



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Scienze Molecolari e Biomolecolari  
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche e Farmaceutiche (STEBICEF)  
SSD: BIO/19- Microbiologia

## BIODEGRADAZIONE DEGLI IDROCARBURI: DALLE COMUNITÀ MICROBICHE MARINE AI SISTEMI *READY TO USE* PER IL BIORISANAMENTO

IL DOTTORE  
**VALENTINA CATANIA**

IL COORDINATORE  
**PROF.SSA PATRIZIA DIANA**

IL TUTOR  
**DOTT.SSA PAOLA QUATRINI**

IL CO TUTOR  
**DOTT. SIMONE CAPPELLO**

CICLO XXIX  
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2018



## **Prefazione**

Questa tesi è il risultato del mio Dottorato di Ricerca in Scienze Molecolari e Biomolecolari (XXIX ciclo). Le attività di ricerca sono state svolte presso il laboratorio di Microbiologia Ambientale ed Ecologia Microbica del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF) dell'Università degli Studi di Palermo, nel periodo compreso tra Gennaio 2014 e Maggio 2017. La tesi si colloca nella tematica delle Biotecnologie Blu (o Biotecnologie marine) che si basano sullo sfruttamento delle risorse marine per creare prodotti e applicazioni di interesse industriale.

Questa tesi di Dottorato prende spunto dal Progetto di Ricerca e Formazione (PON01\_03112) “Tecnologie avanzate eco-sostenibili finalizzate alla bonifica ed al ripristino di aree marine costiere degradate” (Progetto TETIDE, <http://www.progettotetide.com/>), progetto di ricerca ad elevata valenza ambientale da sviluppare nel SIN di Priolo (Sicilia). Il progetto si basa sullo sviluppo di tecnologie avanzate per l’ottenimento di prodotti, processi e servizi eco-compatibili ed eco-sostenibili, finalizzati alla realizzazione di interventi di bonifica, risanamento e recupero di ambienti marini costieri alterati da attività antropiche. Molti prodotti e applicazioni delle biotecnologie blu vengono già effettivamente utilizzati nella quotidianità, mentre altri, come il biorisanamento e lo sfruttamento delle potenzialità cataboliche dei microrganismi marini per lo sviluppo di processi e prodotti biotecnologici per il trattamento e la bonifica di aree marine contaminate, sono ancora oggetto di studio e di ricerca. Questo ambito delle biotecnologie ambientali offre grandi opportunità di innovazione raggiungibili solo combinando competenze provenienti da diversi settori come ingegneria, biologia e biotecnologie.

L’attività di ricerca è stata supervisionata dalla Dott.ssa Paola Quatrini, ricercatore presso l'Università degli Studi di Palermo, ed è stata svolta in collaborazione con il Dottore Simone Cappello, Ricercatore presso l’Istituto per l’Ambiente Marino Costiero (IAMC) CNR, della sezione di Messina.

Parte degli esperimenti sono stati effettuati in collaborazione con il Prof. Ing. Roberto Scaffaro del Dipartimento di Ingegneria Civile, Ambientale, Aerospaziale, dei Materiali (DICAM) ed il Dott. Vito Armando Laudicina del Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (SAAF), entrambi dell’Università degli Studi di Palermo.



A mamma, papà, Dario e Andrea



## Scopo del lavoro

Il petrolio è uno dei principali inquinanti ambientali. Una tecnologia promettente per il trattamento di siti contaminati si basa sulla biodegradazione degli inquinanti da parte di popolazioni microbiche capaci di utilizzare gli inquinanti come fonte di carbonio ed energia. Nonostante sia ormai noto che le comunità microbiche idrocarburo-ossidanti di siti contaminati svolgano un ruolo fondamentale nell'attenuazione delle aree impattate, c'è ancora una limitata conoscenza dei processi e dei microrganismi coinvolti nella degradazione degli idrocarburi negli ambienti marini. Per superare questi limiti, è di primaria importanza un maggiore approfondimento sulla diversità filogenetica e funzionale delle comunità microbiche potenzialmente coinvolte nella biodegradazione degli idrocarburi. Le ricerche condotte negli ultimi anni hanno dimostrato che i siti altamente contaminati sono inestimabili fonti inesplorate di microrganismi con un alto potenziale per lo studio dei processi di biorisanamento e per lo sviluppo di nuove strategie nell'ambito del risanamento ambientale.

Il Mar Mediterraneo è un'area particolarmente a rischio per l'inquinamento da idrocarburi a causa della sua natura fisica; si tratta di un bacino chiuso con un lento turnover di acqua che ospita circa il 20% del traffico petrolifero globale e decine di siti di lavorazione del petrolio lungo le sue coste. Lo studio di siti del Mar Mediterraneo cronicamente inquinati dovrebbe portare alla scoperta di nuove risorse biologiche sfruttabili per gli approcci di biorisanamento.

La rada di Augusta, localizzata in Sicilia nel Mar Mediterraneo orientale, è compresa nella fascia costiera interessata dalle attività del polo petrolchimico di Priolo-Melilli-Augusta. Le caratterizzazioni ambientali hanno identificato la rada di Augusta come un sito ad elevata criticità, a causa della presenza di sedimenti fortemente contaminati da mercurio (Hg), idrocarburi pesanti, esaclorobenzene (HCB), policlorobifenili (PCB), diossine e furani (PCDD/F), derivanti dalle attività pregresse e/o ancora in corso (ISPRA, 2010). La Baia di Priolo, adiacente al Porto di Augusta all'interno della rada di Augusta è stata dichiarata nel 1990 dal Ministero dell'Ambiente "Area di elevato rischio di crisi ambientale" e costituisce un Sito di Interesse Nazionale. La caratterizzazione delle comunità microbiche idrocarburo-ossidanti presenti nel sito, e l'analisi dei sistemi catabolici di specie batteriche autoctone ad alto potenziale biodegradativo risultano importanti sia per una ipotetica realizzazione di interventi ottimali di biorisanamento, sia per ampliare le conoscenze di base sui meccanismi di biodegradazione degli idrocarburi.

L'obiettivo di questa tesi di Dottorato è stato quello di valutare il potenziale di biorisanamento di batteri degradatori di idrocarburi tramite:

- i) Lo studio dell'effetto di contaminazioni croniche da idrocarburi sulle comunità microbiche di acqua di mare, sedimento superficiale (0-5cm) e sub-superficiale (5-10cm) della Baia di Priolo
- ii) La Caratterizzazione fisiologica e metabolica di *Oleibacter marinus*, batterio degradatore di idrocarburi alifatici, poco caratterizzato, isolato di recente in mari tropicali e per la prima volta nel Mar Mediterraneo da uno dei campioni di acqua del Baia di Priolo durante l'analisi delle comunità microbiche



- iii) La messa a punto e la valutazione di un nuovo sistema biotecnologico *ready to use*, in collaborazione con ingegneri dei materiali, basato su biopolimeri biodegradabili per la bioremediation di acque contaminate da idrocarburi.

Il capitolo I di questa tesi di dottorato è lo stato dell'arte sulla biodegradazione degli idrocarburi in ambiente marino.

Il Capitolo II è focalizzato sull'analisi della diversità microbica e sul potenziale biodegradativo della Baia di Priolo, e si basa sulla descrizione della struttura delle comunità microbiche che popolano l'acqua di mare e i sedimenti di quest'area altamente contaminata.

Il capitolo III si focalizza sull'analisi filogenetica e funzionale di tre isolati batterici appartenenti al genere *Oleibacter marinus*, un batterio marino idrocarburoclasto ancora poco noto.

Il capitolo IV descrive un sistema biotecnologico innovativo, pronto all'uso, basato sull'immobilizzazione di cellule batteriche idrocarburo-ossidanti su supporti carrier biodegradabili, da utilizzare per applicazioni di biorisanamento in situ ed ex situ di acque contaminate da idrocarburi.

## Abstract

Crude oil is one of the major hazardous pollutants. A promising technology for the treatment of contaminated sites is based on biodegradation of oil pollutants by microbial populations. Several microorganisms are known to use hydrocarbons as carbon sources. In the marine environment, obligate hydrocarbonoclastic bacteria (BIC) have been defined as being ecologically important for the aerobic removal of hydrocarbons. Recent advances in microbial ecology make it possible to combine molecular and culture-dependent approaches to identify bacterial community at environmental sites. In this thesis a microbiological survey of the Priolo Bay (eastern coast of Sicily, Ionian Sea), a chronically polluted marine coastal area, was carried out in order to discern its intrinsic bioremediation potential. Microbiological analysis, 16S rDNA-based Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) fingerprinting and analysis of hydrocarbons were performed on seawater, superficial sediment (0-5cm) and sub-superficial sediment (5-10 cm) samples from six stations on two transects. The analysis of organic contaminants revealed high concentrations of total hydrocarbons (HC) represented mainly by aliphatic hydrocarbons in all samples. High levels of Unresolved Complex Mixture of hydrocarbons (UCMs) were detected in sub-superficial sediments. The Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis showed higher diversity and variability in superficial sediment than in water samples although seawater contains higher diversity of culturable hydrocarbon-degrading bacteria. Random sequencing of the DGGE bands revealed the presence of Alpha, Gammaproteobacteria, and uncultured Firmicutes HC degraders. A collection of 258 isolates, adapted to grow on mineral medium supplemented with crude oil as unique carbon source, was obtained from superficial sediments and seawater samples. The 16S rRNA analysis showed the presence of Gammaproteobacteria affiliated to genera of obligate hydrocarbonoclastic bacteria (*Alcanivorax*) and/or to generalist HC-degraders (*Marinobacter*, *Thalassospira*, *Alteromonas*) and *Oleibacter* (first isolation from the Mediterranean area). The HC-degrading microbial communities in sub-superficial sediment, generally operating under microaerophilic conditions are still not well understood. The microbial (archaea and bacteria) communities and metabolic potential in sub-superficial sediment of Priolo Bay was investigated. Bacterial communities show lower phylogenetic diversity than those of the superficial layer 0-5 cm but retain biodegradation capacities towards crude oil n-alkanes as shown by oil supplemented microcosms experiments. The DGGE analysis revealed that the bacterial communities responded to oil supplementation with a significant reduction in biodiversity and a shift in the composition that was different for each sampling station. Random sequencing of DGGE bands revealed the presence of obligate and generalist HC-degrading Gammaproteobacteria (*Halomonas*, *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*), Alphaproteobacteria (*Thalassospira*), genera frequently detected in oiled sediments (*Idiomarina*), anaerobic nitrate-reducers (*Vallitalea*) and sulphate-reducers (*Peptoniphilus*). Most of the detected bacteria were also isolated in pure culture. Interestingly Epsilonproteobacteria, exclusively represented by the genus *Arcobacter*, were identified in a unique sample. The composition of microbial communities inhabiting sub-superficial contaminated sediment shows features in communities with communities of subsurface petroleum reservoirs, produced water and hypersaline environments, where syntrophic degradation between HC



degrading bacteria and archaea has been proposed. The archaeal DGGE profiles exhibited a limited diversity and were less influenced by supplementing of oil. Random sequencing of DGGE bands revealed the presence of Crenarchaeota and Thaumarchaeota, identified in contaminated habitat. The subsuperficial sediment retain high biodegradation capacities and host hydrocarbon (HC) degraders that were isolated and identified. The presence of catabolic genes involved in the degradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons was investigated by cloning and sequencing of amplified fragments. The retrieved alkane-monooxygenase (*alkB*) gene sequences clustered with those of uncultivated bacteria detected in many polluted marine sediments. Overall the results obtained on the characterization of microbial communities reveal that the Priolo bay hosts a rich community of HC degraders known for catabolic potentials which could contribute to natural attenuation of the area.

Among the Priolo isolates, particularly interesting appears the isolation of *Oleibacter marinus* by enrichment culture on a n-alkane mixture (C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>24</sub>) from seawater, sampled at station N3. The strains belonging to the genus *Oleibacter* was described until now as a major degrader of petroleum aliphatic hydrocarbon spills and these isolates were further characterized as the first in tropical seas. The phylogenetic analyses of the strains, designated *Oleibacter* 3, 4 and 5, revealed that the isolates show 98-99% identity of their 16S rRNA gene with *Oleibacter marinus* type strain 201<sup>T</sup>. A fragment of the alkane monooxygenase encoding gene *alkB*, shows 76% identity with that of *Pseudomonas nitroreducens* and, among Oceanospirillaceae, with *Thalassolituus oleivorans* *alkB* gene (73% id.). The isolates grow on crude oil and n-alkanes and also on a limited number of C sources. Crude oil degradation, measured by Gas-Chromatography-FID analysis, is in the range of 82-99% of short and medium size chain n-alkanes. Low bio-surfactant production has been observed with three different methods (E24, drops collapse, oil spreading). The fatty acid methyl esters (FAMES) of *Oleibacter marinus* 3, 4, 5 were detected by GC-FID analysis. *Oleibacter* and other Oceanobacter-related bacteria dominate in crude-oil impacted tropical seawater and their hydrocarbon-degradation activity was compared to that of the genus *Alcanivorax* with which they could compete. *Oleibacter marinus* might have a future key role in bioremediation of marine environments.

In the last few years, the application of biotechnological processes that involving HC-degrading microorganisms, with the objective of solving environmental pollution problems, is rapidly growing. The use of immobilized cells has been investigated as an alternative technology for environmental applications.

A novel biotechnological system based on immobilization of *Oleibacter marinus* and other hydrocarbon-degrading bacterial isolates (*Alcanivorax* SK2., *Gordonia* SoCg., *Nocardia* SoB) on biodegradable carrier (3D polycaprolactone scaffold, polylactic acid (PLA) and polycaprolactone (PCL) membranes), was developed to clean (sea)water contaminated by crude oil and its derivatives. A high capacity of adhesion and proliferation of bacterial cells within the whole three-dimensional structure of scaffold was observed after 48 h. The bacterial strains were able to attach to the PLA and PCL membranes using scanning electron microscopy (SEM) after 48h, reaching high proliferation and biofilm formation within the whole structure in 5 days. The biodegradation efficiency of HC-embedded scaffold and bacteria-



membrane-systems was tested by GC-FID analysis and compared with planktonic cells. More than 50% of crude oil was removed by bacterial strains immobilized in biodegradable polycaprolactone (PCL) 3D scaffold, polylactic acid (PLA) and polycaprolactone (PCL) membranes; the degradative ability was between 7% and 20% higher than that of planktonic cells. The bacterial immobilization is a promoting factor for biodegradation and a novel ready to use system can be developed for promising tools for bioremediation of aquatic systems.

**INDICE**

Scopo del lavoro	Pagina 1
Abstract	Pagina 3
<b>CAPITOLO I: Introduzione</b>	
1.1 Inquinamento da petrolio in mare	Pagina 9
1.2 Rimozione degli idrocarburi del petrolio: metodi fisico-chimici e metodi biologici	Pagina 11
1.3 Microorganismi degradatori di idrocarburi	Pagina 12
1.4 Batteri marini degradatori di idrocarburi	Pagina 14
1.5 Fattori che influenzano la biodegradazione	Pagina 15
1.6 Pathway della degradazione degli idrocarburi	Pagina 16
1.6.1 Biodegradazione aerobia dei composti alifatici	Pagina 16
1.6.2 Biodegradazione dei composti aromatici in aerobiosi	Pagina 18
1.6.3 Biodegradazione anaerobica degli idrocarburi	Pagina 19
1.7 Sistemi alcano idrossilasi e organismi modello	Pagina 20
1.8 Sistemi degradatori di HC aromatici e organismi modello	Pagina 23
1.9 Interazioni microbiche durante la biodegradazione in mare	Pagina 25
1.10 Metodi di studio delle comunità microbiche idrocarburo ossidanti	Pagina 26
<b>CAPITOLO II: Il potenziale di biorisanamento della Baia di Priolo</b>	
Abstract	Pagina 28
2.1 Introduzione	Pagina 29
2.1.1 L'inquinamento da petrolio nel Mar Mediterraneo	Pagina 29
2.1.2 Scopo del lavoro	Pagina 30
2.2 Materiali e metodi	Pagina 31
2.2.1 Area di studio e campionamento	Pagina 31
2.2.2 Analisi degli idrocarburi nei sedimenti	Pagina 32
2.2.3 Misure di abbondanza microbica in acqua e sedimento superficiale	Pagina 32
2.2.3.1 <i>Abbondanza batterica totale (conta diretta in fulorescenza DAPI)</i>	Pagina 32
2.2.3.2 <i>Batteri coltivabili (CFU)</i>	Pagina 33
2.2.3.3 <i>Numero più probabile (MPN)</i>	Pagina 33
2.2.4 Set-up di microcosmi e biodegradazione degli idrocarburi nel sedimento sub-superficiale	Pagina 33
2.2.5 Analisi della comunità microbica di acqua e sedimenti	Pagina 33
2.2.5.1 <i>Estrazione di DNA</i>	Pagina 34
2.2.5.2 <i>PCR-DGGE</i>	Pagina 34
2.2.6 Isolamento di batteri idrocarburo ossidanti da acqua e sedimenti	Pagina 35
2.2.7 Identificazione degli isolati idrocarburo-ossidanti	Pagina 35
2.2.8 Analisi delle capacità degradative di batteri idrocarburo-ossidanti di acqua e sedimento superficiale	Pagina 36
2.2.9 Produzione di biosurfattanti	Pagina 36
2.2.9.1 <i>Misura della tensione superficiale</i>	Pagina 36
2.2.9.2 <i>Misura dell'attività di emulsificazione</i>	Pagina 36
2.2.9.3 <i>Drop collapse test</i>	Pagina 36
2.2.9.4 <i>CTAB Agar Plate</i>	Pagina 37
2.2.10 Analisi di geni catabolici di batteri idrocarburo-ossidanti	Pagina 37
2.2.11 Libreria del gene 16S rRNA dal microcosmo S5 del sedimento sub-superficiale	Pagina 37
2.2.12 Analisi di geni catabolici nei sedimenti sub-superficiale	Pagina 38
2.3 Risultati e discussione	Pagina 39
2.3.1 Contaminazione da idrocarburi nel sedimento superficiale	Pagina 39
2.3.2 Abbondanza microbica di acqua e sedimento superficiale	Pagina 40
2.3.3 Diversità batterica di acqua e sedimento superficiale	Pagina 40

2.3.4 Batteri degradatori di idrocarburi da acqua e sedimento superficiale	Pagina 42
2.3.5 Analisi del potenziale biodegradativo di batteri idrocarburo-ossidanti di acqua e sedimento superficiale	Pagina 46
2.3.6 Contaminazione da idrocarburi nel sedimento sub-superficiale	Pagina 47
2.3.7 Biodegradazione del petrolio nel sedimento sub-superficiale in microcosmo	Pagina 48
2.3.8 Diversità di archaea e batteri nel sedimento sub-superficiale	Pagina 48
2.3.9 Gli Epsilonbacteria dominano il microcosmo S5	Pagina 53
2.3.10 Identificazione di geni catabolici nei sedimenti sub-superficiali	Pagina 54
2.3.11 Isolamento e identificazione dei batteri degradatori di HC da sedimento sub-superficiale	Pagina 55
2.4 Conclusioni	Pagina 57
<b>CAPITOLO III: Caratterizzazione di tre ceppi di <i>Oleibacter marinus</i> isolati per la prima volta nel Mar Mediterraneo</b>	
Abstract	Pagina 58
3.1 Introduzione	Pagina 59
3.1.1 Descrizione di <i>Oleibacter marinus</i> , nuovo genere degradatore di idrocarburi alifatici in ambiente marini tropicali	Pagina 59
3.1.2 Scopo del lavoro	Pagina 62
3.2 Materiali e metodi	Pagina 62
3.2.1 Ceppi batterici	Pagina 63
3.2.2 Analisi del gene 16S rRNA, costruzione dell'albero filogenetico e biogeografia	Pagina 63
3.2.3 Analisi degli acidi grassi	Pagina 64
3.2.4 Utilizzazione degli idrocarburi	Pagina 65
3.2.5 Curva di crescita su esadecano	Pagina 65
3.2.6 Capacità degradative	Pagina 65
3.2.7 Produzione di biosurfattanti	Pagina 66
3.2.7.1 <i>Drop collapsing test</i>	Pagina 66
3.2.7.2 <i>Test EA24 (emulsification activity)</i>	Pagina 66
3.2.7.3 <i>Oil spreading test</i>	Pagina 67
3.2.8 Amplificazione del gene catabolico <i>alkB</i>	Pagina 67
3.3 Risultati	Pagina 68
3.3.1 Analisi filogenetica di <i>Oleibacter marinus</i>	Pagina 68
3.3.2 Analisi del profilo degli acidi grassi	Pagina 70
3.3.3 fingerprinting di utilizzazione degli idrocarburi	Pagina 71
3.3.4 Curve di crescita su esadecano	Pagina 72
3.3.5 Capacità degradative	Pagina 73
3.3.6 Produzione di biosurfattanti	Pagina 74
3.3.6.1 <i>Drop collapsing test</i>	Pagina 74
3.3.6.2 <i>Test EA24 (emulsification activity)</i>	Pagina 74
3.3.6.3 <i>Test oil spreading</i>	Pagina 75
3.3.7 Identificazione del gene catabolico <i>alkB</i>	Pagina 75
3.4 Conclusioni	Pagina 77
<b>CAPITOLO IV: Sistemi innovativi per il biorisanamento di acqua contaminate</b>	
Abstract	Pagina 79
4.1 Introduzione	Pagina 80
4.1.1 Approcci di biorisanamento	Pagina 80
4.1.2 Biorisanamento basato sull'immobilizzazione di batteri HC-ossidanti	Pagina 81
4.1.3 Tecniche di immobilizzazione dei batteri idrocarburo-ossidanti	Pagina 81
4.1.3.1 <i>Adsorbimento</i>	Pagina 81
4.1.3.2 <i>Legame su una superficie</i>	Pagina 82
4.1.3.3 <i>Intrappolamento in matrici porose</i>	Pagina 82
4.1.3.4 <i>incapsulamento</i>	Pagina 82
4.1.4 I carrier per il biorisanamento	Pagina 82



4.2 Scopo del lavoro	Pagina 84
4.3 Materiali e Metodi	Pagina 85
4.3.1 Carrier biodegradabili	Pagina 85
4.3.2 Ceppi idrocarburo-ossidanti	Pagina 86
4.3.3 Sterilizzazione dei carrier	Pagina 86
4.3.4 Immobilizzazione delle cellule batteriche e analisi al SEM (scanning electron microscopy)	Pagina 86
4.3.5 Esperimenti di degradazione del petrolio in microcosmo	Pagina 87
4.3.5.1 Preparazione del sistema carrier-batteri	Pagina 87
4.3.5.2 Analisi GC-FID	Pagina 87
4.4 Risultati e discussione	Pagina 89
4.4.1 <i>Colonizzazione batterica</i>	Pagina 89
4.4.2 <i>Efficienza di biodegradazione delle cellule immobilizzate</i>	Pagina 93
4.5 Conclusioni	Pagina 96
Conclusioni generali	Pagina 98
Ringraziamenti	Pagina 100
Bibliografia	Pagina 101

## Capitolo I

### Introduzione

#### 1.1 Inquinamento da petrolio in mare

Il petrolio, in qualità di fonte di energia trasportabile e facilmente utilizzabile, è considerato sin dall'inizio del XX secolo, una delle materie prime più importanti del mondo tale da essere noto con il nome di “oro nero”. Il petrolio è una miscela naturale ed eterogenea di idrocarburi rappresentate principalmente da alcani a differente lunghezza di catena e differenti punti di ramificazioni, ciclo-alcani, idrocarburi mono-aromatici o policiclici aromatici (IPA) (Fig.1.1). Altre componenti presenti nel petrolio in minore percentuale rispetto agli idrocarburi sono rappresentate da resine e asfaltini, che contengono azoto, zolfo e ossigeno, mentre fosforo e metalli pesanti, come nickel e vanadio, possono essere presenti in tracce. La composizione del petrolio varia ampiamente a seconda del tipo di greggio e ogni componente presente ha diverse proprietà fisico-chimiche, compresa viscosità, solubilità e capacità di assorbimento, nonché biodisponibilità e tossicità (McGenety 2014).

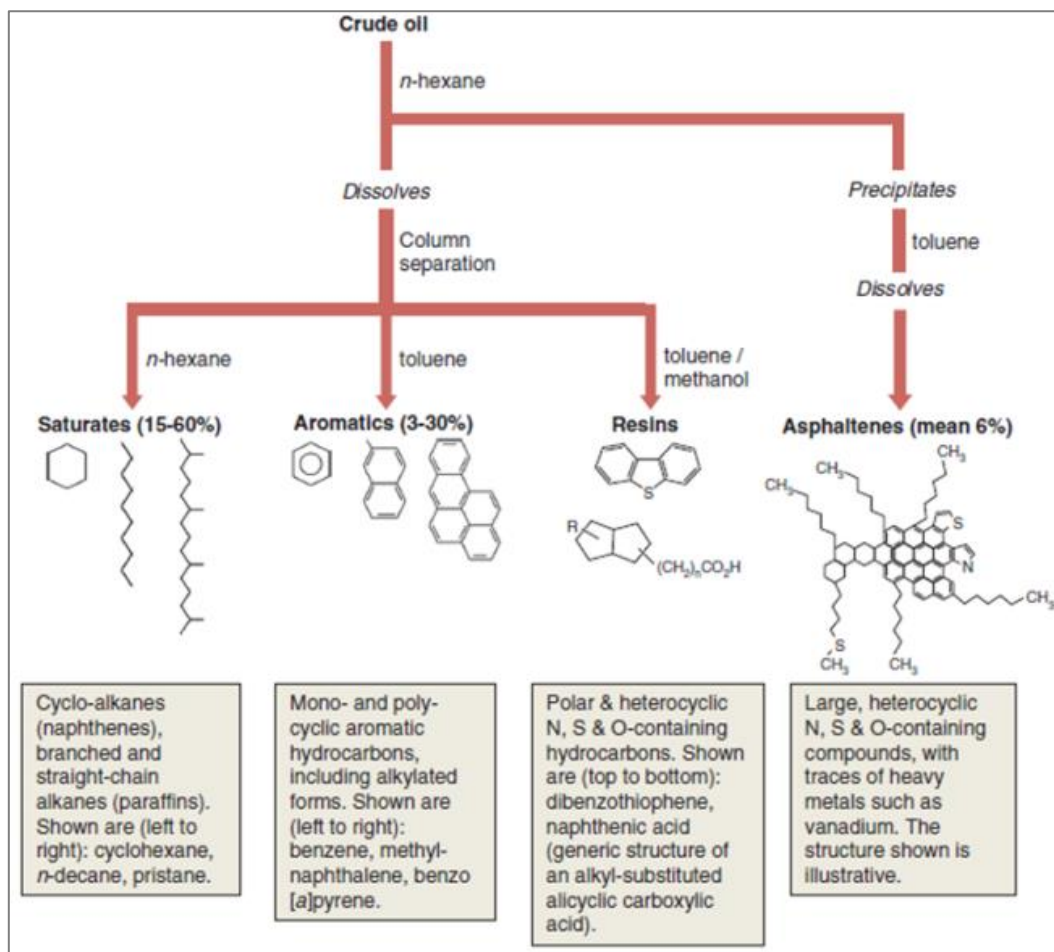
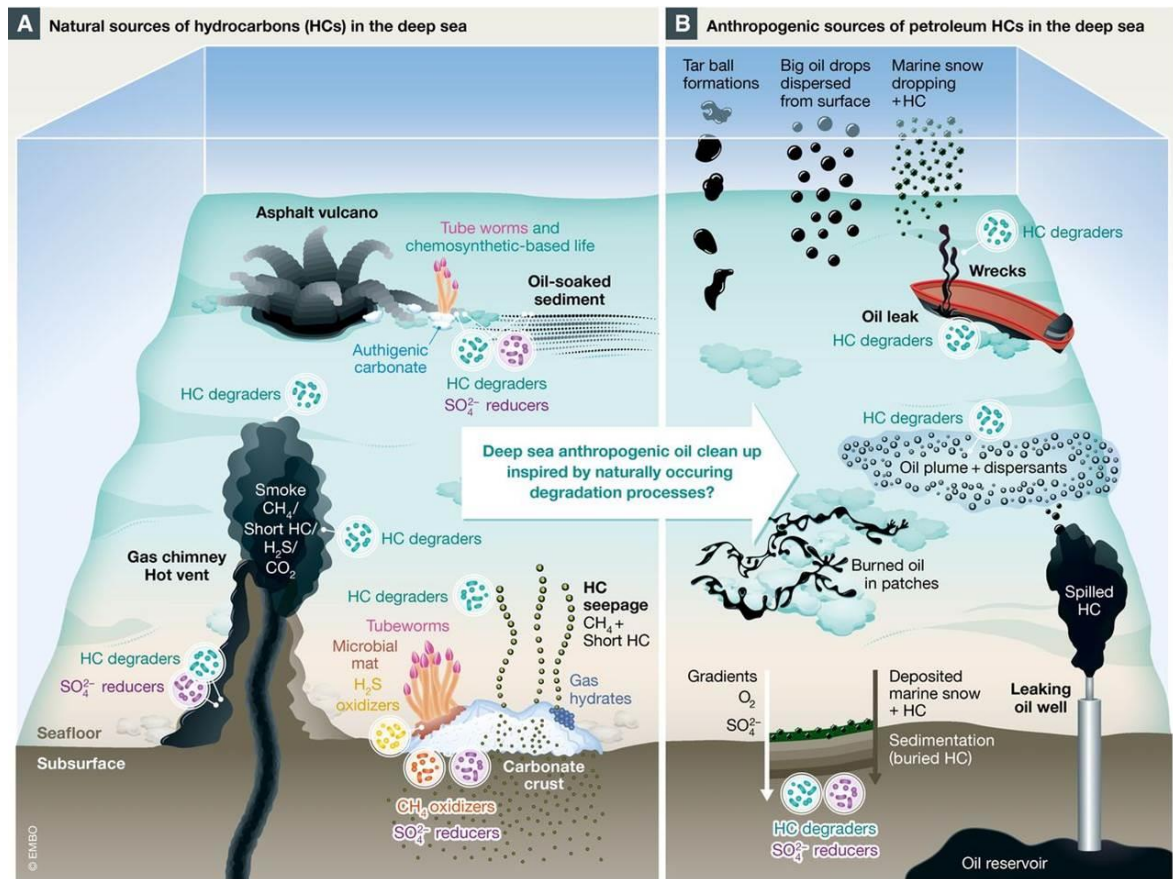


Fig. 1.1 Classificazione delle principali componenti del petrolio greggio basati sul sistema SARA (Saturati-Aromatici-Resine-Asfalti) (McGenety 2014).

Nonostante gli idrocarburi del petrolio siano importanti risorse energetiche e una delle materie prime per diversi tipi di industrie, sono classificati come inquinanti prioritari. Molti costituenti come il benzene, toluene, etilbenzene e xilene (BTEX) e gli IPA risultano recalcitranti e altamente tossici per la presenza di componenti emotossici, cancerogeni e teratogeni (Zhang et al., 2011; Costa et al., 2012; Chandra et al., 2013; Souza et al., 2014; Meckenstock et al., 2016); così come gli acidi naftenici (costituiti principalmente da acidi carbossilici alicicli sostituiti alchilici) che costituiscono anche l'1% del petrolio greggio. Effetti acuti o cronici e diretti/indiretti sono stati riportati in precedenza in animali marini (Chandra et al., 2013; Meckenstock et al., 2016). Alterazioni nelle reazioni metaboliche e nell'equilibrio ormonale sono considerate come effetti diretti/indiretti (Souza et al., 2014), mentre mortalità acuta, necrosi, ipotermia, sono alcuni degli impatti a breve termine (Varjani 2017). Questi effetti causano cambiamenti in una popolazione o comunità e quindi possono causare modifiche dell'intero ecosistema (Walker 2006).

Si stima che 1.3 milioni di tonnellate di petrolio entrano nell'ambiente marino ogni anno sia da fonti naturali (es. cold seeps), che rilasciano basse e croniche quantità di idrocarburi, sia da fonti antropogeniche, che causano invece un apporto massiccio di petrolio di circa 120 milioni di litri all'anno (McGenety et al., 2012, Scoma et al., 2017). Veri e propri disastri ambientali sono avvenuti negli ultimi decenni con conseguenze ambientali devastanti, tra i più recenti l'esplosione della piattaforma petrolifera Deepwater Horizon, avvenuta nel 2010, che ha causato la fuoriuscita di circa 600.000 tonnellate di petrolio nel Golfo del Messico, e l'affondamento della petroliera Prestige, al largo delle coste spagnole nel 2002, che ha riversato in mare più di 70.000 tonnellate di greggio (de la Huz et al. 2005).

Il destino che il petrolio segue una volta raggiunto l'ambiente marino dipende dai fattori ambientali quali temperatura, correnti oceaniche e altre condizioni meteorologiche (Atlas, 1981, Widdel e Rabus, 2001). Il petrolio è sottoposto a diversi processi come diffusione, evaporazione, dispersione, affondamento, dissoluzione, emulsificazione, foto-ossidazione, affioramento, formazione di "tar ball" e biodegradazione (Al-Majed et al., 2012; Souza et al., 2014) (Fig. 1.2). Nel processo di biodegradazione i microrganismi presenti nell'ambiente marino utilizzano gli inquinanti organici come principale o unica fonte di carbonio e di energia convertendoli, tramite un processo di ossidazione step by step, in CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e biomassa (Varjani 2017). La biodegradazione ad opera dei microrganismi rappresenta uno dei meccanismi principali con cui il petrolio e altri contaminanti vengono rimossi dall'ambiente marino. E' importante sottolineare che le immissioni nell'ambiente marino di idrocarburi dovute a cause naturali (es. cold seep), costituiscono una percentuale minima che viene utilizzata come fonte di nutrimento da una vasta gamma di microrganismi, che sono pertanto capaci di operarne uno smaltimento naturale (Head et al., 2006; Yakimov et al., 2007). Al contrario, il massivo contributo antropico supera di gran lunga le capacità biodegradative proprie della flora e della fauna marina. Nonostante ciò, il fatto che la crosta terrestre e gli oceani non siano inondata dal petrolio testimonia l'efficienza e la versatilità delle reti di microrganismi che degradano idrocarburi, alcuni dei quali hanno recentemente iniziato a rivelare i segreti di come e quando sfruttano idrocarburi come fonte di carbonio e di energia.



**Fig.1.2** Fonti naturali (A), antropiche (B) e pathways degli idrocarburi del petrolio in ambiente marino (Scoma et al., 2017).

## 1.2 Rimozione degli idrocarburi del petrolio: metodi fisico-chimici e metodi biologici

L'interesse nella degradazione delle sostanze inquinanti ha subito un considerevole incremento negli ultimi anni per rispondere all'esigenza di trovare nuove strategie ecosostenibili ed immediate per il risanamento ambientale. Negli ultimi decenni, vari metodi fisici, chimici e biologici sono stati proposti per il risanamento degli ambienti marini contaminati da petrolio (Agarwal & Liu 2015). In Tab.1.1 sono elencate alcune strategie di rimozione degli idrocarburi dai sedimenti marini; mentre le principali tecniche di reintervento per la rimozione del petrolio dalla colonna d'acqua possono essere raggruppate in tre categorie: contenimento meccanico o recupero, che viene generalmente applicato attraverso l'utilizzo di barriere, skimmer (una specie di pompa, che riesce a rimuovere solo l'idrocarburo in galleggiamento sull'acqua), materiali assorbenti naturali o sintetici; metodi chimici o biologici come agenti disperdenti o gelificanti; metodi fisici come pulizia con materiali assorbenti o lavaggi ad alta pressione. Alcuni di questi approcci adottati per effettuare le bonifiche degli ambienti marini contaminati, seppur dirette a fronteggiare l'emergenza, comportano esse stesse un problema di smaltimento quando fanno uso ad esempio di solventi. I metodi di decontaminazione fisico-chimico convenzionali inoltre a volte possono essere piuttosto costosi, e poco ecosostenibili. Generalmente questi trattamenti dovrebbero essere considerati come misure di emergenza da utilizzare nelle fasi iniziali in caso di perdita accidentale di petrolio, per controllare in modo rapido la diffusione e la deriva del petrolio, ma non sono adatti per il ripristino ecologico (Xue 2015).



Inoltre i costi crescenti delle materie prime e l'efficacia limitata di questi trattamenti tradizionali hanno stimolato lo sviluppo di tecnologie alternative basate sulla biodegradazione. Per queste ragioni il biorisanamento rappresenta un'alternativa efficiente, economica, versatile e a basso impatto ambientale che porta nella maggior parte dei casi alla completa degradazione degli inquinanti (Yakimov et al., 2007).

Metodi per la rimozione di idrocarburi da sedimenti	Principio	Vantaggi	Svantaggi
Biorisanamento	Sfrutta la capacità dei microrganismi di degradare i contaminanti del petrolio	Efficiente, economica, versatile, a basso impatto ambientale	L'applicazione in situ ha bisogno di ulteriori indagini
Flottazione	Sfrutta reagenti che agiscono sulle proprietà superficiali dei contaminanti per conferire proprietà adsorbenti	Rapida, efficace	Elevato dispendio energetico, rimozione del contaminante incompleta
lavaggio	Si basa sul trasferimento dei contaminanti dal sedimento ad una fase liquida	Riutilizzodel materiale, basso dispendio energetico, costi e tempi ridotti	Richiede interventi di dragaggio
Coal agglomeration	Sfrutta l'affinità tra particelle idrofobe di carbone fini e liquidi non polari come il petrolio	Semplice, economica, tempi di trattamento brevi	Non adatta per i sedimenti ricchi di argilla e idrocarburi a basso punto di ebollizione
Desorbimento termico	Separa fisicamente i composti volatili e semivolatili dai sedimenti	Elevata efficienza di rimozione, tempi brevi	Molto costosa
Desorbimento ultrasonico	Si basa sull'utilizzo di ultrasuoni per la separazione degli idrocarburi dai sedimenti	Tecnica "verde", non richiede l'utilizzo di prodotti chimici	L'applicazione su larga scala ha bisogno di ulteriori indagini
Rimozione chimica	Si basa sull'utilizzo di sostanze chimiche ossidanti	Estremamente veloce, efficace, economica	Trasferimento del contaminante da una matrice ad un'altra
Estrazione con liquidi ionici	Sfrutta l'affinità degli idrocarburi del petrolio con liquidi ionici	Rapida, efficace, relativamente economica	Trasferimento del contaminante da una matrice ad un'altra

**Tab. 1.1** Tecnologie di risanamento di sedimenti contaminati da petrolio (Agarwal & Liu 2015)

### 1.3 Microrganismi degradatori di idrocarburi

La presenza del petrolio nell'ambiente per milioni di anni ha portato all'evoluzione di microrganismi in grado di degradare e usare gli idrocarburi come fonte principale, o esclusiva, di carbonio e di energia (McGenity et al., 2012). Questi microrganismi giocano un ruolo cruciale nel mantenimento dell'ecosistema e della biosfera per sviluppare un ambiente sostenibile. Le ricerche condotte negli ultimi 20 anni hanno fornito una base solida per la nostra attuale ampia conoscenza sulla microbiologia della biodegradazione degli idrocarburi, permettendo di identificare un numero sempre maggiore di microrganismi. Ad oggi numerosi batteri, lieviti, funghi, e alghe provenienti da ecosistemi sia terrestri che acquatici sono riportati per la loro capacità di degradare idrocarburi (Boonchan et al., 2000; Hendrickx et al., 2006; Varjani e Upasani, 2013; Wilkes et al., 2016). L'efficienza di biodegradazione varia dal 6% all'82% per i funghi, dallo 0,13% al 70% per i batteri del suolo (Quatrini et al., 2008) e dallo 0,003% al 100% per i batteri marini (Das & Chandran

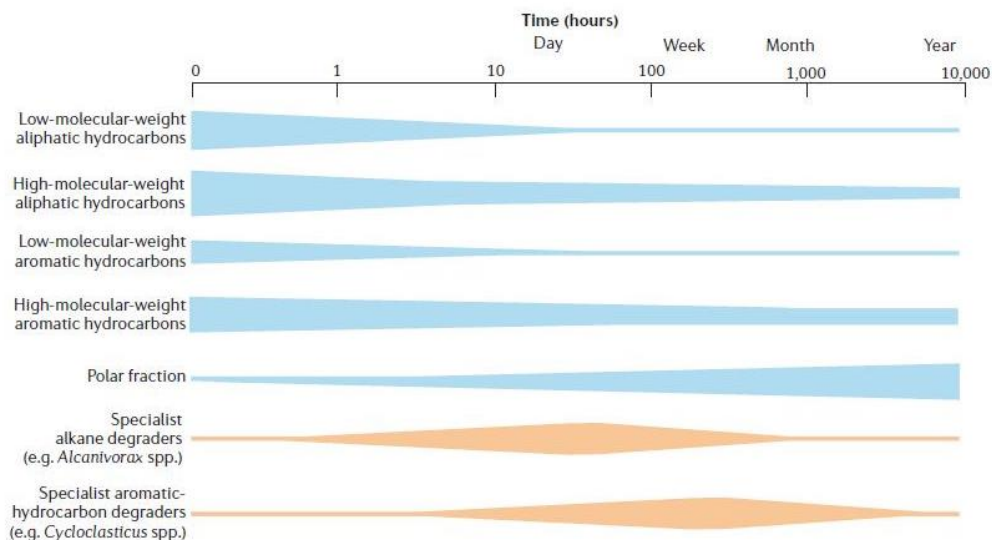
2011). Tra tutti i microrganismi i batteri sono riportati come i degradatori primari e gli agenti più attivi nella biodegradazione; sono in grado di degradare un'ampia gamma di substrati idrocarburi attraverso percorsi aerobici e anaerobici, anche se la degradazione più veloce e completa della maggior parte degli inquinanti organici avviene in condizioni aerobiche, grazie al vantaggio metabolico di avere la disponibilità di O<sub>2</sub> come accettore di elettroni. Sono noti microrganismi che degradano composti alifatici, monoaromatici o poliaromatici ed anche resine. Le vie cataboliche che portano alla degradazione di tali composti inquinanti, coinvolgono ognuna enzimi diversi specializzati nella degradazione di substrati specifici. In tabella 1.2 è riportato un elenco di diversi generi di batteri degradatori di HC con i rispettivi substrati degradati. Per la maggior parte dei casi si tratta di batteri appartenenti al phylum dei Proteobacteria, ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Proteobatteri), e all'ordine degli Actinomycetales (Gram-positivi ad alto contenuto in G + C) (Quatrini et al., 2008, van Beilen et al. 2003). Più recentemente sono stati isolati degradatori appartenenti al phylum dei Firmicutes (*Bacillus*, *Geobacillus*) e al phylum dei Deinococcus-Thermus (*Thermus*) (Meintanis et al. 2006). Altri ceppi batterici appartenenti al phylum Bacteroidetes-Chlorobi (Flavobacteria e Sphingobacteria) sono stati trovati in ambienti contaminati da petrolio suggerendo un loro possibile ruolo nella biodegradazione (Brakstad & Lodeng 2005).

Idrocarburi del petrolio	Microrganismo	Riferimento bibliografico
Alifatici	<i>Acinetobacter</i> sp.	Mittal and Singh (2009) and Foght (2008)
	<i>Alcanivorax</i> sp.	Harayama et al. (2004) and Brooijmans et al. (2009)
	<i>Azoarcus</i> sp.	Widdel and Rabus (2001)
	<i>Bacillus</i> sp.	Ghazali et al. (2004) and Das and Mukherjee (2007)
	<i>Brevibacterium</i>	Leahy and Colwell (1990)
	<i>Desulfosarcina</i> sp.	Jaekel et al. (2013)
	<i>Desulfococcus</i> sp.	Jaekel et al. (2013)
	<i>Gordonia</i> sp.	Quatrini et al. (2008)
	<i>Marinobacter</i> sp.	Yakimov et al. (2007)
	<i>Micrococcus</i> sp.	Roy et al. (2002) and Ghazali et al. (2004)
	<i>Ochrobactrum</i> sp.	Varjani et al. (2015)
	<i>Oleispira</i> sp.	Harayama et al. (2004) and Brooijmans et al. (2009)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Mittal and Singh (2009), Rocha et al. (2011), Sajna et al. (2015), Varjani et al. (2015) and Varjani and Upasani (2016c)
		<i>Rhodococcus</i> sp.
	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Varjani et al. (2015)
	<i>Thalassolituus</i> sp.	Brooijmans et al. (2009)
Monoaromatici	<i>Acinetobacter</i> sp.	Batista et al. (2006)
	<i>Bacillus</i> sp.	Janbandhu and Fulekar (2011)
	<i>Halomonas</i> sp.	Widdel and Rabus (2001)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Mittal and Singh (2009) and Meckenstock et al. (2016)
	<i>Rhodococcus</i> sp.	Leahy and Colwell (1990) and Salleh et al. (2003)
	<i>Sphingobacterium</i> sp.	Janbandhu and Fulekar (2011)
Poliaromatici	<i>Achromobacter</i> sp.	Janbandhu and Fulekar (2011)
	<i>Bacillus</i> sp.	Mittal and Singh (2009)
	<i>Cycloclasticus</i> sp.	Harayama et al. (2004)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Widdel and Rabus (2001) and Meckenstock et al. (2016)
Resine	<i>Vibrio</i> sp.	Widdel and Rabus (2001)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Leahy and Colwell (1990)
	Member of family Vibrionaceae,	Chandra et al. (2013)
	Enterobacteriaceae <i>Moraxella</i> sp.	

**Tab. 1.2** Microrganismi che degradano gli idrocarburi del petrolio e substrati corrispondenti (Varjani et al., 2017).

#### 1.4 Batteri marini degradatori di idrocarburi

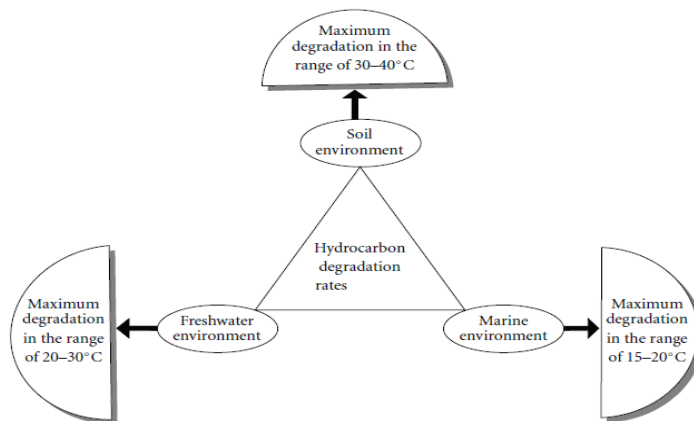
Nuovi generi degradatori sono costantemente identificati portando ad una migliore comprensione del ruolo dei microrganismi negli ecosistemi terrestri e marini; tuttavia la prova più evidente della grande importanza che i batteri hanno nella degradazione di idrocarburi proviene da ambienti marini. L'abilità di utilizzare gli idrocarburi come substrato di crescita è nota per diverse specie batteriche marine classificate in generaliste e specializzate. Le specie definite generaliste presentano un metabolismo capace di utilizzare, oltre agli idrocarburi, diversi substrati di crescita. In questa categoria sono annoverate numerose specie, appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Marinomonas* e *Vibrio*. I batteri degradatori di HC obbligati, noti come idrocarburoclasti (BIC), invece hanno un metabolismo altamente specializzato nei confronti degli idrocarburi, loro unica fonte di energia e sono esclusivamente marini ed hanno un'ampia distribuzione globale (Head et al. 2006). Ai BIC, appartengono i generi *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Thalassolituus*, *Oleispira*, *Oleibacter*, alcuni membri del genere *Planomicrobium* e *Cycloclasticus*. È possibile ipotizzare che l'elevata specificità dei BIC sia una strategia adattativa che consente loro di "sopravvivere" in un ambiente altamente oligotrofico come quello marino, tanto che non sono praticamente rilevabili in ambienti non contaminati ma arrivano a costituire fino al 90% della comunità microbica in prossimità di sversamenti di petrolio. La risposta microbica agli sversamenti petroliferi consiste dunque in una modificazione della comunità microbica presente nell'ambiente impattato, costituita da più specie idrocarburo-ossidanti coesistenti che condividono la stessa risorsa (Yakimov et al. 2004, 2005) (Fig. 1.3). La predominanza di un ceppo batterico rispetto ad altri varia comunque in funzione delle caratteristiche fisico-chimiche dell'ambiente contaminato, in funzione della concentrazione dei nutrienti ed in base alla tipologia di idrocarburo presente (Hara et al. 2003; Yakimov et al. 2005, 2007). La classe di inquinante seleziona i batteri capaci di utilizzarlo come fonte di carbonio, tramite l'attivazione di vie cataboliche differenti, ognuna delle quali coinvolge enzimi diversi ed è specializzata nella degradazione di substrati specifici (idrocarburi alifatici lineari e/o ramificati, idrocarburi aromatici) (Wang et al., 2013).



**Fig. 1.3** Rappresentazione dei cambiamenti nella composizione del petrolio in ambiente marino in funzione del tempo, e cambiamenti in termini di abbondanza dei microorganismi marini degradatori (Head et al., 2006).

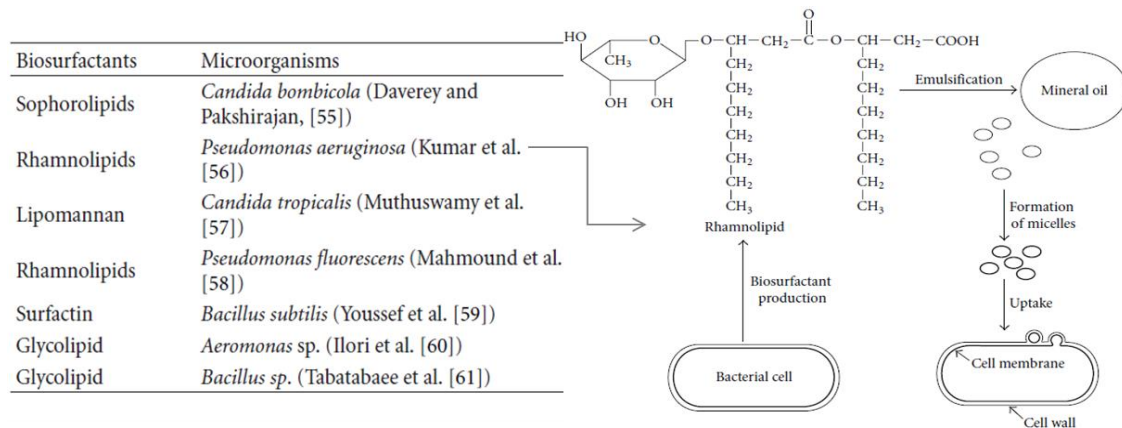
## 1.5 Fattori che influenzano la biodegradazione

L'efficienza della biodegradazione dipende da vari fattori tra i quali la complessità del substrato da degradare in termini di peso molecolare e struttura, e da parametri ambientali come temperatura, ossigeno, salinità, pressione e nutrienti. Generalmente l'efficienza di degradazione decresce con l'aumentare del numero di atomi di carbonio degli HC; gli alcani a catena corta sono degradati più facilmente, seguiti da alcani ramificati, aromatici, ciclici aromatici, asfalteni e composti pesanti (Xue et al. 2015). Tra i fattori fisici la temperatura gioca un ruolo molto importante in quanto influisce sia sulle proprietà chimiche dell'inquinante (es. solubilità, viscosità) sia sulla attività dei microrganismi (Das & Chandran 2011). A basse temperature la viscosità aumenta, mentre la volatilità degli idrocarburi a basso peso molecolare si riduce ritardando l'inizio della degradazione. In generale il rate di biodegradazione decresce con il decremento della temperatura (Fig. 1.4).



**Fig.1.4** Tasso di degradazione degli idrocarburi in diversi habitat (Das & Chandran 2011).

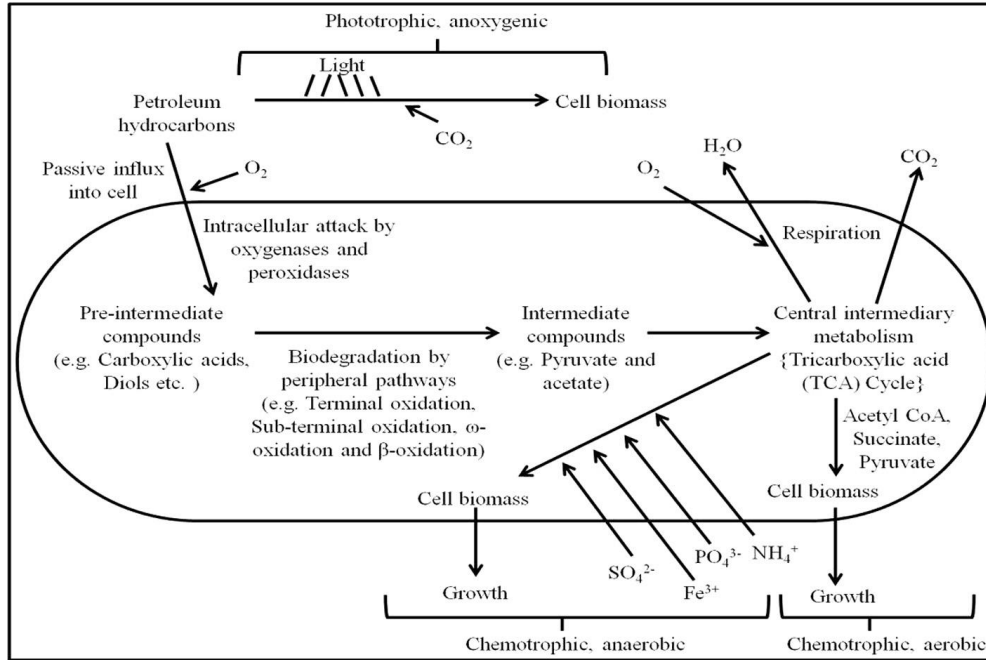
Uno dei fattori importanti che limita la biodegradazione degli HC nell'ambiente è la loro biodisponibilità, definita come l'ammontare di sostanza che è fisicamente e chimicamente accessibile ai microrganismi. Per superare la bassa biodisponibilità dei contaminanti idrofobici i microrganismi adottano strategie che riducono la tensione superficiale mediante la produzione di surfattanti, che agiscono da agenti emulsificanti favorendo la formazione di micelle. I biosurfattanti sono un gruppo eterogeneo di composti chimici, rappresentati da glicolipidi, fosfolipidi, lipopeptidi, lipoproteine, acidi grassi, lipidi neutri, lipidi polimerici e biopolimeri ad alto peso molecolare, sintetizzati durante la fase stazionaria di crescita dei batteri (Das & Chandran 2011). Molti microrganismi degradatori di idrocarburi producono biosurfattanti. In Fig. 1.5 è riportato un elenco di classi di biosurfattanti ed un esempio di meccanismo di formazione di micelle nell'uptake degli idrocarburi da parte di *Pseudomonas*. Un'altra strategia messa in atto dai batteri per favorire il contatto diretto con gli idrocarburi è l'aumento dell'idrofobicità della superficie cellulare (Lo Piccolo et al., 2012). Questo include la sintesi di strutture di adesione quali proteine, acidi micolici e altri esopolimeri idrofobi (Abbasnezhad et al., 2011). *Rhodococcus* 20S-E1-c utilizza questa strategia producendo uno strato idrofobico esterno composto da acidi micolici.



**Fig. 1.5** Biosurfattanti prodotti dai microrganismi e meccanismo di formazione di micelle nel processo di uptake degli idrocarburi da parte di *Pseudomonas* sp. (Das & Chandran 2011).

### 1.6 I pathway della degradazione degli idrocarburi

Numerosi studi condotti sulla biodegradazione degli idrocarburi negli ultimi anni hanno descritto i meccanismi generali e le vie cataboliche (Farhadian et al., 2008; Varjani et al, 2015; Rojo, 2009; Ron e Rosenberg, 2014; Meckenstock et al., 2016; Wilkes et al., 2016). In figura 1.6 sono mostrati i principali meccanismi della degradazione degli idrocarburi per via aerobia e anaerobia. Le reazioni di ossidazione, riduzione, idrossilazione e deidrogenazione, e il meccanismo di uptake degli idrocarburi sono comuni sia ai pathway aerobi che anaerobi.



**Fig.1.6** Pathway di degradazione degli idrocarburi (Varjani 2017).

#### 1.6.1 Biodegradazione aerobia dei composti alifatici

Gli alcani sono la componente del petrolio degradata più rapidamente e in maniera completa soprattutto in condizioni aerobie (Riser-Roberts, 1998). Sulla base del loro peso molecolare gli idrocarburi

alifatici sono suddivisi in quattro gruppi: alcani gassosi, a basso peso molecolare ( $C_8$ - $C_{16}$ ), a peso molecolare medio ( $C_{17}$ - $C_{28}$ ) e ad alto peso molecolare ( $>C_{28}$ ). Sebbene gli alcani a basso e medio peso molecolare siano più facilmente degradati dai microorganismi, diversi ceppi batterici sono in grado di degradare idrocarburi alifatici fino a  $C_{36}$  e oltre (Lo Piccolo et al., 2011). Il meccanismo di degradazione degli alcani da parte dei microrganismi è mostrato in figura 1.7 e può seguire diversi pathway come l'ossidazione terminale, subterminale,  $\beta$  e  $\omega$  ossidazione (Ji et al., 2013).

La degradazione aerobica degli alcani utilizza ossigeno molecolare come reagente per attivare, e rendere così reattivo, il composto idrocarburo altrimenti caratterizzato da una elevata stabilità chimica. La prima tappa consiste nell'ossidazione di un metile terminale che porta alla formazione di un alcol primario, questa reazione può avvenire ad opera di enzimi (mono-ossigenasi) che catalizzano l'incorporazione nella molecola organica di un solo atomo di ossigeno in posizione terminale o sub terminale sotto forma di gruppo ossidrilico OH (per questo sono anche dette idrossilasi). L'alcol primario è ossidato ad aldeide e quindi ad acido grasso da due deidrogenasi specifiche; successivamente l'acido grasso è coniugato al CoA e quindi processato tramite beta-ossidazione per generare acetyl-CoA. I prodotti finali della mineralizzazione degli idrocarburi sono ATP,  $CO_2$  e  $H_2O$  (Rojo 2009).

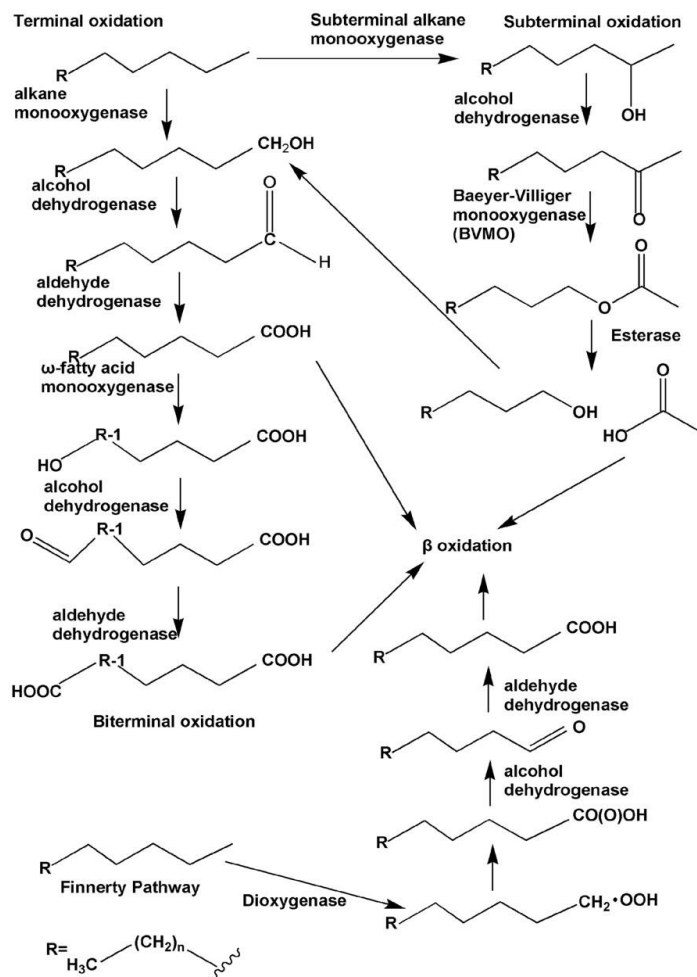
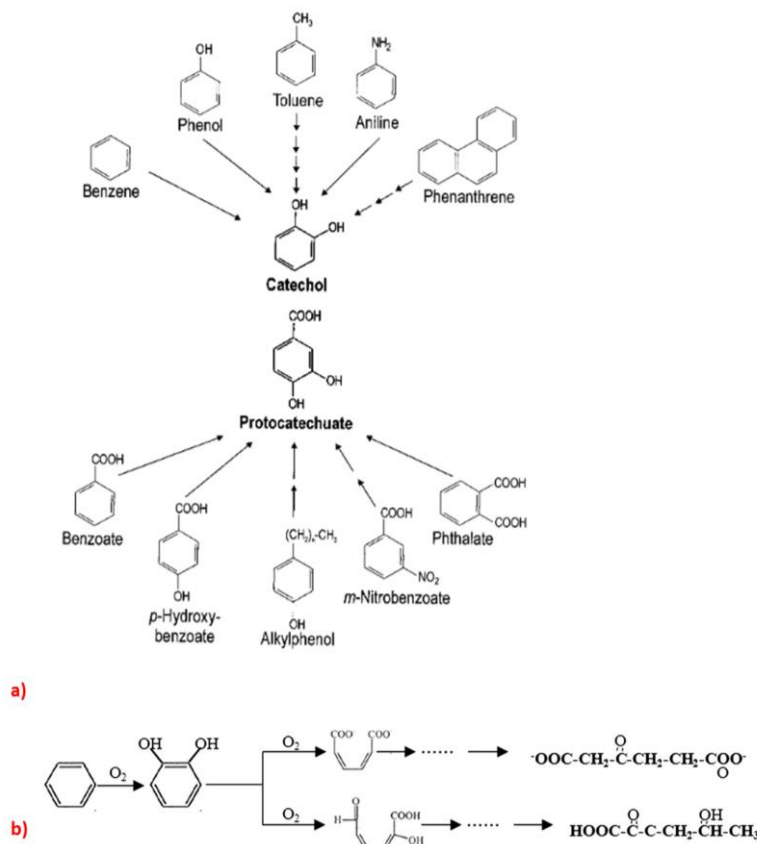


Fig. 1.7 Pathway di degradazione degli idrocarburi in aerobiosi (Ji et al., 2013).

### 1.6.2 Biodegradazione dei composti aromatici in aerobiosi

I composti aromatici (es. benzene, toluene, etilbenzene, xilene, naftalene) sono caratterizzati da una maggiore stabilità termodinamica rispetto i composti alifatici; essi comunque possono essere biodegradati da vari batteri. L'efficienza di degradazione dipende dalla solubilità del composto, dal numero di anelli benzene, dal tipo e dal numero di sostituenti, e dalle proprietà degli atomi eterociclici (Xue et al., 2015). La versatilità catabolica dei batteri nei confronti dei composti aromatici è basata, come per i composti alifatici, sull'esistenza di geni catabolici, che codificano per monoossigenasi che idrossilano direttamente l'anello aromatico o il sostituente alchilico legato all'anello. Le vie cataboliche successive, attraverso l'attività enzimatica di specifiche deidrogenasi, portano alla formazione di catecoli e protocatecuati. I catecoli sono intermedi metabolici che derivano dal catabolismo di composti aromatici non alchilati, come il benzene o il fenantrene, o da composti aromatici aventi un gruppo funzionale come il toluene o il fenolo; i protocatecuati sono invece intermedi metabolici che derivano dal catabolismo di composti aromatici polialchilati o dal catabolismo del benzoato e dei suoi derivati (Fig. 1.8a). Successivamente alla formazione degli intermedi catecolici, si ha una rottura dell'anello aromatico tramite una apertura in orto o in meta catalizzate rispettivamente dalle intradiolo- diossigenasi (tipo I) o extradiolo-diossigenasi (tipo II) (Fig 1.8b). Una serie di reazioni portano poi alla formazione di intermedi metabolici, come acetil-CoA, succinato, formiato, acetaldeide, piruvato, che possono entrare nel metabolismo centrale per la produzione di energia e biomassa. I metaboliti finali sono anidride carbonica e acqua.



**Fig. 1.8** Vie cataboliche che portano alla formazione di catecoli e protocatecuati (Pathway periferici) (a). Principali pathways catabolici per la degradazione del fenolo (b) (Pathway centrali) (Fritsche, W., & Hofrichter, M., 2008, Xue et al., 2015).

### 1.6.3 Biodegradazione anaerobica degli idrocarburi

La degradazione anaerobica degli idrocarburi rappresenta un importante meccanismo che consente il riciclo ambientale dei contaminanti organici petroliferi. Nelle matrici ambientali anossiche, la biodegradazione avviene con tassi più lenti rispetto alle sovrastanti zone ossiche, dove invece procede con ritmi più intensi. I batteri anaerobici utilizzano accettori finali di elettroni alternativi all'ossigeno come il solfato, il nitrato o il ferro<sup>III</sup>, e presentano meccanismi differenti per l'attivazione e la degradazione degli idrocarburi (Widdel & Rabus 2001). Il meccanismo iniziale maggiormente conosciuto consiste nell'aggiunta di fumarato in posizione sub-terminale per formare un derivato alchil-succinato, che è successivamente legato al CoA con formazione di acil-CoA che entra nella via della beta-ossidazione (Fig. 1.9). Nel meccanismo di carbossilazione subterminale si ha la formazione di bicarbonato inorganico e la rimozione di due atomi di carbonio dall'alcano portando alla formazione di un acido grasso più corto di un carbonio rispetto all'alcano di partenza.

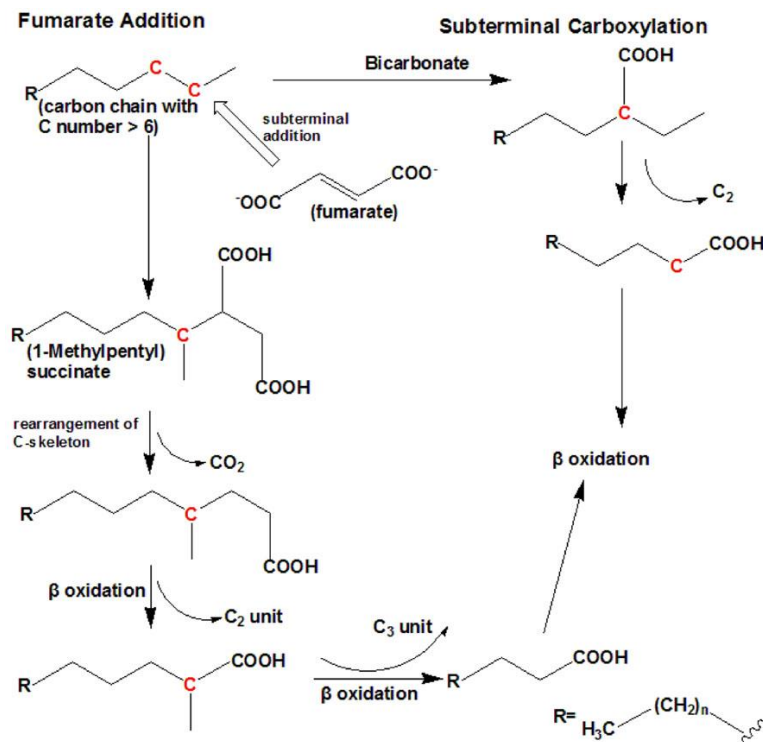
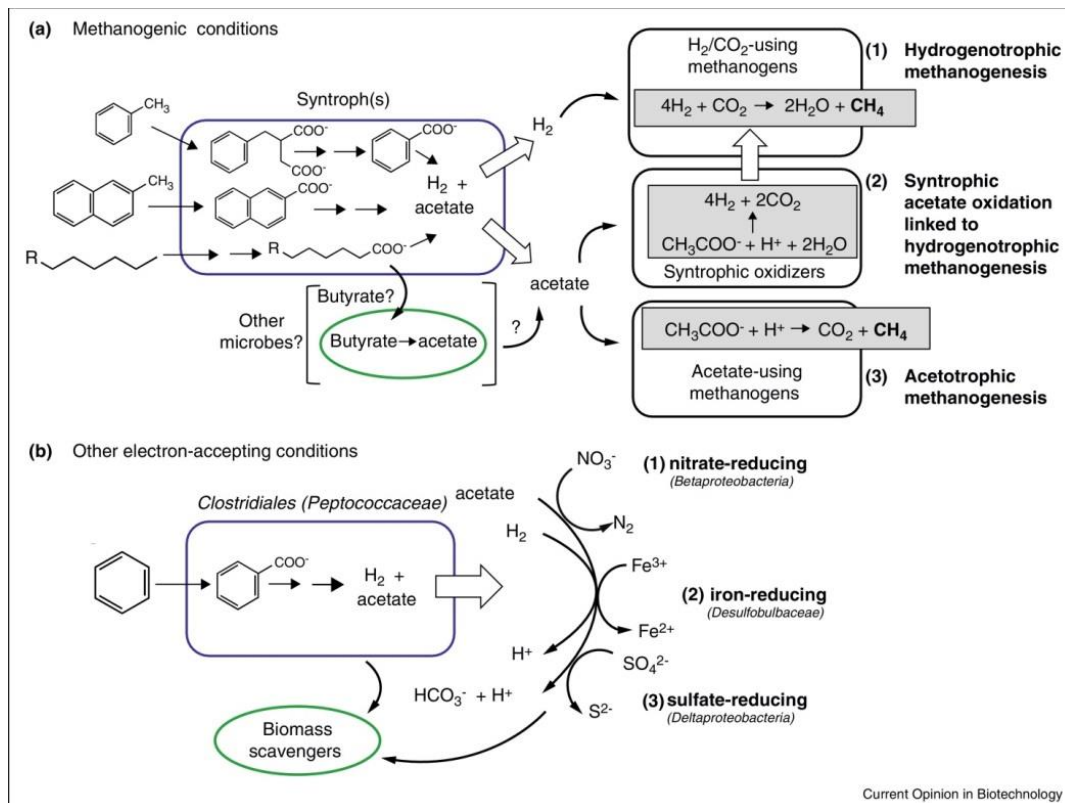


Fig. 1.9 Pathway di degradazione degli idrocarburi in anaerobiosi (Ji et al., 2013).

La degradazione degli idrocarburi in assenza di ossigeno può avvenire anche per interazione simbiotica fra batteri fermentatori e archaea metanogeni che sono frequentemente presenti in ecosistemi altamente anossici, dove gli accettori finali di elettroni sono limitati o assenti (Sieber et al., 2012; Kleinsteuber et al., 2016). Altre interazioni simbiotiche possono anche avvenire in assenza di metanogeni, in sistemi caratterizzati da alto potenziale ossido-riduttivo dove sono presenti accettori finali di elettroni alternativi all'ossigeno, come nitrato, il solfato e il ferro<sup>III</sup>. Alla base dei processi simbiotici vi è un meccanismo di trasferimento elettronico fra le specie interessate, che coinvolge lo scambio di composti ridotti che derivano dalle fermentazioni degli idrocarburi, come H<sub>2</sub>, acetato e formiato (Gieg et al., 2014). I



protagonisti iniziali nei processi sintrofici sono un ampio gruppo di batteri fermentatori, i quali, con meccanismi di attivazione ancora non noti, e attraverso vie metaboliche ancora sconosciute, riescono a degradare idrocarburi alifatici e aromatici rilasciando nell'ambiente i prodotti di scarto derivati dalla fermentazione, come acidi grassi, alcol, acetato, formiato, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (Sieber et al., 2012). Gli acidi grassi sono fermentati ulteriormente dai fermentatori secondari, che producono acetato, formiato e H<sub>2</sub>. In ecosistemi privi di accettori finali di elettroni, gran parte dell'idrogeno molecolare e dell'anidride carbonica prodotti sono mantenuti a basse concentrazioni tramite il consumo da parte di archaea metanogeni idrogenotrofici, che li utilizzano per la crescita e come fonte energetica; producendo acqua e metano. L'acetato prodotto può essere anche utilizzato anche da archaea metanogeni acetotrofici, che producono CO<sub>2</sub> e metano (Gieg et al., 2014). In ecosistemi invece dove vi è la presenza di accettori finali di elettroni, l'acetato e l'idrogeno prodotto dalle fermentazioni primarie e/o secondarie, sono utilizzati per la crescita chemiolitoorganotrofa di varie specie batteriche anaerobiche. Uno schema generale è mostrato in Figura 1.10.



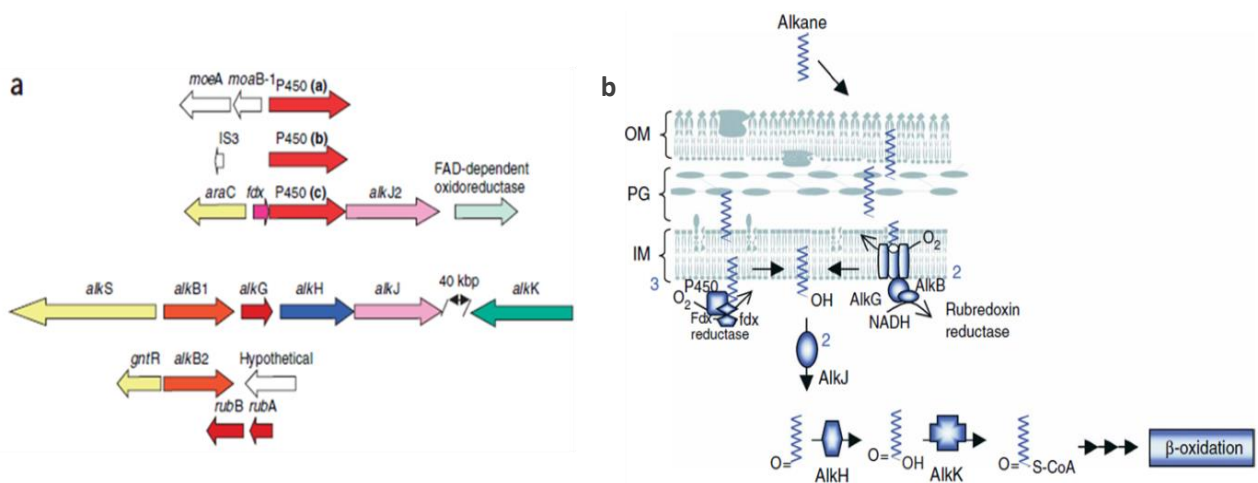
**Fig. 1.10** Processi catabolici della degradazione anaerobica sintrofica di idrocarburi aromatici in ambiente metagenico (a) e in presenza di accettori finali di elettroni alternativi all'ossigeno (b) (Gieg et al., 2014).

### 1.7 Sistemi alcano idrossilasi e organismi modello

Numerosi sistemi alcano idrossilasi sono stati isolati, caratterizzati, e analizzati, ed è noto che questi enzimi appartengono a diverse famiglie. Sulla base del range di substrati degradato vengono classificate in: metano e propano monoossigenasi (MMOs), butano ossigenasi (BMOs), alcano-idrossilasi AlkB, alcano idrossilasi citocromo p450 che ossidano gli alcani da C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>, e alcano monoossigenasi per gli alcani a catena

lunga (LadA) che ossidano gli alcani con più di 20 atomi di carbonio. I microrganismi in grado di utilizzare alcani non gassosi hanno frequentemente in comune il sistema enzimatico Alk.

Questo sistema è stato studiato in *Alcanivorax borkumensis*, sistema modello dei batteri marini idrocarburo-ossidanti obbligati (BIC). Questo BIC utilizza un range piuttosto ampio di idrocarburi come unica fonte di carbonio e di energia (idrocarburi a catena lineare fino C<sub>32</sub>, isoprenoidi, alchil-cicloalcani) (Yakimov et al. 2007; Hara et al., 2003). Nel 2006 il suo genoma è stato sequenziato, rivelando che la capacità di *Alcanivorax* di degradare più substrati idrocarburi, è data dalla presenza di diverse vie cataboliche che coinvolgono due sistemi alcano-idrossilasi (AlkB1 e AlkB2), e tre alcano-monossigenasi citocromo P450 (Fig.1.11a). L'espressione di questi sistemi catabolici è regolata dalla presenza e dalla natura degli inquinanti. L'operone *alkSB1GHJ* di *A. borkumensis*, la cui trascrizione è attivata in presenza di alcani a catena media da C<sub>5</sub> a C<sub>12</sub>, codifica per un enzima alcano-idrossilasi (gene *alkB1*), un alcool e un'aldeide deidrogenasi (geni *alkH* e *alkJ* rispettivamente) ed un regolatore trascrizionale (gene *alkS*). I geni codificanti per la rubredoxina e la rubredoxina reduttasi (*rubA* e *rubB* rispettivamente) sono mappati separatamente rispetto ai geni del sistema alcano idrossilasi. In presenza di alcani a catena media, in un range compreso tra C<sub>8</sub> e C<sub>16</sub>, è attivata la trascrizione di un secondo sistema alcano idrossilasi, che codifica per un regolatore negativo della trascrizione (GntR) e per l'alcano idrossilasi AlkB2. I sistemi coinvolti nel catabolismo degli idrocarburi isoprenoidi sono tre sistemi citocromo P450, mappati in tre loci differenti. Il cluster P450 comprende anche i geni codificanti una ferredoxina (*fdx*), un alcool deidrogenasi (*alkJ2*), una ossido-reduttasi FAD-dipendente e un regolatore della trascrizione (*Arac*). Esperimenti di espressione genica rivelano che tutti gli enzimi codificati da questo cluster genico sono up-regolati dal tetradecano, mentre si evidenziano livelli bassi o assenti di *alkB1* e *alkB2* (Schneiker et al., 2006). I citocromi p450 sono eme-proteine che idrossilano un alto numero di composti in presenza di una ferredoxina e una ferredoxina reduttasi che trasferiscono elettroni dal NADPH al citocromo. Molti ceppi batterici noti, abili nel degradare alcani da 5 a 10 atomi di carbonio, contengono alcano-idrossilasi che appartengono a distinte famiglie di citocromi P450 solubili. Queste famiglie di monossigenasi sono state ben caratterizzate in *Acinetobacter* sp. EB104 e sono presenti anche nel phylum dei Proteobatteri (Rojo et al, 2009).



**Fig. 1.11** Cluster dei geni che codificano per gli enzimi coinvolti nella degradazione degli alcani (a) e pathway di degradazione in *A. borkumensis* SK2 (b) (Schneiker et al., 2006).

I geni *alk* sono presenti in numerose specie batteriche degradatrici di n-alcani. I geni catabolici di *Pseudomonas putida* Gp01 sono localizzati sul plasmide OCT. L'operone *alkBFGHJKL* codifica per gli enzimi necessari per convertire gli alcani in acetyl-coA; di questo pathway fanno parte i geni *alkF* e *alkG*, che codificano rispettivamente per una rubredoxina reduttasi e la rubredoxina solubile che fungono da cofattori della monossigenasi, codificata dal gene *alkB* (Fig. 1.12). Gli alcoli vengono a loro volta ossidati ad aldeidi ad opera dell'alcool deidrogenasi AlkJ, e ulteriormente ossidati ad acidi grassi ad opera dell'aldeide deidrogenasi AlkH. L'acil-CoA sintetasi AlkK porta alla formazione dell'Acetil-CoA che entra nella via degli acidi tricarbossilici. Nell'operone *alkBFGHJKL* si trova il gene *alkL* che codifica per una proteina esterna della membrana che si presume partecipi all'uptake del substrato idrocarburico. Sul plasmide OCT di *Pseudomonas putida* GpO1 è presente anche l'operone *alkST* che codifica per AlkT, una rubredossina reduttasi, e AlkS che è un regolatore positivo dell'espressione genica dell'operone *alkBFGHIJKL* (Fig 1.12)

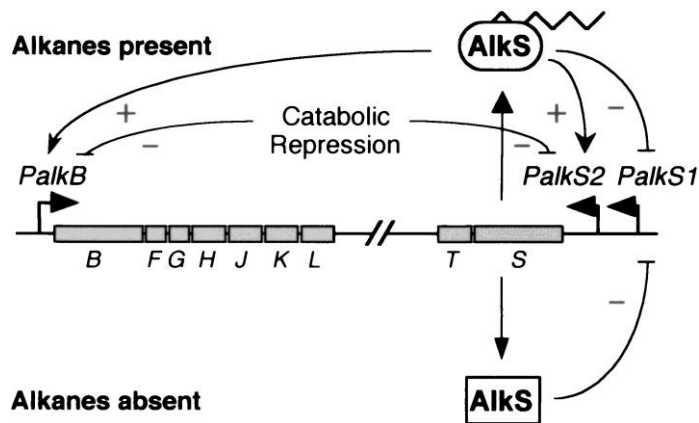
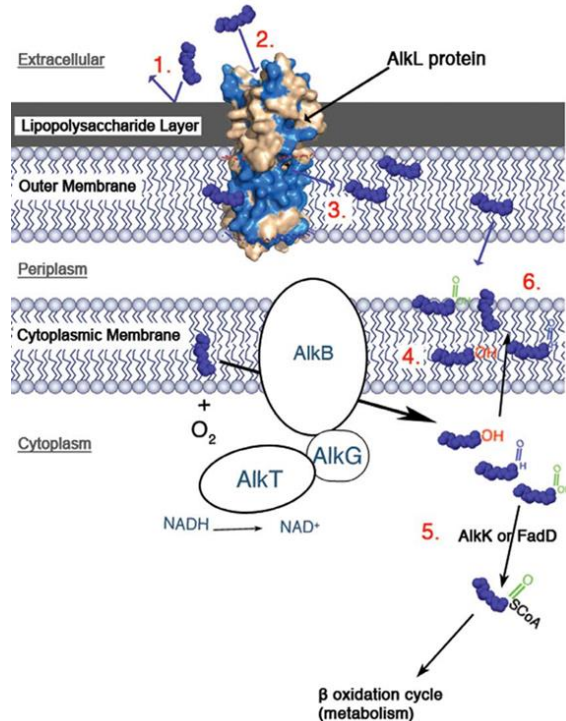


Fig. 1.12 Pathway di degradazione degli alcani in *Pseudomonas putida* GpO1 (Dinamarca et al., 2002)

Una ipotesi proposta per l'uptake degli idrocarburi in *Pseudomonas* è che la proteina di membrana esterna AlkL possa formare un poro idrofobico che attraversa lo strato di poliliposaccaridi (Fig. 1.13). Questa proteina possiede un dominio extracellulare con una elevata affinità per le molecole idrofobiche che, una volta legati al dominio extracellulare, passano per diffusione nel dominio transmembrana della proteina AlkL. Tramite una apertura laterale, formata da due proline del dominio transmembrana, gli idrocarburi escono lateralmente nella membrana interna lipofila. Il complesso alcano-1-monoossigenasi presente nella membrana citoplasmatica catalizza la prima reazione di ossidazione che porta successivamente alla formazione di intermedi metabolici della beta ossidazione.

Sono stati isolati da diversi microrganismi enzimi omologhi ad AlkB di *P. putida* con una sequenza conservata nel sito attivo della proteina. Più di 60 omologhi di *alkB* sono conosciuti e sono stati trovati sia in Gram-negativi che in Gram-positivi. Alcune specie contengono nel proprio genoma più di una copia del gene *alkB*, fino a cinque in alcuni ceppi appartenenti al genere *Rhodococcus*, due in *Pseudomonas aeruginosa*. La presenza di sistemi di degradazione multipli suggerisce l'implicazione di pathway catabolici diversi a seconda del range di n-alcanti da degradare. Molti ceppi batterici possono degradare alcani più lunghi di 20 atomi di carbonio grazie a sistemi alcano-idrossilasi simili ad AlkB di *P. putida* o al citocromo p450 di

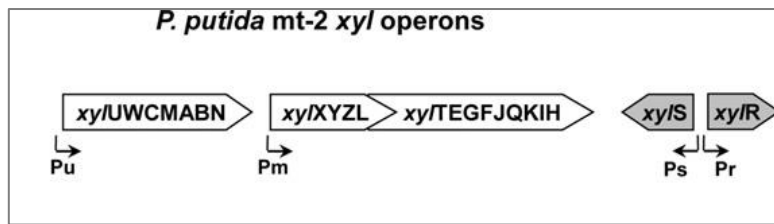
*Acinetobacter*, ma possono anche possedere enzimi completamente differenti come monoossigenasi LadA o alcano-idrossilasi solubili Cu<sup>2+</sup>-dipendenti (Tani et al., 2001). Recentemente è stato caratterizzato un ceppo di *Gordonia* sp. SoCg che possiede un unico locus *alk* responsabile della degradazione di *n*-alcani da dodecano (C<sub>12</sub>) a esatriacontano (C<sub>36</sub>) (Quatrini et al. 2008; Lo Piccolo et al., 2011).



**Fig. 1.13** Meccanismo di uptake e bioconversione degli alcani in *Pseudomonas putida* GpO1 (Grant et al., 2014).

### 1.8 Sistemi degradatori di HC aromatici e organismi modello

Altri ceppi appartenenti al genere *Pseudomonas* degradano composti aromatici, grazie ad attività enzimatiche espresse da uno o più operoni catabolici localizzati su grandi plasmidi a basso numero di copie. Il plasmide pWW0 (circa 117 Kb) di *Pseudomonas putida* mt-2 è stato il primo plasmide TOL ad essere identificato (Williams and Murray, 1974); e rappresenta il sistema modello per la degradazione degli idrocarburi aromatici. I geni catabolici e regolatori (geni *xyl*) nel plasmide pWW0 sono organizzati come quattro unità trascrizionali e sono mappati in una regione di circa 40 Kb (Fig. 1.14). Il primo operone (*xylCMABN*), codifica per tutti gli enzimi coinvolti nell'upper pathway che convertono il toluene e xilene (isomeri meta e para) a benzoato e derivati metilici, e per una proteina di membrana codificata dal gene *xylN*. Il secondo operone (*xylXYZLTEGFJQKIH*) è composto da 11 geni, che codificano per gli enzimi del lower pathway che convertono il benzoato ad acetaldeide e piruvato che entrano nel ciclo degli acidi tricarbossilici. Il gene *xylE* codifica per la catecolo-2,3-diossigenasi che catalizza l'apertura dell'anello aromatico del catecolo a semialdeide 2-idrossimuconica ed è l'enzima chiave del lower pathway. A valle del lower pathway sono presenti due geni regolatori, *xylS* e *xylR*, coinvolti nel controllo trascrizionale degli operoni catabolici del plasmide TOL di *P. putida* mt-2.



**Fig. 1.14** Rappresentazione schematica dell'operone *xyl* di *P. putida* mt-2. le frecce bianche rappresentano i cluster genici dell'upper e lower pathway, le frecce grigie rappresentano i geni regolatori, le frecce nere sottili rappresentano le regioni del promotore. La punta delle frecce indica la direzione della trascrizione (Bertini et al., 2013).

Un gruppo di batteri in grado di degradare gli idrocarburi aromatici in ambiente marino sono i membri del genere *Cycloclasticus*. Questi batteri sono stati isolati da diverse località, utilizzano idrocarburi aromatici, tra cui bifenile, naftalene, fenantrene, toluene e xilene, come uniche fonti di carbonio ed energia, mentre non possono utilizzare zuccheri e amminoacidi. L'Analisi dell'organizzazione dei cluster genici in *Cycloclasticus* spp. ha rivelato la presenza di un gruppo di sei ORF (open reading frame) *xyIXMKGCI2* per l'utilizzo di tutte e tre le forme di xilene (Fig. 1.15). Il cluster mostra un'organizzazione simile ai determinanti catabolici dei  $\beta$ -proteobatteri d'acqua dolce degradatori di IPA, *Burkholderia xenovorans* LB400 e *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2. Analisi di sequenza di un frammento di DNA da 10,5 kb da *Cycloclasticus* sp. A5 ha rivelato un cluster di geni *phn* per la degradazione di naftalene, metilnaftalene, fenantrene e dibenzotiofene. I geni *phnA1*, *phnA2*, *phnA3* e *phnA4*, codificano rispettivamente per le subunità  $\alpha$  e  $\beta$  di una proteina ferro-zolfo, una ferredossina e una ferredossina riduttasi, e per l'enzima iniziale della via catabolica, la diossigenasi PAH. l'organizzazione genetica del cluster del gene del *phn* di *Cycloclasticus* è simile a quella che si trova in altri  $\alpha$ -proteobatteri (Fig. 1.15). La cassetta del gene *phn* di *Novosphingobium aromaticivorans* F199 si trova su un grande plasmide, pNL1. È interessante notare che il gene *pdxA*, che codifica per un enzima coinvolto nella biosintesi del coenzima piridossilfosfato (PLP), è raggruppato e co-orientato con *phnA1b*, caratteristica delle cassette tipo *phn*. L'ampia gamma di substrati degradata da *Cycloclasticus* potrebbe riflettere l'esistenza di più diossigenasi nel genoma di questo batterio, analogo alla situazione delle monoossigenasi degli alcani trovati in *Alcanivorax*. È interessante notare che in *C. oligotrophus* è stata rilevata una terza ipotesi diossigenasi, omologa all'enzima iniziale del pathway per la degradazione dell'acido 2,4-diclorofenossiacetico. Questo indica che *Cycloclasticus* spp. potrebbe degradare non solo diversi idrocarburi (poli) aromatici, ma anche derivati clorurati, coerentemente con la loro ubiquità negli ambienti marini.

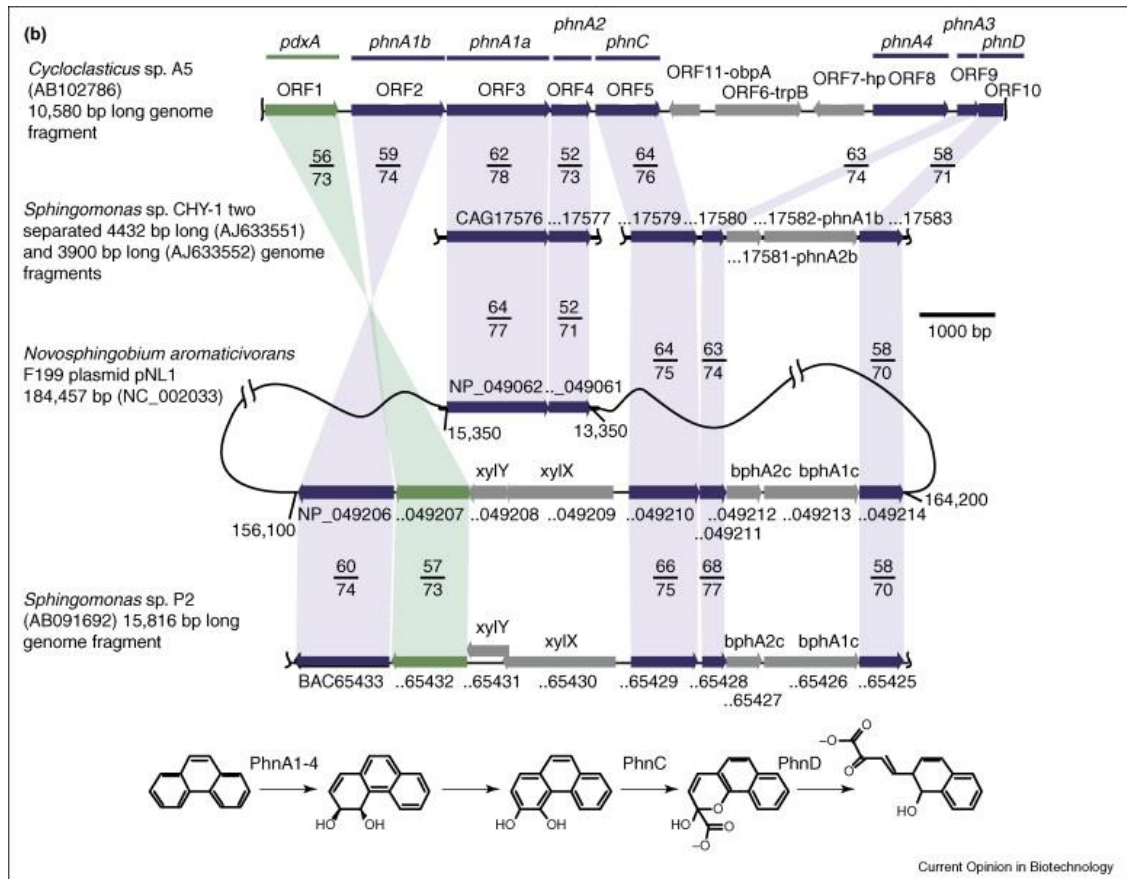


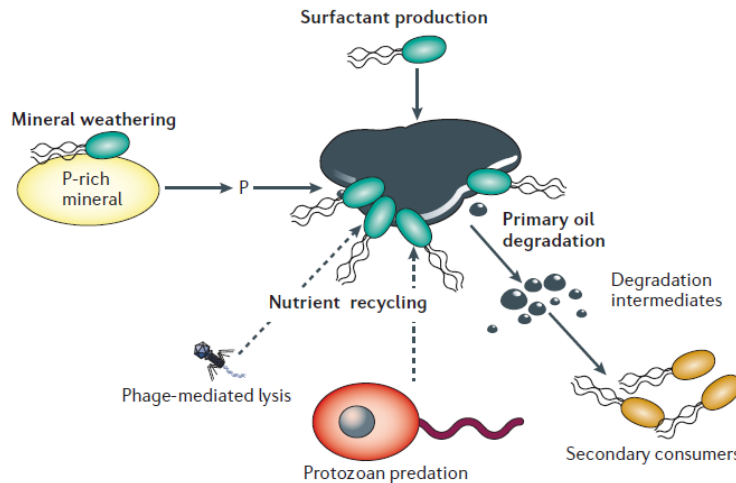
Fig. 1.15 Cluster genici per la degradazione di idrocarburi policiclici aromatici (Yakimov et al., 2007).

### 1.9 Interazioni microbiche durante la biodegradazione in mare

E' importante sottolineare che, essendo il petrolio una miscela complessa, la degradazione di tutte le sue diverse componenti richiede la presenza di un consorzio batterico. Quando il petrolio è presente in ambiente marino si osserva un network di interazioni cooperative, dirette e indirette, tra membri della stessa comunità che coesistono. Queste interazioni possono avvenire tra specie fisicamente separate che utilizzano metaboliti solubili o volatili per la trasmissione delle informazioni, o tra specie che si trovano nelle immediate vicinanze, e che si associano formando biofilm microbici (Head et al., 2006; McGenity et al. 2012). Gli idrocarburi possono essere metabolizzati selettivamente da un singolo ceppo batterico oppure da un consorzio di ceppi microbici (Boopathy, 2000; Varjani et al., 2015; Varjani & Srivastava, 2016). Tuttavia, il consorzio è stato dimostrato essere più efficace per la degradazione completa dei diversi idrocarburi del petrolio. Nel modello di degradazione in aerobiosi proposto in Fig. 1.16 si osserva un'interazione cooperativa tra batteri degradatori primari che attaccano direttamente il petrolio grazie alla produzione di biosurfattanti, e consumatori secondari, che non degradano direttamente gli idrocarburi ma sopravvivono in loro presenza, utilizzando come fonte di carbonio metaboliti e altri composti intermedi della degradazione, rilasciati dai degradatori primari.

Studi di biorisanamento tendono a concentrarsi sui singoli microrganismi che degradano i contaminanti. Tuttavia, questi microrganismi fanno parte di una rete ecologica, che coinvolge molte interazioni dirette e indirette con gli altri membri della comunità microbica. Per questo motivo negli ultimi

anni l'attenzione si è focalizzata sullo studio dell'intera comunità microbica presente nei siti contaminati, al fine di avere una maggiore comprensione dell'impatto della contaminazione da idrocarburi sull'intera comunità.



**Fig. 1.16** Network di interazioni cooperative tra batteri che incrementano la degradazione di idrocarburi in condizioni di aerobiosi. I degradatori primari sono indicati in verde, i consumatori secondari in giallo (Head et al., 2006).

### 1.10 Metodi di studio delle comunità microbiche idrocarburo ossidanti

Isolare i batteri idrocarburo-ossidanti in coltura pura è un punto fondamentale nello studio delle comunità microbiche in quanto consente l'analisi delle caratteristiche genetiche, biochimico-metaboliche e fisiologiche dei ceppi isolati, contribuendo ad elucidare i pathways metabolici e le basi genetiche della degradazione degli idrocarburi e le loro interazioni in situ. Per l'isolamento dei batteri idrocarburo-ossidanti la strategia utilizzata è quella di allestire colture di arricchimento, inoculando i campioni ambientali in terreni minerali supplementati con HC come unica fonte di carbonio. Il risultato sarà la proliferazione selettiva di tutte le specie batteriche capaci di sopravvivere in presenza di HC e di utilizzarli per la crescita. Uno dei principali limiti delle metodiche colturali è che solo una minima percentuale dei batteri presenti in natura è coltivabile, sia perché le condizioni artificiali ricreate in laboratorio non ne consentono la crescita (Amann et al., 1995), sia perché diversi ceppi batterici entrano in uno stato vitale non coltivabile quando sono sottoposti a cambiamenti delle condizioni vitali (Su *et al.*, 2013). Lo sviluppo di nuove tecniche molecolari coltura-indipendenti permette di studiare la frazione di batteri non coltivabile, consentendo una caratterizzazione più ampia delle comunità microbiche e dei batteri degradatori di siti contaminati. Le tecniche di biologia molecolare (es. librerie geniche) e le tecniche fingerprinting come la PCR-DGGE (elettroforesi su gel in gradiente denaturante) permettono di studiare la frazione di batteri non coltivabile sia in termini di diversità filogenetica che di diversità metabolica e funzionale. Il marker filogenetico procariotico per eccellenza è rappresentato dal gene che codifica per la subunità ribosomiale 16S dell'rRNA (Woese et al., 1983). Il gene 16S rRNA è utilizzato come orologio molecolare per identificare i batteri, sia in coltura pura sia in analisi metagenomiche effettuate sul DNA totale estratto da una matrice ambientale o da una coltura di arricchimento. La sua struttura primaria del gene 16S rRNA è un'alternanza di sequenze geniche altamente



conservate, sequenze variabili e ipervariabili. L'amplificazione mediante PCR dell'intero gene o di regioni specifiche, e il suo successivo sequenziamento, consente di identificare i ceppi batterici come genere e di valutare relazioni filogenetiche basate sulla percentuale di somiglianza di sequenza.

Se da una parte le tecniche molecolari coltura indipendente hanno consentito di aumentare le conoscenze sull'intera comunità microbica idrocarburo-ossidante, di contro l'isolamento di questi ceppi batterici rimane di fondamentale importanza per lo studio dei meccanismi di degradazione (Daffonchio et al., 2013).



## CAPITOLO II

### **IL Potenziale di biorisanamento della Baia di Priolo**

#### **Abstract**

A microbiological survey of the Priolo Bay (eastern coast of Sicily, Ionian Sea), a chronically polluted marine coastal area, was carried out in order to discern its intrinsic bioremediation potential. Microbiological analysis and 16S rDNA-based DGGE fingerprinting analysis were performed on seawater, superficial sediment (0-5 cm), sub-superficial sediment (5-10 cm) samples from six stations on two transects. Higher diversity and variability among stations was detected by DGGE in superficial sediment than in water samples although seawater revealed higher diversity of culturable hydrocarbon-degrading bacteria. Alkane- and PAH-degrading bacteria were isolated from all stations and assigned to *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Thalassospira*, *Alteromonas* and *Oleibacter* (first isolation from the Mediterranean area) genera.

The bacterial communities of sub-surfaces sediment display lower phylogenetic diversity than the surface sediment, respond to oil supplementation in microcosms with a significant reduction in biodiversity and a shift in composition. They retain high biodegradation capacities and host hydrocarbon degraders that were isolated and identified. HC degrading Alfa, Gamma and Epsilonproteobacteria together with Clostridia and Archaea are a common feature of sub-surface communities. These assemblages show similarities with that of subsurface petroleum reservoirs also characterized by the presence of biodegraded and weathered oils where anaerobic or microaerophilic syntrophic HC metabolism has been proposed. High total microbial diversity associated to a large selection of HC degraders is believed to contribute to natural attenuation of the area, provided that new contaminant contributions are avoided.

## 2.1 Introduzione

### 2.1.1 L'inquinamento da petrolio nel Mar Mediterraneo

Gli ambienti costieri, in particolare i bacini semi-chiusi caratterizzati da un basso turnover di acqua come il Mar Mediterraneo, sono esposti ad elevati livelli di contaminazione da idrocarburi petroliferi. Gli idrocarburi del petrolio sono inquinanti persistenti che rimangono intrappolati nei sedimenti per lunghi periodi di tempo, rendendoli una fonte di inquinamento permanente (McGenity et al., 2012). Una parte degli HC del petrolio è degradata in acqua in tempi relativamente brevi (giorni o mesi) mentre, quando il petrolio raggiunge la costa, ha un tempo di permanenza più lungo nell'ambiente marino (Hazen, al., 2016). In molti sistemi acquatici, i sedimenti generalmente agiscono come un “*sink*” di inquinanti, che possono successivamente risalire attraverso la colonna d'acqua causando gravi conseguenze. Infatti, rispetto agli strati della parte superiore della colonna d'acqua, quelli inferiori sono caratterizzati da una maggiore concentrazione di inquinanti a causa della risospensione del sedimento e degli inquinanti associati (McGenity et al., 2012). Tra i contaminanti comunemente introdotti nell'ambiente marino, gli idrocarburi esercitano una pressione selettiva sulle comunità microbiche (Langworthy et al., 2002; Wang & Tam, 2012).

Le comunità batteriche dei sedimenti costieri svolgono un ruolo chiave nella degradazione di questi contaminanti in condizioni aerobiche, microaerofile e anaerobiche. I sedimenti hanno generalmente la maggiore abbondanza e diversità microbica all'interno dell'habitat marino e le comunità batteriche idrocarburo-ossidanti che popolano gli ambienti costieri marini rivelano differenze funzionali e metaboliche tra diversi siti (Acosta-González & Marqués 2016). Maggiore consapevolezza dell'importanza delle comunità microbiche nei processi ambientali marini, insieme alle loro capacità di rispondere alla contaminazione ambientale, ha intensificato l'attenzione sulla relazione tra struttura della comunità microbica e concentrazione di contaminanti. La caratterizzazione delle comunità microbiche può fornire tantissime informazioni per comprendere l'entità della contaminazione nei sedimenti o nella colonna d'acqua, e anche valutare e prevedere il potenziale catabolico dei siti contaminati.

Molte ricerche condotte negli ultimi anni hanno contribuito ad aumentare la conoscenza sulla diversità delle popolazioni microbiche indigene di habitat marini altamente contaminati (Daffonchio et al., 2013; Bargiela et al., 2015). Studi di monitoraggio di aree portuali del Mediterraneo hanno confermato la presenza di comunità microbiche idrocarburo-ossidanti ad alto potenziale di biorisanamento. Questi siti rappresentano inestimabili fonti inesplorate di microrganismi con un alto potenziale per lo studio dei processi di biorisanamento e per lo sviluppo di nuovi prodotti in questo campo. Lo studio di siti del Mar Mediterraneo cronicamente inquinati dovrebbe portare alla scoperta di nuove risorse biologiche sfruttabili per gli approcci di biorisanamento. Tutti i paesi del Mediterraneo hanno adottato norme severe per ridurre al minimo gli eventi di inquinamento, e stanno attuando una serie di studi di fattibilità di biorisanamento per i siti più inquinati. Tuttavia, La maggior parte degli studi sono condotti in siti inquinati del lato Nord del bacino. Quelli del lato sud sono invece scarsamente studiati, nonostante molti di questi paesi siano grandi produttori ed esportatori di petrolio, e rappresentino importanti “*hot spot*” di inquinamento ai quali porre attenzione.

Alcuni progetti di ricerca recentemente finanziati dall'UE (es. ULIXES 'Unravelling and exploiting Mediterranean Sea microbial diversity and ecology for xenobiotics' and pollutants' clean up') hanno avuto come scopo principale quello di aumentare le conoscenze sul potenziale di biorisanamento delle aree più impattate dei paesi meridionali del Mediterraneo; tentando di colmare il gap di conoscenza attuale di questi siti (Daffonchio et al., 2013). Caratterizzare i consorzi microbici degradatori di idrocarburi presenti in queste aree è uno degli strumenti di base sia per migliorare le conoscenze sulle capacità biodegradative in ambienti cronicamente contaminati sia per la progettazione di nuovi approcci di biorisanamento. Tra tutte le aree più contaminate del Mar Mediterraneo la Baia di Augusta, sulla costa orientale della Sicilia (Mar Ionio), è identificata come un'area con una forte industrializzazione per la presenza di impianti petrochimici e di trattamento delle acque reflue lunga la costa; parte della contaminazione inoltre deriva dall'adiacente porto di Augusta nella parte settentrionale della baia. Inoltre, la navigazione e il dragaggio dei sedimenti inquinati avvenuti nel corso del secolo scorso per scaricare direttamente contaminanti dalle industrie, sono stati identificati come la causa principale della contaminazione ambientale della Baia di Augusta (Bellucci et al., 2012).

### **2.1.2 Scopo del lavoro**

L'obiettivo dell'attività di ricerca descritta in questo capitolo è stato quello di caratterizzare il potenziale di biorisanamento delle comunità microbiche di campioni di acqua di mare, sedimento superficiale (0-5cm) e sedimento subsuperficiale (5-10cm) della Baia di Priolo attraverso:

- (i) La caratterizzare della contaminazione organica dei sedimenti
- (ii) L'analisi molecolare e metabolica delle comunità microbiche idrocarburo-ossidanti indigene associate a questa zona
- (iii) L'isolamento di batteri degradatori di idrocarburi

La maggior parte degli studi che analizzano l'effetto dell'inquinamento da idrocarburi sui sedimenti hanno analizzato i centimetri più alti e in alcuni casi la profondità del materiale campionato non è nemmeno stata dettagliata (Bargiela et al., 2015, Acosta-Gonzalez & Marques, 2016). Le comunità batteriche che abitano i sedimenti anossici sono poco conosciute e la loro risposta alla contaminazione merita una particolare attenzione (Miralles et al., 2007). Per queste ragioni anche le comunità microbiche dei sedimenti sub-superficiali (da 5 a 10 cm di profondità) dalla Baia di Priolo sono stati caratterizzati.

L'analisi dei contaminanti e la valutazione dell'attività catabolica delle comunità microbiche è stata svolta in collaborazione con il Dott.re Simone Cappello presso l'Istituto per l'ambiente marino Costiero - Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR) della sezione di Messina.

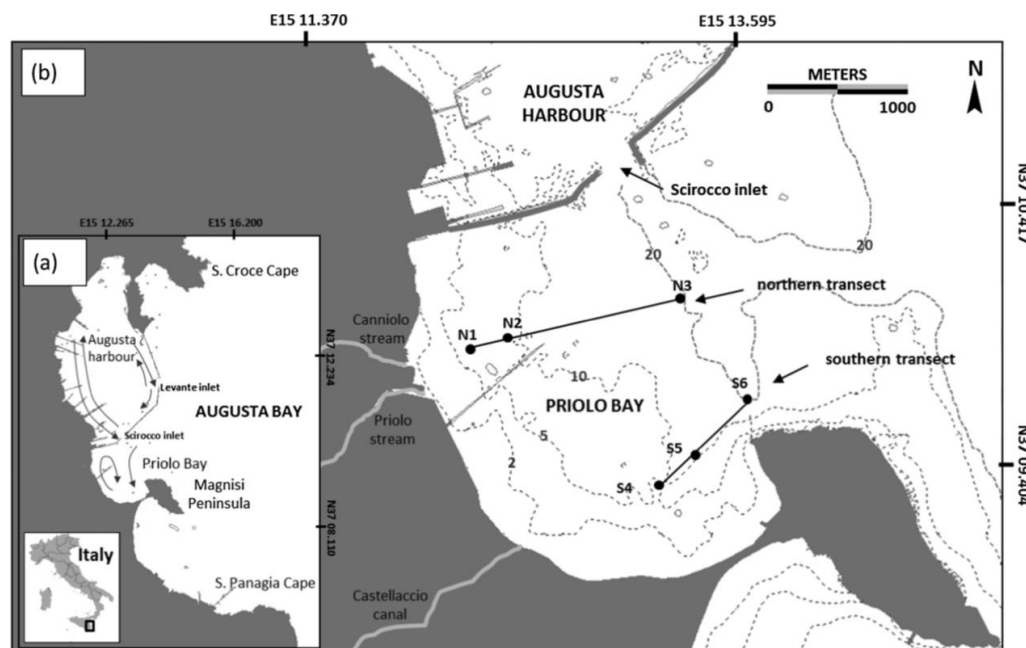
## 2.2 Materiali e metodi

### 2.2.1 Area di studio e campionamento

Il campionamento è stato effettuato nella Baia di Priolo nel Luglio del 2012 da tre stazioni (N1, N2 e N3) poste lungo un transetto settentrionale (N) e tre stazioni (S4, S5 e S6) situate lungo un transetto meridionale (S) (Fig. 2.1) (Tab. 2.1).

La Baia di Priolo si trova nella baglia di Augusta che è un bacino semi-chiuso situato sulla costa sud della Sicilia (Mar Ionio, Mediterraneo centrale) tra Capo S. Croce e la penisola di Magnisi. Dal 1950, la Baia è stata suddivisa in due parti dai frangiflutti: la parte settentrionale che ospita il porto industrializzato di Augusta e la parte meridionale che è la zona costiera della Baia di Priolo. I due settori sono in comunicazione attraverso una connessione, passaggio dello Scirocco (300 m a largo, 13m profondità), dalla quale si verifica il trasferimento di contaminanti dal porto di Augusta alla Baia di Priolo. (Di Leonardo et al., 2014).

Da ogni stazione sono stati prelevati, un campione di acqua di mare, un campione di sedimento superficiale e un campione di sedimento sub-superficiale (definiti rispettivamente come la frazione posta a 0-5 cm e 5-10 cm all'interfaccia con l'acqua). Il campionamento è stato effettuato utilizzando contenitori in plexiglass (20 cm di lunghezza, 5 cm di diametro). Dopo la raccolta, i campioni sono stati immediatamente trasportati a freddo in laboratorio, dove sono stati aliquotati. Una parte di aliquote è stata utilizzata per le analisi immediate, mentre altre aliquote sono state conservate a  $-80^{\circ}\text{C}$  e a  $-20^{\circ}\text{C}$  con glicerolo (20% di concentrazione finale) per le analisi successive. Purtroppo, parte della componente di acqua dei campioni provenienti dalla stazione S4 è stata persa durante il campionamento ed è stata sufficiente solamente per l'isolamento dei batteri degradatori di HC.



**Fig. 2.1** Mappa della Baia di Augusta (a sinistra) e della Baia di Priolo (a destra) (Mar Ionio, Italia meridionale). I transetti (linee nere) e le stazioni di campionamento (cerchi neri) sono riportati nella mappa più grande a destra. (Di Leonardo et al., 2014).

Stazioni di campionamento	Latitude	Longitudo	Profondità
N1	37.16619894	15.20074368	5 m
N2	37.16770367	15.20604372	10 m
N3	37.16927676	15.21497011	20 m
S4	37.15569923	15.21703005	5 m
S5	37.15850386	15.21939039	10 m
S6	37.1630184	15.22239447	20 m

**Tab. 2.1** Coordinate geografiche e profondità delle stazioni di campionamento indicate nella fig. 2.1. (Catania et al., 2015)

### 2.2.2 Analisi degli idrocarburi nei sedimenti

Gli idrocarburi totali sono stati estratti dal sedimento seguendo la Procedura 3550C EPA (Environmental Protection Agency) (Rocchetti et al., 2012). Una miscela di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$  (1: 1, v / v) è stata aggiunta ai campioni di sedimento. La miscela è stata sottoposta a sonicazione per 2 minuti in bagnetto a ultrasuoni (Branson 1200 Ultrasonico Cleaner). I campioni sono stati ulteriormente agitati a 150g per 30 min, centrifugati per 10 min a 5000 g e il surnatante è stato trattato con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro. Un secondo trattamento con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  è stato effettuato, gli estratti ottenuti sono stati portati a secco. I residui sono stati risospesi in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  prima dell'analisi Gas-cromatografica (GC). Tutte le misurazioni sono state eseguite usando lo strumento Master GC DANI, dotato di Iniettore SSL e rilevatore FID. I campioni (1  $\mu\text{l}$ ) sono stati iniettati a 330°C. Come colonna analitica è stata utilizzata la colona Restek Rxi-5 Sil MS con Integra-Guard, 30 m x 0,25 mm (ID x 0,25  $\mu\text{m}$  di spessore). Come gas di supporto è stato utilizzato l'elio che è stato mantenuto a un flusso costante di 1,5 ml  $\text{min}^{-1}$ . Per ciascuno campione sono stati calcolati gli idrocarburi totali (Genovese et al., 2014). L'analisi è stata effettuata in triplicato.

### 2.2.3 Misure di abbondanza microbica in acqua e sedimento superficiale

Per monitorare l'abbondanza delle popolazioni microbiche presenti nei campioni di acqua di mare e sedimento superficiale, sono state utilizzate tre differenti metodiche: la conta diretta in fluorescenza (colorazione DAPI), la conta dei batteri coltivabili (CFU) e la tecnica del numero più probabile (MPN)

#### 2.2.3.1 Abbondanza batterica totale (conta diretta in fluorescenza DAPI)

I campioni di acqua di mare, sono stati sottoposti ad un breve trattamento a ultrasuoni (30'') e fissati con formaldeide (concentrazione finale 2%) prima della conta batterica totale che è stata effettuata mediante DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole 2HCl). I campioni di sedimento sono stati incubati per 15 min con Tween 80 (concentrazione finale, 1  $\text{mg l}^{-1}$ ) e sonicati per 20 minuti. Dopo centrifugazione (8 minuti a 8000g) la fase acqua-tween 80 è stata fissata con formaldeide (concentrazione finale 2%) per l'analisi DAPI. La detection è stata effettuata mediante epifluorescenza usando il microscopio Axioplan 2 Imaging. I risultati sono stati espressi come numero di cellule  $\text{ml}^{-1}$  per l'acqua marina e numero di cellule  $\text{g}^{-1}$  per i sedimenti.

### 2.2.3.2 Batteri coltivabili (CFU)

Per la conta dei batteri eterotrofi totali le cellule batteriche presenti nei campioni di acqua e sedimento sono state diluite in acqua di mare sterile e 100 µl sono stati trasferiti su Marine agar. Tutte le piastre sono state incubate a  $20 \pm 1$  ° C per 7 giorni. I risultati sono stati espressi come unità formanti colonie (CFU) per ml (campioni di acqua di mare, CFU ml<sup>-1</sup>) e per grammo (campione di sedimento, CFU g<sup>-1</sup>).

### 2.2.3.3 Numero Più Probabile (MPN)

Il numero di batteri degradatori di HC è stato stimato utilizzando la tecnica “Most probable number” (MPN)”. Il numero dei batteri degradatori HC è stato determinato dalle tabelle MPN fornite da “American Public Health Association” (A.P.H.A., 1992).

### 2.2.4 Set-up di microcosmi e biodegradazione degli idrocarburi nel sedimento sub-superficiale

Per valutare il potenziale di biodegradazione dei sedimenti sub-superficiali, sono stati allestiti microcosmi su petrolio greggio in condizioni di anaerobiosi. 0,5 g di sedimento sub-superficiale sono stati trasferiti in vials di vetro da 10 ml contenenti 5 ml di terreno minerale ONR7a (Dyksterhouse et al., 1995) addizionato con 1% (v / v) di petrolio greggio (Arabian Light Crude Oil, ENI SpA) come unica fonte di carbonio. I microcosmi sono stati allestiti in triplicato preparando anche controlli abiotici e incubati a 18° C senza agitazione per un mese. Gli idrocarburi totali e i loro derivati (TERHC) sono stati estratti dai microcosmi e analizzati mediante analisi GC-FID secondo la procedura precedentemente descritta. I TERHC sono stati estratti a temperatura ambiente con diclorometano (DCM) (10% v / v). Questa procedura è stata ripetuta tre volte e la fase di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> è stata combinata e trattata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro per rimuovere l'acqua residua. Gli estratti sono stati concentrati per evaporazione con Rotavapor a temperatura ambiente. La composizione dei TERHC è stata analizzata mediante lo strumento ad alta risoluzione “Master GC Fast Gas Chromatograph System”. L'identificazione degli idrocarburi alifatici risolti è stata ottenuta confrontando i tempi di ritenzione con gli standard corrispondenti. Per ogni campione sono state calcolate le concentrazioni di n-alcani in un range compreso da C<sub>10</sub> a C<sub>28</sub>, del Pristano (Pr) e Fitano (Ph) isoprenoidi, n-alcani totali risolti (Σnalk). I valori di concentrazione degli idrocarburi sono stati espressi in ppm. Gli indici di valutazione selezionati per valutare la biodegradazione relativa di n-alcani sono stati: n-C<sub>17</sub> / Pristane (nC<sub>17</sub> / Pr), n-C<sub>18</sub> / fitano (nC<sub>18</sub> / Ph).

### 2.2.5 Analisi della comunità microbica di acqua e sedimenti

L'analisi DGGE (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis) è stata utilizzata per analizzare la struttura e la composizione della popolazione batterica dei campioni di acqua di mare e sedimento superficiale, e la comunità microbica totale (batteri ed archaea) dei sedimenti sub-superficiali, immediatamente dopo il campionamento e dai microcosmi supplementati con petrolio, e allestiti come descritto precedentemente

### **2.2.5.1 Estrazione di DNA**

Il DNA metagenomico è stato estratto dai campioni di acqua di mare utilizzando il Kit MasterPure Complete DNA/RNA (Epicenter) seguendo le istruzioni della casa produttrice. Prima dell'estrazione un'aliquota di 100 ml di campione è stata filtrata utilizzando filtri Millipore da 0,2 µM; i filtri sono stati trasferiti in tubi da 1,5 ml a cui sono stati aggiunti 350 µl di soluzione di lisi contenente 50 µg di Proteinasi K. Il campione è stato incubato a 65° C per 15 min e trasferito in ghiaccio per 5 min. Al termine dell'incubazione il filtro è stato rimosso.

Per i campioni di sedimento è stato utilizzato il kit SPIN FastDNA™ for soil (MP Biomedicals) seguendo le procedure descritte dalla casa produttrice.

Il DNA totale dai microcosmi su petrolio, allestiti inoculando il sedimento sub-superficiale, è stato estratto usando il kit QIAamp® DNA Stool Kit (Qiagen). Prima dell'estrazione un'aliquota di 10ml è stata prelevata da ogni microcosmo, centrifugata per 10 minuti a 14.000rpm e il pellet è stato lavato in acqua sterile per due volte.

Il DNA estratto è stato sottoposto ad analisi elettroforetica su gel agarosio 1% per verificarne la qualità. La quantizzazione è stata effettuata utilizzando Spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). I campioni di DNA sono stati conservati a -20 ° C per le successive analisi.

### **2.2.5.2 PCR- DGGE**

Per l'analisi DGGE della comunità batterica è stata amplificata la regione v3 del gene 16S rRNA, utilizzando i primers 341f-GC (contenente la GC-clamps) e 354r (Muyzer et al., 1993). Per l'analisi della comunità degli archaea sono stati utilizzati i primers ARCH 349 F-GC, A571R (Gagliano et al., 2016). L'amplificazione è stata eseguita in 50 µl di volume finale utilizzando 1µl di Taq polimerasi "Phire Hot Start II DNAPolymerase" (ThermoScientific), Phire Reaction Buffer 1X, 500 µM di ogni primer, 0.3 mM di dNTPs, 150-300 ng di DNA stampo. La PCR per l'amplificazione della regione v3 dei batteri è stata eseguita nelle seguenti condizioni: uno step iniziale di denaturazione a 98°C per 30 sec., seguito da 40 cicli di 15 sec. a 98°C, 10 sec. a 66°C, 10 sec. a 72°C, con una estensione finale di 2 min. a 72°C. L'amplificazione della regione v3 del gene 16srRNA degli archaea è stata effettuata nelle stesse condizioni modificando solamente la temperatura di annealing, che è stata portata a 58°C. Gli ampliconi (500ng circa) sono stati caricati su gel di Acrilamide/Bis-acrilamide all' 8% [acrilamide/bisacrilamide 37.5:1], ed un gradiente denaturante lineare, composto da urea e formammide, compreso nell'intervallo tra 35% e 70%. L'elettroforesi è stata eseguita per 17 ore a 60°C, 200 V, con TAE 1X, utilizzando il sistema Phor-U2 (Ingeny, Leiden). Il gel è stato colorato con SYBR® Gold (Invitrogen CA, USA). Le bande di interesse, sono state estratte dal gel, risospese in 20 µl di acqua DNA/RNA-free e incubate over night. 2µl del DNA eluito sono ri-amplificati nelle stesse condizioni descritte per il sequenziamento. Gli amplificati purificati con il Kit Nucleospin® Gel and Pcr Clean-Up (Macherey-Nagel) sono stati sequenziati presso la società MacroGen Europe. Le sequenze della regione ipervariabile V3 ottenute per batteri e archaea sono state confrontate con il database non ridondante di EMBL / SwissProt / GenBank, con il database 16S\_ribosomal\_RNA

utilizzando l'algoritmo Mega BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ed il database Ribosomal Database II (RDP), Versione 2.8 (Cole et al., 2013). Gli indici di diversità e l'analisi cluster sono stati ottenuti utilizzando il software PAST (Hammer et al., 2001).

### 2.2.6 Isolamento di batteri idrocarburo-ossidanti da acqua e sedimenti

Per isolare i batteri degradatori di idrocarburi i campioni di acqua di mare e sedimento superficiale sono stati utilizzati come inoculo per allestire colture di arricchimento in terreno minerale ONR7a (Dyksterhouse et al., 1995). Diversi set di colture di arricchimento sono state allestite supplementando il terreno minerale con differenti fonti idrocarburiche rappresentate da una miscela di *n*-alcani (C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub> e C<sub>24</sub>), singoli idrocarburi policiclici aromatici (fenantrene, pirene, bifenile e dibenzotiofene) o petrolio greggio (Arabian Light Crude Oil). Tutti i substrati sono stati utilizzati alla concentrazione dello 0.1% (v/v). Dopo un mese di incubazione a 25°C, sono state preparate subcolture trasferendo un'aliquota (1%) delle colture di arricchimento in ONR7a fresco addizionato con le stesse componenti idrocarburiche precedentemente usate. Le nuove colture di arricchimento sono state coltivate nelle stesse condizioni descritte. Aliquote di tutte le colture di arricchimento e delle subcolture sono state conservate a -80°C con 20% di glicerolo. Diluizioni seriali con soluzione salina (NaCl 0.9%) di ogni coltura di arricchimento sono state preparate dopo il periodo di incubazione, e un'aliquota di 100µl è stata trasferita su piastra di terreno minerale contenente le stesse fonti idrocarburiche utilizzate per le colture di arricchimento. Colonie fenotipicamente diverse sono state trasferite in nuove piastre di ONR7a con e senza fonte di carbonio per eliminare batteri autotrofi e agar-utilizzatori. La procedura è stata ripetuta, e solo gli isolati che mostravano una pronunciata crescita su petrolio greggio e/o sugli altri idrocarburi sono stati selezionati per le ulteriori caratterizzazioni.

Per isolare i batteri degradatori di HC dai sedimenti sub-superficiali un'aliquota dei microcosmi precedentemente descritti è stata trasferita su terreno minerale ONR7 contenete come unica fonte di carbonio petrolio greggio (ENI SpA). I batteri eterotrofici sono stati isolati su piastre di Marine Agar (Pronadisa, Conda). Tutti i set di piastre sono stati incubati a 20° C in condizioni aerobiche e anaerobiche. Dopo l'incubazione, tutte le colonie fenotipicamente differenti sono state e trasferite in nuove piastre fino ad ottenere colture pure. Tutti gli isolati sono stati conservati in glicerolo (20% di concentrazione finale) a -80°.

### 2.2.7 Identificazione degli isolati idrocarburo-ossidanti

Per la caratterizzazione tassonomica degli isolati è stata effettuata l'amplificazione del gene 16S rRNA utilizzando la coppia di primers 27F-1492R (Frank et al. 2008). La reazione di amplificazione è stata eseguita in 30 µl di volume finale contenente Buffer RXN invitrogen 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, dNTPs 0,2 mM, 0,2 µM di ogni primers, 1U di Taq Dna polymerase Recombinant, 20ng di DNA stampo. Il programma di amplificazione prevede una denaturazione iniziale a 94° per 3 min, seguita da 30 cicli di: denaturazione a 94°C per 45 sec., annealing a 50°C per 1 min., estensione di 72°C per 1 min. e 30 sec.; allungamento finale a 72° per 10 min. I prodotti PCR sono stati purificati con il kit NucleoSpin® Gel e PCR Clean-Up (Macherey-Nagel) seguendo le istruzioni del produttore. Il DNA stampo è stato estratto dai ceppi batterici selezionati



utilizzando il kit di estrazione DNA/RNA (QIAGEN). I prodotti di PCR sono stati analizzati tramite analisi elettroforetica su gel di agarosio 1%. Gli ampliconi sono stati purificati il Kit Nucleospin® Gel And Pcr Clean-Up (Macherey-Nagel), seguendo le istruzioni della casa produttrice e spediti alla società MacroGen per il sequenziamento. Le sequenze del gene 16S rRNA ottenute sono state analizzate come descritto e depositate nel database DDBJ/EMBL/Genbank sotto gli accession number KT348211/KT348365; KX604244/KX604249

### **2.2.8 Analisi delle capacità degradative di batteri idrocarburo-ossidanti di acqua e sedimento superficiale**

Le Colture batteriche sono state preparate inoculando una singola colonia in 10 mL di terreno minerale ONR7a (Dyksterhouse et al., 1995) contenente 0.1% (v/v) di tetradecano ( $C_{14}H_{30}$ ) sterile. Dopo due giorni di incubazione in agitatore (150 rpm) a  $25 \pm 1^\circ C$ , un'aliquota di 500  $\mu L$  di coltura batterica è stata trasferita in 50 mL di terreno minerale fresco ONR7a addizionato con fonti differenziali di carbonio quali: Petrolio greggio (Arabian Ligth Crude Oil), Squalene, Pristano, Fenanatrene, Pirene, Dibenzotiofene e Bifenile. Le colture sono state incubate per 10 giorni alla temperatura di  $25 \pm 1^\circ C$  in agitazione (150 rpm). L'estrazione degli idrocarburi dalle colture batteriche è stata realizzata come descritto.

### **2.2.9 Produzione di biosurfattanti**

La capacità di produrre biosurfattanti da parte di batteri idrocarburo-ossidanti è stata tramite quattro test differenti: misure di tensione superficiale, attività di emulsificazione (emulfication activity,  $E_{24}$ ), misura del Drop Collapse test e prove di crescita sul CTAB agar.

#### **2.2.9.1 Misura della tensione superficiale**

Misure della variazione della tensione superficiale sono state realizzate sulle colture batteriche preparate come descritto dopo 10 giorni di incubazione. La tensione superficiale è stata misurata tramite il metodo della piastra di Wilhelmy utilizzando un tensiometro digitale (Gibertini, Italy), in accordo con le istruzioni della casa costruttrice. Tutti valori di tensione superficiale ottenuti sono stati espressi come  $mN m^{-1}$  (Hassanshahian et al., 2012). Misure realizzate con acqua distillata e terreno di coltura sono state utilizzate come bianco sperimentale.

#### **2.2.9.2 Misura dell'attività di emulsificazione**

L'attività di emulsificazione (emulsification activity,  $E_{24}$ ) è stata determinata miscelando, 2ml di coltura batterica e 2ml di esadecano; la miscela è stata vortexata vigorosamente per 2 minuti ed incubata a temperatura ambiente per 24 ore. L'attività di emulsificazione è stata calcolata come percentuale dell'altezza dello strato emulsificato (mm) diviso per il totale dell'altezza dello strato liquido della colonna (mm).

#### **2.2.9.3 Drop collapse test**

Il "Drop collapse test" è stato realizzato in accordo con quanto descritto in Hassanshahian et al., 2012. Un volume di 2  $\mu L$  di petrolio greggio è stato aggiunto nei pozzetti di una micropiastra sterile, successivamente sono stati aggiunti 10  $\mu L$  di coltura batterica. Dopo un minuto di incubazione si è proceduto all'osservazione della forma della goccia di petrolio sulla superficie del pozzetto. Risultati positivi sono stati

considerati i pozzetti con una precipitazione della goccia di petrolio, mentre negativi sono stati considerati i pozzetti con la goccia di petrolio compatta. Controlli positivi e negativi sono stati preparati rispettivamente con SDS e ONR7a sterile.

#### **2.2.9.4 CTAB Agar Plate**

Prove di produzione di biosurfattati sono state realizzate su terreno minerale minimo addizionato con blu di metilene e cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). Formazione di aloni di degradazione indicano positività al test.

#### **2.2.10 Analisi di geni catabolici di batteri idrocarburo-ossidanti**

Un frammento di 550bp del gene *alkB*, che codifica per la monossigenasi di membrana che catalizza il primo step di ossidazione dell'alcano degli alcani, è stato amplificato utilizzando la coppia di primers degenerati *alkB1F* e *alkB1R* (Kloos et al. 2006). La reazione di PCR è stata eseguita in un volume totale di 20 µl contenenti OneTaq Standard Reaction Buffer 1 x (NEB), 0,2 mM di dNTPs (Invitrogen), 0,5 µM di primer Forward e reverse, 1 U di OneTaq DNA Polymerase (NEB), e 10ng di DNA stampo estratto con il kit Qiagen stool seguendo le istruzioni della casa produttrice. Il programma di amplificazione consiste in una fase di denaturazione iniziale di 30 sec. a 94 ° C, seguita da 35 cicli di 30 sec. a 94 ° C, 30 sec. a 55 ° C, 1 min a 68°C, ed una fase di estensione finale di 5 min. a 68°C. Per amplificare il gene per l'alcano idrossilasi Citocromo P450 della famiglia CYP153 è stata utilizzata la coppia di primers *P450fw1* e *P450rv3* (Van Beilen et al., 2006). La reazione di amplificazione è stata condotta nelle stesse condizioni utilizzate per amplificare il gene *alkB* modificando la temperatura di annealing a 58°C. Tutti gli ampliconi sono stati visualizzati su gel d'agarosio 1%.

#### **2.2.11 Libreria del gene 16S rRNA dal microcosmo S5 del sedimento sub-superficiale**

Il DNA totale estratto dal microcosmo S5, allestito inoculando il sedimento sub-superficiale S5 in terreno minerale contenente petrolio come unica fonte di carbonio, è stato utilizzato come DNA stampo per amplificare il gene 16S rRNA usando i primers universali 27F e 1492R (Frank et al. 2008) e amplificando nelle condizioni descritte. I frammenti di PCR purificati (circa 150 ng) sono stati clonati nel vettore pCR 2.1-TOPO e le cellule di *Escherichia Coli* One shot TOP10 chimicamente competenti sono state trasformate con il vettore ricombinante utilizzando il kit TOPO® TA Cloning Kit (Invitrogen) secondo le istruzioni del produttore. I plasmidi ricombinanti sono stati estratti e digeriti con l'enzima di restrizione AfaI (Biolabs New England). I pattern di restrizione ottenuti sono stati utilizzati per raggruppare i cloni in unità tassonomiche operative (OTU). Un clone rappresentativo di ogni OTU è stato selezionato, il DNA plasmidico è stato estratto utilizzando il Kit Gen Elute Plasmid Miniprep (SIGMA-ALDRICH) e il suo inserto è stato sequenziato utilizzando i primers universali M13. Le sequenze ottenute sono state analizzate come descritto e depositate nel database GenBank con gli accession number KY595131/KY595133.

### 2.2.12 Analisi di geni catabolici nel sedimento sub-superficiale

Per individuare i geni catabolici coinvolti nei processi di biodegradazione, è stato amplificato un frammento degli enzimi monoossigenasi e diossigenasi utilizzando come stampo il DNA totale estratto dai sedimenti sub-superficiali. In particolare è stato amplificato il frammento terminale della componente idrossilasi della xylene monoossigenasi codificata dal gene *xylM*, la componente responsabile del trasferimento di elettroni della xylene monoossigenasi codificata dal gene *xylA* e la catecholo 2,3-diossigenasi codificata dal gene *xylE1* utilizzando rispettivamente i primers TOL- F / TOL-R, XYLA-F / XYLA-R, XYLE1-F / XYLE1-R come descritto da Hendrickx et al. (2006). Un frammento del gene che codifica per l'alcano monoossigenasi *alkB* è stato amplificato utilizzando i primers *alkB*-1f e *alkB*-1r (Kloos et al., 2006) e amplificando nelle condizioni descritte. Tutti gli ampliconi sono stati visualizzati su gel d'agarosio 1,2%. Il frammento del gene *alkB* di 550bp è stato clonato nel vettore pCR 2.1-TOPO utilizzando il kit TOPO® TA Cloning Kit (Invitrogen) come descritto in precedenza. Le sequenze *alkB* ottenute sono state analizzate come descritto e depositate nel database DDBJ/EMBL/Genbank sotto gli accession number KY595110/KY595119; KY595121/KY595130

## 2.3 Risultati e discussione

### 2.3.1 Contaminazione da idrocarburi nel sedimento superficiale

Per valutare la contaminazione dei sedimenti superficiali (0-5cm) della Baia di Priolo sono stati estratti e analizzati gli idrocarburi totali tramite analisi GC-FID. Tutti i campioni di sedimento risultano contaminati da idrocarburi. L'analisi dei sedimenti superficiali ha rivelato la più alta concentrazione di idrocarburi nella stazione N3 del transetto settentrionale ( $10.786 \text{ ng g}^{-1}$ ), e nella stazione S4 del transetto meridionale ( $10.364 \text{ ng g}^{-1}$ ); mentre S5 è risultato il sedimento meno contaminato ( $3733 \text{ ng g}^{-1}$ ) (Tab. 2.2). Le stazioni N3 ed S4 hanno mostrato anche la concentrazione maggiore di idrocarburi lineari (*n*-alcani da  $C_8$  a  $C_{30}$ ) con valori rispettivamente di  $710$  e  $524 \text{ ng g}^{-1}$ .

	Sedimento superficiale					
	N1	N2	N3	S4	S5	S6
Idrocarburi totali	3975 (119.5)	5329 (84.8)	10786 (428)	10364 (360.7)	3733 (97.8)	8905 (99.7)
Idrocarburi alifatici ( $C_8$ - $C_{30}$ )	245 (13.3)	260 (21.2)	710 (31.6)	524 (41.8)	167 (17.6)	160 (8.5)

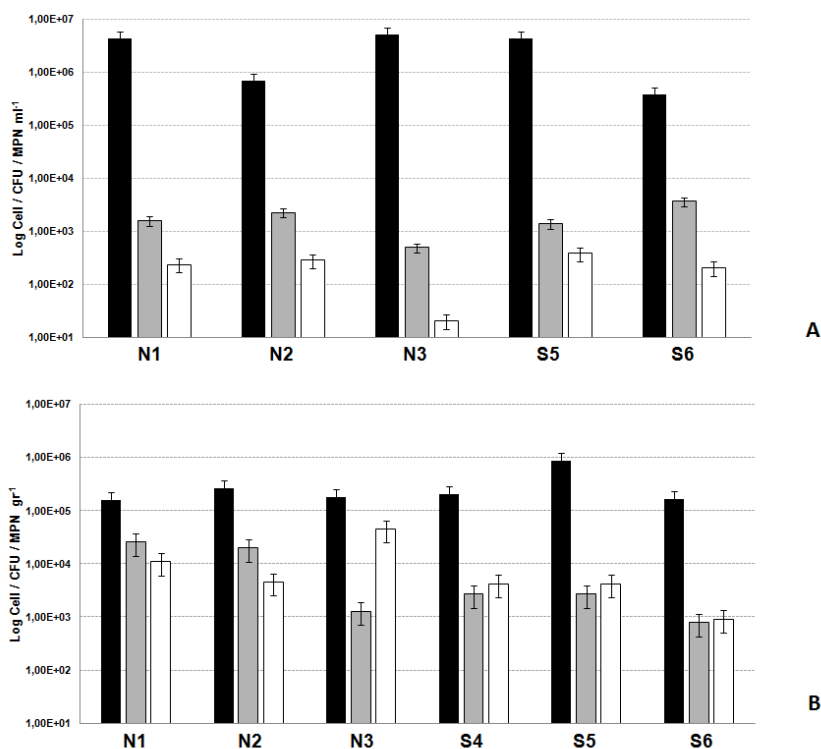
**Tab. 2.2** Idrocarburi totali e idrocarburi alifatici (alcani  $C_8$ - $C_{30}$ ) ( $\text{ng g}^{-1}$ ) (SD) rilevati nei sedimenti superficiali della Baia di Priolo.

L'analisi dei contaminanti organici nel sedimento superficiale ha evidenziato alte concentrazioni di idrocarburi totali chiaramente provenienti dalle attività antropiche. La stazione più profonda del transetto Nord (N3, 20 m di profondità) e le stazioni meridionali (S4 e S6) risultano i siti più contaminati. Una grande frazione di idrocarburi è rappresentata da olii minerali presumibilmente derivati dalla distillazione del petrolio per produrre benzina e altri prodotti a base di petrolio. Gli olii minerali hanno un ruolo importante nell'industria petrolchimica e sono utilizzati principalmente come intermedi chimici per produrre un numero di composti petrochimici come gli alcoli grassi, alcanolamidi, sulfo-metil esteri, esteri di saccarosio e altri detergenti. L'alta concentrazione di olii minerali rispetto alla concentrazione di altri HC (*n*-alcani) indica chiaramente che il sedimento superficiale è caratterizzato da una contaminazione cronica, infatti le frazioni più facilmente biodegradabili rappresentate dagli idrocarburi alifatici sono state degradate o ridotte in termini di concentrazione rispetto alle frazioni che hanno una bassa percentuale di degradazione (Head et al., 2006). Questa deduzione è confermata dai profili molecolari di idrocarburi policiclici aromatici ottenuti da altri studi condotti sugli stessi campioni (Di Leonardo et al., 2014), che hanno mostrato una prevalenza di idrocarburi policiclici aromatici (IPA) con tre anelli ad alto peso molecolare rispetto ad una concentrazione moderata di IPA a due anelli. (Di Leonardo et al., 2014). La distribuzione dei contaminanti nel sedimento non è stata omogenea e i dati chimici ottenuti non descrivono un gradiente di contaminazione dalla costa al mare aperto che possa rivelare una fonte di contaminazione proveniente dalle coste in cui operano le raffinerie. La quantità e la natura degli HC variavano ad ogni stazione, le stazioni N3, S4 e S6 contengono la quantità più elevata di HC totali. L'estrema eterogeneità della distribuzione dei contaminanti nel

sedimento superficiale potrebbe essere dovuta all'eterogeneità del fondale marino della baia. Dati batimetrici e osservazioni dirette dei subacquei durante il campionamento, hanno rivelato la presenza di bacini e depressioni che funzionano da punti di accumulo per idrocarburi e contaminanti. Inoltre, la distribuzione non uniforme di contaminanti all'interno della Baia di Priolo può essere dovuta anche alle operazioni di scarico di sedimenti contaminanti che sono stati drenati dentro il Porto di Augusta, che sembra quindi fungere da fonte di contaminanti per gli ecosistemi marini vicini e lontani (Di Leonardo et al., 2014).

### 2.3.2 Abbondanza microbica di acqua e sedimento superficiale

Le Misure di abbondanza microbica (DAPI, CFU e MPN) effettuate sui campioni di acqua di mare (Fig. 2.2A) e sedimento superficiale (Fig. 2.2B) hanno mostrato che nella Baia di Priolo sono presenti popolazioni batteriche piuttosto ricche e diverse, inclusi batteri degradatori di HC. L'abbondanza dei degradatori di HC nel campione di sedimento più contaminato (N3) risulta superiore a quello dei batteri totali eterotrofi, indicando un'attività catabolica attiva in questo sito. I risultati ottenuti dimostrano che l'alta contaminazione da HC ha un effetto diretto sull'abbondanza dei batteri idrocarburo-ossidanti (misurati tramite la tecnica MPN) che risultano più abbondanti in tutte le stazioni del transetto meridionale.

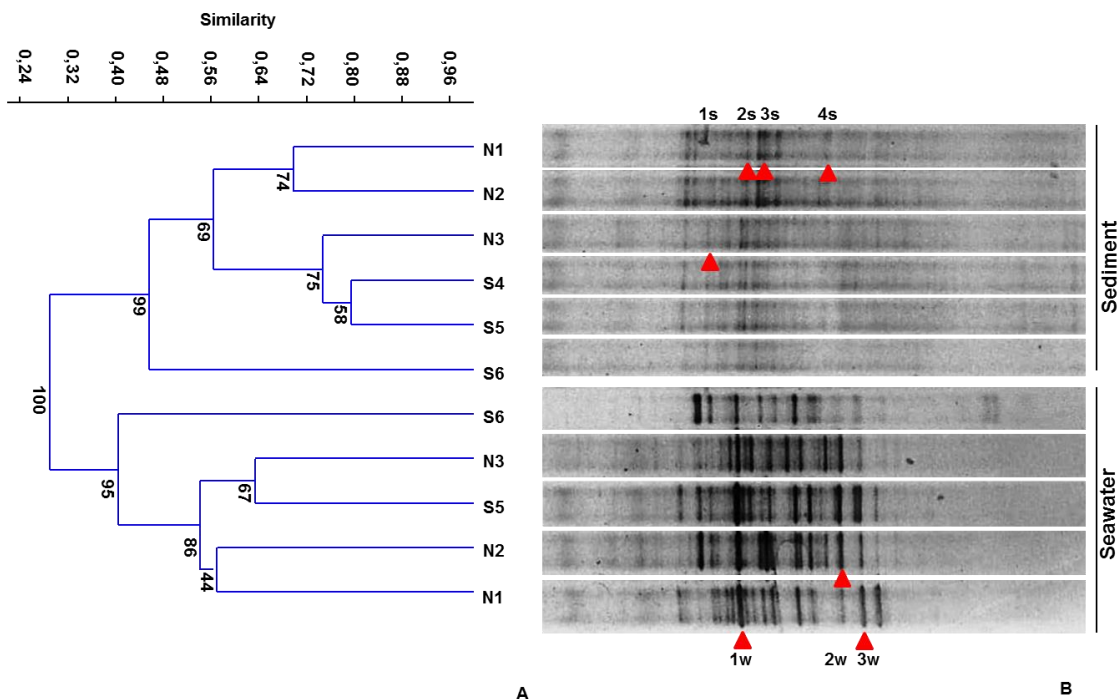


**Fig. 2.2** Abbondanza microbica dei campioni di acqua di mare (A) e sedimento superficiale (B) calcolata tramite DAPI (barre in nero); CFU dei batteri coltivabili eterotrofi (barre in grigio); Most Probable Number (MPN) (barre in bianco).

### 2.3.3 Diversità batterica di acqua e sedimento superficiale

Per comparare la diversità batterica associata ai campioni di acqua di mare e sedimento superficiale di Priolo è stata effettuata l'analisi PCR-DGGE (Denaturing Gradient gel Electrophoresis) della regione ipervariabile v3 del gene 16SrDNA. Per ogni campione è stato ottenuto un numero di bande visibile

compreso tra 23 e 41. Il pattern di bande ottenuto rivela una composizione della comunità batterica differente tra campioni di acqua e sedimento, solo poche bande infatti risultano identiche tra i profili dell'acqua e del sedimento (Fig. 2.3). Il dendrogramma costruito sui profili DGGE ha permesso di raggruppare in termini di composizione la comunità batterica dei campioni analizzati in due branche distinte. All'interno di ognuna di queste i profili N1 ed N2 del transetto Nord sono raggruppati insieme, così come le stazioni N3, S4, S5 (Fig. 2.3A). Il pattern di bande della stazione S6, ottenuto sia per l'acqua che per il sedimento, posiziona questa stazione in un ramo assestante del dendrogramma, indicando una composizione della comunità batterica totalmente differente rispetto alle altre, riflettendo differenti condizioni ambientali.



**Fig. 2.3** Diversità batterica dei campioni di acqua di mare e sedimento superficiale della Baia di Priolo . (A) Dendrogramma che raffigura la comunità batterica. Il coefficiente di Jaccard e l'analisi bootstrap 100 sono state utilizzate per misurare la similarità tra i pattern DGGE ottenuti. (B) Profili DGGE dei prodotti di PCR della regione V3 del gene 16S rRNA amplificati dai campioni di sedimento e acqua di mare. Le frecce indicano le bande predominanti comuni a tutti i campioni che sono state riamplicate e sequenziate (Tab.2.4). Il campione di acqua S4 non è stato sufficiente per le analisi.

I profili ottenuti dall'analisi DGGE dei sedimenti superficiali e dell'acqua hanno permesso di distinguere le comunità microbiche del transetto settentrionale da quelle del transetto meridionale con la comunità della stazione S6 clusterizzata sempre distante dalle altre. I risultati ottenuti suggeriscono tuttavia che la diversità batterica totale, non sembra essere influenzata né dalla profondità né dai livelli di contaminazione; infatti le stazioni più profonde (N3 ed S6) hanno mostrato rispettivamente i livelli di diversità batterica più alti e più bassi, anche se la concentrazione di idrocarburi totali è la più alta in entrambe le stazioni. La più alta diversità batterica della stazione N3 corrisponde alla più alta concentrazione totale di HC, *n*-alcani e Total Carbon Organic (TOC) (Di Leonardo ed altri, 2014). I Cambiamenti nella composizione delle comunità microbica potrebbero essere spiegati come un effetto indiretto dell'inquinamento da HC sulla lisi mediata dai

fagi e sulla predazione dei protozoi; entrambi gli effetti infatti tendono ad aumentare in risposta all'inquinamento (Head et al., 2006). Gli indici di diversità calcolati per ogni profilo DGGE sono risultati in media più alti e più variabili nei sedimenti rispetto ai campioni di acqua (Tab.2.3). In particolare il sedimento N3 mostra l'indice di diversità Chao più alto tra tutti i campioni (861), mentre il sedimento S6 quello più basso (273). La media degli indici di diversità Chao dei campioni di acqua è risultata 506. In tabella 2.5 sono riportati gli indici di diversità di tutti i campioni.

	Acqua						Sedimento superficiale					
	N1	N2	N3	S4	S5	S6	N1	N2	N3	S4	S5	S6
Taxa_S	28	33	33	-	34	28	34	39	41	34	36	23
Shannon	3.33	3.49	3.49	-	3.52	3.33	3.52	3.66	3.71	3.52	3.58	3.13
Chao-1	406	561	561	-	595	406	595	780	861	595	666	276

**Tab. 2.3** Indici di diversità batterica dei campioni acqua e di sedimento superficiale della Baia di Priolo calcolati sui profili DGGE (Fig. 2.3). Il campione di acqua S4 non è stato sufficiente per le analisi.

Per avere informazioni filogenetiche sulle comunità microbiche che popolano i campioni di acqua di mare e sedimento del Baia di Priolo, sette bande (4 dal sedimento e 3 dall'acqua) tra quelle più intense e rappresentate sono state selezionate per il sequenziamento. L'analisi delle sequenze ha rivelato la presenza di Alpha e Gammaproteobacteria idrocarburo-ossidanti non coltivabili, appartenenti ai generi *Alcanivorax* (nei sedimenti) e *Alteromonas* (nell'acqua) (tab. 2.4). *Alcanivorax* è un batterio degradatore di HC obbligato che degrada n-alcani, mentre *Alteromonas* degrada idrocarburi aromatici (Gutierrez et al., 2013). Le altre sequenze analizzate hanno mostrato elevata similitudine con ceppi appartenenti alla famiglia dei Firmicutes (ordine Clostridiales), in particolare con un probabile batterio degradatore appartenente al genere *Thalassobius* (Iwaki et al., 2012) e *Thermoanaerobacterium*, che risulta spesso il batterio dominante in microcosmi di metanogeni che degradano alcani (Wang et al., 2014).

	Sito	Banda DGGE	Sequenza (bp)	Sequenza con la maggiore similarità	Similarità(%)	Accession Number
Sedimento superficiale	N3	1s	125	Uncultured bacterium ( <i>Alcanivorax sp.</i> )	86	GU797076.1
	N1	2s	131	Uncultured <i>Thermoanaerobacterium</i>	83	JF819847.1
	N1	3s	142	Uncultured bacterium (Gammaproteobacteria)	90	FM214477.1
	N1	4s	124	Uncultured bacterium (Gammaproteobacteria)	94	KF741563.1
Acqua	N1	1w	162	Uncultured bacterium ( <i>Alteromonas</i> )	93	GQ377785.1
	N2	2w	134	Uncultured <i>Thalassobius</i>	88	HQ836410.1
	N1	3w	116	Uncultured <i>Alteromonas</i>	96	HQ836379.1

**Tab. 2.4** Batteri identificati mediante PCR-DGGE nei campioni di acqua e sedimento superficiale

### 2.3.4 Batteri degradatori di idrocarburi da acqua e sedimento superficiale

Al fine di isolare i batteri degradatori di idrocarburi dai campioni di sedimento superficiale e acqua di mare sono state allestite colture di arricchimento su terreno minerale ONR7a supplementate con una miscela di n-alcani (C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>24</sub>), differenti IPA (fenantrene, pirene, bifenile e dibenzotiofene) e petrolio

greggio (Arabian Light Crude Oil) come unica fonte di carbonio. Un totale di 258 ceppi batterici sono stati isolati dai campioni di acqua di mare e dai sedimenti superficiali (Tab. 2.5).

Substrato	Sedimento	Acqua	HB
<i>n</i> -alkanes <sup>a</sup>	62	31	93
Crude Oil <sup>b</sup>	55	37	92
BPH <sup>c</sup>	9	14	23
PYR <sup>d</sup>	13	7	20
DBT <sup>e</sup>	6	7	13
PHEN <sup>f</sup>	13	4	17
Totale	158	100	258

<sup>a</sup> Mixtures of *n*-alkanes (C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>24</sub>)

<sup>b</sup> Arabian Light Crude Oil

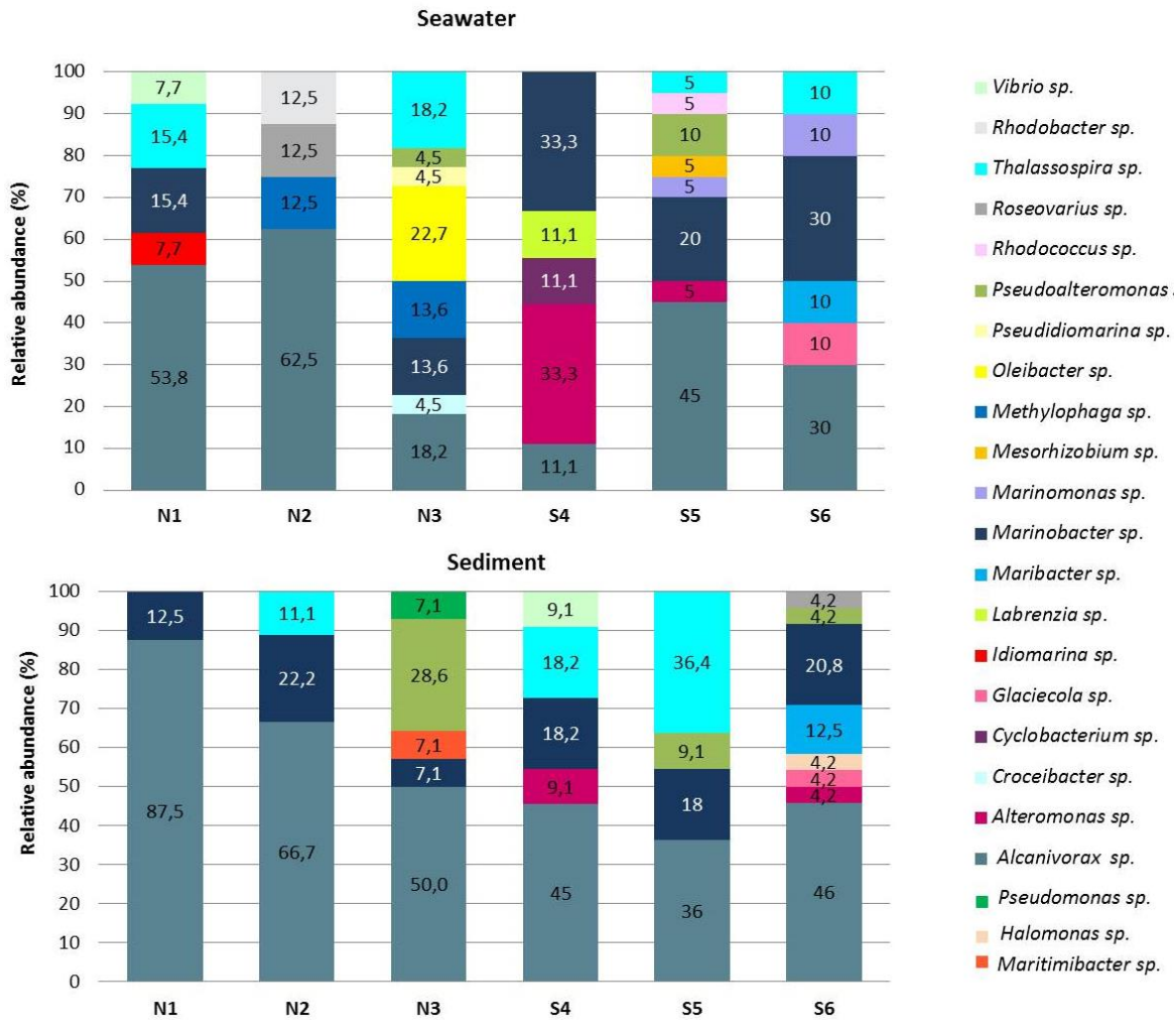
<sup>c</sup> Byphenile; <sup>d</sup> Pyrene; <sup>e</sup> Dibenzothiophene; <sup>f</sup> Phenantrene

**Tab. 2.5** Batteri totali e degradatori di idrocarburi (HB) isolati dalle colture di arricchimento allestite inoculando campioni di acqua di mare e sedimento superficiale.

Sulla base di differenti caratteristiche fenotipiche, 158 isolati sono stati selezionati per l'identificazione tassonomica mediante analisi del gene 16S rDNA (Fig. 2.4). Le sequenze hanno mostrato alta identità con quelle di batteri idrocarbonoclasti obbligatori (*Alcanivorax*, *Oleibacter*) e/o degradatori generalisti (*Thalassospira*, *Vibrio*, *Marinobacter*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*). Una maggiore diversità di batteri idrocarburo-ossidanti è stata rilevata nei campioni di acqua di mare (20 generi) rispetto ai campioni di sedimento (12 generi) (Tab. 2.6). Il campione di acqua N3 possiede la maggiore diversità, in termini di genere (8) mentre il campione di sedimento N1 la più bassa (2). La maggior parte dei campioni di sedimento e acqua hanno mostrato una predominanza di batteri appartenenti ai generi *Alcanivorax* e *Marinobacter*. Altri batteri degradatori di idrocarburi, come *Thalassospira* sono stati isolati solo da alcuni campioni. La diversità dei batteri degradatori di HC isolati dai campioni di acqua di mare sembra essere influenzata dalla contaminazione dei sedimenti; i campioni di acqua di mare hanno infatti una simile, anche se non identica, distribuzione di specie paragonabile a quella osservata nei sedimenti. La presenza in ogni campione di batteri appartenenti a specifici generi risulta fortemente dipendente dalla natura degli inquinanti idrocarburi. Una spiegazione potrebbe essere data dall'evidenza che le comunità microbiche all'interno degli ecosistemi contaminati tendono ad essere dominate dagli organismi in grado di consumare e/o tollerare i composti organici tossici presenti.

Particolarmente interessante risulta la presenza di *Oleibacter* sp., isolato dal campione di acqua N3. *Oleibacter marinus* è stato descritto come un importante degradatore di idrocarburi alifatici del petrolio in mari tropicali (Teramoto et al., 2011). L'isolamento di questo ceppo dai campioni del Baia di Priolo è il primo isolamento ufficiale di un ceppo di *O. marinus* dal mar Mediterraneo.





**Fig. 2.4** Abbondanza relativa dei generi batterici degradatori di HC isolati dalle colture di arricchimento dei campioni di acqua di mare e sedimento superficiale della Baia di Priolo.

I risultati ottenuti dall'identificazione degli isolati rispecchiano la tendenza dei ceppi microbici di *Alcanivorax*, altamente specializzati nella degradazione degli alcani, a predominare in presenza di petrolio greggio, ed in particolare su n-alcani. I batteri appartenenti al genere *Alcanivorax* sono batteri idrocarburoclasti cosmopoliti che si trovano a basse concentrazioni in ambienti marini incontaminati, ma diventano rapidamente predominanti in siti contaminati da petrolio, in cui l'azoto e il fosforo non sono limitanti (Hara et al. 2003, Yakimov et al. 2005). Il genere *Alcanivorax* è stato associato con la fasi precoce della degradazione di idrocarburi a catena lineare e ramificata. Il vantaggio competitivo di *Alcanivorax* rispetto agli altri isolati è dovuto al suo metabolismo fortemente orientato alla degradazione degli idrocarburi (presenza di geni ed enzimi specifici) e alla produzione di biosurfattanti (Schneiker et al., 2006). La capacità del genere *Alcanivorax* di utilizzare gli idrocarburi come unica fonte di carbonio ed energia è stata ampiamente descritta (Yakimov et al., 1998; Schneiker et al., 2006) e sembrerebbe attribuibile alla capacità di questo ceppo di produrre un bio-tensioattivo lipidico che aumenta la biodisponibilità dei contaminanti e la capacità di usarli (Yakimov et al., 1998; Schneiker et al., 2006, Kasai 2002; Cappello et al. 2012). Il Tensioattivo di *Alcanivorax borkumensis* SK2 è considerato come uno dei più efficaci tensioattivi batterici.

	Acqua		Sedimento			
	Alcani <sup>a</sup>	Petrolio <sup>b</sup>	IPA <sup>c</sup>	Alcani <sup>a</sup>	Petrolio <sup>b</sup>	IPA <sup>c</sup>
<i>Alcanivorax</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Alteromonas</i>			+	+		
<i>Marinobacter</i>			+	+		+
<i>Marinomonas</i>	+					
<i>Oleibacter</i>	+					
<i>Pseudoalteromonas</i>	+	+	+			+
<i>Thalassospira</i>	+	+	+		+	
<i>Vibrio</i>	+				+	
<i>Croceibacter</i>			+			
<i>Cyclobacterium</i>			+			
<i>Glaciecola</i>			+			+
<i>Idiomarina</i>			+			
<i>Labrenzia</i>			+			
<i>Mesorhizobium</i>			+			
<i>Methylophaga</i>			+			
<i>Pseudidiomarina</i>			+			
<i>Rhodococcus</i>			+			
<i>Rhodobacter</i>			+			
<i>Halomonas</i>						+
<i>Roseovarius</i>			+			+
<i>Pseudomonas</i>						+
<i>Maritimibacter</i>						+
<i>Maribacter</i>						+

<sup>a</sup> Miscela di alcani: C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>24</sub>

<sup>b</sup> Arabian Light Crude Oil

<sup>c</sup> Singoli idrocarburi policiclici aromatici: bifenile, pirene, dibenzotiofene, fenantrene

**Tab. 2.6** Generi batterici isolati dalle colture di arricchimento di acqua e sedimento superficiale allestite utilizzando idrocarburi diversi come unica fonte di energia/carbonio.

L'abbondanza degli isolati di *Alcanivorax* è stata riscontata in tutti i campioni di acqua (11%) e nei sedimenti (87,5%). L'abbondanza di questo genere sembra avere un effetto negativo sulla diversità di altri generi degradatori di HC (McGenity et al., 2012; Newton et al., 2013). In due campioni di acqua (N3 e S4) in cui *Alcanivorax* è presente al di sotto del 20%, si osserva una predominanza di *Oleibacter* e *Alteromonas*. La competizione tra i BIC potrebbe dipendere dalle risorse, ma anche dalla produzione di molecole inibenti da parte di *Alcanivorax* (Kanoh et al., 2008). *O. marinus* è una specie di BIC recentemente scoperta, filogeneticamente legata a *Oceanobacter* sp. e *Thalassolituus* sp., isolato da un ambiente marino tropicale. Ha una elevata attività degradante nei confronti di alcani lineari e ramificati (Teramoto et al., 2011) che è paragonabile a quella del genere *Alcanivorax*, suggerendo che *Oleibacter* potrebbe svolgere un ruolo chiave nella degradazione degli idrocarburi del petrolio nell'ambiente marino. *Oleibacter* è stato identificato anche nei biofilm associati a batteri fototrofici e diazotrofici, suggerendo che questa interazione possa essere importante per la degradazione di idrocarburi (Al-Bader et al., 2013; McGenity, 2014). Una maggiore diversità di batteri degradanti IPA è stata riscontrata nei sedimenti del transetto meridionale, dove sono stati isolati batteri affiliati ai generi *Thalassospira* (Cui et al., 2008; Guibert et al., 2012), *Marinobacter* e *Alteromonas* (Cui et al., 2008; Jin et al., 2012), la loro presenza sembra essere legata al rapporto LPAH/HPAH che è risultata più elevata in questo transetto (Di Leonardo ed altri, 2014).

I risultati ottenuti dunque attestano la presenza nella Baia di Priolo -Augusta di una notevole diversità di batteri idrocarburo-ossidanti, conferendo a quest'area fortemente e cronicamente contaminata da idrocarburi un elevato potenziale biodegradativo.

### **2.3.5 Analisi del potenziale biodegradativo di batteri idrocarburo-ossidanti di acqua e sedimento superficiale**

Cinque ceppi batterici appartenenti alla collezione di batteri idrocarburo-ossidanti isolati dalla Baia di Priolo, sono stati oggetto di ulteriori indagini metaboliche e fisiologiche. Gli isolati appartenenti ai generi *Thalassospira* sp., *Rhodococcus* sp. e *Methylofaga* sp. sono noti in letteratura per le capacità cataboliche nei confronti degli idrocarburi del petrolio e risultano ancora poco studiati e caratterizzati. Gli isolati sono stati testati per la capacità di produrre biosurfattanti, per la capacità di degradare idrocarburi alifatici a catena lineare e ramificata e per la presenza di geni catabolici appartenenti ai sistemi alcani idrossilasi responsabili della degradazione di alcani a catena lineare (AlkB) e ramificata (Citocromo P450). L'analisi sulla produzione di biosurfattanti, effettuata utilizzando quattro differenti metodi, ha evidenziato la capacità di produrre biosurfattanti da parte di tutti gli isolati (Tab. 2.7). In particolare due ceppi batterici appartenenti al genere *Thalassospira* e l'isolato appartenente al genere *Methylofaga* hanno mostrato la migliore capacità emulsificante (indice E24). Tutti i ceppi sono capaci di degradare idrocarburi alifatici a catena lineare, con una percentuale di degradazione compresa tra il 90% e 70%, e idrocarburi alifatici a catena ramificata, con una percentuale di degradazione compresa tra il 70% e 30% (Tab. 2.7). La capacità di degradare diversi range di idrocarburi è stata confermata dalla presenza di diverse alcani idrossilasi (Tab. 2.7). In particolare la presenza del gene *alkB* è correlata alla degradazione di alcani alifatici compresi solitamente nel range C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>, mentre la presenza del gene citocromo P450 è correlata alla capacità di degradare alcani ramificati. Tre o più sistemi di ossidazione degli alcani sono stati trovati in altri batteri idrocarbonoclastici e in specie con un metabolismo piuttosto versatile. *A. borkumensis* ha due sistemi alcani idrossilasi AlkB, e tre geni che codificano per i citocromi P450 coinvolti nell'ossidazione degli alcani ramificati (Scheinker et al., 2006).

I dati ottenuti dall'analisi GC-FID evidenziano come gli isolati, dopo 10 giorni di incubazione, presentino importanti tassi di abbattimento nei confronti del petrolio e di alcuni isoprenoidi (es. pristano e squalene), evidenziando un elevato potenziale di degradazione della Baia di Priolo. Questo potenziale è stato confermato dalla capacità di produrre biosurfattanti e dalla presenza nel genoma degli isolati di geni catabolici della famiglia delle alcani idrossilasi *alkB* e del gene CYP153 della famiglia del citocromo P450.

Isolato	Produzione di biosurfattanti				Capacità degradative			Geni catabolici	
	Tensione Superficiale (mN m <sup>-1</sup> )	Drop Colla pse	CTAB agar	E24 (%)	Petrolio	Squalene	Pristano	<i>alkB</i>	<i>CYP450</i>
<i>Thalassospira lucentensis</i>	49.7	+	-	22.2	+++	nd	nd	+	+
<i>Thalassospira profundimaris</i>	53.8	+	+	20.1	+++	nd	nd	+	+
<i>Thalassospira xianensis</i>	52.3	+	-	11.1	+++	++	+	+	+
<i>Rhodococcus</i> sp.	52	+	+	11.1	+++	++	+	+	+
<i>Methylofaga</i> sp.	51.7	+	-	16.6	+++	++	+	+	+

**Tab. 2.7** Analisi delle capacità di produzione di biosurfattanti e delle capacità degradative di 5 ceppi batterici idrocarburo-ossidanti isolati dalla Baia di Priolo. +++ degradazione superiore al 70%, ++ degradazione compresa in un range tra il 70% e 50%, + degradazione compresa in un range tra 50% e 30%.

### 2.3.6 Contaminazione da idrocarburi nel sedimento sub-superficiale

I sedimenti sub-superficiali mostrano alti livelli di contaminazione da idrocarburi, rappresentati principalmente da miscele complesse di idrocarburi non risolte (UCM) e da idrocarburi alifatici (Tab. 2.8).

Gli UCM sono composti da diversi tipi di idrocarburi petroliferi alifatici e aromatici recalcitranti che non possono essere risolti mediante gascromatografia convenzionale. Sono considerati il risultato della degradazione microbica e la conseguenza dell'accumulo nei sedimenti in seguito ad agenti atmosferici (Scarlett et al., 2007). Gli effetti degli UCM sull'ecosistema marino sono stati solo parzialmente studiati, è noto che questi composti hanno un potenziale di bioaccumulo ed una elevata tossicità (Frenzel et al., 2009); risultano persistenti nei sedimenti per decenni dove alterano la biodisponibilità di altri contaminanti in quanto agiscono da sorbenti (Scarlett et al., 2007). Tra tutti i campioni analizzati il sito N3 ha mostrato i livelli più alti di contaminazione mentre N1 è risultato il sito meno contaminato. La stazione N3 è risultata fortemente contaminata HC totali anche nel sedimento superficiale (Catania et al., 2015). Una motivazione potrebbe essere data dalla posizione della stazione N3, che è la più vicina all'ingresso dello Scirocco che crea un punto di connessione tra il porto di Augusta e la Baia di Priolo. Questa ipotesi suggerisce un effetto di contaminazione diretta dal porto di Augusta che si associa ad una contaminazione indiretta dovuta alle attività di dragaggio nelle aree adiacenti (Romano et al., 2013).

Nei campioni di sedimento sub-superficiale gli idrocarburi policiclici aromatici (PAHs) sono risultati al di sotto dei limiti di rilevazione in tutte le stazioni, ad eccezione del campione N3 dove sono stati rilevati anche se a basse concentrazioni. Gli alti livelli di contaminazione individuati in tutti i campioni analizzati possono essere spiegati dalle caratteristiche geografiche della Baia stessa. La Baia di Augusta è un'ampia Baia naturale con un basso turnover d'acqua che si estende lungo 10 km della costa orientale della Sicilia. Questa regione è caratterizzata da una forte industrializzazione, da una fitta urbanizzazione e da una pesante traffico di cisterne che trasportano petrolio greggio e raffinato dalla raffineria situata in questo sito. Questi fattori antropici hanno colpito fortemente l'ambiente marino del porto di Augusta (ISPRA, 2010).

	Sedimento Sub-superficiale (5-10cm)					
	N1	N2	N3	S4	S5	S6
Idrocarburi totali	7,27	144,40	216,64	23,76	140,90	119,66
Idrocarburi policiclici aromatici	0	0	1,57	0	0	0
Alcani	2.57	20.36	50.50	2.83	7.51	6.55
UCMs <sup>a</sup>	4.70	124.0	164.6	20.9	133.4	113.1

<sup>a</sup> Miscele complesse di idrocarburi non risolte

**Tab. 2.8** Idrocarburi totali, Policiclici aromatici, alifatici (alcani) e miscele complesse di idrocarburi non risolte (UCMs) (mg Kg-1) rilevati nei sedimenti sub-surperficiali della Baia di Priolo.

### 2.3.7 Biodegradazione del petrolio nel sedimento sub-superficiale in microcosmo

Per valutare il potenziale di biodegradazione dei sedimenti sub-superficiali della Baia di Priolo, sono stati allestiti microcosmi su petrolio greggio. Dopo un mese di incubazione in microaerofilia tutti i microcosmi hanno mostrato una moderata torbidità ed una elevata percentuale di biodegradazione degli idrocarburi. In particolare è stata osservata una degradazione quasi completa per la frazione di idrocarburi a catena corta e a catena media, con valori compresi tra 100% e 86%, mentre gli alcani a catena lunga sono stati degradati in misura minore con una percentuale compresa tra il 96% e il 73% (Tab. 2.9). La degradazione degli idrocarburi è stata simile per tutti i microcosmi, ad eccezione di quelli inoculati con il sedimento N3 dove è stata osservata una minore percentuale di degradazione soprattutto nei confronti degli alcani a catena media e lunga. I risultati ottenuti dagli esperimenti in microcosmo rivelano la capacità di degradare gli alcani del petrolio delle comunità microbiche che popolano la Baia di Priolo.

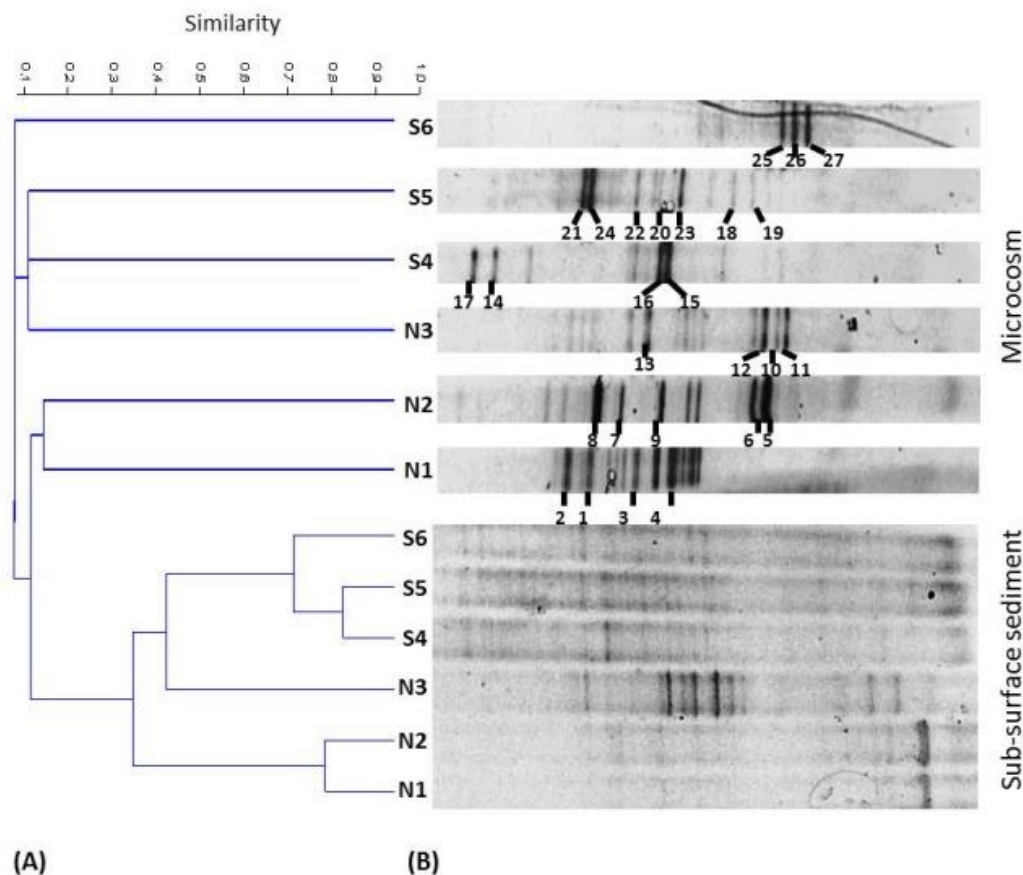
Alcani (% degradazione)		Transetto settentrionale			Transetto meridionale		
		N1	N2	N3	S4	S5	S6
Catena corta	C <sub>10</sub>	100	100	98	100	98	99
Σ Catena media	C <sub>11</sub> - C <sub>16</sub>	97	100	86	99	91	97
Σ Catena lunga	C <sub>17</sub> -C <sub>28</sub>	92	98	73	96	79	91

**Tab. 2.9.** Capacità degradative delle comunità microbiche in microcosmi allestiti mediante inoculo dei sedimenti sub-superficiali in terreno minerale ONR7a addizionati con petrolio (1%) come unica fonte di carbonio. L'analisi GC- FID è stata condotta dopo un mese di incubazione in condizioni di microaerofilia.

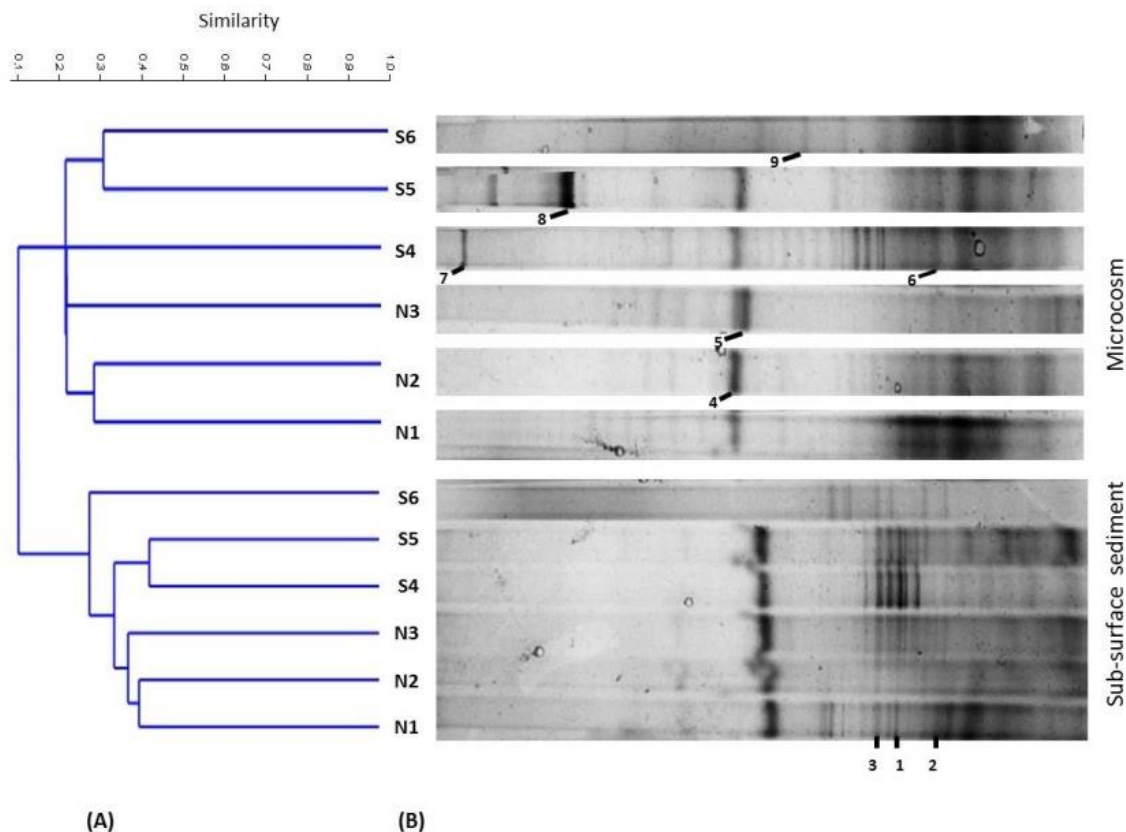
### 2.3.8 Diversità di archaea e batteri nel sedimento sub-superficiale

Le comunità microbica totale dei sedimenti sub-superficiali è stata analizzata, tramite PCR-DGGE, subito dopo il campionamento e dopo un mese di incubazione in microcosmi supplementati con petrolio come unica fonte di carbonio. Il profilo DGGE della comunità batterica mostra un numero variabile di bande visibili compreso tra 12 e 37 (Fig. 2.5), mentre la comunità degli archaea mostra una minore abbondanza e una minore diversità rispetto alla comunità batterica con profili DGGE contenenti un numero di bande visibili comprese tra 6 e 20 (Fig. 2.6). Gli indici di diversità batterica dei sedimenti sub-superficiali, calcolati per ogni profilo DGGE, sono risultati più alti nella stazione S5 e più bassi alla stazione N1 (Tab. 2.10) e non sembrano essere correlati al livello di contaminazione da HC. Dopo un mese di incubazione in microcosmo

si osserva una riduzione della diversità batterica, soprattutto nei campioni provenienti dalle stazioni del transetto meridionale. In generale la diversità batterica dei sedimenti sub-superficiali risulta più bassa rispetto ai sedimenti superficiali. L'analisi cluster basata sui profili DGGE raggruppa in un unico cluster le stazioni del transetto Nord localizzate più vicine alla costa (N1, N2), e in un secondo cluster tutte le stazioni del transetto Sud (S4, S5, S6) suggerendo una simile composizione batterica (Fig. 2.5). Le comunità batteriche dei microcosmi N1 e N2 sono più vicine alle comunità dei sedimenti prima dell'inoculo in microcosmo, indicando che l'arricchimento su petrolio ha avuto scarsi effetti su queste comunità. Le altre comunità dei microcosmi sono raggruppate in un unico cluster ad eccezione della stazione S6 che ha un profilo assestante. In tutti i campioni sia di sedimento che nei microcosmi è stata osservata una minore abbondanza e diversità della comunità degli archaea rispetto alle comunità batteriche. Inoltre, la diversità degli archaea sembra meno influenzata dalla aggiunta del petrolio; non sono state infatti identificate differenze significative nel numero di taxa individuati nei microcosmi rispetto a quelli presenti nel sedimento subito dopo il campionamento (Tab.2.10).



**Fig. 2.5** Diversità batterica del sedimento sub-superficiale della Baia di Priolo. (A) Dendrogramma dell'analisi cluster, (B) profili DGGE della regione V3 del gene 16S rRNA amplificato dai sedimenti sub-superficiali (Sub-surface sediment) e dai sedimenti arricchiti su petrolio (Microcosm). I numeri indicano le bande selezionate per il sequenziamento. In tab. 2.11 è riportata l'identificazione delle bande.



**Fig. 2.6** Diversità degli archaea del sedimento sub-superficiale della Baia di Priolo. (A) Dendrogramma dell'analisi cluster, (B) profili DGGE della regione V3 del gene 16S rRNA amplificata dai sedimenti sub-superficiali (Sub-surficial sediment) e dai sedimenti arricchiti su petrolio (Microcosm). I numeri indicano le bande amplificate e sequenziate (Tab. 2.11)

		Sedimento sub-superficiale						Microcosmo					
		N1	N2	N3	S4	S5	S6	N1	N2	N3	S4	S5	S6
Batteri	Taxa_S	18	20	28	35	37	32	17	21	20	21	22	12
	Shannon_H	2.890	2.996	3.332	3.555	3.611	3.466	2.833	3.045	2.996	3.045	3.091	2.485
	Chao-1	171	210	406	630	703	528	153	231	210	231	253	78
Archaea	Taxa_S	15	9	13	15	18	6	6	15	15	20	14	6
	Shannon_H	2,708	2,197	2,565	2,708	2,89	1,792	1,792	2,708	2,708	2,996	2,639	1,792
	Chao-1	120	45	91	120	171	21	21	120	120	210	105	21

**Tab. 2.10** Indici di diversità delle comunità di batteri e Archaea, calcolati sui profili DGGE dei sedimenti sub-superficiali subito dopo il campionamento e dopo un mese di incubazione su petrolio (microcosmi).

Per l'analisi filogenetica della comunità batterica 27 bande random selezionate dal gel DGGE dei microcosmi sono state riamplicate e sequenziate. Le sequenze ottenute sono state affiliate al phylum dei Proteobatteri (Alpha, Epsilon, Gamma) e dei Firmicutes (Tab.2.11). La maggior parte delle sequenze appartengono a Gammaproteobatteri degradatori generalisti di idrocarburi, noti per essere direttamente coinvolti nella degradazione di n-alcane e idrocarburi policiclici aromatici (*Pseudoalteromonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Marinobacter sp.*, *Halomonas sp.*) (McGenity et al., 2012). Due sequenze appartenenti

alla classe degli Alpha-proteobatteri degradatori di idrocarburi sono state identificate (*Polymorphum* sp., *Thalassospira* sp.). Altre sequenze mostrano elevata identità con generi frequentemente individuate in comunità microbiche che popolano ambienti marini altamente contaminati (*Idiomarina* sp., *Colwellia* sp.) (McGenity 2014; Hazen et al., 2016). Un'unica sequenza affiliata alla classe degli Epsilonproteobatteri è stata individuata esclusivamente nel microcosmo S5. Altre sequenze sono state assegnate a batteri nitrato riduttori anaerobi (*Vallitalea*) e solfato riduttori (*Peptoniphilus*).

Sito	Banda DGGE batteri	Sequenza (bp)	Analisi filogenetica (RDPII database)		Blast nr (megablast)				
			Phylum	Classe	Sequenza con la maggiore similarità	Similarità (%)	Accession number		
N1	1	150	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Vibrio</i> sp.	99	NR_119058.1		
	2	156			<i>Vibrio</i> sp.	92	NR_113182.1		
	3	150			<i>Vibrio</i> sp.	97	NR_122060.1		
	4	156			<i>Vibrio</i> sp.	99	NR_122060.1		
N2	5	90	Firmicutes	Clostridia	<i>Clostridium</i> sp.	97	NR_125713.1		
	6	101	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Thalassospira</i> sp.	100	NR_136875.1		
	7	100		Gammaproteobacteria	<i>Colwellia</i> sp.	96	NR_136835.1		
	8	173			<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	99	NR_113220.1		
	9	151			<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	92	NR_044837.2		
N3	10	130	Firmicutes	Clostridia	<i>Clostridium</i> sp.	99	NR_104889.1		
	11	135			<i>Clostridium</i> sp.	94	NR_104889.1		
	12	118			<i>Peptoniphilus</i> sp.	92	NR_108213.1		
	13	158			Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Amphritea</i> sp.	99	NR_042455.1
S4	14	130	Firmicutes	Clostridia	<i>Acetivibrio</i> sp.	93	NR_025917.1		
	15	123			<i>Sporobacterium</i> sp.	98	NR_024967.1		
	16	110			<i>Vallitalea</i> sp.	99	NR_125677.1		
	17	134			<i>Clostridium</i> sp.	90	NR_029164.1		
S5	18	130	Firmicutes	Clostridia	<i>Clostridium</i> sp.	97	NR_104889.1		
	19	137			<i>Clostridium</i> sp.	90	NR_104889.1		
	20	122			<i>Natranaerovirga</i> sp.	91	NR_108636.1		
	21	127			Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	<i>Arcobacter</i> sp.	96	NR_136420.1
	22	166				Gammaproteobacteria	<i>Idiomarina</i> sp.	94	NR_074933.1
	23	117					<i>Marinobacter</i> sp.	94	NR_025116.1
	24	89					<i>Pseudomonas</i> sp.	94	NR_074829.1
	25	192			Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Polymorphum</i> sp.	97	NR_074240.1
S6	26	143			<i>Roseibium</i> sp.	97	NR_025885.1		
	27	95		Gammaproteobacteria	<i>Halomonas</i> sp.	95	NR_125612.1		

**Tab. 2.11** Membri della comunità batterica identificati mediante analisi PCR-DGGE nei microcosmi allestiti inoculando i sedimenti sub-superficiali della Baia di Priolo in terreno minerale contenente esclusivamente petrolio (1%).

Anche la comunità degli archaea è stata caratterizzata filogeneticamente mediante sequenziamento di 9 bande random. L'analisi delle sequenze ha rivelato la presenza nei microcosmi e nel campione N1 di Crenarchaeota e Thaumarchaeota non coltivabili (Tab. 2.12). Le comunità batteriche dei sedimenti sub-superficiali mostrano una diversità filogenetica inferiore a quella dei sedimenti dello strato superficiale. Queste comunità rispondono alla presenza del petrolio nei microcosmi con una significativa riduzione della biodiversità ed uno shift nella composizione differente tra tutti i campioni.



Sito	Banda DGGE archaea	Sequenza (bp)	Analisi filogenetica (RDPII database)		Blast nr (megablast)		
			Phylum	Class	Sequenza con la maggiore similarità	Similarità (%)	Accession number
N1	1	140	Crenarchaeota	Thermoprotei	Uncultured <i>Sulfolobales</i> archaeon A980	91	LN896654.1
	2	142			Uncultured archaeon R124.5-9	89	JQ750558.1
	3	154			Uncultured <i>Desulfurococcales</i> Kam37_lr270106f07	92	JF305865.1
N2	4	163	Thaumarchaeote	Nitrososphaeria	Uncultured thaumarchaeote OTU 140	91	LT625952.1
N3	5	154	Thaumarchaeote	Nitrososphaeria	Uncultured archaeon QL-15-OTU21	99	KU297806.1
S4	6	161	Crenarchaeota	Thermoprotei	Uncultured crenarchaeote 01F7_S56	98	HG931461.1
	7	72			Thaumarchaeote	Nitrososphaeria	Uncultured archaeon OTU253
S5	8	162	Thaumarchaeote	Nitrososphaeria	Uncultured archaeon AS36	93	KT225016.1
					Uncultured Thermoprotei archaeon OTU_121	98	LT624873.1
S6	9	143	Crenarchaeota	Thermoprotei			

**Tab. 2.12** Membri della comunità degli archaea identificati tramite analisi PCR-DGGE nei sedimenti sub-superficiali della Baia di Priolo immediatamente dopo il campionamento (sito N1) e nei microcosmi (siti N2-S6).

Cambiamenti nella composizione della comunità batterica si osservano in genere a seguito di un input di idrocarburi che causa una pressione selettiva che ha come effetto una perdita di diversità e l'arricchimento dei membri della comunità in grado di tollerare e/o degradare HC (Acosta-González & Marqués 2016). Un trend comune si osserva nello shift delle comunità microbiche in siti altamente contaminati, ed ha come risultato generalmente la predominanza di Gammaproteobacteria, considerati come le specie microbiche “best-adapter” in ambienti inquinati (Fuentes et al., 2014). Le caratteristiche comuni di quasi tutte le stazioni sono state la presenza di Gamma e Alphaproteobatteri degradatori di HC e la presenza di Clostridi. Tra i Gammaproteobatteri *Marinobacter*, *Halomonas*, e *Pseudomonas* sono noti per svolgere un ruolo importante nella degradazione degli idrocarburi alogenati e nei meccanismi di “microbial enhanced oil recovery” (MEOR), nelle *reservoir* di petrolio (Gao et al., 2015) e *petroleum proced water* (Piubeli et al., 2014). Tra gli Alphaproteobatteri *Idiomarina* e *Thalassospira* coesistono con i Gammaproteobatteri negli habitat caratterizzati da una elevata salinità e da una estesa contaminazione da petrolio greggio (Fathepure et al., 2015). *Pseudomonas stutzeri*, *Arcobacter* sp. e *Clostridium* sp., sono stati individuati in *petroleum proced water* a basse temperature (Grabowski et al., 2005).

La presenza di Clostridi nei microcosmi, insieme ai Gamma ed Alphaproteobatteri degradatori, suggerisce che la degradazione degli HC possa coinvolgere anche i Clostridi che partecipano al meccanismo di degradazione in consorzio con batteri metanogeni degradatori (Piubeli et al., 2014). Alcuni Clostridi sono stati proposti come degradatori di HC. In particolare, *Vallitalea*, è un eterotrofo fermentativo anaerobio obbligato, che utilizza piccole molecole organiche, tra le quali alcani a catena corta (Postec et al., 2015). I Clostridi nel sito S5, sono rappresentati dai generi *Clostridium* e *Natnaerovirga*. La sequenza più vicina è la specie *Natnaerovirga pectinivora* AP3, recentemente proposta come *Abyssivirga alkaniphila*, ceppo batterico rigorosamente anaerobio, mesofilo, sintrofico capace di degradare alcani, isolato da un biofilm batterico di siti contaminati (Schouw et al. 2016).

La comunità microbica del sedimento sub-superficiale S5 è stata l'unica caratterizzata dalla presenza di Epsilonbacteria e Clostridi fermentatori, e Gammaproteobatteri aerobi e anaerobi degradatori di HC. Gli Epsilonproteobacteria dominano diversi habitat e sono considerati membri significativi delle comunità delle reservoir di petrolio greggio (Grabowski 2005; Hubert et al., 2012).

Le comunità degli archaea sono generalmente poco studiate in ambienti contaminati da petrolio (Stauffert et al., 2014). Una bassa diversità di archaea è stata rilevata in tutti i campioni di sedimento sub-superficiale e i dati ottenuti dall'analisi DGGE sui microcosmi hanno dimostrato che la presenza del petrolio, a differenza delle comunità batteriche, non determina cambiamenti sulla composizione. Probabilmente la presenza del petrolio ha effetti negativi solo sull'abbondanza piuttosto che sulla diversità degli archaea che già risulta bassa nei campioni di sedimento prima dell'aggiunta del petrolio nei microcosmi (Joshi et al., 2014). Gli archaea identificati nei sedimenti sono rappresentati principalmente dai phylum dei Crenarchaeota e Thaumarchaeota. Generi appartenenti a questi phyla sono rilevati anche nei suoli contaminati da petrolio, negli impianti di trattamento delle acque reflue delle raffinerie petrolifere e in altre matrici inquinate (Gao et al., 2015; Grabowski et al., 2005). Specie del phylum dei Thaumarchaeota sono noti per la capacità di ossidare ammoniaca; anche se recentemente è stato ipotizzato che essi potrebbero non essere ammonio-ossidanti autotrofici obbligati ma potrebbero effettivamente essere in grado di crescere eterotroficamente utilizzando i composti derivanti dal petrolio greggio (Mikkonen et al., 2014).

### 2.3.9 Gli Epsilonbacteria dominano il microcosmo S5

L'analisi delle sequenze del DNA estratto dal gel DGGE ha rivelato la presenza di membri della classe degli Epsilonproteobatteri solo nel microcosmo S5. Per caratterizzare ulteriormente la comunità microbica del microcosmo S5, piuttosto unica e interessante in termini di composizione, e per stimare l'abbondanza relativa degli Epsilonproteobatteri, è stata costruita una libreria di cloni del gene 16S rRNA. Sessanta cloni (su 600 totali) sono stati analizzati mediante analisi ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) e sequenziamento. L'analisi ARDRA ha raggruppato i cloni in tre unità tassonomiche operative (OTUs), due delle quali sono state affiliate alla classe dei Proteobatteri (97% dei cloni) e una alla classe dei Firmicutes (3% dei cloni). I proteobatteri sono quasi esclusivamente rappresentati da Epsilonproteobatteri appartenenti al genere *Arcobacter* (82%), mentre i Gammaproteobatteri sono stati assegnati al genere *Photobacterium* (15%). I Firmicutes risultano rappresentati esclusivamente dal genere *Oceanirhabdus* (3%) (Tab. 2.13).

La comunità microbica del sedimento sub-superficiale S5 è stata l'unica caratterizzata dalla presenza di Epsilonproteobatteri insieme a Clostridia fermentanti e degradatori di HC, e Gammaproteobacteria aerobi e anaerobi degradatori di HC. Gli Epsilonproteobacteria dominano diversi habitat e sono considerati membri significativi delle comunità delle reservoir (Grabowski 2005; Hubert et al., 2012). Sempre più numerosi sono i dati sulla presenza e dominanza dei batteri denitrificanti ossidoriduttori appartenenti alla classe degli Epsilonproteobatteri, e in particolare al genere *Arcobacter* in acque contaminate da petrolio. In particolare, si ipotizza che *Arcobacter* possa avere un ruolo nella degradazione anaerobia sintrofica degli HC (Hubert,

2012). Alcuni isolati di *Arcobacter*, che sono stati fisiologicamente caratterizzati, sono in grado di ridurre il ferro o il manganese e possono crescere in condizioni di microaerofilia (Hubert et al., 2012). La comunità microbica del sedimento S5 è simile alle comunità microbiche individuate in *reservoir* di petrolio greggio in cui la degradazione degli HC avviene per associazioni simbiotiche tra batteri acetogeni come *Arcobacter* sp., che metabolizzano idrocarburi ad acetato e H<sub>2</sub>, e batteri metanogeni che utilizzano acetato e H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (Grabowski et al., 2005). Anche se non sono stati rilevati archaea metanogeni nei sedimenti sub-superficiali di Priolo, la presenza di *Arcobacter* potrebbe essere spiegata dalla loro capacità di utilizzare composti organici di zolfo nel greggio come donatore di elettroni e fonte di energia (Hubert et al., 2012).

Secondo questo modello la degradazione degli HC in assenza di ossigeno o in condizioni di microaerofilia potrebbe verificarsi per co-metabolismo tra batteri riduttori di nitrati, ferro o solfato, piuttosto che per metanogenesi (Gieg et al., 2014).

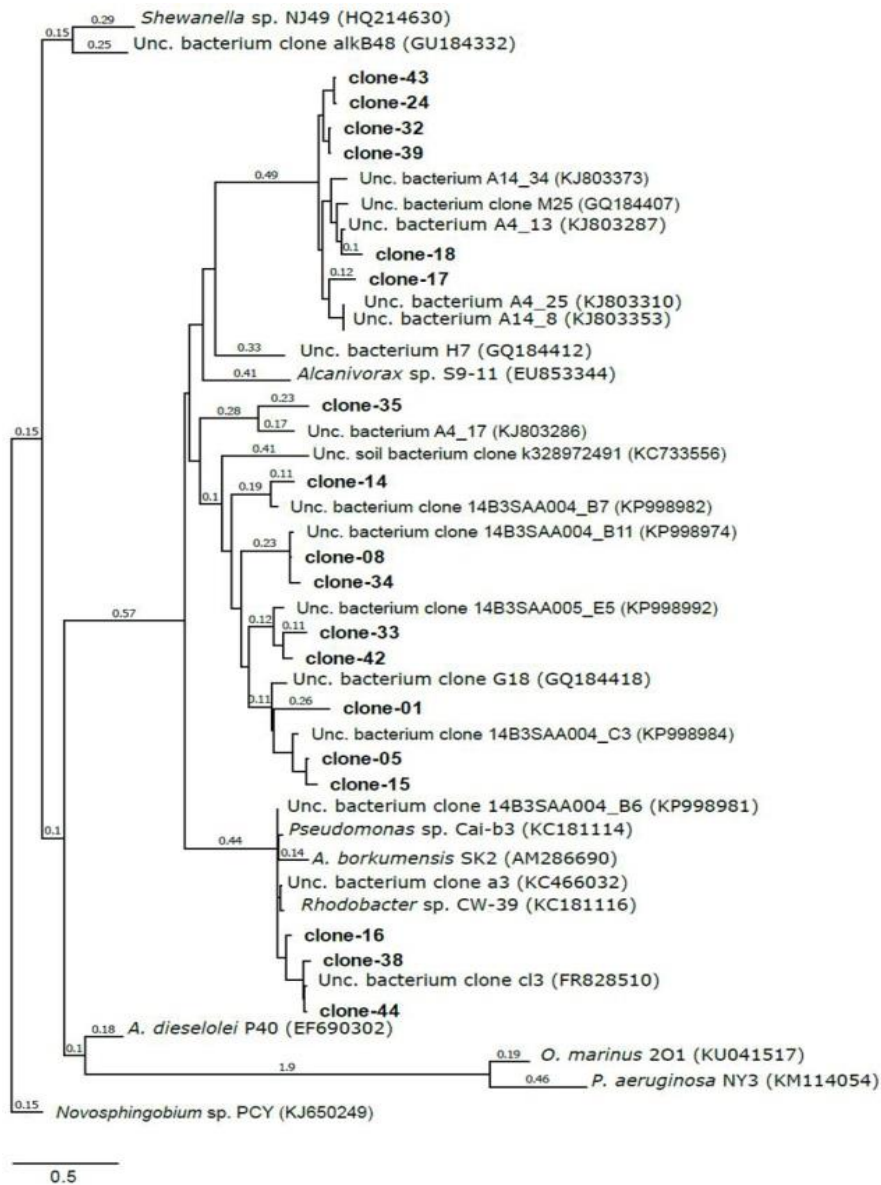
OTU	Analisi Filogenetica (RDPII database)		Blast 16S (megablast)			
	Cloni (%)	Phylum	Classe	Sequenza con la maggiore similarità	Similarità (%)	Accession Number
A	82	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	<i>Arcobacter bivalviorum</i> F4	98	NR_116730.1
B	15		Gammaproteobacteria	<i>Photobacterium aplysiae</i> GMD509	98	NR_043188.1
C	3	Firmicutes	Clostridia	<i>Oceanirhabdus sedimicola</i> NH-JN4	99	NR_109625.1

**Tab. 2.13** Affiliazione filogenetica dei cloni della libreria del gene 16S rRNA del microcosmo S5 allestito inoculando il sedimento sub-superficiale S5 su terreno minerale ONR7a al quale è stato aggiunto petrolio greggio come unica fonte di carbonio.

### 2.3.10 Identificazione di geni catabolici nei sedimenti sub-superficiali

I geni che codificano per le monoossigenasi e diossigenasi sono considerati marcatori molecolari della biodegradazione degli idrocarburi (Fuentes et., al 2014). Un frammento di 550bp corrispondente al gene *alkB* è stato identificato in tutti i campioni di sedimento sub-superficiale; mentre nessun prodotto di PCR è stato ottenuto usando primers per i geni del catabolismo degli idrocarburi policiclici aromatici (*xyIM*, *xylA*, *xylE1*). L'assenza di geni coinvolti nella degradazione dei composti aromatici indicherebbe una bassa capacità degradativa di questi idrocarburi che risultano effettivamente inferiori al livello di rilevamento minimo in quasi tutti i sedimenti. Per ottenere una stima preliminare del potenziale di degradazione degli alcani delle popolazioni microbiche dei sedimenti sub-superficiali, l'amplicone di di 550bp del sedimento N3 è stato clonato e sono stati sequenziati 20 cloni; le sequenze dei 20 inserti hanno mostrato una identità compresa tra il 76% ed il 98% con geni *alkB* di batteri incultivabili, rilevati in sedimenti altamente contaminati da idrocarburi provenienti dal mar Timor in Australia (Wasmund et al., 2009), dalla laguna di Berre (Paisse et al. , 2011), dal Mare Adriatico e dal Mare di Bohai (Korlević et al., 2015). Dei 20 cloni sequenziati, 18 cloni sono stati utilizzati per la costruzione dell'albero filogenetico (Fig. 2.7). La maggior parte delle sequenze *alkB* ottenute sono state raggruppate in tre grandi cluster. Tre sequenze *alkB* formano un cluster con *Alcanivorax borkumensis*, *Pseudomonas* e *Rhodobacter*; tutte le altre sequenze sono state

raggruppate con sequenze di batteri incoltivabili e *Alcanivorax* sp S9-11. Le sequenze dei cloni hanno mostrato una notevole divergenza evolutiva dalle sequenze di altri batteri marini degradatori di HC incluse nell'albero. L'identificazione molecolare delle sequenze *alkB* conferma la capacità di biodegradazione dei sedimenti sub-superficiali. L'osservazione che la maggior parte delle sequenze *alkB* ottenute siano strettamente correlate a batteri individuati in siti altamente contaminati, suggerisce una tendenza comune nella struttura delle comunità microbiche in presenza di petrolio.



**Fig. 2.7** Albero filogenetico costruito allineando sequenze amminoacidiche ottenute dalla libreria di cloni *alkB* del sedimento N3, sequenze di batteri coltivabili degradatori di HC, e sequenze ottenute da altre librerie di clone *alkB*. Le sequenze della libreria di cloni della Baia di Priolo sono indicate in grassetto.

### 2.3.11 Isolamento e identificazione dei batteri degradatori di HC da sedimento sub-superficiale

Un totale di 72 isolati sono stati ottenuti dai microcosmi allestiti inoculando i sedimenti sub-superficiali in terreno minerale addizionato con petrolio come unica fonte di carbonio. Il campione N1 è stato l'unico dal quale non sono stati ottenuti isolati. 50 isolati sono stati ottenuti su Marine Agar in condizioni

aerobie e anaerobie, mentre un totale di 19 isolati capaci di crescere su mezzo minerale utilizzando petrolio come unica fonte di carbonio sono stati ottenuti. Nessuna crescita è stata osservata su mezzo minerale in condizioni anaerobiche. Un totale di 36 colonie morfologicamente diverse, considerando tutte le condizioni, sono state selezionate per l'identificazione tassonomica.

I risultati dell'analisi filogenetica sono riportati nella Tab. 2.14. Gammaproteobatteri degradatori di HC sono stati isolati su petrolio in condizioni di aerobiosi dalle stazioni N2, S4, S5 e S6. Gli isolati sono stati affiliati ai phyla dei Proteobacteria e Firmicutes. In particolare sono state individuate sequenze assegnate a batteri generalisti degradatori di HC alifatici e/o aromatici (*Halomonas*, *Marinobacter*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*) conosciuti anche come produttori di biosurfattanti; un solo filotipo isolato dal sito S5 (sia su Marine agar che sul greggio) è stato affiliato al genere *Idiomarina*, abbondantemente rilevato in altri sedimenti contaminati (McGenety 2014) ma poco conosciuto per la sua capacità catabolica. Solo recentemente è stata descritta la capacità degradativa nei confronti degli HC del petrolio e l'attività di emulsificazione di ceppi appartenenti al genere *Idiomarina* isolati dalle cozze (Bayat et al., 2016). Gli unici ceppi batterici isolati dai microcosmi N3 e S4 sono stati affiliati al genere *Vallitalea*. È interessante notare che sia *Vallitalea* che la maggior parte degli altri generi isolati in coltura pura sono stati rilevati anche tramite sequenziamento delle bande DGGE (Tab. 2.11).

Sito	Analisi filogenetica (RDPII database)				Blast 16S (megablast)			
	Marine Agar		Onr7a + petrolio		Phylum	Classe	Sequenza con maggiore similarità (99%)	Accession number
	Air	Ana	Air	Ana				
N1	-	-	-	-				
N2	-	-	+	-	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Pseudoalteromonas shioyasakiensis</i>	NR_125458.1
	-	+	+	-			<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	NR_027551.1
N3	-	+	-	-	Firmicutes	Clostridia	<i>Vallitalea guaymasensis</i>	NR_117645.1
S4	-	+	-	-	Firmicutes	Clostridia	<i>Vallitalea guaymasensis</i>	NR_117645.1
S5	+	+	+	-	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	NR_074829.1
	-	-	+	-			<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	NR_027551.1
	+	-	+	-			<i>Idiomarina baltica</i>	NR_027560.1
S6	-	-	+	-	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Halomonas</i>	NR_027219.1
	-	+	-	-			<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	NR_027551.1

**Tab. 2.14** Isolati batterici da sedimenti sub-superficiali in differenti condizioni di crescita (+/- presenza o assenza di colonie su mezzo solido); Air: condizioni aerobie; Ana: condizioni anaerobie in greggio.

## 2.4 Conclusioni

I dati chimici e microbiologici consentono di raffigurare un complesso scenario ambientale della Baia di Priolo. Tutte le sei stazioni analizzate hanno mostrato elevati livelli di idrocarburi totali ed n-alcani in concomitanza ad una elevata abbondanza e diversità di batteri idrocarburo-ossidanti che sono noti per svolgere un ruolo chiave nella degradazione dei composti idrocarburi. Gli idrocarburi policiclici aromatici risultano assenti. Gli n-alcani risultano i contaminanti dominanti seguiti dalla frazione di miscele di idrocarburi complesse non risolte (UCM). I sedimenti superficiali (0-5cm) ospitano una maggiore diversità e variabilità in termini di composizione della comunità batterica totale rispetto ai campioni di acqua di mare; che di contro hanno rivelato una maggiore diversità di batteri idrocarburo-ossidanti coltivabili. In generale la diversità batterica totale non sembra essere influenzata dai livelli di contaminazione anche se il sedimento superficiale più inquinato (N3) ospita una maggiore diversità batterica totale e una maggiore abbondanza e diversità di degradatori di idrocarburi coltivabili rispetto agli altri siti. Batteri degradatori generalisti e/o obbligati appartenenti ai generi *Alcanivorax*, *Marinobacter Thalassospira*, *Alteromonas* e *Oleibacter* sono stati isolati dai sedimenti superficiali e acqua provenienti da tutte le stazioni. La massiccia presenza in questi campioni di batteri idrocarburo-ossidanti obbligati appartenenti al genere *Alcanivorax* suggerisce una contaminazione cronica probabilmente derivata dal porto adiacente (Head et al., 2006). Molto interessante risulta la presenza *Oleibacter* raro ceppo idrocarburo-ossidante obbligato, isolato fino ad oggi solo in mari tropicali e ancora poco caratterizzato. La sua presenza nel SIN di Priolo potrebbe suggerire un ruolo importante che questo batterio svolge nella degradazione degli idrocarburi anche nel Mar Mediterraneo. Ulteriori analisi fisiologiche e metaboliche su questo ceppo batterico sono state oggetto di questa tesi di dottorato e sono riportate nel capitolo III. Il quadro che risulta dall'analisi della comunità microbica dei sedimenti sub-superficiali (5-10) cm è piuttosto complesso e diverso da quello dei comparti sovrastanti. Le analisi chimiche e molecolari effettuate descrivono i sedimenti sub-superficiali altamente divergenti dai sedimenti superficiali. Questi sedimenti risultano altamente contaminati da n-alcani e da miscele complesse di idrocarburi non risolte (UCMs) e allo stesso tempo ospitano una comunità microbica caratterizzata da un alto potenziale di biodegradazione. La composizione della comunità microbica risulta simile a quella di *reservoir* di petrolio e *produced water* in cui è stato proposto un metabolismo degli HC sintrofico anaerobico o microaerofilo. I dati microbiologici suggeriscono quindi la presenza di micrositi anossici o comunque a bassa tensione di ossigeno, nei quali si stabiliscono popolazioni microbiche sintrofiche in grado di degradare idrocarburi. I sedimenti sub-superficiali possiedono capacità di biodegradazione nei confronti di n-alcani del petrolio greggio come dimostrato dagli esperimenti in microcosmo in microaerofilia. Questa capacità è stata confermata dall'isolamento di degradatori di HC e dall'identificazione molecolare delle sequenze di geni del sistema alcano monoossigenasi nel sito più inquinato N3. I dati sui sedimenti sub-superficiali confermano l'elevato potenziale intrinseco di biorisanamento basato sui microrganismi autoctoni della Baia di Priolo. L'elevata diversità microbica associata ai batteri degradatori di HC si suppone che possa contribuire all'attenuazione naturale dell'area (Dell'Anno et al., 2012). La comunità ricca e diversificata di batteri HC ossidanti è dotata di un potenziale molto elevato di applicazione per il biorisanamento di questa zona.

### Capitolo III

## **Caratterizzazione di tre ceppi di *Oleibacter marinus* isolati per la prima volta nel Mar Mediterraneo**

### **Abstract**

Oceanospirillaceae are widespread marine bacteria belonging to Gammaproteobacteria. Several genera of this family, like *Thalassolituus* and *Marinomonas*, are known as hydrocarbonoclastic bacteria (HCB) specialized in petroleum degradation. Among them, the recently described genus *Oleibacter* has, till now, been detected only in tropical marine environments. Three isolates have been isolated by enrichment culture on a *n*-alkane mixture (C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>24</sub>) from seawater sampled in the chronically polluted Augusta harbour in Sicily, representing the first isolation of members of this genus, from Mediterranean Sea. The isolates show 98-99% identity of their 16S rRNA gene with *Oleibacter marinus* strain 2O1<sup>T</sup>, the original isolate from the Indonesia coast. The Fatty acid methyl ether analysis, show that the main cellular fatty acids have high similarity with that of the closest phylogenetic strains (2O1 and *thalassolithus*), predominant cellular fatty acids are 16:1 $\omega$ 7, 16:0 C18:1 $\omega$ 9. The *Oleibacter* isolates grow on crude oil and *n*-alkanes and also on a limited number of C sources. Crude oil degradation, measured by Gas-Chromatography-FID analysis, is in the range of 88-93% of short and medium size chain *n*-alkanes components. Low bio-surfactant production has been observed, with three different methods, compared to other strains. A fragment of the alkane monooxygenase encoding gene *alkB*, shows 76% identity with that of *Pseudomonas nitroreducens* and, among Oceanospirillaceae, with *Thalassolituus oleivorans alkB* gene (73% id.). *Oleibacter* and other *Oceanobacter*- related bacteria dominate in crude-oil impacted tropical seawater and their hydrocarbon-degradation activity was compared to that of the genus *Alcanivorax* with which they could compete. *Oleibacter* might have a future key role in bioremediation of marine environments.

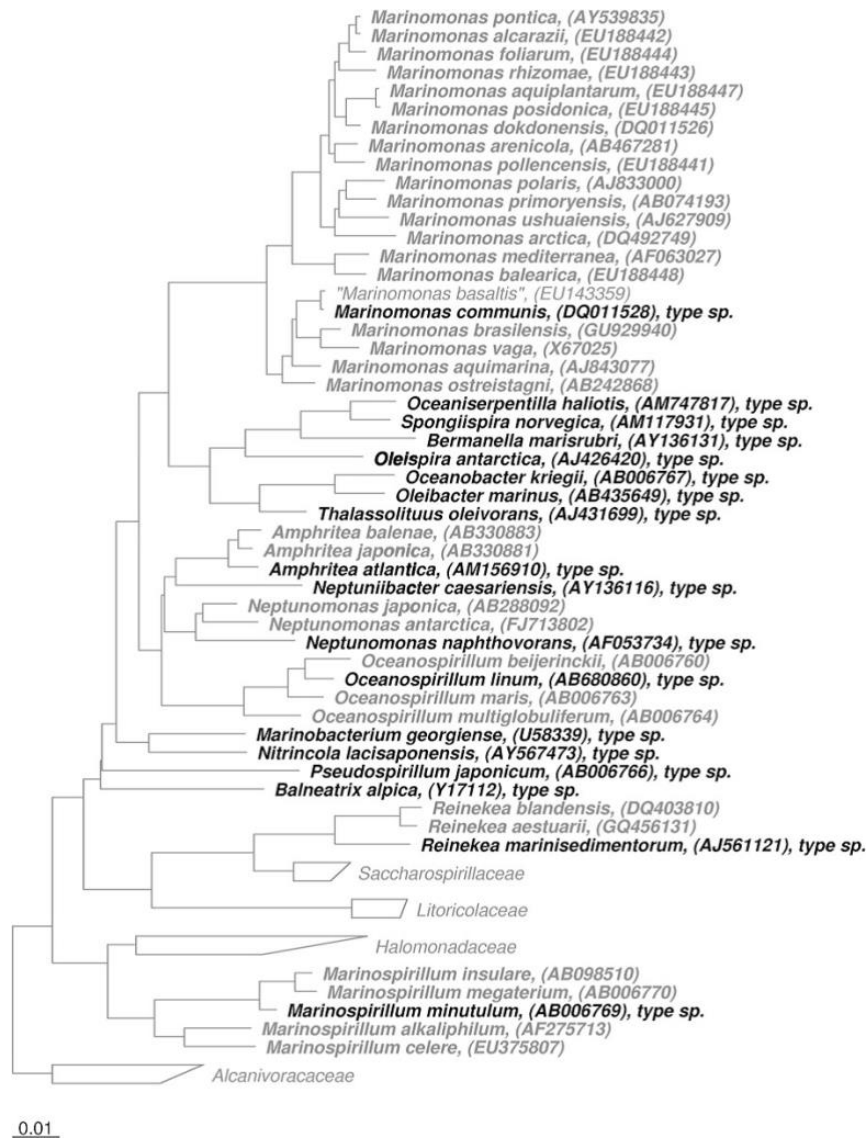
### 3.1 Introduzione

#### 3.1.1 Descrizione di *Oleibacter marinus*, nuovo genere degradatore di idrocarburi alifatici in ambiente marini tropicali

La famiglia delle Oceanospirillaceae, ordine Oceanospirillales, classe Gammaproteobacteria consiste di 17 generi (Fig. 3.1). I batteri appartenenti a questa famiglia sono tutti aerobi, gram negativi, la maggior parte sono alotolleranti o alofili, richiedono ioni sodio per la crescita e sono largamente distribuiti in ambiente marino. Numerose specie hanno caratteristiche uniche, compresa la capacità di degradare i composti del petrolio, di produrre composti battericidi e pigmenti di melanina. *Oleibacter*, *Oleispira* e *Thalassolituus* sono i generi associati alla degradazione del petrolio; sono stati isolati da ambienti ricchi di idrocarburi (HC), principalmente acqua di mare e sedimenti contaminati (Satomi & Fujii 2014). Tutti questi isolati sono noti come batteri idrocarburo-ossidanti obbligati, in quanto utilizzano HC come fonte esclusiva di carbonio ed energia e tendono ad essere i membri dominanti delle comunità batteriche in ambienti contaminati da idrocarburi (Teramoto et al., 2011).

Recentemente è stato dimostrato che membri del genere *Thalassolituus* dominano in microcosmi di acqua di mare temperata contenente n-alcane (McKew et al., 2007; Yakimov et al. 2005) e petrolio greggio (Coulon et al., 2007; McKew et al. 2007). I meccanismi di degradazione e i dettagli sui pathway coinvolti nella degradazione sono stati solo in parte chiariti per questi generi degradatori della famiglia delle Oceanospirillaceae, in particolare *Oleibacter marinus*, genere filogeneticamente molto vicino ad *Oceanobacter*, risulta poco studiato e caratterizzato. Tre ceppi di *Oleibacter marinus* designati come 2O1<sup>T</sup>, 1O14 e 1O18, sono stati isolati nel 2009 da campioni di acqua di mare raccolti a Pari Island situati vicino Jakarta, in Indonesia, dopo arricchimento su petrolio greggio e continua supplementazione di acqua di mare integrata con azoto, fosforo e ferro (Teramoto et al., 2009). Gli isolati sono stati descritti per la prima volta come un nuovo genere di Oceanospirillaceae, a cui la sola specie di *Oleibacter marinus* è stata finora assegnata (Teramoto et al., 2011). Gli isolati sono stati caratterizzati sia da un punto di vista tassonomico che metabolico; le caratteristiche fisiologiche e biochimiche investigate sono elencate in Tab. 3.1. L'analisi filogenetica ha rivelato una somiglianza della sequenza del gene 16S rRNA, compresa tra il 96,4-96,5%, con *Oceanobacter kriegii* IFO 15467T (Fig. 3.2), che a differenza di *Oleibacter* non è un ceppo degradatore di HC ed utilizza un diverso spettro di substrati per la crescita (Bowditch et al., 1984; Teramoto et al., 2009).





**Fig.3.1** Ricostruzione filogenetica della famiglia delle Oceanospirillaceae basata sul gene 16srDNA (Satomi et al., 2014)

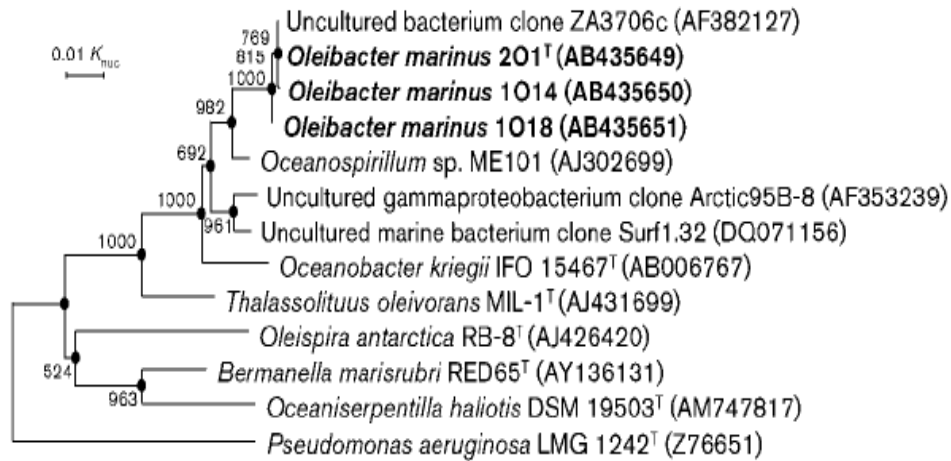
Strains: 1, *Oleibacter marinus* gen. nov., sp. nov. ( $n=3$ ); 2, *Oceanobacter kriegii* NBRC 15467<sup>T</sup>; 3, *Thalassolituus oleivorans* DSM 14913<sup>T</sup>. Data were obtained in this study unless indicated. +, Positive; -, negative; ND, no data available.

Characteristic	1	2	3
Monopolar flagella	1	1 <sup>a</sup> *	1-4 <sup>b</sup>
Growth at 4 °C	-	- <sup>a</sup>	+ <sup>b</sup>
Optimum temperature (°C)	25-30	25-30	20-25 <sup>b</sup>
pH range	6-10	5-9	7.5-9 <sup>b</sup>
Reduction of nitrate	+	+ [- <sup>a</sup> ]	- <sup>b</sup>
Fatty acids (%)			
C <sub>18:1</sub> ω6 and/or ω9	9.0-27.4†	0	10.9 <sup>b</sup>
C <sub>18:1</sub> ω7	2.7-5.4	28.6	ND
Major 3-OH fatty acid (% of total 3-OH)	C <sub>12:0</sub> (58-67)	C <sub>10:0</sub> (51) [C <sub>12:0</sub> (54)] <sup>b</sup>	C <sub>12:0</sub> (100) <sup>b</sup>
Major isoprenoid quinone (%)	Q-9 (97-99)	Q-8 (91)	Q-9 (97)

\*Data obtained from: a, Bowditch et al. (1984); b, Yakimov et al. (2004).

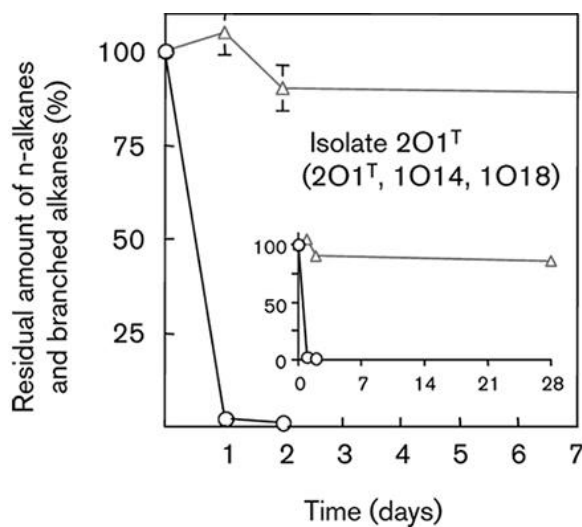
†C<sub>18:1</sub>ω9.

**Tab.3.1** Caratteristiche fisiologiche e biochimiche di *Oleibacter marinus* e dei ceppi filogeneticamente più vicini (Teramoto et al., 2011)



**Fig. 3.2** Albero filogenetico costruito sulle sequenze del gene 16S rRNA che mostra la posizione filogenetica dei ceppi 201<sup>T</sup>, 1014 e 1018 appartenenti al genere *Oleibacter* e dei taxa correlati (Teramoto et al., 2011)

Gli isolati di *Oleibacter marinus* hanno dimostrato un'elevata attività degradativa nei confronti di alcani alifatici compresi nel range C<sub>12</sub>-C<sub>22</sub> ed una più bassa capacità degradativa nei confronti di alcani ramificati (Pristano e Fitano) (Fig. 3.3). L'attività degradativa di *Oleibacter* è comparabile a quella di *Alcanivorax*, microrganismo modello della degradazione di idrocarburi alifatici in ambiente marino. Inoltre esperimenti in microcosmo dimostrano che *Oleibacter marinus* domina in microcosmi di acqua marina contaminati da petrolio. Questa caratteristica comune ad *Alcanivorax* suggerisce che *Oleibacter* potrebbe svolgere un ruolo importante nella degradazione di idrocarburi alifatici. Un gene con una elevata similarità all'alcane monoossigenasi *alkB* è stato individuato negli isolati di *Oleibacter*, mentre risulta assente in *Oceanobacter kriegii* NBRC 15467<sup>T</sup> (Bowditch et al., 1984; Teramoto ed altri, 2009; Yakimov et al., 2004). Dal 2011 ad oggi nessun altro ceppo batterico appartenente a questa specie risulta isolato, tutte le sequenze correlate a questo genere sono riconducibili a ceppi non coltivabili.



**Fig. 3.3** Degradazione degli alcani alifatici da C<sub>12</sub> a C<sub>22</sub> (cerchi) e del Pristano e Fitano (triangoli) da parte di *Oleibacter marinus* 201, 1014 e 1018 su mezzo minerale contenente 0.1% (v/v) di petrolio a 25°C (Teramoto et al., 2011)

Tre nuovi ceppi batterici appartenenti al genere *Oleibacter marinus* sono stati isolati dal Baia di Priolo. I ceppi sono stati ottenuti da colture di arricchimento allestite inoculando il campione di acqua di mare proveniente dalla stazione più contaminata (N3) su terreno minerale ONR7a addizionato con una miscela di *n*-alcani ( $C_{16}$ ,  $C_{18}$ ,  $C_{24}$ ) come unica fonte di carbonio. L'isolamento di *Oleibacter* dal Baia di Priolo risulta molto interessante e meritevole di ulteriori approfondimenti in quanto si tratta del primo isolamento nell'area del Mar mediterraneo, nonché del secondo isolamento a livello mondiale.

### 3.1.2 Scopo del lavoro

Le indagini microbiologiche nella Baia di Priolo condotte durante il primo periodo del mio Dottorato di ricerca hanno permesso di caratterizzare la comunità microbica della Baia di Priolo, portando all'isolamento di *Oleibacter marinus*. Vista la rarità di questo genere, e considerata sia l'alta attività degradativa nei confronti di *n*-alcani dei ceppi isolati dall'oceano Pacifico (Teramoto et al., 2011) sia le scarse conoscenze sui pathway catabolici, i tre ceppi di *Oleibacter marinus*, (*Oleibacter* 3, 4 e 5) isolati dal Mar mediterraneo sono stati caratterizzati da un punto di vista fisiologico e metabolico tramite differenti analisi; finalizzate a confrontare gli isolati del Mediterraneo con altri due ceppi idrocarburo-ossidanti appartenenti alla famiglia delle Oceanospirillaceae: 1) il Type Strain *Oleibacter marinus* 201<sup>T</sup> (Teramoto et al., 2011); 2) *Thalassolituus oleivorans* MIL-1T (DSM14913T) che è la specie filogeneticamente più vicina ad *Oleibacter*. L'analisi filogenetica è stata effettuata tramite caratterizzazione fenotipica, tassonomica e analisi del profilo degli esteri degli acidi grassi (FAMES).

Per analizzare il potenziale biotecnologico degli isolati è stata saggiata: la capacità di utilizzare diversi idrocarburi come unica fonte di carbonio, l'andamento della crescita su esadecano ( $C_{16}$ ) (curva di crescita), l'attività emulsionante, la produzione di biosurfattanti, l'attività degradativa nei confronti di alcani a catena lineare in un range compreso tra  $C_{10}$ - $C_{28}$ , e la presenza del gene per l'alcano mono-ossigenasi *alkB*.






L'analisi del profilo degli esteri degli acidi grassi (FAMES) è stata svolta in collaborazione con il Dott. Armando Laudicina presso il Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (SAAF) dell'Università di Palermo.

La valutazione dell'attività degradativa è stata svolta in collaborazione con il Dott.re Simone Cappello presso l'Istituto per l'ambiente marino Costiero-Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR) della sezione di Messina.

### 3.2 Materiali e metodi

#### 3.2.1 Ceppi batterici

*Oleibacter marinus* 3, *Oleibacter marinus* 4 e *Oleibacter marinus* 5 sono stati isolati dalla Baia di Priolo, dal campione di acqua di mare N3 dopo allestimento di colture di arricchimento su terreno minerale ONR7a con una miscela di *n*-alcani (C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub> and C<sub>24</sub>). il Type Strain *Oleibacter marinus* 201<sup>T</sup> (Teramoto et al., 2011) è stato acquistato presso una collezione internazionale; *Thalassolituus oleivorans* MIL-1T (DSM14913<sup>T</sup>) proviene dalla ceppoteca dei batteri idrocarburo-ossidanti dell'Istituto per l'Ambiente Marino Costiero-Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR) della sezione di Messina.

Isolati		Classe	Famiglia	Riferimento bibliografico
<i>Oleibacter marinus</i> 3		Gammaproteobacteria	Oceanospirillaceae	Catania et al., 2015
<i>Oleibacter marinus</i> 4		Gammaproteobacteria	Oceanospirillaceae	Catania et al., 2015
<i>Oleibacter marinus</i> 5		Gammaproteobacteria	Oceanospirillaceae	Catania et al., 2015
<i>Oleibacter marinus</i> 201 <sup>T</sup>		Gammaproteobacteria	Oceanospirillaceae	Teramoto et al., 2011
<i>Thalassolituus oleivorans</i> MIL-1T		Gammaproteobacteria	Oceanospirillaceae	Yakimov et al., 2004

**Tab. 3.2** Ceppi batterici analizzati

#### 3.2.2 Analisi del gene 16S rRNA, costruzione dell'albero filogenetico e biogeografia

Per l'analisi filogenetica è stato amplificato il gene che codifica per l'rDNA 16S dei ceppi *O. marinus* 3, 4, 5 tramite colony PCR. Ogni colonia è stata prelevata da piastra ONR7a contenente esadecano mediante colony picking e sottoposta a lisi cellulare tramite shock termico. Il lisato batterico è stato utilizzato come stampo per la reazione di amplificazione dell'rDNA 16S utilizzando la coppia di primers universale 27F e 1492R (Frank et al., 2008). L'amplificazione è stata condotta in 30 µL di volume finale, utilizzando Buffer Standard One Taq (Biolabs, New England) 1X, 200mM di dNTPs, 0,2 µM di primers 27F e 1492R, One taq polymerase 1 U e 1µl di lisato batterico. Il DNA è stato amplificato nelle seguenti condizioni: denaturazione iniziale a 94°C per 30sec., 35 cicli di denaturazione a 94°C per 30sec, annealing a 50°C per 60sec, estensione a 68°C per 90sec. I prodotti sono stati purificati con il kit Nucleospin® Gel And Pcr Clean-Up Macherey-Nagel (NucleoSpin® Extract II) seguendo le istruzioni della casa produttrice e sottoposti a reazione di sequenziamento presso la società "MacroGen Europe". Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state analizzate utilizzando il database RDP Naive Bayesian rDNA Classifier ("Confidence threshold" 80%), il database GenBank dell'NCBI usando il programma nucleotide-BLAST, MEGABLAST ("Highly similar sequences"). Le sequenze sono state depositate nel database DDBJ/EMBL/Genbank sotto gli accession number KT906690/ KT906692. Le sequenze sono state successivamente allineate tramite il database clustalW per la costruzione dell'albero filogenetico basato sulle sequenze 16S rDNA degli isolati di *Oleibacter* e di altri ceppi degradatori. L'albero filogenetico è stato costruito utilizzando il programma Arb.

La biogeografia dei BIC è stata ampiamente analizzata per altri generi, quali *Alcanivorax* spp. che risulta ubiquitario (Yakimov et al. 2007), *Thalassolituus oleivorans* e *Cycloclasticus* spp. che risultano essere ampiamente distribuiti, specialmente nell'emisfero Nord (Yakimov et al. 2007); *Oleispira*, altro genere delle Oceanospirillaceae, risulta maggiormente distribuito in acque fredde (Yakimov et al. 2007), mentre *O. marinus* è stato proposto come degradatore di ambienti marini tropicali (Teramoto et al. 2011). La biogeografia di *Oleibacter* è stata effettuata mediante analisi bioinformatica di tutte le sequenze 16S RNA di *Oleibacter* utilizzando il programma nucleotide-BLAST, e come sonda la sequenza 16S rRNA di *Oleibacter marinus* 3. Tutti i matches con una copertura inferiore al 99% e una identità inferiore al 97%, sono stati eliminati. Le sequenze che in banca dati riportano “uncultured bacterium” sono state ottenute tramite metodi coltura-indipendenti come DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) oppure 16S rDNA clone library.

### 3.2.3 Analisi degli acidi grassi

L'analisi del profilo degli esteri metilici degli acidi grassi (FAMES - Fatty acid methyl esters) di *O. Marinus* 3, 4, 5 e del type strain 201<sup>T</sup>, cresciuti su piruvato, e su esadecano come unica fonte di carbonio, è stata effettuata utilizzando il metodo di estrazione EL (ester-linked) (Kuykendall et al. 1988) basato su metanolisi leggermente alcalina per l'estrazione degli ELFAs (ester-linked fatty acid). Un Preinoculo in 3 ml di ONR7a contenente 1% di esadecano o di dMBpyr (Teramoto et al., 2011) è stato preparato e incubato a temperatura ambiente in agitazione (160 r.p.m.) per 7 giorni. Una aliquota dell'1% del preinoculo è stata trasferita in 100ml di terreno fresco e le colture sono state incubate come descritto. Le colture batteriche sono state centrifugate a 4000r.p.m. per 20 minuti. I pellet sono stati risospesi in 15 mL 0,2 M KOH a cui sono stati aggiunti 3 µg di standard interno STD-I (0,250 mL di una soluzione 0,1 mg mL<sup>-1</sup> del C19:0 metil-estere – P.M. 312,53 – in esano). E' stata quindi aggiunta una soluzione 1:1 di metanolo e cloroformio, e i campioni sono stati incubati a 37°C per 1 ora e agitati con vortex ad intervalli di 10 minuti, per permettere il rilascio e la metilazione degli ELFAs. Per neutralizzare il pH sono stati aggiunti 3 mL di acido acetico 1 M, e 10 mL di isoesano (2,metil-pentano) per l'estrazione finale dei FAMES. I campioni sono stati centrifugati a 1500 rpm. per 3 minuti, lo strato superiore dell'isoesano trasferito in nuovi tubi ed evaporato fino a disseccazione in Rotavapor. I campioni sono stati risospesi in 100 µl di isoesano e analizzati in gas-cromatografo (GC) equipaggiato con un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) e una colonna capillare. La sequenza di temperatura utilizzata nella GC è stata la seguente: Isoterma iniziale a 115°C per 5 minuti, Aumento a un tasso di 1.5 °C per minuto da 115 a 230°C, Isoterma finale a 230°C per 2 minuti. Il detector è stato settato a 250°C, come carrier è stato usato dell'elio settato a flusso costante a 1 mL min<sup>-1</sup>. L'acido metil-ester-nonadecanoico è stato usato come standard interno STD-I per la quantificazione dei FAMES. L'identificazione dei picchi è stata basata sul confronto dei tempi di ritenzione con standards conosciuti. L'ammontare di ogni FAME individuato è stato espresso come area percentuale di ogni picco rispetto al totale delle aree di tutti i FAMES individuati nel campione.

### 3.2.4 Utilizzazione degli idrocarburi

La capacità di utilizzare idrocarburi singoli o in miscela degli isolati di *O. marinus* 3, 4 e 5 è stata valutata tramite prove di crescita effettuate su terreno minerale ONR7a liquido e/o solido in presenza di differenti substrati idrocarburi, singoli o in miscela, utilizzati come unica fonte di carbonio alla concentrazione finale dell'1%. Gli idrocarburi testati sono stati i seguenti: dodecano ( $C_{12}$ ), esadecano ( $C_{16}$ ), tetracosano ( $C_{24}$ ), triacontano ( $C_{30}$ ), pristano ( $C_{19}$ ), etere di Petrolio (Mix  $C_5$ - $C_{10}$ ), greggio, gasolio, olio motore. Anche la capacità degli isolati di utilizzare fonti di carbonio non idrocarburi è stata valutata coltivando i ceppi su terreno minerale (solido e liquido) dMB (Teramoto et al., 2011) contenente piruvato o acetato (5g/l) come fonte di carbonio. Infine è stata valutata la capacità di crescere su terreno di coltura solido Marine Broth specifico per la crescita dei batteri marini eterotrofi. Questo terreno di coltura contiene peptone, ed estratto di lievito come fonte di carbonio. Per le prove di crescita in terreno liquido singole colonie di ogni ceppo batterico sono state inoculate in 3ml di terreno di coltura e incubate a 25°C in agitazione (160 r.p.m.). Le colture su terreno minerale sono state preparate aggiungendo la fonte idrocarburi precedentemente sterilizzata per filtrazione alla concentrazione finale dell'1% (v/v). Un'aliquota dell'1% di preinoculo è stata trasferita in 50 ml di terreno fresco e le colture sono state incubate nelle stesse condizioni descritte per 10 giorni. La crescita è stata valutata giornalmente come densità ottica rispetto ad un controllo abiotico preparato nelle stesse condizioni senza inoculo batterico. Per la crescita su terreno minerale solido l'idrocarburo (100  $\mu$ l) è stato aggiunto su un dischetto di carta da filtro 3 mm ( $\varnothing$  60 mm) precedentemente sterilizzato in autoclave e posto sul coperchio della capsula petri. Le piastre sono state sigillate con Parafilm per impedire la fuoriuscita delle componenti volatili dell'idrocarburo, e incubate a temperatura ambiente fino a comparsa delle colonie batteriche

### 3.2.5 Curva di crescita su esadecano

La crescita di *Oleibacter spp.* è stata valutata su esadecano ( $C_{16}$ ). Preculture sono state preparate inoculando singole colonie batteriche in 3ml di terreno minerale ONR7a addizionato con esadecano (1%) come unica fonte di carbonio. Le colture sono state incubate a temperatura ambiente in agitazione (160r.p.m.) per 7 giorni. Subcolture di 50ml sono state preprate come descritto inoculando un'aliquota di preinoculo (1%) ad  $OD_{600} \sim 0,1$ . in 100ml di terreno minerale fresco contenente 1% di esadecano. Le subcolture sono state incubate nelle stesse condizioni dei preinoculi. La densità cellulare è stata determinata mediante misura della densità ottica ( $OD_{600}$ ) ogni 24 ore per 20 giorni. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e risultati sono stati espressi come media dei valori ottenuti riportando l'errore standard.

### 3.2.6 Capacità degradative

L'efficienza di degradazione degli isolati 3, 4, e 5 nei confronti degli alcani del petrolio è stata determinata calcolando la percentuale di *n*-alcani residui, in un range compreso tra  $C_{10}$  e  $C_{28}$ , in coltura liquida dopo una settimana di incubazione su petrolio come unica fonte di carbonio. I preinoculi sono stati preparati come descritto e dopo avere centrifugato le colture batteriche ed effettuato tre lavaggi con acqua distillata, 1ml di coltura batterica ad  $OD_{600} 0.1$  è stato trasferito in 30 ml di ONR7a addizionato con 0.1% di

petrolio greggio come unica fonte di carbonio. Le colture sono state incubate a temperatura ambiente in agitazione (160 r.p.m.) per 7 giorni. Al termine dell'incubazione i campioni sono stati acidificati con acido cloridrico 1N, e gli HC sono stati estratti tramite 3 lavaggi con Diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). I campioni sono stati trattati con sodio solfato anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) per rimuovere possibili residui di acqua. L'estratto è stato concentrato e risospeso successivamente in 1 ml di Diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). La composizione totale degli idrocarburi è stata determinata mediante analisi gravimetrica usando un Gascromatografo con rivelatore a ionizzatore di fiamma (GC-FID) (Master GC DANI Instruments). La sequenza di temperatura nella GC utilizzata è stata la seguente: isoterma iniziale a  $300^\circ\text{C}$  per 4 minuti; rate da  $99^\circ\text{C}$  a  $50^\circ\text{C}$  per 53min. Il detector è stato impostato alla temperatura di  $330^\circ\text{C}$ . I campioni sono stati preparati in duplicato. In parallelo alle colture batteriche è stato preparato anche un controllo abiotico. La degradazione degli alcani del petrolio è stata calcolata come quantità di idrocarburi residua al termine dell'incubazione ed espressa come percentuale di alcani degradati, in un range compreso da  $\text{C}_{10}$  a  $\text{C}_{28}$  rispetto al tempo zero.

### 3.2.7 Produzione di biosurfattanti

Le colture batteriche dei ceppi di *Oleibacter* spp. sono state preparate inoculando singole colonie in 3ml di terreno minerale ONR7a addizionato con 0,1% di esadecano. Dopo una settimana di incubazione a temperatura ambiente in agitazione (160 r.p.m.) è stata valutata la capacità di produrre biosurfattanti tramite tre differenti test: Drop collapsing, Oil spreading, ed EA24

#### 3.2.7.1 Drop collapsing test

Questo test si basa sul principio che gocce di coltura batterica poste su una superficie solida rivestita di petrolio diffondono, o addirittura collassano, se la coltura liquida contiene tensioattivi; se invece le colture non producono tensioattivi le molecole di acqua polari sono respinte dalla superficie idrofoba del petrolio e la goccia resta stabile. La stabilità delle gocce dipende dalla concentrazione di tensioattivo prodotto ed è correlata con la tensione superficiale e interfacciale. In ogni pozzetto di una microwell da 96 pozzetti sono stati trasferiti  $7\mu\text{L}$  di petrolio greggio ai quali sono stati aggiunti  $20\mu\text{L}$  di coltura batterica preparata come descritto in Ali & Rajak 2013. Dopo un minuto di incubazione a temperatura ambiente i risultati sono stati descritti nel modo seguente: le colture batteriche che hanno dato gocce piatte sono state classificate come produttrici di biotensioattivi, mentre le colture che hanno dato gocce arrotondate, indicative della mancanza di produzione di biotensioattivo, sono state classificate come non produttrici (Ali & Rajak 2013)

#### 3.2.7.2 Test EA24 (emulsification activity)

La capacità emulsionante è stata valutata mediante il calcolo dell'indice di emulsione (EA24). L'EA24 delle colture batteriche è stato determinato miscelando 2 ml di coltura batterica e 2 ml di esadecano. I campioni sono stati agitati in vortex ad alta velocità per 2 minuti e lasciati riposare per 1 ora per calcolare l'indice di emulsione (EA), e per 24 ore per calcolare la stabilità dell'emulsione (indice EA24). L'indice di emulsione è dato come percentuale dell'altezza dello strato emulsionato (cm) diviso per l'altezza totale della frazione liquida (cm). La percentuale di indice di emulsione è stata calcolata utilizzando la seguente equazione:  $E = \text{Altezza dell'emulsione formata} / \text{altezza totale della soluzione} * 100$ .

### **3.2.7.3 Oil spreading Test**

In una capsula Petri sono stati trasferiti 30 ml di ONR7a sterile e 20µl di petrolio greggio. Sopra la goccia di petrolio, sono stati lasciati cadere 20 µl di coltura batterica. Dopo 1 minuto di incubazione è stata valutata la presenza di un alone di dispersione della goccia di petrolio dovuto alla produzione di biosurfattanti ad opera dei microrganismi. Le colture che non mostravano alcun alone sono state classificate come negative mentre per le colture batteriche che presentavano l'alone è stata data una misura dell'attività emulsificante espressa in termini di dimensioni (mm) dell'alone di dispersione prodotto (Ali & Rajak 2013)

### **3.2.8 Amplificazione del gene catabolico *alkB***

Un frammento del gene *alkB*, che codifica per l'alcano monossigenasi che catalizza la reazione chiave del pathway di degradazione degli alcani, è stato amplificato utilizzando la coppia di primers degenerati *alkB1F* e *alkB1R* (Kloos et al. 2006). La reazione di PCR è stata eseguita in un volume totale di 20 µl contenenti OneTaq Standard Reaction Buffer 1 x (NEB), 0,2 mM di dNTPs (Invitrogen), 0,5 µM di primer Forward e reverse, 1 U di OneTaq DNA Polymerase (NEB), e 10ng di DNA stampo estratto con il kit Qiagen stool seguendo le istruzioni della casa produttrice. Il programma di amplificazione consiste in una fase di denaturazione iniziale di 30 sec. a 94 ° C, seguita da 35 cicli di 30 sec. a 94 ° C, 30 sec. a 55 ° C, 1 min a 68°C, ed una fase di estensione finale di 5 min. a 68°C. I prodotti di PCR sono stati purificati direttamente da gel utilizzando il kit *Macherey-Nagel* e sequenziati. Le sequenze nucleotidiche sono state analizzate come descritto precedentemente e depositate nel database DDBJ/EMBL/Genbank sotto gli accession number KU041514/KU041517. Oltre alle sequenze del gene *alkB* degli isolati del Mediterraneo, è stata depositata nel database Genbank anche la sequenza *alkB* del type strain 2O1, poiché assente in banca dati. che dal type strain 2O1L l'algoritmo tBLASTx è stato utilizzato per confrontare le sequenze tradotte. Le sequenze *alkB* ottenute sono state allineate con il software MEGA6 per la costruzione dell'albero filogenetico.



### 3.3 Risultati

#### 3.3.1 Analisi filogenetica di *Oleibacter marinus*

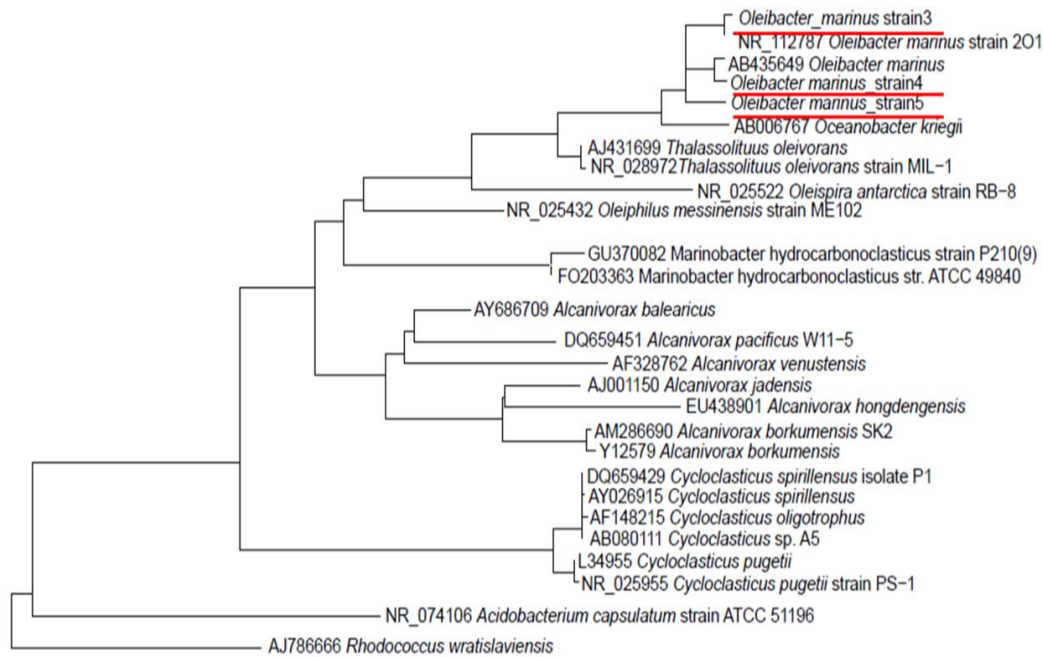
Gli isolati del Mediterraneo sono stati sottoposti all'analisi del gene ribosomale 16S completo per effettuare il confronto filogenetico. Tutte le sequenze complete del gene ribosomale 16S degli isolati 3, 4, 5 sono state assegnate al Phylum dei Proteobacteria (100%), classe Gammaproteobacteria (100%), ordine Oceanospirillales (100%), famiglia Oceanospirillaceae (100%), genere *Oleibacter* (100%), utilizzando il database RDP classifier. Le sequenze hanno presentato una copertura pari al 100% e un'identità compresa tra 98-99% con sequenze di *Oleibacter marinus* del Ceppo Tipo 2O1<sup>T</sup> isolato dal mare dell'Indonesia, nell'Oceano Pacifico (Teramoto et al., 2011) (Tab. 3.3).

Isolato	16S ribosomal RNA database				Nucleotide collection (nr/nt) database		
	Seq. (bp)	Descrizione	Similarità (%)	Genbank accession n°	Descrizione	Similarità (%)	Genbank accession n°
<i>O. marinus</i> 3	1417	<i>Oleibacter marinus</i> 2O1	99%	NR_112787.1	<i>Oleibacter marinus</i> 1O14	99%	AB435650.1
<i>O. marinus</i> 4	1419	<i>Oleibacter marinus</i> NBRC 105760	99%	NR_114287.1	<i>Oleibacter marinus</i> 1O18	99%	AB435651.1
<i>O. marinus</i> 5	1427	<i>Oleibacter marinus</i> NBRC 105760	98%	NR_114287.1	Uncultured bacterium clone Postplume-I-800m-011	98%	JX878989.1

**Tab. 3.3** Identificazione tassonomica degli isolati ottenuta dall'analisi delle sequenze del gene 16s rDNA utilizzando il programma BLASTN (Megablast).

L'analisi BLAST, effettuata utilizzando il database nucleotidico non ridondante (nr/nt), BLASTN (Megablast), ha dimostrato che la sequenza nucleotidica dell'isolato 3 è strettamente correlata a quella di *Oleibacter marinus* 1O14 (GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers AB435650); mentre l'isolato 4 sembra più vicino ad *Oleibacter marinus* 1O18 (GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers AB435651) (Tab. 3.3). L'isolato 5 mostra invece una alta similarità di sequenza con un ceppo batterico non coltivabile proveniente da popolazioni batteriche idrocarburo-ossidanti identificate nelle acque del Golfo del Messico in seguito al disastro ambientale causato dallo sversamento massiccio di petrolio della piattaforma petrolifera Deepwater Horizon nel 2010. Le sequenze del gene 16S rRNA degli isolati del Mediterraneo sono state allineate utilizzando il software CLUSTAL X per la costruzione di un albero filogenetico con le sequenze di *Oleibacter marinus* isolato dall'oceano Pacifico e altre sequenze di specie appartenenti alla famiglia delle Oceanospirillaceae presenti in banca dati. L'albero filogenetico è riportato in Fig. 3.4.

Al fine di individuare i siti in cui questo genere è stato identificato finora, è stata effettuata un'analisi bioinformatica di tutte le sequenze 16SRNA di *Oleibacter* depositate nel database dell'NCBI. I risultati della biogeografia di *Oleibacter* sono riportati nella Tab. 3.4.



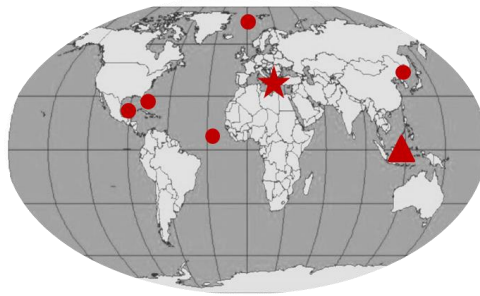
**Fig. 3.4** Albero filogenetico costruito sulle sequenze 16S rDNA di *Oleibacter marinus* e altri batteri idrocarburo-ossidanti.

Descrizione	Query cover (%)	Similarità con <i>O. marinus</i> 3 (%)	I/NC <sup>a</sup>	Provenienza	Riferimento Bibliografico	Accession Number
<i>Oleibacter marinus</i> IO14	100	99	I	Indonesia	Teramoto et al., 2011	AB435650.1
Uncultured bacterium	100	99	NC	Atlantico	Fuchs et al., 2004 (unpublished)	AF382127.1
Uncultured bacterium	100	99	NC	Golfo Messico	Yang et al., 2014	JX878989.1
Uncultured bacterium	99	99	NC	Sud Pacifico	Sudek et al., 2009 (unpublished)	FJ497511.1
Uncultured bacterium	100	97	NC	Golfo Messico	Lau and Armbrust, 2006	DQ071156.1
Uncultured bacterium	100	97	NC	Oceano Artico	Bano and Hollibaugh, 2002	AF353239.1

<sup>a</sup>I: isolato; NC: non coltivato

**Tab. 3.4** Elenco delle sequenze del gene 16S rDNA depositate nel database NCBI, nucleotide collection (nr/nt), con identità di sequenza  $\geq 97\%$  con la sequenza 16S rDNA di *O. marinus* 3.

I risultati riportati in Figura 3.5 mostrano l'attuale distribuzione geografica dei batteri appartenenti al genere *Oleibacter* sia come isolati, che come sequenze appartenenti a batteri non coltivati. *Oleibacter* risulta distribuito in tutti gli oceani: Oceano Pacifico, Oceano Atlantico e Oceano Artico con particolare localizzazione nella fascia tropicale, ma nonostante la larga scala di distribuzione, risulta un batterio difficilmente coltivabile. È noto che molti batteri idrocarburoclasti obbligati sono difficili da mantenere in coltura pura in una forma metabolicamente attiva per lunghi periodi (Yakimov et al. 2007).



● Uncultured ★ Mediterranean Isolates ▲ Pacific Ocean isolates

**Fig. 3.5** Attuale distribuzione geografica di *Oleibacter marinus*

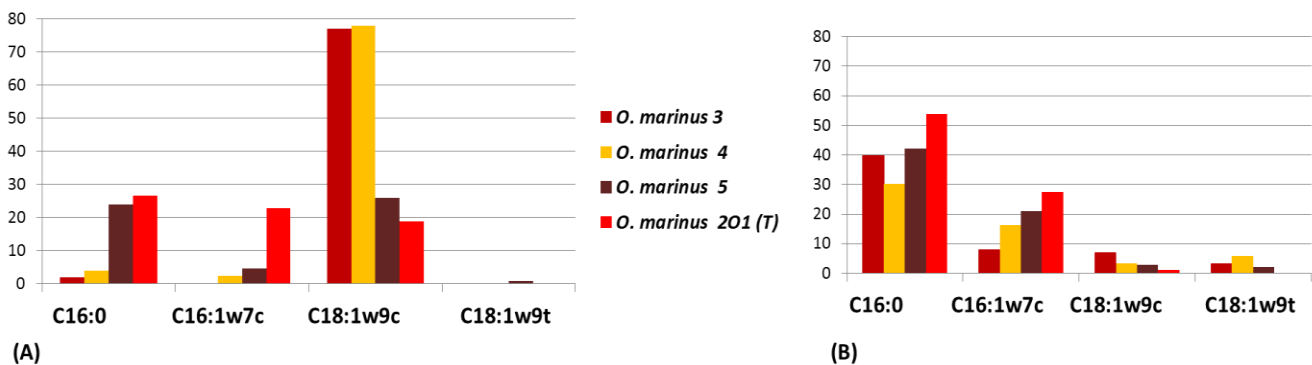
### 3.3.2 Analisi del profilo degli acidi grassi

L'analisi degli esteri metilici degli acidi grassi (FAMES - *Fatty acid methyl esters*) è una metodica comune per l'identificazione batterica che si avvale della caratterizzazione dei tipi e delle proporzioni di acidi grassi presenti nei lipidi della membrana citoplasmatica e della membrana esterna (Gram negativi) delle cellule. La composizione in acidi grassi dei procarioti può essere molto variabile, in termini di lunghezza della catena, presenza o assenza di doppi legami, anelli, catene ramificate o gruppi ossidrilici. Di conseguenza, il profilo degli acidi grassi può spesso identificare una particolare specie batterica (Brock *et al.* 2007). Al fine di valutare il profilo degli acidi grassi dei tre nuovi isolati di *Oleibacter marinus* del Mar Mediterraneo (3, 4, 5) e dell'Oceano Pacifico 201<sup>T</sup> è stata condotta l'analisi degli esteri metilici mediante GC-MS degli isolati cresciuti su esadecano o piruvato come unica fonte di carbonio. Il profilo degli acidi grassi ottenuto per i tre isolati e per il type strain è mostrato in tabella 3.5. I risultati sono stati espressi come valori percentuali calcolati sul totale delle aree dei picchi identificati e non identificati.

Fonte di carbonio	<i>O. marinus</i> 3		<i>O. marinus</i> 4		<i>O. marinus</i> 5		<i>O. marinus</i> 201 <sup>T</sup>	
	C <sub>16</sub>	Pyr	C <sub>16</sub>	Pyr	C <sub>16</sub>	Pyr	C <sub>16</sub>	Pyr
<b>Acidi Grassi</b>								
C <sub>10:0</sub>	-	3,82	3,54	1,90	-	6,83	-	0,02
C <sub>12:0</sub>	3,62	0,24	1,72	0,90	-	2,53	8,96	5,94
C <sub>13:0</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-
C <sub>14:0</sub>	-	0,26	0,96	0,10	0,39	1,56	5,34	4,33
C <sub>15:0</sub>	0,17	-	0,34	0,04	0,02	0,24	-	-
C <sub>15:0<sup>a</sup></sub>	0,01	-	1,08	-	0,42	1,02	-	-
C <sub>15:0<sup>i</sup></sub>	0,06	-	3,96	0,09	1,37	1,81	-	-
<b>C<sub>16:0</sub></b>	<b>39,66</b>	<b>2,07</b>	<b>30,17</b>	<b>4,03</b>	<b>42,25</b>	<b>24,02</b>	<b>53,75</b>	<b>37,37</b>
C <sub>16:0<sup>i</sup></sub>	-	-	0,89	-	0,58	1,54	-	-
C <sub>16:1 ω 7c</sub>	8,03	-	16,35	2,35	21,06	4,74	27,42	26,35
C <sub>17:0</sub>	0,20	-	0,50	-	0,07	0,87	-	-
C <sub>17:0<sup>cy</sup></sub>	0,15	-	0,54	-	0,10	1,53	-	0,85
C <sub>17:0<sup>i</sup></sub>	12,97	-	6,85	-	17,87	1,65	3,48	-
C <sub>18:0</sub>	0,81	4,85	1,40	2,17	0,09	4,75	-	1,08
C <sub>18:1 ω 7c</sub>	-	-	3,42	-	-	-	-	-
C <sub>18:1 ω 9c</sub>	7,07	77,11	3,38	77,89	2,95	25,97	1,06	20,09
C <sub>18:1 ω 9t</sub>	3,11	-	5,80	-	2,11	0,90	-	-
C <sub>18:2 ω 6,9c</sub>	-	9,17	18,82	7,96	-	-	-	-
C <sub>19:0<sup>cy</sup></sub>	0,24	-	0,27	0,21	0,22	11,04	-	0,92
C <sub>20:0</sub>	0,04	-	-	0,24	0,45	1,34	-	0,87
Identificati (%)	76,15	97,53	100	98,05	89,96	93,22	100	97,83
Non identificati	23,85	2,47	-	1,95	10,04	6,78	-	2,17

**Tab. 3.5** Composizione percentuale degli acidi grassi dei ceppi di *Oleibacter marinus* isolati nel Mar Mediterraneo (3, 4, 5) e del type strain 201<sup>T</sup>, cresciuti su esadecano (C<sub>16</sub>) o piruvato (Pyr) come unica fonte di carbonio

In tutti gli isolati, gli acidi grassi predominanti su piruvato sono stati i seguenti: C16:0 (dal 30% in *O. marinus 4* a l 55% in *O. marinus 2O1<sup>T</sup>*) e C16:1 $\omega$ 7c (dal 16% in *O. marinus 3* al 27% in *O. marinus 2O1<sup>T</sup>*) (Fig. 3.6). Questi valori corrispondono a quelli riportati in letteratura come acidi grassi più abbondanti nelle specie appartenenti alla famiglia delle Oceanospirillaceae (Satomi 2014) e ai generi *Oleibacter* (Teramoto et al. 2011). I quattro ceppi cresciuti su piruvato hanno mostrato una predominanza dell'acido grasso C18:1 $\omega$ 9C, mentre su esadecano domina l'acido grasso C16:0; suggerendo un possibile utilizzo dal mezzo di coltura. Piccole variazioni nella quantità percentuale degli acidi grassi predominanti sono state osservate tra gli isolati del Mar Mediterraneo e il ceppo del Pacifico, suggerendo differenze fisiologiche e metaboliche attribuibili alla divergenza geografica.



**Fig. 3.6** Acidi grassi predominanti nei ceppi di *Oleibacter marinus* isolati dal Mediterraneo e nel ceppo del Pacifico 2O1<sup>T</sup> cresciuti in presenza di piruvato (A) ed esadecano (B) come unica fonte di carbonio.

### 3.3.3 Fingerprinting di utilizzazione degli idrocarburi

La capacità di utilizzare idrocarburi come principale fonte di carbonio ed energia è una delle caratteristiche dei batteri idrocarburo-ossidanti obbligati (BIC). *Oleibacter marinus 2O1* è stato classificato come un BIC capace di degradare idrocarburi alifatici in ambienti marini tropicali (Teramoto et al., 2011). Per saggiare la capacità di utilizzare idrocarburi come fonte esclusiva di carbonio, gli isolati del Mar Mediterraneo sono stati coltivati su terreno minerale in presenza di singoli idrocarburi alifatici a catena media (C<sub>12</sub>, C<sub>16</sub>) e a catena lunga (C<sub>28</sub>, C<sub>32</sub>), in presenza di miscele idrocarburiche (etere di petrolio, gasolio, olio motore, petrolio greggio), e confrontati con crescita su piruvato e acetato, composti a basso peso molecolare che i BIC utilizzano oltre agli idrocarburi. Un confronto sulla capacità di crescita è stata effettuato con *Oleibacter marinus 2O1<sup>T</sup>* e *Thalassolituus oleivorans<sup>T</sup>*, un batterio degradatore di HC appartenente alla famiglia delle Oceanospirillaceae. I risultati sono riportati in tab. 3.6. Nelle prove su terreno solido, tutti gli isolati formano colonie su n-dodecano (C<sub>12</sub>) ed esadecano (C<sub>16</sub>), così come su tutte le miscele di idrocarburi saggiate (greggio, pristano, gasolio e olio motore), già a partire dal 2°-3° giorno di incubazione. Nessuno dei ceppi utilizza etere di petrolio, che è una miscela di alcani a catena corta (C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub>) ottenuta mediante distillazione frazionata del petrolio greggio e utilizzata come solvente in laboratori chimici. Nessun isolato cresce su Marine Agar; terreno di coltura utilizzato per l'isolamento dei batteri marini eterotrofi, contenente estratto di lievito e peptone come fonte di carbonio. L'assenza di crescita di

*O. marinus* su Marine agar riflette l'incapacità dei batteri idrocarburo-ossidanti di crescere su fonti di carbonio non idrocarburi (McGenity et al. 2012), confermando per questo genere l'appartenenza agli idrocarburo-ossidanti obbligati. Tutti i ceppi crescono su terreno liquido in presenza di idrocarburi singoli n-dodecano ( $C_{12}$ ) ed esadecano ( $C_{16}$ ) e sulla miscela di petrolio greggio. I ceppi di *O. marinus* 3 e *O. marinus* 5 non sono in grado di crescere su terreno liquido in presenza di idrocarburi singoli a catena lunga tetracosano ( $C_{24}$ ), triacontano ( $C_{30}$ ), e sulla miscela di etere di petrolio. I risultati ottenuti dimostrano che *O. marinus* è un batterio HC ossidante obbligato capace di utilizzare idrocarburi a catena media, ramificati (pristano) e miscele idrocarburiache complesse come unica fonte di carbonio. *O. marinus* 4 ha mostrato le migliori capacità cataboliche paragonabili a quelle del type strain 2O1, per la capacità di utilizzare alcani a catena lunga fino a  $C_{30}$ . *O. marinus* 3 e *O. marinus* 5 utilizzano lo stesso range di HC di *Thalassolitus oleivorans*. Nessun isolato cresce su alcani a catena corta nè singoli nè in miscela. L'analisi al microscopio delle singole colonie cresciute su piruvato e acetato non evidenzia differenze fenotipiche tra gli isolati, mentre nel terreno ONR7a con HC, si osservano differenze nelle dimensioni, nella forma e nel colore delle colonie.

Isolato	n-Dodecano	n-esadecano	Tetracosano	Triacontano	Pristano	Etere di petrolio	Petrolio	Diesel	Olio motore	Piruvato	Acetato	Marine Broth
<i>Oleibacter marinus</i> 3	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>Oleibacter marinus</i> 4	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>Oleibacter marinus</i> 5	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>Oleibacter marinus</i> 2O1 <sup>T</sup>	+	+	+	+	nd	-	+	nd	nd	+	+	nd
<i>Thalassolitus oleivorans</i> MIL-1 <sup>T</sup>	+	+	-	-	nd	-	nd	nd	nd	nd	+	nd

**Tab. 3.6** Crescita di *Oleibacter* spp. e *Thalassolitus* sp. su mezzo minerale ONR7a addizionato con *n*-alcani singoli, alcani ramificati, miscele di idrocarburi, e altre fonti di carbonio non costituite da HC (+: crescita positiva, -: nessuna crescita, nd: non determinato).

### 3.3.4 Curve di crescita su esadecano

L'andamento della crescita di *O. marinus* su esadecano è stato studiato su terreno liquido ONR7a contenete 1% Esadecano ( $C_{16}$ ) come unica fonte di carbonio. La crescita è stata valutata mediante letture allo spettrofotometro ( $OD_{600}$ ) una volta al giorno per 21 giorni, fino a fase di declino. I risultati sono mostrati in Fig. 3.7. Tutti i valori di densità ottica ottenuti sono compresi in un range che va da 0.2 a 2. Il type strain 2O1 ha mostrato un andamento della curva di crescita più elevato. Tra gli isolati del Mediterraneo solo *O. marinus* 3, mostra un andamento della curva di crescita simile a quello del type strain, anche se con valori di densità ottica minori. *O. marinus* 4 e *O. marinus* 5 mostrano una curva di crescita con valori di densità ottica inferiori e quasi del tutto sovrapponibile tra loro. Le curve di crescita su esadecano di *O. marinus* 4 e *O. marinus* 5, con valori di densità ottica decisamente inferiori rispetto agli altri due ceppi suggeriscono che questi isolati siano meno efficienti nell'utilizzare esadecano. Si può ipotizzare che i bassi valori di densità

ottica ottenuti per i ceppi del Mediterraneo rispetto al ceppo del Pacifico siano attribuibili a differenze metaboliche per esempio nel meccanismo di uptake degli HC.

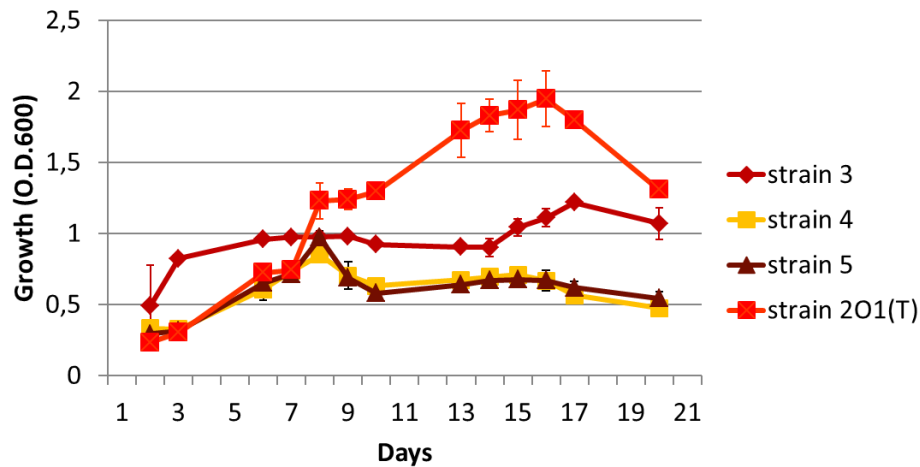
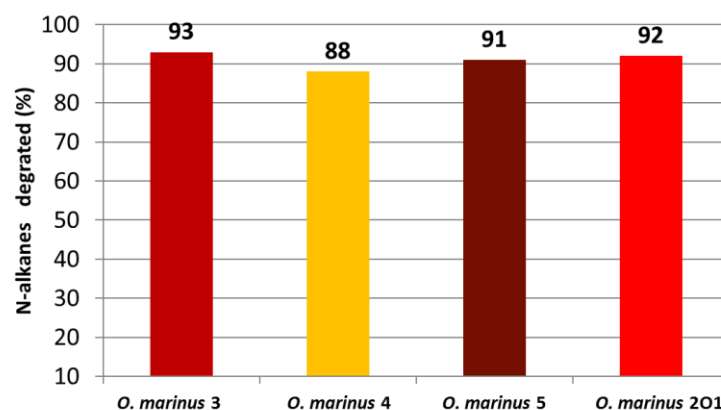


Fig. 3.7 Curva di crescita su esadecano di *O. marinus* 3, *O. marinus* 4, *O. marinus* 5 e *O. marinus* 2O1<sup>T</sup>

### 3.3.5 Capacità degradative

La capacità degradativa nei confronti degli idrocarburi alifatici del petrolio di *O. marinus* del Mediterraneo è stata valutata tramite analisi GC-FID e confrontata con le capacità del ceppo 2O1<sup>T</sup> di degradare gli stessi substrati idrocarburi. Gli idrocarburi residui sono stati estratti dalle colture batteriche incubate per 7 giorni su petrolio greggio. I risultati sono stati riportati come la media delle percentuali di idrocarburi degradati ottenuta a partire dalle percentuali residue dei singoli n-alcani nel range C<sub>10</sub>-C<sub>28</sub> (Fig. 3.8). Tutti i ceppi hanno mostrato una elevata capacità di degradazione nei confronti degli alcani lineari con una percentuale variabile da 88% a 93%. In particolare, i migliori ceppi degradatori risultano *O. marinus* 3 e *O. marinus* 5 (93% e 91% rispettivamente), la cui abilità degradativa è comparabile con quella del ceppo tipo 2O1 (92%). *Oleibacter marinus* 4 risulta essere il meno efficiente con una capacità degradativa del 88%. Il ceppo *Oleibacter marinus* 2O1 è noto in letteratura per degradare alcani alifatici da C<sub>12</sub> a C<sub>22</sub>, con una efficienza del 100% in due giorni di incubazione (Teramoto et al. 2009). I risultati ottenuti in questa tesi ampliano il range degli alcani utilizzati dal type strain *O. marinus* 2O1, sebbene l'efficienza di degradazione sia leggermente inferiore (92%).



**Fig. 3.8** Potenziale catabolico di *O. marinus* 3, *O. marinus* 4, *O. marinus* 5 e *O. marinus* 2O1<sup>T</sup> misurata mediante crescita su petrolio greggio e analizzata come percentuale residua degli alcani da C<sub>10</sub> a C<sub>28</sub> dopo 7 giorni di incubazione.

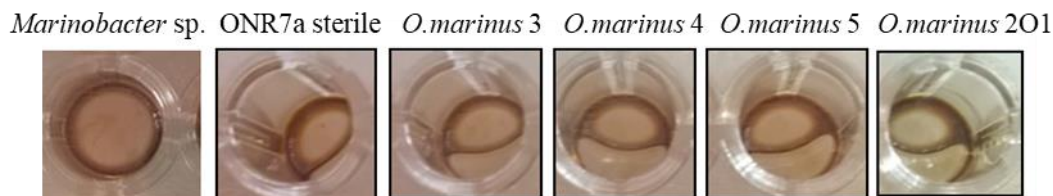
### 3.3.6 Produzione di biosurfattanti

La maggior parte dei batteri degradatori di HC sono noti per la loro capacità di produrre biosurfattanti che agiscono sulla superficie degli idrocarburi, aumentando la tensione superficiale di questi substrati idrofobici, con un conseguente aumento della biodisponibilità (Ron et al. 2002).

La capacità di *O. marinus* 3, *O. marinus* 4, *O. marinus* 5, di produrre biosurfattanti è stata testata e quantificata tramite 3 differenti tests e confrontata con l'attività emulsificante di *Oleibacter marinus* 2O1<sup>T</sup>

#### 3.3.6.1 Drop collapsing test

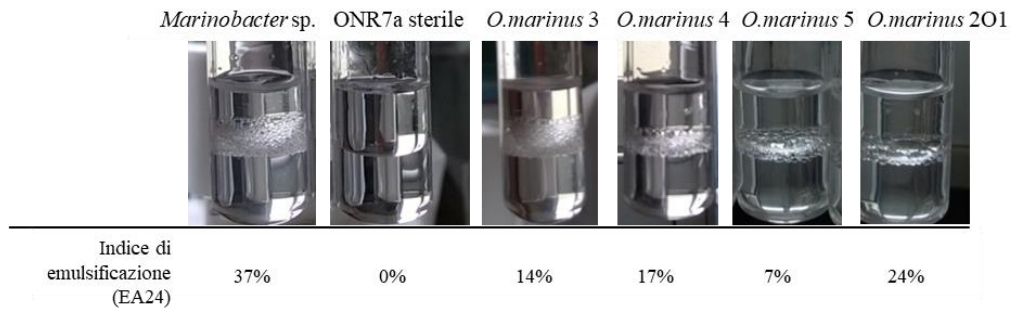
I risultati ottenuti con questo test hanno mostrato una bassa, se non addirittura assente, presenza di molecole ad attività surfattante in tutti i ceppi di *Oleibacter marinus*. Osservando la figura 3.9 è possibile notare la completa emulsificazione del petrolio nel controllo positivo (K+), rappresentato da *Marinobacter* sp., ceppo noto per la produzione di biosurfattanti, mentre nelle colture di *O. marinus* 3, 4, 5 e 2O1 le gocce di sospensione cellulare appaiono come gocce ben distinte, che non collassano sulla superficie oleosa. La stabilità delle gocce dipende comunque dalla concentrazione dei biosurfattanti ed è correlata alla tensione superficiale ma non con l'attività emulsionante, di conseguenza i ceppi di *Oleibacter* potrebbero produrre biosurfattanti a basse concentrazioni.



**Fig. 3.9** test drop collapsing su greggio di *Oleibacter marinus* 3, *Oleibacter marinus* 4, *Oleibacter marinus* 5 e *Oleibacter marinus* type strain (2O1). *Marinobacter* sp.: Controllo positivo, ONR7a sterile: controllo abiotico.

#### 3.3.6.2 Test EA24 (emulsification activity)

L'attività di emulsificazione di *Oleibacter* spp. (EA%) è stata valutata su esadecano dopo 1 ora di incubazione, mentre l'indice di emulsificazione (EA% 24), che rappresenta la stabilità dell'emulsione, è stata determinata dopo 24 ore. L'EA e EA24 sono stati calcolati come valori percentuali dividendo l'altezza dello strato di emulsione per l'altezza totale della miscela, i valori di emulsificazione ottenuti dopo un'ora e dopo 24 ore di incubazione risultavano sovrapponibili. Tutti gli isolati hanno mostrato una bassa capacità di emulsificazione se confrontati con il controllo positivo, costituito da *Marinobacter* sp., dove è invece visibile un'abbondante fase alta di esadecano emulsificato (37%) (Fig. 3.10). Tutti gli isolati mostrano una bassa percentuale di emulsificazione compresa tra il 7% e il 17% (Fig. 3.10); in particolare *O. marinus* 5 è il ceppo che mostra la minore capacità emulsificante (7%). Nel confronto con *O. marinus* 2O1<sup>T</sup> emerge una differenza nelle capacità emulsificanti tra i ceppi del Mediterraneo e il ceppo dell'oceano Pacifico che mostra una migliore capacità emulsificante (24%).



**Fig. 3.10** immagine del test EA24 effettuato per valutare l'attività emulsificante di *Oleibacter marinus* 3, *Oleibacter marinus* 4, *Oleibacter marinus* 5 e *Oleibacter marinus* type strain. *Marinobacter* sp.: Controllo positivo, ONR7a sterile: controllo abiotico.

### 3.3.6.3 Test oil spreading

Con il test dell'oil spreading si misura il diametro, espresso in mm, dell'alone di dispersione che si forma quando una goccia di una sospensione cellulare di batteri produttori di biosurfattanti viene posta su una superficie acqua-petrolio. I risultati di questo test suggeriscono una bassa produzione di biosurfattanti da parte di tutti gli isolati di *O. marinus* (Tab. 3.7). Tutti gli isolati hanno mostrato un alone di dispersione piuttosto piccolo se non addirittura assente come nel caso di *O. marinus* 5. *Oleibacter marinus* 2O1<sup>T</sup> ha invece mostrato la maggiore capacità emulsificante con un alone di dispersione di 5mm. Questo test ha confermato definitivamente i risultati ottenuti dai due test precedenti.

Campione	Alone di dispersione (diametro)
<i>Oleibacter marinus</i> 3	2 mm
<i>Oleibacter marinus</i> 4	4 mm
<i>Oleibacter marinus</i> 5	0 mm
<i>Oleibacter marinus</i> 2O1 <sup>T</sup>	5 mm
Controllo abiotico	0 mm

**Tab. 3.7** Test oil spreading su greggio di *Oleibacter marinus* 3, *Oleibacter marinus* 4, *Oleibacter marinus* 5, e *Oleibacter marinus* 2O1<sup>T</sup>. Controllo abiotico: ONR7a sterile

### 3.3.7 Identificazione del gene catabolico *alkB*

La capacità catabolica dei batteri di utilizzare idrocarburi come unica fonte di carbonio e di energia dipende dalla presenza nel loro genoma di geni che codificano per enzimi che intervengono nel pathway di degradazione dell'inquinante. Uno degli enzimi chiave che interviene nella prima tappa della degradazione degli alcani è la monossigenasi di membrana *AlkB*. Per verificare la presenza del gene *alkB* negli isolati di *O. marinus* è stato amplificato un frammento di 550bp. Le sequenze ottenute, di lunghezza variabile tra 491bp e 514bp, sono state confrontate con le sequenze del database del "National Center for Biotechnology Information (NCBI)" tramite il programma nucleotide-BLAST (blastn). I risultati, riportati nella Tab. 3.8, mostrano una identità del gene *alkB* di *O. marinus* del Mediterraneo compresa tra il 75% ed il 76% con sequenze nucleotidiche di alcano-monossigenasi di *Pseudomonas nitroreducens*. Il fatto che la massima



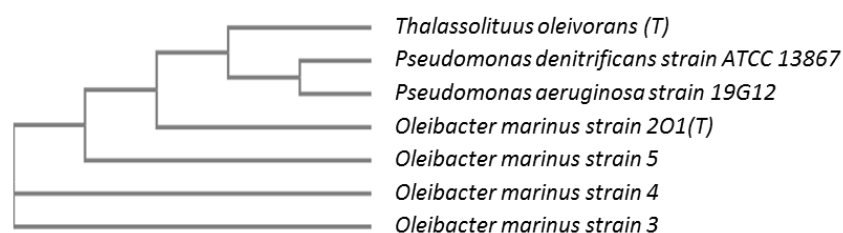
identità per tutte le sequenze sia stata riscontrata con un ceppo tassonomicamente distante suggerisce un possibile meccanismo di “horizontal gene transfer”, ovvero l’acquisizione di questo gene non da cellule ascendenti ma da batteri filogeneticamente distanti. Come è già noto per altri microorganismi degradatori di alcani, l’intero cluster *alkSB1GHJ* è una regione di origine aliena; caratterizzato da un contenuto G+C significativamente basso e dalla presenza di ipotetiche trasposasi alle estremità, che consentono il trasferimento casuale tra i batteri attraverso elementi genetici mobili (Yakimov et al., 2007).

Isolato	BLASTn			tBLASTx			
	Sequenza (bp)	Descrizione	Similitudine (%)	Accession Number	Descrizione	Similitudine (%)	Accession Number
<i>O. marinus</i> 3	514	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> SIL3107	76%	KJ023684.1	<i>Thalassolitus oleivorans</i> R6-15	99%	CP006829.1
<i>O. marinus</i> 4	498	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> SIL3107	76%	KJ023684.1	<i>Thalassolitus oleivorans</i> R6-15	99%	CP006829.1
<i>O. marinus</i> 5	503	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> SIL3107	75%	KJ023684.1	<i>Thalassolitus oleivorans</i> R6-15	99%	CP006829.1
<i>O. marinus</i> 2O1 <sup>T</sup>	491	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> SIL3107	75%	KJ023684.1	<i>Thalassolitus oleivorans</i> R6-15	99%	CP006829.1

**Tab. 3.8** Analisi della sequenza nucleotidica (BLASTn) e amminoacidica (tBLASTx) del gene *alkB* di *Oleibacter marinus*

La sequenza nucleotidica ottenuta è stata analizzata con l’algoritmo tBLASTx per individuare sequenze di aminoacidi che corrispondono ai frammenti *alkB* ottenuti. La più alta similarità (99%) per tutti i ceppi è stata ottenuta con *Thalassolitus oleivorans* batterio degradatore di idrocarburi, appartenente alla stessa famiglia di *Oleibacter* (tab. 3.8).

L’analisi filogenetica delle sequenze di *alkB* allineate con il software MEGA6, ha rivelato che la sequenza di *O. marinus* 3 e *O. marinus* 4 risultano essere vicine tra loro, mentre la sequenza del ceppo 5 risulta essere distante sia dagli altri due isolati del Mediterraneo sia da *Oleibacter marinus* 2O1<sup>T</sup> (Fig. 3.11).



**Fig. 3.11** Albero filogenetico del gene *alkB* di *Oleibacter marinus* e altri ceppi batterici idrocarburo-ossidanti

### 3.4 Conclusioni

In questa tesi di dottorato si riporta il primo isolamento nel Mar Mediterraneo, nonché il secondo a livello mondiale (Teramoto et al. 2009), di tre isolati batterici appartenenti al genere *Oleibacter marinus*. I tre isolati del Mar Mediterraneo sono stati analizzati e caratterizzati da un punto di vista fisiologico, genetico e metabolico, e confrontati con il type strain (*O. marinus* 2O1<sup>T</sup>) isolato dall'Oceano Pacifico e un altro membro degradatore di HC appartenente alla famiglia delle Oceanospilillaceae, *Thalassolithus oleivorans* MIL-1<sup>T</sup>. Gli isolati mostrano una elevata identità del gene rRNA 16S con il ceppo *Oleibacter marinus* 2O1<sup>T</sup>. L'analisi dei metilesteri degli acidi grassi, mostra che il profilo dei principali acidi grassi cellulari ha un'alta somiglianza con quella dei ceppi filogeneticamente più vicini (*O. marinus* 2O1 e *Thalassolithus*). Gli isolati crescono su singoli *n*-alcani a catena media, alcani ramificati, miscele idrocarburiche complesse. L'utilizzo di limitate fonti di carbonio diverse dagli idrocarburi, rappresentate da acetato e piruvato, conferma l'appartenenza di *Oleibacter* alla categoria dei batteri marini idrocarburo-ossidanti obbligati (Yakimov et al., 2007). Tutti i ceppi mostrano elevate capacità cataboliche (88%-93%) nei confronti di alcani a catena media e lunga del petrolio, in un range compreso tra C<sub>10</sub> e C<sub>30</sub>. La bassa produzione di biosurfattanti da parte dei ceppi del Mediterraneo potrebbe essere la causa della differenza nelle curve di crescita su esadecano rispetto al type strain 2O1<sup>T</sup>, che mostra alti valori di densità ottica corrispondenti ad una discreta attività emulsificante. Considerata l'elevata attività catabolica dei ceppi (tutti ottimi degradatori) si suppone che gli isolati utilizzino meccanismi alternativi alla produzione di biosurfattanti per l'uptake degli idrocarburi. Gli isolati posseggono il gene codificante l'alcano monoossigenasi *alkB* le cui sequenze hanno un'identità compresa tra il 75% ed il 76% con il gene *alkB* di *Pseudomonas nitroreducens* suggerendo possibili meccanismi di trasferimento genico orizzontale. Ulteriori delucidazioni sui pathway catabolici saranno fornite dal sequenziamento del genoma completo di *O. marinus* attualmente in corso. *Oleibacter* e altri batteri associati al genere *Oceanobacter* dominano nell'acqua di mare tropicale contaminata da petrolio greggio e la loro attività di degradazione degli idrocarburi è stata paragonata a quella del genere *Alcanivorax* suggerendo che *Oleibacter* potrebbe svolgere un ruolo chiave nella degradazione degli idrocarburi del petrolio nell'ambiente marino (Teramoto et al., 2011). *Oleibacter* risulta presente solo nel campione di acqua N3 della Baia di Priolo, corrispondente alla zona più contaminata, dove risulta dominante rispetto agli altri isolati, negli altri campioni analizzati il genere dominante è in genere *Alcanivorax*. La distribuzione di questi due generi confermerebbe un possibile meccanismo competitivo tra *Oleibacter* e *Alcanivorax* dipendente dalle risorse ma anche dalla produzione di molecole inibenti da parte di *Alcanivorax* (Kano et al., 2008). *Oleibacter* è stato identificato anche nei biofilm associati a batteri fototrofici e diazotrofici, suggerendo che questa interazione possa essere importante per la degradazione di idrocarburi (Al-Bader et al., 2013; McGenity, 2014). In Conclusione gli isolati di *Oleibacter marinus* del Mediterraneo hanno la stessa efficienza di degradazione del petrolio e utilizzano lo stesso range di HC di *Oleibacter marinus* 2O1<sup>T</sup> isolato dal Pacifico. Tuttavia il type strain mostra una maggiore capacità emulsificante ed una migliore crescita rispetto ai nuovi isolati. Al fine di saggiare le reali capacità cataboliche dei nuovi isolati il ceppo 5 è stato



scelto, insieme ad altri batteri degradatori di HC, per lo sviluppo di un sistema biotecnologico descritto nel capitolo IV di questa tesi.

## **Capitolo IV**

### **Sistemi innovativi per il biorisanamento di acque contaminate**

#### **Abstract**

Bioremediation, that uses microorganisms to degrade or remove hazardous environmental pollutants, is considered the best way of restoring the environment due to its low cost and sustainability. Immobilization of microorganisms capable of degrading specific contaminants significantly promotes bioremediation processes and improves their efficiency. An innovative “ready to use” bioremediation system to clean up oil-contaminated water was developed immobilizing highly performant HC degrading bacteria, isolated from marine and soil environments, on biodegradable oil-absorbing carriers. Two marine Gammaproteobacteria (*Alcanivorax borkumensis*. SK2, *Oleibacter marinus* 5), and two soil Actinobacteria (*Gordonia* sp. SoCg, *Nocardia* sp. SoB) known for their ability to degrade a wide range n-alkanes, were immobilized on 3D scaffold polycaprolactone (PCL) and biopolymeric membranes prepared by electrospinning. Membranes were based on polylactic acid, PLA and polycaprolactone, PCL. These carriers are characterized by high uptake capacity and rate, oil retention, buoyancy, durability, reusability and recoverability of the oil absorbed. The morphology of the carriers and microbial adhesion and proliferation were evaluated using scanning electron microscopy (SEM). A high capacity of adhesion and proliferation of bacterial cells was observed within the whole structure of 3D porous scaffolds after 48h, and on PLA and PCL membranes after 5 days. The bioremediation efficiency of the carrier-bacteria systems was tested on crude oil by GC-FID analysis and compared with planktonic cells. The bacterial immobilization on 3D scaffolds, PLA and PCL membranes was a promoting factor for biodegradation, increasing hydrocarbon removal up to 15% and 20% respectively, in respect to planktonic cells. Increasing availability of the contaminants and a better interaction between the hydrophobic substrate and the bacterial cells probably resulted in enhancing the degradation rate. Biofilm-mediated bioremediation is a versatile tool to be developed for in situ and ex situ bioremediation of aquatic systems. Several applications can be designed in order to exploit both the high oil uptake capacity of the carriers, and the biodegradation potential of autochthonous microorganisms that adhere to the carriers and proliferate in situ, and/or of selected microorganisms that are immobilized on the carriers before exposure to the contaminated site.

## 4.1 Introduzione

### 4.1.1 Approcci di biorisanamento

Nuove misure di mitigazione sono urgentemente necessarie per la bonifica delle aree marine contaminate da petrolio. Negli ultimi decenni, vari metodi fisici, chimici e biologici sono stati proposti per il risanamento degli ambienti marini. Tra tutte queste strategie di bonifica il biorisanamento rappresenta una tecnologia promettente non invasiva ed economica che potrebbe fornire un ripristino più efficace e sostenibile delle acque e dei sedimenti contaminati (Dzionic et al., 2016). Il successo del biorisanamento richiede una combinazione di competenze provenienti da diversi settori come ingegneria, biologia e biotecnologie. Le biotecnologie ambientali potrebbero fornire contributi significativi per risolvere i problemi di inquinamento marino causati dagli idrocarburi petroliferi attraverso lo sfruttamento delle risorse microbiologiche marine e nuovi strumenti biotecnologici come i biopolimeri. Numerosi programmi dell'UE hanno aumentato la consapevolezza dell'importanza delle comunità microbiche nei processi ambientali marini, in particolare nella biodegradazione degli inquinanti di idrocarburi da parte di batteri idrocarbonoclastici specializzati e generalisti (Yakimov et al., 2007).

Gli interventi di bioremediation possono essere effettuati nel luogo di contaminazione (interventi *in situ*) o in ambiente confinato come i bioreattori (interventi *ex situ*). La tecnologia in situ viene utilizzata quando non c'è possibilità di trasferire la matrice inquinata, ad esempio quando la contaminazione interessa un'area estesa. L'attenuazione naturale è collegata alle capacità di degradazione dei microrganismi indigeni. La rimozione dei contaminanti mediante l'attenuazione naturale richiede molto tempo perché i microrganismi degradatori rappresentano solo il 10% della popolazione totale.

L'aumento dell'efficienza di bioremediation in situ può essere realizzata stimolando i batteri degradatori autoctoni attraverso l'alterazione dei parametri fisici e chimici dell'ambiente, aggiungendo composti come sostanze nutritive, o accettori di elettroni e ossigeno (Biostimulation). Qualora la comunità microbica autoctona fosse insufficiente o inefficace a sostenere l'attività degradativa può essere opportuno ricorrere alla bioaugmentation, che consiste nell'introdurre batteri alloctoni degradatori nell'ambiente contaminato. Per rendere il processo di bioaugmentation di successo, i microrganismi introdotti nell'ambiente inquinato devono essere in grado di degradare la componente contaminante presente, sopravvivere in un ambiente estraneo e devono essere geneticamente stabili e vitali. Il risultato della bioaugmentation dipende dall'interazione tra popolazioni di microrganismi autoctoni e alloctoni a causa della competizione per i nutrienti (Bayat et al., 2015).

Esistono diversi approcci al biorisanamento. Sistemi di trattamento di reflui, basati su biofilm adesi su superfici sintetiche o naturali, come i biofiltri, i reattori a fanghi granulari aerobi e anaerobici, sono ampiamente utilizzati e diffusi. I biofilm di batteri degradatori possono essere creati artificialmente su substrati inerti, come particelle di ghiaia o su lastre di vetro e plastica. Nei biofilm, i batteri godono di vari benefici che facilitano e migliorano la loro attività di biodegradazione (Dzionic et al., 2016).

#### 4.1.2 Biorisanamento basato sull'immobilizzazione di batteri HC-ossidanti

Numerose strategie vengono messe in atto attualmente per aumentare l'efficienza di biorisanamento, tra queste sempre più spesso si utilizza il metodo dell'immobilizzazione delle cellule batteriche su supporti di diverso tipo, in quanto l'immobilizzazione migliora la resistenza dei microrganismi aumentandone le capacità metaboliche. L'immobilizzazione è definita come la limitata mobilità delle cellule microbiche o dei loro enzimi con la conseguente preservazione della vitalità e delle funzioni catalitiche (Dzionic et al., 2016). Questo processo può sfruttare la naturale capacità dei microrganismi di formare biofilm sulla superficie di vari materiali. L'immobilizzazione riduce significativamente i costi dei processi di biorisanamento, ne migliora l'efficienza in quanto elimina il problema della dispersione e diluizione delle cellule nell'ambiente, garantisce un microambiente stabile per cellule e/o enzimi, portando tra l'altro ad una maggiore tolleranza alle alte concentrazioni di inquinanti (Hudson et al., 2005). Esistono cinque principali tecniche di immobilizzazione che vengono utilizzate nei processi di biorisanamento: adsorbimento, legame su una superficie (elettrostatica o covalente), flocculazione (naturale o artificiale), intrappolamento e incapsulamento (Fig. 4.1).

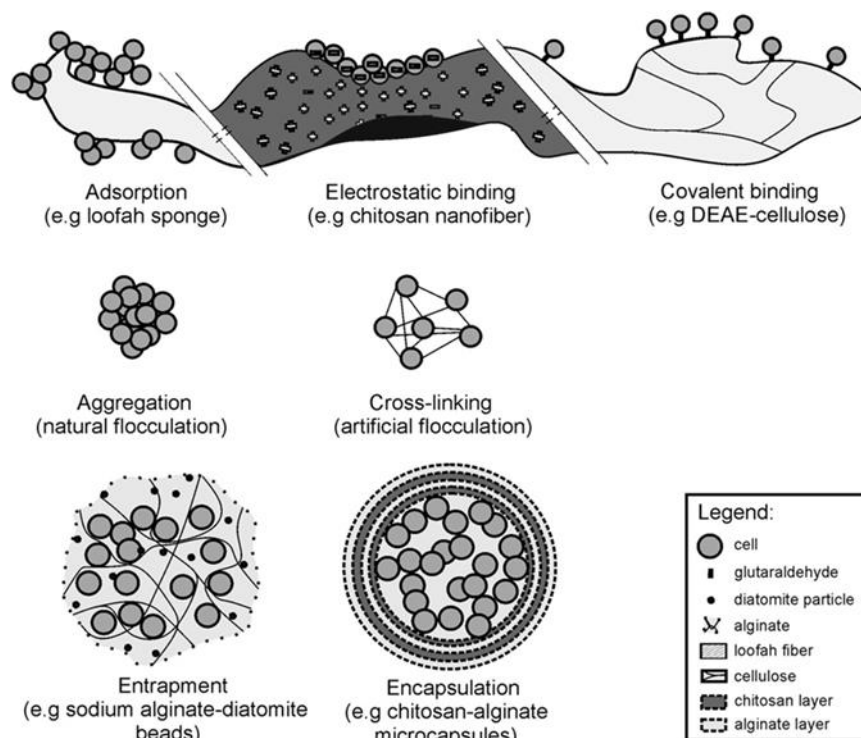


Fig. 4.1. Metodi di immobilizzazione (Dzionic et al., 2016).

#### 4.1.3 Tecniche di immobilizzazione dei batteri idrocarburo-ossidanti

##### 4.1.3.1 Adsorbimento

L'immobilizzazione delle cellule microbiche ed enzimi mediante adsorbimento avviene attraverso la loro interazione fisica con la superficie di carrier insolubili in acqua. Questo metodo, comunemente usato nei processi di biorisanamento, è veloce, semplice, ecocompatibile e a basso costo. L'adsorbimento su un

supporto carrier avviene mediante formazione di legami deboli (Bayat et al., 2015, Cristóvão et al., 2011, Hou et al., 2014).

#### **4.1.3.2 Legame su una superficie**

Il legame elettrostatico su una superficie è molto simile a quello dell'adsorbimento fisico. Questo metodo richiede il lavaggio della superficie del supporto con una soluzione tampone per ottenere una superficie idrofila in grado di attrarre negativamente cellule cariche o enzimi (Hudson et al., 2005; Lee and Tsai 2009). La procedura per l'immobilizzazione è diversa nel caso di legame covalente, perché richiede la presenza di un agente legante. L'immobilizzazione può essere eseguita solo con l'attivazione chimica mediante vettori arricchiti con legami di ammidi, etere e carbammato. Questo metodo è utilizzato principalmente per l'immobilizzazione degli enzimi, perché gli agenti leganti sono spesso tossici per le cellule.

#### **4.1.3.3 Intrappolamento in matrici porose**

L'intrappolamento di microrganismi è ben noto e ampiamente utilizzato in bioremediation. L'intrappolamento è un metodo rapido, non tossico, poco costoso e versatile (Wojcieszynska et al., 2012, Wojcieszynska et al., 2013). I microrganismi intrappolati sono protetti contro i fattori ambientali. Il parametro più importante nell'intrappolamento di microrganismi è il rapporto tra le dimensioni dei pori del carrier e le dimensioni delle cellule. (Bleve et al., 2011; Bayat et al., 2015; Kourkoutas et al., 2004)

#### **4.1.3.4 Incapsulamento**

L'incapsulamento è molto simile all'intrappolamento, ma in questo caso le particelle immobilizzate sono separate dall'ambiente esterno da una membrana semi-permeabile. Il vantaggio più grande di questo metodo è la protezione delle cellule contro le condizioni avverse dell'ambiente esterno. Tuttavia, a causa della permeabilità limitata delle membrane l'incapsulamento è usato raramente per le applicazioni di bioremediation *ex situ* (Bayat et al., 2015; Kourkoutas et al., 2004; Klein et al., 2012)

### **4.1.4 I carrier per il biorisanamento**

Il processo di immobilizzazione richiede vettori con proprietà specifiche, non tutti i materiali sono infatti adatti all'immobilizzazione delle cellule batteriche. La scelta del vettore è un elemento essenziale per il successo dell'intervento di biorisanamento. È anche importante considerare il tipo di processo (*in situ* o *ex situ*), il tipo di inquinante e le proprietà dei microrganismi immobilizzati. Un buon vettore dovrebbe essere insolubile, non tossico sia per le cellule immobilizzate che per l'ambiente, facilmente accessibile, economico, stabile ed adatto a rigenerazione. Per esempio, i supporti utilizzati per l'adsorbimento o il legame sulla superficie dovrebbero avere una alta porosità ed essere biodegradabili (Martins et al., 2013; Kariminiaae-Hamedaani et al., 2003). I carrier sono classificati come organici e inorganici, naturali o sintetici. Un elenco è mostrato in tabella 4.1. Questi supporti sono idrofili, biodegradabili, biocompatibili e poco costosi perché sono per lo più rifiuti dell'industria alimentare. Tuttavia, la possibilità della loro applicazione nei processi di biorisanamento è limitata a causa della bassa resistenza alla biodegradazione, della sensibilità ai solventi organici e a causa della stabilità in un intervallo di pH ristretto (Bayat et al., 2015; Rivelli et al., 2013;

Cubitto et al., 2015; Paliwal et al., 2015). Una valida alternativa è rappresentata dalle sostanze polimeriche di origine sintetica. Ad oggi i polimeri più usati come sorbenti sono polipropilene, polietilene o poliuretano (Son et al., 2011). Questi prodotti sono abbastanza efficienti, ma uno dei loro principali svantaggi è la non biodegradabilità. Nonostante siano state proposte diverse strategie per ottenere dispositivi porosi in grado di soddisfare i requisiti di base quali biodegradabilità, elevata capacità di assorbimento, bassi costi e alta efficienza ci sono ancora molte sfide che devono essere affrontate per superare le forti limitazioni, quali percorsi di fabbricazione complessi e costosi, incompatibilità ambientale, scarsa riciclabilità.

Per questo motivo negli ultimi anni, i polimeri biodegradabili hanno suscitato molto interesse per le loro proprietà trovando applicazioni in diversi campi tecnologicamente avanzati come la produzione di dispositivi biomedici (Scaffaro et al., 2016a, ; Son et al., 2011), l'intensificazione del bioprocesso (Scaffaro et al., 2016b, Ndlovu et al., 2015) e la rimozione dei rifiuti (Feng et al., 2015). Il successo dei biopolimeri porosi può essere attribuito a diverse caratteristiche proprie, come la relativa facilità di produzione rispetto ad altri materiali e l'elevato potere assorbente. In questo contesto, i polimeri sintetici biodegradabili più comunemente utilizzati o studiati per applicazioni avanzate includono acido polilattico (PLA), e il policaprolattone (PCL).

Carrier	Removed pollution	Immobilized microorganisms	Efficiency of bioremediation
Plant fibres (Loofah sp.)	Aromatic hydrocarbons	<i>Bacillus cereus</i>	Unimmobilized – 74% Immobilized – 79%
	Phenol	<i>Trametes versicolor</i>	Unimmobilized – 39% Immobilized – 87%
	Methyl parathion	Bacterial consortium	Unimmobilized – 55% Immobilized – 98%
	Carbendazim (pesticide)	Bacterial consortium	Unimmobilized – 12% Immobilized – 95%
	Ni	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Unimmobilized – 64% Immobilized – 88%
Baggase	Tetradecane	<i>A. venetianus</i>	Unimmobilized – 22.3% Immobilized – 76.8%
	Anthracene	<i>P. chrysosporium</i>	Unimmobilized – 43% Immobilized – 82%
	Mesotrione (herbicide)	<i>Bacillus pumilus</i> HZ-2	Unimmobilized – 48% Immobilized – 75%
	Chromium	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	Unimmobilized – 38% Immobilized – 92%
Sawdust	Petroleum oil	<i>Arthrobacter</i> sp.	Unimmobilized – 18% Immobilized – 36%
	Crude oil hydrocarbon	Bacterial consortium	Unimmobilized – 79.37% Immobilized – 95.9%
	Chromium	<i>A. haemolyticus</i>	Unimmobilized – 80% Immobilized – 99.8%
Corn cob	<i>p</i> -Nitrophenol	<i>Arthrobacter protophormiae</i> RKJ100	Unimmobilized – 39% Immobilized – 79%
	Carbofuran	<i>B. cepacia</i> PCL2	Unimmobilized – 67.69% Immobilized – 96.97%
	Hexadecane	<i>Pseudomonas</i> sp.	Unimmobilized – 33% Immobilized – 56%
	Chlorophenols	Bacterial consortium	Unimmobilized – 87% Immobilized – 89.7%
Expanded perlite	Methyl <i>tert</i> -butyl ether	Soil consortium	Unimmobilized – 22% Immobilized – 50%
	Hexadecane	<i>Aspergillus niger</i>	Unimmobilized – 81% Immobilized – 96%
Tezontle	Styrene	<i>P. aeruginosa</i>	Immobilized – 90%
	Sulfonated azo dyes (Acid Orange 7, Acid Red 8)	Bacterial consortium	Abiotic test – 16.8 mg/(L • 24 h) Immobilized – 80 mg/(L • 24 h)
	Propanil (herbicide)	Bacterial consortium	Immobilized – 36.78 mg/(L • 24 h)
	Methyl paration	Bacterial consortium	Abiotic test – 9% Immobilized – 58%
	DDT (pesticide)	<i>E. coli</i> RAZEK	Unimmobilized – 49% Immobilized – 95%
Coco-peat	Oil	<i>P. fluorescens</i>	Unimmobilized – 55% Immobilized – 99%
		Bacterial consortium	Unimmobilized – 51.2% Immobilized – 86.6%
Husks of sunflower seeds	Crude oil	<i>Rhodococcus</i> sp. QBTo	Unimmobilized – 28% Immobilized – 66.1%
Cotton fibres	<i>n</i> -Heptadecane	<i>Acinetobacter</i> sp. HCB-3S	Unimmobilized – 82% Immobilized – 96%

Tab.4.1 Carrier usati in bioremediation (Dzionic et al., 2016)



## 4.2 Scopo del lavoro

Le biotecnologie ambientali offrono grandi opportunità di innovazione raggiungibili solo combinando competenze provenienti da diversi settori quali l'ingegneria, la biologia e le biotecnologie. Lo scopo descritto in questo capitolo della mia tesi di dottorato, è stato applicare le conoscenze acquisite e le risorse microbiologiche derivate dall'esplorazione degli ambienti contaminati per lo sviluppo di un sistema innovativo, *ready to use*, per il biorisanamento di acque contaminate da petrolio. Di fondamentale importanza per il raggiungimento di questo obiettivo, è stata la collaborazione con gli ingegneri dei materiali del dipartimento DICAM dell'Università Palermo che da anni studiano le trasformazioni di materiali polimerici e biopolimerici e le loro applicazioni. Dalla sinergia tra lo sfruttamento delle risorse microbiologiche marine e ambientali da una parte, e le conquiste della scienza e della tecnologia polimeriche dall'altra sono stati ideati, sviluppati e saggiati nuovi sistemi di biorisanamento basati sull'interazione tra biopolimeri biodegradabili e batteri biodegradatori di HC.

Lo scopo di questa parte della tesi è stato quindi sviluppare e ottimizzare scaffold 3D e membrane biocompatibili progettati per accelerare e massimizzare i processi di biorisanamento, incapsulando i batteri degradanti gli HC o stimolandone la crescita come biofilm attivi sulle loro superfici. La sfida consiste nel realizzare una nuova via di biorisanamento combinando la nuova possibilità di materiali biopolimerici (rimozione meccanica) con lo sfruttamento delle risorse marine naturali (rimozione biologica), per ottenere una maggiore efficienza di degradazione degli inquinanti.

Al fine di raggiungere tale obiettivo sono stati immobilizzati due dei Gammaproteobatteri HC-ossidanti marini isolati dalla Baia di Prilo e altri due Actinobatteri del suolo idrocarburo-ossidanti su supporti biodegradabili caratterizzati da elevata capacità e velocità di assorbimento del petrolio ed elevata galleggiabilità. È stata valutata la capacità di adesione e proliferazione delle cellule batteriche sui carrier biodegradabili, e l'efficienza di biodegradazione del sistema.

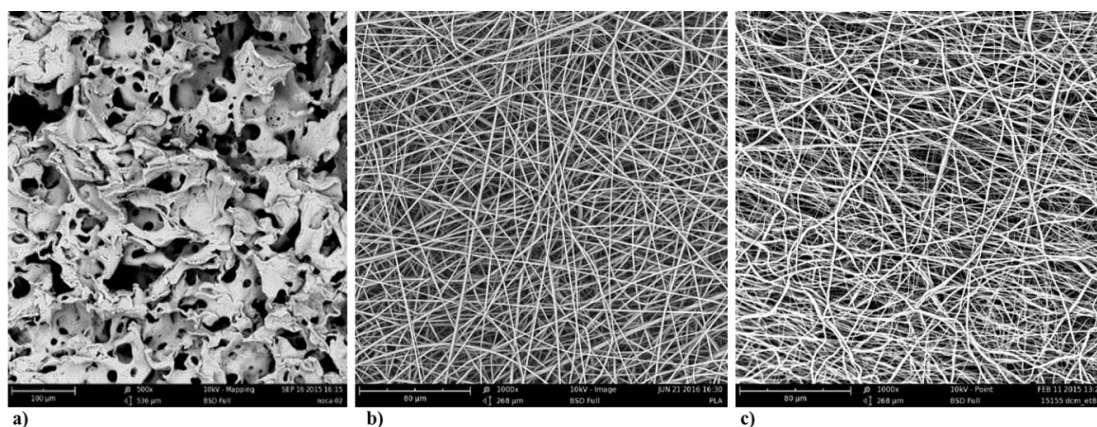
I supporti biodegradabili sono stati sintetizzati dal laboratorio del Prof. Scaffaro del dipartimento DICAM (dipartimento di Ingegneria Civile, Ambientale, Aerospaziale, dei Materiali) dell'Università degli Studi di Palermo.

La fase di valutazione dell'efficienza del sistema è stata svolta in collaborazione con il Dott.re Simone Cappello dell'Istituto per l'Ambiente Marino Costiero (IAMC) – CNR U.O.S. di Messina

### 4.3 Materiali e Metodi

#### 4.3.1 Carrier biodegradabili

Gli scaffold 3D di policaprolattone (PCL) sono stati prodotti per fusione combinando la miscelazione allo stato fuso e la lisciviazione del particolato, senza l'uso di solventi tossici. In particolare i materiali porosi 3D sono stati preparati mescolando nella matrice di fusione del polimero due agenti porogeni idrosolubili (NaCl e PEG) e successivamente lisciviando in acqua i composti PCL / NaCl / PEG come descritto da Scaffaro et al., 2017. Gli scaffold 3D hanno il vantaggio di essere prodotti in grandi quantità e sono dotati di una elevata lipofilia. Il polimero principale della matrice è rappresentato dal policaprolattone mentre gli agenti porogeni idrosolubili sono particelle di NaCl e polietilenglicole (PEG) 2000. La dimensione media dei pori risulta compresa tra 50-100  $\mu\text{m}$ . Le membrane di acido polilattico (PLA) e di policaprolattone sono state sintetizzate per elettrospinning utilizzando un'apparecchiatura per elettrospinning convenzionale. Le soluzioni polimeriche sono state preparate utilizzando il 10% in peso di PCL, che è stato sciolto in Diclorometano (DCM): etanolo (EtOH) (8: 2 vol). Il 10% in peso di PLA è stato sciolto in cloroformio ( $\text{CHCl}_3$ : acetone (Ac) (2: 1 vol). L'elettrofilatura è stata eseguita con una serie di parametri costanti: portata, 1 ml / h; distanza tra la punta dell'ago e il collettore, 15 cm; alimentato ad alta tensione, 15 kV; temperatura, 25 ° C e umidità relativa, 40%. Le membrane sono state asciugate per almeno 2 giorni sotto cappa aspirante al fine di rimuovere eventuali solventi residui. Le membrane sono costituite da fibre in scala nanometrica con una dimensione media del diametro di 1,4  $\mu\text{m}$ . La morfologia e le caratteristiche principali dei carrier sono mostrate rispettivamente in Figura 4.2 ed in tabella 4.2.



**Fig. 4.2** Immagine al Microscopio a scansione elettronica (SEM) degli scaffold 3D porosi (a), delle membrane elettrofilate di acido polilattico (b) e policaprolattone (c).





Caratteristiche	Carrier biodegradabili		
	Scaffold 3D PCL	Membrana PLA	Membrana PCL
Dimensioni	15mm x 10mm	12mm x 10mm	15mm x 10mm
Porosità (%)	83,7 $\pm$ 0.5	95 $\pm$ 0.5	95 $\pm$ 0.5
Oil uptake	500 %	40 g/g	20gr/gr
Dimensione media dei pori	50-100 $\mu\text{m}$	-	-
Connectività (%)	99 $\pm$ 0.15	99.45 $\pm$ 0.15	99.45 $\pm$ 0.15

**Tab. 4.2** Proprietà chimico-fisiche dei carrier utilizzati per l'immobilizzazione dei batteri idrocarburo-ossidanti. PCL: policaprolattone; PLA: acido polilattico

### 4.3.2 Ceppi idrocarburo-ossidanti

*Alcanivorax* sp. SK2 e *Oleibacter* sp. 5 appartengono alla classe dei Gammaproteobatteri, sono classificati come batteri marini degradatori di idrocarburi obbligati (BIC) per la loro capacità di utilizzare quasi esclusivamente alcani come fonte di carbonio ed energia (Tab. 4.3). *Alcanivorax borkumensis* SK2 è stato scelto perché è considerato il sistema modello dei BIC e degrada quasi esclusivamente alcani lineari, cicloalcani e isoprenoidi (Yakimov et al., 1998). *Oleibacter marinus* 5 è stato scelto per le caratteristiche degradative già descritte nel capitolo 3. I due ceppi saggiati sono stati isolati dalla Baia di Priolo durante la fase di caratterizzazione delle comunità microbiche (Capitolo 2). *Nocardia* sp. SoB e *Gordonia* sp. SoCg appartengono alla classe degli Actinobatteri, sono stati isolati da un'area costiera del Mediterraneo nella Sicilia Orientale contaminata da idrocarburi e fanno parte della ceppoteca di batteri idrocarburo-ossidanti del laboratorio di Microbiologia Ambientale ed Ecologia Microbica dove ho svolto la mia tesi di dottorato (Tab. 4.3). I due isolati sono noti per degradare una vasta gamma di idrocarburi alifatici compresi in un ampio range da C<sub>8</sub> a C<sub>36</sub> (Quatrini et al., 2008).

I ceppi *Alcanivorax* sp. SK2 ed *Oleibacter* sp. 5, ed i ceppi *Nocardia* sp. SoB e *Gordonia* sp. SoCg sono stati coltivati rispettivamente in terreno minerale ONR7a e Bushnell Haas (BH). Entrambi i mezzi colturali sono stati addizionati con esadecano sterile 1% (v/v) (C<sub>16</sub>) o petrolio greggio (0,1%) come unica fonte di carbonio. Le colture batteriche sono state incubate a 30 ± 1 ° C per 7 giorni in agitatore (200 × g).

Isolati		Classe	HC degradati	Riferimento Bibliografico
<i>Alcanivorax borkumensis</i> sp. SK2		Gammaproteobacteria	<i>n</i> -alkanes C <sub>5</sub> -C <sub>32</sub> , branched aliphatic	Yakimov et al., 1998
<i>Oleibacter marinus</i> sp. 5		Gammaproteobacteria	<i>n</i> -alkanes C <sub>10</sub> C <sub>30</sub>	Catania et al., 2015
<i>Gordonia amicalis</i> sp. SoCg		Actinobacteria	<i>n</i> -alkanes C <sub>12</sub> -C <sub>36</sub>	Quatini et al., 2008
<i>Nocardia cyriacigeorgica</i> sp. SoB		Actinobacteria	<i>n</i> -alkanes C <sub>8</sub> -C <sub>36</sub>	Quatini et al., 2008

**Tab. 4.2** Caratteristiche degli isolati idrocarburo-ossidanti immobilizzati sui carrier biodegradabili

### 4.3.3 Sterilizzazione dei carrier

Gli scaffold 3D e le membrane di PLA e PCL sono state sterilizzate tramite un lavaggio di 30 minuti in etanolo 70%. L'etanolo residuo è stato eliminato tramite due lavaggi di 30 minuti con acqua distillata sterile. Un trattamento aggiuntivo di sterilizzazione è stato effettuato trattando i campioni con raggi UV (lunghezza d'onda 253 nm) per 30 minuti.

### 4.3.4 Immobilizzazione delle cellule batteriche e analisi al SEM (scanning electron microscopy)

L'immobilizzazione delle cellule batteriche sugli scaffold 3D di policaprolattone è stata effettuata inoculando singole colonie di *Alcanivorax* SK2 e *Nocardia* SOB in 3 ml di terreno minerale (ONR7a e BH rispettivamente) contenenti lo scaffold 3D di PCL (15mm x 10mm) precedentemente immerso in 30µl di esadecano sterilizzato per filtrazione. Le colture sono state incubate a 30 ± 1 ° C in agitazione (200 × g) per

48 ore. L'immobilizzazione sulle membrane elettrofilate di PLA e PCL è stata effettuata inoculando singole colonie di *Alcanivorax* SK2, *Oleibacter* sp.5 e *Gordonia* SoCg, *Nocardia* SOB, in 3 ml di terreno minerale (ONR7a e BH rispettivamente) contenenti una membrana di PLA o di PCL (15mm x 10mm) precedentemente immersa in 30µl di esadecano sterilizzato per filtrazione. Le colture sono state incubate a  $30 \pm 1$  ° C per 48, 120 e 240 ore in agitazione ( $200 \times g$ ). Controlli abiotici sono stati preparati nelle stesse condizioni senza inoculazione batterica. Terminato il periodo di incubazione gli scaffold 3D PCL, le membrane elettrofilate di PLA, e le membrane di PCL sono state prelevate dalle colture batteriche in condizioni di sterilità e trattate come segue per l'analisi al SEM. I supporti sono lavati in PBS 1× per 3 minuti e le cellule sono state fissate con glutaraldeide al 4% per 30 minuti a 4°C. I campioni sono stati disidratati con una soluzione crescente di etanolo a temperatura ambiente (15, 30, 50, 75, 100%); ogni lavaggio è stato eseguito per 3 minuti (Mudryk et al., 2006). L'adesione batterica e la proliferazione nei supporti carrier è stata valutata utilizzando la microscopia elettronica a scansione (SEM, Phenom ProX, PhenomWorld).

### **4.3.5 Esperimenti di degradazione del petrolio in microcosmo**

#### **4.3.5.1 Preparazione del sistema carrier-batteri**

Le colture batteriche sono state preparate inoculando singole colonie di *Alcanivorax* sp. SK2 , *Oleibacter* sp. 5 e *Gordonia* sp. SoCg, *Nocardia* sp. SoB in 25 ml di terreno minerale (ONR7a e BH rispettivamente) addizionati con 0.1% (v/v) di petrolio. Le colture sono state incubate a  $30 \pm 1$  ° C per 7 giorni in agitazione ( $200 \times g$ ). Le cellule sono state centrifugate a  $9000 \times g$  for 10 min, lavate con acqua distillata sterile, risospese in terreno minerale ed 1 ml di ogni sospensione batterica con un valore di densità ottica ( $OD_{600}$ ) 0.1 è stato inoculato in vials da 100 ml contenenti 30 ml di terreno minerale (ONR7a o BH) e uno scaffold 3D imbevuto precedentemente con 30µl di petrolio greggio sterilizzato per filtrazione (Arabian Light Crude Oil, ENI S.p.A). Tre serie di microcosmi sono state preparate e incubate a  $30 \pm 1$  ° C in agitatore ( $200 \times g$ ) per 2, 4, e 6 giorni rispettivamente.

Lo stesso procedimento è stato seguito per allestire i microcosmi contenenti le membrane di PLA e le membrane di PCL aumentando i tempi di incubazione a 5 e 10 giorni, al fine di osservare una degradazione del petrolio quasi completa. Controlli abiotici (senza batteri) e controlli con le cellule batteriche non immobilizzate sui carrier sono stati preparati in parallelo per valutare la degradazione degli HC dovuta a processi puramente fisico-chimici, e la degradazione delle colture delle cellule libere rispetto alle cellule immobilizzate. Ogni microcosmo è stato preparato in triplicato per ogni condizione.

#### **4.3.5.2 Analisi GC-FID**

Dopo la rimozione dei carrier da ciascun microcosmo, gli idrocarburi totali estratti (TERHC), in fase liquida, sono stati analizzati mediante GC-FID ad alta risoluzione utilizzando il sistema EPA 3510 (Environmental Protection Agency) (Gentile et al., 2016). Dopo l'acidificazione del campione, i TERCH sono stati estratti a temperatura ambiente utilizzando diclorometano ( $CH_2Cl_2$ , 10% v / v). I TERCH presenti nei carrier sono stati estratti utilizzando esano ( $C_6H_{14}$ ) come solvente di estrazione.



La procedura di estrazione (sia per il mezzo liquido che per i carrier) è stata ripetuta tre volte e la fase solvente è stata combinata e disidratata con solfato di sodio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Gli estratti sono stati concentrati per evaporazione rotante (Rotavapor) a temperatura ambiente. Tutte le misurazioni sono state eseguite utilizzando il sistema di cromatografia a gas rapido DANI Master GC (DANI Instruments S.p.A.,) dotato di un iniettore SSL split / splitless e di un rivelatore FID. I campioni ( $1\mu\text{l}$ ) sono stati iniettati in modalità splitless a  $330^\circ\text{C}$ . Come colonna analitica è stata utilizzata LA colonna Restek Rxi-5 Sil MS con Integra-Guard,  $30\text{ m} \times 0,25\text{ mm}$  (diametro interno  $0,25\text{-}\mu\text{m}$ ). Come gas di trasporto è stato utilizzato l'elio, mantenuto a un flusso costante di  $1,5\text{ ml min}^{-1}$ . Le concentrazioni di TERCH sono state calcolate come singole concentrazioni di *n*-alcani, pristano e fitano.

## 4.4 Risultati e discussione

### 4.4.1 Colonizzazione batterica

Dopo 48 ore di co-incubazione di *Alcanivorax* SK2 e *Nocardia* SoB con gli scaffold 3D di policaprolattone (PCL), i carrier sono stati osservati al microscopio a scansione elettronica (SEM). Le immagini hanno confermato l'elevata capacità di colonizzazione delle cellule batteriche all'interno della struttura porosa 3D degli scaffold. Sia le porzioni esterne che quelle interne hanno mostrato un'adesione significativa e una abbondante proliferazione cellulare (Fig. 4.3). Lo scaffold 3D PCL colonizzato da *Nocardia* SOB ha rivelato la presenza di strutture filamentose come evidenziato dalla freccia in Fig. 4.3. La presenza di queste strutture filamentose è probabilmente attribuibile alla formazione di biofilm. Strutture simili non sono state osservate negli scaffold incubati con *Alcanivorax* SK2. Entrambi i ceppi sono noti per produrre strutture di polisaccaridi adesive che contribuiscono alla formazione di biofilm. *Alcanivorax* forma biofilm durante la crescita su esadecano producendo una considerevole quantità di sostanze polimeriche extracellulari (EPS), che sembrano supportare la struttura tridimensionale del biofilm (Sabirova et al., 2011). Una possibile spiegazione per l'assenza di queste fibre nello scaffold PCL colonizzato da *Alcanivorax* potrebbe essere data dal breve periodo di incubazione che non è stato sufficiente per consentire la formazione di una fibra visibile di esopolisaccaride.

Tutti i ceppi testati sulle membrane di acido polilattico (PLA) e policaprolattone (PCL) hanno mostrato una buona capacità di adesione già dopo 48h. Le sezioni di membrana osservate al SEM rivelano comunque la presenza di un numero più basso di cellule batteriche adese ai supporti elettrofilati, al termine delle 48h, rispetto ai supporti porosi, suggerendo che la struttura tridimensionale degli carrier possa favorire una maggiore adesione e proliferazione cellulare.

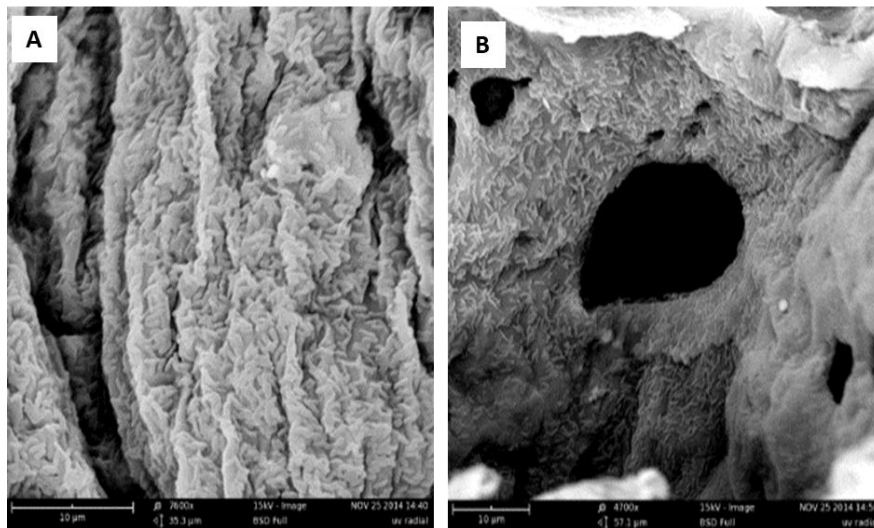
Al termine delle 120h e 240h di incubazione si osserva invece una elevata capacità di adesione e proliferazione cellulare sia nelle membrane di PLA che in quelle di PCL, paragonabile a quella osservata per gli scaffold 3D dopo 48h di incubazione (Fig. 4.4, Fig. 4.5).

I ceppi batterici marini idrocarburo-ossidanti *Alcanivorax* e *Oleibacter* mostrano una capacità di adesione alle membrane inferiore rispetto agli Attinomiceti, seppur mantenendo una buona capacità di adesione nei supporti dopo i tempi di incubazione. Nel caso dei ceppi batterici marini è possibile osservare ancora dopo 240h di incubazione fibre di membrana non colonizzata e l'assenza di strutture attribuibili ad un biofilm batterico. L'assenza di biofilm era stata già osservata negli scaffold colonizzati da *Alcanivorax*. I risultati ottenuti dimostrano che l'incapacità di *Oleibacter* e *Alcanivorax* di formare biofilm non è attribuibile a tempi di incubazione insufficienti ma ad altri fattori da investigare. Altri studi condotti sull'immobilizzazione di batteri marini su materiali carrier spiegano l'assenza di formazione di biofilm come una conseguenza dell'attrazione elettrostatica tra cariche positive e negative che è abbastanza forte da immobilizzare le cellule batteriche nei supporti carrier senza formazione di biofilm. (Hou et al., 2013).

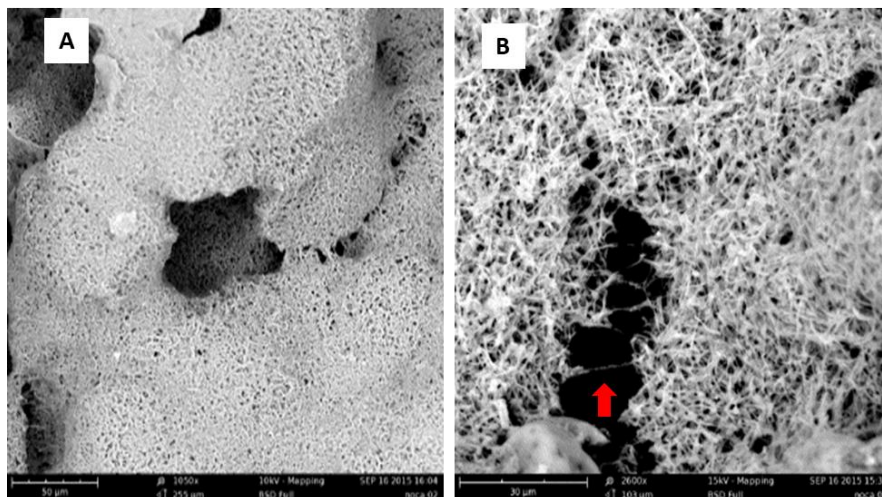
Anche *Nocardia* SoB e *Gordonia* SoCg mostrano una elevata capacità di adesione e proliferazione nelle membrane elettrofilate; *Gordonia* SoCg in particolare mostra la formazione un biofilm ben strutturato,

piuttosto compatto ed una completa colonizzazione in tutta la superficie del supporto, che appare con le nanofibre completamente inglobate all'interno del biofilm dopo 240h (Fig. 4.5). Le immagini ottenute al SEM hanno dimostrato che tutti i ceppi batterici immobilizzati sono in grado di aderire e proliferare nei carrier biodegradabili. Nessuna differenza nella capacità di adesione è stata osservata tra il policaprolattone e l'acido polilattico, mentre una differente capacità è stata notata tra le strutture tridimensionali (scaffold) e le membrane elettrofilate, che hanno mostrato una minore efficienza di adesione da parte delle cellule batteriche. Una ipotesi per spiegare questa differenza potrebbe essere attribuibile alla struttura stessa dei supporti, la matrice tridimensionale porosa probabilmente fornisce un ambiente più adatto e di protezione per le cellule batteriche che risultano invece maggiormente esposte a condizioni avverse quando immobilizzati sulle membrane elettrofilate, limitandone la proliferazione cellulare.

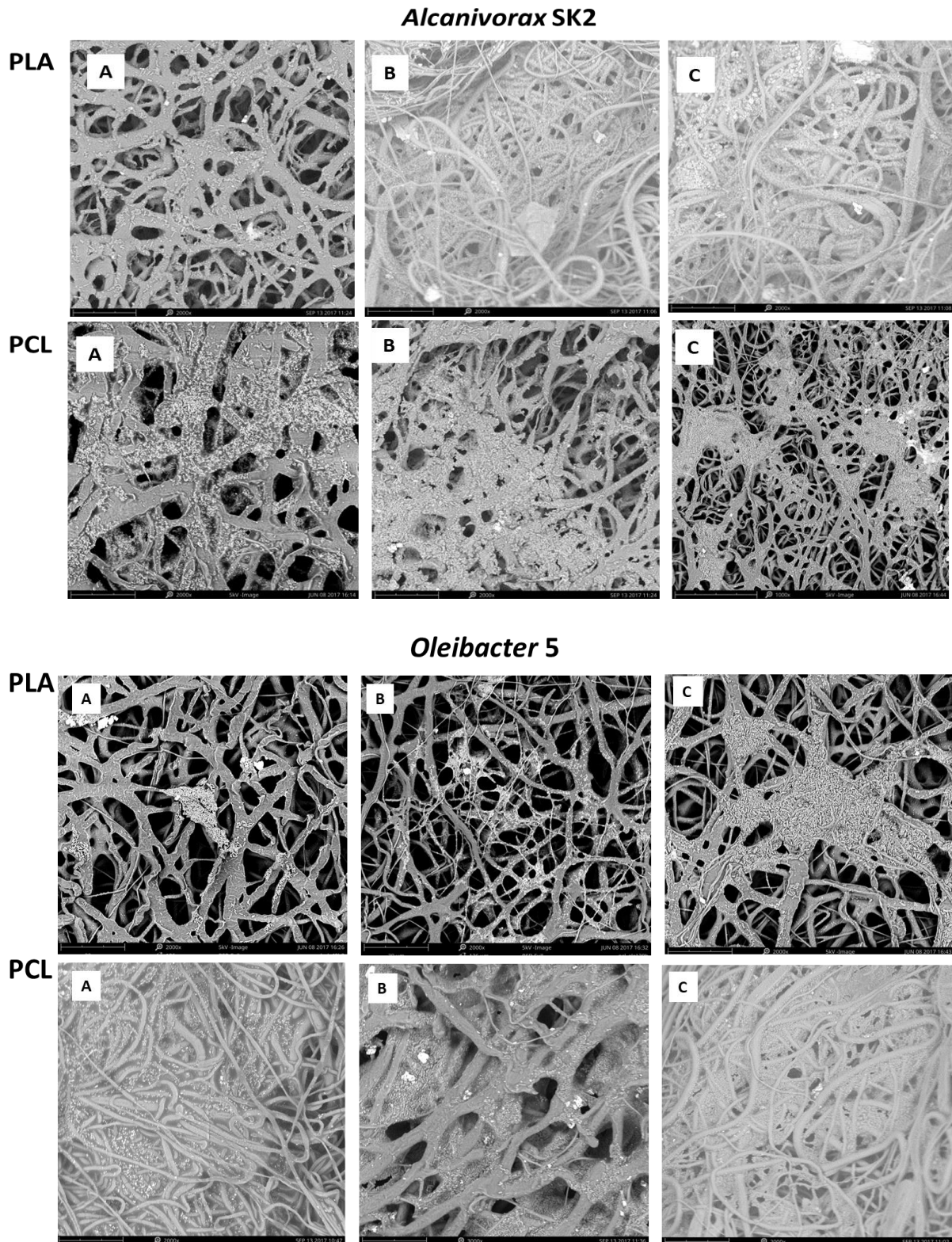
### *Alcanivorax SK2*



### *Nocardia SoB*

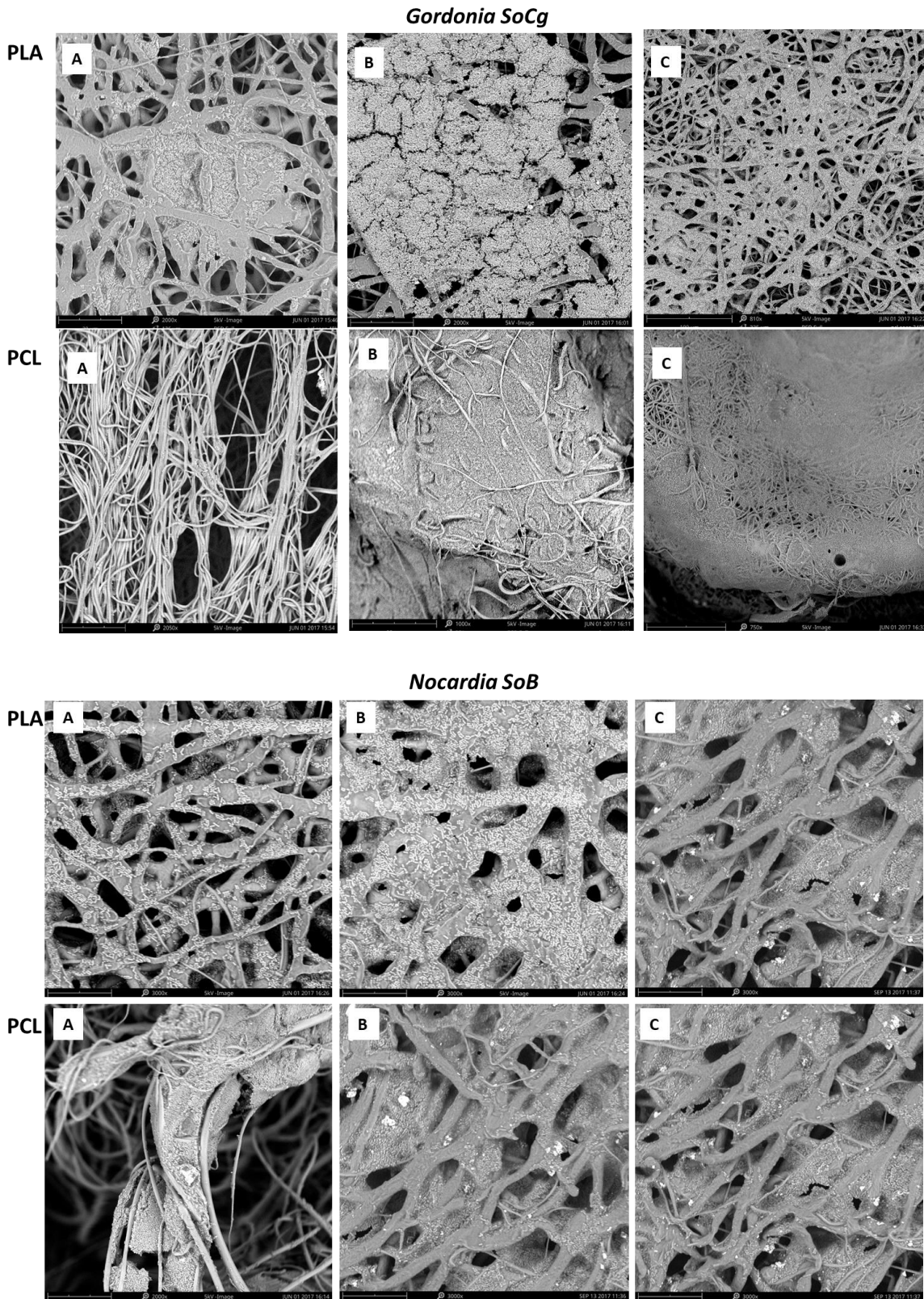


**Fig. 4.3** Immagini al SEM dell'adesione di *Alcanivorax SK2* e *Nocardia SoB* all'interno della struttura porosa (A) e sulla superficie esterna (B) dello scaffold 3D PCL dopo 48h di incubazione. La freccia indica la presenza di strutture filamento attribuibili a formazione di biofilm.



**Fig. 4.4** Immagine al SEM di *Alcanivorax* SK2 e *Oleibacter* 5 nelle membrane di acido polilattico (PLA) e policaprolattone (PCL) dopo 48h (A), 120h (B), 240h (C) di incubazione.





**Fig. 4.5** Immagine al SEM dell'adesione di *Gordonia SoCg* e *Nocardia SoB* nelle membrane di acido polilattico (PLA) e policaprolattone (PCL) dopo 48h (A), 120h (B), 240h (C) di incubazione

#### 4.4.2 Efficienza di biodegradazione delle cellule immobilizzate

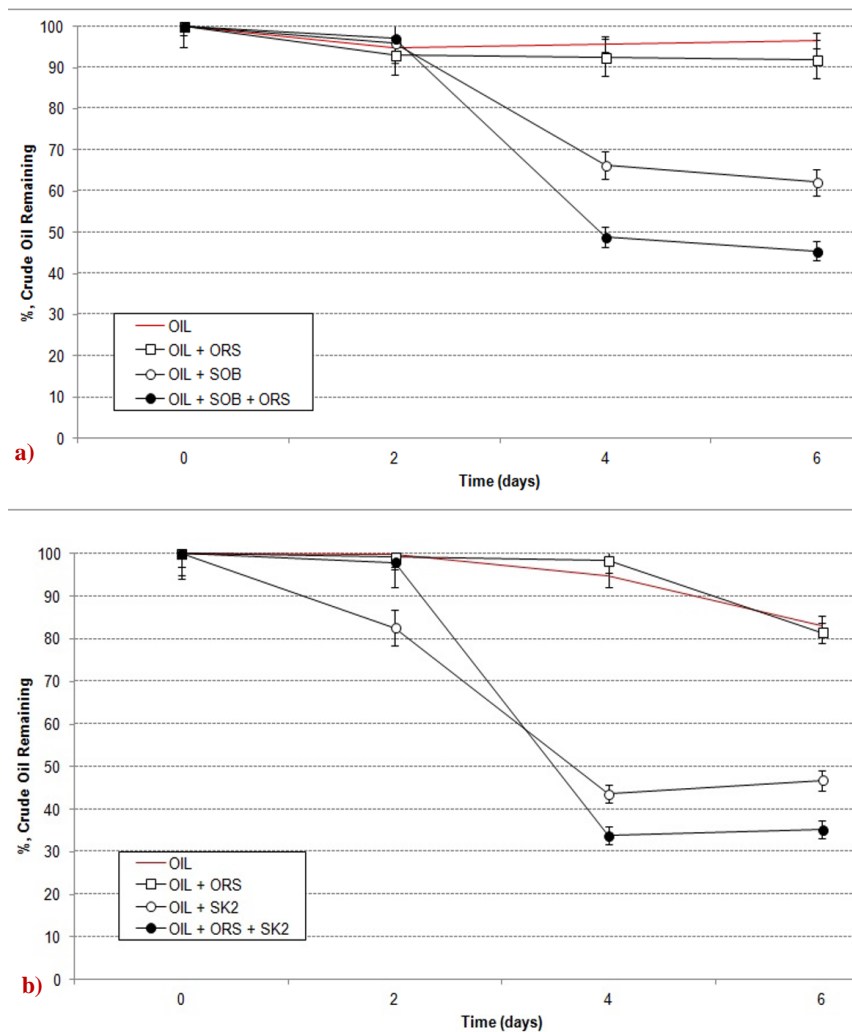
L'efficienza di biodegradazione degli scaffold 3D PCL è stata testata in microcosmi su petrolio greggio. I residui totali di idrocarburi sono stati estratti dopo 2, 4 e 6 giorni di incubazione. Più del 40% e 50% di petrolio sono stati degradati dopo 6 giorni in presenza *Nocardia* e *Alcanivorax* rispettivamente, come riportato nelle Fig. 4.6. La degradazione più significativa da parte dei batteri immobilizzati si osserva dopo il secondo giorno di incubazione; al sesto giorno di incubazione, oltre il 55% e il 65% del petrolio sono stati rimossi rispettivamente dalle cellule di *Nocardia* e *Alcanivorax* immobilizzate. Le cellule immobilizzate negli scaffold 3D PCL hanno rimosso circa il 10-15% in più rispetto alle cellule planctoniche. Questa cinetica di degradazione è compatibile con la corrispondente cinetica di crescita che non è stata però misurata in questo esperimento. Tuttavia, esperimenti simili condotti con altre specie batteriche immobilizzate sugli stessi supporti biopolimerici hanno mostrato che la biomassa immobilizzata aumenta sensibilmente fino al 3 giorno di crescita, mentre il massimo di attività metabolica si registra proprio al termine di tale periodo (Scaffaro et al., 2016). L'efficienza di biodegradazione del petrolio greggio dei sistemi batteri-membrane elettrofilate di PLA e di PCL è stata valutata dopo 120 ore e 240 ore di incubazione. La capacità di degradazione del petrolio delle cellule immobilizzate è stata confrontata con quella delle cellule planctoniche (senza membrane) nelle stesse condizioni sperimentali. Tutti i ceppi batterici hanno mostrato una capacità degradativa compresa tra il 50% e il 30% dopo 120h di incubazione in microcosmo. Al termine delle 240h di incubazione si osserva un ulteriore decremento degli idrocarburi residui in coltura in un range compreso tra il 5% e il 20%. Più del 50% del petrolio greggio è stato rimosso dai ceppi batterici immobilizzati nelle membrane di acido polilattico (PLA) e policaprolattone (PCL), mostrando un aumento della capacità degradativa compresa tra il 7% e il 20% rispetto alle cellule planctoniche (Fig. 4.7).

*Alcanivorax* è stato il ceppo che ha mostrato la maggiore attività degradativa con valori del 75% di idrocarburi degradati dopo 240h di immobilizzazione nelle membrane sia di PLA che di PCL. Anche *Nocardia* è in grado di degradare il 75% di idrocarburi in 240h quando immobilizzato in membrane di PLA. Non si osservano differenze significative nelle capacità di degradazione tra i ceppi batterici immobilizzati nelle membrane di PLA e quelli immobilizzati nelle membrane di PCL, un dato simile era già stato riscontrato per la capacità di adesione e proliferazione; suggerendo che entrambi i materiali possono essere utilizzati indistintamente per l'immobilizzare di ceppi batterici degradatori di HC.

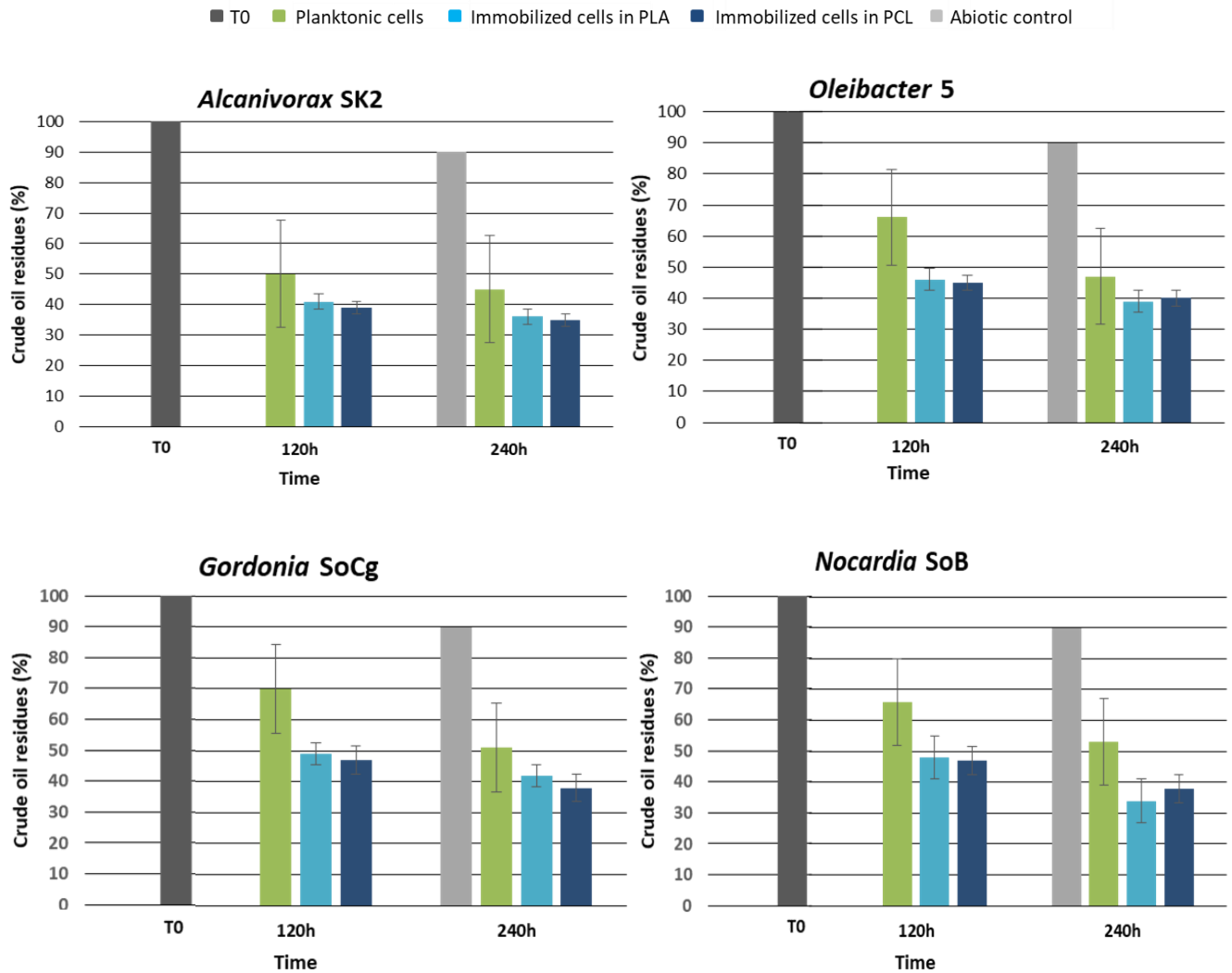
La maggiore efficienza di degradazione osservata per le cellule immobilizzate potrebbe essere spiegata con l'ipotesi che l'immobilizzazione aumenta l'affinità tra le cellule batteriche e il substrato idrofobico, e di conseguenza il tasso di degradazione. Altri studi hanno dimostrato che le cellule immobilizzate su diversi supporti, rispetto ai batteri in forma libera, sono metabolicamente più attive, hanno una emivita più lunga, e un'attività di degradazione del petrolio più elevata (Bayat et al., 2015). Consorzi di ceppi degradatori del diesel aumentano la percentuale di rimozione del gasolio in 32 giorni dal 36,7% al 53,5% dopo immobilizzazione su alcol polivinilico (PVA) (Cunningham et al., 2004). *Acinetobacter* sp. F9, batterio marino degradatore di petrolio, immobilizzato su carrier galleggianti e biodegradabili (PFM)

contenenti alginato di calcio (CA) e chitosano rimuove più dell'80% del gasolio in un giorno, mentre solo il 45% del gasolio è rimosso dalle stesse cellule libere (Hou et al., 2013).

Confronti diretti tra diversi sistemi carrier-batteri, non sono possibili a causa della variabilità delle condizioni sperimentali, dei tempi di incubazione e dei metodi analitici. Tuttavia quasi tutti i risultati ottenuti finora attestano che le cellule immobilizzate rappresentano una valida alternativa tecnologica per le applicazioni ambientali. Una ipotesi proposta per spiegare l'aumento delle capacità degradative dei batteri immobilizzati è che venga aumentata la biodisponibilità del contaminante. I materiali sorbenti potrebbero favorire le capacità delle cellule batteriche di aderire ai contaminanti idrocarburi. Secondo questo meccanismo di uptake l'assorbimento iniziale del petrolio nel materiale assorbente è seguito dall'adesione dei microrganismi nel supporto all'interfaccia acqua/petrolio. La staticità del sistema, rispetto alle cellule libere sottoposte invece ad un continuo meccanismo di agitazione, favorisce l'uptake dell'idrocarburo e di conseguenza il rate di degradazione risulta più alto.



**Fig. 4.6** Capacità degradativa (espressa come percentuale residua di petrolio) in presenza dei batteri degradatori di HC *Nocardia* SoB (a) e *Alcanivorax* SK2 (b). Controlli abiotici, terreno minerale con petrolio senza batteri: OIL; mezzo minerale con petrolio e ORS: OIL + ORS. Microcosmi planctonici, terreno minerale con petrolio e batteri: OIL + SK2 e OIL + SOB. Microcosmi di cellule immobilizzate, terreno minerale con petrolio, batteri e ORS: OIL + SK2 + ORS e OIL + SOB + ORS



**Fig. 4.7** Efficienza di degradazione espressa come percentuale di HC del petrolio residui in coltura delle cellule batteriche immobilizzate nelle membrane di acido polilattico (PLA) e policaprolattone (PCL). T0: controlli prima dell'incubazione, Abiotic control: controlli dopo l'incubazione senza batteri.

#### 4.5 Conclusioni

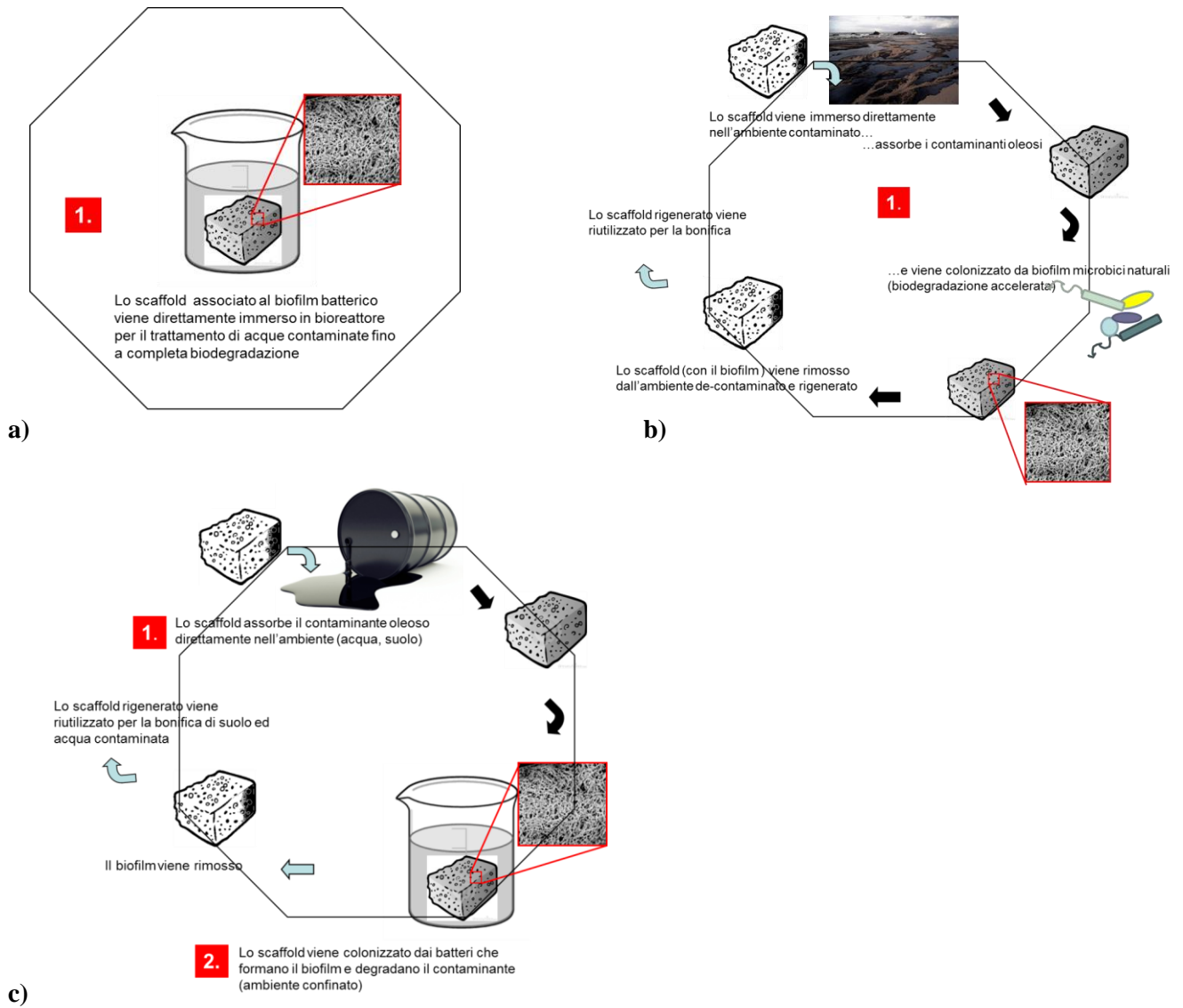
In conclusione, è stato messo a punto un sistema innovativo pronto all'uso basato sulla tecnologia dell'immobilizzazione delle cellule batteriche che consiste nell'uso simultaneo di microrganismi e carrier sorbenti biodegradabili.

L'efficienza di biorisanamento del sistema è stata testata su petrolio greggio utilizzando due ceppi batterici marini HC-ossidanti altamente performanti: il sistema modello dei BIC (*Alcanivorax borkumensis* SK2) ed un nuovo genere poco caratterizzato e studiato nel capitolo 2 di questa tesi di dottorato (*Oleibacter marinus* 5); e due ceppi batterici del suolo degradatori di *n*-alcani a catena lunga (*Nocardia* sp. SoB., *Gordonia* sp. SoCg). I carrier utilizzati sono stati sintetizzati, senza l'uso di solventi organici, utilizzando biopolimeri caratterizzati da una elevata capacità di rimuovere inquinanti organici di natura idrofobica (fino al 500% in peso). La natura intrinseca lipofila del policaprolattone (PCL) e dell'acido polilattico (PLA) ha reso il dispositivo poroso e le membrane in grado di assorbire selettivamente gli inquinanti oleosi con alta efficienza e alto tasso di riutilizzabilità. Una elevata capacità di adesione e proliferazione delle cellule batteriche all'interno dell'intera struttura dei carrier testati è stata osservata. L'immobilizzazione delle cellule batteriche sugli scaffold 3D PCL, e sulle membrane elettrofilate di PLA e di PCL risulta un fattore promettente per la biodegradazione, un aumento compreso tra il 15% e il 20% è stato osservato per le cellule immobilizzate rispetto alle cellule planctoniche. Il sistema più performante è rappresentato da *Alcanivoraax* immobilizzato su entrambi i supporti.

Il sistema batteri-carrier messo a punto si presta per applicazioni di biorisanamento in situ ed ex situ utilizzabili tramite differenti formulazioni e metodi diversi. Il sistema potrebbe essere usato in ambiente confinato in un metodo a singola fase in cui lo scaffold viene rivestito del biofilm batterico più adatto, costituito da una o più specie selezionate, ed immerso direttamente nell'acqua contaminata in bioreattore fino a degradazione (Fig. 4.9a). Successivamente lo scaffold viene rimosso e riciclato previa eliminazione del biofilm mediante sterilizzazione e lavaggio. Una possibile applicazione per tale metodo/dispositivo è il disinquinamento delle acque di sentina e delle acque di zavorra direttamente sul natante.

Nelle applicazioni in situ si potrebbe utilizzare il metodo a singola fase immergendo lo scaffold direttamente nell'acqua contaminata (Fig. 4.9b). La natura porosa e le caratteristiche dello scaffold favoriscono la formazione di un biofilm microbico per l'azione colonizzatrice di microrganismi autoctoni già presenti nell'ambiente contaminato. Questo sistema potrebbe essere utilizzato in casi di sversamenti accidentali di petrolio, come incidenti navali offshore o perdite durante le operazioni di carico e scarico nei porti.

In caso di assenza nel sito contaminato di batteri capaci di effettuare la biodegradazione, o nel caso di fattori ambientali limitanti per la crescita di tali microrganismi si potrebbe effettuare un intervento di biorisanamento ex situ a due fasi, sfruttando l'azione di assorbimento del contaminante ad opera dello scaffold nella prima fase; ottenendo una rapida rimozione, ed il trasferimento, nella seconda fase, in ambiente confinato dove avviene la degradazione del contaminante ad opera dei batteri selezionati, con la conseguente rigenerazione dello scaffold (Fig. 4.9c).



**Fig.4.9** Rappresentazione schematica di possibili applicazioni dei sistemi carrier-batteri messi a punto in questa tesi che sfruttano sia le proprietà dei materiali biopolimerici (rimozione meccanica), che le capacità degradative di microrganismi selezionati (a, c) o autoctoni (b) (rimozione biologica) sia in ambiente confinato (a, c) che in situ (b) per ottenere una maggiore efficienza di degradazione degli inquinanti.

## Conclusioni generali

Questa tesi di Dottorato si inserisce nella tematica delle Biotecnologie Blu (o Marine) basate sullo sfruttamento delle risorse marine per creare prodotti e applicazioni di interesse industriale ed ambientale. Tra le biotecnologie blu, il biorisanamento, che sfrutta le potenzialità cataboliche dei microrganismi per lo sviluppo di processi e prodotti per il trattamento e la bonifica di aree contaminate, costituisce uno straordinario settore di sviluppo. In questa prospettiva le biotecnologie microbiche ambientali offrono grandi opportunità di innovazione, raggiungibili solo combinando competenze provenienti da diversi settori come l'ecologia, la biologia, l'ingegneria che concorrono alle soluzioni biotecnologiche.

Durante il mio dottorato di ricerca ho affrontato l'urgente problema dell'inquinamento costiero marino soprattutto a carico degli idrocarburi derivati dal petrolio, valutando le potenzialità dei microrganismi marini nel degradare, e quindi risanare, un'area costiera cronicamente contaminata in Sicilia. Pertanto, partendo da un SIN ad elevatissimo rischio di crisi ambientale, la Baia di Priolo, adiacente al polo petrolchimico di Priolo-Melilli-Augusta, al centro del Mar Mediterraneo, ho verificato e dimostrato il potenziale di biorisanamento a carico della componente microbica dell'acqua e del sedimento dell'area.

Il quadro che risulta dall'analisi della comunità microbica della Baia di Priolo è complesso e variabile tra le stazioni di campionamento. Le comunità microbiche che risiedono nei diversi campioni di acque e sedimento sono distinte tra loro e la loro composizione e diversità non è correlata con la concentrazione di HC. Inoltre la struttura della comunità microbica subisce modifiche sostanziali già tra il primo strato di sedimento superficiale (0-5 cm) ed il secondo di sedimento sub-superficiale (5-10 cm). I sedimenti ospitano comunità batteriche più diversificate rispetto all'acqua ma la diversità dei batteri coltivabili è più elevata nell'acqua rispetto al sedimento. I dati microbiologici dei sedimenti sub-superficiali suggeriscono la presenza di micrositi anossici o comunque a bassa tensione di ossigeno, nei quali si stabiliscono popolazioni microbiche sintrofiche in grado di degradare idrocarburi. Gli approcci di coltivazione adottati per arricchire e isolare batteri idrocarburo-ossidanti hanno portato alla selezione di 329 ceppi batterici diversi e specializzati nella degradazione degli HC. All'interno della collezione, i generi più abbondanti sono *Alcanivorax*, *Alteromonas*, *Halomonas*, *Marinobacter*, *Oleibacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*. Considerato il fatto che l'isolamento di *Oleibacter* da Priolo risulta il primo nel Mar Mediterraneo, e il secondo a livello mondiale, tutti gli isolati afferenti a questo genere sono stati ulteriormente investigati in termini di diversità filogenetica e funzionale. I dati preliminari ottenuti hanno permesso di ottenere preziose informazioni su questi isolati rivelando promettenti potenzialità per il biorisanamento. Il confronto con gli unici ceppi isolati dall'Oceano Pacifico, afferenti a questo genere, ha suggerito differenze funzionali e metaboliche tra ceppi dello stesso genere da attribuire probabilmente alla divergenza geografica.

L'analisi filogenetica e funzionale delle comunità microbiche e dei microrganismi HC-degradatori del sito contaminato, condotta in stretta collaborazione con gli ecologi, ha contribuito da un lato a suggerire che un approccio di risanamento basato sul potenziale degradativo intrinseco delle popolazioni autoctone è possibile, dall'altro ha posto la sfida di come tale potenziale possa essere praticamente sfruttato "in campo"

attraverso applicazioni biotecnologiche mirate e sostenibili. Mentre, infatti, l'elevata diversità ed attività microbica dei batteri degradatori di HC della Baia di Priolo è senz'altro responsabile di fenomeni di attenuazione naturale dell'area (purchè cessino le fonti di inquinamento), è urgente trovare soluzioni più rapide ed efficienti per risolvere i problemi di inquinamento che non la sola attenuazione naturale.

Ho quindi voluto applicare le conoscenze acquisite e le risorse microbiologiche derivate dall'esplorazione degli ambienti contaminati per lo sviluppo di un sistema innovativo, *ready to use*, per il biorisanamento di acque contaminate da petrolio. Di fondamentale importanza per il raggiungimento di questo obiettivo, è stata la collaborazione con gli ingegneri dei materiali dell'Università di Palermo che da anni studiano le trasformazioni di materiali polimerici e biopolimerici e le loro applicazioni. Dalla sinergia tra lo sfruttamento delle risorse microbiologiche marine e ambientali da una parte, e le conquiste della scienza e della tecnologia polimeriche dall'altra sono stati ideati, sviluppati e saggiati nuovi sistemi di biorisanamento basati sull'interazione tra biopolimeri biodegradabili e batteri biodegradatori di HC. Considerata l'elevata potenzialità dei ceppi batterici isolati dalla Baia di Priolo i più versatili da un punto di vista metabolico sono stati utilizzati per lo sviluppo e l'implementazione di un sistema innovativo *ready to use* basato sull'immobilizzazione su carrier assorbenti biodegradabili, di ceppi batterici degradatori di idrocarburi anche ottenuti in questa stessa tesi. L'immobilizzazione è risultata un fattore promettente per la biodegradazione suggerendo una possibile applicazione in situ ed ex situ del sistema carrier-batteri realizzato. In generale un aumento compreso tra il 15% e il 20% è stato osservato per le cellule immobilizzate rispetto alle cellule planctoniche. Il sistema più efficiente è quello basato su *Alcanivorax* immobilizzato su entrambi i supporti.

Il sistema batteri-carrier messo a punto si presta per applicazioni di biorisanamento in situ ed ex situ utilizzabili tramite differenti formulazioni e metodi diversi che sfruttano sia le proprietà dei materiali biopolimerici (rimozione meccanica), che le capacità degradative di microrganismi selezionati o autoctoni (rimozione biologica) in ambiente confinato e in situ, per ottenere una maggiore efficienza di degradazione degli inquinanti.



## **Ringraziamenti**

Si ringrazia il Prof. Antonio Mazzola e la Prof.ssa Salvatrice Vizzini del Dipartimento Scienze della Terra e del Mare (DISTeM) dell'Università di Palermo per il campionamento effettuato nell'ambito del progetto di ricerca e formazione "Tecnologie avanzate eco-sostenibili finalizzate alla bonifica ed al ripristino di aree marine costiere degradate" (Tetide) (PON01\_03112).

Si ringrazia il Dott.re Simone Cappello e la Dott.ssa Santina Santisi dell' Istituto per l'ambiente marino Costiero -Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR) della sezione di Messina per le analisi GC-FID e la collaborazione nell'isolamento di batteri dalla Baia di Priolo.

Si ringrazia il Prof. Roberto Scaffaro e il Dott. Francesco Lopresti del Dipartimento di Ingegneria Civile, Ambientale, Aerospaziale, dei Materiali (DICAM) per la produzione dei carrier biodegradabili e le analisi al SEM.

Si ringrazia il Dott. Armando Laudicina del Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (SAF ) dell' Università di Palermo per le analisi di caratterizzazione degli acidi grassi sugli isolati di *Oleibacter* spp.

Infine desidero esprimere la mia più sincera gratitudine alla Dottoressa Paola Quatrini per il lavoro di supervisione svolto, per l'inestimabile contributo scientifico e umano, per il costruttivo incoraggiamento ed il prezioso supporto.

## Bibliografia

- Abbasnezhad, H., Gray, M., & Foght, J. M. (2011). Influence of adhesion on aerobic biodegradation and bioremediation of liquid hydrocarbons. *Applied microbiology and biotechnology*, 92(4), 653.
- Acosta-González, A., & Marqués, S. (2016). Bacterial diversity in oil-polluted marine coastal sediments. *Current opinion in biotechnology*, 38, 24-32.
- Agarwal, A., & Liu, Y. (2015). Remediation technologies for oil-contaminated sediments. *Marine pollution bulletin*, 101(2), 483-490.
- Al-Bader, D., Kansour, M. K., Rayan, R., & Radwan, S. S. (2013). Biofilm comprising phototrophic, diazotrophic, and hydrocarbon-utilizing bacteria: a promising consortium in the bioremediation of aquatic hydrocarbon pollutants. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(5), 3252-3262.
- Ali, S. R., & Rajak, B. R. C. M. (2013). Screening and characterization of biosurfactants producing microorganism from natural environment (whey spilled soil). *Screening*, 3(13).
- Al-Majed, A.A., Adebayo, A.R., Hossain, M.E. (2012). A sustainable approach to controlling oil spills. *J. Environ. Manage.* 113, 213-227.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143-169.
- American Public Health Association (A.P.H.A.), (1992) Standard methods for the examination of water and waste water, 18th edition. Washington, DC: American Public Health Association.
- Atlas, R. M. (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev* 7:285-292.
- Bargiela, R., Herbst, F.A., Martínez-Martínez, M., Seifert, J., Rojo, D., Cappello, S., Genovese, M., Crisafi, F., Denaro, R., Chernikova, T.N., Barbas, C., von Bergen, M., Yakimov, M.M., Ferrer, M., Golyshin, P.N. (2015). Metaproteomics and metabolomics analyses of chronically petroleum polluted sites reveal the importance of general anaerobic processes uncoupled with degradation. *Proteomics*, 15(20), 3508-3520.
- Bayat, Z., Hassanshahian, M., & Cappello, S. (2015). Immobilization of microbes for bioremediation of crude oil polluted environments: a mini review. *The open microbiology journal*, 9, 48.
- Bayat, Z., Hassanshahian, M., & Hesni, M. A. (2016). Study the symbiotic crude oil-degrading bacteria in the mussel *Macra stultorum* collected from the Persian Gulf. *Marine pollution bulletin*, 105(1), 120-124
- Bellucci, L.G., Giuliani, S., Romano, S., Albertazzi, S., Mugnai, C., & Frignani, M. (2012). Effects of prokaryotic diversity changes on hydrocarbon degradation rates and metal partitioning during bioremediation of contaminated anoxic marine sediment. *Mar Pollut Bull.* 64(8):1688-98
- Bertini, L., Cafaro, V., Proietti, S., Caporale, C., Capasso, P., Caruso, C., & Di Donato, A. (2013). Deepening TOL and TOU catabolic pathways of *Pseudomonas* sp. OX1: cloning, sequencing and characterization of the lower pathways. *Biochimie*, 95(2), 241-250.
- BLAST. Basic Local Alignment Search Tool. Online verfügbar unter <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- Bleve, G., Lezzi, C., Chiriatti, M. A., D'Ostuni, I., Tristezza, M., Di Venere, D., ... & Grieco, F. (2011). Selection of non-conventional yeasts and their use in immobilized form for the bioremediation of olive oil mill wastewaters. *Bioresource technology*, 102(2), 982-989.
- Boonchan, S., Britz, M.L., Stanley, G.A., 2000. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal bacterial cocultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (3), 1007-1019.
- Boopathy, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource technology*, 74(1), 63-67.
- Bowditch, R. D., Baumann, L., & Baumann, P. (1984). Description of *Oceanospirillum kriegii* sp. nov. and *O. jannaschii* sp. nov. and assignment of two species of *Alteromonas* to this genus as *O. commune* comb. nov. and *O. vagum* comb. nov. *Current Microbiology*, 10(4), 221-229.
- Brakstad, O. G., & Løðeng, A. G. G. (2005). Microbial diversity during biodegradation of crude oil in seawater from the North Sea. *Microbial Ecology*, 49(1), 94-103.
- Cappello, S., Genovese, M., Della Torre, C., Crisari, A., Hassanshahian, M., Santisi, S., Calogero, R., Yakimov, M.M. (2012). Effect of bioemulsificant exopolysaccharide (EPS) on microbial community dynamics during assays of oil spill bioremediation: a microcosm study. *Mar Pollut Bull.* 64(12):2820-8
- Catania, V., Santisi, S., Signa, G., Vizzini, S., Mazzola, A., Cappello, S., ... Quatrini, P. (2015). Intrinsic bioremediation potential of a chronically polluted marine coastal area. *Marine Pollution Bulletin*, 99(1), 138-149.
- Catania, V., Sarà, G., Settanni, L., & Quatrini, P. (2016). Bacterial communities in sediment of a Mediterranean Marine Protected Area. *Can J Microbiol.* doi: 10.1139/cjm-2016-0406. Chandra, S., Sharma, R., Singh, K., Sharma, A., 2013. Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Ann. Microbiol.* 63, 417-431.
- Chaudhry, Q., Blom-Zandstra, M., Gupta, S., Joner, E.J. (2005). Utilizing the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 12 (1), 34-48.
- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., ... & Tiedje, J. M. (2013). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic acids research*, gkt1244.
- Costa, A.S., Romao, L.P., Araujo, B.R., Lucas, S.C., Maciel, S.T., Wisniewski Jr., A., Alexandre, M.R., (2012). Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. *Bioresour. Technol.* 105, 31-39.
- Coulon, F., McKew, B. A., Osborn, A. M., McGenity, T. J., & Timmis, K. N. (2007). Effects of temperature and biostimulation on oil degrading microbial communities in temperate estuarine waters. *Environmental Microbiology*, 9(1), 177-186.
- Cristóvão, R. O., Tavares, A. P., Brígida, A. I., Loureiro, J. M., Boaventura, R. A., Macedo, E. A., & Coelho, M. A. Z. (2011). Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72(1), 6-12.
- Cubitto, M. A., & Gentili, A. R. (2015). Bioremediation of Crude Oil-Contaminated Soil By Immobilized Bacteria on an Agroindustrial Waste—Sunflower Seed Husks. *Bioremediation Journal*, 19(4), 277-286.

- Cui, Z., Lai, Q., Dong, C., & Shao, Z. (2008). Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon- degrading bacteria from deep sea sediments of the Middle Atlantic ridge. *Environmental microbiology*, 10(8), 2138-2149.
- Cunningham, C. J., Ivshina, I. B., Lozinsky, V. I., Kuyukina, M. S., & Philp, J. C. (2004). Bioremediation of diesel-contaminated soil by microorganisms immobilised in polyvinyl alcohol. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54(2), 167-174.
- Daffonchio, D., Ferrer, M., Mapelli, F., Cherif, A., Lafraya, A., Malkawi, H. I., ... & Kalogerakis, N. (2013). Bioremediation of Southern Mediterranean oil polluted sites comes of age. *New biotechnology*, 30(6), 743-748.
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*, 2011.
- De la Huz, R., Lastra, M., Junoy, J., Castellanos, C., & Vieitez, J. M. (2005). Biological impacts of oil pollution and cleaning in the intertidal zone of exposed sandy beaches: preliminary study of the "Prestige" oil spill. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 65(1), 19-29.
- Di Leonardo, R., Mazzola, A., Tramati, C. D., Vaccaro, A., & Vizzini, S. (2014). Highly contaminated areas as sources of pollution for adjoining ecosystems: the case of Augusta Bay (Central Mediterranean). *Marine pollution bulletin*, 89(1), 417-426.
- Dinamarca, M. A., Ruiz-Manzano, A., & Rojo, F. (2002). Inactivation of cytochrome o ubiquinol oxidase relieves catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPo1 alkane degradation pathway. *Journal of bacteriology*, 184(14), 3785-3793.
- Dyksterhouse, S. E., Gray, J. P., Herwig, R. P., Lara, J. C., & Staley, J. T. (1995). *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(1), 116-123.
- Dzionic, A., Wojcieszynska, D., & Guzik, U. (2016). Natural carriers in bioremediation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 23, 28-36.
- Farhadian, M., Vachelard, C., Duchez, D., Larroche, C., 2008. In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review. *Bioresour. Technol.* 9, 5296-5308.
- Fathpure, B. Z. 2015. Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. In *The Proceedings from Halophiles 2013, the International Congress on Halophilic Microorganisms* (Vol. 5, No. 12, p. 35). Frontiers Media SA.
- Frank, J. A.; Reich, C. I.; Sharma, S.; Weisbaum, J. S.; Wilson, B. A.; Olsen, G. J. (2008): Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes. In: *Applied and Environmental Microbiology* 74 (8), S. 2461-2470. DOI: 10.1128/AEM.02272-07.
- Frenzel, M., James, P., Burton, S. K., Rowland, S. J., & Lappin-Scott, H. M. (2009). Towards bioremediation of toxic unresolved complex mixtures of hydrocarbons: identification of bacteria capable of rapid degradation of alkyltetralins. *Journal of Soils and Sediments*, 9(2), 129-136.
- Fritsche, W., & Hofrichter, M. (2008). Aerobic degradation by microorganisms. *Biotechnology Set, Second Edition*, 144-167.
- Fuentes, S., Méndez, V., Aguila, P., & Seeger, M. (2014). Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(11), 4781-4794.
- Gagliano, A. L., Tagliavia, M., D'alessandro, W., Franzetti, A., Parello, F., & Quatrini, P. (2016). So close, so different: geothermal flux shapes divergent soil microbial communities at neighboring sites. *Geobiology*, 14(2), 150-162.
- Gao, P., Tian, H., Li, G., Sun, H., & Ma, T. (2015). Microbial diversity and abundance in the Xinjiang Luliang long-term water-flooding petroleum reservoir. *MicrobiologyOpen*, 4(2), 332-342.
- Genovese, M., Crisafi, F., Denaro, R., Cappello, S., Russo, D., Calogero, R., ... & Genovese, L. (2014). Effective bioremediation strategy for rapid in situ cleanup of anoxic marine sediments in mesocosm oil spill simulation. *Frontiers in microbiology*, 5.
- Gieg, L. M., Fowler, S. J., & Berdugo-Clavijo, C. (2014). Syntrophic biodegradation of hydrocarbon contaminants. *Current opinion in biotechnology*, 27, 21-29.
- Grabowski, A., Nercessian, O., Fayolle, F., Blanchet, D., & Jeanthon, C. (2005). Microbial diversity in production waters of a low-temperature biodegraded oil reservoir. *FEMS Microbiology Ecology*, 54(3), 427-443.
- Grant, C., Deszcz, D., Wei, Y. C., Martínez-Torres, R. J., Morris, P., Folliard, T., ... & Baganz, F. (2014). Identification and use of an alkane transporter plug-in for applications in biocatalysis and whole-cell biosensing of alkanes. *Scientific reports*, 4.
- Guibert, L. M., Loviso, C. L., Marcos, M. S., Commendatore, M. G., Dionisi, H. M., & Lozada, M. (2012). Alkane biodegradation genes from chronically polluted subantarctic coastal sediments and their shifts in response to oil exposure. *Microbial ecology*, 64(3), 605-616.
- Gutierrez, T., Singleton, D. R., Berry, D., Yang, T., Aitken, M. D., & Teske, A. (2013). Hydrocarbon-degrading bacteria enriched by the Deepwater Horizon oil spill identified by cultivation and DNA-SIP. *The ISME journal*, 7(11), 2091-2104.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST-palaeontological statistics, ver. 1.89. *Palaeontologia electronica*, 4(9).
- Hara, A., Syutsubo, K., & Harayama, S. (2003). *Alcanivorax* which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation. *Environmental Microbiology*, 5(9), 746-753.
- Hassanshahian, M., Emtiazi, G., (2008). Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 62:170-178.
- Hassanshahian, M., Emtiazi, G., Cappello, S., (2012). Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 64:7-12
- Hazen, T. C., Prince, R. C., & Mahmoudi, N. (2016). Marine oil biodegradation.
- Head, I. M., Jones, D. M., & Röling, W. F. (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3).
- Hendrickx, B., Junca, H., Vosahlova, J., Lindner, A., Rüegg, I., Bucheli-Witschel, M., ... & Brennerova, M. (2006). Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. *Journal of Microbiological Methods*, 64(2), 250-265.
- Hou, J., Dong, G., Ye, Y., & Chen, V. (2014). Laccase immobilization on titania nanoparticles and titania-functionalized membranes. *Journal of Membrane Science*, 452, 229-240.
- Hubert, C. R., Oldenburg, T. B., Fustic, M., Gray, N. D., Larter, S. R., Penn, K., ... & Voordouw, G. (2012). Massive dominance of Epsilonproteobacteria in formation waters from a Canadian oil sands reservoir containing severely biodegraded oil. *Environmental microbiology*, 14(2), 387-404.

- Hudson, S., Magner, E., Cooney, J., & Hodnett, B. K. (2005). Methodology for the immobilization of enzymes onto mesoporous materials. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(41), 19496-19506.
- ISPRA (Istituto Superiore per la protezione e la Ricerca Ambientale) 2010. Elaborazione e Valutazione Dei Risultati Della Caratterizzazione Ai Fini Della Individuazione Degli Opportuni Interventi Di Messa In Sicurezza E Bonifica Del Litorale Di Priolo Dalla Diga Foranea Della Rada Di Augusta Al Porto Grande Di Siracusa.
- Ji, Y., Mao, G., Wang, Y., & Bartlam, M. (2013). Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. *Frontiers in microbiology*, 4.
- Jin, H. M., Kim, J. M., Lee, H. J., Madsen, E. L., & Jeon, C. O. (2012). *Alteromonas* as a key agent of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in crude oil-contaminated coastal sediment. *Environmental science & technology*, 46(14), 7731-7740.
- Joshi, M. N., Dhebar, S. V., Dhebar, S. V., Bhargava, P., Pandit, A., Patel, R. P., ... & Bagatharia, S. B. (2014). Metagenomics of petroleum muck: revealing microbial diversity and depicting microbial syntrophy. *Archives of microbiology*, 196(8), 531-544.
- Kanoh, K., Adachi, K., Katsuta, A., & Shizuri, Y. (2008). Structural Determination and Proposed Biosynthesis of Alcanivorone, a Novel  $\alpha$ -Pyrone Produced by *Alcanivorax jadensis*. *The Journal of antibiotics*, 61(2), 70-74.
- Kariminiaae-Hamedani, H. R., Kanda, K., & Kato, F. (2003). Wastewater treatment with bacteria immobilized onto a ceramic carrier in an aerated system. *Journal of bioscience and bioengineering*, 95(2), 128-132.
- Kasai, Y.; Kishira, H.; Harayama, S. Bacteria belonging to the genus *Cycloclasticus* play a primary role in the degradation of aromatic hydrocarbons released in a marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68 (11), 5625-5633
- Kleinsteuber, S., Riis, V., Fetzner, I., Harms, H., & Müller, S. (2006). Population dynamics within a microbial consortium during growth on diesel fuel in saline environments. *Applied and environmental microbiology*, 72(5), 3531-3542.
- Kloos, K., Munch, J. C., & Schloter, M. (2006). A new method for the detection of alkane-monoxygenase homologous genes (alkB) in soils based on PCR-hybridization. *Journal of Microbiological Methods*, 66(3), 486-496.
- Korlević, M., Zucko, J., Dragić, M. N., Blažina, M., Pustijanac, E., Zeljko, T. V., ... & Long, P. F. (2015). Bacterial diversity of polluted surface sediments in the northern Adriatic Sea. *Systematic and applied microbiology*, 38(3), 189-197.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. M., Marchant, R., & Koutinas, A. A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, 21(4), 377-397.
- Kuykendall, L. D., Roy, M. A., O'Neill, J. J., & Devine, T. E. (1988). Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(4), 358-361.
- Langworthy, D. E., Stapleton, R. D., Sayler, G. S., & Findlay, R. H. (2002). Lipid analysis of the response of a sedimentary microbial community to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Microbial ecology*, 43(2), 189-198.
- Lee, C. A., & Tsai, Y. C. (2009). Preparation of multiwalled carbon nanotube-chitosan-alcohol dehydrogenase nanobiocomposite for amperometric detection of ethanol. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 138(2), 518-523.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (62).
- Lo Piccolo, L.; Pasquale, C. de; Fodale, R.; Puglia, A. M.; Quatrini, P. (2011): Involvement of an Alkane Hydroxylase System of *Gordonia* sp. Strain SoCg in Degradation of Solid n-Alkanes. In: *Applied and Environmental Microbiology* 77 (4), S. 1204-1213. DOI: 10.1128/AEM.02180-10.
- Martins, S. C. S., Martins, C. M., Fiúza, L. M. C. G., & Santaella, S. T. (2013). Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. *African journal of biotechnology*, 12(28).
- McGenity, T. J. (2014). Hydrocarbon biodegradation in intertidal wetland sediments. *Current opinion in biotechnology*, 27, 46-54.
- McGenity, T. J. (2014). Hydrocarbon biodegradation in intertidal wetland sediments. *Current opinion in biotechnology*, 27, 46-54.
- McGenity, T. J., Folwell, B. D., McKew, B. A., & Sanni, G. O. (2012). Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquatic biosystems*, 8(1), 10.
- McKew, B. A., Coulon, F., Yakimov, M. M., Denaro, R., Genovese, M., Smith, C. J., ... & McGenity, T. J. (2007). Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. *Environmental microbiology*, 9(6), 1562-1571.
- Meckenstock, R. U., Boll, M., Mouttaki, H., Koelschbach, J. S., Tarouco, P. C., Weyrauch, P., ... & Himmelberg, A. M. (2016). Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 26(1-3), 92-118.
- Meintanis, C., Chalkou, K. I., Kormas, K. A., & Karagouni, A. D. (2006). Biodegradation of crude oil by thermophilic bacteria isolated from a volcano island. *Biodegradation*, 17(2), 3-9.
- Mikkonen, A., Santalahti, M., Lappi, K., Pulkkinen, A.-M., Montonen, L. and Suominen, L. (2014), Bacterial and archaeal communities in long-term contaminated surface and subsurface soil evaluated through co-extracted RNA and DNA. *FEMS Microbiol Ecol*, 90: 103-114. doi:10.1111/1574-6941.12376.
- Mudryk, Z. J., & Podgórska, B. (2006). Scanning electron microscopy investigation of bacterial colonization of marine beach sand grains. *Baltic Coastal Zone. Journal of Ecology and Protection of the Coastline*, 10.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 59(3), 695-700.
- Ndlovu, T. M., Ward, A. C., Glassey, J., Eskildsen, J., & Akay, G. (2015). Bioprocess intensification of antibiotic production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2) in micro-porous culture. *Materials Science and Engineering: C*, 49, 799-806.
- Newton, R. J., Huse, S. M., Morrison, H. G., Peake, C. S., Sogin, M. L., & McLellan, S. L. (2013). Shifts in the microbial community composition of Gulf Coast beaches following beach oiling. *PLoS One*, 8(9), e74265.
- Paisse, S., Duran, R., Coulon, F., & Goñi-Urriza, M. (2011). Are alkane hydroxylase genes (alkB) relevant to assess petroleum bioremediation processes in chronically polluted coastal sediments?. *Applied microbiology and biotechnology*, 92(4), 835-844.
- Paliwal, R., Uniyal, S., & Rai, J. P. N. (2015). Evaluating the potential of immobilized bacterial consortium for black liquor biodegradation. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(9), 6842-6853.

- Piubeli, F., Grossman, M. J., Fantinatti-Garboggini, F., & Durrant, L. R. (2014). Phylogenetic analysis of the microbial community in hypersaline petroleum produced water from the Campos Basin. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(20), 12006-12016.
- Postec, A., Quéménéur, M., Méline Bes, N. M., Benaïssa, F., Payri, C., Pelletier, B., ... & Pisapia, C. (2015). Microbial diversity in a submarine carbonate edifice from the serpentinizing hydrothermal system of the Prony Bay (New Caledonia) over a 6-year period. *Frontiers in microbiology*, 6.
- Quatrini, P., Scaglione, G., De Pasquale, C., Riela, S. E. R. E. N. A., & Puglia, A. M. (2008). Isolation of Gram- positive n- alkane degraders from a hydrocarbon- contaminated Mediterranean shoreline. *Journal of applied microbiology*, 104(1), 251-259.
- Riser-Roberts, E. (1998). *Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical processes*. CRC press.
- Rivelli, V., Franzetti, A., Gandolfi, I., Cordoni, S., & Bestetti, G. (2013). Persistence and degrading activity of free and immobilised allochthonous bacteria during bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils. *Biodegradation*, 24(1), 1-11.
- Rocchetti, L., Beolchini, F., Hallberg, K. B., Johnson, D. B., & Dell'Anno, A. (2012). Effects of prokaryotic diversity changes on hydrocarbon degradation rates and metal partitioning during bioremediation of contaminated anoxic marine sediments. *Marine pollution bulletin*, 64(8), 1688-1698.
- Royo, F. (2009). Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental microbiology*, 11(10), 2477-2490.
- Romano, E., Bergamin, L., Magno, M. C., & Ausili, A. (2013). Sediment characterization of the highly impacted Augusta harbour (Sicily, Italy): modern benthic foraminifera in relation to grain-size and sediment geochemistry. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 15(5), 930-946.
- Sabirova, J. S., Becker, A., Lünsdorf, H., Nicaud, J. M., Timmis, K. N., & Golyshin, P. N. (2011). Transcriptional profiling of the marine oil-degrading bacterium *Alcanivorax borkumensis* during growth on n-alkanes. *FEMS microbiology letters*, 319(2), 160-168.
- Sarin, S. (2011). Isolation of biosurfactant-producing bacteria with antimicrobial activity against bacterial pathogens. *EnvironmentAsia*, 4(1), 1-5.
- Satomi, M., & Fujii, T. (2014). The Family Oceanospirillaceae. In *The prokaryotes* (pp. 491-527). Springer Berlin Heidelberg.
- Scaffaro, R., Lopresti, F., Botta, L., Rigogliuso, S., & Ghersi, G. (2016a). Integration of PCL and PLA in a monolithic porous scaffold for interface tissue engineering. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 63, 303-313.
- Scaffaro, R., Lopresti, F., Sutura, A., Botta, L., Fontana, R. M., Puglia, A. M., & Gallo, G. (2016b). Effect of PCL/PEG-Based Membranes on Actinorhodin Production in *Streptomyces coelicolor* Cultivations. *Macromolecular bioscience*, 16(5), 686-693
- Scaffaro, R., Lopresti, F., Catania, V., Santisi, S., Cappello, S., Botta, L., & Quatrini, P. (2017). Polycaprolactone-based scaffold for oil-selective sorption and improvement of bacteria activity for bioremediation of polluted water: Porous PCL system obtained by leaching melt mixed PCL/PEG/NaCl composites: Oil uptake performance and bioremediation efficiency. *European Polymer Journal*, 91, 260-273.
- Scarlett A., T.S. Galloway, S.J. Rowland, (2007) Chronic toxicity of unresolved complex mixtures (UCM) of hydrocarbons in marine sediments. *J. Soils Sediments* 7 (4), 200-206
- Schneider, S., dos Santos, V. A. M., Bartels, D., Bekel, T., Brecht, M., Buhrmester, J., ... & Goesmann, A. (2006). Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Nature biotechnology*, 24(8), 997-1004.
- Schouw, A., Eide, T. L., Stokke, R., Pedersen, R. B., Steen, I. H., & Bødtker, G. (2016). *Abyssivirga alkaniphila* gen. nov., sp. nov., an alkane-degrading, anaerobic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent system, and emended descriptions of *Natranaerovirga pectinovora* and *Natranaerovirga hydrolytica*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(4), 1724-1734.
- Scoma, A., Yakimov, M. M., Daffonchio, D., & Boon, N. (2017). Self- healing capacity of deep- sea ecosystems affected by petroleum hydrocarbons. *EMBO reports*, 18(6), 868-872.
- Sieber J.R., McInerney M.J., Gunsalus R.P. (2012). Genomic insights into syntrophy: the paradigm for anaerobic metabolic cooperation. *Ann Rev Microbiol*; 66: 429-452
- Son, J. S., Kim, S. G., Oh, J. S., Appleford, M., Oh, S., Ong, J. L., & Lee, K. B. (2011). Hydroxyapatite/polylactide biphasic combination scaffold loaded with dexamethasone for bone regeneration. *Journal of biomedical materials research Part A*, 99(4), 638-647.
- Souza, E.C., Vessoni-Penna, T.C., Oliveira, R.P.D.S., 2014. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: an overview. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 89, 88– 94.
- Stauffer, M., Duran, R., Gassie, C., & Cravo-Laureau, C. (2014). Response of archaeal communities to oil spill in bioturbated mudflat sediments. *Microbial ecology*, 67(1), 108-119.
- Su X, Ding L, Shen C. (2013). Potential of viable but non-culturable bacteria in polychlorinated biphenyls degradation: a review; 53(9): 908-14.
- Tani A., Ishige T., Sakai Y. and Kato N. (2001). Gene structures and regulation of the alkane hydroxylase complex in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *J Bacteriol*; 183: 1819–1823.
- Teramoto, M., Ohuchi, M., Hatmanti, A., Darmayati, Y., Widyastuti, Y., Harayama, S., & Fukunaga, Y. (2011). *Oleibacter marinus* gen. nov., sp. nov., a bacterium that degrades petroleum aliphatic hydrocarbons in a tropical marine environment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(2), 375-380.
- Teramoto, M.; Suzuki, M.; Okazaki, F.; Hatmanti, A.; Harayama, S. (2009): Oceanobacter-related bacteria are important for the degradation of petroleum aliphatic hydrocarbons in the tropical marine environment. In: *Microbiology* 155 (10), S. 3362–3370. DOI: 10.1099/mic.0.030411-0.
- Teramoto, Maki; Queck, Shu Yeong; Ohnishi, Kouhei; Trujillo, Martha (2013): Specialized Hydrocarbonoclastic Bacteria Prevailing in Seawater around a Port in the Strait of Malacca. In: *PLoS ONE* 8 (6), S. e66594. DOI: 10.1371/journal.pone.0066594.
- Van Beilen, J. B.; Li, Z.; Duetz, W. A.; Smits, T. H.M.; Witholt, B. (2003): Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment. In: *Oil & Gas Science and Technology - Rev. IFP* 58 (4), S. 427–440. DOI: 10.2516/ogst:2003026.
- van Beilen, J. B., Funhoff, E. G., van Loon, A., Just, A., Kaysser, L., Bouza, M., ... & Witholt, B. (2006). Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases. *Applied and environmental microbiology*, 72(1), 59-65.
- Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277-286.

- Varjani, S.J., Srivastava, V.K., 2015. Green technology and sustainable development of environment. *Renewable Res. J.* 3 (1), 244–249.
- Varjani, S.J., Upasani, V.N., 2012. Characterization of hydrocarbon utilizing *Pseudomonas* strains from crude oil contaminated samples. *Int. J. Sci. Comput.* 6 (2), 120–127.
- Varjani, S.J., Upasani, V.N., 2013. Comparative studies on bacterial consortia for hydrocarbon degradation. *Int. J. Innovative Res. Sci. Eng. Technol.* 2 (10), 5377–5383.
- Walker, C.H., 2006. *Principles of Ecotoxicology*. CRC, Taylor and Francis, Boca Raton, U.S.A..
- Wang, L. Y., Ke, W. J., Sun, X. B., Liu, J. F., Gu, J. D., & Mu, B. Z. (2014). Comparison of bacterial community in aqueous and oil phases of water-flooded petroleum reservoirs using pyrosequencing and clone library approaches. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(9), 4209-4221.
- Wang, Y. F., & Tam, N. F. Y. (2012). Natural attenuation of contaminated marine sediments from an old floating dock part II: changes of sediment microbial community structure and its relationship with environmental variables. *Science of the Total Environment*, 423, 95-103.
- Wasmund, K., Burns, K. A., Kurtböke, D. I., & Bourne, D. G. (2009). Novel alkane hydroxylase gene (alkB) diversity in sediments associated with hydrocarbon seeps in the Timor Sea, Australia. *Applied and environmental microbiology*, 75(23), 7391-7398.
- Widdel, F., Rabus, R., 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 259–276.
- Wilkes, H., Buckel, W., Golding, B.T., Rabus, R., 2016. Metabolism of hydrocarbons in n-Alkane utilizing anaerobic bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 26, 138–151.
- Williams, P. A., & Murray, K. (1974). Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. *Journal of Bacteriology*, 120(1), 416-423.
- Woese, C. R., Gutell, R., Gupta, R. A. M. E. S. H., & Noller, H. F. (1983). Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiological reviews*, 47(4), 621.
- Wojcieszynska, D., Hupert-Kocurek, K., & Guzik, U. (2013). Factors affecting activity of catechol 2, 3-dioxygenase from 2-chlorophenol-degrading *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2. *Biocatalysis and Biotransformation*, 31(3), 141-147.
- Wojcieszynska, D., Hupert-Kocurek, K., Jankowska, A., & Guzik, U. (2012). Properties of catechol 2, 3-dioxygenase from crude extract of *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 immobilized in calcium alginate hydrogels. *Biochemical engineering journal*, 66, 1-7.
- Xue, J., Yu, Y., Bai, Y., Wang, L., & Wu, Y. (2015). Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: a review. *Current microbiology*, 71(2), 220-228
- Yakimov, M. M., Cappello, S., Crisafi, E., Tursi, A., Savini, A., Corselli, C., ... & Giuliano, L. (2006). Phylogenetic survey of metabolically active microbial communities associated with the deep-sea coral *Lophelia pertusa* from the Apulian plateau, Central Mediterranean Sea. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 53(1), 62-75.
- Yakimov, M. M., Denaro, R., Genovese, M., Cappello, S., D'Auria, G., Chernikova, T. N., ... & Giuliano, L. (2005). Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons. *Environmental microbiology*, 7(9), 1426-1441.
- Yakimov, M. M., Giuliano, L., Denaro, R., Crisafi, E., Chernikova, T. N., Abraham, W. R., ... & Golyshin, P. N. (2004). *Thalassolituus oleivorans* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(1), 141-148.
- Yakimov, M. M., Golyshin, P. N., Lang, S., Moore, E. R., Abraham, W. R., Lünsdorf, H., & Timmis, K. N. (1998). *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(2), 339-348.
- Yakimov, M. M., Timmis, K. N., & Golyshin, P. N. (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current opinion in biotechnology*, 18(3), 257-266
- Zhang, Z., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Tao, F., Xu, P., 2011. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresour. Technol.* 102 (5), 4111–4116.

### Publicazioni dei risultati della tesi di Dottorato

1. Scaffaro, R., **Catania, V.**, Lopresti, F., Cappello, S., Botta, L., Quatrini, P. Innovative ready to use biodegradable carrier-bacteria devices for bioremediation of oil contaminated water. Manoscritto in preparazione
2. Scaffaro, R., Lopresti, F., **Catania, V.**, Santisi, S., Cappello, S., Botta, L., Quatrini, P. (2017) Polycaprolactone-based scaffold for oil-selective sorption and improvement of bacterial activity for bioremediation of polluted water. **European Polymer Journal**, 91, 260-273.
3. **Catania, V.**, Cappello, S., Di Giorgi, V., Santisi, S., Di Maria, R., Mazzola, A., Vizzini, S., Quatrini, P. (2017) Microbial communities of polluted sub-surface marine. **Mar Pollut Bull.** In revisione.
4. **Catania, V.**, Santisi, S., Signa, G., Vizzini, S., Mazzola, A., Cappello, S., Yakimov M.M., Paola Quatrini (2015). Intrinsic bioremediation potential of a chronically polluted marine coastal area. **Marine pollution bulletin**, 99(1), 138-149.

### Altre pubblicazioni in collaborazione

5. La Marca, E C., **Catania, V.**, Quatrini, P., Milazzo, M., & Chemello, R., (2017) Settlement performance of the Mediterranean reef-builders *Dendropoma cristatum* (Biondi 1859) in response to natural bacterial films. **Marine Environmental Research** in revisione
6. **Catania, V.**, Sarà, G., Settanni, L., & Quatrini, P. (2016). Bacterial communities in sediment of a Mediterranean marine protected area. **Canadian Journal of Microbiology**, 63(4), 303-311.
7. Salamone, M., Nicosia, A., Bennici, C., Quatrini, P., **Catania, V.**, Mazzola, S., Ghersi, G., & Angela Cuttitta (2015). Comprehensive analysis of a *Vibrio parahaemolyticus* strain extracellular serine protease VpSP37. **PloS one**, 10(7), e0126349.
8. Arbi, S. B., Chekireb, D., Quatrini, P., **Catania, V.**, Cheriet, D., & Ouarsi, A. (2015). Phenotypic and genotypic characterization of root nodules rhizobia of *Medicago littoralis* Rhode and *Melilotus indicus* (L.) All. growing in the Oasis of Touggourt, Oued Righ Valley, in the Algerian Sahara. **Symbiosis**, 66(2), 75-87.

### Comunicazioni a convegni internazionali

1. Lopresti, F., **Catania, V.**, Botta, L., Quatrini, P., & Scaffaro, R., "Biopolymeric porous structure for selective oil sorption and activity intensification of oil-degrading bacteria". MoDeSt Workshop Nanomaterials and Biomaterials for the Next Decade, Pantelleria (TP), Italy, 5 – 7 July 2017. Oral Communication.
2. Djahnit, N., Chernai-hamdi, S., Hamdi, B., China, B., **Catania, V.**, Cappello, S., & Quatrini, P., Isolation and characterization of hydrocarbonoclastic bacteria from Algerian coast. FEMS (Federation of European Microbiological Society) VII Congress of European Microbiologists, Valenzia (ES), July 9-13, 2017, Abstract: 633
3. La Marca, E. C., Milazzo, M., Quatrini, P., **Catania, V.**, Lopresti, F., Scaffaro, R., & Chemello, R., Implication of the biofilm ageing for the settlement of the vermetid gastropod *Dendropoma cristatum* (Biondi 1857). 11th International Temperate Reefs Symposium University of Pisa, June 26-30, 2016 (pp.205-205)
4. Quatrini, P.; Cappello, S.; **Catania, V.**; Santisi, S.; & Yakimov, M. Isolation, identification and metabolic characterization of hydrocarbonoclastic bacteria from a polluted harbour in Sicily (Italy). MedRem 2014 Microbial resource management for polluted marine environments and bioremediation. Hammameth, Tunisia, 16-18 Gennaio 2014 (pp.34-34)

### Comunicazioni a convegni nazionali

1. La Marca, E.C., **Catania, V.**, Tagliavia, M., Sardina, M.T., Di Gerlando, R., Milazzo, M., Chemello, R., & Quatrini, P., Biological diversity of the microbial film associated with the central- Mediterranean *Dendropoma cristatum* (Biondi, 1859) reefs . XXXII SIMGBM Congress (Società Italiana di Microbiologia Generale e Biotecnologie Microbiche), Palermo, September 17-20, 2017 (P 35-35)
2. **Catania, V.**, Lopresti, F., Cappello, S., Scaffaro, R., & Quatrini, P. Blue biotechnology: oil bioremediation using hydrocarbon-degrading bacteria immobilized on biodegradable membranes. XXXII SIMGBM Congress (Società di Microbiologia Generale e Biotecnologie Microbiche), Palermo, September 17-20, 2017 (P 58-58)
3. Quatrini, P., Tagliavia, M., Gagliano, A.L., Tolone, M., **Catania, V.**, D'Alessandro, W. Microbial communities and novel taxa in « Continental Smokers » of northern Greece. XXXII SIMGBM Congress

- (Società Italiana di Microbiologia Generale e Biotecnologie Microbiche), Palermo, September 17-20, 2017 (P 72-72)
4. Serena, S., Badalamenti, E., **Catania, V.**, La Mantia, T., & Quatrini, P. The occurrence of mycorrhizal fungi in *Betula aetnensis* Raf. roots: from ecological role to conservation strategies. XXXII SIMGBM Congress (Società Italiana di Microbiologia Generale e Biotecnologie Microbiche), Palermo, September 17-20, 2017 (P 75-75)
  5. **Catania, V.**, Lopresti, F., Santisi, S., Cappello, S., Scaffaro, R., & Quatrini. Blue biotechnology: enhancement of bioremediation using bacterial biofilms on biodegradable scaffolds. 4° meeting BIOTECNOLOGIE RICERCA DI BASE INTERDISCIPLINARE TRASLAZIONALE IN AMBITO BIOMEDICO Palermo 15-16 Dicembre 2016 (pp.2-2) Comunicazione orale
  6. **Catania, V.**, Quatrini, P., LoPresti, F., Santisi, S., Cappello, S., & Scaffaro, R., A new scaffold-bacteria-based system for bioremediation of oil contaminated water. 31° Meeting of SIMGBM (Società Italiana di Microbiologia Generale e Biotecnologie Microbiche) Ravenna, Italy 23-26 Settembre 2015 (pp.47-47)
  7. Dello Ioio, L., **Catania, V.**, Santisi, S., Laudicina, A., Bolnar, C., Cappello, S., & Quatrini, P., First isolation of the marine tropical HC degrader *Oleibacter* sp. in the Mediterranean Sea. 31° Meeting of SIMGBM (Società Italiana di Microbiologia Generale e Biotecnologie Microbiche) Ravenna, Italy 23-26 Settembre 2015 (pp.48-48)
  8. Di Maria, R., **Catania, V.**, Ales, F., Santisi, S., Cappello, S., & Quatrini, P., The microbial community of sub-surface sediment of a chronically contaminated SIC. 31° Meeting of SIMGBM (Società Italiana di Microbiologia Generale e Biotecnologie Microbiche) Ravenna, Italy 23-26 Settembre 2015 (pp.48-48)
  9. Gentile, G., Maimone, G., La Ferla, R., Azzaro, M., Fiumara, E., Santisi, S., Quatrini, P., **Catania, V.**, Giuliano, L., Genovese, L., Yakimov, M.M., & Cappello, S., Change in volume and morphology in cultures of *oleispira antarctica* as a function of temperature and substrates used. 31° Meeting of SIMGBM (Società Italiana di Microbiologia Generale e Biotecnologie Microbiche) Ravenna, Italy 23-26 Settembre 2015 (pp.48-49)
  10. Volta, A., Santisi, S., Morici, C., Torregrossa, M., Mancini, G., Quatrini, P., **Catania, V.**, Yakimov, M.M., & Cappello, S., Oil-degrading bacteria from a membrane bioreactor (MBR) system for treatment of saline oily waste: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. 31° Meeting of SIMGBM (Società Italiana di Microbiologia Generale e Biotecnologie Microbiche) Ravenna, Italy 23-26 Settembre 2015 (pp.55-55)
  11. Santisi S.; **Catania V.**; Quatrini P.; Genovese L.; Cappello S.; Yakimov M.M. Hydrocarbon degrading bacteria vs microbial consortia in the degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. L'ecologia oggi: responsabilità e governance, Ferrara 15-17 Settembre 2014 (pp.80-80).





## Intrinsic bioremediation potential of a chronically polluted marine coastal area



Valentina Catania<sup>a,1</sup>, Santina Santisi<sup>b,c,1</sup>, Geraldina Signa<sup>d</sup>, Salvatrice Vizzini<sup>d</sup>, Antonio Mazzola<sup>d</sup>, Simone Cappello<sup>b</sup>, Michail M. Yakimov<sup>b</sup>, Paola Quatrini<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Dept. of Biological, Chemical and Pharmaceutical Sciences and Technologies (STEBICEF), University of Palermo, Viale delle Scienze, blg. 16, 90128 Palermo, Italy

<sup>b</sup> Institute for Coastal Marine Environment (IAMC) – CNR of Messina, Spianata San Raineri, 86, 98121 Messina, Italy

<sup>c</sup> PhD School of “Cellular Biology and Biotechnology” University of Messina, Messina, Italy

<sup>d</sup> Dept. of Earth and Marine Sciences (DISTEM), University of Palermo, CoNISMa, Via Archirafi 22, 90123 Palermo, Italy

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 June 2015

Accepted 18 July 2015

Available online 4 August 2015

#### Keywords:

Sediment bacteria

Hydrocarbonoclastic bacteria

DGGE

PLFA

*Oleibacter*

### ABSTRACT

A microbiological survey of the Priolo Bay (eastern coast of Sicily, Ionian Sea), a chronically polluted marine coastal area, was carried out in order to discern its intrinsic bioremediation potential. Microbiological analysis, 16S rDNA-based DGGE fingerprinting and PLFAs analysis were performed on seawater and sediment samples from six stations on two transects. Higher diversity and variability among stations was detected by DGGE in sediment than in water samples although seawater revealed higher diversity of culturable hydrocarbon-degrading bacteria. The most polluted sediment hosted higher total bacterial diversity and higher abundance and diversity of culturable HC degraders. Alkane- and PAH-degrading bacteria were isolated from all stations and assigned to *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Thalassospira*, *Alteromonas* and *Oleibacter* (first isolation from the Mediterranean area). High total microbial diversity associated to a large selection of HC degraders is believed to contribute to natural attenuation of the area, provided that new contaminant contributions are avoided.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Petroleum hydrocarbons are among the most widespread environmental pollutants (Hassanshahian et al., 2012). Oil pollution may arise either accidentally or operationally; indeed, pollutants may enter into marine ecosystems following catastrophic accidents (shipping disasters or pipeline failures), chronic pollution (ships, ports, oil terminals, freshwater runoff, rivers and sewage systems), natural oil seepages and natural sources (biota) (Floodgate, 1972).

In many aquatic systems, sediment generally act as a sink of pollutants, which may afterwards move back up through the water column causing serious consequences. Indeed, compared to upper layers of the water column, the bottom ones are characterized by a higher concentration of pollutants because of the re-suspension of sediment and of associated pollutants (McGenity et al., 2012).

The presence of pollutants in marine sediment may produce adverse effects on marine ecosystems and human health. Benthic

organisms can gather toxic substances in their body, affecting and poisoning predators at the highest level of the food chain (Moreno et al., 2013). As hydrocarbon components belong to the family of carcinogens and neurotoxic organic pollutants, harmful effects are expected on humans exposed to such contaminants (Jarvis et al., 2014).

Increased awareness of the importance of microbial communities in marine environmental processes, together with their ability to respond to environmental contamination, has intensified the attention on the relation between microbial community structure and contaminant concentration. Among the contaminants most commonly introduced into the marine environment, hydrocarbons can exert a selective pressure on microbial communities (e.g. Langworthy et al., 2002; Wang and Tam, 2012). Bacterial communities have therefore great potential to be used as sensitive indicators of contamination in marine sediment (Sun et al., 2012). On the other hand, microorganisms (bacteria and fungi) are the main degraders of organic pollutants in marine environments. Many marine bacteria endowed with biodegradative abilities have been described (Yakimov et al., 2007) and their role in the bioremediation of contaminated sites has been addressed (Ron and

\* Corresponding author.

E-mail address: [paola.quatrini@unipa.it](mailto:paola.quatrini@unipa.it) (P. Quatrini).

<sup>1</sup> The first two authors, VC and SS, contributed equally to the work.

Rosenberg, 2014). Techniques of bioremediation and utilization of oil degrading bacteria and hydrocarbon-degrading microbial consortia have a key role in these processes (Beolchini et al., 2010; Rocchetti et al., 2011). In general, bioremediation is based on in situ stimulation of the microbial community (biostimulation) or amending the microbial community with an inoculum of hydrocarbon-degrading bacteria (bioaugmentation).

Biological treatments using marine bacteria are becoming more important, mainly because of the low environmental impact, cheaper costs than other clean-up technologies, the capability to degrade organic contaminants and the possibility of beneficial use of treated sediment (Rulkens and Bruning, 2005).

Polluted sediment can be sanitized via in situ actions, which always require an accurate knowledge of the local biocenosis (Doni et al., 2013). In particular, marine obligate hydrocarbonoclastic bacteria exhibit peculiar properties on hydrocarbon degradation (Yakimov et al., 2007) and, when nutrients (as nitrogen and phosphorous) are available at not limiting concentrations, an increase of their growth rate is registered with the decrease of pollutants (Röling et al., 2004; Cappello et al., 2007a, 2007b; Yakimov et al., 2006, 2007). The complexity of contaminant transformation processes in the natural environment is due to the influence of the nature and amount of hydrocarbons, the structure and dynamics of the indigenous microbial community and the interplay of geochemical and biological factors at contaminated sites (Atlas, 1981; Leahy and Colwell, 1990; Gibson and Saylor, 1992).

A better understanding of the processes inherent to natural bioremediation requires enhancement of microbial ecology awareness. The first challenge is to overcome the complicated attribution of in situ microbe-mediated processes to the responsible organism(s), improving the knowledge on dynamics and functional activity together with identification of ecologically significant strains and genes in response to environmental stressors.

Characterization of microbial communities can provide important information to understand the extent of contamination in the sedimentary compartment and in the water column, and also to assess and predict the catabolic potential of environmental sites. DNA-based molecular analysis, such as 16S rDNA-based DGGE fingerprinting (Nocker et al., 2007), and biochemical analysis of phospholipid fatty acids (PLFA), that are essential component of viable bacterial cell membranes (Findlay et al., 1990; Kaur et al., 2005), are considered as robust tools to depict the bacterial communities in relation to environmental stressors.

The Augusta Bay, on the eastern coast of Sicily (Ionian Sea) is identified as an area with heavy industrialization (petrochemical and wastewater treatment plants) and high contamination due also to the presence of the Augusta Harbour in the northern part of the bay. Navigation and dredging of polluted sediment, in addition to direct discharge of contaminants from the industries occurred during the last century, have been identified as the main cause of the environmental contamination in the harbour and nearby (Bellucci et al., 2012). Indeed, severe inorganic and organic pollution has been detected both in and outside the harbour, as effect of dumping of dredged sediment in the surrounding area (ISPRA-APAT, 2007; ISPRA, 2010; Sprovieri et al., 2012; Di Leonardo et al., 2014) with important risks on ecosystem and human health (Ausili et al., 2008; Bonsignore et al., 2013; Genovese et al., 2014).

The goals of the present study are: (i) to characterize the organic contamination of surface sediment of the southern part of Augusta Bay, Priolo Bay (Sicily, Italy); (ii) to perform a molecular and biochemical analysis of the indigenous microbial communities associated with this area and (iii) to isolate oil degrading bacteria and hydrocarbonoclastic bacteria to discern the intrinsic bioremediation potential of the area.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample collection

Seawater and sediment samples were collected in Priolo Bay (South-East Sicily, Italy, Mediterranean Sea) in July 2012 (Fig. 1). Surface sediment (0–5 cm, Fig. S1) samples with the upper seawater layer were collected in triplicate using sterile Plexiglas cores (20 cm long, 5 cm diameter), from three stations located along a northern transect (N1, N2 and N3) and three stations located along a southern transect (S4, S5 and S6) (Fig. 1).

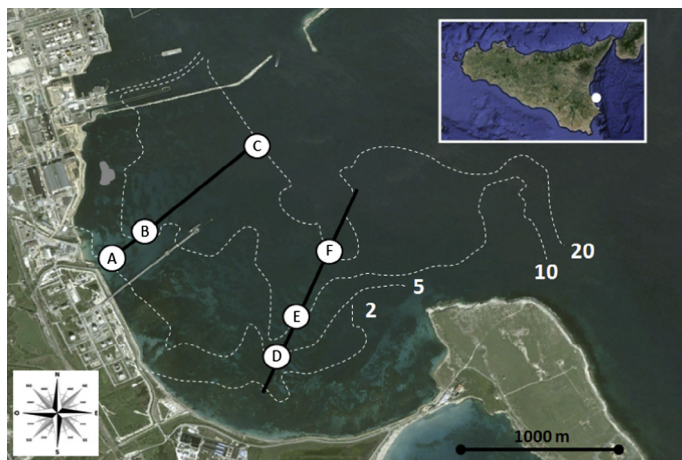
After collection, samples were immediately transported to the laboratory in a cool box ( $4 \pm 1$  °C), where samples were used for immediate analysis or aliquots were stored at  $-80 \pm 5$  °C and at  $-20 \pm 1$  °C with glycerol (20% final concentration). Unfortunately, part of the water component of core samples of station S4 was lost during sampling and could only be analyzed for PLFAs, and isolation of HC degraders. The physico-chemical characteristics of the sediment are described elsewhere (Di Leonardo et al., 2014).

### 2.2. Analysis of hydrocarbons

Total hydrocarbons were extracted from sediment following the 3550C EPA (Environmental Protection Agency) procedure (Rocchetti et al., 2012). Briefly, a mixture of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{COCH}_3$  (1:1, v/v) was added to sediment samples. The mixture was sonicated for 2 min in ultrasound bath (Branson 1200 Ultrasonic Cleaner, Branson, USA). Samples were further shaken at 150g for 30 min, centrifuged for 10 min at 5000g and supernatant was passed through a ceramic column filled with anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (Sigma–Aldrich, Milan). Same treatment of pooled and dried sediment was repeated with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and the obtained extracts were combined and volatilized to dryness. Residues were re-suspended in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  prior the gas chromatography (GC) analysis. All measures were performed using a Master GC DANI Instruments (Development Analytical Instruments), equipped with SSL injector and FID detector. Samples (1  $\mu\text{l}$ ) were injected in splitless mode at 330 °C. The analytical column was a Restek Rxi-5 Sil MS with Integra-Guard, 30 m  $\times$  0.25 mm (ID  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$  film thickness). Helium carrier gas was maintained at a constant flow of 1.5 ml  $\text{min}^{-1}$ . Total hydrocarbons were also calculated for each sample (Genovese et al., 2014). Three samples for any stations in study were analyzed.

### 2.3. Phospholipids fatty acids (PLFA) extraction and analysis

Approximately 4 g of freeze-dried sediment was weighted in screw-cap Pyrex test tubes. Lipids were extracted in triplicate and separated into fractions following the method proposed by Bligh and Dyer (1959) and modified by White et al. (1979), that is with a mixture of chloroform:methanol:P-buffer solution (1:2:0.8 v/v/v). Phospholipids were separated from the other lipid fractions using silicic solid phase extraction (SPE) cartridges under low vacuum and derivatized to fatty acid methyl esters (FAME) by mild alkaline methanolysis. The organic phase was evaporated to dryness under gentle nitrogen stream and reconstituted with an *N*-hexane solution with internal standard (C 23:00). PLFAs were analyzed through a Shimadzu 2010 Gas Chromatograph equipped with a flame ionization detector (GC-FID) using a fused siloxane capillary column (BPX-70; 30  $\times$  25 mm i.d.; film thickness 0.25  $\mu\text{m}$  SGE, Inc., Austin, TX). Individual PLFAs were identified by comparison of retention times with commercially available standard mixtures (FAME and BAME mix, Supelco) and quantified by correlating the peak areas to that of the internal standard. Results were given as relative percentage abundance.



Sampling Station	Station Code	Latitude	Longitude	Depth
A	N1	37.16619894	15.20074368	5 m
B	N2	37.16770367	15.20604372	10 m
C	N3	37.16927676	15.21497011	20 m
D	S4	37.15569923	15.21703005	5 m
E	S5	37.15850386	15.21939039	10 m
F	S6	37.1630184	15.22239447	20 m

**Fig. 1.** Map showing the location of sampling stations in Priolo Bay (Augusta, Sicily, Italy). The bathymetry of the sampling area is indicated by white dashed lines and numbers.

Conventional nomenclature was used for PLFAs, namely A:Bn-C where A indicates the carbon chain length, B the degree of unsaturation, and C the position of the first double bond from the omega or aliphatic end of the molecule. Terminal branching was indicated by *i* (*iso*) and *a* (*anteiso*); presence of cyclopropane and hydroxyl groups in the PLFA molecule was indicated with the suffix *cy-* and *OH-*, respectively, plus the position from the carboxylic carbon. PLFAs were grouped into biomarkers of specific microbial groups according to Findlay et al. (1990) and Kaur et al. (2005).

PLFA data were analyzed using multivariate techniques by means of the software PRIMER 6 (Anderson et al., 2008). Cluster analysis (group average linkage method) and Principal Coordinate analysis (PCO; Anderson and Willis, 2003) were carried out on Bray Curtis similarities calculated from the arcsine-transformed relative abundance of the 34 PLFA identified. Selected PLFA biomarkers were superimposed onto the graph to detect their correspondence with the ordination obtained. Clusters defined at 91% of similarity were also superimposed.

#### 2.4. Measures of microbial abundance

To monitor the abundance of microbial populations present in seawater and sediment, measures of direct bacterial count (DAPI), cultivable bacteria (CFU) and Most Probable Number (MPN) were carried out in triplicates.

##### 2.4.1. Total bacterial abundance (DAPI count)

For seawater samples, after a short-time (30") ultrasonic treatment (Ultrasonic Bath Branson 1200, Branson, USA), the total bacterial cell counts were performed by DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole 2HCl, Sigma-Aldrich S.r.L., Milan, Italy) staining of seawater samples fixed by formaldehyde (2% final concentration), according to Porter and Feig (1980) and Cappello et al. (2012).

For sediment, prior to dispersion, samples were incubated for at least 15 min with Tween 80 (final concentration, 1 mg l<sup>-1</sup>). According to Kuwae and Hosokawa (1999) an ultrasonic cleaner (Branson 1200, Milan) was used for the bacterial dispersion from the sediment (20 min). After centrifugation (8 min at 8000g) and collection of water-tween 80 phase, cell counts were performed by DAPI as above described.

Slides were examined by epifluorescence by using an Axioplan 2 Imaging (Zeiss; Carl Zeiss Inc., Thornwood, N.Y.) microscope. Cell counts from 10 grid fields on each slide were tallied (Ni Chadhain et al., 2006). Results were expressed for seawater and sediment samples as number of cells ml<sup>-1</sup> and number of cells g<sup>-1</sup>, respectively.

##### 2.4.2. Cultivable bacteria (CFU)

For enumeration of total heterotrophic bacteria and hydrocarbon-degrading bacteria, cells present in seawater and sediment samples (from bacterial dispersion carried out as previously

described) were serially diluted in sterile natural seawater (0.2  $\mu$ M Millipore filter; Millipore, Milan, Italy) and plated (100  $\mu$ l) on Marine 2216 agar medium (Difco S.p.a, Milan, Italy). All agar plates were incubated at  $20 \pm 1$  °C for 7 days. Results were expressed as colony forming units (CFU) in ml (for seawater samples, CFU ml<sup>-1</sup>) and grams (for sediment sample, CFU g<sup>-1</sup>).

#### 2.4.3. Most Probable Number (MPN)

Hydrocarbon-degrading bacteria from seawater and sediment samples (after dispersion procedures) were enumerated by a miniaturized Most Probable Number (MPN) method (Brown and Braddock, 1990), slightly modified (Cappello et al., 2007a). The MPN of hydrocarbon-degrading microorganisms was determined from the appropriate MPN tables according to American Public Health Association (A.P.H.A., 1992).

#### 2.5. PCR-DGGE

Denaturing Gel Gradient Electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified 16S rRNA gene was used to analyze the taxonomic structure of microbial population present in seawater and sediment samples.

##### 2.5.1. Extraction of DNA

The extraction of total DNA from seawater samples was performed using the MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre, USA). An aliquot of 100 ml of seawater samples was filtered with 0.2  $\mu$ M Millipore filter (Millipore, Milan, Italy); the filters were transferred to 1.5 ml plastic tubes and 350  $\mu$ l of Cell Lysis solution containing 50  $\mu$ g of Proteinase K were added. Each sample was incubated at  $65 \pm 1$  °C for 15 min, transferred on ice 5 min and the filter removed. The precipitation of total nucleic acids was performed following the manufacturer's instructions. The total nucleic acids were suspended in 50  $\mu$ l of DNA/RNA free water (GIBCO).

0.5 g of frozen sediment sample from each core were used for direct extraction with the FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Germany), following the procedures described by the manufacturer except in the last step, where the nucleic acids were eluted with 50  $\mu$ l of DNA/RNA free water (GIBCO). To homogenize sediment samples the FastPrep instrument was used according to the manufacturer's instructions. The quality and concentration of DNA extracted from seawater and sediment samples were checked on 1.0% agarose gel run in Tris–acetate–EDTA buffer stained with ethidium bromide and UV illuminated. Nucleic acids were quantified using NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies). DNAs were stored at  $-20$  °C until required for PCR amplification.

##### 2.5.2. PCR-DGGE analysis

Primers 341f-GC and 354r (Muyzer et al., 1993) were used to amplify the variable V3 region of bacterial 16S rRNA genes for DGGE analysis. PCR amplification was performed in a 50  $\mu$ l final volume with Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific), 1 $\times$  PCR buffer, 500 nM each primer, 0.30 mM dNTP and 150–300 ng of DNA. The PCR procedure was as follows: an initial cycle of 30 s at 98 °C, followed by 35 cycles of 15 s at 98 °C, 10 s at 66 °C, 10 s at 72 °C, with a final extension of 1 min at 72 °C. PCR products were purified and the amplicons analyzed on 1.5% agarose gel. Amplicons were run in polyacrylamide gels (20 cm  $\times$  20 cm  $\times$  1 mm) using the Phor-U2 system (Ingeny, Leiden, The Netherlands). Gels were prepared with 8% (w/v) polyacrylamide acrylamide/bisacrylamide (37:5:1) in a 1 $\times$  TAE [40 mM Tris, 20 mM acetic acid, and 1 M EDTA (pH 8.0)] buffer with a 20% and 70% denaturing gradient [100% denaturant corresponding to 7 M urea and 40% (v/v) deionised formamide] increasing in the

direction of electrophoresis. Electrophoresis was performed at 60 °C, at 80 V with 1 $\times$  TAE for 17 h; after samples were loaded, it was run for 15 min at 20 V and then at 80 V for 17 h. Gel was stained for 30 min in SYBR® Gold I Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen CA, USA) at 37 °C, washed with sterile distilled water and captured with a Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA). Some dominant DGGE bands were excised with a sterile pipette tip and re-suspended overnight in 20  $\mu$ l DNA/RNA free water (GIBCO) at 4 °C then frozen at  $-20$  °C. A 2  $\mu$ l aliquot was used as template for PCR using the 341f-GC and 354r primer set as described above. The PCR products were purified with NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel) following the manufacturer's instructions and sequenced.

#### 2.6. Isolation of HC-degrading bacteria by enrichment cultures

To isolate the aerobic hydrocarbon degrading bacteria, samples of seawater and superficial sediment were used as inoculum for enrichment cultures in the mineral medium ONR7a (Dyksterhouse et al., 1995).

Different enrichment sets were performed by supplementing the ONR7a medium, respectively, with 0.1% (v/v) *n*-alkanes mixture (C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub> and C<sub>24</sub>), PAHs (phenanthrene, pyrene, biphenyl and dibenzothiophene) or crude oil (Arabian Light Crude Oil).

After incubation at  $20 \pm 1$  °C with shaking (80 g) for 1 month, subcultures were prepared by transferring 1% v/v from the enrichment cultures to flasks containing fresh medium ONR7a and 0.1% of chemicals. The new enrichment cultures were cultivated under the same conditions for 1 month. All the enrichment cultures and subcultures were aliquoted and stored at  $-80$  °C with 20% glycerol. After 1 month, the enrichment cultures were serially diluted with saline solution (0.9% NaCl), and spread on mineral ONR7a plates containing the same hydrocarbons.

Phenotypically different colonies obtained from the plates of ONR7a were transferred to fresh plates of ONR7a with and without carbon source to eliminate autotrophs and agar-utilizing bacteria. The procedure was repeated, and only isolates exhibiting pronounced growth on crude oil and/or other hydrocarbons were stored in stock media with glycerol at  $-20$  °C for further characterization (Chaillan et al., 2004; Hassanshahian and Emtiazi, 2008).

##### 2.6.1. Biochemical characterization

To identify and characterize the bacterial isolates, Gram staining and biochemical tests for oxidation/fermentation, the production of acid from carbohydrates and the hydrolysis of gelatin and citrate were performed according to the Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (taxonomy) (Holt et al., 1998).

##### 2.6.2. Taxonomical analysis of 16S rRNA genes

Analysis of the 16S rRNA gene was performed for the taxonomic characterization of the isolates. Extraction of total DNA from the isolates was performed using a DNA/RNA extraction kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA), according to manufacturer's instructions. The bacterial 16S rRNA loci were amplified using the domain-specific (Lane, 1991) forward primer Bac27\_F (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') and the universal reverse primer Uni\_1492R (5'-TACGYTACCTGTACGACTT-3'). The amplification reaction was performed in a total volume of 50  $\mu$ l containing 1 $\times$  solution Q (Qiagen, Hilden, Germany), 1 $\times$  Qiagen reaction buffer, 1 mM of each forward and reverse primer, 10 mM dNTPs (Gibco, Invitrogen Co., Carlsbad, CA), and 2 U of Taq polymerase (Qiagen). Amplification for 35 cycles was performed in aGeneAmp5700 thermocycler (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The temperature profile for PCR was 95 °C for 5 min (1 cycle); 94 °C for 1 min and 72 °C for 2 min (35 cycles); and 72 °C for 10 min after the final cycle (Troussellier et al., 2005). The amplified 16S rRNA fragment was

sequenced with a Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit on an automated capillary sequencer (model 3100 Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems). The similarity rank from the Ribosomal Database Project RDP (Maidak et al., 1997) and FASTA Nucleotide Database Queries were used to estimate the degree of similarity to other 16S rRNA gene sequences. Phylogenetic analysis of the sequences was performed as previously described (Yakimov et al., 2006).

16S rDNA sequences were deposited in Genbank under accession numbers KT348211 – KT348365.

### 3. Results

#### 3.1. Hydrocarbon contamination in sediment

All the sediment samples were contaminated by hydrocarbons. GC-FID analysis (Table 1) revealed that the highest concentration of total hydrocarbons was detected in station N3 (10,786 ng g<sup>-1</sup>) from the northern transect and in stations S4 (10,364 ng g<sup>-1</sup>) from the southern transect; the less contaminated station S5 (3733 ng g<sup>-1</sup>). Stations N3 and S4 showed also the maximum concentration of linear hydrocarbons (*n*-alkanes from C<sub>8</sub> to C<sub>30</sub>) with values of 710 and 524 ng g<sup>-1</sup>, respectively (Table 1). High concentrations of PAHs (18 PAH congeners, including the 16 priority PAHs defined by the U.S. EPA) were previously detected in N3 sediment also by Di Leonardo et al. (2014), although the highest contamination of PAHs was recorded in N1 station.

#### 3.2. Microbial abundance

Measures of microbial abundance (DAPI, CFU and MPN counts) (Fig. 2) from seawater and sediment samples showed that rich and diverse populations of bacteria, including HC degraders, thrived in this chronically polluted area. The abundance of HC degraders in the most polluted sediment (N3) was higher than that of total heterotrophs, indicating an active catabolic activity.

#### 3.3. Microbial diversity at Priolo Bay

##### 3.3.1. Total microbial diversity of the sediment

Thirty-four phospholipid fatty acids (PLFA) were identified in the sediment samples from Priolo Bay (Table 2). The most important biomarkers, indicative of the microbial community components, were computed and also listed in Table 2 to assess if there were significant changes in community composition in relation to sediment contamination. The highest relative abundance of PLFAs were made up of saturated (SFA: 45.46 ± 2.03%) and monounsaturated PLFAs (MUFA: 31.33 ± 1.54%) without substantial differences among stations. Sum of polyunsaturated PLFAs showed the highest mean concentration in stations S4 and S6 (PUFA: 12.33 ± 2.47% and 14.61 ± 3.47%, respectively) mainly driven by the high relative abundance of 20:4 n6 and 20:5 n3, biomarkers of macro- and microalgae (Kelly and Scheibling, 2012; Parrish, 2013). As regards biomarkers of specific microbial groups, the sum of MUFAs most representative of bacteria (bacterial MUFA: 16:1 n7; 18:1 n7; 19:1) was higher than 20% in all stations, indicating an overall dominance of Gram negative bacteria in the whole area. The sum of cyclopropyl and hydroxyl PLFAs, also indicative of Gram negative bacteria, showed the highest mean values in all three northern transect stations: N1, N2, N3 (Fig. 3, Table 2). Sum of terminal branched fatty acids, indicators of Gram positive and sulfate-reducing bacteria, were around 10–12% in all stations except in S6 (8.34 ± 0.21%). Fungal biomarkers (18:2 n6, 18:3 n3, 18:3 n6) and the ratio of the sum of fungal vs. bacterial biomarkers were slightly higher in S6 and S5, while the

**Table 1**

Total hydrocarbons (HCs) and *n*-alkanes (C<sub>8</sub>–C<sub>30</sub>) (ng g<sup>-1</sup>) (SD) in Priolo Bay sediment.

	Sediment					
	N1	N2	N3	S4	S5	S6
Total HCs	3975 (119.5)	5329 (84.8)	10,786 (428)	10,364 (360.7)	3733 (97.8)	8905 (99.7)
<i>n</i> -Alkanes (C <sub>8</sub> –C <sub>30</sub> )	245 (13.3)	260 (21.2)	710 (31.6)	524 (41.8)	167 (17.6)	160 (8.5)

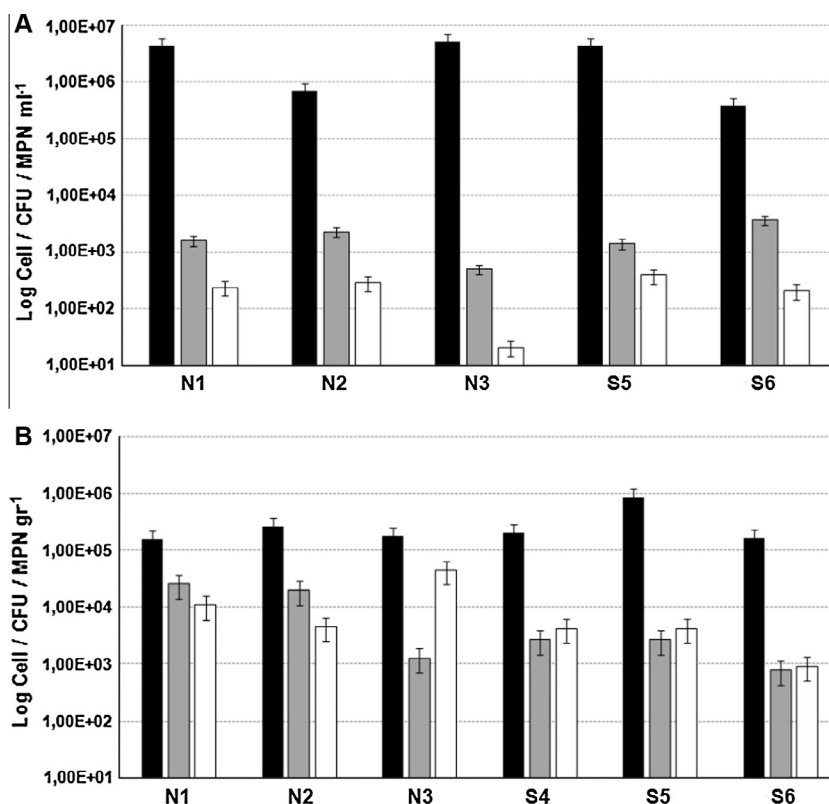
protozoan biomarkers (sum of all PUFAs 20 n6) were slightly higher in the three southern transect stations: S4, S5, S6 (Table 2). PCO ordination was performed using the whole PLFA profile to assess the similarity among sampling stations (Fig. 3). The northern transect stations clustered in the right side of the ordination, while the southern transect stations were distributed more along the centre/left side: S4 and S5 grouped in the below part and S6 sharply distinct in the upper part. Indeed, S6 site was featured by the exclusive presence of a number of PLFAs (17:1 n7, 20:1 n9, 24:1 n9, 22:4 n6) that caused this clear isolation and masked the separation between the two transects. In spite of the influence of S6, the clusters superimposed to the graph reveal that northern and southern transect are well distinct. PLFA biomarkers superimposed to the graph indicated that cyclopropyl, hydroxyl and bacterial MUFAs featured the northern transect stations, while fungal, protozoan, diatom biomarkers and the ratio of the sum of fungal vs. bacterial biomarkers determined the ordination of S4 and S5. The first axis (PCO1) explained 56.4% of the total variation, while the second axis (PCO2) 26.4%.

##### 3.3.2. Bacterial diversity of sediment and water

To compare the bacterial diversity associated with seawater and surface sediment collected from Priolo Bay, 16S rDNA Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) was performed (Fig. 4). Twenty-three to forty-one discernible bands were observed for each sample. The DGGE patterns revealed that the bacterial community composition of seawater and sediment was partially distinct, although a few identical bands were identified in all seawater and sediment profiles. Diversity indices calculated for each DGGE profile were in general higher and more variable in sediment than in water samples. Sediment from station N3 showed the highest Chao's index (861), while sediment from S6 the lowest one (276) (Table 3). The average Chao's index in seawater was 506. The dendrogram, applied to the DGGE profiles, clustered sediment and seawater bacterial communities on two different branches. Within each of these two branches, N1 and N2 profiles from the northern transect clustered together as well as N3, S4 and S5 (Fig. 4). The S6 banding patterns from both sediment and seawater were on a different branch, indicating a totally different bacterial community that reflects different environmental conditions. The sequence of a few common bands identified the presence of uncultured Alpha and Gammaproteobacteria, including the hydrocarbon degraders *Alcanivorax* (in sediment) and *Alteromonas* (in seawater), and of Firmicutes (order Clostridiales) in sediment samples (Table 4).

##### 3.3.3. Diversity of culturable HC-degrading bacteria

In order to isolate the HC-degrading bacteria, sediment and seawater were used to set enrichment cultures on mineral ONR7a medium with a *n*-alkanes mixture (C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>24</sub>), different PAHs (phenanthrene, pyrene, biphenyl and dibenzothiophene) or crude oil (Arabian Light Crude Oil). A total of 258 isolates were obtained from seawater (100 isolates) and sediment (158 isolates) enrichments (Table 5). On the basis of different colony morphology, 158 isolates were identified by 16S rDNA analysis (Fig. 5,



**Fig. 2.** Microbial abundance measured as DAPI total counts (black bars); CFU of heterotrophic cultivable bacteria (gray bars); Most Probable Number (MPN) (white bars) in seawater (A) and superficial sediment (B).

Table 6) and were affiliated mainly to genera of obligate hydrocarbonoclastic bacteria (*Alcanivorax*) and/or to generalist HC-degraders (*Thalassospira*, *Oleibacter*, *Vibrio*, *Marinobacter*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*).

A higher diversity of culturable hydrocarbon-degrading bacteria was detected in seawater samples (20 genera) in respect to sediment samples (12). The water sample N3 yielded the highest number of genera (8) and the sediment sample N1 the lowest (2).

Most sediment and water samples were dominated by bacteria related to *Alcanivorax* and *Marinobacter* genera. Other hydrocarbon degrading bacteria as those belonging to *Thalassospira* were preferentially isolated from a few water and sediment samples and *Oleibacter* from only one water sample (N3). *Oleibacter marinus* was described as a major degrader of petroleum aliphatic hydrocarbons spills in tropical seas (Teramoto et al., 2013) and particularly interesting appears that the isolation of this strain, in this work, is the first official isolation of a strain of *O. marinus* from the Mediterranean area.

#### 4. Discussion

Augusta Bay is a wide natural bay with low water turnover that extends along 10 km of the eastern coast of Sicily. This region is characterized by heavy industrialization, dense urbanization and heavy large tanker traffic transporting crude and refined oil to and from the refinery located at this site. These anthropogenic factors have strongly affected the marine environment of the harbour (ISPRA, 2010).

The analysis of organic contaminants in surface sediment revealed high concentrations of total hydrocarbons clearly originating from human activities. The northern deepest station (N3, 20 m depth) and the southern stations (S4 and S6) result in the most intensively contaminated sites.

A large fraction of hydrocarbons is represented by mineral oils presumably derived from the distillation of petroleum to produce gasoline and other petroleum-based products; indeed, mineral oils have an important role in the petrochemical industry and are mostly used as chemical intermediates to produce a number of petrochemicals such as fatty alcohols, alkanolamides, sulfo-methyl esters, sucrose esters and other detergents. The relative high concentration of mineral oils compared to the concentration of other HC (*n*-alkanes) clearly indicates that the sediment is characterized by an old chronic presence of contaminants, where the most potentially degradable fractions have been degraded or reduced (both biologically and/or chemically), in respect to the fractions that have a lower degradation rate (Head et al., 2006). This deduction is confirmed by PAH molecular profiles obtained, on the same samples, by Di Leonardo et al. (2014), where a prevalence of high molecular weight PAHs (above three-ring) was detected in respect to a moderate concentration of two-ring PAHs.

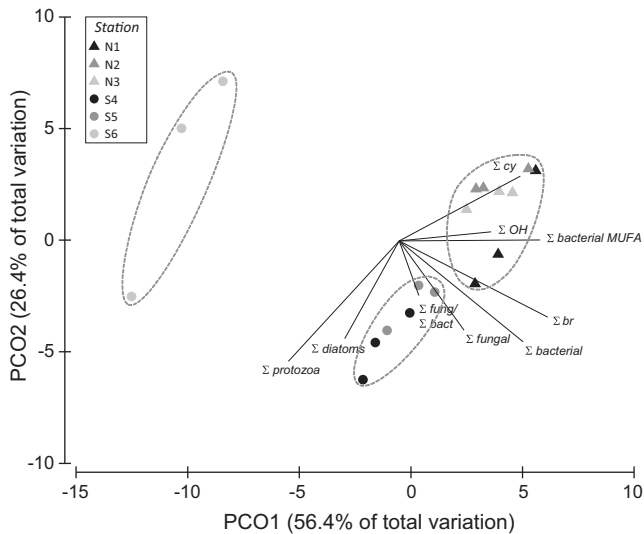
The distribution of HC contaminants in the sediment was not homogeneous nor the chemical data do allow describing a contamination gradient from the coast to offshore that would reflect a contamination source from the coasts where refineries operate. The amount and nature of the HC varied at each station and N3, S4 and S6 stations contained the highest amount of total HC. The extreme heterogeneity of contaminant distribution in the sediment could be due to heterogeneity of the seabed at the bay. Bathymetry and direct observations by divers during sampling, revealed the presence of basins and depressions that work as catchments for hydrocarbons and contaminants. Moreover, this un-patterned distribution of contaminants within Priolo Bay may account for the dumping of contaminant sediment dredged within Augusta Harbour that consequently seems to act as a source of contaminants for nearby coastal and off-shore marine ecosystems (Di Leonardo et al., 2014).

**Table 2**Profiles of PLFAs (wt% of the total PLFAs; mean  $\pm$  standard deviation) in the surface sediment. Sums and biomarker PLFAs are also indicated below.

	N1		N2		N3		S4		S5		S6	
	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd
<i>Saturated</i>												
12:00	5.36	0.38	5.60	0.09	5.39	0.29	4.65	0.55	4.98	0.62	4.51	0.71
14:00	5.28	0.12	5.57	0.53	5.32	0.19	4.91	0.19	4.90	0.10	4.47	0.18
15:00	2.45	0.13	2.20	0.25	2.53	0.07	1.96	0.11	1.86	0.26	1.82	0.15
16:00	15.42	0.17	15.20	0.15	15.12	0.46	15.49	0.81	14.48	1.21	13.74	0.38
17:00	1.92	0.14	1.86	0.07	1.82	0.10	1.64	0.11	1.70	0.20	1.80	0.35
18:00	8.80	0.56	9.22	0.20	8.78	0.52	8.03	0.55	8.53	0.53	8.20	1.35
20:00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.17	0.40	4.35	1.80	3.12	0.46
24:00	6.42	0.52	6.76	0.12	6.31	0.30	5.56	0.71	6.10	0.77	5.43	0.86
$\Sigma$ SFA	45.66	1.40	46.42	0.79	45.28	1.48	45.41	1.74	46.89	1.76	43.09	3.36
<i>Monounsaturated</i>												
16:1 n7	4.93	0.32	4.28	0.27	4.23	0.37	4.34	0.50	3.84	1.46	3.91	1.84
17:1 n7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.43	0.05
18:1 n9	4.49	0.26	4.65	0.33	4.53	0.27	4.15	0.18	4.03	0.13	4.01	0.36
18:1 n7	12.43	0.49	12.16	0.47	12.23	0.28	11.93	0.49	11.72	0.40	10.57	0.31
19:1 n9	7.06	0.97	9.52	0.19	8.36	0.97	7.08	0.89	10.12	1.69	7.44	1.23
20:1 n9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.29	0.11
20:1 n11	1.81	0.17	1.84	0.05	2.72	1.43	1.49	0.17	1.81	0.26	1.54	0.25
24:1 n9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.02	0.30
$\Sigma$ MUFA	30.73	1.22	32.43	0.59	32.08	2.11	29.00	1.09	31.51	0.23	32.21	0.16
<i>Polysaturated</i>												
18:2 n6	1.34	1.19	1.44	1.27	1.72	0.31	1.93	0.36	1.74	0.41	1.34	0.12
18:3 n3	0.98	0.85	0.00	0.00	0.00	0.00	1.37	0.04	1.41	0.22	0.37	0.64
20:2 n6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.83	0.73	0.40	0.69	0.40	0.69
20:4 n6	2.19	0.28	1.92	0.03	1.90	0.34	2.91	0.41	2.12	0.30	2.76	0.85
20:5 n3	2.84	0.33	3.08	0.50	3.07	0.52	4.24	0.38	2.73	0.34	3.98	1.47
22:4 n6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.20	0.39
22:6 n3	2.06	0.08	2.01	0.22	2.05	0.44	1.03	0.90	0.50	0.86	2.56	0.46
$\Sigma$ PUFA	9.41	2.53	8.45	1.96	8.74	0.92	12.33	2.47	8.89	1.13	14.61	3.47
<i>Branched</i>												
i-C14:00	1.15	0.06	1.20	0.06	1.25	0.05	1.11	0.06	1.17	0.04	0.97	0.16
i-15:00	3.25	0.04	2.97	0.17	3.17	0.06	3.06	0.08	2.98	0.30	2.45	0.18
a-15:00	3.04	0.06	2.64	0.31	3.27	0.15	3.64	0.37	3.06	0.34	2.22	0.07
i-16:00	2.77	0.11	2.82	0.11	2.87	0.15	2.56	0.19	2.62	0.14	2.38	0.35
i-17:00	0.13	0.09	0.02	0.03	0.06	0.11	0.23	0.04	0.08	0.14	0.09	0.11
a-17:00	1.01	0.03	0.96	0.06	0.98	0.11	0.98	0.01	0.95	0.10	0.24	0.41
$\Sigma$ br	11.35	0.08	10.60	0.59	11.60	0.46	11.58	0.28	10.86	0.66	8.34	0.21
<i>Cyclopropyl</i>												
cy-17:00	2.04	0.03	1.87	0.11	2.07	0.06	1.57	0.09	1.74	0.09	1.67	0.11
cy-19:00	0.12	0.02	0.00	0.00	0.13	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
$\Sigma$ cy	2.16	0.03	1.87	0.11	2.20	0.06	1.57	0.09	1.74	0.09	1.67	0.11
<i>Hydroxy</i>												
2-OH 10:00	0.11	0.19	0.00	0.00	0.09	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2-OH 12:00	0.18	0.09	0.23	0.04	0.14	0.01	0.11	0.02	0.10	0.09	0.08	0.04
2-OH 14:00	0.53	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
$\Sigma$ OH	0.83	0.18	0.23	0.04	0.24	0.17	0.11	0.02	0.10	0.09	0.08	0.04
$\Sigma$ bact MUFA	24.42	1.17	25.95	0.85	24.83	0.78	23.36	0.85	25.68	0.59	21.92	0.44
$\Sigma$ bact	49.27	0.50	47.49	1.30	48.40	1.08	50.40	0.74	49.85	0.60	43.80	1.11
$\Sigma$ fung	2.32	2.03	1.44	1.27	1.72	0.31	3.31	0.33	3.15	0.60	1.72	0.70
$\Sigma$ fung/ $\Sigma$ bact	0.05	0.04	0.03	0.03	0.04	0.01	0.07	0.01	0.06	0.01	0.04	0.02
$\Sigma$ protozoa	2.19	0.28	1.92	0.03	1.90	0.34	3.74	0.99	2.52	0.93	3.15	1.43

Microbial diversity of the sediment was analyzed by ester-linked phospholipid fatty acids (PLFA) analysis and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of the variable V3 region of bacterial 16S rRNA gene. Both PLFA profiles and biomarkers and DGGE analysis allowed to distinguish the microbial communities of the northern transect from those in the southern transect with the communities of station S6 always clustering apart from the others. Total bacterial diversity, however, seemed not influenced by depth nor by levels of contamination; the deepest stations, namely N3 and S6 showed the highest and lowest bacterial diversity levels, respectively, although the concentration of total hydrocarbons was the highest at both stations. The highest bacterial diversity at station N3 corresponds to the highest concentration of total HC, *n*-alkanes and Total Organic Carbon (TOC, Di Leonardo et al., 2014).

Microbial communities in the northern part of the bay showed PLFA profiles indicative of abundance of Gram-negative bacteria. In contrast, microeukaryotes (diatoms, fungi and protozoa) resulted more abundant in the southern stations, except from S6, where zooplanktonic biomarkers (20:1 n9, 24:1; Parrish, 2013) resulted abundant, probably due to the outward position along the transect that make it more influenced by the local currents. Increase of Gram-negative bacteria has been reported in marine sediment subjected to various stress conditions, among which PAH (Timmis et al., 2005; Castle et al., 2006; Wang and Tam, 2012) and trace element contamination (Córdova-Kreylos et al., 2006). The increased resistance and survival of Gram-negative bacteria to stressors is mainly attributable to the presence of cyclopropyl FAs that maintains higher membrane stability (Kaur et al., 2005). Conversely, microeukaryotes (diatoms,

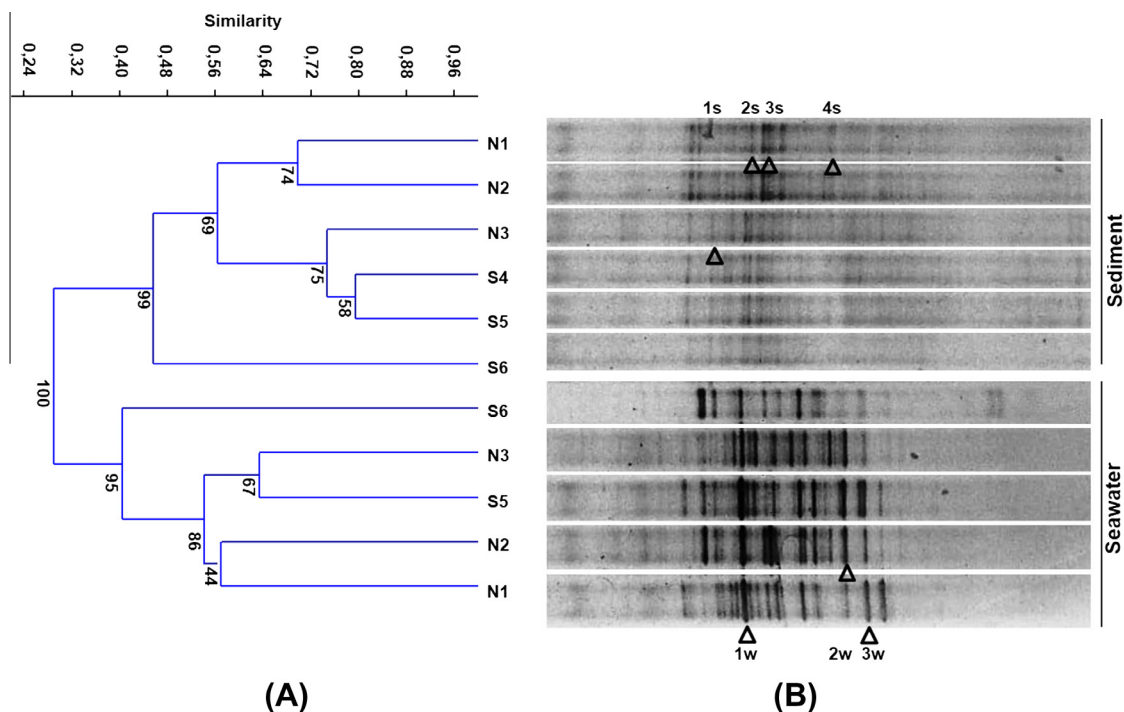


**Fig. 3.** Principal coordinates analysis (PCO) ordination based on Bray-Curtis similarity of arcsine-transformed PLFAs of surface sediment from Priolo Bay. The contribution of each axis (PCO1 and PCO2) to the total variation is shown. Vectors related to PLFA biomarkers of specific groups of microbial communities were superimposed to the graph. Clusters defined at 91% of similarity were superimposed too.

fungi, protozoa), characterized by high levels of PUFAs, seem to be more sensitive to physical and chemical disturbances. Similarly to our results, Napolitano et al. (1994) observed a decrease of 20:4 n6 and 20:5 n3 in streams polluted with chlorine and/or mixed industrial effluents, as well as Kelly et al. (2003) reported reduction of 18:2 n6 in soils contaminated by trace elements. Changes in microbial community composition could be also explained by indirect effect of HC pollution on phage-mediated lysis and on predation by protozoa; both effects tend to increase in response to pollution (Head et al., 2006).

High HC contamination has a direct effect on abundance of HC degraders (measured by MPN) that was higher in the most contaminated northern station N3 and in all the stations of the southern transect. The diversity of HC degraders isolated from seawater samples seemed also to be influenced by the sediment contamination and seawater samples reflected a similar, although not identical, species distribution of sediment samples.

Microbial communities within contaminated ecosystems tend to be dominated by the organisms capable of consuming and/or tolerating toxic organic compounds. Crude oil as a complex mixture of different classes of hydrocarbons can support the growth of various bacteria, each preferentially degrading one or several types of hydrocarbons. The presence of bacteria was strongly dependent on the nature of hydrocarbon pollutants and they had low inter-sample similarity.



**Fig. 4.** Bacterial diversity of seawater and surface sediment of Priolo Bay. (A) Cluster analysis dendrogram displaying the bacterial community of seawater and surface sediment samples. Jaccard's coefficient and 100 bootstrap analysis was used to measure similarity among the eleven DGGE banding patterns. (B) DGGE profiles of PCR-amplified 16S rDNA V3 region from seawater and surface sediment samples. Arrowheads indicate the predominant band shared by all samples that were reamplified and sequenced (Table 4) S4 water sample is missing.

**Table 3**  
Bacterial diversity indices of sediment and water samples in Priolo Bay based on DGGE profiles.

	Seawater						Sediment					
	N1	N2	N3	S4	S5	S6	N1	N2	N3	S4	S5	S6
Taxa_S	28	33	33	n.d.	34	28	34	39	41	34	36	23
Shannon	3.332	3.497	3.497	-	3.526	3.332	3.526	3.664	3.714	3.526	3.584	3.135
Chao-1	406	561	561	-	595	406	595	780	861	595	666	276



**Table 4**  
List of bacteria detected by PCR-DGGE in the seawater and sediment samples.

Band no.	Sample	Sequence length (bp)	Closest sequence match (accession no)	Score (% sequence similarity)	E value
<i>Sediment</i>					
1s	N3	125	Uncultured bacterium ( <i>Alcanivorax</i> sp.) (GU797076.1)	149 (86)	7e–33
2s	N1	131	Uncultured <i>Thermoanaerobacterium</i> (JF819847.1)	134 (83)	2e–28
3s	N1	142	Uncultured bacterium (Gammaproteobacteria) (FM214477.1)	185 (90)	1e–43
4s	N1	124	Uncultured bacterium (Gammaproteobacteria) (KF741563.1)	185 (94)	9e–44
<i>Seawater</i>					
1w	N1	162	Uncultured bacterium ( <i>Alteromonas</i> ) (GQ377785.1)	230 (93)	4e–57
2w	N2	134	Uncultured <i>Thalassobius</i> (HQ836410.1)	165 (88)	1e–37
3w	N1	116	Uncultured <i>Alteromonas</i> (HQ836379.1)	268 (96)	1e–68

**Table 5**  
Total bacterial isolates obtained from the enrichment cultures of seawater and sediment and total hydrocarbon-degrading bacteria (HB) growing exclusively on hydrocarbons.

Substrate	Sediment	Seawater	HB
<i>n</i> -Alkanes <sup>a</sup>	62	31	93
Crude oil <sup>b</sup>	55	37	92
BPH <sup>c</sup>	9	14	23
PYR <sup>d</sup>	13	7	20
DBT <sup>e</sup>	6	7	13
PHEN <sup>f</sup>	13	4	17
Total	158	100	258

<sup>a</sup> Mixtures of *n*-alkanes (C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>24</sub>).

<sup>b</sup> Arabian Light Crude Oil.

<sup>c</sup> Bypheylene.

<sup>d</sup> Pyrene.

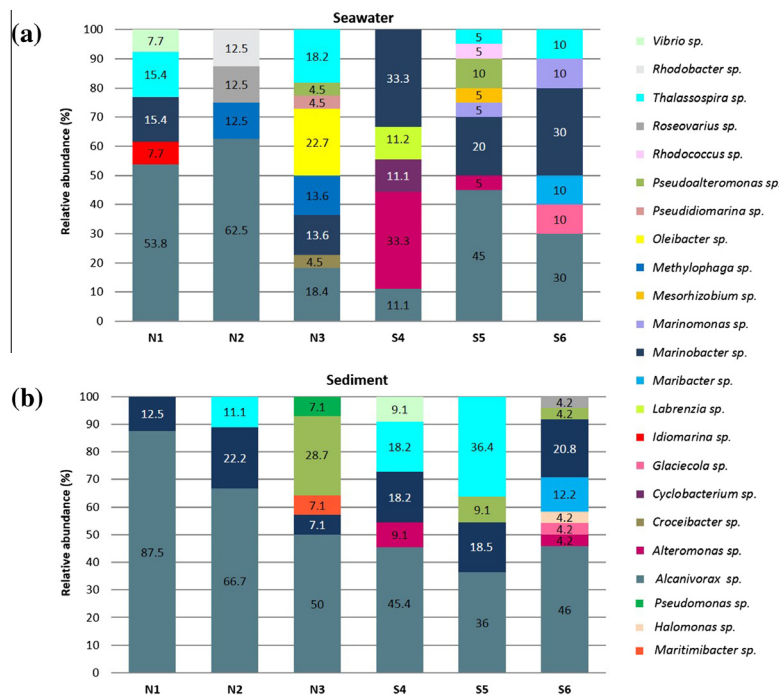
<sup>e</sup> Dibenzothiophene.

<sup>f</sup> Phenanthrene.

Most HC degraders isolated from Priolo Bay are Gram negative (specialized or generalist) alkane- and PAH-degraders and their isolation is consistent with the detection of Gram negative bacteria by PLFA analysis. HC degraders were not only cultivated after enrichment cultures on HC, but were also directly detected in the sediment

and seawater samples, by sequencing of random DGGE bands. The sequencing of DGGE bands confirms that both sediment and seawater contain known HC degraders as *Alcanivorax* (alkanes) and *Alteromonas* (aromatics, Gutierrez et al., 2013) or putative, such as *Thalassobius* (Iwaki et al., 2012) and *Thermoanaerobacterium*, often dominant in methanogenic alkanes degrading enrichment culture microcosms (Wang et al., 2014).

Alkanes are the major constituents of crude oil, which explains the massive presence of *Alcanivorax* strains among all the sediment and water isolates (Hara et al., 2003). Capability of *Alcanivorax* genus to use hydrocarbons as the only sources of energy and organic carbon was widely described (Yakimov et al., 1998; Schneiker et al., 2006). Kasai (2002) and Cappello et al. (2012) explain these characteristics in ability of this strain to produce a lipidic bio-surfactant that increases the bioavailability of contaminants and the ability to use them (Yakimov et al., 1998; Schneiker et al., 2006). *Alcanivorax borkumensis* SK2 surfactant is proposed as one of the most efficient of bacterial surfactants. Abundance of *Alcanivorax* isolates was obtained from all the water (11%) and sediment samples (87.5%) of Priolo Bay and their abundance seems to have a negative effect on the diversity of other HC degrading genera (McGenity et al., 2012; Newton et al., 2013). In two water samples (N3 and S4) where *Alcanivorax*



**Fig. 5.** Relative abundance of HC-degrading bacterial genera isolated from (a) seawater and (b) sediment of Priolo Bay by enrichment cultures.

**Table 6**

Bacterial genera isolated from seawater and sediment enrichment cultures on different hydrocarbons as energy/carbon sources.

	Seawater			Sediment		
	<i>n</i> -Alkanes <sup>a</sup>	Crude oil <sup>b</sup>	PAHs <sup>c</sup>	<i>n</i> -Alkanes <sup>a</sup>	Crude oil <sup>b</sup>	PAHs <sup>c</sup>
<i>Alcanivorax</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Alteromonas</i>			+	+		
<i>Marinobacter</i>			+	+		+
<i>Marinomonas</i>	+					
<i>Oleibacter</i>	+					
<i>Pseudoalteromonas</i>	+	+	+			+
<i>Thalassospira</i>	+	+	+		+	
<i>Vibrio</i>	+				+	
<i>Croceibacter</i>			+			
<i>Cyclobacterium</i>			+			
<i>Glaciecola</i>			+			
<i>Idiomarina</i>			+			+
<i>Labrenzia</i>			+			
<i>Mesorhizobium</i>			+			
<i>Methylophaga</i>			+			
<i>Pseudidiomarina</i>			+			
<i>Rhodococcus</i>			+			
<i>Rhodobacter</i>			+			
<i>Halomonas</i>						+
<i>Roseovarius</i>			+			+
<i>Pseudomonas</i>						+
<i>Maritimibacter</i>						+
<i>Maribacter</i>						+

<sup>a</sup> Mixtures of *n*-alkanes: C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>24</sub>.<sup>b</sup> Arabian Light Crude Oil.<sup>c</sup> Polycyclic aromatic hydrocarbons: byphenile, pyrene, dibenzothiophene, phenanthrene.

was below 20%, it is probably not just by chance that two companion genera, *Oleibacter* and *Alteromonas*, prevail in the assemblage. Competition among HCB could depend on resources, but also on the production of inhibiting molecules by *Alcanivorax* (Kano et al., 2008).

In this study, the isolation of *Oleibacter* from the Mediterranean Sea was reported for the first time. *O. marinus* is a recently discovered species of OHCB, phylogenetically related to *Oceanobacter* sp. and *Thalassolituus* sp. that was isolated from a tropical marine environment. It shows high *n*-alkane and branched alkanes degrading activity (Teramoto et al., 2011) that is comparable to that of the genus *Alcanivorax*, suggesting that *Oleibacter* plays a key role in the degradation of petroleum hydrocarbons in the marine environment. *Oleibacter* was identified in biofilms associated with phototrophic and diazotrophic bacteria, suggesting that this interaction may be important for hydrocarbon degradation (Al-Bader et al., 2013; McGenity, 2014).

A higher diversity of PAH-degrading bacteria isolated from sediment of the southern transect mainly affiliated to the genera *Thalassospira* (Cui et al., 2008; Guibert et al., 2012), *Marinobacter* and *Alteromonas* (Cui et al., 2008; Jin et al., 2012), seems to be related to higher LPAH/HPAH ratio identified in the southern transect (Di Leonardo et al., 2014).

All together chemical and microbiological data allowed depicting a complex environmental scenario of the Priolo Bay where the release of pollutants from the adjacent Augusta Harbour adds to chronic contamination of the area. This hypothesis is supported by the higher contamination of the stations closer to Augusta Harbour (or directly influenced by the currents) and also by the massive presence of OHCB and *Alcanivorax* in particular, that is expected to decline after the removal of the bulk saturated hydrocarbons (Head et al., 2006).

New trends of environmental ecology are focused in the use of innovative techniques for the recovery of impacted ecosystems, rather than simply reducing the massive volume of oil released into the sea (clean up), or the removal of the contaminated matrix

(sediment). Special attention is devoted to self-cleaning processes occurring in the sea after oil spill events as well as to the physical, chemical and biological factors influencing such power.

Biodegradation by natural populations of microorganisms is the central and most reliable mechanism by which thousands of pollutants, including crude oil, are eliminated from the environment (Prince et al., 2013). “Biostimulation” (growth stimulation of indigenous microorganisms) and “bioaugmentation” (direct inoculation of allochthonous and/or autochthonous oil-degrading bacteria) are promising strategies of accelerating the detoxifying and degrading activities into polluted site with minimal impact on natural environment (Cappello et al., 2007b; Emtiazi et al., 2005; Hassanshahian et al., 2012). Recovery of the polluted matrix (seawater and/or sediment) is possible using “passive” methods such as bioremediation, which uses bacteria to break down the hydrocarbons in the sediment into harmless by-products.

Priolo Bay shows high levels of total HC, saturated HC and PAHs in concomitance with high abundance and diversity of OHCB that are known to play a key role in HC degradation. The high total microbial diversity associated to a large selection of HC degraders is believed to contribute to natural attenuation of the area (Dell'Anno et al., 2012). The rich and diverse community of HC degraders is endowed with a very high potential of application in the bioremediation of this area. Several isolates obtained from enrichment cultures from Priolo Bay showed high degradation rates (98–99%) of crude oil (Santisi and Catania, unpublished). Levels of contamination in the bay are expected to be reduced by natural attenuation by autochthonous HC degraders provided that new contaminant contributions are avoided.

The use of natural microbial communities to clean the marine polluted sediment is identified as “green technology” because it does not introduce exogenous bacteria into the waters to be restored. Knowledge of microbial community dynamics and activities and efficiency of bacteria in oil-polluted sites may be helpful to promote bioremediation of contaminated sites since human actions can be planned in order to promote clean up oil pollution (Denaro et al., 2005).

## Author contribution

Conceived and designed the experiments: PQ, SC, SV. Performed the experiments: VC, SS, GS. Analyzed the data and wrote the MS: PQ, SC, SV. Supervised and revised the MS: AM, MY.

## Acknowledgments

This work was supported by grants of (i) University of Palermo (Italy), (ii) Istituto per l'Ambiente Marino Costiero (IAMC) – CNR of Messina, Italy, (iii) National Operative Project PON R&C 2007–2013 “Tecnologie avanzate eco-sostenibili finalizzate alla bonifica ed al ripristino di aree marine costiere degradate (PON01\_03112 – TETIDE), and (iv) Flagship Project RITMARE—Italian Research for the Sea—funded by the Italian Ministry of Education, University and Research. The authors are grateful to A. Savona and A.M. Vaccaro for help in field activity.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.07.042>.

## References

- Al-Bader, D., Kansour, M.K., Rayan, R., Radwan, S.S., 2013. Biofilm comprising phototrophic, diazotrophic, and hydrocarbon-utilizing bacteria: a promising consortium in the bioremediation of aquatic hydrocarbon pollutants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 3252–3262.
- American Public Health Association (A.P.H.A.), 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, 18th ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Anderson, M.J., Gorley, R.N., Clarke, K.R., 2008. PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods. PRIMER-E, Plymouth.
- Anderson, M.J., Willis, T.J., 2003. Canonical analysis of principal coordinates: a useful method of constrained ordination for ecology. *Ecology* 84, 511–525.
- Atlas, R.M., 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 7, 285–292.
- Ausili, A., Gabellini, M., Cammarata, G., Fattorini, D., Benedetti, M., Pisanelli, B., Gorbi, S., Regoli, F., 2008. Ecotoxicological and human health risk in a petrochemical district of southern Italy. *Mar. Environ. Res.* 66 (1), 215–217.
- Bellucci, L.G., Giuliani, S., Romano, S., Albertazzi, S., Mugnai, C., Frignani, M., 2012. Effects of prokaryotic diversity changes on hydrocarbon degradation rates and metal partitioning during bioremediation of contaminated anoxic marine sediment. *Mar. Pollut. Bull.* 64 (8), 1688–1698.
- Beolchini, F., Rocchetti, L., Regoli, F., Dell'Anno, A., 2010. Bioremediation of marine sediment contaminated by hydrocarbons: experimental analysis and kinetic modeling. *J. Hazard. Mater.* 182 (1–3), 403–407.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Bonsignore, M., Salvaggio Manta, D., Oliveri, E., Sprovieri, M., Basilone, G., Bonanno, A., Falco, F., Traina, A., Mazzola, S., 2013. Mercury in fishes from Augusta Bay (southern Italy): risk assessment and health implication. *Food Chem. Toxicol.* 56, 184–194.
- Brown, E.J., Braddock, J.F., 1990. Sheen Screen, a miniaturized Most-Probable-Number method for enumeration of oil-degrading microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (12), 3895–3896.
- Cappello, S., Genovese, M., Della Torre, C., Crisari, A., Hassanshahian, M., Santisi, S., Calogero, R., Yakimov, M.M., 2012. Effect of bioemulsificant exopolysaccharide (EPS<sub>2003</sub>) on microbial community dynamics during assays of oil spill bioremediation: a microcosm study. *Mar. Pollut. Bull.* 64 (12), 2820–2828.
- Cappello, S., Caruso, G., Zampino, D., Monticelli, L.S., Maimone, G., Denaro, R., Tripodo, B., Troussellier, M., Yakimov, M.M., Giuliano, L., 2007a. Microbial community dynamics during assays of harbour oil spill bioremediation: a microscale simulation study. *J. Appl. Microbiol.* 102 (1), 184–194.
- Cappello, S., Denaro, R., Genovese, M., Giuliano, L., Yakimov, M.M., 2007b. Predominant growth of *Alcanivorax* during experiments on “oil spill bioremediation” in mesocosms. *Microbiol. Res.* 162, 185–190.
- Castle, D.M., Montgomery, M.T., Kirchman, D.L., 2006. Effects of naphthalene on microbial community composition in the Delaware estuary. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56 (1), 55–63.
- Chaillan, F., Le Flèche, A., Bury, E., Phantavong, Y.H., Grimont, P., Saliot, A., Oudot, J., 2004. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon degrading microorganisms. *Res. Microbiol.* 155 (7), 587–595.
- Córdova-Kreylos, A.L., Cao, Y., Green, P.G., Hwang, H.M., Kuivila, K.M., LaMontagne, M.G., Van De Werfhorst, L.C., Holden, P., Scow, K.M., 2006. Diversity, composition, and geographical distribution of microbial communities in California salt marsh sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3357–3366.
- Cui, Z., Lai, Q., Dong, C., Shao, Z., 2008. Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from deep sea sediment of the Middle Atlantic Ridge. *Environ. Microbiol.* 10 (8), 2138–2149.
- Dell'Anno, A., Beolchini, F., Rocchetti, L., Luna, G.M., Danovaro, R., 2012. High bacterial biodiversity increases degradation performance of hydrocarbons during bioremediation of contaminated harbor marine sediment. *Environ. Pollut.* 167, 85–92.
- Denaro, R., D'Auria, G., Di Marco, G., Genovese, M., Troussellier, M., Yakimov, M.M., Giuliano, L., 2005. Assessing terminal restriction fragment length polymorphism suitability for the description of bacterial community structure and dynamics in hydrocarbon-polluted marine environments. *Environ. Microbiol.* 7 (1), 78–87.
- Di Leonardo, R., Mazzola, A., Tramati, C.D., Vaccaro, A., Vizzini, S., 2014. Highly contaminated areas as sources of pollution for adjoining ecosystems: the case of Augusta Bay (Central Mediterranean). *Mar. Pollut. Bull.* 89 (1–2), 417–426.
- Doni, S.C., Macci, Peruzzi E., Iannelli, R., Ceccanti, B., Masciandaro, G., 2013. Decontamination and functional reclamation of dredged brackish sediment. *Biodegradation* 24 (4), 499–512.
- Dyksterhouse, S.E., Gray, J.P., Herwig, R.P., Lara, J.C., Staley, J.T., 1995. *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediment. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 116–123.
- Emtiazi, G., Hassanshahian, M., Golbang, N., 2005. Development of a microtiter plate method for determination of phenol utilization, biofilm formation and respiratory activity by environmental bacterial isolates. *Int. Biodeter. Biodegr.* 56, 231–235.
- Findlay, R.H., Trexler, M.B., Guckert, J.B., White, D.C., 1990. Laboratory study of disturbance in marine sediment: response of a microbial community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 62, 135–148.
- Floodgate, G.D., 1972. Biodegradation of hydrocarbons in the sea. In: Mitchell, R. (Ed.), *Water Pollution Microbiology*. Wiley-Interscience, New York, pp. 153–171.
- Genovese, M., Crisafi, F., Denaro, R., Cappello, S., Russo, D., Calogero, R., Santisi, S., Caltafamo, M., Modica, A., Smedile, F., Genovese, L., Golyshin, P.N., Giuliano, L., Yakimov, M.M., 2014. Effective bioremediation strategy for rapid in situ cleanup of anoxic marine sediment in mesocosm oil spill simulation. *Front. Microbiol.* 5, 162.
- Gibson, D.T., Saylor, G.S., 1992. Scientific Foundations of Bioremediation: Current Status and Future Needs. American Academy of Microbiology, Washington, DC.
- Guibert, L.M., Loviso, C.L., Marcos, M.S., Commendatore, M.G., Dionisi, H.M., Lozada, M., 2012. Alkane biodegradation genes from chronically polluted subantarctic coastal sediment and their shifts in response to oil exposure. *Microb. Ecol.* 64, 605–616.
- Gutierrez, T., Singleton, D.R., Berry, D., Yang, T., Aitken, M.D., Teske, A., 2013. Hydrocarbon-degrading bacteria enriched by the Deepwater Horizon oil spill identified by cultivation and DNA-SIP. *ISME J.* 7, 2091–2104.
- Hara, A., Syutsubo, K., Harayama, S., 2003. *Alcanivorax* which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation. *Environ. Microbiol.* 5, 746–753.
- Hassanshahian, M., Emtiazi, G., 2008. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 62, 170–178.
- Hassanshahian, M., Emtiazi, G., Cappello, S., 2012. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 7–12.
- Head, I.M., Jones, D.M., Röling, W.F., 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat. Rev. Microbiol.* 4 (3), 173–182.
- Holt, S.G., Krieger, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T., 1998. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins, New York.
- ISPRA-APAT (Istituto Superiore per la protezione e la Ricerca Ambientale – Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici), 2007. *6770 Manuale per la movimentazione di sedimenti marini*. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del territorio e del Mare.
- ISPRA (Istituto Superiore per la protezione e la Ricerca Ambientale), 2010. *Elaborazione e Valutazione Dei Risultati Della Caratterizzazione Ai Fini Della Individuazione Degli Opportuni Interventi Di Messa In Sicurezza E Bonifica Del Litorale Di Priolo Dalla Diga Foranea Della Rada Di Augusta Al Porto Grande Di Siracusa*.
- Iwaki, H., Nishimura, A., Hasegawa, Y., 2012. Isolation and characterization of marine bacteria capable of utilizing phthalate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28 (3), 1321–1325.
- Jarvis, I.W., Dreij, K., Mattsson, Å., Jernström, B., Stenius, U., 2014. Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures and implications for cancer risk assessment. *Toxicology* 321, 27–39.
- Jin, H.M., Kim, J.M., Lee, H.J., Madsen, E.L., Jeon, C.O., 2012. *Alteromonas* as a key agent of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in crude oil-contaminated coastal sediment. *Environ. Sci. Technol.* 46 (14), 7731–7740.
- Kanoh, K., Adachi, K., Katsuta, A., Shizuri, Y., 2008. Structural determination and proposed biosynthesis of alcanivorone, a novel alpha-pyrone produced by *Alcanivorax jadensis*. *J. Antibiot.* 61 (2), 70–74.
- Kasai, Y., Kishira, H., Sasaki, T., Syutsubo, K., Watanabe, K., Harayama, S., 2002. Predominant growth of *Alcanivorax* strains in oil-contaminated and nutrient-supplemented sea water. *Environ. Microbiol.* 4 (3), 141–147.

- Kaur, A., Chaudhary, A., Kaur, A., Choudhary, R., Kaushik, R., 2005. Phospholipid fatty acid – a bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Curr. Sci.* 89 (7), 1103–1112.
- Kelly, J., Häggblom, M., Tate, R., 2003. Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter as indicated by analysis of microbial community phospholipid fatty acid profiles. *Biol. Fertil. Soils* 38, 65–71.
- Kelly, J.R., Scheibling, R.E., 2012. Fatty acids as dietary tracers in benthic food webs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 446, 1–22.
- Kuwaie, T., Hosokawa, Y., 1999. Determination of abundance and biovolume of bacteria in sediment by dual staining with 4',6'-diamidino-2-phenylindole and acridine orange: relationship to dispersion treatment and sediment characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (8), 3407–3412.
- Lane, D.J., 1991. 16/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley, New York, pp. 115–175.
- Langworthy, D.E., Stapleton, R.D., Sayler, G.S., Findlay, R.H., 2002. Lipid analysis of the response of a sedimentary microbial community to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Microb. Ecol.* 43, 189–198.
- Leahy, J.G., Colwell, R.R., 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54, 305–315.
- Maidak, B.L., Olsen, G.J., Larsen, N., Overbeek, R., McCaughey, M.J., Woese, C.R., 1997. The RDP (ribosomal database project). *Nucleic Acids Res.* 25 (1), 109–111.
- McGenity, T.J., 2014. Hydrocarbon biodegradation in intertidal wetland sediment. *Curr. Opin. Biotechnol.* 27, 46–54.
- McGenity, T.J., Folwell, B.D., McKew, B.A., Sanni, G.O., 2012. Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquat. Biosyst.* 8 (1), 10.
- Moreno, R., Jover, L., Diez, C., Sardà-Palamera, F., Sanpera, C., 2013. Ten years after the prestige oil spill: seabird trophic ecology as indicator of long-term effects on the coastal marine ecosystem. *PLoS One* 8 (10), e77360.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.
- Napolitano, G.E., Hill, W.R., Guckert, J.B., Stewart, A.J., Nold, S.C., White, D.C., 1994. Changes in periphyton fatty acid composition in chlorine-polluted streams. *J. North Am. Benthol. Soc.* 13, 237–249.
- Newton, R.J., Huse, S.M., Morrison, H.G., Peake, C.S., Sogin, M.L., McLellan, S.L., 2013. Shifts in the microbial community composition of gulf coast beaches following beach oiling. *PLoS One* 8, e74265.
- Ni Chadhain, S.M., Norman, R.S., Pesce, K.V., Kukor, J.J., Zylstra, G.J., 2006. Microbial dioxygenase gene population shifts during polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4078–4087.
- Nocker, A., Burr, M., Camper, A.K., 2007. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microb. Ecol.* 54, 276–289.
- Parrish, C., 2013. Lipids in marine ecosystems ISRN. *Oceanography*, 1–16.
- Porter, K.G., Feig, Y.S., 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25, 943–948.
- Prince, R.C., McFarlin, K.M., Butler, J.D., Febbo, E.J., Wang, F.C., Nedwed, T.J., 2013. The primary biodegradation of dispersed crude oil in the sea. *Chemosphere* 90 (2), 521–526.
- Rocchetti, L., Beolchini, F., Ciani, M., Dell'Anno, A., 2011. Improvement of bioremediation performance for the degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sediment. *Appl. Environ. Soil Sci.* <http://dx.doi.org/10.1155/2011/319657>.
- Rocchetti, L., Beolchini, F., Hallberg, K.B., Johnson, B., Dell'Anno, A., 2012. Effects of prokaryotic diversity changes on hydrocarbon degradation rates and metal partitioning during bioremediation of contaminated anoxic marine sediment. *Mar. Pollut. Bull.* 64 (8), 1688–1698.
- Röling, W.F.M., Milner, M.G., Martin Jones, D., Fratepietro, F., Swannell, R.P.J., Daniel, F., Head, I.M., 2004. Bacterial community dynamics and hydrocarbon degradation during a field-scale evaluation of bioremediation on a mudflat beach contaminated with buried oil. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (5), 2603–2613.
- Ron, E.Z., Rosenberg, E., 2014. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. *Curr. Opin. Biotechnol.* 27, 191–194.
- Rulkens, W.H., Bruning, H., 2005. Cleanup technologies for dredged fine sediment: review and future challenges. In: Olfenbittel, R.F., White, P.J. (Eds.), *Remediation of Contaminated Sediment – 2005: Finding Achievable Risk Reduction Solutions*. Proceedings of the Third International Conference on Remediation of Contaminated Sediment. Battelle Press, Columbus, Ohio, USA (New Orleans, La, USA), p. C6-01 (January, 2005).
- Schneiker, S., Dos Santos, P.M., Bartels, D., Bekel, T., Brecht, M., Buhrmester, J., et al., 2006. Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Nat. Biotechnol.* 24, 997–1004.
- Sprovieri, M., Oliveri, E., Di Leonardo, R., Romano, E., Ausili, A., Gabellini, M., et al., 2012. An integrated approach to the assessment of pollutant delivery chronologies to impacted areas: Hg in the Augusta Bay (Italy). *Environ. Sci. Technol.* 46 (4), 2040–2046.
- Sun, M.Y., Dafforn, K.A., Brown, M.V., Johnston, E.L., 2012. Bacterial communities are sensitive indicators of contaminant stress. *Mar. Pollut. Bull.* 64 (5), 1029–1038.
- Teramoto, M., Queck, S.Y., Ohnishi, K., 2013. Specialized hydrocarbonoclastic bacteria prevailing in seawater around a port in the Strait of Malacca. *PLoS One* 8 (6), e66594.
- Teramoto, M., Ohuchi, M., Hatmanti, A., Darmayati, Y., Widayastuti, Y., Harayama, S., Fukunaga, Y., 2011. *Oleibacter marinus* gen. nov., sp. nov., a bacterium that degrades petroleum aliphatic hydrocarbons in a tropical marine environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 375–380.
- Timmis, K.T., Golyshin, P.N., Giuliano, L., 2005. Natural microbial diversity in superficial sediment of Milazzo Harbour (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons. *Environ. Microbiol.* 7 (9), 1426–1441.
- Troussellier, M., Got, P., Mboup, M., Corbin, D., Giuliano, L., Cappello, S., Bouvy, M., 2005. Daily bacterioplankton dynamics in a sub-Saharan estuary (Senegal River, West Africa): a mesocosm study. *Aquat. Microb. Ecol.* 40 (1), 13–24.
- Wang, L.Y., Ke, W.J., Sun, X.B., Liu, J.F., Gu, J.D., Mu, B.Z., 2014. Comparison of bacterial community in aqueous and oil phases of water-flooded petroleum reservoirs using pyrosequencing and clone library approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 4209–4221.
- Wang, Y.F., Tam, N.F., 2012. Natural attenuation of contaminated marine sediment from an old floating dock Part II: Changes of sediment microbial community structure and its relationship with environmental variables. *Sci. Total Environ.* 423, 95–103.
- White, D.C., Davis, W.M., Nickels, J.S., King, J.D., Bobbie, R.J., 1979. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia* 40, 51–62.
- Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Golyshin, P.N., 2007. Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 257–266.
- Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., Lang, S., Moore, E.R.B., Abraham, W.R., Lunsdorf, H., Timmis, K.N., 1998. *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 339–348.
- Yakimov, M.M., Cappello, S., Crisafi, E., Tursi, A., Corselli, C., Scarfi, S., Giuliano, L., 2006. Phylogenetic survey of metabolically active microbial communities associated with the deep-sea coral *Lophelia pertusa* from the Apulian Plateau, Central Mediterranean Sea. *Deep-Sea Res.* 53, 62–75.



# Polycaprolactone-based scaffold for oil-selective sorption and improvement of bacteria activity for bioremediation of polluted water

## Porous PCL system obtained by leaching melt mixed PCL/PEG/NaCl composites: Oil uptake performance and bioremediation efficiency

Roberto Scaffaro<sup>a,\*</sup>, Francesco Lopresti<sup>a</sup>, Valentina Catania<sup>b</sup>, Santina Santisi<sup>c</sup>, Simone Cappello<sup>c</sup>, Luigi Botta<sup>a</sup>, Paola Quatrini<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Civil, Environmental, Aerospace and Materials Engineering, University of Palermo, RU INSTM of Palermo, Viale delle Scienze, blg. 6, 90128 Palermo, Italy

<sup>b</sup> Dept. of Biological, Chemical and Pharmaceutical Sciences and Technologies (STEBICEF), University of Palermo, Viale delle Scienze, blg. 16, 90128 Palermo, Italy

<sup>c</sup> Institute for Coastal Marine Environment (IAMC) – CNR of Messina, Spianata San Raineri, 86, 98121 Messina, Italy

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Melt polymer processing  
Oil/water separation  
Biodegradable polymeric sponge  
*Alcanivorax*  
*Nocardia*

### ABSTRACT

A novel floatable and biodegradable sponge for the selective absorption of oil from water and potentially useful as cell carrier for bioremediation treatments was prepared in polycaprolactone (PCL). The eco-friendly process for fabricating the PCL sponge does not involve either synthetic routes or organic solvents, thus minimizing environmental hazard. In particular, the 3D porous materials have been prepared by mixing in the melt the polymer matrix with two water-soluble porogen agents (NaCl and PEG) and thereafter leaching the obtained PCL/NaCl/PEG composites in water. The PCL sponges here proposed are capable to remove different types of oily pollutants (up to 500 wt%), and were successfully tested as carrier materials of hydrocarbon(HC)-degrading bacteria for bioremediation. The bioremediation efficiency of the scaffold-bacteria system was analyzed on crude oil and *n*-alkanes using two highly performant HC-degrading bacterial strains: the marine hydrocarbonoclastic model strain *Alcanivorax borkumensis* SK2 and the soil long-chain *n*-alkane degrader *Nocardia* sp. SoB.

Morphological analysis highlighted a high capacity of adhesion and proliferation of bacterial cells within the whole interconnected three-dimensional structure. HC degradation rates, evaluated by GC-FID analysis, demonstrated the higher degrading performance of immobilized-cells if compared with conventional submerged liquid culture.

### 1. Introduction

Oil pollution is one of the environmental concerns that are currently becoming a major issue in the petroleum industry. The

\* Corresponding author.

E-mail address: [roberto.scaffaro@unipa.it](mailto:roberto.scaffaro@unipa.it) (R. Scaffaro).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.04.015>

Received 25 January 2017; Received in revised form 11 April 2017; Accepted 12 April 2017

Available online 13 April 2017

0014-3057/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

current methods of controlling oil spills include using booms [1], skimming [2], and burning the oil on the surface of the water [3]. These techniques are time consuming and energy inefficient, and they create pollution and require excessive energy for recovery of the oil. Therefore, it is preferable to use sorbents to recover the spilled oils because of their peculiar properties such as uptake capacity, uptake rate, buoyancy, oil retention, durability, reusability and recoverability of the oil that has been absorbed by the sorbent.

Several strategies were proposed in order to achieve porous devices which can fulfill the basic requirements of high absorption capacity, low costs and high efficiency. The fabrication of absorbent devices considered the use of a large variety of materials, ranging from polymeric [4–7] to inorganic [8,9]. Despite the considerable efforts, there are still several challenges that have to be addressed to overcome strong limitations, such as complex and expensive fabrication routes, environmental incompatibility, poor recyclability [10,11].

The most often used polymers are polypropylene, polyethylene, or polyurethane [12]. These products are quite efficient, but one of their major drawbacks is their non-biodegradability. Natural materials include the following: (i) mineral products, such as perlite which sorption capacity ( $q$ ) is generally around 6 g/g [13]; (ii) animal-derived materials such as wool ( $q = 16$  g/g) [14]; and (iii) vegetable products, such as barley straw ( $q = 7$  g/g), cotton ( $q = 20$  g/g), kapok ( $q = 25$  g/g) [15].

In this context, bioremediation is often considered a promising and cost-effective technology that could help a more effective and sustainable recovery of contaminated water by using oil-degrading microorganisms endowed with high catabolic abilities [16,17]. This technology can be considered sustainable from an economic point of view because does not require physicochemical such as the use of surfactants [16,17]. One challenge for bioremediation is maintaining high biomass of bacterial populations even after a prolonged period or obtaining bioaugmentation of highly efficient bacteria in confined environments [18]. Cell immobilization in porous sorbent materials can be a key challenge to improve the survival and retention of the bioremediation agents in the contaminated sites. In fact, immobilized cells have been extensively used in the production of useful chemicals, treatment of wastewaters and bioremediation of pollution cause of its longer operating lifetime and enhanced stability and survival of the cells [18–22]. Ideally, the cell-carrier material would be biodegradable, available in large quantities, and have the appropriate chemical/physical properties to allow for sufficient adhesion of specific microorganisms useful for bioremediation [23,24].

In this context, over the recent years, biodegradable polymers attracted much interest due to their bioactive properties with living cells [25–27]. Among these, polycaprolactone (PCL) gained both industrial and academic interest due to its peculiar properties, in terms of biodegradation, biocompatibility and mechanical properties. For these reasons, it is used for a wide range of applications, such as drug delivery systems [28,29] tissue-engineered devices [30–32] and bioprocess intensification [21] with a particular focus on the preparation of sponge-like devices.

In this work, it is proposed for the first time a PCL-based biodegradable and floatable oil removal sponge (ORS) able to immobilize and increase biodegradation ability of hydrocarbon degrading bacteria for bioremediation purpose.

The ORS preparation route can be considered sustainable from economic and environmental point of view since it was performed by melt, without using organic solvent, expensive and potentially dangerous for the environment. The intrinsic lipophilic nature of PCL made the porous device able to selectively absorb oily pollutants with high efficiency and high rate of reusability. The devices were characterized from morphological, oily waste uptake and mechanical point of view by considering three different oily waste (olive oil, motor oil, gasoline) and up to fifty recycles.

Furthermore, in order to apply the ORS to bioremediation scenarios purposes the device was used to immobilize hydrocarbon degrading bacteria and the resulting system tested for biodegradation efficiency on crude oil. Microorganisms are known to mitigate, degrade or reduce hydrocarbons to innocuous compounds such as  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  and biomass without adversely affecting the environment and biodegradation pathways have been widely described and reviewed elsewhere (see for example [33]). To this aim, two bacterial strains with high oil degradation capability were chosen: the obligate marine hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis* SK2 (class Gammaproteobacteria) [34] and the soil, long-chain *n*-alkane degrader *Nocardia* sp. SoB (class Actinobacteria) [17]. The tests demonstrated the higher degrading performance of immobilized cells if compared with conventional submerged liquid culture.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials and processing

PCL ( $M_w = 80$  kDa,  $\rho = 1.145$  g/cm<sup>3</sup>), polyethylene glycol (PEG) ( $M_w = 2000$  Da,  $\rho = 1.12$  g/cm<sup>3</sup>), and Sodium Chloride (NaCl) (purity > 99%,  $\rho = 2.17$  g/cm<sup>3</sup>) were purchased by Sigma Aldrich. PCL and PEG were used as received without any further treatment, whereas NaCl was sieved in order to select only the fraction of 75–110  $\mu\text{m}$  particle size.

As standard oily waste, three commercial systems were chosen: olive oil and motor oil as high boiling point pollutants, and gasoline as volatile waste. Olive oil (density = 0.91 g/cm<sup>3</sup>; kinematic viscosity = 43.2 mm<sup>2</sup>/s at 40 °C) was purchased from Sigma–Aldrich; motor oil (density = 0.87 g/cm<sup>3</sup> kinematic viscosity = 97.7 mm<sup>2</sup>/s at 40 °C) and gasoline (density = 0.68 g/cm<sup>3</sup>; kinematic viscosity = 2 mm<sup>2</sup>/s) were supplied by Total S.A.

The olive oil chemical composition is made up primarily of triacylglycerols and the group of glyceridic compounds made up of free fatty acids and mono- and di-acylglycerols while other fatty acid derivatives such as phospholipids, waxes and esters of sterols are traditionally classified into the set of minor compounds [35].

This motor oil is a commercial 10W-40 system purchased by Total S.A. The chemical composition of this oil consists of hydrocarbons with between 18 and 34 carbon atoms per molecule.

The chemical composition the gasoline used in the frame of this work consists of hydrocarbons with between 4 and 12 carbon atoms per molecule. It is a mixture of alkanes, cycloalkanes and alkenes.

ORS were prepared by melt mixing. Briefly, PCL, PEG and NaCl (11/7/82%wt), were fed to an internal batch mixer (Brabender PLE-330, T = 100 °C, rotor speed = 64 rpm) and processed until a constant value of torque was achieved, usually after about 10 min. The blend was then fed out and rapidly cooled in liquid nitrogen. To avoid hydrolytic scission during processing, PCL and NaCl were vacuum dried overnight, respectively at 40 °C and 105 °C, prior to use.

The blends were then compression molded in a Carver laboratory press at 100 °C and 180 bar in appropriate cylindrical molds with a diameter of 15 mm and a height of 10 mm.

Finally, the porogen part of the blends (NaCl and PEG) was removed by selective leaching in distilled water for 3 h at 50 °C. The resulting structures were then left to dry for 12 h at room temperature. PEG was chosen as organic water soluble porogen phase because it is partially miscible with PCL. It was expected to create a microporous network able to enhance pore interconnection, as discussed in our previous works [21,31,32].

## 2.2. Characterizations

Scanning electron microscopy, (SEM, Phenom ProX, PhenomWorld) was used to image the cross sections of the sponges. The samples, broken under liquid nitrogen, were attached on an aluminum stub using an adhesive carbon tape and then sputter coated with gold (Sputtering Scancoat Six, Edwards) for 90 s under argon atmosphere before imaging to avoid electrostatic discharge during the test.

Contact-angle measurements were performed on FTA 1000 (Ten Angstrom) equipment by using distilled water as liquid phase.

In order to detect the effect of waste typology and number of recycles on the mechanical behavior of the samples, simple uniaxial compression tests were performed on at least five specimens of each type, by using a universal material testing machine (INSTRON 3365 (UK) equipped with a 1 kN load cell. Dry specimens were placed directly on a stiff flat aluminum substrate and compressed with a cross-head speed of 1 mm/min until 80% strain to measure the compressive modulus ( $E_1$ ) in the first linear part of the stress-strain curve, and the plastic modulus ( $E_2$ ), characteristic of the densification phenomena.

The parameters describing the porous properties of ORS were obtained by gravimetric measurements. Theoretical porosity, porosity and connectivity were calculated according to the following equations [25]:

$$Porosity_{Theoretical} (\%) = \frac{m_{NaCl}/\rho_{NaCl} + m_{PEG}/\rho_{PEG}}{m_{NaCl}/\rho_{NaCl} + m_{PEG}/\rho_{PEG} + m_{PCL}/\rho_{PCL}} \times 100\% \quad (1)$$

$$Porosity (\%) = \left(1 - \frac{\rho_{sponge}}{\rho_{PCL}}\right) \times 100 \quad (2)$$

$$Connectivity = \frac{(m_0 - m_{dry})}{m_{NaCl} + m_{PEG}} \times 100\% \quad (3)$$

where  $m_{NaCl}$ ,  $m_{PEG}$  and  $m_{PCL}$ , are the theoretical masses of NaCl, PEG, and PCL respectively.

$m_0$  is the weight of ternary blend before leaching;  $m_{dry}$  the weight of the sponge dried after leaching;  $\rho_{scaffold}$  is the apparent density of the sponge.

The densities ( $\rho$ ) of NaCl, PEG and PCL are 2.16 g/cm<sup>3</sup>, 1.12 g/cm<sup>3</sup> e 1.145 g/cm<sup>3</sup>, respectively.

Theoretical porosities were calculated by assuming the complete solvation of porogen agents. The real porosity was calculated by using Eq. (2) as the reciprocal of the ratio between the apparent density of the sponge ( $\rho_{sponge}$ ) and the non-porous PCL material density ( $\rho_{PCL}$ ). It also expresses the ratio between the empty and the full volume of the sponge.

Connectivity is a measure of the continuity of the porogen phases and was evaluated by using Eq. (3), which takes into account the weight variation of the sponge before and after the porogen agent extraction.

The maximum amount of oily waste absorbable by the sponge was evaluated by immersing the samples in a becker containing only the oily pollutant.

The ORS selectivity was evaluated by immersing ORS in a biphasic system containing the water and the maximum amount of oily waste absorbable from the sponge i.e. around 1.4 g of oil in 20.0 g of water, for 0.3 g of ORS. In particular it was compared the weight of the water (before adding oil) and the weight of the biphasic mixture after the immersion and removal of the ORS. Furthermore, in order to verify the presence of oil in the water after the uptake, it was evaporated and thereafter weighted in order to evaluate the presence of residues of oil.

The mass-based oil absorption capacity (oil uptake) was calculated according to Eqs. (4) and (5):[36]

$$Mass\text{-based oily uptake} (\%) = \left(\frac{m_{wet} - m_{dry}}{m_{dry}}\right) \times 100\% \quad (4)$$

While the swelling ratio, was evaluated according to Eq. (5):

$$Swelling (\%) = \left(\frac{V_{wet} - V_{dry}}{V_{dry}}\right) \times 100\% \quad (5)$$

where  $m_{\text{wet}}$ ,  $V_{\text{wet}}$ ,  $m_{\text{dry}}$ ,  $V_{\text{dry}}$  respectively indicate the weights and the volumes of the sponge before and after oil absorption.

The pores filled by oils were evaluated according to the following Eq. (6):

$$\text{Pores filled by oil-dry (\%)} = \left( \frac{V_{\text{oil}}}{V_{\text{empty}}} \right) \times 100\% \quad (6)$$

where,  $V_{\text{oil}}$  is the volume of oil filled in ORS; ( $V_{\text{empty}} = \text{Porosity} \times V_{\text{dry}}$ ) indicate the volume of empty space of ORS.

These measurements were performed with a precision balance (Sartorius AX224) with a resolution of  $\pm 0.1$  mg.

The reusability of the ORS was evaluated by removing the pollutant from the device by two methods depending on the boiling point of pollutant. High boiling point pollutants (motor oil and olive oil) were removed by rinsing ORS two times with 75 mL of diethyl ether for 30 min, in a soxhlet apparatus, in order to assess the possibility to recycle the ORS in a close system thus avoiding solvent loss. Thereafter, the ORS were dried for 6 h in a fume hood to remove the diethyl ether.

In the case of volatile waste (gasoline), the pollutant was removed from ORS by direct evaporation. The vapors were then collected and condensed for recycling. In particular, ORS were dried in a fume hood overnight. The minimum time necessary to totally remove the gasoline by simple evaporation was experimentally determined (data not reported).

### 2.3. Cultivation of *n*-alkane degrading bacteria

The two strains *Nocardia* sp. SoB and *Alcanivorax borkumensis* SK2 used in this study were originally isolated from natural environments by crude oil enrichments and belong to the collections of hydrocarbon-degrading bacteria held at the Institute for Coastal Marine Environment (IAMC)-CNR of Messina (*Alcanivorax*) and at the department STEBICEF of the University of Palermo (*Nocardia*). *Nocardia* sp. SoB [17] belongs to the class Actinobacteria and was isolated from a contaminated Mediterranean shoreline, it degrades a wide range of *n*-alkanes from  $C_8$  to  $C_{36}$  [37]. *Alcanivorax borkumensis* SK2 is considered a paradigm of marine 'hydrocarbonoclastic' bacteria [34] and degrades almost exclusively linear alkanes, cyclo-alkanes and isoprenoids. *Nocardia* sp. SoB was grown in the Bushnell–Haas mineral medium (BH; Difco) and *Alcanivorax borkumensis* SK2 was grown in ONR7a mineral medium [38]; both media were supplemented with 1% (v/v) of sterile hexadecane ( $C_{16}$ ; Sigma-Aldrich, Milan); the cultures were routinely incubated at  $30 \pm 1$  °C for 7 days in a rotary shaker (New Brunswick C24KC, Edison, NJ, USA; 200 × g).

### 2.4. Cell immobilization on the 3D PLC scaffold and scanning electron microscopy

*Nocardia* SOB and *A. borkumensis* SK2 were inoculated in 3 ml of mineral medium (BH and ONR7a, respectively) with one  $15 \times 10$  mm ORS previously soaked in 30  $\mu$ l of filter-sterilized hexadecane. Before treatment all ORS were washed in ethanol (70%) for 30 min, rinsed twice with sterile distilled water (30 min each) and finally exposed to a germicidal UV-C light (wavelength 253.7 nm) for 30 min. Abiotic controls were prepared with BH and ONR7a media containing the scaffold soaked with hexadecane without bacterial inoculation. The cultures and the abiotic controls were incubated for 48 h in a rotary shaker (New Brunswick C24KC, Edison, NJ, USA; 200 × g) at  $30 \pm 1$  °C. For SEM observation, the culture-incubated ORS were washed with PBS 1 × for 3 min, this step was repeated 3 times; the cells were fixed with glutaraldehyde 4% for 30 min at 4 °C. The samples were dehydrated with an increasing ethanol solution at room temperature (15, 30, 50, 75, 100%); each wash was performed for 3 min [39]. The bacterial adhesion and proliferation in ORS was evaluated using the scanning electron microscope (SEM) described above.

### 2.5. Oil degradation experiments in microcosms

#### 2.5.1. Scaffold-bacteria system preparation

Starter cultures were prepared by inoculating a loop of *Nocardia* SoB and *Alcanivorax* SK2 into 25 ml of BH or ONR7a mineral medium, respectively, supplemented with 1% (w/v) sterile hexadecane as a unique carbon source. The cultures were allowed to grow in a rotary shaker (New Brunswick C24KC, Edison NJ, USA; 200 × g) at  $30 \pm 1$  °C for 7 days. After 1 week, cells were harvested by centrifugation at 9000 × g for 10 min, washed twice with sterile medium, re-suspended in the sterile medium to an O.D.(600 nm) 0.1 and 1 ml of the suspension was inoculated into each microcosm. Microcosms were set-up in a 100-ml sterile Erlenmeyer flask containing 30 ml mineral medium (BH or ONR7a) and one ORS soaked in 30  $\mu$ l filter-sterilized oil (Arabian Light Crude Oil). Microcosms were incubated for 2, 4 and 6 days in a rotary shaker (New Brunswick C24KC, Edison, NJ, USA; 200 × g) at  $30 \pm 1$  °C. Abiotic controls (without bacteria) and free cells controls (without scaffold) were prepared in parallel in order to evaluate the degradation of each hydrocarbon due to purely physicochemical processes, and the degradation of free-cells cultures in respect to immobilized cells, respectively. Each microcosm was prepared in triplicate for every condition.

#### 2.5.2. GC-FID analysis of oil degradation

After removal of ORS from each microcosm, total extracted and resolved hydrocarbons and their derivatives (TERHCs), in liquid phase (medium), were analyzed by high-resolution GC–FID following the 3510 EPA (Environmental Protection Agency) as described by Gentile et al. [40]. After acidification of sample, the TERCHs were extracted at room temperature on a shaking table using dichloromethane ( $CH_2Cl_2$ , Sigma-Aldrich, Milan, Italy; 10% v/v). The TERCHS present in ORS were extracted using a slightly modified 3550C EPA (US Environmental Protection Agency) procedure [41,42] using hexane ( $C_6H_{14}$ , Sigma-Aldrich, Milan, Italy) as extraction solvent.



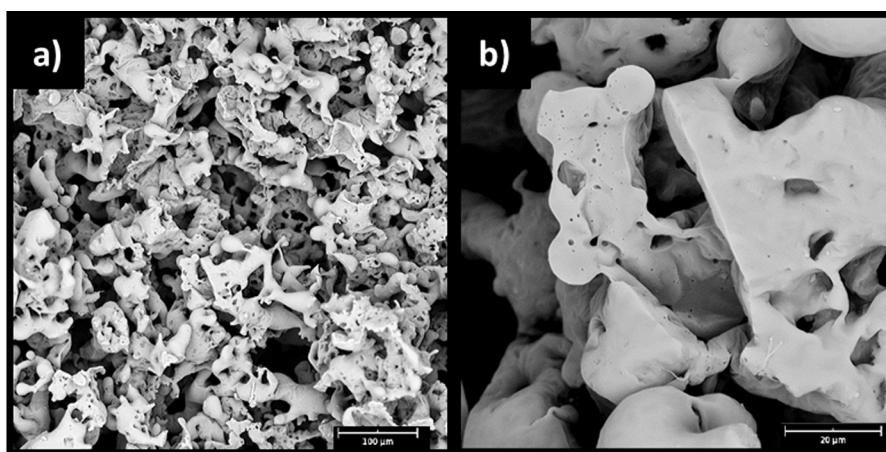


Fig. 1. SEM images of ORS at different magnifications, scale bar (a) 100  $\mu\text{m}$ ; (b) 20  $\mu\text{m}$ .

The extraction procedure (either for the medium or for the ORS) was repeated three times, and the solvent phase was combined and dehydrated with anhydrous sodium sulfate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , Sigma-Aldrich, Milan, Italy).

The extracts were concentrated by rotary evaporation (Rotavapor model R110; Büchi Labortechnik AG, Switzerland) at room temperature. As indicated, all measurements were performed using a DANI Master GC Fast Gas Chromatograph System (DANI Instruments S.p.A., Milan, Italy) equipped with a split/splitless SSL injector and FID detector. Samples (1  $\mu\text{l}$ ) were injected in the splitless mode at 330  $^\circ\text{C}$ . The analytical column was a Restek Rxi-5 Sil MS with Integra-Guard, 30 m  $\times$  0.25 mm (ID  $\times$  0.25- $\mu\text{m}$  film thickness). Helium carrier gas was maintained at a constant flow of 1.5 ml  $\text{min}^{-1}$ . Concentrations of TERCHs were calculated with the mean response factors of *n*-alkanes; that is, the individual *n*-alkane concentrations, pristane and phytane, were calculated [40].

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Morphology of ORS

Typical SEM images of PCL sponges are shown in Fig. 1a and b. The sponge morphology of ORS was characterized by a multimodal pore structure with distinct pore sizes and pore architectures. The macropores are homogeneously distributed in the polymer matrix as shown in Fig. 1a. The size of these macropores varies considerably throughout the scaffold from 50 to 100  $\mu\text{m}$ . It looks to depend on the size distribution of the salt particles added that were sieved in the range 75–125  $\mu\text{m}$ . Moreover the absence of salt crystals suggests that the dissolution of the porogen agents is complete. In addition to the macropores resulting from the leaching of salt crystals, a micropores network characterized by cylindrical pores with a maximum size of approximately 5  $\mu\text{m}$ , can be observed at higher magnification (Fig. 1b). The presence of these micropores can be reasonably ascribed to the presence of the PEG phase, partially miscible in PCL [31,32,43,44]. However, it is worth noting that the partial miscibility of the PCL/PEG combination arises from phase separation by spinodal decomposition induced by the crystallization of PCL during cooling [43]. Thus, the paths resulting from the extraction of PEG would be co-continuous and possibly with mesoporosity dimensions (rather than 5  $\mu\text{m}$  in diameter). Nevertheless, the NaCl crystals can be expected to strongly interact with PEG thus affecting the final phase separation of PEG and the consequent pores dimension and morphology. However, the presence of this microporous network is crucial for the whole interconnection of the sponge and to enlarge the specific area of the device.

#### 3.2. Porosity and connectivity

Porosity and connectivity are important parameters related to sponge-based devices. The first feature refers to the volume that could be potentially filled by fluids, the second influences the interconnection rate between pores by assuming that the porogen agents (NaCl and PEG) are removed by the fluid phase (Water) during the leaching step.

The sponges were designed with a theoretical volumetric porosity of 82%, assuming the complete extraction of porogen agents. The measurement of the real porosity of sponges, calculated according to Eq. (2), was 83.7%  $\pm$  0.5%. It was found to be higher than the theoretical one, presumably due to the loss of low amounts of PCL during leaching process and/or to small inhomogeneity of the blend itself.

The value of the connectivity measured according to Eq. (3) was around 99.5% for all the materials.

#### 3.3. Oil uptake

As shown in Fig. 2a, the porous and interconnected structure, appears to be highly hydrophobic thus showing potential interest in the removal of oily and hydrophobic pollutants. In fact, when a drop of water and a drop of olive oil were put onto the surface of the

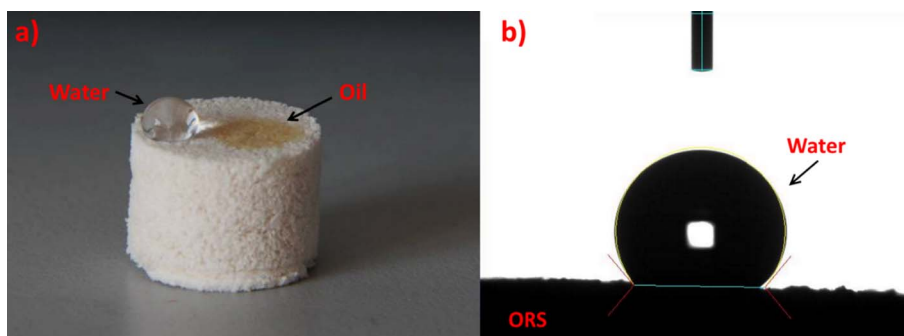


Fig. 2. Two drops of water and oil onto the surface of sponge. The drop of water remains onto the surface, while the drop of oil was immediately absorbed. In the inset, the water contact angle measurement of the virgin sponge.

sponge, the drop of oil was immediately absorbed, while the drop of water remained stable onto the surface of the sponge with a contact angle of 130 degrees (Fig. 2b).

Accordingly, when an ORS was placed in contact with a system simulating polluted waters, consisting of distilled water and olive oil, it was able, in a few seconds, to completely and selectively remove the organic pollutant from the water (see Fig. 3).

Indeed, when a sponge is placed onto the surface of a biphasic mixture (Fig. 3a) it is able to be around half-filled just within 4 s (Fig. 3b), and starts to sink after 8 s (Fig. 3c) indicating a filling higher than 50%. After 12 s (Fig. 3d) and 16 s (Fig. 3e) the sponge gradually absorb the pollutant up to completely entrap and remove it within only 20 s (Fig. 3f). Furthermore, since density of the ORS-oil system is lower than the water one, the sponge floated on the water surface, indicating a potential easy removal of oil spillage or any oily leakage. The selective oil uptake was evaluated by weighing the water before adding oil and the biphasic mixture after the immersion of the ORS. From this test, it was found that the water's weight after the ORS immersion and the subsequent removal was about the 99% of the initial weight. Moreover, in order to verify if the water even after the uptake contained still oil, it was evaporated and thereafter weighted finding that no residue was present. These findings suggest the selectivity of the ORS in removing the oil from water

With the aim to evaluate the possibility to recycle the ORS, we looked for a system able to remove the absorbed olive oil, but at the same time that do not damage the ORS. Exploiting the insolubility of polycaprolactone in different organic solvents [45], we chose diethyl ether as model solvent to clean-up and recycle the ORS, since its ability to dissolve oily compounds and without damaging PCL porous architecture. SEM images reported in Fig. 4a and b, show in fact that the morphology of ORS is the same of the virgin one reported in Fig. 1a and b.

Encouraged by these interesting results, we decided to evaluate the possibility to recycle the ORS up to fifty times and even to assess the effect of different pollutants, i.e. olive oil, motor oil and gasoline that differ for viscosity and chemical constitution. In fact, a good system with the capability to remove organic pollutants, should be able to remove oily waste with different properties and also reusable, thus permitting to recover the pollutants without affecting removal efficiency.

In order to characterize the absorptive capability of the ORS, we used the following parameters: mass and volume of seized

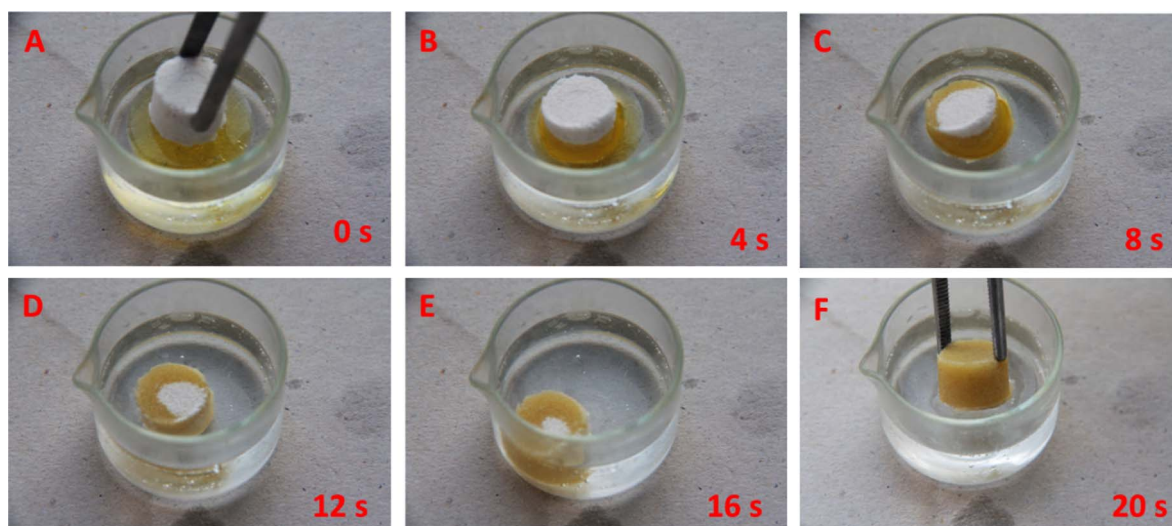


Fig. 3. Photo-frame every 4 s of a sponge immerse into the biphasic solution of water and olive oil. Initially the sponge float onto the surface, but while it is filling up, it starts to precipitate on the bottom of crystallizer.

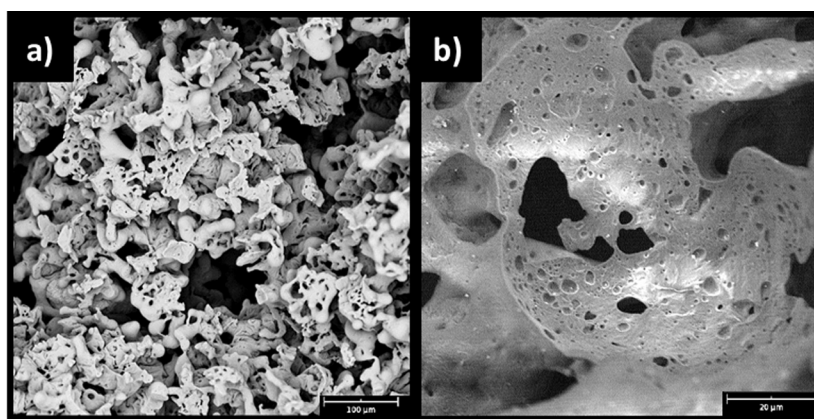


Fig. 4. SEM images of the ORS after cleaning up at different scale bar (a) 100  $\mu\text{m}$ ; (b) 20  $\mu\text{m}$ .

pollutant, and the correlated parameters, mass oil uptake% and percentage of pores filled by oils (accordingly respectively to Eqs. (4) and (6)) that are reported as a function of the cycle number in Fig. 5a–c. In particular, the results reported in Fig. 5a show that the ORS is able to absorb a similar weight of pollutants for all the fifty tested cycles although when the olive oil is used, a very slight decrease of the absorbed mass of pollutant can be observed on increasing the cycle number.

To take into account the different densities of the three used pollutant, their absorbed volume was reported in the same figure (Fig. 5a). Data showed that the largest volume of pollutants seized by ORS was of gasoline while the more viscous motor oil and olive oil showed a lower volume uptake.

This may be likely attributed to the lowest viscosity of gasoline and its consequent capability to completely fill even the smallest pores of ORS [46]. In fact, the capillary attraction of the oil is opposed by viscous forces (viscosity related) and gravity forces (related to density), which explains why the gasoline absorption is higher in terms of volume than the more viscous motor and olive oils. Between motor oil and olive oil the small difference in terms of volume uptake at the first cycle may be attributed to the chemical composition of the two pollutants. The fatty acids composing olive oil present probably less interaction with PCL thus inducing a lower volume uptake even if the viscosity of olive oil is about half of that of motor oil.

In Fig. 5b it is shown the weight of the ORS after every cycle, i.e. after absorbing the pollutant and the following cleaning up, normalized with respect to the pristine one. The weight of ORS remains the same after each cycle, indicating an optimal extraction and total removal of the pollutants.

Still, in Fig. 5b, when the results of oily uptake were shown in terms of mass-based oil uptake, a value up to 500% (respect to the original weight) can be observed. In particular it was higher for motor oil, gasoline and olive oil respectively.

But if the same data were reported as a function of pores filled by oil (evaluated according to Eq. (7) and shown in Fig. 5c) an unexpected result is observed. Indeed these values were unreasonably higher than 100%. In order to find a possible answer, we observed, that, when the ORS were put in contact with the pollutant, an increase of the volume of the sponges occurs. The swelling ratio changes depending on the analyzed systems and in particular it was 36% for the gasoline, 13% for the motor oil and 7% for the olive oil. Indeed, as shown in Fig. 5c, if the percentages of pores filled by water were normalized with respect to the volume of swelled sponges, the results get back under the reasonable 100%.

SEM analyses were performed on ORS used for the removal of the three standard pollutant after 10, 25 and 50 cycles, as shown in Fig. 6, to analyze the effect of wastes and of the clean-up on the morphology of the reused samples. After 10 and 25 cycles, all ORS samples showed morphology very similar to the virgin one (Fig. 1), thus likely suggesting that matrix surface is inert towards both the oily wastes and the diethyl ether used for the clean-up. Indeed, the multimodal pore structure seems to remain unchanged, as neither breakages nor discontinuity of the polymeric phase were detected.

After 50 cycles, huge differences could be noticed between the initial structure and the structures after absorption of motor oil and gasoline. In particular, it can be noticed a higher discontinuity of the internal structures in that samples. Moreover, the appearance of empty regions (around 300  $\mu\text{m}$ ) was clearly visible in ORS that absorbed motor oil and gasoline. ORS which absorbed olive oil after 50 cycles present a pore structure that seems to be less compromised with some empty regions which size did not exceed 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.4. Mechanical properties

The results of the compression tests were interpreted in terms of stress–strain curves for the several fabricated ORS. A typical stress–strain curve is shown in Fig. 7.

The plot put into evidence that ORS showed the typical behavior of polymeric foams under compression tests. It is possible to divide the plot into three different regions, i.e. linear, transition and densification region. All the samples showed an initial linear-elastic behavior associated with the bending of the pore walls. The compressive modulus ( $E_1$ ) was determined as the slope of the linear region in the stress–strain curve and it is reported in Fig. 8a as a function of the type of pollutant and the number of cycles. In the second region, it is possible to notice a transition attributable to the beginning of the plastic deformation [47,48]. In the last

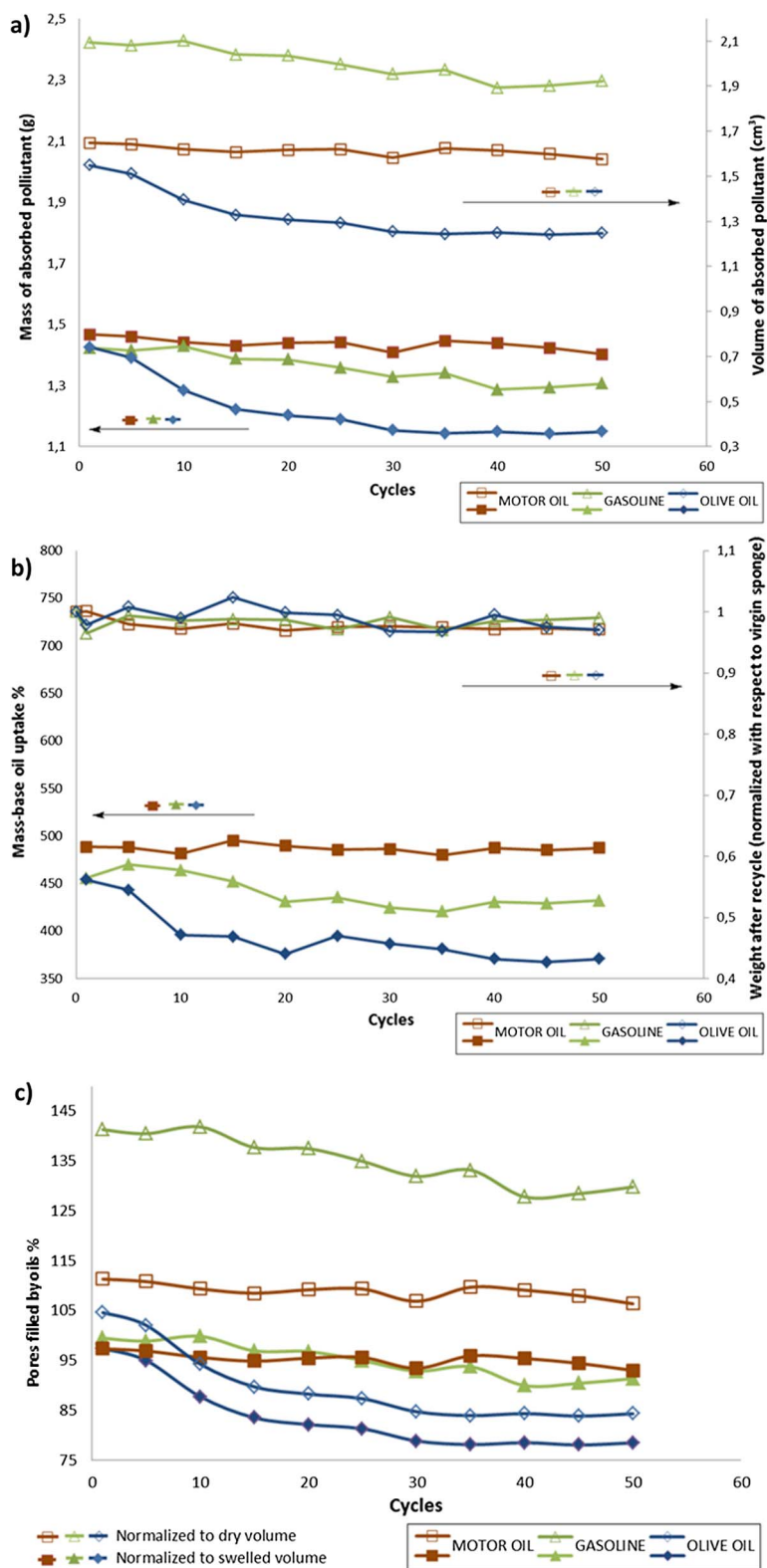


Fig. 5. (a) Mass and volume of absorbed pollutant versus number of cycles, (b) the weight of sponge after each cycle and mass-base oil uptake %, (c) pores filled by oils in relation to dry volume and swelled volume of the ORS.

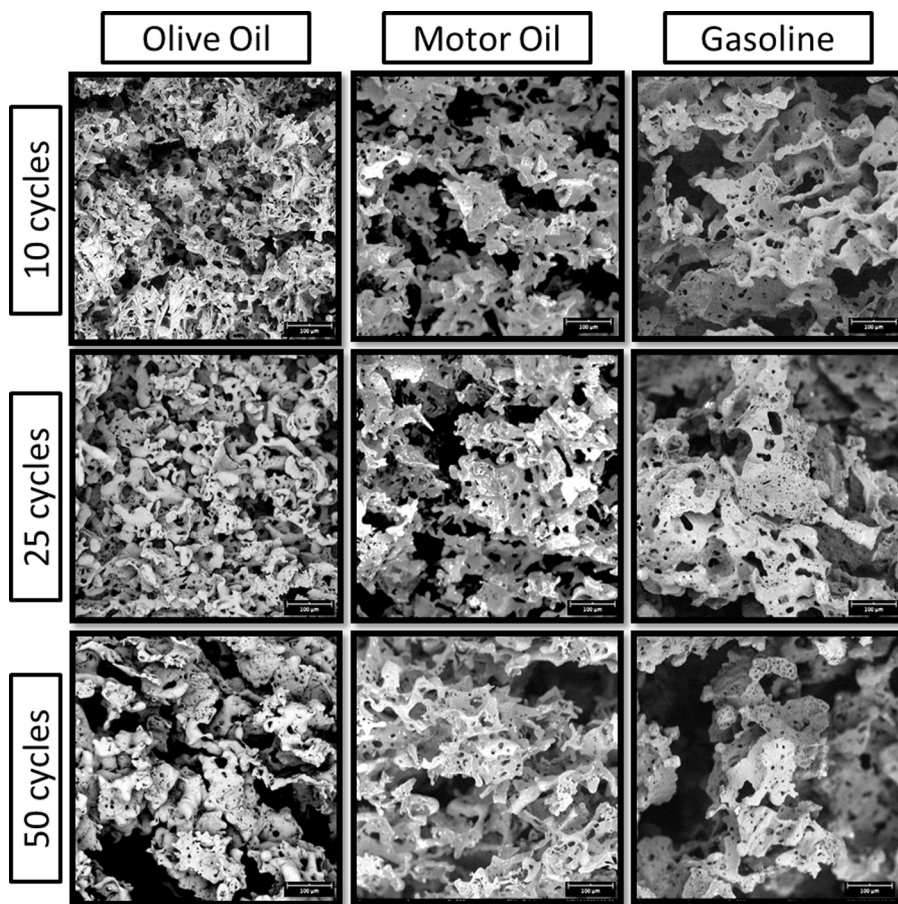


Fig. 6. SEM images of ORS morphology after 10, 25 and 50 recycles for different oily systems.

region of the plot, the stress was found again to vary linearly with the strain. In this latter case, the so-called plastic modulus ( $E_2$ ) measured was due to the densification phenomena occurring since the pore walls collapsed thus filling the voids. As consequence, a steep increasing in stress was measured.  $E_2$  as a function of the type of pollutant and of the number of the cycles is shown in Fig. 8b.

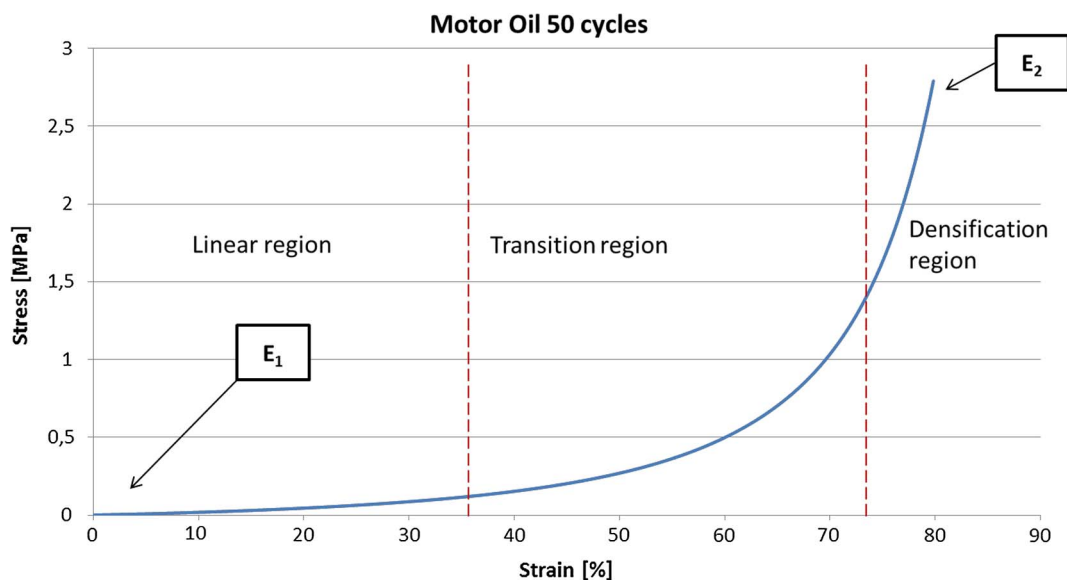


Fig. 7. Representative stress strain curve for ORS and points of evaluation of  $E_1$  and  $E_2$  parameters.

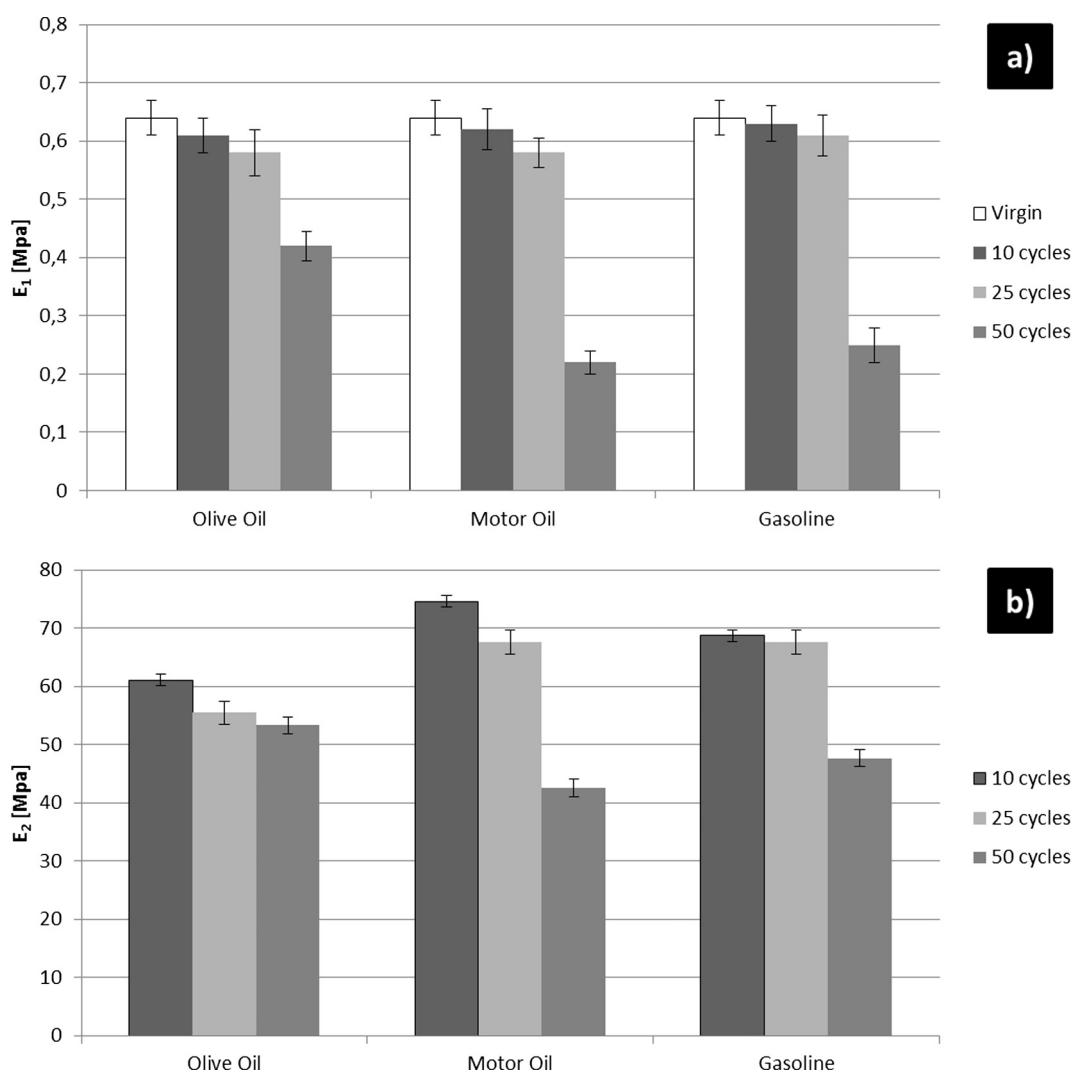


Fig. 8. Variation of  $E_1$  (a) and  $E_2$  (b) with the increasing of recycles for different oily systems.

Compressive modulus was found to be almost independent on the kind of pollutants up to 25 cycles. Meanwhile a large reduction of  $E_1$  value was visible at 50 cycles, although motor oil seems to get worse. Obviously a reduction of the  $E_1$  value can be attributed to the physical damage of the sponge due to the cycles of absorption and extraction of the pollutants.

The behavior of the  $E_2$  as a function of the typology of pollutants and of the number of cycles was very similar to that of  $E_1$ . The value was found to be 1000% higher than  $E_1$  because the porosity of the system was gradually reduced by densification phenomena but, in all the cases, a decrease with respect to the initial value was evident. The most remarkable difference can be observed at 50 cycles for motor oil and for gasoline wastes with a significant decrease of  $E_2$ .

By considering the effect on morphology and on mechanical properties of the different oils, probably ORS are more adequate for absorptions of olive oil rather than more aggressive oils.

### 3.5. Bacterial colonization of the PLC scaffolds

After 48 h co-incubation of oil-degrading bacteria with the PCL-based scaffolds, the ORS were observed at SEM. The images confirmed the high capacity of colonization by bacterial cells within the 3D structure. Both the external and internal portions of scaffolds have shown a significant adhesion and cell proliferation (Fig. 9A–D). No differences can be observed for the internal or external parts of the scaffold, which showed the same cell adhesion. ORS colonized by *Nocardia* SOB showed the presence of filamentous structures as highlighted by the arrow in Fig. 9B, probably due to the formation of biofilm, while no similar structures were observed in ORS incubated with *Alcanivorax* SK2. Both *Nocardia* and *Alcanivorax* are known to generate adhesive polysaccharide structures, leading to biofilm formation. *Alcanivorax* forms biofilm during growth on hexadecane producing considerable amount of extracellular polymeric substances (EPS), which appears to support the three-dimensional structure of a biofilm [49]; moreover

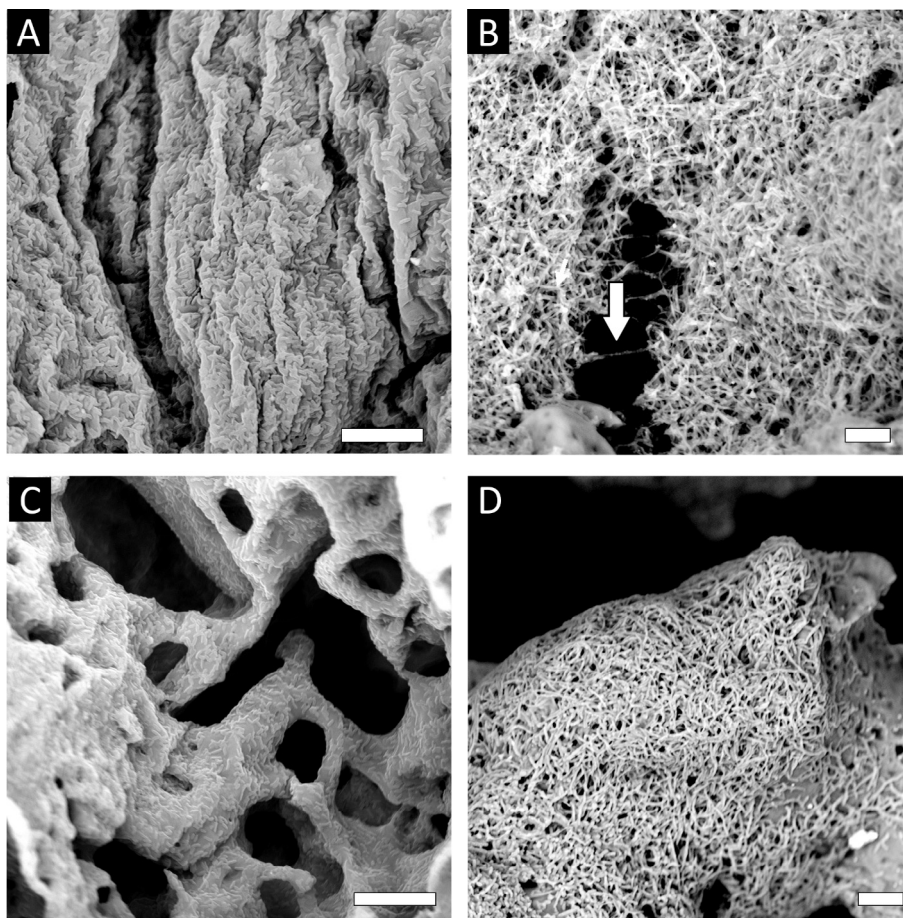


Fig. 9. SEM images of the *Alcanivorax SK2* and *Nocardia SoB* adhesion on the scaffold surface (A and B) and in the porous structure (C and D). Scale bars are 10  $\mu$ m. The arrow in picture B highlight the filamentous structure of *Nocardia SoB*.

*Alcanivorax* is known to produce bio-surfactants, which increase cell adhesion to the substrate [50]. One explanation for the absence of these fibers in our ORS is that the incubation period was too short to allow visible exopolysaccharide fiber formation.

The ability to adhere on various surfaces is advantageous for the microorganisms, immobilized cells have better chance of survival and adaptability and higher bioavailability of contaminants. Several studies reported that immobilization was a promoting factor for biodegradation respect to planktonic cells [24].

### 3.6. Oil biodegradation ability of the scaffold-bacteria systems

The bioremediation efficiency of our scaffold-bacteria systems was tested in microcosms on crude oil (Arabian light crude oil). The total hydrocarbon residues were extracted after 2, 4, and 6 days of incubation from microcosms inoculated with *Nocardia SoB* and *Alcanivorax SK2*. More than 40% and 50% oil was degraded after 6 days in the presence of *Nocardia* and *Alcanivorax*, as reported in Fig. 10A and B respectively.

The degradation by immobilized bacteria was more rapid since the second day incubation in respect to degradation carried out without the scaffolds; after six days incubation more than 55% and 65% of the oil was removed by the immobilized *Nocardia* and *Alcanivorax* respectively. The immobilized cells removed about 10–15% more respect to the planktonic cells. The ORS provided suitable and protective niches for bacteria in which to carry out fast degradation. The stable microenvironments may protect immobilized bacterial cells from adverse environmental factors and improve the affinity between the hydrophobic immobilization material and the substrates leading enhances the degradation rate. Several studies have demonstrated that immobilized cells on different carriers, compared with free living bacteria, are more effective, have longer shelf life, shorter lag phase and higher crude oil degrading activity [24]. Direct comparisons among different carrier-bacteria systems, are not straightforward due to variability in experimental conditions, time of incubation and analytical methods. Nevertheless almost all the results obtained so far, attest that immobilized cells are a valid technological alternative for environmental applications. Diesel-degrading consortium, for example, increased the percentage removal of diesel oil in 32 days from 36.7% (batch cultured consortium) to 53.5% of the same consortium immobilized on polyvinyl alcohol (PVA) [51]. The oil-degrading marine bacterium *Acinetobacter* sp. F9 immobilized on floatable and biodegradable carrier material made by coating puffed foxtail millet (PFM) with a calcium alginate (CA)-chitosan removes more than

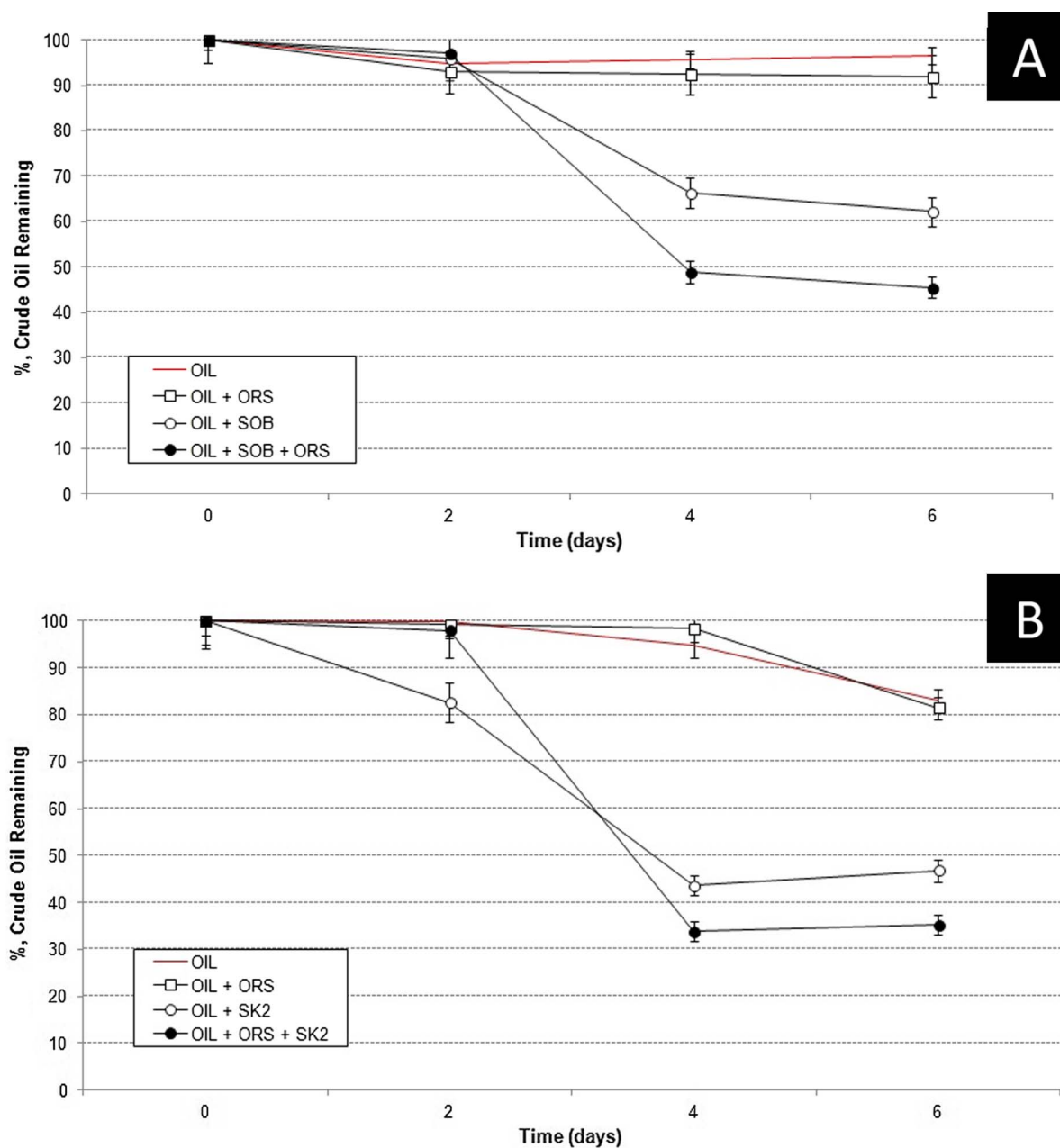


Fig. 10. Degradative capability (expressed as percentage of crude oil residue) in the presence of the HC degrading bacteria *Nocardia SoB* (a) and *Alcanivorax SK2* (b). Abiotic controls, mineral medium with crude oil without bacteria: OIL; mineral medium with crude oil and the ORS: OIL + ORS. Planktonic microcosms, mineral medium with crude oil and bacteria: OIL + SK2 and OIL + SOB. Immobilized cells microcosms, mineral medium with crude oil, bacteria and ORS: OIL + SK2 + ORS and OIL + SOB + ORS.

80% of the diesel oil in one day while only approximately 45% of the diesel oil was removed by free F9 cells [18]. Immobilization of HC utilizing indigenous bacteria on peanut hull powder, finally, increased total petroleum hydrocarbon removal from 27% with free cells to 61% of immobilized cells after a 12-week treatment [52].

#### 4. Conclusions

In conclusion, we reported a facile and solvent-free method for preparing sponges with high capability to remove organic pollutant of hydrophobic nature. ORSs were found to have a mass-based oil uptake up to 500 wt% and high reusability since retained almost 90% of their initial absorption capability up to 50 cycles. Furthermore, ORS demonstrated excellent biocompatibility with two different HC-degrading bacteria that colonized all the porous structure. The device obtained using this floatable and degradable



formulation hosting immobilized cells was able to degrade crude oil more efficiently than the conventional free-cell systems demonstrating to be adequate as carrier for bioremediation purposes.

In perspective, ORS could be suitable to absorb oils in oil-spilled accidents and also as floatable and biodegradable carrier material ready-to-use for bioremediation. Beyond the increased biodegradation ability of immobilized cells, several applications of the device can be designed. The high absorption capacity of the ORS suggests a two-step bioremediation procedure based on *in situ* oil removal using the ORS and a second step of *off-site* oil degradation in bioreactors. Moreover, the compressive modulus of the ORS was found to be almost independent on the kind of pollutants and very close to that of virgin one up to 25 cycles.

## Acknowledgements

Thanks are due to Mr. Maurizio Catalfamo (IAMC-CNR of Messina) for his precious technical support for GC-FID analysis.

## References

- [1] M.A. Hubbe, O.J. Rojas, M. Fingas, B.S. Gupta, Cellulosic substrates for removal of pollutants from aqueous systems: a review. 3. Spilled oil and emulsified organic liquids, *BioResources* 8 (2013) 3038–3097.
- [2] N.E. Kinner, L. Belden, P. Kinner, Unexpected sink for Deepwater Horizon oil may influence future spill response, *Eos, Trans. Am. Geophys. Union* 95 (2014) 176.
- [3] D.P. Prendergast, P.M. Gschwend, Assessing the performance and cost of oil spill remediation technologies, *J. Clean. Prod.* 78 (2014) 233–242.
- [4] K.C. Payne, C.D. Jackson, C.E. Aizpurua, O.J. Rojas, M.A. Hubbe, Oil spills abatement: factors affecting oil uptake by cellulosic fibers, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 7725–7730, <http://dx.doi.org/10.1021/es3015524>.
- [5] S. Palchoudhury, J.R. Lead, A facile and cost-effective method for separation of oil-water mixtures using polymer-coated iron oxide nanoparticles, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 14558–14563, <http://dx.doi.org/10.1021/es5037755>.
- [6] S. Kawano, T. Kida, K. Miyawaki, Y. Noguchi, E. Kato, T. Nakano, et al., Cyclodextrin polymers as highly effective adsorbents for removal and recovery of polychlorobiphenyl (PCB) contaminants in insulating oil, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 8094–8100, <http://dx.doi.org/10.1021/es501243v>.
- [7] F. de Souza, J.A. Marins, C.H.M. Rodrigues, J.C. Pinto, A magnetic composite for cleaning of oil spills on water, *Macromol. Mater. Eng.* 295 (2010) 942–948, <http://dx.doi.org/10.1002/mame.201000090>.
- [8] Y. Shen, Q. Fang, B. Chen, Environmental applications of three-dimensional graphene-based macrostructures: adsorption, transformation, and detection, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 67–84, <http://dx.doi.org/10.1021/es504421y>.
- [9] E.V. Lebedeva, A. Fogden, Adhesion of oil to kaolinite in water, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 9470–9475, <http://dx.doi.org/10.1021/es102041b>.
- [10] Z. Zhang, G. Sèbe, D. Rentsch, T. Zimmermann, P. Tingaut, Ultralightweight and flexible silylated nanocellulose sponges for the selective removal of oil from water, *Chem. Mater.* 26 (2014) 2659–2668, <http://dx.doi.org/10.1021/cm5004164>.
- [11] R. Scaffaro, F. Lopresti, L. Botta, A. Maio, Mechanical behavior of polylactic acid/polycaprolactone porous layered functional composites, *Compos. Part B Eng.* 98 (2016) 70–77, <http://dx.doi.org/10.1016/j.compositesb.2016.05.023>.
- [12] M.A. Zahid, J.E. Halligan, R.F. Johnson, Oil slick removal using matrices of polypropylene filaments, *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* 11 (1972) 550–555.
- [13] D. Bastani, A.A. Safekordi, A. Alihosseini, V. Taghikhani, Study of oil sorption by expanded perlite at 298.15 K, *Sep. Purif. Technol.* 52 (2006) 295–300.
- [14] M. Radetic, V. Ilic, D. Radojevic, R. Miladinovic, D. Jovic, P. Jovancic, Efficiency of recycled wool-based nonwoven material for the removal of oils from water, *Chemosphere* 70 (2008) 525–530.
- [15] R. Wahi, L.A. Chuah, T.S.Y. Choong, Z. Ngaini, M.M. Nourouzi, Oil removal from aqueous state by natural fibrous sorbent: an overview, *Sep. Purif. Technol.* 113 (2013) 51–63, <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2013.04.015>.
- [16] L. Lo Piccolo, C. De Pasquale, R. Fodale, A.M. Puglia, P. Quatrini, Involvement of an alkane hydroxylase system of *Gordonia* sp. strain SoCg in degradation of solid n-alkanes, *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011) 1204–1213.
- [17] P. Quatrini, G. Scaglione, C. De Pasquale, S. Riela, A.M. Puglia, Isolation of Gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline, *J. Appl. Microbiol.* 104 (2008) 251–259.
- [18] D. Hou, X. Shen, Q. Luo, Y. He, Q. Wang, Q. Liu, Enhancement of the diesel oil degradation ability of a marine bacterial strain by immobilization on a novel compound carrier material, *Mar. Pollut. Bull.* 67 (2013) 146–151, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.11.021>.
- [19] C.D. Scott, Immobilized cells: a review of recent literature, *Enzyme Microb. Technol.* 9 (1987) 66–72.
- [20] M.B. Cassidy, H. Lee, J.T. Trevors, Environmental applications of immobilized microbial cells: a review, *J. Ind. Microbiol.* 16 (1996) 79–101.
- [21] R. Scaffaro, F. Lopresti, A. Sutura, L. Botta, R.M. Fontana, A.M. Puglia, et al., Effect of PCL/PEG-based membranes on actinorhodin production in streptomyces coelicolor cultivations, *Macromol. Biosci.* 16 (2016) 686–693, <http://dx.doi.org/10.1002/mabi.201500391>.
- [22] M.P. Diaz, K.G. Boyd, S.J.W. Grigson, J.G. Burgess, Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers, *Biotechnol. Bioeng.* 79 (2002) 145–153.
- [23] C. Elliott, Z. Ye, S.C. Mojumdar, M.T. Saleh, A potential bacterial carrier for bioremediation, *J. Therm. Anal. Calorim.* 90 (2007) 707–711.
- [24] Z. Bayat, M. Hassanshahian, S. Cappello, Immobilization of microbes for bioremediation of crude oil polluted environments: a mini review, *Open Microbiol. J.* 9 (2015) 48–54, <http://dx.doi.org/10.2174/1874285801509010048>.
- [25] G. Lo Re, F. Lopresti, G. Petrucci, R. Scaffaro, A facile method to determine pore size distribution in porous scaffold by using image processing, *Micron* 76 (2015) 37–45, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2015.05.001>.
- [26] R. Scaffaro, F. Lopresti, L. Botta, A. Maio, F. Sutura, M.C. Mistretta, et al., A facile and eco-friendly route to fabricate poly(lactic acid) scaffolds with graded pore size, *J. Vis. Exp.* (2016) 1–8, <http://dx.doi.org/10.3791/54595>.
- [27] R. Scaffaro, F. Lopresti, L. Botta, S. Rigogliuso, G. Gherzi, Preparation of three-layered porous PLA/PEG scaffold: relationship between morphology, mechanical behavior and cell permeability, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 54 (2016) 8–20, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.08.033>.
- [28] R. Scaffaro, L. Botta, M. Sanfilippo, G. Gallo, G. Palazzolo, A.M. Puglia, Combining in the melt physical and biological properties of poly(caprolactone) and chlorhexidine to obtain antimicrobial surgical monofilaments, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 99–109, <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4283-x>.
- [29] R. Scaffaro, L. Botta, G. Gallo, A.M. Puglia, Influence of drawing on the antimicrobial and physical properties of chlorhexidine-compounded poly(caprolactone) monofilaments, *Macromol. Mater. Eng.* 12 (2015) 1268–1277, <http://dx.doi.org/10.1002/mame.201500121>.
- [30] R. Scaffaro, F. Lopresti, A. Maio, L. Botta, S. Rigogliuso, G. Gherzi, Electrospun PCL/GO-g-PEG structures: processing-morphology-properties relationships, *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* 92 (2017) 97–107, <http://dx.doi.org/10.1016/j.compositesa.2016.11.005>.
- [31] R. Scaffaro, F. Lopresti, L. Botta, S. Rigogliuso, G. Gherzi, Melt processed PCL/PEG scaffold with discrete pore size gradient for selective cellular infiltration, *Macromol. Mater. Eng.* 301 (2016) 182–190, <http://dx.doi.org/10.1002/mame.201500289>.
- [32] R. Scaffaro, F. Lopresti, L. Botta, S. Rigogliuso, G. Gherzi, Integration of PCL and PLA in a monolithic porous scaffold for interface tissue engineering, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 63 (2016) 303–313, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.06.021>.
- [33] S.J. Varjani, Microbial degradation of petroleum hydrocarbons, *Bioresour. Technol.* 223 (2017) 277–286.
- [34] M.M. Yakimov, P.N. Golyshin, S. Lang, E.R.B. Moore, W.-R. Abraham, H. Lünsdorf, et al., *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 48 (1998) 339–348.
- [35] D.L. García-González, R. Aparicio-Ruiz, R. Aparicio, Virgin olive oil - chemical implications on quality and health, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110 (2008) 602–607, <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200700262>.

- [36] R.M. Allaf, I.V. Rivero, N. Abidi, I.N. Ivanov, Porous poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds for load-bearing tissue regeneration: Solventless fabrication and characterization, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 101 B (2013) 1050–1060, <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.32915>.
- [37] C. De Pasquale, E. Palazzolo, L. Lo Piccolo, P. Quatrini, Degradation of long-chain n-alkanes in soil microcosms by two actinobacteria, *J. Environ. Sci. Heal. Part A* 47 (2012) 374–381, <http://dx.doi.org/10.1080/10934529.2012.645786>.
- [38] V. Catania, S. Santisi, G. Signa, S. Vizzini, A. Mazzola, S. Cappello, et al., Intrinsic bioremediation potential of a chronically polluted marine coastal area, *Mar. Pollut. Bull.* 99 (2015) 138–149.
- [39] Z.J. Mudryk, B. Podgórska, Scanning electron microscopy investigation of bacterial colonization of marine beach sand grains, *Balt. Coast. Zo. J. Ecol. Prot. Coastline* 10 (2006).
- [40] G. Gentile, M. Bonsignore, S. Santisi, M. Catalfamo, L. Giuliano, L. Genovese, et al., Biodegradation potentiality of psychrophilic bacterial strain *Oleispira antarctica* RB-8 T, *Mar. Pollut. Bull.* 105 (2016) 125–130.
- [41] L. Rocchetti, F. Beolchini, K.B. Hallberg, D.B. Johnson, A. Dell'Anno, Effects of prokaryotic diversity changes on hydrocarbon degradation rates and metal partitioning during bioremediation of contaminated anoxic marine sediments, *Mar. Pollut. Bull.* 64 (2012) 1688–1698.
- [42] M. Genovese, F. Crisafi, R. Denaro, S. Cappello, D. Russo, R. Calogero, et al., Effective bioremediation strategy for rapid in situ cleanup of anoxic marine sediments in mesocosm oil spill simulation, *Metab. Pathways Environ. Control. Hydrocarb. Biodegrad. Mar. Ecosyst.* (2015) 146.
- [43] W.T. Chuang, K.S. Shih, P. Da Hong, Kinetics of phase separation in poly( $\epsilon$ -caprolactone)/poly(ethylene glycol) blends, *J. Polym. Res.* 12 (2005) 197–204, <http://dx.doi.org/10.1007/s10965-004-1868-9>.
- [44] R. Scaffaro, G. Lo Re, S. Rigogliuso, G. Gherzi, 3D polylactide-based scaffolds for studying human hepatocarcinoma processes in vitro, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 13 (2012) 45003, <http://dx.doi.org/10.1088/1468-6996/13/4/045003>.
- [45] C. Bordes, V. Fréville, E. Ruffin, P. Marote, J.Y. Gauvrit, S. Briançon, et al., Determination of poly( $\epsilon$ -caprolactone) solubility parameters: application to solvent substitution in a microencapsulation process, *Int. J. Pharm.* 383 (2010) 236–243, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.09.023>.
- [46] H. Wang, E. Wang, Z. Liu, D. Gao, R. Yuan, L. Sun, et al., A novel carbon nanotubes reinforced superhydrophobic and superoleophilic polyurethane sponge for selective oil-water separation through a chemical fabrication, *J. Mater. Chem. A* 3 (2015) 266–273.
- [47] V.M. Correlo, L.F. Boesel, E. Pinho, A.R. Costa-Pinto, M.L. Alves da Silva, M. Bhattacharya, et al., Melt-based compression-molded scaffolds from chitosan-polyester blends and composites: morphology and mechanical properties, *J. Biomed. Mater. Res. A* 91 (2009) 489–504, <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.32221>.
- [48] J.-E. Park, M. Todo, Development and characterization of reinforced poly(L-lactide) scaffolds for bone tissue engineering, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22 (2011) 1171–1182, <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-011-4289-4>.
- [49] J.S. Sabirova, A. Becker, H. Lünsdorf, J.-M. Nicaud, K.N. Timmis, P.N. Golyshin, Transcriptional profiling of the marine oil-degrading bacterium *Alcanivorax borkumensis* during growth on n-alkanes, *FEMS Microbiol. Lett.* 319 (2011) 160–168.
- [50] S. Cappello, A. Volta, S. Santisi, C. Morici, G. Mancini, P. Quatrini, et al., Oil-degrading bacteria from a membrane bioreactor (BF-MBR) system for treatment of saline oily waste: Isolation, identification and characterization of the biotechnological potential, *Int. Biodeterior. Biodegradation* 110 (2016) 235–244.
- [51] C.J. Cunningham, I.B. Ivshina, V.I. Lozinsky, M.S. Kuyukina, J.C. Philp, Bioremediation of diesel-contaminated soil by microorganisms immobilised in polyvinyl alcohol, *Int. Biodeterior. Biodegradation* 54 (2004) 167–174.
- [52] Y. Xu, M. Lu, Bioremediation of crude oil-contaminated soil: comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments, *J. Hazard. Mater.* 183 (2010) 395–401.