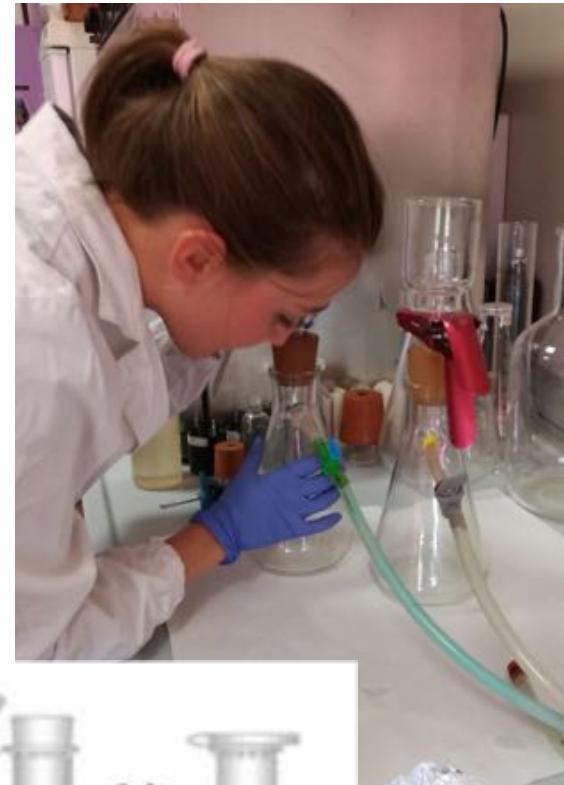
Dolinová, Iva, Martina Štrojsová, Miroslav Černík, Jan Němeček, Jiřina Macháčková, and Alena Ševčů. 2017. "Microbial Degradation of Chloroethenes: A Review." *Environmental Science and Pollution Research* 24 (15):13262-8



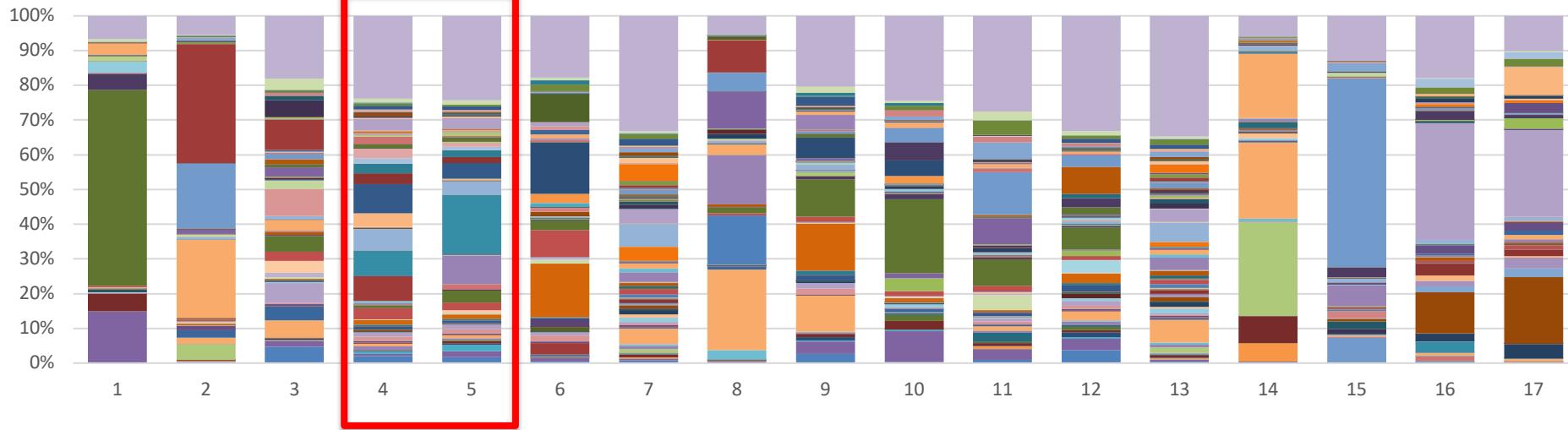
Modello concettuale di un acquifero contaminato da percloroetilene con le relative vie di degradazione biologica
Dolinová, I., Štrojsová, M., Černík, M. et al. Environ Sci Pollut Res (2017)

Analisi metagenomiche e bioinformatiche

- L'estrazione del DNA è stata effettuata con il Kit Fast DNA Spin
- Questo DNA è stata utilizzato per il *profiling* del 16S rDNA dei campioni



60-120 mila sequenze/campione



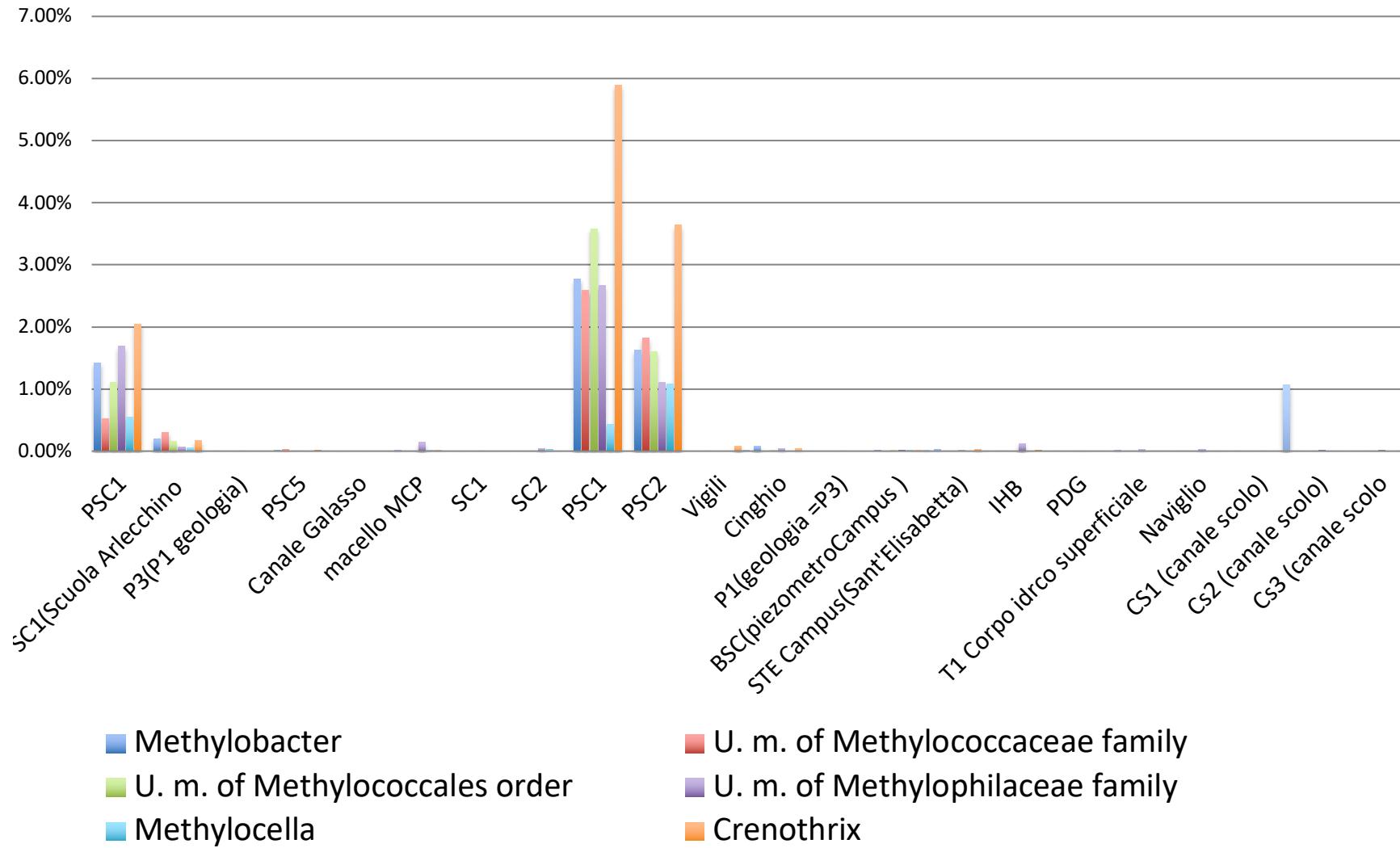
- U. m. of Acidobacteria phylum
- Gaiella
- Prevotella 9
- Fluvicola
- U. m. of Sphaerotilaceae family
- U. m. of Cyanobacteria phylum
- Clostridium sensu stricto 5
- U. m. of Peptostreptococcaceae family
- Gemmatimonadaceae family
- Nitrospira
- U. m. of 4-Org1-14 order
- Shewanella
- Acidovorax
- Leptothrix
- Pseudorhodoferax
- U. m. of Oxalobacteraceae family
- Caulobacter
- Desulfatirhabdium
- Crenothrix
- U. m. of Methylophilaceae family
- Sideroxydans
- Alkanindiges
- Methylocella

- █ U. m. of Actinobacteria phylum
- █ U. m. of Microbacteriaceae family
- █ U. m. of Rikenellaceae family
- █ Flavobacterium
- █ U. m. of Chlorobiaceae family
- █ Virgulinella fragilis
- █ Blautia
- █ Faecalibacterium
- █ U. m. of Gracilibacteria phylum
- █ U. m. of Parcubacteria phylum
- █ Aeromas
- █ Achromobacter
- █ Caenimonas
- █ Limnohabitans
- █ Rhodoferax
- █ Undibacterium
- █ Phenylbacterium
- █ Geobacter
- █ Methylobacter
- █ U. m. of Neisseriaceae family
- █ U. m. of Gallionellaceae family
- █ Perlucidibaca
- █ Hyphomicrobium

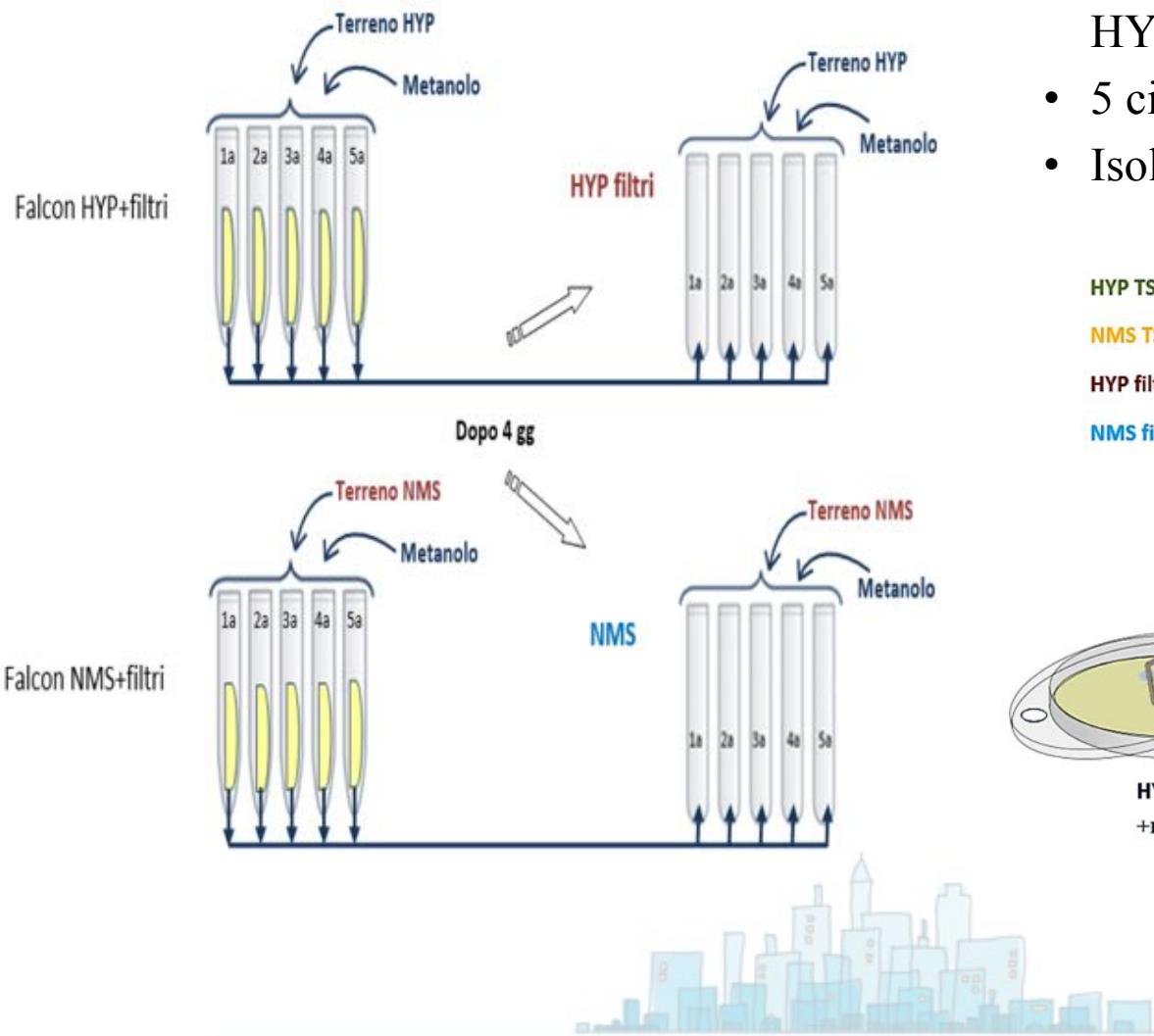
- *Mycobacterium*
- *Nocardioides*
- *Pseudarccicella*
- *Sediminibacterium*
- *U. m. of Anaerolineaceae family*
- *Clostridium sensu stricto 1*
- *U. m. of Lachnospiraceae family*
- *Turicibacter*
- *U. m. of SR-FBR-L83 family*
- *U. m. of Peregrinibacteria phylum*
- *U. m. of Proteobacteria phylum*
- *Pusillimonas*
- *Comamonas*
- *Macromonas*
- *Sphaerotilus*
- *Arcobacter*
- *Cellvibrio*
- *Escherichia-Shigella*
- *U. m. of Methylococcaceae family*
- *Vogesella*
- *U. m. of Nitrosomonadaceae family*
- *Pseudomonas*
- *Ensifer*

Legend for the phylogenetic tree:

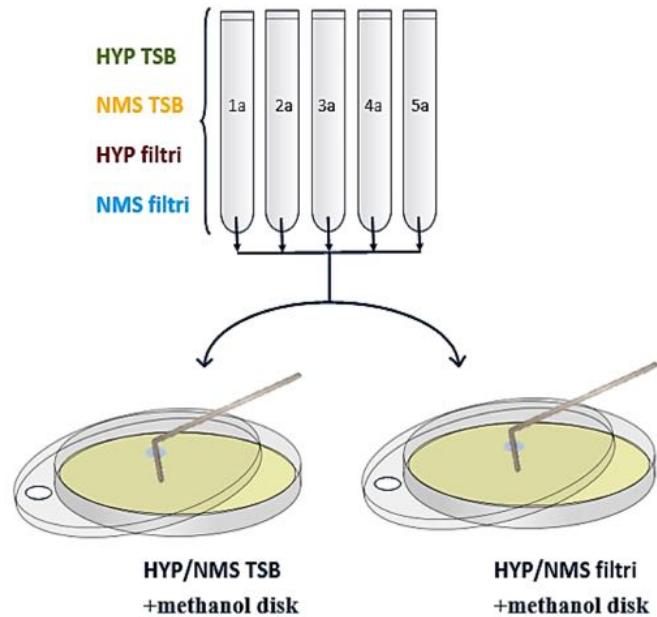
- hgcl clade (Orange)
- U. m. of Elev-16S-1332 family (Dark Blue)
- U. m. of Cytophagaceae family (Purple)
- U. m. of Chitinophagaceae family (Red)
- U. m. of Chloroflexi phylum (Light Blue)
- Clostridium sensu stricto 2 (Dark Green)
- Romboutsia (Dark Orange)
- Streptococcus (Light Orange)
- U. m. of Latescibacteria phylum (Dark Blue)
- U. m. of 195up order (Light Blue)
- Pseudoalteromonas (Light Green)
- Polynucleobacter (Dark Blue)
- Hydrogenophaga (Purple)
- Methylibium (Red)
- U. m. of Comamonadaceae family (Light Blue)
- Helicobacter (Light Blue)
- Rheinheimera (Dark Blue)
- U. m. of CABC2E06 family (Orange)
- U. m. of Methylococcales order (Light Blue)
- Candidatus Nitrotoga (Dark Blue)
- Acinetobacter (Dark Blue)
- U. m. of A0839 family (Red)
- U. m. of Rhizobiales order (Dark Blue)

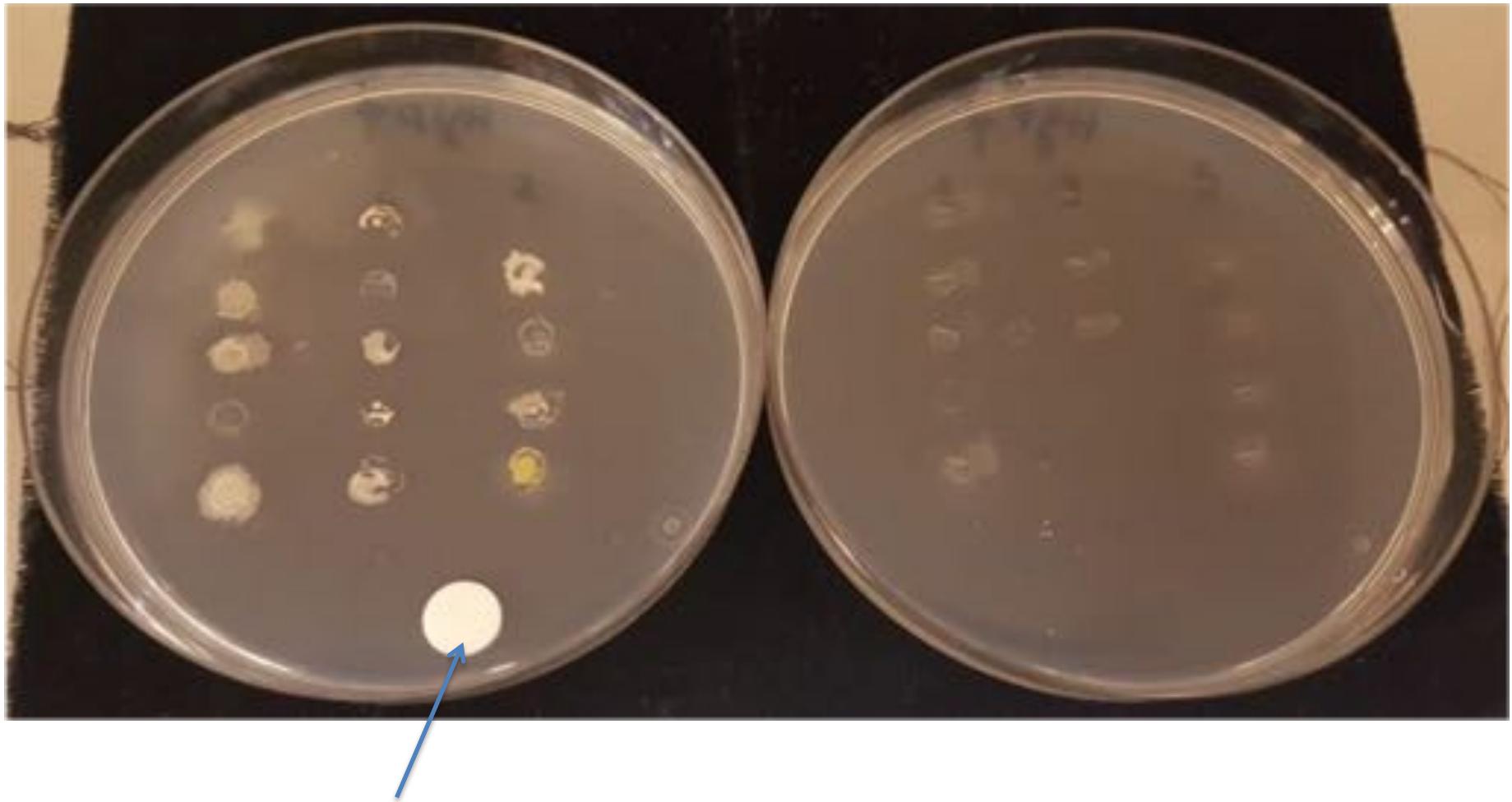


Isolamento dei ceppi batterici



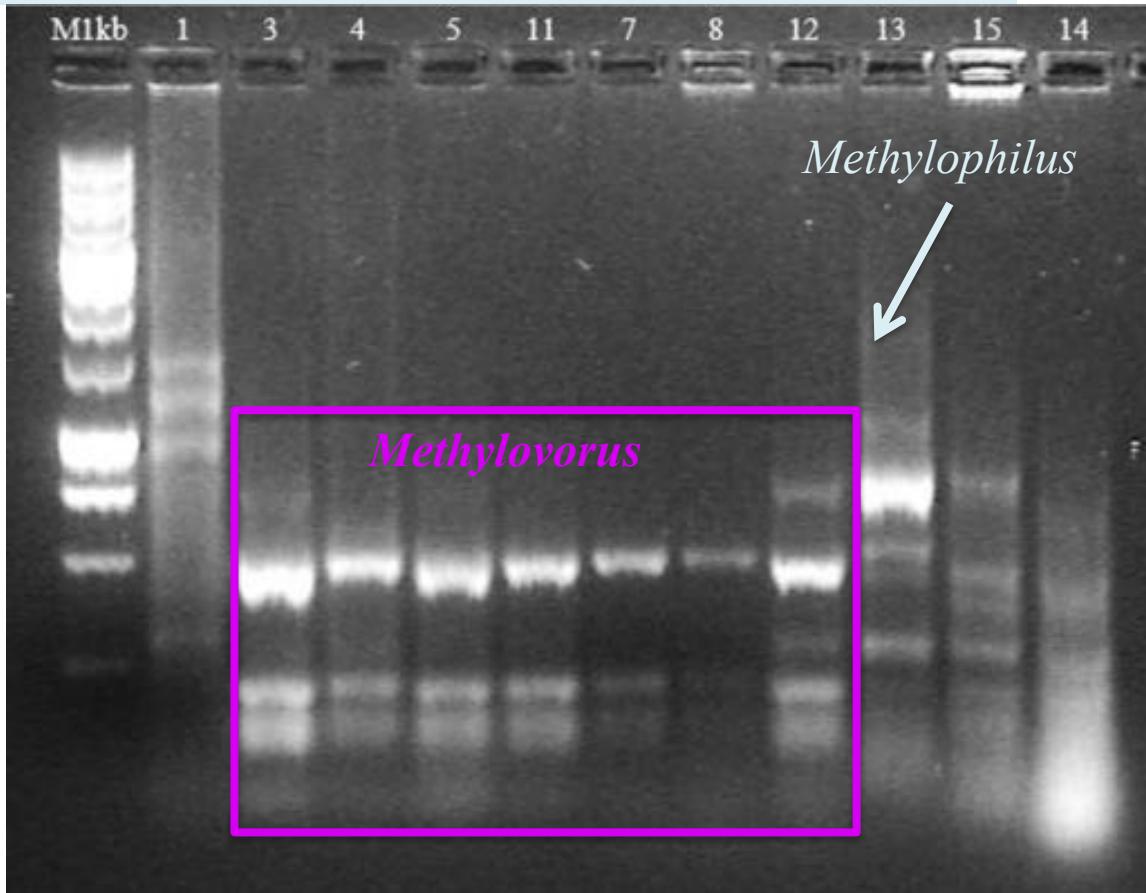
- Filtrazione dei campioni
- Inoculo in due terreni selettivi: HYP e NMS
- 5 cicli di arricchimento
- Isolamento su piastra





metanolo

Analisi ARDRA

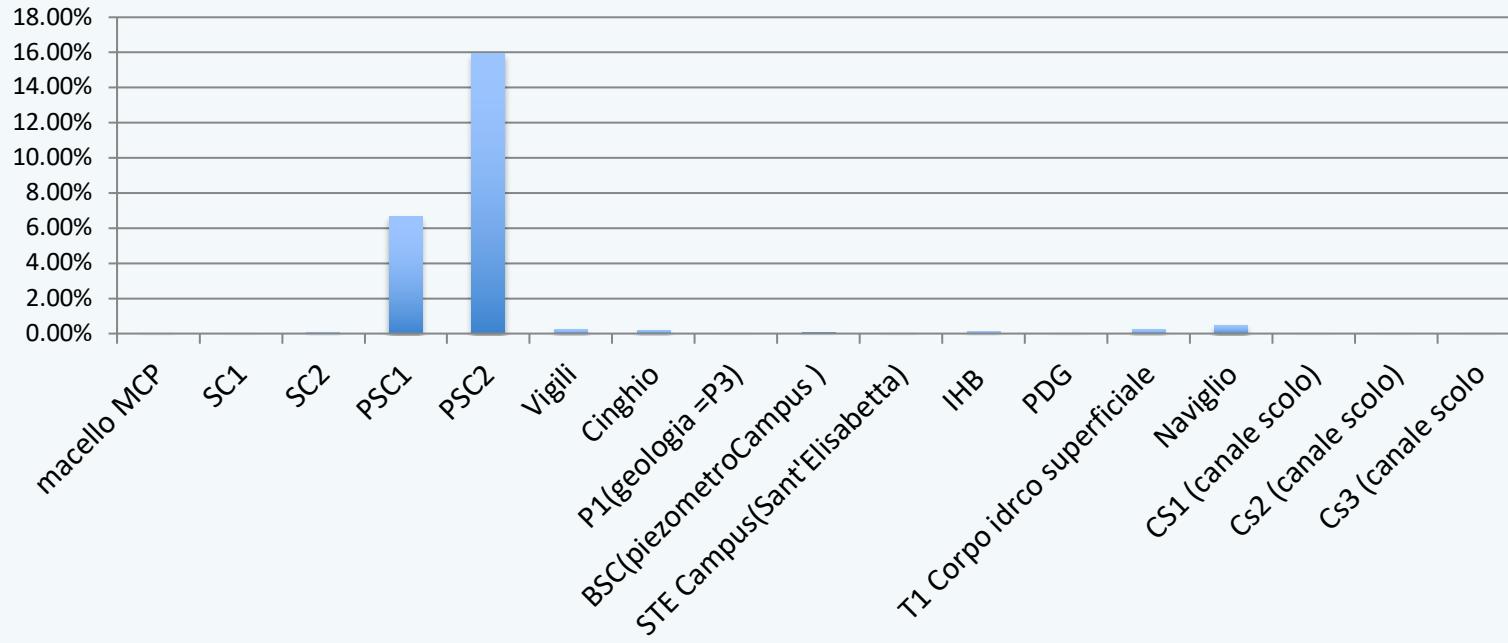


Famiglia delle
Methylophilaceae

Profili di restrizione degli ampliconi 16rDNA di alcuni dei ceppi batterici isolati



Rhodoferax



Paes, F., Liu, X., Mattes, T.E. Alison M. Cupples "Elucidating carbon uptake from vinyl chloride using stable isotope probing and Illumina sequencing" Appl Microbiol Biotechnol (2015) 99: 7735



CONCLUSIONI

- ✧ Attraverso l'analisi delle comunità batteriche si può fare un quadro del potenziale biodegradativo in un ambiente contaminato.
- ✧ Si possono selezionare batteri particolarmente efficiaci nella biodegradazione ed utilizzarli per la BIOAUGMENTATION oppure, semplicemente, incentivarne l'attività tramite l'aggiunta nutrienti e/o ossigeno



GRAZIE A TUTTI PER L'ATTENZIONE

SOLVENTI CLORURATI
NELLE FALDE ACQUIFERE:
IL PROGETTO "AMIIGA"
INTERREG CENTRAL EUROPE
E ALTRE ESPERIENZE REGIONALI

Per informazioni:
Marco Ghirardi - m.ghirardi@comune.parma.it
Andrea Zanini - andrea.zanini@unipr.it

VENERDÌ 4 MAGGIO 2018
Sala conferenze
Centro S. Elisabetta,
Parco Area delle Scienze, 95
Campus Universitario Parma

WWW.INTERREG-CENTRAL.EU/AMIIGA