



**Università
degli Studi
di Palermo**

AREA QUALITÀ, PROGRAMMAZIONE E SUPPORTO STRATEGICO
SETTORE STRATEGIA PER LA RICERCA
U. O. DOTTORATI

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MOLECOLARI E BIOMOLECOLARI
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF)
Settore Scientifico Disciplinare: BIO/19 – Microbiologia generale

**ENHANCED BIOREMEDIATION E
MONITORAGGIO MICROBIOLOGICO
DI ACQUA CONTAMINATA
DA SOLVENTI CLORURATI**

IL DOTTORE
Dott.ssa Ilenia Cruciatà

IL COORDINATORE
Prof.ssa Giovanna Pitarresi

IL TUTOR
Prof. Andrea Pace

IL CO TUTOR
Prof.ssa Paola Quatrini

CICLO XXXIV
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2023

*A mio padre,
ai miei figli,
a mio marito.*

INDICE

ABSTRACT	Pag. 5
INTRODUZIONE	Pag. 7
SOLVENTI CLORURATI	Pag. 8
Proprietà chimico-fisiche	Pag. 8
Produzione e applicazioni	Pag. 9
Diffusione e trasporto nell'ambiente	Pag. 10
Tossicità per l'uomo	Pag. 11
Limiti di legge	Pag. 11
1,2-DICLOROETANO	Pag. 12
BONIFICA DI SITI CONTAMINATI DA SOLVENTI CLORURATI	Pag. 13
Tecniche di biorisanamento	Pag. 14
BIODEGRADAZIONE DEI SOLVENTI CLORURATI	Pag. 16
Ossidazione aerobia diretta	Pag. 19
Cometabolismo ossidativo aerobio	Pag. 21
Declorurazione riduttiva anaerobia	Pag. 23
Declorurazione riduttiva cometabolica	Pag. 26
SCOPO DEL LAVORO DI TESI	Pag. 27
CAPITOLO 1 - CARATTERIZZAZIONE MICROBIOLOGICA DELL'ACQUA CONTAMINATA	Pag. 29
INTRODUZIONE	Pag. 30
Descrizione dell'acqua contaminata	Pag. 30
SCOPO DEL LAVORO	Pag. 31
MATERIALI E METODI	Pag. 32
Campionamento dell'acqua dall'area contaminata	Pag. 32
Filtrazione dei campioni di acqua contaminata	Pag. 33
Estrazione del DNA dalla biomassa filtrata	Pag. 33
Analisi della diversità microbica dell'acqua contaminata mediante ARISA	Pag. 35
Analisi delle comunità microbiche dell'acqua contaminata mediante 16S rRNA metabarconding	Pag. 37
Ricerca di generi OHRB mediante Nested-PCR del gene 16S rRNA	Pag. 39
RISULTATI E DISCUSSIONE	Pag. 41
Parametri chimico-fisici dei campioni di acqua contaminata	Pag. 41
Stima della biomassa dei campioni di acqua contaminata	Pag. 42
Diversità e composizione delle comunità microbiche nei campioni di acqua contaminata	Pag. 45
Monitoraggio nel tempo delle comunità microbiche nei campioni di acqua contaminata	Pag. 54
CONCLUSIONI	Pag. 58
CAPITOLO 2 - VALUTAZIONE DELLA BIODEGRADAZIONE DI 1,2- DICLOROETANO IN MICROCOSMO	Pag. 60
INTRODUZIONE	Pag. 61
Metabolismi biodegradativi di 1,2-dicloroetano	Pag. 61
SCOPO DEL LAVORO	Pag. 66
MATERIALI E METODI	Pag. 67
Allestimento di microcosmi in anaerobiosi	Pag. 67
Allestimento di microcosmi in aerobiosi	Pag. 71
Monitoraggio chimico della biodegradazione di 1,2-DCA	Pag. 73
<i>Misurazione della concentrazione di 1,2-DCA mediante Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>	Pag. 73
<i>Determinazione del rilascio di ioni cloruro</i>	Pag. 74
Monitoraggio biologico dei microcosmi	Pag. 75
<i>Filtrazione ed estrazione del DNA dai microcosmi e dalle colture di arricchimento</i>	Pag. 75
<i>Analisi della diversità microbica dei microcosmi mediante ARISA</i>	Pag. 76

<i>Analisi delle comunità microbiche in microcosmo mediante 16S rRNA metabarcoding</i>	Pag. 76
<i>Ricerca di generi OHRB nei microcosmi anaerobi mediante Nested-PCR del gene 16S rRNA</i>	Pag. 76
<i>Ricerca dei geni catabolici della dechlorurazione</i>	Pag. 77
RISULTATI E DISCUSSIONE	Pag. 79
Preliminari evidenze di biodegradazione di 1,2-DCA nei microcosmi anaerobi del 2020	Pag. 79
Valutazione della biodegradazione di 1,2-DCA nei microcosmi anaerobi del 2021	Pag. 83
<i>Monitoraggio chimico dei microcosmi anaerobi 2021</i>	Pag. 83
<i>Monitoraggio biologico dei microcosmi anaerobi 2021</i>	Pag. 85
Valutazione della biodegradazione di 1,2-DCA in aerobiosi	Pag. 90
<i>Monitoraggio chimico dei microcosmi aerobi</i>	Pag. 90
<i>Monitoraggio biologico dei microcosmi aerobi</i>	Pag. 91
CONCLUSIONI	Pag. 94
CAPITOLO 3 - VALUTAZIONE DELLA BIODEGRADAZIONE DI 1,2-DICLOROETANO IN UNA SIMULAZIONE DI BARRIERA REATTIVA PERMEABILE	Pag. 96
BIOLOGICAL REMOVAL OF 1,2-DICHLOROETHANE FROM A REAL POLLUTED GROUNDWATER BY USING ENRICHED BACTERIAL CONSORTIA UNDER AEROBIC AND ANAEROBIC CONDITIONS	Pag. 100
CAPITOLO 4 - UTILIZZO DI SUPPORTI BIOPOLIMERICI PER IL BIORISANAMENTO DI ACQUE CONTAMINATE	Pag. 119
INTRODUZIONE	Pag. 120
Tecnologie di biorisanamento basate sull'immobilizzazione di batteri degradatori	Pag. 120
SCOPO DEL LAVORO	Pag. 123
MATERIALI E METODI	Pag. 124
Supporti biopolimerici	Pag. 124
Valutazione della capacità di adesione microbica ai supporti biopolimerici	Pag. 125
<i>Preparazione dei supporti biopolimerici</i>	Pag. 125
<i>Preparazione dei microrganismi</i>	Pag. 125
<i>Immobilizzazione delle cellule batteriche sui supporti biopolimerici</i>	Pag. 125
Valutazione della capacità di assorbimento del contaminante dei supporti biopolimerici	Pag. 126
<i>Valutazione della capacità di assorbimento di 1,2-DCA dei supporti biopolimerici in soluzione acquosa</i>	Pag. 126
<i>Valutazione della capacità di assorbimento di 1,2-DCA dei supporti biopolimerici in acqua contaminata</i>	Pag. 126
Valutazione dell'immobilizzazione di batteri dell'acqua contaminata su supporti biopolimerici	Pag. 127
<i>Incubazione dei fluff in microcosmo con acqua contaminata</i>	Pag. 127
<i>Estrazione di DNA dai fluff e caratterizzazione della comunità microbica adesa</i>	Pag. 127
RISULTATI E DISCUSSIONE	Pag. 128
Valutazione della colonizzazione microbica dei supporti biopolimerici	Pag. 128
Valutazione della capacità di assorbimento di 1,2-DCA dei supporti biopolimerici	Pag. 129
Valutazione dell'immobilizzazione di batteri dell'acqua contaminata su supporti biopolimerici	Pag. 130
CONCLUSIONI	Pag. 132
BIBLIOGRAFIA	Pag. 133
Ringraziamenti	Pag. 142

ABSTRACT

I solventi clorurati sono composti organici di sintesi appartenenti alla classe degli idrocarburi alifatici clorurati, largamente impiegati in diversi settori industriali e, come conseguenza, ampiamente diffusi nell'ambiente come inquinanti e particolarmente pericolosi anche per la salute umana. Tra i metodi di bonifica di siti contaminati da solventi clorurati, quelli basati sul biorisanamento sfruttano uno dei peculiari metabolismi batterici coinvolti nella biodegradazione di tali composti: la dechlorurazione riduttiva anaerobia in cui il composto clorurato è utilizzato come accettore terminale di elettroni in un vero e proprio processo di respirazione anaerobia, detta dealorespirazione; il cometabolismo aerobio in cui il composto clorurato viene fortuitamente ossidato ad opera di ossigenasi batteriche normalmente utilizzate per l'uptake del substrato di crescita preferenziale; l'ossidazione aerobia diretta in cui il composto clorurato funge da donatore di elettroni e substrato di crescita primario per il microrganismo.

Il presente lavoro di tesi di dottorato si è occupato della caratterizzazione microbiologica di un'acqua contaminata da solventi clorurati, prevalentemente da 1,2-dicloroetano (1,2-DCA), e della valutazione del suo potenziale di biodegradazione, con l'obiettivo di sfruttare consorzi microbici autoctoni alla matrice contaminata per la definizione di un eventuale intervento di biorisanamento *in situ*.

Le comunità microbiche autoctone dell'acqua contaminata sono state dapprima caratterizzate in termini di struttura, diversità e composizione, mediante ARISA (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) e 16S rRNA metabarcoding, evidenziando una grande variabilità: campioni di acqua raccolti da diversi punti di prelievo e in diversi periodi sono risultati infatti piuttosto eterogenei, sia da un punto di vista chimico-fisico che da un punto di vista microbiologico. Abbastanza limitata è risultata la presenza di specie batteriche note in grado di degradare solventi clorurati.

La biodegradazione di 1,2-DCA è stata successivamente valutata mediante analisi gascromatografiche in spazio di testa effettuate in microcosmo. Allo scopo di indagare tutti i metabolismi biodegradativi noti nei confronti di 1,2-DCA, sono stati allestiti e opportunamente biostimolati microcosmi in aerobiosi e anaerobiosi. I microcosmi sono stati realizzati all'interno di vials con acqua contaminata, un opportuno terreno di coltura e una quota aggiunta di 1,2-DCA. Il monitoraggio della concentrazione di 1,2-DCA nel tempo ha mostrato elevati abbattimenti nei microcosmi anaerobi biostimolati in presenza/assenza di lattato e nei microcosmi biostimolati in presenza di O₂. In entrambi, la caratterizzazione della comunità microbica ha evidenziato la presenza di batteri in grado di svolgere dechlorurazione riduttiva di

solventi clorurati e dealogenazione idrolitica di 1,2-DCA. Nel DNA metagenomico dei suddetti microcosmi è stata anche rilevata la presenza di sequenze dei geni per una dealogenasi riduttiva specifica per 1,2-DCA (*dcaA*) e per la aloalcano dealogenasi (*dhlA*).

Un'efficiente biodegradazione di 1,2-DCA è stata evidenziata anche in una simulazione di sistema di Barriera Reattiva Permeabile in colonna biostimolato con poli- β -idrossibutirrato (PHB), quale substrato fermentabile e donatore di elettroni a lento rilascio per i processi di declorurazione riduttiva. Il sistema in colonna è stato alimentato con l'acqua contaminata, inoculata con un consorzio batterico precedentemente arricchito su PHB.

Infine, è stata avviata una sperimentazione che vede l'utilizzo di carrier biopolimerici biodegradabili come innovativa tecnologia di immobilizzazione di batteri biodegradatori direttamente reclutati dall'acqua contaminata, allo scopo di ottenere una maggiore efficienza di biodegradazione di solventi clorurati, a basso costo e in maniera ecocompatibile. Supporti in acido polilattico hanno dato preliminari evidenze sia di assorbimento del contaminante 1,2-DCA, sia di adesione microbica quando immersi nell'acqua contaminata in un sistema a scala di microcosmo.

INTRODUZIONE

SOLVENTI CLORURATI

Proprietà chimico-fisiche

Gli idrocarburi alifatici clorurati (CAHs, *Chlorinated Aliphatic Hydrocarbons*), comunemente definiti “solventi clorurati” per la loro grande capacità solvente, sono composti organoalogenati in cui uno o più atomi di cloro costituiscono l’elemento alogeno. I CAHs sono classificati come clorometani, cloroetani e cloroeteni a seconda dell’idrocarburo alifatico capostipite da cui discendono per sostituzione di uno o più atomi di idrogeno con altrettanti atomi di cloro (Fig. 1).

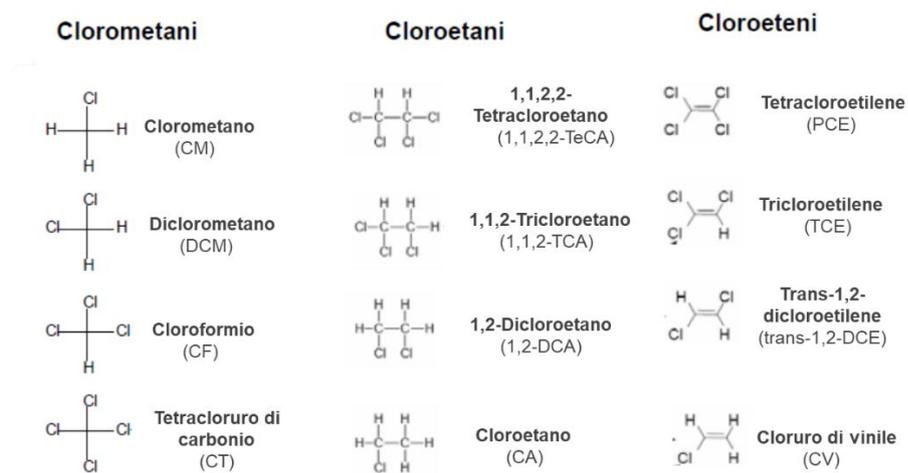


Fig. 1 Principali idrocarburi alifatici clorurati (CAHs).

I clorometani derivano dalla molecola di metano per sostituzione di almeno un atomo di idrogeno con un atomo di cloro. Essi comprendono clorometano (CM), diclorometano (DCM), cloroformio (CF) e tetracloruro di carbonio (CT). Eccetto il CM, che è un gas a temperatura ambiente, gli altri clorometani sono liquidi volatili incolori con scarsa solubilità in acqua. Tutti sono caratterizzati da elevata stabilità, elevata volatilità, scarsa infiammabilità ed elevata capacità solvente. I cloroetani derivano dalla molecola di etano, in cui almeno uno dei sei atomi di idrogeno viene sostituito da un atomo di cloro. Essi comprendono cloroetano (CA), 1,2-dicloroetano (1,2-DCA), 1,1-dicloroetano (1,1-DCA), 1,1,2-tricloroetano (1,1,2-TCA), 1,1,1-tricloroetano (1,1,1-TCA), 1,1,2,2-tetracloroetano (1,1,2,2-TeCA), 1,1,1,2-tetracloroetano (1,1,1,2-TeCA), pentacloroetano (PCA) ed esacloroetano (HCA). I cloroetani sono generalmente liquidi con basso punto di ebollizione, scarsa solubilità in acqua ed elevata volatilità. I cloroeteni discendono dalla molecola di etilene, caratterizzata dalla presenza di un doppio legame C=C, in cui almeno un atomo di idrogeno è sostituito da un atomo di cloro. Essi comprendono cloruro di vinile (CV), cis-1,2-dicloroetilene (cis-1,2-DCE), trans-1,2-dicloroetilene (trans-1,2-DCE), 1,1-dicloroetilene (1,1-DCE), tricloroetilene (TCE) e

tetracloroetilene o percloroetilene (PCE). Gli ultimi due, in particolare, sono dotati di ottimo potere solvente e bassa infiammabilità [Huang et al., 2014].

A temperatura e pressione ambiente, la maggior parte dei solventi clorurati sono liquidi incolori con un caratteristico odore dolce, alcuni invece sono gassosi (CM, CA, CV) e altri solidi (HCA). Essendo caratterizzati da un basso punto di ebollizione e una elevata volatilità, essi appartengono alla categoria dei composti organici volatili (VOCs, *Volatile Organic Compounds*). Inoltre, risultano più densi dell'acqua e sono classificati come liquidi organici densi in fase non acquosa (DNAPLs, *Dense Non-Aqueous Phase Liquids*) poiché in acqua formano una fase separata. La loro natura idrofobica li rende scarsamente solubili in acqua e maggiormente affini con le fasi organiche [Rodrigues et al., 2020]. La presenza di uno o più atomi di cloro nella loro struttura chimica ne influenza le proprietà chimico-fisiche: all'aumentare del numero di atomi di cloro presenti, aumentano il peso molecolare e la densità, mentre diminuiscono la tensione di vapore e la solubilità in acqua.

Produzione e applicazioni

La maggior parte dei CAHs sono prodotti di sintesi di derivazione antropogenica, tuttavia alcuni di essi hanno un'origine naturale. Alcuni clorometani, quali CM e CF, vengono prodotti da organismi viventi, quali alghe marine, funghi e licheni, tuberi di patate, termiti. Anche processi di combustione naturale, quali incendi di biomassa, attività vulcanica e altri processi geotermici, possono generare una vasta gamma di composti organoalogenati. Clorometani, 1,1- e 1,2-DCA, 1,1-DCE sono stati ritrovati all'interno di rocce, minerali e scisti, e possono essere rilasciati in piccole quantità a seguito della loro erosione dovuta ad agenti atmosferici o ad operazioni di estrazione mineraria [Gribble, 2003]. In ogni caso, la maggior parte dei solventi clorurati è prodotta industrialmente mediante processi di clorurazione (reazioni di addizione, elettrofile o radicaliche) di idrocarburi saturi o insaturi.

Fin dall'inizio del XX secolo, i solventi clorurati hanno trovato largo impiego nell'industria chimica, tessile, della gomma, delle materie plastiche, degli estintori di incendio, essendo utilizzati per il lavaggio a secco, lo sgrassaggio di metalli, la lavorazione di materiali grezzi, la produzione di prodotti farmaceutici, pesticidi, adesivi, liquidi refrigeranti. Proprio a causa del loro massiccio impiego in diversi settori industriali, spesso si sono verificati episodi di sversamento nell'ambiente durante la produzione, l'utilizzo o come conseguenza di procedure di stoccaggio e smaltimento non appropriate, risultando in un'ampia distribuzione nell'ambiente. Altra fonte di diffusione ambientale di solventi clorurati è la disinfezione dell'acqua operata mediante clorazione: il cloro, infatti, reagisce con la materia organica presente nell'acqua formando grandi quantità di sottoprodotti, tra cui clorometani, soprattutto

CF. Così, i solventi clorurati si configurano come inquinanti ubiquitari ampiamente diffusi in diverse matrici ambientali, dal suolo, all'aria, alle risorse idriche, comprese acque sotterranee, fiumi e laghi [Huang et al., 2014].

Diffusione e trasporto nell'ambiente

I solventi clorurati, tipicamente, vengono scaricati nell'ambiente come liquidi organici puri o come miscele di liquidi organici. Il loro destino e il loro trasporto sotto la superficie del suolo dipendono dalle loro peculiari proprietà chimico-fisiche. La loro densità, nettamente maggiore di quella dell'acqua, e la viscosità considerevolmente minore ne favoriscono la veloce migrazione attraverso il suolo, il raggiungimento della falda e il movimento verticale verso il fondo dell'acquifero. Configurandosi come DNAPLs, essi tendono a stratificare formando uno spessore di fase separata sugli strati impermeabili più profondi dell'acquifero. Inoltre, durante la migrazione verso il basso, una porzione di fase separata viene intrappolata nelle porosità della fase solida a causa di forze capillari, creando una contaminazione lungo tutto lo spessore dell'acquifero [Rodrigues et al., 2020] (Fig. 2). I composti clorurati più solubili, con densità leggermente maggiore dell'acqua, riescono invece a scendere più lentamente verso gli strati profondi e possono migrare, secondo la direzione di deflusso della falda, fino a interessare superfici anche molto estese.

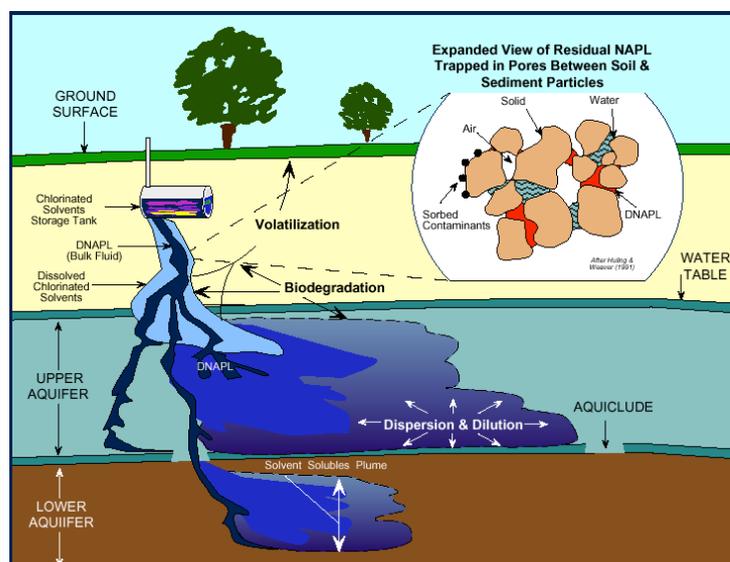


Fig. 2 Migrazione di DNAPL all'interno di un acquifero [Brusseau et al., 2001].

In numerose falde acquifere, i livelli di contaminazione da solventi clorurati hanno largamente compromesso l'utilizzo della risorsa idrica [Aulenta et al., 2006a; Moran et al., 2007; Kao et al., 2016]. Tra l'altro, la maggior parte dei CAHs è fortemente recalcitrante nei confronti della biodegradazione e può persistere nell'ambiente per periodi di tempo molto lunghi, da decenni fino a secoli.

Tossicità per l'uomo

Oltre ad essere contaminanti ambientali particolarmente dannosi, i solventi clorurati sono anche pericolosi per la salute umana. Nell'uomo sono assorbiti prevalentemente per via respiratoria, ma è possibile anche un'introduzione accidentale per via cutanea o gastrointestinale. Gli effetti tossici si manifestano sia a seguito di esposizione acuta che prolungata e riguardano diversi distretti dell'organismo: fegato, rene, sistema immunitario, apparati respiratorio, gastrointestinale, riproduttivo e sistema nervoso centrale. Se inalati, i CAHs possono causare irritazione delle vie aeree, dolore toracico, alterazioni del ritmo cardiaco, vertigini e persino coma. L'esposizione cutanea causa spesso irritazione, ustioni chimiche, congiuntivite. L'esposizione cronica a solventi clorurati causa effetti a lungo termine e spesso irreversibili, quali disturbi del sonno, vertigini, perdita di memoria, problemi di concentrazione o tendenze depressive [Rodrigues et al., 2020]. Alcuni solventi clorurati, inoltre, sono presunti o accertati agenti cancerogeni. Secondo la classificazione della IARC (*International Agency for Research on Cancer*), rientrano nel Gruppo 1 (cancerogeni accertati) TCE e CV, nel Gruppo 2A (probabili cancerogeni) PCE e nel Gruppo 2B (possibili cancerogeni) DCM, CF, CT, DCA, TeCA, HCA.

Limiti di legge

A causa dei rischi che i solventi clorurati comportano per la conservazione del territorio e delle risorse idriche e per la salute umana, la loro presenza nell'ambiente è sotto stretto controllo e monitoraggio e i limiti di concentrazione di tali sostanze nei suoli e nelle acque sono stabiliti dalla legge. In Italia, la presenza di composti organoclorurati nei suoli e nelle acque (sotterranee e superficiali), nonché i valori limite accettabili negli scarichi, è regolamentata dal D. Lgs. 152/2006 (Fig. 3).

Alifatici Clorurati Cancerogeni	CSC (µg/L)
Clorometano	1,5
Triclorometano (Cloroformio)	0,15
Cloruro di Vinile	0,5
1,2 Dicloroetano	3
1,1 Dicloroetilene	0,05
Tricloroetilene	1,5
Tetracloroetilene	1,1
Esaclorobutadiene	0,15
Sommatoria organoalogenati	10
Alifatici Clorurati Non Cancerogeni	CSC (µg/L)
1,1 Dicloroetano	810
1,2 Dicloroetilene	60
1,2 Dicloropropano	0,15
1,1,2 Tricloroetano	0,2
1,2,3 Tricloropropano	0,001
1,1,1,2 Tetracloroetano	0,05

Fig. 3 Concentrazioni soglia di contaminazione (CSC) di idrocarburi alifatici clorurati nelle acque sotterranee secondo il D. Lgs. 152/2006.

1,2-DICLOROETANO

L'1,2-dicloroetano (1,2-DCA) appartiene alla categoria dei cloroetani e possiede due atomi di cloro nella sua struttura molecolare (formula chimica: $\text{Cl-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl}$; massa molecolare: 98,97; numero CAS: 107-06-2) (Fig. 4). A temperatura ambiente si presenta come un liquido incolore, pesante e oleoso dall'odore penetrante di solvente, simile a quello del cloroformio. È facilmente infiammabile, volatile e poco solubile in acqua (solubilità in acqua a 20 °C: 8,7 g/L).

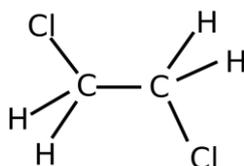


Fig. 4 Struttura molecolare di 1,2-dicloroetano.

Viene per lo più preparato per sintesi diretta, a partire da etilene e cloro gassosi, in presenza di cloruro ferrico quale catalizzatore. È principalmente prodotto in Europa, USA e Giappone [Huang et al., 2014], dove nel 1985 il volume di produzione era rispettivamente pari a 8, 7 e 2,5 milioni di tonnellate [Fetzner, 1998]; nel 2015 la sua produzione ha raggiunto negli Stati Uniti un range tra 9 e 14 milioni di tonnellate [U.S. EPA, 2019]. Il suo principale utilizzo è come intermedio nella sintesi del cloruro di vinile, a sua volta precursore del polivinilcloruro; è usato anche come solvente e sgrassante di metalli, nella sintesi di altri solventi clorurati (quali TCE e PCE), per rimuovere il piombo nelle benzine. Improprie procedure di stoccaggio e smaltimento o fuoriuscite accidentali hanno causato una diffusa contaminazione da 1,2-DCA delle acque sotterranee, minacciando gli ecosistemi, la fornitura di acqua pulita e la salute umana. Inoltre, a causa della sua elevata volatilità, 1,2-DCA può ritrovarsi anche nell'aria. Si stima che tra il 1987 e il 1993, oltre 209 tonnellate di 1,2-DCA siano state sversate nelle acque sotterranee [Marzorati et al., 2007].

Nell'uomo, oltre ad essere classificato come possibile cancerogeno (Gruppo 2B nella classificazione IARC), 1,2-DCA provoca diversi effetti tossici a seguito di inalazione, ingestione o contatto dermico. Una volta assorbito si distribuisce velocemente ai tessuti e si accumula nel fegato e nel rene. Sembra che sia in grado di attraversare la barriera emato-encefalica e la placenta ed è stato trovato anche nel latte materno. L'esposizione acuta causa alterazioni al sistema nervoso centrale, al fegato, all'apparato gastrointestinale, respiratorio, renale, cardiovascolare e al sistema immunitario. L'esposizione per via inalatoria provoca anoressia, nausea, vomito, debolezza, irritabilità, dolore epigastrico, irritazione alle vie respiratorie e agli occhi [Nagano et al., 2006; Liu et al., 2010].

Nel 2019, la U.S. EPA (*United States Environmental Protection Agency*) ha, inoltre, designato 1,2-DCA come sostanza ad alta priorità per la valutazione del rischio nell'ambito del TSCA (*Toxic Substances Control Act*), un quadro normativo per la gestione e la conformità delle sostanze chimiche pericolose [U.S. EPA, 2020]. In Italia, secondo il D. Lgs. 152/2006, la CSC nelle acque sotterranee è pari a 3 µg/L (Fig. 3).

BONIFICA DI SITI CONTAMINATI DA SOLVENTI CLORURATI

Le tecnologie per la bonifica di siti contaminati da solventi clorurati sono numerose e sono basate su processi di tipo chimico, fisico, chimico-fisico e biologico.

In generale, in base alle modalità operative con cui vengono condotti, gli interventi di bonifica ad un sito contaminato vengono distinti in:

- trattamenti *in situ*: gli interventi sono eseguiti direttamente nello stesso sito in cui è avvenuta la contaminazione, senza escavazione del terreno o del sedimento contaminato o la rimozione delle acque di falda;
- trattamenti *ex situ*: gli interventi prevedono il trattamento della matrice ambientale contaminata in un ambiente diverso da quello naturale, dopo aver effettuato l'escavazione del terreno o del sedimento contaminato o la rimozione dell'acqua di falda. Tali interventi sono ulteriormente classificati a seconda che il trattamento avvenga in prossimità del luogo di origine della matrice contaminata (*on site*) o preveda il trasporto verso un sito di trattamento esterno (*off site*) [Kumar et al., 2011].

Nel caso in cui la contaminazione da solventi clorurati riguardi acque sotterranee, le tecnologie *in situ* più usate sono [Stroo e Ward, 2010]:

- *Air Sparging* (AS): consiste nell'iniezione di aria in pressione all'interno della zona satura della falda e si basa sul trasferimento fisico degli inquinanti volatili dalla fase acquosa a quella di vapore, a cui fa seguito la loro migrazione nella zona insatura sovrastante e la loro rimozione.
- *Soil Vapor Extraction* (SVE): spesso accoppiata all'AS, consiste nella rimozione dei vapori (ricchi in concentrazione di contaminanti) dalla zona insatura della falda mediante appositi dispositivi di aspirazione e il loro successivo trattamento, prima di essere liberati in atmosfera nel rispetto dei limiti previsti dalla normativa vigente.
- *In Situ Chemical Oxidation* (ISCO): si basa sull'uso di ossidanti chimici, quali il perossido di idrogeno e il permanganato di potassio, che vengono iniettati all'interno della falda insieme a composti catalizzatori per degradare i contaminanti clorurati.

- Desorbimento termico: è un trattamento termico basato sull'incremento di temperatura del suolo allo scopo di favorire la volatilizzazione dei contaminanti volatili e la loro successiva estrazione e distruzione.
- *Pump&Treat* (P&T): si basa sull'installazione di una serie di pozzi di emungimento trasversalmente al deflusso idrico, la cui azione crea dei coni di depressione piezometrica, richiamando il plume di contaminazione e impedendone la migrazione verso valle e nell'ambiente circostante; le acque captate ed emunte vengono poi trattate in uno specifico sistema di abbattimento degli inquinanti, sito in superficie, al fine di rispettare gli standard di qualità previsti per il corpo ricettore in cui esse troveranno recapito (acque di falda, corpi idrici superficiali, rete fognaria).

Tuttavia, in molti casi di contaminazione da solventi clorurati, gli obiettivi di bonifica non sono stati raggiunti con i trattamenti chimico-fisici sopra citati e così la ricerca si è indirizzata nello sviluppo di sistemi alternativi per tecniche di bonifica sostenibili, quali il biorisanamento.

Tecniche di biorisanamento

Tra le azioni di decontaminazione e ripristino di siti impattati, il biorisanamento rappresenta un promettente approccio, non invasivo ed economico, che potrebbe fornire un ripristino più efficace e sostenibile degli ambienti contaminati da effettuare come strategia alternativa ai trattamenti chimico-fisici [Das e Dash, 2014]. Con il termine biorisanamento si intende l'insieme delle tecnologie in cui specifici microrganismi vengono utilizzati per ridurre la presenza di composti inquinanti mediante processi condotti in condizioni controllate che portano alla conversione dei contaminanti in sostanze innocue, o quantomeno alla diminuzione della concentrazione degli stessi fino al limite consentito dalla legge, sia in sistemi acquatici che terrestri [Kumar et al., 2011]. Il biorisanamento sfrutta quindi la capacità di molti batteri di sopravvivere, degradare e trasformare gli inquinanti rendendo possibile la rivitalizzazione naturale dei siti contaminati [Quatrini et al., 2008; Catania et al., 2015; Catania et al., 2018].

La messa a punto di interventi di bioremediation ad un sito contaminato prevede sempre una fase di caratterizzazione dell'inquinante (composizione, concentrazione, disponibilità, tossicità, caratteristiche chimico-fisiche), una fase di caratterizzazione idrogeochimica del sito (proprietà geologiche, entità e direzioni dei flussi, pH, temperature, condizioni redox) e una fase di caratterizzazione microbiologica (comunità microbiche autoctone, attività metaboliche, diversità catabolica, potenziale biodegradativo).

Anche gli interventi di bioremediation possono essere effettuati nel luogo di contaminazione (interventi *in situ*) o in ambiente confinato come i bioreattori (interventi *ex situ*). In particolare, l'obiettivo della progettazione di un intervento di bioremediation *in situ* consiste nel creare e

mantenere direttamente sul luogo della contaminazione, ovvero senza movimentazione della matrice inquinata, le condizioni adatte allo sviluppo e all'attività metabolica dei batteri degradatori del contaminante. Le tecnologie di trattamento *in situ* nell'ambito del risanamento biologico includono: attenuazione naturale, biostimulation e bioaugmentation. L'attenuazione naturale è il risultato di più fenomeni di tipo meccanico (connessi alla dispersione del contaminante e alla sua diluizione), di tipo chimico-fisico (con effetto sul decadimento naturale del contaminante) e di tipo biologico (connessi all'attività degradativa dei microrganismi). Gli altri due approcci si basano sulla possibilità di stimolare l'attività microbica implementandola. La biostimolazione consiste nell'aggiunta di nutrienti, quali azoto e fosforo, di accettori di elettroni, quali l'ossigeno, per le reazioni aerobiche, o di donatori di elettroni, quali metano, lattato, H₂, per le reazioni di riduzione. 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 [Goswami et al., 2018] (Fig. 5). In tal caso i microrganismi possono essere selezionati da popolazioni già presenti nel sito, dopo aver arricchito la biomassa in reattori di laboratorio o di campo, oppure possono essere ottenuti da varietà isolate in laboratorio a partire da batteri noti per la capacità di degradare specifici composti.

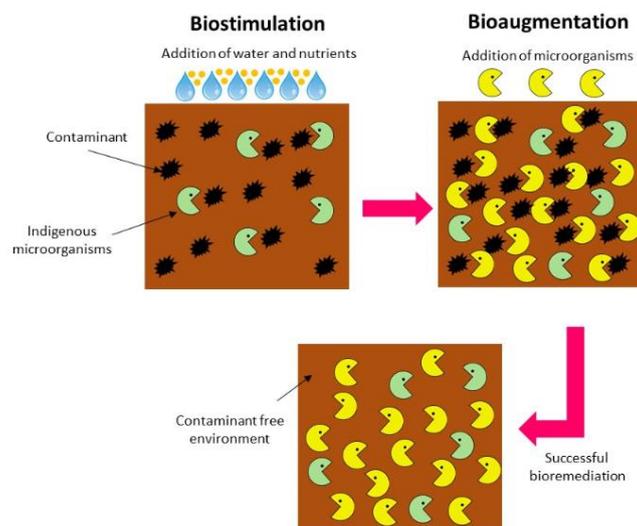


Fig. 5 Tecniche di biorisanamento basate su biostimulation e bioaugmentation [Goswami et al., 2018].

Negli ultimi anni, inoltre, stanno guadagnando un crescente interesse le strategie innovative di biorisanamento, volte a ridurre gli svantaggi e i limiti riscontrati durante il processo di applicazione delle tecniche di biostimulation o bioaugmentation, come per esempio la bassa concentrazione di biomassa microbica, la biodisponibilità di inquinanti, la sopravvivenza e la stabilità cellulare, le restrizioni metaboliche e il tempo di biodegradazione [Sonawane et al., 2022]. Una tecnologia emergente per applicazioni innovative di biorisanamento ambientale si

basa sull'utilizzo di biofilm microbici degradatori immobilizzati su diverse matrici di supporto [Scaffaro et al., 2017; Xu et al., 2018; Catania et al., 2020]. Questo nuovo approccio, che verrà trattato nel capitolo 4 della presente tesi, permette di superare alcuni importanti limiti delle tradizionali tecniche di biorisanamento, rendendo il processo più efficiente, più economico e maggiormente versatile.

Nel caso specifico di contaminazione da solventi clorurati, il biorisanamento si basa sulle peculiari proprietà cataboliche di batteri, sia aerobi che anaerobi, che saranno trattati nel prossimo paragrafo.

BIODEGRADAZIONE DEI SOLVENTI CLORURATI

I solventi clorurati sono biodegradabili in presenza di opportune condizioni ambientali e microrganismi specializzati, i quali li utilizzano come donatori o accettori di elettroni. La biodegradazione può fare ricorso a processi aerobici e anaerobici, in entrambi i casi in modo diretto (in reazioni accoppiate alla crescita dei microrganismi) o cometabolico (in trasformazioni fortuite che non apportano vantaggi per i microrganismi). La capacità di svolgere un processo piuttosto che un altro dipende dalle condizioni redox esistenti nel sistema, dalla composizione microbica e dal grado di alogenazione del composto in esame. In generale, i composti altamente clorurati si degradano principalmente attraverso reazioni di tipo riduttivo, mentre reazioni ossidative sono solitamente più efficaci per la degradazione dei composti a limitato grado di clorurazione.

Il biorisanamento di siti contaminati da solventi clorurati si basa su tre principali metabolismi batterici: la declorurazione riduttiva anaerobia, il cometabolismo aerobio e l'ossidazione aerobia diretta; tali processi si configurano come le reazioni di degradazione di CAHs più abbondanti riscontrate in natura e più studiate in letteratura scientifica [Xing et al., 2022].

La declorurazione riduttiva anaerobia si configura come una vera e propria respirazione anaerobia, detta dealoespirazione, in cui il composto clorurato è utilizzato come accettore terminale di elettroni; il risultato è la progressiva sostituzione degli atomi di cloro con atomi di idrogeno fino ad ottenere un composto a minore grado di clorurazione o completamente declorurato ed il concomitante rilascio di ioni cloruro (Cl^-). In Fig. 6, come esempio, è mostrata la riduzione sequenziale del PCE, in TCE, in cis- o trans-1,2-DCE, in CV ed infine in etilene.

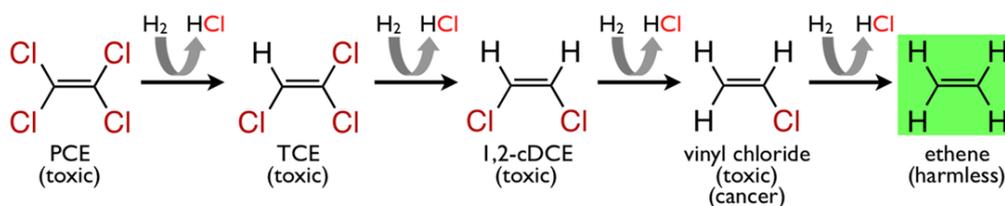


Fig. 6 Declorurazione riduttiva sequenziale del tetracloroetilene (PCE) fino ad etilene.

La declorurazione riduttiva anaerobica è stata utilizzata con successo in numerose applicazioni sia su scala pilota che su scala reale. Tra i tre metabolismi sopracitati, è il solo che può potenzialmente portare alla biodegradazione dell'intera gamma di solventi clorurati. Tuttavia, il tasso di declorurazione riduttiva diminuisce nettamente al diminuire del numero di atomi di cloro nella molecola, il che risulta nell'accumulo di CAHs a basso grado di clorurazione ma altamente tossici, quali 1,2-DCE e CV [Frasconi et al., 2015]. Le reazioni di declorurazione riduttiva richiedono l'immissione di elettroni da un donatore esterno. A causa della natura oligotrofica di molte falde acquifere contaminate da solventi clorurati, l'aggiunta di un donatore di elettroni si rende necessaria per stimolare i processi di declorurazione riduttiva. A tale scopo, sia in laboratorio che in campo, sono stati utilizzati parecchi substrati organici, come glucosio, formiato, estratto di lievito, metanolo, lattato, proprionato, butirato, benzoato, etanolo. Tali molecole vengono fermentate a idrogeno o acetato, i quali risultano gli effettivi donatori di elettroni utilizzati per la declorurazione riduttiva [Aulenta et al., 2006b]. Recentemente, donatori di elettroni a lento rilascio, quali polimeri di riserva batterici costituiti da polioidrossialcanoati, sono stati utilizzati come substrato per processi di declorurazione riduttiva configurandosi come una tecnologia efficace e sostenibile per la bonifica di acque di falda contaminate da solventi clorurati [Aulenta et al., 2008].

Oltre che un processo metabolico diretto (in cui la molecola di CAH si configura come unico accettore terminale di elettroni per la cellula batterica), la declorurazione riduttiva può avvenire anche cometabolicamente. In quest'ultimo caso, il flusso di elettroni è principalmente diretto verso l'accettore terminale di elettroni preferenziale per il microrganismo (come il solfato), mentre una piccola frazione del flusso di elettroni è fortuitamente utilizzata per la riduzione della molecola clorurata [Frasconi et al., 2015].

Il cometabolismo aerobio avviene quando le ossigenasi batteriche normalmente utilizzate per l'uptake di un substrato di crescita fortuitamente catalizzano l'ossidazione di un CAH, senza che il microrganismo mediatore della reazione ne ricavi energia. Vari CAHs, compresi le molecole altamente clorate come TCE e TeCA, possono essere così degradati; tuttavia, il tasso di biodegradazione diminuisce all'aumentare del livello di clorurazione della molecola, tant'è che gli unici CAHs per cui non è stata osservata trasformazione mediante cometabolismo aerobio sono quelli completamente clorurati, ovvero CT, HCA e PCE [Frasconi et al., 2015]. Il

cometabolismo aerobio è stato applicato con successo per il biorisanamento di suoli e acque di falda contaminati. I vantaggi dell'applicazione del cometabolismo aerobio rispetto alla dechlorurazione riduttiva anaerobia in un piano di biorisanamento si riferiscono ai più elevati tassi di degradazione e alla limitata generazione di prodotti finali di reazione tossici (nonostante la possibile produzione di metaboliti intermedi instabili). Tuttavia, il cometabolismo aerobio pone anche una serie di sfide: (1) i substrati di crescita per i microrganismi coinvolti devono essere continuamente forniti e, se consumati in maniera incompleta, potrebbero generare una contaminazione secondaria; (2) la falda acquifera potrebbe intasarsi a causa dell'eccessiva crescita di biomassa in corrispondenza dei punti di iniezione di ossigeno e substrati di crescita; (3) diversi fattori, compresi l'inibizione competitiva e il rapporto tra substrati di crescita preferenziali e fortuiti, rendono il cometabolismo aerobio un processo complesso e difficile da applicare *in situ*, in termini di progettazione, simulazione, ottimizzazione e controllo [Frasconi et al., 2015; Xing et al., 2022].

Nell'ossidazione aerobia diretta la molecola di CAH rappresenta la sola fonte di carbonio ed energia per il microrganismo mediatore della reazione, fungendo da donatore di elettroni e substrato di crescita primaria. In tal caso, i CAHs vengono ossidati con rilascio di anidride carbonica, acqua e ioni cloruro, mentre l'ossigeno, utilizzato come accettore terminale di elettroni, viene ridotto ad acqua. Solo un limitato range di solventi clorurati è potenzialmente degradabile mediante ossidazione diretta: tra questi CV, cis-1,2-DCE, 1,2-DCA, DCM e CM [Frasconi et al., 2015]. Rispetto al cometabolismo, l'ossidazione aerobia diretta presenta alcuni vantaggi: non è richiesta l'aggiunta di ulteriori substrati di crescita; non vi è competizione per l'ossigeno fornito, poiché questo viene consumato solo per l'ossidazione dei CAHs bersaglio; la formazione di metaboliti intermedi tossici viene evitata. Tuttavia, l'applicabilità di un piano di biorisanamento da solventi clorurati basato sull'ossidazione aerobia diretta è limitata dalla carenza di informazioni approfondite su ceppi batterici, meccanismi e condizioni implicati in questo metabolismo ossidativo e dalla ristretta gamma di CAHs così potenzialmente ossidabili [Xing et al., 2022].

La scelta di uno dei tre metabolismi descritti da applicare in un intervento di biorisanamento *in situ* nei confronti di un sito contaminato da solventi clorurati, dipende dalle caratteristiche idrogeochimiche del sito stesso (proprietà geologiche, entità e direzioni dei flussi, pH, temperatura, condizioni redox), dalla tipologia e dall'entità della contaminazione (tipo di CAHs presenti, concentrazione, tossicità, caratteristiche chimico-fisiche), dalla composizione della comunità microbica autoctona e dal suo potenziale biodegradativo. Nella maggior parte dei siti contaminati da solventi clorurati, i CAHs sono presenti in miscele di molecole a diverso grado di clorurazione, le quali possono non essere biodegradate tutte con la stessa via metabolica.

Così, l'applicazione di ossidazione aerobia diretta e/o cometabolismo aerobio a seguito di interventi basati sulla dechlorurazione riduttiva anaerobia potrebbe essere un promettente approccio, già testato per alcuni siti [Morkin et al., 2000; Devlin et al., 2004; Noell, 2009]: se la dechlorurazione riduttiva di CAHs altamente clorurati (es. PCE, TCE) porta all'accumulo di CV e cis- o trans-1,2-DCE, questi ultimi potrebbero essere completamente dechlorurati via ossidazione diretta o cometabolica [Frasconi et al., 2015].

I microrganismi giocano un importante ruolo nel risanamento di siti contaminati da solventi clorurati grazie a specifici enzimi batterici globalmente definiti dealogenasi, naturalmente disponibili o acquisiti per trasferimento genico orizzontale. Tali enzimi catalizzano la dealogenazione, ovvero la rimozione dei sostituenti alogeni da composti organoalogenati, sia in condizioni aerobie che anaerobie. In natura esistono differenti tipi di dealogenasi che, nonostante le diverse specificità di substrato nei confronti di molecole clorate, brominate o iodinate, condividono meccanismi catalitici simili basati sulla sostituzione nucleofila dell'alogeno [Ang et al., 2018].

Ossidazione aerobia diretta

L'ossidazione aerobia diretta avviene quando l'idrocarburo clorurato viene utilizzato dai microrganismi come unica fonte di carbonio ed energia e viene convertito in anidride carbonica e cloro inorganico. Il metabolismo ossidativo diretto di solventi clorurati nell'ambiente è mostrato in Fig. 7. Poiché i CAHs rappresentano il substrato di crescita primaria per le cellule batteriche, essi stimolano la proliferazione batterica, promuovendo ulteriormente la biodegradazione mediante un processo di bioaugmentazione [Xing et al., 2022].

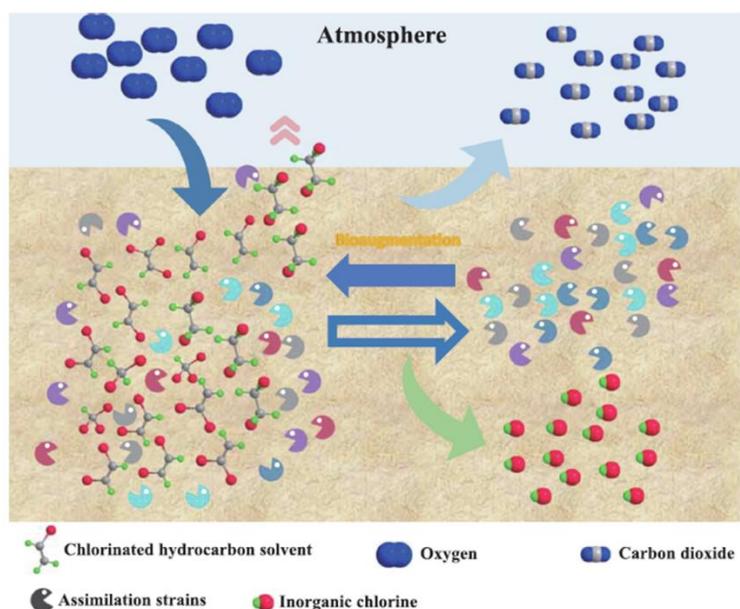


Fig. 7 Rappresentazione schematica del processo di ossidazione aerobia diretta di idrocarburi alifatici clorurati nell'ambiente [Xing et al., 2022].

I CAHs che possono essere utilizzati come substrati di crescita microbica comprendono CM, DCM, 1,2-DCA, CV, cis-1,2-DCE e TCE; in particolare, la biodegradazione di CV tramite ossidazione diretta è quella più spesso descritta [Dolinovà et al., 2017]. Diversi microrganismi in grado di operare ossidazione aerobia diretta delle suddette molecole sono stati isolati e caratterizzati. Essi comprendono batteri appartenenti ai phyla Proteobacteria (tra cui i generi *Hyphomicrobium*, *Methylobacterium*, *Nocardioideis*, *Ochrobactrum*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Starkeya*, *Stenotrophomonas*, *Xanthobacter*), Firmicutes (tra cui *Bacillus* e *Lysinibacillus*) e Actinobacteria (genere *Mycobacterium*) [Dolinovà et al., 2017; Xing et al., 2022] (Fig. 8).

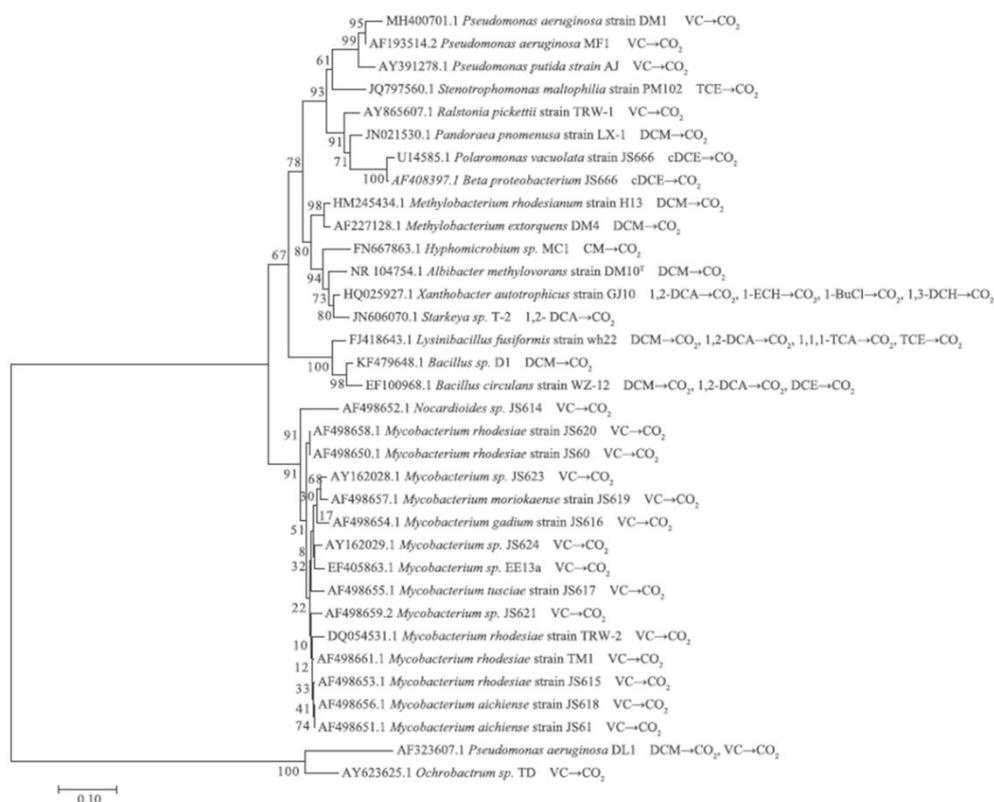


Fig. 8 Albero filogenetico basato sulle sequenze del gene 16S rRNA di batteri in grado di svolgere ossidazione aerobia diretta di CAHs [Xing et al., 2022].

Uno dei meccanismi di reazione descritto per l'ossidazione aerobia diretta di idrocarburi alifatici clorurati è la dealogenazione idrolitica operata dall'enzima aloalcano dealogenasi. La prima aloalcano dealogenasi, definita Dh1A, è stata identificata in *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 [Jansenn et al., 1989], il quale utilizza 1,2-DCA come fonte di carbonio. Tale dealogenasi ha mostrato un'ampia specificità di substrato, catalizzando la dealogenazione di più di 24 composti aloalifatici [Fetzner, 1998]. Le aloalcano dealogenasi convertono gli aloalcani nei corrispondenti alcoli, con il rilascio di ioni alogenuro e H^+ . Da un punto di vista strutturale, esse appartengono alla famiglia degli enzimi idrolitici "α/β-idrolasi fold", i quali contengono nel loro dominio catalitico sette foglietti β paralleli e uno antiparallelo, affiancati da α-eliche. Il

meccanismo catalitico è gestito da una triade aminoacidica Asp-His-Asp e, nel caso specifico della dealogenasi Dh1A, prevede l'iniziale attacco nucleofilo del gruppo carbossilato del residuo Asp124 su uno dei due atomi di carbonio della molecola di 1,2-DCA con la formazione di un estere intermedio e lo spiazzamento del cloro. Quest'ultimo viene dapprima stabilizzato da due residui di triptofano e poi rilasciato sotto forma di ione Cl⁻; l'estere intermedio viene idrolizzato da una molecola d'acqua, attivata da His289, con il rilascio di 2-cloroetanolo. Il residuo Asp260, quale terzo membro della triade catalitica, stabilizza la carica positiva temporanea su His289 [Fetzner, 1998; Ang et al., 2018].

Altro meccanismo di reazione descritto, in particolare, per la declorazione ossidativa diretta del diclorometano è la dealogenazione tiolitica messa in atto da batteri metilotrofi (quali *Hyphomicrobium*, *Methylophilus*, *Methylobacterium*) e catalizzata dall'enzima inducibile glutatione-S-transferasi con la formazione di cloruro e S-clorometilglutazione. Quest'ultimo intermedio instabile viene poi idrolizzato a glutatione, cloruro e formaldeide, molecola centrale nel metabolismo metilotrofo [Fetzner, 1998].

Riguardo ai meccanismi molecolari e ai batteri coinvolti nella degradazione ossidativa diretta dei cloroeteni ci sono poche informazioni, poiché queste molecole si ritrovano per lo più in ambienti a basso potenziale redox e vengono degradate soprattutto in condizioni anaerobiche. In ogni caso, sono stati descritti batteri in grado di ossidare cis-1,2-DCE e CV (Fig. 8), adattati a concentrazioni di ossigeno molto basse, come quelle che si possono ritrovare in nicchie all'interno di acquiferi contaminati [Dolinovà et al., 2017].

Cometabolismo ossidativo aerobio

Il cometabolismo si basa sulla capacità di alcuni microrganismi di trasformare fortuitamente molecole diverse dal loro substrato di crescita primario, senza una concomitante crescita microbica. Così, quando un contaminante ambientale non supporta la crescita microbica, il cometabolismo aerobio si configura come un utile approccio per il biorisanamento di un sito contaminato, particolarmente appropriato per i solventi clorurati. Un'ampia gamma di CAHs, eccetto quelli a maggior grado di clorurazione, può infatti essere biodegradata cometabolicamente in condizioni aerobiche. Le trasformazioni cometaboliche sono mediate da enzimi batterici normalmente utilizzati per l'ossidazione del substrato di crescita preferenziale, senza però apportare benefici in termini di carbonio ed energia alle cellule mediatrici della reazione; pertanto, il substrato di crescita primario deve essere periodicamente fornito per permettere la crescita microbica e la produzione degli enzimi stessi.

Le reazioni di ossidazione cometabolica a carico dei solventi clorurati coinvolgono gli enzimi ossigenasi, l'ossigeno molecolare e una fonte di equivalenti riducenti, tipicamente NAD(P)H. I

prodotti di ossidazione generati possono reagire con le macromolecole cellulari o possono essere idrolizzati spontaneamente in anidride carbonica, cloruro e altri prodotti non volatili facilmente mineralizzabili dai microrganismi [Alvarez-Cohen e Speitel, 2001]. Le ossigenasi, appartenenti alla categoria delle ossidoreduttasi, sono coinvolte in molteplici funzioni nella cellula batterica, fra cui biosintesi, detossificazione, catabolismo. Esse catalizzano la riduzione dell'O₂ con l'incorporazione di uno (monossigenasi) o due (diossigenasi) atomi di O nella molecola del substrato, il quale viene così ossidato. Le monossigenasi richiedono la presenza di un agente riducente per ridurre il secondo atomo di O ad H₂O; le diossigenasi, invece, non necessariamente richiedono agenti riducenti, poiché entrambi gli atomi di O₂ vengono ridotti a seguito dell'incorporazione nella molecola di substrato. Tutte le ossigenasi contengono un gruppo prostetico (flavina, eme, Cu o Fe) che facilita l'attivazione della molecola di O₂ nello stato reattivo [Arp et al., 2001].

I solventi clorurati possono essere cometabolicamente ossidati da diversi microrganismi che utilizzano le loro ossigenasi sui substrati preferenziali, quali metano, propano, propilene, isoprene, isopropilbenzene, toluene, fenolo, butano, ammoniaca. Batteri metanotrofi quali, *Methylosinus trichosporium* OB3b e *Methylomonas methanica* 68-1, utilizzano la loro metano monossigenasi (MMO), in entrambe le sue forme, solubile (sMMO) e particolato (pMMO), per ossidare fortuitamente CV, 1,1-DCE, cis- e trans-1,2-DCE, TCE, CF, 1,2-DCA e 1,1,1-TCA. L'ammoniaca monossigenasi (AMO) di *Nitrosomonas europaea*, può catalizzare l'ossidazione di CF, 1,2-DCA e TCE piuttosto che di ammoniaca. Gli isomeri del DCE e il TCE possono essere cometabolicamente ossidati anche da batteri degradatori di composti aromatici (quali toluene e fenolo) appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Ralstonia*, *Burkholderia* e *Variovorax*, grazie ad enzimi quali le toluene mono- e diossigenasi. *Pseudomonas* è anche coinvolta nell'ossidazione cometabolica di CV. Le alchene monossigenasi di *Xanthobacter* Py2 e *Rhodococcus corallinus* B-276 possono catalizzare l'ossidazione sia di alcheni (es. etilene, propilene) sia di cloroalcheni (es. TCE). *Mycobacterium vaccae* JOB5 con la sua propano monossigenasi può ossidare TCE [Alvarez-Cohen e Speitel, 2001; Arp et al., 2001; Jesus et al., 2016]. Fattori limitanti il tasso di degradazione cometabolica dei solventi clorurati comprendono: l'inibizione competitiva tra il substrato di crescita e il/i substrato/i cometabolico/i per il sito attivo dell'ossigenasi coinvolta; la deplezione nella cellula di agenti riducenti (es. NAD(P)H), i quali vengono rigenerati dal catabolismo dei normali substrati di crescita, ma non a seguito dell'ossidazione di un substrato cometabolico; la formazione di intermedi clorurati tossici per le ossigenasi stesse e per altri costituenti cellulari [Alvarez-Cohen e Speitel, 2001].

Declorurazione riduttiva anaerobia

Gli ambienti sotterranei, quali le falde acquifere e gli strati di suolo più profondi, sono spesso privi di ossigeno e i microrganismi che li popolano mettono in atto processi di respirazione anaerobia, in cui l'ossidazione della materia organica è accoppiata alla riduzione di un'ampia gamma di molecole organiche e inorganiche, compresi i solventi clorurati. La declorurazione riduttiva anaerobia dei CAHs è uno dei più importanti processi di dealogenazione biotica in ambienti anossici ed, essendo accoppiata alla sintesi di ATP mediante un meccanismo chemiosmotico, si configura come una vera e propria respirazione anaerobia, detta dealorespirazione (*OrganoHalide Respiration*, OHR), in cui il composto clorurato è utilizzato come accettore terminale di elettroni. OHR è quindi un processo respiratorio che, oltre a generare energia per i microrganismi che la mettono in atto, riduce o elimina la tossicità dei composti clorurati, o comunque li rende maggiormente biodegradabili, grazie alla sequenziale rimozione degli atomi di cloro e al conseguente rilascio di ioni cloruro (Cl^-) [Leys et al., 2013]. Più in particolare, la declorurazione riduttiva può essere mediata da un meccanismo idrogenolitico, in cui un atomo di cloro viene sostituito da un atomo di idrogeno, oppure da un meccanismo di dicloroeliminazione, in cui la rimozione di due atomi di cloro inizialmente legati ad atomi di carbonio adiacenti è accompagnata dalla formazione di un doppio legame tra i due atomi di carbonio (Fig. 9). Come tale, la dicloroeliminazione è limitata ai CAHs con atomi di cloro vicinali (es. 1,2-DCA) [Atashgahi et al., 2018].

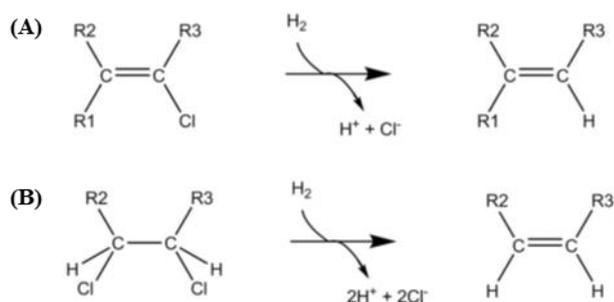


Fig. 9 Declorurazione riduttiva mediante (A) idrogenolisi e (B) dicloroeliminazione [Atashgahi et al., 2018].

I microrganismi in grado di ricavare energia per la crescita dalla declorurazione riduttiva di composti alifatici/aromatici alogenati sono classificati come OHRB (*OrganoHalide Respiring Bacteria*) e sono particolarmente importanti ai fini del biorisanamento di ambienti sotterranei contaminati da solventi clorurati. Generi di OHRB appartengono ai phyla Chloroflexi (*Dehalococcoides*, *Dehalogenimonas*, *Dehalobium*), Firmicutes (*Dehalobacter*, *Desulfitobacterium*), Deltaproteobacteria (*Anaeromyxobacter*, *Geobacter*, *Desulfomonile*, *Desulfuromonas*, *Desulfovibrio*, *Desulfoluna*), Epsilonproteobacteria (*Sulfurospirillum*) e Betaproteobacteria (*Shewanella*, *Comamonas*) [Türkowsky et al., 2018; Molenda et al., 2020] (Tab. 1).

Tab. 1 OrganoHalide Respiring Bacteria descritti in letteratura scientifica; indicati i ceppi noti degradatori di 1,2-DCA.

Phylum	Famiglia	Genere	Ceppi 1,2-DCA degradanti
Chloroflexi	Dehalococcoidaceae	<i>Dehalococcoides</i>	<i>D. mccartyi</i> 195, BAV1, 11a
		<i>Dehalogenimonas</i>	<i>D. lykanthroporepellens</i> BL-DC-9 <i>D. alkenigignens</i> IP3-3, SPB-1
	Chloroflexales incertae sedis	<i>Dehalobium</i>	-
Firmicutes	Peptococcaceae	<i>Desulfitobacterium</i>	<i>D. dichloroeliminans</i> LMG P-21439, <i>D. sp.</i> AusDCA
		<i>Dehalobacter</i>	<i>D. sp.</i> WL
Betaproteobacteria	Comamonadaceae	<i>Comamonas</i>	-
Deltaproteobacteria	Geobacteraceae	<i>Geobacter</i>	<i>G. sp.</i> AY, IAE
	Anaeromyxobacteraceae	<i>Anaeromyxobacter</i>	-
	Syntrophaceae	<i>Desulfomonile</i>	-
	Desulfuromonadaceae	<i>Desulfuromonas</i>	-
	Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i>	-
	Desulfobacteraceae	<i>Desulfoluna</i>	-
	Shewanellaceae	<i>Shewanella</i>	-
Epsilonproteobacteria	Campylobacteraceae	<i>Sulfurospirillum</i>	-

modificata da Türkowsky et al. (2018), Molenda et al. (2020) e Jiang et al. (2022).

Gli OHRB sono anaerobi stretti, caratterizzati da crescita lenta, sensibilità alla luce e alle variazioni di pH e necessitano di cofattori corrinoidi; risultano difficili da coltivare e crescono bene all'interno di comunità microbiche anaerobie, piuttosto che in coltura pura [Jugder et al., 2016]. Nei confronti della dealoespirazione, gli OHRB possono essere classificati come obbligati e facoltativi. I Chloroflexi e *Dehalobacter* sono OHRB obbligati, capaci di utilizzare esclusivamente composti alogenati come accettori terminali di elettroni; *Desulfitobacterium* e i membri dealogenanti dei Proteobacteria sono invece OHRB facoltativi, con un metabolismo più versatile che prevede la fermentazione di acidi organici e l'utilizzo di accettori di elettroni anche non alogenati, quali solfato, nitrato, fumarato e persino, nel caso di *Anaeromyxobacter dehalogenans* e *Sulfurospirillum multivorans*, piccole quantità di O₂ [Türkowsky et al., 2018]. Come descritto, gli OHRB appartengono a gruppi tassonomici abbastanza diversi e filogeneticamente distanti tra loro; essi possono dechlorurare un'ampia gamma di substrati alifatici e aromatici, senza che tuttavia sia stata riscontrata una precisa correlazione tra l'affiliazione filogenetica e la specificità del substrato clorurato [Hug et al., 2013].

L'enzima chiave nella dealoespirazione è la dealogenasi riduttiva (RDasi). Essa è costituita da una subunità catalitica (Reductive dehalogenase homologous A subunit, RdhA) rivolta sul

versante periplasmatico della membrana cellulare e presente in forma dimerica, e una subunità di ancoraggio alla membrana plasmatica (RdhB). RdhA ospita un cofattore corrinicoide (cobalamina o vitamina B₁₂) e due centri ferro-zolfo che mediano il meccanismo della dechlorurazione riduttiva: gli elettroni richiesti per la riduzione del substrato clorurato derivano da un donatore di elettroni (nella maggior parte dei casi rappresentato da idrogeno o acetato) e vengono trasferiti, attraverso i due centri Fe-S, alla cobalamina che, passando dallo stato ridotto (Co^{I/II}) allo stato ossidato (Co^{III}), causa la rottura del legame C-Cl e la sequenziale rimozione degli atomi di cloro con il rilascio di ioni Cl⁻. L'accoppiamento tra ossidazione del donatore di elettroni (es. H₂) e la dechlorurazione riduttiva dell'accettore di elettroni (CAH) è iniziato da una idrogenasi di membrana e coinvolge una catena di trasporto di elettroni transmembrana che culmina con la generazione di una forza motrice protonica e la conseguente sintesi di ATP [Jugder et al., 2016]. In Fig. 10 è rappresentato, come esempio, il pathway biochimico descritto in *Sulfurospirillum multivorans*.

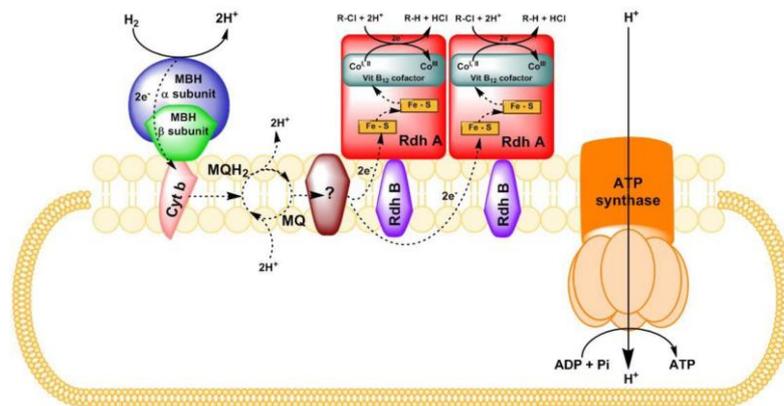


Fig. 10 Rappresentazione della catena di trasporto degli elettroni con H₂ come donatore di elettroni e un generico composto clorurato (R-Cl) come accettore di elettroni, descritta in *Sulfurospirillum multivorans*. RdhA, reductive dehalogenase catalytic subunit; RdhB, reductive dehalogenase membrane anchor protein; MBH, membrane-bound uptake hydrogenase; Cyt b, cytochrome b subunit of the MBH; MQ, menaquinone; MQH₂, dihydromenaquinone [Jugder et al., 2016].

La dealoespirazione necessita di condizioni ambientali favorevoli, ovvero di un basso potenziale redox e della presenza di idrogeno molecolare. È importante quindi il consorzio microbico in cui gli OHRB sono inseriti: H₂ viene infatti fornito dalla fermentazione di composti organici mediata da altri microrganismi. Tuttavia, la presenza nello stesso consorzio di batteri solfato-riduttori, ferro-riduttori, metanogeni risulta limitante per i processi di dechlorurazione riduttiva, a causa della competizione di tali batteri con gli OHRB per gli elettroni forniti da H₂ o acetato [McCarty, 1997].

I geni codificanti per la dealogenasi riduttiva sono localizzati in un operone che tipicamente comprende il gene *rdhA* per la subunità catalitica dell'enzima, il gene *rdhB* per la subunità di ancoraggio e uno o più geni addizionali (*rdhTKZECD*) [Hug et al., 2013; Molenda et al., 2020]. Il genoma di più di 60 OHRB è stato sequenziato. In generale, gli OHRB obbligati hanno

genomi di piccole dimensioni (1,3-3,2 Mbp) con un elevato numero di geni *rdhA* (5-38), a dimostrazione dell'estrema specializzazione nella dealoespirazione di questi microrganismi; il genoma di OHRB facoltativi, al contrario, ha maggiori dimensioni (2,9-6,5 Mbp) e ospita un numero più limitato di geni *rdhA* (1-7) [Türkowsky et al., 2018]. L'esistenza di plasmidi negli OHRB è generalmente rara e, se presenti, essi di norma non contengono geni *rdh* [Türkowsky et al., 2018].

Gli OHRB sono in grado di respirare un'ampia gamma di composti alogenati, sia alifatici che aromatici. Esistono infatti numerosi geni *rdhA* codificanti per dealogenasi riduttive che differiscono per lo specifico substrato alogenato che sono in grado di ridurre. La presenza di RDasi con differenti specificità di substrato in un microrganismo, in una coltura di arricchimento o in un sito contaminato, detta il range di composti clorurati che possono essere utilizzati come accettori di elettroni nel processo di dealoespirazione [Hug et al., 2013]. Tuttavia, la similarità di sequenza tra differenti geni *rdhA* e la specificità di substrato dei relativi enzimi RDasi non sono generalmente correlate: sebbene diverse RdhA condividano domini altamente conservati, infatti, anche minime variazioni di sequenza sono responsabili di differenti specificità di substrato [Jugder et al., 2016]. Alcune RDasi sono state identificate e parzialmente caratterizzate: in *Sulfurospirillum*, *Desulfitobacterium*, *Dehalobacter* e *Dehalococcoides* è stata identificata la dealogenasi PceA, avente specificità di substrato nei confronti di PCE e TCE; in *Dehalococcoides* sono state caratterizzate anche le dealogenasi TceA (che agisce su TCE) e VcrA (che riduce tutti gli isomeri del DCE e il CV); in *Desulfitobacterium dichloroeliminans* DCA1 è stata descritta la dealogenasi DcaA specifica per 1,2-DCA [Hug et al., 2013; Jugder et al., 2016]. Molte altre proteine RdhA devono ancora essere caratterizzate e la funzione ad esse assegnata è solo ipotetica [Molenda et al., 2020]. Da un punto di vista evolutivo, le regioni del genoma contenenti i geni *rdh* sono caratterizzate da elevata plasticità in quanto fisicamente associate a elementi genetici mobili che potrebbero giocare un ruolo nello sviluppo di nuovi pathway catabolici [Marzorati et al., 2007].

Declorazione riduttiva cometabolica

Molti batteri metanogeni, acetogeni, solfato-riduttori e ferro-riduttori sono in grado di svolgere una declorazione riduttiva cometabolica nei confronti dei solventi clorurati, senza tuttavia ricavarne beneficio in termini di energia per la cellula. Tale reazione è mediata da cofattori proteici, quali la vitamina B₁₂, il cofattore F₄₃₀ e il gruppo eme contenenti rispettivamente un atomo di cobalto, nickel e ferro, i quali passando tra differenti stati redox riducono la molecola target e possono fortuitamente utilizzare molecole di CAHs come accettori di elettroni [Atashgahi et al., 2018]. Di seguito alcuni esempi di batteri che riducono cometabolicamente

CAHs: batteri metanogeni, quali *Methanobacterium thermoautotrophicum* e *Methanosarcina* spp., dechlorurano CT, CF, 1,2-DCA, 1,1,1-TCA e PCE; l'acetogeno *Acetobacterium woodii* dechlorura comebolicamente CT, 1,1,1-TCA e PCE; *Desulfobacterium autotrophicum* riduce CT e 1,1,1-TCA; *Pseudomonas* sp. KC e *Shewanella putrefaciens* mediano la dechlorurazione di CT [Holliger e Schraa, 1994; Fetzner, 1998]. La dechlorurazione riduttiva cometabolica avviene molto più lentamente rispetto alla deaerazione e spesso non porta alla completa dechlorurazione di un composto clorurato. A causa della trasformazione fortuita di un composto da parte di enzimi che normalmente sono utilizzati dal microorganismo per altri scopi, il coinvolgimento del cometabolismo nella dechlorurazione riduttiva non è facile da discernere. Per esempio, comunità microbiche miste che dechlorurano composti organoclorurati hanno mostrato bassi tassi di crescita se paragonati a quelli di OHRB noti, probabilmente a causa del coinvolgimento di processi cometabolici o di OHRB ancora ignoti [Atashgahi et al., 2018].

SCOPO DEL LAVORO DI TESI

Il presente lavoro di tesi di dottorato rientra nell'ambito del biorisanamento ambientale di siti contaminati e, nello specifico, si è occupato della fase di caratterizzazione microbiologica di un'acqua prevalentemente contaminata da solventi clorurati, in particolare da 1,2-dicloroetano (1,2-DCA), e della valutazione del suo potenziale di biodegradazione, con l'obiettivo di fornire le conoscenze preliminari per la definizione di un'eventuale tecnologia di biorisanamento sito-specifica basata sullo sfruttamento di consorzi microbici autoctoni all'area contaminata.

Durante la prima fase di lavoro, l'obiettivo è stato quello di caratterizzare le comunità microbiche autoctone dell'acqua contaminata, descrivendone la struttura, la diversità e la composizione ed indagandone il potenziale catabolico intrinseco nei confronti della biodegradazione dei solventi clorurati (Capitolo 1).

La seconda fase di lavoro ha avuto come obiettivo quello di determinare le condizioni ottimali, in termini di biodegradazione del contaminante 1,2-DCA, per stimolare il potenziale catabolico intrinseco dell'acqua contaminata valutato nella precedente fase. A tale scopo numerosi microcosmi sono stati allestiti in diverse condizioni per biostimolare i metabolismi microbici descritti per la biodegradazione di 1,2-DCA, e monitorati per valutare l'abbattimento del contaminante (Capitolo 2).

Una volta valutate le massime efficienze di biodegradazione conseguibili in microcosmo, durante la terza fase di lavoro, è stato realizzato un test pilota in colonna, con l'obiettivo di verificare l'efficienza di biodegradazione del contaminante 1,2-DCA anche in una simulazione di Barriera Reattiva Permeabile, ovvero un'innovativa tecnologia di trattamento *in situ* di acque sotterranee contaminate (Capitolo 3).

In microcosmo è stata anche valutata l'efficacia di carrier biopolimerici biodegradabili quale innovativa tecnologia di immobilizzazione di batteri biodegradatori direttamente reclutati dall'acqua contaminata, allo scopo di ottenere una maggiore efficienza di biodegradazione di solventi clorurati, a basso costo e in maniera ecocompatibile (Capitolo 4).

Le attività sperimentali descritte sono state svolte presso il dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF) dell'Università degli Studi di Palermo, nello specifico presso il Laboratorio di Microbiologia Ambientale & Ecologia Microbica (EMME-Lab) di cui è responsabile la prof.ssa Paola Quatrini, co-tutor del presente lavoro di tesi, e presso il Laboratorio di Metodologie Innovative in Chimica Organica di cui è responsabile il prof. Andrea Pace, tutor della tesi. Parte delle attività sono state svolte in collaborazione con il Dott. Daniele di Trapani del Laboratorio di Ingegneria Sanitaria "Prof. Luigi Gagliardi" e con il Prof. Roberto Scaffaro del Laboratorio di Ingegneria dei Materiali del dipartimento di Ingegneria (DI) dell'Università degli Studi di Palermo.

CAPITOLO 1

CARATTERIZZAZIONE MICROBIOLOGICA DELL'ACQUA CONTAMINATA

INTRODUZIONE

Descrizione dell'acqua contaminata

Oggetto del presente studio è l'acqua prelevata da un'area contaminata da solventi clorurati. In particolare, 1,2-dicloroetano si configura come il principale responsabile della contaminazione, con concentrazioni che superano i limiti imposti dalla legge, raggiungendo anche valori nell'ordine del grammo per litro. Oltre a 1,2-DCA, nell'acqua contaminata sono stati rilevati altri solventi clorurati, quali CF, CV, 1,1- e 1,2-DCE, TCE, 1,1-DCA, 1,1,2-TCA, la cui concentrazione, seppur minore, ha superato talvolta i valori limite. Tra questi, il cloruro di vinile, composto anche più pericoloso di 1,2-DCA per l'ambiente e la salute umana, più tossico e accertato cancerogeno [Zelko et al., 2022], è il contaminante più abbondante dopo 1,2-DCA. Nell'area di studio sono dislocati otto punti di prelievo dell'acqua e i campioni di acqua contaminata da essi raccolti sono denominati MW14, MW31, MW32, MW33, MW34, MW37, MWE, MWE2. I campioni MW33, MW34 e MWE sono generalmente caratterizzati dai più elevati livelli di contaminazione da solventi clorurati, a cui a dare il maggiore contributo è 1,2-DCA. Per il campione MW14, caratterizzato anch'esso da un'elevata contaminazione, è CV a essere prevalente. Al contrario, i campioni MW31, MW37, MWE2 e MW32 mostrano generalmente minori livelli di contaminazione da solventi clorurati, in cui a prevalere è per lo più CV, piuttosto che 1,2-DCA. La spiegazione di questa differenza nella distribuzione della contaminazione da solventi clorurati nell'acqua prelevata dalla stessa area potrebbe risiedere nelle caratteristiche idrogeochimiche dell'area e nei flussi dell'acqua stessa. Come mostrato in Fig. 1.1, nell'area contaminata il principale flusso dell'acqua va da Nord-Est a Sud-Ovest. I campioni d'acqua MW33, MW34 e MWE vengono prelevati da punti che intercettano grandi portate di flusso dell'acqua proveniente da Nord-Est, dove è localizzata la presunta fonte principale di contaminazione da 1,2-DCA. Al contrario, i campioni MW14, MW31, MW37 e MWE2, che mostrano generalmente minori livelli di contaminazione da 1,2-DCA, sono prelevati da punti interessati da minori portate di flusso ed idraulicamente separati dalla zona a maggior grado di contaminazione da uno spartiacque.

Nell'acqua contaminata sono stati anche rilevati inquinanti non clorurati, come molecole inorganiche (solfati, boro, ammonio), metalli (arsenico, ferro, manganese, mercurio, nichel) e in alcuni casi idrocarburi, le cui concentrazioni superano talvolta i limiti consentiti dalla legge.

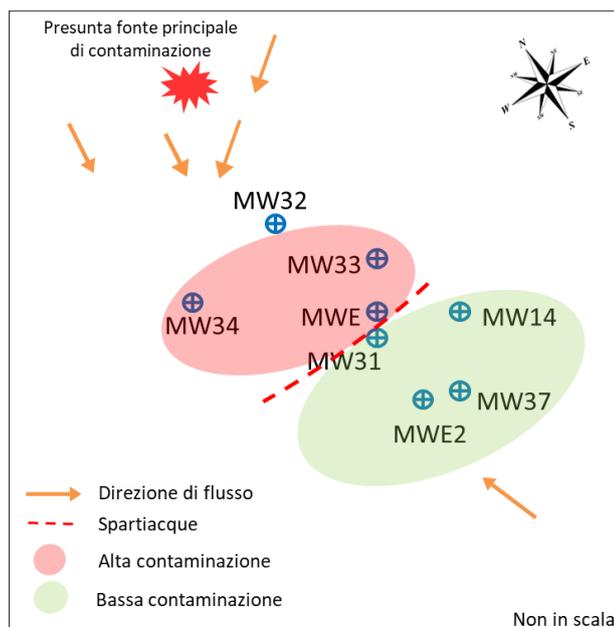


Fig. 1.1 Mappa schematizzata dell'area contaminata in cui sono mostrati i punti di prelievo dei campioni di acqua, la presunta fonte principale di contaminazione e la direzione di flusso dell'acqua.

SCOPO DEL LAVORO

La messa a punto di interventi di migliorata attenuazione o di biorisanamento *in situ* richiedono la preliminare caratterizzazione microbiologica della matrice contaminata, ovvero la conoscenza delle comunità microbiche autoctone e del loro potenziale biodegradativo nei confronti del/i contaminante/i.

Il primo obiettivo del presente studio è stato, infatti, quello di caratterizzare le comunità microbiche presenti nell'acqua contaminata, descrivendole in termini di diversità e composizione e indagandone il potenziale catabolico intrinseco nei confronti della biodegradazione dei solventi clorurati. Le comunità microbiche autoctone sono state monitorate nello spazio, in riferimento ai diversi punti di prelievo dell'acqua contaminata, e nel tempo. Campioni di acqua sono stati infatti raccolti e analizzati da otto punti di prelievo dislocati nell'area di studio, allo scopo di avere una visione globale della microbiologia dell'acqua impattata. Inoltre, soltanto i tre campioni di acqua che avevano mostrato il più alto grado di contaminazione da 1,2-DCA sono stati prelevati in tempi successivi per valutare le modificazioni nel tempo della struttura e della composizione delle comunità microbiche in relazione ai livelli di contaminazione.

MATERIALI E METODI

Campionamento dell'acqua dall'area contaminata

Campioni di acqua contaminata sono stati raccolti da otto punti di prelievo dislocati nell'area di studio. Sono stati effettuati tre campionamenti in un arco temporale di due anni. In particolare, nel primo campionamento (anno 2019) campioni di acqua contaminata sono stati raccolti dagli otto punti di prelievo presenti nell'area di studio; il secondo campionamento (anno 2020) ha riguardato solo i campioni MW33, MW34 e MWE, ovvero quelli che mostravano sempre le più elevate concentrazioni di 1,2-DCA; infine, il terzo campionamento (anno 2021) è stato effettuato solo per i campioni MW33 e MW34.

Per ogni evento di campionamento e per ogni campione di acqua raccolto sono stati misurati i parametri chimico-fisici dell'acqua campionata (pH, temperatura, potenziale redox, O₂ disciolto, conducibilità elettrica) mediante una sonda multiparametrica. I campioni di acqua sono stati raccolti in bottiglie da 1 L in vetro ambrato con tappi muniti di setti in teflon, preventivamente sterilizzate e condizionate con gas azoto, allo scopo di rimuovere l'ossigeno atmosferico (Fig. 1.2). Le bottiglie sono state riempite lentamente e fino all'orlo senza lasciare spazio di testa, minimizzando così il contatto con l'aria ed evitando la formazione di bolle e gorgogliamenti all'interno del campione in modo da mantenere per quanto possibile condizioni anaerobiche in tutte le fasi di prelievo. Una volta riempite, le bottiglie sono state chiuse strettamente, riposte al buio e in ambiente refrigerato e spedite entro 24 h al laboratorio di Microbiologia Ambientale & Ecologia Microbica (EMMElab) del dipartimento STEBICEF dell'Università degli Studi di Palermo, in cui i campioni di acqua sono stati processati entro 24-48 h.

Sugli stessi campioni di acqua sono state misurate le concentrazioni delle sostanze inquinanti mediante metodi ufficiali. In particolare, 1,2-DCA e altri CAHs sono stati rilevati secondo i metodi EPA 8260D 2018 o APAT CNR IRSA 5150 29/2003; le concentrazioni di cloruri, fluoruri, solfati, fosfati sono state determinate con metodo EPA 9056A 2007; l'ammonio è stato rilevato con metodo APAT CNR IRSA 4030 A2 C 29/2003; differenti metalli sono stati valutati mediante metodo EPA 6020B 2014.



Fig. 1.2 Campionamento di acqua dall'area contaminata e raccolta dei campioni in bottiglie di vetro ambrato.

Filtrazione dei campioni di acqua contaminata

Allo scopo di recuperare la biomassa microbica presente nell'acqua contaminata ed ottenerne successivamente il DNA, i campioni di acqua prelevati durante ciascun evento di campionamento sono stati filtrati. In particolare, l'acqua ottenuta dal primo campionamento è stata filtrata utilizzando due diversi sistemi: circa 2 L di acqua da ciascun campione sono stati filtrati attraverso membrane in acetato di cellulosa surfactant-free (SFCA) sterili di porosità 0,2 μm (NALGENE[®]) utilizzando una pompa da vuoto (Fig. 1.3A); circa 1 L di acqua di ciascun campione è stato, inoltre, filtrato attraverso membrane in polietersulfone (PES) sterili su un sistema Sterivex[™] (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) (Fig. 1.3B). I due sistemi di filtrazione sono stati scelti al fine di paragonare la resa in DNA estratto da ciascuno dei due tipi di membrane ed anche la struttura delle comunità microbiche da esse ottenute. Per i successivi campionamenti, è stato utilizzato solo il sistema di filtrazione con membrane in SFCA per filtrare 1 L di acqua da ciascun campione. Dopo la filtrazione, ciascuna membrana è stata ritagliata dal sistema in cui era inserita e conservata a -20 °C per la successiva estrazione del DNA.



Fig. 1.3 Filtrazione di acqua contaminata (A) su membrana in SFCA con pompa da vuoto e (B) su membrana in PES con sistema Sterivex[™].

Estrazione del DNA dalla biomassa filtrata

L'estrazione e la purificazione del DNA metagenomico dalla biomassa recuperata su ciascun tipo di filtro sono state condotte utilizzando il QIAamp[®] Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), secondo il relativo protocollo ma con qualche modifica nella fase iniziale (Fig. 1.4). In breve, per facilitare il distacco e la lisi delle cellule, la membrana filtrante è stata dapprima raschiata in superficie con un bisturi, ritagliata poi in piccoli pezzi ed infine miscelata

mediante vortex insieme al buffer di lisi cellulare (InhibitEx buffer, 2 mL). Il lisato cellulare così ottenuto è stato recuperato e, dopo incubazione a 95 °C per 5 min, è stato centrifugato a 14.000 rpm per 1 min. Il surnatante è stato quindi sottoposto alle successive fasi del protocollo proposto dalla casa produttrice. La purificazione del DNA è stata ottenuta mediante colonnina contenente resina cationica, la quale lega il DNA separandolo dal resto dei componenti cellulari. Il DNA estratto è stato eluito in 50 µL di acqua distillata ultraPURE™ DNase/RNase-free (GIBCO®) e quantificato tramite spettrofotometro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), mediante il quale ne è stata anche verificata la purezza.

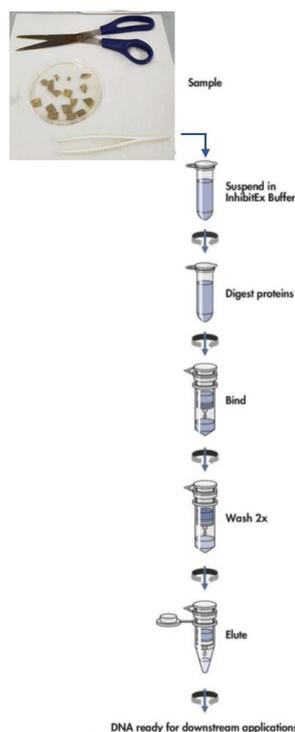


Fig. 1.4 Procedura per l'estrazione e la purificazione del DNA a partire dalla membrana filtrante ritagliata, così come proposta dal QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN).

Per verificarne la qualità e l'amplificabilità, il DNA estratto è stato usato come stampo per l'amplificazione del gene procariotico 16S rRNA con la coppia di primers universali 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') [Frank et al., 2008]. Per ciascun campione di DNA, la reazione di PCR è stata eseguita in 20 µL di volume finale utilizzando 0,1 µL di OneTaq® DNA Polymerase (NEW ENGLAND BioLabs®), OneTaq Standard Reaction Buffer 1X, 0,2 mM di dNTPs, 0,2 µM di ogni primer, 1 µL di DNA stampo. Il programma di amplificazione prevedeva uno step iniziale di denaturazione a 94 °C per 30 sec, seguito da 30 cicli di denaturazione a 94 °C per 30 sec, annealing a 50 °C per 1 min, estensione a 68 °C per 1 min e 30 sec, con una estensione finale a 68 °C per 5 min. I prodotti di PCR, di dimensioni pari a 1500 bp, sono stati sottoposti ad elettroforesi orizzontale su gel di agarosio all'1% in tampone TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X

insieme ad un'aliquota di 1 kb DNA Ladder (*NEW ENGLAND BioLabs*[®]); la corsa elettroforetica è stata condotta a 80 V per circa 30 min e la visualizzazione delle bande di PCR è avvenuta a seguito di colorazione con GelRedTM Nucleic Acid Stain (Biotium) ed esposizione a radiazione UV al ChemiDocTM (Bio-Rad[®]).

I campioni di DNA, così estratto e verificato, sono stati conservati a -20 °C per le successive analisi.

Analisi della diversità microbica dell'acqua contaminata mediante ARISA

L'ARISA (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) è una metodica di fingerprinting molecolare mediante la quale è possibile studiare la struttura e la diversità di una comunità microbica e confrontare comunità microbiche diverse [Sharma et al., 2022]. Essa viene applicata al polimorfismo di lunghezza dello spaziatore intergenico ribosomale procariotico ITS (*Internal Transcribed Spacer*), situato tra i geni per gli rRNA 16S e 23S. La regione ITS, infatti, è presente in copie multiple nelle varie specie e ceppi batterici e tra essi varia per inserzioni o delezioni di poche paia di basi; tale polimorfismo di lunghezza fa dell'ITS un marker filogenetico utilizzato ai fini della caratterizzazione microbiologica di un campione. La metodica ARISA prevede, a partire dal DNA totale della comunità microbica che si vuole studiare, l'amplificazione mediante PCR della regione ITS utilizzando primers oligonucleotidici universali, di cui uno marcato con fluoroforo, complementari alle regioni conservate nei geni per gli rRNA 16S e 23S. Gli ampliconi fluorescenti così ottenuti vengono separati mediante elettroforesi capillare eseguita con sistema automatizzato (GeneScan) [Fisher e Triplett, 1999]. In generale, i risultati di un'elettroforesi capillare sono rappresentati da elettroferogrammi i cui picchi individuano i prodotti di separazione; l'altezza dei picchi è data dall'intensità di fluorescenza, la quale è direttamente proporzionale all'abbondanza di ogni prodotto. Nel caso dell'analisi ARISA, ogni picco rappresenta uno spaziatore ITS di data lunghezza (in bp) e indica almeno un'OTU (*Operational Taxonomic Unit*); l'altezza del picco risulta direttamente proporzionale all'abbondanza di una determinata OTU all'interno della comunità studiata. In microbiologia, il concetto di OTU indica un raggruppamento tassonomico (popolazione, genere, specie) che mostra una notevole somiglianza genetica ed evolutiva (Fig. 1.5).

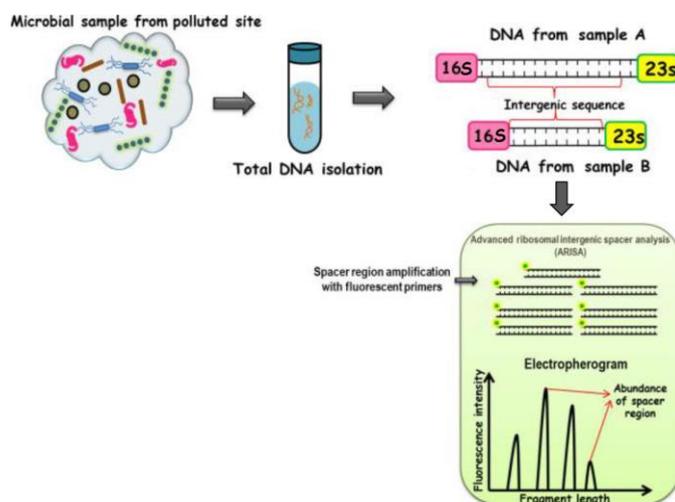


Fig. 1.5 Workflow della metodica ARISA.

Nel caso specifico, l'ARISA è stata applicata per lo studio delle comunità microbiche dei campioni di acqua contaminata ottenuti durante il primo campionamento (2019) da otto punti di prelievo dell'area studio e durante il secondo campionamento (2020) solo per i tre campioni a maggior grado di contaminazione da 1,2-DCA, allo scopo di monitorare le modifiche di tali comunità non solo nello spazio, in relazione al punto di prelievo e alle caratteristiche chimico-fisiche e di contaminazione dell'acqua campionata, ma anche nel tempo. Inoltre, solo per i campioni del 2019, l'analisi è stata estesa alla biomassa raccolta mediante entrambi i sistemi di filtrazione per ogni singolo campione di acqua contaminata, al fine di valutare se la differente filtrazione influisca sulla struttura della comunità microbica con essa ottenuta. Il DNA metagenomico estratto dai campioni di acqua è stato usato come stampo per l'amplificazione mediante PCR della regione ITS utilizzando la coppia di primers ITSf (5'-GTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3') e ITSReub-Hex (5'-GCCAAGGCATCCACC-3'), quest'ultimo marcato con sonda fluorescente [Cardinale et al., 2004]. Per ciascun campione di DNA, la reazione di PCR è stata eseguita in 20 μ L di volume finale utilizzando 0,1 μ L di OneTaq[®] DNA Polymerase (NEW ENGLAND BioLabs[®]), OneTaq Standard Reaction Buffer 1X, 0,2 mM di dNTPs, 0,2 μ M di ogni primer, 10 ng di DNA stampo. Il programma di amplificazione prevedeva uno step iniziale di denaturazione a 94 °C per 30 sec, seguito da 30 cicli di denaturazione a 94 °C per 30 sec, annealing a 55 °C per 1 min, estensione a 68 °C per 1 min e 30 sec, con una estensione finale a 68 °C per 5 min. I prodotti di PCR sono stati dapprima sottoposti ad elettroforesi orizzontale su gel di agarosio al 2% in tampone TAE 1X; la corsa elettroforetica è stata condotta a 80 V per circa 30 min e la visualizzazione delle bande di PCR è avvenuta a seguito di colorazione con GelRed[™] Nucleic Acid Stain (Biotium) ed esposizione a radiazione UV al ChemiDoc[™] (Bio-Rad[®]). I prodotti di PCR, così ottenuti e verificati, sono stati separati mediante elettroforesi capillare con tecnologia Genescan, servizio

effettuato dall'azienda BMR Genomic srl (Padova). I dati in uscita sono stati elaborati tramite il Peak Scanner™ Software v1.0 (Applied Biosystems) ottenendo un elettroferogramma per ciascun campione analizzato, in cui l'insieme dei picchi di altezza variabile è interpretato come il profilo specifico di una comunità microbica. I dati ottenuti da ciascun elettroferogramma sono stati ulteriormente elaborati per il calcolo degli indici di diversità e l'analisi cluster con il software per analisi statistica PAST (PALaeontological STATistics) v2.17c.

Analisi delle comunità microbiche dell'acqua contaminata mediante 16S rRNA metabarcoding

La composizione delle comunità microbiche presenti nei campioni di acqua contaminata è stata indagata mediante sequenziamento ad alta resa del gene 16S rRNA (16 rRNA metabarcoding). Tale analisi è stata applicata agli otto campioni del 2019 (filtrati su membrana in SFCA) allo scopo di caratterizzare le popolazioni autoctone dell'acqua contaminata in esame considerando diversi punti di prelievo, e, per il solo campione MW33, anche ai campioni prelevati nel 2020 e nel 2021 allo scopo di monitorare nel tempo la comunità microbica del campione di acqua maggiormente contaminata da 1,2-DCA.

Il metagenoma, ovvero l'insieme del materiale genetico presente in un campione ambientale, è rappresentativo delle specie che lo popolano. L'analisi metagenomica, basata sull'estrazione e sul sequenziamento del DNA del campione ambientale (DNA metagenomico), permette di studiare le comunità microbiche associate a un determinato contesto ambientale, evitando la coltivazione in laboratorio e dando informazioni molto più complete sulla composizione e sulla diversità filogenetica e potenzialmente funzionale dei membri componenti la comunità. I metodi colturali convenzionali, infatti, non permettono l'individuazione dei microrganismi non coltivabili, i quali rappresentano il 95-99,9% della popolazione di un campione ambientale [Ritz, 2007]. L'analisi metagenomica si basa su tecnologie di sequenziamento del DNA di nuova generazione (NGS, *Next Generation Sequencing*), ovvero tecniche di sequenziamento massivo con elevata capacità throughput (*high-throughput*), che permettono di sequenziare separatamente singole molecole di DNA a partire da miscele miste e di ottenere una quantità di dati ad una profondità e ampiezza impensabili con le metodiche di sequenziamento tradizionali basate sul metodo Sanger. Quando il sequenziamento di specifici markers genetici che forniscono informazioni tassonomiche è accoppiato alle tecnologie di NGS si parla di metabarcoding del DNA. L'idea di base del metabarcoding sta nell'esistenza di un così detto "barcoding gap", per il quale la variazione delle sequenze nucleotidiche all'interno di una specie è minore rispetto a quella che intercorre tra sequenze nucleotidiche di specie diverse. La sequenza nucleotidica contenente il marker genetico utilizzato in un'analisi metabarcoding

deve avere una serie di caratteristiche: deve essere distribuita universalmente nel gruppo in esame; deve variare con una velocità commisurata alla distanza evolutiva; deve essere specie-specifica; deve essere fiancheggiata da sequenze conservate in modo da permettere l'appaiamento dei primers da PCR. 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 infatti utilizzato come orologio molecolare per l'identificazione batterica, sia in coltura pura sia in analisi metagenomiche. La sua struttura primaria è un'alternanza di sequenze geniche altamente conservate tra Archaea e Bacteria, sequenze variabili e sequenze ipervariabili (V1-V9); queste ultime contengono una diversità di sequenza sufficiente per permettere la classificazione tassonomica dei ceppi batterici a livello di genere, e talvolta di specie, e per valutare relazioni filogenetiche basate sulla percentuale di somiglianza di sequenza (Fig. 1.6). L'analisi di metabarcoding di un DNA metagenomico applicata al gene 16S rRNA permette quindi di avere un'idea riguardo la composizione della comunità procariotica presente in un campione ambientale e l'abbondanza relativa di ciascuna OTU identificata.

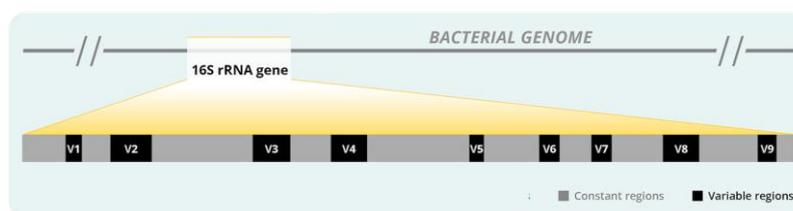


Fig. 1.6 Struttura del gene 16S rRNA.

L'analisi 16S rRNA metabarcoding applicata ai campioni di acqua contaminata indagati nel presente studio è stata condotta dall'azienda di servizi di sequenziamento BMR Genomics srl (Padova). In breve, a partire dal DNA metagenomico estratto da ciascun campione, fornito all'azienda, è stata amplificata la regione contenente le sequenze ipervariabili V3-V4 del gene 16S rRNA di Bacteria e Archaea con i primers modificati con code universali Pro341F (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNBGCASCAG-3') e Pro805R (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACNVGGGTATCTAATCC-3') [Takahashi et al., 2014]. La reazione di PCR è stata eseguita in 25 µL di volume finale utilizzando 0,2 µL di Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (ThermoFisher Scientific), High Fidelity PCR Buffer 1X, MgSO₄ 2 mM, 0,2 mM di dNTPs, 0,4 µM di ogni primer, 5 µL di DNA stampo. Il programma di amplificazione prevedeva uno step iniziale di denaturazione a 94 °C per 30 sec, seguito da 25 cicli di denaturazione a 94 °C per 30 sec, annealing a 55 °C per 30 sec, estensione a 68 °C per 45 sec, con una estensione finale a 68 °C per 7 min. I prodotti di PCR sono stati purificati con biglie magnetiche AMPure XP e legati

agli Index Illumina Nextera XT in un secondo step di PCR. La libreria di ampliconi indicizzati così ottenuta è stata sottoposta a sequenziamento su piattaforma Miseq Illumina con strategia 300PE (300 bp paired-end reads). L'high-throughput sequencing, su cui si basa il 16S rRNA metabarcoding, genera un'enorme quantità di dati di output (decine di migliaia di sequenze), i quali vengono elaborati mediante sofisticati software bioinformatici che consentono di raggruppare le sequenze in OTUs e assegnare le OTUs ai taxa di riferimento mediante il confronto con sequenze depositate in database specifici. Nel caso specifico, l'analisi post-sequencing ha previsto dapprima un controllo della qualità delle sequenze condotto con il software FASTQC. La pipeline di analisi utilizzata era basata sul software Qiime2 v2019.4 e, una volta assemblate, le sequenze filtrate sono state raggruppate in OTUs con una soglia di identità del 99%. L'assegnazione tassonomica è stata realizzata sulle sequenze rappresentative per ciascuna OTU utilizzando il database GreenGenes v13-8.

I valori di abbondanza relativa delle varie OTUs, calcolati a partire dal numero di reads associate a ciascuna OTU, sono stati utilizzati per calcolare gli indici di diversità mediante il software per analisi statistica PAST (PALaeontological STATistics) v2.17c.

Ricerca di generi OHRB mediante Nested-PCR del gene 16S rRNA

Specifiche sequenze del gene 16S rRNA presenti nel genoma dei più noti generi di batteri in grado di operare dealorespirazione di solventi clorurati (OHRB), in particolare *Dehalococcoides*, *Dehalogenimonas* (Dehalococcoidaceae), *Dehalobacter*, *Desulfitobacterium* (Peptococcaceae) e *Desulfuromonas* (Desulfuromonadaceae), sono state amplificate mediante approccio di Nested-PCR a partire dal DNA metagenomico estratto dal campione di acqua MW33 ottenuto nei tre campionamenti effettuati, con il particolare obiettivo di indagare la presenza/assenza di tali batteri nel campione di acqua maggiormente contaminata da 1,2-DCA. Poiché l'abbondanza di OHRB nei campioni di acqua potrebbe essere piuttosto ridotta, una PCR diretta che utilizza primers specifici per sequenze del gene 16S rRNA esclusive di batteri dealorespiranti, potrebbe rendere dei falsi negativi. Per aumentare la sensibilità e poter rilevare la presenza delle sequenze ricercate, è opportuno utilizzare, piuttosto, un approccio di Nested-PCR, che prevede una prima amplificazione del gene 16S rRNA con coppie di primers universali a partire dal DNA metagenomico della comunità microbica indagata, e una successiva amplificazione con coppie di primers OHRB-specifiche a partire dagli ampliconi ottenuti nel primo step [Löffler et al., 2005]. Per il primo step di PCR, il DNA metagenomico estratto dal campione MW33 del 2019, del 2020 e del 2021 è stato usato come stampo per l'amplificazione del gene 16S rRNA con la coppia di primers universali 27F/1492R [Frank et al., 2008]. Per ciascun campione di DNA, la reazione di PCR è stata eseguita in 30 µL di volume

finale utilizzando 0,15 µL di DreamTaq™ DNA polymerase (ThermoFisher Scientific™), DreamTaq Buffer 1X, 0,2 mM di dNTPs, 0,2 µM di ogni primer, 1 µL di DNA stampo. Il programma di amplificazione prevedeva uno step iniziale di denaturazione a 95 °C per 3 min, seguito da 30 cicli di denaturazione a 95 °C per 30 sec, annealing a 50 °C per 30 sec, estensione a 72 °C per 1 min, con una estensione finale a 72 °C per 15 min. Per il secondo step, diluizioni 1:5 degli ampliconi del gene 16S rRNA ottenuti nella PCR con i primers universali sono state utilizzate come stampo per l'amplificazione di sequenze del gene 16S rRNA OHRB-specifiche con le coppie di primers riportate in Tab. 1.1. Per ciascun campione, la reazione di PCR è stata eseguita in 20 µL di volume finale utilizzando 0,1 µL di DreamTaq™ DNA polymerase (ThermoFisher Scientific™), DreamTaq Buffer 1X, 0,2 mM di dNTPs, 0,25-0,5 µM di ogni primer (0,4 µM per le coppie Dhc1f/Dhc264r e Desulfo16sF3/Desulfo16sR5; 0,5 µM per le coppie Dhb477f/Dhb647r e BL-DC-142f/BL-DC-1351r; 0,25 µM per la coppia Dsm16Sf/Dsm16Sr), 1 µL di DNA stampo. Il programma di amplificazione era uguale a quello utilizzato nel primo step di PCR, con temperature di annealing specifiche per ogni coppia di primers (Tab. 1.1).

Tab. 1.1 Coppie di primers per sequenze del gene 16S rRNA specifiche di generi OHRB.

OHRB	Coppia di primers	Sequenza (5'→3')	T _a (°C)	Prodotto (bp)	Riferimento bibliografico
<i>Dehalococcoides</i>	Dhc1f	GATGAACGCTAGCGGCG	59	264	Grostern e Edwards, 2009
	Dhc264r	CCTCTCAGACCAGCTACCGATCGAA			
<i>Dehalogenimonas</i>	BL-DC-142f	GTGGGGGATAACACTTCGAAAGAAGTGC	63	1199	Chen et al., 2014
	BL-DC-1351r	AACGCGCTATGCTGACACGCGT			
<i>Dehalobacter</i>	Dhb477f	GATTGACGGTACCTAACGAGG	63	170	Grostern e Edwards, 2006
	Dhb647r	TACAGTTTCCAATGCTTTACGG			
<i>Desulfitobacterium</i>	Desulfo16sF3	TTARTAGATGGATCCGCGTCTG	51	500	Marzorati et al., 2006
	Desulfo16sR5	TTTCCGATGCAGTCCCAGG			
<i>Desulfuromonas</i>	Dsm16Sf	AACCTTCGGGTCTACTGTC	58	835	Löffler et al., 2000
	Dsm16Sr	GCCGAAGTACCCTATGTT			

Dopo entrambi gli step di amplificazione, i prodotti di PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi orizzontale su gel di agarosio all'1% in tampone TAE 1X insieme ad un'aliquota di 100 bp o 1 kb DNA Ladder (*NEW ENGLAND BioLabs*®); la corsa elettroforetica è stata condotta a 80 V per circa 30-40 min e la visualizzazione delle bande di PCR è avvenuta a seguito di colorazione con GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium) ed esposizione a radiazione UV al ChemiDoc™ (Bio-Rad®).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Parametri chimico-fisici dei campioni di acqua contaminata

La Tab. 1.2 mostra, per tutti gli eventi di campionamento, i parametri chimico-fisici dei campioni di acqua e le concentrazioni delle sostanze inquinanti, diverse dai solventi clorurati. In generale, l'acqua contaminata è caratterizzata da condizioni riducenti, con concentrazioni di O₂ disciolto inferiori a 1 mg/L e valori negativi di potenziale redox (compresi tra -462 in MW34 e -51 in MWE2), a indicare un ambiente principalmente anaerobio. Il pH si mantiene vicino alla neutralità, in un range da 5,99 a 7, e la temperatura media è di 23 °C. Responsabili della contaminazione sono, oltre agli inquinanti inorganici riportati in Tab. 1.2, soprattutto diversi solventi clorurati. Come mostrato in Tab. 1.3, 1,2-DCA e CV sono i contaminanti prevalenti e la loro concentrazione varia per sei ordini di grandezza nei diversi campioni (0,6 – 320.000 µg/L per 1,2-DCA e 0,14 – 21.000 µg/L per CV), con i più alti livelli rilevati nel campione MW33, seguito da MWE e MW34. I valori registrati per queste sostanze eccedono di gran lunga le concentrazioni minime indicate nel D. Lgs. 152/2006. Livelli di contaminazione molto minori sono stati registrati, invece, per i campioni MW31, MW32, MW37 e MWE2, con concentrazioni di 1,2-DCA e CV di pochi µg/L. Il campione di acqua MW14 mostrava contaminazione da CV, ma 1,2-DCA non rilevato. Fra gli altri solventi clorurati, sono stati rilevati anche 1,1-DCE, 1,2-DCE, 1,1-DCA e 1,1,2-TCA, sebbene in concentrazioni molto minori rispetto ai prevalenti 1,2-DCA e CV (Tab. 1.3).

Le elevate e perduranti concentrazioni raggiunte da 1,2-DCA nell'area in esame fanno ipotizzare l'assenza o la scarsa rilevanza di fenomeni di attenuazione naturale, biotici o abiotici. Il CV rilevato, anch'esso a livelli considerevoli, potrebbe derivare dalla trasformazione di 1,2-DCA, il quale rappresenta l'inquinante primario. Per esempio, in anaerobiosi, condizione che caratterizza l'acqua in esame, 1,2-DCA potrebbe essere idrolizzato abioticamente in CV [Nobre et al., 2017], e tale trasformazione potrebbe trovare condizioni più favorevoli in alcune regioni dell'area contaminata piuttosto che in altre (per es. nella regione corrispondente al campione MW14).

I campioni di acqua presentano notevoli differenze in relazione al punto di prelievo e al periodo del campionamento, sia nei parametri chimico-fisici sia nei livelli di contaminazione da solventi clorurati. Questa grande e inaspettata variabilità nello spazio e nel tempo potrebbe essere dovuta ai movimenti di flusso delle acque nell'area contaminata e all'instaurarsi di due zone a maggiore e minore grado di contaminazione, come ipotizzato precedentemente. Inoltre, la probabile presenza di fasi DNAPL potrebbe rappresentare una continua fonte di rilascio di solventi

clorurati alla fase acquosa, contribuendo alla disomogenea distribuzione della contaminazione nell'area in esame.

Stima della biomassa dei campioni di acqua contaminata

La biomassa presente nei campioni di acqua contaminata è stata stimata come quantità di dsDNA estratto riferito a volume di acqua filtrata. I campioni raccolti nel 2019 sono stati filtrati con due diversi sistemi: su membrane in SFCA oppure su membrane in PES. Per entrambi i tipi di membrane filtranti utilizzate per ciascun campione di acqua è stata ottenuta una resa simile in termini di DNA totale estratto e l'effetto del differente sistema di filtrazione sulla quantità di biomassa raccolta e il relativo DNA non è risultato significativo (dati non mostrati). La Tab. 1.4 mostra la quantità di DNA totale estratto per volume di acqua filtrata ottenuta per ogni campione e per ogni evento di campionamento effettuato. Solo per il primo campionamento, ogni valore rappresenta la media \pm SE del DNA totale estratto da entrambi i tipi di membrane filtranti, in SFCA e in PES. Per i successivi campionamenti ogni valore risulta da una singola filtrazione su membrane in SFCA. La quantità di DNA nell'acqua contaminata va da un minimo di 247 ± 37 ng/L (campione MW31) ad un massimo di 7752 ± 327 ng/L (campione MWE) per il primo campionamento e cambia anche nel tempo, aumentando per il campione MW33 e diminuendo per il campione MWE (Tab. 1.4).

Tab 1.2 Parametri chimico-fisici dei campioni di acqua contaminata.

	MW14	MW31	MW32	MW33	MW33	MW33	MW34	MW34	MW34	MW37	MWE	MWE	MWE2
	<i>2019</i>	<i>2019</i>	<i>2019</i>	<i>2019</i>	<i>2020</i>	<i>2021</i>	<i>2019</i>	<i>2020</i>	<i>2021</i>	<i>2019</i>	<i>2019</i>	<i>2020</i>	<i>2019</i>
Potenziale redox (mV)	-326	-92	-389	-198	-243	-199	-462	-445	-368	-247	-228	-247	-51
O ₂ disciolto (mg/L)	0,04	0,16	0,04	0,32	0,13	0,27	0,08	0,07	0,09	0,05	0,35	0,18	0,91
Temperatura (°C)	21,86	22,53	21,28	21,92	30,51	23,3	21,45	21,87	22,1	22,48	23,71	26,43	22,61
pH	6,42	6,62	6,96	5,99	6,37	6,1	6,3	6,56	6,3	7	6,37	6,52	6,77
Conducibilità elettrica (µS/cm)	8215	13877	11372	22404	19620	19532	10422	9270	8953	8052	23467	20190	21944
Solidi disciolti totali (mg/L)	5700	8100	8200	14000	13000	-	7500	7000	6830	5500	14000	13000	14000
Cloruri (mg/L)	1600	3800	2700	7900	5300	-	1800	1800	1590	2100	7300	4400	7100
Fluoruri (µg/L)	1000	1400	1000	670	720	-	910	1100	1200	1300	880	900	1000
Solfati (mg/L)	1600	2400	2700	1700	1600	-	1300	1900	2090	1000	2500	1700	1900
Fosfati (mg/L)	0,06	0,11	0,15	0,97	<0,065	-	0,063	<0,065	1,48	0,1	0,16	<0,065	0,16
Ammonio (mg/L)	6,9	350	3,4	100	120	-	1,8	2	2,18	22	370	360	220
Alluminio (µg/L)	13	<11	18	<11	<28	-	27	<28	<20	16	18	<28	13
Arsenico (µg/L)	18	4	<1,8	7,2	4,8	-	43	23	20,8	<1,8	9,8	14	4,7
Boro (µg/L)	1200	1900	3500	3600	3800	-	4200	2900	3370	1200	2800	2900	2900
Cobalto (µg/L)	<2,1	3,9	<2,1	<2,1	0,56	-	2,4	1,4	0,84	<2,1	<2,1	0,51	<2,1
Ferro (µg/L)	1700	4400	110	7300	5100	-	36000	25000	32600	2000	4800	5600	7100
Manganese (µg/L)	2200	890	2100	2600	2100	-	2000	1700	1570	440	2600	1900	1300
Mercurio (µg/L)	<0,49	<0,49	<0,49	<0,49	<0,42	-	<0,49	0,5	<0,10	<0,49	1,2	<0,42	<0,49
Nichel (µg/L)	3,5	5	<2,2	4,3	6,1	-	<2,2	0,96	1,05	8,2	4,9	1,8	23
Zinco (µg/L)	<12	<12	<12	<12	13	-	13	70	<20	<12	15	19	47
Idrocarburi totali (µg/L)	55	<29	<29	130	76	-	<29	44	1490	<29	99	44	<29

In grassetto i valori che superano le CSC indicate dal D. Lgs. 152/06.

Tab. 1.3 Concentrazione dei solventi clorurati rilevati nei campioni di acqua contaminata.

	MW14	MW31	MW32	MW33	MW33	MW33	MW34	MW34	MW34	MW37	MWE	MWE	MWE2
	<i>2019</i>	<i>2019</i>	<i>2019</i>	<i>2019</i>	<i>2020</i>	<i>2021</i>	<i>2019</i>	<i>2020</i>	<i>2021</i>	<i>2019</i>	<i>2019</i>	<i>2020</i>	<i>2019</i>
1,2-DCA (µg/L)	<4,7	1,7	0,6	220000	320000	35000	25000	20000	14600	1,9	130000	35000	16
CV (µg/L)	11000	4,8	0,14	21000	12000	3200	1600	520	490	0,59	8300	3200	5
CF (µg/L)	<1,3	<0,013	<0,013	<13	<13	<1,30	16	<1,30	<0,05	<0,013	<13	<1,30	<0,013

1,1-DCE (µg/L)	48	0,23	0,39	1200	500	94	72	18	15,1	0,33	180	94	0,9
1,1-DCA (µg/L)	33	23	1	160	84	42	130	54	58	0,93	53	42	3,1
1,2-DCE (µg/L)	17	0,92	0,17	120	<84	29	6,9	<8,40	4,1	5,8	<39	29	3,3
1,1,2-TCA (µg/L)	<1,7	<0,017	<0,017	78	65	2,2	17	7,5	4,5	<0,017	<17	2,2	<0,017

In grassetto i valori che superano le CSC indicate dal D. Lgs. 152/06.

Tab. 1.4 DNA totale per volume di acqua filtrata per ciascun campionamento.

	MW14	MW31	MW32	MW33	MW33	MW33	MW34	MW34	MW37	MWE	MWE	MWE2
	2019	2019	2019	2019	2020	2021	2019	2020	2019	2019	2020	2019
DNA (ng/L)	329 ±45	247 ±37	280 ±35	255 ±44	1766	3391	398	451	689 ±125	7752 ±327	1523	5986±407

Per il campionamento del 2019, ogni valore rappresenta la media ±SE del DNA estratto dalle membrane filtranti in SFCA e in PES. Per i campionamenti successivi, ogni valore è il risultato di una singola filtrazione su membrane in SFCA.

Tab. 1.5 Indici di diversità delle comunità microbiche dei campioni di acqua contaminata ottenuti dal primo campionamento e filtrati su membrane in SFCA e in PES, calcolati sui dati ARISA.

	MW14		MW31		MW32		MW33		MW34		MW37		MWE		MWE2	
	SFCA	PES														
Taxa (S)	21	24	25	24	39	26	56	30	83	19	30	29	11	9	53	53
Shannon (H)	2,17	2,28	2,53	2,28	3,13	2,50	2,87	2,11	3,38	2,20	2,30	2,74	1,85	1,87	2,70	2,39
Dominance (D)	0,22	0,17	0,13	0,17	0,06	0,14	0,15	0,29	0,08	0,16	0,25	0,14	0,23	0,19	0,17	0,27
Simpson (1-D)	0,78	0,83	0,87	0,83	0,94	0,86	0,8	0,71	0,92	0,84	0,75	0,86	0,77	0,81	0,83	0,73

Per il campione MW14-PES l'analisi ARISA non è andata a buon fine.

Tab. 1.6 Risultati dell'analisi 16S rRNA metabarcoding eseguita sui campioni di acqua contaminata e indici di diversità su di essi calcolati.

	MW14	MW31	MW32	MW33	MW33	MW33	MW34	MW37	MWE	MWE2
	2019	2019	2019	2019	2020	2021	2019	2019	2019	2019
n° reads finali	40041	40025	58214	51563	60204	36384	46058	47041	44089	45084
OTUs (99% id.)	348	777	782	811	401	223	759	1888	126	361
Shannon (H)	4,64	4,20	4,54	5,16	3,65	2,60	5,15	6,38	1,30	3,85
Dominance (D)	0,02	0,07	0,05	0,02	0,06	0,20	0,02	0,01	0,46	0,07
Simpson (1-D)	0,98	0,93	0,95	0,98	0,94	0,80	0,98	0,99	0,54	0,93

Diversità e composizione delle comunità microbiche nei campioni di acqua contaminata

Le comunità microbiche dell'acqua contaminata prelevata da otto diversi punti dell'area studio durante il primo campionamento (2019) sono state caratterizzate sia in termini di struttura e diversità mediante ARISA, sia in termini di composizione mediante 16S rRNA metabarcoding, allo scopo di studiare le popolazioni autoctone, di valutarne le modifiche nello spazio e di verificarne il potenziale biodegradativo nei confronti dei solventi clorurati.

L'analisi ARISA, condotta per ciascun campione a partire dalla biomassa raccolta per filtrazione su due tipi di membrane (in SFCA e in PES), ha mostrato, nei vari campioni, la presenza di comunità microbiche piuttosto ricche e diversificate. In Tab. 1.5 sono riportati gli indici di alfa diversità di ogni comunità indagata. La ricchezza (S), espressa come numero di OTUs, è compresa tra 9 e 83 e, in generale, risulta simile nello stesso campione di acqua filtrato sui due tipi di membrane, mentre varia tra i diversi campioni. In particolare, il campione MWE2 mostra la comunità più ricca con un numero medio di OTUs pari a 53, a differenza del campione MWE che invece risulta caratterizzato dai più bassi livelli di ricchezza con un numero medio di OTUs pari a 10. L'indice Shannon (H) tiene conto sia del numero di specie che delle abbondanze relative, sintetizzando l'informazione in un unico valore di diversità; esso assume valore 0 quando tutti gli individui appartengono ad una specie e valore massimo, $\log(S)$, quando gli individui sono ugualmente distribuiti tra tutte le specie. Nel caso specifico, l'indice di Shannon ha valori che vanno da 1,85 (MWE-SFCA) a 3,4 (MW34-SFCA). L'indice di Simpson (1-D) esprime la probabilità che due individui di una comunità, presi in maniera casuale, appartengano alla stessa specie; in comunità molto diversificate, in cui vi sono molte specie con pochi individui ciascuna, questa probabilità è bassa, al contrario, quando molti individui sono concentrati in una o poche specie l'indice ha valori più alti. Esso varia tra 0 e 1, dove 1 indica la dominanza massima (una specie rappresenta tutti gli individui) e 0 la diversità massima. Nel caso specifico, l'indice di Simpson ha valori compresi tra 0,71 (MW33-PES) e 0,94 (MW32-SFCA) (Tab. 1.5). Al fine di determinare il grado di similarità nella struttura delle comunità batteriche dei diversi campioni di acqua contaminata, i profili ARISA ottenuti per ciascun campione sono stati utilizzati per costruire il cladogramma mostrato in Fig. 1.8. Quest'ultimo separa le comunità microbiche analizzate in due clusters principali; all'interno di ogni cluster si osserva un'elevata similarità tra le comunità raccolte sui due tipi di membrane filtranti per ciascun campione e notevoli differenze tra comunità microbiche provenienti da campioni di acqua diversi. I due clusters principali, tra l'altro, raggruppano le comunità microbiche coerentemente rispetto ai livelli di contaminazione da solventi clorurati dei relativi campioni di acqua: nello stesso cluster, infatti, rientrano le comunità microbiche derivanti dai campioni MW33, MW34, MWE e MW14, ovvero quelli a maggior grado di contaminazione da 1,2-DCA

e CV. Parrebbe quindi, che la presenza di elevate concentrazioni di solventi clorurati selezioni nell'area di studio comunità microbiche più simili tra loro e maggiormente diverse rispetto a quelle presenti in acque meno contaminate. Inoltre, il fatto che i due tipi di membrane filtranti utilizzate per ciascun campione di acqua contaminata mostrino una resa in DNA estratto e un profilo ARISA di comunità microbica simili, dimostra come il differente sistema di filtrazione non influisca né sulla quantità, né sulla qualità della biomassa raccolta. Di conseguenza, per le successive indagini mirate allo studio della composizione delle otto comunità microbiche raccolte dall'acqua in esame è stato scelto il DNA metagenomico estratto a partire dalla sola membrana in SFCA.

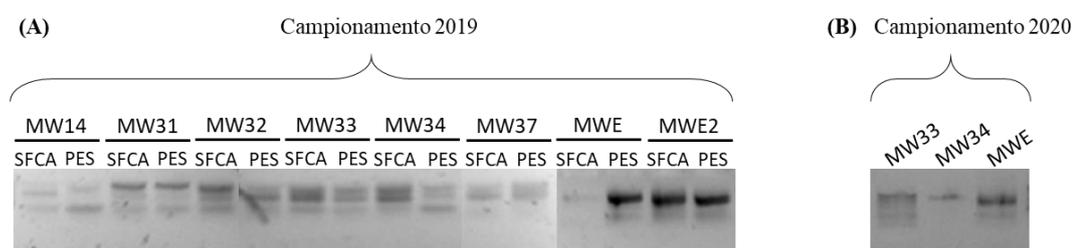


Fig. 1.7 Prodotti di amplificazione della regione ITS visualizzati su gel di agarosio al 2% corrispondenti ai campioni di acqua contaminata prelevati durante (A) il primo e (B) il secondo campionamento.

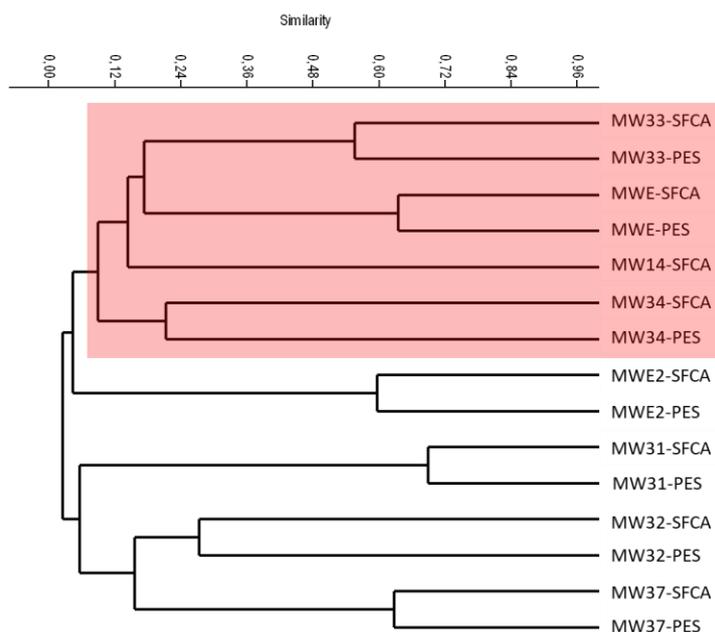


Fig. 1.8 Cladogramma costruito sui profili ARISA delle comunità microbiche dei campioni di acqua contaminata raccolti durante il primo campionamento (2019) e filtrati su due tipi di membrane (in SFCA e in PES). Per il campione MW14-PES l'analisi ARISA non è andata a buon fine. Similarità calcolata utilizzando il coefficiente di Bray-Curtis. Evidenziati in rosso i campioni di acqua a maggior grado di contaminazione da 1,2-DCA e CV.

L'indagine di 16S rRNA metabarcoding ha permesso di delineare la composizione delle comunità microbiche autoctone agli otto campioni di acqua contaminata, identificando i taxa di appartenenza e l'abbondanza relativa di ogni taxa. Il numero di reads finali, ovvero dopo i processi di trimming, denoising e filtering, per ogni campione era compreso tra 40.025 (MW31)

e 58.214 (MW32); il numero di OTUs, clusterizzate al 99% di identità, rientrava in un range da 126 (MWE) a 1.888 (MW37) (Tab 1.6). L'analisi metagenomica ha evidenziato un'elevata diversità microbica dell'acqua in esame, con un totale di 70 phyla, 220 famiglie e 261 generi identificati nella totalità dei campioni; diversità che contraddistingue anche ogni singolo campione, come è evidente dagli elevati valori di indice Shannon. Solo il campione MWE mostra un numero ridotto di OTUs e un indice Shannon più basso rispetto agli altri campioni (Tab. 1.6). Tutti i campioni hanno evidenziato un rapporto Bacteria/Archaea superiore all'85% (Fig 1.9).

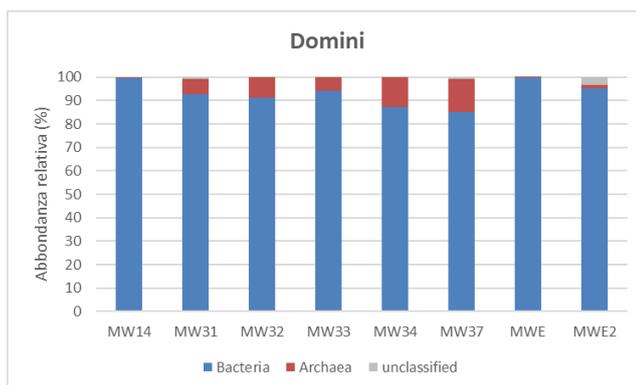


Fig. 1.9 Abbondanza relativa (%) dei domini di Bacteria e Archaea nelle comunità microbiche dei campioni di acqua contaminata ottenuti dal primo campionamento.

Gli istogrammi in Fig. 1.10 mostrano la composizione delle comunità studiate a livello tassonomico di phylum (Fig. 1.10A) e famiglia (Fig. 1.10B), prendendo in considerazione, in entrambi i casi, i taxa identificati con abbondanza relativa superiore all'1%.

A livello tassonomico di phylum, tra i 70 phyla identificati in tutti i campioni, solo 22 hanno un'abbondanza relativa superiore all'1% (Fig. 1.10A). Tra essi, i Proteobacteria sono presenti in tutti gli otto campioni come il phylum più rappresentato, con un'abbondanza relativa compresa tra 17,8% (MW33) e 97,7% (MWE), seppur le classi dominanti all'interno del phylum differiscano tra i campioni (Alphaproteobacteria sono i più abbondanti in MW14, Betaproteobacteria in MW31, MW37 e MWE2, Gammaproteobacteria in MW32, Deltaproteobacteria in MW33 e MW34, Epsilonproteobacteria in MWE). La dominanza dei Proteobacteria è piuttosto marcata in tutti i campioni, ad eccezione del campione di acqua maggiormente contaminata da 1,2-DCA, ovvero MW33, in cui i phyla Proteobacteria (17,8%), GN02 (15,5%), Bacteroidetes (10,4%) e Firmicutes (9,4%) mostrano un'abbondanza relativa simile. Dopo i Proteobacteria, i phyla più rappresentati sono diversi tra i vari campioni. Tra i gruppi più abbondanti vi sono i phyla Bacteroidetes, Firmicutes e Nitrospirae, appartenenti al dominio dei Bacteria, il phylum Parvarchaeota del dominio degli Archaea e le divisioni GN02 e TM7, con un'abbondanza relativa di almeno il 10% in almeno un campione. Tra i gruppi meno abbondanti, Chloroflexi e Actinobacteria sono stati identificati in tutti i campioni, seppur

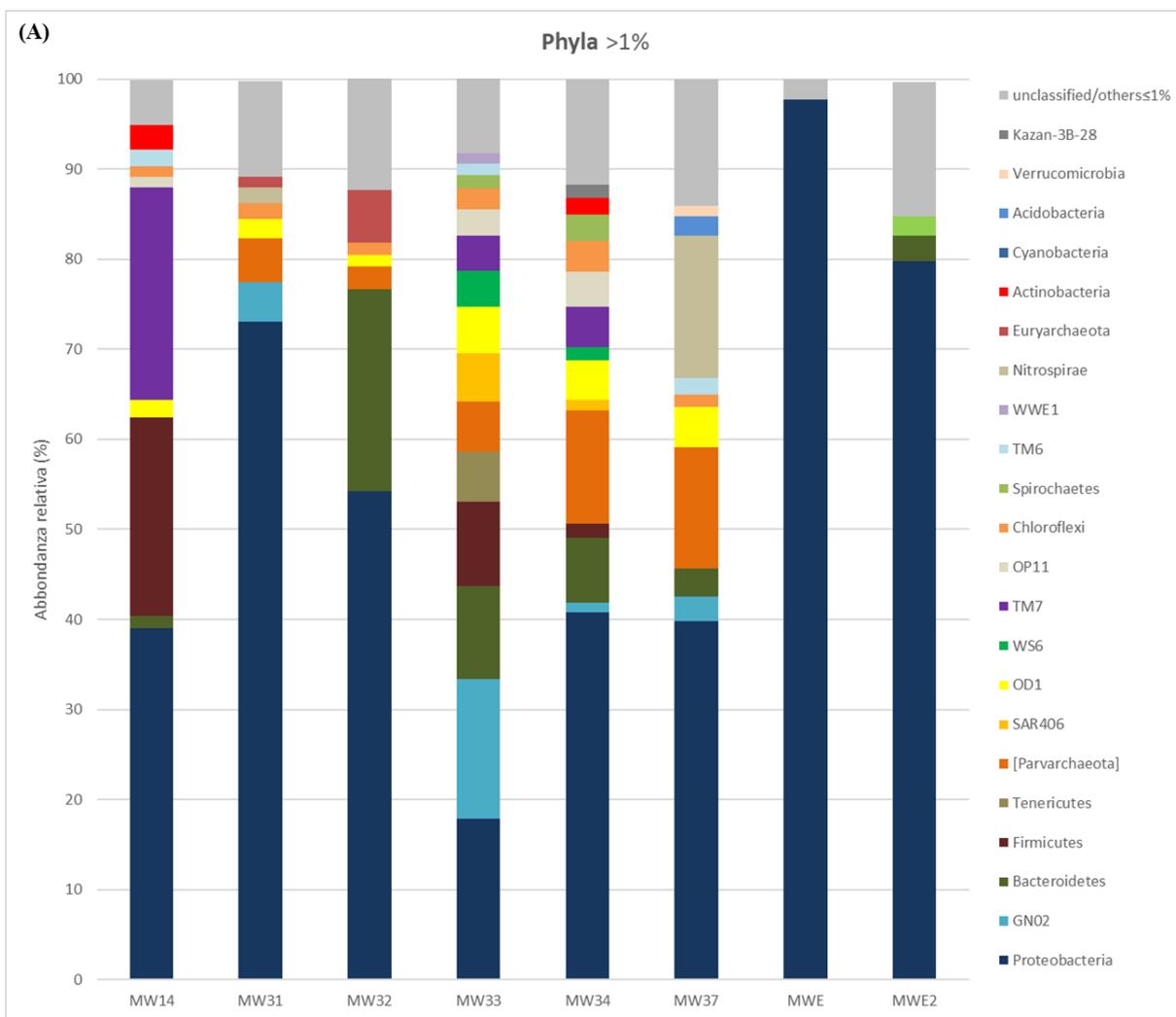
con abbondanze relative diverse, mentre altri phyla sono stati rilevati solo in alcuni campioni e risultano completamente assenti in altri. Tra i campioni più contaminati, MW33 e MW34 mostrano il più elevato numero di phyla identificati con abbondanza superiore all'1%, mentre in MWE la comunità batterica è quasi esclusivamente rappresentata da membri dei Proteobacteria.

A livello di famiglia, tra le 220 famiglie identificate in tutti i campioni, solo 45 hanno un'abbondanza relativa superiore all'1% (Fig. 1.10B). Scendendo di livello tassonomico, molto alta è la percentuale di generi non identificati che va da 36,9% (MWE2) a 89,7% (MW33), ad eccezione del campione MWE in cui i generi non classificati sono solo il 4,7%; 261 sono i generi identificati e fra essi solo 33 hanno un'abbondanza relativa oltre l'1%. Sono presenti batteri anaerobi obbligati e facoltativi e batteri microaerofili, nel complesso più abbondanti rispetto a batteri aerobi che pure vengono identificati. Ciò è in accordo con i valori di potenziale redox negativi e le basse concentrazioni di O₂ disciolto registrate nell'acqua in esame. Tra l'altro, la coesistenza di batteri aerobi e anaerobi appare comune in contesti contaminati simili a quello ivi studiato [Munro et al., 2017; Carpani et al., 2021]. Sono stati riscontrati batteri chemolitotrofi, fra cui ferrobatteri, quali *Mariprofundus* (Mariprofundaceae) [McAllister et al., 2019] e *Gallionella* (Gallionellaceae) [Hallbeck e Pedersen, 2015], e batteri nitrificanti, quali *Nitrospira* (Nitrospiraceae) [Daims et al., 2015]; batteri coinvolti nel ciclo dello zolfo in qualità di solfuro-ossidanti, quali *Sulfuricurvum* e *Sulfurimonas* (Helicobacteraceae) [Kodama e Watanabe, 2004; Han e Perner, 2015], *Thiothrix* (Thiotrichaceae) [Trubitsyn et al., 2014], *Thiobacillus* (Hydrogenophilaceae) [Kumar et al., 2020] *Acidithiobacillus* (Acidithiobacillaceae) [Kumar et al., 2020] e *Thiomonas* (Comamonadaceae) [Chen et al., 2004], e solfato-riduttori, quali *Desulfobacca* (Syntrophaceae) [Stams e Oude Elferink, 2015], *Desulfosporosinus* (Peptococcaceae) [Robertson et al., 2001] e membri delle famiglie Desulfuromonadaceae [Wang et al. 2021], Desulfarculaceae [Davidova et al., 2016] e Desulfobulbaceae [Li et al., 2021]; batteri metilotrofi e metanotrofi, quali *Methylomonas* e *Methylosoma* (Methylococcaceae) [Yu et al., 2017] e *Methylothena* (Methylophilaceae) [Lapidus et al., 2011]. Le famiglie e i generi dominanti sono diversi nei vari campioni. Nel campione MW14 la famiglia più abbondante è quella delle Staphylococcaceae (18,8%), interamente rappresentate dal genere *Staphylococcus* il quale si ritrova talvolta in ambienti di falda contaminata [Das e Barooah, 2018]; seguono Rhizobiaceae e Aeromonadaceae, entrambe rappresentate per il 7,6%. In MW31 domina la famiglia delle Mariprofundaceae (6,9%), esclusivamente costituita dal genere *Mariprofundus*; seguono batteri metanotrofi delle famiglie Methylophilaceae (5,7%) e Methylococcaceae (5,5%) [Yu et al., 2017]. Nel campione MW32 dominano i batteri solfuro-ossidanti appartenenti ai generi *Sulfuricurvum* (9,5%), della famiglia

delle Helicobacteraceae che è la più abbondante in questo campione (10,4%), e *Thiothrix* (6,3%), unico rappresentate della famiglia delle Thiotrichaceae; al 5,1% sono rappresentati anche membri della famiglia delle Xanthomonadaceae, la quale oltre a batteri fitopatogeni comprende generi di rilevanza ecologica nell'ambito del biorisanamento ambientale [Cutiño-Jiménez et al., 2020]. È rilevante osservare che il campione d'acqua più contaminata da 1,2-DCA, MW33, presenta la più elevata percentuale di famiglie non classificate (78,1%) e solo otto famiglie identificate abbondano oltre l'1%; tra queste, le Desulfuromonadaceae, a cui appartiene il noto genere OHRB *Desulfuromonas* [Löffler et al., 2000] (0,2% in MW33), sono la famiglia più abbondante (6,4%), seguita da Eubacteriaceae (4,5%) e Pelobacteraceae (3,7%). Le ultime due famiglie hanno mostrato una correlazione positiva con le concentrazioni di 1,2-DCA e CV (Fig. 1.11). Membri delle Eubacteriaceae, a cui appartiene il genere *Acetobacterium*, e delle Pelobacteraceae, a cui appartiene *Pelobacter*, si sono dimostrati capaci di agire in consorzi batterici a sostegno dei processi di dechlorurazione riduttiva di composti clorurati da parte di batteri OHRB [Grostern e Edwards, 2009; Mao et al., 2017]; in più, *Acetobacterium* è stato dimostrato essere direttamente coinvolto in meccanismi di dechlorurazione riduttiva cometabolica nei confronti di 1,2-DCA [De Wildeman et al., 2003a]. Il ruolo di batteri appartenenti a tali famiglie a supporto di meccanismi di dechlorurazione riduttiva potrebbe spiegare la correlazione positiva osservata con le concentrazioni di solventi clorurati. Nel campione MW34, anch'esso tra i tre più contaminati da 1,2-DCA, domina la famiglia delle Syntrophaceae (17%), per la maggior parte rappresentata dal solfato-riduttore *Desulfobacca* (15,7%) e in cui è stato identificato, seppur in bassissima percentuale, anche *Desulfomonile* (0,08%), il primo genere OHRB a essere stato isolato [DeWeerd et al., 1990]; seguono per abbondanza le Helicobacteraceae (4,9%) e le Desulfarculaceae (4,2%). In MW37 la famiglia delle Nitrospiraceae (12,5%), quasi interamente rappresentate da batteri nitrificanti del genere *Nitrospira* [Daims et al., 2015], è la più abbondante; a seguire le Gallionellaceae, interamente classificate come *Gallionella* (5,1%), batteri Fe(II)-ossidanti che possono trovarsi in nicchie aerobiche presenti in ambienti di acque sotterranee ad elevato contenuto di ferro ferroso [Hallbeck e Pedersen, 2015]. Il campione MWE, uno dei più contaminati da 1,2-DCA, è costituito quasi interamente da *Sulfurimonas* (93,3%), batteri solfuro-ossidanti della famiglia delle Helicobacteraceae ampiamente distribuiti sul pianeta e con metabolismo energetico molto versatile, in grado di crescere su una varietà di donatori e accettori di elettroni [Han e Perner, 2015]; presenti anche le Pelobacteraceae (1,4%) e le Desulfuromonadaceae (1,3%). Infine, nel campione MWE2 dominano i ferrobatteri appartenenti alla famiglia delle Mariprofundaceae, interamente rappresentate dal genere *Mariprofundus* (21,5%), e delle Gallionellaceae (8,5%); abbondanti anche le Helicobacteraceae (9,6%) e le Comamonadaceae (6,2%). Sono solo sei le

famiglie, sulle 220 identificate, presenti in tutti gli otto campioni, seppur con abbondanze relative differenti (*Helicobacteraceae*, *Desulfuromonadaceae*, *Comamonadaceae*, *Desulfobulbaceae*, *Hydrogenophilaceae* e *Desulfobacteraceae*).

Nonostante tutti i campioni di acqua provengano dalla stessa area contaminata da solventi clorurati, anche se ottenuti da differenti punti di prelievo e zone a differente grado di contaminazione, è sorprendente la grandissima variabilità tra campioni sia nella struttura delle comunità microbiche autoctone rilevata dall'analisi ARISA, sia nella loro composizione rilevata dall'analisi di 16S rRNA metabarcoding.



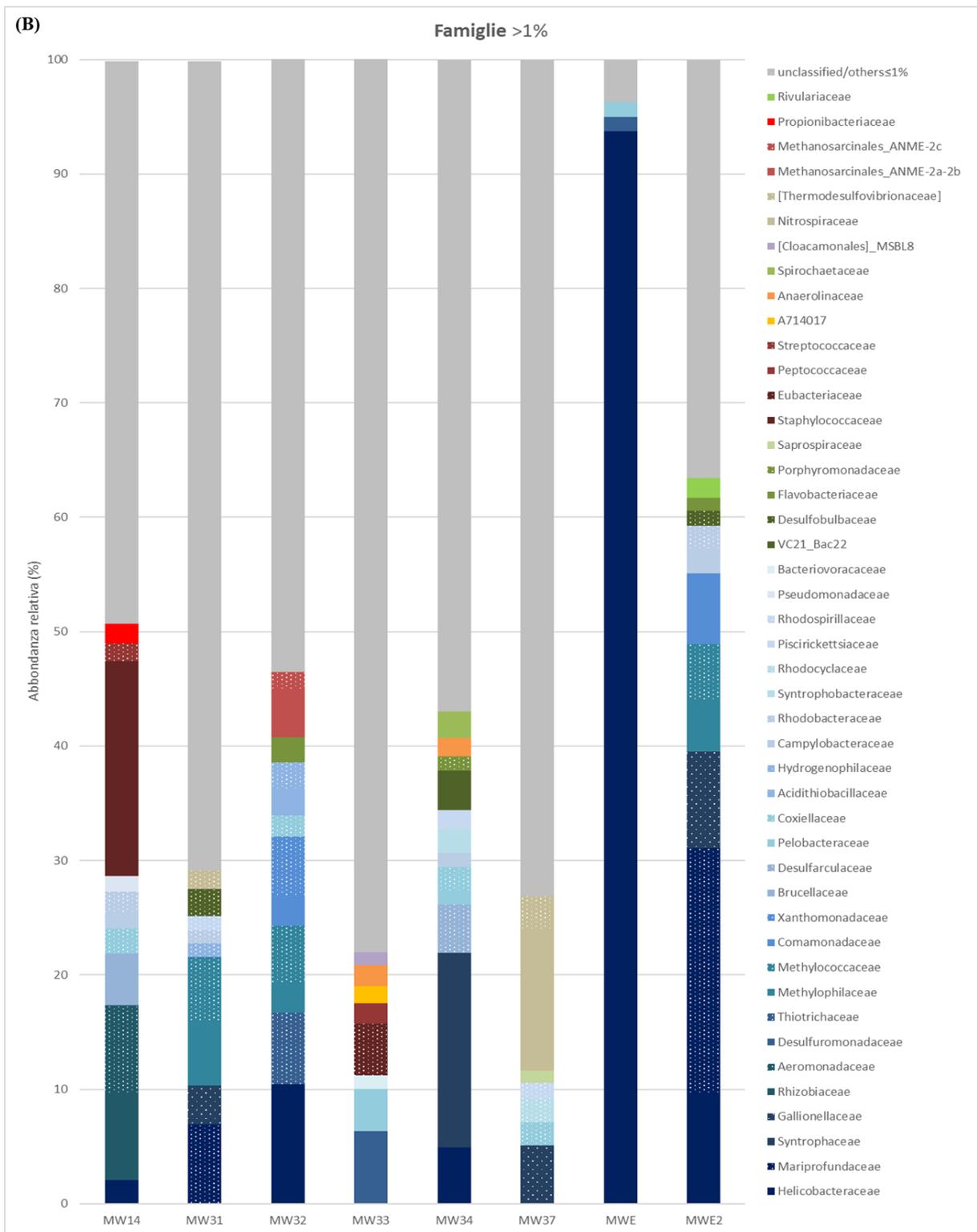


Fig. 1.10 Abbondanza relativa (%) dei phyla (A) e delle famiglie (B) nelle comunità microbiche dei campioni di acqua contaminata ottenuti dal primo campionamento. Sono indicati i taxa con abbondanza relativa >1% in almeno un campione; i rimanenti rientrano nella categoria “unclassified/others ≤ 1%”.

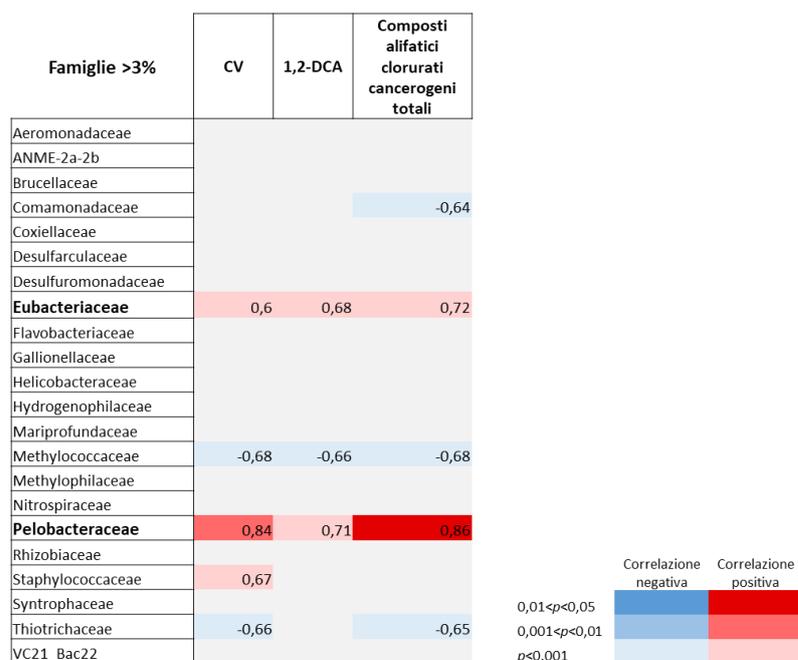


Fig. 1.11 Coefficienti di correlazione di Spearman, calcolati mediante il software RStudio, tra l'abbondanza relativa delle famiglie più rappresentate (abbondanza relativa >3%) e le concentrazioni di solventi clorurati nei campioni di acqua contaminata. Sono mostrate solo le correlazioni significative con p-value <0,05.

Con l'obiettivo di valutare il potenziale dealogenante intrinseco alle comunità microbiche autoctone all'acqua oggetto di studio, sono stati ricercati, tra tutte le famiglie identificate mediante 16S rRNA metabarcoding, i batteri, noti in letteratura scientifica, in grado di ridurre o ossidare solventi clorurati per via diretta o cometabolica. Gli istogrammi in Fig. 1.12 mostrano, per ogni campione di acqua contaminata, l'abbondanza relativa delle famiglie che comprendono generi di batteri in grado di operare dechlorurazione di solventi clorurati, mediante i meccanismi di dechlorurazione diretta (dealo respirazione) o cometabolica (Fig. 1.12A) oppure di ossidazione aerobia diretta o metabolismo ossidativo aerobio (Fig. 1.12B). Considerando tutti i metabolismi sopracitati, nelle otto comunità batteriche studiate, l'abbondanza relativa di tali famiglie non supera il 6,4% (Desulfuromonadaceae in MW33), ad esclusione delle Syntrophaceae che in MW34 raggiungono il 17%; inoltre, la maggior parte delle famiglie coinvolte hanno abbondanza relativa inferiore all'1%. Riguardo i metabolismi di dechlorurazione riduttiva che hanno luogo in condizioni di anaerobiosi, le famiglie delle Dehalococcoidaceae, Peptococcaceae, Syntrophaceae, Desulfuromonadaceae, Desulfovibrionaceae e Campylobacteraceae, comprendenti batteri OHRB già descritti (Tab. 1), e le famiglie delle Eubacteriaceae e Pseudomonadaceae nelle quali sono stati descritti generi di batteri coinvolti nella dechlorurazione riduttiva cometabolica [Fetzner, 1998], sembrano essere più rappresentate nei campioni di acqua maggiormente contaminata da 1,2-DCA e CV (Fig. 1.12A). All'interno di tali famiglie sono stati identificati, seppur a bassissima percentuale, i generi OHRB *Dehalogenimonas* (0,9% in MW34, 0,4% in MW33 e 0,1% in MWE),

Desulfomonile (0,3% in MW32), *Desulfuromonas* (0,2% in MW33), *Desulfovibrio* (0,2% in MW34 e 0,1% in MW33) e *Sulfurospirillum* (0,02-0,03% in MW33 e MW34). La metodica utilizzata, invece, non ha permesso di identificare gli OHRB più noti e studiati, quali *Dehalococcoides*, *Dehalobacter* e *Desulfitobacterium*. Riguardo, invece, i metabolismi di dechlorurazione ossidativa che hanno luogo in condizioni di aerobiosi, le famiglie delle Hyphomicrobiaceae, Methylophilaceae, Comamonadaceae, Burkholderiaceae, Xanthobacteraceae, Xanthomonadaceae, Bacillaceae, Mycobacteriaceae, Methylococcaceae, Methylocystaceae e Nitrosomonadaceae, comprendenti generi di batteri che agiscono sia nell'ossidazione diretta che nel cometabolismo ossidativo di solventi clorurati, sono più rappresentate nei campioni di acqua a minor grado di contaminazione, seppur nella maggior parte dei casi la loro abbondanza relativa è al di sotto dell'1% e, in linea di massima, inferiore rispetto a quella delle famiglie coinvolte nella dechlorurazione riduttiva (Fig. 1.12B). All'interno di tali famiglie sono stati identificati con abbondanza relativa <0,5% i generi *Hyphomicrobium*, *Ralstonia*, *Stenotrophomonas* e *Mycobacterium*, e con abbondanza relativa <0,1% i generi *Methylophilus*, *Methylobacterium*, *Xanthobacter* e *Bacillus*, tutti batteri le cui capacità di svolgere ossidazione diretta di solventi clorurati sono state già descritte [Dolinová et al., 2017; Xing et al., 2022]. Presenti anche generi di batteri che notoriamente ossidano molecole di CAHs per via cometabolica, ovvero *Methylomonas* (con abbondanza >1% in MW31 e MW33), *Methylosinus* e *Nitrosomonas* (<0,5%) e *Burkholderia* (<0,1%) [Alvarez-Cohen e Speitel, 2001; Arp et al., 2001]. Il genere *Ochrobactrum* (Brucellaceae) raggiunge un'abbondanza relativa del 4,5% nel campione MW14, fortemente contaminato da CV; batteri appartenenti a tale genere si sono dimostrati agire non solo nella biodegradazione di composti clorurati quali i bifenili policlorurati (PCB) [Murínová e Dercová, 2014], ma anche nella conversione aerobia del CV in etilene [Danko et al., 2006]. Con particolare riferimento al campione di acqua MW33 contaminato dalle maggiori concentrazioni di 1,2-DCA, esso presenta la più elevata percentuale di Desulfuromonadaceae (6,4%), Peptococcaceae (1,8%) ed Eubacteriaceae (4,5%) ed in esso sono rappresentate anche le altre famiglie sopracitate coinvolte nella dechlorurazione riduttiva; pochissimo rappresentate (<0,1%), invece, sono in tale campione solo alcune delle famiglie implicate nell'ossidazione diretta di CAHs.

Dalla ricerca dei batteri notoriamente dechloruranti tra i taxa identificati nelle comunità microbiche studiate, si evince come il potenziale catabolico intrinseco nei riguardi della biodegradazione dei solventi clorurati sia piuttosto scarso nell'acqua in esame.

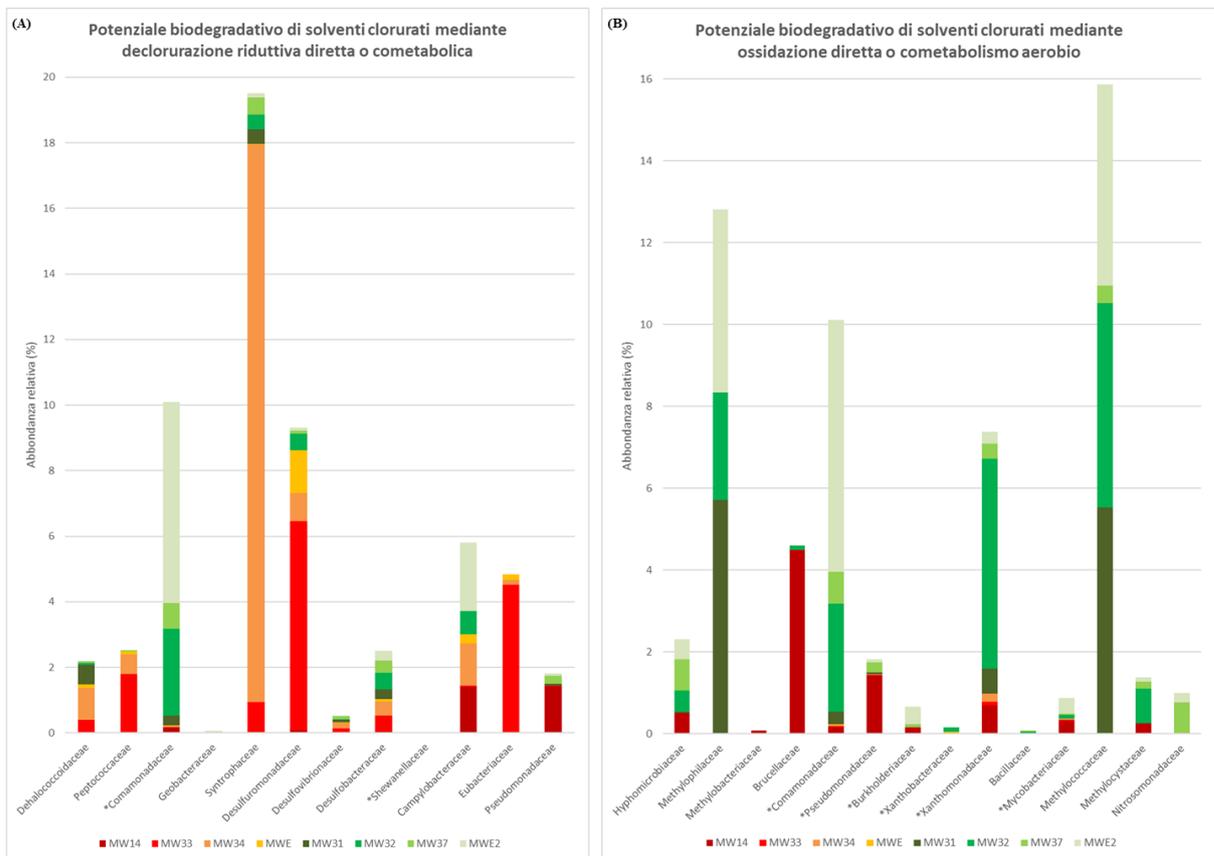


Fig. 1.12 Abbondanza relativa (%) delle famiglie identificate nella comunità microbica di ogni campione di acqua contaminata, ottenuto dal primo campionamento, che comprendono generi noti in letteratura scientifica di batteri in grado di operare (A) dechlorazione riduttiva diretta o cometabolica oppure (B) ossidazione diretta o cometabolismo aerobio di solventi clorurati. Le famiglie contrassegnate con asterisco comprendono generi coinvolti in entrambi i metabolismi indicati nel relativo grafico.

Monitoraggio nel tempo delle comunità microbiche nei campioni di acqua contaminata

Allo scopo di monitorare nel tempo le modificazioni delle comunità microbiche dei soli campioni di acqua che hanno mostrato i più elevati livelli di contaminazione da 1,2-DCA, l'analisi ARISA è stata applicata anche ai campioni di acqua MW33, MW34 e MWE prelevati durante il secondo campionamento (2020). Il cladogramma costruito sui profili ARISA ottenuti dagli stessi campioni nei due diversi prelievi (per il campionamento del 2019 è stato scelto il campione ottenuto dalla filtrazione su membrana in SFCA), rappresentato in Fig. 1.13, mostra che la struttura di tutte e tre le comunità varia nel tempo, e che tale variazione è più marcata per il campione MW34. Tali variazioni sono evidenziabili anche dagli indici di alfa diversità riportati in Tab. 1.7: dal primo al secondo campionamento il numero di OTUs e gli indici Shannon e Simpson aumentano per il campione MW33, diminuiscono notevolmente per il campione MW34 e rimangono stabili per il campione MWE. Di conseguenza, anche le modalità con cui le comunità microbiche dell'acqua contaminata si modificano nel tempo sono abbastanza variabili.

Tab. 1.7 Indici di diversità delle comunità microbiche dei campioni di acqua a maggior grado di contaminazione ottenuti dal primo e dal secondo campionamento.

	MW33		MW34		MWE	
	2019	2020	2019	2020	2019	2020
Taxa (S)	30	39	83	10	11	12
Shannon (H)	2,11	3,0	3,38	1,29	1,85	2,00
Dominance (D)	0,29	0,08	0,08	0,45	0,23	0,17
Simpson (1-D)	0,71	0,92	0,92	0,55	0,77	0,83

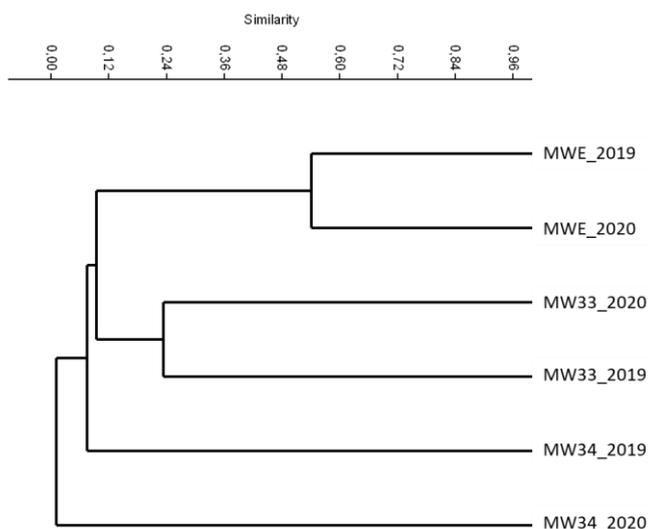


Fig. 1.13 Cladogramma costruito sui profili ARISA delle comunità microbiche dei campioni di acqua a maggior grado di contaminazione ottenuti dal primo e dal secondo campionamento. Similarità calcolata utilizzando il coefficiente di Bray-Curtis.

Per il solo campione di acqua maggiormente contaminata da 1,2-DCA, allo scopo di verificare se e come la composizione della relativa comunità microbica si modifichi nel tempo, quest'ultima è stata monitorata mediante sequenziamento 16S rRNA metabarcoding applicato al campione di acqua MW33 ottenuto da tre campionamenti successivi (2019, 2020 e 2021). Il numero di reads finali e di OTUs, clusterizzate al 99% di identità, era rispettivamente, 51.563 e 811 per il campione del 2019, 60.204 e 401 per il campione del 2020, e 36.384 e 223 per il campione del 2021 (Tab. 1.6). Gli istogrammi in Fig. 1.14 mostrano i taxa identificati per ogni campionamento, a livello tassonomico di phylum e famiglia con abbondanza relativa superiore a 1% (Fig. 1.14A-B) e a livello di genere con abbondanza relativa superiore a 0,5% (Fig. 1.14C). Il numero totale di OTUs diminuisce nel tempo, all'incirca dimezzandosi ad ogni campionamento, e diminuisce anche l'indice Shannon (Tab. 1.6); la riduzione della diversità batterica a cui si assiste nei tre campionamenti successivi è evidente anche guardando ogni singolo livello tassonomico (Fig. 1.14). In linea di massima, per i taxa sempre identificati nel tempo, la composizione delle tre comunità microbiche resta abbastanza costante, anche se variano le abbondanze relative. Andando dal primo al terzo campionamento, inoltre, risulta diminuita anche la percentuale di famiglie e generi non identificati, che va rispettivamente da

65,7% a 16,6% e da 89,7% a 40,1%. A livello di phylum, i Proteobacteria sono sempre il phylum dominante e si osserva un loro arricchimento nel tempo: essi rappresentano più della metà della comunità batterica nel 2020 e raggiungono quasi l'80% nel 2021. La divisione GN02 è la seconda più rappresentata nei tre campioni e la sua abbondanza si dimezza dal 2019 (15,5%) al 2021 (7,3%). Il phylum Bacteroidetes è il terzo per abbondanza in tutti i campioni e la sua abbondanza si mantiene stabile tra il 2019 e il 2020 (10,6%) per poi diminuire nel 2021 (3,7%). I Firmicutes rappresentano il 9,4% nel 2019 e diminuiscono nei campionamenti successivi (1,4% nel 2020 e 3,2% nel 2021).

A livello di famiglia, le Helicobacteraceae e le Desulfuromonadaceae sono le più abbondanti nei campionamenti più recenti. Le Helicobacteraceae, dominate dai generi solfuro-ossidanti *Sulfuricurvum* e *Sulfurimonas*, sono pochissimo rappresentate nel 2019 (0,4%), e subiscono un notevole arricchimento nel tempo raggiungendo il 33% nel 2020 e il 56,8% nel 2021. Anche l'abbondanza delle Desulfuromonadaceae aumenta nel tempo (6,4% nel 2019, 13,3% nel 2020 e 10,8% nel 2021); esse sono per lo più non classificate a livello di genere, seppur una piccolissima percentuale dell'OHRB *Desulfuromonas*, che non supera lo 0,2% nei tre tempi, è stata identificata. Considerando altri OHRB identificati nel campione MW33, la famiglia delle Dehalococcoidaceae risulta più abbondante nel 2020 (1,8%) e al suo interno è stato rilevato il genere *Dehalogenimonas* (1,4% nel 2020); la famiglia delle Peptococcaceae, invece, è rappresentata solo nel 2019 (1,8%) e la sua abbondanza è inferiore allo 0,1% nei tempi successivi. Discretamente rappresentate in tutti e tre i campionamenti sono le famiglie delle Pelobacteraceae ed Eubacteriaceae, i cui membri, come descritto nel paragrafo precedente, si sono dimostrati agire in consorzi batterici a sostegno dei processi di dealoespirazione da parte di batteri OHRB. Pochissimo rappresentate (<0,1%), invece, sono nel campione MW33, così nel 2019 anche nei periodi successivi, famiglie di batteri coinvolti nell'ossidazione diretta di solventi clorurati.

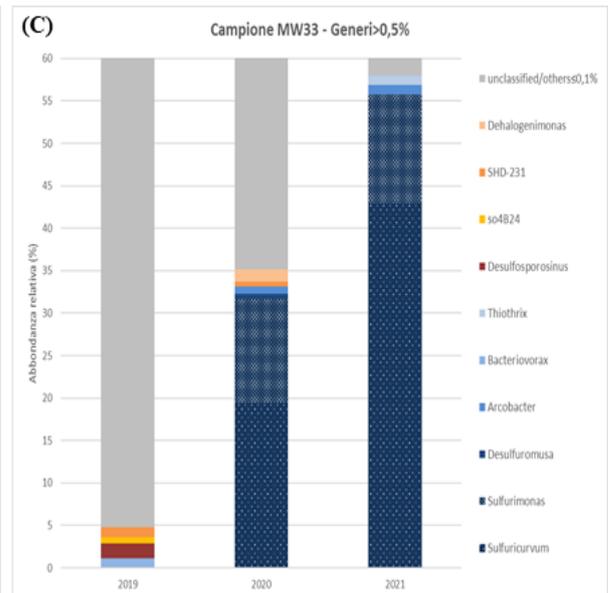
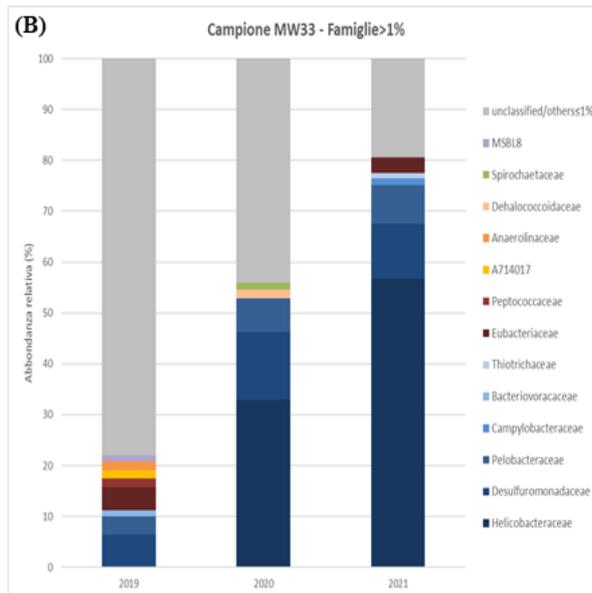
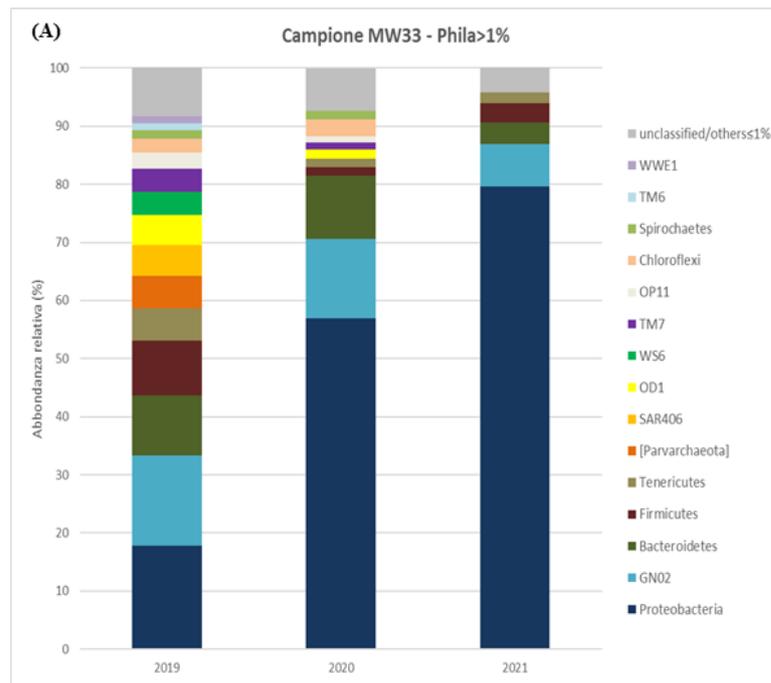


Fig. 1.14 Abbondanza relativa (%) dei phyla (A), delle famiglie (B) e dei generi (C) nelle comunità microbiche del campione di acqua maggiormente contaminata MW33 ottenuto dai campionamenti del 2019, 2020 e 2021. Sono indicati i taxa con abbondanza relativa $>0,5-1\%$ in almeno un campione; i rimanenti rientrano nella categoria “unclassified/others”.

La ricerca degli OHRB *Dehalococcoides*, *Dehalogenimonas*, *Dehalobacter*, *Desulfitobacterium* e *Desulfuromonas* condotta mediante Nested-PCR utilizzando, quale marker filogenetico, sequenze del gene 16S rRNA specifiche dei suddetti generi, ha dato riscontro positivo per tutti i generi ricercati. In particolare, il gene 16S rRNA specifico di *Desulfuromonas* e *Dehalogenimonas* è stato rilevato nel DNA dei campioni MW33 di tutti e tre i campionamenti, in accordo con i risultati del sequenziamento 16S rRNA metabarcoding, secondo i quali entrambi i generi sono risultati identificati in tutti e tre i tempi, seppur a bassissima percentuale. Nonostante *Dehalococcoides* non sia stato identificato all'interno della famiglia delle Dehalococcoidaceae mediante 16S rRNA metabarcoding, tale genere ha dato

risultato positivo in tutti i tempi indagati mediante l'approccio di Nested-PCR. Anche i generi *Dehalobacter* e *Desulfitobacterium* hanno dato riscontro positivo, seppur non per tutti i campionamenti: *Dehalobacter* risulta presente solo nel 2019 e *Desulfitobacterium* solo nel 2019 e 2021; tali generi non erano stati identificati dall'analisi metagenomica nonostante la famiglia delle Peptococcaceae, a cui entrambi appartengono, sia stata rilevata con abbondanza relativa >1% nel 2019. Questi ultimi risultati aiutano a comprendere il potenziale dechlorurante intrinseco al campione MW33 e mettono in luce la necessità di integrare l'approccio di 16S rRNA metabarcoding basato sulla regione V3-V4 con ulteriori analisi che guardino ad altre sequenze genere-specifiche dello stesso gene.

Tab. 1.8 Ampliconi di peso molecolare atteso ottenuti a seguito di Nested-PCR con coppie di primers per sequenze del gene 16S rRNA specifiche di generi OHRB.

OHRB	Coppia di primers	Prodotto (bp)	Presenza amplicone in MW33 2019	Presenza amplicone in MW33 2020	Presenza amplicone in MW33 2021
<i>Dehalococcoides</i>	Dhc1f Dhc264r	264	+	+	+
<i>Dehalogenimonas</i>	BL-DC-142f BL-DC-1351r	1199	+	+	+
<i>Dehalobacter</i>	Dhb477f Dhb647r	170	+	-	-
<i>Desulfitobacterium</i>	Desulfo16sF3 Desulfo16sR5	500	+	-	+
<i>Desulfuromonas</i>	Dsm16Sf Dsm16Sr	835	+	+	+

La presenza nel campione di acqua MW33 di batteri appartenenti ai più noti generi e famiglie di OHRB, seppur non dominanti nella comunità microbica, rivela la presenza di un potenziale di biodegradazione nei confronti di 1,2-DCA, potenziale che è stato meglio indagato con gli studi in microcosmo descritti nel capitolo seguente e che potrebbe essere sfruttato ai fini del biorisanamento dell'area contaminata.

CONCLUSIONI

Le indagini descritte nel presente capitolo costituiscono il primo studio microbiologico di un'acqua contaminata da solventi clorurati prelevata da un'area ad oggi ancora inesplorata. Gli studi di caratterizzazione microbiologica hanno messo in evidenza da un lato la grande variabilità dell'acqua in esame, sia nello spazio che nel tempo: campioni di acqua raccolti da diversi punti di prelievo e in diversi periodi risultano eterogenei, sia in termini di caratteristiche chimico-fisiche e livelli di contaminazione da solventi clorurati, sia in termini di struttura e composizione delle comunità microbiche autoctone. Questa grande e inaspettata variabilità, chimica e biologica, potrebbe essere dovuta alla complessa situazione idrogeochimica, sia naturale che influenzata da interventi esterni, dell'area studiata. In questo quadro così

eterogeneo, caratterizzato anche da un'elevata diversità microbica, sembrerebbe che la presenza di elevate concentrazioni di solventi clorurati selezioni comunità microbiche più simili tra loro e maggiormente diverse rispetto a quelle presenti in acque meno contaminate, anche se è stato difficile trovare una chiara relazione tra i livelli di contaminazione e la presenza dei principali taxa identificati nelle comunità microbiche.

Dall'altro lato, nonostante la profonda contaminazione da solventi clorurati, abbastanza limitata è la presenza nell'acqua contaminata di generi batterici noti in grado di degradare tali composti. Tra i batteri dechloruranti identificati, seppur scarsamente rappresentati, quelli potenzialmente in grado di respirare molecole di CAHs (OHRB) sono risultati più abbondanti rispetto a batteri aerobi in grado di ossidare tali molecole, soprattutto nei campioni di acqua a maggiore contaminazione, e ciò non sorprende visto l'ambiente anaerobio che caratterizza l'area di studio. Nonostante la presenza di generi di batteri notoriamente dechloruranti, la loro abbondanza relativa è così bassa da far pensare che le eventuali reazioni di dechlorurazione riduttiva siano soprafatte da metabolismi di altro tipo messi in atto dagli altri ceppi batterici dominanti nella comunità microbica; è noto infatti che batteri solfato-riduttori e ferro-riduttori, riscontrati con elevata abbondanza nei campioni di acqua contaminata, competano con gli OHRB per i donatori di elettroni necessari alla respirazione anaerobia [McCarty, 1997]. Lo scarso potenziale di biodegradazione riscontrato, tra l'altro, è in accordo con l'assenza di fenomeni di attenuazione naturale nell'area di studio evidenziata dai profondi livelli di contaminazione da solventi clorurati che perdurano nel tempo. In ogni caso, l'elevata percentuale di taxa indicati come non classificati supporta l'ipotesi che batteri dechloruranti ancora ignoti potrebbero essere presenti nell'acqua studiata.

CAPITOLO 2

VALUTAZIONE DELLA BIODEGRADAZIONE DI 1,2-DICLOROETANO IN MICROCOSMO

INTRODUZIONE

Metabolismi biodegradativi di 1,2-dicloroetano

1,2-dicloroetano (1,2-DCA) è uno xenobiotico e, come tale, persiste come contaminante nell'ambiente per molti anni o anche decenni ed è recalcitrante alla biodegradazione, che, se avviene naturalmente, risulta estremamente lenta. Per tale motivo, vi è sempre un maggiore interesse nel trovare utili approcci di biostimolazione del potenziale biodegradativo di un sito contaminato da 1,2-DCA da poter applicare in interventi di biorisanamento *in situ* [Marzorati et al., 2006].

La biodegradazione di 1,2-DCA è stata dimostrata sia in studi di laboratorio sia in applicazioni in campo [Munro et al., 2016]. 1,2-DCA può essere biodegradato in condizioni aerobiche, anaerobiche e cometaboliche [Nobre et al., 2017]. Sono noti almeno quattro tipi di batteri che fisiologicamente possono degradare 1,2-DCA: batteri aerobici che crescono su 1,2-DCA quale fonte di carbonio ed energia a seguito di una iniziale reazione, idrolitica o ossidativa; batteri aerobici che ossidano 1,2-DCA con un meccanismo di cometabolismo aerobico; batteri anaerobici che operano dechlorurazione riduttiva utilizzando 1,2-DCA come accettore di elettroni [Munro et al., 2016]. Questi processi metabolici riguardano la maggior parte degli isolati batterici più noti e studiati per la loro capacità di biodegradare 1,2-DCA; tuttavia, tale lista non è esaustiva. Esistono, per esempio, alcuni batteri anaerobici che usano 1,2-DCA quale fonte di carbonio ed energia mentre respirano nitrato [Dinglasan-Panlilio et al., 2006]. È probabile quindi che ulteriori processi metabolici e microrganismi che li mettano in atto nella degradazione di 1,2-DCA debbano ancora essere scoperti e descritti.

In condizioni di aerobiosi, 1,2-DCA può direttamente sostenere la crescita batterica come fonte di carbonio ed energia, e la sua dealogenazione può essere iniziata da una reazione idrolitica o da una reazione ossidativa. La dealogenazione idrolitica di 1,2-DCA è avviata dall'enzima aloalcano dealogenasi (DhlA) e porta, a seguito di una serie di reazioni catalizzate da altri enzimi, alla produzione di acido cloroacetico; quest'ultimo viene ulteriormente dealogenato dall'enzima aloacetato dealogenasi (DhlB) producendo acido glicolico. In totale vengono rilasciati due ioni cloruro, uno da ciascuna reazione di dealogenazione idrolitica catalizzata dai due tipi di dealogenasi, DhlA e DhlB (Fig. 2.1). Queste ultime sono codificate rispettivamente dai geni *dhlA* e *dhlB* [Song et al., 2004]. L'enzima DhlA e il relativo gene sono stati originariamente scoperti e descritti in *Xanthobacter autotrophicus* GJ10, un batterio azotofissatore che è stato arricchito e isolato su 1,2-DCA come unica fonte di carbonio [Keuning et al., 1985; Jansenn et al., 1989]. Successivamente, il gene *dhlA* con sequenza nucleotidica identica a quella descritta per *X. autotrophicus* GJ10, è stato ritrovato in altri ceppi e specie del

genere *Xanthobacter* e in altri batteri appartenenti ai generi *Ancylobacter* e *Starkeya*; per tale gene è stata descritta una localizzazione plasmidica e una diffusione per trasferimento genico orizzontale tra microrganismi diversi [van den Wijngaard et al., 1992; Song et al., 2004; Munro et al., 2016]. In Fig. 2.2 è mostrata l'organizzazione del gene *dhlA* in *X. autotrophicus* GJ10 e in *X. flavus* UE15, in entrambi i casi di lunghezza pari a 933 bp. Allo stato attuale, DhIA è l'unica aloalcano dealogenasi idrolitica descritta in batteri degradatori di 1,2-DCA. Almeno 12 copie identiche del gene *dhlA* sono state individuate in differenti isolati batterici ambientali e tale gene sembra essere univocamente associato alla crescita su 1,2-DCA [Munro et al., 2016].

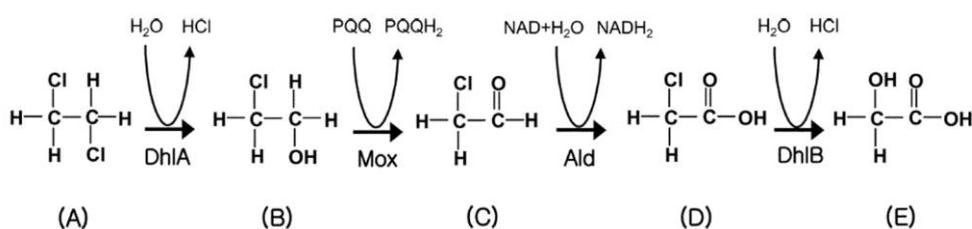


Fig. 2.1 Pathway catabolico proposto per la dealogenazione idrolitica di 1,2-DCA. (A), 1,2-dicloroetano; (B), 2-cloroetano; (C), 2-cloroacetaldeide; (D), acido monocloroacetico; (E), acido glicolico; DhIA, aloalcano dealogenasi; Mox, alcol deidrogenasi; Ald, aldeide deidrogenasi; DhIB, aloacetato dealogenasi [Song et al., 2004].

(A) *X. flavus* UE15



(B) *X. autotrophicus* GJ10

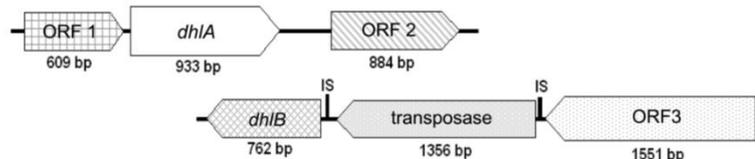


Fig. 2.2 Organizzazione genetica dei geni *dhl* in (A) *Xanthobacter flavus* UE15 e (B) *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 [Song et al., 2004].

La dealogenazione ossidativa di 1,2-DCA è mediata, invece, da una monossigenasi citocromo P450 ed è stata dimostrata in batteri appartenenti ai generi *Pseudomonas* [Hage e Hartmans, 1999] e *Polaromonas* [Nishino et al., 2013]. L'ossidazione di 1,2-DCA porta all'iniziale formazione dell'intermedio instabile 1,2-dicloroetano, il quale spontaneamente rilascia Cl⁻ producendo cloroacetaldeide; procedendo in un pathway simile a quello descritto per il meccanismo idrolitico, la cloroacetaldeide viene convertita in acido cloroacetico, il quale viene dealogenato dalla aloacetato dealogenasi con produzione di acido glicolico (Fig. 2.3) [Hage e Hartmans, 1999; Nishino et al., 2013].

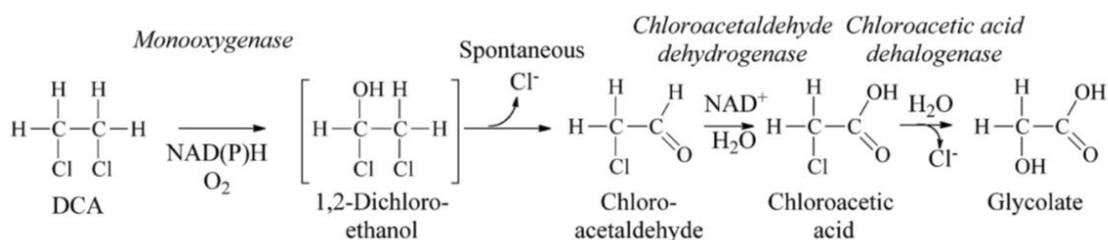


Fig. 2.3 Pathway catabolico proposto per la dealogenazione ossidativa di 1,2-DCA [Nishino et al., 2013].

Microrganismi che esprimono enzimi ossigenasi possono potenzialmente degradare 1,2-DCA mediante un processo cometabolico. Cometabolismo ossidativo aerobio di 1,2-DCA è stato dimostrato in batteri metanotrofi quali *Methylosinus* [Alvarez-Cohen e Speitel, 2001], e batteri ammonioossidanti quali *Nitrosomonas* [Kocameci e Çeçen, 2009], i quali usano le loro ossigenasi, rispettivamente MMO e AMO, sui substrati preferenziali metano e ammoniaca, e fortuitamente su 1,2-DCA. Anche batteri appartenenti ai generi *Mycobacterium*, che normalmente cresce su un ampio range di idrocarburi (etilene, propene, alcani C₂–C₁₆) [Le e Coleman, 2011], e *Rhodococcus* che cresce su isobutano [Azizian e Semprini, 2022], hanno mostrato degradazione cometabolica di 1,2-DCA.

In condizioni di anaerobiosi, batteri dealorespiranti possono usare 1,2-DCA come accettore terminale di elettroni. La dechlorurazione riduttiva di 1,2-DCA può avvenire mediante idrogenolisi con la formazione prima di cloroetano e poi di etano, oppure mediante dicloroeliminazione, ovvero la rimozione dei due atomi di cloro vicinali con la formazione del doppio legame tra i rispettivi atomi di carbonio nella molecola di etilene. Inoltre, 1,2-DCA può essere trasformato in cloruro di vinile mediante un meccanismo di deidroclorurazione; tuttavia quest'ultima, non essendo una reazione di ossidoriduzione, non è accoppiata alla generazione di energia e quindi a crescita batterica [Nobre et al., 2017; Jiang et al., 2022] (Fig. 2.4). La dicloroeliminazione è il principale meccanismo di biodegradazione di 1,2-DCA ed è di particolare interesse ai fini del biorisanamento: tale reazione converte il contaminante 1,2-DCA direttamente in etilene, molecola innocua per l'ambiente, senza la generazione di intermedi clorurati tossici; inoltre, è termodinamicamente favorevole in quanto richiede solo una molecola di H₂ per la rimozione di due atomi di cloro [Marzorati et al., 2007].

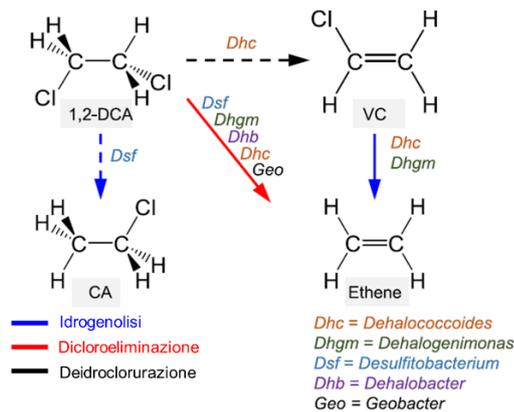


Fig. 2.4 Pathways di dechlorazione e generi OHRB coinvolti nella biotrasformazione di 1,2-DCA in condizioni anaerobie. Le linee tratteggiate indicano reazioni che non supportano la crescita batterica [Jiang et al., 2022].

La dicloroeliminazione è stata dimostrata in batteri anaerobi OHRB appartenenti ai generi *Dehalococcoides*, *Dehalogenimonas* [Palau et al., 2017], *Dehalobacter*, *Desulfitobacterium* e *Geobacter* [Jiang et al., 2022] (Tab. 1) (Fig. 2.4). *Desulfitobacterium dichloroeliminans* LMG P-21439 (precedentemente *D. dichloroeliminans* DCA1) è stato il primo OHRB ad essere isolato e caratterizzato per la sua capacità di operare dicloroeliminazione di 1,2-DCA in etilene utilizzando H_2 come donatore di elettroni [De Wildeman et al., 2003b]. A partire da acque di falda contaminate esclusivamente e cronicamente da 1,2-DCA ottenute da un'area industriale in Italia, Marzorati et al. hanno arricchito un consorzio batterico che mostrava trasformazione di 1,2-DCA in etilene come unico prodotto di dechlorazione, con un concomitante rilascio stechiometrico di ioni cloruro; tale coltura di arricchimento, stabilmente dechlorurante, denominata 6VS, è stata mantenuta con regolare apporto di 1,2-DCA e lattato (quale donatore di elettroni a supporto dei processi di dechlorazione riduttiva) e ha dimostrato un arricchimento in batteri appartenenti ai generi *Dehalobacter* e *Desulfitobacterium* [Marzorati et al., 2006; Marzorati et al., 2007]. Nel metagenoma della coltura 6VS e nel genoma di *D. dichloroeliminans* LMG P-21439 gli stessi autori hanno per la prima volta identificato un cluster genico di circa 7 kb codificante per una dealogenasi riduttiva specifica per 1,2-DCA, denominato rispettivamente RD-54 (Fig. 2.5) e RD-DCA1. Entrambi questi cluster comprendono una sequenza di quattro geni (*dcaABC* e *dcaT*), simile a quella ritrovata nei cluster per dealogenasi riduttive di altre specie di *Desulfitobacterium* e *Dehalobacter*, attive nei confronti di cloroeteni (es. PCE). Più in particolare, tutti i geni, a eccezione di *dcaA*, mostrano il 97-99% di identità con la sequenza nucleotidica dei corrispondenti geni *pceB*, *pceC* e *pceT* di cluster specifici per cloroeteni; il gene *dcaA*, codificante per la subunità catalitica substrato-specifica dell'enzima, invece, mostra una minore identità (92-93%) con il corrispondente gene *pceA*. A livello di sequenza aminoacidica, circa il 10-11% dei residui dell'enzima DcaA codificato da RD-54 e RD-DCA1 differiscono da quelli delle proteine PceA e il 53% di tale

diversità è localizzata in due regioni ben precise, le quali potrebbero essere coinvolte, in generale, nella specificità di substrato degli enzimi RDasi e, in particolare, nel riconoscimento di 1,2-DCA. Da un punto di vista evolutivo, l'evidenza che solo uno di quattro geni *dca* diverge, in regioni precise, dai corrispondenti geni di altri cluster per RDasi può essere spiegata da eventi di ricombinazione genetica. Inoltre, nei cluster RD-54 e RD-DCA1, a monte dei geni *dca*, è localizzata una parziale sequenza del gene *tnpA* per una trasposasi, con il 99% di identità con il corrispondente gene di *Dehalobacter* e *Desulfitobacterium* spp., la quale potrebbe essere associata con un passato evento di trasferimento genico e acquisizione di un nuovo pathway catabolico attivo nei confronti di 1,2-DCA [Marzorati et al., 2007]. Successivamente, Grostern e Edwards hanno identificato nuove sequenze *rdhA* (geni *rdhA1*, *rdhA2* e *rdhA3*) correlate con la dicloroeliminazione di 1,2-DCA in una co-cultura di arricchimento che mostrava degradazione di 1,2-DCA in etilene e conteneva *Dehalobacter* sp. WL, quale microrganismo responsabile della dechlorurazione. In particolare, la proteina codificata da *rdhA1* mostra il 95% di similarità nella sequenza aminoacidica con la PceA di *Dehalobacter restrictus* e il 92% di similarità con la DcaA di *D. dichloroeliminans* LMG P-21439 [Grostern e Edwards, 2009]. Il gene *rdhA1*, inoltre, condivide il 99% di identità nella sequenza nucleotidica con quattro sequenze *rdhA* identificate nel metagenoma di una coltura 1,2-DCA-dechlorurante ottenuta dalle acque di falda prelevate dallo strato più profondo dello stesso acquifero contaminato da cui proveniva la coltura 6VS (ottenuta invece a partire dallo strato superiore dell'acquifero) e arricchita in batteri dell'ordine dei Clostridiales (al quale appartengono *Desulfitobacterium* e *Dehalobacter*) a seguito di biostimolazione con lattato [Merlino et al., 2015]. Nel 2019 Low et al. hanno isolato e caratterizzato *Desulfitobacterium* sp. AusDCA con attività dealoespirante nei confronti di 1,2-DCA mediante dicloroeliminazione. Tramite l'uso di coppie di primers degenerati per le sequenze *rdhAB* di ceppi di *Desulfitobacterium* e *Dehalobacter* associati con la dicloroeliminazione di 1,2-DCA (disegnati, in particolare, sulle sequenze del consorzio 6VS, di *D. dichloroeliminans* LMG P-21439 e di *Dehalobacter* sp. WL), gli stessi autori hanno amplificato ipotetiche sequenze *dcaAB* anche nella coltura da cui il ceppo AusDCA è stato isolato. In particolare, la proteina DcaA del ceppo AusDCA mostra il 97% di identità con la RdhA1 di *Dehalobacter* sp. WL e risulta molto simile anche alle rispettive proteine di *D. dichloroeliminans* LMG P-21439 e della coltura 6VS [Low et al., 2019].

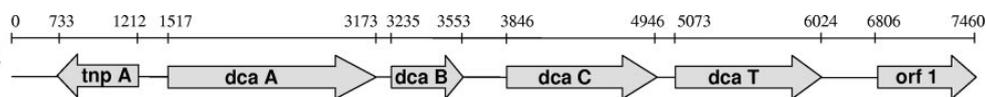


Fig. 2.5 Mappa del cluster genico RD-54 ottenuto dal metagenoma della coltura di 6VS [Marzorati et al., 2007].

In condizioni di anaerobiosi, 1,2-DCA può anche andare incontro a dechlorurazione riduttiva cometabolica grazie all'azione di cofattori corrinoidi o del coenzima F₄₃₀, caratterizzati da forte potere riducente, presenti come gruppi prostetici in proteine coinvolte nel metabolismo energetico dei batteri che le posseggono. Tale attività è stata dimostrata in Archaea metanogeni ed acetogeni. In *Methanosarcina barkeri*, per esempio, l'azione della cobalamina e del cofattore F₄₃₀ portava alla conversione di 1,2-DCA rispettivamente in etilene e cloroetano [Holliger et al., 1992]. De Wildeman et al. hanno isolato e caratterizzato un ceppo di *Acetobacterium*, batterio acetogeno in grado di svolgere dicloroeliminazione cometabolica di 1,2-DCA in etilene utilizzando formiato come substrato di crescita [De Wildeman et al., 2003a]; in tal caso ad essere coinvolti nella riduzione di 1,2-DCA erano corrinoidi come la vitamina B₁₂, ovvero gli stessi cofattori presenti nel sito catalitico delle dealogenasi riduttive che catalizzano la dechlorurazione riduttiva diretta di composti clorurati.

SCOPO DEL LAVORO

La biodegradazione di 1,2-dicloroetano da parte di batteri autoctoni all'acqua contaminata oggetto di studio è stata valutata mediante studi in microcosmo, in cui la crescita batterica e l'attività biodegradativa nei confronti di 1,2-DCA sono state biostimate in maniera controllata imponendo differenti condizioni e/o fornendo adeguati substrati di crescita. L'allestimento di una serie appropriata di microcosmi è un punto chiave per la comprensione dell'efficacia di un intervento di accelerazione della decontaminazione biologica. Le prove in microcosmo sono state, infatti, realizzate con l'obiettivo di individuare le condizioni operative ottimali, in termini di biodegradazione del contaminante, per lo sviluppo di un eventuale intervento di biorisanamento *in situ*. I microcosmi sono stati allestiti incubando l'acqua contaminata in condizioni differenti, ovvero con l'aggiunta di substrati di crescita e/o di una miscela di sali ed oligoelementi; inoltre, in ciascun microcosmo è stato aggiunto il contaminante 1,2-DCA. Nonostante i dati chimico-fisici dell'acqua contaminata evidenziassero valori negativi di potenziale redox e una ridotta concentrazione di ossigeno disciolto, sono stati indagati tutti i metabolismi biodegradativi noti nei confronti di 1,2-DCA e pertanto sono stati previsti microcosmi sia in aerobiosi sia in anaerobiosi. In Fig. 2.6 è riportato l'intero piano sperimentale degli studi in microcosmo condotti nel presente lavoro di tesi. Dopo essere stati allestiti i microcosmi sono stati monitorati nel tempo per valutare la biodegradazione di 1,2-DCA sia da un punto di vista chimico, misurando la concentrazione di 1,2-DCA mediante Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC/MS) e il rilascio di ioni cloruro mediante saggio colorimetrico, sia da un punto di vista biologico, caratterizzando la comunità microbica in essa

arricchitasi mediante 16S rRNA metabarcoding e valutando il potenziale biodegradativo mediante ricerca dei geni correlati al metabolismo dechlorurante indagato.

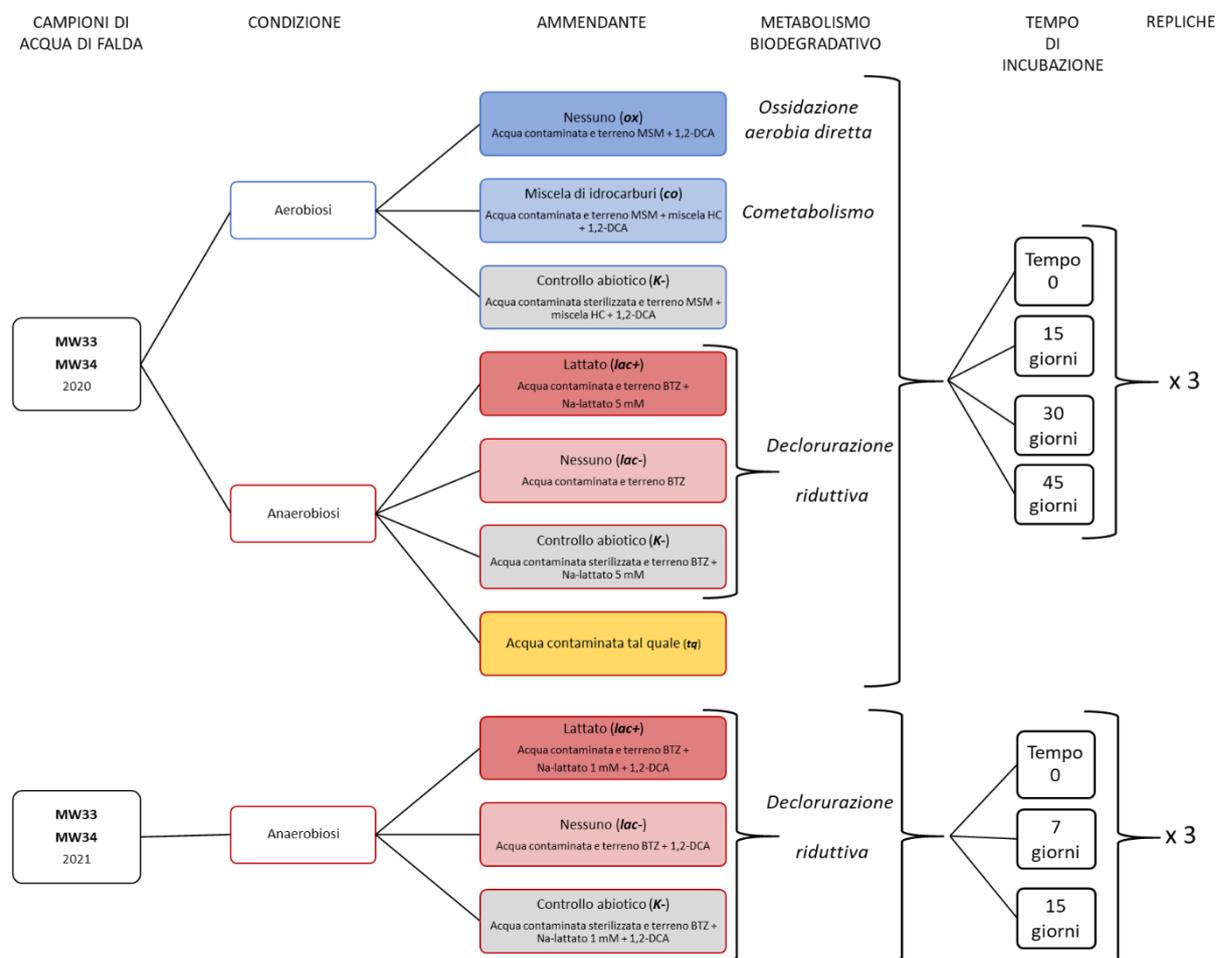


Fig. 2.6 Piano sperimentale degli studi in microcosmo condotti nel presente lavoro di tesi.

MATERIALI E METODI

Allestimento di microcosmi in anaerobiosi

In condizioni di anaerobiosi, 1,2-DCA può essere degradato ad opera di batteri OHRB che lo utilizzano come accettore terminale di elettroni. Il principale meccanismo di dechlorurazione riduttiva di 1,2-DCA è la dicloroeliminazione, mediante la quale 1,2-DCA viene convertito direttamente in etilene senza la generazione di intermedi clorurati tossici. Dopo aver verificato la presenza di un potenziale catabolico intrinseco all'acqua contaminata oggetto di studio, una serie di microcosmi è stata allestita in condizioni di anaerobiosi allo scopo di biostimolare le reazioni di dicloroeliminazione eventualmente mediate da batteri OHRB la cui presenza, seppur limitata, è stata riscontrata nei campioni di acqua contaminata, e di individuare le migliori condizioni imposte in termini di arricchimento di batteri dechloruranti e di resa di biodegradazione del contaminante.

Microcosmi anaerobi sono stati realizzati in due diversi momenti a partire dai campioni di acqua maggiormente contaminata da 1,2-DCA: in particolare, una prima serie è stata allestita a partire dai campioni MW33 e MW34 ottenuti dal campionamento del 2020, e una seconda serie a partire dagli stessi campioni ottenuti dal campionamento del 2021 (Fig. 2.6). Poiché la realizzazione di microcosmi in anaerobiosi non è di facile esecuzione e di certa riuscita, il primo set di microcosmi è stato realizzato con il principale obiettivo di mettere a punto non solo l'allestimento in condizioni di anaerobiosi ma anche il mantenimento di tali condizioni per tutta la durata dell'incubazione; altro obiettivo è stato quello di ottenere dei dati preliminari riguardo le condizioni imposte e la biodegradazione di 1,2-DCA.

Tutti i microcosmi sono stati preparati all'interno di vials per gas-cromatografia con prelievo in spazio di testa, ovvero l'analisi utilizzata successivamente per il monitoraggio della concentrazione di 1,2-DCA in microcosmo. In particolare, si trattava di vials da 20 mL (23x75 mm, Verex™) che venivano riempite per un volume totale di 12 mL con acqua contaminata e terreno di coltura e chiuse con tappi a vite muniti di setto perforabile (Verex™) (Fig. 2.7).



Fig. 2.7 Microcosmo allestito all'interno di vial da 20 mL.

Per assicurare le condizioni di anaerobiosi, i microcosmi sono stati preparati all'interno di una glove box la cui atmosfera è stata preventivamente saturata con N₂ sterilizzato per filtrazione: il condizionamento dell'atmosfera interna alla glove box è stato realizzato eseguendo dieci cicli di vuoto-azoto, in cui la rimozione dell'atmosfera mediante una pompa da vuoto veniva intervallata dall'immissione di N₂ gassoso. Per lo stesso motivo, il terreno di coltura e le altre soluzioni utilizzate sono state gorgogliate con N₂ prima di essere utilizzate nei microcosmi, allo scopo di rimuovere da esse l'O₂ presente (Fig. 2.8).



Fig. 2.8 Allestimento di microcosmi anaerobi in glove box con atmosfera saturata con N₂ sterilizzato.

In entrambe le serie di microcosmi anaerobi, quella del 2020 e quella del 2021, è stato scelto di verificare se l'aggiunta o meno di un opportuno donatore di elettroni potesse favorire la dealoespirazione di 1,2-DCA. Come donatore di elettroni è stato scelto il lattato. La biostimolazione con lattato, quale substrato per la declorurazione riduttiva di solventi clorurati, in particolare di 1,2-DCA, è stata già verificata in precedenti studi in microcosmo, simili a quello qui descritto [Marzorati et al., 2006; Carpani et al., 2021]. In consorzi batterici decloruranti, il lattato viene convertito in acetato e H₂ e quest'ultimo viene utilizzato come donatore diretto di elettroni nei processi di dicloroeliminazione. Le condizioni imposte, in entrambe le serie di microcosmi, sono state le seguenti:

- condizione *lac+*: aggiunta del donatore di elettroni lattato al terreno di coltura;
- condizione *lac-*: condizione di controllo in cui nessun donatore di elettroni è stato aggiunto al terreno di coltura;
- condizione *K-*: controllo abiotico realizzato con acqua sterilizzata allo scopo di verificare l'eventuale presenza di reazioni non mediate da microrganismi che possano portare alla degradazione di 1,2-DCA.

Nei microcosmi anaerobi del 2020 è stata prevista anche un'altra condizione di controllo, rappresentata dalla sola acqua contaminata senza aggiunta di terreno di coltura o altri ammendanti (condizione *tq*), allo scopo di paragonare l'eventuale potenziale biodegradativo intrinseco alla matrice naturale rispetto a quello delle colture ammendate (Fig. 2.6).

Il terreno di coltura utilizzato, denominato BTZ, è stato adattato a partire da quello descritto da Marzorati et al. (2006) ed è stato costituito come di seguito riportato. Una soluzione salina contenente concentrazioni finali in microcosmo di NH₄Cl 0,043 g/L, KH₂PO₄ 0,5 g/L, MgCl₂ x 6H₂O 0,2 g/L e CaCl₂ · 2H₂O 0,01 g/L è stata supplementata con una diluizione 1:200 della Trace Elements Solution riportata in Tab. 2.1, una diluizione 1:1000 della Seven Vitamins Solution riportata in Tab. 2.2 (contenente tra le altre la vitamina B₁₂, cofattore della dealogenasi riduttiva), Hepes/NaOH pH 7 0,5 mM [4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid solution] (per mantenere il pH nel range 6,8–8,2), estratto di lievito 0,05% (w/v), cisteina 1 mM (utilizzata come agente riducente per aiutare a mantenere le condizioni anaerobiche). Per i microcosmi nelle condizioni *lac+* e *K-*, al terreno BTZ è stato aggiunto Na-lattato quale fonte di carbonio/donatore di elettroni.

Tab. 2.1 Trace Elements Solution.

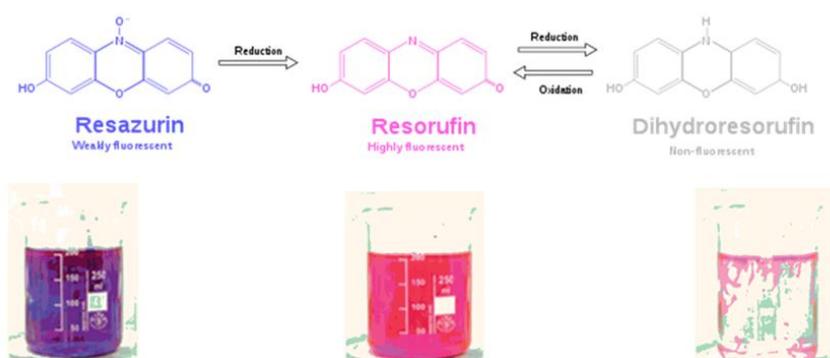
Acido nitrilotriacetico (NTA)	12,80 g
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	1,350 g
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,100 g
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,024 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,100 g
ZnCl ₂	0,100 g
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	0,025 g
H ₃ BO ₃	0,010 g
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,024 g
NaCl	1,000 g
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	0,120 g
Na ₂ SeO ₃ · 5 H ₂ O	0,026 g
H ₂ O distillata	1 L

Tab. 2.2 Seven Vitamins Solution.

Vitamina B ₁₂	100 mg
Acido para-aminobenzoico	80 mg
D(+)-biotina	20 mg
Acido nicotinico	200 mg
Calcio pantotenato	100 mg
Piridossina cloridrato	300 mg
Tiamina cloridrato · 2H ₂ O	200 mg
H ₂ O distillata	1 L

Ciascuna condizione in microcosmo è stata allestita in triplicato per i tempi di incubazione prescelti. Dopo essere stati preparati, i microcosmi sono stati sigillati, portati fuori dalla cabina anaerobia e incubati al buio a temperatura ambiente e in condizioni statiche.

Solo nella prima serie di microcosmi anaerobi, costituiti a partire dai campioni di acqua contaminata raccolti nel 2020, al terreno di coltura è stato aggiunto l'indicatore di potenziale redox resazurina (7-idrossi-10-ossido-3-oxofenossoazina). Questa presenta una colorazione diversa a seconda della presenza o assenza nel mezzo della molecola di O₂: nella sua forma ossidata mostra una colorazione blu/viola, mentre quando viene ridotta irreversibilmente a resorufina mostra una colorazione rosa. A condizioni di potenziale redox ancora inferiori la resorufina può essere ulteriormente ridotta in maniera reversibile in diidroresorufina che mostra uno stato incolore (trasparente) (Fig. 2.9).

**Fig. 2.9** Stati di ossidazione della resazurina, utilizzata in microcosmo come indicatore di potenziale redox.

Nei microcosmi del 2020, inoltre, la concentrazione finale di Na-lattato aggiunto nelle condizioni *lac+* e *K-* era di 5 mM [Marzorati et al., 2006]. In ciascun microcosmo nelle condizioni *lac+*, *lac-* e *K-* il rapporto tra acqua contaminata e terreno di coltura era di 1:1; i microcosmi nella condizione *tq* contenevano soltanto acqua contaminata. Per la realizzazione del controllo abiotico (*K-*) di questa prima serie di microcosmi, l'acqua contaminata è stata sterilizzata mediante filtrazione, quindi aggiunta al terreno di coltura contenente Na-lattato.

Sono stati scelti quattro tempi di incubazione (0, 15, 30 e 45 giorni), al termine dei quali ciascun microcosmo è stato analizzato per il monitoraggio della concentrazione di 1,2-DCA nel tempo. In virtù dei risultati preliminari ottenuti dalla prima serie di microcosmi anaerobi, e al fine di migliorare le condizioni di biostimolazione della biodegradazione di 1,2-DCA, nella seconda serie di microcosmi realizzata a partire dai campioni di acqua raccolti nel 2021, sono state apportate alcune modifiche. La concentrazione finale di Na-lattato è stata abbassata a 1 mM [Carpani et al., 2021]. Il rapporto tra acqua contaminata e terreno di coltura è stato aumentato a 5:1, allo scopo di aumentare la quantità di biomassa inoculata in microcosmo. Il controllo abiotico è stato realizzato trattando l'acqua contaminata con sodio azide (NaN_3) 1%, quale agente batteriostatico [Carpani et al., 2021]. Ai microcosmi è stato anche aggiunto il contaminante 1,2-DCA (ACS reagent, Sigma-Aldrich®), quale accettore terminale di elettroni per la dealoespirazione, ad una concentrazione finale di 100 ppm. Per fornire una quota di H_2 come donatore di elettroni subito disponibile per la reazione di dicloroeliminazione di 1,2-DCA, una miscela gassosa contenente 80% N_2 , 15% CO_2 e 5% H_2 è stata iniettata all'interno della glove box durante l'ultimo dei dieci cicli di condizionamento per l'anaerobiosi. Tre sono stati i tempi di incubazione scelti (0, 7 e 15 giorni), al termine dei quali è stata misurata la concentrazione di 1,2-DCA in ciascun microcosmo. Una replica dei microcosmi nelle condizioni *lac+* e *lac-* è stata mantenuta fino a 30 giorni di incubazione ed è stata utilizzata sia come inoculo per l'allestimento di colture in batch sia per la successiva estrazione del DNA. Le colture di arricchimento sono state preparate a partire dai microcosmi costituiti dal campione di acqua MW33 del 2021 (*33lac+* e *33lac-*), in condizioni di anaerobiosi, in duplicato, all'interno di serum bottles da 160 mL, rispettando lo stesso rapporto tra contenuto liquido e spazio di testa impostato per i microcosmi all'interno delle vials da 20 mL, e sono state mantenute nel tempo eseguendo passaggi periodici ogni circa 30 giorni. Per ogni passaggio, un inoculo (10% v/v) proveniente dalla relativa coltura precedente è stato trasferito su terreno di coltura BTZ fresco, con o senza Na-lattato 1 mM, a cui erano sempre aggiunte 100 ppm di 1,2-DCA. In fase di allestimento di ogni nuovo batch, dei controlli abiotici sono stati realizzati con terreno di coltura non inoculato. Tutte le colture sono state incubate in condizioni statiche, al buio e a temperatura ambiente. Nei batch di arricchimento è stata monitorata la biodegradazione di 1,2-DCA nel tempo, prevedendo quattro tempi di incubazione (0, 4, 7 e 15 giorni). Ad ogni passaggio, aliquote di ciascuna coltura sono state crioconservate a -80 °C in glicerolo 20%.

Allestimento di microcosmi in aerobiosi

In condizioni di aerobiosi, 1,2-DCA può direttamente sostenere la crescita batterica come fonte di carbonio ed energia, e la sua degradazione può essere iniziata da una reazione idrolitica o da

una reazione ossidativa (in entrambi i casi si tratta di un metabolismo di ossidazione aerobia diretta); in alternativa, 1,2-DCA può essere degradato mediante un meccanismo di cometabolismo aerobio. Allo scopo di verificare se nei campioni di acqua contaminata, opportunamente biostimolati in presenza di O₂, potessero avere luogo reazioni di ossidazione, diretta o cometabolica, di 1,2-DCA, una serie di microcosmi è stata realizzata in condizioni di aerobiosi a partire dai campioni di acqua MW33 e MW34 prelevati nel 2020. Le condizioni imposte e realizzate in aerobiosi sono state le seguenti:

- condizione *ox*: aggiunta del contaminante 1,2-DCA al terreno di coltura come unica fonte di carbonio per biostimolare i processi di ossidazione aerobia diretta;
- condizione *co*: aggiunta nel microcosmo di una miscela di idrocarburi volatili quali substrato di crescita preferenziale per quei batteri che eventualmente utilizzerebbero 1,2-DCA mediante un processo di cometabolismo aerobio;
- condizione *K*-: controllo abiotico realizzato con acqua sterilizzata per filtrazione allo scopo di verificare l'eventuale presenza di reazioni non mediate da microrganismi che possano portare alla degradazione aerobia di 1,2-DCA (Fig. 2.6).

I microcosmi aerobi sono stati allestiti in normali condizioni atmosferiche all'interno di vials da 20 mL, analoghe a quelle utilizzate per i microcosmi anaerobi (Fig. 2.7), aggiungendo acqua contaminata e terreno di coltura in un rapporto di 1:1. Il terreno di coltura utilizzato, denominato MSM (Minimal Salt Medium), è stato adattato a partire da quello descritto da Coleman et al. (2002) ed è stato costituito come di seguito riportato. Per un volume totale di 1 L, a una soluzione salina contenente K₂HPO₄ · 3 H₂O 2,97 g/L, KH₂PO₄ 0,95 g/L e (NH₄)₂SO₄ 0,67 g/L sono stati aggiunti 2 mL della Metals Solution riportata in Tab. 2.3 e 5 mL di una diluizione 1:100 della Seven Vitamins Solution riportata in Tab 2.2. Nei microcosmi nella condizione *ox* è stato aggiunto il contaminante 1,2-DCA (ACS reagent, Sigma-Aldrich®), come unica fonte di carbonio, ad una concentrazione finale di 100 ppm; nei microcosmi nella condizione *co* e *K*- è stata anche iniettata una miscela di idrocarburi volatili (1% metano, 1% etano, 0,01% C4-C6) (5% v/v) allo scopo di fornire il substrato di crescita preferenziale per quei batteri che eventualmente e cometabolicamente utilizzerebbero 1,2-DCA.

Tab 2.3 Metals Solution

Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	6,37 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1,0 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	2,5 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,1 g
CuSO ₄	0,064 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,2 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0,52 g

MgSO ₄ · 7H ₂ O	60,0 g
H ₂ O distillata	1 L

Ciascuna condizione in microcosmo è stata allestita in triplicato per quattro tempi di incubazione (0, 15, 30 e 45 giorni). Dopo essere stati preparati, i microcosmi sono stati sigillati e incubati al buio, a temperatura ambiente e in lieve agitazione. Al termine dei periodi di incubazione previsti, ciascun microcosmo è stato analizzato per il monitoraggio della concentrazione di 1,2-DCA nel tempo.

Una replica dei microcosmi nelle condizioni *ox* e *co* è stata mantenuta fino a 90 giorni di incubazione ed è stata utilizzata come inoculo per l'allestimento di colture in batch. Queste ultime sono state preparate in duplicato all'interno di serum bottles da 120 mL, rispettando lo stesso rapporto tra contenuto liquido e spazio di testa impostato per i microcosmi all'interno delle vials da 20 mL, e mantenute nel tempo eseguendo passaggi periodici ogni circa 90 giorni. Per ogni passaggio, un inoculo (10% v/v) proveniente dalla relativa coltura precedente è stato trasferito su terreno di coltura MSM fresco a cui erano sempre aggiunte 100 ppm di 1,2-DCA. In fase di allestimento di ogni nuovo batch di arricchimento, dei controlli abiotici sono stati realizzati con terreno di coltura non inoculato. Tutte le colture sono state incubate in lieve agitazione, al buio e a temperatura ambiente. In ogni batch di arricchimento è stata monitorata la biodegradazione di 1,2-DCA nel tempo, prevedendo tre tempi di incubazione (0, 15 e 25 giorni), al termine dei quali ciascuna coltura è stata analizzata. Ad ogni passaggio, aliquote di ciascuna coltura sono state crioconservate a -80 °C in glicerolo 20%.

Monitoraggio chimico della biodegradazione di 1,2-DCA

Misurazione della concentrazione di 1,2-DCA mediante Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Essendo una molecola volatile e poco solubile in acqua, all'interno di un sistema chiuso come quello nel quale sono stati costituiti i microcosmi descritti in questo studio, 1,2-DCA si ripartisce all'equilibrio tra fase liquida e fase gassosa. Per tale motivo, la sua concentrazione in microcosmo è stata monitorata nel tempo mediante analisi in gas-cromatografia con prelievo in spazio di testa e rilevazione in spettrometria di massa (HS-GC/MS). Per il monitoraggio dei microcosmi anaerobi costituiti a partire dai campioni di acqua raccolti nel 2020, è stato utilizzato il gascromatografo/spettrometro di massa GCMS-QP2010 Plus (SHIMADZU) equipaggiato con la colonna capillare Supelcowax™ 10 di lunghezza 30 m, spessore 0,32 mm e diametro 0,25 µm. Il gas carrier era rappresentato da elio. Il metodo di analisi è stato preventivamente messo a punto su soluzioni a concentrazione nota di 1,2-DCA e prevedeva una

temperatura di iniezione di 240 °C e il programma di temperature in colonna di seguito mostrato:

	Rate	Final Temp.	Hold time
0	-	40 °C	2 min
1	25 °C/min	200 °C	0

Il prelievo di 1 mL di spazio di testa e la successiva iniezione in colonna (eseguita in modalità *splitless*) sono stati effettuati in manuale per tre repliche di ciascun microcosmo. Sui cromatogrammi derivanti dall'analisi 1,2-DCA mostrava un picco corrispondente ad un tempo di ritenzione di 4,2 minuti. L'area del picco, calcolata come integrale, viene correlata alla concentrazione di 1,2-DCA, espressa in parti per milione (ppm), riferendosi ad una curva di taratura preventivamente costruita a partire da soluzioni a concentrazione nota di 1,2-DCA.

Il monitoraggio della concentrazione di 1,2-DCA nei microcosmi anaerobi del 2021, nei microcosmi aerobi e nelle colture in batch da essi derivate è stato eseguito con la stessa metodica ma con una diversa strumentazione munita di autocampionatore. In particolare, è stato utilizzato il gascromatografo/spettrometro di massa 7890B GC System/7000C GC/MS/MS Triple Quad (Agilent Technologies) equipaggiato con la colonna Agilent 19091S-433UI di lunghezza 30 m, spessore 0,25 mm e diametro 0,25 µm ed elio come gas carrier. Anche in questo caso, il metodo di analisi è stato preventivamente messo a punto su soluzioni a concentrazione nota di 1,2-DCA e prevedeva una temperatura di iniezione di 270 °C e il programma di temperature in colonna di seguito mostrato:

	Rate	Final Temp.	Hold time
0	-	40 °C	0,2 min
1	10 °C/min	240 °C	0

Il prelievo di 250 µL di spazio di testa e la successiva iniezione in colonna (con split ratio 5:1) sono avvenuti mediante autocampionatore; prima del prelievo, ciascuna vial veniva incubata in agitazione a 30 °C per 10 minuti. Per ogni condizione in microcosmo sono state analizzate tre repliche, ciascuna con due misurazioni consecutive. L'elaborazione dei cromatogrammi derivanti dall'analisi, su cui 1,2-DCA mostrava un tempo di ritenzione pari a 3,2 minuti, e il calcolo della concentrazione di 1,2-DCA in riferimento alla relativa curva di taratura sono stati effettuati mediante il software Agilent MassHunter Qualitative Data Analysis.

Determinazione del rilascio di ioni cloruro

La degradazione di 1,2-DCA, sia che avvenga mediante dicloroeliminazione sia mediante ossidazione diretta, determina la rottura di legami C-Cl con la conseguente liberazione di due ioni Cl⁻ da ciascuna molecola di 1,2-DCA. Di conseguenza, il rilascio di ioni Cl⁻ si configura

come un indicatore di avvenuta biodegradazione di 1,2-DCA. La determinazione del rilascio di ioni cloruro è stata utilizzata come metodo di monitoraggio della biodegradazione di 1,2-DCA nelle colture di arricchimento aerobiche e anaerobiche. A tal fine è stato utilizzato il kit commerciale QuantiChrom™ Chloride Assay Kit (BioAssay Systems), il quale si basa su un saggio colorimetrico. Il reagente fornito dal kit (mercuric 2,4,6-tripiridyl-s-triazine) forma un complesso colorato legandosi specificamente con il cloruro. L'intensità della colorazione, misurata a 610 nm, è direttamente proporzionale alla concentrazione di ioni Cl⁻ nel campione. Quest'ultima viene calcolata riferendosi a una curva di taratura già costruita a partire da soluzioni a concentrazione nota di cloruro. Aliquote delle colture da monitorare sono state prelevate al tempo 0 (ovvero subito dopo l'allestimento delle colture stesse) e dopo i tempi di incubazione previsti; il prelievo è stato effettuato con una siringa attraverso il setto perforabile che costituiva i tappi delle serum bottles contenenti la coltura batterica. Subito dopo il prelievo, le aliquote di coltura sono state centrifugate a 14.000 rpm per 2 min al fine di eliminare la componente cellulare e recuperare solo il surnatante. 5 µL di quest'ultimo sono stati trasferiti nei pozzetti di una piastra 96-wells e ad essi sono stati aggiunti 200 µL del reagente fornito dal kit. Dopo 5 min di incubazione a temperatura ambiente, la densità ottica è stata letta a 610 nm.

Monitoraggio biologico dei microcosmi

Al termine del periodo di incubazione previsto, i microcosmi che avevano dato le migliori rese in termini di abbattimento di 1,2-DCA, sono stati analizzati per caratterizzare le comunità microbiche in essi arricchitesi e per ricercare le specie batteriche e i geni potenzialmente responsabili della dechlorurazione del contaminante.

Filtrazione ed estrazione del DNA dai microcosmi e dalle colture di arricchimento

Tutte le indagini molecolari effettuate sui microcosmi e sulle colture di arricchimento allestiti e incubati nelle condizioni selezionate, sono state eseguite a partire dal DNA metagenomico da essi estratto. Al termine del tempo di incubazione stabilito e successivamente alle analisi chimiche eseguite in HS-GC/MS per la misurazione della concentrazione di 1,2-DCA, tutte le repliche di ciascuna condizione in microcosmo o nella coltura in batch sono state filtrate insieme su filtri a membrana MF-Millipore in esteri misti di cellulosa di porosità 0,22 µm, preventivamente sterilizzati, mediante il sistema sotto vuoto rappresentato in Fig. 2.10. Dopo la filtrazione, ciascuna membrana è stata conservata a -20 °C per la successiva estrazione del DNA.



Fig. 2.10 Sistema di filtrazione sotto vuoto utilizzato per recuperare la biomassa dei microcosmi.

L'estrazione e la purificazione del DNA metagenomico dalla biomassa recuperata su ciascun filtro sono state condotte utilizzando il QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), seguendo la stessa procedura descritta per l'estrazione del DNA dai campioni di acqua contaminata. In particolare, il DNA metagenomico è stato ottenuto dal primo set di microcosmi anaerobi (condizioni *lac+* 2020, *lac-* 2020 e *tq*) e dai microcosmi aerobi (condizioni *ox* e *co*), entrambi costituiti dai campioni di acqua MW33 e MW34 prelevati nel 2020, dopo 45 giorni di incubazione; dal secondo set di microcosmi anaerobi costituiti dal campione di acqua MW33 prelevato nel 2021 (condizioni *33lac+* 2021 e *33lac-* 2021), dopo 30 giorni di incubazione; e dalla coltura di arricchimento derivante dal microcosmo nella condizione *ox* allestito dal campione di acqua MW33 (*33ox*), dopo 90 giorni di incubazione.

Analisi della diversità microbica nei microcosmi mediante ARISA

Analisi ARISA è stata applicata al DNA metagenomico estratto dai microcosmi anaerobi e aerobi del 2020 (condizioni *lac+* 2020, *lac-* 2020, *tq* e *ox*) con le stesse modalità già descritte.

Analisi delle comunità microbiche in microcosmo mediante 16S rRNA metabarcoding

La composizione delle comunità microbiche arricchitesi in microcosmo è stata indagata mediante analisi 16 rRNA metabarcoding, con le stesse modalità già descritte. In particolare, è stata caratterizzata la comunità microbica dei microcosmi anaerobi del 2020 nella condizione *33lac+* 2020, dei microcosmi anaerobi del 2021 nelle condizioni *33lac+* 2021 e *33lac-* 2021, dei microcosmi aerobi e delle relative colture di arricchimento nella condizione *33ox*.

Ricerca di generi OHRB nei microcosmi anaerobi mediante Nested-PCR del gene 16S rRNA

Nella comunità batterica arricchitasi nei microcosmi anaerobi del 2021 (condizioni *33lac+* 2021 e *33lac-* 2021) sono stati ricercati i più noti generi di batteri in grado di operare dealoespirazione di solventi clorurati (OHRB), in particolare *Dehalococcoides*, *Dehalogenimonas*, *Dehalobacter*, *Desulfitobacterium* e *Desulfuromonas*. A tal fine, il DNA

metagenomico estratto dai suddetti microcosmi è stato utilizzato come stampo per un approccio di Nested-PCR per l'amplificazione di sequenze del gene 16S rRNA specifiche dei sopraccitati OHRB, utilizzando le stesse coppie di primers e seguendo le stesse modalità già descritte.

Ricerca dei geni catabolici della declorurazione

Il DNA metagenomico estratto dai microcosmi anaerobi *33lac+ 2021* e *33lac- 2021* e del microcosmo e arricchimento *33ox*, è stato utilizzato per la ricerca dei potenziali geni catabolici responsabili dei processi di declorurazione di solventi clorurati, in particolare di 1,2-DCA. A tale scopo è stato usato un approccio di PCR diretta con l'utilizzo di coppie di primers degenerati e specifici per i geni in questione, individuate in letteratura scientifica.

In particolare, nel DNA metagenomico dei microcosmi anaerobi *33lac+ 2021* e *33lac- 2021* sono state ricercate sequenze del gene *dcaA*, codificante per una dealogenasi riduttiva che agisce specificamente nella dicloroeliminazione di 1,2-DCA, e sequenze di altri geni *rdhA*, codificanti per le dealogenasi riduttive descritte per gli OHRB *Sulfurospirillum* e *Shewanella*, i quali, come sarà descritto nei risultati, sono stati individuati nella comunità microbica di entrambi i microcosmi. Tutte le reazioni di PCR sono state condotte in 20 µL di volume finale utilizzando DreamTaq™ DNA polymerase (ThermoFisher Scientific™) e le coppie di primers riportate in Tab. 2.4, secondo le condizioni descritte nella letteratura di riferimento. In particolare, la coppia di primers Rdh522F/Rdh625R è stata utilizzata usando come DNA stampo gli ampliconi ottenuti dall'amplificazione con la coppia di primers DHL-F1/DHL-R1 seguendo un approccio di Nested-PCR. I prodotti di PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi orizzontale su gel di agarosio all'1-2%; la corsa elettroforetica è stata condotta a 80 V per 30-45 min e la visualizzazione delle bande di PCR è avvenuta a seguito di colorazione con GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium) ed esposizione a radiazione UV al ChemiDoc™ (Bio-Rad®). Gli ampliconi di 95 bp ottenuti dall'amplificazione con la coppia di primers Rdh522F/Rdh625R per il gene *dcaA* a partire dal DNA estratto da entrambi i microcosmi *33lac+ 2021* e *33lac- 2021*, 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 mediante TOPO® TA Cloning Kit (Invitrogen) secondo le istruzioni del produttore. Il DNA plasmidico è stato estratto mediante GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (SIGMA-ALDRICH®) e i plasmidi ricombinanti sono stati individuati a seguito di analisi di restrizione eseguita con l'enzima di restrizione EcoRI (Invitrogen). Gli inserti sono stati sequenziati utilizzando i primers universali M13 presso la ditta Macrogen Europe (Amsterdam, Olanda). Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state allineate con il software Clustal Omega e confrontate con quelle presenti nel database GenBank del National Center for Biotechnology

Information (NCBI) utilizzando l'algoritmo Mega BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Nel DNA metagenomico del microcosmo aerobio *33ox* e della relativa coltura di arricchimento sono state ricercate sequenze del gene *dhlA*, codificante per la aloalcano dealogenasi, ovvero l'enzima che catalizza la dealogenazione idrolitica di 1,2-DCA. A tal fine è stata utilizzata la coppia di primers degenerati DHMf/DHMr, disegnata sui geni *dhlA* di *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 e *Ancylobacter aquaticus* AD27 (Tab. 2.4). La reazione di PCR è stata eseguita in 20 µL di volume finale utilizzando 0,1 µL di OneTaq® DNA Polymerase (NEW ENGLAND BioLabs®), OneTaq Standard Reaction Buffer 1X, 0,2 mM di dNTPs, 2 µM di ogni primer, 1 µL di DNA stampo. Il programma di amplificazione prevedeva uno step iniziale di denaturazione a 94 °C per 30 sec, seguito da 30 cicli di denaturazione a 94 °C per 30 sec, annealing a 60 °C per 1 min, estensione a 68 °C per 30 sec, con una estensione finale a 68 °C per 5 min. I prodotti di PCR, di dimensioni pari a 450 bp, sono stati sottoposti ad elettroforesi orizzontale su gel di agarosio all'1% e visualizzati come descritto.

Tab. 2.4 Coppie di primers per geni catabolici della declorurazione utilizzate in questo studio.

Gene	Funzione	Coppia di primers	Sequenza (5'→3')	T _a (°C)	Prodotto (bp)	Riferimento bibliografico
<i>dcaA</i>	dealogenasi riduttiva specifica per 1,2-DCA	DHL-F1 DHL-R1	GGACCTCGTTGGACT CC GGCAAATCCCATGGC ATTA	54	400	Marzorati et al., 2007
		DHL-F2 DHL-R2	GTTAAAAAGGCAGCC TGTT GTAAACTTTCCCGT CGC	54	326	Marzorati et al., 2007
		PceAFor1 DcaBRev	ACGTGCAATTATTAT TAAGG TGGTATTCACGCTCC GA	54	1944	Marzorati et al., 2007
		Rdh522F Rdh625R	ATGACCAATGAAATA GCTAATGA TGTTGGCCTTGTTGTC GCACACT	52	95	Carpani et al., 2021
<i>rdhA</i>	dealogenasi riduttiva di <i>Sulfurospirillum</i> spp.	RDH_Group20F RDH_Group20R	GCCTGAACTCTCAAG AAGAG GCTTACAGTGTCTCT AAAATGGTC	50	1470	Hug e Edwards, 2013
		Sul-rdhA-f Sul-rdhA-r	TTRGTRGGTRTTGCA AGATT CTTGTCCTAACCTG CTTC	53	394	Buttet et al., 2013
<i>rdhA</i>	dealogenasi riduttiva di <i>Shewanella</i> spp.	RDH_group31BF RDH_Group31R	TGGATAAACAMAR AGTYGAAGG GRCAWGMHTCRGCR CA	50	960	Hug e Edwards, 2013

<i>rdh</i>	dealogenasi riduttiva specifica per cloroeteni	ceRD2L RD7	GCAGCACGCCTTTT GGIGCIKMIYTNGTIGG AANGGRCAIACIGCIW CRCA	47	700-900	Regeard et al., 2004
		ceRD2S RD7	GCAGCACGCCTTTT GGIGCIKMIWSIGTIGG AANGGRCAIACIGCIW CRCA	47	700-900	Regeard et al., 2004
<i>dhlA</i>	aloalcano dealogenasi	DHMf DHMr	GGCGAGCCCACCTGG AGYTAC GWMKYGTCTRGGGAA RGGCGC	60	450	Govender e Pillay, 2011

RISULTATI E DISCUSSIONE

Preliminari evidenze di biodegradazione di 1,2-DCA nei microcosmi anaerobi del 2020

La prima serie di microcosmi anaerobi, allestita a partire dai campioni di acqua contaminata MW33 e MW34 del 2020 nelle condizioni *lac+*, *lac-*, *tq* e *K-*, ha avuto come principale obiettivo quello di mettere a punto il laborioso allestimento in condizioni di anaerobiosi; inoltre, sono stati ottenuti dati preliminari riguardo la biodegradazione di 1,2-DCA e la struttura e la composizione delle comunità microbiche arricchite in microcosmo.

Allo scopo di valutare l'instaurarsi delle condizioni anaerobiche durante l'allestimento e il mantenimento di tali condizioni per tutta la durata dell'incubazione, al terreno colturale BTZ era stata aggiunta resazurina quale indicatore di potenziale redox. In Fig. 2.11 è mostrata, in maniera esemplificativa per tutti i microcosmi preparati in anaerobiosi, una delle repliche del microcosmo nella condizione *lac+* subito dopo il suo allestimento (Fig. 2.11A), dopo 7 giorni (Fig. 2.11B) e dopo 10 giorni (Fig. 2.11C) di incubazione. La colorazione rosa mostrata al tempo 0 è indice di riduzione della resazurina (blu/viola) in resorufina (rosa) e dà evidenza dell'instaurarsi delle condizioni anossiche durante la fase di allestimento dei microcosmi all'interno della glove box. Durante il periodo di incubazione si assiste a una progressiva diminuzione del potenziale redox, evidenziata dall'aspetto via via più trasparente assunto dal microcosmo e dovuto all'ulteriore riduzione della resorufina a diidroresorufina. La situazione mostrata in Fig. 2.11C è la stessa registrata fino all'ultimo periodo di incubazione previsto (45 giorni). Ciò dimostra che l'anaerobiosi non solo è stata instaurata fin dal principio, ma si è anche mantenuta nel tempo all'interno delle vials in cui i microcosmi sono stati preparati.

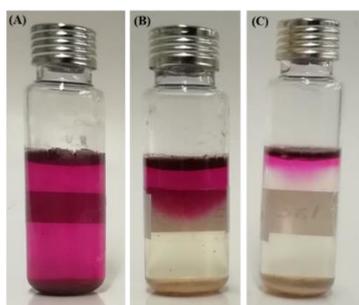


Fig. 2.11 Monitoraggio delle condizioni anaerobiche nei microcosmi *lac+* 2020 mediante l'indicatore di potenziale redox resazurina. (A) Microcosmo subito dopo l'allestimento, (B) dopo 7 giorni e (C) dopo 10 giorni di incubazione.

Il monitoraggio nel tempo della concentrazione di 1,2-DCA nei microcosmi, eseguito mediante HS-GC/MS, non ha dato delle evidenze conclusive di degradazione del contaminante, piuttosto ha mostrato una eccessiva variabilità e nel contempo una scarsa ripetibilità delle misurazioni effettuate sulle tre repliche di una stessa condizione. L'alta variabilità ha reso poco attendibile il confronto tra i risultati dopo i vari periodi di incubazione e tra le condizioni imposte con i relativi controlli. La variabilità intra-repliche rilevata all'interno di una singola condizione in microcosmo potrebbe essere stata generata da un lato da errori manuali durante il complicato allestimento dei microcosmi all'interno della cabina anaerobia, dall'altro dal prelievo dello spazio di testa eseguito in manuale per ciascuna vial previsto dalla stessa analisi gascromatografica. In ogni caso, dai risultati ottenuti è stato possibile derivare un trend di abbattimento di 1,2-DCA nei microcosmi biostimolati con lattato (condizione *lac+*) rispetto al controllo abiotico (*K-*). In Fig. 2.12 è mostrata la percentuale di rimozione di 1,2-DCA osservata nei microcosmi *33lac+* 2020 e *34lac+* 2020, nettamente più elevata rispetto a quella osservata nel relativo controllo abiotico dopo 30 giorni di incubazione. Lo stesso trend non è stato evidenziato nelle condizioni *lac-* e *tq*.

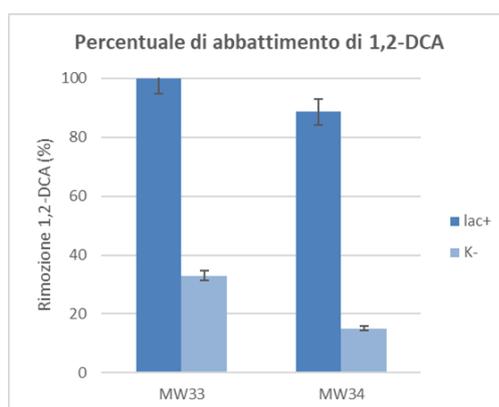


Fig. 2.12 Percentuale di rimozione di 1,2-DCA osservata nei microcosmi anaerobi *33lac+* 2020 e *34lac+* 2020 costituiti dall'acqua contaminata campionata nel 2020 dopo 30 giorni di incubazione.

La biomassa arricchitasi nei microcosmi dopo 45 giorni di incubazione è stata stimata come quantità di dsDNA estratto riferita al volume di microcosmo filtrato (tre repliche per ogni condizione), i cui valori sono riportati in Tab. 2.5. Tutte le condizioni in microcosmo hanno

mostrato un aumento più o meno pronunciato della quantità di DNA totale rispetto a quello ottenuto dal relativo campione di acqua contaminata iniziale (1,8 ng/mL per MW33 e 0,5 ng/mL per MW34, Tab. 1.4), con il maggiore arricchimento in biomassa osservato nei microcosmi nella condizione *lac+* 2020.

Tab. 2.5 DNA totale nei microcosmi riferito al volume di microcosmo filtrato.

	33	34	33	34	33	34	33	34	33	34	33	33
	<i>lac+</i>	<i>lac+</i>	<i>lac-</i>	<i>lac-</i>	<i>tq</i>	<i>tq</i>	<i>ox</i>	<i>ox</i>	<i>co</i>	<i>co</i>	<i>lac+</i>	<i>lac-</i>
	2020	2020	2020	2020	2020	2020	2020	2020	2020	2020	2021	2021
DNA (ng/mL)	1299	749,6	171,8	62,3	33,6	16,3	17,3	23,4	26,6	5,0	124,5	248,3

Allo scopo di confrontare la struttura delle comunità microbiche arricchitesi in microcosmo, il DNA metagenomico estratto dai microcosmi anaerobi nelle condizioni *lac+*, *lac-* e *tq* e da quelli aerobi nella condizione *ox*, entrambi costituiti dai campioni di acqua MW33 e MW34 prelevati nel 2020, è stato sottoposto ad analisi ARISA. Il cladogramma ottenuto (Fig. 2.13) mostra una netta separazione tra le comunità dei microcosmi aerobi e anaerobi; in particolare, le comunità dei microcosmi *lac+* 2020 e *lac-* 2020 sono più simili tra loro, con un grado di similarità abbastanza elevato per le comunità *lac-* dei microcosmi costituiti dai due campioni di acqua (33*lac-* 2020 e 34*lac-* 2020), mentre le comunità *ox* clusterizzano su rami separati, a indicare che, come ci si aspetta, le condizioni di aerobiosi e anaerobiosi selezionano ceppi batterici molto diversi, innanzitutto per la loro tolleranza nei confronti dell'O₂. Le comunità dei microcosmi *tq*, caratterizzate da elevata beta diversità, come atteso da campioni di acqua contaminata che si sono già dimostrati molto diversi tra loro, sono nettamente separate da quelle dei microcosmi anaerobi, mentre risultano un po' più simili a quelle dei microcosmi *ox*.

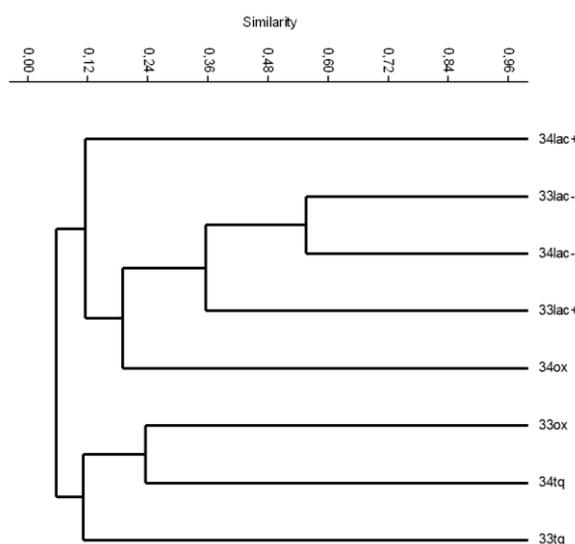


Fig. 2.13 Cladogramma costruito sui profili ARISA delle comunità microbiche dei microcosmi costituiti dai campioni di acqua contaminata MW33 e MW34 raccolti nel 2020. Similarità calcolata utilizzando il coefficiente di Bray-Curtis.

Poiché i microcosmi biostimolati con lattato avevano dato preliminari evidenze di biodegradazione di 1,2-DCA e poiché dalla preliminare caratterizzazione microbiologica dell'acqua contaminata il campione MW33, in particolare, aveva mostrato la presenza di potenziali batteri dealogenanti, si è scelto di analizzare la composizione della comunità microbica del microcosmo *33lac+ 2020* mediante analisi metagenomica di 16S rRNA metabarcoding. Sono state ottenute 45.726 reads finali e 89 OTUs, clusterizzate al 99% di identità, a indicare una notevole riduzione della diversità rispetto all'acqua contaminata iniziale utilizzata per costituire il microcosmo, in cui sono state rilevate 401 OTUs (Tab. 1.6). In Fig. 2.14 è riportata la composizione della comunità batterica del microcosmo *33lac+ 2020* a livello tassonomico di phylum (Fig. 2.14A) e genere (Fig. 2.14B), indicando i taxa identificati con un'abbondanza relativa superiore all'1%. Dopo biostimolazione con lattato si assiste a un notevole arricchimento in *Arcobacter* (famiglia Campylobacteraceae), *Pseudomonas* e *Shewanella*. *Arcobacter* è un patogeno di uomo e animali, che è stato ritrovato in ambienti acquatici, comprese le acque sotterranee [Shrestha et al., 2022]. Nel campione di acqua contaminata iniziale era rappresentato solo per lo 0,8% e in microcosmo rappresenta metà della popolazione batterica; tale arricchimento potrebbe essere stato stimolato dalla presenza di elevate concentrazioni di lattato, il quale si è dimostrato un ottimo substrato di crescita per alcuni ceppi di *Arcobacter* [Szydłowska et al., 2020]. Tuttavia, di *Arcobacter* non sono note capacità degradanti nei confronti di solventi clorurati. Volendo descrivere come varia il potenziale dealogenante prima e dopo biostimolazione con lattato, sono state paragonate le abbondanze relative delle famiglie comprendenti noti generi OHRB nel campione di acqua contaminata MW33 del 2020 e nel relativo microcosmo *33lac+ 2020* (Fig. 2.15). Le famiglie delle Dehalococcoidaceae, Peptococcaceae, Syntrophaceae, Desulfuromonadaceae e Desulfobacteraceae non hanno subito un arricchimento in microcosmo, anzi la loro abbondanza è diminuita rispetto all'acqua iniziale; invece, ad aumentare in microcosmo è stata l'abbondanza delle Campylobacteraceae, Desulfovibrionaceae e Shewanellaceae. Oltre al già citato *Arcobacter*, tra le Campylobacteraceae è stato identificato *Sulfurospirillum* (1,4%) che, insieme a *Desulfovibrio* (1,2%) e *Shewanella* (7%) comprendono ceppi di OHRB facoltativi [Dolinová et al., 2017], i quali potrebbero essere responsabili della biodegradazione di 1,2-DCA osservata in microcosmo. Tuttavia, i livelli di OHRB relativamente bassi riscontrati nel microcosmo *33lac+ 2020* potrebbero essere spiegati col fatto che le elevate dosi di lattato (5 mM) aggiunte per fornire H₂ come donatore di elettroni per la dechlorurazione riduttiva, abbiano stimolato maggiormente la crescita di batteri che consumano lattato senza un diretto effetto sui batteri dealorespiranti.

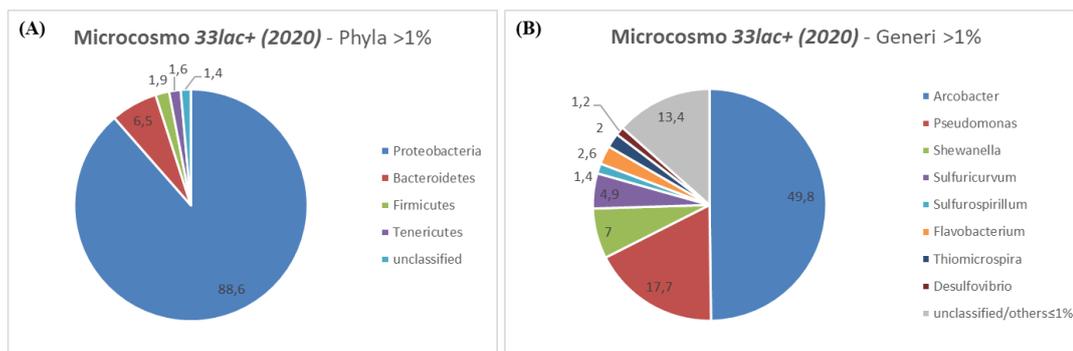


Fig. 2.14 Abbondanza relativa (%) dei phyla (A) e dei generi (B) nella comunità microbica del microcosmo *33lac+* 2020 costituito dal campione di acqua contaminata MW33 prelevato nel 2020. Sono indicati i taxa con abbondanza relativa >1% in almeno un campione; i rimanenti rientrano nella categoria “unclassified/others≤1%”.

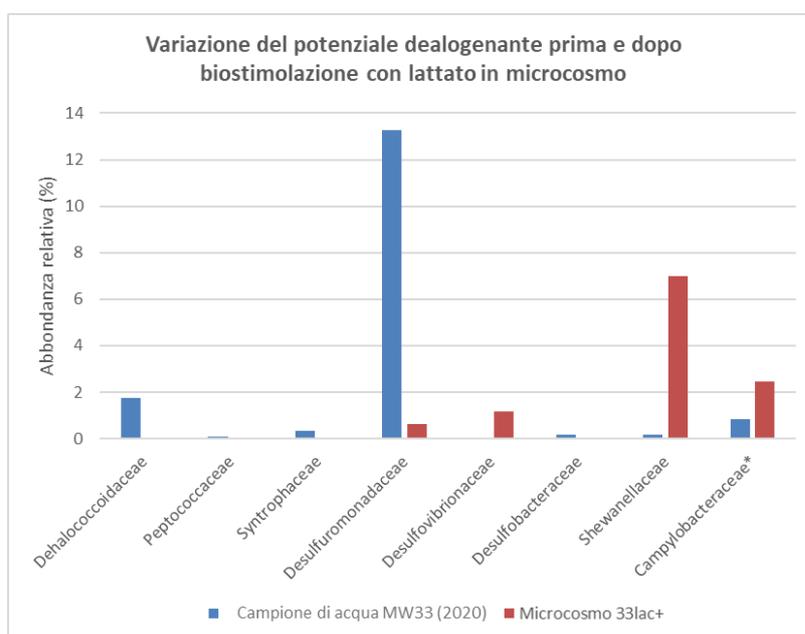


Fig. 2.15 Abbondanza relativa (%) delle famiglie identificate nelle comunità microbiche del microcosmo *33lac+* 2020 e dell’iniziale acqua contaminata (MW33 2020) che comprendono generi OHRB noti in letteratura scientifica. L’abbondanza relativa della famiglia delle Campylobacteraceae, contrassegnata con asterisco, non comprende il genere non dealogenante *Arcobacter*.

Valutazione della biodegradazione di 1,2-DCA nei microcosmi anaerobi del 2021

Monitoraggio chimico dei microcosmi anaerobi 2021

Il monitoraggio nel tempo della concentrazione di 1,2-DCA nei microcosmi anaerobi costituiti dai campioni di acqua contaminata MW33 e MW34 prelevati nel 2021 è stato eseguito mediante HS-GC/MS con prelievo in spazio di testa automatizzato, allo scopo di ridurre l’errore dovuto al prelievo in manuale. Tale monitoraggio ha mostrato in entrambe le condizioni imposte (*lac+* e *lac-*) un abbattimento completo del contaminante entro il 7° giorno di incubazione per i microcosmi *33lac+* 2021 e *33lac-* 2021 (Fig. 2.16A), ed entro il 15° giorno di incubazione per i microcosmi *34lac+* 2021 e *34lac-* 2021 (Fig. 2.16B). Al contrario, la concentrazione di 1,2-

DCA nei controlli abiotici (*K*-) si manteneva elevata nel tempo, pari a quella rilevata al tempo 0, a indicare che gli eventi di degradazione di 1,2-DCA osservati in microcosmo sono imputabili a reazioni mediate da microrganismi. Le analisi non hanno rilevato prodotti secondari della dealogenazione di 1,2-DCA, come CV, suggerendo che il meccanismo di dealogenazione a carico di 1,2-DCA potrebbe essere la sua dicloroeliminazione in etilene (dati non mostrati).

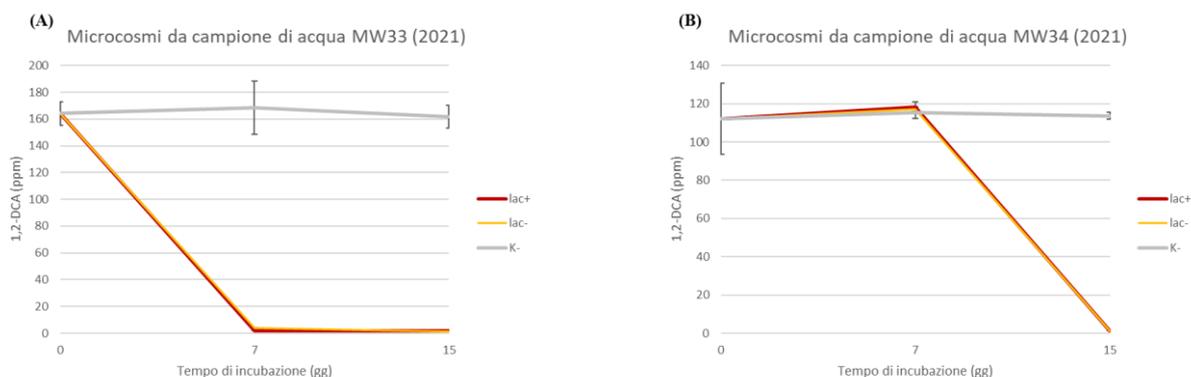


Fig. 2.16 Monitoraggio nel tempo della concentrazione di 1,2-DCA nei microcosmi anaerobi del 2021.

La biodegradazione di 1,2-DCA osservata nei microcosmi *33lac+* 2021 e *33lac-* 2021 è stata confermata monitorando il rilascio di ioni cloruro nelle relative colture di arricchimento. In entrambe le colture è stato osservato un aumento di ioni Cl^- rispetto al controllo abiotico già dopo 4 giorni di incubazione (Fig. 2.17).

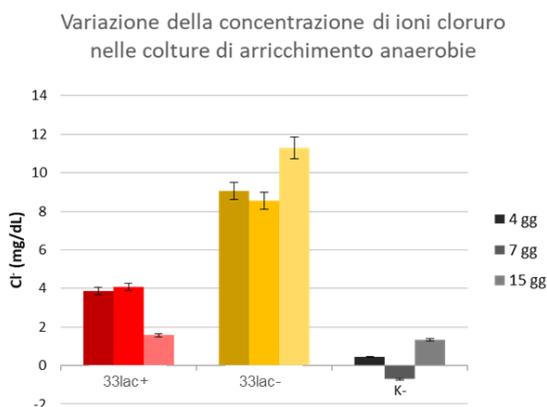


Fig. 2.17 Variazione della concentrazione di ioni cloruro nelle colture di arricchimento ottenute a partire dai microcosmi anaerobi allestiti dal campione di acqua MW33. Per ogni tempo di incubazione, la variazione di Cl^- è mostrata come differenza tra il dosaggio al termine dell'incubazione e quello al tempo zero.

I dati suggeriscono che la biostimolazione sia da attribuire alla sola presenza del terreno di coltura BTZ (contenente, tra gli altri, estratto di lievito e vitamina B_{12} , cofattore della dealoespirazione), il quale quindi sembra sufficiente a promuovere la biodegradazione di 1,2-DCA, a prescindere dalla presenza di lattato. Tale biodegradazione è risultata più rapida nei microcosmi costituiti dal campione di acqua MW33 rispetto a quelli costituiti dal campione di acqua MW34.

Monitoraggio biologico dei microcosmi anaerobi 2021

Poichè i microcosmi *33lac+ 2021* e *33lac- 2021* avevano dato le migliori rese in termini di abbattimento del contaminante, essi sono stati anche monitorati da un punto di vista biologico, per caratterizzare le comunità microbiche in essi arricchitesi e per ricercare le specie batteriche e i geni potenzialmente responsabili della biodegradazione di 1,2-DCA.

La quantità di DNA estratto dai suddetti microcosmi, dopo 30 giorni di incubazione, è riportata in Tab. 2.5 ed è risultata notevolmente aumentata rispetto all'acqua contaminata di partenza (campione di acqua MW33 del 2021: 3,4 ng/mL; Tab. 1.4).

La composizione delle comunità microbiche arricchitesi in entrambi i microcosmi, determinata mediante analisi 16S rRNA metabarcoding, è stata confrontata con quella dell'acqua di partenza. La ricchezza in OTUs diminuisce in entrambi i microcosmi, passando da 223 OTUs rilevate nel campione di acqua contaminata (Tab. 1.6) a 119 OTUs nel microcosmo *33lac- 2021* e 79 OTUs nel microcosmo *33lac+ 2021*, a indicare un aumento della specializzazione in microcosmo dimostrato anche dai valori dell'indice Simpson (Tab. 2.6).

Tab. 2.6 Risultati dell'analisi 16S rRNA metabarcoding condotta sui microcosmi e indici di diversità su di essi calcolati.

	Microcosmo <i>33lac- 2021</i>	Microcosmo <i>33lac+ 2021</i>	Microcosmo <i>33ox</i>	Arricchimento <i>33ox</i>
n° reads finali	18516	27202	27196	30526
OTUs (99% id.)	119	79	89	38
Shannon (H)	3,64	3,03	2,20	1,98
Dominance (D)	0,04	0,08	0,20	0,24
Simpson (1-D)	0,96	0,92	0,80	0,76

In Fig. 2.18 è riportata la composizione delle comunità batteriche dei microcosmi *33lac+ 2021* e *33lac- 2021*, insieme a quella del campione di acqua contaminata MW33 prelevato nel 2021, a livello tassonomico di phylum (Fig. 2.18A), famiglia (Fig. 2.18B) e genere (Fig. 2.18C), indicando i taxa identificati con un'abbondanza relativa superiore all'1%.

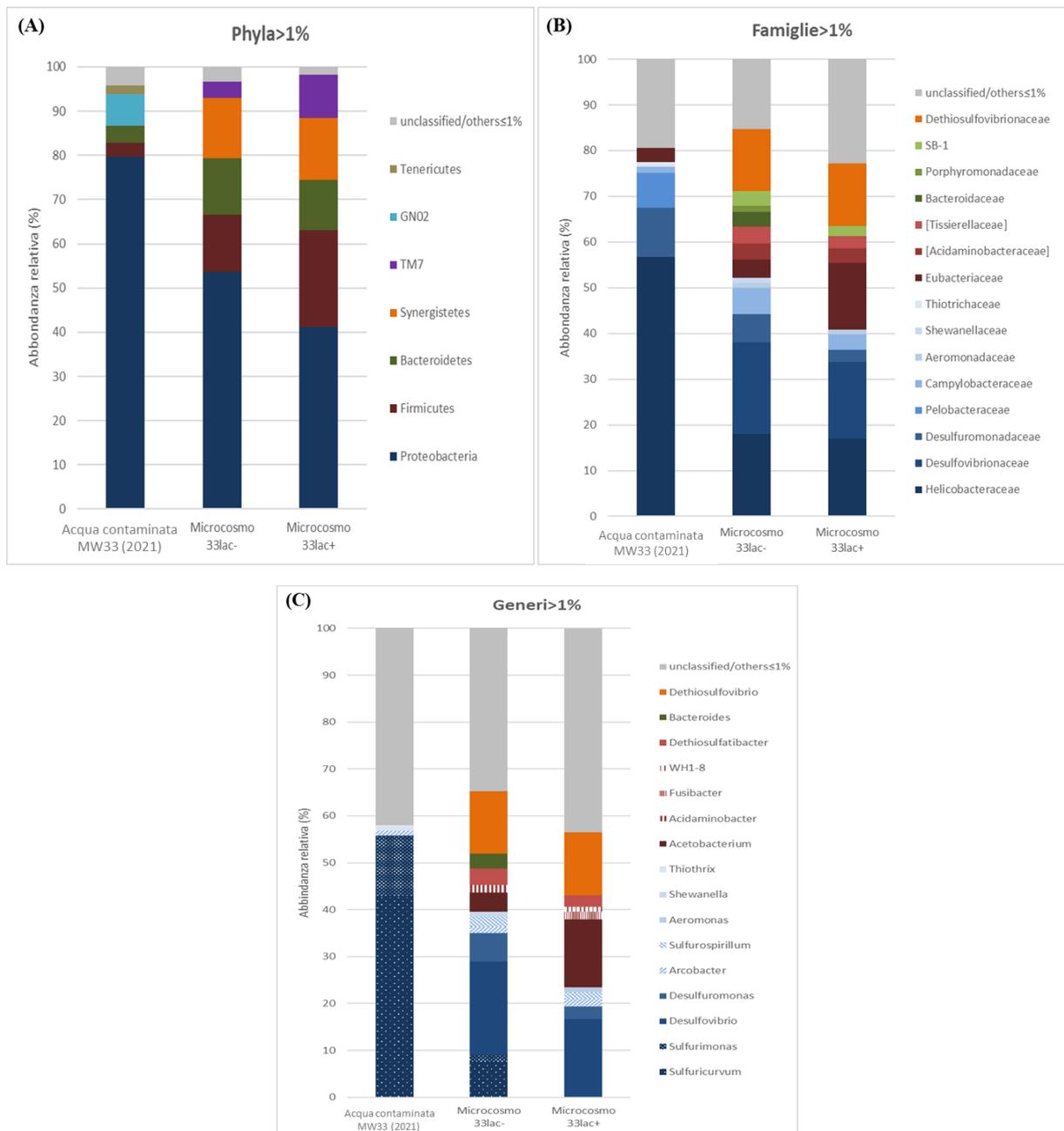


Fig. 2.18 Abbondanza relativa (%) dei phyla (A), delle famiglie (B) e dei generi (C) nelle comunità microbiche dei microcosmi costituiti dall'acqua MW33 campionata nel 2021 nelle condizioni *lac+* e *lac-*. Sono indicati i taxa con abbondanza relativa >1% in almeno un campione; i rimanenti rientrano nella categoria "unclassified/others≤1%".

La composizione della comunità microbica in microcosmo in presenza e in assenza di lattato è risultata piuttosto simile. A livello di phylum si assiste a una diminuzione dell'abbondanza dei Proteobacteria (fino al 50%) rispetto all'acqua iniziale (80%). In tutte e tre le condizioni essi sono per la maggior parte rappresentati da Deltaproteobacteria ed Epsilonproteobacteria. I meno abbondanti nei microcosmi sono gli Epsilonproteobacteria (che passano da 58% nell'acqua di partenza a 20-24% in microcosmo), mentre l'abbondanza dei Deltaproteobacteria si mantiene costante. Nei microcosmi, inoltre, si assiste a un arricchimento nei membri dei phyla Firmicutes, Bacteroidetes e Synergistetes rispetto all'acqua iniziale.

Scendendo a livello tassonomico di genere, se nell'acqua contaminata di partenza i generi più abbondanti erano *Sulfuricurvum* e *Sulfurimonas* (Helicobacteraceae, 56,8%), in entrambi i microcosmi ad essere più rappresentati sono *Desulfovibrio* (20% in 33lac- 2021 e 16,7% in 33lac+ 2021), *Dethiosulfovibrio* (13% in entrambi i microcosmi) e *Acetobacterium* (4,1% in 33lac- 2021 e 14,4% in 33lac+ 2021), tutti generi non identificati o con abbondanza relativa inferiore a 0,1% nell'acqua iniziale. *Desulfovibrio* (Desulfovibrionaceae) è un anaerobio obbligato e solfato-riduttore che può utilizzare idrogeno, lattato e altri composti organici come donatori di elettroni per la riduzione del solfato [Voordouw, 1995]. È stato spesso ritrovato, insieme agli OHRB *Dehalobacter*, *Dehalococcoides* e *Desulfotobacterium*, in consorzi batterici che biodegradavano composti clorurati, tra cui cloroeteni, PCB e anche 1,2-DCA [Drzyzga et al., 2001; Stening et al., 2008; Wang et al., 2019]. In tali consorzi probabilmente si instaurano interazioni sinergiche e sintrofiche tra *Desulfovibrio* e i batteri dealoespiranti: il solfato-riduttore potrebbe infatti utilizzare lattato o altri substrati organici per la sua crescita producendo H₂, il quale verrebbe trasferito agli OHRB che lo utilizzerebbero come donatore di elettroni per la dealoespirazione di composti clorurati, configurandosi come “accettori di elettroni biologici” per *Desulfovibrio* [Drzyzga et al., 2001; Wang et al., 2019; Xiao et al., 2020]. Inoltre, alcuni ceppi di *Desulfovibrio* si configurano anche come OHRB facoltativi [Turkowsky et al., 2018], come il ceppo *Desulfovibrio* sp. TBP-1 che si è dimostrato in grado di operare dealogenazione riduttiva di fenoli brominati [Boyle et al., 1999]. *Dethiosulfovibrio* (Dethiosulfovibrionaceae) è un anaerobio obbligato che riduce lo zolfo elementare e il tiosolfato in solfuro in presenza di substrati fermentabili [Surkov et al., 2001]. *Acetobacterium* (Eubacteriaceae), anch'esso anaerobio stretto, è un batterio acetogeno, in grado di crescere, tra gli altri, anche su lattato [Simankova e Kotsyurbenko, 2015]. Esso si è dimostrato agire nella declorurazione riduttiva cometabolica di 1,2-DCA, grazie al forte potere riducente della cobalamina, che oltre ad avere un ruolo fondamentale nell'acetogenesi è anche cofattore della dealogenazione riduttiva [De Wildeman et al., 2003a]. È probabile che la presenza nel terreno di coltura BTZ, utilizzato nei microcosmi anaerobi, di vitamina B₁₂ (Tab. 2.2), abbia stimolato il cometabolismo da parte di *Acetobacterium* nei confronti di 1,2-DCA.

Nelle comunità microbiche di entrambi i microcosmi sono stati anche identificati generi di OHRB facoltativi, ovvero *Desulfuromonas* (6,1% in 33lac- 2021 e 2,7% in 33lac+ 2021), *Sulfurospirillum* (2,2% in 33lac- 2021 e 1,4% in 33lac+ 2021) e *Shewanella* (1,1% in 33lac- 2021 e 0,2% in 33lac+ 2021). *Desulfuromonas* (Desulfuromonadaceae) è un anaerobio obbligato con un metabolismo di tipo respiratorio che utilizza lo zolfo elementare come accettore terminale di elettroni [Kuever et al., 2015]. Alcuni ceppi, quali *D.* sp. BB1, *D. chloroethenica* e *D. michiganensis*, hanno dimostrato grandi capacità biodegradative nei

confronti di cloroeteni [Guerrero-Barajas et al., 2011]. Anche *Sulfurospirillum* (Campylobacteraceae), batterio microaerofilo, è uno zolfo-riduttore [Stolz et al., 2015]; esso è l'unico OHRB appartenente alla classe degli Epsilonproteobacteria e la dealoespirazione di composti alogenati, cloroeteni in particolare, è stata ampiamente studiata nelle specie *S. multivorans* e *S. halorespirans* [Goris e Diekert, 2016]. *Shewanella* (Shewanellaceae) è un genere di batteri anaerobi facoltativi che comprende specie dealoespiranti quali *S. putrefaciens* 200, *S. algae* BrY e *S. oneidensis*, tutte in grado di ridurre tetraclorometano (CT) [Hau e Gralnick, 2007].

Da notare che in ogni caso la percentuale di generi non identificati rimane elevata con il 27,9% e il 41% di generi non classificati rispettivamente in *33lac- 2021* e *33lac+ 2021*.

Mediante Nested-PCR condotta utilizzando, quale marker filogenetico, sequenze del gene 16S rRNA specifiche di generi OHRB è stata anche rilevata la presenza nel DNA metagenomico dei microcosmi di *Dehalococcoides* e *Desulfotobacterium* e confermata la presenza di *Desulfuromonas* (Tab. 2.7).

Tab. 2.7 Ampliconi di peso molecolare atteso ottenuti a seguito di Nested-PCR con coppie di primers per sequenze del gene 16S rRNA specifiche di generi OHRB.

OHRB	Coppia di primers	Prodotto (bp)	Presenza amplicone in <i>33lac- 2021</i>	Presenza amplicone in <i>33lac+ 2021</i>
<i>Dehalococcoides</i>	Dhc1f Dhc264r	264	+	+
<i>Dehalogenimonas</i>	BL-DC-142f BL-DC-1351r	1199	-	-
<i>Dehalobacter</i>	Dhb477f Dhb647r	170	-	-
<i>Desulfotobacterium</i>	Desulfo16sF3 Desulfo16sR5	500	+	-
<i>Desulfuromonas</i>	Dsm16Sf Dsm16Sr	835	+	+

La ricerca dei potenziali geni catabolici della dechlorurazione riduttiva nel metagenoma dei microcosmi *33lac+ 2021* e *33lac- 2021*, ha dato un riscontro positivo, per entrambi i microcosmi, solo per sequenze del gene *dcaA*, codificante per una dealogenasi riduttiva che agisce su 1,2-DCA come substrato specifico. Per il gene *rdhA* di *Sulfurospirillum* e *Shewanella*, invece, non è stato ottenuto alcun amplicone di peso molecolare atteso in nessuno dei campioni. In particolare, l'amplificazione con la coppia di primer DHL-F1/DHL-R1 ha reso un frammento di circa 300 bp, più piccolo dell'atteso (400 bp); mentre la coppia di primer DHL-F2/DHL-R2 ha amplificato un frammento di dimensioni attese (326 bp) solo nel metagenoma *33lac- 2021* (Fig. 2.19A). La coppia di primers Rdh522F/Rdh625R, utilizzata sugli ampliconi ottenuti da DHL-F1/DHL-R1 come DNA stampo, ha dato frammenti di peso molecolare atteso (95 bp) per entrambi i microcosmi (Fig. 2.19B).

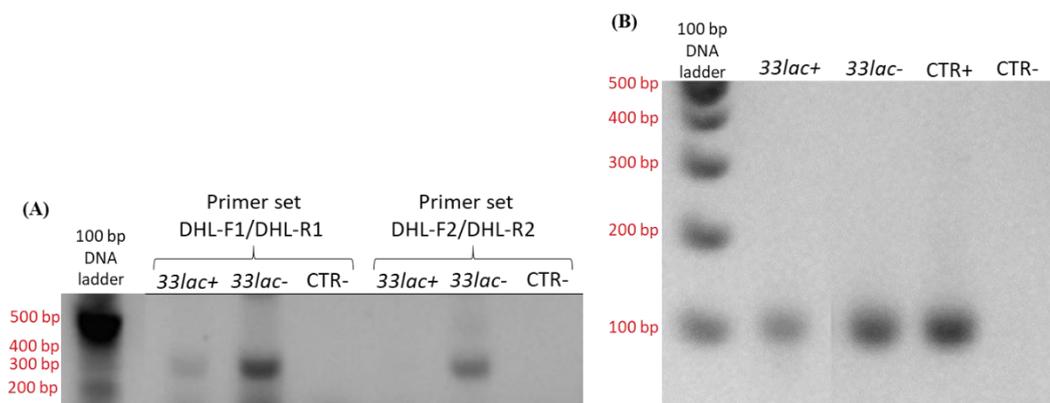


Fig. 2.19 Ampliconi ottenuti a seguito di amplificazione mediante PCR di frammenti del gene *dcaA*, utilizzando le coppie di primers (A) DHL-F1/DHLR1 (400 bp), DHL-F2/DHLR2 (326 bp) e (B) Rdh552F/Rdh625R (95 bp) sul DNA metagenomico dei microcosmi anaerobi *33lac+* 2021 e *33lac-* 2021, e visualizzati su gel d'agarosio. Per il controllo positivo (CTR+) è stato usato come DNA stampo un plasmide trasformato con la sequenza ricercata; per il controllo negativo (CTR-) non è stato aggiunto DNA stampo alla miscela di reazione.

Tali frammenti sono stati clonati nel vettore pCR 2.1-TOPO e, a seguito della trasformazione di cellule di *Escherichia coli* One Shot TOP10, sono stati selezionati sette cloni ricombinanti per ciascun microcosmo (7 cloni *33lac+* 2021 e 7 cloni *33lac-* 2021). A seguito del sequenziamento degli inserti e del confronto delle sequenze nucleotidiche risultanti con quelle presenti sul database GenBank dell'NCBI tramite il programma nucleotide-BLAST (BLASTn), per tutti i cloni selezionati è stata ottenuta un'identità di sequenza del 98-99% con sequenze del cluster genico RD-54 descritto da Marzorati et al. (2007) e codificante per una dealogenasi riduttiva specifica per 1,2-DCA, ed anche con sequenze di geni *pce* di *Desulfitobacterium hafniense* Y51 e *Dehalobacter restrictus* PER-K23, così come riportato in Tab. 2.8. Questo risultato suggerisce che nei microcosmi anaerobi *33lac+* 2021 e *33lac-* 2021 siano presenti sequenze geniche correlate ai pathways di dicloroeliminazione di 1,2-DCA, seppur non siano stati ancora ben chiariti i microrganismi di appartenenza.

Tab. 2.8 Analisi BLAST delle sequenze nucleotidiche ottenute per il frammento *dcaA* di 95 bp.

BLAST best match (nr/nt database)	Percentuale di identità	Accession number	Riferimento bibliografico
Uncultured bacterium dichloroethane reductive dehalogenase gene cluster	98-99%	AM183919.1	Marzorati et al., (2007)
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> Y51 orf0, orf1, pceA, pceB genes for transposase, hypothetical protein, PCE dehalogenase, PCE dehalogenase membrane-bound subunit, partial and complete cds	98-99%	AB070709.1	Suyama et al., (2002)
<i>Dehalobacter restrictus</i> pce operon (pceABCT genes), strain PER-K23	98-99%	AJ439607.2	Maillard et al., (2003)

L'insieme dei risultati ottenuti dal monitoraggio biologico dei microcosmi anaerobi costituiti dal campione di acqua contaminata MW33 del 2021, sia in presenza che in assenza di lattato,

suggerisce che la biodegradazione di 1,2-DCA osservata in entrambe le condizioni possa essere mediata da diversi metabolismi instauratisi e coesistenti nello stesso consorzio batterico:

- la dicloroeliminazione con conversione diretta di 1,2-DCA in etilene catalizzata dall'enzima DcaA, ovvero l'unica RDasi con specificità di substrato nei confronti di 1,2-DCA ad essere stata descritta;
- la dechlorurazione riduttiva diretta operata dagli OHRB facoltativi *Desulfuromonas*, *Sulfurospirillum* e *Shewanella* e da OHRB obbligati come *Dehalococcoides*;
- l'azione sintrofica alla dealoespirazione mediata da *Desulfovibrio*;
- la dechlorurazione riduttiva cometabolica mediata da *Acetobacterium*, arricchitosi soprattutto in presenza di lattato, verosimilmente supportata dalla presenza di cofattori corrinoidi nel terreno di coltura.

Non è comunque esclusa la presenza di ulteriori specie dechloruranti tra la grande percentuale di taxa non identificati.

Valutazione della biodegradazione di 1,2-DCA in aerobiosi

Monitoraggio chimico dei microcosmi aerobi

Il monitoraggio nel tempo della concentrazione di 1,2-DCA, eseguito mediante HS-GC/MS con prelievo automatizzato in spazio di testa, per i microcosmi aerobi costituiti dai campioni di acqua contaminata MW33 e MW34 raccolti nel 2020, ha mostrato preliminari evidenze di biodegradazione del contaminante nelle condizioni *33ox*, *33co* e *34co*. Tali evidenze sono state successivamente confermate dal monitoraggio della concentrazione di 1,2-DCA nelle relative colture di arricchimento. I grafici in Fig. 2.20A, in particolare, mostrano i risultati nelle colture di arricchimento aerobie ottenute dopo due trasferimenti. Per le colture derivate dal campione di acqua MW33, entrambe le condizioni imposte (*33ox* e *33co*) hanno mostrato un abbattimento completo del contaminante entro 15 giorni di incubazione. Da tale evidenza è possibile ipotizzare che la presenza di O₂ stimoli meccanismi di ossidazione diretta di 1,2-DCA; nella condizione *33co* è possibile che ad agire siano oltre che meccanismi ossidativi diretti, anche cometabolici. Per le colture derivate dal campione di acqua MW34, soltanto la condizione *34co* ha mostrato abbattimento totale di 1,2-DCA entro 15 giorni di incubazione; nella coltura *34ox*, invece, si osserva soltanto una iniziale diminuzione della concentrazione di 1,2-DCA, pari a circa il 50%, concentrazione che si mantiene tale fino i 30 giorni di incubazione. Ciò suggerisce che per tali colture non siano attivi processi di ossidazione diretta di 1,2-DCA e che nella coltura *34co* avvengano esclusivamente fenomeni di cometabolismo aerobio. Anche il controllo abiotico (*K-*), costituito dal solo terreno di coltura MSM con aggiunta di 1,2-DCA ma senza inoculo batterico, ha mostrato diminuzione della concentrazione di 1,2-DCA, seppur non un

abbattimento completo: probabilmente in aerobiosi intervengono reazioni chimiche non mediate da microrganismi che causano la trasformazione/degradazione di 1,2-DCA. Tali reazioni abiotiche, probabilmente avvengono in tutte le condizioni imposte in aerobiosi, ma laddove si evidenzia un abbattimento di entità e rapidità maggiori rispetto al controllo abiotico, è possibile ipotizzare l'instaurarsi anche di fenomeni di biodegradazione mediati da microrganismi.

Le evidenze di biodegradazione nelle colture *33ox*, *33co* e *34co* valutate misurando direttamente la diminuzione della concentrazione di 1,2-DCA, sono state anche confermate dall'aumento della concentrazione di ioni cloruro osservato nelle stesse colture, quali prodotti di dechlorurazione di 1,2-DCA (Fig. 2.20B).

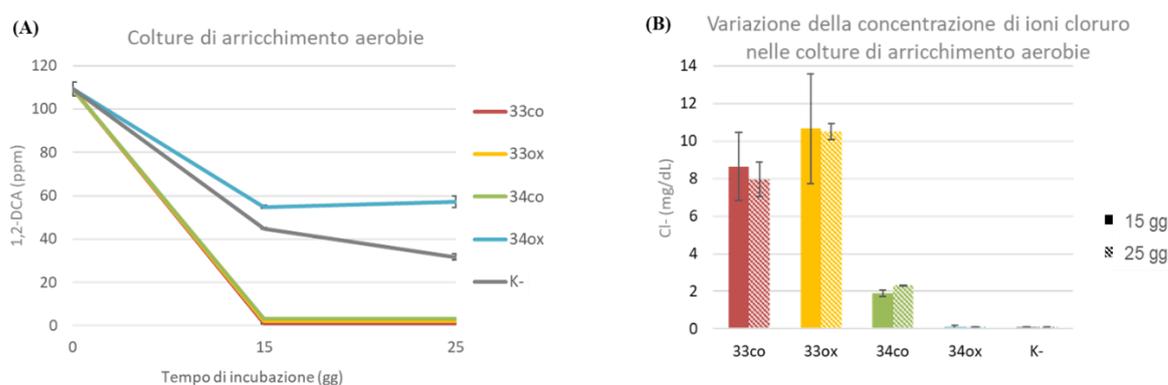


Fig. 2.20 (A) Monitoraggio nel tempo della concentrazione di 1,2-DCA nelle colture di arricchimento derivate dai relativi microcosmi aerobi. (B) Variazione della concentrazione di ioni cloruro nelle stesse colture; per ogni tempo di incubazione, la variazione di Cl⁻ è mostrata come differenza tra il dosaggio al termine dell'incubazione e quello al tempo zero.

Monitoraggio biologico dei microcosmi aerobi

La condizione *33ox*, che aveva dato chiare evidenze di biodegradazione di 1,2-DCA, è stata scelta per ulteriori indagini biologiche, allo scopo di chiarire se i meccanismi implicati nella dechlorurazione del contaminante fossero da implicare effettivamente a reazioni microbiche di ossidazione diretta. A tal fine, sono state caratterizzate le comunità microbiche presenti nel microcosmo iniziale e nella coltura di arricchimento ottenuta dopo due trasferimenti (per semplicità indicati da adesso in poi come “microcosmo” e “arricchimento” *33ox*) e sono stati ricercati i geni potenzialmente responsabili dell'ossidazione diretta di 1,2-DCA.

La quantità di DNA estratto dal microcosmo, dopo 45 giorni di incubazione, e dall'arricchimento, dopo 90 giorni di incubazione, successivamente a filtrazione, è indicata come quantità di dsDNA riferita al volume di coltura filtrata ed è risultata rispettivamente pari a 17,3 ng/mL e 22 ng/mL, in entrambi i casi aumentata rispetto all'acqua di partenza (campione di acqua MW33 del 2020: 1,8 ng/mL; Tab. 1.4).

La composizione delle comunità microbiche arricchitesi nel microcosmo *33ox* e successivamente nel relativo arricchimento è stata studiata mediante analisi 16S rRNA metabarcoding ed è stata confrontata con quella dell'acqua contaminata di partenza (campione MW33 del 2020). La ricchezza in OTUs diminuisce notevolmente passando da 401 OTUs rilevate nell'acqua iniziale (Tab. 1.6) a 89 OTUs nel microcosmo e 38 OTUs nell'arricchimento, a indicare una graduale riduzione della diversità microbica e un aumento della specializzazione in trasferimenti via via successivi (Tab. 2.6). In Fig. 2.21 è riportata la composizione delle comunità batteriche nel microcosmo e nell'arricchimento *33ox*, insieme a quella del campione di acqua MW33 prelevato nel 2020, a livello tassonomico di phylum (Fig. 2.21A), famiglia (Fig. 2.21B) e genere (Fig. 2.21C), indicando i taxa identificati con un'abbondanza relativa superiore all'1%.

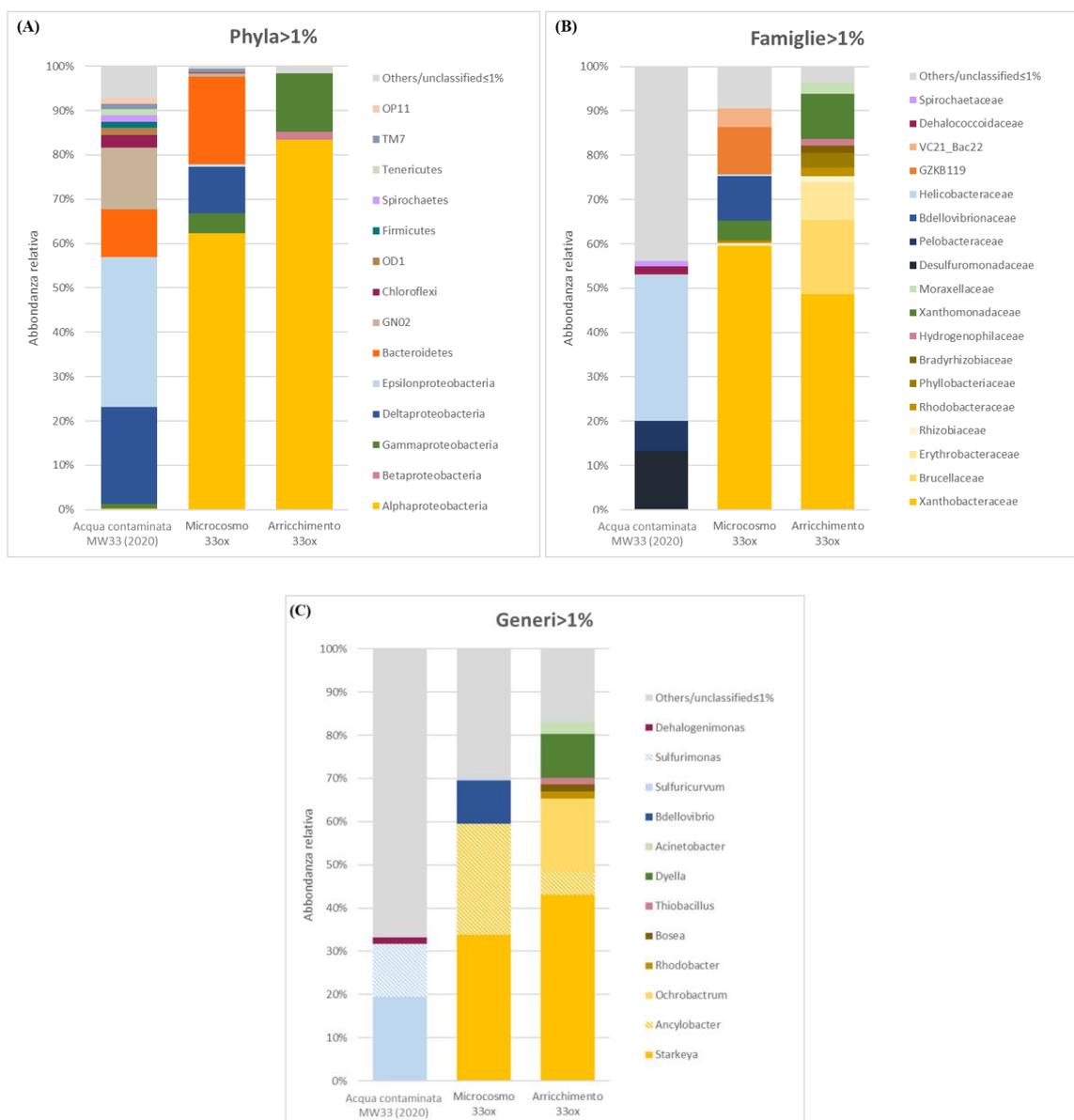


Fig. 2.21 Abbondanza relativa (%) dei phyla (A), delle famiglie (B) e dei generi (C) nelle comunità microbiche del microcosmo *33ox* e della relativa coltura di arricchimento. Sono indicati i taxa con abbondanza relativa >1% in almeno un campione; i rimanenti rientrano nella categoria “unclassified/others≤1%”.

A livello tassonomico di phylum, si assiste ad un progressivo arricchimento in Proteobacteria che rappresentano il 57% della comunità batterica nell'acqua di partenza, il 77,9% nel microcosmo e raggiungono la quasi totalità (98,4%) nell'arricchimento. In particolare, nell'acqua contaminata iniziale essi sono per lo più rappresentati da Deltaproteobacteria e Epsilonproteobacteria, mentre ad arricchirsi in microcosmo sono gli Alphaproteobacteria, che nell'arricchimento raggiungono un'abbondanza relativa dell'83,4%. Sia nel microcosmo che nell'arricchimento, la famiglia maggiormente rappresentata è quella delle Xanthobacteraceae (59,5% e 48,6%, rispettivamente), all'interno della quale sono stati identificati i generi *Starkeya* (33,8% e 43,1%) e *Ancylobacter* (25,7% e 5,4%). Entrambi i suddetti batteri sono noti e descritti degradatori aerobi di 1,2-DCA secondo il meccanismo di dealogenazione idrolitica avviato dall'enzima aloalcano dealogenasi (DhlA) [Munro et al., 2016; Kumar et al., 2020]. È quindi fortemente probabile che la biostimolazione in microcosmo con O₂ e con il terreno di coltura MSM abbia promosso la crescita di ceppi batterici appartenenti ai generi *Starkeya* e *Ancylobacter*, basata proprio sul consumo di 1,2-DCA fornito nelle colture come unica fonte di carbonio ed energia.

Dalla coltura di arricchimento *33ox* sono stati avviati gli isolamenti dei potenziali batteri degradatori di 1,2-DCA. Gli isolamenti sono stati condotti mediante semina per striscio su terreno di coltura MSM agarizzato all'interno di vials da 20 mL chiuse in presenza di 1,2-DCA come unica fonte di carbonio. È attualmente in itinere la purificazione di almeno sei isolati che mostrano liberazione di ioni cloruro (dati non mostrati).

In base all'evidenza che il metagenoma del microcosmo e dell'arricchimento *33ox* contiene generi di batteri per i quali è stato descritto il gene *dhlA*, codificante per l'enzima aloalcano dealogenasi, un frammento di 450 bp di tale gene è stato amplificato con una coppia di primers degenerati, usando come stampo il DNA metagenomico estratto dal microcosmo e dall'arricchimento *33ox*. Un amplicone di dimensioni attese è stato ottenuto per entrambe le colture (Fig. 2.22) dando una preliminare evidenza della presenza del gene catabolico e rafforzando l'ipotesi che la biodegradazione di 1,2-DCA osservata nell'assetto *33ox* sia mediata da un meccanismo di dealogenazione idrolitica.

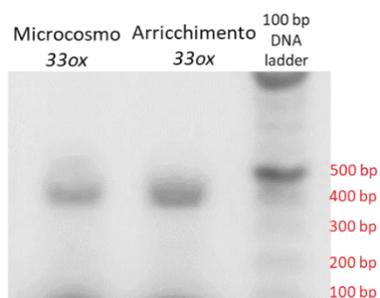


Fig. 2.22 Ampliconi ottenuti a seguito di amplificazione mediante PCR di un frammento del gene *dhlA* (450 bp), utilizzando la coppia di primers DHMf/DHMr sul DNA metagenomico del microcosmo e dell'arricchimento *33ox*, e visualizzati su gel d'agarosio.

CONCLUSIONI

Gli studi in microcosmo descritti nel presente capitolo sono stati importanti per comprendere il potenziale biodegradativo delle comunità microbiche autoctone all'acqua contaminata oggetto di studio e come questo potenziale possa essere stimolato. Evidenze di biodegradazione di 1,2-dicloroetano in microcosmo sono state ottenute sia in aerobiosi che in anaerobiosi e i microcosmi più performanti sono risultati quelli preparati a partire dal campione di acqua caratterizzato dai maggiori livelli di contaminazione da 1,2-DCA (MW33). La contemporanea presenza di batteri aerobi e anaerobi biodegradatori di solventi clorurati è stata già dimostrata in altri siti contaminati [Munro et al., 2017, Temme et al., 2019, Chen et al., 2020]. In anaerobiosi, nonostante i batteri dealoespiranti più noti non appaiano arricchiti in microcosmo, il metabolismo principale che ha condotto alla biodegradazione del contaminante parrebbe essere la dechlorurazione riduttiva, sia diretta che cometabolica, biostimolata sia in presenza che in assenza del donatore di elettroni fornito in microcosmo (lattato). In aerobiosi, invece, la biostimolazione realizzata in presenza di ossigeno ha promosso la crescita in microcosmo di batteri aerobi già descritti come biodegradatori di 1,2-DCA, suggerendo che la biodegradazione del contaminante avvenga grazie a meccanismi di ossidazione diretta avviati da reazioni di dealogenazione idrolitica.

Nonostante lo scarso potenziale dechlorurante evidenziato nell'acqua contaminata, si è riusciti a trovare le condizioni opportune per biostimolare in microcosmo tale potenziale, con la prospettiva di potere applicare tali condizioni, oltre che a scala di laboratorio, anche in campo in interventi di biorisanamento *in situ*. Mantenendo le condizioni di anaerobiosi tipiche dell'area contaminata, parrebbe che per biostimolare i meccanismi di dechlorurazione riduttiva nei confronti di 1,2-DCA non sia indispensabile l'aggiunta di molecole che fungano da donatori di elettroni, ma sia sufficiente la presenza di vitamine (in particolare vitamina B₁₂) e sali minerali, come tra l'altro già dimostrato per altri siti contaminati [Druschel e Kinner, 2013; Al-Mailem et al., 2017]. In alternativa, un intervento di biorisanamento da applicare in campo

potrebbe essere basato sulla fornitura di ossigeno, sotto forma di perossido di idrogeno [Pardieck et al., 1992], allo scopo di biostimolare i meccanismi ossidativi di dealogenazione idrolitica che avvengono in aerobiosi.

CAPITOLO 3

VALUTAZIONE DELLA BIODEGRADAZIONE DI 1,2-DICLOROETANO IN UNA SIMULAZIONE DI BARRIERA REATTIVA PERMEABILE

Le Barriere Reattive Permeabili (PRB) sono un'innovativa tecnologia di trattamento *in situ* delle acque sotterranee contaminate a scopo di bonifica [Di Molfetta e Sethi, 2012]. Il principio di funzionamento di una PRB si basa sull'installazione di materiale reattivo nel sottosuolo, all'interno del sistema acquifero, realizzando una struttura fissa (barriera) che possa intercettare un pennacchio contaminato ed essere attraversata dall'acqua contaminata che si muove per effetto del gradiente idraulico naturale; lo scopo è trasformare i contaminanti in sostanze meno tossiche o innocue raggiungendo i valori di concentrazione adeguati alla bonifica a valle della barriera (Fig. 3.1). Tale tecnologia si configura, pertanto, come un trattamento di bonifica di tipo passivo, realizzato *in situ*, di una contaminazione a carico del sistema acquifero. In base alla tipologia del materiale reattivo, le sostanze contaminanti possono essere degradate per via chimica o microbiologica. La degradazione, inoltre, può essere completa o dare origine a prodotti intermedi a tossicità diversa di quella dei composti iniziali. Pertanto, le installazioni di barriere reattive permeabili richiedono un monitoraggio post-operam costante per valutare la variazione delle concentrazioni dei contaminanti e l'attività del materiale reattivo impiegato.

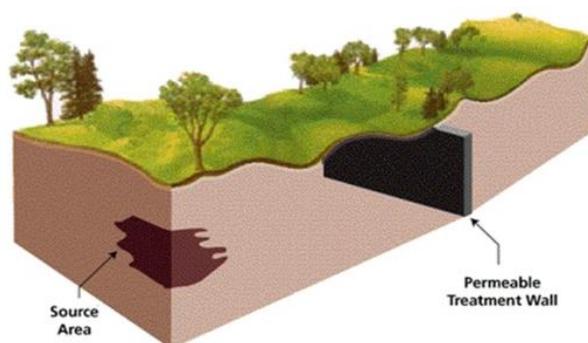


Fig. 3.1 Schema di funzionamento di una barriera reattiva permeabile.

Uno dei mezzi reattivi più comunemente utilizzati nelle PRB per la rimozione di solventi clorurati da acquiferi contaminati è il ferro zero valente (ZVI). Esso è caratterizzato da un elevato potenziale redox (-440 mV) e agisce come agente riducente in una reazione di riduzione diretta o indiretta sulla superficie del metallo, portando alla dechlorurazione dell'alifatico clorurato. Tuttavia, non tutti i solventi clorurati, compreso 1,2-DCA, possono essere trattabili mediante barriere reattive permeabili a ZVI [Di Molfetta e Sethi, 2012]. Di conseguenza, l'interesse è sempre più rivolto verso mezzi reattivi che possano stimolare la dechlorurazione riduttiva di solventi clorurati basata su processi microbiologici.

Il poli- β -idrossibutirrato (PHB) è un biopolimero biodegradabile appartenente alla famiglia dei poliidrossialcanoati. Oltre ad essere prodotto a partire da colture batteriche pure e substrati selezionati, processi di produzione più sostenibili si sono basati negli ultimi anni sull'uso di colture microbiche miste [Valentino et al., 2019; Amanat et al., 2021] e materie prime a basso

costo, come le acque reflue da produzioni industriali [Morgan-Sagastume, 2016; Kourmentza et al., 2017]. In uno studio a cui ho collaborato durante il mio corso di dottorato di ricerca, è stata dimostrata la produzione di PHB da una coltura microbica mista ottenuta dal trattamento delle acque reflue di un'industria di trasformazione degli agrumi [Corsino et al., 2022]. Il PHB si è dimostrato efficace come donatore di elettroni a lento rilascio per il processo di dechlorurazione riduttiva di solventi clorurati [Aulenta et al., 2008; Pierro et al., 2017; Amanat et al., 2021]: la sua fermentazione, rilasciando contemporaneamente donatori di elettroni (idrogeno e acetato) e substrato carbonioso (acidi grassi volatili), è in grado di sostenere la crescita a lungo termine di microrganismi, compresi batteri dealoespiranti.

In virtù delle precedenti considerazioni, allo scopo di verificare se la biodegradazione di 1,2-DCA osservata in microcosmo, sia in condizioni di anaerobiosi che di aerobiosi, così come descritto nel capitolo 2 della presente tesi, potesse essere ottenuta anche in una simulazione di barriera reattiva permeabile, un test pilota in colonna è stato condotto in collaborazione con il gruppo di ricerca del dott. Daniele Di Trapani del dipartimento di Ingegneria (DI) dell'Università degli Studi di Palermo. I metabolismi biodegradativi a carico di solventi clorurati che sono stati indagati nel sistema di PRB in colonna sono la dechlorurazione riduttiva biostimolata da PHB e l'ossidazione, diretta o cometabolica. Presso il Laboratorio di Ingegneria Sanitaria "Prof. Luigi Gagliardi" del DI sono stati realizzati due sistemi in colonna (colonna A e colonna B), entrambi riempiti con sabbia e alimentati con il campione di acqua contaminata MW34 prelevato durante il campionamento del 2020. Ognuna delle due colonne era suddivisa in due sezioni: la prima sezione simulava una PRB e la seconda sezione simulava la porzione dell'acquifero a valle della PRB. Nella colonna A, in cui la sperimentazione è stata condotta mantenendo condizioni di anaerobiosi, la PRB conteneva, misto alla sabbia, il biopolimero PHB. La colonna B è stata soggetta ad una portata d'aria in ingresso, allo scopo di fornire O₂ al sistema e mantenere le condizioni di aerobiosi utili a processi biodegradativi basati sull'ossidazione di 1,2-DCA. L'acqua contaminata utilizzata per alimentare i due sistemi è stata inizialmente inoculata con consorzi batterici dechloruranti precedentemente arricchiti in microcosmo a partire dalla stessa acqua. In particolare, in occasione dell'allestimento della prima serie di microcosmi anaerobi del 2020, oltre alle condizioni già descritte, sono stati allestiti anche microcosmi biostimolati con PHB in polvere alla concentrazione di 3,4 mM. Tali microcosmi sono stati preparati in anaerobiosi e monitorati per la biodegradazione di 1,2-DCA con le stesse modalità già descritte nel capitolo 2 e hanno mostrato abbattimento del contaminante rispetto al controllo abiotico K-, ad indicare l'arricchimento in batteri dechloruranti. Il consorzio batterico instauratosi nei microcosmi biostimolati con PHB è stato

ulteriormente arricchito tramite diversi passaggi in colture in batch ed utilizzato come inoculo nella colonna A. La colonna B, invece, è stata inoculata con un consorzio batterico ottenuto, in seguito a diversi passaggi in coltura, dai microcosmi aerobi in cui venivano valutati processi di cometabolismo aerobio realizzati a partire dal campione di acqua contaminata MW34 del 2020 (microcosmi 34co).

La sperimentazione nelle due colonne ha avuto lo scopo di verificare processi di biodegradazione di 1,2-DCA in una situazione dinamica più simile a quella reale, biostimolando opportuni metabolismi. In particolare, nella colonna A l'obiettivo è stato quello di creare una zona reattiva biologica in cui i microrganismi inoculati potessero usare i prodotti di fermentazione del PHB come donatori di elettroni per il mantenimento dei processi di dechlorurazione riduttiva di 1,2-DCA; mentre nella colonna B l'obiettivo è stato quello di promuovere la biodegradazione di 1,2-DCA in presenza di ossigeno, tramite meccanismi di cometabolismo aerobio, senza escludere eventuali reazioni di ossidazione diretta.

Di seguito si riporta il manoscritto sottomesso alla rivista *International Biodeterioration & Biodegradation*, in cui sono descritti i risultati della sperimentazione qui introdotta.

BIOLOGICAL REMOVAL OF 1,2-DICHLOROETHANE FROM A REAL POLLUTED GROUNDWATER BY USING ENRICHED BACTERIAL CONSORTIA UNDER AEROBIC AND ANAEROBIC CONDITIONS

Federica De Marines ^a, Ilenia Cruciata ^{b,*}, Gaetano Di Bella ^c, Daniele Di Trapani ^a, Maria Gabriella Giustra ^c, Laura Scirè Calabrisotto ^b, Pietro Greco Lucchina ^a, Paola Quatrini ^b, Gaspare Viviani ^a

^aDepartment of Engineering (DI), University of Palermo, Viale delle Scienze, bldg. 8, 90128, Palermo, Italy

^bDepartment of Biological, Chemical and Pharmaceutical Sciences and Technologies (STEBICEF), University of Palermo, Viale delle Scienze, bldg. 16, 90128, Palermo, Italy

^cFaculty of Engineering and Architecture, University of Enna “Kore”, Cittadella Universitaria, 94100, Enna, Italy

* Corresponding author.

E-mail address: ilenia.cruciata@unipa.it

Abstract

Permeable reactive barriers (PRBs) based on biological reductive dechlorination processes represent a promising technology for the remediation of groundwater contaminated by chlorinated solvents. The aim of this work was to gain insights about the feasibility of chlorinated solvents removal through an anaerobic biological process in a laboratory-scale PRB, based on the use of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) as electron donor, and comparing the results with those achieved under aerobic conditions. The experimental plant consisted of two Plexiglas cylindrical columns filled with silica sand and fed with 1,2-dichloroethane (1,2-DCA) contaminated groundwater: in column A the simulated PRB contained powder PHB under anaerobic conditions, in column B an inlet air flow rate ensured aerobic conditions. Both columns were inoculated with dechlorinating bacterial consortia obtained from the contaminated groundwater. Results from column A proved that PHB can be fermented and used as a slow-releasing carbon source for sustaining reductive dechlorination, as revealed by acetate production and complete 1,2-DCA removal. The microbial community detected in column A at the end of the experimental period was mainly enriched in sulfate reducing bacteria that could act as both dechlorinating and fermenting agents. Column B showed a slight lower 1,2-DCA removal efficiency likely related to the establishment of aerobic (co)-metabolic processes, probably carried out by *Pseudomonas* spp.

Keywords: Biological reductive dechlorination; Aerobic (co)-metabolic process; Chlorinated solvents; Poly- β -hydroxybutyrate; Permeable reactive barriers.

1. Introduction

Chlorinated solvents are organic compounds belonging to the class of chlorinated aliphatic hydrocarbons and they are a subgroup of organ-halogen compounds. These compounds have been widely used in various industrial sectors, as degreasers of mechanical and electronic parts, dry cleaning of metals and clothes, as solvents and raw materials in the chemical-pharmaceutical industry. The major issues related to these compounds are represented by high toxicity and carcinogenicity; furthermore, they are poorly soluble and degradable, and very often, because of improper handling and disposal methods, they can be released into the environment. For this reason they can be found in the environmental matrices, promoting in particular aquifer contamination (APAT IRSA-CNR, 2003; Bradley, 2003; Anam et al., 2019; Aulenta et al., 2019). To date, in fact, several cases of soils and groundwater contamination by chlorinated solvents have been reported in technical literature (Majone et al., 2015; Pierro et al., 2016, 2017; Aulenta et al., 2019).

Generally, chlorinated solvents discovered in the environment belong to the class of chlorinated methanes, ethanes and ethenes, such as 1,2-dichloroethane (1,2-DCA), 1,1,1-trichloroethane (1,1,1-TCA), carbon tetrachloride, methylene chloride, chloroform, tetrachloroethylene (PCE) and trichloroethylene (TCE). Most of them have some peculiar chemical-physical characteristics that describe their behavior in soils and groundwater, including a high vapor pressure, a greater density than water and a very limited water solubility (Ajo-Franklin et al., 2006). Consequently, most of the chlorinated compounds, if released in high quantities, are prone to form a dense non-aqueous phase liquids (DNAPLs). Moreover, the high density favors their rapid percolation through the unsaturated soil, reaching the aquifer, where these compounds settle down to the impermeable bottom and are then dispersed along the water flow direction (Sleep and Sykes, 1989; Cohen and Mercer, 1993; Pierro et al., 2016).

Conventionally applied remediation processes, such as Pump & Treat (P&T), are ineffective to solve DNAPLs contamination; these treatments, in fact, rarely allow reaching the low standard limits imposed by Regulations for water reinjection into groundwater; therefore, the final destiny is often the discharge into surface water bodies. Moreover, this treatment is based on contaminant phase transfer, regardless its effective degradation (Starr and Cherry, 1994; Beretta, 2000; Majone et al., 2009).

This led to the interest in the development of new in situ remediation technologies, including permeable reactive barriers (PRBs), based on physical-chemical and biological processes (Majone et al., 2015; Fan et al., 2017; Cameselle and Gouveia, 2018; Li et al., 2019). This technology presents potential advantages over the P&T in terms of lower management costs, related to lower energy demand, absence of external discharges to be treated and disposed as well as less site disturbance issues. Furthermore, this technology promotes the contaminant degradation, rather than its phase transfer.

Concerning PRB based on physical-chemical processes, zero-valent iron (ZVI), activated carbon and natural and synthetic zeolites, have been widely applied (Accardi et al., 2012; Baric et al., 2012; Piscitello et al., 2020; Rossi et al., 2021). ZVI is the most frequently employed reactive media, especially for the treatment of chlorinated hydrocarbon plumes, referring in particular to chlorinated ethenes and ethanes (Odziemkowski et al., 1998; Furukawa et al., 2002). It has been demonstrated that ZVI can effectively degrade these pollutants to nontoxic compounds, such as ethene and ethane, through a series of dechlorination reactions (Baric et al., 2012). However, PRB-ZVI technology is affected by some operational issues, the main one likely being the long-term performance decrease due to loss of ZVI reactivity and/or porosity reduction (Song and Carraway, 2005; Henderson and Demond, 2007). Indeed, the alkaline pH (8–9) and the presence of ferrous and ferric ions within the barrier, due to ZVI corrosion, can lead to the precipitation of minerals, which depends on groundwater chemical composition, which can form a passive layer over the iron surface. This aspect might hamper the electron transfer process, thus reducing the iron reactivity (Odziemkowski et al., 1998; Furukawa et al., 2002). Additionally, iron precipitation could cause pore occlusion, resulting in a greater flow velocity, thus reducing the treatment effectiveness due to the decrease of the residence time within the PRB (Morrison and Bartlett, 2009;

Baric et al., 2012). Moreover, some compounds, e.g., chloromethane, dichloromethane and 1,2-dichloroethane, do not undergo chemical reduction in the presence of ZVI (Song and Carraway, 2005; Baric et al., 2012). Among them, 1,2-DCA, a carcinogenic compound, is of particular concern because it is one of the most widespread groundwater contaminants (De Wildeman et al., 2003).

It has been demonstrated that most of chlorinated solvents can be effectively degraded by biological processes carried out by bacteria. The biodegradation of chlorinated compounds can occur through an oxidation (aerobic) or reductive (anaerobic) reaction and it can follow a direct or cometabolic pathway (Frasconi et al., 2015). In the oxidative direct pathway, the microorganism consumes the chlorinated compound, which acts as an electron donor and growth substrate; conversely, in cometabolism, an oxygenase enzyme, synthesized by the microorganism for the uptake of a growth substrate, fortuitously catalyzes the oxidation of the chlorinated compound. Generally, low-chlorinated compounds are degraded through a oxidative direct pathway; in contrast, polychlorinated compounds can be effectively degraded via biological reductive dechlorination (Furukawa et al., 2002), provided that specific microorganisms and available electron donors are present (which is usually the limiting factor in natural reductive biodegradation processes) (Baric et al., 2012, 2014).

The biological reductive dechlorination (BRD) is a natural process where indigenous microorganisms present in the groundwater ecosystem through an anaerobic multi-step reaction convert highly chlorinated parent compounds to less chlorinated daughter products and finally to non-toxic end products, like as ethene and ethane (Xiao et al., 2020; Lin et al., 2021; Amanat et al., 2022). In this anaerobic respiratory process, called dehalorespiration, organohalide respiring bacteria (OHRB) utilize the chlorinated compounds as terminal electron acceptors (Hug et al., 2013). BRD is an electron consuming process and it is often limited by the lack of suitable electron donors that results in an incomplete process and leads to the accumulation of undesired by-products (Li et al., 2021; Yan et al., 2021; Amanat et al., 2022). Therefore, it is possible to enhance and sustain BRD through the addition of fermentable substrates by supplying the microorganisms with sources of electron donors (e.g., hydrogen, butyrate, lactate).

To date, poly- β -hydroxybutyrate (PHB) derived both from pure and mixed microbial culture has proven to be effective as a slow-release electron donor for the reductive dechlorination process (Aulenta et al., 2008; Pierro et al., 2017; Amanat et al., 2020, 2021, 2022) and various studies (Baric et al., 2012, 2014; Matturro et al., 2018; Amanat et al., 2021, 2022) confirmed the feasibility to use it as a reactive medium in a PRB. Heretofore, the most common way to produce PHB is to use pure bacterial cultures and selected substrates; however, this involves high costs and makes the production process economically unsustainable (Ivanov et al., 2014; Villano et al., 2014). For these reasons, in recent years, more sustainable processes based on the use of mixed microbial cultures (MMC) (Valentino et al., 2019; Amanat et al., 2021) and low-cost feedstocks (such as wastewaters) (Morgan-Sagastume, 2016; Kourmentza et al., 2017; Corsino et al., 2022) have been extensively studied. This represents an economically and environmentally sustainable solution, according to the principles of circular bio-economy. To date, there are few experimental studies in which PHB has been used as a fermentable substrate to support reductive dechlorination (Aulenta et al., 2005a, 2005b; Baric et al., 2012, 2014; Amanat et al., 2020, 2022). Moreover, these studies have been conducted on a microcosm or laboratory-scale and using synthetic waters contaminated with chlorinated compounds (PCE, TCE, 1,2-DCA). This aspect, if on one hand simplified the understanding of the mechanisms occurring within the studied system, on the other hand, did not allow to appreciate the possible issues related to the treatment of a real contaminated water in which there are many other compounds that can cause interferences.

In general, the chlorinated compounds investigated in the aforementioned studies are prone to be refractory to aerobic biodegradation, excepting the lower chlorinated compounds; for this reason, the experiments have been carried out ensuring anaerobic conditions within the system.

In this context, the aim of the present study was to evaluate the feasibility of bioremediation of a real groundwater contaminated by chlorinated solvents through a biological process in a permeable reactive

barrier, filled with PHB to be used as slow-release electron donors to sustain the BRD process. PHB fermentation, in fact, is able to support the long-term growth of microbial consortia including dechlorinating bacteria. In order to fulfil the aim of the study, an experimental bench-scale apparatus was realized, consisting in two parallel Plexiglas cylindrical columns (column A and column B) filled with silica sand. Column A was added with powder PHB and run under anaerobic conditions, while column B was filled only with silica sand and operated under aerobic conditions. Both columns were fed with a real contaminated groundwater for the entire experimental duration. At the beginning of the experiment the columns were inoculated with two different enrichment cultures obtained from the same contaminated groundwater under anaerobic PHB conditions and under aerobic conditions. The novelty of this study relies in the use of a real groundwater contaminated by chlorinated solvents, mainly 1,2-DCA; the results from this study can provide useful preliminary indications towards the evaluation of 1,2-DCA biodegradation pathways, both anaerobic and aerobic, when treating real contaminated groundwater.

2. Materials and Methods

The experimental campaign had an overall duration of 180 days. In particular, during the first 90 days, enrichment cultures were set up from the real chlorinated solvents contaminated groundwater in order to favor the autochthonous dechlorinating bacterial population. A dechlorinating bacterial consortium was enriched in presence of PHB powder, as electron donor for the reductive dechlorination process, under anaerobic conditions. In parallel, an enrichment culture on 1,2-DCA was carried out from the same groundwater under aerobic conditions, in order to biostimulate oxidative processes. During the subsequent 90 days, a pilot study was carried out on a laboratory-scale plant fed with the real contaminated groundwater inoculated with the dechlorinating bacterial consortia mentioned above.

2.1. Contaminated groundwater characterization

Before being used for experimentation, the real groundwater sample was stored at 4 °C in a container with no headspace and hermetically sealed, in order to limit, as much as possible, the exposure to atmospheric oxygen, maintaining anaerobic conditions and limiting the contaminants volatilization. The groundwater was mainly contaminated by 1,2-DCA and was characterized by high values of electrical conductivity as well as chlorides and total dissolved solids. Among the pollutant compounds found in the real groundwater, 1,2-DCA, a carcinogenic compound, is of high concern since it is one of the most widespread groundwater contaminants (Marzorati et al., 2006). In Table 1, the main characteristics of the real groundwater used in this study and the analytical methods adopted in their determination are shown.

Table 1. Chemical-physical characteristics of groundwater and analytical methods for their determination.

PARAMETER	ANALYTICAL METHOD	UNIT OF MEASURE	CSC D.LGS. 152/06	MEASURED CONCENTRATION
REDOX POTENTIAL	ASTM D1498-14 (III)	mV	-	-450,00
ELECTRIC CONDUCTIBILITY	APAT CNR IRSA 2030 Man 29 2003	$\mu\text{S cm}^{-1}$	-	9.400,00
pH	APAT CNR IRSA 2060 Man 29 2003	pH	-	7,30
TOTAL DISSOLVED SOLIDS	SM 2540 C 2017	mg l^{-1}	-	7.000,00

CHLORIDE	EPA 9056A 2007	mg l ⁻¹ (as Cl ⁻)	-	1.800,00
NITRATES	EPA 9056A 2007 (PRI)	mg l ⁻¹ (as NO ₃)	-	< 0,88
SULPHATES	EPA 9056A 2007	mg l ⁻¹ (as SO ₄)	250	1.900,00
TOTAL CYANIDE	EPA 9014A 2014 T	µg l ⁻¹ (as CN)	-	< 5
METHYL-ter-BUTYLETHER	EPA 8260D 2018	µg l ⁻¹	-	< 7,6
AMMONIUM	APAT CNR IRSA 4030 A2 Man 29 2003	mg l ⁻¹ (as NH ₄)	-	2,00
HEXAVALENT CHROMIUM	APAT CNR IRSA 3150 C Man 29 2003	µg l ⁻¹ (as Cr)	5,00	< 0,84
TOTAL CHROMIUM	EPA 6020B 2014	µg l ⁻¹ (as Cr)	50,00	< 0,92
IRON	EPA 6020B 2014	µg l ⁻¹ (as Fe)	200,00	25.000,00
MANGANESE	EPA 6020B 2014	µg l ⁻¹ (as Mn)	50,00	1.700,00
CHLOROMETHANE	EPA 8260D 2018	µg l ⁻¹	1,50	< 7,5
CHLOROFORM	EPA 8260D 2018	µg l ⁻¹	0,15	< 1,3
VINYL CHLORIDE	EPA 8260D 2018	µg l ⁻¹	0,50	520,00
1,2-DCA	EPA 8260D 2019	µg l ⁻¹	3,00	20.000,00
1,1-DCE	EPA 8260D 2020	µg l ⁻¹	0,05	18,00
TCE	EPA 8260D 2021	µg l ⁻¹	1,50	< 7
PCE	EPA 8260D 2022	µg l ⁻¹	1,10	< 6,9

2.2. Set up of enrichment cultures in microcosm

Enrichment cultures in microcosm were set up using the real groundwater sample from the contaminated site in order to enrich the autochthonous 1,2-DCA dechlorinating bacterial community. Anaerobic enrichment cultures were set up with groundwater and culture medium (Marzorati et al., 2006) (50% vol/vol) and biostimulated with poly-3-hydroxybutyrate (PHB) powder 3.4 mM to a final volume of 12 ml into 20 ml screw cap vials in an anaerobic box under an atmosphere of filter-sterilized N₂. The anaerobic cultures were incubated statically in the dark at room temperature. In parallel, aerobic enrichment cultures were set up with groundwater and culture medium (Coleman et al., 2002) and were amended with 1,2-DCA to a final concentration of 100 ppm and a mixture of volatile hydrocarbons (1% methane, 1% ethane, 0.01% C₄-C₆) in a final volume of 12 ml into 20 ml screw cap vials. The aerobic cultures were incubated in the dark at room temperature on a rotary shaker. In both anaerobic and aerobic conditions, abiotic controls were set up using filter-sterilized groundwater. All microcosms were

prepared in triplicate. At the end of four established incubation times (0, 15, 30 and 45 days), a set of microcosms of each condition was analyzed by gas-chromatography as described in 2.4. section. After 45 days of incubation, the obtained anaerobic and aerobic dechlorinating cultures were further enriched by transferring an inoculum (10% vol/vol) into fresh culture medium for 45 more days. These consortia were used to inoculate the columns as described below.

2.3. Continuous-flow experimental apparatus

Two parallel Plexiglas columns (length: 44 cm, inner diameter: 2.8 cm), namely column A and column B, were realized and continuously fed throughout the entire experimental laboratory-scale study (90 days). In particular, column A was conceived to simulate a first PRB portion (from 0 to 22 cm) and a down-gradient aquifer (from 22 to 44 cm); the PRB portion was filled with a mixture of silica sand and PHB at 5% on a weight basis; in contrast, the aquifer portion was filled with silica sand only. Column B was filled with silica sand only and at the flow inlet it was equipped with an aeration system in order to promote the aerobic metabolism.

Powder PHB was obtained from Sigma-Aldrich (CAS 29435-48-1, purity 99.9%). A 2 cm sand and coarse gravel layer was placed at the bottom of each column to homogenize the distribution of the water flow. Each column was equipped with a sampling port placed at the middle of the column; in addition, another sampling point has been realized at the outlet of the columns.

Before running the experiments, both columns were inoculated with the two enriched microbial communities previously obtained from the chlorinated solvents contaminated groundwater. In column A the dechlorinating consortium enriched on PHB under anoxic conditions was added with the specific aim of creating a biological reactive zone, where inoculated microorganisms could use the PHB fermentation products as electron donors. In column B, the dechlorinating consortium enriched on 1,2-DCA in presence of O₂ was inoculated with the aim of promoting an aerobic (co)-metabolism. In each column, 70 ml of groundwater were inoculated with 10% (vol/vol) bacterial culture at OD₆₀₀ = 0.1 and left in batch conditions for one week, before starting the continuous groundwater feeding.

Finally, columns were covered and kept in the dark in order to simulate the same condition of a real aquifer, and also avoiding algae formation. Before the start-up of the experimental activity, column A was flushed with nitrogen gas to eliminate oxygen. Both columns were fed upward with the same real groundwater contaminated by 1,2-DCA at a concentration close to 20 mg l⁻¹. While running experiments, groundwater was continuously pumped into the columns by two peristaltic pumps at a flow rate of 0.1 ml min⁻¹, which corresponded to 30 hours of residence time or 1.3 cm h⁻¹ of pore water velocity. The feed water was stored in sealed bags with a capacity of about 2 l, which were periodically refilled (autonomy of about 14 days). For column A, the bags were previously flushed with nitrogen gas to eliminate oxygen ensuring anaerobic conditions. Furthermore, before each bags refill, groundwater was enriched in nutrients (urea - CH₄N₂O: 7.5 ml in 1 liter of water and potassium dihydrogen phosphate - K₂HPO₄: 8.6 ml in 1 liter of water) in order to avoid limitations for microbial growth. Nutrients were dosed according to Baric et al. (2014); in order to remove any residual dissolved oxygen in the feeding water of column A, a deoxygenation procedure, with sodium sulphite and cobalt chloride, was performed in accordance with Capodici et al. (2019).

Figure 1 shows a schematic layout (a) and a panoramic view (b) of the laboratory-scale columns.

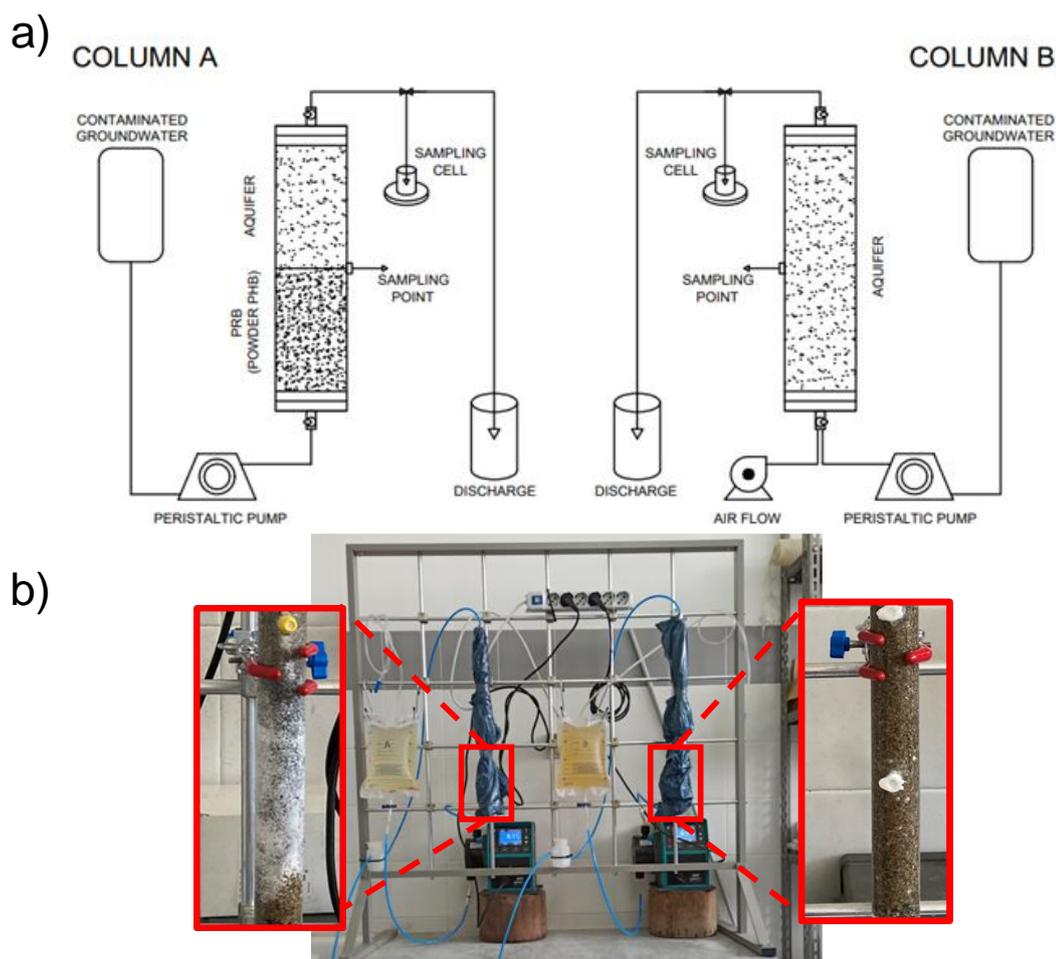


Figure 1. Schematic (a) and panoramic overview (b) of the laboratory-scale columns.

2.4. Analytical methods

During the experimental activity, the main operational parameters as dissolved oxygen (DO), redox potential (ORP), electric conductivity (EC) and pH have been regularly measured in a sampling cell, located at the outlet of both systems, by means of dedicated probes connected to a multimeter (WTW 3340) to monitor plant behavior.

Liquid samples were periodically collected (every 14 days) at the inlet, at the middle (corresponding to a retention time of 900 min) and at the outlet of each column (corresponding to a retention time of 1800 min). In column A, where the middle point of sampling corresponded with the outlet of PRB, the aim was to monitor respectively the features of the influent water, the PHB fermentation in terms of acetate production, and the BRD progress in terms of 1,2-DCA biodegradation. In column B, the aim was to monitor the performance of the aerobic PRB in terms of 1,2-DCA oxidative biodegradation.

In detail, 1,2-DCA concentration in enrichment cultures and in columns was determined by headspace-gas chromatography/mass spectrometry using the *7000C GC/MS Triple Quad GC/MS System*, equipped with the column *Agilent 19091S-433UI*; helium was used as carrier gas, oven temperature was set at 240 °C and injection temperature was 270 °C. In column A, Volatile Fatty Acids (VFAs) were analyzed by ion chromatography (*DIONEX ICS-1100*) according to *APAT IRSA CNR 4020*.

2.5. Characterization of microbial communities by *Illumina Miseq16S rRNA gene sequencing*

The microbial community of the two portions (section 1 and 2 respectively, in column A corresponding to PRB and aquifer) of both columns was characterized using high throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing. At the end of the experimental period, samples of sand were recovered from both sections

of columns A and B. Metagenomic DNA was extracted from 0.5 g of each sample using the Fast DNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) following manufacturer's instructions. Purity and concentration of extracted DNA were assessed using a Nano DROP ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). As reported in Corsino et al. (2022), genomic DNA obtained from each sample was used as template to amplify bacterial and archaeal V3-V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene; the amplicons sequencing was carried out using the Illumina-MiSeq® platform; reads filtering and denoising were performed using Qiime2 tools version 2019.4 and taxonomy was assigned using trained Operational Taxonomic Units (OTUs) at 99% from Green Genes database version 13–8.

3. Results and discussion

3.1. Enrichment cultures in microcosm

Gas-chromatographic analysis conducted on anaerobic and aerobic enrichment cultures after 45 days incubation during the preliminary experimental study revealed a removal of 1,2-DCA of 90% in the PHB biostimulated anaerobic microcosms, and of 100% in the aerobic microcosms; a decrease of 1,2-DCA concentration was also observed in anaerobic/aerobic abiotic control microcosms, but to a lesser extent (30% and 70%, respectively) (Figure 2), thus confirming that a dechlorinating community was enriched in both conditions in microcosm. The obtained dechlorinating consortia were further enriched and used to inoculate the two columns of the continuous-flow experimental apparatus.

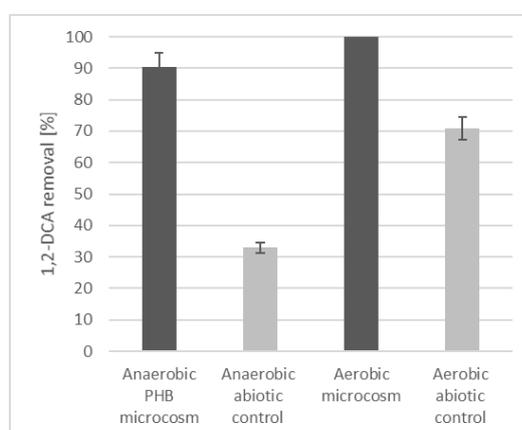


Figure 2. 1,2-DCA removal in PHB anaerobic microcosm, in aerobic microcosm and in their relative abiotic controls after 45 days of incubation.

3.2. Performance of continuous-flow experiments

3.2.1. Parameter monitoring

As expected, the two columns showed a different behavior throughout experiments. Figure 3 shows the parameters variation during the experimental campaign with continuous-flow into the columns.

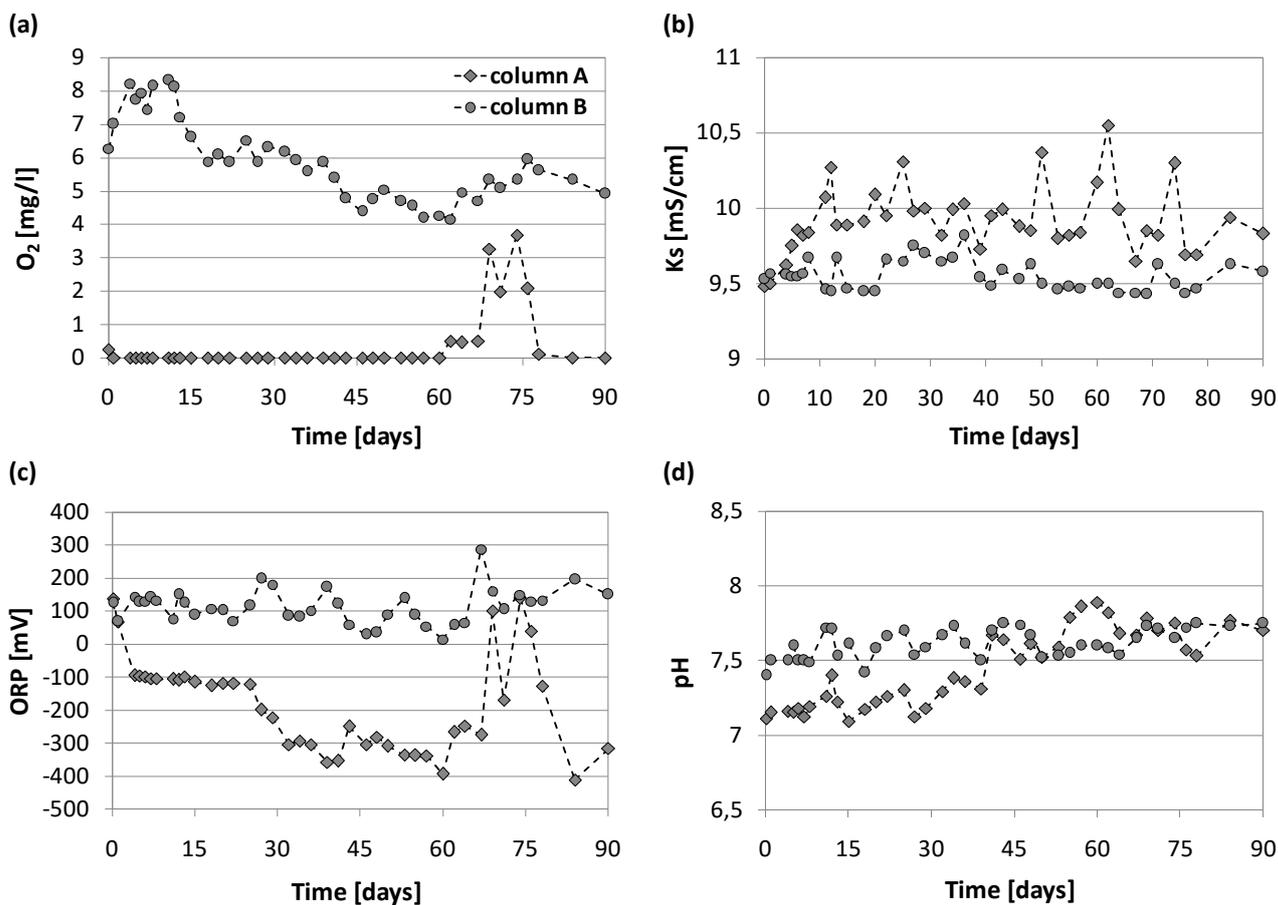


Figure 3. DO concentration (a), electric conductivity (b), redox potential (c), and pH (d) over time for column A and B.

Figure 3a reports the trend profile of DO concentration throughout experiments in the two columns. In particular, the DO concentration for column A was always equal to zero confirming the establishment of suitable conditions for the anaerobic pathways in the column, excepting a short time period (from day 60 to day 78) when a sudden increase of the oxygen concentration was observed. This result could be likely due to an improper water-bag storage. In contrast, in column B, the DO concentrations at the outlet of the system were significantly higher, thus promoting the suitable conditions for the aerobic (co)-metabolic pathway. Interestingly, a decreasing trend during experiments was observed, probably due to biotic oxygen consumption. These behaviors were confirmed by the ORP values measured at the outlet of both columns throughout experiments (Figure 3c). Indeed, in column A, the ORP always showed negative values, excepting the short period corresponding to the increase of oxygen concentration; these negative values confirmed the establishment of anaerobic conditions within column A. Conversely, the ORP values in column B were always strongly positive, thus indicating aerobic conditions, at least at the outlet of the system. Electric conductivity remained almost constant over time in both columns, with higher values observed in column A compared to column B (Figure 3b). The pH had a different behavior (Figure 3d); in both columns, it showed an increasing trend and it was higher in column A. This growing trend could be due to the acetate consumption process by microorganisms inside column A, thus causing an increase in alkalinity. This trend could be explained by a balance between two opposite phenomena occurring simultaneously: on one hand, PHB hydrolysis from which acetate is produced, which determines a pH decrease, while on the other hand, acetate consumption by microorganisms, which leads to a pH increase. It is possible that, from a kinetic point of view, consumption overwhelmed production thus determining a pH increasing trend.

3.2.2. PHB fermentation and acetate production in column A

Analysis of acetate concentration in column A showed that, under anaerobic condition, bacterial fermentation of PHB with production of acetate was enhanced (Figure 4). The registered trend of acetate concentration suggests an high rate of microbial activity inside the column A stimulated by the high specific surface area of the powder PHB that can explain the rapid biopolymer degradation (Baric et al. 2012).

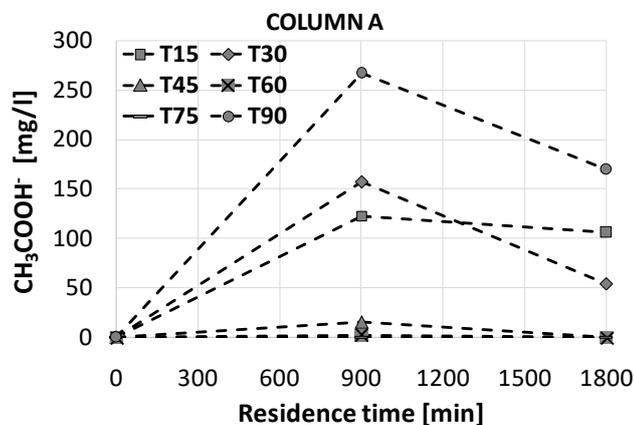


Figure 4. Acetate concentration trend over time along the column A at day 15, 30, 45, 60, 75 and 90.

Along column A, the highest values of acetate were observed at the end of the PRB, rather than at the exit of the column. This is probably due because PHB hydrolysis took place in the reactive portion of the column, resulting in the production of acetate, while in the aquifer this was consumed by microorganisms and presumably used as growth substrate. However, the amount of acids deriving from the PHB was sufficient to sustain an efficient and prolonged dechlorination activity in the column, as better discussed below. Furthermore, it was observed that during the first 15 days the acetate production was higher than the consumption rate, denoting a greater fermentation activity compared to acetate consumption; consequently, no significant increase in pH was observed at this stage (Figure 5). Subsequently, from 30th to 60th day, the acetate consumption kinetics increased resulting in pH increase, as discussed previously. In fact, CH₃COOH⁻ concentration at day 45 decreased significantly in section 1 and was close to zero in section 2; this behavior was observed also at day 60, with acetate concentration close to zero in both sections. Thereafter, up to day 75, the acetate concentration remained close to zero in both sections but in this case for a zeroing of the fermentation kinetics which caused a reduction in the pH growth trend; this could be due to the inhibition of fermentation process caused by the unfavorable aerobic conditions established in that period inside the column. Finally, at experimental day 90, after optimal conditions for biopolymer fermentation were recovered within the system, a significant increase of acetate production was observed, reaching the maximum concentration of the entire experimental campaign, close to 267 mg l⁻¹.

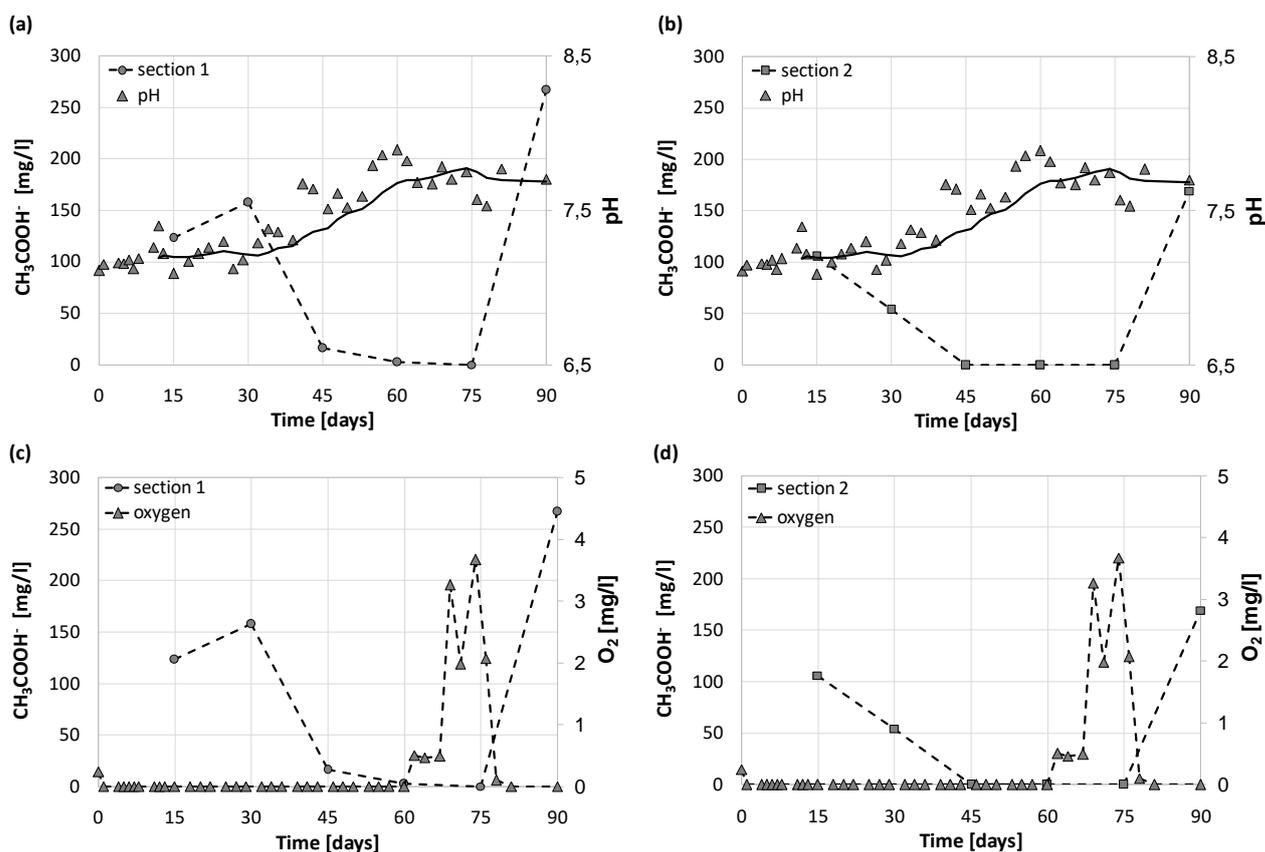


Figure 5. Correlation between pH and acetate in section 1 (a) and 2 (b) and DO and acetate in section 1 (c) and 2 (d) in column A.

3.2.3. 1,2-DCA concentration

Referring to column A, 1,2-DCA was degraded to a concentration close to the standard limit imposed by Legislative Decree No 152/06 (1,2-DCA = $6 \mu\text{g l}^{-1}$; CSC - contamination threshold concentration = $3 \mu\text{g l}^{-1}$) on the 60th experimental day, while it was below the instrument detection limit after 75 days of operation. From the observed results, it was confirmed the effectiveness of the anaerobic pathway for 1,2-DCA degradation. On the contrary, in column B, the degradation rate was lower and 1,2-DCA concentration was significantly higher than the CSC (1,2-DCA = $324 \mu\text{g l}^{-1}$). 1,2-DCA degradation in column B was related to the establishment of an aerobic pathway, as it was confirmed by the dissolved oxygen and redox potential values achieved during experiments. However, the aerobic conditions did not allow a complete 1,2-DCA removal. Aerobic degradation of 1,2-DCA has been observed in previous studies (McCarty and Semprini, 1994), in which it has been shown that 1,2-DCA can be degraded both by direct oxidation and by a cometabolic process. Figure 6 shows the 1,2-DCA concentration trend along the two columns.

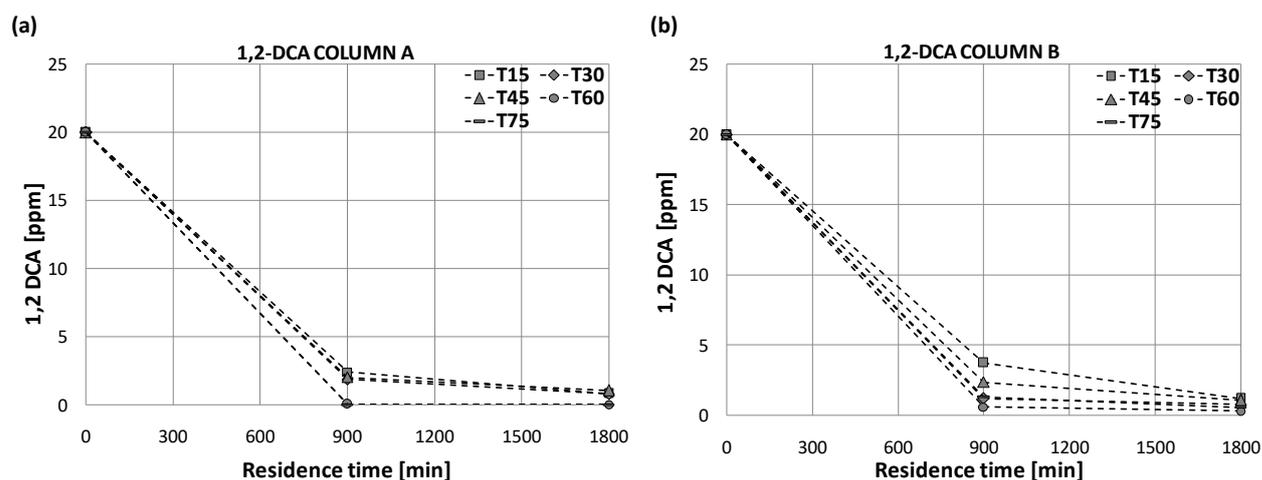


Figure 6. 1,2-DCA concentration trend along column A (a) and B (b).

Figure 7 shows the normalized trend of the effluent 1,2-DCA, for the two columns during the experimental period. In both columns very low values of the normalized 1,2-DCA were found, with a general decreasing trend, confirming a high 1,2-DCA degradation, with removal efficiencies always higher than 90%. In particular, in column A, after 75 experimental days, an almost complete removal of the 1,2-DCA was obtained, with an efficiency therefore close to 100%. The maximum removal efficiency observed in column B, on the other hand, was approximately 98%. From the achieved results, the suggestion is that for the operational conditions under study, the anaerobic pathway enhanced by PHB was more effective compared to the aerobic one.

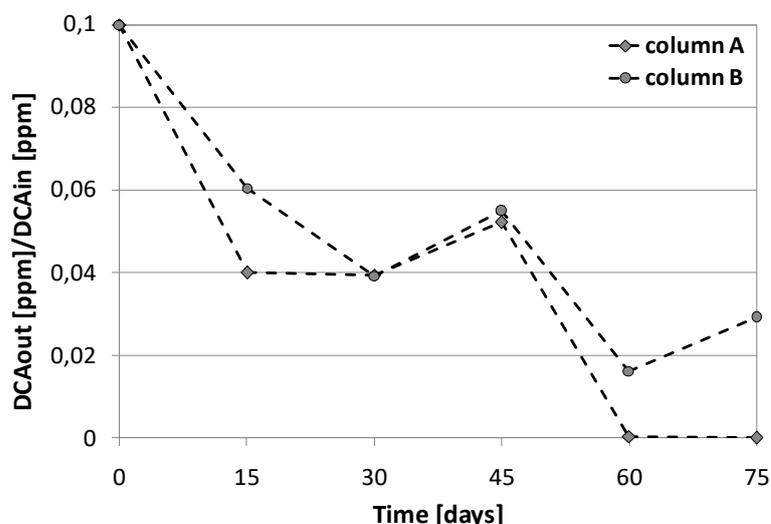


Figure 7. Normalized 1,2-DCA concentration trend over time for column A and B.

3.3. Microbial consortia in the columns

Microbial biomass of the columns was estimated as total double strand extracted DNA (dsDNA). Columns A and B had a similar biomass content that was higher in section 1 in respect to section 2 for both columns (Table 2). Illumina MiSeq 16S rRNA gene sequencing was performed on the metagenomic DNA extracted from the silica sand samples from columns A and B in order to detect and identify the bacterial communities and to verify the presence of microbes involved in BRD and direct or cometabolic oxidation of chlorinated solvents.

The summary of Illumina sequencing output is reported in Table 2. Clustering of sequences at 99% similarity, led to a similar number of operational taxonomic units (OTUs) in the two sections from column A (143 for section 1 and 131 for section 2), and a slightly higher number of OTUs in column B (Table 2). The clusters were taxonomically identified using Green Genes database version 13–8.

The histograms (Figure 8) show the composition of the two microbial consortia at the taxonomic level of phylum (Figure 8a), family (Figure 8b) and genus (Figure 8c). Taxonomic groups with relative abundance greater than 1% were taken into consideration.

Table 2. Microbial biomass of columns and summary of 16S Illumina sequencing output

Column	Section	Microbial biomass (dsDNA) ($\mu\text{g g}^{-1}$ column content)	non-chimeric reads (n)	Bacterial diversity observed_OTUs (99% id.)
A	1	2.3	31640	143
A	2	1.6	29555	131
B	1	2.0	42446	214
B	2	1.8	32309	203

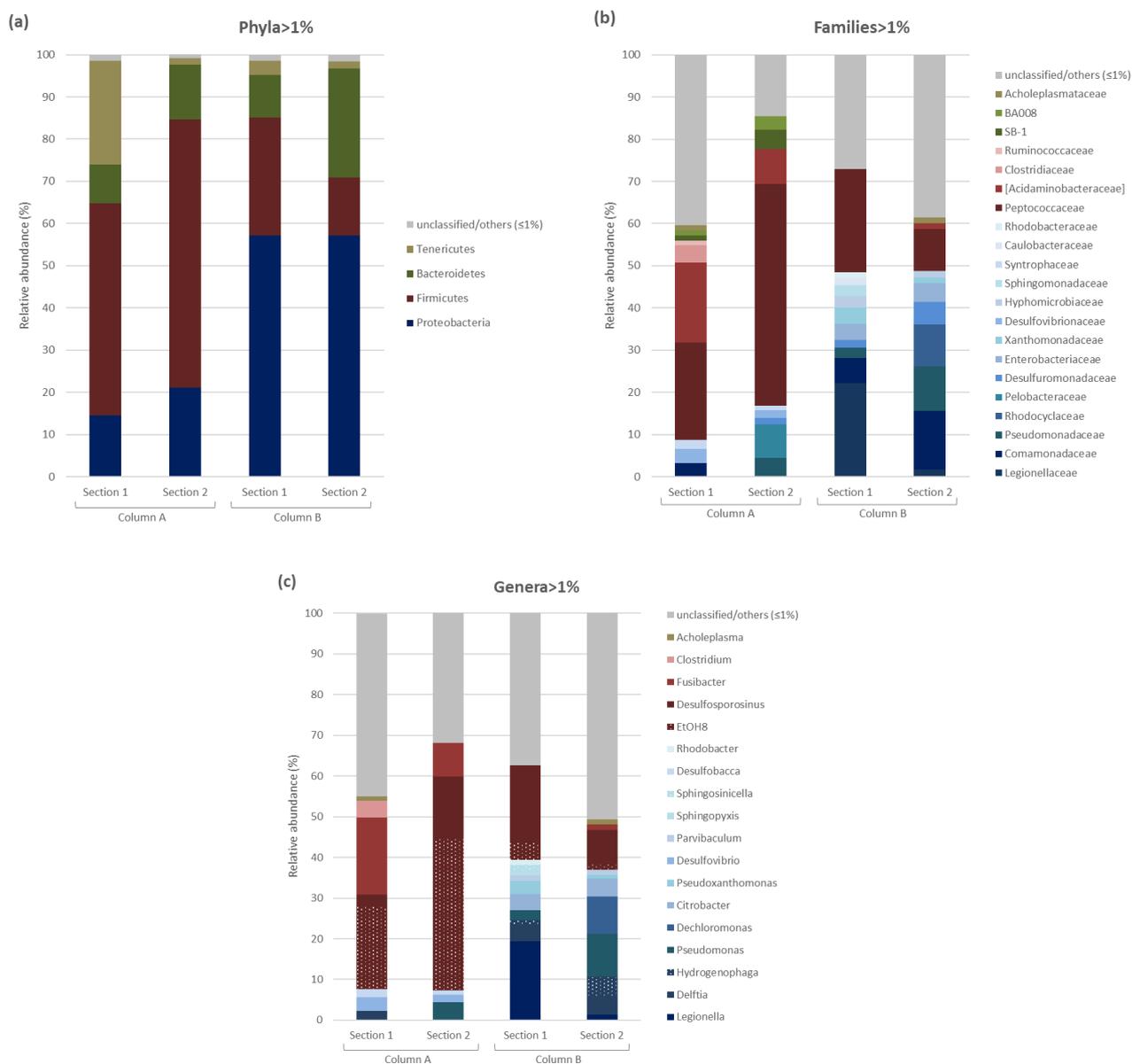


Figure 8. Relative abundances (%) of bacterial phyla (a), families (b) and genera (c) in section 1 and section 2 of columns A and B. Only taxa with relative abundance >1% in at least one sample are represented.

The microbial communities of columns A and B showed quite similar profiles at phylum level, although the relative abundances of the identified taxa varied between the two columns and between sections within each column. The most represented phyla in both columns were Firmicutes and Proteobacteria, followed by Bacteroidetes and Tenericutes. Column A was dominated by Firmicutes (50% and 64%, in section 1 and 2 respectively) followed by Tenericutes (25% and 1%). Conversely, column B was dominated by Proteobacteria (57% in both sections) followed by Firmicutes (28% and 14%).

At family level, column A was enriched in Peptococcaceae and Acidaminobacteraceae (Firmicutes) and to a lesser extent in Pelobacteraceae and Desulfovibrionaceae (Proteobacteria). Members of these families are almost exclusively obligate anaerobes confirming that anaerobic conditions were established throughout column A (Figure 3). Peptococcaceae, that include well known dehalogenating genera (Richardson, 2013), were represented in column A mainly by *Desulfosporosinus*, while Acidaminobacteraceae were represented by the genus *Fusibacter*. Both genera are sulfate and thiosulfate reducers but they have also a fermentative metabolism (Hippe and Stackebrandt, 2015; Ravot et al., 2015). Sulfate reducing bacteria (SRB) are known to be involved in the bioremediation of aromatic and chlorinated hydrocarbons (Dutta et al., 2022) and *Desulfosporosinus* in particular includes PCE-degrading species (Robertson et al., 2001), but the role of *Fusibacter* and *Desulfosporosinus* in dehalogenation of 1,2-DCA is not confirmed. *Fusibacter*, that was the most abundant identified genus in section 1 (19%), was detected also as the most abundant active genus resident in an organohalide polluted groundwater underneath a landfill stimulated with molasses (Bertolini et al., 2021). This genus, in column A could have a role as OHRB and also as fermenting agent responsible for acetate production from the degradation of PHB (Ravot et al., 1999).

The bacterial community of section 2 was enriched in *Desulfosporosinus* (15%) suggesting that this bacterium takes advantage of the presence of acetate, presumably released in section 1. Beyond Peptococcaceae, members of Pseudomonadaceae, Desulfovibrionaceae, Desulfuromonadaceae and Syntrophaceae, although detected in the column at lower abundance, include dehalogenating species (Dolinová et al., 2017; Türkowsky et al., 2018) which could be involved in the biodegradation of 1,2-DCA.

Surprisingly the most well-known OHRB genera within Peptococcaceae (i.e. *Dehalobacter* and *Desulfitobacterium*) were not detected but it is worth to note that a large part of the reads could not be assigned at genus level.

In column B, Proteobacteria were more than 57% and mainly made up of families Legionellaceae and Comamonadaceae in section 1 and Comamonadaceae, Pseudomonadaceae, Rhodocyclaceae and Desulfuromonadaceae in section 2. Firmicutes were mainly made up of Peptococcaceae (including the unidentified phylotype EtOH8) in both sections and included also Acidaminobacteraceae in section 2. The presence of aerobic families such as Legionellaceae and Comamonadaceae was expected. The Legionellaceae are aerobic Gram-negative bacilli that are found mainly in aqueous environments (Edelstein and Lück, 2015); they were probably present in the groundwater used to feed the columns and enriched in column B taking advantage of oxygen.

Beyond aerobic Legionellaceae and Comamonadaceae, column B hosts also facultative and anaerobic bacteria (i.e. Enterobacteriaceae and Peptococcaceae, respectively) suggesting that micro oxygen depletion zones can be formed inside the column. As above discussed, oxygen concentration in column B showed a slight decrease during the experiments from 8 to almost 5 mg l⁻¹ thus suggesting oxygen consumption during microbial growth (Figure 3). Anaerobic Peptococcaceae were abundant in both sections of column B (although less abundant in section 2) and were mainly represented by SRB *Desulfosporosinus*, already described for column A. In addition, column B hosted also other families including known degraders of chlorinated solvents such as Comamonadaceae (6% in section 1 and 14% in section 2), Desulfuromonadaceae (1.8% and 5.4%) and Pseudomonadaceae (2.5% and 10.6%) (Dolinová et al., 2017; Bertolini et al., 2021). Within Pseudomonadaceae, members of the genus *Pseudomonas*, highly represented in column B (2.5% and 10.5%, in section 1 and 2 respectively), are

known hydrocarbon degraders that are able to carry out cometabolic oxidation of chlorinated solvents (Alvarez-Cohen and Speitel, 2001). Within Comamonadaceae, the genus *Delftia* (4.2% and 4.5%) includes members that have been reported in anoxic-aerobic environments, where they could degrade halogenated aromatic compounds (Zhang et al., 2019).

4. Conclusions

From the results obtained for column A, it appeared that the powder PHB was effectively hydrolyzed and used as a substrate by autochthonous microorganisms that converted it into acetate, which accumulated up to concentrations of 267 mg l⁻¹ after 90 days. The fast fermentation was determined not only by the favorable conditions established within the system, but also by the high specific surface of the biopolymer itself. This shows that poly- β -hydroxybutyrate in powder form can be effectively used to support a long-term reductive dechlorination process as it ensures long-term electron donor release, allowing the almost complete removal of the chlorinated compound. It was also observed that in the presence of PHB fermentation products the consortium was able to completely degrade 1,2-DCA. The microbial consortia established in column A and B derived from a 1,2-DCA dehalogenating mixed microbial communities obtained from a chlorinated solvents contaminated groundwater after enrichment in the presence of 1,2-DCA, with the addition of PHB under anaerobic conditions (column A) or under aerobic conditions (column B). The columns were fed with the same groundwater used for the enrichment but the composition of the two final communities was different as expected. This difference could only depend on PHB presence as well as the physical-chemical conditions of the two columns, referring in particular to dissolved oxygen concentrations. Anaerobic conditions in the presence of powder PHB favored the enrichment of fermentative/sulfate reducing bacteria in column A. The degradation of powder PHB was evidenced by acetate formation and also by microbial biomass proliferation. Alternate anoxic/aerobic conditions in column B enriched the consortium with a less abundant and more diverse microbial community, composed of aerobic chemoorganotrophs and fermentative/sulfate reducing bacteria. Although the most frequently detected 1,2-DCA dehalogenating genera (such as *Dehalococcoides*, *Dehalogenimonas*, *Dehalobacter* and *Desulfitobacterium*) were not found, authors suggest 1,2-DCA was removed by members of the two consortia, mainly by reductive dehalogenation in column A enhanced by fermentation products from powder PHB degradation, and aerobic (co)-metabolism in column B.

In general, the experimental activity results confirm that biological processes can be effectively applied for the remediation of 1,2-DCA contaminated aquifers. Furthermore, this study confirmed the possibility to use a completely biodegradable polymer to stimulate biological reductive dechlorination, thus promoting the application of an environmentally sustainable remediation technique, with acetate production strongly affected by PHB form, significantly influencing the effectiveness of BRD process.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors are grateful to Prof. Andrea Pace and Dr. Elisa Maria Petta (Department of Biological, Chemical and Pharmaceutical Sciences and Technologies, University of Palermo) for technical support in GC/MS analyses.

References

- Accardi, D.S., Pierro, L., Baric, M., Palleschi, C., Uccelletti, D., Majone, M., Beccari, M., Petrangeli Papini, M., 2012. L'attività microbiologica in Barriere Permeabili Reattive. ECO, Bonifiche Rifiuti-Demolizioni, Anno 6, numero 22, pag 28-31.
- Ajo-Franklin, J.B., Geller, J.T., Harris, J.M., 2006. A survey of the geophysical properties of chlorinated DNAPLs. *J. Appl. Geophys.* 59, 177–189. <https://doi.org/10.1016/j>
- Alvarez-Cohen, L., Speitel, G.E., 2001. Kinetics of aerobic cometabolism of chlorinated solvents. *Biodegradation* 12, 105–126. <https://doi.org/10.1023/A:1012075322466>
- Amanat, N., Maturro, B., Rossi, M.M., Valentino, F., Villano, M., Papini, M.P., 2021. Assessment of long-term fermentability of pha-based materials from pure and mixed microbial cultures for potential environmental applications. *Water (Switzerland)* 13. <https://doi.org/10.3390/w13070897>
- Amanat, N., Maturro, B., Villano, M., Lorini, L., Rossi, M.M., Zeppilli, M., Rossetti, S., Petrangeli Papini, M., 2022. Enhancing the biological reductive dechlorination of trichloroethylene with PHA from mixed microbial cultures (MMC). *J. Environ. Chem. Eng.* 10, 107047. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.107047>
- Amanat, N., Rossi, M.M., Andreini, F., Majone, M., Petrangeli Papini, M., 2020. Poli-idrossialcanoati (PHA) da colture microbiche miste (MMC) a supporto alla dechlorazione biologica riduttiva. Conference Book SiCon 2020. Siti Contaminati. Esperienze negli interventi di risanamento, ISBN 88-7850-023-2
- Anam, G.B., Choi, J., Ahn, Y., 2019. Reductive dechlorination of perchloroethene (PCE) and bacterial community changes in a continuous-flow, two-stage anaerobic column. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 138, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.12.014>
- APAT, IRSA-CNR, 2003. Metodi analitici per le acque. Manuali e linee guida. Volume Secondo, Sezione 4000 - Inorganici metallici, Sezione 5000-Organici, pp. 799-809.
- Aulenta, F., Bianchi, A., Majone, M., Petrangeli Papini, M., Potalivo, M., Tandoi, V., 2005a. Assessment of natural or enhanced in situ bioremediation at a chlorinated solvent-contaminated aquifer in Italy: A microcosm study. *Environ. Int.* 31, 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.09.014>
- Aulenta, F., Fuoco, M., Canosa, A., Papini, M.P., Majone, M., 2008. Use of poly- β -hydroxy-butyrate as a slow-release electron donor for the microbial reductive dechlorination of TCE. *Water Sci. Technol.* 57, 921–925. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.073>
- Aulenta, F., Gossett, J.M., Papini, M.P., Rossetti, S., Majone, M., 2005b. Comparative study of methanol, butyrate, and hydrogen as electron donors for long-term dechlorination of tetrachloroethene in mixed anaerobic cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 91, 743–753. <https://doi.org/10.1002/bit.20569>
- Aulenta, F., Rossetti, S., Tandoi, V., Papini, M.P., Majone, M., 2019. Biorisanamento in situ di falde contaminate da solventi clorurati: un caso di studio in provincia di Milano. *Geol. dell'Ambiente*, Suppl. al n. 2/2019 25–34.
- Baric, M., Majone, M., Beccari, M., Petrangeli Papini, M., 2012. Coupling of polyhydroxybutyrate (PHB) and zero valent iron (ZVI) for enhanced treatment of chlorinated ethanes in permeable reactive barriers (PRBs). *Chem. Eng. J.* 195–196, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.04.026>
- Baric, M., Pierro, L., Petrangeli, B., Papini, M.P., 2014. Polyhydroxyalkanoate (PHB) as a slow-release electron donor for advanced in situ bioremediation of chlorinated solvent-contaminated aquifers. *N. Biotechnol.* 31, 377–382. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.10.008>
- Beretta, G.P., 2000. Utilità ed efficienza dei sistemi pozzi-barriera per il disinquinamento delle acque sotterranee. Atti del 51° Corso di aggiornamento in Ingegneria sanitaria-ambientale, Politecnico di Milano 354–368.
- Bertolini, M., Zecchin, S., Beretta, G. Pietro, De Nisi, P., Ferrari, L., Cavalca, L., 2021. Effectiveness of permeable reactive bio-barriers for bioremediation of an organohalide-polluted aquifer by

- natural-occurring microbial community. *Water* (Switzerland) 13. <https://doi.org/10.3390/w13172442>
- Bradley, P.M., 2003. History and Ecology of Chloroethene Biodegradation: A Review, *Bioremediation Journal* Vol. 7, 81–109. <https://doi.org/10.1080/713607980>
- Cameselle, C., Gouveia, S., 2018. Electrokinetic remediation for the removal of organic contaminants in soils. *Curr. Opin. Electrochem.* 11, 41–47. <https://doi.org/10.1016/J.COEELEC.2018.07.005>
- Capodici, M., Corsino, S.F., Di Trapani, D., Torregrossa, M., Viviani, G., 2019. Effect of biomass features on oxygen transfer in conventional activated sludge and membrane bioreactor systems. *J. Clean. Prod.* 240, 118071. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118071>
- Cohen, R.M., Mercer, J.W., 1993. DNAPL Site Evaluation. Research report. No. PB-93-150217/XAB. GeoTrans, Inc., Sterling, VA (United States).
- Coleman, N. V., Mattes, T. E., Gossett, J. M., Spain, J. C., 2002. Biodegradation of cis-dichloroethene as the sole carbon source by a β -proteobacterium. *Applied and environmental microbiology* 68(6), 2726-2730. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2726-2730.2002>
- Corsino, S.F., Di Trapani, D., Traina, F., Cruciatà, I., Scirè Calabrisotto, L., Lopresti, F., La Carrubba, V., Quatrini, P., Torregrossa, M., Viviani, G., 2022. Integrated production of biopolymers with industrial wastewater treatment: Effects of OLR on process yields, biopolymers characteristics and mixed microbial community enrichment. *J. Water Process Eng.* 47. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102772>
- De Wildeman, S., Diekert, G., Van Langenhove, H., Verstraete, W., 2003. Stereoselective microbial dehalorespiration with vicinal dichlorinated alkanes, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 5643 – 5647. 69. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5643-5647.2003>
- Dolinová, I., Štrojsová, M., Černík, M., Němeček, J., Macháčková, J., Ševců, A., 2017. Microbial degradation of chloroethenes: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 13262–13283. [doi:10.1007/s11356-017-8867-y](https://doi.org/10.1007/s11356-017-8867-y). 13–14.
- Dutta, N., Usman, M., Awais, M., Luo, G., 2022. A Critical Review of Recent Advances in the Bioremediation of Chlorinated Substances by Microbial Dechlorinators A critical review of recent advances in the bio-remediation of chlorinated substances by microbial dechlorinators. <https://doi.org/10.1016/j.ceja.2022.100359>
- Edelstein, P.H., Lück, C., 2015. Legionella. *Manual of clinical microbiology*, 887-904. <https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch49>
- Fan, D., Gilbert, E.J., Fox, T., 2017. Current state of in situ subsurface remediation by activated carbon-based amendments. *J. Environ. Manage.* 204, 793–803. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.02.014>
- Frascari, D., Zanaroli, G., Danko, A.S., 2015. In situ aerobic cometabolism of chlorinated solvents: A review. *J. Hazard. Mater.* 283, 382–399. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.09.041>
- Furukawa, Y., Kim, J.W., Watkins, J., Wilkin, R.T., 2002. Formation of ferrihydrite and associated iron corrosion products in permeable reactive barriers of zero-valent iron, *Environ. Sci. Technol.* 36 5469 – 5475. <https://doi.org/10.1021/es025533h>
- Henderson, A.D., Demond, A.H., 2007. Long-term performance of zero-valent iron permeable reactive barriers: a critical review. *Environ Eng Sci* 24:401 – 23. <https://doi.org/10.1089/ees.2006.0071>
- Hippe, H., Stackebrandt, E., 2015. Desulfosporosinus. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-10. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00660>
- Hug, L.A., Maphosa, F., Leys, D., Löffler, F.E., Smidt, H., Edwards, E.A., Adrian, L., 2013. Overview of organohalide-respiring bacteria and a proposal for a classification system for reductive dehalogenases. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 368. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0322>
- Ivanov, V., Stabnikov, V., Ahmed, Z., Dobrenko, S., Saliuk, A., 2014. Production and applications of crude polyhydroxyalkanoate-containing bioplastic from the organic fraction of municipal solid waste. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 12, 725–738. <https://doi.org/10.1007/s13762-014-0505-3>

- Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H.N., Reis, M.A.M., 2017. Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA). *Bioengineering* 4, 55. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055>
- Li, J., Dou, X., Qin, H., Sun, Y., Yin, D., Guan, X., 2019. Characterization methods of zerovalent iron for water treatment and remediation. *Water Res.* 148, 70–85. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.025>
- Li, J., Hu, A., Bai, S., Yang, X., Sun, Q., Liao, X., Yu, C., 2021. Characterization and performance of lactate-feeding consortia for reductive dechlorination of trichloroethene, *Microorganisms* 9 (4) 751, <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040751>.
- Lin, W.H., Chien, C.C., Lu, C.W., Hou, D.Y., Sheu, Y.T., Chen, S.C., Kao, C.M., 2021. Growth inhibition of methanogens for the enhancement of TCE dechlorination, *Sci. Total Environ.* 787, 147648, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147648>.
- Majone, M., Rolle E., Petrangeli Papini M., Beretta G.P., Cicconi V., Maffucci M., 2009. Messa in sicurezza e bonifica di falde contaminate: un'analisi delle tecnologie impiegate a partire dall'applicazione del D.M. 471/99. *La Chim. e l'industria* 1, 104–109.
- Majone, M., Verdini, R., Aulenta, F., Rossetti, S., Tandoi, V., Kalogerakis, N., Agathos, S., Puig, S., Zanolli, G., Fava, F., 2015. In situ groundwater and sediment bioremediation: barriers and perspectives at European contaminated sites. *N. Biotechnol.* 32, 133–146. doi:10.1016/j.nbt.2014.02.011.
- Marzorati, M., Borin, S., Brusetti, L., Daffonchio, D., Marsilli, C., Carpani, G., De Ferra, F., 2006. Response of 1, 2-dichloroethane-adapted microbial communities to ex-situ biostimulation of polluted groundwater. *Biodegradation* 17, 41–56. <https://doi.org/10.1007/s10532-005-9004-z>
- Matturo, B., Pierro, L., Frascadore, E., Papini, M.P., Rossetti, S., 2018. Microbial community changes in a chlorinated solvents polluted aquifer over the field scale treatment with poly-3-hydroxybutyrate as amendment. *Front. Microbiol.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01664>
- McCarty, P.L., Semprini, L., 1994. Ground-water treatment for chlorinated solvents. In Norris RD, Hinchee RE, Brown R, McCarty PL, Semprini L, Wilson JT, Kampbell DH, Reinhard M, Bouwer EJ, Borden RC, Vogel TM, Thomas JM, Ward CH, eds, *Handbook of Bioremediation*.
- Morgan-Sagastume, F., 2016. Characterisation of open, mixed microbial cultures for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Environ. Sci. Biotechnol.* 15, 593–625. <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9411-0>
- Morrison, S.J., Bartlett, T.R., 2009. Tracer method to determine residence time in a permeable reactive barrier. *Ground Water* 47, 598–604. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2009.00544.x>
- Odzimekowski, M.S., Schuhmacher, T., Gillham, R.W., Reardon, E.J., 1998. Mechanism of oxide film formation on iron in simulating groundwater solutions: Raman spectroscopic studies, *Corros. Sci.* 40 371–389. [https://doi.org/10.1016/S0010-938X\(97\)00141-8](https://doi.org/10.1016/S0010-938X(97)00141-8)
- Pierro, L., Matturo, B., Rossetti, S., Sagliaschi, M., Sucato, S., Alesi, E., 2017. Polyhydroxyalkanoate as a slow-release carbon source for in situ bioremediation of contaminated aquifers: from laboratory investigation to pilot-scale testing in the field. *N. Biotechnol.* 37, 60–68. doi: 10.1016/j.nbt.2016. 11.004. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.11.004>
- Pierro, L., Matturo, B., Rossetti, S., Sagliaschi, M., Sucato, S., Bartsch, E., Alesi, E., Majone, M., Arjmand, F., Petrangeli Papini, M., 2016. A new technology for the remediation of residual DNAPL sources: results from the first full scale test. *Ing. dell'Ambiente* 3. <https://doi.org/10.14672/ida.v3i2.464>
- Piscitello, A., Mondino, F., Bianco, C., Gallo, A., Tosco, T., Sethi, R., 2020. Iniezione di particelle ferrose per la bonifica di sistemi acquiferi: studio sperimentale su modelli di laboratorio di larga scala. *SiCon2020*, Roma, 12-14 febbraio.
- Ravot, G., Garcia, J.L., Magot, M., Ollivier, B., 2015. *Fusibacter*. *Bergey's Manual of Systematics of*

- Archaea and Bacteria, 1-5. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00723>
- Ravot, G., Magot, M., Fardeau, M.-L., Patel, B.K.C., T H O R N A ~, P., Garcia', J.-L., Ollivierl, B., 1999. *Fusibacterpaucivorans* gen. nov., sp. nov., an Anaerobic, Thiosulfate-Reducing Bacterium From an Oil-Producing Well. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 141–142. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-3-1141>
- Richardson, R.E., 2013. Genomic insights into organohalide respiration. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 498–505. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.02.014>
- Robertson, W.J., Bowman, J.P., Franzmann, P.D., Mee, B.J., 2001. *Desulfosporosinus meridiei* sp. nov., a spore-forming sulfate-reducing bacterium isolated from gasoline-contaminated groundwater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 133–140. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-133>
- Rossi, M.M., Andreini, F., Caruso, P., Amanat, N., Petrangeli Papini, M., 2021. Rimozione di tricloroetilene (TCE) attraverso dechlorazione biologica riduttiva (BRD) su biochar: studio preliminare e scale-up con donatore di elettroni alternativo, Conference Book SiCon 2021, ISBN 88-7850-025-9.
- Sleep, B.E., Sykes, J.F., 1989. Modeling the transport of volatile organics in variably saturated media. *Water resources research*, 25(1), 81-92. <https://doi.org/10.1029/WR025i001p00081>
- Song, H., Carraway, E.R., 2005. Reduction of chlorinated ethanes by nanosized zero-valent iron: Kinetics, pathways and effects of reaction conditions. *Env. Sci Technol* 39, 6237–6245. <https://doi.org/10.1021/es048262e>
- Starr, R.C., Cherry, J.A., 1994. In Situ Remediation of Contaminated Ground Water: The Funnel-and-Gate System. *Ground Water* 32, 465–476. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.1994.tb00664.x>
- Türkowsky, D., Jehmlich, N., Diekert, G., Adrian, L., von Bergen, M., Goris, T., 2018. An integrative overview of genomic, transcriptomic and proteomic analyses in organohalide respiration research. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94, 1–21. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy013>
- Valentino, F., Moretto, G., Lorini, L., Bolzonella, D., Pavan, P., Majone, M., 2019. Pilot-Scale Polyhydroxyalkanoate Production from Combined Treatment of Organic Fraction of Municipal Solid Waste and Sewage Sludge. *Ind. Eng. Chem. Res.* 58, 12149–12158. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b01831> <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b01831>
- Villano, M., Valentino, F., Barbeta, A., Martino, L., Scandola, M., Majone, M., 2014. Polyhydroxyalkanoates production with mixed microbial cultures: From culture selection to polymer recovery in a high-rate continuous process. *N. Biotechnol.* 31, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.08.001>
- Xiao, Z., Jiang, W., Chen, D., Xu, Y., 2020. Bioremediation of typical chlorinated hydrocarbons by microbial reductive dechlorination and its key players: a review, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 202, 110925, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110925>.
- Yan, J., Wang, J., Villalobos Solis, M.I., Jin, H., Chourey, K., Li, X., Yang, Y., Yin, Y., Hettich, R.L., Löffler, F.E., 2021. Respiratory vinyl chloride reductive dechlorination to Ethene in TceA-expressing *Dehalococcoides mccartyi*. *Environ. Sci. Technol.* 55 (8) 4831–4841, <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c07354>.
- Zhang, C., Wang, S., Lv, Z., Zhang, Y., Cao, X., Song, Z., Shao, M., 2019. NanoFe₃O₄ accelerates anoxic biodegradation of 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol. *Chemosphere* 235, 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.114>

CAPITOLO 4

UTILIZZO DI SUPPORTI BIOPOLIMERICI PER IL BIORISANAMENTO DI ACQUE CONTAMINATE

INTRODUZIONE

Tecnologie di biorisanamento basate sull'immobilizzazione di batteri degradatori

Le tecnologie di immobilizzazione microbica sono una classe di tecnologie di trattamento biologico con un grande potenziale applicativo in molti campi come l'agricoltura, l'industria e la protezione ambientale [Berillo et al., 2021]. L'utilizzo di biofilm microbici degradatori di sostanze contaminanti immobilizzati su diverse matrici di supporto adsorbenti, in particolare, rappresenta una tecnologia emergente per applicazioni innovative di biorisanamento ambientale [Scaffaro et al., 2017; Xu et al., 2018; Catania et al., 2020]. Questo nuovo approccio permette di superare alcuni limiti delle tradizionali tecniche di biorisanamento, rendendo il processo più efficiente, più economico e maggiormente versatile. I biofilm microbici sono vantaggiosi rispetto alle cellule planctoniche per diverse ragioni, come ad esempio la maggiore tolleranza agli agenti inquinanti, la maggiore capacità di degradare i contaminanti, il maggiore livello di produzione di biotensioattivi, la sopravvivenza microbica più lunga, la stabilità e la riutilizzabilità senza perdita di attività [Bayat et al., 2015; Yadav et al., 2017; Escobedo-Morales et al., 2022]. L'uso della tecnologia di immobilizzazione microbica permette di rimuovere in modo efficiente molti composti tossici o composti a bassa biodegradabilità, come idrocarburi policiclici aromatici e solventi clorurati [Sridharan e Krishnaswamy, 2022].

La formazione di biofilm microbici su matrici di supporto è solitamente un processo lungo e rappresenta il principale costo e limite dei processi biotecnologici che utilizzano i batteri immobilizzati. Un biofilm microbico si sviluppa nei seguenti passaggi: le cellule batteriche mobili si attaccano alla superficie del supporto, maturano e producono una matrice extracellulare protettiva. Nelle applicazioni di biorisanamento ambientale, tale processo può essere effettuato mediante tre metodiche principali schematizzate in Fig. 4.1: (a) intrappolamento fisico di cellule batteriche all'interno della struttura del supporto; (b) biofilm generato sulla superficie porosa del supporto; (c) formazione di legami covalenti diretti tra le cellule batteriche e il supporto.

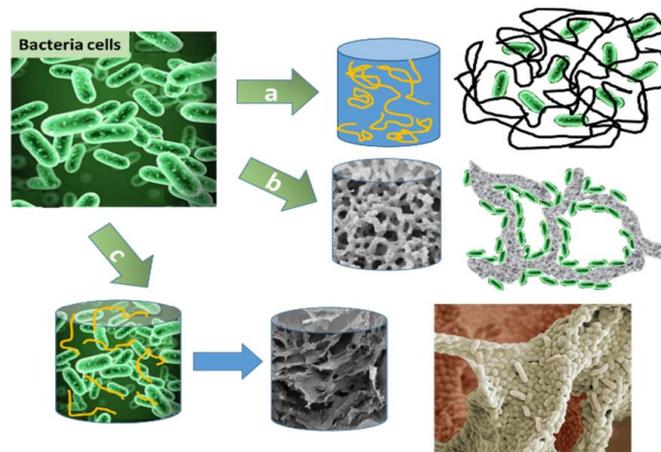


Fig. 4.1 Formazione di biofilm microbico su supporti carrier [Berillo et al., 2021].

Per il processo di immobilizzazione microbica, i supporti carrier utilizzati devono soddisfare alcuni criteri: la matrice deve essere leggera, flessibile, meccanicamente e chimicamente stabile, inerte, non inquinante, non tossica, insolubile in mezzo acquoso, deve possedere un'elevata diffusività e un'elevata ritenzione di biomassa [Partovinia e Rasekh, 2018]. La selezione di una buona matrice/supporto per l'immobilizzazione microbica è dunque un criterio essenziale. La produzione di polimeri sintetici per l'immobilizzazione di cellule batteriche, i quali possiedono un'adeguata stabilità meccanica e chimica, porosità, elevata capacità di adsorbimento e biocompatibilità, rende questi materiali potenziali candidati per le applicazioni di biorisanamento, sebbene molti fattori come struttura, dimensione dei pori, idrofobicità, influenzino l'efficacia dell'immobilizzazione delle cellule batteriche e della biodegradazione [Memon et al., 2020; Berillo et al., 2021]. Anche la scelta del microrganismo risulta fondamentale per sviluppare un sistema di biorisanamento efficace. I batteri immobilizzati devono infatti essere capaci di formare biofilm e contemporaneamente degradare efficacemente il contaminante.

Negli ultimi anni la bonifica ambientale basata sulla tecnologia di immobilizzazione batterica si è sviluppata rapidamente [Sonawane et al., 2022], e l'immobilizzazione delle cellule microbiche su vari substrati è stata utilizzata per numerose applicazioni biotecnologiche, sia su scala di laboratorio che su scala industriale [Alessandrello et al., 2018; Partovinia et al., 2018; Berillo et al., 2021] (Fig. 4.2).

Microorganism	Polymer Type or Cross-Linker	Application	Reference
<i>Aspergillus awamori</i>	polyacrylonitrile membrane	phenol biodegradation	[21]
<i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Rhodococcus</i> spp.	glutaraldehyde	biofuel, bioremediation	[23,62,78]
<i>E. coli</i> , <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Rhodococcus</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp.	PVA-aldehyde/PEI aldehyde/oxidized dextran or aldehyde dextran	hydrolysis/fermentation/bioremediation	[23,28,29,62]
<i>Actinobacillus succinogenes</i> , <i>Rhizopusoryzae</i> spp.	PVA-cryogel	lactic, fumaric and succinic acids	[51]
<i>Chlorella</i> spp.	Alg, Carrageenan, Agarose, Alginate and Agar beads, polyurethane foam	removal of ions Ni, Zn, Cd, Cu, Hg, Pb, and uranium, phosphate, nitrite, NH ₄	[52,111–113]
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	PVA bamboo-biochar beads	toluene and hydrocarbons	[46]
<i>Trichoderma</i> spp.	HEMA cryogel	cyanide removal	[55]
<i>Komagataei bacterxylinum</i>	PVA-cryogel	microcellulose	[58]
-	polylysine-b-polyvaline GA cryogel	water treatment, antimicrobial activity E-coli	[54]
-	Gum Arabic linked with divinyl sulfone	scaffolds or mammalian cell immobilisation	[28,82]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (S3X), <i>Microbacterium oxydans</i> (EC29)	hydroxyapatite	removal of zinc and cadmium ions	[68]
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> , <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> , <i>Bacillus lateroporus</i>	cryogel polyethylenoxide UV	phenol, methylphenol/cresol remediation	[85,86,122]
<i>Nitrosomonas europaea</i> C-31 and ' <i>Candidatus Jettenia caeni</i> , <i>Rhodococcus</i> spp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> spp.	PVA cryogel	removal of ammonia	[90,98]
<i>Bacillus</i>	PVA- H3BO3-Ca- Alg beads	polycyclic aromatic hydrocarbons removal	[101]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	PVA-Alg-Ca cryogel	lactate production	[103]
<i>Bacillus cereus</i>	pAAm-BisAAm cryogel	crude oil degradation	[104]

Fig. 4.2 Ceppi batterici e polimeri utilizzati per applicazioni di biorisanamento basate sulla tecnologia dell'immobilizzazione microbica su supporti carrier [Berillo et al., 2021].

Recentemente, sono stati realizzati nuovi polimeri biodegradabili come supporto per la formazione di biofilm batterici per applicazioni di biorisanamento di acque contaminate da idrocarburi [Catania et al., 2018; Catania et al., 2020]. In particolare, scaffold e membrane elettrofilati in policaprolattone (PCL) e in acido polilattico (PLA) sono stati sintetizzati e testati per la rimozione di idrocarburi da acque di mare. Tali supporti sono dotati di elevate capacità di assorbimento (fino al 500% del loro peso) e hanno mostrato un'ottima capacità di ospitare biofilm microbici degradatori di idrocarburi, con un aumento dell'efficienza di biodegradazione compreso tra il 15% e il 20%. Numerosi altri sistemi sono stati sviluppati con consorzi microbici o singoli ceppi batterici utilizzando una vasta gamma di supporti organici inerti, sintetici o naturali, materiali compositi, supporti inorganici, supporti attivati chimicamente [Berillo et al., 2021]. Per esempio, l'immobilizzazione microbica su substrati come chitosano, alginato, agar, collagene, agarosio, carbone attivo, ossidi metallici inorganici, membrane o polimeri porosi, criogel, è stata già sfruttata per numerose applicazioni biotecnologiche su scala di laboratorio o per applicazioni industriali [Alessandrello et al., 2018; Partovinia et al., 2018].

Alla luce delle precedenti considerazioni, l'ottimizzazione dei metodi di immobilizzazione di biofilm microbici degradatori di contaminanti su supporti carrier è continuamente richiesta per le applicazioni di biorisanamento. L'innovazione e il progresso dei materiali di supporto, insieme all'identificazione di ceppi microbici sempre più efficienti nella degradazione di

composti contaminanti, sono diventati il fulcro di future ricerche e applicazioni nel campo del biorisanamento ambientale.

SCOPO DEL LAVORO

Al fine di testare un innovativo approccio di *enhanced bioremediation* nei confronti dell'acqua contaminata da solventi clorurati oggetto del presente studio, è stata sviluppata una nuova tecnologia basata sull'immobilizzazione di batteri direttamente reclutati dall'acqua contaminata su supporti biopolimerici. La peculiarità del sistema proposto consiste nel combinare la capacità di biopolimeri a base di acido polilattico (PLA) o di policaprolattone (PCL), altamente assorbenti, ecocompatibili e biodegradabili [Scaffaro et al., 2019], di rimuovere 1,2-dicloroetano, ovvero il contaminante ambientale oggetto di studio (rimozione meccanica), e la capacità di batteri autoctoni all'acqua contaminata di formare un biofilm sui suddetti supporti e di degradare il contaminante (rimozione biologica), allo scopo di ottenere una maggiore efficienza di biodegradazione di solventi clorurati, a basso costo e in maniera ecocompatibile. Lo scopo di questa fase del lavoro di tesi è stato quello di sviluppare e ottimizzare supporti a base di PCL ottenuti per lisciviazione (detti "scaffold"), e supporti a base di PLA ottenuti per elettrofilatura (detti "fluff"), per accelerare e massimizzare i processi di biorisanamento, valutando da un lato la loro capacità di assorbire 1,2-DCA e dall'altro la loro capacità di agire da substrato fisico per l'adesione microbica e la formazione di biofilm attivi da parte di batteri potenzialmente decloruranti reclutati direttamente dall'acqua contaminata. Al fine di raggiungere gli obiettivi descritti, sono stati dapprima eseguiti una serie di test preliminari per selezionare il migliore tipo di supporto in termini di assorbimento di 1,2-DCA e di capacità di immobilizzazione microbica. Fluff in PLA sono stati quindi posti nell'acqua contaminata in un sistema a scala di laboratorio, ovvero all'interno di vials in condizioni di anaerobiosi e, dopo 30 giorni di incubazione, è stata caratterizzata la comunità microbica su di essi immobilizzata mediante analisi metagenomica di 16S rRNA metabarcoding.

Questa fase di lavoro è stata svolta in collaborazione con il prof. Roberto Scaffaro del Laboratorio di Ingegneria dei Materiali del dipartimento di Ingegneria (DI) dell'Università degli Studi di Palermo, che da anni studia le trasformazioni di materiali polimerici e biopolimerici e le loro applicazioni.

MATERIALI E METODI

Supporti biopolimerici

I dispositivi biopolimerici da testare per la loro applicazione come supporti per l'immobilizzazione di biofilm microbici deodoranti e come innovativo approccio di *enhanced bioremediation* di acque contaminate da solventi clorurati, sono stati prodotti presso il Laboratorio di Ingegneria dei materiali dell'Università degli Studi di Palermo. I supporti sono stati realizzati utilizzando due differenti materiali biopolimerici, policaprolattone (PCL) e acido polilattico (PLA), in entrambi i casi attraverso due tecniche: lisciviazione ed elettrofilatura.

I supporti tridimensionali realizzati mediante lisciviazione sono detti "scaffold". Essi 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 sono stati preparati mescolando nella matrice di fusione del polimero due agenti porogeni idrosolubili e successivamente lisciviando in acqua i composti come descritto da Scaffaro et al. (2017). Gli scaffold hanno il vantaggio di essere prodotti in grandi quantità e sono dotati di una elevata lipofilia. Il polimero principale della matrice è rappresentato da PCL o PLA, mentre gli agenti porogeni idrosolubili sono particelle di NaCl e polietilenglicole (PEG) 2000. La dimensione media dei pori risulta compresa tra 50-100 μm .

I supporti tridimensionali realizzati mediante elettrofilatura sono detti "fluff". Fluff in PLA e fluff in PCL sono stati sintetizzati utilizzando un'apparecchiatura per elettrospinning convenzionale. Le soluzioni polimeriche da elettrofilare sono state preparate come segue: il 10% in peso di PCL è stato sciolto in diclorometano: etanolo (8:2 vol); il 10% in peso di PLA è stato sciolto in cloroformio: acetone (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; alimentazione ad alta tensione, 15 kV; temperatura, 25 °C, umidità relativa, 40%. I fluff sono stati asciugati per almeno due giorni sotto cappa aspirante al fine di rimuovere eventuali solventi residui. I fluff sono costituiti da fibre in scala nanometrica con una dimensione media del diametro di 1,4 μm .

La tipologia di supporto e le caratteristiche principali dei carrier sono mostrate in Tab. 4.1.

Tab. 4.1 Supporti biopolimerici utilizzati in questo studio.

Tipo di supporto	Polimero	Metodo di Sintesi	Composizione
Scaffold	PLA	Lisciviazione	PLA-PEG-NaCl
Scaffold	PCL	Lisciviazione	PCL-PEG-NaCl
Fluff	PLA	Elettrofilatura	PLA
Fluff	PCL	Elettrofilatura	PCL

PLA: acido polilattico; PCL: policaprolattone.

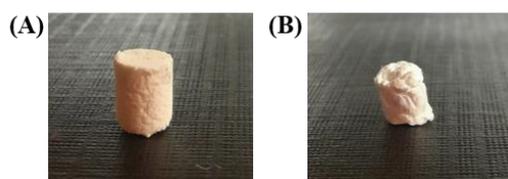


Fig. 4.3 Aspetto macroscopico di uno scaffold (A) e di un fluff (B).

Valutazione della capacità di adesione microbica ai supporti biopolimerici

Preparazione dei supporti biopolimerici

Tutti i supporti biopolimerici sono stati pesati prima di eseguire i test di adesione microbica e di assorbimento del contaminante di seguito descritti, al fine di riportare i risultati dei test all'unità di peso del supporto stesso. Prima della pesatura, i lisciviati (scaffold) di entrambi i materiali, PCL e PLA, sono stati sottoposti a tre lavaggi successivi in acqua distillata, per rimuovere il sale residuo proveniente dalla procedura di lisciviazione. Entrambi i tipi di supporti, scaffold e fluff, inoltre, sono stati fatti essiccare a 37 °C fino al raggiungimento del peso costante (peso secco T0).

Preparazione dei microrganismi

Per valutare la capacità di adesione, formazione del biofilm e proliferazione delle cellule batteriche negli scaffold e fluff in PCL e PLA, è stato selezionato il batterio marino filmogeno *Pseudoalteromonas tetraodonis*, precedentemente isolato nel laboratorio di Microbiologia Ambientale & Ecologia Microbica, a partire da un biofilm microbico adeso a supporti in PLA esposti in mare, e appartenente alla ceppoteca del Dipartimento STEBICEF dell'Università degli Studi di Palermo.

Il ceppo batterico è stato prelevato dallo stab conservato a -80 °C, trasferito su piastre di Marine Agar e incubato a 30 °C per 24 h. Una singola colonia è stata successivamente prelevata e inoculata in 3 mL di terreno di coltura Marine broth. Gli inoculi sono stati incubati a 30 °C in agitazione a 200 rpm per cinque giorni. Al termine del periodo di incubazione la determinazione della crescita batterica è stata effettuata tramite misurazione della densità ottica (OD₆₀₀) allo spettrofotometro.

Immobilizzazione delle cellule batteriche sui supporti biopolimerici

L'immobilizzazione delle cellule batteriche su scaffold e fluff in PCL e PLA, è stata realizzata inoculando colture batteriche di *Pseudoalteromonas tetraodonis* con OD₆₀₀ pari a 0,2 in 3 mL di terreno Marine Broth contenente uno scaffold o un fluff in PLA o in PCL (15 mm x 10 mm). Le colture sono state incubate a 30 °C in agitazione a 200 rpm per 48 h e 96 h. Controlli abiotici sono stati preparati nelle stesse condizioni senza inoculo batterico. Per ogni condizione descritta gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato. Terminato il periodo di incubazione, tutti i

supporti biopolimerici sono stati prelevati dalle colture batteriche in condizioni di sterilità, pesati ed essiccati fino a peso costante per ricavare il peso secco della biomassa adesa al supporto. Prima dell'essiccazione del supporto, un viability test è stato eseguito tamponando il supporto su terreno Marine Agar per verificare la vitalità del microorganismo formante biofilm tramite la crescita di colonie microbiche su piastra.

Valutazione della capacità di assorbimento del contaminante dei supporti biopolimerici

Valutazione della capacità di assorbimento di 1,2-DCA dei supporti biopolimerici in soluzione acquosa

La capacità dei quattro tipi di supporti biopolimerici di assorbire il contaminante 1,2-dicloroetano, sequestrandolo dalla componente acquosa, è stata valutata mediante analisi gascromatografiche in seguito ad incubazione di ogni tipo di supporto (scaffold e fluff, in PLA e in PCL) in una soluzione acquosa a concentrazione nota di 1,2-DCA. In particolare, un supporto di ogni tipo, precedentemente essiccato e pesato, è stato posto in 12 mL di una soluzione acquosa di 1,2-DCA 10 ppm all'interno di vials da 20 mL (23x75 mm, Verex™). Un controllo negativo è stato allestito nelle stesse condizioni in assenza di supporto. Le soluzioni sono state incubate al buio a temperatura ambiente per 48 h prima di essere analizzate mediante HS-GC/MS con il gascromatografo/spettrometro di massa 7890B GC System/7000C GC/MS/MS Triple Quad (Agilent Technologies) col metodo già descritto in precedenza. Secondo il principio per cui il contaminante assorbito dal supporto non partecipa all'equilibrio acqua/spazio di testa, la quantità di 1,2-DCA assorbita da ognuno dei quattro tipi di supporto è stata ricavata per sottrazione di 1,2-DCA residuo nel mezzo acquoso rispetto a una soluzione a concentrazione nota (10 ppm), e riportata all'unità di peso del supporto utilizzato.

Valutazione della capacità di assorbimento di 1,2-DCA dei supporti biopolimerici in acqua contaminata

La capacità dei supporti fluff in PLA di assorbire 1,2-DCA è stata valutata anche in seguito ad incubazione dei supporti nell'acqua contaminata. A tale scopo, in occasione dell'allestimento della seconda serie di microcosmi anaerobi a partire dal campione di acqua contaminata MW33 raccolto nel 2021 descritto nel capitolo 2, sono stati preparati all'interno di vials da 20 mL dei microcosmi costituiti da acqua contaminata trattata con sodio azide (NaN_3) 1% come agente batteriostatico e terreno di coltura BTZ contenente Na-lattato 1 mM in un rapporto di 5:1; a ciascun microcosmo, preparato in maniera analoga ai controlli abiotici (K-) appositamente allestiti per il monitoraggio della biodegradazione di 1,2-DCA in anaerobiosi (Fig. 2.6), sono stati aggiunti tre supporti fluff in PLA e 1,2-DCA ad una concentrazione finale di 100 ppm. I fluff in microcosmo sono stati incubati al buio a temperatura ambiente e, dopo 15 giorni di

incubazione, la concentrazione di 1,2-DCA nel mezzo acquoso è stata misurata mediante HS-GC/MS col metodo già descritto in precedenza, e paragonata a quella rilevata nel controllo abiotico *K*-. Partendo dal presupposto che nei suddetti microcosmi non sussistono attività biodegradative da parte di microrganismi, né reazioni abiotiche di degradazione di 1,2-DCA, come dimostrato e riportato nel capitolo 2, la percentuale di 1,2-DCA assorbito dai supporti è stata stimata come differenza di concentrazione del contaminante tra le due condizioni abiotiche in microcosmo.

Valutazione dell'immobilizzazione di batteri dell'acqua contaminata su supporti biopolimerici

Allo scopo di verificare se batteri direttamente reclutati dall'acqua contaminata oggetto di studio avessero la capacità di formare biofilm su supporti biopolimerici, e se tra questi fossero presenti potenziali batteri biodegradatori di solventi clorurati, i fluff in PLA sono stati posti in un microcosmo costituito esclusivamente dall'acqua contaminata del campione MW33 prelevato nel 2021 e, dopo 30 giorni di incubazione, è stata caratterizzata la comunità batterica immobilizzata sui supporti.

Incubazione dei fluff in microcosmo con acqua contaminata

36 mL del campione di acqua contaminata MW33 prelevato nel 2021 sono stati posti all'interno di serum bottles da 60 mL in condizioni di anaerobiosi, lavorando all'interno di una glove box con atmosfera saturata di N₂, così come precedentemente descritto. Al microcosmo così costituito sono stati aggiunti cinque supporti fluff in PLA. L'allestimento descritto è avvenuto in duplicato e le serum bottles sigillate sono state incubate al buio e a temperatura ambiente. Dopo 30 giorni di incubazione, i fluff sono stati recuperati e da essi è stato estratto il DNA metagenomico da utilizzare per la caratterizzazione della comunità microbica adesa ai supporti.

Estrazione di DNA dai fluff e caratterizzazione della comunità microbica adesa

Il DNA metagenomico è stato estratto dai supporti fluff in PLA immersi in acqua contaminata in una condizione di microcosmo anaerobio dopo 30 giorni di incubazione utilizzando il QIAamp[®] Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), secondo la procedura già descritta in precedenza. Nella fase iniziale della procedura, al fine di ottenere il massimo distacco delle cellule batteriche dai supporti biopolimerici, dopo essere stati posti nel buffer di lisi cellulare (InhibitEx buffer, 2 mL), i fluff sono stati dapprima sonicati in bagnetto a ultrasuoni per 3 min e poi vortexati per 3 min alla massima velocità. Il DNA estratto è stato eluito in 50 µL di acqua distillata ultraPURE™ DNase/RNase-free (GIBCO[®]) e quantificato tramite spettrofotometro NanoDrop[®] ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

Il DNA metagenomico estratto dai fluff è stato utilizzato per analisi 16 rRNA metabarcoding, svolta con le stesse modalità già descritte, al fine di caratterizzare la composizione della comunità microbica immobilizzata sui fluff posti in microcosmo con acqua contaminata per 30 giorni.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Valutazione della colonizzazione microbica dei supporti biopolimerici

Di recente, una innovativa strategia di biorisanamento è stata applicata per la rimozione di contaminanti derivati dal petrolio sfruttando materiali innovativi a basso costo con elevate capacità di assorbimento del contaminante e adatti alla crescita microbica [Scaffaro et al., 2017]. Le spugne in PCL proposte nello studio condotto da Scaffaro et al. (2017) erano in grado di rimuovere idrocarburi e sono state testate con successo come materiali in grado di immobilizzare batteri idrocarburo-degradanti e favorirne l'adesione e la proliferazione a scopi di biorisanamento ambientale. Tenendo conto di ciò, è stata testata la capacità di adesione microbica su simili dispositivi biopolimerici in PCL e in PLA, sintetizzati mediante lisciviazione o elettrofilatura, in funzione di una eventuale futura applicazione in interventi di biorisanamento di acque contaminate da solventi clorurati. Tra i quattro tipi di supporti testati, quelli che hanno mostrato la migliore resa in termini di adesione microbica da parte del microorganismo modello formante biofilm (*Pseudoalteromonas tetraodonis*) sono stati gli scaffold, i quali hanno registrato un aumento medio del peso secco maggiore rispetto ai fluff (Fig. 4.4).

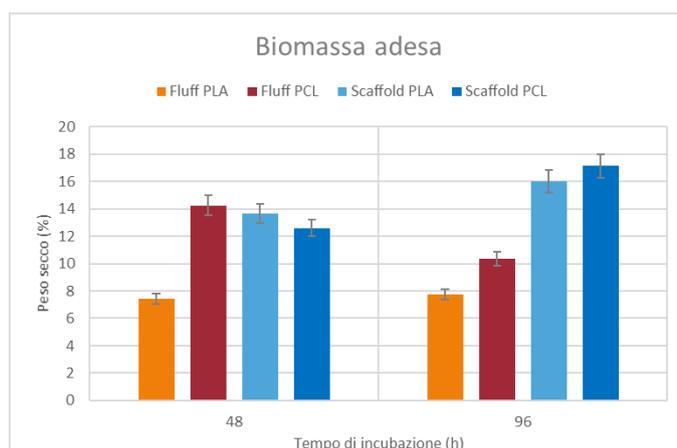


Fig. 4.4 Stima della biomassa microbica adesa ai supporti biopolimerici valutata come aumento medio percentuale del peso secco dei supporti dopo 48 h e 96 h di incubazione in coltura di *Pseudoalteromonas tetraodonis*.

Il viability test, eseguito al termine di ogni tempo di incubazione previsto, ha confermato la vitalità delle cellule adese al supporto (Fig. 4.5).

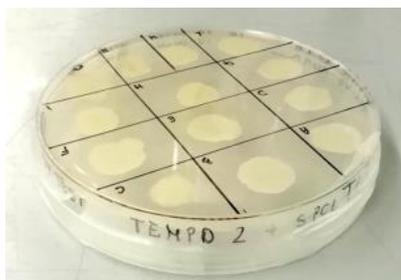


Fig. 4.5 Test di vitalità su Marine Agar di *Pseudoalteromonas tetraodonis* adeso ai supporti biopolimerici (fluff e scaffold) in PCL e PLA dopo 48 h e 96 h di incubazione.

Valutazione della capacità di assorbimento di 1,2-DCA dei supporti biopolimerici

La capacità dei quattro tipi di supporti biopolimerici (scaffold e fluff, in PLA e in PCL) di assorbire 1,2-DCA è stata dapprima valutata utilizzando come mezzo di incubazione una soluzione acquosa a concentrazione nota di 1,2-DCA. In Fig. 4.6 sono mostrati i risultati delle analisi condotte mediante HS-GC/MS ottenuti dopo 48 h di incubazione. Tra i quattro tipi di supporti testati, i fluff in PLA hanno mostrato la migliore resa in termini di assorbimento di 1,2-DCA (5,4 µg di 1,2-DCA assorbito per mg di supporto).

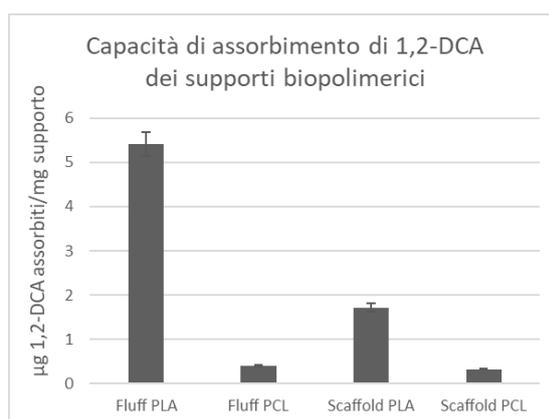


Fig. 4.6 Capacità di assorbimento dei supporti biopolimerici nei confronti dell'1,2-DCA espressa come quantità di 1,2-DCA assorbita per unità di peso del supporto.

In virtù di questo risultato, i fluff in PLA sono stati scelti per valutarne la capacità di assorbimento di 1,2-DCA utilizzando come mezzo di incubazione l'acqua contaminata. A tale scopo i fluff sono stati posti in microcosmo, in una condizione analoga a quella realizzata per i microcosmi di controllo abiotico *K-* della serie di microcosmi anaerobi del 2021 e, dopo 15 giorni di incubazione, è stata misurata la concentrazione di 1,2-DCA mediante HS-GC/MS. I grafici in Fig. 4.7 mostrano la percentuale di concentrazione di 1,2-DCA residuo nel mezzo acquoso del microcosmo rilevata dopo il periodo di incubazione, che per i microcosmi *K-* in assenza di fluff è del 100%, mentre in presenza dei fluff è del 72,5%, ad indicare che i supporti biopolimerici hanno assorbito il 27,5% del contaminante presente in microcosmo al momento del suo allestimento (tempo 0).

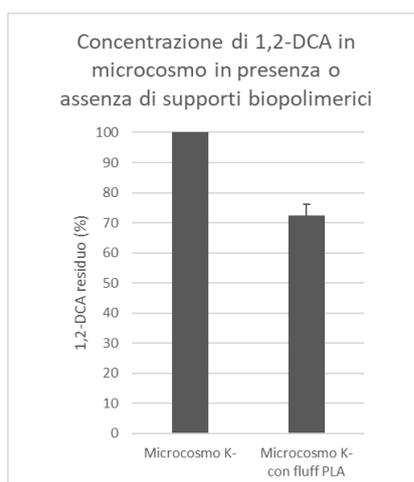


Fig. 4.7 Capacità di assorbimento dei fluff in PLA nei confronti dell'1,2-DCA rilevata in microcosmo costituito da acqua contaminata ed espressa come percentuale di 1,2-DCA residuo nel mezzo acquoso dopo 15 giorni di incubazione.

I supporti biopolimerici utilizzati in questo studio si sono dimostrati in grado di assorbire solventi clorurati, 1,2-DCA in particolare. Nello specifico, i fluff in acido polilattico hanno mostrato discrete capacità di assorbimento del contaminante sia in un sistema di laboratorio, sia in una situazione più simile a quella di campo.

Valutazione dell'immobilizzazione di batteri dell'acqua contaminata su supporti biopolimerici

L'immobilizzazione di batteri direttamente reclutati dall'acqua contaminata oggetto di studio su supporti fluff in PLA è stata valutata caratterizzando la comunità microbica adesa a tali supporti posti per 30 giorni in immersione nel campione di acqua MW33 raccolto nel 2021 in un sistema di microcosmo in anaerobiosi.

La quantità di DNA totale estratto dai supporti era pari a 58,8 ng per singolo fluff.

Dall'analisi 16S rRNA metabarcoding sono state ottenute 18.725 reads finali e 93 OTUs, clusterizzate al 99% di identità. In Fig. 4.8 è riportata la composizione della comunità batterica immobilizzata sui fluff a livello tassonomico di phylum (Fig. 4.8A), famiglia (Fig. 4.8B) e genere (Fig. 4.8C), indicando i taxa identificati con un'abbondanza relativa superiore all'1%. La composizione di tale comunità è risultata notevolmente diversa da quella descritta per il campione di acqua MW33 del 2021 (Fig. 2.18), utilizzato per l'immersione dei fluff in microcosmo. Nonostante il sistema in microcosmo sia stato allestito e incubato in condizioni di anaerobiosi, sono stati identificati sia batteri anaerobi sia aerobi; probabilmente la struttura porosa dei supporti biopolimerici utilizzati ha creato delle nicchie in cui la presenza di O₂ ha stimolato la crescita di batteri aerobi. A livello di phylum, la categoria più rappresentata è quella dei Proteobacteria (63,7%), costituita per la maggior parte da Alphaproteobacteria (29,2%) e Betaproteobacteria (26,2%); seguono i phyla Bacteroidetes (31,9%) e Chlorobi (3%). A livello

di famiglia e genere, la famiglia più abbondante è quella delle Comamonadaceae (25,2%) per la maggior parte rappresentata dal genere *Hydrogenophaga* (24,8%). Nella famiglia delle Comamonadaceae rientrano batteri in grado di svolgere ossidazione diretta o cometabolica di solventi clorurati [Jesus et al., 2016; Dolinová et al., 2017]. *Hydrogenophaga* è un batterio aerobio, chemiorganotrofo o chemolitoautotrofo che usa l'ossidazione di H₂ come fonte di energia e la CO₂ come fonte di carbonio [Willems e Gillis, 2015]; alcuni ceppi hanno dimostrato capacità biodegradative nei confronti di composti clorurati, quali i PCBs [Lambo e Patel, 2007]. Segue per abbondanza la famiglia delle Flavobacteriaceae (15,8%) rappresentata dai generi *Flavobacterium* (10%) e *Muricauda* (5,1%). *Flavobacterium* sono batteri aerobi chemoeterotrofi ampiamente distribuiti in natura, soprattutto in ecosistemi acquatici [Bernardet e Bowman, 2006]; alcune specie possono anche crescere in condizioni microaerofile o anaerobiche e in alcuni ceppi è dimostrata la presenza di enzimi dealogenasi riduttive in grado di dealogenare composti clorurati [Xun et al., 1992]. Presenti anche membri della famiglia delle Xanthobacteraceae (11,2%), fra cui è stato identificato il genere *Ancylobacter* (8,4%), noto per operare dealogenazione idrolitica di 1,2-DCA in condizioni di aerobiosi [Kumar et al., 2020]. Abbastanza rappresentata è anche la famiglia delle Rhodobacteraceae (10,5%), all'interno della quale sono stati identificati i generi *Paracoccus* (5,6%), *Rhodobacter* (2,2%) e *Antarctobacter* (1,4%). Le Rhodobacteraceae sono batteri acquatici che comprendono principalmente foto- e chemioeterotrofi aerobi, ma possono ritrovarsi anche in ambienti anaerobici [Pujalte et al., 2014]. Nel genere *Paracoccus* sono stati descritti ceppi aerobi degradatori di solventi clorurati, come DCM [Field e Sierra-Alvarez, 2004], e l'enzima 2-aloacido dealogenasi descritto in *P. sp. DEH99* si è dimostrato attivo nei confronti della dechlorurazione del DL-2-cloropropionato [Zhang et al., 2014]. Tra i batteri immobilizzati sui fluff sono stati identificati anche membri della famiglia delle Desulfuromonadaceae (1,2%), che, come descritto, comprendono generi di OHRB come *Desulfuromonas*.

La caratterizzazione della comunità batterica che ha aderito ai fluff, suggerisce che tali supporti biopolimerici sono in grado di fornire un substrato fisico utile per l'adesione microbica e la formazione di biofilm da parte di batteri autoctoni all'acqua contaminata, compresi batteri potenzialmente degradatori di 1,2-DCA.

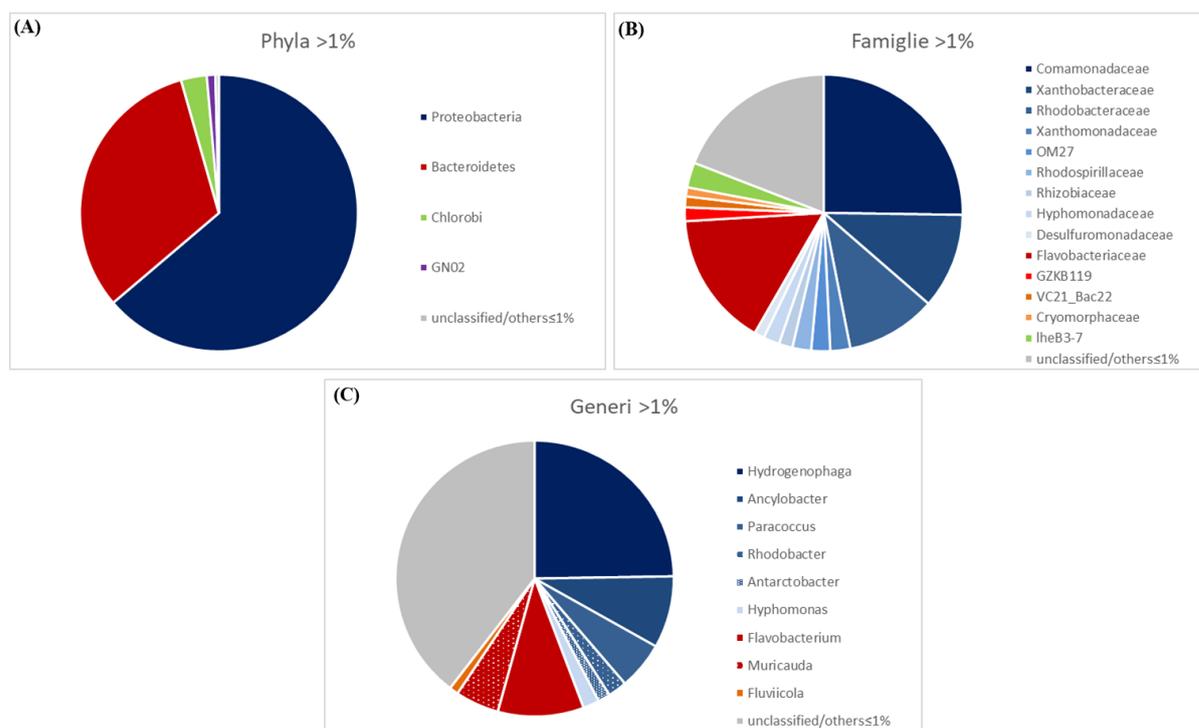


Fig. 4.8 Abbondanza relativa (%) dei phyla (A), delle famiglie (B) e dei generi (C) nella comunità microbica adesa ai supporti fluff in PLA posti per 30 giorni in microcosmo costituito dal campione di acqua contaminata MW33 nel 2021. Sono indicati i taxa con abbondanza relativa >1%; i rimanenti rientrano nella categoria “unclassified/others≤1%”.

CONCLUSIONI

Le indagini descritte nel presente capitolo hanno permesso di mettere a punto un sistema innovativo per il biorisanamento ambientale basato sulla tecnologia dell’immobilizzazione di cellule batteriche su carrier sorbenti biodegradabili. Tra tutti i tipi di supporti biopolimerici testati, i fluff in acido polilattico si sono dimostrati i più performanti sia per la loro capacità di assorbire il contaminante 1,2-dicloroetano, oggetto del presente studio, sia per la loro capacità di fornire un supporto per l’adesione microbica. La natura porosa e le caratteristiche di tali supporti favoriscono la formazione di biofilm microbici, dimostrata sia da parte del microorganismo modello formante biofilm utilizzato (*Pseudoalteromonas tetraodonis*), sia da parte di batteri direttamente reclutati dall’acqua contaminata, comprendenti potenziali batteri biodegradatori di 1,2-DCA.

Nel complesso, questi risultati suggeriscono la potenziale applicazione dei supporti biopolimerici ivi presentati in interventi di biorisanamento *in situ* di acque contaminate da solventi clorurati.

BIBLIOGRAFIA

- Al-Mailem, D. M., Al-Deieg, M., Eliyas, M., & Radwan, S. S. (2017). Biostimulation of indigenous microorganisms for bioremediation of oily hypersaline microcosms from the Arabian Gulf Kuwaiti coasts. *Journal of environmental management*, 193, 576-583.
- Alessandrello, M. J., Tomás, M. S. J., Isaac, P., Vullo, D. L., & Ferrero, A. (2018). Use of immobilized biomass as low-cost technology for bioremediation of PAHs contaminated sites. *Strategies for Bioremediation of Organic and Inorganic Pollutants; CRC Press: Boca Raton, FL, USA*, 67-81.
- Alvarez-Cohen, L., & Speitel, G. E. (2001). Kinetics of aerobic cometabolism of chlorinated solvents. *Biodegradation*, 12(2), 105-126.
- Amanat, N., Maturro, B., Rossi, M. M., Valentino, F., Villano, M., & Petrangeli Papini, M. (2021). Assessment of long-term fermentability of PHA-based materials from pure and mixed microbial cultures for potential environmental applications. *Water*, 13(7), 897.
- Ang, T. F., Maiangwa, J., Salleh, A. B., Normi, Y. M., & Leow, T. C. (2018). Dehalogenases: from improved performance to potential microbial dehalogenation applications. *Molecules*, 23(5), 1100.
- Arp, D. J., Yeager, C. M., & Hyman, M. R. (2001). Molecular and cellular fundamentals of aerobic cometabolism of trichloroethylene. *Biodegradation*, 12(2), 81-103.
- Atashgahi, S., Liebensteiner, M. G., Janssen, D. B., Smidt, H., Stams, A. J., & Sipkema, D. (2018). Microbial synthesis and transformation of inorganic and organic chlorine compounds. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3079.
- Aulenta, F., Fuoco, M., Canosa, A., Petrangeli Papini, M., & Majone, M. (2008). Use of poly- β -hydroxy-butyrate as a slow-release electron donor for the microbial reductive dechlorination of TCE. *Water Science and Technology*, 57(6), 921-925.
- Aulenta, F., Majone, M., & Tandoi, V. (2006b). Enhanced anaerobic bioremediation of chlorinated solvents: environmental factors influencing microbial activity and their relevance under field conditions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 81(9), 1463-1474.
- Aulenta, F., Potalivo, M., Majone, M., Papini, M. P., & Tandoi, V. (2006a). Anaerobic bioremediation of groundwater containing a mixture of 1, 1, 2, 2-tetrachloroethane and chloroethenes. *Biodegradation*, 17(3), 193-206.
- Azizian, M. F., & Semprini, L. (2022). Aerobic Cometabolism of Chlorinated Solvents and 1, 4-Dioxane in Continuous-Flow Columns Packed with Gellan-Gum Hydrogels Coencapsulated with ATCC Strain 21198 and TBOS or T2BOS as Slow-Release Compounds. *ACS ES&T Engineering*.
- 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.
- Berillo, D., Al-Jwaid, A., & Caplin, J. (2021). Polymeric materials used for immobilisation of bacteria for the bioremediation of contaminants in water. *Polymers*, 13(7), 1073.
- Bernardet, J. F., & Bowman, J. P. (2006). The genus flavobacterium. *The prokaryotes*, 7, 481-531.
- Boyle, A. W., Phelps, C. D., & Young, L. Y. (1999). Isolation from estuarine sediments of a *Desulfovibrio* strain which can grow on lactate coupled to the reductive dehalogenation of 2, 4, 6-tribromophenol. *Applied and environmental microbiology*, 65(3), 1133-1140.
- Brusseau, M. L., Arnold, R. G., Ela, W., & Field, J. (2001). Overview of innovative remediation approaches for chlorinated solvents. *Rapport technique, University of Arizona*.
- Buttet, G. F., Holliger, C., & Maillard, J. (2013). Functional genotyping of *Sulfurospirillum* spp. in mixed cultures allowed the identification of a new tetrachloroethene reductive dehalogenase. *Applied and environmental microbiology*, 79(22), 6941-6947.
- Cardinale, M., Brusetti, L., Quatrini, P., Borin, S., Puglia, A. M., Rizzi, A., ... & Daffonchio, D. (2004). Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. *Applied and environmental microbiology*, 70(10), 6147-6156.

- Carpani, G., Marchesi, M., Pietrini, I., Alberti, L., Zaninetta, L. M., Shouakar-Stash, O., & de Ferra, F. (2021). 1, 2-DCA Natural Attenuation Evaluation in Groundwater: Insight by Dual Isotope $^{13}\text{C}/^{37}\text{Cl}$ and Molecular Analysis Approach. *Water*, *13*(5), 728.
- Catania, V., Cappello, S., Di Giorgi, V., Santisi, S., Di Maria, R., Mazzola, A., ... & Quatrini, P. (2018). Microbial communities of polluted sub-surface marine sediments. *Marine Pollution Bulletin*, *131*, 396-406.
- Catania, V., Lopresti, F., Cappello, S., Scaffaro, R., & Quatrini, P. (2020). Innovative, ecofriendly biosorbent-biodegrading biofilms for bioremediation of oil-contaminated water. *New Biotechnology*, *58*, 25-31.
- 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*(1-2), 138-149.
- Chen, J., Bowman, K. S., Rainey, F. A., & Moe, W. M. (2014). Reassessment of PCR primers targeting 16S rRNA genes of the organohalide-respiring genus *Dehalogenimonas*. *Biodegradation*, *25*(5), 747-756.
- Chen, S. K., Yang, H. Y., Huang, S. R., Hung, J. M., Lu, C. J., & Liu, M. H. (2020). Complete degradation of chlorinated ethenes and its intermediates through sequential anaerobic/aerobic biodegradation in simulated groundwater columns (complete degradation of chlorinated ethenes). *International Journal of Environmental Science and Technology*, *17*(11), 4517-4530.
- Chen, X. G., Geng, A. L., Yan, R., Gould, W. D., Ng, Y. L., & Liang, D. T. (2004). Isolation and characterization of sulphur-oxidizing *Thiomonas* sp. and its potential application in biological deodorization. *Letters in applied microbiology*, *39*(6), 495-503.
- Coleman, N. V., Mattes, T. E., Gossett, J. M., & Spain, J. C. (2002). Biodegradation of cis-dichloroethene as the sole carbon source by a β -proteobacterium. *Applied and environmental microbiology*, *68*(6), 2726-2730.
- Corsino, S. F., Di Trapani, D., Traina, F., Cruciata, I., Calabrisotto, L. S., Lopresti, F., ... & Viviani, G. (2022). Integrated production of biopolymers with industrial wastewater treatment: Effects of OLR on process yields, biopolymers characteristics and mixed microbial community enrichment. *Journal of Water Process Engineering*, *47*, 102772.
- Cutiño-Jiménez, A. M., Menck, C. F. M., Cambas, Y. T., & Díaz-Pérez, J. C. (2020). Protein signatures to identify the different genera within the Xanthomonadaceae family. *Brazilian Journal of Microbiology*, *51*(4), 1515-1526.
- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., ... & Wagner, M. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, *528*(7583), 504-509.
- Danko, A. S., Saski, C. A., Tomkins, J. P., & Freedman, D. L. (2006). Involvement of coenzyme M during aerobic biodegradation of vinyl chloride and ethene by *Pseudomonas putida* strain AJ and *Ochrobactrum* sp. strain TD. *Applied and environmental microbiology*, *72*(5), 3756-3758.
- Das, S., & Barooah, M. (2018). Characterization of siderophore producing arsenic-resistant *Staphylococcus* sp. strain TA6 isolated from contaminated groundwater of Jorhat, Assam and its possible role in arsenic geocycle. *BMC microbiology*, *18*(1), 1-11.
- Das, S., & Dash, H. R. (2014). Microbial bioremediation: A potential tool for restoration of contaminated areas. In *Microbial biodegradation and bioremediation* (pp. 1-21). Elsevier.
- Davidova, I. A., Wawrik, B., Callaghan, A. V., Duncan, K., Marks, C. R., & Suflita, J. M. (2016). *Dethiosulfatarculus sandiegensis* gen. nov., sp. nov., isolated from a methanogenic paraffin-degrading enrichment culture and emended description of the family Desulfarculaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *66*(3), 1242-1248.

- De Wildeman, S., Diekert, G., Van Langenhove, H., & Verstraete, W. (2003b). Stereoselective microbial dehalorespiration with vicinal dichlorinated alkanes. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5643-5647.
- De Wildeman, S., Neumann, A., Diekert, G., & Verstraete, W. (2003a). Growth-substrate dependent dechlorination of 1, 2-dichloroethane by a homoacetogenic bacterium. *Biodegradation*, 14(4), 241-247.
- Devlin, J. F., Katic, D., & Barker, J. F. (2004). In situ sequenced bioremediation of mixed contaminants in groundwater. *Journal of contaminant hydrology*, 69(3-4), 233-261.
- DeWeerd, K. A., Mandelco, L., Tanner, R. S., Woese, C. R., & Suflita, J. M. (1990). Desulfomonile tiedjei gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium. *Archives of Microbiology*, 154(1), 23-30.
- Di Molfetta, A., & Sethi, R. (2012). *Ingegneria degli acquiferi*. Springer Science & Business Media.
- Dinglasan-Panlilio, M. J., Dworatzek, S., Mabury, S., & Edwards, E. (2006). Microbial oxidation of 1, 2-dichloroethane under anoxic conditions with nitrate as electron acceptor in mixed and pure cultures. *FEMS microbiology ecology*, 56(3), 355-364.
- Dolinová, I., Štrojsová, M., Černík, M., Němeček, J., Macháčková, J., & Ševců, A. (2017). Microbial degradation of chloroethenes: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(15), 13262-13283.
- Druschel, S. J., & Kinner, N. E. (2013). Improvements to TCE microcosm protocols for biostimulation in bedrock aquifers. *Remediation Journal*, 23(1), 73-84.
- Drzyzga, O., Gerritse, J., Dijk, J. A., Elissen, H., & Gottschal, J. C. (2001). Coexistence of a sulphate-reducing Desulfovibrio species and the dehalorespiring Desulfitobacterium frappieri TCE1 in defined chemostat cultures grown with various combinations of sulphate and tetrachloroethene. *Environmental Microbiology*, 3(2), 92-99.
- Escobedo-Morales, G., Hernández-Beltrán, J. U., Balagurusamy, N., Hernández-Almanza, A. Y., & Luévanos-Escareño, M. P. (2022). Immobilized enzymes and cell systems: an approach to the removal of phenol and the challenges to incorporate nanoparticle-based technology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(3), 1-20.
- Fetzner, S. (1998). Bacterial dehalogenation. *Applied microbiology and biotechnology*, 50(6), 633-657.
- Field, J. A., & Sierra-Alvarez, R. (2004). Biodegradability of chlorinated solvents and related chlorinated aliphatic compounds. *Reviews in environmental Science and Bio/technology*, 3(3), 185-254.
- Fisher, M. M., & Triplett, E. W. (1999). Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and environmental microbiology*, 65(10), 4630-4636.
- 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. *Applied and environmental microbiology*, 74(8), 2461-2470.
- Frascari, D., Zanaroli, G., & Danko, A. S. (2015). In situ aerobic cometabolism of chlorinated solvents: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 283, 382-399.
- Ghaju Shrestha, R., Tanaka, Y., & Haramoto, E. (2022). A Review on the Prevalence of Arcobacter in Aquatic Environments. *Water*, 14(8), 1266.
- Goris, T., & Diekert, G. (2016). The genus sulfurospirillum. In *Organohalide-respiring bacteria* (pp. 209-234). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Goswami, M., Chakraborty, P., Mukherjee, K., Mitra, G., Bhattacharyya, P., Dey, S., & Tribedi, P. (2018). Bioaugmentation and biostimulation: a potential strategy for environmental remediation. *J Microbiol Exp*, 6(5), 223-231.
- Govender, A., & Pillay, B. (2011). Characterization of 1, 2-dichloroethane (DCA) degrading bacteria isolated from South African waste water. *African Journal of Biotechnology*, 10(55), 11567-11573.

- Gribble, G. W. (2003). The diversity of naturally occurring organohalogen compounds. *Chemosphere*, 52, 289-297.
- Grosterm, A., & Edwards, E. A. (2006). Growth of Dehalobacter and Dehalococcoides spp. during degradation of chlorinated ethanes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 428-436.
- Grosterm, A., & Edwards, E. A. (2009). Characterization of a Dehalobacter coculture that dechlorinates 1, 2-dichloroethane to ethene and identification of the putative reductive dehalogenase gene. *Applied and environmental microbiology*, 75(9), 2684-2693.
- Guerrero-Barajas, C., Garibay-Orijel, C., & Rosas-Rocha, L. E. (2011). Sulfate reduction and trichloroethylene biodegradation by a marine microbial community from hydrothermal vents sediments. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), 116-123.
- Hage, J. C., & Hartmans, S. (1999). Monooxygenase-mediated 1, 2-dichloroethane degradation by *Pseudomonas* sp. strain DCA1. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), 2466-2470.
- Hallbeck, L. E. L., & Pedersen, K. (2015). Gallionella. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-10.
- Han, Y., & Perner, M. (2015). The globally widespread genus *Sulfurimonas*: versatile energy metabolisms and adaptations to redox clines. *Frontiers in microbiology*, 6, 989.
- Hau, H. H., & Gralnick, J. A. (2007). Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 61, 237-258.
- Holliger, C., & Schraa, G. (1994). Physiological meaning and potential for application of reductive dechlorination by anaerobic bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 15(2-3), 297-305.
- Holliger, C., Schraa, G., Stupperich, E., Stams, A. J., & Zehnder, A. J. (1992). Evidence for the involvement of corrinoids and factor F430 in the reductive dechlorination of 1, 2-dichloroethane by *Methanosarcina barkeri*. *Journal of Bacteriology*, 174(13), 4427-4434.
- Huang, B., Lei, C., Wei, C., & Zeng, G. (2014). Chlorinated volatile organic compounds (Cl-VOCs) in environment—sources, potential human health impacts, and current remediation technologies. *Environment international*, 71, 118-138.
- Hug, L. A., & Edwards, E. A. (2013). Diversity of reductive dehalogenase genes from environmental samples and enrichment cultures identified with degenerate primer PCR screens. *Frontiers in microbiology*, 4, 341.
- Hug, L. A., Maphosa, F., Leys, D., Löffler, F. E., Smidt, H., Edwards, E. A., & Adrian, L. (2013). Overview of organohalide-respiring bacteria and a proposal for a classification system for reductive dehalogenases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1616), 20120322.
- Janssen, D. B., Pries, F., van der Ploeg, J., Kazemier, B., Terpstra, P., & Witholt, B. (1989). Cloning of 1, 2-dichloroethane degradation genes of *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 and expression and sequencing of the *dhlA* gene. *Journal of bacteriology*, 171(12), 6791-6799.
- Jesus, J., Frascari, D., Pozdniakova, T., & Danko, A. S. (2016). Kinetics of aerobic cometabolic biodegradation of chlorinated and brominated aliphatic hydrocarbons: A review. *Journal of hazardous materials*, 309, 37-52.
- Jiang, L., Yang, Y., Jin, H., Wang, H., Swift, C. M., Xie, Y., ... & Yan, J. (2022). *Geobacter* sp. Strain IAE Dihaloeliminates 1, 1, 2-Trichloroethane and 1, 2-Dichloroethane. *Environmental Science & Technology*, 56(6), 3430-3440.
- Jugder, B. E., Ertan, H., Bohl, S., Lee, M., Marquis, C. P., & Manefield, M. (2016). Organohalide respiring bacteria and reductive dehalogenases: key tools in organohalide bioremediation. *Frontiers in microbiology*, 7, 249.
- Kao, C. M., Liao, H. Y., Chien, C. C., Tseng, Y. K., Tang, P., Lin, C. E., & Chen, S. C. (2016). The change of microbial community from chlorinated solvent-contaminated groundwater after biostimulation using the metagenome analysis. *Journal of hazardous materials*, 302, 144-150.

- Keuning, S., Janssen, D. B., & Witholt, B. (1985). Purification and characterization of hydrolytic haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *Journal of bacteriology*, 163(2), 635-639.
- Kocamemi, B. A., & Çeçen, F. (2009). Biodegradation of 1, 2-dichloroethane (1, 2-DCA) by cometabolism in a nitrifying biofilm reactor. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(6), 717-726.
- Kodama, Y., & Watanabe, K. (2004). *Sulfuricurvum kujiense* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground crude-oil storage cavity. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(6), 2297-2300.
- Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H. N., & Reis, M. A. (2017). Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioengineering*, 4(2), 55.
- Kuever, J., Rainey, F. A., & Widdel, F. (2015). *Desulfuromonas*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-7.
- Kumar, A., Bisht, B. S., Joshi, V. D., & Dhewa, T. (2011). Review on bioremediation of polluted environment: A management tool. *International journal of environmental sciences*, 1(6), 1079.
- Kumar, A., Pillay, B., & Olaniran, A. O. (2020). Genome sequence and metabolic analysis revealed the catabolic pathways for the degradation of 1, 2-dichloroethane and other related Xenobiotics in *Ancylobacter aquaticus* strain UV5. *Gene Reports*, 21, 100969.
- Kumar, M., Zeyad, M. T., Choudhary, P., Paul, S., Chakdar, H., & Rajawat, M. V. S. (2020). *Thiobacillus*. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 545-557). Academic Press.
- Lambo, A. J., & Patel, T. R. (2007). Biodegradation of polychlorinated biphenyls in Aroclor 1232 and production of metabolites from 2, 4, 4'-trichlorobiphenyl at low temperature by psychrotolerant *Hydrogenophaga* sp. strain IA3-A. *Journal of applied microbiology*, 102(5), 1318-1329.
- Lapidus, A., Clum, A., LaButti, K., Kaluzhnaya, M. G., Lim, S., Beck, D. A., ... & Chistoserdova, L. (2011). Genomes of three methylotrophs from a single niche reveal the genetic and metabolic divergence of the Methylophilaceae. *Journal of bacteriology*, 193(15), 3757-3764.
- Le, N. B., & Coleman, N. V. (2011). Biodegradation of vinyl chloride, cis-dichloroethene and 1, 2-dichloroethane in the alkene/alkane-oxidising *Mycobacterium* strain NBB4. *Biodegradation*, 22(6), 1095-1108.
- Leys, D., Adrian, L., & Smidt, H. (2013). Organohalide respiration: microbes breathing chlorinated molecules. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1616), 20120316.
- Li, C., Reimers, C. E., & Alleau, Y. (2021). Using Oxidative Electrodes to Enrich Novel Members in the *Desulfobulbaceae* Family from Intertidal Sediments. *Microorganisms*, 9(11), 2329.
- Liu, J. R., Fang, S., Ding, M. P., Chen, Z. C., Zhou, J. J., Sun, F., ... & Huang, J. (2010). Toxic encephalopathy caused by occupational exposure to 1, 2-Dichloroethane. *Journal of the neurological sciences*, 292(1-2), 111-113.
- Löffler, F. E., Sanford, R. A., & Ritalahti, K. M. (2005). Enrichment, cultivation, and detection of reductively dechlorinating bacteria. *Methods in enzymology*, 397, 77-111.
- Löffler, F. E., Sun, Q., Li, J., & Tiedje, J. M. (2000). 16S rRNA gene-based detection of tetrachloroethene-dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1369-1374.
- Low, A., Zhao, S., Rogers, M. J., Zemb, O., Lee, M., He, J., & Manefield, M. (2019). Isolation, characterization and bioaugmentation of an acidotolerant 1, 2-dichloroethane respiring *Desulfitobacterium* species from a low pH aquifer. *FEMS microbiology ecology*, 95(5), fiz055.

- Maillard, J., Schumacher, W., Vazquez, F., Regard, C., Hagen, W. R., & Holliger, C. (2003). Characterization of the corrinoid iron-sulfur protein tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalobacter restrictus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(8), 4628-4638.
- Mao, X., Oremland, R. S., Liu, T., Gushgari, S., Landers, A. A., Baesman, S. M., & Alvarez-Cohen, L. (2017). Acetylene fuels TCE reductive dechlorination by defined *Dehalococcoides/Pelobacter* consortia. *Environmental science & technology*, *51*(4), 2366-2372.
- Marzorati, M., Borin, S., Brusetti, L., Daffonchio, D., Marsilli, C., Carpani, G., & de Ferra, F. (2006). Response of 1, 2-dichloroethane-adapted microbial communities to ex-situ biostimulation of polluted groundwater. *Biodegradation*, *17*(2), 41-56.
- Marzorati, M., De Ferra, F., Van Raemdonck, H., Borin, S., Alliffranchini, E., Carpani, G., ... & Daffonchio, D. (2007). A novel reductive dehalogenase, identified in a contaminated groundwater enrichment culture and in *Desulfitobacterium dichloroeliminans* strain DCA1, is linked to dehalogenation of 1, 2-dichloroethane. *Applied and environmental microbiology*, *73*(9), 2990-2999.
- McAllister, S. M., Moore, R. M., Gartman, A., Luther III, G. W., Emerson, D., & Chan, C. S. (2019). The Fe (II)-oxidizing Zetaproteobacteria: historical, ecological and genomic perspectives. *FEMS microbiology ecology*, *95*(4), fiz015.
- McCarty, P. L. (1997). Breathing with chlorinated solvents. *Science*, *276*(5318), 1521-1522.
- Memon, H., Lanjewar, K., Dafale, N., & Kapley, A. (2020). Immobilization of microbial consortia on natural matrix for bioremediation of wastewaters. *International Journal of Environmental Research*, *14*(4), 403-413.
- Merlino, G., Balloi, A., Marzorati, M., Mapelli, F., Rizzi, A., Lavazza, D., ... & Daffonchio, D. (2015). Diverse reductive dehalogenases are associated with Clostridiales-enriched microcosms dechlorinating 1, 2-dichloroethane. *BioMed research international*, *2015*.
- Molenda, O., Jácome, L. A. P., Cao, X., Nesbø, C. L., Tang, S., Morson, N., ... & Edwards, E. A. (2020). Insights into origins and function of the unexplored majority of the reductive dehalogenase gene family as a result of genome assembly and ortholog group classification. *Environmental Science: Processes & Impacts*, *22*(3), 663-678.
- Moran, M. J., Zogorski, J. S., & Squillace, P. J. (2007). Chlorinated solvents in groundwater of the United States. *Environmental Science & Technology*, *41*(1), 74-81.
- Morgan-Sagastume, F. (2016). Characterisation of open, mixed microbial cultures for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, *15*(4), 593-625.
- Morkin, M., Devlin, J. F., Barker, J. F., & Butler, B. J. (2000). In situ sequential treatment of a mixed contaminant plume. *Journal of Contaminant Hydrology*, *45*(3-4), 283-302.
- Munro, J. E., Kimyon, Ö., Rich, D. J., Koenig, J., Tang, S., Low, A., ... & Coleman, N. V. (2017). Co-occurrence of genes for aerobic and anaerobic biodegradation of dichloroethane in organochlorine-contaminated groundwater. *FEMS Microbiology Ecology*, *93*(11), fix133.
- Munro, J. E., Liew, E. F., Ly, M. A., & Coleman, N. V. (2016). A new catabolic plasmid in *Xanthobacter* and *Starkeya* spp. from a 1, 2-dichloroethane-contaminated site. *Applied and environmental microbiology*, *82*(17), 5298-5308.
- Murínová, S., & Dercová, K. (2014). Potential use of newly isolated bacterial strain *Ochrobactrum anthropi* in bioremediation of polychlorinated biphenyls. *Water, Air, & Soil Pollution*, *225*(6), 1-16.
- Nagano, K., Umeda, Y., Senoh, H., Gotoh, K., Arito, H., Yamamoto, S., & Matsushima, T. (2006). Carcinogenicity and chronic toxicity in rats and mice exposed by inhalation to 1, 2-dichloroethane for two years. *Journal of occupational health*, *48*(6), 424-436.

- Nishino, S. F., Shin, K. A., Gossett, J. M., & Spain, J. C. (2013). Cytochrome P450 initiates degradation of cis-dichloroethene by *Polaromonas* sp. strain JS666. *Applied and environmental microbiology*, 79(7), 2263-2272.
- Nobre, R. C. M., Nobre, M. M. M., Campos, T. M. P., & Ogles, D. (2017). In-situ biodegradation potential of 1, 2-DCA and VC at sites with different hydrogeological settings. *Journal of hazardous materials*, 340, 417-426.
- Noell, A. L. (2009). Estimation of sequential degradation rate coefficients for chlorinated ethenes. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, 13(1), 35-44.
- Palau, J., Yu, R., Hatijah Mortan, S., Shouakar-Stash, O., Rosell, M., Freedman, D. L., ... & Hunkeler, D. (2017). Distinct dual C–Cl isotope fractionation patterns during anaerobic biodegradation of 1, 2-dichloroethane: Potential to characterize microbial degradation in the field. *Environmental Science & Technology*, 51(5), 2685-2694.
- Pardieck, D. L., Bower, E. J., & Stone, A. T. (1992). Hydrogen peroxide use to increase oxidant capacity for in situ bioremediation of contaminated soils and aquifers: A review. *Journal of Contaminant Hydrology*, 9(3), 221-242.
- Partovinia, A., & Rasekh, B. (2018). Review of the immobilized microbial cell systems for bioremediation of petroleum hydrocarbons polluted environments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 48(1), 1-38.
- Pierro, L., Matturro, B., Rossetti, S., Sagliaschi, M., Sucato, S., Alesi, E., ... & Papini, M. P. (2017). Polyhydroxyalkanoate as a slow-release carbon source for in situ bioremediation of contaminated aquifers: From laboratory investigation to pilot-scale testing in the field. *New biotechnology*, 37, 60-68.
- Pujalte, M. J., Lucena, T., Ruvira, M. A., Arahal, D. R., & Macián, M. C. (2014). The family rhodobacteraceae. Springer.
- Quatrini, P., Scaglione, G., De Pasquale, C., RIELA, S., & 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.
- Regeard, C., Maillard, J., & Holliger, C. (2004). Development of degenerate and specific PCR primers for the detection and isolation of known and putative chloroethene reductive dehalogenase genes. *Journal of Microbiological Methods*, 56(1), 107-118.
- Ritz, K. (2007). The plate debate: cultivable communities have no utility in contemporary environmental microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 60(3), 358-362.
- Robertson, W. J., Bowman, J. P., Franzmann, P. D., & Mee, B. J. (2001). *Desulfosporosinus meridiei* sp. nov., a spore-forming sulfate-reducing bacterium isolated from gasoline-contaminated groundwater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1), 133-140.
- Rodrigues, R., Betelu, S., Colombano, S., Tzedakis, T., Masselot, G., & Ignatiadis, I. (2020). In situ chemical reduction of chlorinated organic compounds. In *Environmental Soil Remediation and Rehabilitation* (pp. 283-398). Springer, Cham.
- 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.
- Scaffaro, R., Maio, A., Sutura, F., Gulino, E. F., & Morreale, M. (2019). Degradation and recycling of films based on biodegradable polymers: A short review. *Polymers*, 11(4), 651.
- Sharma, P., Bano, A., Singh, S. P., Dubey, N. K., Chandra, R., & Iqbal, H. M. (2022). Microbial fingerprinting techniques and their role in the remediation of environmental pollution. *Cleaner Chemical Engineering*, 100026.

- Simankova, M. V., & Kotsyurbenko, O. R. (2015). Acetobacterium. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-11.
- Sonawane, J. M., Rai, A. K., Sharma, M., Tripathi, M., & Prasad, R. (2022). Microbial biofilms: Recent advances and progress in environmental bioremediation. *Science of The Total Environment*, 153843.
- Song, J. S., Lee, D. H., Lee, K., & Kim, C. K. (2004). Genetic organization of the dh1A gene encoding 1, 2-dichloroethane dechlorinase from *Xanthobacter flavus* UE15. *Journal of Microbiology*, 42(3), 188-193.
- Sridharan, R., & Krishnaswamy, V. G. (2022). Biofilm mediated bioremediation and other applications. In *Development in Wastewater Treatment Research and Processes* (pp. 449-459). Elsevier.
- Stams, A. J., & Oude Elferink, S. J. (2015). Desulfobacca. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-2.
- Stening, J., Manefield, M., Zemb, O., Przepiora, A., & Vogán, J. (2008). Reductive dechlorination of 1, 2-dichloroethane in a reactive iron barrier. In *Proceedings of the Sixth International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds* (pp. 19-22).
- Stolz, J. F., Oremland, R. S., Paster', B. J., Dewhirst, F. E., & Vandamme, P. (2015). Sulfurospirillum. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-7.
- Stroo, H. F., & Ward, C. H. (Eds.). (2010). *In situ remediation of chlorinated solvent plumes*. Springer Science & Business Media.
- Surkov, A. V., Dubinina, G. A., Lysenko, A. M., Glöckner, F. O., & Kuever, J. (2001). Dethiosulfovibrio russensis sp. nov., Dethiosulfovibrio marinus sp. nov. and Dethiosulfovibrio acidaminovorans sp. nov., novel anaerobic, thiosulfate- and sulfur-reducing bacteria isolated from Thiodendron/sulfur mats in different saline environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 327-337.
- Suyama, A., Yamashita, M., Yoshino, S., & Furukawa, K. (2002). Molecular characterization of the PceA reductive dehalogenase of Desulfitobacterium sp. strain Y51. *Journal of Bacteriology*, 184(13), 3419-3425.
- Szydłowski, L., Lan, T. C., Shibata, N., & Goryanin, I. (2020). Metabolic engineering of a novel strain of electrogenic bacterium *Arcobacter butzleri* to create a platform for single analyte detection using a microbial fuel cell. *Enzyme and Microbial Technology*, 139, 109564.
- Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., & Nishijima, M. (2014). Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PloS one*, 9(8), e105592.
- Temme, H. R., Carlson, A., & Novak, P. J. (2019). Presence, diversity, and enrichment of respiratory reductive dehalogenase and non-respiratory hydrolytic and oxidative dehalogenase genes in terrestrial environments. *Frontiers in microbiology*, 1258.
- Trubitsyn, I. V., Belousova, E. V., Tutukina, M. N., Merkel, A. Y., Dubinina, G. A., & Grabovich, M. Y. (2014). Expansion of ability of denitrification within the filamentous colorless sulfur bacteria of the genus *Thiothrix*. *FEMS Microbiology Letters*, 358(1), 72-80.
- Türkowsky, D., Jehmlich, N., Diekert, G., Adrian, L., von Bergen, M., & Goris, T. (2018). An integrative overview of genomic, transcriptomic and proteomic analyses in organohalide respiration research. *FEMS microbiology ecology*, 94(3), fiy013.
- United States Environmental Protection Agency. *Final Scope of the Risk Evaluation for 1,2-Dichloroethane*; Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, 2020. https://www.epa.gov/sites/default/files/2020-09/documents/casrn_107-06-2_12-dichloroethane_final_scope.pdf
- United States Environmental Protection Agency. *Proposed Designation of 1,2-Dichloroethane as a High-Priority Substance for Risk Evaluation*; Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, 2019. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=P100XPQQ.txt>

- Valentino, F., Moretto, G., Lorini, L., Bolzonella, D., Pavan, P., & Majone, M. (2019). Pilot-scale polyhydroxyalkanoate production from combined treatment of organic fraction of municipal solid waste and sewage sludge. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 58(27), 12149-12158.
- van den Wijngaard, A. J., Van der Kamp, K. W., van der Ploeg, J., Pries, F., Kazemier, B., & Janssen, D. B. (1992). Degradation of 1, 2-dichloroethane by *Ancylobacter aquaticus* and other facultative methylotrophs. *Applied and environmental microbiology*, 58(3), 976-983.
- Voordouw, G. (1995). The genus *Desulfovibrio*: the centennial. *Applied and environmental microbiology*, 61(8), 2813-2819.
- Wang, Q., Zhou, G., Qin, Y., Wang, R., Li, H., Xu, F., ... & Kong, Q. (2021). Sulfate removal performance and co-occurrence patterns of microbial community in constructed wetlands treating saline wastewater. *Journal of Water Process Engineering*, 43, 102266.
- Wang, S., Chen, C., Zhao, S., & He, J. (2019). Microbial synergistic interactions for reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls. *Science of the Total Environment*, 666, 368-376.
- Willems, A., & Gillis, M. (2015). Hydrogenophaga. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-15.
- Woese, C. R., Gutell, R., Gupta, R., & Noller, H. F. (1983). Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiological reviews*, 47(4), 621-669.
- Xiao, Z., Jiang, W., Chen, D., & Xu, Y. (2020). Bioremediation of typical chlorinated hydrocarbons by microbial reductive dechlorination and its key players: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 202, 110925.
- Xing, Z., Su, X., Zhang, X., Zhang, L., & Zhao, T. (2022). Direct aerobic oxidation (DAO) of chlorinated aliphatic hydrocarbons: A review of key DAO bacteria, biometabolic pathways and in-situ bioremediation potential. *Environment International*, 162, 107165.
- Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., ... & Yu, H. (2018). Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis. *Frontiers in microbiology*, 9, 2885.
- Xun, L. U. Y. I. N. G., Topp, E., & Orser, C. S. (1992). Purification and characterization of a tetrachloro-p-hydroquinone reductive dehalogenase from a *Flavobacterium* sp. *Journal of bacteriology*, 174(24), 8003-8007.
- Yadav, M. K. (2017). Role of biofilms in environment pollution and control. In *Microbial Biotechnology* (pp. 377-398). Springer, Singapore.
- Yu, Z., Beck, D. A., & Chistoserdova, L. (2017). Natural selection in synthetic communities highlights the roles of Methylococcaceae and Methylophilaceae and suggests differential roles for alternative methanol dehydrogenases in methane consumption. *Frontiers in microbiology*, 8, 2392.
- Zelko, I. N., Taylor, B. S., Das, T. P., Watson, W. H., Sithu, I. D., Wahlang, B., ... & Srivastava, S. (2022). Effect of vinyl chloride exposure on cardiometabolic toxicity. *Environmental Toxicology*, 37(2), 245-255.
- Zhang, J., Xin, Y., Cao, X., Xue, S., & Zhang, W. (2014). Purification and characterization of 2-haloacid dehalogenase from marine bacterium *Paracoccus* sp. DEH99, isolated from marine sponge *Hymeniacidon perlevis*. *Journal of Ocean University of China*, 13(1), 91-96.

Ringraziamenti

Questa tesi rappresenta la conclusione di un percorso di studi e di crescita professionale e personale, un percorso a volte tortuoso, complicato e pieno di imprevisti, ma anche stimolante e ricco di preziosi insegnamenti nella ricerca e nella vita. Per questo percorso e la meta raggiunta mi sento immensamente riconoscente e desidero ringraziare le persone più importanti che ne hanno fatto parte.

Un sentito ringraziamento va alla prof.ssa Paola Quatrini, guida presente e stimolante durante l'intero dottorato: grazie per avermi insegnato a fare ricerca in un ambito per me del tutto inesplorato e per la stima che ho sempre sentito forte nei miei riguardi.

Un doveroso ringraziamento al prof. Andrea Pace, tutor di questa tesi e prezioso supporto per le indagini chimiche.

Grazie al prof. Roberto Scaffaro e al dott. Daniele Di Trapani e i loro rispettivi gruppi di ricerca, per le collaborazioni che hanno arricchito l'interdisciplinarietà di questo lavoro.

Il mio ringraziamento è anche per il prof. Fabio Caradonna il quale, seppur non direttamente coinvolto in questo dottorato, è per me "papà scientifico", costante guida e fermo punto di riferimento; grazie per aver sempre creduto in me, più di quanto io stessa non faccia, e per la grande stima reciproca, personale e professionale.

Un grazie speciale alla dott.ssa Valentina Catania per i consigli, il sostegno e la sincera amicizia che nel tempo è maturata: ci sei sempre stata e questa tesi è anche un po' tua!

Ringrazio la dott.ssa Laura Scirè Calabrisotto per aver condiviso insieme il lavoro di ricerca e la dott.ssa Elisa Maria Petta per la solarità portata nel gruppo di laboratorio.

Con tutto l'amore che ho, ringrazio la mia famiglia: mio marito e i miei figli, motore della mia esistenza. A mio marito Alberto, mio fidato ed essenziale compagno di squadra, grazie per esserci sempre, per aver gioito con me dei successi, per aver lenito lo sconforto di certi momenti e per avermi sempre dato forza e determinazione per andare avanti. Ai miei figli, Federico il mio ometto grande di cui sono ogni giorno più fiera, e Michele, il mio piccolo adorato tornado nato durante questo dottorato: con voi questo percorso è stata la sfida più meravigliosamente difficile che ho superato! Grazie per l'immenso dono di essere la vostra mamma.

Infine, ringrazio mio padre, mia luce perenne che dal cielo mi ha sempre guidata; la sento la tua fierezza per me, oggi come quando eri al mio fianco.

Ilenia Cruciana