

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”

in consorzio con

***SECONDA UNIVERSITÀ DI NAPOLI
UNIVERSITÀ “PARTHENOPE” NAPOLI***

in convenzione con

***ISTITUTO PER L’AMBIENTE MARINO COSTIERO – C.N.R.
STAZIONE ZOOLOGICA “ANTON DOHRN”***

Dottorato in Scienze ed Ingegneria del Mare
XVII ciclo

Tesi di Dottorato

**ANALISI SU MEDIA SCALA DELL’EVOLUZIONE DI
CONTAMINANTI IDROCARBURICI IN AMBIENTI MARINI:
RUOLO ED OTTIMIZZAZIONE DELLE POTENZIALITA’
BIODEGRADATIVE DELLE POPOLAZIONE NATURALI**

Candidato: Dott. **Simone CAPPELLO** Relatore: Dr.ssa **Laura GIULIANO**

Co-Relatore: Dott. **Marc TROUSSELLIER**

Il Coordinatore del Dottorato: Prof. **Bruno D’Argenio**

ANNO 2005

ITACA

Quando ti metterai in viaggio per Itaca
devi augurarti che la strada sia lunga
fertile in avventure e in esperienze.

I Lestrigoni e i Ciclopi
o la furia di Nettuno non temere,
non sarà questo il genere d'incontri
se il pensiero resta alto e il sentimento
fermo guida il tuo spirito e il tuo corpo.

In Ciclopi e Lestrigoni, no certo
né nell'irato Nettuno incapperai
se non li porti dentro
se l'anima non te li mette contro.

Devi augurarti che la strada sia lunga
che i mattini d'estate siano tanti
quando nei porti - finalmente e con che gioia -
toccherai terra tu per la prima volta:
negli empori fenici indugia e acquista
madreperle coralli ebano e ambre
tutta merce fina, anche aromi
penetranti d'ogni sorta, più aromi
inebrianti che puoi,
va in molte città egizie
impara una quantità di cose dai dotti.

Sempre devi avere in mente Itaca
- raggiungerla sia il pensiero costante.
Soprattutto, non affrettare il viaggio;
fa che duri a lungo, per anni, e che da vecchio
metta piede sull'isola, tu, ricco
dei tesori accumulati per strada
senza aspettarti ricchezze da Itaca.

Itaca ti ha dato il bel viaggio,
senza di lei mai ti saresti messo
in viaggio: che cos'altro ti aspetti?

E se la trovi povera, non per questo Itaca ti avrà deluso.
Fatto ormai savio, con tutta la tua esperienza addosso
Già tu avrai capito ciò che Itaca vuole significare.

Costantino Kavafis

Un grazie speciale va a **Laura Giuliano**...la nostra “Capessa” e la nostra “Mamma”...un incrocio tra “Wonder Woman” e “Biancaneve”. Le dedico una frase che è stata oggetto di alcune nostre e-mail e conversazioni che riassume il fulcro principale delle nostre vite e del nostro lavoro “Ad astra per aspera”. La ringrazio sempre per l'aiuto, la presenza costante e rassicurante dimostratemi in ogni momento in tutti questi anni.

Siamo lieti di annunciare che in concomitanza della mia entrata nel suo laboratorio è iniziato il suo processo di beatificazione che si concluderà con la nomina di “Santa Laura Giuliano da Messina” (gemellata con la Madonna di Saratov) protettrice degli incidenti di laboratorio, degli incidenti diplomatici e delle crisi nervose e dei problemi psichici ed esistenziali in genere. Semplicemente Enormemente Grazie.

Un particolare ringraziamento va a **Michail “Micha” Yakimov**. Un uomo dagli occhi di ghiaccio e dal cuore di fuoco. Una persona umanamente e scientificamente speciale. Un amico e un capo che tra pugni, barzellette (bruttissime!), momenti sereni e tristi, lacrime e...”IDIUOTA”... mi ha spinto ad amare il mio lavoro, superare i momenti di crisi ed a chiedere sempre il massimo da me stesso.

Ringrazio inoltre **Marc Troussellier** per avermi accolto, a più riprese, nel suo laboratorio e avermi seguito pazientemente nella crescita di questo lavoro e per avermi iniziato ad una dottrina, quella della modellizzazione, che ha definitivamente distrutto i miei ultimi neuroni funzionanti.

Ringrazio inoltre tutto il personale dell'Istituto per l'Ambiente Marino Costiero (IAMC) di Messina in particolare: il Direttore **Ermanno Crisafi**, il dott. **Alessandro Bergamasco**, il dott. **Luis S. Monticelli**, la dott.ssa **Gabriella Caruso**, la dott.ssa **Daniela Zampino**, la dott.ssa **Monique Mancuso** e la dott.ssa **Giovanna Maimone**.

Un saluto e un ringraziamento al dr. **Therry Bouvier** dell'Università de Montpellier II-CNRS (Francia) al il dr. **Andrew Dalby** dell'Hellenic Center for Marine Research (Grecia) e al dr. **Christian Tamburini** dell' UMR 6117-CNRS de l' Université de la Méditerranée Centre d'Océanologie di Marsiglia (Francia) per l'aiuto e l'amicizia dimostratemi durante questo lavoro.

Un ringraziamento particolare è rivolto al Prof. **Salvatore P. P. Guglielmino** il quale, volontariamente o involontariamente (questo non lo capirò mai!), con le sue parole ha cambiato la mia vita, incidendo “a fuoco” quel marchio che da “fedele scudiero” conserverò sempre come il più prezioso dei regali.

Un grazie a tutti miei colleghi di laboratorio (in ordine alfabetico): **Francesco, Gabriella, Gina, Mariella, Peppe, Renata, Violetta**. Che mi hanno sopportato, sostenuto e voluto bene anche quando “progettavo di tagliarle a pezzi con una sega e occultare i loro cadaveri nello scantinato”. Ringrazio specialmente **Barbara Tripodo** per l'aiuto (professionale, preciso e “logico-grammaticale”) dimostratemi con costanza e professionalità durante tutto questo lavoro. Non finirò mai di volere bene (anche in maniera carnale!) ai miei colleghi, una serie di persone eccezionali con cui abbiamo trasformato un serio laboratorio di un covo di pazzi!!!

Un pensiero va a mio nonno **Simone Cappello** di cui con orgoglio ne porto il nome e il cognome. Una persona che mi ha sempre accompagnato nella mia vita e il cui ricordo mi spinge a migliorarmi e a migliorare il nome della mia famiglia.

Il ricordo più dolce va la mia nonna **Carmela Toscano**, la cui morte ha lasciato nel mio cuore un vuoto incolmabile ed insostituibile. Sapendo che vive sempre dentro di me, ho la consapevolezza che un giorno ci incontreremo sulla stella più bella da cui ora mi osserva e mi protegge.

Un grazie va alla mia famiglia. Ai miei genitori **Francesco Cappello** e **Maria Urbino** e a mio fratello **Andrea Cappello** che mi sono stati sempre vicino e hanno sempre creduto in me e difeso (anche quando avevo torto marciol) e che non potrei mai sostituire (a meno che non si ponga l'opportunità con Bill e Melinda Gates come genitori e di Paris Hilton come sorella!). Vi voglio bene!

Inoltre, un grande e dolcissimo ringraziamento va alla mia compagna **Giovanna Cucinotta** (anche lei in avanzato stato di santificazione!) che ha vissuto e condiviso con me questa avventura...sperando che questo sia solo uno dei tanti mattoni che ci permetteranno di costruire (presto!) la nostra casa e la nostra famiglia... Ti Amo! Simone.

A mia Nonna

<u>INTRODUZIONE GENERALE</u>	1
<ul style="list-style-type: none"> • <u>CAPITOLO I: ANALISI dei PARAMETRI FUNZIONALI</u> • 	5
PARAGRAFO I: SPERIMENTAZIONI in NANOSCALA	9
MATERIALI e METODI	11
Valutazione della biodegradabilità dell'EPS-2003.	
<i>Raccolta dei campioni.</i>	
<i>Prove di degradabilità extracellulare dell'EPS-2003</i>	
<i>Terreni e condizioni di crescita.</i>	
<i>Estrazione del DNA e identificazione tassonomica.</i>	
<i>Crescita Batterica.</i>	
<i>Analisi del quantitativo di RNA.</i>	
<i>Mineralizzazione dell'EPS e respirometria.</i>	
<i>Valutazione della tossicità dell'EPS-2003.</i>	
<i>Conta delle cellule totali.</i>	
<i>Misura delle cellule vitali (LIVE/DEAD staining).</i>	
<i>Conteggio dei batteri eterotrofi coltivabili (CFU).</i>	
RISULTATI	18
<u>Valutazione della biodegradabilità dell' EPS-2003.</u>	
<u>Valutazione della tossicità del biosurfattante in studio.</u>	
DISCUSSIONI e CONCLUSIONI	26
PUBBLICAZIONE n°1	29
Cappello S., Dalby A., Tipodo B., Giuliano L., Crescenzi F., Bergamasco A. e Yakimov M. M. (2005). Biodegradation of a new biosurfactant exopolysaccharide by Marine Bacteria. Submittet for pubblication in <i>Journal Applied Micrbiology</i> (Impact factor 1.834)	
PARAGRAFO II: SPERIMENTAZIONI in MICROSCALA	31
MATERIALI e METODI	31
Ingegneria dei microcosmi.	
Set-up dei microcosmi.	
Schema delle Sperimentazioni in microscala.	

Tempistica e Campionamento.

Misura dei Parametri Funzionali.

Analisi dei Parametri abiotici.

Determinazione dei nutrienti: Ammoniaca, Nitrati, Nitriti, Fosfati.

Analisi del: Particulate Organic Carbon (POC), Particulate Organic Nitrogen (PON), Dissolved Organic Carbon (DOC).

Analisi quali-quantitativa del petrolio.

Misura del pH e della Temperatura.

Misure batteriologiche di abbondanza.

Conta delle cellule totali.

Misura delle cellule vitali.

Conteggio cellulare tramite Citometria a Flusso.

Misure batteriologiche di diversità.

Conteggio dei batteri eterotrofi coltivabili (CFU).

Conteggio dei batteri capaci di utilizzare il petrolio.

Isolamento dei batteri idrocarburo degradanti (HCB).

Diversità Coloniale.

Analisi tassonomica del 16S rDNA.

Misure Relative al metabolismo batterico.

Attività enzimatica.

Biochemical Oxygen Demand (BOD).

Misure di abbondanza virale.

Misure di abbondanza degli Eterotrophic Nano Flagellates (HNF).

RISULTATI **51**

DISCUSSIONI e CONCLUSIONI **87**

PUBBLICAZIONE n°2 **93**

Yakimov M. M., Gentile G., Bruni V., Cappello S., D'Auria G., Golyshin N. P. e Giuliano L. (2004).

Crude oil-induced structural shift of coastal bacterial communities of rod bay (Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica) and characterization of cultured cold-adapted hydrocarbonoclastic bacteria.

FEMS *Microbiology Ecology* 43:3 pp. 419-432. (Impact factor 2.947)

PUBBLICAZIONE n° 3	108
Yakimov M. M., Denaro R., Genovese M., Cappello S., D'Auria G., Chernikova N. T., Timmis N. K., Golyshin N. P. e Giuliano L. (2005).	
Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons.	
<i>Environmental Microbiology</i> (Impact factor 3.995)	
• <u>CAPITOLO II: ANALISI DELL'EFFETTO SCALA</u>	124
INTRODUZIONE	126
PARAGRAFO I: SPERIMENTAZIONI in MICROSCALA	130
MATERIALI e METODI	130
Ingegneria e Set-up dei microcosmi.	
Schema delle sperimentazioni in microscala.	
Tempistica e Campionamento.	
Misura dei Parametri funzionali.	
RISULTATI	132
PUBBLICAZIONE n°4	186
Cappello S., Caruso G., Zampino D., Yakimov M. M., Monticelli S. L., Tripodo B., Troussellier M. e Giuliano Laura. (2005).	
Microbial community dynamics during assays of an harbour oil spill bioremediation: a microscale simulation study	
Submitted for publication in <i>Journal Applied Microbiology</i> (Impact factor 1.834)	
PARAGRAFO II: SPERIMENTAZIONI in MESOSCALA	188
MATERIALI e METODI	190
Ingegneria dei mesocosmi.	
Set-up dei mesocosmi.	
Schema delle Sperimentazioni in mesoscala.	
Tempistica e Campionamento.	
Misura dei Parametri Funzionali.	
RISULTATI	202

DISCUSSIONI e CONCLUSIONI GENERALI	229
• <u>CAPITOLO III: MODELLIZZAZIONE</u>	235
INTRODUZIONE	237
STRUTTURA DEL MODELLO	238
COMPARTIMENTAZIONE	241
Petrolio.	
Batteri.	
<i>Assimilazione dei composti.</i>	
<i>Tasso di crescita batterica.</i>	
Batteri Morti.	
Protozoi.	
Nutrienti Disciolti.	
<i>Prodotti secreti.</i>	
<i>Carbonio organico disciolto.</i>	
<i>Azoto e Fosforo.</i>	
BILANCIO DELLE VARIABILI	245
EQUAZIONI	
<i>Petrolio Utilizzabile</i>	
<i>Petrolio Refrattario.</i>	
<i>Batteri Idrocarburo degradanti (HCB).</i>	
<i>Batteri non Idrocarburo degradanti (NHCB).</i>	
<i>Batteri Morti.</i>	
<i>Protozoa.</i>	
<i>Prodotti Escreti.</i>	
<i>Equazioni dei Nutrienti.</i>	
VALORI ADOTTATI NELLE SIMULAZIONI	251
RISULTATI di SIMULAZIONE	256
DISCUSSIONI e CONCLUSIONI	258

• <u>CONCLUSIONI GENERALI</u>	261
• <u>BIBLIOGRAFIA</u>	268

Questo lavoro di Tesi è stato svolto all'interno del Programma Operativo Nazionale (PON) misura 1.3 “Analisi dell'efficacia di surfattanti in attività di bioremediation *in-situ* ed *ex-situ* (reattori) mediante studio su media scala” (S.A.B.I.E.); che si proponeva come obiettivo di creare dei sistemi calibrati su media scala per valutare l'efficacia di diversi tipi di surfattanti nelle attività di bioremediation *in-situ* ed *ex-situ* nonché di ottimizzazione metodologie di intervento relative ai processi di bioremediation.

Questa Tesi è stata realizzata in co-tutela tra il dottorato di “Scienza ed Ingegneria del Mare”, dell'Università degli Studi di Napoli “Federico II” e l'Ecole Doctorale di “Sciences de la Terre et de l'eau” della Formation Doctorale di “Sciences et l'eau dans l'environnement continental” dell'Università di Montpellier II (Francia). L'attività di ricerca è stata svolta, infatti, in collaborazione tra il laboratorio di “Ecologia Microbica e Biologia Molecolare” dell'Istituto per l'Ambiente Marino Costiero (IAMC) IST-CNR di Messina e il laboratorio di “Ecosystemes Lagunaires” de l'Unité de Recherche CNRS-UMR 5119 dell' Università di Montpellier II – Sciences et Techniques du Languedoc.

L'obiettivo principale di questo lavoro è stato valutare l'utilizzo di sistemi sperimentali in scala (mesocosmi) per l'ottimizzazione delle potenzialità degradative delle popolazioni batteriche naturali durante interventi di biostimulation.

Conseguentemente ai risultati ottenuti, è stato sviluppato un modello di previsione matematica per lo studio della dinamica delle comunità microbiche e della degradazione del petrolio coinvolte nei processi di bioremediation.

INTRODUZIONE GENERALE

Il petrolio è la principale fonte di energia e di sostegno della società moderna; tuttavia la sua produzione, trasporto, utilizzazione ed eliminazione lo rendono il principale agente inquinante dell'ambiente. E' stato calcolato che dei 3.2 bilioni di petrolio prodotti annualmente, circa 3.2 milioni di tonnellate vengono immesse nell'ambiente marino a seguito di eventi catastrofici o di versamenti, apparentemente inevitabili, nelle operazioni di trasporto e di scarico delle petroliere (Prince *et al.*, 2003; Swannell *et al.*, 1996). A questi fattori di input, che determinano circa il 40% del petrolio presente nell'ambiente marino, vanno inoltre aggiunti quelli derivanti dalle infiltrazioni naturali (circa 50%) e dai processi di produzione (Atlas, 1981). Gli ambienti marini costieri, che subiscono in maniera più evidente ed estesa l'impatto della contaminazione accidentale o cronica da petrolio, sono risorse di importanza primaria sia dal punto di vista economico e sociale, con particolare riferimento alle attività ricreative, che dal punto di vista ecologico. Di conseguenza, è ormai largamente riconosciuta l'urgenza di realizzare sistemi di intervento rapidi ed efficaci per recuperare le zone marine costiere contaminate da petrolio.

Nonostante i notevoli progressi che hanno caratterizzato il settore del recupero degli ambienti contaminati, con particolare riferimento agli interventi d'emergenza a seguito di versamento accidentale di petrolio in mare (oil spill), la ricerca ha di recente mostrato che le tecniche in uso sono spesso molto meno efficaci di quello che si era a lungo creduto e che bisognerebbe che queste siano orientate sul recupero degli ecosistemi impattati piuttosto che sulla semplice riduzione massiccia del volume di petrolio rilasciato in mare (clean up). Fra gli interventi di tipo fisico, per esempio, i mezzi meccanici messi a punto per limitare l'estensione delle macchie di petrolio o per impedire la penetrazione in particolari zone perdono tutta la loro efficacia quando le condizioni meteorologiche sono sfavorevoli; anche i procedimenti chimico-fisici non si sono sempre rivelati ottimali (Marty, 1994).

I risultati più promettenti, a questo proposito, sono stati ottenuti mediante l'applicazione delle tecniche di bioremediation, che sfruttano le capacità biodegradative di popolazioni batteriche autoctone degli ambienti marini contaminati (Bragg *et al.*, 1994; Prince *et al.*, 1994). La bioremediation offre numerosi vantaggi rispetto alle tecnologie tradizionali: è relativamente poco costosa (Atlas, 1995), al contrario degli interventi fisico-chimici che producono nuovi contaminanti a partire dal petrolio, è eco-compatibile poiché termina con la produzione di composti minerali; la bioremediation, inoltre, sfrutta processi naturali realizzati dal comparto biotico già caratteristico dell'ambiente da decontaminare.

La biodegradazione del petrolio negli ecosistemi marini è un fenomeno complesso, legato alla capacità di degradazione degli idrocarburi di varie popolazioni microbiche autoctone. L'evoluzione della miscela idrocarburea dipende da un insieme di fattori abiotici ambientali (la temperatura, il vento, la concentrazione di ossigeno, i nutrienti e i raggi solari), biologici (la struttura della comunità microbica) e dalla natura chimica stessa del contaminante (il petrolio). Perché siano efficaci, pertanto, le tecniche di bioremediation richiedono di essere ottimizzate rispetto alle condizioni (biotiche e abiotiche) tipiche dell'ambiente da recuperare e non possono essere generalizzate neanche a delle "tipologie" di ambiente. L'identificazione dei microrganismi che giocano un ruolo chiave nei processi di degradazione naturale è indispensabile per la realizzazione di interventi ottimali di bioremediation. Inoltre, la realizzazione di un intervento di bioremediation mirato non può prescindere dallo studio accurato e completo dell'ambiente su cui l'intervento dovrà essere effettuato (le sue caratteristiche ecologiche, la velocità di risposta delle popolazioni autoctone capaci di degradare gli idrocarburi, ecc.). In questa ottica la bioremediation di ambienti contaminati dal petrolio o dai suoi idrocarburi si propone come una tecnologia interdisciplinare che coinvolge la microbiologia, l'ingegneria, l'ecologia e la chimica.

La naturale scomparsa degli idrocarburi in mare è un processo che si realizza in una scala di tempo incompatibile con le attività economiche umane (come la pesca o il turismo) e che determina un problema ambientale di grave portata, su cui sono state incentrate la maggior parte delle ricerche ecologiche degli ultimi anni. Lo scopo degli interventi di bioremediation, pertanto, è quello di accelerare le attività biodegradative naturali proprie dell'ambiente contaminato mediante l'alterazione temporanea di alcuni parametri ambientali. Gli approcci più utilizzati a tale scopo sono (i) la bioaugmentation, che consiste nell'aggiunta al sistema di elevate densità di popolazioni batteriche idrocarburo degradanti e (ii) la biostimulation, che consiste nella stimolazione dei tassi di crescita e/o biodegradazione delle popolazioni batteriche naturali con capacità idrocarburo degradanti. Studi in campo ed in laboratorio hanno dimostrato ampiamente che gli interventi di biostimulation sono i più efficaci (Prince, 1993; Swannell *et al.*, 1996; Venosa *et al.*, 1996).

Il tasso di degradazione degli idrocarburi da parte dei batteri marini idrocarburo degradanti è generalmente limitato da due fattori: la scarsa concentrazione di nutrienti (composti dell'azoto e del fosforo) e la bassa solubilità dei composti idrocarburei in acqua che influenza la biodisponibilità del petrolio per qualunque tipo d'attacco microbico (Atlas 1981; Focht e Westlake, 1987; Leahy e Colwell, 1990).

Nonostante i recenti progressi tecnologici al fine di migliorare le capacità degradative della naturale popolazione microbica, nel settore del recupero degli ambienti marini contaminati da petrolio, l'impatto dei diversi tipi di intervento sugli ecosistemi naturali è ancora in gran parte sconosciuto.

L'avanzamento su queste tematiche è rallentato dalla scarsa corrispondenza fra i risultati osservati nelle prove di laboratorio e quelli ottenuti nell'ambiente naturale (Engel A. *et al.*, 2002; Reilly T. J., 1999; Santas S. *et al.*, 1999; Vallino J.J., 1999).

Difatti i singoli esperimenti realizzati in laboratorio portano di norma a dei risultati poco realistici, che non riescono a riprodurre la relazione causa-effetto presente nell'ambiente naturale (Santas R. *et al.* 1999); per contro, i tentativi di sperimentazione diretta *in situ* sono spesso di difficile realizzazione e portano spesso risultati difficilmente interpretabili a causa della complessità dei processi biologici analizzati (Reilly T.J., 1999).

La necessità di trovare un collegamento tra gli esperimenti condotti in laboratorio, che possono essere statisticamente replicati, ma soffrono di mancanza di realismo ambientale e le sperimentazioni in grande scala che presentano intrinseche difficoltà di controllo, ha portato ad un sempre maggiore utilizzo di sistemi sperimentali in scala (microcosmi e/o mesocosmi).

Tuttavia il numero estremamente limitato di informazioni ottenute da esperimenti su scala pilota, che sono stati realizzati in maniera mirata previa corretta realizzazione degli impianti e del disegno strategico (Mearns, 1997; Venosa, 1998), non permette sempre una loro semplice utilizzazione.

E' sempre più evidente, quindi, la necessità urgente di linee guide pratiche per l'applicazione mirata della bioremediation che rispondano a domande quali quando è utile applicare le tecniche di bioremediation, quali agenti usare per la biostimulation e come farlo, come monitorare ed interpretare i risultati dell'esperimento.

In questa ottica la definizione di alcune tappe preliminari per il corretto avvio di un esperimento di bioremediation su scala pilota devono necessariamente includere: il corretto disegno e realizzazione delle vasche per l'esperimento; la scelta dei parametri chiave per il monitoraggio dello stesso ed uno studio accurato dell'esperimento (inclusi i limiti legati alle condizioni sperimentali scelte) al fine di ottenere una corretta interpretazione dei risultati ottenuti.

La tesi proposta si prefigge di valutare l'utilizzo di sistemi pilota in mesoscala per ottimizzare le potenzialità degradative delle popolazioni batteriche naturali e seguito di interventi di bioremediation come la biostimulation.

Questo lavoro si è articolato lungo tre capitoli.

Nel primo capitolo (Analisi dei parametri funzionali) sono state avviate delle sperimentazioni in beuta (nanoscala) per valutare la biodegradabilità e l'eventuale tossicità del biodispersente (EPS-2003), utilizzato in questo studio, nei confronti delle comunità microbiche presenti nell'ambiente naturale. Nello stesso sono mostrate due sperimentazioni allestite in microscala per ottimizzare le tecniche e i protocolli da adottare per lo studio dei parametri funzionali durante le nostre simulazioni. In queste sperimentazioni è stato osservato il comportamento della popolazione microbica presente in acqua di mare contaminata artificialmente ma non sottoposta al trattamento di biostimulation e dell'acqua addizionata con nutrienti inorganici.

Nel secondo capitolo (Analisi dell'effetto scala) sono stati allestiti (in parallelo) tre diverse sperimentazioni che simulavano, su due diverse scale di grandezza (microcosmo e mesocosmo), interventi di biostimulation realizzati su un campione marino di provenienza costiera artificialmente contaminato da petrolio. L'accelerazione dei processi biodegradativi naturali è stata realizzata tramite l'utilizzo di nutrienti inorganici e di un biodispersente (EPS-2003), mentre il controllo di riferimento era rappresentato da sistemi contenenti acqua di mare non trattata.

Nel terzo capitolo (Modellizzazione) è stato sviluppato un modello matematico di previsione (in base ai risultati sperimentali ottenuti). Tale modello teorico è stato realizzato al fine di poter fornire importanti informazioni per l'ottimizzazione dei processi di recupero ambientale.

CAPITOLO I:
ANALISI DEI PARAMETRI FUNZIONALI

CAPITOLO I: ANALISI dei PARAMETRI FUNZIONALI

SPERIMENTAZIONI in NANOSCALA

MATERIALI e METODI

Valutazione della biodegradabilità dell'EPS-2003.

Raccolta dei campioni.

Prove di degradabilità extracellulare dell'EPS-2003.

Terreni e condizioni di crescita.

Estrazione del DNA e identificazione tassonomica.

Crescita Batterica.

Analisi del quantitativo di RNA.

Mineralizzazione dell'EPS e respirometria

Valutazione della tossicità dell'EPS-2003.

Conta delle cellule totali.

Misura delle cellule vitali (LIVE/DEAD staining).

Conteggio dei batteri eterotrofi coltivabili (CFU).

RISULTATI

Valutazione della biodegradabilità dell' EPS-2003.

Valutazione della tossicità del biosurfattante in studio.

DISCUSSIONI e CONCLUSIONI

PUBBLICAZIONE n°1

Cappello S., Dalby A., Tripodo B., Giuliano L., Crescenzi F., Bergamasco A., e Yakimov M. (2005).

Biodegradation of a new biosurfactant exopolysaccharide by Marine Bacteria.

Submittet for pubblication in *Journal Applied Microbiology* (Impact factor 1.834)

SPERIMENTAZIONI in MICROSCALA

MATERIALI e METODI

Ingegneria dei microcosmi.

Set-up dei microcosmi.

Schema delle Sperimentazioni in microscala.

Tempistica e Campionamento.

Misura dei Parametri Funzionali.

Analisi dei Parametri abiotici “chiave”.

Determinazione dei nutrienti: Ammoniaca, Nitrati, Nitriti, Fosfati.

Analisi del: Particulate Organic Carbon (POC), Particulate Organic Nitrogen (PON), Dissolved Organic Carbon (DOC).

Analisi quali-quantitativa del petrolio.

Misura del pH e della Temperatura.

Misure batteriologiche di abbondanza.

Conta delle cellule totali.

Misura delle cellule vitali.

Conteggio cellulare tramite Citometria a Flusso.

Misure batteriologiche di diversità.

Conteggio dei batteri eterotrofi coltivabili (CFU).

Conteggio dei batteri capaci di utilizzare il petrolio.

Isolamento dei batteri idrocarburo degradanti (HCB).

Diversità Coloniale.

Analisi tassonomica del 16S crDNA.

Misure Relative al metabolismo batterico.

Attività enzimatica.

Biochemical Oxygen Demand (B.O.D).

Misure di abbondanza virale.

Misure di abbondanza degli Eterotrophic Nano Flagellates (HNF).

RISULTATI

DISCUSSIONI e CONCLUSIONI

PUBBLICAZIONE n°2

Yakimov M. M., Gentile G., Bruni V., Cappello S., D'Auria G., Golyshin N. P. e Giuliano L. (2004).

Crude oil-induced structural shift of coastal bacterial communities of rod bay (Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica) and characterization of cultured cold-adapted hydrocarbonoclastic bacteria.

FEMS *Microbiology Ecology* 43:3 pp. 419-432. (Impact factor 2.947)

PUBBLICAZIONE n° 3

Yakimov M. M., Denaro R., Genovese M., Cappello S., D'Auria G., Chernikova N. T., Timmis N. K., Golyshin N. P. e Giuliano L. (2005).

Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons.

Environmental Microbiology (Impact factor 3.995).

Nella prima parte di questo lavoro sono state realizzate una serie di sperimentazioni in nanoscala (beuta) e microscala (microcosmi), al fine di determinare la biodegradabilità e la potenziale tossicità del biosurfattante EPS-2003, utilizzato in questo studio, da parte di una naturale popolazione batterica marina; in microcosmi pilota sono state realizzate delle sperimentazioni al fine di ottimizzare le tecniche e le metodologie utilizzate per la misura dei parametri funzionali identificati come fondamentali durante i processi di degradazione microbica.

SPERIMENTAZIONI in NANOSCALA

La degradazione degli idrocarburi in ambiente marino è condizionata da parametri chimici, fisici e biologici di diversa natura. Una delle principali cause della prolungata persistenza degli idrocarburi idrofobici in mare è la bassa solubilità dei contaminanti in acqua che riduce la superficie di contatto per i microrganismi e di conseguenza rallenta i processi biodegradativi (Bartha, 1986; Cerniglia, 1993; Miller *et al.*, 1989; Rosenberg *et al.*, 1999).

Studi realizzati sull'utilizzo di sostanze tensioattive di vario tipo, come surfattanti sintetici (Aronstein *et al.*, 1993; Grimberg *et al.*, 1995; Volkering *et al.*, 1995) o biosurfattanti (Desai *et al.*, 1997; Miller, R.M., 1995; Muller-Hurtig *et al.*, 1993; Rosenberg, 1986) hanno contribuito significativamente alla comprensione dei meccanismi che determinano la naturale emulsificazione del petrolio aumentando la biodisponibilità dei composti organici idrofobici all'attacco microbico e l'interazione tra i batteri degradanti, i surfattanti e gli idrocarburi (Guha *et al.*, 1996; Volkering *et al.*, 1995; Willumsen *et al.*, 1998).

Tuttavia, la relativa tossicità, sia nei confronti dei microrganismi degradanti che di altri organismi marini, la bassa biodegradabilità, la possibilità di bioaccumulo e la ridotta efficienza a basse concentrazioni limitano notevolmente il loro utilizzo nei siti contaminati (Desai *et al.*, 1997; Barkay *et al.*, 1999).

Diversi dagli agenti tensioattivi chimicamente sintetizzati, che sono classificati in base alle caratteristiche del loro gruppo polare, i biosurfattanti possono essere catalogati in riferimento alla loro composizione chimica e alla loro origine microbica. In generale, la loro struttura include una parte idrofila caratterizzata generalmente da amminoacidi o peptidi anionici o cationici; mono-, di-, o polisaccaridi; e una parte idrofoba caratterizzata principalmente da acidi grassi saturi od insaturi. Di conseguenza, le principali classi di biosurfattanti includono i glicolipidi, i lipopeptidi, le lipoproteine, i fosfolipidi, gli acidi grassi e i surfattanti polimerici (Desai *et al.*, 1993; Rosenberg *et al.*, 1986; Desai *et al.*, 1997).

I biosurfattanti hanno diversi ruoli, alcuni dei quali sono unici nella fisiologia e nell'ecologia dei microrganismi che li producono. Importanti studi sono stati realizzati per la loro caratterizzazione come per i ramnolipidi di *Pseudomonas aeruginosa*, i lipidi solforosi di *Torulopsis bombicola*, le lichesine di *Bacillus* sp. o ancora per le molecole ad alto peso molecolare come i surfattanti polimerici prodotti da *A. calcoaceticus* (Emulsan, Biodispersant) o da *C. lipolytica* (Liposan) (Barkay *et al.*, 1999; Bicca *et al.*, 1999; Deasai *et al.*, 1999). È impossibile pertanto generalizzare o identificare una o più funzioni che accomunino tutti i surfattanti di origine microbica sebbene in generale sono stati proposti tre tipi di funzioni naturali dei biosurfattanti:

- i. aumento dell'area superficiale dei substrati idrofobici insolubili in acqua;
- ii. aumento della biodisponibilità dei substrati idrofobici;
- iii. regolazione dell'attacco o distacco dei microrganismi alle o dalle superfici (Rosenberg *et al.*, 1999).

In quest'ottica i bioemulsionanti hanno significativi vantaggi rispetto ai surfattanti chimici, ciò dovrebbe permettere loro di avere un ruolo importante nelle applicazioni industriali e nella gestione ambientale (Muller-Hurtig *et al.*, 1993).

In questo lavoro durante le prove di bioremediation, condotte sia in microscala (microcosmi) che in mesoscala (mesocosmi), è stato utilizzato l'EPS-2003 (ENI Tecnologie), un biosurfattante esopolissaccaridico ottenuto dalla coltivazione del batterio idrocarburo degradante *Acinetobacter calcoaceticus* CBS 962.97 isolato in laboratorio. La struttura chimica di tale molecola corrisponde a una catena polisaccaridica ramificata con acidi grassi sostituiti in posizione 12 e 18. Inoltre, come illustrato nella [figura 1](#), una significativa frazione di materiale di natura proteica è strettamente legata alla porzione polisaccaridica.

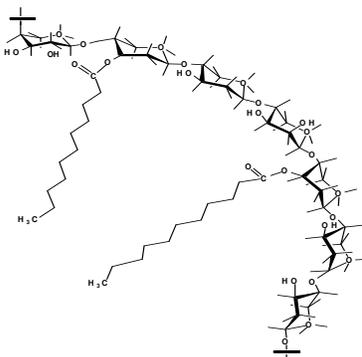


Fig. 1. Struttura semplificata della molecola del biosurfattante EPS-2003 utilizzata in questo lavoro.

Al fine di determinare la biodegradabilità di questa sostanza sono state realizzate delle sperimentazioni in nanoscala (beuta).

In queste sperimentazioni la biodegradabilità dell'EPS-2003 è stata determinata attraverso la misura della degradazione extracellulare da parte di popolazioni batteriche naturali e la valutazione della capacità di crescita, di mineralizzazione e di respirometria di due ceppi batterici isolati durante coltivazione in arricchimento con EPS-2003 come unica fonte di carbonio ed energia.

Inoltre ulteriori analisi in nanoscala sono state condotte per valutare una possibile tossicità del biosurfattante nei confronti della naturale popolazione batterica marina.

MATERIALI e METODI

Valutazione della biodegradabilità dell'EPS-2003

Raccolta dei campioni

I campioni di acqua marina, utilizzati in questo lavoro, sono stati prelevati da due siti antistanti l'Istituto per l'Ambiente Marino Costiero (IAMC) IST-CNR, nei pressi del porto di Messina, (Molo Norimberga e Mare Sicilia) e da un sito posto all'interno del porto di Augusta (come mostrato in [figura 2](#)).

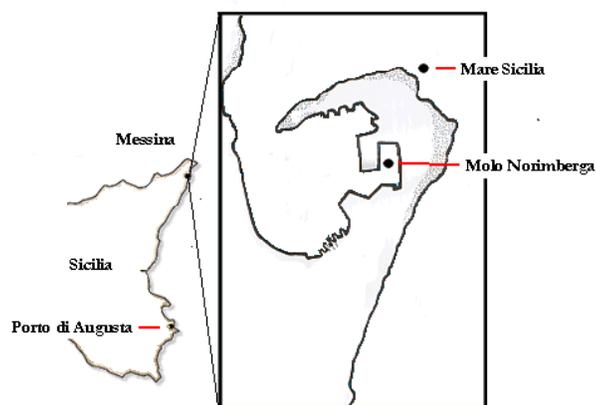


Fig.2. Siti di campionamento (indicati con i punti neri) dell'acqua di mare utilizzata per le sperimentazioni in nanoscala.

Prove di degradabilità extracellulare dell'EPS-2003.

I campioni d'acqua (100 ml), una volta raccolti, sono stati immediatamente trasportati in laboratorio dove sono stati filtrati su membrane di tipo Millipore da 0.22 micron (Millex-GV

0,22 micron Filter Unit). I filtri, così preparati, sono stati posti in colture di arricchimento costituite da terreno liquido ONR7a addizionato con EPS-2003 allo 0.1% (peso/volume) e lasciati incubare per 5 giorni alla temperatura di 20°C. Dopo questo periodo di incubazione, le colture sono state centrifugate a 6000xg per 10 min (Eppendorf Centrifuge 5810 R) in modo tale da eliminare possibili contaminazioni cellulari e l'EPS-2003 residuo. Il surnatante è stato filtrato per due volte con membrane Millipore da 0.22 micron (Millex-GV 0.22 micron Filter Unit) e un'aliquota di 10 ml di surnatante è stato addizionato con 0,68 mg di EPS-2003. I campioni sono stati vortexati fino a totale dispersione dell'EPS, e messi ad incubare a 37°C (Cella Termostata ad Acqua B9.1 Biocasa). All'inizio della sperimentazione (time zero) e dopo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 ore è stata misurata la densità ottica della sospensione (A_{600nm}) al fine di determinare la degradazione dell'EPS-2003 da parte di enzimi extracellulari presenti nel surnatante delle colture. Tutte le letture sono state realizzate in triplo su un Eppendorf Biophotomer, utilizzando come bianco di calibrazione i surnatanti sterili dei rispettivi siti senza l'aggiunta di EPS-2003.

Terreni e condizioni di crescita.

I ceppi batterici utilizzati in questo studio sono stati ottenuti piastrandoli aliquote di 100 µl di campioni di acqua di mare (prelevato dal sito identificato come Mare Sicilia) su terreno minerale ONR7a (tabella 5, Dyksterhouse *et al.*, 1995) addizionato con 1.4% di agarosio (Bacto agar, Difco) e 0.1% di EPS-2003 (peso/volume). Le piastre sono state incubate per 5 giorni alla temperatura di 20°C. Durante questo screening iniziale sono state isolate dieci colonie batteriche.

Estrazione del DNA e identificazione tassonomica.

Il DNA genomico dei ceppi batterici in studio è stato estratto utilizzando il DNA/RNA extraction kit (QIAGEN, Valencia, CA) in accordo con il protocollo fornitoci dalla casa produttrice.

Una volta estratto il DNA genomico la porzione tassonomica corrispondente al 16S DNA è stata amplificata tramite PCR con l'utilizzo di due primer specifici il 530 F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3') specifico per batteri e il primer universale 1492 R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACT-3') (Lane, 1991).

La miscela di PCR è stata costituita da 50 ng of crDNA, 1X Qiagen reaction buffer, 1X solution Q (Qiagen), 1 pM dei primer sovradescritti, 200µM dNTPs (Gibco) e 2.5 U di Qiagen *Taq* Polymerase.

La reazione di PCR è stata realizzata in un Mastercycler Gradient (Eppendorf), secondo le seguenti condizioni: 95°C per 5 min (1 ciclo); 94°C per 1 min., 50°C per 1 min. e 72°C per 2 min (35 cicli), con un'estensione finale di 72°C per 10 min.

I prodotti della PCR sono stati purificati con QIAQuick PCR purification columns (Qiagen) e gli ampliconi ottenuti sono stati analizzati tramite corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1% in tampone TBA 1X colorato con bromuro d'etidio e illuminato agli UV.

Gli ampliconi delle sequenze parziali del 16S rDNA sono stati sequenziati utilizzando un kit di reazione (PE) di ABI Prism Big Dye 1.1 Terminator Cycle Sequencer e un sequenziatore 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems Hitachi). In seguito le sequenze sono state analizzate on line tramite il software Ribosomal Database Project Sequence Match e Similarity Matrix (Yakimov *et al.*, 2005).

Dei dieci ceppi batterici isolati, sette ceppi sono risultati tassonomicamente affiliati a *Pseudoalteromonas* sp. A28 e tre ceppi correlabili a *Vibrio proteolyticus*.

Due ceppi batterici, isoDES-01, affiliato a *Pseudoalteromonas* sp. A28 (100%) e isoDES-07, affiliato a *Vibrio proteolyticus* (98.9%) sono stati scelti per i test di mineralizzazione e respirometria. Di questi ceppi è stato inoltre misurato il tasso di crescita e l'analisi quantitativa dell'RNA totale.

Crescita Batterica.

I due ceppi rappresentativi sono stati inoculati in quattro beute contenenti rispettivamente 200 ml di terreno ONR7a e ONR7a addizionato con EPS-2003 0.1% (peso/volume). Le beute così allestite sono state messe ad incubare per 12 giorni a 25°C.

Ogni 24 ore la crescita batterica è stata misurata spettrofotometricamente (Biophotomer Eppendorf) come densità ottica (A_{600nm}).

Analisi del quantitativo di RNA.

Ad intervalli regolari di 24 ore (per 12 giorni) un'aliquota di 10 ml di biomassa batterica è stata prelevata direttamente dalla beuta di coltura. Le cellule sono state raccolte tramite centrifugazione a 6000xg per 10 min (Eppendorf Centrifuge 5810 R) e l'RNA totale è stato ottenuto tramite una modificazione del protocollo di estrazione degli acidi nucleici con il CTAB (Doyle & Doyle, 1987; Cullings *et al.*, 1992). Durante la prima estrazione con il fenolo e cloroformio la concentrazione dell'RNA è stata misurata spettrofotometricamente (A_{260nm}).

Il quantitativo di RNA è stato direttamente correlato con il quantitativo cellulare tramite la formula:

$$A = 0.0020 \text{ pg} / (\text{mg total RNA}) (10 \text{ ml})$$

dove A corrisponde al numero di cellule per ml di coltura, 0.0020 pg è una costante corrispondente al quantitativo di RNA presente in una singola cellula mentre 10 ml indica ovviamente il volume del campione in analisi.

Mineralizzazione dell'EPS e respirometria.

Il protocollo utilizzato per la misurazione della mineralizzazione è stato descritto da Bruheim *et al.* (1997). La produzione di anidride carbonica è stata determinata tramite la respirometria di Warburg. Le cellule sono state fatte crescere per 48 ore (prima della fase stazionaria) in beuta da 500 ml contenente 100 ml di terreno ONR7a a 25°C. Le cellule sono state centrifugate a 15000 xg, e lavate due volte con ONR7a. In tutti gli esperimenti è stata utilizzata una concentrazione standard di EPS 0.01% (peso/vol).

L'EPS e il terreno minerale ONR7a (5 ml) sono stati premixati nel compartimento centrale della camera di mineralizzazione per 30 minuti, con una temperatura di equilibrio di 25°C, prima di aggiungere le cellule. La concentrazione cellulare è stata determinata spettrofotometricamente come assorbanza (A_{600}) e come biomassa secca. Un appropriato volume cellulare è stato aggiunto ad ogni beuta di coltura per dare una densità cellulare finale di circa 2×10^8 cellule ml^{-1} . Le beute sono state immediatamente chiuse con dei tappi di silicone, all'interno di tali beute erano presenti trappole per CO_2 costituite da provette di vetro con 0.5 ml di NaOH 2M che sono state sospese a circa 2 cm dalla superficie del terreno.

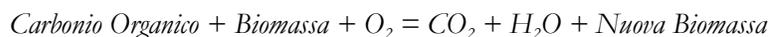
Le beute sono state incubate per 5 giorni a 25°C. Il contenuto delle trappole è stato periodicamente sostituito con un'aliquota fresca e la soluzione di NaOH 2M è stata successivamente triziata per determinare la quota di CO_2 sviluppata. La produzione di CO_2 riflette l'attività microbica. I risultati sono stati presentati come percentuale di EPS convertito a CO_2 . Le quote di mineralizzazione sono state calcolate per determinati intervalli di tempo durante la mineralizzazione al fine di farla procedere linearmente col tempo.

Ogni esperimento è stato ripetuto due volte con tre beute per ogni condizione ed intervallo di tempo. Le variazioni statistiche sono state analizzate come deviazioni standard. Alla fine dell'esperimento (120 ore) la biomassa è stata concentrata tramite centrifugazione a 15000 xg, lavata due volte in terreno minerale ONR7a e asciugata a 65 °C per 24-30 ore fino a quando è stata registrata alcuna variazione nel peso.

La respirometria è stata riferita alla misura dell'evoluzione dell'anidride carbonica, come una

misura indiretta della massa rimossa nella reazione stechiometrica. Risultati positivi indicano una significativa evoluzione della CO_2 nel tempo, che in rapporto al controllo, indica un'utilizzazione dell'EPS-2003. La mineralizzazione aerobica riferita alla conversione dell'esopolissacaride EPS-2003 porta alla formazione di vari prodotti chimici (es. anidride carbonica, acqua e biomassa microbica). In generale, devices respirometrici sono utilizzati per la misurazione dell'ossigeno biochimico totale (TBOU) e della quota di ossigeno biochimico preso (BOUR) presente nella popolazione microbica. In condizioni di aerobiosi, questi microrganismi consumano ossigeno proporzionalmente alla quota di carbonio organico e biomassa nel reattore.

L'espressione:



descrive questa relazione.

A mano a mano che la reazione procede nel reattore di respirometria, l'anidride carbonica è raccolta nello spazio della testa del reattore.

Poiché l'anidride carbonica prodotta è proporzionale all'ossigeno consumato, non sono necessari cambiamenti di pressione nella testa del reattore. Sebbene, piazzando una soluzione alcalina forte (KOH o NaOH) nello spazio della testa del reattore, l'anidride carbonica sviluppata durante la respirazione microbica è assorbita, creando una pressione differenziale (negativa) relativamente alla pressione di partenza durante il test.

Questi cambiamenti nella pressione sono rivelati dal sistema e una uguale quota di ossigeno è portato al reattore, mantenendolo in equilibrio.

Valutazione della tossicità dell'EPS 2003

Allo scopo di misurare il grado di eventuale tossicità dell'EPS-2003, sono state allestite otto colture liquide in beuta (100 ml), ciascuna rappresentata da un subvolume di acqua marina. Le beute sono state addizionate con diverse concentrazioni di EPS-2003 e su di un tensioattivo di riferimento il GAMLEN-OD₄₀₀₀ (Gamlen S.p.A).

Tutte le sperimentazioni sono state realizzate in doppio. In particolare, il set completo di esperimenti paralleli è dettagliato in tabella 1.

condizione	sperimentazione			
	A	B	C	D
EPS-2003 0.01 gr/L	1	.	.	.
	2	.	.	.
EPS-2003 0.1 gr/L	.	3	.	.
	.	4	.	.
Gamlen - OD ₄₀₀₀ 0.01 gr/L	.	.	5	.
	.	.	6	.
Gamlen - OD ₄₀₀₀ 0.1gr/L	.	.	.	7
	.	.	.	8

Tab. 1. Schema delle sperimentazioni realizzate in beuta per testare la tossicità e la biodegradabilità dell'EPS-2003 utilizzato in questo studio.

Le beute così preparate sono state messe ad incubare a 20°C in agitazione (350 rpm). Dal momento dell'inoculo (tempo zero) e per un periodo di 12 giorni, ad intervalli regolari di 3, 6 e 12 giorni è stata misurata la vitalità cellulare tramite:

conta delle cellule totali; misura delle cellule vitali tramite colorazione fluorescente; conteggio dei batteri eterotrofi coltivabili.

Conta delle cellule totali.

La conta del batterioplancton totale è stata realizzata tramite osservazione diretta con coloranti fluorescenti. In precedenza la conta diretta con l'utilizzo di coloranti fluorescenti era limitata all'uso dell'acridina orange [3,6-bis(dimetilammino)cloruro di acridio] anche se, col passare del tempo, tale fluorocromo è stato rapidamente sostituito dal DAPI (4',6-diamino-2-fenilindolo), che oltre ad avere una fluorescenza più stabile è sembra essere più specifico per il DNA e può essere utilizzato per la conta delle cellule totali (includendo cellule non vitale e cellule vitali ma non coltivabili). Anche se recenti studi hanno messo in discussione la specificità del DAPI per gli acidi nucleici, sottolineando che tale fluorocromo si può legare ad estratti di biopolimeri sintetici, RNA a doppio filamento, proteine, fosfolipidi e batteri privi di nucleoide (chiamati anche ghost cellulari), tale tecnica rimane comunque uno dei metodi maggiormente utilizzati per la valutazione del quantitativo batterico nelle acque.

In accordo con la metodologia riportata dal Porter (Porter e Feig, 1980), l'abbondanza batterica è stata misurata tramite conta diretta al microscopio ad epifluorescenza.

Aliquote di 1 ml di campione sono state fissate utilizzando della paraformaldeide alla concentrazione finale del 2% in tampone fosfato salino (PBS: 120mM NaCl, 2.7 mM KCl in 10 mM in tampone fosfato, pH 7.6) a 4°C.

L'abbondanza delle cellule batteriche è stata stimata filtrando dei subvolumi di campione su filtri in policarbonato Black Costar con porosità di 0.2 μm e 25 mm di diametro (Nucleopore, Corning Costar Corp., Cambridge, MA).

Una media di 200 cellule per filtro è stata contata utilizzando un microscopio Axioplan 2 Imaging (Zeiss), equipaggiato con filtri appositi.

Misura delle cellule vitali (LIVE/DEAD staining).

La metodica della colorazione Live/Dead è un saggio di vitalità che si basa sull'integrità della membrana plasmatica batterica. I batteri con membrana plasmatica integra sono stati enumerati dopo colorazione con Live/Dead BacLight Viability Kit (Molecular Probes, Inc.). Questo kit è composto da una miscela di due coloranti di acidi nucleici, il SYTO 9 e il propidium iodide (PI), che differiscono nella loro capacità di penetrare nelle cellule batteriche. Il SYTO 9 colora tutte le cellule batteriche, sia quelle con membrana plasmatica integra sia con membrana plasmatica danneggiata, mentre il PI penetra colorando solo batteri con membrana danneggiata. La fluorescenza dovuta al primo colorante viene ridotta quando nella cellula batterica sono presenti entrambi i fluorocromi. In tal modo i batteri con membrana plasmatica integra (identificati come vitali), colorati con SYTO 9, emettono fluorescenza verde, mentre quelli con membrana danneggiata, colorati con PI, risultano colorati in rosso.

Aliquote di 1 ml di campione sono state colorate con la miscela Live/Dead (concentrazione finale: 6 $\mu\text{mol l}^{-1}$ di SYTO 9 e 30 $\mu\text{mol l}^{-1}$ di propidium iodide) e incubate a temperatura ambiente, al buio, per 15 minuti. I campioni così preparati sono stati filtrati in filtri di policarbonato e poi filtrati in filtri di policarbonato Black Costar con porosità di 0.2 μm e 25mm di diametro (Nucleopore, Corning Costar Corp., Cambridge, MA).

Quando il conteggio dei batteri è stato difficoltoso a causa dell'eccessiva crescita batterica dovuta alle condizioni sperimentali, il campione è stato opportunamente diluito.

Il conteggio batterico è stato effettuato tramite un microscopio ad epifluorescenza Axioplan Zeiss, osservando le cellule vive (verdi) e morte (rosse) con filtri separati, rispettivamente con fluoresceina (BP 450-490; FT 510; LP 520) e con rodamina (BP 546/12; FT 580; LP 590). Per evitare il rapido decadimento della fluorescenza, l'intensità della luce è stata diminuita al di sotto del 50%. Il conteggio cellulare è stato effettuato su un minimo di 20 campi scelti a caso e le concentrazioni sono state riportate come numero medio di cellule ml^{-1} .

Conteggio dei batteri eterotrofi coltivabili (CFU).

Il conteggio dei batteri eterotrofi coltivabili è stato realizzato su terreno Marine Agar (Difco), la cui composizione è illustrata nella [tabella 2](#).

Campioni di acqua, prelevati direttamente *in situ* o dalle vasche di sperimentazione, sono stati seminati in doppio su piastre del tramite diluizioni seriali.

Le piastre così preparate sono state incubate alla temperatura di 25°C per sette giorni e a seguire per altri tre giorni a temperatura ambiente (18°C).

Per il conteggio e il calcolo delle colonie sviluppate sono state scelte le diluizioni che hanno prodotto fra 30 e 150 colonie per piastra. I risultati sono stati espressi come Unità Formanti Colonia (CFU) ml⁻¹ del campione.

RISULTATI

Valutazione della biodegradabilità del biosurfattante EPS-2003.

Prove di degradabilità extracellulare dell'EPS-2003.

In tutti i campioni in studio (Mare Sicilia, Molo Norimberga e porto di Augusta), l'analisi spettrofotometrica dell'attività extracellulare rivela, durante le prime sei ore di analisi un forte tasso di degradazione.

Tale degradazione si mostra più incisiva nei campioni provenienti dal porto di Messina (Mare Sicilia, Molo Norimberga) in cui è possibile osservare una diminuzione dei valori che passano da 0.14 A_{600nm} (time zero) a 0.5 A_{600nm} (time 6 h) mantenendosi costanti fino alla fine della sperimentazione ([figura 3 e 4](#)). Nel campione proveniente dal porto di Augusta l'andamento della curva di degradazione extracellulare procede in maniera simile a quella delle sperimentazioni precedenti, benché siano registrati valori leggermente più alti (0.7) alla fine della sperimentazione ([figura 5](#)).

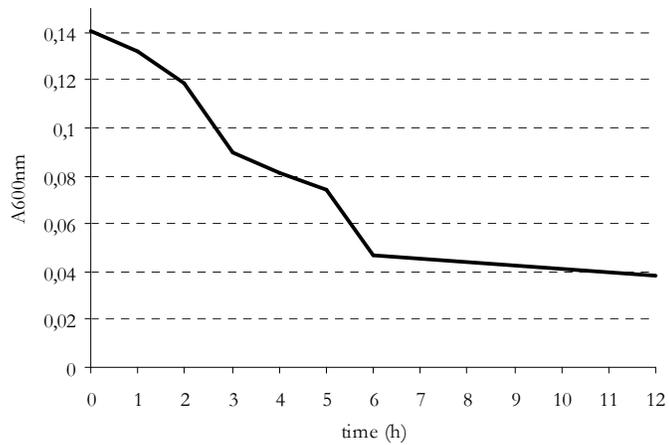
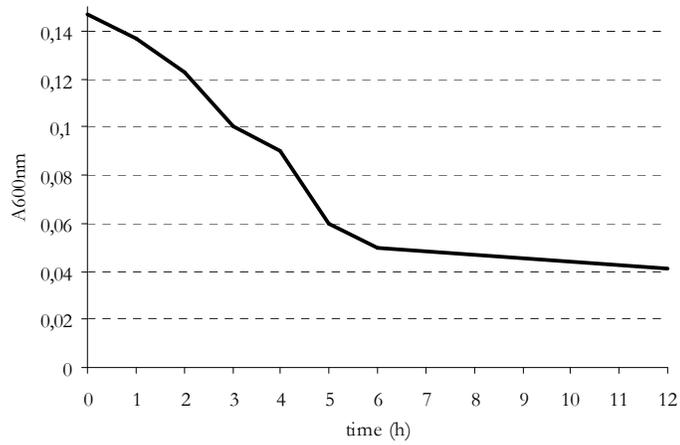
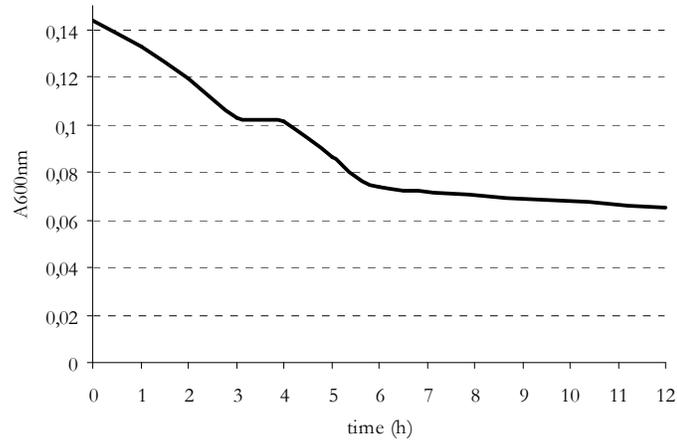


Fig. 3, 4 e 5. Curve di degradazione extracellulare dell'EPS-2003 relative ai campioni prelevati all'interno del porto di Messina Mare Sicilia (in alto) e del Molo Norimberga (al centro) e del porto di Augusta (sotto).

Analisi Tassonomica.

L'analisi del profilo di restrizione dei ceppi (batterici isolati durante le colture di arricchimento)

ha evidenziato la presenza di due patterns di restrizione specifici. Un'ulteriore analisi tassonomica, condotta tramite sequenziamento della porzione del 16S rDNA, ha rilevato inoltre che tutti gli isolati appartenevano al gruppo dei γ -Proteobatteri. Dei dieci ceppi batterici isolati, sette (identificati come isoDE-01, isoDE-02, isoDE-04, isoDE-05, isoDE-06, isoDE-09 e isoDE-10) sono risultati affiliabili a *Pseudoalteromonas* sp. A28 con un grado di similarità del 100%, i restanti tre ceppi batterici (isoDE-03, isoDE-04 e isoDE-07) sono risultati essere correlati, con una similarità del 98.9% a *Vibrio proteolyticus* (figura 6). Due isolati, isoDE-01 e isoDE-07, sono stati scelti come ceppi rappresentativi per effettuare i test di respirometria e di mineralizzazione. Inoltre, come indice dell'attività metabolica, sono stati presi in considerazione la capacità di crescita e il quantitativo di RNA totale registrati durante la coltivazione su terreno salino contenente EPS-2003.

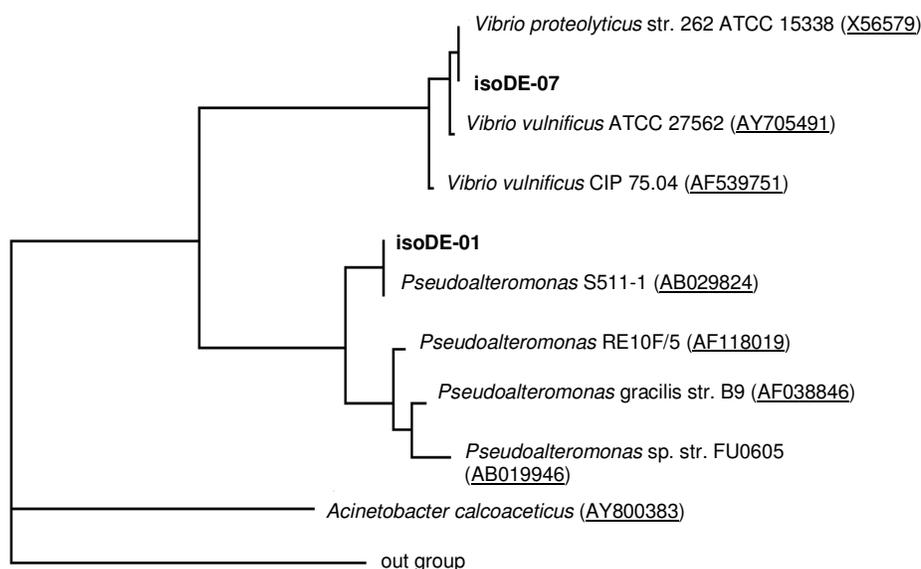


Fig. 6. Albero filogenetico dei batteri isolati durante le prove di arricchimento con EPS-2003. Le affiliazioni filogenetiche sono basate sulla comparazione delle sequenze geniche complete del 16S rDNA. Nell'albero filogenetico è inoltre rappresentata la posizione tassonomica di *A. calcoaceticus*, produttore del biosurfattante (EPS-2003) utilizzato in questo lavoro.

Crescita batterica.

Durante i primi giorni di coltivazione in terreno salino ONR7a addizionato con EPS-2003 (0.1%) il ceppo isoDE-01 ha mostrato un incremento della biomassa (misurata come densità ottica), che passa da valori prossimi allo zero al tempo dell'inoculo, a valori medi di circa 1 al terzo giorno. Tale incremento raggiunge il massimo valore, circa 1.6 (OD_{600nm}), al settimo giorno. Successivamente la misura della biomassa microbica ha mostrato una fase stazionaria che si è mantenuta fino alla fine dell'esperimento (dodicesimo giorno).

Quando lo stesso ceppo è stato coltivato in terreno ONR7a, è stato possibile assistere ad una

crescita rallentata con un valore massimo di 0.6 (OD_{600nm}), che si è mantenuto costante per tutto il tempo di sperimentazione.

Il ceppo isoDE-07 ha mostrato un andamento simile al ceppo isoDE-01 durante la crescita in ONR7a con EPS-2003 (0.1%). Durante i primi quattro giorni di coltivazione è stato possibile evidenziare un incremento della biomassa, che passa da valori di assorbanza di 0.05 (tempo dell'inoculo) a 1.4 (a tempo sette giorni), tale valore si mantiene costante per il restante tempo di sperimentazione. Quando il ceppo isoDE-07 è stato coltivato in terreno ONR7a sono stati registrati valori massimi di 0.5 (OD_{600nm}), che si sono mantenuti costanti per tutto il tempo di sperimentazione (figura 7).

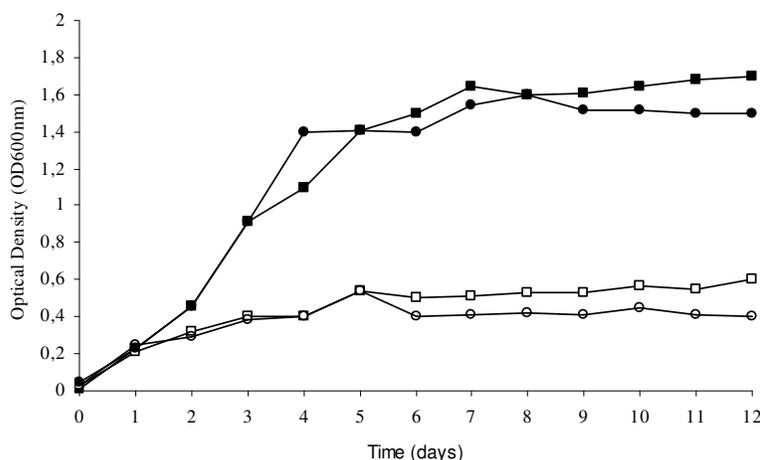


Fig. 7. Curve di crescita dei ceppi isoDE-01 (indicato con i quadrati) e isoDE-07 (indicato con i cerchi), durante la crescita in ONR7a addizionato con EPS-2003 (riempimento nero) solo in ONR7a come controllo (riempimento bianco).

Analisi del quantitativo di RNA totale.

Durante il periodo di coltivazione in ONR7a addizionato con EPS-2003 allo 0.1% il quantitativo di RNA totale tende ad aumentare sia per il ceppo isoDE-01 che per il ceppo isoDE-07. Il ceppo isoDE-01 mostra un incremento dei valori che passano da 23 ng μl^{-1} al tempo dell'inoculo a 63 ng μl^{-1} dopo quattro giorni e arriva a 85 ng μl^{-1} alla fine del periodo di osservazione. Per contro valori medi di 30 ng μl^{-1} sono rilevati per tutto il periodo di osservazione nella coltivazioni in ONR7a.

Un andamento simile è mostrato per ceppo isoDE-07 (figura 8).

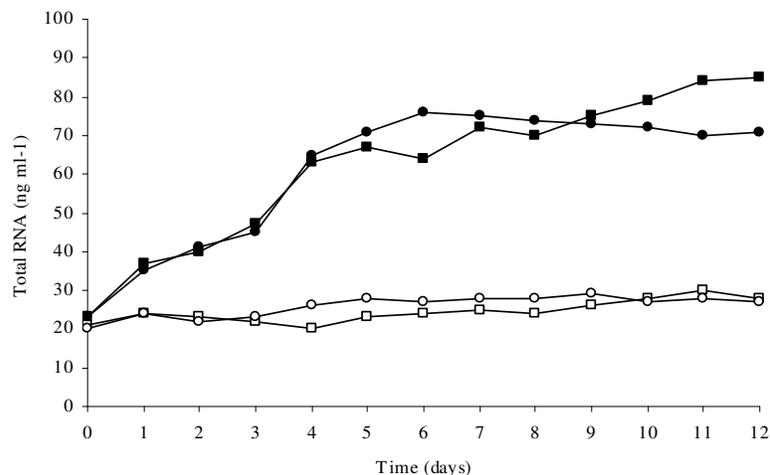


Fig. 8. Misura spettrofotometrica del quantitativo di RNA totale dei ceppi isoDE-01 (indicato con i quadrati) e isoDE-07 (indicato con i rotondi), durante crescita in ONR7a addizionato con EPS-2003 (riempimento nero) e in ONR7a come controllo (riempimento bianco).

Mineralizzazione dell'EPS e respirometria.

La mineralizzazione aerobica si riferisce alla conversione del biodispersante EPS-2003 a prodotti biochimici quali l'anidride carbonica, l'acqua e la biomassa microbica.

Come mostrato in [figura 9](#), la mineralizzazione dell'EPS-2003 da parte dell'isolato isoDE-01, procede molto più velocemente e in maniera più completa che nell'isolato isoDE-07. Tale processo termina dopo 100-120 ore di coltivazione quando il 35-55% del substrato aggiunto è stato convertito a CO₂.

Più del 90% dell'EPS-2003 è stato mineralizzato da *Pseudoalteromonas* sp. isoDE-01 per la formazione di biomassa (35%) e la respirazione (55%), mentre solo il 60% del substrato esopolisaccaridico è stato mineralizzato dall'isolato isoDE-07 (*Vibrio proteolyticus*) di cui il 25% per la formazione di biomassa e il 35% per la respirazione. Il calcolo del bilancio della mineralizzazione dell'EPS-2003 dei due ceppi utilizzati in questi esperimenti è rappresentato in [figura 10](#).

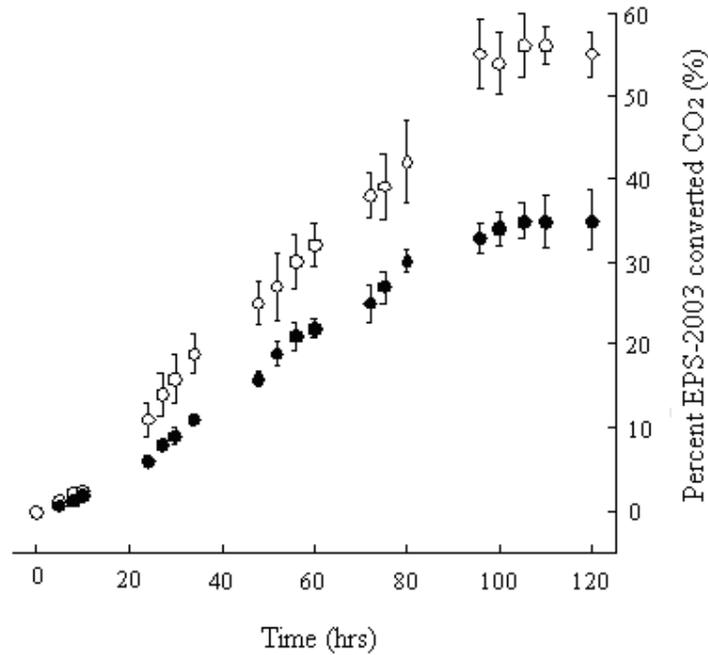


Fig. 9. Mineralizzazione dell'EPS-2003 da parte degli isolate isoDE-01 e isoDE-07.

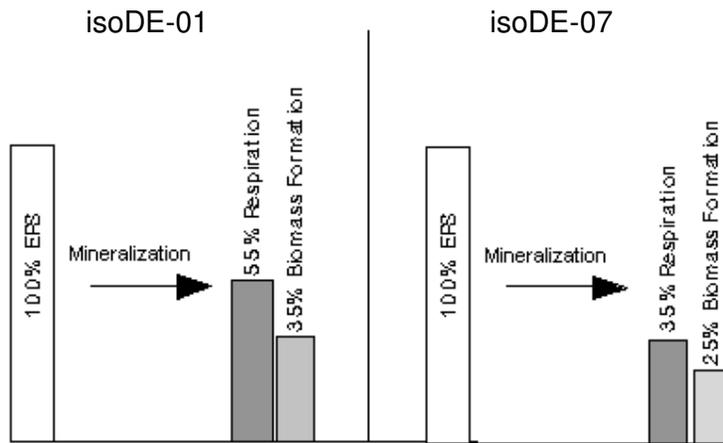


Fig. 10. Calcolo del bilancio di mineralizzazione dell'EPS-2003 da parte dei ceppi isoDE-01 e isoDE-07 utilizzati in questo studio.

Valutazione della tossicità del biosurfattante in studio

Conta delle cellule totali.

I risultati ottenuti durante la misura del batterioplankton totale hanno rivelato una maggiore tossicità del disperdente GAMLEN-OD₄₀₀₀ rispetto all'EPS-2003 (figura 11).

Durante la crescita con EPS-2003, sia allo 0.01% che allo 0.1%, è possibile osservare un progressivo incremento dell'abbondanza batterica di un ordine di grandezza. Durante la crescita con il Gamlen-OD₄₀₀₀ è invece osservabile un andamento costante con valori di medi che si aggirano su 10⁵ cell. ml⁻¹.

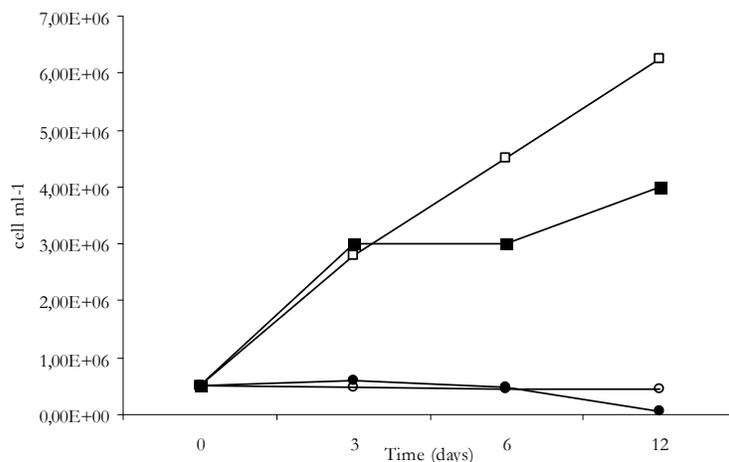


Fig. 11. Misura delle cellule totali tramite conteggio diretto DAPI durante arricchimento dell'acqua di mare con EPS-2003 0.01% (quadrati vuoti), EPS-2003 0.1% (quadrati pieni), Gamlen-OD₄₀₀₀ 0.01% (cerchi vuoti) e Gamlen-OD₄₀₀₀ (cerchi pieni).

Misura delle cellule vitali (Live/Dead staining).

Anche il conteggio delle cellule vitali tramite l'utilizzo di coloranti fluorescenti ha mostrato una diversa risposta della popolazione batterica alla presenza del biosurfattante EPS-2003 e del Gamlen-OD₄₀₀₀ rivelando una maggiore tossicità di quest'ultimo.

L'analisi della vitalità cellulare alla fine del periodo di incubazione rilevava, in presenza di Gamlen-OD₄₀₀₀ alla concentrazione di 0.01%, una popolazione batterica costituita prevalentemente da cellule morte (circa l'84%) e solo una parte minoritaria (16%) da cellule vitali. Una situazione simile è stata riscontrata anche quando è stata aumentata la concentrazione del prodotto (0.1%).

Per contro entrambe le sperimentazione realizzate con l'EPS-2003 hanno evidenziato una maggiore tollerabilità delle cellule batteriche a questo prodotto, mostrando una popolazione costituita in prevalenza da cellule vitali ([figura 12](#)).

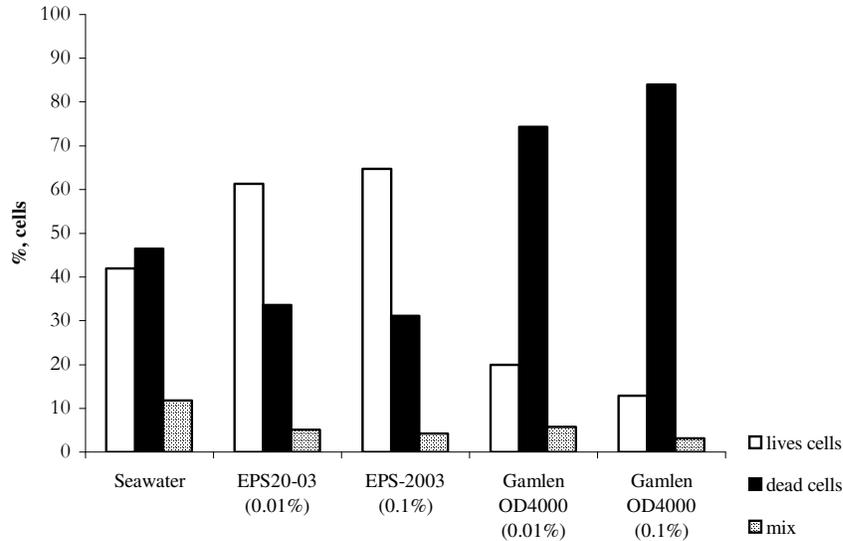


Fig. 12. Analisi della vitalità cellulare misurata tramite colorazione fluorescente Live/Dead. In figura è mostrata lo stato di una popolazione microbica all’inizio del periodo di sperimentazione (Seawater) e dopo dodici giorni con l’aggiunta del surfattante EPS-2003 e del disperdente Gamlen-OD₄₀₀₀. Le cellule vive sono state identificate con il riempimento bianco, le morte con il nero e con la trama a grani sono state indicate tutte le cellule di incerta interpretazione identificate come “mix”.

Conteggio dei batteri eterotrofi coltivabili (CFU).

Al momento dell’inoculo (tempo zero) i valori di CFU ml⁻¹ erano di circa 3×10^3 in tutte le condizioni analizzate. Durante i primi giorni di analisi è stato osservato un decremento del numero dei batteri vitali e coltivabili in tutte le beute in esame, in particolar modo in quelle contenente il disperdente GAMLEN-OD₄₀₀₀ in cui i valori sono arrivati a 2×10^2 CFU ml⁻¹ dopo i primi tre giorni di incubazione. La differente concentrazione di prodotto non sembra necessariamente influenzare la vitalità cellulare su piastra, dal momento che gli andamenti si presentano abbastanza simili per tutte le condizioni. Anche durante la coltivazione con EPS-2003 si può assistere ad un iniziale decremento dei valori di CFU ml⁻¹ che si mantiene poi costante per tutto il periodo di sperimentazione. Per contro la coltivazione con GAMLEN-OD₄₀₀₀ porta ad un decremento costante della vitalità cellulare che continua fino alla fine della sperimentazione (figura 13).

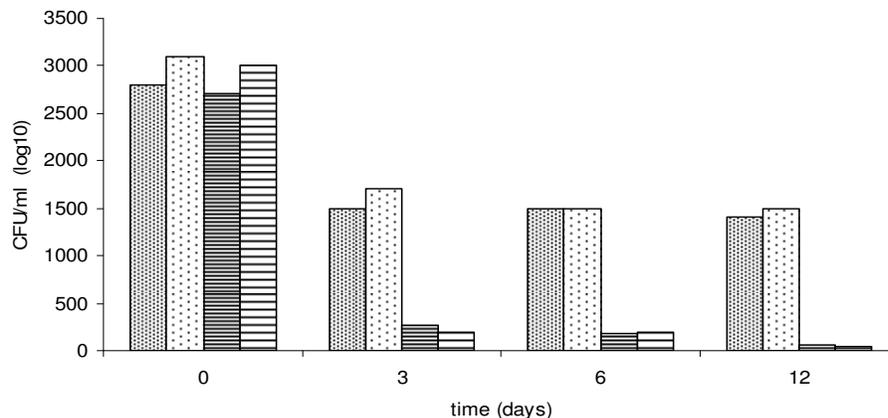


Fig. 13. Influenza del biosurfattante EPS-2003 (riempimento a grani) e del biodispersante (riempimento a righe) sulla vitalità di una popolazione microbica naturale espressa come capacità di formare colonia (CFU). Gamlen-OD₄₀₀₀ (riempimento a righe) sulla vitalità cellulare. Sono state analizzate concentrazioni di sostanze dello 0.1 (granio e righe più strette) e dello 0.01% (grani e righe più larghe) al fine di valutare quale di queste concentrazioni potesse risultare tossica.

DISCUSSIONI e CONCLUSIONI

Da circa vent'anni Rosenberg *et al.*, hanno descritto la degradazione microbica dell'Emulsan (Shoham *et al.* 1983; Shoham and Rosenberg, 1983). L'Emulsan è un biosurfattante prodotto da *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 e costituito chimicamente da un eteropolisaccaride polianionico.

Attraverso culture di arricchimento è stata selezionata una popolazione batterica mista, capace di degradare questa molecola utilizzandola come unica fonte di carbonio.

Da queste colture è stato inoltre isolato un batterio degradante l'Emulsan, chiamato YUV-1, dalla forma bastoncellare, gram-negativo e non sporulante con un metabolismo strettamente aerobio e una capacità di crescita ottimale nei terreni minerali contenenti estratto di lievito.

Durante la coltivazione in piastra del ceppo YUV-1, con *A. calcoaceticus* RAG-1, è stata osservata la formazione di placche traslucide riconducibili alla solubilizzazione delle capsula di Emulsan del ceppo RAG-1, ad opera di un enzima isolato e caratterizzato come una endoglicosidasi chiamata Emulsan Depolimerasi. Una completa degradazione dell'Emulsan ad opera di questo enzima porta alla formazione di oligosaccaridi con un peso molecolare di 3000 Dalton (Shoham and Rosenberg, 1983).

Dalle nostre sperimentazioni sono state ottenute nuove informazioni utili sull'attacco microbico e sull'emulsificazione del biosurfattante.

La degradazione dell'EPS-2003, da parte dei ceppi isoDE-01 e isoDE-07 dimostrava una grande accessibilità e biodegradabilità del prodotto ad opera dei batteri negli ambienti marini naturali.

Tale degradabilità appariva sensibilmente superiore rispetto, a quella riportata per i composti simili attualmente utilizzati come emulsificanti (Emulsan). Infatti, la degradazione microbica dell'Emulsan ad opera del ceppo batterico YUV-1 è stata documentata come un processo bifasico che necessita solitamente di una fonte carbonica supplementare degradabile. La dinamica di questo processo degradativo è caratterizzato, durante le prime 24 ore, da un aumento della concentrazione cellulare (di almeno dieci ordini di grandezza) che non corrisponde comunque ad una diminuzione visibile della quantità di Emulsan (fase di induzione). Durante la crescita batterica, nella fase lag (da 24 a 48 ore), la molecola dell'Emulsan viene inattivata tramite un fenomeno di depolimerizzazione ma non viene totalmente eliminata.

L'attacco biochimico del ceppo YUV-1 alle molecole di Emulsan si realizza completamente durante la seconda fase di crescere (da 48 a 70 ore); tale attacco è costituito da una depolimerizzazione (Shoham *et al.*, 1983; Shoham e Rosenberg, 1983).

La degradazione dinamica dell'EPS-2003 senza dei prodotti biodegradabili con un'efficacia di una degradazione del 90% dopo 120 ore di incubazione nelle sperimentazioni *in situ*. Inoltre, le popolazioni batteriche che possono degradare tale sostanza in ambiente marino sono distribuite uniformemente nelle comunità naturali. Numerosi isolamenti effettuati sul campione naturale hanno permesso l'identificazione di batterici del genere *Pseudoalteromonas* e *Vibrio* che possono utilizzare l'EPS-2003 come unica fonte di carbonio o energia (dati non mostrati). I risultati ottenuti dalla coltura dei ceppi isoDE-01 ed isoDE-07 in un mezzo solido ed in un mezzo liquido, sono in perfetto accordo con i risultati biomolecolari e con le prove di degradazione e di mineralizzazione. Entrambi i ceppi hanno mostrato un maggiore sviluppo nel terreno in cui era stato addizionato l'EPS-2003. Tale sviluppo è stato evidenziato sia come un aumento della densità ottica che come un aumento del quantitativo dell'rRNA totale.

Tali risultati sono avvalorati dagli esperimenti realizzati in beuta per testare la tossicità del prodotto utilizzato e hanno rivelato un'alta tollerabilità dell'EPS-2003 rispetto al GAMLEN OD₄₀₀₀.

La differente concentrazione di prodotto non sembra necessariamente influenzare la vitalità cellulare su piastra visto che gli andamenti si presentano abbastanza simili per tutte le condizioni.

Tenendo in considerazione i dati ottenuti (e i dati riportati in letteratura) è possibile delineare e confermare i vantaggi dell'utilizzo dei surfattanti di origine microbica, e in particolar modo dell'EPS-2003 prodotto da *Acinetobacter* sp. rispetto ai surfattanti sintetici:

1. Efficacia dei biosurfattanti in condizioni estreme. Le variazioni del pH e della concentrazione salina non influenzano l'attività emulsionante dei biosurfattanti (es.: l'attività emulsionante dell'Alasan è osservata nell'intervallo dei valori di pH fra 3,3 e 9,2 e non è influenzata dalla concentrazione dei cationi mono- e bivalenti come NaCl e MgCl₂), Navon-Venezia *et al.*,1995;
2. Resistenza dei biosurfattanti alle variazioni di temperatura. La temperatura è l'unico fattore che abbia effetto sull'attività emulsionante, infatti l'aumento della temperatura porta all'aumento della solubilizzazione.(es.: attività emulsionante dell'Alasan aumenta con l'aumento della temperatura ed è ottimale a 55°C (Barkay *et al.*,1999);
3. Efficacia dei biosurfattanti a basse concentrazioni. Per neutralizzare una determinata quantità di petrolio è necessaria una quantità pressoché uguale di detergente sintetico, mentre i biosurfattanti sono attivi anche a concentrazioni basse (es.: RAG-1 emulsan è attivo a 0.01 – 0.001%, il rapporto Emulsan/idrocarburo da 1:100 a 1:1000), Rosenberg *et al.*, 1999;
4. Bassa tossicità dei biosurfattanti. La maggior parte dei surfattanti sintetici sono altamente tossici per i microrganismi, inibendo conseguentemente i processi biodegradativi (Laha *et al.*, 1991; 1992), inoltre, possono essere bioaccumulati (Desai *et al.*, 1997). I dati ottenuti in questo studio dimostrano che il biosurfactante EPS-2003 di *Acinetobacter* sp. è degradato dai batteri marini e non è tossico essendo utilizzato per la crescita di tali microrganismi;
5. Possibilità di essere sintetizzati *in-situ*.

PUBBLICAZIONE n° 1

Questo lavoro è stato sottomesso per la pubblicazione su Journal Applied Microbiology in data 18 novembre 2005

(Manuscript ID: JAM-2005-1377)

1 **Biodegradation of a new biosurfactant exopolysaccharide by**

2 **Marine Bacteria**

3

4 **S. Cappello¹, A. Dalby³, B. Tripodo¹, L. Giuliano¹, F. Crescenzi², A. Bergamasco¹ and M.**

5 **M. Yakimov¹**

6 ¹ *Istituto Ambiente Marino Costiero (IAMC) sez. Messina. Istituto Sperimentale*

7 *Talassografico (IST). Spianata S. Raineri, 86 I-98122 Messina (Italy)*

8 ² *ENI Tecnologie, Monterotondo, Roma, Italy*

9 ³ *Institute of Oceanography, Hellenic Center for Marine Research. 46,7km Athinon-*

10 *Souniou, Mavro Lithari P.O. BOX 712 – 19013 Anavissos Athens, Greece.*

11

12 **BIODEGRADATION OF A NEW BIOSURFACTACT**

13

14 *Simone Cappello, Istituto Ambiente Marino Costiero (IAMC) sez. Messina. Istituto Sperimentale Talassografico*

15 *(IST). Spianata S. Raineri, 86 I-98122 Messina, Italy: tel. 0039090669003, fax. 090669007;*

16 *simone.cappello@iamc.cnr.it.*

17

17 **ABSTRACT**

18 S. CAPPELLO, A. DALBY, B. TRIPODO, L. GIULIANO, F. CRESCENZI, A.,
19 BERGAMASCO AND M. M. YAKIMOV

20 **Aims:** Analysis of the biodegradation capacity of a new biosurfactant exopolysaccharide
21 (EPS-2003) by heterotrophic bacterial strains isolated during the screening for EPS-degrading
22 marine bacteria.

23 **Methods and Results:** Ten bacterial strains were isolated from enriched mixed cultures,
24 obtained from seawater samples collected from the harbour of Messina, Italy, using EPS 2003
25 as the sole carbon source. Two representative bacterial strains, isoDES-01, clustered with
26 *Pseudoalteromonas* sp. A28 (100%) and isoDES-07, closely related to *Vibrio proteolyticus*
27 (98.9%), were chosen for mineralization and respirometry tests. Bacterial growth and total
28 RNA measurement were also performed. More than 90% of EPS-2003 was mineralized by the
29 isoDE01 strain, for biomass formation and respiration, while EPS-2003 mineralization by the
30 isoDE-07 strain was less effective, reaching 60%.

31 **Conclusions:** This approach combines the study of the microbial community with its
32 functional aspects (i.e. mineralisation and respirometry test) allowing a more precise
33 assessment of biosurfactant degradation.

34 **Significance and Impact of the Study:** These results enhance our knowledge of microbial
35 ecology of EPS-degrading bacteria and the mechanisms by which this biodegradation occurs.
36 This will prove helpful for predicting the environmental fate of these compounds and for
37 developing practical EPS bioremediation strategies from future marine hydrocarbon pollution.

38

39 **Keywords:** biosurfactant, EPS 2003, biodegradation, *Pseudoalteromonas* sp., *Vibrio*
40 *proteolyticus*.

41

42

SPERIMENTAZIONI in MICROSCALA

Per ottimizzare le tecniche e le metodologie, utilizzate nella determinazione e nella misura dei parametri biotici e abiotici chiave per lo studio dei fenomeni di bioremediation in ambiente costiero sono state allestite due sperimentazioni pilota in microscala (microcosmi).

In queste sperimentazioni è stato valutato l'effetto che l'aggiunta del petrolio greggio o dei nutrienti inorganici potessero avere sulla selezione di una popolazione microbica specializzata nella degradazione degli idrocarburi.

MATERIALI e METODI

Ingegneria dei microcosmi

Nei sistemi in microscala le sperimentazioni sono state realizzate in vasche di vetro rettangolari dalla capacità di 100 litri con dimensione di 100 cm (lunghezza), 30 cm (profondità) e 30 cm (larghezza), come mostrato in [figura 14 e 15a e 15b](#).

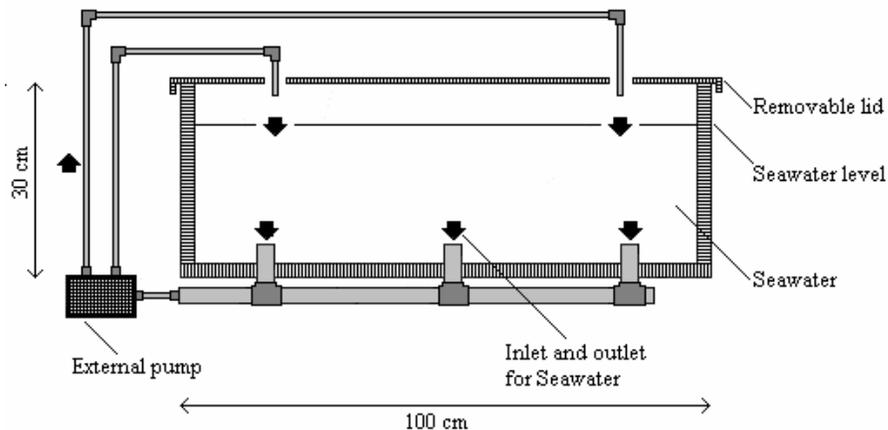


Fig. 14. Struttura schematica delle vasche utilizzate per le sperimentazioni in microscala (microcosmi).

Durante le sperimentazioni l'acqua contenuta all'interno delle vasche è mantenuta in continuo movimento tramite un sistema di ricircolo interno.

L'acqua viene aspirata tramite tre condotte dal diametro di 250 mm, poste sul fondo della vasca, da un sistema di pompe esterne (Maxi-Jet MJ1000 1000l/h – 280 usg/h) ed è riammessa nel sistema attraverso un circuito perimetrale. Sia la pompa esterna che i tubi



Figura 15a e 15b. Sistemi in microscala (microcosmi) utilizzati durante le nostre sperimentazioni.

perimetrali sono accessoriati con valvole a farfalla in pvc dal diametro di 100 mm, al fine di permettere una regolazione nella velocità di flusso.

La velocità di ricircolo dell'acqua (5 litri h^{-1}) è stata arbitrariamente settata al fine di ottenere una sufficiente ossigenazione del sistema e di evitare una possibile adesione della componente idrocarburica alle pareti delle vasche.

I microcosmi sono altresì dotati di un coperchio in vetro removibile posto al fine di limitare i processi di evaporazione del greggio.

Set-up dei microcosmi

Durante le sperimentazioni le vasche sono state riempite con 70 litri di acqua marina prelevata, tramite una presa diretta, dal un sito (Mare Sicilia) antistante l'Istituto per l'Ambiente Marino Costiero (IAMC) IST-CNR, come mostrato in [figura 2](#).

L'acqua è stata preventivamente filtrata con un filtro di nylon (porosità $100 \mu\text{m}$) al fine di eliminare possibili detriti in sospensione e metazoi. Per ottenere sistemi chimicamente e biologicamente omogenei l'acqua è stata raccolta in un unico contenitore sterile e suddivisa nelle vasche d'analisi.

La temperatura dell'acqua all'interno dei microcosmi è stata mantenuta intorno ai 18°C per tutto il periodo di sperimentazione, con fluttuazioni giornaliere che non hanno mai superato i 2°C .

Il fotoperiodo è riprodotto utilizzando un sistema di illuminazione formato da sei lampade visibili/UV (36W, 120 cm) che riproducono il ciclo giorno/notte 12:12h.

Schema delle Sperimentazioni in microscala

Al fine di ottimizzare le tecniche e identificare i parametri chiave da utilizzare nel corso di questo lavoro sono state realizzate due sperimentazioni pilota in microscala. Nella prima è stato allestito un microcosmo (*microcosmo A*) contenente 70 litri di acqua di mare a cui sono stati addizionati dei nutrienti inorganici ad una concentrazione superiore di quella presente naturalmente nell'acqua marina. Sali di fosfato di potassio monobasico (KH_2PO_4), cloruro d'ammonio (NH_4Cl) e nitrato di sodio (NaNO_3), rispettivamente come fonte inorganica di fosfato, ammonio e nitrato sono stati rispettivamente aggiunti alle quantità di 0.077, 0.2 e 0.1 gr/L.

Mentre la seconda sperimentazione (*microcosmo B*) è stata allestita aggiungendo all'acqua di mare del petrolio greggio alla concentrazione di 0.01 gr/L. Il petrolio greggio utilizzato in questo lavoro è stato del tipo Arabian Light Crude Oil. Tale greggio, le cui principali caratteristiche chimico fisiche sono state riportate in tabella 3, è generalmente indicato in letteratura come uno dei greggi di riferimento per gli studi di bioremediation.

Tempistica e Campionamento

Le sperimentazioni realizzate in microscala sono state condotte per un periodo di tempo di 15 giorni. Ad intervalli di 2, 5, 8, 12 e 15 giorni a partire dal momento dell'inoculo (tempo zero), sub-campioni d'acqua sono stati raccolti direttamente dalle vasche di reazioni per la misura dei parametri funzionali biotici e abiotici da noi identificati come fondamentali per lo studio dei processi di bioremediation.

Misura dei Parametri Funzionali

Tutti i campioni provenienti dagli esperimenti di simulazione in microscala sono stati monitorati attraverso:

Analisi dei Parametri Abiotici “Chiave”

Determinazione dei nutrienti: Ammoniaci, Nitrati, Nitriti, Fosfati.

Analisi del: Particulate Organic Carbon (POC), Particulate Organic Nitrogen (PON), Dissolved Organic Carbon (DOC).

Analisi quali-quantitativa del petrolio.

Misura del pH e della Temperatura.

Misure Batteriologiche di Abbondanza

Conta delle cellule totali.

Misura delle cellule vitali (Live/ Dead staining)

Conteggio cellulare tramite Citometria a Flusso.

Misure Batteriologiche di Diversità

Conteggio dei batteri eterotrofi coltivabili (CFU).

Conteggio dei batteri capaci di utilizzare il petrolio (MPN)

Isolamento dei batteri idrocarburo degradanti (HCB).

Diversità Coloniale.

Analisi tassonomica del 16S crDNA.

Misure Relative al Metabolismo Batterico

Attività enzimatica

Biochemical Oxygen Demand (BOD).

Misure di Abbondanza Virale

Misure di Abbondanza degli Eterotrophic NanoFlagellates (HNF)

Analisi dei Parametri Abiotici “Chiave”

Per il nostro studio abbiamo considerato fondamentale la determinazione quantitativa di alcuni nutrienti inorganici, quali: l'Ammoniaca, i Nitrati, i Nitriti e i Fosfati. Particolare attenzione è stata rivolta anche all'analisi del: Particulate Organic Carbon (POC), Particulate Organic Nitrogen (PON), Dissolved Organic Carbon (DOC).

Inoltre le analisi quali quantitative del petrolio utilizzato durante i processi di bioremediation sono state effettuate tramite gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GCMS).

Determinazione dei nutrienti: Ammoniaca, Nitrati, Nitriti, Fosfati.

I campioni per l'analisi dei nutrienti (N-NH₄, N-NO₂, N-NO₃, P-PO₄) sono stati filtrati su filtri Whatman GF/F e quindi congelati a -20 °C fino al momento delle analisi. Queste sono state eseguite utilizzando uno spettrofotometro Cary 50 Varian. Le analisi di fosfati, nitriti e nitrati sono state effettuate secondo le metodiche descritte da Strickland e Parsons (1972), mentre l'ammoniaca è stata analizzata secondo il metodo di Aminot e Chaussepied (1983).

Analisi del Particulate Organic Carbon (POC), Particulate Organic Nitrogen (PON) e Dissolved Organic Carbon (DOC).

Aliquote del volume di 1 litro d'acqua sono state prelevate direttamente dalle vasche di analisi per la misura del Particulate Organic Carbon (POC), Particulate Organic Nitrogen (PON) e

Dissolved Organic Carbon (DOC). Questi campioni sono stati filtrati, come descritto da Altabet *et al.* (1989) su filtri Anopore da 0.2 micron. I filtri sono stati successivamente essiccati a 60°C, lavati con HCl e nuovamente asciugati a 60°C e conservati.

Le analisi sono state condotte con l'utilizzo di un analizzatore Leemann Labs CHN utilizzando come standard l'acetanidile.

Analisi quali-quantitativa del petrolio.

Il petrolio è una miscela estremamente complessa di idrocarburi costituita da un amalgama di centinaia di composti chimici differenti che variano in relazione alla regione ed alle zone geologica di formazione. La maggior parte dei composti può essere differenziata in volatili, volubili e suscettibili di biodegradazione; di questi alcuni sono facilmente degradabili, altri resistono alla degradazione per un lungo periodo altri sono virtualmente non biodegradabili.

Gli idrocarburi del petrolio possono in generale essere divisi in quattro categorie principali: saturi, aromatici, asfalteni e resine. La distribuzione di tali frazioni all'interno del greggio è stata ampiamente studiata da Tissot e Welte (1984), che attraverso l'analisi di circa 527 tipi di petrolio differenti hanno cercato di tracciare un profilo generale della composizione di un greggio ideale identificando una composizione (virtuale) media costituita per il 58.2% dagli idrocarburi saturi, per il 28.6% da quelli aromatici e per il 14.2% da composti polari.

A queste frazioni principali vanno aggiunte altre frazioni quantitativamente minoritarie caratterizzate da resine, paraffine e asfalteni la cui presenza è comunque quantitativamente costante nei diversi tipi di greggio.

Gli idrocarburi saturi costituiscono il gruppo relativamente più abbondante delle varie frazioni del petrolio e con questo termine sono identificati generalmente tutti quei composti aventi nella loro struttura un singolo legame C-C a cui fanno parte gli n-alcani, gli alcani ramificati e i cicloalcani.

Gli alcani lineari rappresentano la frazione più abbondante e anche quella più facilmente degradabile. Come riportato in letteratura i microrganismi sono in grado di metabolizzare composti con un elevato numero di atomi di carbonio (superiore a n-C₄₄) anche se molecole aventi da 10 a i 24 atomi di C (C₁₀-C₂₄) sono usualmente più semplici da degradare. Le catene più corte di C₁₂ sono generalmente interessate da fenomeni di evaporazione. Solo alcune specie batteriche sono capaci di utilizzare gli alcani della serie C₁-C₄; e alcuni microrganismi possono portare alla degradazione degli alcani C₅-C₉ che risultano essere tossiche per gli altri.

Gli alcani ramificati sono, se paragonati ai lineari, più resistenti all'attacco microbico nei processi di bioremediation.

Come evidenziato da Schaeffer *et al.* (1979) maggiore è il numero delle ramificazioni, maggiore sarà la resistenza di tali composti all'attacco microbico, identificando in queste ramificazioni dei blocchi per i processi biodegradativi.

A basse concentrazioni i cicloalcani possono essere degradati in piccole quantità, mentre quando sono altamente concentrati possono persistere per lunghi periodi. I cicloalcani sono particolarmente resistenti all'attacco microbico specie se costituiti da complessi aliciclici, come ad esempio l'opano.

Gli idrocarburi aromatici sono caratterizzati da tutti quei composti costituiti dalla presenza di uno o più anelli benzenici. Questi composti possono essere degradati più facilmente quanto più è basso il loro peso molecolare. Gli idrocarburi aromatici a basso peso molecolare sono normalmente soggetti a fenomeni di evaporazione e sebbene altamente tossici per molti organismi marini sono al tempo stesso molto facili da degradare. Petroli leggeri contengono normalmente tra il 2 e il 20% di composti aromatici leggeri, tuttavia questa proporzione è inferiore negli oli pesanti. Ad un aumento del peso molecolare e della complessità della struttura coincide un aumento della difficoltà di degradazione, infatti la degradazione di composti poliaromatici non è rapida come quella delle sostanze monoaromatiche e composti con cinque o più anelli non possono essere attaccati e tendono a persistere nell'ambiente. Composti aromatici ad alto peso molecolare rappresentano il 2-10% della composizione dei petroli leggeri ed il 35% di quelli pesanti.

La frazione degli asfalteni contiene composti non biodegradabili o con una quota di degradazione davvero bassa, la stessa cosa vale per le resine che includono tutta una serie di composti del petrolio contenenti azoto, zolfo e/o ossigeno come costituenti; tuttavia a basse concentrazioni anche queste sostanze possono andare incontro a fenomeni di limitato attacco microbico. Asfalteni e resine sono composti difficili da analizzare e per questo motivo sono poche le informazioni sono generalmente disponibili sulla loro degradazione. Petroli leggeri contengono generalmente dall'1 al 5% di queste sostanze, mentre nei petroli pesanti o invecchiati la loro quantità può arrivare al 25% per gli asfalteni e al 20% per le resine. La degradazione di vari componenti del petrolio contenenti zolfo sono stati ampiamente esaminati ma nessun pathway di degradazione uniforme, comparabile con quelli stabiliti per gli idrocarburi alifatici aromatici è stato identificato come caratteristico.

Al fine di analizzare la composizione degli idrocarburi totali e dei loro derivati (total hydrocarbons and their derivatives, TERHC) nei campioni di acqua marina in studio (durante le sperimentazioni effettuate) sono state realizzate delle misure qualitative e quantitative tramite gas cromatografia accoppiata con la spettrometria di massa (GCMS).

Dopo previa acidificazione con HCl 4M dei campioni in studio, l'estrazione idrocarburica è stata realizzata, a temperatura ambiente, tramite successivi lavaggi con diclorometano (Dicloruro di Metile, CH₂Cl₂ - Baker) alla concentrazione finale del 10% (v/v). Una volta eliminata la fase acquosa il campione è stato trattato con Na₂SO₄ anidro (100 mg/ml concentrazione finale) per rimuovere residui di acqua. L'estratto ottenuto è stato concentrato tramite evaporazione (Rotavapor R110, Büchi, Switzerland) a temperatura ambiente (< di 30°C).

I campioni in analisi sono stati processati con l'utilizzo di tre standard: uno interno, il nonano e due di processo, il fitano (Phytane C₂₀H₄₂ – FLUKA) e il pristano (Pristane C₁₉H₄₀ – SIGMA), entrambi alla concentrazione di 1 µl L⁻¹ di campione. L'uso di tali standard è stato fondamentale sia per evitare errori derivanti dalla cattiva manipolazione e del cattivo trattamento dei campioni, sia per permettere il calcolo quali quantitativo delle componenti idrocarburiche estratte.

Tutti i campioni sono stati analizzati tramite uno spettrometro di massa Perkin-Elmer TurboMass connesso ad un AutoSystem XL GC con colonna capillare di silice (DB-TPH 30 m x 0.32 mm; J&W Scientific). Nello spettrometro è stato utilizzato un gas inerte come l'elio con un flusso di 1.7 ml/min, mentre il volume di iniezione è stato di 1µl, con una temperatura settata a 50 °C per 5 min e incrementata fino a 300 °C tramite step successivi di 6 °C/min per un totale di 20 min.

Per normalizzare i risultati ottenuti dall'analisi GC-MS e misurare l'intensità della degradazione è stato calcolato il rapporto tra l'eptadecano (C₁₇) ed il fitano (2,6,10,14-C₂₀) e tra l'octadecano (n-C₁₈) e il pristano (2,6,10,14-Tetrametilpentadecano) utilizzando la formula (Marty, 1994):

$$(C_{17}/Ph + C_{18}/Pr) / 2$$

Misura del pH e della Temperatura

La temperatura pur non presentandosi come il maggior fattore limitante per la degradazione degli idrocarburi influisce sullo stato fisico dell'inquinante e sulla disponibilità dello stesso per la colonizzazione microbica. In ambiente marino la temperatura si aggira normalmente tra i -2 e i 35°C e numerose pubblicazioni hanno dimostrato i processi di biodegradazione in questo range (Zo Bell 1973; Traxler, 1973; Kulg e Markovetz 1976). Le quote di degradazione degli idrocarburi sono difatti più veloci ad alte temperature e decrementano drammaticamente in situazioni climatiche più fredde.

Sperimentazioni di laboratorio hanno dimostrato che una diminuzione della temperatura da 25 a 5°C può determinare una riduzione dell'efficienza di biodegradazione di almeno dieci volte. A basse temperature il petrolio si presenta particolarmente viscoso (Atlas e Bartha, 1972) determinando un rallentamento dei processi di volatilizzazione delle frazioni di petrolio a basso peso molecolare che rimangono persistenti, inibendo l'attività microbica a causa della loro elevata tossicità (Leahy e Colwell, 1999).

In uno studio condotto da Atlas sono stati analizzati i processi degradativi di sette tipi di petrolio in dipendenza della loro composizione e della temperatura di incubazione. Ad una temperatura media di 20°C i petroli leggeri dopo i processi di weathering chimico fisico sono maggiormente suscettibili ai processi biodegradativi; per contro nei “petroli pesanti” le quote di degradazione sono generalmente inferiori. I “petroli leggeri” tuttavia a 10°C perdono lentamente le frazioni volatili e le sostanze appartenenti alle paraffine, agli aromatici e agli asfaltani sono maggiormente predisposte alla degradazione che avviene a base temperature.

Data la loro naturale stabilità gli ecosistemi marini non sono particolarmente soggetti a fluttuazioni per variabili come il pH che si mantiene approssimativamente tra valori di 7.6 a 8.1. Le variazioni del pH non sembrano avere un importante effetto sui processi degradativi, sebbene pH estremi possono condizionare negativamente l'abilità dei microrganismi a legarsi alla superficie degli idrocarburi.

Ad intervalli regolari di 24 ore e per tutto il periodo di sperimentazione il pH e la temperatura dei sistemi in studio sono stati accuratamente monitorati. Il pH veniva misurato con l'utilizzo di un pHmetro 3510 pH Meter –Jenway.

Misure di abbondanza microbica

L'abbondanza microbica nei campioni in esame è stata misurata tramite conteggio microscopico delle cellule totali e delle cellule vitali. Il quantitativo batterico nei campioni è stato, inoltre, analizzato tramite la citometria di flusso.

Conta delle cellule totali

In accordo con la metodologia riportata dal Porter (Porter e Feig, 1980), l'abbondanza batterica è stata misurata tramite conta diretta al microscopio ad epifluorescenza (Rif. Cap. I – *Paragrafo I: Sperimentazioni in Nanoscala*).

Campioni di acqua (50 ml) sono stati fissati utilizzando della paraformaldeide alla concentrazione finale del 2% in tampone fosfato salino (PBS: 120mM NaCl, 2.7 mM KCl in 10 mM in tampone fosfato, pH 7.6) a 4°C.

L'abbondanza delle cellule batteriche è stata stimata filtrando dei subvolumi di campione su filtri in policarbonato Black Costar con porosità di 0.2 µm e 25 mm di diametro (Nucleopore, Corning Costar Corp., Cambridge, MA).

Una media di 200 cellule per filtro sono state contate utilizzando un microscopio Axioplan 2 Imaging (Zeiss), equipaggiato con filtri appositi.

Misura delle cellule vitali (LIVE/DEAD staining).

La misura delle cellule totali è stata realizzata tramite colorazione con Live/Dead BacLight Viability Kit (Molecular Probes, Inc.) (Rif. Cap. I – *Paragrafo I: Sperimentazioni in Nanoscala*).

I campioni così preparati sono stati incubati a temperatura ambiente, al buio, per 15 minuti e poi filtrati con filtri in policarbonato Black Costar con porosità di 0.2 µm e 25mm di diametro (Nucleopore, Corning Costar Corp., Cambridge, MA).

Quando il conteggio dei batteri è stato reso difficoltoso dall'abbondanza batterica (stimolata dalle condizioni sperimentali) il campione è stato opportunamente diluito.

Il conteggio batterico è stato effettuato tramite un microscopio ad epifluorescenza Axioplan Zeiss, osservando le cellule vive (verdi) e morte (rosse) con filtri separati, rispettivamente con fluoresceina (BP 450-490; FT 510; LP 520) e con rodamina (BP 546/12; FT 580; LP 590). Per evitare il rapido decadimento della fluorescenza, l'intensità della luce è stata diminuita al di sotto del 50%. Il conteggio cellulare è stato effettuato su un minimo di 20 campi scelti a caso e le concentrazioni sono state riportate come numero medio di cellule ml⁻¹.

Conteggio cellulare tramite Citometria a Flusso.

La citometria a flusso è il metodo analitico con le maggiori potenzialità nello studio dei microrganismi ambientali grazie all'elevata quantità, qualità e rapidità dei dati ottenuti. Dall'analisi di tre parametri di riferimento (l'angolo di incidenza; l'angolo di riflessione; lo scatter della luce incidente dei tre canali di luce fluorescente blu, verde e rossa) è possibile ottenere informazioni indicative sia per l'enumerazione dei microrganismi ambientali sia per l'identificazione delle loro caratteristiche fisiche (es. taglia e forma).

I campioni per le analisi quantitative, sono stati preparati aggiungendo a 500 µl di campione in esame 10 µl di biglie fluorescenti (necessarie per la determinazione numerica e dimensionale) e 1.25 µl di Syber Green. Dopo incubazione al buio per 15 minuti i campioni sono stati analizzati utilizzando un Citometro a Flusso del tipo FACSCalibur (Becton Dickinson), equipaggiato con un laser ad argon da 15mW avente una λ di emissione di 488nm con filtri standard.

Parallelamente a queste analisi, previa incubazione del campione con Acridina Orange (5 minuti al buio), è stata analizzata la misura quantitativa della concentrazione del DNA cellulare.

Per facilità di analisi il DNA è stato suddiviso in tre classi in riferimento al suo peso molecolare basso (low DNA, LDNA), alto (high DNA, HDNA) e altissimo (super high DNA, SHDNA).

Misure della diversità microbica

Come è stato dimostrato da numerosi studi (Rolling *et al.*, 2003; Yakimov *et al.*, 2005) i microrganismi capaci di degradare gli idrocarburi sono ampiamente distribuiti nell'ambiente marino. Esistono tuttavia molte difficoltà per la caratterizzazione delle comunità microbiche interessate dagli idrocarburi del petrolio principalmente a causa delle numerose interazioni che si vengono a costituire tra questi batteri, i singoli substrati e/o l'ambiente di reazione. Le metodologie per catalogare le diversità microbica e le funzioni della comunità possono essere suddivise in due categorie; le metodologie “cultura dipendente” e metodologie “cultura-indipendente”, nelle quali sono incluse tutte le tecniche di caratterizzazione genetica. I tradizionali metodi cultura-dipendente sono basati sulla differenziazione morfologica, metabolica e fisiologica dei batteri previo isolamento e coltivazione su terreni solidi; o ancora prove sullo stato liquido (come il Most Probabile Number, MPN) o ancora l'utilizzazione delle piastre Biolog (il metodo più recente). Tuttavia questi studi sono fortemente limitati poiché la maggior parte di queste specie batteriche (dal 90 al 99%), con le normali tecniche di coltura, non determina la formazione di colonie (MacNaughton *et al.*, 1999).

Per ovviare a questo problema, molti ricercatori hanno studiato i cambiamenti della comunità batterica tramite le tecniche di “cultura-indipendente”, che comprendono generalmente l'esame diretto dei microrganismi metabolicamente attivi utilizzando colorazioni e marker fluorescenti come il (INT)-formizan e il CTC e la Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). La rapida espansione delle tecniche di biologia molecolare ha permesso inoltre un'estensiva applicazione per l'identificazione della diversità microbica attraverso l'analisi del 16S rRNA (Torsvik *et al.* 2002) e la catena di amplificazione della polimerasi (PCR) in combinazioni con metodi che generano dei fingerprinting come gel elettroforesi a gradiente di temperatura (TGGE), gel a gradiente di denaturazione (DGGE), Termal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) (Evans *et al.*, 2002).

In base a queste considerazioni è facile intuire che solo attraverso la comparazione di tecniche e metodologie diverse ci è permesso ottenere una visione quantomeno realistica della struttura e della funzionalità della comunità microbica naturale.

Il conteggio dei batteri eterotrofi coltivabili e dei batteri idrocarburodegradanti, l'analisi morfologica delle colonie e l'analisi tassonomica del 16S crDNA sono state considerate come le misure principali per la determinazione della diversità microbica.

Conteggio dei batteri eterotrofi coltivabili (CFU).

Il conteggio dei batteri eterotrofi coltivabili è stato realizzato su terreno Marine Agar (Difco), la cui formulazione è illustrata nella [tabella 2](#).

I campioni di acqua, prelevati direttamente *in situ* o dalle vasche di sperimentazione, sono stati seminati in doppio su piastre tramite diluizioni seriali.

Le piastre, così preparate, sono state incubate alla temperatura di 25°C per 7 giorni e a seguire per altri 3 giorni a temperatura ambiente (18°C).

Per il conteggio e il calcolo delle colonie sviluppate sono state scelte le diluizioni che hanno prodotto fra 30 e 150 colonie per piastra. I risultati sono stati espressi come Unita' Formanti Colonia (CFU) ml⁻¹ del campione.

Conteggio dei batteri capaci di utilizzare il petrolio (MPN).

Il conteggio dei batteri capaci di degradare il petrolio è stato realizzato utilizzando il metodo del Most Probabile Number (MPN) di Brown e Braddock (1990).

La metodologia del Most Probabile Number (MPN) è stata proposta come il metodo più realistico per l'enumerazione dei microrganismi che utilizzano gli idrocarburi poiché questa procedura elimina la necessità di un agente solidificante e permette direttamente l'utilizzo degli idrocarburi, come unica fonte di carbonio, da parte dei microrganismi attivi, eliminando tra l'altro possibili tracce di contaminanti organici.

A tale scopo è stato impiegato un terreno formulato sulla base del Bushnell-Hass medium (Difco) adattato all'ambiente marino ([tabella 4](#)).

Un set di cinque tubi è stato realizzato utilizzando delle piastre sterili da 24 pozzetti per coltura cellulare. Ognuno di questi pozzetti è stato inoculato con 2 ml di Bushnell-Hass (B-H) medium sterile addizionato con NaCl 2% (pH 7.0). Le diluizioni seriali dei campioni (da 10⁻² a 10⁻⁹) sono state realizzate nello stesso terreno.

Ogni pozzetto è stato inoculato con 100 µl di campione. Inoltre 10 µl di petrolio sterile, Arabian Light Crude Oil è stato applicato nell'area centrale del pozzetto. Le piastre sono state incubate a 25 °C per circa 21 giorni.

I pozzetti sono risultati positivi quando l'emulsificazione dell'olio era chiaramente indicata dalla degradazione del petrolio superficiale o quando l' "anello di contatto" superficiale

formato tra l'olio e il terreno si presentava accompagnato da un cambiamento di colore; i risultati, espressi come MPN di batteri che utilizzano gli idrocarburi del petrolio ml^{-1} , sono stati calcolati in accordo al protocollo A.P.H.A (1992).

Isolamento dei batteri idrocarburo degradanti (HCB).

La componente batterica è considerata la causa predominante della degradazione idrocarburi nell'ambiente marino.

Una singola specie batterica è capace di degradare solo un numero limitato di composti del petrolio, mentre un consorzio formato da specie batteriche differenti (con caratteristiche enzimatiche diverse) può sviluppare una sintrofia metabolica che può portare ad una mineralizzazione completa degli idrocarburi fino alla produzione di CO_2 e H_2O (Ghazali *et al.*, 2004).

L'abilità di degradare gli idrocarburi del petrolio non è ristretta a pochi microrganismi; più di 30 generi di batteri marini sono stati identificati e distribuiti in diversi (sub)phyla (α -; β -; γ -Proteobacteria; Gram positivi; *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides*) (Roling *et al.*, 2002). Tra i generi più importanti (basandoci sulla frequenza di isolamento) possiamo ricordare: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Nocardia*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacter*, *Flavobacterium* (Atlas, 1981).

In seguito a sforzi fatti in questi ultimi anni, accanto a questi batteri eterotrofi (capaci cioè di utilizzare fonti di carbonio alternative oltre a quelle idrocarbure) sono stati isolati tramite differenti metodi colturali contenenti idrocarburi come unica fonte di carbonio e successiva analisi tassonomica e fisiologica, una nuova serie di batteri idrocarburo degradanti (in senso striato) caratterizzati da una crescita lenta in condizioni oligotrofe e si dimostrano abili ad utilizzare gli idrocarburi del petrolio con unica fonte di carbonio ed energia. Generalmente questi sono batteri gram-negativi batteri aerobi obbligati capaci di crescere a concentrazioni di NaCl di 0.08–3.5 M.

L'analisi della sequenza genica del 16S rRNA rivela che spesso questi “hydrocarbonoclastic bacteria” (HCB) risultano correlati con *Marinomonas vaga*, *Oceanospirillum linum*, and *Halomonas elongata* appartenenti al gruppo del γ -Proteobacteria; tuttavia, molti di questi ceppi sono risultati non appartenere a generi nuovi come nel caso di *Alcanivorax* (Yakimov *et al.*, 1998), *Cycloclasticus* (Dyksterhouse *et al.*, 1995), *Marinobacter* (Gauthier *et al.*, 1992), *Neptunomonas* (Hedlund *et al.*, 1999), *Oleiphilus* (Golyshin *et al.*, 2002), e *Oleispira* (Yakimov *et al.*, 2003). In riferimento alle loro proprietà metaboliche questi possono essere suddivisi in due gruppi, quelli che degradano idrocarburi alifatici e quelli che degradano gli idrocarburi aromatici. *Alcanivorax borkumensis* (isolato dal Mare del Nord), *Alcanivorax* sp. ST1 (Mar del Giappone),

Marinobacter hydrocarbonoclasticus (Mar Mediterraneo) e *Marinobacter* sp. CAB (Mar Mediterraneo) degradano catene alifatiche lineari o ramificate, mentre batteri come *Cycloclasticus oligotrophus* (Button *et al.*, 1998), *C. pugetii* (Dyksterhouse *et al.*, 1995) e *Psychroserpens burtonensis* (Bowman *et al.*, 1997) utilizzano idrocarburi aromatici, come toluene, naftalene, fenantrene e antracene come unica fonte di carbonio.

I batteri idrocarburoclasti occupano una nicchia trofica unica fra i batteri eterotrofi che partecipano al ciclo globale del carbonio, in quanto consumano preferenzialmente gli idrocarburi alifatici ed aromatici che sono relativamente difficili da utilizzare per i comuni batteri. Questa proprietà è riflessa nelle loro insolite caratteristiche fisiologiche (Buron *et al.* 1999).

Tali batteri utilizzano come unica fonte di carbonio ed energia solo alcuni idrocarburi e pochi acidi organici a basso peso molecolare, come acetato e piruvato. Possiedono inoltre pochi operoni rRNA (1 o 2), poche proteine citoplasmatiche (non più di 300) ed un piccolo genoma (3-4 Mbp); il numero delle proteine di membrana è di 1.5-2 volte più basso rispetto ad altri batteri eterotrofici come *E. coli* o *Pseudomonas* e, probabilmente, ciò può essere spiegato dal fatto che le cellule possano utilizzare soltanto alcuni substrati.

La correlazione tra la densità di batteri marini idrocarburoclastici, l'inquinamento da petrolio, la loro capacità di emulsificare gli idrocarburi e di utilizzarli come singola fonte di carbonio ed energia, l'abilità di abbassare notevolmente le concentrazioni degli idrocarburi e la loro incapacità di crescere su altri substrati tipici dei microrganismi eterotrofi, sono tutti indizi che suggeriscono che i batteri idrocarburo degradanti (HCB) presentino un ruolo chiave nelle catene alimentari microbiche marine correlate al petrolio e che siano considerati agenti naturali di pulizia degli ecosistemi marini in presenza di petrolio.

In questo lavoro l'isolamento dei batteri degradanti gli idrocarburi è stato realizzato piastrando aliquote di 100 µl, da campioni prelevati direttamente dalle vasche di sperimentazione, su piastre di ONR7a medium agarizzato (tabella 5) contenenti come unica fonte di carbonio, del petrolio greggio del tipo Arabian Light Crude Oil. Le piastre sono state incubate a temperatura ambiente (circa 20°C) per 2-3 settimane.

Diversità coloniale.

Parallelamente al conteggio dei batteri eterotrofi coltivabili (CFU) è stata eseguita un'analisi di diversità coloniale sulle colonie dominanti di ogni campione. Col termine di "colonie dominanti" sono state intese quelle che si sono sviluppate sulle piastre seminate con le più alte diluizioni del campione e che hanno sviluppato fra 30 e 150 colonie. Diversi tipi di colonie

sono state individuate in base a: colore, corpo, bordo, superficie, dimensione e capacità di invadere la superficie del terreno. Per una semplificazione nell'analisi sono state raggruppate in 5 gruppi, identificati come: BC1 (colonie biancastre, corpo cremoso, con diametro di circa 2-8 mm), BC2 (colonie biancastre, corpo cremoso, superficie liscia, 1-1.5 mm), ST (colonie biancastre, corpo semitrasparente, con diametro di 2-5 mm), G (colonie pigmentate di giallo, con diversa gradazione caratterizzate da un corpo cremoso o semitrasparente con bordi netti) e P (colonie piccole, con diametro inferiore ad 1 mm). I risultati sono stati espressi come percentuale di presenza di ogni gruppo riferito al totale delle colonie dominanti osservate.

Analisi Tassonomica del 16S crDNA.

Estrazione dell'RNA. L'estrazione dell'RNA dai campioni di acqua in analisi è stata realizzata utilizzando il DNA/RNA extraction kit (QIAGEN, Valencia, CA) in accordo con il protocollo della casa fornitrice. L'RNA totale è stato precipitato con isopropanolo, lavato con etanolo al 70% e risospeso in 50 µl di acqua sterile trattata con dietil pirocarbonato (DEPC).

Il quantitativo di RNA ottenuto è stato esaminato tramite elettroforesi su gel di agarosio e la sua concentrazione è stata determinata spettrofotometricamente (Biophotometer, Eppendorf). Per evitare la possibilità di ottenere delle amplificazioni positive, l'RNA ottenuto è stato sottoposto a trattamento con la DNase I come descritto dal Mills *et al.*, (2004).

Sintesi del 16S crDNA tramite reazione trascrizione inversa. L'rRNA-crDNA eteroduplex è stato sintetizzato tramite trascrizione inversa utilizzando un reverse primer universale Uni_1492R (5'-TACGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991) e la SuperScript II RNase H-free reverse transcriptase (Life Technologies) secondo il protocollo della casa fornitrice. L'RNA totale è stato inizialmente denaturato tramite riscaldamento a 70°C per 10 minuti. La miscela per la trascrizione inversa è stata costituita da 5 µM di 16S rRNA reverse primer 1492R, specifico per l'amplificazione della maggior parte degli organismi procariotici (Yakimov *et al.*, 2001), 50 o 100 ng di RNA denaturato e 200 µM di una miscela di deossinucleotiti trifosfato.

La miscela di retrotrascrizione è stata incubata per 5 min a 65°C e 2 min a 4°C, prima dell'aggiunta del 1X first-strand buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.3], 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂) e di 75-U dell'RNase inhibitor e del riscaldamento a 37°C per 2 min.

Un aliquota di 200U di SuperScript II RNaseH-free Reverse Transcriptase (Life Technologies) è stata aggiunta prima dell'incubazione per 50 min a 42°C.

La reazione di trascrizione inversa è stata fermata tramite riscaldamento della soluzione a 80°C per 5 min, solo alla fine il crDNA prodotto è stato utilizzato come template per l'amplificazione PCR.

Possibili contaminazioni di DNA nel RNA template sono state monitorate tramite amplificazione PCR di sub-campioni di RNA non trattati con la reazione di trascrizione inversa. Nessuna contaminazione di DNA è stata rilevata in queste reazioni.

Reazione di PCR, clonaggio e analisi dei trasformati. I primer utilizzati per l'amplificazione PCR includono, il 530 F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3') specifico per i batteri e il primer universale Uni_1492 R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACT-3').

La miscela di PCR è stata costituita con 50 ng of crDNA, 1X Qiagen reaction buffer, 1X solution Q (Qiagen), 1 pM dei primer sovradescritti, 200µM dNTPs (Gibco) e 2.5 U di Qiagen *Taq* Polymerase

La reazione di PCR è stata realizzata in un Mastercycler Gradient (Eppendorf), secondo le seguenti condizioni: 95°C per 5 min (1 ciclo), 94°C per 1 min, 50°C per 1 min e 72°C per 2 min (35 cicli), con un estensione finale di 72°C per 10 min.

I prodotti della PCR sono stati purificati con QIAQuick PCR purification columns (Qiagen) e gli ampliconi ottenuti sono stati analizzati con corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1% in tampone TBA 1X e colorato con bromuro d'etidio e illuminato con UV.d.

Gli ampliconi purificati, rappresentanti le sequenze del 16S crDNA sono stati clonati in un vettore pGEM T-easy vector System II (Promega) e inseriti tramite elettroporazione (Multiporator Eppendorf) in cellule ElettoMAX Competent Cells 10β (Invitogen). I trasformati positivi sono stati isolati su terreno selettivo LB agar addizionato con X-gal (Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-b-Galactopyranoside), IPTG (Isopropyl-Thio-b-D-Galactopyranoside) e Ampicillina.

Gli inserti sono stati successivamente amplificati tramite PCR delle colonie lisate utilizzando primers specifici del vettore M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') and M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3').

L'inserto clonato è stato ulteriormente amplificato tramite PCR e preventivamente analizzato tramite RFLP, un aliquota di 3 µl di ogni campione sono state utilizzate per la restrizione con endonucleasi di restrizione *Alu* I e *Rsa* I (New England Biolabs).

Il risultato della restrizione è stato visualizzato tramite gel elettroforetico al 2% di agarose (SeaKem LE agarose - BMA) in tampone 1X TBE. Tutte le immagini sono state acquisite in formato digitale tramite FluorS MultiImager - BIORAD.

Sequenziamento e analisi. In riferimento al profilo dei patterns di restrizione enzimatica sono stati selezionati dei ceppi rappresentativi. Per il sequenziamento è stato utilizzato un (3100 Avant Genetic Analyzer – Applied Biosystems Hitachi), utilizzando un kit di reazione (PE) di ABI Prism Big Dye 1.1 Terminator Cycle Sequencer.

Le sequenze parziali dell'rRNA 16S rRNA degli isolati sono stati analizzati tramite il Ribosomal Database Project Sequence Match e Similarity Matrix (Yakimov *et al.*, 2005).

Calcolo degli indici di diversità. Come indicato da Bowmann (2000) per calcolare l'indice di rarefaction e gli indici di biodiversità le librerie di cloni sono state normalizzate a 100 sequenze. L'analisi della biodiversità è stata realizzata tramite la misura della stima di diversità (indice di Shannon-Weaver), dell'indice di dominanza (indice di Simpson) e di Evenness (indice di Equitability) ed è stata inoltre calcolata la coverage biodiversity.

L'indice di diversità di Shannon-Weaver (H') è stato utilizzato per misurare l'ordine (o il disordine) osservato all'interno della comunità (Andrade S. *et al.*, 2002). Questo indice varia da valori di zero per comunità con una singola specie a valori alti per comunità aventi molte specie (filotipi nel caso di questo lavoro), ciascuna con pochi individui (Brown M. V. *et al.*, 2001).

L'indice di Dominanza (S') rappresenta la probabilità che due individui selezionati casualmente all'interno della comunità possano trovarsi nella stessa specie. Valori di Dominanza che si avvicinano ad 1 indica solo poche specie dominanti nel campione.

L'indice di Evenness (J') misura quanto simile sia l'abbondanza di due specie differenti. I valori dell'indice di Evenness sono calcolati utilizzando le derivazioni dell'indice di Shannon e indicano l'omogeneità della distribuzione di una specie in una data popolazione.

La Biodiversity coverage (C%) è stata calcolata misurando la percentuale di tutti i filotipi unici ottenuti dalla comparazione degli unici e non unici filotipi della comunità in analisi. Per il suo calcolo è stata utilizzata la formula:

$$C\% = 1 - (n_1/N),$$

dove n_1 è il numero dei filotipi presenti solo una volta nella libreria e N è il numero totale dei cloni analizzati.

Il calcolo di queste misure e delle curve di rarefaction è stato realizzato utilizzando le equazioni descritte da Krebs (1989) e da Bowmann (2000) con il software Paleontological Statistics Software (PAST) (<http://folk.uio.no/ohammer/past/index.html>).

Misura del Metabolismo Batterico

Attività enzimatica.

Il metodo seguito per la stima delle attività enzimatiche extracellulari è stato basato sulla quantificazione dell'intensità di fluorescenza rilasciata per idrolisi enzimatica da composti fluorogenici specifici per ciascuno degli enzimi da determinare. Il saggio utilizzato da riferimento alla tecnica di Hoppe (1999), prevede l'aggiunta di concentrazioni crescenti di

substrato fluorogenico (soluzione madre 5mM) a subaliquote (10 ml) di campione. In particolare, per la determinazione dei tassi di attività leucin aminopeptidasica, b-glucosidasica e fosfatase vengono adoperati i substrati L-leucine-7-amido-4-methylcoumarine (Leu-MCA), 4-methylumbelliferyl(MUF)-b-d-glucoside e 4-MUF phosphate (Sigma) rispettivamente. I tassi di attività lipasica ed esterasica sono stati invece stimati mediante l'uso dei substrati MUF-heptanoate e MUF-acetate (Sigma) rispettivamente. Le misure sono state condotte per via spettrofluorimetrica a tempo zero (dopo l'aggiunta del substrato) e dopo 48 ore di incubazione a temperatura "in situ", alle lunghezze d'onda di 380/440 nm (eccitazione/emissione) per Leu-MCA e di 365/445 per i substrati MUF-derivati. I valori di fluorescenza sono stati successivamente convertiti mediante trasformazione di Lineweaver-Burke in velocità massima di idrolisi (V_{max}), espressa in nanomoli di prodotto rilasciato dal substrato per litro e per ora ($nM h^{-1}$).

Biochemical Oxygen Demand (BOD).

La misura della Domanda Biochimica di Ossigeno (BOD) si identifica come la misura della quantità di ossigeno consumato (ad un tempo e una temperatura determinate), per decomporre le sostanze organiche presenti nell'acqua attraverso l'azione batterica (respirazione cellulare).

Sub-aliquote di 400 ml di campione sono state analizzate utilizzando un B.O.D sensor (VELP Scientifica) secondo le istruzioni della casa costruttrice.

Conteggio Virale

I virus sono tra le componenti più importanti degli organismi ubiquitari degli ecosistemi marini (Danovaro *et al.*, 2001; Wihem *et al.*, 2002).

La rivalutazione del loro ruolo ambientale, in questi ultimi anni, è da imputare principalmente alla scoperta della loro grande abbondanza (Noble *et al.*, 1997). In considerazione ai numerosi "fattori di perdita" a cui sono soggetti, la loro persistenza fa supporre dei fenomeni di "rimozione" e "ripristino" relativamente bilanciati che dipendono non solo dalle caratteristiche chimico fisiche dell'ecosistema in cui si trovano ma anche, e soprattutto, da quelle biologiche.

Recenti studi hanno focalizzato l'attenzione dei virus sulle loro implicazioni ecologiche in particolar modo sul rilascio delle sostanze organiche disciolte (DOM), sul ricircolo dei nutrienti e sulla rete trofica microbica (Danovaro *et al.* 2001; Dominique *et al.* 1999). E' stato inoltre dimostrato che i virus sono, insieme ai protozoi, uno dei più importanti fattori implicati

nella mortalità dei batterici in ambiente costiero e si presentano come una forzante principale nella selezione di popolazioni microbiche e indirettamente sulle strutture delle comunità batteriche.

Il conteggio totale dei virus presenti nei campioni d'analisi è sembrata pertanto una misura fondamentale nell'ottica dell'analisi della dinamica della popolazione microbica, considerando quest'ultimi come una forzante di selezione naturale.

Campioni di acqua (5 ml) sono stati preventivamente fissati utilizzando della paraformaldeide alla concentrazione finale del 2% in tampone fosfato salino (PBS: 120mM NaCl, 2.7 mM KCl in 10 mM in tampone fosfato, pH 7.6) a 4°C.

Una subaliquota di tale campioni (200 µl) è stata filtrata su filtri in porcellana con porosità di 0.02 µm e con 25 mm di diametro (Anodisc Membrane Filters, Whatman). I filtri sono stati lavati per due volte con TE buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM di EDTA a pH 7.5) e seccati e messi ad incubare al buio per 15 min. con una soluzione di Syber Green. Dopo l'incubazione gli stessi sono stati montati su vetrini portaoggetti e osservati tramite l'utilizzo di un microscopio ad epifluorescenza Axioplan Zeiss.

Il conteggio virale è stato effettuato su un minimo di 20 campi casuali e le concentrazioni sono state riportate come numero medio di virus per ml⁻¹, secondo la formula:

$$X = \{[283.53 * (\text{num. virus}/10/10)] / 0.0001\} / \text{vol.}$$

Misura dell'Abbondanza degli Heterotrophic Nanoflagellates (HNF)

La misura quantitativa dei protozoi eterotrofi nanoflagellates (HNF) è stata realizzata tramite conta diretta al microscopio ad epifluorescenza.

Aliquote dei campioni (10 ml), sono state prelevate direttamente dalle vasche in esame e sono state fissate utilizzando della paraformaldeide alla concentrazione finale del 2% in tampone fosfato salino (PBS: 120mM NaCl, 2.7 mM KCl in 10 mM in tampone fosfato, pH 7.6) a 4°C. L'abbondanza degli HNF è stata stimata filtrando dei subvolumi di campione (1 ml) su filtri in policarbonato con porosità di 0.45 µm e 25 mm di diametro (Nucleopore, Corning Costar Corp., Cambridge, MA).

Una media di 100 cellule per filtro sono state contate utilizzando un microscopio Axioplan 2 Imaging (Zeiss), equipaggiato con filtri appositi.

RISULTATI

Determinazione dei nutrienti: Ammoniaca, Nitrati, Nitriti, Fosfati.

I risultati ottenuti dall'analisi dei nutrienti realizzata durante la sperimentazioni in *microcosmo A* (seawater ed nutrienti inorganici) sono mostrati in tabella 6.

time (days)	PO ₄	NH ₄	NO ₂	NO ₂ +NO ₃	NO ₃
	μmoli				
0	38,26	67,54	1,00	88,02	87,02
2	40,31	66,68	1,74	86,31	84,57
7	54,72	63,41	0,52	90,04	89,52
15	38,42	63,22	9,89	97,22	87,33

Tab. 6. Misura dei nutrienti inorganici durante la sperimentazione *microcosmo A*.

Analisi quali-quantitativa del petrolio.

La figura 16 mostra il cromatogramma realizzato, tramite analisi CG-MS, su un campione di acqua di mare prelevato prima dell'inizio delle sperimentazioni. I risultati ottenuti mostrano la totale assenza di contaminazioni idrocarburiche o di altre sostanze chimiche che avrebbero potuto influenzare il corretto svolgimento delle sperimentazioni.

L'analisi del petrolio Arabian Ligth Crude Oil ci ha permesso inoltre di ottenere informazioni sulla composizione del greggio utilizzato in questo lavoro. Per facilità di studio le differenti frazioni del petrolio sono state suddivise in quattro classi di idrocarburi (figura 17): lineari (60%), ramificati (32%), ciclici (5%) ed aromatici (3%).

La frazione degli idrocarburi lineari, maggioritaria all'interno del petrolio utilizzato, è particolarmente interessata nei processi di biodegradazione ed è stata analizzata quali-quantitativamente con particolare attenzione (figura 18).

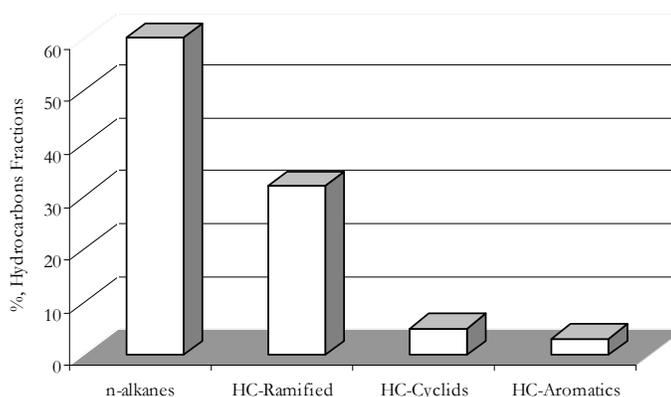


Fig. 16. Suddivisione in percentuale delle differenti frazioni del petrolio Arabian Ligth Crude Oil, ottenuta tramite analisi GS-MS.

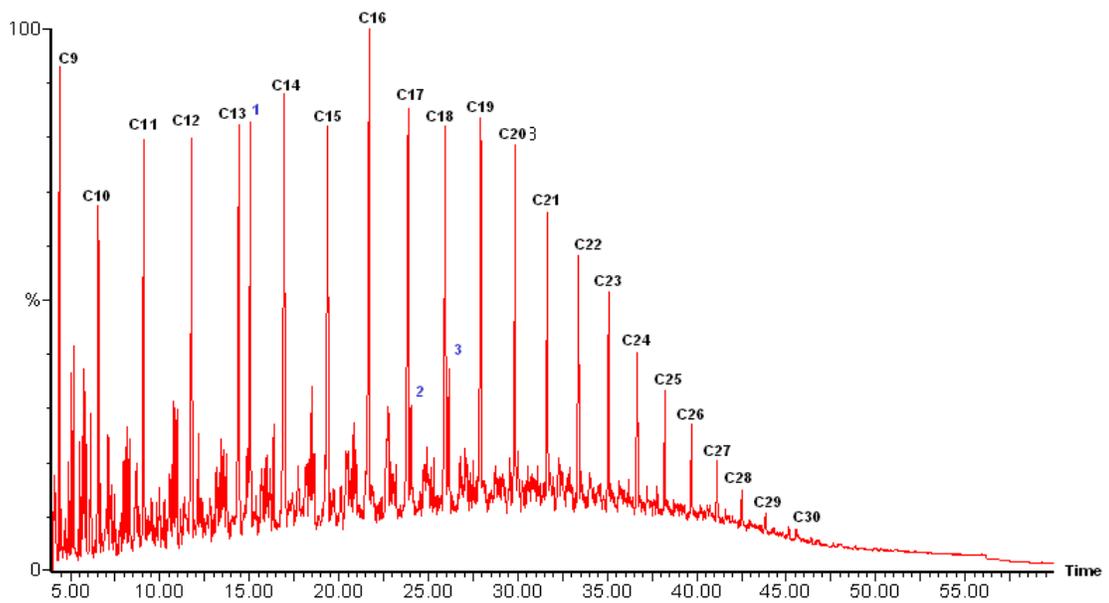
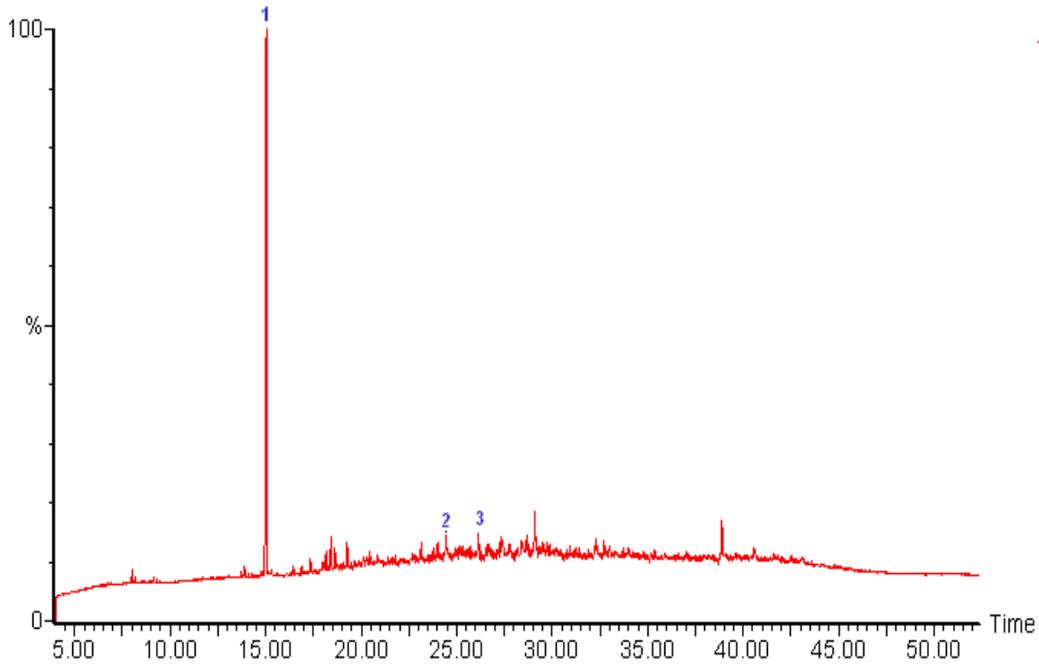


Fig. 17 e 18. Cromatogrammi, realizzati tramite analisi CG-MS, che mostrano la presenza e la distribuzione degli n-alcani in un campione di acqua marina naturale (sopra) e del petrolio Arabian Ligth Crude Oil (sotto). I picchi corrispondenti agli n-alcani sono stati opportunamente nominati, mentre con il numero 1 viene indicato il picco corrispondente al nonano (standard interno di processo), e con i numeri 2 e 3 sono identificati rispettivamente il fitano e il pristano (standard di analisi).

Calcolo dell'indice $(C_{17}/Pr+C_{18}/Ph)/2$. Con riferimento al lavoro di Marty (1994) è stato calcolato il rapporto tra la quota del *fitano* (2,6,10,14- C_{20}) e quella del *pristano* (n- C_{18}) al fine di normalizzare i risultati ottenuti dall'analisi CG-MS e misurare l'intensità della degradazione microbica del petrolio greggio (tabella 7).

Experimentation	Time (days)	C17/Pr	C18/Ph	$(C17/Pr + C18/Ph)/2$
Microcosm B				
	zero	3,24	2,01	2,625
	15	2,85	2,56	2,705

Tab. 7. Rapporto *fitano/pristano* durante le sperimentazioni pilota realizzate.

Microcosmo B. Durante la sperimentazione realizzata aggiungendo del petrolio all'acqua di mare il tasso di biodegradazione del greggio presentava valori estremamente bassi. Come evidenziato in figura 19 dopo quindici giorni di sperimentazione solo il 6.4% del petrolio totale veniva degradato.

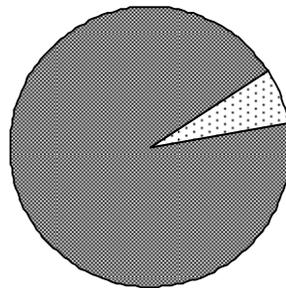


Fig. 19. Degradazione del petrolio dopo quindici giorni di sperimentazione (*microcosmo B*). La porzione rappresentata con il riempimento pieno indica la parte non degradata del greggio (93.4%), con il riempimento chiaro viene indicata la porzione di petrolio interessato da fenomeni di biodegradazione (6.4%).

L'analisi di questa frazione ha mostrato che il 48% del totale era costituito dagli alcani lineari, il 24% dagli idrocarburi ramificati mentre il restante 24% era costituito da idrocarburi ciclici ed aromatici (figura 20).

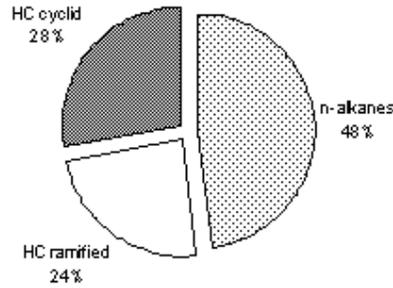


Fig. 20. *Microcosmo B.* Rappresentazione delle differenti frazioni del greggio interessate ai fenomeni di degradazione (6.4% del petrolio totale). Per facilità di rappresentazione ogni frazione a tempo iniziale è stata rappresentata in percentuale assoluta con riempimento scuro, per contro con riempimento chiaro sono state indicate il quantitativo delle frazioni corrispondenti alla fine della sperimentazione.

La degradazione degli idrocarburi lineari è stata accuratamente analizzata come mostrato in [figura 21, 22 e 23](#).

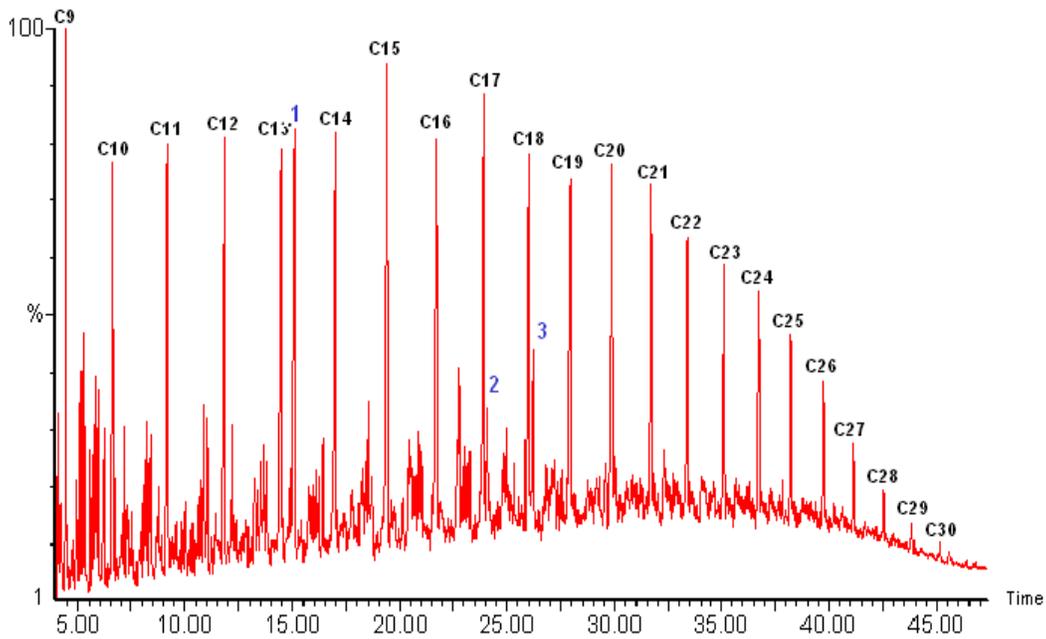


Fig. 21. *Microcosmo B.* Cromatogramma della struttura del petrolio al tempo iniziale della sperimentazione (tempo zero). I picchi corrispondenti agli n-alcani sono stati opportunamente nominati, mentre con il numero 1 viene indicato il picco corrispondente al nonano, e i numeri 2 e 3 sono identificati rispettivamente il fitano e il pristano.

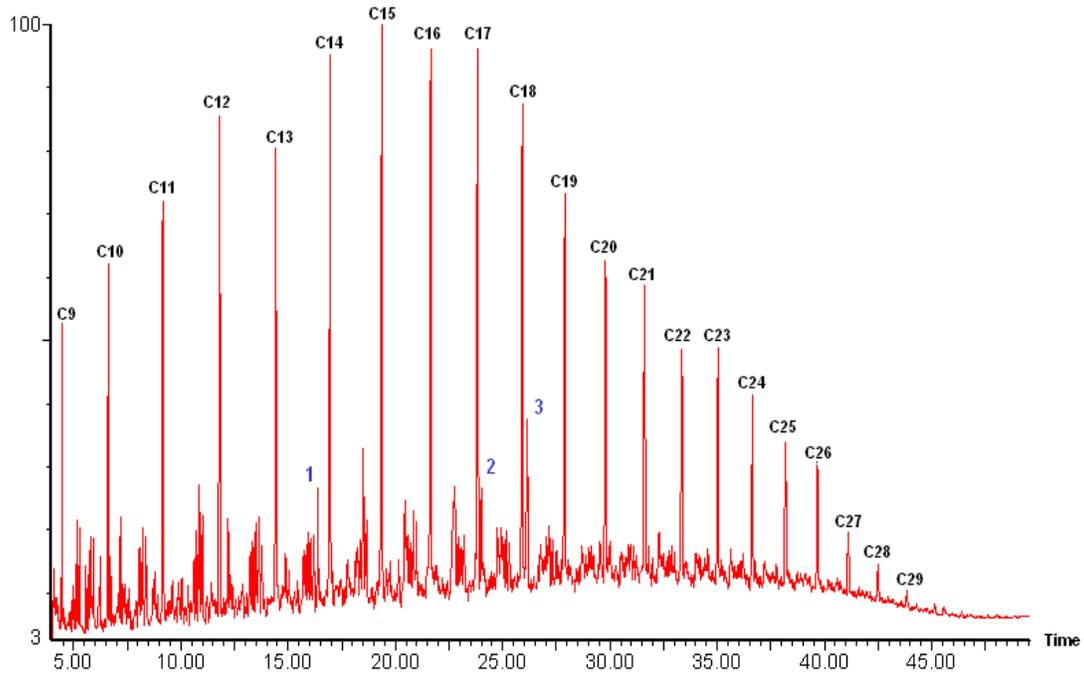


Fig. 22. Cromatogramma, della distribuzione degli n-alcani del petrolio dopo 15 giorni di sperimentazione (*microcosmo B*). I picchi corrispondenti agli n-alcani sono stati opportunamente nominati. Nonano, fitano e pristano sono indicati rispettivamente con i numeri 1, 2, e 3.

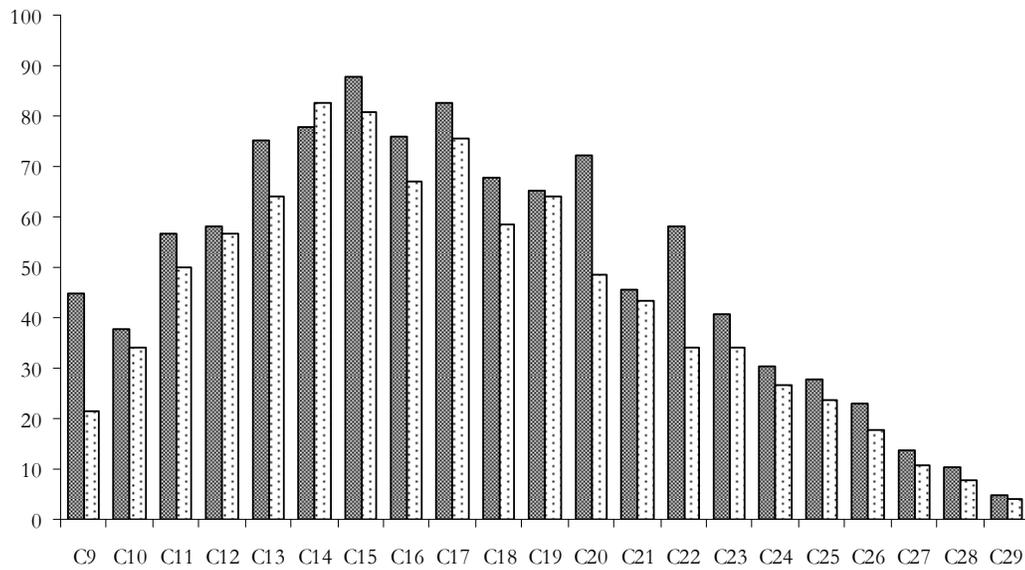


Fig. 23. *Microcosmo B*. Distribuzione degli n-alcani nel petrolio greggio durante il periodo di sperimentazione. Le barre con riempimento scuro identificano gli alcani all'inizio della sperimentazione, con il riempimento chiaro sono indicati gli stessi alcani alla fine del periodo di osservazione.

Misura del pH e della Temperatura

Durante il periodo di sperimentazione le variazioni di pH e di temperatura sono state monitorate ad intervalli regolari di 24 ore.

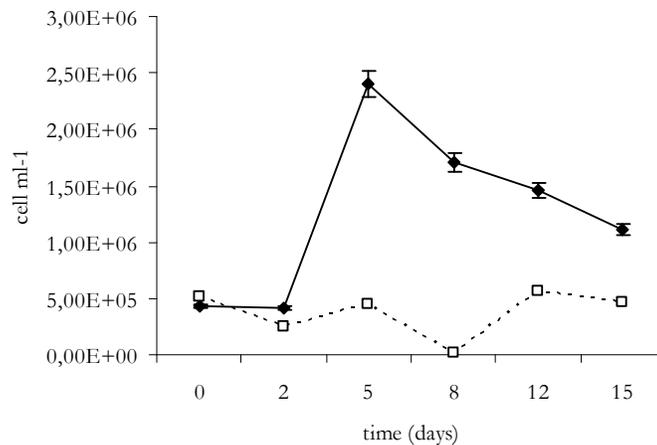
Sia i valori di pH che di temperatura all'interno delle vasche di analisi, si sono sempre mantenuti costanti con valori medi di 8.7 (dati non mostrati) per quanto riguarda il pH e con valori di circa 20°C con escursioni termiche che non hanno mai superato i 2°C (dati non mostrati) per la temperatura.

Misure Batteriologiche di Abbondanza

Conta delle cellule totali.

Microcosmo A. Nel microcosmo allestito addizionando all'acqua marina le fonti di nutrienti inorganici di fosforo, azoto e ammonio, il quantitativo della popolazione batterica presentava un lieve incremento passando da valori medi di 4.2×10^5 cell ml⁻¹ (nelle prime 48 ore) a valori di 2.4×10^6 cell ml⁻¹ (time 5 days). Tali valori si sono mantenuti costanti fino alla fine dell'osservazione (figura 24).

Microcosmo B. Un andamento simile a quella mostrata nel microcosmo B è stato osservato durante questa sperimentazione. In questo sistema, dopo il secondo giorno di incubazione, la popolazione passa da valori di 4.9×10^5 cell ml⁻¹ a valori di 3.1×10^6 cell ml⁻¹, valore che si mantiene costante fino alla fine (figura 25).



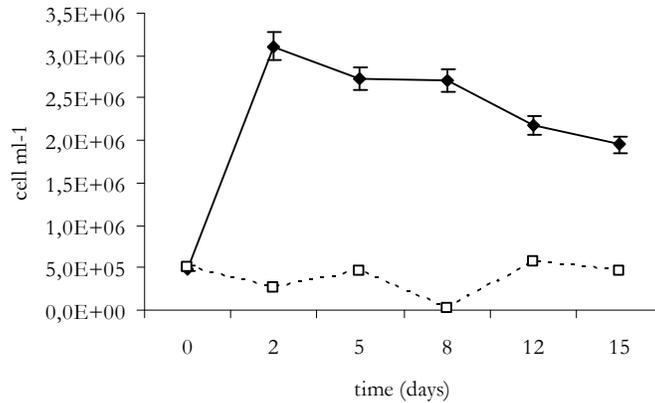


Fig. 24 e 25. Evoluzione dell'abbondanza della popolazione batterica totale. Nella figura in alto è rappresentata la sperimentazione condotta nel *microcosmo A* (Seawater con nutrienti inorganici) mentre in basso sono mostrati i risultati ottenuti dal *microcosmo B* (Seawater con petrolio greggio). Le linee continue nere indicano il microcosmo in studio, mentre le linee bianche tratteggiate si riferiscono al controllo allestito solo con Natural Seawater (*microcosmo 1* – Capitolo II).

Misura delle cellule vitali (LIVE/DEAD staining).

Microcosmo A. Nella sperimentazione realizzata aggiungendo dei nutrienti inorganici all'acqua di mare è possibile rilevare, nelle prime 48 ore, un aumento della popolazione batterica con valori che passano da 8.7×10^5 cell ml⁻¹ a 2.7×10^6 cell ml⁻¹ e che si mantengono costanti fino alla fine. Anche il numero delle cellule vitali tende ad aumentare nel corso dei primi due giorni, passando da valori di 5.6×10^5 cell ml⁻¹ a valori di 2.7×10^6 cell ml⁻¹, dopo il quinto giorno tale valore tende a ridursi di un ordine di grandezza passando a un valore medio di 8.1×10^5 cell ml⁻¹ che si mantiene fino alla fine della sperimentazione. Il numero delle cellule morte, per contro, aumenta nei primi due giorni e si mantiene costante a valori di 4.1×10^6 cell ml⁻¹ fino alla fine. (figura 26)

Microcosmo B. L'andamento delle curve corrispondenti ai valori della popolazione totale, della popolazione vitale e delle cellule morte è mostrata in figura 27. Tutti i valori tendono ad aumentare, nei primi cinque giorni, di un ordine di grandezza passando da 1.5×10^6 cell ml⁻¹ a 9.5×10^7 cell ml⁻¹ fino ad arrivare a valori massimi di 2.9×10^8 cell ml⁻¹ all'ottavo giorno. Il dodicesimo e il quindicesimo giorno sono caratterizzati da valori medi che si aggirano intorno a 6.1×10^7 cell ml⁻¹. Sia le cellule vitali che quelle morte presentavano andamenti simili a quelle delle cellule totali.

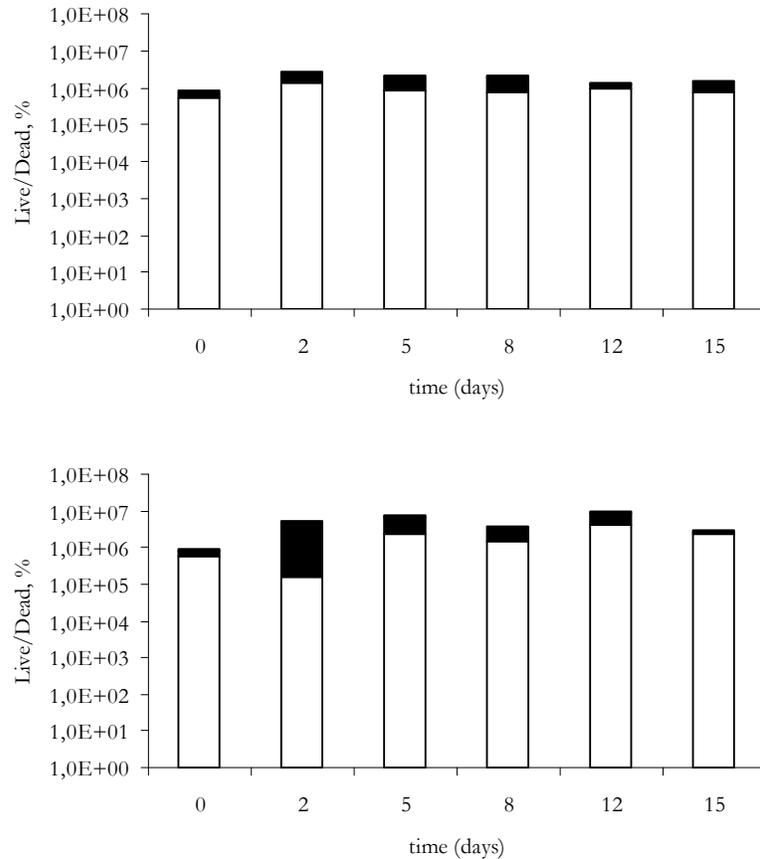


Fig. 26 e 27. Evoluzione della vitalità della popolazione batterica totale. Nella figura in alto è rappresentata la sperimentazione condotta nel *microcosmo A* (Seawater con nutrienti inorganici) mentre in basso sono mostrati i risultati ottenuti dal *microcosmo B* (Seawater con petrolio greggio). In bianco sono indicate le cellule vitali mentre in nero le cellule morte.

Conteggio cellulare tramite Citometria a Flusso.

Microcosmo A. Durante questa sperimentazione l'analisi della popolazione microbica condotta tramite citometria a flusso rivela una popolazione di circa 4.6×10^4 cell ml⁻¹ all'inizio del tempo di analisi. Durante la sperimentazione la biomassa microbica incrementa raggiungendo, al quindicesimo giorno, il valore medio di 2.1×10^6 cell. ml⁻¹ (figura 28). Contemporaneamente l'analisi del quantitativo di DNA cellulare ad alto peso molecolare mostra un incremento già durante le prime 48 ore che raggiunge il massimo valore (74%) all'ottavo giorno di analisi per poi mostrare un andamento variabile. La curva del DNA a basso peso molecolare segue un andamento perfettamente speculare raggiungendo il minimo valore all'ottavo giorno (14%) (figura 28 bis).

Microcosmo B. L'analisi dell'abbondanza batterica condotta tramite citometria a flusso rileva un incremento di un ordine di grandezza nella concentrazione batterica che passa, nei primi 5

giorni, da valori di 5.1×10^5 cell ml^{-1} (time zero) a valori di 2.4×10^6 cell ml^{-1} ; tali valori si manterranno fino alla fine della sperimentazione (figura 29). In questa sperimentazione è stata anche calcolata la concentrazione di DNA cellulare (figura 30). La percentuale del DNA a basso peso molecolare (%LDNA) diminuisce progressivamente con il tempo di sperimentazione a favore del DNA ad alto peso molecolare (%HDNA) tipico delle cellule con metabolismo particolarmente attivo. Quest'ultimo passa difatti da valori del 31% (a tempo zero) a valori del 72% dopo tre giorni di sperimentazioni, percentuale che si mantiene costante fino alla fine. Per contro, il quantitativo del DNA super avvolto ad alto peso molecolare (%SHDNA) rimane costante (valori medi del 6%).

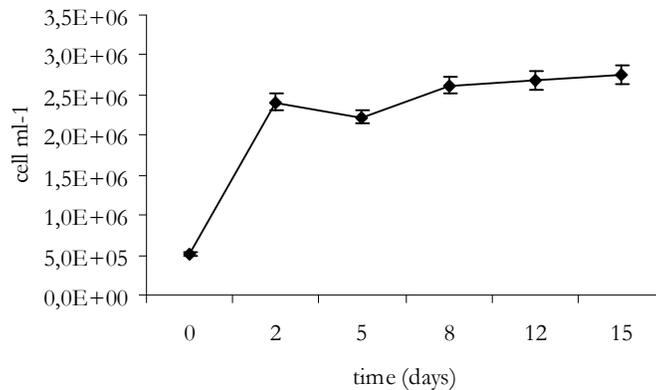
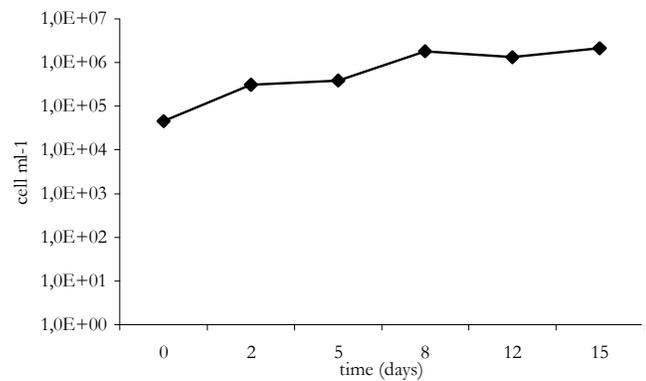


Fig. 28 e 29. Misura della conta batterica totale tramite Citometria a Flusso. Nella figura in alto è mostrato l'andamento della popolazione microbica durante la sperimentazione condotta nel *microcosmo A*, in basso quella nel *microcosmo B*.

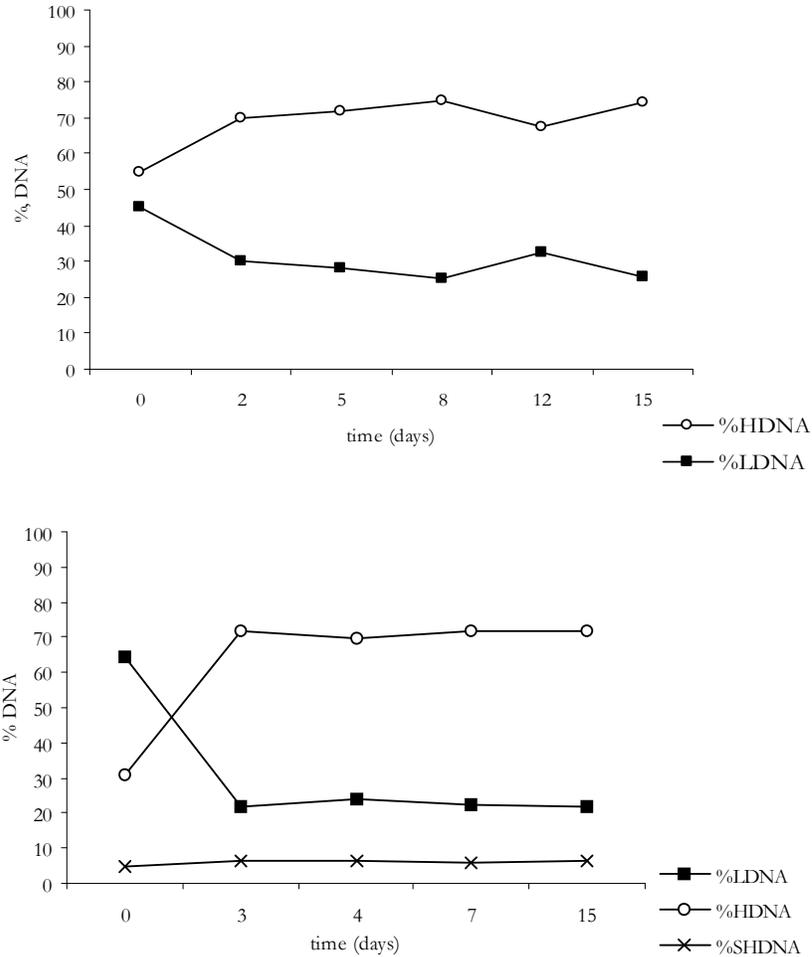


Fig. 28bis e 30. Misura del quali-, quantitativa del DNA cellulare misurato tramite Citometria a flusso nel *microcosmo A* (figura in alto) e nel *microcosmo B* (figura in basso).

Misure Batteriologiche di Diversità

Conteggio dei batteri eterotrofi coltivabili (CFU).

Microcosmo A. Il numero dei batteri eterotrofi coltivabili aumenta nelle prime 48 ore, passando da valori di 2.1×10^3 cell ml⁻¹ a valori di 2.2×10^5 cell ml⁻¹. Dopo il secondo giorno di sperimentazione dati ottenuti dalla misura delle CFU mostrano un andamento stazionario con valori medi di 5.6×10^5 cell ml⁻¹ che si sono mantenuti costanti fino alla fine (figura 31).

Microcosmo B. In questa sperimentazione il numero dei batteri eterotrofi aumenta progressivamente passando da valori iniziali di 2.1×10^3 cell ml⁻¹ a valori di 2.7×10^4 cell ml⁻¹ (time 8 days) e raggiungendo il valore massimo di 3.2×10^5 cell ml⁻¹ al dodicesimo giorno (time 12 days) (figura 32).

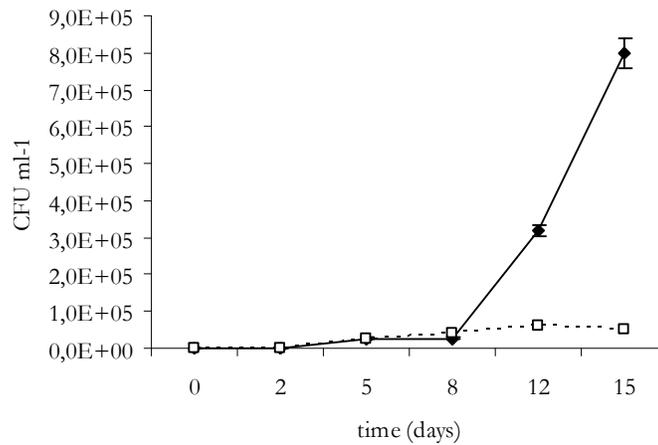
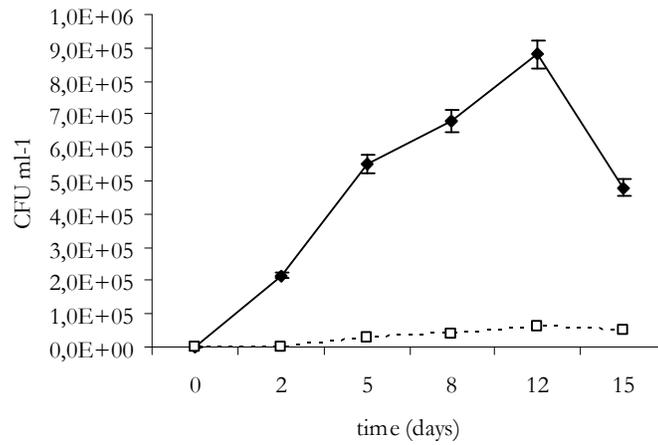


Fig. 31 e 32. Conta dei batteri eterotrofi coltivabili. Nella figura in alto è illustrata la sperimentazione condotta nel *microcosmo A*, in basso quella del *microcosmo B*. Le linee continue nere indicano il microcosmo in studio, mentre le linee bianche tratteggiate si riferiscono al controllo allestito solo con Natural Seawater (*microcosmo 1* – Capitolo II).

Conteggio dei batteri capaci di utilizzare il petrolio (MPN).

Microcosmo A. Nel microcosmo aggiungendo nutrienti inorganici il numero dei batteri idrocarburo degradanti tende ad aumentare di un ordini di grandezza passando da valori di 1.2×10^2 a 5×10^3 MPN ml⁻¹ nei primi otto giorni di sperimentazione. Un ulteriore aumento è mostrato tra il dodicesimo e il quindicesimo giorno con valori rispettivamente di 5×10^4 e 4.8×10^5 MPN ml⁻¹ (figura 33).

Microcosmo B. Come mostrato in figura 34 nel microcosmo allestito aggiungendo del petrolio greggio all'acqua di mare si osserva un costante aumento del numero dei MPN. Durante le prime 48 ore di analisi è possibile rilevare valori di 3.25×10^2 MPN ml⁻¹ che aumentano di tre ordine di grandezza nei primi otto giorni. Il valore massimo (3×10^6 MPN ml⁻¹) è osservato al quindicesimo giorno.

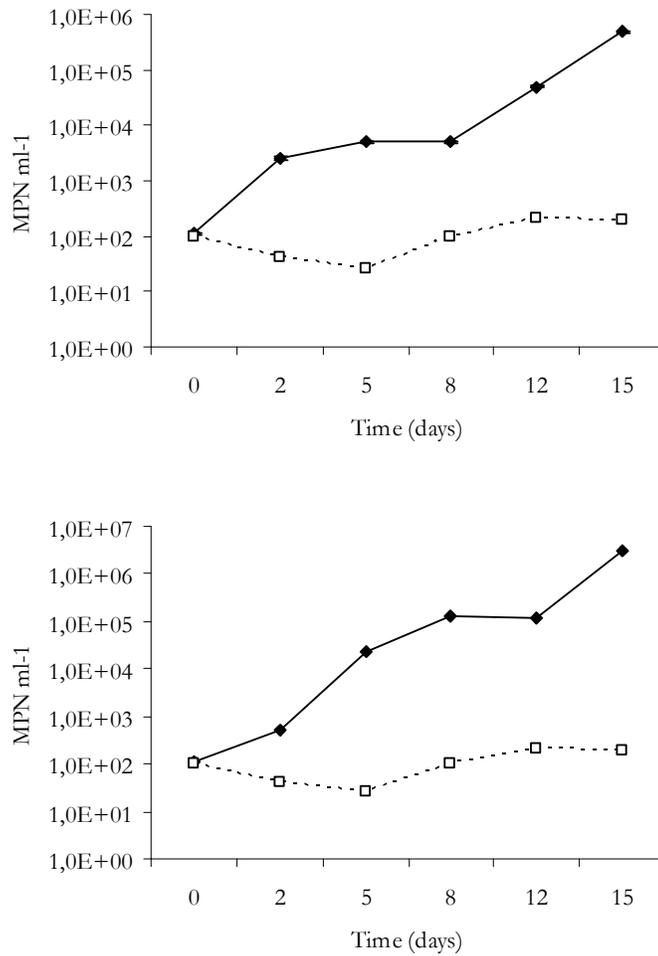


Fig. 33 e 34. Most Probable Numer (MPN) misurato durante la sperimentazione condotta in microscala aggiungendo all'acqua di mare dei nutrienti inorganici (in alto) e nella sperimentazione con aggiunta di petrolio (in basso). In nero è rappresentata la condizione in studio (*microcosmo B*), mentre la linee bianche tratteggiate identificano l'andamento di tale curva nel microcosmo di controllo.

Isolamento dei batteri idrocarburo degradanti (HCB).

Microcosmo A. Non sono state realizzate misure per questa sperimentazione.

Microcosmo B. Su 23 ceppi batterici selezionati a random dalle colonie isolate durante questa sperimentazione solo 1 ceppo, identificato come Iso 01-B è stato considerato positivo alla degradazione del petrolio. L'analisi tassonomica del 16S rDNA di questo isolato ha rivelato una correlazione, con una similarità del 98.1%, con *Alcanivorax borkumensis* (figura 35).

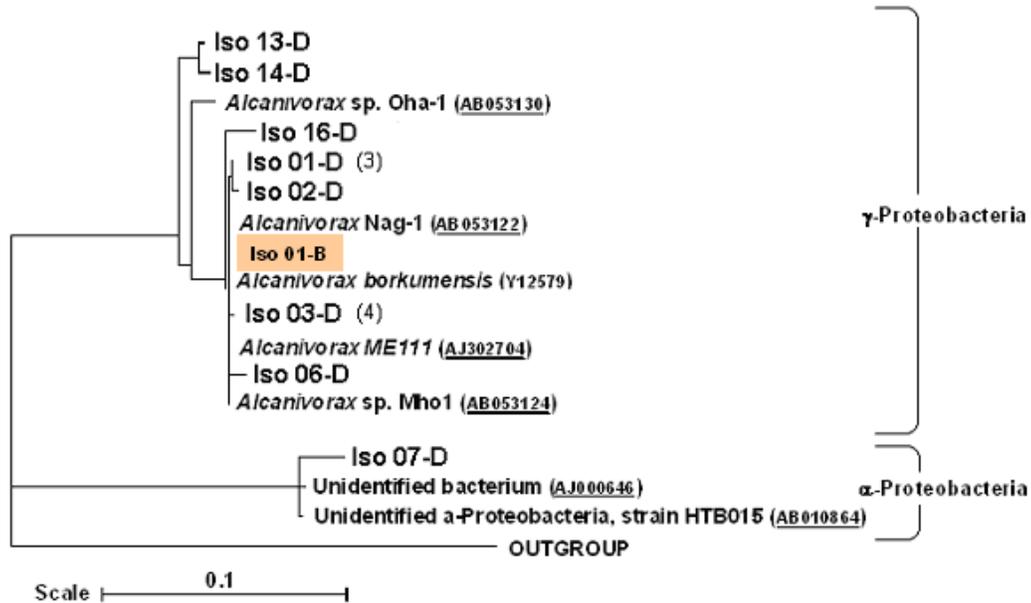


Fig. 35. Albero filogenetico, sviluppato sulla base dell'analisi tassonomica del 16S rDNA, del ceppo Iso 01-B isolati durante le sperimentazione nel *microcosmo B*. L'albero filogenetico mostra inoltre la posizione tassonomica dei ceppi isolati durante le altre sperimentazioni.

Diversità coloniale.

Microcosmo A. Nella sperimentazione realizzata aggiungendo dei nutrienti inorganici all'acqua di mare è possibile rilevare che le colonie identificate come BC1 e ST diminuiscono progressivamente passando da valori iniziali rispettivamente del 21.8 e 25% a valori del 7.9 e del 2.6% (time 15 days). Colonie associabili al morfotipo G, assenti nelle prime 48 ore di sperimentazione, compaiono al quinto giorno con valori del 4.2% che aumentano raggiungendo, al quindicesimo giorno valori del 36.8% (figura 36).

Microcosmo B. In questa sperimentazione in microscala è possibile osservare un andamento pressoché costante nella presenza delle colonie appartenenti al gruppo BC1, BC2 e P. Le colonie del tipo ST diminuiscono, mentre le colonie del tipo G incrementano passando da valori iniziali del 6.6% a valori finali di 26.6% (figura 37).

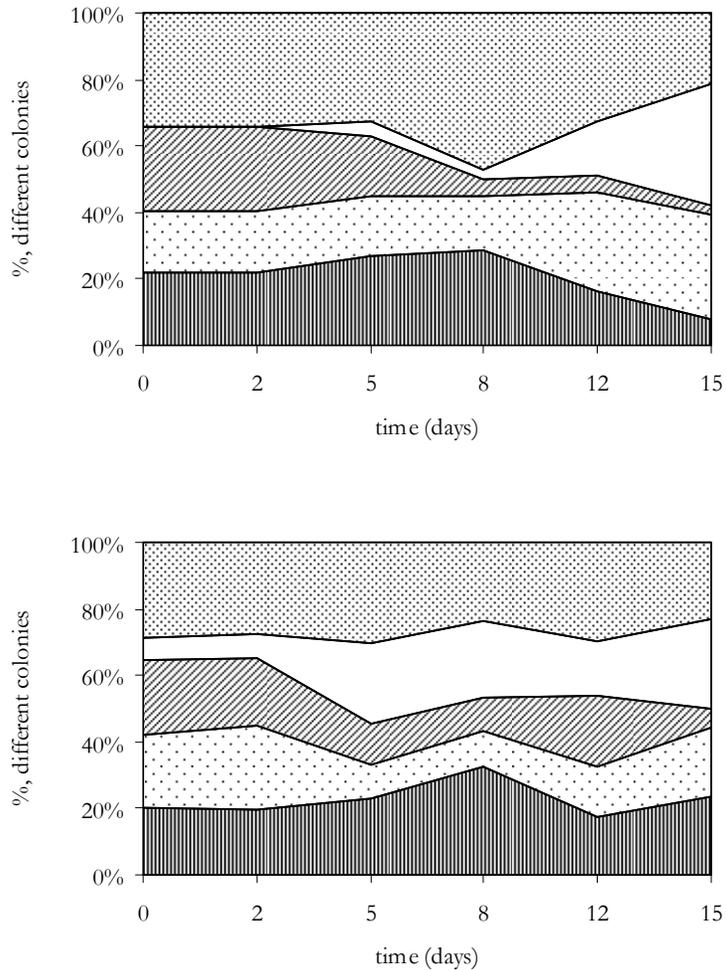


Fig. 36 e 37. Analisi morfologica delle colonie batteriche isolate durante la sperimentazione nel *Microcosmo A* (figura in alto) e nel *Microcosmo B* (in basso). Le colonie osservate sono state raggruppate in 5 morfotipi, identificati come: BC1 (colonie biancastre, corpo cremoso, \varnothing 2-8 mm) rappresentate con il riempimento grigio, BC2 (colonie biancastre, corpo cremoso, superficie liscia, \varnothing 1-1.5 mm) rappresentata con punteggiatura larga, ST (colonie biancastre, corpo semitrasparente, \varnothing 2-5 mm) in figura con linee oblique, G (colonie pigmentate di giallo, con diversa gradazione caratterizzate da un corpo cremoso o semitrasparente con bordi netti) rappresentate in bianco e P (colonie piccole, \varnothing inferiore ad 1 mm) rappresentate con una punteggiatura fitta.

Analisi Tassonomica del 16S crDNA.

Microcosmo A. Durante questa sperimentazione (Seawater con nutrienti inorganici) l'analisi della libreria di cloni realizzata al tempo iniziale (time zero) rivela che l'88% delle sequenze ottenute era associabile alla classe dei γ -Proteobacteria con cloni affilati ai generi di *Alteromonas* (74%), *Thalassomonas* (2%) e *Oceanospirillum* (2%), mentre circa il 10% era associabile a batteri

marini non coltivabili e non identificabili. In tale condizione è stata evidenziata anche la presenza di cloni (12%) affiliati al phylum *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) (tabella 8). Durante il dodicesimo e quindicesimo giorno di sperimentazione (time 12 e 15 days) i γ -Proteobacteria costituiscono sempre il gruppo maggioritario (rispettivamente con valori del 73 e 59%). La maggior parte delle sequenze sono correlabili con generi batterici presenti in entrambe le librerie, quali *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Teredinibacter* e *Oceanospirillum*, anche se alcuni generi come *Pseudoalteromonas* (10%) sono presenti solo al dodicesimo giorno, mentre altri come *Alkalilimnicola* (5%) e *Alteromonas* (3%) sono specifici del quindicesimo giorno. Una parte di sequenze (circa il 26%) si presenta correlata a batteri marini non coltivabili o non identificati (γ -Other). Altri tre gruppi batterici quali gli α - (7%), i δ -Proteobacteria (4%) e i CFB group (16%) sono presenti nelle librerie analizzate accanto ai γ -Proteobacteria (tabella 9, tabella 10, figura 38, 39, 40 e 41).

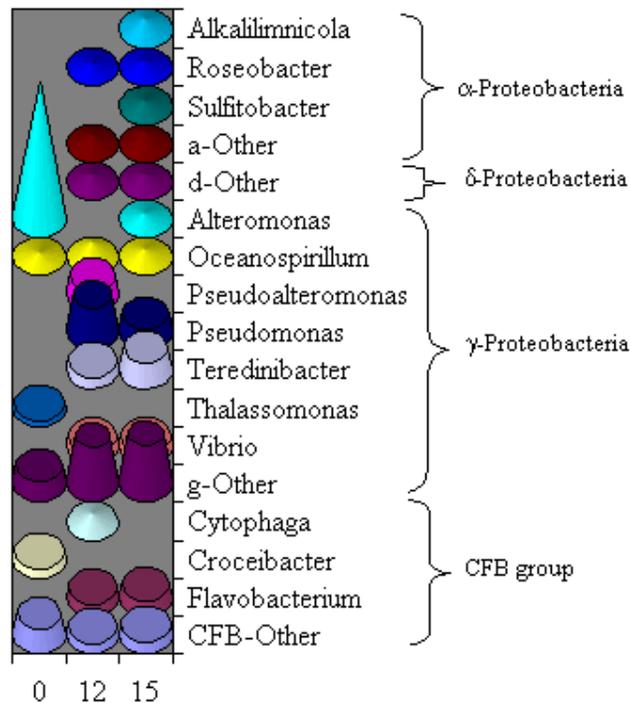


Fig. 38. Distribuzione schematica della popolazione microbica, durante la sperimentazione pilota *microcosmo A*, ottenuta tramite l'analisi tassonomica del 16S crDNA.

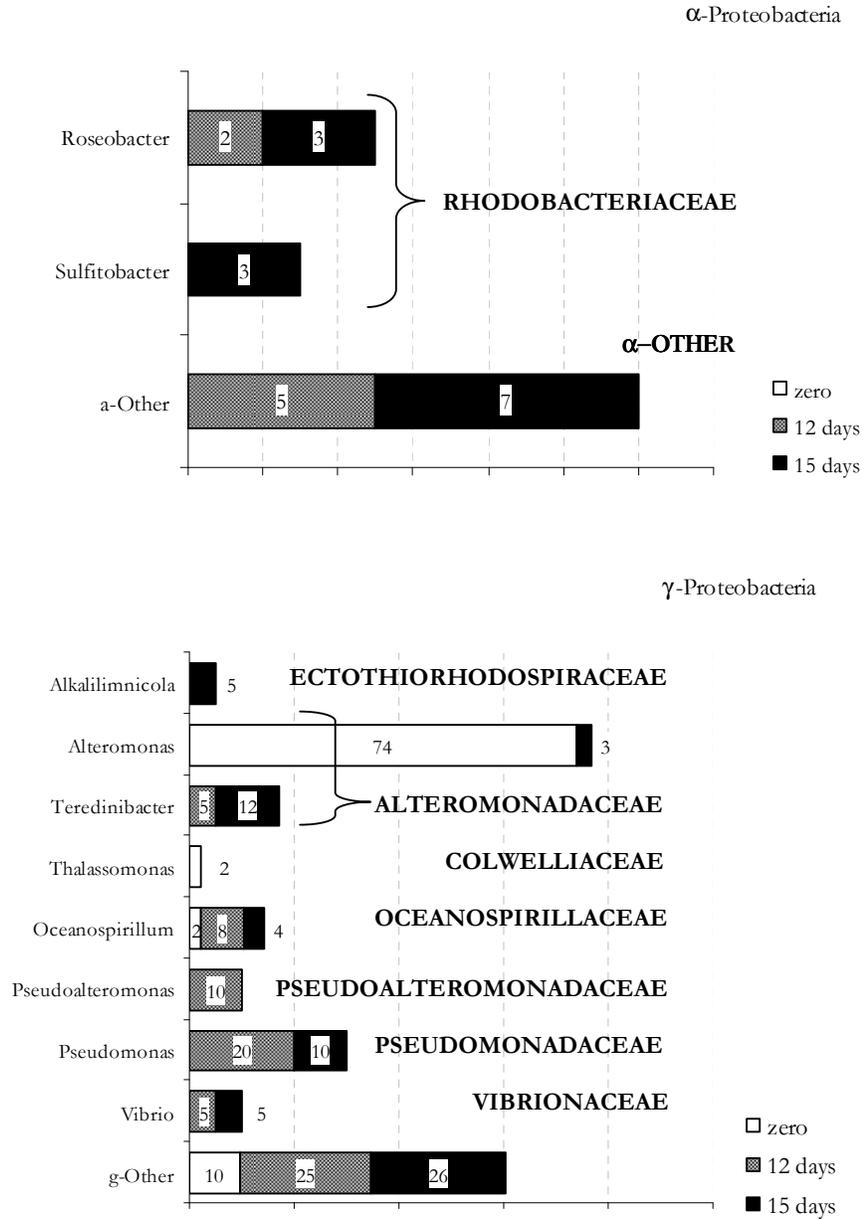


Fig. 39 e 40. Analisi tassonomica del 16S crDNA. Distribuzione dei differenti gruppi filogenetici appartenenti agli α - (figura in alto) e ai γ -Proteobacteria (figura in basso) durante la sperimentazione in *Microcosmo A*. La presenza del singolo gruppo batterico è espressa in riferimento al genere e alla famiglia di appartenenza e la sua presenza è espressa come percentuale all'interno della barra corrispondente.

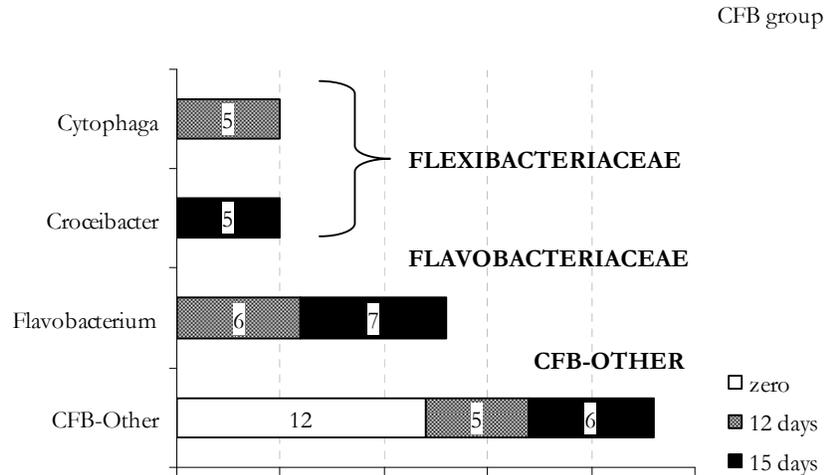


Fig. 41. Distribuzione dei cloni affiliati al phylum dei *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB). Le sequenze sono state suddivise per generi e famiglia di appartenenza.

Microcosmo B. L'analisi tassonomica dei 149 cloni isolati in questa sperimentazione rivela una struttura di comunità microbica costituita quasi esclusivamente da α -, γ -Proteobacteria e CFB group. Sequenze correlate al gruppo degli α -Proteobacteria sono presenti durante il secondo giorno di analisi. Sequenze affiliate al genere *Sphingomonas* (3%) e *Salipinger* (5%) sono specifiche, rispettivamente del secondo e dell'ottavo giorno di analisi; altri generi come *Mesorhizobium* e *Sulfitobacter* sono per contro presenti solo verso la fine della sperimentazione. Sequenze correlate a unidentified e uncultured batteri di questo gruppo sono sempre presenti. Il gruppo dei γ -Proteobacteria è (in tutti i tempi di analisi costituiscono il gruppo quantitativamente con più sequenze (115 cloni). Sequenze affiliate ai generi di *Oceanospirillum* (Oceanospirillaceae), *Pseudomonas* (Pseudomonadaceae) e *Alteromonas* (Alteromonadaceae) sono riscontrate durante tutta la sperimentazione, sebbene con percentuali variabili nel tempo. Sequenze dei generi *Microbulbifer* (3%) e *Teredinibacter* (6%) sono presenti solo dopo il dodicesimo giorno di analisi. Il gruppo delle *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* risulta costituito principalmente da due generi *Cytophaga* e *Croceibacter* (entrambi appartenenti alle Flavobacteriaceae) (tabella 11, 12, 13, 14 e 15 e nelle figura 42, 43, 44 e 45).

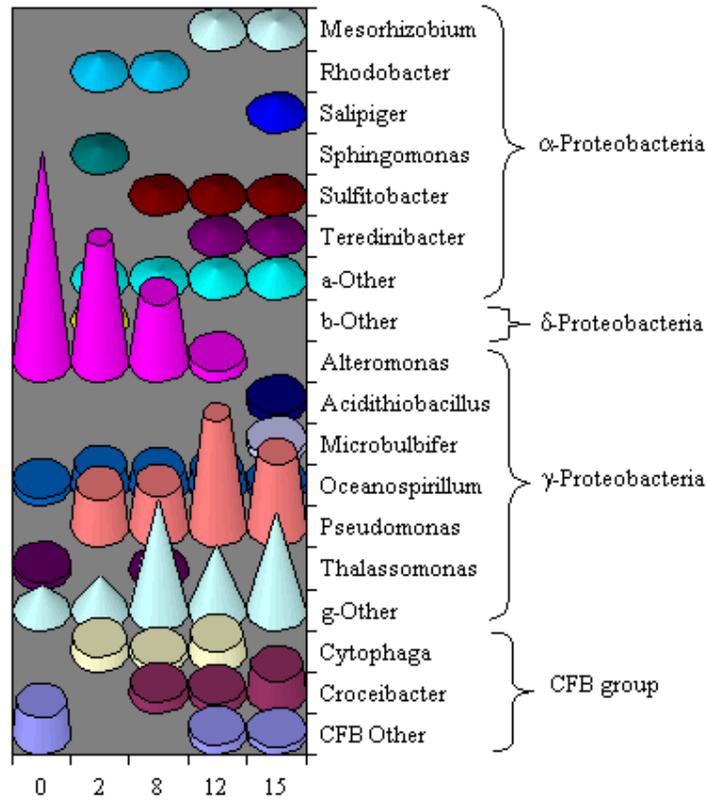


Fig. 42. Distribuzione quantitativa dei cloni ottenuti dall'analisi delle librerie di cloni realizzate tramite l'analisi tassonomica del 16S rDNA della popolazione microbica.

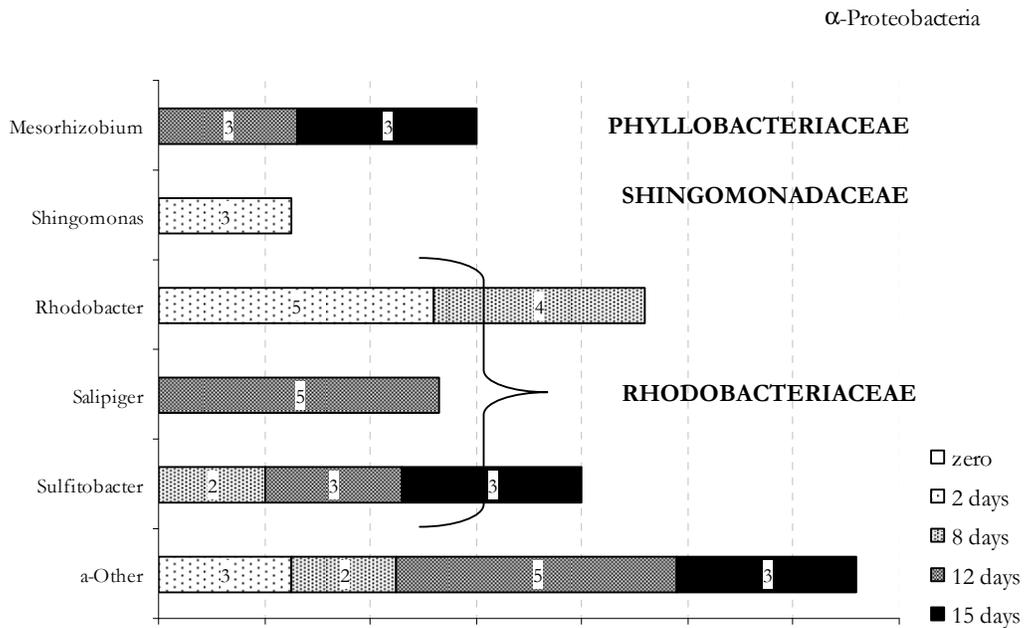


Fig. 43. Distribuzione temporale dei cloni affiliati al gruppo degli α -Proteobacteria durante la sperimentazione nel *microcosmo B*.

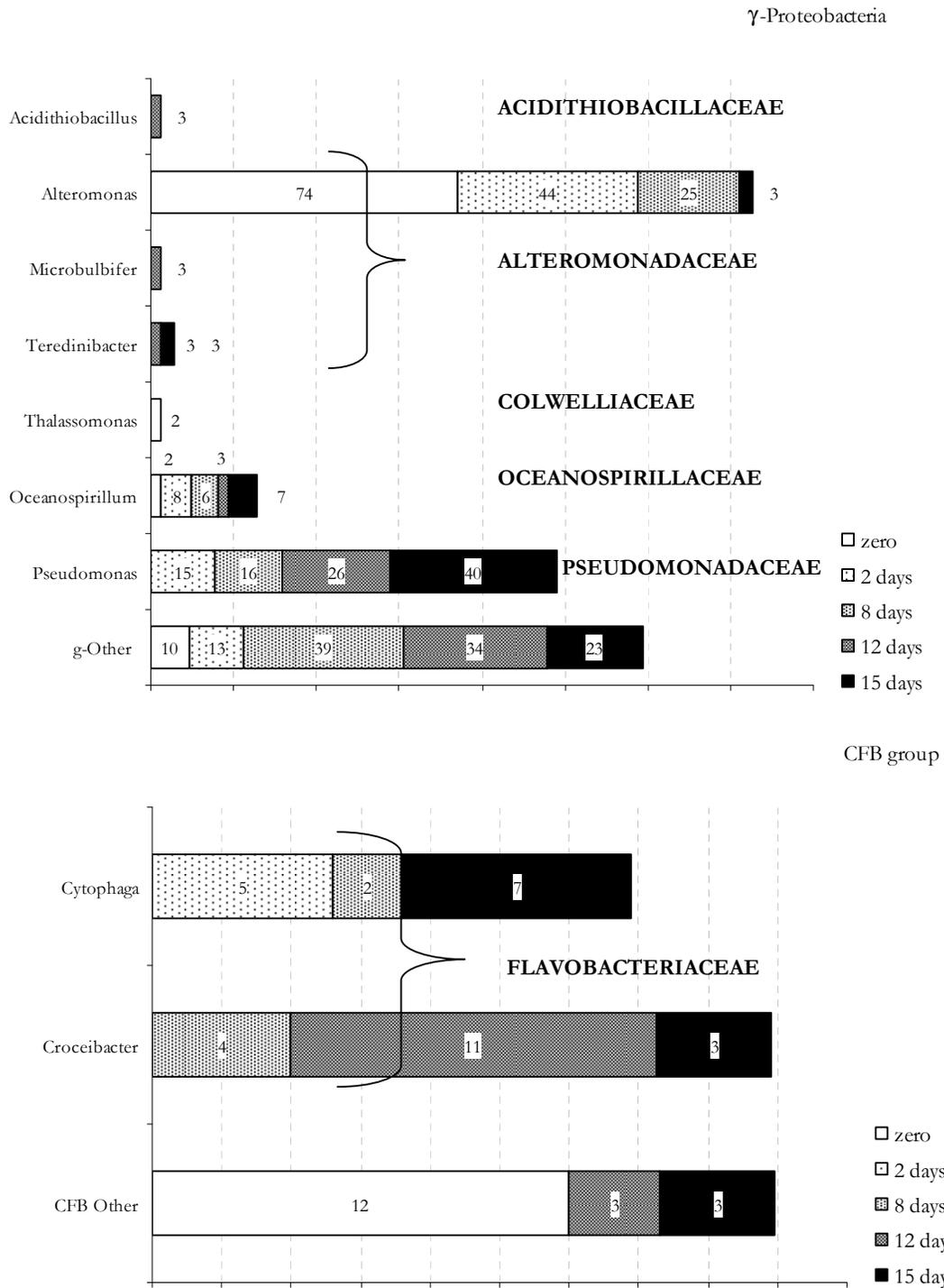


Fig. 44 e 45. Analisi tassonomica del 16S crDNA. Distribuzione dei differenti gruppi filogenetici appartenenti agli γ -Proteobacteria (figura in alto) e dei CFB group (figura in basso) durante la sperimentazione in *Microcosmo B*. La presenza del singolo gruppo batterico è espressa in riferimento al genere e alla famiglia di appartenenza e la sua presenza è espressa come percentuale all'interno della barra corrispondente.

Microcosmo A – time zero –

Bacterial Division	Representative clone	N° of sequences	Best-matched organism	Accession N°	Family	Genus	%, Identity
g-Proteobacteria	miB-0-42	1	Bacterium K2-14	AY345435	Other	uncl. bacteria	97,8
	miB-0-04	1	Unc. proteobacterium CHAB-IV-19	UGA240914	Other	env. Sample	95,5
	miB-0-90	1	Gamma proteobacterium JC204	AY194066	Colwelliaceae	<i>Thalassomonas</i>	97,8
	miB-0-14	1	Marine bacterium Tw-1	AY028196	Halomonadaceae	uncl. bacteria	98,3
	miB-0-24	1	<i>Oceanospirillum multiglobuliferum</i>	AB006764	Oceanospirillaceae	<i>Oceanospirillum</i>	99,6
	miB-0-16	1	Uncultured bacterium clone ZA3706c	AF382127	Other	env. Sample	99,1
	miB-0-33	5	<i>Alteromonas</i> sp. AS-30	ASP391191	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	98,2
	miB-0-23	7	<i>Alteromonas</i> sp. AS-31	ASP391192	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	98,5
	miB-0-70	18	<i>Alteromonas</i> sp.	AB015135	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	98,9
	miB-0-23	1	<i>Alteromonas alvinellae</i>	AF288360	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	98,8
CFB group	miB-0-20	5	Marine bacterium SCRIPPS-41	AF359548	Flavobacterium	env. Sample	98,3

Tabella 8

Microcosmo A – time 2 days –

Bacterial Division	Representative clone	N° of sequences	Best-matched organism	Accession N°	Family	Genus	%, Identity
a-Proteobacteria	miA-12-12	1	<i>Roseobacter</i> sp. LA7	AF513438	Rhodobacteriaceae	<i>Roseobacter</i>	99,1
	miA-12-41	1	<i>Rhodobacteraceae</i> bacterium JC2049	AY442178	Rhodobacteraceae	env. Sample	98,2
	miA-12-35	1	<i>Teredinibacter turnerae</i> strain CS32	AY949836	Alteromonadales	<i>Teredinibacter</i>	91,5
g-Proteobacteria	miA-12-34	1	<i>Teredinibacter turnerae</i>	AY028398	Alteromonadales	<i>Teredinibacter</i>	99,4
	miA-12-67	1	<i>Oceanospirillum</i> sp. MED92	AY136116	Oceanospirillales	<i>Oceanospirillum</i>	96,9
	miA-12-01	2	<i>Oceanospirillum</i> sp. ME113	OSP302700	Oceanospirillales	<i>Oceanospirillum</i>	97,5
	miA-12-90	1	<i>Pseudomonas</i> sp. ND137	AB052965	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	98,7
	miA-12-02	3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain AU5056	AY486371	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	93,2
	miA-12-74	4	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. EBD	DQ218321	Pseudoalteromonadaceae	<i>Pseudoalteromonas</i>	97,8
	miA-12-17	2	<i>Vibrio fischeri</i> VFISC	AY780012	Vibrionaceae	<i>Vibrio</i>	99,0
	miA-12-81	1	Unc. marine gamma proteobacterium BY-97	AY344367	Other	env. Sample	92,1
	miA-12-71	1	marine g-proteobacterium HTCC2120	AY386340	Other	Other	97,6
CFB group	miA-15-71	2	<i>Flavobacterium</i> sp. V4.MO.3	FSP244697	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	99,3
	miA-12-80	1	Uncultured <i>Cytophaga</i> sp. clone B10	DQ072865	Flexibacteraceae	<i>Cytophaga</i>	99,4
	miA-12-22	2	<i>Cytophaga</i> sp. TUT1213	AB188214	Flexibacteraceae	<i>Cytophaga</i>	96,9
	miA-12-62	2	Flavobacteriaceae bact. Gaa02_04net2_3	AY319330	Flavobacteriacea	Other	97,5

Tabella 9

Microcosmo A – time 15 –

Bacterial Division	Representative clone	N° of sequences	Best-matched organism	Accession N°	Family	Genus	%, Identity
a-Proteobacteria	miA-15-34	2	<i>Roseobacter</i> sp. JL-126	AY998066	Rhodobacteraceae	Roseobacter	97,7
	miA-15-61	2	<i>Sulfotobacter litoralis</i> strain iso1	DQ097527	Rhodobacteraceae	Sulfotobacter	99,4
	miA-15-28	4	Uncultured <i>Sulfotobacter</i> sp. F2C100	AY936189	Rhodobacteraceae	Other	98,4
g-Proteobacteria	miA-15-33	3	<i>Alkalilimnicola halodurans</i> 34Alc	AHA404972	Ectothiorhodospiraceae	Alkalilimnicola	97,9
	miA-15-72	2	<i>Alteromonas</i> sp. 7IX/A01/156	AY576745	Alteromonadaceae	Alteromonadas	98,7
	miA-15-05	4	<i>Teredinibacter turnerae</i>	AY028398	Alteromonadaceae	Teredinibacter	98,6
	miA-15-06	3	<i>Teredinibacter turnerae</i> CS30	AY949835	Alteromonadaceae	Teredinibacter	95,7
	miA-15-40	3	marine gamma proteobacterium HTCC2120	AY386340	Other	Other	98,3
	miA-15-67	7	sulfur-oxidizing bacterium OBII5	AF170421	Other	Other	99,1
	miA-15-91	4	gamma proteobacterium HTCC234	AY102028	Other	Other	97,6
	miA-15-18	1	Unc. <i>Oceanospirillum</i> sp. JL-ESNP-I48	AY664230	Other	Other	98,4
	miA-15-21	3	<i>Vibrio wodanis</i> isolate VWOD	AY780011	Vibrionaceae	Vibrio	99,2
	CFB group	miA-15-05	3	<i>Croceibacter atlanticus</i> strain HTCC2559T	AY163576	Flavobacteriaceae	Croceibacter
miA-15-73		3	Uncultured gamma proteobacterium	UGA318170	Other	env. Sample	98,3
miA-15-59		3	marine bacterium MBIC1357	AB032514	Flavobacteriaceae	Other	98,7
miA-15-14		4	<i>Flavobacterium</i> sp. V4.BO.21	FSP244691	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	98,6

Tabella 10

Microcosmo B – time zero –

Bacterial Division	Representative clone	N° of sequences	Best-matched organism	Accession N°	Family	Genus	%, Identity
<i>g-Proteobacteria</i>	miB-0-42	1	Bacterium K2-14	AY345435	Other	uncl. bacteria	97,8
	miB-0-04	1	Unc. proteobacterium CHAB-IV-19	UGA240914	Other	env. Sample	95,5
	miB-0-90	1	Gamma proteobacterium JC204	AY194066	Colwelliaceae	<i>Thalassomonas</i>	97,8
	miB-0-14	1	Marine bacterium Tw-1	AY028196	Halomonadaceae	uncl. bacteria	98,3
	miB-0-24	1	<i>Oceanospirillum multiglobuliferum</i>	AB006764	Oceanospirillaceae	<i>Oceanospirillum</i>	99,6
	miB-0-16	1	Uncultured bacterium clone ZA3706c	AF382127	Other	env. Sample	99,1
	miB-0-33	5	<i>Alteromonas</i> sp. AS-30	ASP391191	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	98,2
	miB-0-23	7	<i>Alteromonas</i> sp. AS-31	ASP391192	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	98,5
	miB-0-70	18	<i>Alteromonas</i> sp.	AB015135	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	98,9
	miB-0-23	1	<i>Alteromonas alvinellae</i>	AF288360	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	98,8
CFB group	miB-0-20	5	Marine bacterium SCRIPPS-41	AF359548	Flavobacterium	env. Sample	98,3

Tabella 11

Microcosmo B – time 2 days –

Bacterial Division	Representative clone	N° of sequences	Best-matched organism	Accession N°	Family	Genus	%, Identity
a-Proteobacteria	miB-2-18	2	Uncultured <i>Roseobacter</i> sp.		Rhodobacteraceae	<i>Rhodobacter</i>	93,5
	miB-2-25	1	<i>Sphingomonas</i> sp. Kw07	AB187587	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	91,3
	miB-2-05	1	Endosymbiont UWET39	AF132139	Holosparaceae	env. Sample	98,3
b-Proteobacteria	miB-2-17	2	Beta proteobacterium HTCC16	AY102013	Other	env. Sample	94,6
g-Proteobacteria	miB-2-19	2	<i>Alteromonas</i> sp.	AB015135	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	98,3
	miB-2-47	15	<i>Alt. marina</i> strain SW-47	AF529060	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	99,1
	miB-2-01	1	<i>Oceanospirillum</i> sp. ME101	OSP302699	Oceanospirillaceae	<i>Oceanospirillum</i>	97,4
	miB-2-10	2	<i>Oc. pusillum</i> strain:IFO13613	AB006768	Oceanospirillaceae	<i>Oceanospirillum</i>	97,4
	miB-2-77	6	<i>Pseudomonas</i> sp. PE1	AB052968	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	94,6
	miB-2-01	1	Unc. bacterium CHAB-II-49	AJ240909	Other	env. Sample	98,0
	miB-2-05	1	Unc. bacterium clone 133ds10	AY212583	Other	env. Sample	88,3
	miB-2-07	1	Unc. bacterium clone MB-C2-128	AY093481	Other	env. Sample	99,2
	miB-2-15	1	Unid. bacterium clone K2-30-6	AY344418	Other	env. Sample	93,1
	miB-2-17bis	1	Unc. bacterium gene f	AB186992	Other	env. Sample	99,2
CFB group	miB-2-27	2	<i>Cytophaga</i> sp. strain:J18-M01	AB017046	Flexibacteriaceae	<i>Cytophaga</i>	96,0

Tabella 12

Microcosmo B – time 12 days –

Bacterial Division	Representative clone	N° of sequences	Best-matched organism	Accession N°	Family	Genus	%, Identity	
a-Proteobacteria	miB-12-27	2	<i>Salipiger mucescens</i> strain A3	AY527274	Rhodobacteraceae	<i>Salipiger</i>	97,4	
	miB-12-28	1	<i>Sulfitobacter pontiacus</i>	SPY13155	Rhodobacteraceae	<i>Sulfitobacter</i>	95,6	
	miB-12-15	1	Uncultured <i>Roseobacter</i> 667-19	URO294355	Rhodobacteriaceae	env. Sample	97,4	
	miB-12-38	1	<i>Mesorhizobium loti</i>	AP003001	Phyllobacteriaceae	<i>Mesorhizobium</i>	87,9	
	miB-12-04	1	Unc. alpha proteobacterium clone Nubeena66	AY499897	Other	env. Sample	96,3	
g-Proteobacteria	miB-12-01	7	Unclassified <i>Pseudomonas</i>	AF102866	Pseudomonadaceae	env. Sample	95,5	
	miB-12-02	3	<i>Pseudomonas</i> sp. ND137	AB052965	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	96,5	
	miB-12-13	3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain AU5056	AY486371	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	93,2	
	miB-12-48	1	<i>Pseudomonas veronii</i>	AF064460	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	96,6	
	miB-12-45	1	<i>Pseudomonas</i> sp. Pss26	AF468448	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	98,9	
	miB-12-43	1	<i>Pseudomonas pachastrellae</i> clone KMM330	AB125366	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	99,5	
	miB-12-34	1	<i>Pseudomonas</i> sp. WAI-21	AY520572	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	97,6	
	miB-12-35	1	Unc. g proteobacterium clone Nubeena119	AY499917	Pseudomonadaceae	env. Sample	94,7	
	miB-12-38	1	<i>Oceanospirillum multiglobuliferum</i>	AB006764	Oceanospirillaceae	<i>Oceanospirillum</i>	94,0	
	miB-12-14	1	<i>Microbulbifer hydrolyticus</i>	AJ608704	Alteromonadaceae	<i>Microbulbifer</i>	93,4	
	miB-12-58	1	<i>Teredinibacter turnerae</i>	AY028398	Alteromonadaceae	<i>Teredinibacter</i>	94,6	
	miB-12-33	1	<i>Acidithiobacillus</i> sp. SH	AB080298	Acidithiobacillaceae	<i>Acidithiobacillus</i>	97,6	
	miB-12-24	2	Marine g-proteobacteria HTCC2188	AY386344	Other	env. Sample	98,7	
	miB-12-50	1	Unc. G-proteobacteria clone Arctic96B-1	AF353242	Other	env. Sample	98,0	
	miB-12-08	1	Uncultured gamma proteobacterium	UGA318170	Other	env. Sample	95,7	
	miB-12-22	1	Uncultured bacterium clone CR99-24-28	AF429138	Other	env. Sample	89,7	
	CFB group	miB-12-42	4	<i>Croceibacter atlanticus</i> strain HTCC2559T	AY163576	Croceibacter	<i>Flavobacteriaceae</i>	99,6
		miB-12-39	1	Unc. CFB group bacterium MERTZ_0CM_363	AF424359	env. Sample	Other	96,7

Microcosmo B – time 15 days –

Bacterial Division	Representative clone	N° of sequences	Best-matched organism	Accession N°	Family	Genus	%, Identity
a-Proteobacteria	miB-15-58	1	<i>Sulfitobacter</i> sp. ARCTIC-P4	AY573043	Rhodobacteraceae	<i>Sulfitobacter</i>	98,3
	miB-15-21	1	<i>Mesorhizobium loti</i>	AP003001	Phyllobacteriaceae	<i>Mesorhizobium</i>	99,4
	miB-15-10	1	Unc. alpha proteobacterium MB11C09	AY033324	Rhodobacteraceae	env. Sample	97,1
g-Proteobacteria	miB-15-17	3	Unc. g-proteobacterium clone Arctic96B-1	AF353242	Other	env. Sample	97,6
	miB-15-47	1	Uncultured bacterium SIC.B8	AF277556	Other	env. Sample	98,4
	miB-15-50	1	Uncultured bacterium ACE-21	AF142798	Other	env. Sample	99,1
	miB-15-59	2	Uncultured proteobacterium c1-B045	AF420370	Other	env. Sample	99,6
	miB-15-21	6	<i>Pseudomonas</i> sp. PE1	AB052968	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	98,6
	miB-15-91	2	<i>Pseudomonas</i> sp. ND137	AB052965	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	99,5
	miB-15-11	4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain AU5056	AY486371	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	91,3
	miB-15-31	1	Unc. clone LAS-B5N	AF513940	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	91,3
	miB-15-24	1	<i>Oceanospirillum multiglobuliferum</i>	AB006764	Oceanospirillaceae	<i>Oceanospirillum</i>	94,0
	miB-15-67	1	<i>Oceanospirillum multiglobuliferum</i>	AB006764	Oceanospirillaceae	<i>Oceanospirillum</i>	99,2
CFB group	miB-15-81	1	<i>Croceibacter atlanticus</i> strain HTCC2559T	AY163576	Flavobacteriaceae	<i>Croceibacter</i>	94,6
	miB-15-26	1	Flavobacteriaceae bact. Gaa02_04net2_3	AY319330	Flavobacteriacea	Other	96,5
	miB-15-58	2	<i>Cytophaga</i> sp. strain:J18-M01	AB017046	Flexibacteriaceae	<i>Cytophaga</i>	97,9

Tabell

Analisi di diversità. Come suggerito da Brown (2001) per il calcolo degli indici di diversità tutte le librerie di cloni sono state normalizzate a 100 cloni. L'analisi della biodiversità è stata realizzata tramite la misura della stima di diversità (indice di Shannon-Weaver), dell'indice di dominanza (indice di Simpson), di Evenness (indice di Equitability) e della coverage biodiversity.

Durante la sperimentazione nel *microcosmo A* (tabella 16) i risultati ottenuti dal calcolo dell'indice degli indici di diversità mostrano che la diversità microbica incrementa con il tempo di sperimentazione. Il numero dei taxa batterici osservati durante il dodicesimo e quindicesimo giorno di analisi (12 e 14) sono più del doppio di quelli registrati all'inizio delle sperimentazione (figura 46). I valori della coverage diversity (90, 82 e 79% rispettivamente all'inizio della sperimentazione al dodicesimo e al quindicesimo della stessa) sono relativamente alti e i dati dell'indice di dominanza non rivelano la presenza (ad esclusione del tempo d'inizio della sperimentazione) di un gruppo batterico preponderante, risultato inoltre supportato dall'analisi di diversità tassonomica.

Come mostrato in tabella 17 la distribuzione di gruppi tassonomici durante la seconda sperimentazione (*microcosmo B*) può essere virtualmente divisa in tre fasi distinti caratterizzati, oltre che dalla fase iniziale, da una fase intermedia (dal secondo all'ottavo giorno di analisi) e da una fase finale (dodicesimo e quindicesimo giorno). La coverage diversità mostra una riduzione dei valori passando da 85% a valori del 74%. Tuttavia sia i valori dell'indice di Evenness (J') che quelli di Dominance (S') si mantengono relativamente stabili evidenziando ulteriormente una popolazione estremamente differenziata (aumento dei generi tassonomici) ma uniformemente distribuita.

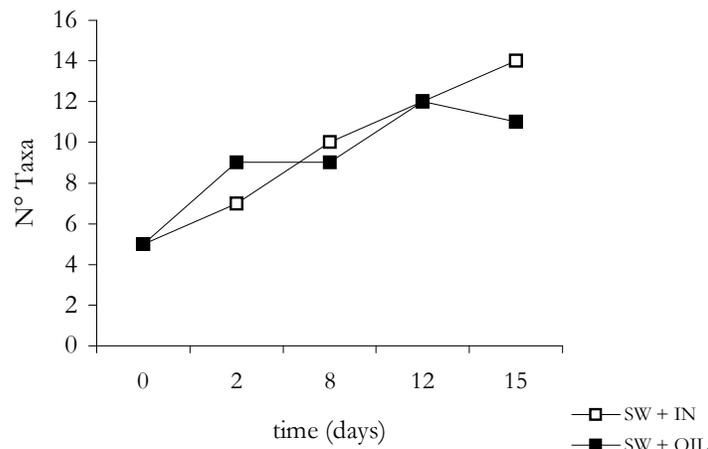


Fig. 46. Distribuzione dei generi tassonomici durante le sperimentazioni realizzate (*microcosmo A* e *B*)

GENUS	Time (days)		
	zero	12	15
Taxa S	5	12	14
Individuals	100	100	100
Dominance (S')	0.5728	0.137	0.1188
Shannon (H')	0.864	2.226	2.398
Simpson (1-S')	0.4272	0.863	0.8812
Evenness (J')	0.4745	0.7715	0.7862
Coverage (%)	90	82	79

Tab. 16. Misura degli indici di diversità calcolati durante la sperimentazione condotta nel microcosmo A.

GENUS	Time (days)				
	zero	2	8	12	15
Taxa S	5	9	9	12	11
Individuals	100	100	100	100	100
Dominance (S')	0.5728	0.24	0.2482	0.1966	0.2454
Shannon (H')	0.864	1.775	1.668	1.988	1.811
Simpson (1-S')	0.4272	0.76	0.7518	0.8034	0.7546
Evenness (J')	0.4745	0.6553	0.5891	0.6084	0.5561
Coverage (%)	85	88	81	74	74

Tab. 17. Misura degli indici di diversità misurati dalle sequenze ottenute durante la sperimentazione *microcosmo B*.

Misure Relative al Metabolismo Batterico

Attività enzimatica.

Microcosmo A. Durante questa sperimentazione tutti i valori delle attività esoenzimatiche si mostrano valori più bassi rispetto a quelli identificati nel *microcosmo B*, come mostrato in [figura 47](#).

Microcosmo B. Durante le prime 24 ore di sperimentazione è possibile rilevare un aumento di tutte le attività enzimatiche. Tale incremento continua al quinto giorno per la lipasi, la fosfatasi e l'esterasi mentre tende a diminuire per la leucina amminopeptidasi ([figura 48](#)).

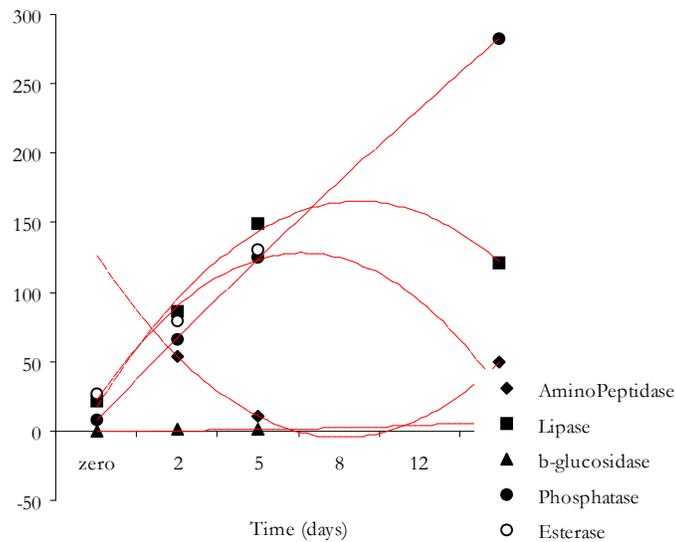
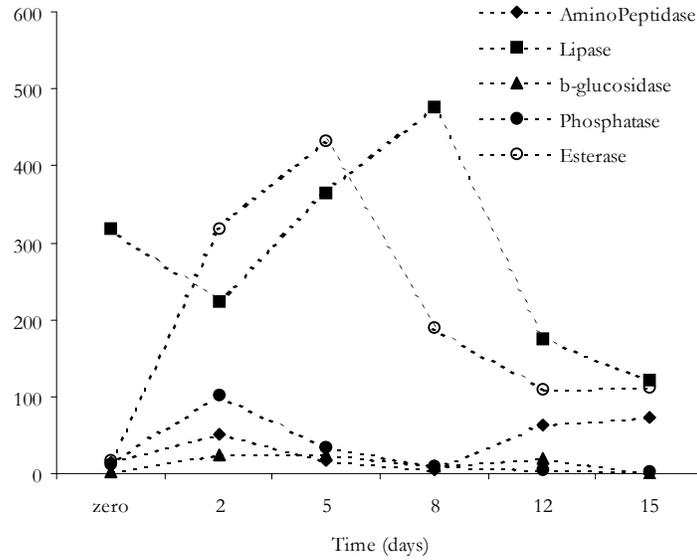


Fig. 47 e 48. Andamento dell'attività enzimatica durante le sperimentazione condotte nel *Microcosmo A* (sopra) e *microcosmo B* (sotto). Gli andamenti dei diversi enzimi sono mostrati secondo leggenda. Le linee rosse identificano le linee di tendenza di tali attività esoenzimatiche, mentre in nero sono rappresentate le linee di andamento reali.

Biochemical Oxygen Demand (BOD)

Microcosmo A. Nel microcosmo allestito aggiungendo all'acqua di mare dei nutrienti inorganici è possibile evidenziare, nei primi otto giorni di sperimentazione, un andamento costante con valori medi di $1.7 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$. Tali valori aumentano dopo il dodicesimo giorno raggiungendo il massimo valore di $16.1 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ al quindicesimo (figura 49).

Microcosmo B. Come mostrato in [figura 50](#) l'andamento dei valori di BOD mostrano, durante i quindici giorni di sperimentazioni, dei valori generalmente costanti che passano da valori di 1.3 a valori di 6.3 mg O₂ l⁻¹.

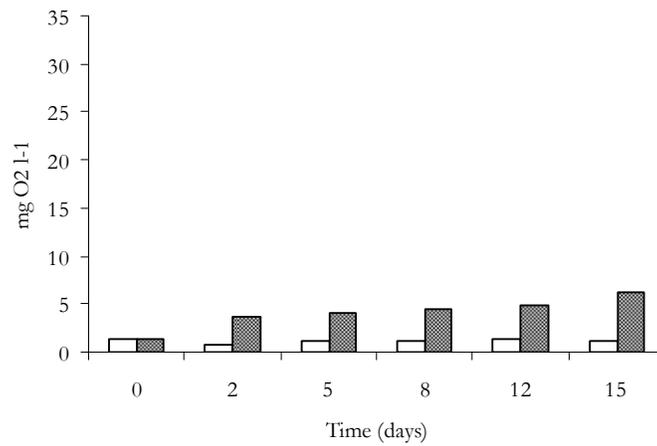
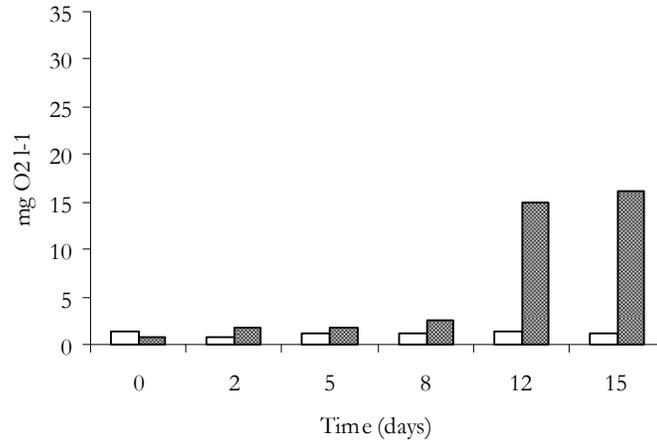


Fig. 49 e 50. Misura della Biochemical Oxygen Demand durante le sperimentazione condotte nel *microcosmo A* (in alto), e nel *microcosmo B* (in basso). Le barre con il riempimento nero indicano la sperimentazione in studio mentre con il riempimento bianco è rappresentato il controllo (*microcosmo A*, allestito solo con acqua di mare – Capitolo II).

Misure di Abbondanza Virale

Microcosmo A. Come mostrato in [figura 51](#) l'abbondanza delle particelle virali si mantiene costante durante i primi otto giorni di sperimentazione (valori medi di 1.8×10^7 virus ml⁻¹).

Dopo l'ottavo giorno di analisi è possibile osservare un incremento di un ordine di grandezza, per arrivare (al dodicesimo e il quindicesimo giorno) a valori medi di 1.6×10^8 virus ml^{-1} .

Microcosmo B. Come per il *microcosmo A* anche durante questa sperimentazione l'abbondanza virale si è mantenuta costante con valori medi di 8.7×10^7 virus ml^{-1} mostrando un picco massimo di 1×10^8 virus ml^{-1} all'ottavo giorno (figura 52).

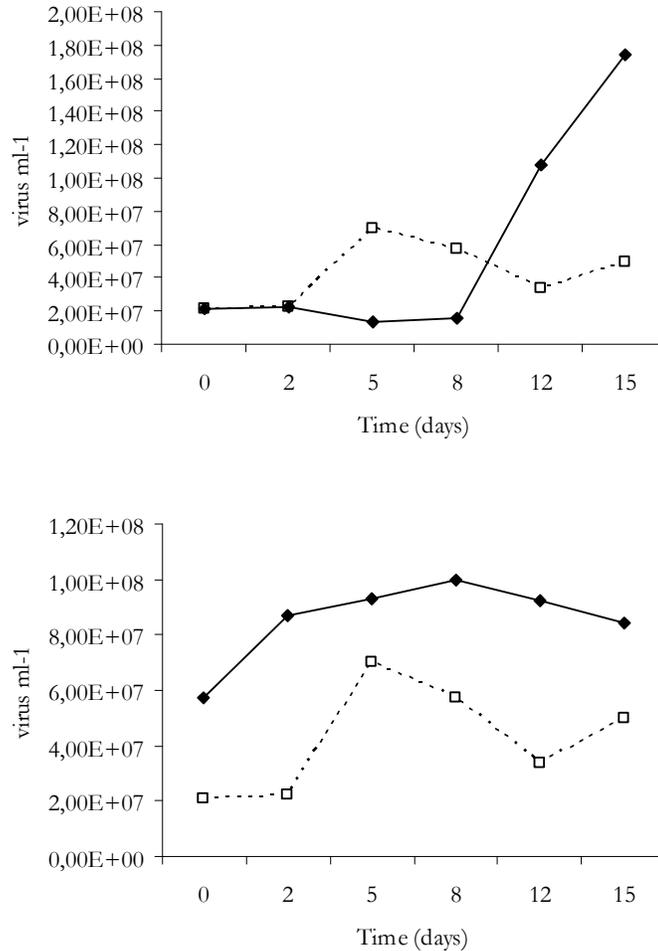


Fig. 51 e 52. Nella figura in alto è mostrato il conteggio dell'abbondanza virale del *microcosmo A* (Natural Seawater) mentre in basso quello del *microcosmo B* (Seawater con nutrienti inorganici). Le linee continue nere indicano il microcosmo in studio, mentre le linee bianche tratteggiate si riferiscono alla condizione presente nel microcosmo di controllo (microcosmo allestito solo con acqua di mare, *Microcosmo A* Capitolo II).

Misure di Abbondanza degli Eterotrophic NanoFlaggelates (HNF)

Microcosmo A. Come evidenziato in figura 53 il massimo valore della concentrazione protozoica ($18000 \text{ cell. ml}^{-1}$) è stato registrato durante il quinto giorno di sperimentazione. Successivamente tale valore tende a decrescere ritornando a valori simili a quelli iniziali ($2000 \text{ cell. ml}^{-1}$).

Microcosmo B. Così come per il *microcosmo A*, anche in questa sperimentazione realizzata aggiungendo del petrolio greggio all'acqua di mare il quantitativo dei protozoi tende a mantenersi costante con valori medi di $1800 \text{ cell. ml}^{-1}$ (figura 55).

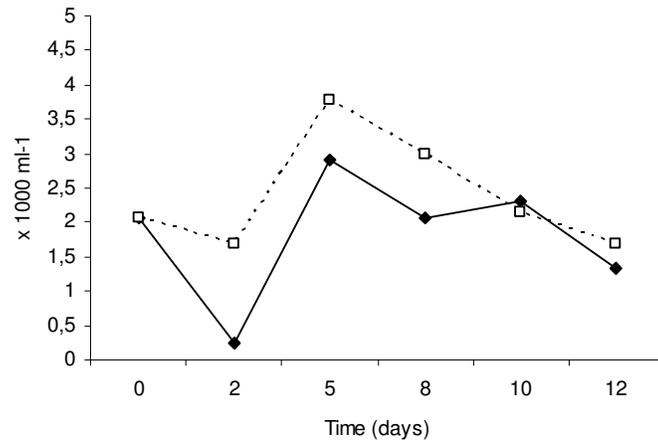
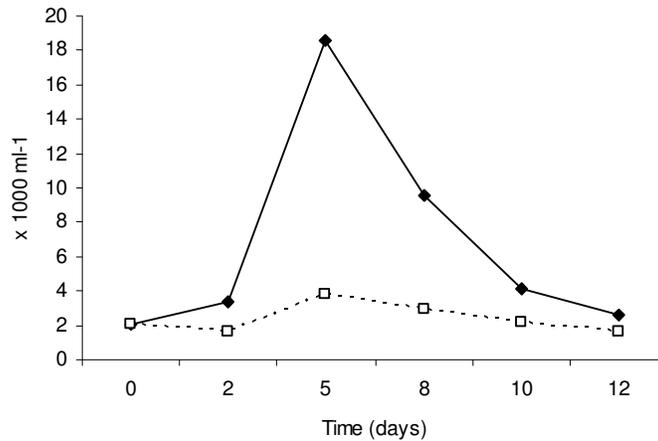


Fig. 53 e 54. Misura degli organismi Heterotrophic Nano Flagellates (HNF) durante la sperimentazione nel *Microcosmo A* (sopra) e nel *Microcosmo B* (sotto). Le linee continue nere indicano il microcosmo in studio, mentre le linee bianche tratteggiate si riferiscono al controllo.

Tab.2_- MARINE AGAR

Composizione del terreno MARINE-AGAR utilizzato nel conteggio dei batteri eterotrofi coltivabili. Il terreno dovrà essere sterilizzato tramite autoclave (121°C per 15 minuti) e dovrà presentare a 25°C un pH finale di circa 7.6.

Bacto peptone	5.00 g
Bacto yeast extract	1.00 g
Fe(III) citrate	0.10 g
NaCl	19.45 g
MgCl ₂ (dried)	5.90 g
NaSO ₄	3.24 g
CaCl ₂	1.80 g
KCl	0.55 g
Na ₂ CO ₃	0.16 g
KBr	0.08 g
SrCl ₂	34.00 mg
H ₃ BO ₃	22.00 mg
Na-silicate	4.00 mg
NaF	2.40 mg
(NH ₄)NO ₃	1.60 mg
Na ₂ HPO ₄	8.00 mg

Tab. 3- ARABIAN LIGTH CRUDE OIL

Principali caratteristiche chimico fisiche* del petrolio Arabian Ligth Crude Oil utilizzato in questo lavoro:

Massa Volumetrica	859
Gravita Specifica (g/cm ³)	0.89
Viscosità Cinematica (CST)	15.0 (a 10°C) 6.0 (a 40°C)
API	36.7
Quantitativo di acqua ottenuta per distillazione (% del volume)	0.05
Quantitativo di H ₂ S disciolto (ppm)	< 3
Quantitativo di Paraffine (MIBK a -30°C)	5.8
Quantitativo di Asfalteni (% del peso)	0.75
Quantitativo di Carbonio CONRADSON (% del peso)	4.8
Quantitativo in Azoto totale (% del peso)	0.4
Quantitativo di idrocarburi leggeri fino a C ₅ (% del peso)	2.15
Idrocarburi lineari (% del volume)	60
Idrocarburi aromatici (% del volume)	3
Idrocarburi ciclici (% del volume)	5
Idrocarburi ramificati (% del volume)	32

* Tabella redatta su dati sperimentali ottenuti in questo lavoro e con riferimento alla Tesi di Dottorato del 1994 di P. Marty dal titolo “Utilisation d’un nutriment oleophile associe a une biodegradation pour accellerer la biodegradation d’un petrole brut en milieu marin. Essai de Modelisation” e del lavoro “Crude oil bioremediation in sub-Antarctic intertidal sediments: chemistry and toxicity of oiled residues” di E. Pelletier *et al.* (2004). Marine Environmental Research 57311–327.

Tab. 4 - BUSHNELL-HAAS MEDIUM

Composizione del terreno BUSHNELL-HAAS MEDIUM utilizzato per il conteggio dei batteri capaci di utilizzare il petrolio (MPN). Il terreno dovrà essere sterilizzato tramite autoclave (121°C per 15 minuti) e dovrà presentare a 25°C un pH finale di circa 7.6.

MgSO ₄ *7H ₂ O	0.2 gr
CaCl ₂	0.02 gr
KH ₂ PO ₄	1 gr
K ₂ HPO ₄	1 gr
NH ₄ NO ₃	1 gr
FeCl ₃	0.05 gr

Tab. 5 - ONR7a

Composizione del terreno salino minerale ONR7a*. Le tre soluzioni (A, B e C) dovranno essere sterilizzate separatamente (per evitare possibili precipitazioni dei sali disciolti) e solo successivamente unificate ad una temperatura di circa 50°C. Per il terreno solido è necessario aggiungere alla *soluzione A* 15 gr/L di Agar Bacteriological.

soluzione A

NaCl	22.79 gr
Na ₂ SO ₄	3.98 gr
KCl	0.72 gr
NaBr	83 mg
NaHBO ₃	31 mg
H ₃ BO ₃	27 mg
NaF	2.60 gr
NH ₄ Cl	0.27 gr
Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	89 mg
TAPSO	1.30 gr

soluzione B

MgCl ₂ *6H ₂ O	11.18 gr
CaCl ₂ *2H ₂ O	1.46 gr
SrCl ₂ *6H ₂ O	24 mg

soluzione C

FeCl ₂ *4H ₂ O	2 mg
--------------------------------------	------

* Tabella tratta dal sito della Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH Braunschweig, Germania (<http://www.dmsz.de/media/med950.htm>).

DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

Questa parte di lavoro è stata incentrata sulla ottimizzazione sia della progettazione delle strutture pilota utilizzate (le vasche dei microcosmi) sia per l'ottimizzazione dei protocolli metodologici utilizzati per la misura dei parametri biotici e abiotici, considerati fondamentali nello studio dei processi biodegradativi.

Possiamo subito dire che i sistemi pilota utilizzati si sono rivelati, pur nella loro semplicità ingegneristica, estremamente efficaci e versatili. Precedenti sperimentazioni (i cui risultati non sono stati mostrati in questo lavoro) hanno evidenziato come il vetro (utilizzato per la costruzione delle pareti) e il PVC (utilizzato nel sistema idraulico) si presentino, come materiali inerti e atossici, ottimi per la progettazione di tali strutture non permettendo né l'adesione del petrolio e né dei microrganismi sulla sua loro superficie; inoltre proprio come materiali inerti questi non determinano (a lungo termine) il rilascio di sostanze dall'azione batteriostatica o batteriocida. L'impiego di questi materiali è supportato inoltre dai bassi costi di acquisto, da una facilità di lavorazione e di recupero dei pezzi di ricambio. Tali sistemi pilota pur non presentando strutture annesse come simulatori di onda, vasche di marea o sistemi di filtrazioni (identificate per altro come componenti fondamentali in un progetto di costruzione di sistemi per simulazione in scala di ambienti marini) si presentano comunque come strutture base complete e funzionali. La velocità di ricircolo interno (5 litri h^{-1}), opportunamente regolata per mantenere un'ossigenazione costante della vasca permette una miscelazione continua dell'acqua che fa sì che la concentrazione dell'ossigeno non sia mai un fattore limitante per lo sviluppo microbico, condizione che intercorre naturalmente in un sistema marino naturale.

L'ottimizzazione delle metodiche utilizzate è stato un punto fondamentale di questa parte di lavoro.

L'analisi della componente biologica con particolare riferimento alla frazione microbica, sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo che delle sua attività è stato da sempre uno degli obiettivi principali dell'ecologia ambientale.

Se si considerano le numerose interazioni che si vengono a creare tra i batteri, i singoli substrati e/o l'ambiente di reazione e le caratteristiche morfologiche e fisiologiche (forme batteriche vitali, quiescenti, vitali ma non coltivabili, ultramicrobatteri) tipiche dei microrganismi ambientali si può facilmente comprendere che esistono numerose difficoltà per la caratterizzazione delle comunità microbiche specie in ambienti interessati da inquinamento idrocarburico.

E' da sottolineare inoltre che le tecniche tradizionali di numerazione e coltivazione sono generalmente difficoltose e dipendenti dal tempo e che ogni metodica può presentare delle limitazioni intrinseche o dipendenti dalle manipolazioni dei campioni o dall'operatore.

Recenti studi hanno messo in discussione la specificità del DAPI normalmente utilizzato per la conta del batterioplancton totale sottolineando che tale fluorocromo, pur legandosi specificatamente al DNA cellulare si può legare ad estratti di biopolimeri sintetici, RNA a doppio filamento, proteine, fosfolipidi e batteri privi di nucleoide (chiamati anche ghost cellulari) portando pertanto a conteggio sotto stimati o sovrastimati.

Problemi di stima sono presenti anche in tecniche che impiegano coloranti fluorescenti per l'analisi della vitalità cellulare (colorazione Live/Dead). L'utilizzo una miscela di due coloranti degli acidi nucleici (il SYTO 9 e il propidium iodide), permette effettivamente la distinzione di cellule vive (colorate in verde) da cellule morte (in rosso) ma può determinare la comparsa di artefatti caratterizzati da cellule con colorazione mista (colorazione in arancio) di difficile interpretazione. Inoltre ad alte concentrazioni batteriche ed in presenza di petrolio si può osservare la formazione di micelle di olio a cui i batteri sono strettamente adesi; i batteri in questa fase risultano pertanto difficilmente contabili mostrandosi come ammassi cellulari di difficile enumerazione.

Ancora l'utilizzo delle metodologie "cultura dipendente" sono basati sulla differenziazione morfologica, metabolica e fisiologica dei batteri previo isolamento e coltivazione su terreni solidi (conta delle Unità Formanti Colonia, CFU) o sullo stato liquido (come il Most Probabile Number, MPN). Tuttavia questi studi sono fortemente limitati sia dalla considerazione, ormai ampiamente conosciuta, che la maggior parte delle specie batteriche non determina la formazione di colonie (dal 90 al 99%) con le normali tecniche colturali (MacNaughton *et al.*, 1999), sia in dipendenza della considerazione che il substrato di crescita che può influenzare più o meno fortemente lo sviluppo di determinate popolazioni microbiche.

Queste limitazioni intrinseche possono comunque essere ovviate o utilizzando particolari accortezze metodologiche che portino ad un'ottimizzazione delle tecniche in uso (come ad esempio un aumento dei campi di osservazione diretta al microscopio, utilizzo di diluizioni, utilizzo di un numero sempre maggiore di substrati di crescita) o realizzando un confronto incrociato dei risultati singolarmente ottenuti.

Ogni metodologia, difatti, presenta dei vantaggi e delle caratteristiche uniche che possono essere tra loro integrati permettendoci di osservare una visione sempre più completa del fenomeno (in questo caso della componente batterica) in studio, difatti:

- i. Nello studio dell'abbondanza microbica il conteggio diretto con il DAPI e l'utilizzo della Citometria di Flusso permettono, difatti, una rapida misura degli individui cellulari in popolazioni omogenee ed eterogenee, ma in generale non possono essere determinanti per la misura della vitalità cellulare che per altro può essere analizzata tramite colorazioni vitali.
- ii. I metodi colturali ci danno importanti informazioni sulle caratteristiche fisiologiche dei batteri isolati ma contemporaneamente l'utilizzo di "metodi non colturali" (es. analisi tassonomica del 16ScrDNA) mostrano come la diversità microbica di comunità batteriche naturali è molto più grande di quella osservabile con i semplici metodi di osservazione e isolamento.
- iii. I metodi biomolecolari risultano particolarmente costosi ed laboriosi e non danno informazioni direttamente quantitative su di una specie.
- iv. La vitalità cellulare è per contro dipendente sia dai metodi colturali, sia dall'analisi quantitativa di DNA realizzato tramite Citometria a Flusso che si integra con i risultati ottenuti dalla misura del metabolismo batterico (Biochemical Oxygen Demand ed attività enzimatica).

L'osservazione dei risultati ottenuti durante le sperimentazioni condotte nei microcosmi pilota hanno dato generalmente risultati ampiamente paragonabili mostrando un bontà nella scelta e delle materiali e metodi utilizzati.

Durante le sperimentazioni realizzate sono stati analizzati i cambiamenti quali-, quantitativi della popolazione microbica naturale a seguito dell'introduzione di nutrienti inorganici o di petrolio greggio. Numerosi lavori hanno dimostrato una stretta corrispondenza tra variazioni del normale equilibrio marino, a seguito di fattori atropici, e struttura e nella funzionalità della popolazione microbica marina evento che si può interpretare come un adattamento comunitario alla nuova condizione ambientale.

Nel *microcosmo A* (realizzato aggiungendo all'acqua di mare dei nutrienti inorganici) è possibile osservare un incremento della popolazione microbica, già dopo il secondo giorno di sperimentazione, che si rileva tanto nella conta totale che in quella vitale.

In ambiente marino la crescita batterica è generalmente limitata dalla scarsa concentrazione di nutrienti (composti dell'azoto e del fosforo) che si presenta comunque come una situazione comune in natura.

Per supportare la crescita delle popolazioni indigene di batteri idrocarburo degradanti, una delle tecniche maggiormente utilizzate durante i processi di bioremediation, è l'impiego di

fertilizzanti come fonti nutrizionali, come i fertilizzanti solubili dell'azoto, quelli a basso rilascio (SFRs) o ancora quelli oleofili (Marty, 1983; Lee *et al.*, 1995; Young-Sook *et al.*, 2001). Ancora apporto dei nutrienti può essere determinato dall'introduzione di prodotti nutrienti solubili in acqua comunemente usati includono i sali nutrienti minerali (per esempio KNO_3 , NaNO_3 , NH_3NO_3 , K_2HPO_4 , MgNH_4PO_4) e molti fertilizzanti inorganici commerciali. Molti studi hanno dimostrato l'aggiunta non adeguata di tali nutrienti può determinare basse quote di biodegradazione. Gli ecosistemi marini (e non) sono generalmente carenti di queste sostanze poiché i microrganismi non degradanti il petrolio (includendo anche il fitoplankton) le consumano in competizione con le specie petrolio degradanti. Inoltre, il fosforo tende a precipitare come fosfato di calcio ad un pH simile a quello del mare sebbene quando il petrolio è disperso in un ampio volume, gli altri nutrienti richiesti per la crescita batterica, come l'azoto, non divengono più totalmente limitanti poiché sono disponibili (anche se in concentrazione minime).

Confrontato ad altri tipi di sostanze nutrienti, le sostanze nutrienti solubili in acqua sono più prontamente disponibili e più facili da maneggiare per effettuare le concentrazioni nutrienti dell'obiettivo in acqua interstiziale. Lo svantaggio principale è che sono più probabili essere lavate via tramite azione delle onde e delle maree.

I nostri esperimenti sono stati condotti in sistemi chiusi per cui non si è andato incontro a nessuna perdita di sali nutritivi per diluizione e considerando che essi sono stati inseriti in grande quantità (circa 100 volte di quella presenta naturalmente nell'ambiente marino) possiamo ipotizzare che essi non siano mai divenuti limitanti. La disponibilità costante di nutrienti si rileva sullo stato della popolazione microbica, che appare particolarmente attiva presentando un incremento dei valori sia nell'analisi delle unità formate colonia (CFU) che delle cellule vitali (Live/Dead staining).

Parallelamente è possibile osservare un incremento dei batteri idrocarburo degradanti che può essere giustificato se valutiamo che queste particolari specie batteriche già presenti nel campione dell'acqua (in uno stato di cellula vitale ma non attiva) passano ad uno stato vegetativo a seguito della disponibilità nutrizionale; la presenza di questi batteri eterotrofi specializzati nell'utilizzo di piccoli composti organici può essere inoltre spiegato dall'assenza, nelle vasche di analisi, di fattori di diluizione del carbonio organico che invece intercorrono nell'ambiente naturale.

L'analisi tassonomica della popolazione microbica attiva rivela la presenza di specie batteriche eterotrofi caratteristiche dell'ambiente marino come *Terenidibacter*, *Pseudoalteromonas* e *Vibrio* e di specie potenzialmente interessate dai fenomeni di biodegradazione come *Pseudomonas* o

appartenenti al gruppo degli α -Proteobacteria. Durante questa sperimentazione la popolazione batterica mostra una prova di omeostasi mostrando una buona stabilità in termini di diversità specifica.

Al contrario un qualitativo cambio delle condizioni nutrizionali (come l'aggiunta del petrolio) induce un rapido cambio nella composizione qualitativa della popolazione microbica.

L'introduzione (naturale o per effetto antropico) di inquinanti idrocarburici in un ecosistema si traduce in una modificazione della popolazione microbica durante un periodo comunemente identificato come "periodo di adattamento", caratterizzato dall'effetto tossico (del petrolio) per alcuni microrganismi e la presenza di una fonte di carbonio imprevista per altri.

Di norma quattro meccanismi sono evidenti in questo "periodo", ovvero:

- i. l'azione tossica delle frazioni leggere del petrolio sulla biocenosi microbica
- ii. l'induzione o la repressione di enzimi specifici
- iii. cambiamenti genetici indotti dalle nuove capacità metaboliche
- iv. arricchimento selettivo di nuovi microrganismi adattati alla natura chimica dell'inquinante

La risposta della biocenosi è praticamente costante quali siano i fattori ambientali. Il processo di adattamento è un processo rapido, da qualche giorno a poche settimane e perdura fintanto che la concentrazione del petrolio è tale da attivarlo.

È stato dimostrato che la proporzione delle popolazioni adattate alle popolazioni eterotrofe totali riflette generalmente l'andamento della contaminazione dell'ambiente (Leahy and Colwell, 1990). In presenza di contaminazione, vi è un adattamento dei batteri Gram negativi con cambiamento nella struttura e nella diversità delle specie dominanti.

Una volta superato il periodo di contaminazione, la popolazione tende a ritrovare la diversità d'origine (MacNaughton *et al.*, 1999).

I risultati ottenuti, con le differenti metodologie, mostrano risultati coincidenti che evidenziano come durante la sperimentazione realizzata con aggiunta del petrolio greggio (*microcosmo B*) è possibile registrare un aumento dell'abbondanza batterica, presumibilmente a seguito dell'input dato del petrolio. L'incremento quantitativo della popolazione già dal secondo giorno di analisi non mostra una corrispondenza con i valori di CFU e MPN, che presentano curve con un andamento generalmente più lento. Il petrolio pur presentandosi con un ottima fonte di carbonio non supporta il fabbisogno dei nutrienti inorganici che pertanto in questa condizione si presentano come limitanti.

Dopo questo incremento la popolazione presenta un'apparente fase stazionaria che termina verso l'ottavo giorno quando è osservabile un ulteriore cambiamento nell'attività microbica sia

tramite conta delle CFU, MPN che dell'attività respiratoria (BOD). L'apporto del petrolio greggio determina comunque un cambiamento nella struttura della comunità microbica come rivelano le analisi tassonomiche condotte sulla popolazione in cui è osservabile la comparsa di specie batteriche diverse da quelli della condizione iniziale e come risultato dalla coltivazione in piastra interessate dalla caratteristica di degradare gli idrocarburi., tanto che alla fine del periodo di sperimentazione il 6% del petrolio inserito nelle vasche risultava degradato. Questi dati sono inoltre avvalorati da quelli ottenuti da Roling (2002) che evidenziano come in microcosmi contaminati da petrolio, senza l'aggiunta di nutrienti, non è mostrato nessun significativo processo di degradazione. L'aumento della componente batterica in questo caso può essere supportata dal rilascio di azoto e fosforo dalla biomassa micobica uccisa dall'effetto del petrolio. Inoltre è importante sottolineare che inquinanti idrocarburiici possono indurre l'attivazione di profaghi e la selezione di protozoi specializzati, con conseguente lisi e fenomeni di grazing di un'ampia porzione della popolazione, che si traduce con un cambio composizionale della popolazione indipendentemente da un ampio processo degradativo.



Crude oil-induced structural shift of coastal bacterial communities of rod bay (Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica) and characterization of cultured cold-adapted hydrocarbonoclastic bacteria

Michail M. Yakimov ^{a,*}, Gabriella Gentile ^b, Vivia Bruni ^b, Simone Cappello ^a, Giuseppe D'Auria ^a, Peter N. Golyshin ^c, Laura Giuliano ^a

^a Institute for Coastal Marine Environment (IAMC), CNR, Spianata S. Raineri 86, 98122 Messina, Italy

^b Department of Animal Biology and Marine Ecology, University of Messina S.ta Sperone, 31, 98166 Messina, Italy

^c Institute of Microbiology, Technical University of Braunschweig, Spielmannstrasse 7, 38106 Braunschweig, Germany

Received 14 May 2003; received in revised form 14 October 2003; accepted 20 April 2004

First published online 18 May 2004

Abstract

For preliminary screening of human impact on Antarctic coasts, the compositions of microbial communities were analyzed in seawater at two sites located in the Terra Nova Bay of Antarctica (Ross Sea) by a combination of 16S rRNA gene sequencing and culture techniques. The bacterial community in the sample from the Rod Bay site, located at the proximity to the Italian Station, was characterized by a high abundance of 16S rRNA gene sequences belonging to the microflora typically found in soil and freshwater environments. In contrast, the seawater sample from the Adelie Cove station, a pristine reference site, contained 16S rRNA gene sequences typically found in marine areas affected by algal blooms and sea ice decay. The addition of crude oil to the Rod Bay seawater sample rapidly induced a shift in the composition of the bacterial community with appearance of novel taxonomic groups and a dramatic increase in the relative abundance of γ -Proteobacteria sequences, whereas no significant changes were detected in the bacterial community of the Adelie Cove sample under the same conditions. Bacteria-exhibiting features with potential interest for industrial and environmental applications were isolated from the Rod Bay oil-enriched sample. In particular, hydrocarbon-degrading, cold-adapted bacteria were selectively enriched, isolated and screened for their ability to synthesize polyunsaturated fatty acids. Twenty two bacterial strains were isolated from the oil enrichment culture and identified. Eighteen isolates were found to be members of γ -Proteobacteria, while the remainder were representatives of α -Proteobacteria, CFB and high G+C divisions.

© 2004 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cold-adapted; Hydrocarbonoclastic bacteria; Ross Sea; Antarctica

1. Introduction

The Antarctic environment is very vulnerable. Environmental monitoring programs and basic research for a better understanding of the structure and dynamics of Antarctic ecosystems are necessary to plan effective management and conservation strategies [1]. Increasing

rates of marine oil pollution call for more research into low temperature natural remediation mechanisms. The discovery of indigenous marine bacteria specialized in the degradation of hydrocarbons (marine hydrocarbonoclastic bacteria, MHCB) has highlighted the major role that bacteria play in the marine natural cleansing processes and offered new perspectives for bioremediation [2,3]. During the last decade, hydrocarbon-degrading bacteria belonging to *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* and *Sphingomonas* have

* Corresponding author. Tel.: +39-090-669003; fax: +39-090-669007.
E-mail address: yakimov@ist.mc.cnr.it (M.M. Yakimov).

been isolated from oil-contaminated soils of Antarctica [4–6]. However, very little is known about the distribution and physiology of autochthonous hydrocarbon-degrading microbes inhabiting Antarctic marine environments [7,8].

Cold-adapted bacteria are also of interest for several biotechnological applications, including production of polyunsaturated fatty acids (PUFA) and cold-adapted enzymes, and bioremediation [4,9–12]. This interest has stimulated recent research activities focusing on isolation, taxonomy and bioactivity screening. Enzymes from cold-adapted microorganisms have evolved to have a higher catalytic efficiency at low, often sub-zero, temperatures. According to the current hypothesis [13,14], this high efficiency could originate from the presence of specific amino acid residues located in the domain of the active site, influencing the conformational flexibility required for activity in the cold. A typical microbial adaptive response to a temperature decrease is the change of membrane lipid composition, mainly due to the increase in the relative content of unsaturated fatty acids [15,16].

In this study, the composition of bacterial communities of seawater samples collected at a depth of 2 m below ice pack from two distinct geographical areas were studied by cloning and sequencing 16S rRNA genes. Subsequently, an analysis, using molecular and cultivation techniques, was performed to examine the alterations in microbial community structures resulting from exposure to petroleum pollution in seawater samples from both sites. Numerically abundant heterotrophic bacteria recovered from a petroleum-enriched culture seem to be present in the microbial community of the Rod Bay area in very low numbers. Using a most probable number (MPN) approach, many of bacteria observed by molecular analyses were successfully isolated and their primary physiological characteristics were determined.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and on-field processing

Seawater surface samples were collected during the Antarctic summer of 1999–2000 from two sites located approximately 10 km apart in the Terra Nova Bay (Antarctica), namely the Rod Bay site (ANT-RB) (74°41.753'S–164°07.188'E) next to the Italian base, and a pristine site, the Adelie Cove (ANT-AC) (74°47.40'S–163°65'E). A 5-liter Niskin bottle was used to collect water samples 2 m below the ice pack through 1.5-m diameter holes made by an ice-drill. Sub-samples of 50 ml were preserved by addition of filtered (0.2 µm), buffered formaldehyde (4% final concentration). Within 2 h after sampling, cells were filtered through a 25-mm

Nucleopore (0.2-µm pore size) black polycarbonate membrane (Costar, United Kingdom) and stored at –20 °C prior to processing in the laboratory in Italy. Seawater samples of 500 ml were collected for DNA isolation from each site. The samples were immediately fixed in formaldehyde (4% final concentration) and collected by filtration through 47-mm diameter, 0.2 µm pore-size Nucleopore filters and subsequently frozen at –20 °C until processing.

2.2. Fluorescence in situ hybridization

The fluorescence in situ hybridization (FISH) with oligonucleotide probes was performed according to Gloekner et al. [17] on filters that were counterstained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and enumerated by epifluorescence microscopy as previously described [18]. FISH was performed using the following CY-3-labeled oligonucleotide probes: Eub338 for eubacteria, Al968 for α -Proteobacteria, Bet42a for β -Proteobacteria, Gam42a for γ -Proteobacteria, CF319a for the CFB group and a negative control probe, nonEUB, for non-specific probe binding [19–23]. Cells were observed using an Axioplan epifluorescence microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with specific filter sets. To determine the fraction of actively respiring bacteria in the natural samples, 50 ml of unpreserved aliquots was incubated with 5 mM of the redox dye 5-cyano-2,3-toluy-tetrazolium chloride (CTC) (Polysciences, Inc., Warrington, PA) [24] at –1.8 °C for 5 h in the dark. The samples were then preserved with filtered formaldehyde (4% final concentration) and stored at –20 °C until laboratory processing. After thawing the samples to 4 °C, they were collected on 0.2-µm pore-size filters and stained for 1 h with DAPI (2 µg ml⁻¹). After incubation, samples were washed with 2-propanol to remove unspecifically bound DAPI stain. Dark conditions were maintained during all sample preparations involving CTC. Stained bacteria were first examined using the DAPI-specific filter set followed by switching to the CTC-specific set for cell counting. Minimum of 20 fields or 200 DAPI-stained cells were examined per sample. Measurements made on five replicate samples were statistically analyzed by means of analysis of variance (ANOVA) at $P \leq 0.01$ [25].

2.3. DNA extraction

Extraction of DNA from filters was performed using a modification of the procedure of Fuhrman et al. [26], previously applied for characterization of Antarctic sea-ice microbial communities [27]. Briefly, the protocol included a chemical lysis in a low salt buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl and 1 mM disodium EDTA, pH 8.0) by boiling of the filters in the presence of sodium dodecyl sulfate (1% w/v SDS final concentration) for 2

min. Proteinase K (10 mg ml⁻¹) was added and the suspension was incubated at 50 °C for 30 min, followed by an addition of cetyltrimethylammonium bromide (10% CTAB in NaCl 0.7 M) at 65 °C for 10 min. DNA was extracted with phenol/chloroform (1:1) and chloroform/isoamyl alcohol (24:1). Cell lysis efficiency of the DNA extraction procedure was checked by DAPI counting of the cells in aliquots of the Rod Bay oil enrichment culture taken after SDS treatment and it was confirmed that 95 ± 4% of the microorganisms were lysed. Finally, DNA was precipitated by addition of 0.7 volume of 100% isopropanol, washed with 70% ethanol and, after air-drying, resuspended in 100 µl of MilliQ deionized sterile water. The quality of the DNA samples was examined by agarose electrophoresis and concentrations were determined by spectrophotometry.

2.4. PCR amplification, cloning and screening of 16S rDNA clones

The universal eubacterial primer sets EUB008 and EUB1492 [28,29] were used to amplify 16S rRNA genes from total community DNA. The PCR was performed using a 50 µl (total volume) mixture containing 1× solution Q (Qiagen, Hilden, Germany), 1× Qiagen reaction buffer, 1 µM of each primer, 10 µM dNTPs (Gibco, Invitrogen Co., Carlsbad, CA), 2.0 µl (40–250 ng) of DNA template and 2.0 U of *Taq* Polymerase (Qiagen). The reaction started with a 3-min hot-start at 95 °C, continued with 30 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 50 °C and 2 min at 72 °C, and finished with a 10-min extension at 72 °C. PCR products were analyzed on agarose gels (0.8% w/v), purified with QIAquick PCR columns (Qiagen) and the 16S rRNA gene fragments were cloned into the pCR2.1 vector (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The resulting ligation products were used to transform *Escherichia coli* DH10B cells (Invitrogen). White colonies (150) from each clone library were randomly picked, and the cells were directly used in a PCR with standard M13f and M13r primers under the conditions described above. Amplified inserts of expected size (approx. 1600 bp) were identified by gel electrophoresis, and 10-µl aliquots of 100 randomly chosen positive amplicons were digested overnight with a combination of the two restriction endonucleases *HhaI* and *RsaI* (NEB, New England Biolabs, Beverly, MA). The RFLP patterns of the digests were then analyzed by gel electrophoresis in 2% w/v MetaPhor® agarose (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME).

Normalization of the clone library was made using the rarefaction method of Tipper [30], by the "Analytic Rarefaction 1.3" program, available at the Stratigraphy Laboratory web site of the University of Georgia (<http://www.uga.edu/strata/software>). From groups possessing the same RFLP pattern, 1–4 clones were selected at random for sequencing. Plasmid DNA from the clones

was isolated using a QIAprep 8 turbo Miniprep Kit (Qiagen). The plasmid templates were sequenced with an ABI 310 DNA Sequencer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) using the ABI Prism BigDye 2® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems).

2.5. Phylogenetic analyses

Sequence analyses were performed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [31] and SIMILARITY_MATRIX version 1.1, SEQUENCE_MATCH version 2.7 and SEQUENCE_ALIGN version 1.7 from RDP [32]. Sequence data were checked using the CHECK_CHIMERA programme to determine the presence of any hybrid sequences [32]. Nucleotide sequences were manually aligned to 16S rRNA sequence data from the RDP database considering their secondary structure using Se-AL sequence alignment editor version 1.0 alpha 1 [33]. Further phylogenetic analyses were restricted to nucleotide positions that were unambiguously alignable in all sequences. Multiple bootstrapped datasets of the alignment data were exported as PHYLIP 3.5 interleaved file type to run the SEQBOOT program. Least-squares distance matrix analyses, based on evolutionary distances, were estimated from similarity values using the maximum likelihood analysis with the multiple datasets option. Phylogenetic analyses using neighbor-joining NEIGHBOR and parsimony DNAPARS methods were performed. Random order input of sequences, single jumbling and the global rearrangement option were used to avoid potential bias introduced by the order of sequence addition. The resulting tree files were analyzed using the CONSENSE program to provide confidence estimates for phylogenetic tree topologies and to make a majority rule consensus tree. All mentioned phylogenetic programs used were from the Phylogenetic Inference Package (PHYLIP) (version 3.6 [34]).

2.6. Enrichment and isolation of cold-adapted hydrocarbonoclastic bacteria

Autoclaved crude oil (Arabian Light crude oil, 0.1% v/v) and ammonium phosphate (1.85 mM) were added to 500-ml samples of untreated seawater from Adelle Cove and Rod Bay sites (AC_OIL and RB_OIL). Both enrichment cultures were further incubated in the dark, at 4 °C. The succession of bacterial assemblages in RB_OIL and AC_OIL cultures was monitored by development of turbidity (600 nm) with a Biophotometer (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) and DAPI counting. Biodegradation of petroleum in the enrichment cultures was monitored by GC-MS. At the beginning of the experiments, 0.8 µg of the biomarker 17 α (H),21 β (H)-hopane (Chiron AS), a degradation resistant compound present in crude oil [35], was added.

At the end of each experiment enrichment, cultures were homogenized and 1 ml of the homogenate was taken for GC–MS analysis and quantified according to previously described protocols [36,37]. The percentage of biodegradation was calculated by dividing the concentration of individual resolved compounds relative to that of 17 α (H),21 β (H)-hopane at the end of the experiment by the concentrations relative to that of 17 α (H),21 β (H)-hopane at the start of the experiment. Measurements made on five replicate samples were statistically analyzed by means of analysis of variance (ANOVA) at a *P* level of 0.01 [25]. Those petroleum compounds that were resolvable by GC–MS analysis were organized by structural similarity in separate groups and their degradation values were calculated.

After incubation, the RB_OIL microcosm was decimally diluted from 1:10 to 1:10,000. After 30 days of incubation at 4 °C in the dark, the diluted cultures were analyzed for growth by epifluorescence microscopy, as described elsewhere [38]. Briefly, 1 ml of the culture was filtered and, after DAPI staining, analyzed for total bacterial counts against a reference sample containing the original inoculum fixed at the beginning of the incubation time (T_0). Extinction cultures were obtained as a 10^{-4} dilution of the original enrichment culture and aliquots (100 μ l) were directly spread onto duplicate agar plates containing ONR7a basal medium [39] amended with different hydrocarbons (crude oil, tetradecane or naphthalene, 0.1% w/v) as single carbon sources.

2.7. Physiological characterization of bacterial isolates

The isolates were tested for their ability to oxidize different carbon sources using BIOLOG microplates according to the manufacturer's instructions (Biolog, Inc., Hayward, CA) [40,41]. Several other substrates: *n*-tetradecane, pyruvate, glycerol, glucose, Tween 80, gasoline and crude oil were tested for support of growth. The temperature range for growth was determined in liquid ONR7a amended with acetate (1% w/v) at temperatures of 4, 15, 20, 25 and 30 °C. To determine the salinity range of growth, the ONR7a medium supplemented with acetate was prepared with varying concentrations of NaCl (between 0.05 and 2.0 M). To evaluate the fatty acid composition, mid-log cultures grown on acetate were centrifuged and the cell pellets were freeze-dried. Fatty acids were extracted by a modified Bligh-Dyer procedure and their corresponding methyl esters were generated and analyzed by gas chromatography, as described previously [42].

2.8. Nucleotide sequence accession numbers

The sequences determined in this study have been submitted to the EMBL nucleotide sequence database and assigned Accession Nos. AJ561123–AJ561194.

3. Results

3.1. Direct bacterial counts and FISH of natural seawater samples

We sampled seawater beneath the ice at Rod Bay and Adelie Cove, in order to compare the community compositions of bacterial assemblages as revealed by FISH and 16S rRNA gene clone libraries. No significant differences were detected between the total number of DAPI-stained bacteria determined from slides prepared after CTC treatment and those prepared from fixed and FISH-stained samples ($P = 0.01$). Total bacterial counts observed in Rod Bay seawater ($36 \pm 4 \times 10^4$ ml $^{-1}$) were significantly higher ($P = 0.01$) than in seawater samples from Adelie Cove ($5.8 \pm 0.8 \times 10^4$ ml $^{-1}$). The abundance of CTC-stained cells was more similar in both sample types and ranged from $8.1 \pm 1.6 \times 10^3$ to $6.6 \pm 0.7 \times 10^3$ bacteria ml $^{-1}$ ($P = 0.01$), with higher numbers observed in the ANT-AC seawater sample. This finding indicated that the proportion of active bacteria detected at this site was almost 10 times higher than that at the ANT-RB site. The percentage of DAPI-stained cells detected with the eubacterial probe Eub338 was also much higher at the ANT-AC site ($87 \pm 11\%$) than at the ANT-RB sampling site ($18 \pm 3\%$). The microbial community structures observed at both sites, as indicated by FISH, were similar and characterized by a strong abundance of γ -Proteobacteria (76 \pm 9% and 71 \pm 7% of the FISH Eub338-stained bacteria in ANT-AC and ANT-RB communities, respectively) (Fig. 1(a)). The prevalence and relative abundance of α - and β -Proteobacteria depended on the site of sampling, while the bacteria rep-

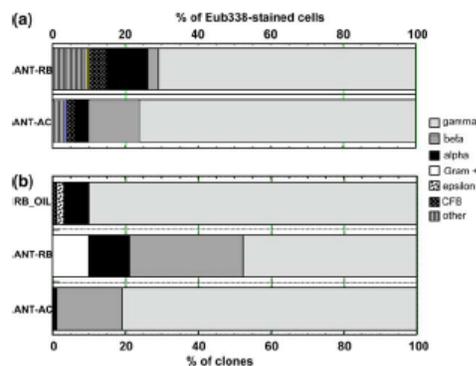


Fig. 1. Percentage of the major phylogenetic groups of bacteria detected by FISH with group-specific bacterial probes (a) and by 16S rRNA gene RFLP analysis and sequencing (b) of clone libraries from natural seawater samples of Adelie Cove (ANT-AC), Rod Bay (ANT-RB) and crude oil Rod Bay enrichment (RB_OIL). The bars entitled "other" indicate cells detected with probe Eub338 but not with any group-specific probe (other *Eubacteria*).

representative of the *CFB* group were a small fraction of the communities comprising at most 5% of all the bacteria detected by the eubacterial probe. Between 4% and 10% of the cells detected with Eub338 were not detected by any of the group-specific probes used.

3.2. Oil degradation by petroleum-enriched microbial community

An increase of bacterial growth was detected in the ANT-RB enrichment culture after only 7 days of enrichment (data not shown) and growth continued for 28 days. After 30 days when a slight decline in turbidity was observed, degradation of the crude oil components were examined. The cell number at that point was approximately 3×10^7 cells ml⁻¹. Significantly greater biodegradation of normal *n*C₁₃-to-*n*C₃₅ and alkylcyclo-alkanes (49.1 ± 3.7 and $27.3 \pm 4.6\%$, respectively) was obtained in comparison with branched alkanes ($7.4 \pm 1.3\%$). The degradation of *n*-alkanes decreased proportionally with an increase in their chain length and ranged from $62.2 \pm 4.6\%$ for *n*-tridecane to $28.3 \pm 1.3\%$ for *n*-pentaatriacontane. The fraction of polyaromatic hydrocarbons (PAH), remaining in the RB_OIL enrichment culture, was $94.4 \pm 5.2\%$ of the initial amount after one month.

The AC_OIL enrichment culture was omitted from further characterization, because no significant ($P = 0.01$) increase in turbidity, DAPI counts nor petroleum degradation were observed.

3.3. Screening of the clone libraries

From the total of 300 clones analyzed by RFLP profiling, 46 OTUs were defined with 8, 18 and 18 OTUs detected in the ANT-AC, ANT-RB and RB_OIL 16S rRNA gene libraries, respectively. Eighty clones representing all RFLP patterns were further sequenced and analyzed. From this, the same number of phylotypes were confirmed and discerned with each phylotype consisting of either a unique clone or a group of clones that have sequence similarities of 0.98 or greater (bootstrap value, >75%). Two phylotypes, namely groups of *Marinobacter* and *Pseudoalteromonas*, were found in all three libraries, whereas the representatives of five other phylotypes were observed at least in two libraries. Since many of the clusters do not contain cultivated prokaryotes, they were designated arbitrarily with the names of corresponding 16S rRNA gene clones derived from earlier studies (Table 1). Distribution of the major phylotypes within ANT-AC, ANT-RB and RB_OIL samples is shown in Fig. 1(b). The ANT-AC clones had representatives from only three bacterial phylotypes, α - (1%), β - (18%) and γ -Proteobacteria (81%). The bulk of the clones in the ANT-RB clone library were γ - and β -Proteobacteria (48% and 31%, re-

spectively). Clones from γ -Proteobacteria were also dominant in the RB_OIL clone library (90%). Clones related to the *CFB* division and ϵ -Proteobacteria were recovered only from this library.

The bacterial compositions of ANT-AC and ANT-RB samples determined by FISH and 16S rRNA gene clone libraries were compared as described previously [43]. Data points for ANT-AC indicated that phylogenetic groups represented in the clone library were correlated to their relative abundance determined by FISH. In contrast, the ANT-RB bacterial composition showed disproportionate data for β - and γ -Proteobacteria, which were correspondingly over- and under-represented in the clone library compared to their relative percentage determined by FISH. Bacteria of the *CFB* group were absent in both clone libraries, whereas their presence was detected in the FISH assay by the probe CF319a for *CFB* (2 and 5% of Eub338-stained cells in ANT-AC and ANT-RB samples, respectively).

As mentioned above, γ -Proteobacteria were the most commonly sampled group, representing 81%, 48% and 90% of clones within the ANT-AC, ANT-RB and RB_OIL libraries, respectively, and comprising 15 major phylotype groups (Table 1). Several of these groups corresponded to chemoheterotrophic species and genera inhabiting cold marine ecosystems, including members of *Colwellia*, *Halomonas*, *Marinobacter*, *Methylophaga*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella* and *Pseudomonas*. Three γ -Proteobacterial phylotypes detected only in the ANT-AC library, however, grouped into four clusters distinct from cultured species (Fig. 2(a)). These groups included only clones detected previously in permanently cold marine sediments and Arctic pack ice samples. The largest cluster (49 clones), designed here as ARKDMS-3 group (name of representative riboclone AF468260), formed a distinct lineage related to predominantly methylotrophic *Methylophaga* and included bacteria detected in dimethyl-sulfide enrichments of Arctic sea ice. Two related phylotypes were placed in the cluster ARKDMS-49/ZD0117 (designated with the names of corresponding riboclones derived from earlier studies). This cluster branched deeply within the γ subclass and included clones found in the Arctic methylotrophic communities after algal blooming [44]. A single phylotype group of the ANT-AC library (18% of all clones) was placed in the β -Proteobacteria and was closely related to the methylotrophic species *Methylophilus methylotrophus*.

More than 30% of ANT-RB clones organized in four phylotypes were apparently affiliated with β -Proteobacteria (Fig. 2(b)). As is typical for marine bacterioplankton libraries, the percentage of clones belonging to this subclass is very low and usually does not exceed 10% [43,45]. The dominant ANT-RB phylotype (25% of all ANT-RB clones) was not affiliated with any cultivable species and was closely related to riboclone

Table 1
16S rDNA phylotype distribution through the ANT-AC, ANT-RB and RB_OIL 16S rRNA gene clone libraries and isolated strains

Phylotyping or taxonomic group ^a	No. of phylotypes (no. of clones) in the following libraries			No. of cultured phylotypes (no. of isolates)
	ANT-AC	ANT-RB	RB_OIL	
<i>α-Proteobacteria</i>				
<i>Erythrobacter</i> group			1 (01)	
<i>Methylobacterium</i> group		1 (01)		
<i>Octadecabacter/Sulfobacter</i> cluster	1 (01)		1 (01)	
<i>Phyllobacterium</i> group		1 (03)		
<i>Sphingomonas</i> group		1 (02)	1 (03)	1 (02)
QSSC9/CTD56B cluster			1 (02)	1 (01)
SJA-9/WD206 cluster		1 (05)		
<i>β-Proteobacteria</i>				
<i>Burkholderia</i> cluster		3 (06)		
<i>Methylophilus</i> /CR99-2-44 cluster	1 (18)			
RPD01a011B group		1 (25)		
<i>γ-Proteobacteria</i>				
<i>Cohellia</i> group			2 (16)	
[<i>Gelidicola</i>] group			1 (21)	2 (07)
<i>Halomonas</i> group		1 (02)	1 (01)	2 (04)
<i>Marinobacter</i> group	1 (01)	1 (03)	1 (05)	1 (05)
<i>Marinomonas</i> group			1 (01)	
<i>Oleispira</i> group			1 (39)	1 (11)
<i>Pseudoalteromonas</i> group	1 (04)	1 (02)	2 (03)	2 (09)
<i>Pseudomonas</i> group		2 (25)	1 (01)	
<i>Shewanella</i> group		1 (15)	1 (02)	1 (04)
<i>Stenotrophomonas</i> group		1 (01)		
Arctic95D-6/OM241 cluster			1 (01)	
ARKDMS-3 cluster	1 (49)			
ARKDMS-49/ZD0117 cluster	2 (26)			
BD1-7/BB2_169 cluster	1 (01)			
Gas-vacuolated bacteria 214.6 group				1 (01)
<i>ε-Proteobacteria</i>				
<i>Arcobacter</i> cluster			1 (02)	
<i>CFB</i>				
<i>Cytophagales</i> cluster			1 (01)	1 (03)
Gram positive				
<i>Bacillus macroides</i>		1 (01)		
<i>Georgenia</i> cluster		1 (05)		
<i>Microbacterium</i> cluster		1 (04)		
<i>Rhodococcus</i> group				1 (04)
TOTAL	8 (100)	18 (100)	18 (100)	14 (51)

^a Phylotype groups correspond to clusters of similar 16S rRNA genes shown in phylogenetic trees in Figs. 2(a)–(c) and Fig. 3.

PRD01a011B recovered from Parker River and characterized as a typical planktonic freshwater bacterium (93.9% identity) [46]. The remaining *β-Proteobacteria* clones revealed the highest similarity values to different hydrocarbon-degrading soil *Burkholderia* spp. The Gram-positive organisms, atypical for marine bacterio-plankton communities, were present in the ANT-RB library by three groups, covering 10% of all clones.

The addition of crude oil to the Rod Bay seawater sample induced a dramatic change in the microbial community composition (Fig. 2(c)). Most of the RB_OIL bacterial clones fell into four phylotype groups, the most significant of which were allied with the genera *Cohellia* and *Oleispira* (16% and 39% of

total clones) (Table 1). One RB_OIL phylotype (21% of clones) branched deeply within the *γ* subclass and clustered with *Acinetobacter calcoaceticus*.

3.4. Diversity and ecophysiology of isolated strains

Fifty one bacterial isolates were obtained from the RB_OIL enrichment culture: 26 on ONR7a medium amended with crude oil, 21 amended with *n*-tetradecane and four amended with naphthalene. RFLP screening of PCR amplicons was applied to assess the purity of the cultures and to select representative isolates for sequencing. For each of 21 clusters obtained, at least one representative isolate was sequenced. As shown in

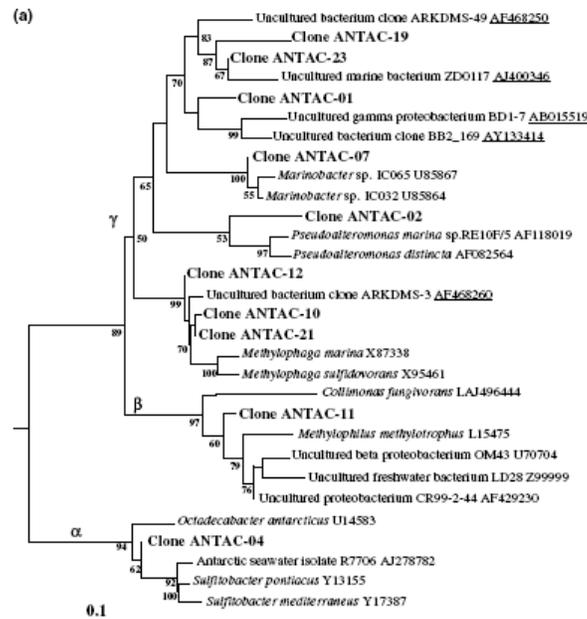


Fig. 2. Rooted phylogenetic trees clustered by Neighbor-joining of maximum likelihood values showing affiliation of partial bacterial 16S rRNA gene sequences to closest-related sequences from either cultivated or cloned members of different bacterial clusters. Both clones and isolates obtained in this work are indicated in bold-type. Species and ribodones with accession numbers underlined have been isolated from cold environments (polar areas, deep sea). Percentages of 1000 bootstrap resampling that supported the branching orders in each analysis are shown above or near the relevant nodes (only values $\geq 50\%$ are shown). All trees were rooted and outgrouped with 16S rRNA gene sequences of *Methanococcus jannaschii* (M59126) and *Thermus thermophilus* (L09659), respectively. Phylogenetic trees depicted: (a) ANT-AC clones; (b) ANT-RB clones and (c) RB_OIL clones and isolates obtained. The scale bar indicates 10% estimated sequence divergence.

Fig. 2(c), the majority of numerically important heterotrophic bacteria found in the RB_OIL 16S rRNA gene clone library was successfully obtained in culture. The 16S rRNA gene sequences of some isolates were identical to the clone sequences obtained from the ANT-RB clone library but not from the RB_OIL clone library (Fig. 3). The 16S rRNA gene sequence affiliation of individual isolates to their closest phylogenetic neighbors and some ecophysiological characteristics are shown in Table 2. All the isolates analyzed were catalase-positive, with oxidative metabolism and able to grow in *n*-tetradecane and Tween 80 at 4 °C. Among these, only eight isolates were psychrophilic with an optimum growth temperature ≤ 15 °C. Two psychrotrophic strains belonging to the *Rhodococcus* and *Sphingomonas* genera were able to grow on naphthalene and biphenyl as single carbon sources. During cultivation on *n*-alkanes, the isolate, *Rhodococcus* sp. GA-05, produced biosurfactants comprised of a mixture of trehalose lipids identical to that of previously characterized Antarctic isolate *Rhodococcus* sp. B15 [12]. Six isolates produced the polyunsaturated fatty acids (PUFAs) at low tem-

peratures. Among them, five isolates, belonging to distinct deep branching lineages within γ -Proteobacteria, were characterized by specificity to grow on a narrow spectrum of organic compounds, more or less restricted to aliphatic compounds and their oxidized derivatives. Such a peculiar substrate profile is typical of marine hydrocarbonoclastic bacteria belonging to genera *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Oleiphilus* and *Thalassolituus* [8,39,42,47,48].

4. Discussion

Little is known of bacterial communities in polar ecosystems with regard to their species composition, significance in various biogeochemical processes and mechanisms and degrees of cold adaptation. Rapidly increasing human activities in both Antarctic and Arctic environments may be detrimental to these extreme and fragile ecosystems. Sewage and petroleum pollution associated with activities at the numerous research stations are impacts leading towards potential ecological risks.

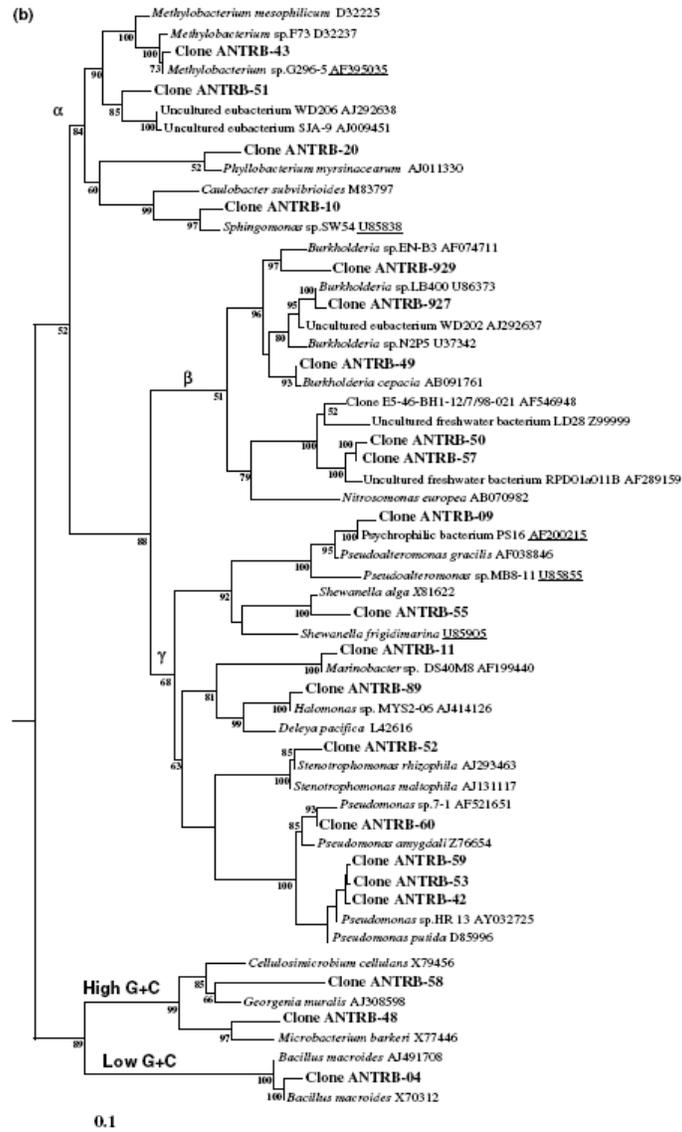


Fig. 2. (continued)

Petroleum spills have been reported from several Antarctic Peninsula stations, in the Windmill Islands and at the South Pole [49]. There have also been major oil spills such as the *Bahia Pariso* that released over 500 tons of petroleum products [50].

This study focused on cold-adapted marine hydrocarbonoclastic bacteria (MHCb) inhabiting Antarctic coastal areas, with the emphasis on the analysis of areas directly affected by human activities. The baseline cultivation-dependent and independent survey in-

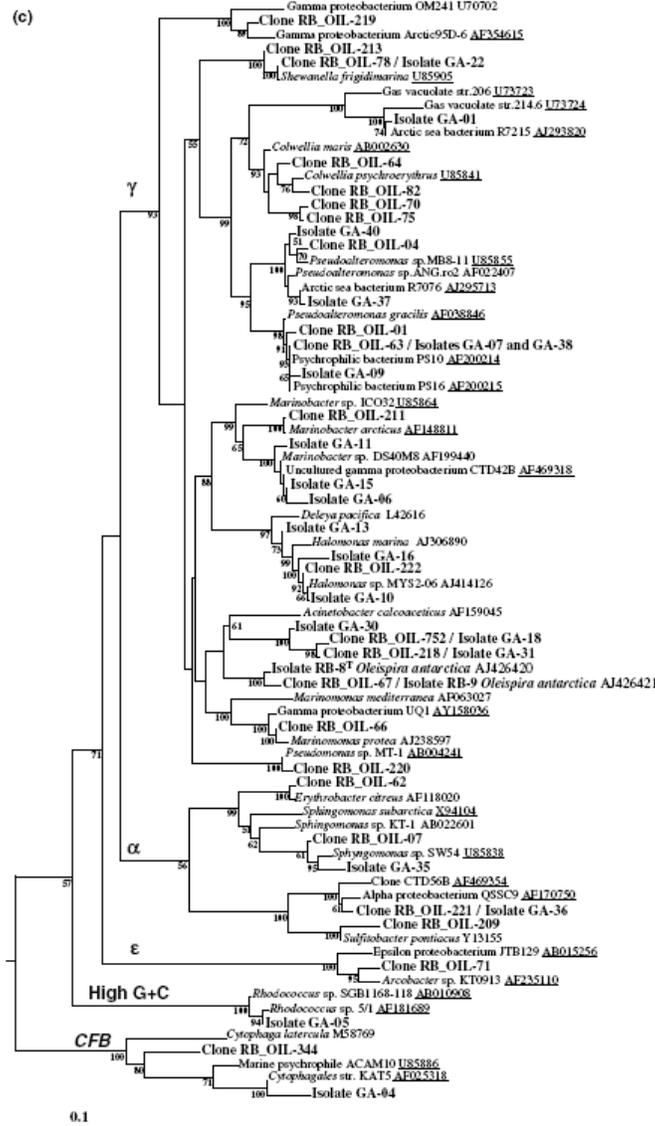


Fig. 2. (continued)

formation was obtained from representative sites that were sampled, namely the Rod Bay and Adelie Cove areas, located close to and distant from the Italian Terra Nova Bay Station, respectively. A first overview of the natural bacterial community composition was

obtained in order to evaluate the distribution of the cold-adapted MHCb in the sampled areas. Consequently, selective enrichments and isolations were done to obtain these bacteria in pure culture for further characterization.

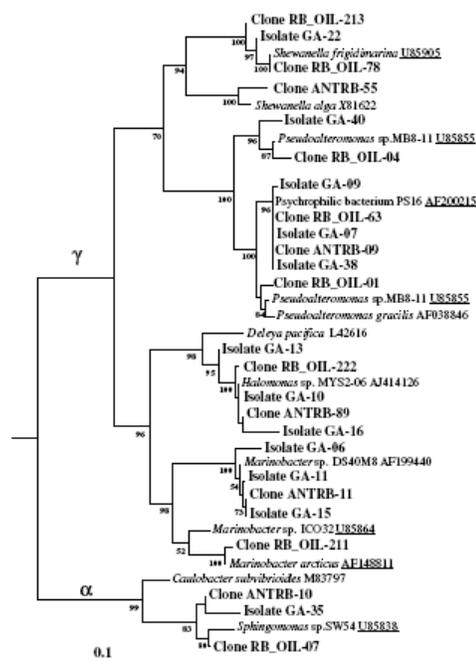


Fig. 3. Phylogenetic relationship among 16S rRNA gene sequences of 12 isolates similar to ANT-RB and RB_OIL clones. Tree was constructed as described in Fig. 2.

As the clone libraries were assembled from only two samples, it is difficult to say how representative they are of the studied areas. However, in spite of the observational character of the data, significant differences in microbial communities between the two stations were detected. The dominance in the ANT-AC library of bacterial groups belonging to the γ -subdivision of the *Proteobacteria* (81% of clones) is typical for Antarctic sea ice microbial communities, where up to 92% of all populations were represented by this division [51]. Interestingly, more than 90% of ANT-AC clones were affiliated with different methylotrophic bacterial taxa. The phenomenon of temporal abundance of methylotrophic microflora is very common for the Southern Ocean and is determined by the decay of sea-ice that releases into the water column the particulate and dissolved organic matter derived from the diatoms blooming in the ice bottom [52].

The phylogenetic analysis of the bacterial community composition in the Rod Bay seawater revealed significant variation in comparison with that of the Adelie Cove and other "typical" Antarctic seawater commu-

nities. It is likely that the observed differences in these sites is in part due to human activities in the Rod Bay. The Italian research station at Terra Nova Bay, in contrast to many Antarctic coastal stations releasing untreated sewage, disposed partially purified sewage into the near-shore environment. As a consequence, the enteric and clostridia-related bacteria, usually detected at high densities next to the coastal stations releasing untreated wastewater [53,54], were not observed in the ANT-RB sample collected 200 m away from the outfall. Nevertheless, the anthropogenic impact on the Rod Bay coastal ecosystem was evident. More than 30% of ANT-RB clones were apparently affiliated with β -*Proteobacteria*, a division predominantly represented in freshwater and soil microbial communities. Among them, 10% of clones were closely related to different hydrocarbon-degrading *Burkholderia* spp. isolated from contaminated soils [55]. A high percentage of riboclones were affiliated with *Actinomycetales* and *Firmicutes* lineages, commonly found in soil and raw domestic sewage. The subdivision of γ -*Proteobacteria* was only partially represented by riboclones grouping with typical marine bacteria, with an abundance of sequences similar to that of fresh water pseudomonads and rhizosphere-associated *Stenotrophomonas* spp.

Our study found a close correlation between the ANT-AC clone library composition and the in situ microbial community composition as determined by FISH. In contrast, the clone library of the Rod Bay sample overestimated the relative abundance of β -*Proteobacteria* and underestimated the γ -*Proteobacteria* group. The *CFB* cluster determined by FISH in both natural bacterioplankton populations resisted amplification with the general eubacterial 16S rRNA-derived primers. The great underestimation of the *CFB* group in clone libraries compared with FISH data was described previously for marine bacterioplankton communities [43]. The mismatches for universal primers in the binding sites of still unknown bacteria belonging to the *CFB* cluster was proposed as a possible explanation of the difference between the FISH and clone library results [43].

Total bacterial counts (DAPI staining) of the Adelie Cove microbial community were found to be lower by as much as one order of magnitude than that of Rod Bay, whereas the number of bacterial cells containing rRNA (FISH counts) and possessing active oxidative metabolism (CTC counts) were quite similar in both native samples. Taking these findings into account, the bulk of the clones recovered in the ANT-RB library likely came from dormant or dead, DNA-containing bacteria of allochthonous origin. In fact, compared to systems from more temperate climates, the low temperature (ca. -1.8 °C) is found to reduce rates of bacteriivory and resulted in prolonged survival of enteric bacteria in Antarctic seawater [56].

Table 2
Phylogenetic relationships and ecophysiological characterization of RB_OIL isolates

Isolate	GenBank No.	Closest cultured neighbor ^a , GenBank No.	Sequence identity (%)	NaCl requirement ^b	Isolation substrate ^c	Psychrophily ^d	PUFA ^e	OHCM ^f
<i>Actinomycetales</i>								
GA-05	AJ561177	<i>Rhodococcus fascians</i> , X79186	99.5	-	NAPH	-	-	-
<i>CFB phylum</i>								
GA-04	AJ561176	<i>Cytophaga</i> sp. MBIC04666, AB073583	95.5	-	TET	-	-	-
<i>α-Proteobacteria</i>								
GA-35	AJ561190	<i>Sphingomonas</i> sp. SW54, U84838	95.6	+	NAPH	-	-	-
GA-36	AJ561191	<i>Ketogulonigenium vulgare</i> , AF136849	94.8	-	OIL	+	-	-
<i>γ-Proteobacteria</i>								
GA-01	AJ561175	<i>Glaciecola pallidula</i> , U85854	92.3	+	TET	+	-	-
GA-06	AJ561178	<i>Marinobacter</i> sp. DS40M8, AF199440	97.7	+	NAPH	-	-	-
GA-07	AJ561179	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 22b, AF443784	99.0	+	TET	+	-	-
GA-09	AJ561180	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 22b, AF443784	98.4	+	OIL	+	-	-
GA-10	AJ561181	<i>Halomonas</i> sp. MYS2-06, AJ414126	100.0	-	OIL	-	-	+
GA-11	AJ561182	<i>Marinobacter</i> sp. NCE312, AF295032	98.9	+	OIL	-	-	-
GA-13	AJ561183	<i>Halomonas</i> sp. MYS2-06, AJ414126	100.0	-	OIL	-	-	-
GA-15	AJ561184	<i>Marinobacter</i> sp. NCE312, AF295032	98.9	+	OIL	-	-	-
GA-16	AJ561185	<i>Halomonas</i> sp. MYS2-06, AJ414126	99.5	-	TET	-	-	-
GA-18	AJ561186	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> AF458218	91.0	+	TET	-	+	+
GA-22	AJ561187	<i>Shewanella livingstonensis</i> , AJ300834	99.8	-	TET	+	+	-
GA-30	AJ561188	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , AJ009589	89.6	+	OIL	-	+	+
GA-31	AJ561189	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , AJ009589	89.8	+	OIL	-	+	+
GA-37	AJ561192	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. TG15, AJ318942	99.5	+	OIL	-	-	-
GA-38	AJ561193	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 22b, AF443784	98.9	+	OIL	+	-	-
GA-40	AJ561194	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 22b, AF443784	98.6	+	OIL	-	-	-
RB-8 [†]	AJ426420	<i>Oleispira antarctica</i> AJ426420 [‡]	100.0	+	TET	+	+	+
RB-9	AJ426421	<i>Oleispira antarctica</i> AJ426421 [‡]	100.0	+	TET	+	+	+

^a The most closely related described cultured species with affiliation to at least genus level given.

^b Growth is not observed in the absence of NaCl and occurred at sodium ions concentrations above 20 mM.

^c Minimal ONR 7a supplemented either with crude oil (OIL), tetradecane (TET), or naphthalene (NAPH) as carbon sources.

^d Optimal growth temperature is ≤ 15 °C.

^e Production of eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) was tested at 4 °C of cultivation.

^f Obligate hydrocarbonoclastic metabolism (OHCM) means capacity of microbial isolates to uptake a narrow spectrum of organic compounds restricted to hydrocarbons and their oxidized derivatives.

[‡] Sequence data from [15].

The addition of crude oil and ammonium phosphate to the natural seawater sample of Rod Bay induced a resource-dependent shift in community structure. We failed to get a similar response with the sample from pristine Adelie Cove. This could be due to a low number of hydrocarbon-degrading bacteria in this environment. The predominance of the γ -subdivision of the *Proteobacteria* (90% of clones) determined among ANT-AC clones was again confirmed in the RB_OIL clone library. It is noteworthy that more than 70% of the bacterial phylotypes were not previously observed in the Rod Bay natural microbial community. Obviously, these clones were overlooked in the ANT-RB clone library as they were less numerous and thus competitively disadvantaged by PCR. The application of the MPN technique [38] permitted all numerically important bacteria found in the RB_OIL clone library to be cultured. More than 20 aerobic strains were isolated in media designed for marine hydrocarbonoclastic bacteria (MHCB). All of them could grow on crude oil and pure hydrocarbons at 4 °C, but only a few of the isolates were psychrophiles. The cold-adapted isolates described here are the first recorded for an Antarctic marine ecosystem.

The results obtained showed that cold-adapted MHCB were observed as the dominant population in the RB_OIL enrichment culture. This finding concurred with previous observations that population sizes of marine hydrocarbon-degrading bacteria are usually low in unpolluted marine waters, but increase significantly in response to oil pollution and fertilization [2,57,58].

In conclusion, the present study provided an initial insight into the distribution and ecophysiology of cold-adapted MHCB inhabiting the coastal zone of the Ross Sea. Physiologically active hydrocarbonoclastic microorganisms seem to be present in the microbial community of the Rod Bay area in very low numbers but appear to be the predominant community fraction after petroleum loading. Many cold-adapted isolates that were obtained are of potential interest for bioremediation and biotechnological applications [59,60].

Acknowledgements

This work was supported by grants from PNRA (Programma Nazionale di Ricerche in Antartide), Italian Ministry for Education, University and Research (PEA 1999-2000, Research Project 1.4 and CLUSTER 10, Project "SAM"), and EC Projects COMMODE (EVK3-CT2002-00077) and INTAS (INTAS 01-2060). We are indebted to Wolf-Rainer Abraham, Peter Wolff and Renè Huppman (Chemical Microbiology Research Group, GBF, Braunschweig, Germany) for assistance in fatty acid analysis. We acknowledge administrative and technical support provided by numerous employees on

Italian Station at Terra Nova Bay. We thank A. Dalby and J. Jansson for critically reading the manuscript.

References

- [1] Abbott, S.B. and Benninghoff, W.S. (1990) Orientation of environmental change studies to the conservation of Antarctic Ecosystems. In: *Antarctic Ecosystems. Ecological Change and Conservation*, pp. 394–414. Springer, Berlin.
- [2] Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y. and Shutsubo, K. (1999) Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1, 63–70.
- [3] Golyshin, P.N., Timmis, K.N. and Yakimov, M.M. (2001) Oil eating bacteria. *Bioworld* 1, 4–7.
- [4] Bej, A.K., Saul, D. and Aislabie, J. (2000) Cold-tolerant alkane-degrading *Rhodococcus* species from Antarctica. *Polar Biol.* 23, 100–105.
- [5] Panicker, G., Aislabie, J., Saul, D. and Bej, A.K. (2002) Cold tolerance of *Pseudomonas* sp. 30-3 isolated from oil-contaminated soil, Antarctica. *Polar Biol.* 25, 5–11.
- [6] Aislabie, J., Foght, J. and Saul, D. (2000) Aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from soil near Scott Base, Antarctica. *Polar Biol.* 23, 183–188.
- [7] Bowman, J.P., McCammon, S.A., Brown, J.L., Nichols, P.D. and McMeekin, T.A. (1997) *Psychroserpens burtonensis* gen. nov. sp. nov., psychrophilic bacteria isolated from Antarctic lacustrine and sea ice habitats. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 670–677.
- [8] Yakimov, M.M., Giuliano, L., Gentile, G., Crisafi, E., Chernikova, T.N., Abraham, W.R., Lünsdorf, H., Timmis, K.N. and Golyshin, P.N. (2003) *Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov., a new hydrocarbonoclastic marine bacterium, isolated from an Antarctic coastal seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 779–785.
- [9] Aguilar, A. (1996) Extremophilic research in European Union: from fundamental aspects to industrial expectations. *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 89–92.
- [10] Bowman, J.P., McCammon, S.A., Brown, J.L., Nichols, D.S., Skerratt, J.H., Rea, S.M., Nichols, P.D. and McMeekin, T.A. (1997) *Shewanella gelidimarina* sp. nov. and *Shewanella frigidimarina* sp. nov., novel Antarctic species with the ability to produce eicosapentaenoic acid (20:5 ω 3) and grow anaerobically by dissimilatory Fe(III) reduction. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 1040–1047.
- [11] Watanabe, K., Yazawa, K., Kond, K. and Kawaguchi, A. (1997) Fatty acid synthesis of an eicosapentaenoic acid-producing bacterium: de novo synthesis, chain elongation, and desaturation systems. *J. Biochem.* 122, 467–473.
- [12] Yakimov, M.M., Giuliano, L., Bruni, V., Scarfi, S. and Golyshin, P.N. (1999) Characterization of Antarctic hydrocarbon-degrading bacteria capable of producing bioemulsifiers. *New Microbiol.* 22, 249–256.
- [13] Hochachka, P.W. and Somero, G.N. (1984) Temperature adaptation. In: *Biochemical Adaptation* (Hochachka, P.W. and Somero, G.N., Eds.), pp. 355–449. Princeton University Press, Princeton.
- [14] Feller, G., Narinx, E., Arpigny, J.L., Aittaleb, M., Baise, E., Genicot, S. and Gerday, C. (1996) Enzymes from psychrophilic organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 189–202.
- [15] DeLong, E.P. and Yayanos, A.A. (1985) Adaptation of the membrane lipids of a deep-sea bacterium to changes in hydrostatic pressure. *Science* 228, 1101–1103.
- [16] Allen, E.E., Facciotti, D. and Bartlett, D.H. (1999) Monounsaturated but not polyunsaturated fatty acids are required for growth of the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* SS9 at high pressure and low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1710–1720.

- [17] Glockner, F.O., Amann, R., Alfreider, A., Pernthaler, J., Psenner, R., Trebesius, K. and Schleifer, K.-H. (1996) An in situ hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 19, 403–406.
- [18] Giuliano, L., Furci, P., De Domenico, M., Bruni, V., Salomone, L. and Alonzo, V. (1999) Variability of some microbial parameters in relation to the hydrological features of the water column in the Eolian basin (Southern Tyrrhenian Sea). *New Microbiol.* 22, 139–150.
- [19] Amann, R.L., Krumholz, L. and Stahl, D.A. (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172, 762–770.
- [20] Glockner, F.O., Fuchs, B.M. and Amann, R. (1999) Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescent in situ hybridization. *Appl. W., Environ. Microbiol.* 65, 3721–3726.
- [21] Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. and Schleifer, K.-H. (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclass of proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 14, 1715–1723.
- [22] Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyet, M. and Schleifer, K.-H. (1996) Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacterioides in the natural environment. *Microbiology* 142, 1097–1106.
- [23] Wallner, G., Amann, R. and Beisker, W. (1993) Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA targeted oligonucleotide probes for low cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14, 136–143.
- [24] Rodriguez, G.G., Phipps, D., Ishiguro, K. and Ridgway, H.F. (1992) Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2332–2337.
- [25] Lison, L. (1961) *Statistica applicata alla biologia sperimentale*. In Casa Editrice Ambrosiana Milano (Gauthier-Villars, Ed.), pp. 1–380.
- [26] Fuhrman, J., Comeau, D.E., Hagstrom, A. and Chan, A.M. (1988) Extraction of natural planktonic microorganisms of DNA suitable for molecular biological studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1426–1429.
- [27] Brown, M.V. and Bowman, J.P. (2001) A molecular phylogenetic survey of sea-ice microbial communities (SIMCO). *FEMS Microb. Ecol.* 35, 267–275.
- [28] Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (Stackerbrandt, E. and Goodfellow, M., Eds.), pp. 115–175. Wiley, New York, NY.
- [29] Ravenshlag, K., Sahn, K., Pernthaler, J. and Amann, R. (1999) High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3982–3989.
- [30] Tipper, J.C. (1979) Rarefaction and rarefaction – the use and abuse of a method in paleontology. *Paleobiology* 5, 423–434.
- [31] Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- [32] Maidak, B.L., Olsen, G.J., Larsen, N., Overbeek, R., McCaughey, M.J. and Woese, C.R. (1997) The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 25, 109–111.
- [33] Rambaut, A. (1996) *Se-Al (Sequence Alignment Editor) version 1.0 alpha 1*. Distributed by the author and available via www site <http://evolve.zoo.ox.ac.uk/Se-Al/Se-Al.html>. Department of Zoology, University of Oxford, UK.
- [34] Felsenstein, J. (2001) *PHYLIP Phylogenetic Inference Package, version 3.6*. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA.
- [35] Prince, R.C., Elmendorf, J.R., Lute, J.R., Hsu, C.S., Haith, C.E., Senius, J.D., Dechert, G.J., Douglas, G.S. and Butler, E.L. (1994) 17 α (H)-21 β (H)-hopane as a conserved internal marker for estimating the biodegradation of crude oil. *Environ. Sci. Technol.* 28, 142–145.
- [36] Dutta, T.K. and Harayama, S. (2001) Analysis of long-side-chain alkylaromatics in crude oil for evaluation of their fate in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 35, 102–107.
- [37] Wang, Z., Li, K., Fingas, M., Sigouin and Menard, L. (2002) Characterization and source identification of hydrocarbons in water samples using multiple analytical techniques. *J. Chromatogr.* 971, 173–184.
- [38] Bianchi, A. and Giuliano, L. (1996) Enumeration of viable bacteria in the marine pelagic environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 174–177.
- [39] Dyksterhouse, S.E., Gray, J.P., Herwig, R.P., Lara, J.C. and Staley, J.T. (1995) *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 116–123.
- [40] Lebaron, P., Ghiglione, J.F., Fajon, C., Batailler, N. and Normand, P. (1998) Phenotypic and genetic diversity within a colony morphotype. *FEMS Microbiol. Lett.* 160, 137–143.
- [41] Lee, C., Russel, I.N.J. and White, G.F. (1995) Rapid screening for bacterial phenotypes capable of biodegrading anionic surfactants: development and validation of a microtitre plate method. *Microbiology* 141, 2801–2810.
- [42] Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., Lang, S., Moore, E.R.B., Abraham, W.R., Lunsdorf, H. and Timmis, K.N. (1998) *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 339–348.
- [43] Cottrell, M.T. and Kirchman, D.L. (2000) Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5116–5122.
- [44] Zubkov, M.V., Fuchs, B.M., Archer, S.D., Kiene, R.P., Amann, R. and Burkil, P.H. (2002) A population of the alpha-proteobacteria dominates the bacterioplankton and dimethylsulphoniopropionate uptake after an algal bloom in the North Sea. *Deep-Sea Res II, Top. Stud. Oceanogr.* 49, 3017–3038.
- [45] Giovanonni, S. and Rappè, M. (2000) Evolution, diversity and molecular ecology of marine prokaryotes. In: *Microbial Ecology of the Oceans* (Kirchman, D.L., Ed.). Wiley-Liss, New York, NY.
- [46] Zwart, G.J.M., Crump, B.C., Agterveld, M., Hagen, F. and Han, S.K. (2002) Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat. Microb. Ecol.* 28, 141–155.
- [47] Golyshin, P.N., Chernikova, T.N., Abraham, W.R., Lunsdorf, H., Timmis, K.N. and Yakimov, M.M. (2002) *Oleiphilaceae* fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 901–911.
- [48] Yakimov, M.M., Giuliano, L., Denaro, R., Crisafi, E., Chernikova, T.N., Abraham, W.R., Lunsdorf, H., Timmis, K.N. and Golyshin, P.N. (2003) *Thalassolituus oleivorans* gen. nov. sp. nov., a marine bacterium confined to the utilization of hydrocarbons. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 141–148.
- [49] Powell, S.M., Bowman, J.P., Snape, I. and Stark, S. (2003) Microbial community variation in pristine and polluted nearshore Antarctic sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45, 135–145.
- [50] Kennicutt, M.C. (1990) Oil spillage in Antarctica. *Environ. Sci. Technol.* 24, 620–624.
- [51] Bowman, J.P., Rea, S.M., Brown, M.V., McCammon, S.A., Smith, M.C., McMeekin, T.A. (2000) Community structure and psychrophily in Antarctic microbial ecosystems. In: *Proceedings of the 8th international Symposium on Microbial ecology*, 9–14

- August 1998 (Bell, C.R., Brylinsky, M. and Johnson-Green, P., Eds.), pp. 287–292. Halifax, NS.
- [52] Brierley, A.S. and Thomas, D.N. (2002) Ecology of southern ocean pack ice. *Adv. Mar. Biol.* 43, 171–276.
- [53] McFeters, G.A., Barry, J.P. and Howington, J.P. (1993) Distribution of enteric bacteria in Antarctic seawater surrounding a sewage outfall. *Water Res.* 27, 645–650.
- [54] Edwards, D.D., McFeters, G.A. and Venkatesan, M.I. (1997) Distribution of *Clostridium perfringens* and fecal sterols in a benthic coastal marine environment influenced by the sewage outfall from McMurdo Station, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2596–2600.
- [55] Mueller, J.G., Devereux, R., Santavy, D.L., Lantz, S.E., Willis, S.G. and Pritchard, P.H. (1997) Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soils. *Antonie Van Leeuwenhoek* 71 (4), 329–343.
- [56] Smith, J.J., Howington, J.P. and McFeters, G.A. (1994) Survival, physiological response and recovery of enteric bacteria exposed to a polar marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2977–2984.
- [57] Kasai, Y., Kishira, H., Syutsubo, K. and Harayama, S. (2001) Molecular detection of marine bacterial populations on beaches contaminated by the Nakhodka tanker oil-spill accident. *Environ. Microbiol.* 3, 246–255.
- [58] Roling, W.F., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J. and Head, I.M. (2002) Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5537–5548.
- [59] Ferrer, M., Chernikova, T.N., Yakimov, M.M., Golyshin, P.N. and Timmis, K.N. (2003) Chaperonins are the cellular determinant of growth of *E. coli* at low temperatures. *Nat. Biotechnol.* 21, 1266–1267.
- [60] Gentile, G., Bonasera, V., Amico, C., Giuliano, L. and Yakimov, M.M. (2003) *Shewanella* sp. GA-22, a psychrophilic hydrocarbonoclastic Antarctic bacterium producing polyunsaturated fatty acids. *J. Appl. Microbiol.* 95, 1124–1133.

Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons

Michail M. Yakimov,¹ Renata Denaro,¹ Maria Genovese,¹ Simone Cappello,¹ Giuseppe D'Auria,¹ Tatyana N. Chernikova,² Kenneth N. Timmis,² Peter N. Golyshin^{2,3*} and Laura Giluliano¹

¹*Istituto per Ambiente Marino Costiero, IAMC-CNR, Sezione di Messina, Italy.*

²*Division of Microbiology, GBF-German Research Centre for Biotechnology and*

³*Institute of Microbiology, Biozentrum, Technical University of Braunschweig, 38106 Braunschweig, Germany.*

Summary

Hydrocarbon-contaminated superficial sediments collected from the Harbor of Milazzo (Tirrean Sea, northern Sicily), a zone strongly affected by anthropogenic activities, were examined for *in situ* biodegradative capacities. A culture-independent molecular phylogenetic approach was used to study the influence of hydrocarbon and nutrient addition on the activity and diversity of the indigenous microbiota during a microcosm evaluation. The autochthonous microbial community in non-polluted sediments was represented by eubacterial phylotypes grouped within *Proteobacteria*, *CFB* and *Firmicutes*. The archaeal domain was represented by members of Marine Group I of *Crenarchaeota*. The majority of recovered sequences was affiliated with heterotrophic genera *Clostridium* and *Vibrio*, typical members of eutrophic coastal environments. Amendments of hydrocarbons and mineral nutrients to microcosms dramatically changed the initial diversity of the microbial community. Only bacterial phylotypes affiliated with *Proteobacteria* and *CFB* division were detected. The decrease in diversity observed in several microcosms could be explained by the strong selection for microorganisms belonging to group of marine hydrocarbonoclastic γ -*Proteobacteria*, namely

Alcanivorax, *Cycloclasticus*, *Marinobacter*, *Marinobacterium/Neptunomonas* and *Thalassolituus*. This study demonstrated that nutrient amendment to hydrocarbon-contaminated superficial sediments enhanced the indigenous microbial biodegradation activity and that highly specialized marine hydrocarbonoclastic bacteria, representing a minor fraction in the natural microbial community, play an important role in the biodegradation of petroleum hydrocarbons accidentally entering the coastal environment.

Introduction

Hydrocarbon contamination of harbour sediments from marine oil transportation, pipe/tanker accidents, dumping of tanker ballast water, petroleum run-off from land, etc., is of great concern because of the toxicity of petroleum hydrocarbons. Many physical remediation strategies, such as sediment dredging and removal, are economically impractical and therefore inapplicable. Moreover, the usage of dredged material as reclaimed soil is very limited, especially in cases where the sediment contains a high concentration of toxic hydrocarbons (Myers and Bowman, 1999). Therefore, this suggests that bioremediation is the more pragmatic approach to the problem. This requires a better understanding of the activities of indigenous hydrocarbon degrading microorganisms to be used in biotreatments.

Bacteria are responsible for major environmental hydrocarbon degradation (Leahy and Colwell, 1990). Such processes occurring in marine ecosystems have been extensively studied (Atlas, 1981; Swannell *et al.*, 1996; Head and Swannell, 1999; Harayama *et al.*, 1999). Recently, a variety of marine hydrocarbon-degrading bacteria from several phyla (*Proteobacteria*, *CFB*, Gram-positive *Firmicutes*) have been isolated from sites all over the world (Gauthier *et al.*, 1992; Dyksterhouse *et al.*, 1995; Yakimov *et al.*, 1998, 2003, 2004; Hedlund *et al.*, 1999; Engelhardt *et al.*, 2001; Golyshin *et al.*, 2002). However, the growth of many of these hydrocarbon-degrading bacteria is limited by the low availability of nitrogen and phosphorus in seawater (Reisfeld *et al.*, 1972; Atlas, 1981,

Received 16 September, 2004; revised 25 January, 2005; accepted 26 January, 2005. *For correspondence. E-mail pgo@gbf.de; Tel. (+49) 531391 5860; Fax (+49) 531391 5858.

1988). Addition of N and P fertilizers has been shown to strongly enhance the biodegradation rates of microbial consortia *in situ* (Prince, 1993; Swannell *et al.*, 1996; Head and Swannell, 1999; Schäfer *et al.*, 2001). Rather than a single species, an assemblage of many different bacterial species is usually involved in the degradation of crude oil. Depending on the chemical nature of the contaminant, different biodegrading microorganisms coexisting in extant micrococenosis may become dominant as it was shown by the temporal fluctuation of population densities of hydrocarbonoclastic *Alcanivorax* and *Cycloclasticus* among the bacteria attached to the oil-polluted grains of gravel (Kasai *et al.*, 2002a; Röling *et al.*, 2002).

The goals of the present study are: (i) to characterize the organic contamination of surface sediments of Milazzo Harbor (Sicily, Italy); (ii) to perform a phylogenetic survey of the indigenous microbial community associated with this site and (iii) to monitor changes in the structure and composition of the bacterial community as a response to nutrient load and the addition of various hydrocarbons.

Results

Harbour sediment characterization

The topmost 5 cm of a sediment core (approximately 50 g) with a distinct colour stratification from brown-grey in the upper 4 cm to black in the lower 1 cm was obtained. The average total organic matter (TOM) content in the surface sediment of Milazzo Harbor was $3.53 \pm 0.15\%$, whereas total nitrogen content was $0.32 \pm 0.06\%$, yielding C/N ratio of 11.0. These values fell well within the observed ranges of other harbour sediments (approximately 1–4% and 9–13 for TOM and C/N respectively) (Sweeney *et al.*, 1980; Takada *et al.*, 1992; Eganhouse and Sherblom, 2001). Total extractable organic matter (TEO) content was 5.87 mg g^{-1} , whereas concentration of total unpolar organic compounds (TUC) was 2.58 mg g^{-1} , yielding the TUC/TEO ratio of 0.44, which is comparable to those reported from other coastal sites contaminated by municipal wastes (38–51% of TEO) (Eganhouse *et al.*, 1981; Eganhouse and Kaplan, 1982; Eganhouse *et al.*, 1983; Eganhouse and Sherblom, 2001). The hydrocarbon fraction was found to be complex and was characterized by a significant amount of unresolved complex mixture (UCM) 28% of TUC fraction. GC-MS analyses of UCM revealed the presence of molecular fragments typical for aliphatic hydrocarbons. Thus, UCM seemed to be comprised largely of a mixture of alkanes *n*-C16 to $>n$ -C32 (branched and cyclic). Unresolved complex mixture with these characteristics could be caused by the presence of fossil fuels or crankcase oil and are not believed to originate from recent biogenic sources (Volkman and Maxwell, 1986; Volkman *et al.*, 1997). The composition of the major

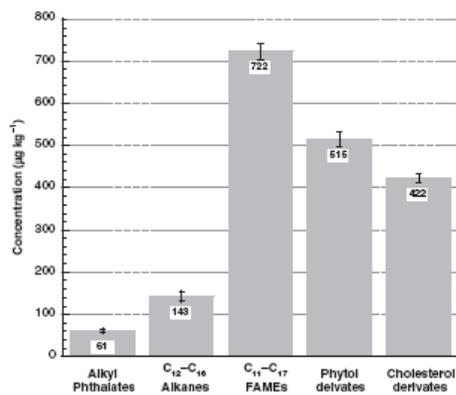


Fig. 1. Composition of major organic pollutants obtained from Milazzo Harbor sediment samples.

resolved fractions of organic compounds isolated from harbour sediments is summarized in Fig. 1 and contains normal C12-C16 alkanes (7.6%), C2-C9 alkyl phthalates (3.3%), methylated C11-C17 fatty acids (38.7%), acyclic C18-C21 isoprenoids (27.7%) and sterols (epi- and coprostanol were dominant) (22.7%).

Clone library analysis of natural microbial community

We used a pair of universal primers (see *Experimental procedures*) to amplify bacterial 16S rRNA genes and, after clone library construction (hereinafter referred to as the 'NAT' library), 200 randomly picked clones containing 16S rDNA inserts have been de-replicated using restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. Forty-five operative taxonomic units (OTU) were observed by RFLP profiling. Twenty-four and 11 OTUs made two large subgroups with matching RFLP patterns. RFLP patterns of 12 clones occurred only once in the clone library. Based on these data, the calculated diversity coverage for NAT library was relatively high (96%), indicating that relatively good coverage of clone diversity was achieved. Sixty-three out of a total 200 clones representing all OTUs were sequenced. Forty-one and 14 of these clones represented two large subgroups detected by RFLP analysis. Thirty phylotypes were discerned with each phylotype consisting of either a unique clone or a group of clones that clustered over 97%. This value of 16S rRNA sequence similarity, as proposed by Rossello-Mora and Amann (2001), could be used as an absolute boundary for species circumscription. An archaeal-specific primer set was also employed and amplification products were obtained. Three RFLP patterns were obtained for 30

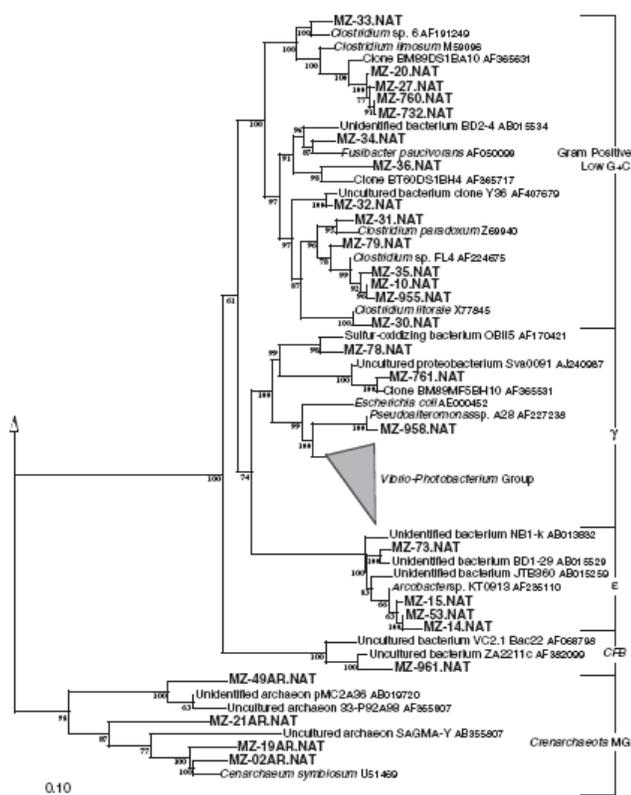


Fig. 2. Rooted phylogenetic tree of NAT clones clustered by Neighbour-joining of maximum likelihood values showing affiliation of partial bacterial 16S rRNA gene sequences to closest related sequences from either cultivated or cloned members of different microbial clusters. Clones obtained in this work are indicated in bold-type. Percentages of 1000 bootstrap resampling that supported the branching orders in each analysis are shown above or near the relevant nodes (only values $\geq 50\%$ are shown). The tree was rooted with 16S rRNA gene sequences of *Methanococcus jannaschii* (M59126). The scale bar indicates 10% estimated sequence divergence.

clones and after sequencing, three sequence types were recovered. All these clones belong to Marine Group I of *Crenarchaeota*, a relatively common group of archaea in seawater (Massana *et al.*, 2000; Lopez-Garcia *et al.*, 2001).

Using the 530R sequencing primer we obtained 450–480 nucleotide sequences (mean size) corresponding to the positions approximately 20–500 of the 16S rRNA gene (*Escherichia coli* numbering). Several clones were almost identical to known 16S rRNA sequences from cultured organisms or environmental clones. Figures 2 and 3 summarize the phylogenetic positions of NAT clones sequenced.

Clostridia and related organisms were present in the NAT library with nine phylotypes and 14 sequenced clones, which made 24% of the total riboclone population. Phylogenetic analysis showed that MZ-10.NAT, MZ-35.NAT, MZ-79.NAT, MZ-955.NAT and MZ-30.NAT were

very closely related to *Clostridium* sp. FL6 and *Clostridium litoreale* (97.7–99.8%, respectively, of sequence identity). Three other clones, MZ-31.NAT, MZ-32.NAT and MZ-33.NAT revealed the highest values of similarity to *Clostridium paradoxum*, the riboclone Y36, retrieved from a hot artesian basin, and *Clostridium* sp. 6 (95.1%, 97.7% and 95.3% respectively). Four clones, MZ-20.NAT, MZ-27.NAT, MZ-732.NAT and MZ-760.NAT, formed a group affiliated with a cluster of coral-associated riboclones (95.5% in average), whereas MZ-34.NAT and MZ-36.NAT were related to *Fusibacter paucivorans* and another coral-associated riboclone, BT60DS1BH4, 93.9% and 90.3% respectively.

Four clones (11.5%) were affiliated with *e-Proteobacteria*. All but one, MZ-73.NAT, matched culturable *Arcobacter* sp. KT0913, isolated from the North Sea (97.0–98.5%). The most similar sequences found in GenBank for the MZ-73.NAT riboclone belong to environ-

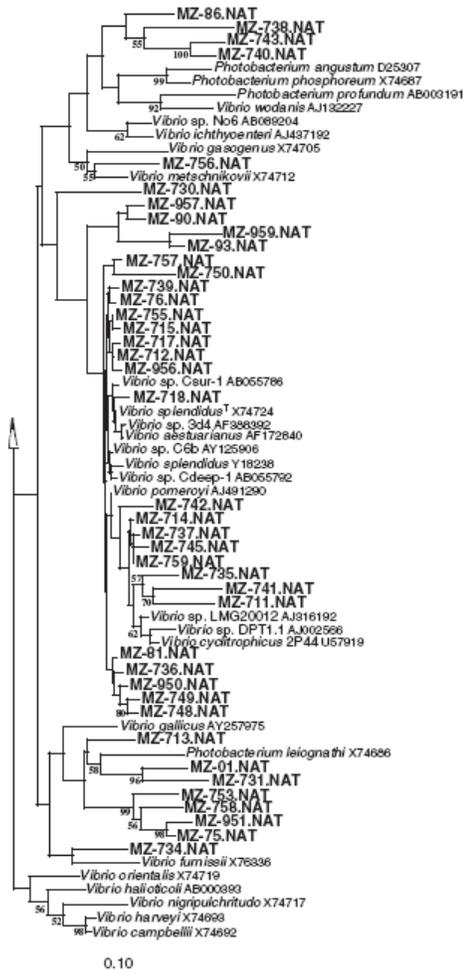


Fig. 3. Rooted phylogenetic tree of *Vibrio*-related NAT clones. The tree was constructed as in Fig. 2 and rooted and out-grouped with 16S rRNA gene sequences of *Psychroserpens burtonensis* (U62913) and *Cycloclastiscus pugettii* (L34955) respectively.

mental clones found in deep marine sediments (97.6% identity to BD1-29).

Only one unique OTU and its sequence was affiliated with the *CFB* division. We have failed to associate clone MZ-961.NAT to any culturable member of the *CFB* division with a validly published name. The closest sequence (94.5% identity) was the environmental clone ZA2211c, recovered from Atlantic bacterioplankton.

The major group (64% of all NAT clones) consisted of γ -*Proteobacteria*. MZ-958.NAT was almost identical (99.6%) to *Pseudoalteromonas* sp. strain A28. MZ-78.NAT was associated with the sulfur-oxidizing bacterium sequence OBII5 (95%). MZ-761.NAT clustered with a deeply branching group of environmental clones BM89MF5BH10 (98.1% similarity) and Sva0091, which were isolated from Bermuda corals and permanently cold marine sediments respectively. The most frequently encountered group (62.5% of NAT clones from 26 RFLP-matching OTUs and 15 phylotypes; 41 sequenced clones) was apparently associated with the *Vibrio-Photobacterium* cluster with similarity values between 94.1% and 99.8% (Fig. 3). Eighteen riboclones showed a close relationship with the *Vibrio splendidus* cluster, with microdiversity at subspecies level (or rRNA operon variability). It should be noted that this cluster includes *Vibrio cyclitrophicus*, the only known PAH-degrading species within this genera (Hedlund and Staley, 2001). Species affiliation was estimated for four clones (MZ-01.NAT, MZ-731.NAT, MZ-734.NAT and MZ-756.NAT), whereas the other 19 clones formed separate groups with unclear taxonomic positions within the *Vibrio-Photobacterium* cluster.

Clone library analysis of microbial community in *N*, *P*-enriched microcosm

The initial sediment was characterized by low phosphate content, close to the lower detection limit (<5 nM). In the experimental microcosm is, hereinafter designated as 'ONR', named for ONR7a which is a mineral medium, described by Dyksterhouse and colleagues (1995) for isolation of *Cycloclastiscus pugettii*. Minerals, phosphorus and nitrogen added at 0.25 mM and 5.0 mM, respectively, were consumed within the first 90 h (data not shown). The degradation of autochthonous hydrocarbons in the ONR microcosm was monitored by the consumption of alkanes and fatty acid methyl esters (FAME). As no mineralization of tracked hydrocarbons was observed during this period, the first peak of cell density detected (Fig. 4) was seemed to correspond to the consumption of other organic compounds present in the original sediment. The EUB388 and GVB oligonucleotide probes were used in dot-blot hybridization using community DNA to roughly quantify the contribution of the *Vibrio* group to the total pool of rRNA genes in our ONR microcosm at this time (96 h of the experiment). Hybridization data indicated that this group accounted for $8 \pm 2\%$ of the bacterial DNA, which is less than that observed in the autochthonous bacterial population. The second peak of microbial density was observed at 240 h (Fig. 4). A slight decrease was registered during next 48 h and the ONR microcosm experiment was concluded after 16 days when a stable plateau was reached for the last four days. The substrates for

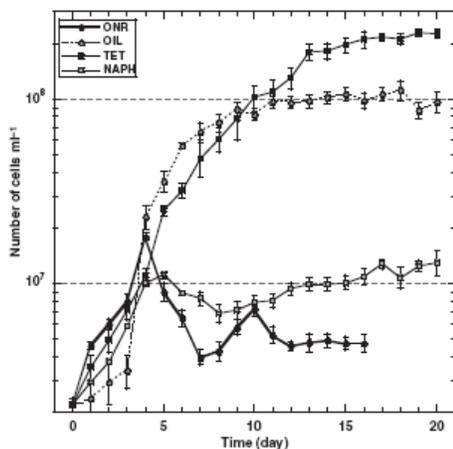


Fig. 4. Bacterial growth in microcosm experiments supplemented with nutrients, crude oil and hydrocarbons. Bacterial numbers in the microcosm supplemented only with nutrients (ONR, closed circles), with nutrients and crude oil (OIL, open circles), with nutrients and tetradecane (TET, closed squares) and with nutrients and naphthalene (NAPH, open squares) were determined after DAPI staining of bacterial cells. The values are averages of three independent measurements. Standard deviations obtained from three independent counting are shown as error bars.

bacterial growth during the second phase were assumed to be the intrinsic hydrocarbons, because a 92% ($\pm 2\%$), 83% ($\pm 6\%$) and 72% ($\pm 9\%$) decreases alkanes, FAMES and phytol concentrations, respectively, were recorded.

An ONR clone library based on universal primers was established. One hundred randomly-picked clones containing 16S rDNA inserts have been grouped using RFLP analysis and 20 different OTUs were obtained. RFLP profiling revealed that 58% of the clones belong to 5 OTUs, while RFLP patterns of four unique clones (each occurring only once in ONR library) gave a diversity coverage of 96%. Twenty-four clones representing 20 OTUs were sequenced from ONR library. No polymerase chain reaction (PCR)-amplification products with archaeal primers were detected. Figure 5 summarizes the phylogenetic positions of the sequenced clones.

Two clones (6% of the ONR clone library) were associated with the *CFB* division. MZ-33.ONR was most closely related to environmental clone JTB244 (94.5%; from the deep cold-seep area sediments) and to Antarctic isolate *Psychroserpens burtonensis* ACAM188 (94.3%), while the exact position of MZ-56.ONR remained uncertain (93% identity to the closest sequence of *Flexibacter* sp. SCB36).

Similarly to phylogenetic diversity of the NAT clone library, ONR was characterized by an abundance of

clones belonging to γ -*Proteobacteria* (84%). MZ-16.ONR, MZ-26.ONR and MZ-50.ONR were most similar to marine methylotrophic organisms *Methylobacter* and *Methylophaga*. MZ-19.ONR was affiliated with the sequence of *Pseudomonas* sp. MBIC2027 (99.4%), isolated from coastal sediments. Almost identical clones MZ-32.ONR and MZ-36.ONR clustered together (96% identity) with members of *Oceanospirillum* sp. *MED92* and marine carbazol-degrading bacterium CAR-SF. Sequences of MZ-04.ONR and MZ-54.ONR were found to be identical to those of *Cycloclasticus pugetii* and *Alcanivorax borkumensis*, respectively, which are marine hydrocarbonoclastic bacteria highly specialized in the degradation of the polyaromatic and aliphatic fractions in oil (Dyksterhouse *et al.*, 1995; Yakimov *et al.*, 1998). Sixty-one per cent of the ONR clones (eight representative sequences) were apparently affiliated with different species related to *Marinobacter* spp. which are alkane- and PAH-degrading marine organisms (Gauthier *et al.*, 1992; Hedlund *et al.*, 2001). Interestingly, some strains of *Marinobacter* were shown to be able to degrade phytol found in the Milazzo sediments (Rontani *et al.*, 1997, 1999).

Ten per cent of the ONR clones were classified as a subclass of α -*Proteobacteria* which was not detected in natural sediments. All clones except MZ-44.ONR appeared in groups related to the *Hyphomonas-Maricaula* cluster, while the last one has a 95% similarity to *Sphingomonas alaskensis*, an oligotrophic ultramicrobacterium, abundant in the northern Pacific Ocean (Eguchi *et al.*, 2001).

Oil degradation and clone library analysis of microbial community in the OIL microcosm

Because of the continuous bacterial growth in the OIL microcosm, degradation of crude oil components was examined after 20 days of the experiment when a slight decline of cell density was observed (Fig. 4). The concentration of crude oil components was normalized using the 17 α (H), 21 β (H)-hopane, and the values obtained in triplicate subsamples were averaged. The concentration of each component in the control crude oil samples was defined as 100%. All GC-MS resolvable petroleum compounds were organized by structural similarity in separated groups (see *Experimental procedures*) and their degradation values were calculated. Significantly greater biodegradation of *n*C₁₀-to-*n*C₃₅ and alkylcyclo-alkanes (41.3 \pm 2.2% and 33.3 \pm 4.6%, respectively) was observed than with branched alkanes (19.2 \pm 4.3% degradation). Polyaromatic hydrocarbons were removed to a lesser extent and 84.4 \pm 7.2% of these compounds remained in the OIL microcosm for more than 3 weeks from the beginning of the experiment.

DNA was extracted from the total microbial community

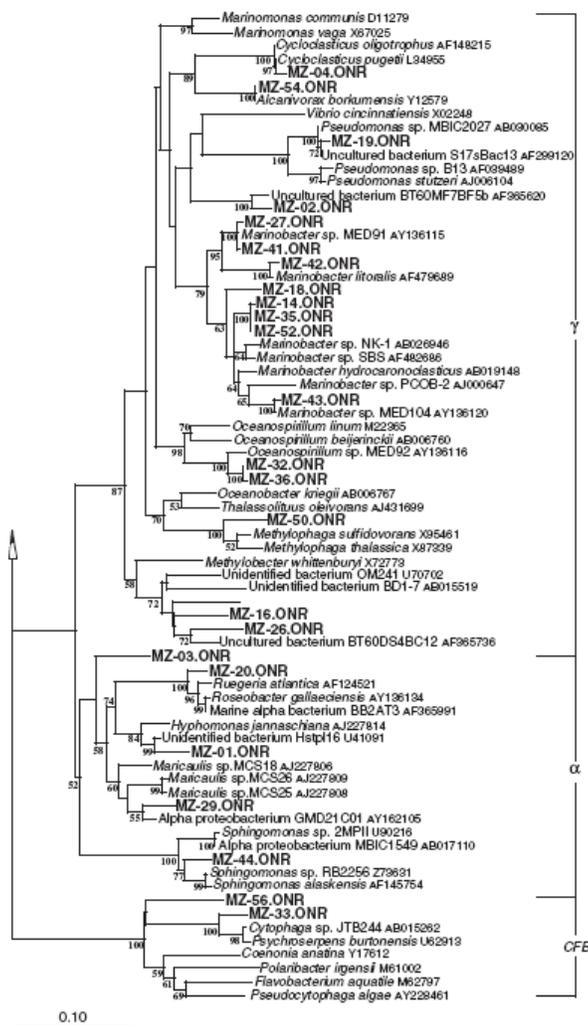


Fig. 5. Phylogenetic relationship of 16S rRNA gene sequences retrieved from the ONR microcosm. The tree was constructed as in Fig. 2 and rooted and out-grouped with 16S rRNA gene sequences of *Methanococcus jannaschii* (M59126) and *Thermus thermophilus* (L09659) respectively.

occurring in the OIL microcosm, then amplified with universal and archaeal-specific primers and the OIL clone library was further analysed. No archaeal amplification was observed.

Twenty-three different RFLP patterns were detected from 100 clones of the OIL library. The most abundant RFLP type constituted 44% of all clones. Ten singletons were recovered. The phylogenetic affiliation of 29 clones representing all RFLP patterns, including the five clones that were most abundant in the OTU library, were inferred

(Fig. 6). Remarkably, 97% of the microbial community were represented by all five divisions of *Proteobacteria*, while the presence of the β and δ divisions was first detected in the OIL library. MZ-365.OIL, representing 7% of OIL clones, was identical to the phenanthrene- and 2,4-D-degrading *Burkholderia* strains TFD6 and S4.11 and closely affiliated to the PAH-degrading strain N3P2. MZ-61.OIL (9% of total OIL clones with identical RFLP profiles) was found to be identical to the toluene-degrading sulfate-reducing bacterium *Desulfobacula toluolica*,

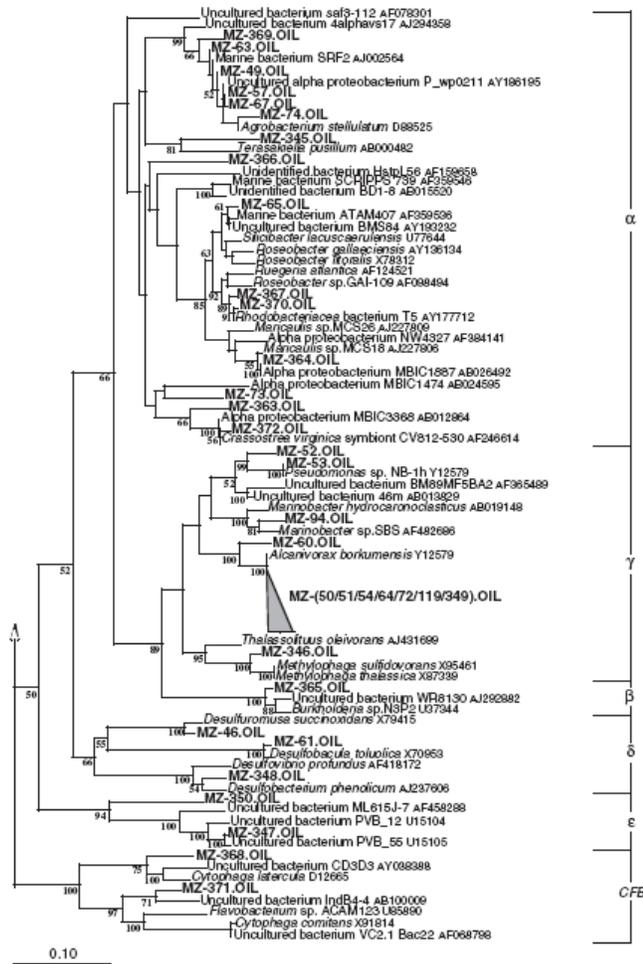


Fig. 6. Phylogenetic relationship of 16S rRNA gene sequences retrieved from the OIL microcosm. The tree was constructed as in Figs 2 and 5.

whereas the unique clone, MZ-348.OIL, was affiliated with *Desulfovibrio profundus* (99% similarity). The ϵ -*Proteobacteria* division was represented in the OIL library only by singleton MZ-347.OIL, which was identical to the environmental riboclonal PVB_OUT_3 and VC2.1 Bac32, both retrieved from a microbial mat at an active hydrothermal vent. Based on a combined analysis of RFLP clustering and DNA sequencing, we found that 30% of the OIL bacterial PCR amplicons were derived from α -*Proteobacteria*. Among them, a cluster of six sequences (11% of OIL clones) was closely affiliated with SRF-2, an environmental clone we had previously recovered from the North-

ern Mediterranean (Giuliano *et al.*, 1999). Another cluster of five sequenced clones, representing 9% of OIL clones, were classified within a group related to *Maricoccus-Roseobacter-Rhodobacter*. The phylogenetic placement of only one clone, MZ-73.OIL, remained unclear because similarity values of 91% with sequences of different α -proteobacterial riboclonal, recovered from grassland soil, rhizosphere and sewage.

A small fraction of the sequences (3% of all clones) retrieved from the OIL microcosm could be assigned to the CFB phylum. Singleton MZ-371.OIL was found to be identical to environmental clone VC2.1 Bac22, recovered

from the deep Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent, while MZ-368.OIL was affiliated with *Cytophaga latercula*.

Almost 90% of all clones affiliated with γ -*Proteobacteria*, and 44% of all OIL clones sequenced grouped within an identical RFLP profile. Seven representative clones were sequenced and a 98–100% similarity to *Alc. borkumensis* SK2^T was found for all seven. Another *Alcanivorax*-related clone, MZ-60.OIL, revealed a similarity of 97%. MZ-346.OIL, whose RFLP pattern was found in 3% of all OIL clones, was closely associated with the marine methylotrophic bacterium *Methylophaga sulfidovorans*. Clones MZ-52.OIL and MZ-53.OIL showed a close relationship to deep sea isolate *Pseudomonas* sp. NB-1h.

Clone library analysis of microbial community in the tetradecane (TET) microcosm

Bacterial growth in the TET microcosm started immediately at the beginning of the experiment, suggesting that microorganisms in the sediments were preadapted to this pollutant and was characterized by a constant increase of cell density during the next 20 days. The experiment was terminated on the 20th day when the density plateau had been reached (Fig. 4). Estimated values of tetradecane degradation on that day were $94.7 \pm 1.5\%$.

Very low diversity was detected for the microbial community in the tetradecane-enriched microcosm. Among the only 8 OTUs found, two similar OTUs accounted for 69 of the 100 clones analysed. One OTU was found to be present by a singleton, giving a very high index of diversity coverage of 99%. Fourteen clones representing all OTUs were sequenced from TET clone library and were shown to be members of four bacterial phylotypes, α - (20%), δ -*Proteobacteria* (3%) and the *CFB* division (8%) with an absolute abundance (69%) of γ -*Proteobacteria* (Fig. 7). The *CFB* phylum was represented by two phylotypes, MZ-28.TET and MZ-46.TET, which are distantly affiliated to a benzene-mineralizing uncultured eubacterium SB-1 (89%), while another three almost identical clones, MZ-12.TET, MZ-13.TET and MZ-70.TET, showed similarity values of 94% to *Flavobacterium columnare*. α -*Proteobacteria* were represented by clones closely affiliated with *Aquaspirillum peregrinum*, *Rhodospirillum rubrum* and *Terakasiella pusillum*. The clone MZ-16.TET was closely related (99%) to riboclone MN13BT4-48, found in the hydrocarbon-seeping Amsterdam mud volcano, in the eastern Mediterranean. The δ -proteobacterium MZ-31.TET had a sequence similarity of 98% to the sulfate-reducing acrylate-degrading bacterium *Desulfovibrio acrylicus*.

Five clones representing two abundant OTUs (69% of all TET clones) were sequenced. Two of them were identical to *Thalassolituus oleivorans*, recently isolated from the same site (Yakimov *et al.*, 2004), whereas three others

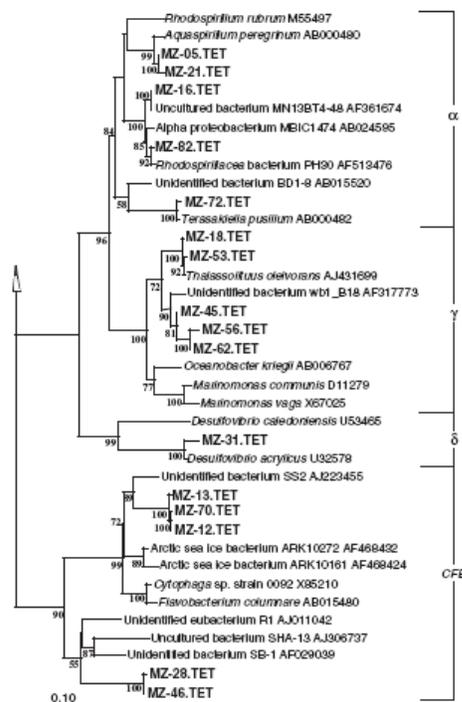


Fig. 7. Phylogenetic relationship of 16S rRNA gene sequences retrieved from the TET microcosm. The tree was constructed as in Figs 2 and 5.

revealed a 95% similarity to this hydrocarbonoclastic bacterium and could be assigned as a new species of *Thalassolituus*.

Clone library analysis of microbial community in the NAPH microcosm

The NAPH microcosm was characterized by a very small increase of microbial density comparable with the nutrient-supplied ONR microcosm and stabilized by the 6th day of the experiment ($P < 0.05$) (Fig. 4). The microcosm was terminated after 20 days for normalization of the data obtained from the other microcosms. GC-MS analysis revealed that $32.3 \pm 5.6\%$ of the naphthalene added was consumed.

The NAPH clone library was analysed by RFLP profiling of 100 clones and 8 different OTUs were found. More than 85% of the NAPH clones represented two abundant RFLP types, formed by 44 and 42 clones respectively. Four singletons were obtained giving the diversity coverage

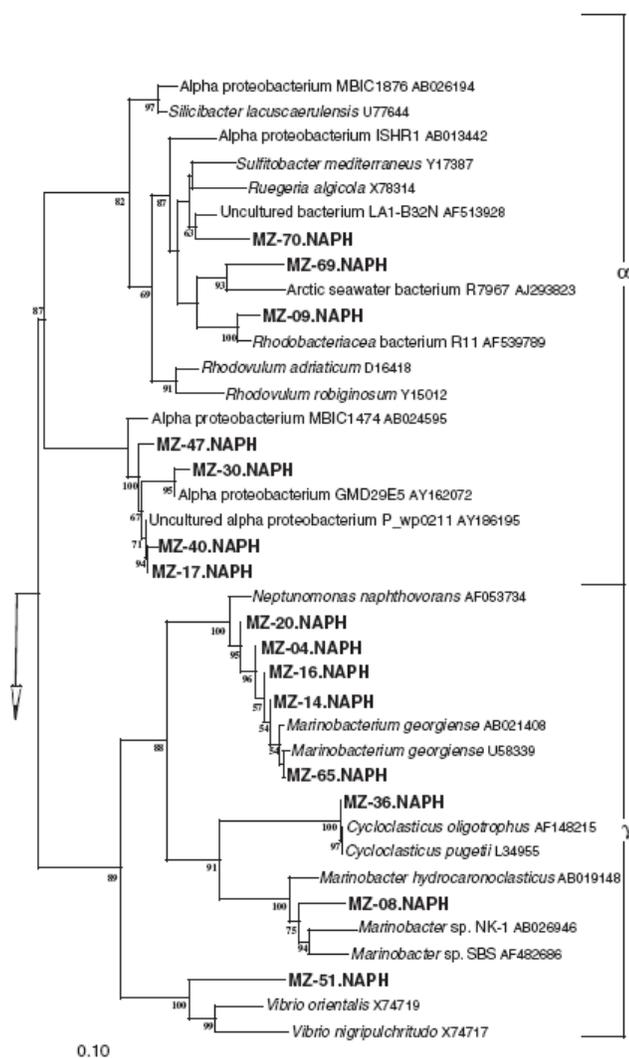


Fig. 8. Phylogenetic relationship of 16S rRNA gene sequences retrieved from the NAPH microcosm. The tree was constructed as in Figs 2 and 5.

index of 96%. Fifteen clones belonging to all OTUs, among which nine clones represented the major RFLP types, were sequenced and their phylogenetic positioning was inferred. The low diversity of the NAPH microbial assemblage was again confirmed as the sequenced clones were affiliated with only two bacterial phylotypes, α - (45%) and of γ -*Proteobacteria* (55%) (Fig. 8). All α -*Proteobacteria* clones, except singletons MZ-09.NAPH, MZ-69.NAPH and MZ-70.NAPH, formed a monotypic

group closely related (99%) to riboclone P_wp0211, retrieved from a PAH-degrading enrichment of deep-sea sediments. Among NAPH clones related to γ -*Proteobacteria*, the distribution of type sequences was also highly disproportional. Singleton MZ-51.NAPH was related to genus *Vibrio* and had equal sequence similarity of 93% to *Vibrio nripulchritudo* and to *Vibrio orientalis*. MZ-08.NAPH covered 3% of NAPH clones (5.5% of all γ -*Proteobacteria*; Fig. 8) and had *Marinobacter* sp. NK-1 as

its closest relative (95% similarity). Seven percent of NAPH clones (12.7% of all NAPH γ -Proteobacteria) represented by MZ-36.NAPH were very closely affiliated with *C. pugetii* (100% of similarity). The most abundant NAPH OTU, represented by 44 clones (80% of all NAPH γ -Proteobacteria), had a monotypic sequence (five identical clones) closely related (99%) to a lineage of lignin-degrading *Marinobacterium georgiense* which includes *Neptunomonas naphthovorans*, a naphthalene-degrading marine bacterium isolated from Puget Sound.

Clonal bacterial diversity in the libraries

As all archaeal clones were retrieved only from the autochthonous microbial community, they were withdrawn from this analysis and comparison of only bacterial diversity was performed. Distribution of 16S rDNA phylotypes from natural and microcosm microbial communities on the basis of phylogenetic grouping is shown in Table 1. Most bacterial phylotypes were affiliated with α - and γ -Proteobacteria and the CFB division. Members of γ -Proteobac-

Table 1. Distribution of bacterial phylotypes in the NAT, ONR, OIL, TET and NAPH 16S rRNA gene clone libraries.

Phylotyping or taxonomic group ^a	No. of phylotypes (no. of clones) in the following libraries				
	NAT	ONR	OIL	TET	NAPH
Bacteria					
<i>α-Proteobacteria</i>					
<i>Agrobacterium</i> P_wp0211 cluster			2 (12)		1 (42)
<i>Aquaspirillum</i> group				1 (7)	
<i>Beijerinckiaceae</i> group			2 (5)		
<i>Hyphomonas</i> group		1 (1)			
<i>Maricaulis</i> group		1 (1)	1 (1)		
<i>Rhodobacteriaceae</i> group			2 (8)		2 (2)
<i>Rhodospirillaceae</i> group				1 (12)	
<i>Ruegeria/Sulfitobacter</i> cluster		2 (4)			1 (1)
<i>Sphingomonas</i> group		1 (4)			
<i>Terastakiella</i> group			1 (1)	1 (1)	
MBIC1474 group			1 (3)		
<i>β-Proteobacteria</i>					
<i>Burkholderia</i> cluster			1 (7)		
<i>γ-Proteobacteria</i>					
<i>Alcanivorax</i> group		1 (6)	2 (39)		
<i>Cycloclasticus</i> group		1 (6)			1 (7)
<i>Marinobacter</i> group		5 (56)	1 (3)		1 (3)
<i>Methylbacter</i> group		2 (5)			
<i>Methylophaga</i> group		1 (4)	1 (2)		
<i>Neptunomonas/Marinobacterium</i> group					1 (44)
<i>Oceanospirillum/wb1_B18</i> cluster		1 (3)		1 (20)	
<i>Pseudoalteromonas</i> group	1 (1)				
<i>Pseudomonas</i> group		1 (2)	2 (4)		
<i>Vibrio/Photobacterium</i> group	15 (125)				1 (1)
<i>Thalassolituus</i> group				1 (49)	
BTe0MF7BF5b cluster		1 (2)			
OB15 group	1 (1)				
Sva0091/BPC022 cluster	1 (1)				
<i>δ-Proteobacteria</i>					
<i>Desulfobacula toluolica</i>			1 (6)		
<i>Desulphuromusa succinoxidans</i>			1 (1)		
<i>Desulfovibrio</i> group			1 (3)	1 (3)	
<i>ϵ-Proteobacteria</i>					
<i>Arcobacter</i> cluster	2 (23)				
PVB_OUT_3 cluster			2 (2)		
CFB					
<i>Bacteroidetes</i> CD3D3 group			1 (2)		
<i>Cellulophaga/Psychroserpens</i> group		2 (6)			
<i>Cytophagales</i> ML-1/IndB4-4 cluster			1 (1)		
<i>Cytophagales</i> SS2/ES13 cluster	1 (1)			1 (6)	
SHA-13/SB-1 group				1 (2)	
Gram-positive					
<i>Clostridium/Fusibacter</i> group	9 (48)				
Total	30 (200)	20 (100)	23 (100)	8 (100)	8 (100)

a. Phylotype groups correspond to clusters of similar 16S rRNA genes shown in phylogenetic trees in Figs 2, 3 and 5–8.

Table 2. Biodiversity characteristics of the clone libraries analysed.

Clone library	Species richness ^a	Diversity coverage	Diversity estimates	Dominance	Dominance concentration	Dominant organisms ^b
NAT	30	94.0	2.593	0.131	0.869	<i>Vibrio</i>
ONR	20	96.0	2.494	0.122	0.878	<i>Marinobacter</i>
OIL	23	90.0	2.379	0.176	0.824	<i>Alcanivorax</i>
TET	8	99.0	2.097	0.164	0.836	<i>Thalassolituus</i>
NAPH	8	96.0	1.201	0.376	0.624	<i>Marinobacterium</i>

a. All sequences that clustered over 97% were taken as indicative of belonging to a single species/separate phylotype.
 b. Identity over 97% to the sequence from the indicated organisms with validly published names.

teria were found to be dominant in all clone libraries: 49% (OIL); 55% (NAPH); 64% (NAT); 69% (TET); and 84% (ONR). The α -*Proteobacteria* division was not found in the natural microbial community in the harbour sediments, whereas its abundance in enriched microcosms was detected. All clone libraries except NAPH contained microorganisms belonging to the *CFB* division. The signatures of sulfate reducing heterotrophs were found in oil- and tetradecane-enriched mesocosms, although their relative proportions did not exceed 10% and 3% respectively. ϵ -*Proteobacteria* were only found in the natural community and in the OIL microcosms. Members of *Firmicutes* and β -*Proteobacteria* were found only once in the NAT and OIL libraries respectively.

To assess bacterial diversity between the five libraries, analysis of phylotype distribution was carried out using common criteria, as described elsewhere (Krebs, 1989; Mullins *et al.*, 1995; Brown and Bowman, 2001). It should be noted that the inherent biases of DNA extraction and PCR can potentially distort clone library data and clone percentages probably do not accurately reflect the microbial diversity, but as all the samples were analysed in the same fashion and the predominant sequences in the clone libraries were so evident, it is likely that our results do reflect, at least partially, relative abundance in the studied microbial communities. Biodiversity coverage was relatively high ranging from 90.0% to 99.0%, suggesting that all bacterial assemblages were characterized by significantly decreased diversity. Based on the definition that each phylotype consists of either a unique clone or a group of clones that have sequence similarities of over 97% (Rossello-Mora and Amann, 2001), a total of 89 different phylotypes were discerned. Although the greatest species richness was observed in NAT library (Table 2), the natural community was characterized by a relatively lower diversity index mainly because: (i) only five major bacterial divisions were present; and (ii) 64% of all defined species derived from heterotrophic *Vibrio* and *Clostridium* species. The Milazzo Harbor sediments seems to be a system highly affected by chronic anthropogenic pollution which inhibits a more diverse microbial community. Interestingly, the diversity estimate observed

in the OIL microcosm was equal to that of the natural microbial community (Table 2). This finding indirectly confirms an environmentally stressed system most probably caused by organic pollution. This could explain the contrast between the observations of other investigators, suggesting that the addition of crude oil to natural microbial populations results in a significant decrease in the diversity index mainly because of strong selection for petroleum-degrading bacteria (Harayama *et al.*, 1999; Kasai *et al.*, 2001; 2002b; Syutsubo *et al.*, 2001). The nutrient-enriched microcosm had the same clone species richness as the OIL microcosm, and exhibited the same clonal diversity as well (Table 2), with strong dominance of *Marinobacter*-related sequences (58% of clones). Such a high prevalence of *Marinobacter* could be explained by recent observations suggesting that this group of marine hydrocarbonoclastic bacteria seem to play an important role in the biodegradation of phytol (Rontani *et al.*, 1997, 1999) found at high concentrations in Milazzo Harbor sediments. Naphthalene and tetradecane addition in the microcosms drastically affected the diversity, either on a bacterial species or phylum level and obviously favoured the development of highly specialized microbial communities degrading these compounds.

Inter-sample similarity was measured numerically by pair wise comparisons of clone library data between each library (Table 3). Surprisingly, only a few phylotypes were shared between each and no one appeared in more than three separate libraries. No matches of NAT phylotypes with those of any other library were found. TET and ONR libraries did not share any of their clones. The highest level

Table 3. Inter-sample similarity between bacterial phylotypes found in the clone libraries constructed from natural sediment sample and from different microcosms.

Clone library	NAT	ONR	OIL	TET	NAPH
NAT	1.00				
ONR	0.00	1.00			
OIL	0.00	0.17	1.00		
TET	0.00	0.00	0.15	1.00	
NAPH	0.00	0.15	0.08	0.12	1.00

of inter-sample similarity of 17% was obtained by a comparison of bacterial phylotypes, recovered from OIL and ONR microcosms. Such a limited values may reflect the establishment of diverse microbial assemblages as a response to different kinds of pollutants, but may also be derived from a limitation of the clone library analysis technique.

Discussion

The harbour of Milazzo is a wide natural bay with low water turnover and runs along 15 km of the north-eastern coast of Sicily. This region is characterized by heavy industrialization, dense urbanization and heavy large tanker traffic transporting crude and refined oil to and from the refinery located at this site. These antropogenic factors have strongly affected the marine environment of the harbour. The analysis of organic contamination in superficial sediments revealed high concentrations of five different classes of hydrocarbon pollutants clearly originating from human activities. The alkanes are principally attributed to the oil hydrocarbons probably from waste from the petrochemical refining plants located at the harbour. Two other contaminants found in the sediments, alkyl phthalates and methylated fatty acids, also seem to originate from oil refining activity and polymer production. Alkyl phthalates are widely used as plasticizers for many polymers, like polyvinyl chloride resins, polystyrene and cellulose ester plastic and may enter the environment via air emissions, aqueous effluent and solid waste products from processing plants. Fatty acid methyl esters are playing an increasingly important role in the petrochemical industry and are mostly used as chemical intermediates to produce a number of petrochemicals such as fatty alcohols, alkanolamides, sulfo-methyl esters, sucrose esters and other detergents. The last two groups of contaminants obtained from sediments, acyclic isoprenoids (phytol dominant) and sterols (coprostanol dominant) are relatively abundant and widespread components of harbour marine sediments. These compounds are often used as biological markers for primary production and urban wastes (Takada and Eganhouse, 1998) and mainly originate from the phytol side-chain of chlorophyll a and from mammalian feces respectively.

Recently, many investigators have raised questions about possible problems associated with PCR of the 16S rRNA gene for phylogenetic analysis of microbial communities. Strong biases may be introduced by the copy number of 16S rRNA genes, varying from 1 to 14 copy number per cell depending on the species or even strains (Farrelly *et al.*, 1995), and by the differential PCR amplification efficacy of DNA from heterogeneous templates (Farrelly *et al.*, 1995; Chandler *et al.*, 1997). These possible effects may mean that the proportions found in the clone libraries

do not always represent the 16S rDNA proportion within microbial communities. Keeping in mind this caveat, the molecular phylogenetic approach using PCR and 16S rDNA cloning is at the moment the most accurate technique available for describing the composition of complex microbial communities and gaining at the very least a descriptive overview of possible differences and comparability between controlled laboratory experiments and environmental samples.

While we found five major phylogenetic groups represented by NAT clones, it is unlikely that the exact proportions found in our study reflect the original *in situ* sediment diversity. It is possible that the complete dominance of *Vibrio*- and *Clostridium*-related organisms under controlled conditions could be a rough approximation of natural conditions in the harbour sediment. Moreover, with the calculated diversity coverage of 94% for NAT library, we failed to find α -, β - and δ -*Proteobacteria* in the natural sample, while bacteria belonging to these lineages were detected in experimental microcosms derived from same sediment. Surprisingly, sequences retrieved from microcosm experiments did not match those from the NAT library, suggesting that a major portion of the assemblage belongs to different phylogenetic lineages that do exist in the natural sample, but at undetectable levels, at least by the methods used.

The high levels of organic contamination, high abundance of the mud fraction in the sediments, and low water turnover in the harbour facilitate fast oxygen consumption at the surface and complete anoxic conditions in the sediment below 4 cm. This stratification favours the growth of anaerobic heterotrophic bacteria, such as *Clostridium*, which was found to be one of the major bacterial groups in the autochthonous microbial community. In general, the microbial community analysed from the sediment was different from that typically described from unpolluted sediment and seawater of the Mediterranean Sea (Boivin-Jahns *et al.*, 1996; Giuliano *et al.*, 1999; Schäfer *et al.*, 2001) and the observed decrease in diversity was obviously affected by anthropogenic impact.

The self-cleaning potential of naturally occurring bacterial assemblages and community successions resulting from sudden hydrocarbon pollution was analysed by means of the microcosm experiments. For the first time, we demonstrated that developed consortia were strongly dependent on the composition of hydrocarbon pollution and they had low inter-sample similarity. Microbial communities within contaminated ecosystems tend to be dominated by the organisms capable of consuming and/or tolerating toxic organic compounds. As a result, these communities are typically less diverse than those in non-stressed systems, although their diversity may be influenced by the complexity of contaminant mixtures present and the time of exposure. Each microcosm was charac-

terized by a strong dominance of different hydrocarbonoclastic bacteria, depending on the experiment. Simple inorganic nutrient addition to the sediments significantly enhanced the degradation of targeted hydrocarbons present in natural samples. Concordant absolute dominance of sequences in the ONR clone library, related to alkane- and phytol-degrading *Marinobacter* spp. was also observed.

Crude oil as a complex mixture of different classes of hydrocarbons could support the growth of various bacteria, each preferentially degrading one or several types of hydrocarbons. Alkanes are the major constituents of crude oil, which explains why *Alcanivorax*-related sequences are prominent in the OIL clone library. Population sizes of these alkane-degrading bacteria, usually low in unpolluted marine waters, increase significantly in response to oil pollution and fertilization (Kasai *et al.*, 2001; 2002b; Sytsubo *et al.*, 2001; Roling *et al.*, 2002). Absence of *Cycloclasticus*-related sequences detected in OIL clone library could be explained by the usage of weathered oil, where only 1% of GC-MS resolvable hydrocarbon fractions are represented by polyaromatic compounds, found to be almost single type of carbon source supported the growth of this highly specialized hydrocarbon-degrading bacterium (Dyksterhouse *et al.*, 1995; Kasai *et al.*, 2002a). These sequences were retrieved in clone library produced from ONR and NAPH microcosms, although their presence was not abundant. Another naphthalene-degrading bacterium, closely related to *Marinobacterium georginense* and *N. naphthovorans*, accounts for the majority of corresponding clones possibly because of its higher growth rate.

Surprisingly, *Alcanivorax*-related sequences were not found among the bacteria growing in tetradecane-enriched microcosms which is their preferred substrate. Almost 70% of the TET clone library consists of two related sequences belonging to a novel genus, *Thalassolituus*. The preliminary study performed in our laboratory demonstrated that *T. oleivorans* MII-1^T possessed higher rates of growth and tetradecane uptake than *Alc. borkumensis* SK-2T (data not shown). Another possible explanation is that *Thalassolituus* produces some secondary metabolites which could be toxic to other microorganisms. The study of interaction between these bacteria is currently in progress.

To our knowledge, the present study is the first attempt to characterize the succession of microbial assemblages derived from the same natural sample in response to differential contaminant load. The microcosm experiments indicated that various groups of marine hydrocarbonoclastic bacteria appeared to be involved in the primary degradation of petroleum hydrocarbons. This diversity presumably reflects the necessity of specific networks at the trophic and functional levels in hydrocarbon-degrading

microbial communities to cope with the chemical complexity, the range of solubility, and toxicity of different hydrocarbon compounds. The present work is the initial phase of long-term study which is particularly relevant in light of the accidental oil spill which occurred in the Harbor of Milazzo at the beginning of January, 2003.

Experimental procedures

Field site, sampling and microcosm set-up

Sediment samples for the microcosms was collected from the upper part of the Milazzo Harbor, Italy, sediment at a depth of 8 m, from a site within a zone of heavy ship traffic (015°14.75E, 038°13.00N). Fifty grams from the upper 5 cm of sediment was transported to the laboratory in a cool box at ambient temperature and used for microcosm experiments within 1 day of collection. The sediment was composed of fine sand with a particle abundance in the range of 150–250 µm and contained more than 25% grey-black mud (sediment particles of <60 µm). The average total organic matter and total nitrogen content of sediment was $3.53 \pm 0.15\%$ and $0.32 \pm 0.06\%$.

The sediment sample was homogenized with sterile seawater in the laboratory and four 5.0-g portions of wet sediment were placed into 200-ml flasks and held at 15°C, while another 5.0-g portion was used for direct extraction of total DNA. Additionally, 10 g of sediments were used for hydrocarbon analysis. Each microcosm received 45 ml of TAPS-buffered (5 mM) sterile seawater supplemented with NH₄Cl and Na₂HPO₄·2H₂O to reach nitrogen and phosphorus concentrations of 5.0 and 0.25 mM respectively. Nutrients amounts and the type of buffer salts were based on those in Dyksterhouse and colleagues (1995), where the mineral medium ONR7a was applied for the cultivation of *C. pugetii*. One microcosm was not further modified (hereafter referred to as 'ONR' microcosm), while three others were supplemented with 0.4% (v/v) of crude oil and tetradecane and 0.2% (w/vol) of naphthalene respectively (hereafter referred to as the 'OIL', 'TET' and 'NAPH' microcosms). Weathering of crude oil (source was a small scale oil producing well of Lehrte, Germany) was simulated by distillation at 230°C in order to remove low-molecular-weight volatile compounds (<C₁₀ alkanes and non-substituted monoaromatic compounds). Total GC-MS resolvable hydrocarbons contributed $42.2 \pm 2.8\%$ of total hydrocarbon content in the weathered oil with relative concentrations of normal, branched, alkylcyclo-, C₁₀-to-C₃₅, alkanes and polyaromatic hydrocarbons of 77%, 16%, 6% and 1% respectively. The weathered oil and tetradecane were mixed vigorously with TAPS-buffered (5 mM) sterile seawater taken from the corresponding microcosm (1:4, v/v) and obtained water-in-oil emulsions were added. Microcosms were not shaken constantly during the experiment, simulating the low water turnover which occurs at the sampling site of the harbour.

Bacterial enumeration and biomass estimation

Total bacterial counts in seawater samples were taken from the microcosms at 24 h intervals and were determined by

fluorescence microscopy using 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. Bacterial numbers in unamended sediments were counted by epifluorescence microscopy with SYBR Gold ($\times 10\,000$ in dimethyl sulfoxide; Molecular Probes) according to the procedure described by Weinbauer and colleagues (1998). This counting technique was not used throughout the microcosm experiments because of very low observed reproducibility. All microcosm experiments, excluding the ONR microcosm, were terminated on the 20th day when the total cell counts in the seawater overlying the sediments reached a plateau over a period of 48 h. The ONR microcosm was terminated earlier, on the 16th day of the experiment.

Dot-blot hybridization experiments were performed with non-radioactive, DIG-labelled universal EUB and *Vibrio*-specific G V oligonucleotide probes and total DNA bounded to QIABRANE nylon membrane (QIAGEN, Germany) as described elsewhere (Giuliano *et al.*, 1999). The analysis was performed on the microbial community of the ONR microcosm at the 96 h of the experiment (corresponding to the first peak of growth).

Total DNA extraction, PCR amplification, cloning and sequencing

Forty-seven millilitres from each microcosm was taken for molecular biological analyses. After centrifugation at 2500 g to settle the sediments, the water samples were filtered onto Durapore polyvinylidene fluoride filters with a pore size of 0.22 μm (Millipore, GVWP, 47-mm diameter). Subsequently, the filters were washed twice with 1 ml of 50 mM sodium phosphate buffer and the effluent was combined with the corresponding sediment for total DNA extraction.

Total DNA extraction was performed following the manufacturer's protocol of the FastDNA[®] SPIN[®] Kit (For Soil) (Q-BIOgene). Recent studies have shown that this bead beating protocol is suitable for obtaining DNA both from Gram-positive bacteria and from hypersaline mud samples (Yakimov *et al.*, 2002). Primers used for 16S rDNA amplification from the total DNA included primers 27F (5'-AGAGTTTGATC MTGGCTCAG-3') and S-D-Bact-1492-a-A-21 (5'-ACG GYTACCTGTTCAGACTT-3') (Lane, 1991). Specific primers, 8aF and S-D-Bact-1492-a-A-21 were used for PCR amplification of archaeal 16S rDNA (Lane, 1991). Polymerase chain reaction conditions utilized and methods used for clone library construction and sequencing have been described previously by Yakimov and colleagues (2002). All riboclones were checked by the CHECK_CHIMERA program (Maidak *et al.*, 1999) to determine the presence of any PCR-amplified hybrid sequences. Sequences were compared with the GenBank nucleotide database library by GAPPED BLAST on-line searches (Altschul *et al.*, 1997) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) and were then manually aligned using SeAl 2.0 alpha 1 program (Rambaut, 1996) together with the most important BLAST hits as well as with the homologous bacterial 16S rRNA primary structures obtained from Ribosomal RNA Project II database (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) (Maidak *et al.*, 1999). Phylogenetic analysis was then performed using the program package PHYLIP (Felsenstein, 2001) as described by Yakimov and colleagues (2002). The sequences determined in this study

have been deposited under GenBank Accession numbers AJ810552-AJ810706.

Diversity analysis

To assess changes in the genetic diversity of the bacterial communities in the microcosms, all five libraries were normalized to 100 clones each by using the RAREFACT.FOR program (Krebs, 1989) (<http://www2.biology.ualberta.ca/jbrzusto/rarefact.php>). Estimates of diversity (Shannon-Weaver Index), and dominance concentration (Simpson Index) were calculated as described elsewhere (Brown and Bowman, 2001). Pair wise comparison of clone libraries were carried out determining a similarity coefficient calculated by dividing the duplicate number of shared phylotypes by the total number of phylotypes detected in compared libraries (Odum, 1971).

Hydrocarbon analyses in natural sediments and microcosms

Hydrocarbons were extracted from natural sediments (10 g), analysed by high-resolution gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and quantified according to previously described protocols (Dutta and Harayama, 2001; Wang *et al.*, 2002). Before proceeding, the samples were spiked with recovery surrogate squalane and decamethyl-anthracene (10 μg each added) to determine extraction efficiency. Subsequently, sediments were extracted using methanol followed by dichloromethane at ambient temperature on a shaker. The extract was concentrated by rotary evaporation ($< 30^\circ\text{C}$) to a small volume (approximately 10 ml) and analysed for total extractable organic matter (TEO) content using a microbalance method. Thin-layer chromatography (TLC) was used for separation of TUC and alcohol (ALC) fractions, yields of which were determined gravimetrically, as described by Eganhouse and Sherblom (2001). The TUC fractions were evaporated under stream of nitrogen and taken up in a solution containing 1-phenyl $-C_{15}$ (2 $\mu\text{g ml}^{-1}$, internal standard). Sterols and phytols present in the ALC fraction were converted to corresponding trimethyl silyl derivatives (Pierce) and taken up in a solution of 5 α (H)-cholestane (2 $\mu\text{g ml}^{-1}$, internal standard). All these compounds were further determined by high resolution GC-MS.

To detect the biodegradation values in microcosms, 200 ng of the biomarker 17 α (H),21 β (H)-hopane (Chiron AS), a degradation resistant compound present in crude oil (Prince *et al.*, 1994), was added at the beginning of experiments. At the end of the experiment each microcosm was homogenized and a 1-ml sample was taken for GC-MS analysis three times. The percentage of biodegradation was calculated by normalizing the concentration of individual compounds relative to that of 17 α (H),21 β (H)-hopane at the end of the experiment and at the start of the experiment. Measurements made on replicate samples showed that precision was in all cases within 10%.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Italian Ministry for Education, University and Research (PEA 1999-2000,

Research Project 1.4 and CLUSTER 10, Project 'SAM'), EC Project COMMODE (EVK3-CT2002-00077) and GenoMik initiative of BMBF (German Federal Ministry of Education and Research). We are indebted to Wolf-Rainer Abraham, and René Huppman (Chemical Microbiology Research Group, GBF, Braunschweig, Germany) for assistance in hydrocarbon analysis. We would also like to thank Andrew Dalby for improving the manuscript.

References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) GAPPED BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389–3402.
- Atlas, R.M. (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol Rev* **45**: 180–209.
- Atlas, R.M. (1988) Biodegradation of hydrocarbons in environment. *Basic Life Sci* **45**: 211–222.
- Boivin-Jahns, V., Ruimy, R., Bianchi, A., Dumas, S., and Christen, R. (1996) Bacterial diversity in a deep-subsurface clay environment. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3405–3412.
- Brown, M.V., and Bowman, J.P. (2001) A molecular phylogenetic survey of sea-ice microbial communities (SIMCO). *FEMS Microbiol Ecol* **35**: 267–275.
- Chandler, D.P., Fredrickson, J.K., and Brockman, F.J. (1997) Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. *Mol Ecol* **6**: 475–482.
- Dutta, T.K., and Harayama, S. (2001) Analysis of long-side-chain alkylaromatics in crude oil for evaluation of their fate in the environment. *Environ Sci Technol* **35**: 102–107.
- Dyksterhouse, S.E., Gray, J.P., Herwig, R.P., Lara, J.C., and Staley, J.T. (1995) *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 568–576.
- Eganhouse, R.P., and Kaplan, I.R. (1982) Extractable organic matter in municipal wastewaters. 1. Petroleum hydrocarbons: temporal variations and mass emission rates to the ocean. *Environ Sci Technol* **16**: 180–186.
- Eganhouse, R.P., and Sherblom, P.M. (2001) Anthropogenic organic contaminants in the effluent of a combined sewer overflow: impact on Boston harbor. *Mar Environ Res* **51**: 51–74.
- Eganhouse, R.P., Simoneit, B.R.T., and Kaplan, I.R. (1981) Extractable organic matter in urban stormwater runoff. 2. Molecular characterization. *Environ Sci Technol* **15**: 315–326.
- Eganhouse, R.P., Blumfield, D.L., and Kaplan, I.R. (1983) Long-chain alkylbenzenes as molecular tracers of domestic wastes in the marine environment. *Environ Sci Technol* **17**: 523–530.
- Eguchi, M., Ostrowski, M., Fegatella, F., Bowman, J., Nichols, D., Nishino, T., and Cavicchioli, R. (2001) *Sphingomonas alaskensis* strain AFO1, an abundant oligotrophic ultramicrobacterium from the North Pacific. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4945–4954.
- Engelhardt, M., Daly, A.K., Swannell, R.P.J., and Head, I.M. (2001) Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading, Gram-positive bacterium, isolated from intertidal beach sediment, and description of *Planococcus alkanoclasticus* sp. nov. *J Appl Microbiol* **90**: 237–247.
- Farrelly, V., F.A. Rainey and E. Stackebrandt. (1995) Effect of genome size and rrr copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl Environ Microbiol* **61**: 2798–2801.
- Felsenstein, J. (2001) *Phylyp phylogenetic inference package*, version 3.6. Seattle, WA, USA: Department of Genetics, University of Washington.
- Gauthier, M.J., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P., and Bertrand, J.-C. (1992) *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 568–576.
- Giuliano, L., DeDomenico, M., DeDomenico, E., Höfle, M.G., and Yakimov, M.M. (1999) Identification of culturable oligotrophic bacteria within naturally occurring bacterioplankton communities of the Ligurian Sea by 16S rRNA sequencing and probing. *Microbiol Ecol* **37**: 77–85.
- Golyshin, P.N., Chernikova, T., Abraham, W.-R., Lünsdorf, H., Timmis, K.N., and Yakimov, M.M. (2002) *Oleiphilaceae* fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 901–911.
- Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y., and Shutsubo, K. (1999) Petroleum biodegradation in marine environments. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**: 63–70.
- Head, I.M., and Swannell, R.P.J. (1999) Bioremediation of petroleum hydrocarbons contaminants in marine habitats. *Curr Opin Biotechnol* **10**: 234–239.
- Hedlund, B.P., and Staley, J.T. (2001) *Vibrio cyclitrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. *Int J System Evol Microbiol* **51**: 61–66.
- Hedlund, B.P., Geiselbrecht, A.D., Bair, T.J., and Staley, J.T. (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. nov., sp. nov. *Appl Environ Microbiol* **65**: 251–259.
- Hedlund, B.P., Geiselbrecht, A.D., and Staley, J.T. (2001) *Marinobacter* strain NCE312 has a *Pseudomonas*-like naphthalene dioxygenase. *FEMS Microbiol Lett* **201**: 47–51.
- Kasai, Y., Kishira, H., Syutsubo, K., and Harayama, S. (2001) Molecular detection of marine bacterial populations on beaches contaminated by *Nakhodka* tanker oil-spill accident. *Environ Microbiol* **3**: 1–10.
- Kasai, Y., Kishira, H., and Harayama, S. (2002a) Bacteria belonging to the genus *Cycloclasticus* play a primary role in the degradation of aromatic hydrocarbons released in marine environment. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5625–5633.
- Kasai, Y., Kishira, H., Sasaki, T., Syutsubo, K., Watanabe, K., and Harayama, S. (2002b) Predominant growth of *Alcanivorax* strains in oil-contaminated and nutrient-supplemented seawater. *Environ Microbiol* **4**: 141–147.
- Krebs, C.J. (1989) *Ecological Methodology*. New York, NY, USA: Harper & Row.
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S sequencing. In *Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (eds). New York, NY, USA: Nucleic John Wiley and Sons, pp. 148–163.

- Leahy, J.G., and Colwell, R.R. (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev* **54**: 305–315.
- Lopez-Garcia, P., Moreira, D., Lopez-Lopez, A., and Rodriguez-Valera, F. (2001) A novel haloarchaeal-related lineage is widely distributed in deep oceanic regions. *Environ Microbiol* **3**: 72–78.
- Maidak, B.L., Cole, J.R., Parker, C.T., Garrity, G.M., Larsen, N., Li, B. *et al.* (1999) A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res* **25**: 3389–3402.
- Massana, R., DeLong, E.F., and Perdos-Alio, C. (2000) A few cosmopolitan phylotypes dominate planktonic archaeal assemblages in widely different oceanic provinces. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1777–1787.
- Mullins, T.D., Britschgi, T.B., Krest, R.L., and Giovannoni, S.J. (1995) Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. *Limnol Oceanogr* **40**: 149–158.
- Myers, T.E., and Bowman, D.W. (1999) *Bioremediation of Pah-Contaminated Dredged Material at the Jones Island Cdf: Materials, Equipment, and Initial Operations*. DOER Technical Notes Collection (TN DOER-C5). Vicksburg, MS, USA: US Army Research Engineer Development Center.
- Odum, E.P. (1971) Principles and concepts pertaining to organisation at the community level. In *Fundamentals of Ecology*. Odum, E. (ed.). Philadelphia, PA, USA: Saunders College Publishing, pp. 140–161.
- Prince, R.C. (1993) Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Crit Rev Microbiol* **19**: 217–242.
- Prince, R.C., Elmendorf, D.L., Lute, J.R., Hsu, C.S., Haith, C.E., Senius, J.D. *et al.* (1994) 17 α (H)-21 β (H)-hopane as a conserved internal marker for estimating the biodegradation of crude oil. *Environ Sci Technol* **28**: 142–145.
- Rambaut, A. (1996) *Se-Al (Sequence Alignment Editor)* version 1.0 alpha 1. Distributed by the author and available from <http://evolve.zoo.ox.ac.uk/Se-Al/Se-Al.html>. Oxford, UK: Department of Zoology, University of Oxford.
- Reisfeld, A., Rosenberg, E., and Gutnik, D.L. (1972) Microbial degradation of crude oil: factors affecting the dispersion in seawater by mixed and pure cultures. *Appl Microbiol* **23**: 363–368.
- Röling, W.F.M., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.P.J., and Head, I.M. (2002) Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5537–5548.
- Rontani, J.-F., Borin, P.C., and Volkman, J.K. (1999) Biodegradation of free phytol by bacterial communities isolated from marine sediments under aerobic and denitrifying conditions. *Appl Environ Microbiol* **65**: 5484–5492.
- Rontani, J.-F., Gilewicz, M.J., Michotey, V.D., Zheng, T.L., Bonin, P.C., and Bertrand, J.-C. (1997) Aerobic and anaerobic metabolism of 6,10,14-trimethylpentadecan-2-one by a denitrifying bacterium isolated from marine sediments. *Appl Environ Microbiol* **63**: 636–643.
- Rossello-Mora, R., and Amann, R. (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 39–67.
- Schäfer, H., Bernard, L., Courties, C., Lebaron, P., Servais, P., Pukall, R. *et al.* (2001) Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiol Ecol* **34**: 243–253.
- Swannell, R.P.J., Lee, K., and McDonagh, M. (1996) Field evaluation of marine oil spill bioremediation. *Microbiol Rev* **60**: 342–365.
- Sweeney, R.E., Kalil, E.K., and Kaplan, I.R. (1980) Characterization of domestic and industrial sewage in southern California coastal sediments using nitrogen, carbon, sulphur and uranium traces. *Mar Environ Res* **3**: 225–243.
- Sytsubo, K., Kishira, H., and Harayama, S. (2001) Development of specific oligonucleotide probes for the identification and *in situ* detection of hydrocarbon-degrading *Alcanivorax* strains. *Environ Microbiol* **3**: 371–379.
- Takada, H., and Eganhouse, R.P. (1998) Molecular markers of anthropogenic waste. In *Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation*. Meyers, R.A. (ed.). New York, NY, USA: John Wiley, pp. 2883–2940.
- Takada, H., Ogura, N., and Ishiwatari, R. (1992) Seasonal variations and modes of riverine input of organic pollutants in coastal zone: 1. Flux of detergent-derived pollutants to Tokyo Bay. *Environ Sci Technol* **26**: 2517–2523.
- Volkman, J.K., and Maxwell, J.R. (1986) Acyclic isoprenoids as biological markers. In *Biological Markers in the Sedimentary Record*. Johns, R.B. (ed.). Amsterdam, the Netherlands: Elsevier, pp. 1–46.
- Volkman, J.K., Revill, A.T., and Murray, A.P. (1997) Applications of biomarkers for identifying sources of natural and pollutant hydrocarbons in aquatic environments. In *Molecular Markers in Environmental Geochemistry*. Eganhouse, R.P. (ed.). Washington, DC, USA: American Chemical Society Symposium Series 671. pp. 110–132.
- Wang, Z., Li, K., Fingas, M., Sigouin, K., and Ménard, L. (2002) Characterization and source identification of hydrocarbons in water samples using multiple analytical techniques. *J Chromatogr* **971**: 173–184.
- Weinbauer, M.G., Beckmann, C., and Hofle, M.G. (1998) Utility of green fluorescent nucleic acid dyes and aluminum oxide membrane filters for rapid epifluorescence enumeration of soil and sediment bacteria. *Appl Environ Microbiol* **64**: 5000–5003.
- Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., Lang, S., Moore, E.R.B., Abraham, W.-R., Luensdorf, H., and Timmis, K.N. (1998) *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 339–348.
- Yakimov, M.M., Giuliano, L., Crisafi, E., Chernikova, T.N., Timmis, K.N., and Golyshin, P.N. (2002) Microbial community of a saline mud volcano at San Biagio-Belpasso, Mt. Etna (Italy). *Environ Microbiol* **4**: 249–256.
- Yakimov, M.M., Giuliano, L., Gentile, G., Crisafi, E., Chernikova, T.N., Abraham, W.-R. *et al.* (2003) *Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov., a new hydrocarbonoclastic marine bacterium, isolated from an Antarctic coastal seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 779–785.
- Yakimov, M.M., Giuliano, L., Denaro, R., Crisafi, E., Chernikova, T.N., Abraham, W.-R. *et al.* (2004) *Thalassolituus oleivorans* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 141–148.

CAPITOLO II:
ANALISI DELL'EFFETTO SCALA

CAPITOLO II: ANALISI DELL'EFFETTO SCALA

INTRODUZIONE

SPERIMENTAZIONI in MICROSCALA

MATERIALI e METODI

Ingegneria e Set-up dei microcosmi

Schema delle sperimentazioni in microscala

Tempistica e Campionamento

Misura dei Parametri funzionali

RISULTATI

DISCUSSIONI e CONCLUSIONI

PUBBLICAZIONE n°4

Cappello S., Caruso G., Zampino D., Yakimov M. M., Monticelli S. L., Tripodo B., Troussellier M. e Giuliano L. (2005).

Microbial community dynamics during assays of an harbour oil spill bioremediation: a microscale simulation study

Submittet for pubblication in *Journal Applied Micrbiology* (Impact factor 1.834).

SPERIMENTAZIONI in MESOSCALA

MATERIALI e METODI

Ingegneria dei mesocosmi

Set-up dei mesocosmi

Schema delle Sperimentazioni in mesoscala

Tempistica e Campionamento

Misura dei Parametri Funzionali

RISULTATI

DISCUSSIONE e CONCLUSIONE

DISCUSSIONI e CONCLUSIONI GENERALI

INTRODUZIONE

L'analisi della letteratura ecologica di questi ultimi anni rivela la presenza di due tendenze parallele. La prima sottolinea un sempre maggiore utilizzo di sistemi sperimentali chiusi (microcosmi, mesocosmi) come strumento per lo studio dei sistemi ecologici ambientali (Ives *et al.*, 1996; Kemp *et al.*, 1980; Odum 1984; Kareiva 1989). La seconda tendenza è legata alla presa di coscienza dell'importanza della scala e del tempo come fattori determinanti nella comprensione dei fenomeni ecologici. Questo è particolarmente evidente se si vede il forte aumento delle pubblicazioni scientifiche che hanno tra le keywords il termine di *scala* e la sempre maggiore presenza di libri su quest'argomento (Peterson *et al.*, 1998).

I sistemi in scala sono stati ampiamente accettati come strumento di studio nell'ecologia sperimentale perché essi permettono la riproduzione di un ecosistema naturale sotto condizioni controllate e con caratteristiche di replica e di ripetibilità (Kemp *et al.*, 1980; Odum 1984).

Tuttavia parallelamente all'enfasi per i mesocosmi il numero delle domande sviluppatesi è sempre maggiore. Nell'utilizzo di questi ecosistemi miniaturizzati è implicito il concetto che le dinamiche dei processi realizzate possono riprodurre chiaramente quelle presenti negli ecosistemi naturali.

Le differenze di scala rendono un sistema pilota diverso dall'ecosistema naturale che è caratterizzato, di norma, da un'ampia serie di fenomeni naturali non sempre riproducibili. Tale differenza di scala è il punto chiave della critica all'utilizzo di queste strutture per lo studio dei fenomeni ecologici (Schindler 1998; Carpenter 1999); tanto che numerosi ricercatori hanno identificato (la scala) come uno, se non il, problema critico di questo tipo di approccio sperimentale (Petersen *et al.*, 1999; Kemp *et al.*, 1980; Lodge *et al.*, 1998).

Il concetto di scala può essere collegato alla comprensione dei numerosi fattori teorici e tecnologici che hanno aumentato la nostra conoscenza dei collegamenti causali fra i fenomeni locali, regionali e globali; la crescente consapevolezza dell'effetto umano sulle scale; e la formalizzazione della scala come soggetto legittimo della richiesta all'interno del campo ecologico.

Sebbene il problema della scala è relativamente nuovo all'ecologia (Kemp *et al.*, 2001), altre discipline hanno una sostanziale esperienza nel trattare questo fenomeno; difatti l'analisi dimensionale è una tecnica adottata già da parecchi anni, ad esempio, dagli ingegneri che disegnano modelli in scala (aeroplani, valvole, canali ecc.) che conservano funzioni specifiche attribuite ai grandi sistemi di interesse (Langharr 1991).

Per esaminare l'impatto della scala sull'ottimizzazione dei sistemi sperimentali sono stati utilizzati, generalmente, tre approcci distinti.

Il primo conduce alla creazione di esperimenti in multiscala in cui le scale temporali e spaziali sono sistematicamente variate. Studi hanno rivelato che cambiamenti nella scala spaziale possono influire

sulla varietà delle variabili ecologiche, includendo la selezione di organismi (Stephenson *et al.*, 1984), il rapporto preda-predatore (Luckinbill 1974), la diversità di specie (Dickerson *et al.*, 1986), la struttura della catena alimentare (Spencer *et al.*, 1996), l'impatto ecologico delle tossine (Morris *et al.*, 1994) e la dominanza relativa delle popolazioni di parete (Chen *et al.*, 1997).

Il secondo tipo di approccio si basa sulla comparazione dei risultati ottenuti durante le sperimentazioni condotte in mesocosmi con quelle ottenute nell'ecosistema naturale (Sardelle 1997).

Un terzo metodo conta, per mezzo di vasta indagine della letteratura, l'identificazione di una scala ottimale di ricerca e di studio.

Sebbene la scale e le sperimentazioni sono concettualmente legate, queste rimangono maldestramente disconnesse nella pratica.

È riconosciuto comunemente che le scale selezionate per ricerca riflettono un equilibrio fragile fra controllo (la capacità di collegare la causa e l'effetto, la replica e la ripetizione degli esperimenti), il realismo (il grado a cui risulta esattamente la natura mimica) e la generalità (la larghezza dei sistemi differenti a cui i risultati sono applicabili).

Normalmente l'utilizzo dei mesocosmi è correlato all'evidenza di tre problemi distinti della scala.

Il primo ed il più evidente, è che gli ecosistemi riprodotti nei mesocosmi sono, per definizione, in una scala spaziale ridotta rispetto le controparti naturali; così come ridotte sono anche la scala temporale, la durata degli esperimenti, la tempistica di molti processi ecologici, i tassi di materiale, le vie geochimiche e i livelli funzionali (Petersen *et al.*, 1999).

Esempi di complessità ridotta relativa all'utilizzo dei mesocosmi includono, in natura, i riduzioni nella struttura trofica (numero di livelli trofici) e nella larghezza trofica (specie per il livello trofico).

Il secondo problema della scala riguarda gli artefatti connessi alla natura "chiusa" dei sistemi pilota.

Con questo termine possono essere identificati tutte quelle alterazioni riconducibili alle variazioni dipendenti dal volume, dalla profondità e dalla struttura delle vasche di reazione; ad esempio artefatti possono originarsi dalle limitazioni degli scambi biologici e/o energetici con l'ambiente esterno prodotte dalle pareti di contenimento che possono essere un indesiderabile, ma potenzialmente influente, input per la crescita di gruppi di organismi favoriti da questo habitat di bordo.

Numerosi studi hanno difatti dimostrato che, per esempio, la dinamica dei mesocosmi acquatici può essere sopraffatta velocemente dallo sviluppo degli organismi sulle pareti delle vasche di reazione (Harte *et al.*, 1980; Chen *et al.*, 1997). Poiché il rapporto del perimetro del bordo della zona interna diminuisce con l'aumento del formato del mesocosmi, gli artefatti della scala sono collegati inestricabilmente delle modifiche in scala spaziale, un fatto che potenzialmente complica l'interpretazione dei risultati e del confronto fra i sistemi sperimentali che differiscono nelle dimensioni (Petersen *et al.*, 1999).

Il terzo problema strettamente collegato alla scala potrebbe essere identificato con il termine di "distorsioni scalari" e si riferisce alle variazioni ecologiche che accadono mentre la scala è ridotta. Un

breve esempio serve ad illustrare come tali “distorsioni scalari” siano un risultato inevitabile delle riduzioni di scala. Sappiamo che i sistemi in mesoscala sono spesso utilizzati per esplorare gli ecosistemi acquatici che includono sia i componenti pelagici che quelli bentonici (Blumenshine *et al.*, 1997; Petersen *et al.*, 1998). Se si volesse riprodurre (in una struttura poco profonda) un ambiente marino (componente pelagica e bentonica) ed esattamente la luce superficiale e l'intensità di miscelazione che caratterizza il riferimento naturale, si andrà incontro ad un fenomeno di “distorsione scalare” caratterizzato da un'elevata illuminazione per il volume unitario di superficie, un'elevata luce, una variabilità di luce ridotta, aumento delle interazioni bentico pelagiche e riduzione del tempo di miscelazione tra la parte pelagica e quella bentonica per unità di volume di acqua.

In alcune circostanze, le distorsioni nelle dimensioni fisiche possono avere un forte effetto sulle dinamiche ecologiche del fenomeno di interesse (Petersen *et al.*, 1997).

Le “distorsioni scalari” sono inoltre comuni in riferimento alle impostazioni sperimentali. Per esempio, generalmente durante le sperimentazioni in mesoscala, il periodo giorno notte viene realizzato spesso con l'illuminazione artificiale ad intensità costante (per esempio 12:12) e lo scambio materiale con gli compartimentazioni circostanti (ad esempio sistemi di reintegro dell'acqua) è realizzato con sistemi a flusso diretto continuo o a intervalli prefissati (per esempio, una volta al giorno); è facile comprendere che queste condizioni non sono naturalmente presenti negli ecosistemi esterni e derivano da una necessità sperimentale nettamente legate alle dinamiche di laboratorio. Ancora a queste fanno parte tutte le alterazioni dipendenti dalla superficie dell'acqua che si pone come è un importante luogo per lo scambio di gas ed energia fra l'ecosistema sperimentale e il “mondo esterno”; pertanto le pareti stese possono alterare il calore, l'energia e trasferimento di energia luminosa.

E' facile intuire che la sovrapposizione contemporanea di questi differenti tipi di artefatto (volume, profondità, pareti e forma della vasca) genera un serio ostacolo per la comparazione delle dinamiche biologiche di con scale diverse e con l'ambiente naturale.

È pur vero che se negli ultimi anni si è cercato di creare una sorta di corrispondenza tra il tipo di domanda di ricerca in esame e un'opportuna scelta della scala è anche vero che “la scala di un'ottimale scala spaziale e temporale” è in diretta dipendenza di vincoli pratici, quali disponibilità economica, di apparecchiature, vincoli pratici di costruzioni che si pongono, purtroppo, come fattori probabilmente più determinanti del formato del sistema e della durata sperimentale (Davies *et al.*, 1987; Parson *et al.* 1982)

Gli ecosistemi sperimentali chiusi hanno guadagnato la popolarità perché elevano le occasioni per controllo. Tuttavia, un certo numero di critici hanno suggerito che l'alto grado di controllo accordato dal mesocosmi viene con una riduzione concomitante del realismo. Effettivamente molti sostengono che gli esperimenti in scala sono generalmente troppo piccoli per poter esprimere ottimamente i processi ecologici chiave (Schindler 1987; Carpenter *et al.* 1995); si è voluto dimostrare come un

aumento del volume di reazione possa determinare anche un aumento dei livelli trofici in esame, ma che in sistemi chiusi come i mesocosmi generalmente solo i primi tre livelli trofici, cioè quello della produzione primaria, della produzione batterica (II livello) e dell'azione protozoica (III livello) possano essere al massimo analizzati. A seguito di questa semplificazione risulta naturale chiedersi come gli scienziati possano estrapolare risultati e osservazioni, ottenute da sperimentazioni in scala ridotta o di breve durata, da applicare agli ecosistemi naturali o a fenomeni con periodi di realizzazioni molto lunghi.

Per rispondere a questa necessità operativa numero si ricercatori hanno incentrato la loro attenzione su una particolare funzione supplementare della scala (sia spaziale che temporale) identificabile con il concetto del *grain*.

Nel senso più generale, il *grain* si riferisce alla più piccola unità di area o di tempo che possa essere analizzata, ciò si riferisce solitamente come il limite spaziale o temporale di una ricerca. Sia l'area che l'intervallo di tempo possono essere divise in un numero limitato di piccole regioni e di intervallo minori. L'area di queste regioni o la lunghezza di questi intervalli possono essere definite *grain*. Per analogia, è utile da pensare al *grain* in termini di pixel per il centimetro quadrato di una foto digitale (*grain* spaziale) o il un singolo fotogramma di un video (*grain* temporale). Se il *grain* è di ampio, si potrà vedere un'immagine poco definita o uno scorrimento non fluido del filmato, per contro se tale *grain* è ridotto si potrà vedere una foto ad alta definizione o un filmato dai movimenti continui e fluidi.

Su questo concetto si è sviluppata l'idea che la conoscenza accurata del *grain* (intesa come la più piccola zona o il periodo di tempo considerato in un insieme o in un modello in osservazione) se opportunamente rapportato può determinare una conoscenza accurata dell' *homogenous*. (inteso come il più grande periodo di tempo o di area).

Al fine di definire una corretta scala da utilizzare durante le simulazioni (in sistemi artificiali) dei processi di bioremediation e identificare l'influenza che tali variazioni scalari possono avere sui processi biodegradativi del petrolio e sulla selezione di popolazioni microbiche specifiche per la degradazione degli idrocarburi (sempre nei sistemi simulati), in questa parte di lavoro sono state realizzate, in parallelo, delle sperimentazioni di "oil spill" in microscala e in mesoscala.

Le sperimentazioni in microscala sono state realizzate in microcosmi dalla capacità volumetrica di 100 litri, mentre per quelle in mesoscala (mesocosmi) sono state utilizzate delle vasche con capacità volumetrica di 10.000 litri.

Sono state allestite tre tipi di sperimentazioni. La prima è stata indicata come una sperimentazione di controllo allestendo una vasca solo con acqua di mare; nelle altre due sono state simulate condizioni di bioremediation chimica, tramite aggiunta di nutrienti inorganici e biodispersanti (l'EPS-2003).

SPERIMENTAZIONI in MICROSCALA

Al fine di valutare l'effetto della scala nella riproduzione dei processi di “oil spill bioremediation” in sistemi pilota *ex situ*, sono state allestite in parallelo tre differenti sperimentazioni in microscala (microcomi) e in mesoscala (mesocosmi).

Basandoci sulle prove precedentemente realizzate (Capitolo I), i parametri biotici e abiotici sono stati accuratamente analizzati nel corso delle stesse sperimentazioni.

MATERIALI e METODI

Ingegneria e Set-up dei microcosmi

La struttura ingegneristica e il set-up delle vasche di reazione per le sperimentazioni in microscala, utilizzate in questa parte di lavoro, sono state precedentemente descritte (Capitolo I – *Paragrafo II*).

Schema delle Sperimentazioni in microscala

Nella prima sperimentazione (*microcosmo 1*) la vasca di reazione è stata allestita esclusivamente con 70 litri di acqua di mare.

Nel secondo esperimento (*microcosmo 2*) alla stessa quantità di acqua di mare sono stati aggiunti dei Sali di fosfato di potassio monobasico (KH_2PO_4), cloruro d'ammonio (NH_4Cl) e nitrato di sodio (NaNO_3), rispettivamente come fonte inorganica di fosfato, ammonio e nitrato sono stati aggiunti alle concentrazioni rispettivamente di 0.077, 0.2 gr e 0.1 gr/L e . del petrolio greggio alla concentrazione di 0.01 gr/L. Il petrolio greggio utilizzato in questo lavoro è stato del tipo Arabian Light Crude Oil. Tale greggio, le cui principali caratteristiche chimico fisiche sono state riportate in tabella 3, è generalmente indicato in letteratura come uno dei greggi di riferimento per gli studi di bioremediation.

La terza sperimentazione (*microcosmo 3*) è stata realizzata aggiungendo all'acqua di acqua di mare di 70 litri veniva aggiunto del petrolio greggio (0.01 gr/L) e il disperdente EPS2003 (ENI tecnologie) ad una concentrazione di 0.05 gr/L.

Tempistica e Campionamento

Le sperimentazioni realizzate in microscala sono state condotte per un periodo di tempo di 15 giorni. Ad intervalli di 2, 5, 8, 12 e 15 giorni a partire dal momento dell'inoculo (tempo zero) sub-campioni d'acqua sono stati raccolti direttamente dalle vasche di reazioni per la misura dei parametri funzionali.

Misura dei Parametri Funzionali

Le metodiche per l'analisi dei parametri biotici e abiotici, misurati durante queste sperimentazioni, sono state già precedentemente descritte (Capitolo I – Paragrafo II).

Analisi dei Parametri Abiotici “Chiave”

Determinazione dei nutrienti: Ammoniaca, Nitrati, Nitriti, Fosfati.

Analisi del: Particulate Organic Carbon (POC), Particulate Organic Nitrogen (PON), Dissolved Organic Carbon (DOC).

Analisi quali-quantitativa del petrolio.

Misura del pH e della Temperatura.

Misure Batteriologiche di Abbondanza

Conta delle cellule totali.

Misura delle cellule vitali.

Conteggio cellulare tramite Citometria a Flusso.

Misure Batteriologiche di Diversità

Conteggio dei batteri eterotrofi coltivabili (CFU).

Conteggio dei batteri capaci di utilizzare il petrolio.

Isolamento dei batteri idrocarburo degradanti (HCB).

Diversità Coloniale.

Analisi tassonomica del 16S rDNA.

Misure Relative al Metabolismo Batterico

Attività enzimatica.

Biochemical Oxygen Demand (BOD).

Misure di Abbondanza Virale

Misure di Abbondanza degli Heterotrophic Nano Flagellates

RISULTATI

Determinazione dei nutrienti: Ammoniaca, Nitrati, Nitriti, Fosfati.

Al fine di misurare la disponibilità microbica dei nutrienti inorganici e analizzare il flusso degli stessi durante le sperimentazioni condotte in microscala sono state misurate le concentrazioni del fosfato, dell'ammonio e dell'azoto (intesi come nitriti e nitrati) come mostrato nelle tabelle corrispondenti (tabella 16, 17 e 18).

<i>microcosmo 1</i>					
	PO₄	NH₄	NO₂	NO₂+NO₃	NO₃
Time (days)	μmoli				
0	0,51	0,73	0,44	11,44	11,00
7	0,23	0,11	0,12	9,51	9,39
15	0,59	0,26	0,13	7,64	7,52

<i>microcosmo 2</i>					
	PO₄	NH₄	NO₂	NO₂+NO₃	NO₃
Time (days)	μmoli				
0	0,66	0,58	0,31	7,70	7,39
7	0,21	0,04	0,22	5,34	5,12
15	1,04	0,49	0,13	4,88	4,75

<i>microcosmo 3</i>					
	PO₄	NH₄	NO₂	NO₂+NO₃	NO₃
Time (days)	μmoli				
0	39,33	68,69	1,86	69,71	67,85
2	42,12	57,78	9,41	68,55	59,14
7	41,96	61,27	0,19	30,03	29,84
15	41,02	60,28	9,89	114,76	104,87

Tab. 16, 17 e 18. **Analisi della concentrazione dei nutrienti inorganici misuranti durante le sperimentazioni in microscala secondo le sperimentazioni corrispondenti.**

Analisi quali-quantitativa del petrolio.

La [figura 55](#) mostra il cromatogramma realizzato, tramite analisi CG-MS, su di un campione di acqua di mare prelevato prima dell'inizio delle sperimentazioni. I risultati ottenuti mostrano la totale assenza di contaminazioni idrocarburiche o di altre sostanze chimiche che avrebbero potuto influenzare il corretto svolgimento delle sperimentazioni.

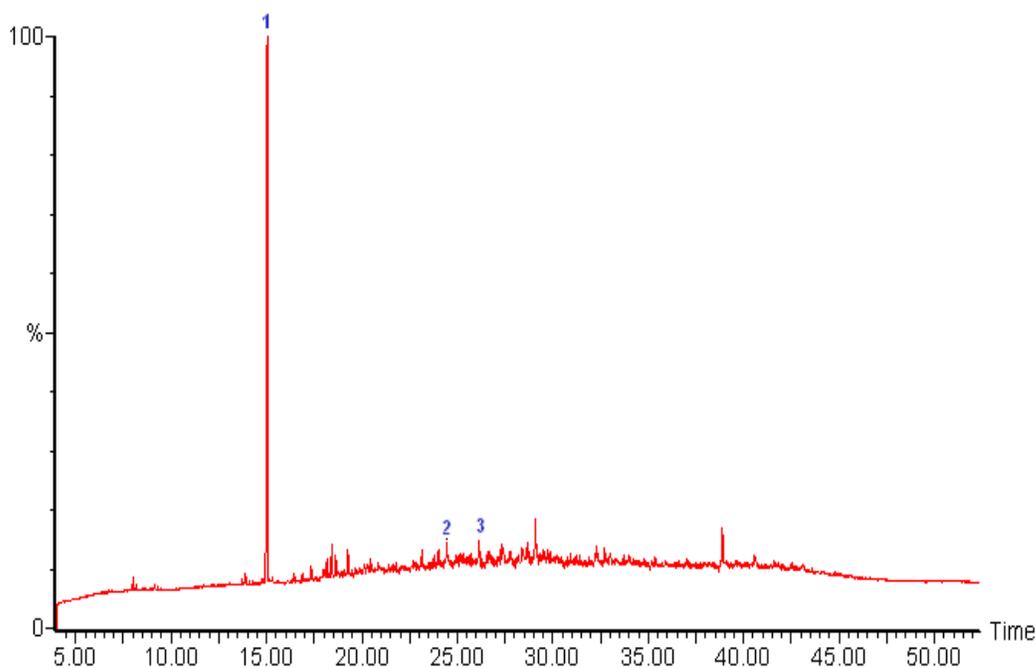


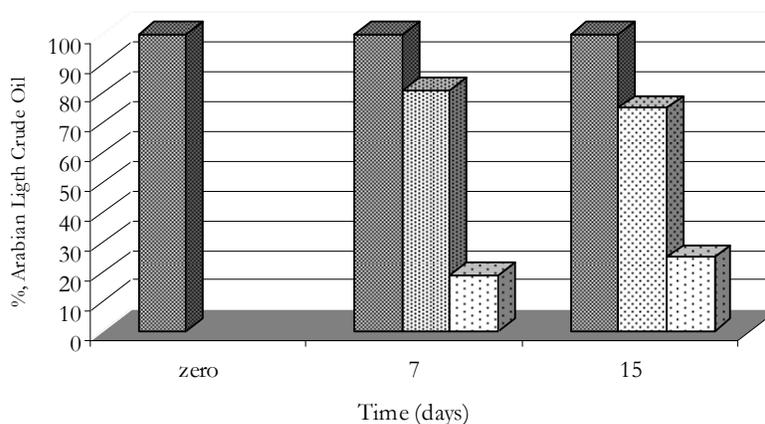
Fig. 55. Cromatogrammi, realizzati tramite analisi CG-MS, che mostrano la totale assenza di contaminanti idrocarburici nell'acqua marina utilizzata durante le nostre sperimentazioni. Con il numero 1 viene indicato il picco corrispondente al nonano (standar interno di processo), mentre con i numeri 2 e 3 identificano rispettivamente il fitano e il pristano (identificati come standard di analisi).

Calcolo dell'indice $(C_{17}/Pr + C_{18}/Ph)/2$. Con riferimento al lavoro di Marty (1994) è stato calcolato del rapporto tra la quota del *fitano* (2,6,10,14- C_{20}) e quella del *pristano* (n- C_{18}) al fine di normalizzare i risultati ottenuti dall'analisi CG-MS e misurare l'intensità della degradazione microbica del petrolio greggio (tabella 19).

Experimentation	Time (days)	C17/Pr	C18/Ph	$(C17/Pr + C18/Ph)/2$
<i>microcosmo 2</i>	zero	0,89	1,34	1,115
	7	1,72	1,19	1,455
	15	1,2	1,29	1,245
<i>microcosmo 3</i>	zero	1,23	1,07	1,15
	7	0,92	0,75	0,835
	15	1,4	0,9	1,15

Tab. 19. Rapporto *fitano/pristano* durante le sperimentazioni realizzate in microscala.

Microcosmo 2. Dopo sette giorni di sperimentazione circa il 19% del petrolio greggio addizionato nella vasca di reazione è stato degradato dalla componente microbica. Il tasso di degradazione incrementa (raggiungendo valori del 25%) alla fine del periodo di analisi come mostrato in [figura 56](#).



Analisi GS-MS hanno rivelato che frazione degradata risulta costituita, rispettivamente, per il 42 e il 42% del totale da idrocarburi lineari e ramificati e per il 16% dagli idrocarburi ciclici, mentre non è stata osservata alcuna degradazione per la frazione aromatica ([figura 57](#)).

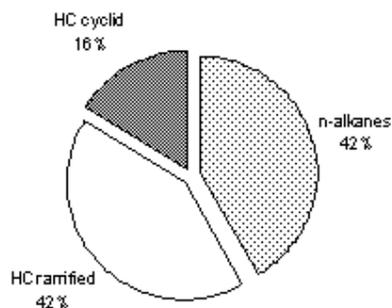


Fig. 57. *Microcosmo 2.* Rappresentazione delle differenti frazioni del greggio interessate ai fenomeni di degradazione durante il quindicesimo giorno di sperimentazione (25% del petrolio totale). Per facilità di rappresentazione ogni frazione al tempo iniziale è stata rappresentata in percentuale assoluta con riempimento scuro, per contro con riempimento chiaro sono state indicate il quantitativo delle frazioni idrocarburiche corrispondenti alla fine della sperimentazione.

La degradazione degli idrocarburi lineari, durante questo periodo è mostrato in [figura 58](#), mentre i cromatogrammi GS-MS corrispondenti sono mostrati in [figura 59](#), [60](#) e [61](#).

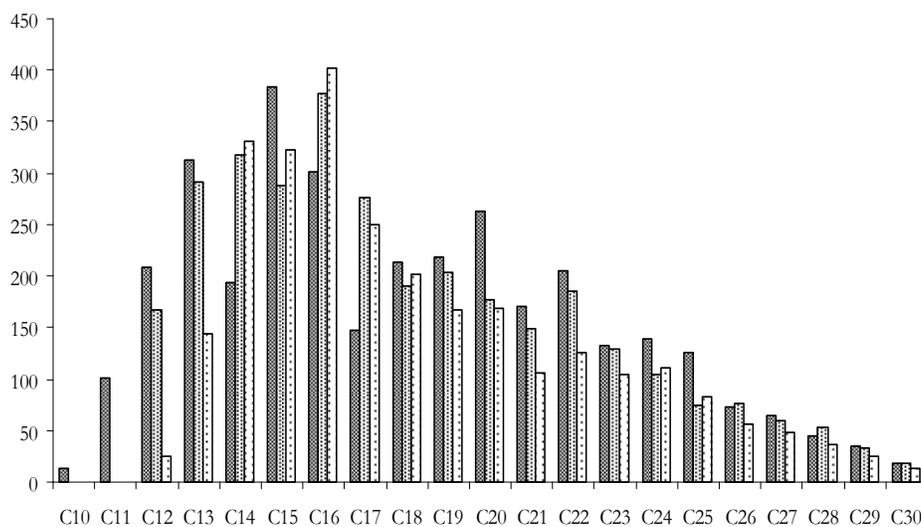


Fig. 58. Distribuzione degli idrocarburi lineari durante la sperimentazione nel *microcosmo 2*. La quota degli n-alcani all'inizio della sperimentazione è identificata in riempimento scuro, mentre in grigio dopo sette giorni e con riempimento chiaro alla fine del periodo di osservazione time (15 days).

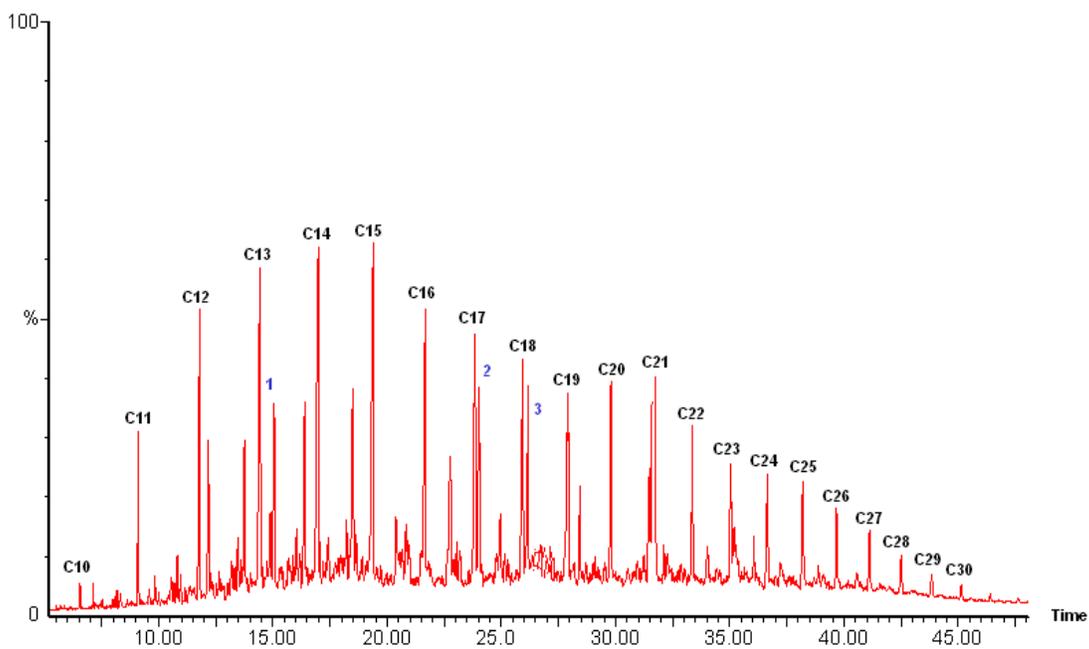


Fig. 59. *Microcosmo 2*. Cromatogramma della distribuzione degli n-alcani all'interno del petrolio all'inizio della sperimentazione. Nonano (1), Fitano (2) e Pristano (3).

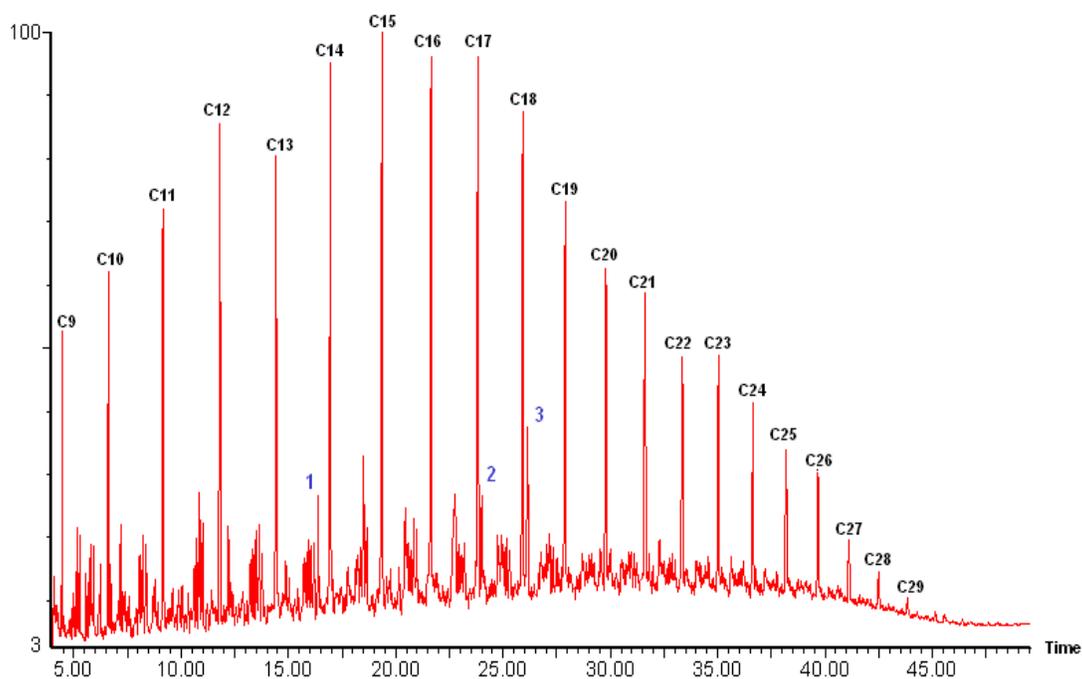
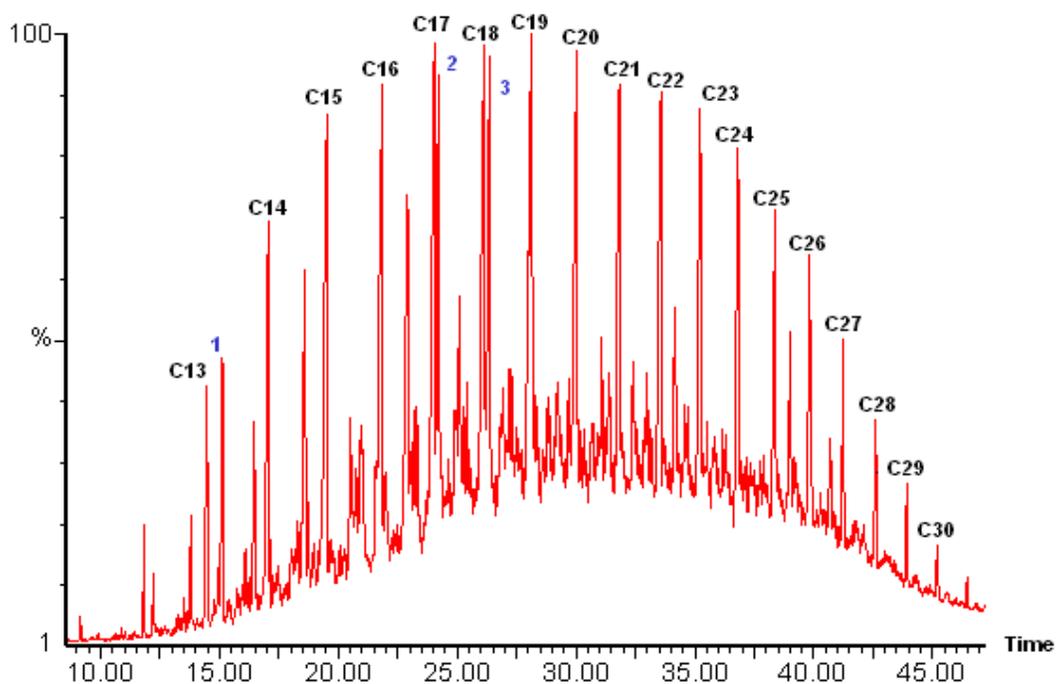


Fig. 61 e 62. I due cromatogrammi mostrano la presenza e la distribuzione degli idrocarburi lineari dopo sette (sopra) e quindici (sotto) giorni di sperimentazione (*microcosmo 2*). I picchi corrispondenti agli n-alcani sono stati opportunamente nominati; con il numero 1 viene indicato il picco corrispondente al nonano con i numeri 2 e 3 sono identificati il fitano e il pristano.

Microcosmo 3. Durante la prova di bioremediation realizzata aggiungendo all'acqua di mare del petrolio greggio e del biosurfattante EPS-2003 la biodegradazione del petrolio interviene in maniera preponderante durante il quindicesimo giorno di sperimentazione raggiungendo valori medi del 24% come mostrato in [figura 62](#).

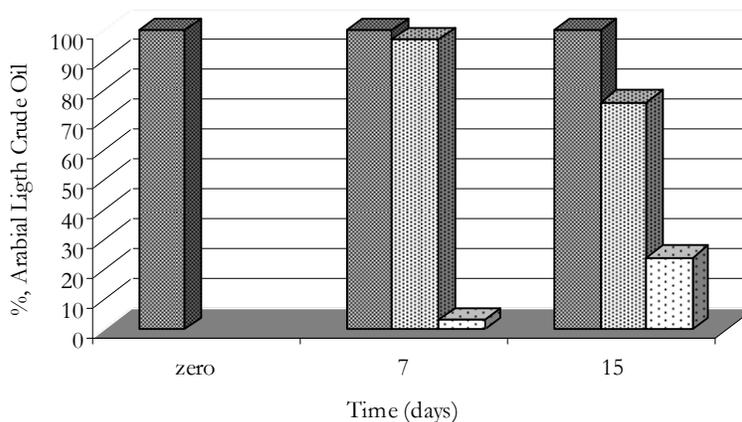


Fig. 62. Degradazione del petrolio Arabian Light Crude Oil durante la sperimentazione con biosurfattante EPS-2003 (*microcosmo 3*). I valori, rappresentati come valore percentuale, indicano il petrolio greggio all'inizio della sperimentazione (riempimento pieno) confrontato con la frazione non degradata (riempimento grigio) e degradata (riempimento chiaro).

Analisi in gas cromatografia hanno identificato che la frazione del petrolio interessata dai processi degradativi era costituita per il 28% del totale dagli n-alcani, mentre gli idrocarburi ciclici e ramificati costituiscono rispettivamente il 32 e il 20%. Un 20% del totale del petrolio degradato è inoltre associabile alla frazione degli idrocarburi ramificati ([figura 66](#)).

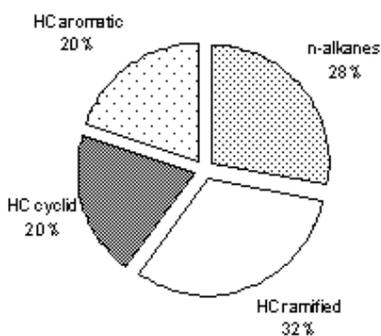


Fig. 66. Rappresentazione delle differenti frazioni del greggio interessate ai fenomeni di degradazione durante il quindicesimo giorno di sperimentazione (24% del petrolio totale). Ogni frazione a tempo iniziale è stata rappresentata in percentuale assoluta con riempimento scuro, per contro con riempimento chiaro sono state indicate le frazioni idrocarburiche corrispondenti alla fine della sperimentazione.

La degradazione degli idrocarburi lineari durante il periodo di sperimentazione è mostrato in figura 68, mentre i corrispettivi cromatogrammi GS-MS sono mostrati in figura 69, 70 e 71.

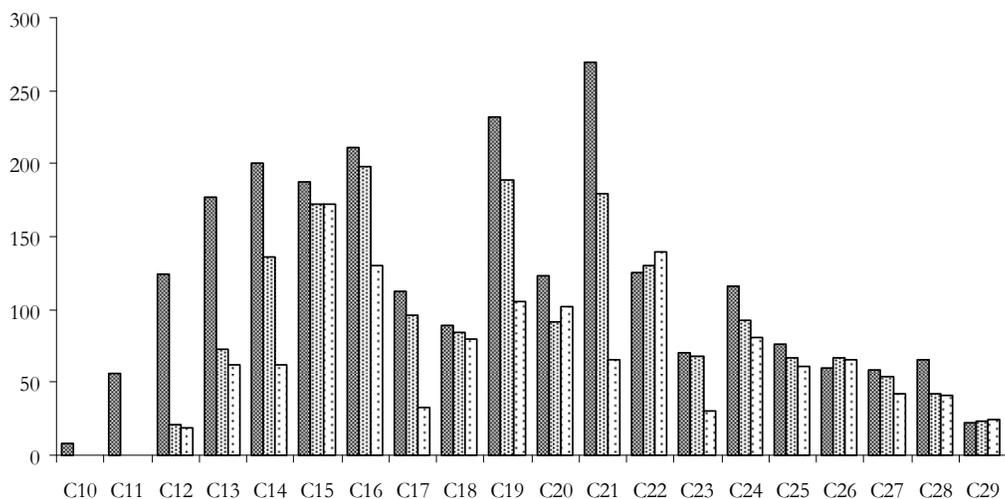


Fig. 68. *Microcosmo 3.* Degradazione degli idrocarburi lineari all'inizio (riempimento scuro), dopo sette (riempimento grigio) e quindici giorni (riempimento chiaro) di sperimentazione.

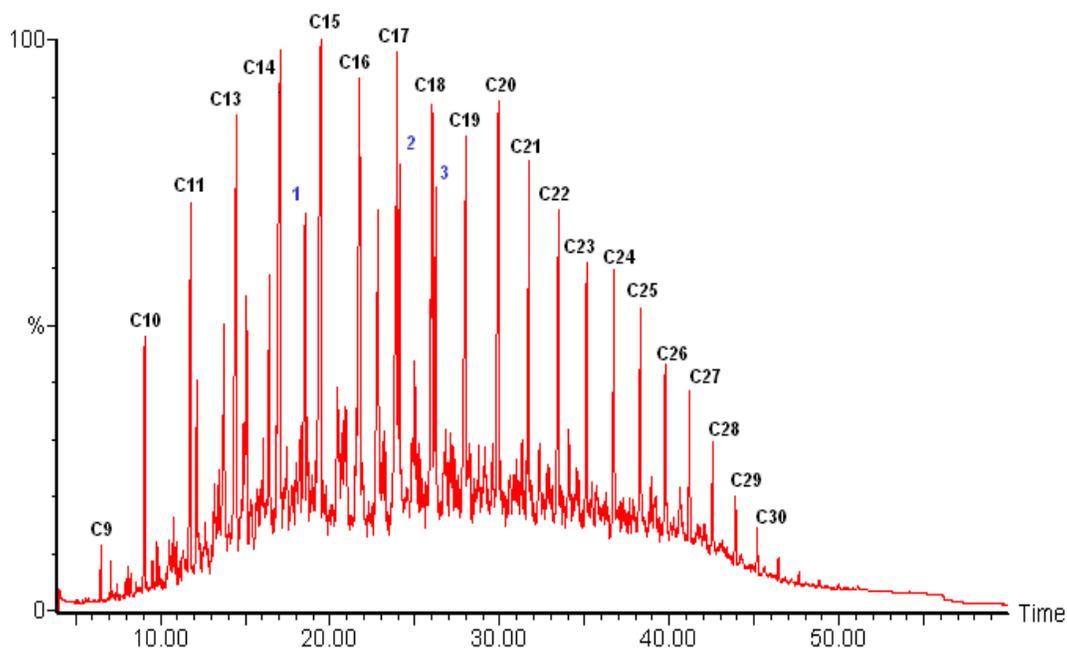


Fig. 69. *Microcosmo 3.* Il cromatogramma si riferisce alla distribuzione degli n-alcani all'inizio della sperimentazione.

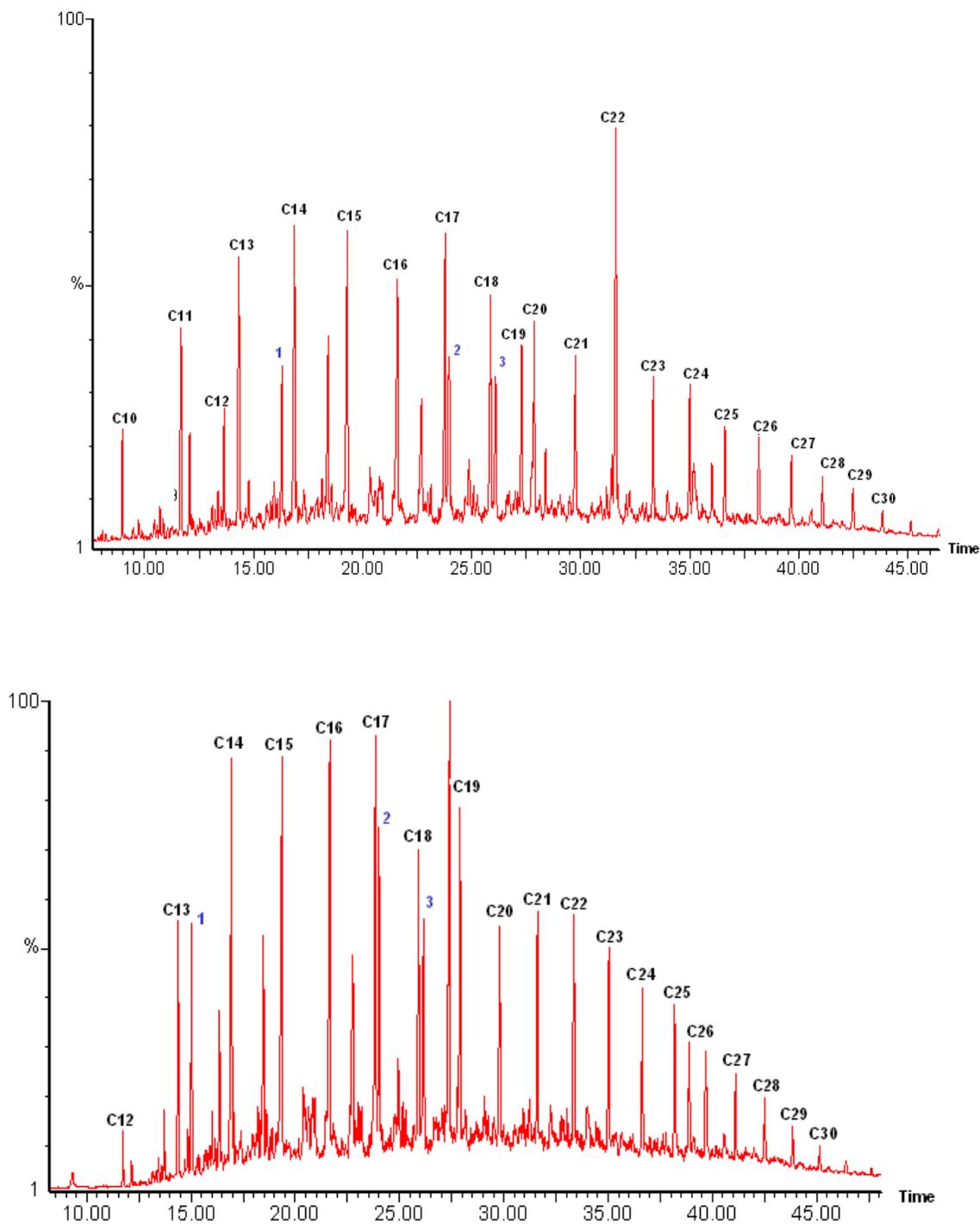


Fig. 70 e 71. Sperimentazione realizzata aggiungendo all'acqua di mare petrolio greggio e biosurfattante EPS-2003 (ENI Tecnologie). Il cromatogramma superiore si riferisce alla presenza degli idrocarburi lineari durante il settimo giorno di sperimentazione, la figura in basso si riferisce per contro alla situazione riscontrata dopo quindici giorni. I picchi corrispondenti agli n-alcani sono stati opportunamente nominati, mentre 1 viene indicato il picco corrispondente al nonano e i numeri 2 e 3 identificano rispettivamente il fitano e il pristano.

Misura del pH e della Temperatura

Le variazioni di pH e di temperatura sono state monitorate ad intervalli regolari di 24 ore nelle differenti sperimentazioni realizzate.

I valori di pH si sono sempre mantenuti costanti con valori medi di 8.7 (dati non mostrati).

Anche la temperatura, all'interno delle vasche di analisi, si è mantenuta costante con valori di circa 20°C con escursioni termiche che non hanno mai ecceduto i 2°C (dati non mostrati).

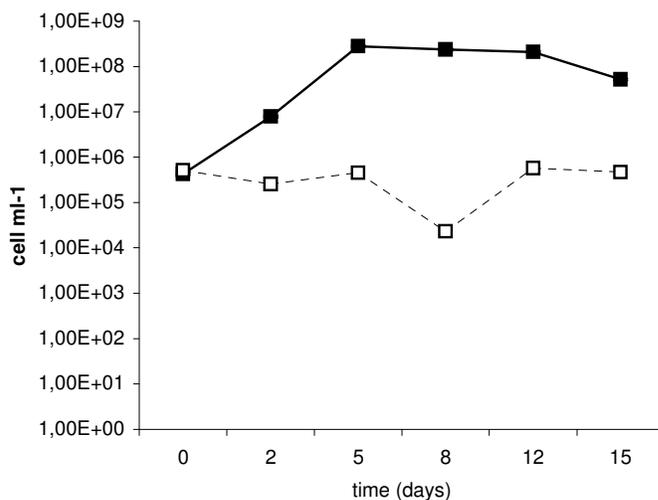
Misure di Abbondanza Batterica

Conta delle cellule totali.

Microcosmo 1. Durante la sperimentazione condotta nel microcosmo allestito con Natural Seawater l'abbondanza del batterioplancton totale si è mantenuta costante per tutto il tempo della sperimentazione con valori medi di 4.5×10^5 cell ml⁻¹ (figura 72).

Microcosmo 2. Nel microcosmo allestito aggiungendo all'acqua di mare petrolio greggio e nutrienti inorganici è possibile riscontrare un incremento della popolazione batterica che passa da valori di 4.3×10^5 cell ml⁻¹ a tempo iniziale (time zero) a valori di 2.8×10^8 cell ml⁻¹ dopo cinque giorni di sperimentazione. Tale incremento si mantiene costante fino al quindicesimo giorno quando diminuisce di un ordine di logaritmo passando a valori di 5.2×10^7 cell ml⁻¹ (figura 73).

Microcosmo 3. Un progressivo aumento della densità dell'abbondanza microbica è mostrato nella sperimentazione condotta aggiungendo all'acqua di mare il petrolio greggio e il biosurfattante esopolissararidico EPS-2003. In questa sperimentazione la concentrazione iniziale di 6×10^5 cell ml⁻¹ aumenta fino a valori di 4.7×10^6 cell ml⁻¹ (time 5 days) raggiungendo il dodicesimo giorno valori medi di 5.7×10^7 cell ml⁻¹ (figura 74).



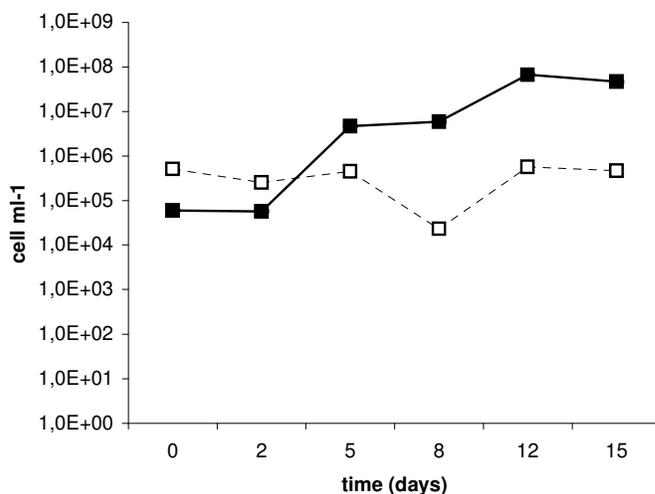


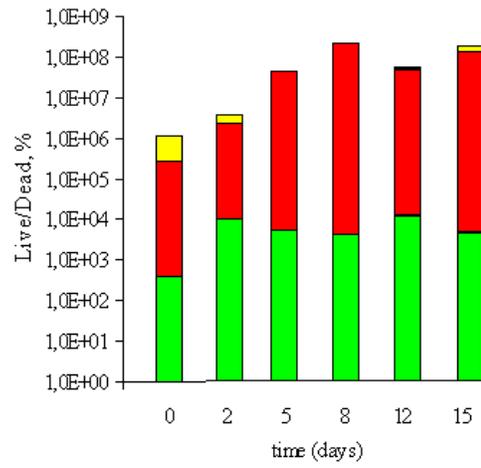
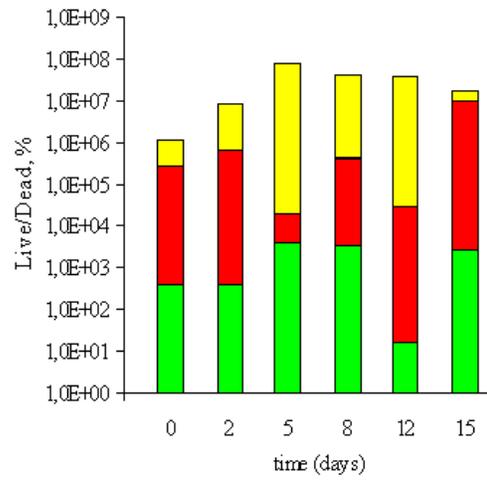
Fig. 72, 73 e 74. Evoluzione dell'abbondanza della popolazione batterica totale. Nella figura in alto è rappresentata la sperimentazione condotta nel *microcosmo 1* (Natural Seawater), al centro il *microcosmo 2* (Seawater con petrolio greggio e nutrienti inorganici) mentre la figura in basso indica il *microcosmo 3* (Seawater con petrolio greggio e EPS-2003). Le linee continue nere indicano il microcosmo in studio, mentre le linee bianche tratteggiate si riferiscono al controllo.

Misura delle cellule vitali (LIVE/DEAD staining).

Microcosmo 1. La misura della popolazione batterica totale presenta un andamento omogeneo con valori medi di 5.6×10^6 cell ml⁻¹ che si mantengono per tutto il periodo di sperimentazione. Anche il conteggio delle cellule vitali e delle cellule morte mostrano un andamento costante con valori rispettivamente di 2.9×10^5 cell ml⁻¹ e di 3.3×10^5 cell ml⁻¹ ([figura 75](#)).

Microcosmo 2. Durante questa sperimentazione l'abbondanza cellulare aumenta progressivamente passando da valori di 1.5×10^5 cell ml⁻¹ a valori di 2.9×10^8 cell ml⁻¹ durante i primi otto giorni di sperimentazione e mantenendosi su questi valori fino alla fine. Un aumento della componente delle cellule vive e delle cellule morte è altresì osservabile nello stesso periodo di tempo con valori che passano da 6.3×10^5 a 2.2×10^8 cell ml⁻¹ per le cellule vive e da 6.9×10^5 a 1.7×10^8 cell ml⁻¹ per le cellule morte. Dopo l'ottavo giorno è registrabile un decremento di un ordine di misura per entrambi i valori ([figura 76](#)).

Microcosmo 3. Gli andamenti della popolazione totale, della componente delle cellule vive e di quelle morte sono mostrati in [figura 77](#).



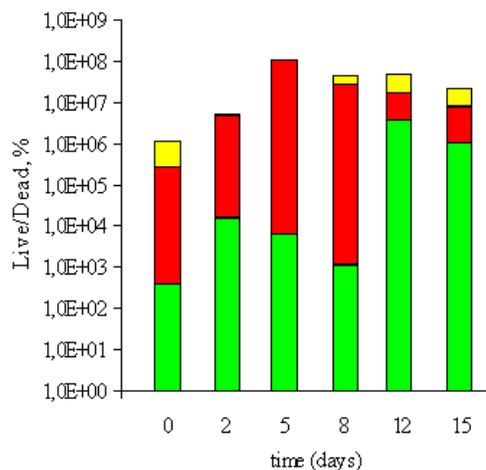


Fig. 75, 76 e 77. Vitalità della popolazione microbica analizzata tramite colorazione fluorescente Live/Dead. Nella pagina precedente (figura in alto) è rappresentata la sperimentazione condotta nel *microcosmo 1*, mentre in basso e visualizzata la sperimentazione identificata come *microcosmo 2*. In questa pagina è mostrata la condizione del *microcosmo 3*. Con il riempimento verde sono indicate le cellule vitali, in rosso quelle morte e in giallo sono identificate tutte quelle cellule (indicate come “MIX”) di difficile interpretazione.

Conteggio cellulare tramite Citometria di Flusso.

Microcosmo 1. Durante questa sperimentazione la concentrazione batterica totale si presenta costante, mostrando per tutto il tempo di analisi valori medi di 1.2×10^5 cell. ml⁻¹ (figura 78). Contemporaneamente l'analisi del quantitativo di DNA cellulare mostra un incremento durante i primi otto giorni di sperimentazione, passando da valori di circa 52% a valori dell'83% durante i primi cinque giorni di analisi e che si mantengono stabili fino alla fine della sperimentazione; per contro durante le prime 48 ore è possibile osservare un decremento del quantitativo del DNA cellulare a basso peso molecolare che si mantiene su valori medi del 25% (figura 79).

Microcosmo 2. Dalle analisi ottenute sulla sperimentazione condotta nel microcosmo contenente acqua di mare, petrolio greggio e nutrienti inorganici, è possibile osservare un lieve incremento della concentrazione microbica rispetto al tempo di inizio della sperimentazione, con valori medi di circa 5.8×10^6 cell ml⁻¹ (figura 80). All'inizio della sperimentazione la popolazione microbica presenta un contenuto di DNA costituito per il 70% da %LDNA (basso peso molecolare) e per (circa) il 30% da %HDNA (ad alto peso molecolare). Durante i primi tre giorni di sperimentazione è osservabile un inversione dei valori che ritornano ai valori iniziali alla fine del quarto giorno per poi mantenersi costante fino alla fine (figura 81).

Microcosmo 3. Non sono state realizzare misure per questa sperimentazione.

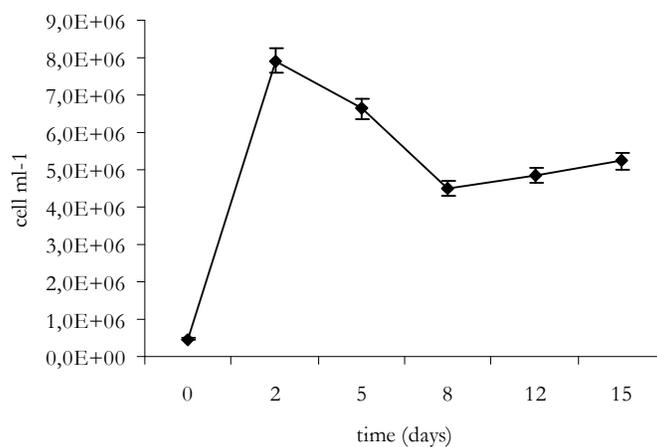
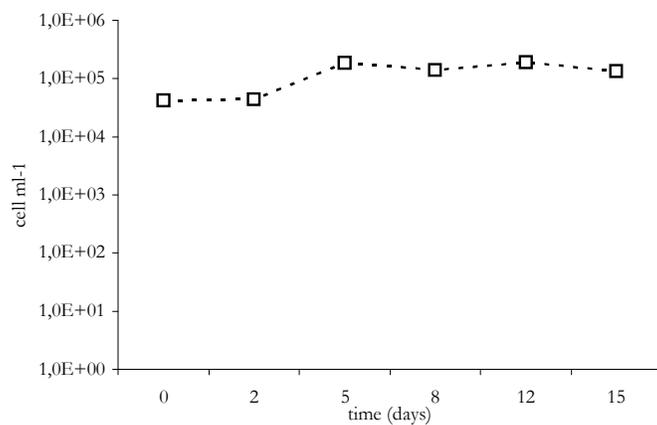
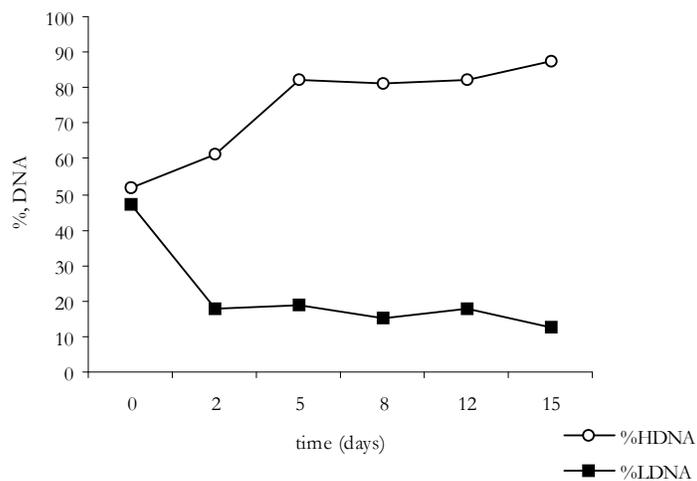


Fig. 78 e 79. Misura quantitativa della popolazione batterica realizzata tramite citometria a flusso nel *microcosmo 1* (in alto) e nel *microcosmo 2* (in basso).



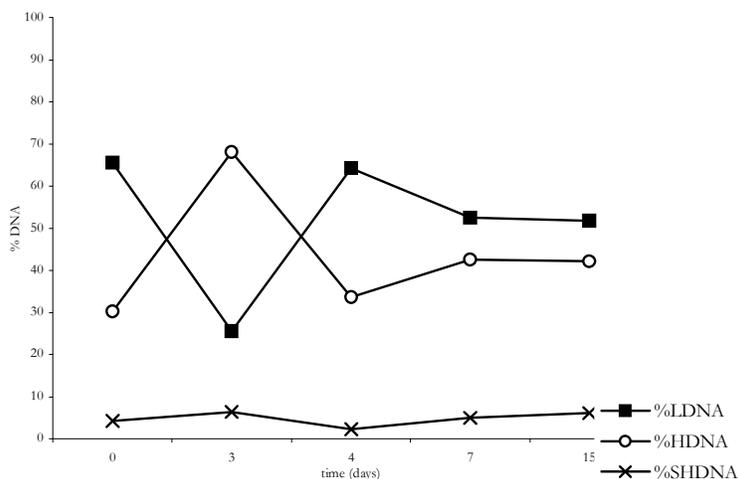


Fig. 80 e 81. Analisi quantitativa e qualitativa del contenuto di DNA cellulare presente nella popolazione microbica durante simulazione in microscala di “oil spill bioremediation” (*microcosmo 2*) e nel microcosmo (*microcosmo 1*) di controllo (solo Seawater nella figura in alto). In leggenda sono mostrati, come valore percentuale, l'andamento del quantitativo di DNA a basso peso molecolare (LDNA), ad alto peso molecolare (HDNA) e del DNA ad altissimo peso molecolare (SHDNA).

Misure di Diversità Microbica

Conteggio dei batteri eterotrofi coltivabili (CFU).

Microcosmo 1. Durante la sperimentazione condotta sul microcosmo allestito con Natural Seawater il numero di batteri eterotrofi coltivabili, misurato come unità formanti colonia (CFU), tende ad aumentare passando da valori medi di 2×10^3 cell ml⁻¹, durante le prime 48 ore di sperimentazioni, a valori di 2.7×10^4 cell ml⁻¹ al quinto giorno. Questi valori sono mantenuti costanti fino alla fine della sperimentazione (figura 82).

Microcosmo 2. Nel microcosmo, allestito aggiungendo all'acqua di mare del petrolio greggio e nutrienti inorganici, è possibile osservare un forte incremento del valore delle CFU che passano da valori di 2.4×10^3 cell ml⁻¹ a valori di 2.4×10^7 cell ml⁻¹ nei primi cinque giorni di sperimentazione. Tali valori si mantengono costanti fino alla fine dell'osservazione (figura 83).

Microcosmo 3. L'aggiunta del biosurfattante EPS-2003 nella vasca di reazione determina un progressivo e costante aumento dei batteri eterotrofi coltivabili. Al tempo iniziale dell'inoculo si osservano valori di 2×10^3 cell ml⁻¹ che in due giorni raggiungono valori di 1.5×10^4 cell ml⁻¹, fino a valori di 6.1×10^5 cell ml⁻¹ registrati all'ottavo giorno. Questi valori tendono a rimanere costanti fino alla fine della sperimentazione (figura 84).

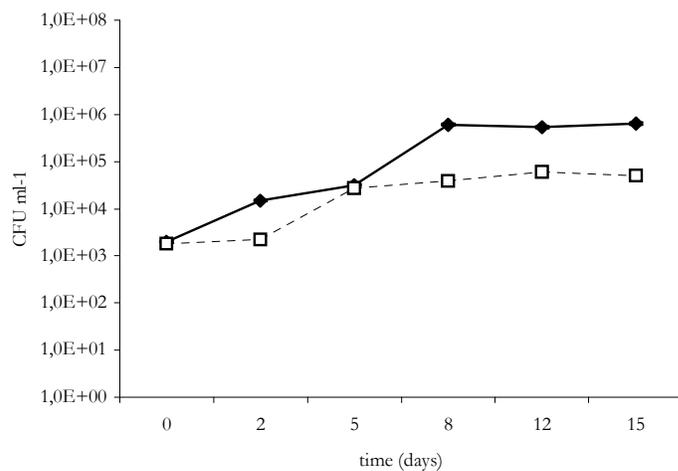
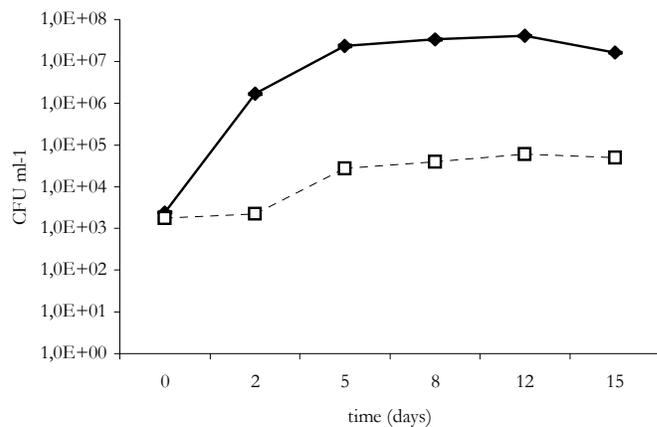
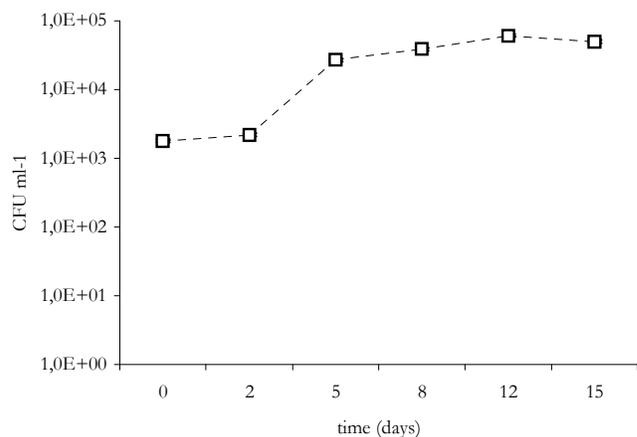


Fig. 82, 83 e 84. Nella pagina precedente sono mostrati gli andamenti della conta dei batteri eterotrofi coltivabili (CFU) durante la sperimentazione condotta nel *microcosmo 1* (in alto), nel *microcosmo 2* (al centro) e *microcosmo 3* (in basso).

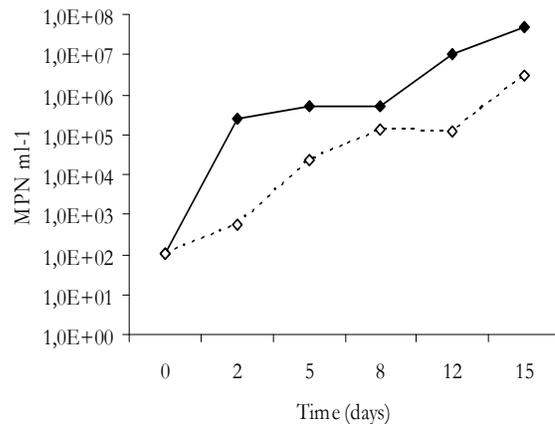
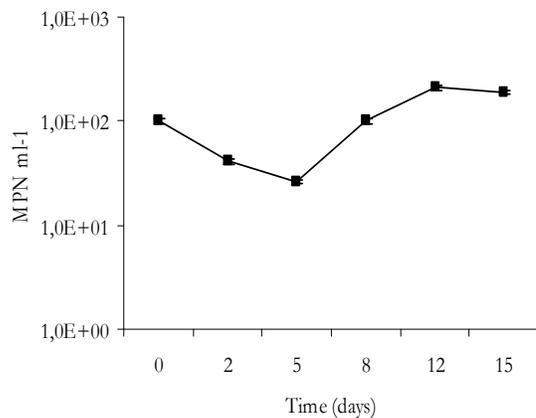
Le linee continue nere indicano il microcosmo in studio, mentre le linee bianche tratteggiate si riferiscono al microcosmo di controllo.

Conteggio dei batteri capaci di utilizzare il petrolio (MPN).

Microcosmo 1. In questa sperimentazione il numero dei batteri idrocarburo degradanti, misurata come Most Probable Number (MPN), si è mantenuto costante per tutto il tempo di analisi con valori medi di 1.1×10^2 MPN ml^{-1} (figura 85).

Microcosmo 2. Un aumento di tre ordini di misura è stato osservato durante i primi due giorni di sperimentazioni con valori che passano da 1.1×10^2 MPN ml^{-1} a 2.1×10^5 MPN ml^{-1} . Questo valore si mantiene costante fino al dodicesimo giorno quando è mostrato un ulteriore aumento con valori medi di 3×10^7 MPN ml^{-1} . (figura 86).

Microcosmo 3. Come è mostrato nella figura 87, nel *microcosmo 3* è possibile osservare, durante il tempo di analisi un progressivo incremento di ben cinque ordini di misura del numero dei MPN con valori che passano da 1.2×10^2 a 3.7×10^7 MPN ml^{-1} .



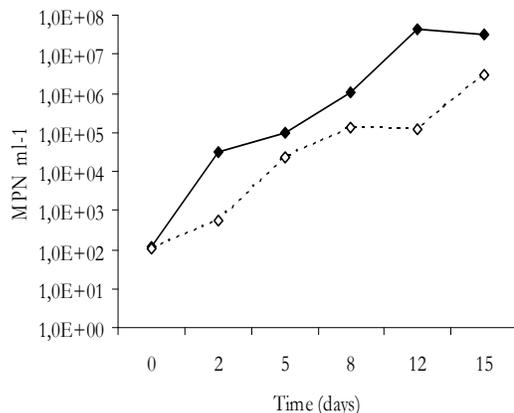


Fig. 85, 86 e 87. Le tre figure mostrano l'andamento della curva del Most Probable Number (MPN) rispettivamente nel *microcosmo 1* (in alto), *microcosmo 2* (al centro) e *microcosmo 3* (in basso). Le linee continue nere indicano il microcosmo in studio, mentre le linee bianche tratteggiate si riferiscono al microcosmo B (Capitolo I) utilizzato come controllo.

Isolamento dei batteri idrocarburo degradanti (HCB).

Microcosmo 1. Dalle piastre di Marine Agar utilizzate per la conta dei batteri eterotrofi coltivabili, relative al quindicesimo giorno di sperimentazione, sono state selezionate, a random, 15 colonie. Tali colonie sono state purificate ed isolate su terreno ONR7a addizionato con del petrolio greggio, come unica fonte di carbonio. In questa condizione, dopo circa tre settimane di incubazione, non è stato isolato nessun ceppo batterico capace di emulsionare il petrolio è stato isolato.

Microcosmo 2. Ben 13 isolati capaci di emulsionare il petrolio sono stati invece isolati durante il microcosmo allestito addizionando a dell'acqua di mare del petrolio greggio con nutrienti inorganici. Dei tredici ceppi batterici isolati, dodici (identificati con le sigle Iso 01-D, Iso 02-D, Iso 03-D, Iso 04-D, Iso 05-D, Iso 06-D, Iso 08-D, Iso 09-D, 13-D, Iso 14-D e Iso 16-D) sono associabili a *Alcanivorax* sp. A28 con un grado di similarità di circa il 97%; per contro solo un ceppo chiamato Iso 07-D è risultato essere correlati alla classe degli α -Proteobacteria ([figura 88](#)).

Microcosmo 3. Non sono state realizzate misure per questa sperimentazione.

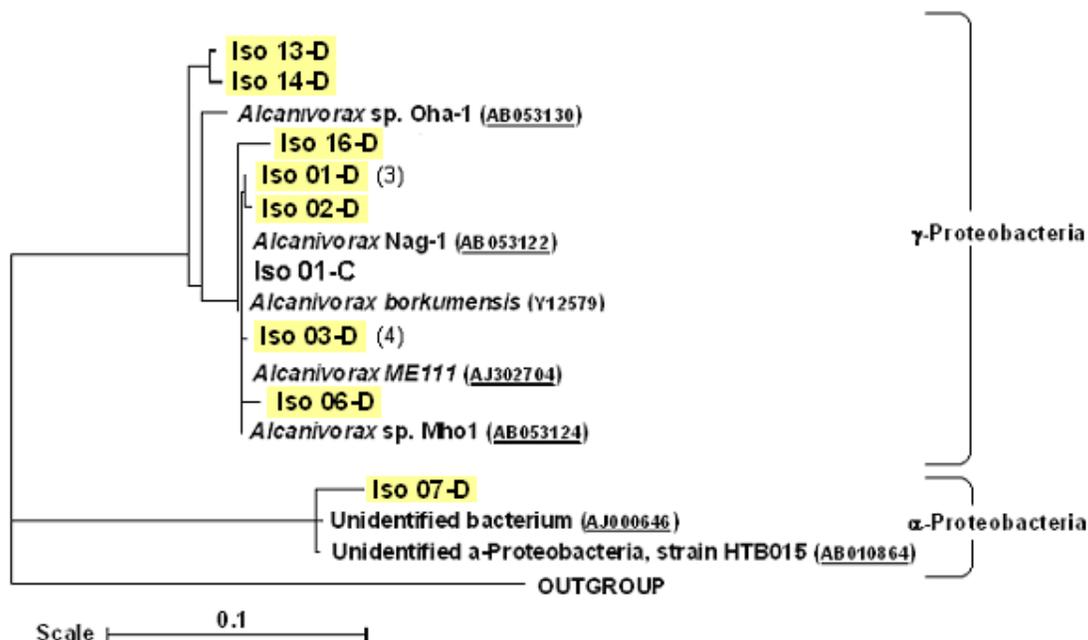


Fig. 88. Albero filogenetico, sviluppato sulla base dell'analisi tassonomica del 16S rDNA, dei ceppi batteri idrocarburo degradanti isolati durante le sperimentazioni condotte in microscala (*Microcosmo 2*). In figura è evidenziata inoltre la posizione tassonomica del ceppo Iso 01-B (*Microcosmo B*- Capitolo I).

Diversità coloniale.

Microcosmo 1. Durante questa sperimentazione la percentuale delle colonie identificate come ST tende a diminuire passando da un valore iniziale del 26.9 %, ad un valore del 10.9%. Per contro le colonie identificate come G, pur mantenendosi stabili con valori medi del 1.8% nei primi cinque giorni aumentano progressivamente passando da un valore di 7.9% (time 8 days) ad un valore del 23% (time 15 days). I valori delle colonie BC1, BC2 e P si mantengono per contro costanti (figura 89).

Microcosmo 2. Nel microcosmo realizzato aggiungendo il petrolio greggio e i nutrienti inorganici le colonie associabili ai gruppi morfologici BC2, ST e G sono interessate, per tutto il tempo di analisi, da una progressiva diminuzione. Per contro, i valori delle colonie tipo BC1 e P incrementano passando da valori, rispettivamente di 20.7 e 31% a valori di 31.6 e 50.5%. (figura 90).

Microcosmo 3. Come è mostrato in figura 91, la presenza delle colonie appartenenti al morfotipo BC1, G e P tende progressivamente ad aumentare passando, rispettivamente, da valori di 20.5, 6.6 e 28.7% a valori di 34.1, 12 e 39.7% alla fine della sperimentazione. La crescita di tali gruppi morfologici è, per contro accompagnata dalla progressiva diminuzione dei gruppi dei BC1 e ST.

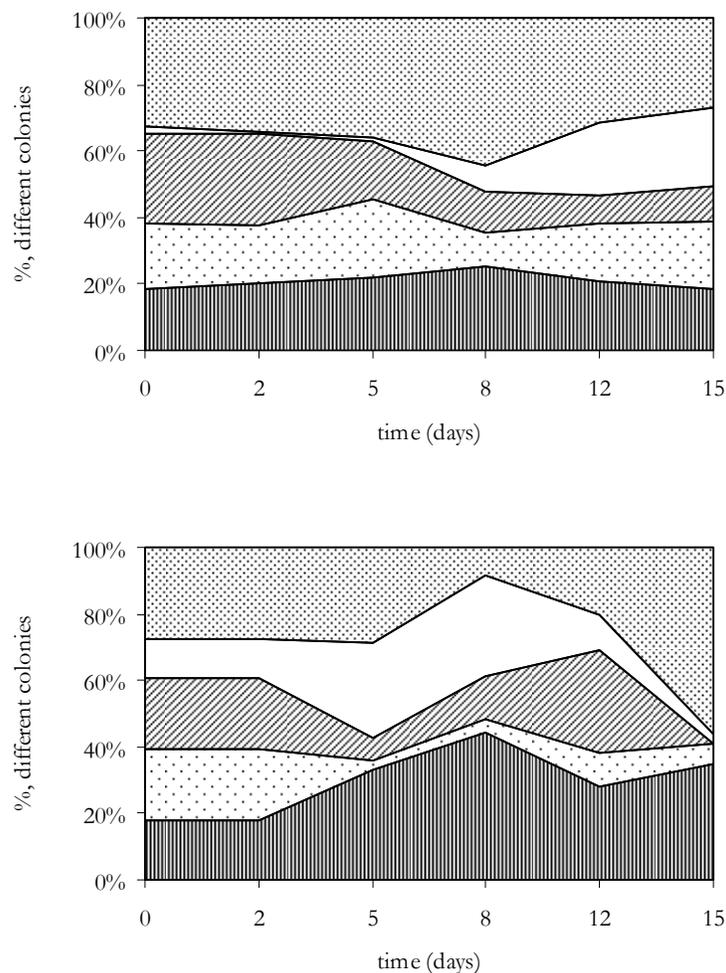


Fig. 89 e 90. Analisi morfologica delle colonie batteriche isolate durante la sperimentazione in *microcosmo 1* e *microcosmo 2*. Le colonie osservate sono state aggruppate in 5 morfotipi, identificati come: BC1 (colonie biancastre, corpo cremoso, Ø 2-8 mm) rappresentate con il riempimento grigio, BC2 (colonie biancastre, corpo cremoso, superficie liscia, Ø 1-1.5 mm) rappresentata con punteggiatura larga, ST (colonie biancastre, corpo semitrasparente, Ø 2-5 mm) in figura con linee oblique, G (colonie pigmentate di giallo, con diversa gradazione caratterizzate da un corpo cremoso o semitrasparente con bordi netti) rappresentate in bianco e P (colonie piccole, Ø inferiore ad 1 mm) rappresentate con una punteggiatura fitta.

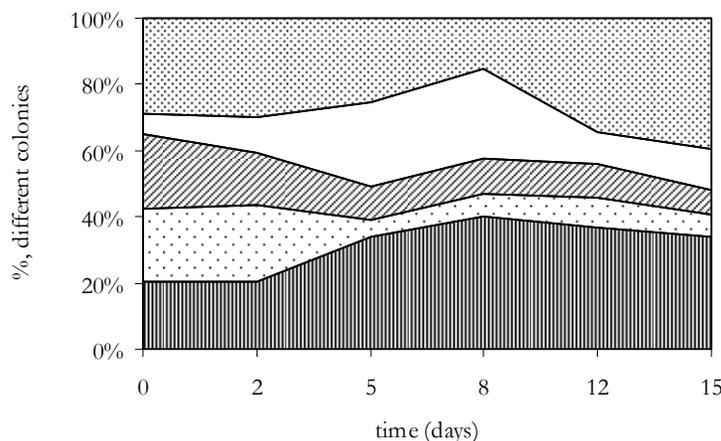


Fig. 91. Analisi morfologica delle colonie batteriche isolate durante la sperimentazione nel *microcosmo 3*. Le colonie osservate sono state aggruppate in 5 morfotipi (vedere testo), identificati come: BC1 (riempimento grigio), BC2 (punteggiatura larga), ST (linee oblique), G (riempimento in bianco) e P (punteggiatura fitta).

Analisi Tassonomica del 16S rDNA.

Microcosmo 1. I cloni appartenenti ai γ -Proteobacteria costituiscono circa il 92% (43 cloni) delle sequenze totali ottenute al tempo iniziale (time zero) della sperimentazione (47 cloni); di questi cloni il 77% era costituito da membri appartenenti alla famiglia delle Alteromonadaceae (comprendendo i filotipi di *Alteromonas* e *Marinobacter*), mentre le altre sequenze erano associabili a membri appartenenti al genere *Oceanospirillum* (14%). Le analisi condotte sulla libreria di cloni ha inoltre evidenziato la presenza (8%) di sequenze associabili al phylum *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) (tabella 20).

L'analisi tassonomica dei cloni (48) durante il secondo giorno di sperimentazione (time 2 days) rivela la presenza di tre gruppi batterici principali, α -(12%), γ -(72%) e CFB group (16%).

Gli α -Proteobacteria includono membri del genere *Sulfitobacter* (2%) e sequenze (10%) correlate con il cluster SAR11 (*Pelagibacter candidatus*) identificato da Giovannoni (2002) come il microrganismo più abbondante del pianeta e quello maggiormente presente tra il bacterioplancton marino. Il gruppo dei γ -Proteobacteria si presenta come gruppo dominante (72%), comprendendo 8 principali gruppi filotipici. Alcuni di questi gruppi corrispondono a specie e generi batterici chemieterotrofi caratteristici degli ecosistemi marini, come *Colwellia*, *Halomonas*, *Pseudomonas* e *Pseudoalteromonas*. Sequenze, correlate con la famiglia delle Alteromonadaceae, costituiscono il gruppo quantitativamente maggioritario (42%). Sequenze affiliate al genere *Cytophaga* (12%) ed ad *uncultured Bacteroides* sono rappresentative del CFB group (tabella 21).

Durante l'ottavo giorno di osservazione (time 8 days) il gruppo degli α -Proteobacteria (12%) si presenta costituito da 3 gruppi filotipici costituiti da batteri eterotrofi aerobi tipici dell'ambiente marino, quali *Pelagibacter*, *Dechlorospirillum* e *Caulobacter*. Sequenze correlabili con la famiglia delle Pseudomonadaceae (29%) ed associabili a unidentified e uncultured γ -Proteobacteria (25%) costituiscono

la porzione numericamente preponderante dei γ -Proteobacteria accando a frazioni minoritarie come *Legionella* (3%), *Microbulbifer* (3%), *Vibrio* (6%) e *Acinetobacter* (3%).

La famiglia delle Flavobacteriaceae (CFB group) costituisce il 13% dei cloni totali con sequenze correlabili al genere *Robiginitalea* (3%) e *Stanierella*.

In piccola percentuale sono stati inoltre trovati cloni affiliati ad altre linee batteriche associabili al genere *Fucophilus* (Verrucomicrobiaceae) ed *Halanaerobium* (Halanaerobiaceae) (tabella 22).

I gruppi filogenetici degli α - (37%) e dei γ -Proteobacteria (46%) costituiscono le frazioni più grandi delle librerie di cloni ottenute dal dodicesimo giorno di analisi (time 12 days). L'analisi di tali librerie ha inoltre mostrato la presenza di altre sequenze associabili ai gruppi dei β -Proteobacteria (10%), dei CFB group (6%) e degli Actinobacteria (2%). All'interno degli α -Proteobacteria ancora cloni associabili al cluster SAR11 (*Pelagibacter candidatus*) e a batteri non coltivabili si presentano come la frazione più numerosa, rispettivamente con il 18 e l'11%, mentre altri gruppi appartenenti ai generi *Caulobacter* (2%), *Caedibacter* (2%) e *Dechlorospirillum* (4%) si presentano minoritari. Il gruppo dei γ -Proteobacteria si presenta composto da 7 principali gruppi filotipici a cui fanno parte sequenze associabili ai generi di *Coxiella*, *Methylococcus* (18%), *Halothiobacillus* (5%), *Actinobacillus* (2%), *Legionella* (3%), *Pseudoalteromonas* (4%) e *Vibrio* (4%) (tabella 23).

Nel quindicesimo giorno di analisi (time 15 days) è possibile osservare un aumento delle sequenze associabili al gruppo dei β -Proteobacteria che raggiungono il 32% del totale (17 cloni su 53 totali) e di cui cloni affiliati al genere *Thiobacillus* (24%) sono i principali rappresentati (17 cloni), accanto a gruppi minoritari quali quello del genere *Methilophilus* (6%) e dei batteri non coltivati e non identificati (β -Other).

Sequenze appartenenti ai γ -Proteobacteria costituiscono il 39% (21 cloni) dei cloni totali e sono principalmente rappresentati da sequenze associate ad *unidentified* ed *unclassified* γ -Proteobacteria (γ -Other) e al genere *Halothiobacillus* (16%).

Tre cloni appartenenti alla famiglia delle Rhodobacteriaceae costituiscono il gruppo degli α -Proteobacteria (6%).

Anche le sequenze affiliate alla classe del CFB group sono interessanti da un incremento (23%) con cloni appartenenti ai generi di *Cellulophaga* (5%), *Marinicola* (4%), *Winogradskyella* (4%), *Roseivirga* e *Flavobacterium*, appartenenti tutti alla famiglia delle Flavobacteriaceae (tabella 24, figura 92, 93, 94, 95 e 96).

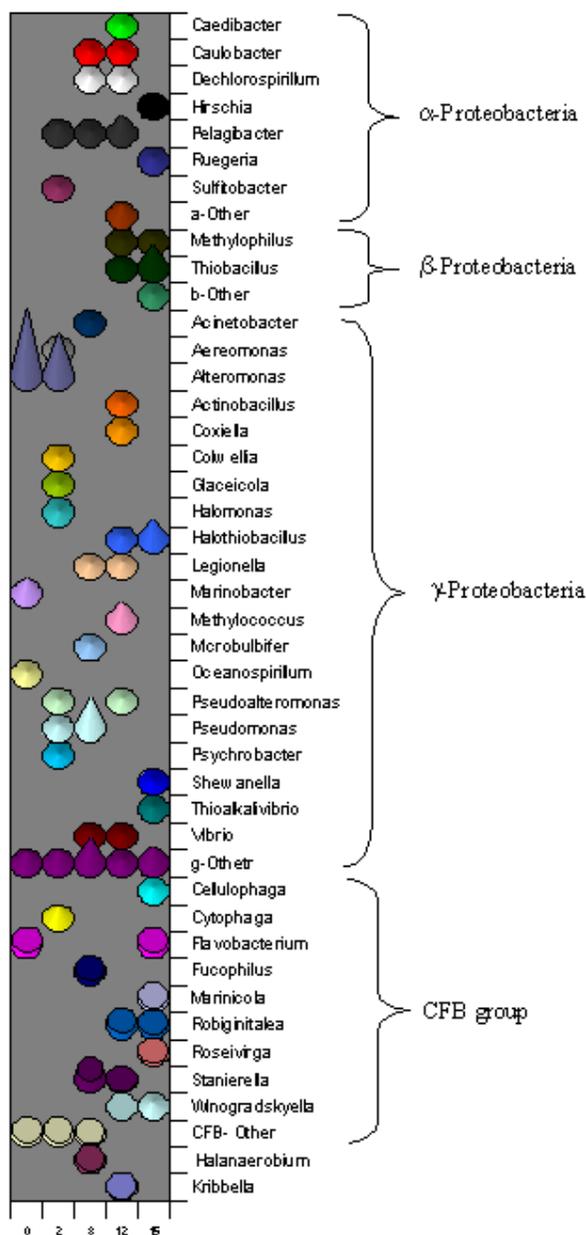


Fig. 92. Distribuzione schematica della popolazione microbica durante la sperimentazione nel *microcosmo 1*.

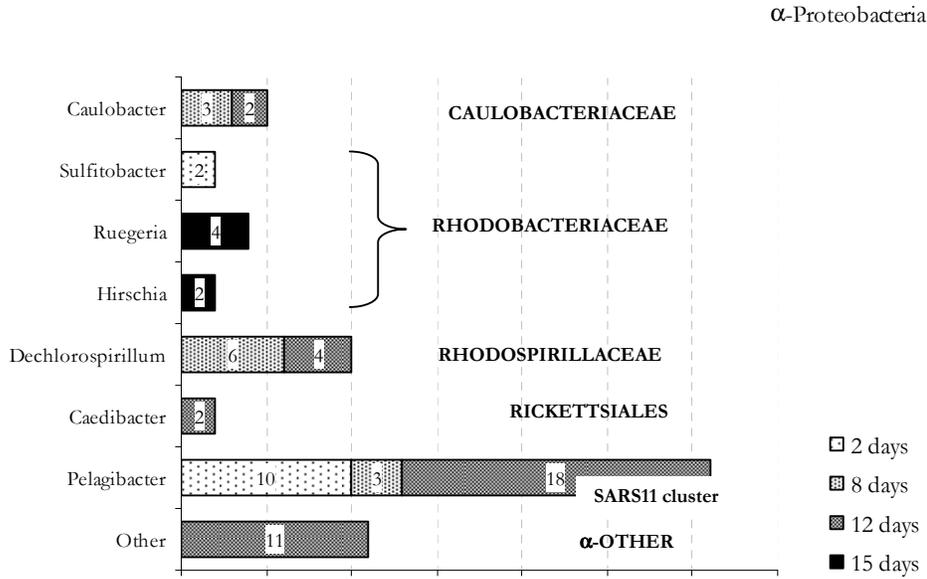


Fig. 93. Distribuzione dei differenti gruppi filogenetici appartenenti agli α -Proteobacteria durante la sperimentazione in *microcosmo 1*. La presenza, espressa in percentuale, è posta all'interno della barra temporale corrispondente. I gruppi batterici sono suddivisi in funzione del genere e della famiglia.

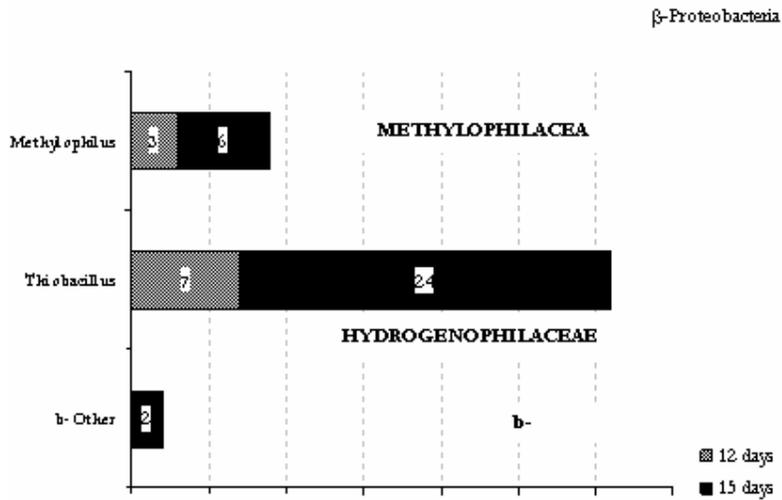


Fig. 94. Distribuzione delle sequenze correlate ai gruppi dei β -Proteobacteria (pagina precedente figura in basso) durante la sperimentazione condotta nel *microcosmo 1*.

γ-Proteobacteria

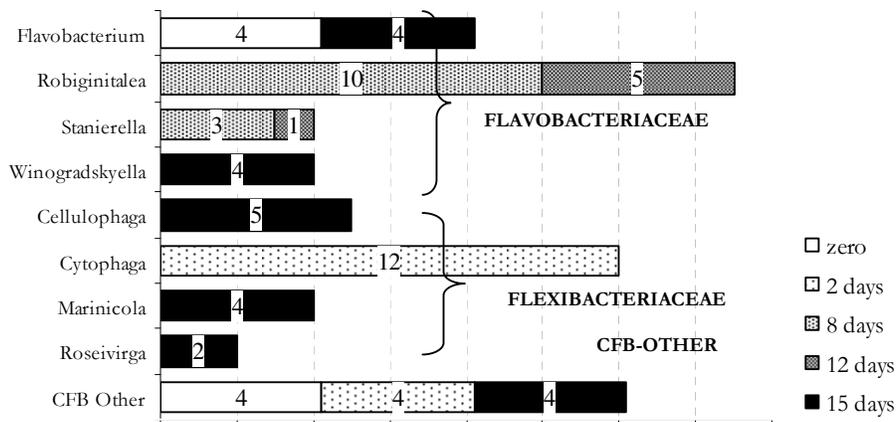
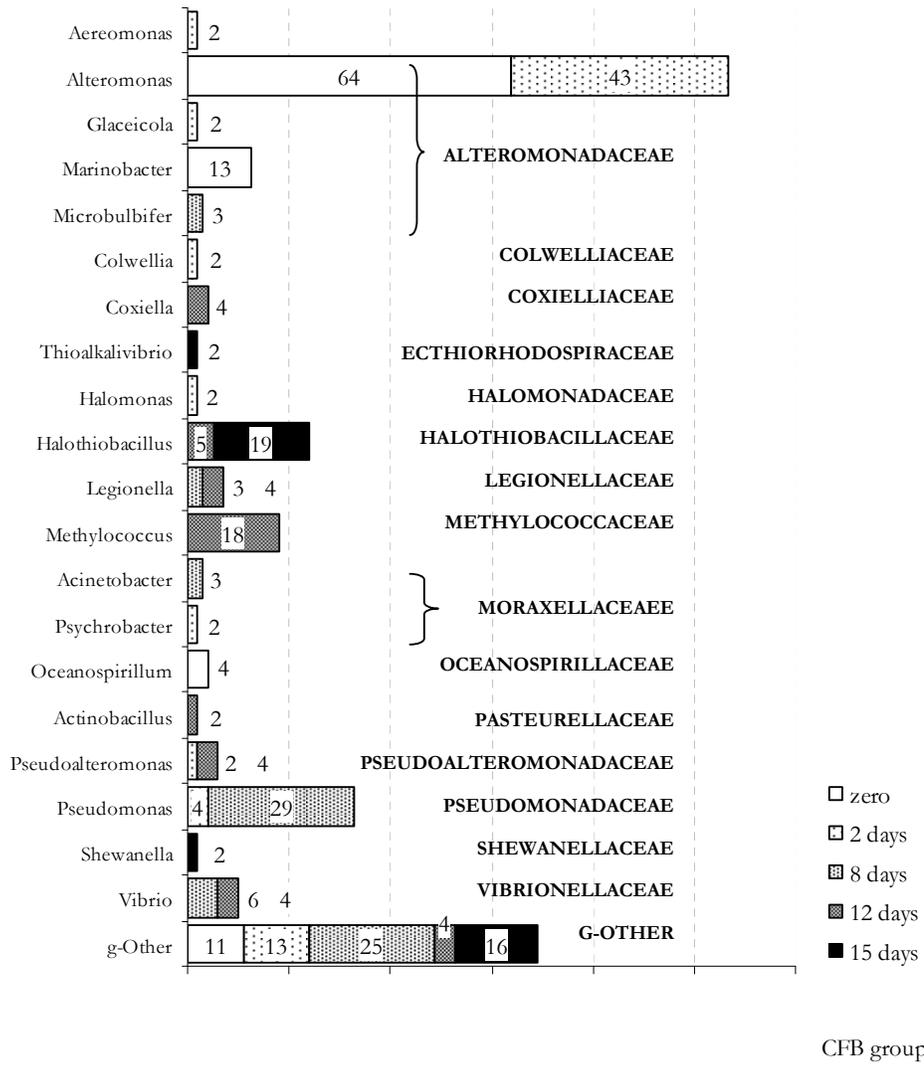


Fig. 95 e 96. *Microcosmo 1*. Distribuzione temporale dei cloni appartenenti ai gruppi dei γ-Proteobacteria (pagina precedente figura in alto) e del phylum *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) (pagina precedente figura in basso).

Microcosmo 1 – time zero –

Bacterial Division	Representative clone	N° of sequences	Best-matched organism	Accession N°	Family	Genus	%, Identity
g-Proteobacteria	m1-0-91	7	<i>Alteromonas</i> sp. U70	AJ832999	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	97,1
	m1-0-34	14	<i>Alteromonas</i> sp. KC98716-13	AB072388	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	97,3
	m1-0-61	6	<i>Alteromonas stellaepolaris</i>	UBA295715	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	98,2
	m1-0-05	3	Unc. clone LAS-B5N	AF513940	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	98,4
	m1-0-21	6	<i>Marinobacter</i> sp. CAB	MCU61848	Alteromonadaceae	<i>Marinobacter</i>	99,1
	m1-0-76	2	<i>Oceanospirillum multiglobuliferum</i>	AB006764	Oceanospirillaceae	<i>Oceanospirillum</i>	98,6
	m1-0-13	1	Gamma proteobacterium JC2043	AY207503	Other	uncl. bacteria	96,8
	m1-0-26	4	g-Proteobacteria MN 154.3	UGA313020	Other	uncl. bacteria	98,6
CFB group	m1-0-89	2	Marine bacterium SCRIPPS-41	AF359548	Flavobacterium	env. Sample	98,6
	m1-0-55	2	<i>Flavobacterium</i> sp. V4.BO.2	FSP244691	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	95,8

Tabella 20

Microcosmo 1 – time 2 days –

Bacterial Division	Representative clone	N° of sequences	Best-matched organism	Accession N°	Family	Genus	%, Identity
a-Proteobacteria	m1-2-59	1	<i>Sulfitobacter</i> sp. ARCTIC-P4	AY573043	Rhodobacteraceae	<i>Sulfitobacter</i>	99,4
	m1-2-03	5	<i>Pelagibacter ubique</i> HTCC1002	AF510192	SARS11 cluster	<i>Candidatus Pelagibacter</i>	90,9
g-Proteobacteria	m1-2-36	16	<i>Alteromonas</i> sp.	AB040466	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	99,4
	m1-2-45	2	<i>Alteromonas stellaepolaris</i>	UBA295715	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	97,6
	m1-2-30	2	Unc. clone LAS-B5N	AF513940	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	99,1
	m1-2-24	1	<i>Halomonas</i> sp. mp1	HSP551115	Halomonadaceae	<i>Halomonas</i>	86,5
	m1-2-23	1	<i>Aeromonas veronii</i> strain B1	AF099024	Aereomonadaceae	<i>Aereomonas</i>	97,6
	m1-2-21bis	1	<i>Psychrobacter</i> sp. wp30	PSP551107	Moraxellaceae	<i>Psychrobacter</i>	78,9
	m1-2-13	1	<i>Colwellia psychroerythraea</i>	AF173964	Colwelliaceae	<i>Colwellia</i>	95
	m1-2-27	1	<i>Glaciecola</i> sp. EL-110	GSP308105	Alteromonadeceae	<i>Glaciecola</i>	96,2
	m1-2-21	6	gamma proteobacteria MN 154.3	UGA313020	Other	Other	94,5
	m1-2-19bis	2	Endosymbiont of Acanthamoeba	AF132139	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	82,6
	m1-2-32	1	<i>Pseudoalteromonas luteoviola</i>	AY217773	Pseudoalteromonadaceae	<i>Pseudoalteromonas</i>	88,5
CFB group	m1-1-4bis	6	<i>Cytophaga</i> sp. T-588	AB073567	Flexibacteriaceae	<i>Cytophaga</i>	94,4
	m1-2-29bis	2	<i>Bacteroidetes</i> bacterium MO4	AY553119	Other	Other	90,0

Tabella 21

Microcosmo 1 – time 8 days –

Bacterial Division	Representative clone	N° of sequences	Best-matched organism	Accession N°	Family	Genus	%, Identity
a-Proteobacteria	m1-8-68	1	<i>Pelagibacter ubique</i> ATCC 1002	AF510192	SAR11 cluster	<i>Pelagibacter</i>	91,3
	m1-8-50	2	<i>Dechlorospirillum</i> sp. SN1 1	AY171615	Rhodospirillaceae	<i>Dechlorospirillum</i>	87,6
	m1-8-04	1	<i>Caulobacter henricii</i>	CHJ227758	Caulobacteraceae	<i>Caulobacter</i>	92,2
g-Proteobacteria	m1-8-33	1	<i>L.cherrii</i> ATCC 35252	LC16SRNB	Legionellaceae	<i>Legionella</i>	88,7
	m1-8-58	7	gamma proteobacteria MN 154.3	UGA313020	Other	Other	94,9
	m1-8-63	5	<i>Pseudomonas</i> sp. 38	AY856844	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	96,9
	m1-8-12	4	Unc. <i>Pseudomonas</i> sp. clone CB013-63	AY857632	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	98,5
	m1-8-21	1	Marine gamma proteobacterium	AY386332	Other	Other	96,3
	m1-8-35	1	<i>Microbulbifer</i> sp. CJ11049 1	AF500206	Alteromonadaceae	<i>Microbulbifer</i>	92,2
	m1-8-11	1	<i>Acinetobacter</i> sp. dcm5A	AF430124	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	98,3
	m1-8-15	2	<i>Vibrio</i> sp. BLI-41	AY217772	Vibrionaceae	<i>Vibrio</i>	97,5
	CFB group	m1-8-859	3	<i>Robiginitalea biformata</i>	AY424900	Flavobacteriaceae	<i>Robiginitalea</i>
m1-8-43		1	<i>Cytophaga latercula</i>	CLRR16SF	Flavobacteriaceae	<i>Stanierella</i>	92,3
Verrucomicrobia	m1-8-53	1	<i>Fucophilus fucoidanolyticus</i>	AB073978	Verrucomicrobiaceae	<i>Fucophilus</i>	95,1
Firmicutes	m1-8-8	1	<i>Haloanaerobium lacurosei</i>	HLRNA	Halanaerobiaceae	<i>Haloanaerobium</i>	87,2

Tabella 22

Microcosmo I – time 12 days –

Bacterial Division	Representative clone	N° of sequences	Best-matched organism	Accession N°	Family	Genus	%, Identity
a-Proteobacteria	m1-12-78	10	<i>Pelagibacter ubique</i> HTCC1002	AF510191	SAR11 cluster	<i>Candidatus Pelagibacter</i>	97
	m1-12-4	1	<i>Caulobacter henricii</i>	CHJ227758	Caulobacteraceae	<i>Caulobacter</i>	93,5
	m1-12-10	1	<i>Caedibacter caryophila</i>	CCA238683	Rickettsiales	<i>Caedibacter</i>	91,1
	m1-12-50	2	<i>Dechlorospirillum</i> sp. SN1 1	AY171615	Rhodospirillaceae	<i>Dechlorospirillum</i>	98,2
	m1-12-61	1	<i>Endosymbiont of Chlamys</i>	AY174895	Other	Other	90,2
	m1-12-1	4	Alpha proteobacterium HTCC1	AY102033	Other	Other	97,0
	m1-12-67	1	Alpha proteobacterium AP-25	AY145562	Other	Other	88,7
b-Proteobacteria	m1-12-54	4	<i>Thiobacillus</i> sp. UAM-I	AY487255	Hydrogenophilaceae	<i>Thiobacillus</i>	98,4
	m1-12-3	1	<i>Methylophilus leisingeri</i>	AB193725	Methylophilaceae	<i>Methylophilus</i>	97,4
g-Proteobacteria	m1-12-39	2	<i>Coxiella burnetii</i> strain RS	AE016960	Coxiellaceae	<i>Coxiella</i>	88,3
	m1-12-31	10	<i>Methylococcus capsulatus</i>	AE017282	Methylococcaceae	<i>Methylococcus</i>	87,8
	m1-12-45	3	<i>Halothiobacillus</i> sp. RA13	AY099401	Halothiobacillaceae	<i>Halothiobacillus</i>	97,5
	m1-12-2	1	<i>Actinobacillus capsulatus</i>	AF224285	Pasteurellaceae	<i>Actinobacillus</i>	77,8
	m1-12-3	3	<i>L.cherrii</i> ATCC 35252	LC16SRNB	Legionellaceae	<i>Legionella</i>	88,1
	m1-12-66	2	<i>A.luteoviolacea</i>	AL16SRRNA	Pseudoalteromonadaceae	<i>Pseudoalteromonas</i>	88,2
	m1-12-31	2	Bisgaard taxon 40	AY172732	Pasteurellaceae	Other	88,5
	m1-12-15	2	<i>Vibrio</i> sp. BLI-41	AY217772	Vibrionaceae	<i>Vibrio</i>	97,5
CFB group	m1-12-59	2	<i>Robiginitalea biformata</i>	AY424900	Flavobacteriaceae	<i>Robiginitalea</i>	90,5
	m1-12-52	2	<i>Cytophaga latercula</i>	CLRR16SF	Flavobacteriaceae	<i>Stanierella</i>	92,3
Acinobacteria	m1-12-54	1	<i>Nocardioides</i> sp. YIM31530 1	AY082063	Nocardioideaceae	<i>Kribbella</i>	85,2

Tabella 23

Microcosmo 1 – time 15 days –

Bacterial Division	Representative clone	N° of sequences	Best-matched organism	Accession N°	Family	Genus	%, Identity
a-Proteobacteria	m1-15-34	1	<i>Hirschia baltica</i>	HBA421782	Rhodobacteracea	<i>Hirschia</i>	98,2
	m1-15-51	2	<i>Ruegeria</i> sp. DG882	AY258078	Rhodobacteraceae	<i>Ruegeria</i>	97,3
b-Proteobacteria	m1-15-1	13	<i>Thiobacillus</i> sp. UAM-I	AY487255	Hydrogenophilaceae	<i>Thiobacillus</i>	98,1
	m1-15-78	2	<i>Methylophilus leisingeri</i>	AB193725	Methylophilaceae	<i>Methylophilus</i>	97,5
	m1-15-92	1	<i>Methylophilus</i> sp. ECd1	AY436792	Methylophilaceae	<i>Methylophilus</i>	99,0
	m1-15-63	1	beta proteobacterium HTCC349	AY429717	Other	Other	98,6
g-Proteobacteria	m1-15-54	10	<i>Halothiobacillus</i> sp. RA13	AY099401	Halothiobacillaceae	<i>Halothiobacillus</i>	97,6
	m1-15-21	5	gamma proteobacterium MN 154.3	UGA313020	Other	Other	97,5
	m1-15-52	1	marine gamma proteobacterium HTCC2120	AY386340	Other	Other	98,6
	m1-15-40	1	sulfur-oxidizing bacterium OBII5	AF170421	Other	Other	97,6
	m1-15-27bis	1	gamma proteobacterium HTCC234	AY102028	Other	Other	98,4
	m1-15-56	1	arsenite-oxidizing bacterium MLHE-1	AF406554	Ectothiorhodospiraceae	Other	98,6
	m1-15-55	1	<i>Shewanella woodyi</i>	AF003549	Shewanellaceae	<i>Shewanella</i>	98,2
CFB group	m1-15-84bis	1	<i>Thioalkalivibrio denitrificans</i>	AF126545	Ectothiorhodospiraceae	<i>Thioalkalivibrio</i>	98,6
	m1-15-23	1	Flavobacteriaceae bact. Gaa02_04net2_3	AY319330	Flavobacteriacea	Other	99,0
	m1-15-09	3	<i>Cellulophaga</i> sp. DG1134	AY258134	Flavobacteriaceae	<i>Cellulophaga</i>	99,4
	m1-15-26	1	Flavobacteriaceae bact. Gaa02_04net2_3	AY319330	Flavobacteriacea	Other	97,6
	m1-15-34bis	2	<i>Marinicola seobaensis</i> strain SW-152	AY739663	Flexibacteraceae	<i>Marinicola</i>	98,5
	m1-15-30	2	<i>Winogradskyella poriferorum</i>	AY848823	Flavobacteriaceae	<i>Winogradskyella</i>	98,6
	m1-15-18	1	<i>Roseivirga ebrenbergii</i>	AY608410	Flexibacteraceae	<i>Roseivirga</i>	92,8
	m1-15-15	1	<i>Flavobacterium</i> sp. V4.BO.21	FSP244691	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	98,6
	m1-15-71	1	<i>Flavobacterium</i> sp. V4.MO.3	FSP244697	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	99,3

Tabella 24

Microcosmo 2. Durante la sperimentazione realizzata aggiungendo dei nutrienti inorganici e del petrolio greggio all'acqua di mare sono stati analizzati un totale di 310 cloni definendo 24 filotipi differenti.

In particolare 5, 8, 14, 10 e 12 filotipi specifici sono stati identificati rispettivamente a tempo zero e a 2, 8, 12 e 15 giorni di sperimentazione.

Alcuni di questi cluster filogenetici sono riconducibili a sequenze che non è stato possibile correlare con microrganismi coltivabili o che sono state associate ad organismi ambientali non identificati; tali sequenze sono state raggruppate in un unico gruppo identificato con il nome di “other”.

Le sequenze appartenenti alla classe dei γ -Proteobacteria sono state le più comuni durante la sperimentazione realizzata, rappresentando circa l'80% (258 sequenze) durante tutto il periodo di analisi. Alcuni di questi gruppi filotipici corrispondono a specie e generi di batteri identificati come chemioeterotrofi e che generalmente possono essere ritrovati in ecosistemi marini includendo membri di *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Halomonas* ed *Oceanospirillum*.

Durante la sperimentazione è stato osservato un progressivo decremento delle sequenze affiliate al genere *Altermonas*, un eterotrofo aerobio, che passano da 74 ad un 27% durante i primi due giorni di sperimentazioni per arrivare a scomparire dopo l'ottavo giorno.

Dopo l'ottavo giorno di sperimentazione è molto interessante osservare la comparsa e il progressivo incremento di sequenze correlate al genere di *Alcanivorax* (8, 29 e 47% delle sequenze totali rispettivamente durante l'ottavo, il dodicesimo e il quindicesimo giorno) e di *Cycloclasticus* (8, 10 e 2%). Numerosi studi (Kasai et al., 2002; Roling et al., 2002; Yakimov et al. 2004) hanno dimostrato che questi due generi batterici sono direttamente implicati nei processi di degradazione del petrolio in ambiente marino. *Alcanivorax* gioca un ruolo fondamentale nella degradazione degli idrocarburi lineari negli ambienti contaminati da petrolio, anche se non interviene efficacemente nella degradazione dei composti aromatici. Membri del gruppo di *Alcanivorax* sono, difatti, capaci di utilizzare, come unica fonte di carbonio, alcuni substrati organici come n-alcani, gruppi alchilici appartenenti ad n-alchilbenzeni e n-alchilcicloalcani. Per contro, batteri appartenenti al genere *Cycloclasticus*, sono implicati nella degradazione dei composti aromatici, includendo molecole come naftalene, alchilnaftalene, bifenile, fenantrene e antracene (Kasai et al. 2002; Dysterhouse et al., 1995; Geiselbrecht et al., 1998).

Cloni affiliati ad altri generi batterici, sempre appartenenti alla classe dei γ -Proteobacteria, sono stati ritrovati in maniera unica in minime proporzioni, quali *Teredinibacter*, *Thalassomonas*, *Alkalilimnicola* e *Francisella*.

Sequenze appartenenti alla classe dei δ -Proteobacteria sono state rilevate solo durante il quindicesimo giorno di sperimentazione. Tali sequenze, che costituiscono solo il 3% del totale, sono riconducibili ad alcuni significanti gruppi filotipi caratterizzati da batteri solfato e ferro riduttori, quali *Pelobacter* e *Desulfuromonas*.

Sono stati rilevati quattro distinti cluster (*Rhodobacter*, *Hyphomonas* e *Rhodovulum* e *Roseobacter*) di α -Proteobacteria, facenti parte della famiglia delle Rhodobacteriaceae. L'analisi delle sequenze mostra una distinta distribuzione temporale rendendo alcuni dei filotipi identificati unici per le diverse librerie analizzate.

I cloni appartenenti a questa sperimentazione sono rappresentati anche da sequenze affiliate alla CFB division (8% del totale) che includono generi batterici strettamente aerobi con metabolismi chemioetrotrofi quali *Croceibacter*, *Cytophaga*, *Flavobacterium* e *Tenacibaculum* (tabella 25, 26, 27, 28 e 29, figura 97, 99, 99, 100).

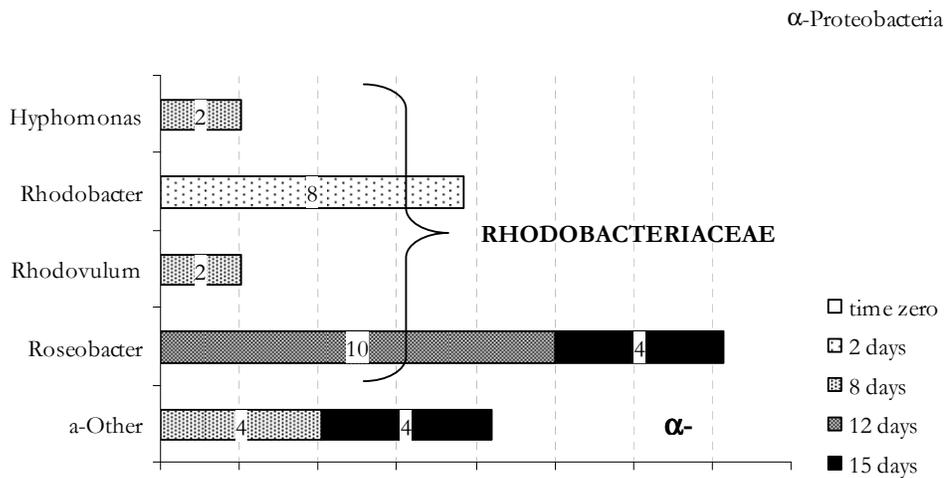
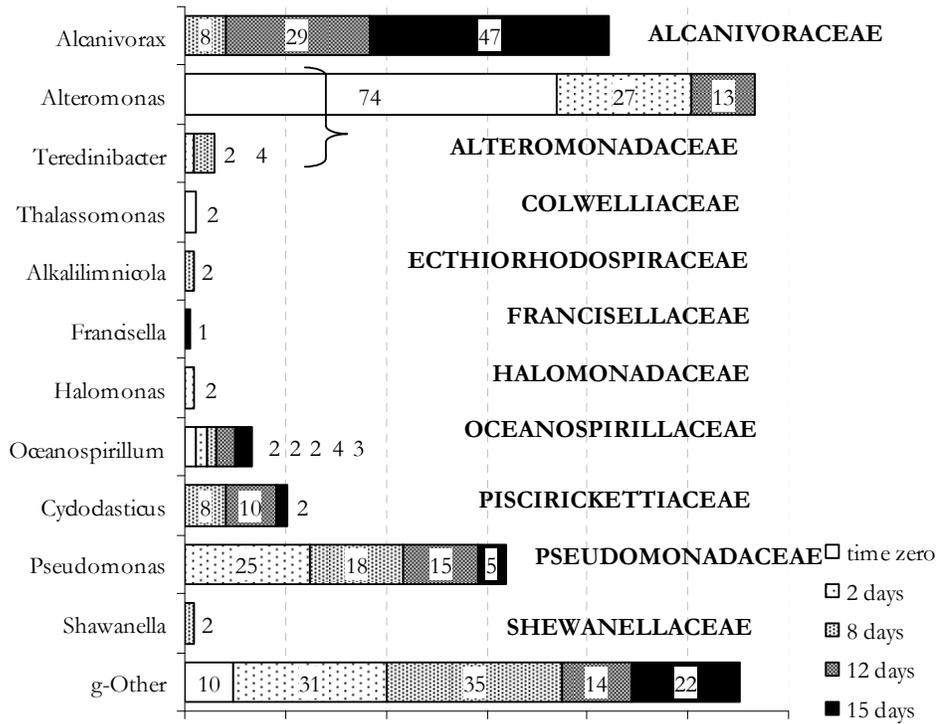


Fig. 97. Struttura tassonomica del gruppo degli α -Proteobacteria presenti durante la sperimentazione realizzata del microcosmo 2.

γ -Proteobacteria



CFB group

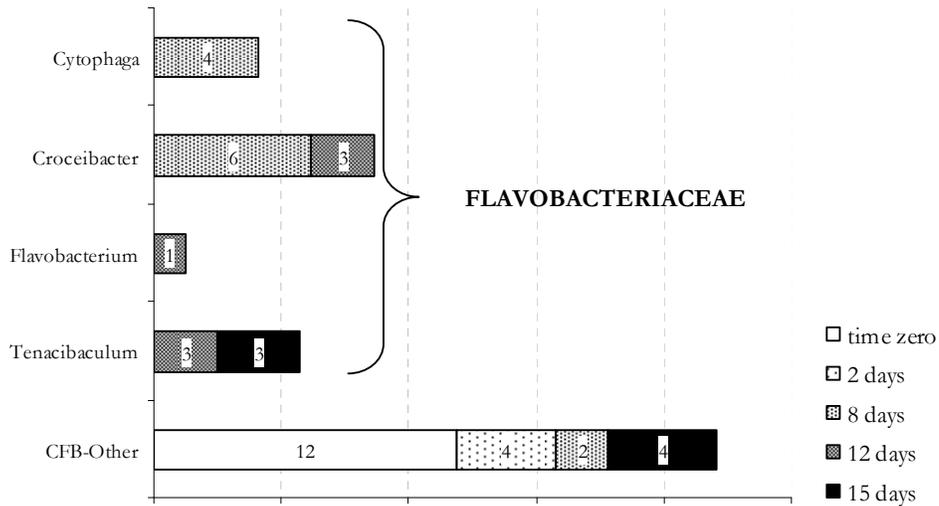


Fig. 98 e 99. Analisi tassonomica del 16S crDNA. Distribuzione dei differenti gruppi filogenetici appartenenti agli γ -Proteobacteria (figura in alto) e dei CFB group (figura in basso) durante la sperimentazione in *microcosmo 2*. La presenza del singolo gruppo batterico è espressa in riferimento al genere e alla famiglia di appartenenza e la sua presenza è espressa come percentuale all'interno della barra corrispondente.

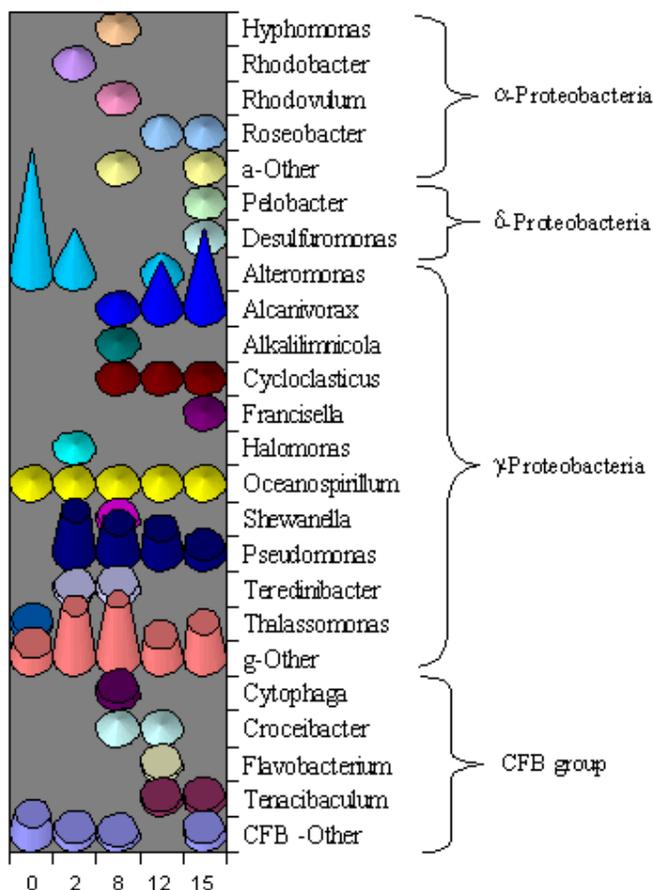


Fig. 100 . Rappresentazione schematica della distribuzione della popolazione in riferimento ai risultati ottenuti dall'analisi tassonomica del 16S crDNA sperimentazione identificata come *microcosmo 2*.

Microcosmo 3. L'analisi tassonomica del 16S crDNA condotta sulle 200 sequenze ottenute durante questa sperimentazione rivela che i cloni affiliati al gruppo dei γ -Proteobacteria si presentano numericamente più abbondante (174 sequenze). Durante i primi due giorni di analisi è possibile osservare una riduzione della percentuale delle sequenze correlate al genere *Alteromonas* che passano da valori del 64 al 27%. Il decremento di tali sequenze coincide con l'incremento di quelle affiliate ai generi di *Pseudomonas* (31%), *Pseudoalteromonas* (18%) ed il chemioorganotrofo *Oceanospirillum* (10%). Durante l'ottavo giorno di analisi è possibile assistere ad un cambiamento nella struttura della popolazione microbica determinato dalla totale scomparsa delle sequenze affiliate ai generi su detti e la comparsa di sequenze affiliate al genere di *Alcanivorax* (61%) e di *Marinobacter* (17%), quest'ultimo comunemente identificato come un batterio implicato nella degradazione degli idrocarburi aromatici policiclici (PAH). La percentuale di presenza di quest'ultime si mantiene pressoché costante fino alla fine della sperimentazione mentre sequenze appartenenti ad genere di *Cycloclasticus* e *Cohvelia* sono identificabili solo durante il dodicesimo e il quindicesimo giorno di analisi.

Due singoli generi batterici, quelli di *Roseobacter* e di *Rhodobacter* rappresentano il gruppo degli α -Proteobacteria rispettivamente al dodicesimo (5%) e quindicesimo girone (3%) accanto a sequenze correlate con ad isolati ambientali identificati come α -Other.

La percentuale delle sequenze affiliati al CFB group si mantiene costante durante la sperimentazione pur variando la composizione interna delle sequenze di appartenenza identificando gruppi come *Cellulophaga*, *Cytophaga* e *Flavobacterium* rispettivamente al secondo (8), all'ottavo (7) e al dodicesimo giorno (8) di analisi. tabella 30, 31, 32, 33 e 34, figura 101, 102, 103 e 104).

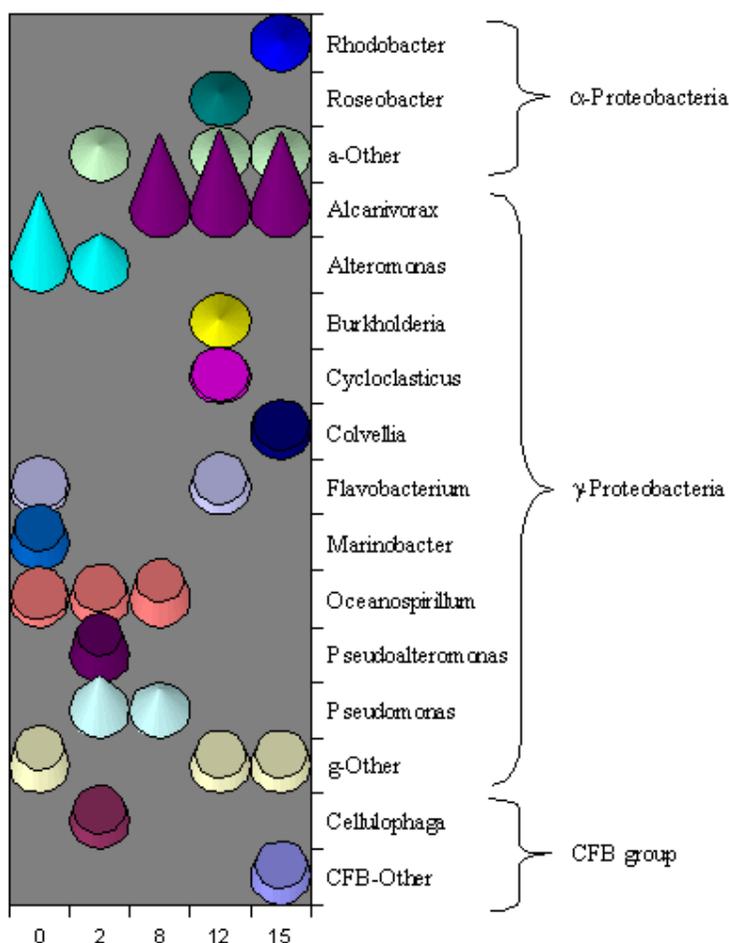


Fig. 101. Distribuzione temporale della popolazione microbica durante la sperimentazione nel *microcosmo 3*.

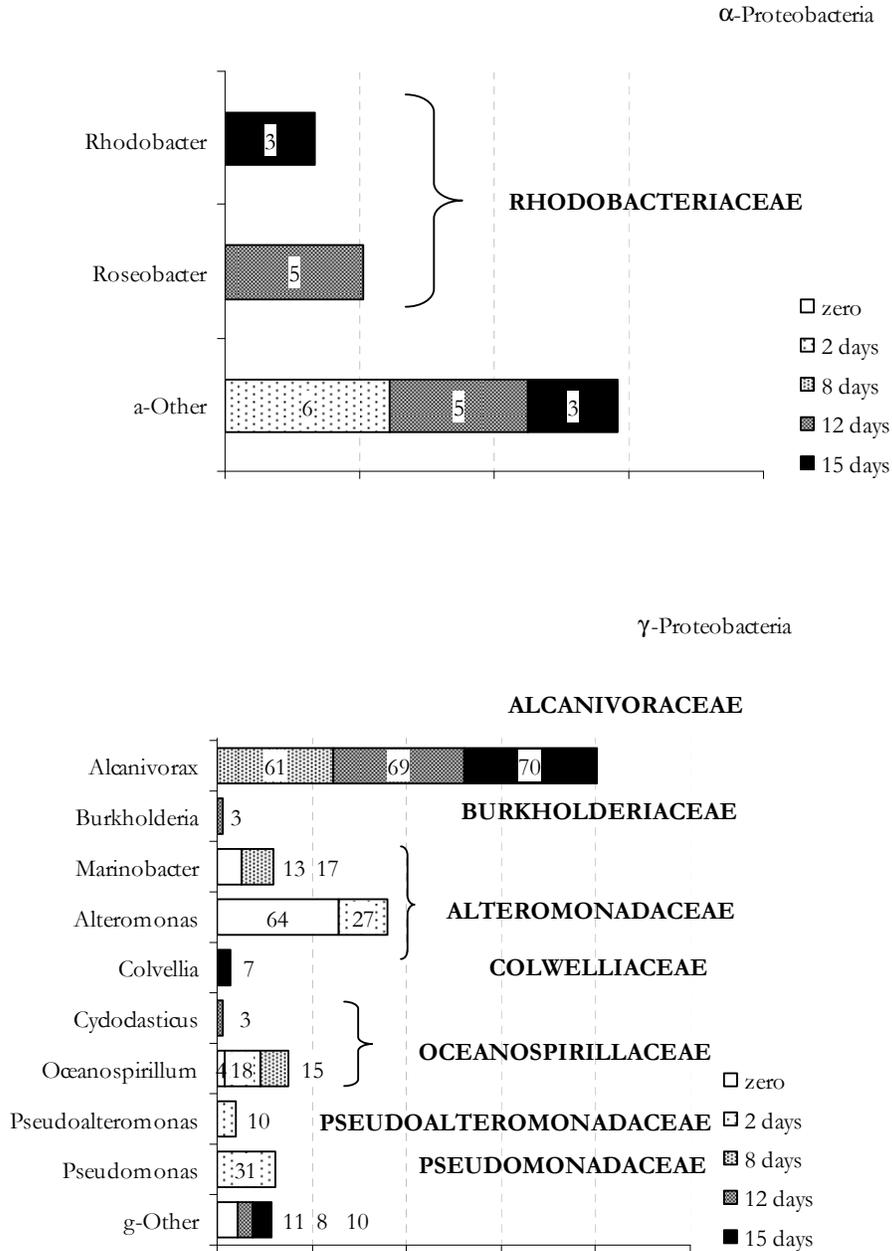


Fig. 102 e 103. Analisi Tassonomica del 16S crDNA. Distribuzione temporale delle sequenze affiliate al gruppo degli α - e dei γ -Proteobacteria durante la sperimentazione condotta nel *microcosmo 2* (Sea water addizionata con petrolio greggio ed EPS-2003). La presenza del singolo gruppo batterico è espressa in riferimento al genere e alla famiglia di appartenenza e la sua presenza è espressa come percentuale all'interno della barra corrispondente.

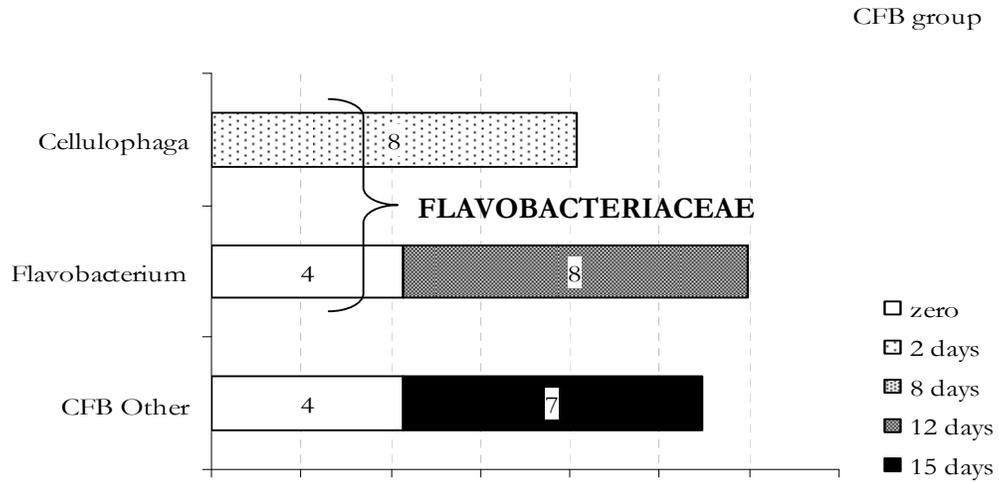


Fig. 104. Distribuzione dei cloni appartenenti al phylum *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB). Le sequenze sono state suddivise per generi e famiglia di appartenenza.

Microcosmo 2 – time zero –

Bacterial Division	Representative clone	N° of sequences	Best-matched organism	Accession N°	Family	Genus	%, Identity
g-Proteobacteria	mi2-0-42	1	Bacterium K2-14	AY345435	Other	uncl. bacteria	97,8
	mi2-0-04	1	Unc. proteobacterium CHAB-IV-19	UGA240914	Other	env. Sample	95,5
	mi2-0-90	1	Gamma proteobacterium JC204	AY194066	Colwelliaceae	<i>Thalassomonas</i>	97,8
	mi2-0-14	1	Marine bacterium Tw-1	AY028196	Halomonadaceae	uncl. bacteria	98,3
	mi2-0-24	1	<i>Oceanospirillum multiglobuliferum</i>	AB006764	Oceanospirillaceae	<i>Oceanospirillum</i>	99,6
	mi2-0-16	1	Uncultured bacterium clone ZA3706c	AF382127	Other	env. Sample	99,1
	mi2-0-33	5	<i>Alteromonas</i> sp. AS-30	ASP391191	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	98,2
	mi2-0-23	7	<i>Alteromonas</i> sp. AS-31	ASP391192	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	98,5
	mi2-0-70	18	<i>Alteromonas</i> sp.	AB015135	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	98,9
	mi2-0-85	1	<i>Alteromonas alvinellae</i>	AF288360	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	98,8
CFB group	mi2-0-20	5	Marine bacterium SCRIPPS-41	AF359548	Flavobacterium	env. Sample	98,3

Tabella 25

Microcosmo 2 – time 2 days –

Bacterial Division	Representative clone	N° of sequences	Best-matched organism	Accession N°	Family	Genus	%, Identity
a-Proteobacteria	mi2-2-67	4	Rhodobacter sp. L544	AY370007	Rhodobacteraceae	<i>Rhodobacter</i>	97,4
g-Proteobacteria	mi2-2-71	1	<i>Pseudomonas</i> sp. 38	AF468448	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	99,1
	mi2-2-25	2	Unclassified <i>Pseudomonas</i> group	AF102866	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	97,7
	mi2-2-26	2	Symbiont LP3 of <i>Lyrodus pedicellatus</i>	AY150578	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	98,7
	mi2-2-92	7	Unc. <i>Pseudomonas</i> sp. clone CB013-63	AY857632	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	98,3
	mi2-2-18	1	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. clone S-3	AY676014	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	97,6
	mi2-2-78	1	Unc. <i>Oceanospirillum</i> sp. clone JL-ESNP-I48	AY664230	Oceanospirillaceae	<i>Oceanospirillum</i>	98,8
	mi2-2-33	8	<i>Alteromonas</i> sp. AS-31	AJ391192	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	97,6
	mi2-2-54	5	<i>Alteromonas</i> sp.	AY371690	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	98,6
	mi2-2-12	1	<i>Teredinibacter turnerae</i>	AY028398	Alteromonadaceae	<i>Teredinibacter</i>	97,6
	mi2-2-01	1	<i>Alteromonas</i> sp. N352	AY371690	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	95,8
	mi2-2-67	1	<i>Halomonas</i> sp. 40	AB105161	Halomonadaceae	<i>Halomonas</i>	98,1
	mi2-2-30	10	gamma proteobacteria MN 154.3	UGA313020	Other	env. Sample	99,1
	mi2-2-08	2	Unc. g-Proteobacteria clone Arctic96B-1	AF353242	Other	env. Sample	96,5
	mi2-2-74	4	Unc. gamma proteobacterium MERTZ_2CM_302	AY344367	Other	env. Sample	97,6
	CFB group	mi2-2-27	1	Marine bacterium SCRIPPS_41	AF359548	Flavobacteriaceae	env. Sample
mi2-2-34		1	Unc. <i>Flavobacterium</i> sp. clone 169-2	AJ871245	Flavobacteriaceae	env. Sample	96,9

Tabella 26

Microcosmo 2 – time 8 days –

Bacterial Division	Representative clone	N° of sequences	Best-matched organism	Accession N°	Family	Genus	%, Identity
a-Proteobacteria	mi2-8-15	1	Unc. Rhodobacter group	AF513934	Rhodobacteriaceae	env. Sample	96,5
	mi2-8-51	1	<i>Hyphomonas polymorphica</i>	HPJ227813	Rhodobacteriaceae	<i>Hyphomonas</i>	97,8
	mi2-8-62	1	<i>Rhodovulum</i> sp. AR2102	RSP401214	Rhodobacteriaceae	<i>Rhodovulum</i>	98,2
	mi2-8-03	1	Uncultured Sulfitobacter MT30	AF211285	Rhodobacteriaceae	env. Sample	98,4
g-Proteobacteria	mi2-8-30	5	<i>Pseudomonas</i> sp. MBIC2027	AB030085	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	99,4
	mi2-8-13	4	<i>Pseudomonas</i> sp. WAS2	AB007999	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	96,2
	mi2-8-08	1	Unc. proteobacterium isolate C1_B045	AF420370	Pseudomonadaceae	env. Sample	99,1
	mi2-8-49	4	<i>Alcanivorax</i> sp. I2	AB053126	Alcanivoraxaceae	<i>Alcanivorax</i>	98,7
	mi2-8-16	2	<i>Teredinibacter turnerae</i>	AY028398	Alteromonadaceae	<i>Teredinibacter</i>	97,1
	mi2-8-57	1	<i>Shewanella kaireiae</i>	AB094598	Alteromonadaceae	<i>Shewanella</i>	
	mi2-8-11	4	<i>Cycloclasticus spirillensus</i>	AY026915	Piscirickettsiaceae	<i>Cycloclasticus</i>	98,0
	mi2-8-53	1	<i>Oceanospirillum multiglobuliferum</i>	AB006764	Oceanospirillaceae	<i>Oceanospirillum</i>	95,2
	mi2-8-29	1	<i>Alkalilimnicola halodurans</i> isolate 34Alc	AHA404972	Ectothiorhodospiraceae	<i>Alkalilimnicola</i>	96,4
	mi2-8-09	1	Unc. proteobacterium isolate C1_B045	AF420370	Other	env. Sample	99,1
	mi2-8-15	1	Unc. g-proteobacterium clone Arctic96B-1	AF353242	Other	env. Sample	98,3
	mi2-8-47	1	Uncultured bacterium SIC.B8	AF277556	Other	env. Sample	99,4
	mi2-8-50	1	Uncultured bacterium ACE-21	AF142798	Other	env. Sample	94,0
	mi2-8-59	1	Uncultured proteobacterium c1-B045	AF420370	Other	env. Sample	99,2
	mi2-8-79	1	Uncultured bacteria cknm0	AF376323	Other	env. Sample	96,8
	mi2-8-48	6	gamma proteobacteria MN 154.3	UGA313020	Other	env. Sample	96,6
	mi2-8-21	4	Marine g-proteobacterium HTCC2188	AY386344	Other	env. Sample	98,8
CFB group	mi2-8-18	3	<i>Croceibacter atlanticus</i> strain HTCC2559T	AY163576	Flavobacteriaceae	<i>Croceibacter</i>	99,5
	mi2-8-45	2	<i>Cytophaga</i> sp. I-377	AB073588	Flavobacteriaceae	<i>Cytophaga</i>	98,0
	mi2-8-23	1	Unc. CFB group bact.MERTZ_0CM_363	AF424359	Flavobacteriaceae	env. Sample	97,3

Microcosmo 2 – time 8 days –

Bacterial Division	Representative clone	N° of sequences	Best-matched organism	Accession N°	Family	Genus	%, Identity
a-Proteobacteria	mi2-12-43	4	<i>Roseobacter</i> sp. BS90	AY672013	Rhodobacteriaceae	<i>Roseobacter</i>	98,5
	mi2-12-12	4	<i>Roseobacter</i> sp. LA7	AF513438	Rhodobacteriaceae	<i>Roseobacter</i>	97,1
g-Proteobacteria	mi2-12-26	7	<i>Alteromonas macleodii</i> strain Adriatic_2	AY831633	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	97,9
	mi2-12-43	3	<i>Alteromonas</i> sp. BH030046	AY553295	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	99,0
	mi2-12-15	5	<i>Pseudomonas</i> sp. DW118	AJ534859	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	95,3
	mi2-12-32	1	Unc. <i>Ps.</i> sp. clone CB013-63	AY857632	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	99,7
	mi2-12-30	6	<i>Pseudomonas</i> sp. 38	AY856844	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	94,9
	mi2-12-08	15	<i>Alcanivorax</i> sp. Nag-2	AB053151	Alcanivoraxaceae	<i>Alcanivorax</i>	98,5
	mi2-12-74	8	<i>Alcanivorax</i> sp. P663	AY371398	Alcanivoraxaceae	<i>Alcanivorax</i>	98,3
	mi2-12-10	6	<i>Cycloclasticus</i> sp. H4	AB080114	Piscirickettsiaceae	<i>Cycloclasticus</i>	97,4
	mi2-12-11	2	Unc. <i>Cycloclasticus</i> sp. clone SIMO-1125	AY710565	Piscirickettsiaceae	<i>Cycloclasticus</i>	99,6
	mi2-12-75	3	<i>Oceanospirillum</i> sp. MED92	AY136116	Oceanospirillaceae	<i>Oceanospirillum</i>	99,1
	mi2-12-13	1	Unc. bacterium clone KS28	AF328177	Other	env. Sample	97,1
	mi2-12-03	4	Unc. bacterium clone s10	AY171346	Other	env. Sample	99,1
	mi2-12-81	1	Unc. marine gamma proteobacterium BY-97	AY344367	Other	env. Sample	92,1
	mi2-12-22	5	Unc. g proteobacterium MERTZ_2CM_302	UMA298371	Other	env. Sample	98,6
CFB group	mi2-12-52	2	<i>Tenacibaculum maritimum</i>	AB185404	Flavobacteriaceae	<i>Tenacibaculum</i>	89,7
	mi2-12-90	1	<i>Flavobacterium</i> sp. MMA/2	AY836678	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	87,2
	mi2-12-61	2	<i>Croceibacter atlanticus</i> strain HTCC2559T	AY163576	Flavobacteriaceae	<i>Croceibacter</i>	95,9

Tabella 28

Microcosmo 2 – time 15 days –

Bacterial Division	Representative clone	N° of sequences	Best-matched organism	Accession N°	Family	Genus	%, Identity
a-Proteobacteria	mi2-15-20	1	Unc. alpha proteobacterium MB11C09	AY033324	Rhodobacteraceae	env. Sample	97,0
	mi2-15-9	4	<i>Roseobacter</i> sp. LA7	AF513438	Rhodobacteraceae	<i>Roseobacter</i>	92,0
	mi2-15-41	1	Rhodobacteraceae bacterium JC2049	AY442178	Rhodobacteraceae	env. Sample	97,6
	mi2-15-09	1	Alpha proteobacterium NW432	AF384141	Other	env. Sample	98,6
	mi2-15-K	1	Alpha proteobacterium FRA000001	AB106186	Other	env. Sample	100,0
d-Proteobacteria	mi2-15-39	2	<i>Pelobacter propionicus</i>	PP16SRNA	Pelobacteraceae	<i>Pelobacter</i>	90,0
	mi2-15-O	1	<i>D.thiophila</i> sp.	DTNZ2716S	Desulfuromonadaceae	<i>Desulfuromonas</i>	94,0
g-Proteobacteria	mi2-15-L	5	<i>Pseudomonas</i> sp. ND137	AB063258	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	99,1
	mi2-15-24	1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato str. DC3000	AE016868	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	84,0
	mi2-15-07	44	<i>Alcanivorax</i> sp. Nag1	AB053122	Alcanivoraceae	<i>Alcanivorax</i>	100,0
	mi2-15-34	2	<i>Oceanospirillum</i> sp. MED92	AY136116	Oceanospirillaceae	<i>Oceanospirillum</i>	97,0
	mi2-15-G	1	<i>Oceanospirillum multiglobulus</i>	AJ302699	Oceanospirillaceae	<i>Oceanospirillum</i>	98,2
	mi2-15-A	1	Cf. <i>Francisella</i> sp. CYH-200	AF385857	Francisellaceae	env. Sample	100,0
	mi2-15-37	1	<i>Francisella philomiragia</i>	FP16SRNAA	Francisellaceae	<i>Francisella</i>	99,0
	mi2-15-H	2	<i>Cycloclasticus spirillensus</i>	AY026915	Piscirickettsiaceae	<i>Cycloclasticus</i>	98,8
	mi2-15-23	10	gamma proteobacteria MN 154.3	UGA313020	Other	env. Sample	96,9
	mi2-15-22	3	Gamma proteobacterium MN 28	GPR555478	Other	env. Sample	92,0
	mi2-15-4	2	Unid. bacterium clone K2-30-25	AY344367	Other	env. Sample	93,0
	mi2-15-25	1	Unc. bacterium clone s30	AY171333	Other	env. Sample	98,0
	mi2-15-5	1	Unc. bacterium isolate 6i08	AY177779	Other	env. Sample	95,0
	mi2-15-29	1	Unc. bacterium clone B92	AY375062	Other	env. Sample	92,0
	CFB group	mi2-15-03	4	<i>Crocibacter atlanticus</i> strain HTCC2559T	AY353813	Flavobacteriaceae	env. Samples
mi2-15-40		2	<i>T. amylolyticum</i> strain:MBIC4355.	AB032505	Flavobacteriaceae	<i>Tenacibaculum</i>	99,9
mi2-15-11		1	<i>Tenacibaculum</i> sp. SW274	AY163576	Flavobacteriaceae	<i>Tenacibaculum</i>	97,0

Microcosmo 3 – time zero–

Bacterial Division	Representative clone	N° of sequences	Best-matched organism	Accession N°	Family	Genus	%, Identity
g-Proteobacteria	mi3-0-91	7	<i>Alteromonas</i> sp. U70	AJ832999	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	97,1
	mi3-0-34	14	<i>Alteromonas</i> sp. KC98716-13	AB072388	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	97,3
	mi3-0-61	6	<i>Alteromonas stellaepolaris</i>	UBA295715	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	98,2
	mi3-0-05	3	Unc. clone LAS-B5N	AF513940	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>	98,4
	mi3-0-21	6	<i>Marinobacter</i> sp. CAB	MCU61848	Alteromonadaceae	<i>Marinobacter</i>	99,1
	mi3-0-76	2	<i>Oceanospirillum multiglobuliferum</i>	AB006764	Oceanospirillaceae	<i>Oceanospirillum</i>	98,6
	mi3-0-13	1	Gamma proteobacterium JC2043	AY207503	Other	uncl. bacteria	96,8
	mi3-0-26	4	gamma proteobacteria MN 154.3	UGA313020	Other	uncl. bacteria	98,6
CFB group	mi3-0-89	2	Marine bacterium SCRIPPS-41	AF359548	Flavobacterium	env. Sample	98,6
	mi3-0-55	2	<i>Flavobacterium</i> sp. V4.BO.2	FSP244691	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	95,8

Tabella 30

Microcosmo 3 – time 2 days –

Bacterial Division	Representative clone	N° of sequences	Best-matched organism	Accession N°	Family	Genus	%, Identity
g-Proteobacteria	mi3-8-27	6	<i>Oceanospirillum</i> sp. ME101	OSP302699	Oceanospirillaceae	<i>Oceanospirillum</i>	91,3
	mi3-8-90	5	<i>Pseudomonas</i> sp. AS-33	PSP391194	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	97,1
	mi3-8-62	2	<i>Pseudomonas</i> sp. PE1	AB052968	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	97,9
	mi3-8-64	25	<i>Alcanivorax</i> sp. Nag1	AB053122	Alcanivoraceae	<i>Alcanivorax</i>	98,6
CFB group	mi3-8-58	3	<i>Cytophaga</i> sp. strain:J18-M01	AB017046	Flexibacteriaceae	<i>Cytophaga</i>	98,4

Tabella 31

Microcosmo 3 – time 8 days –

Bacterial Division	Representative clone	N° of sequences	Best-matched organism	Accession N°	Family	Genus	%, Identity
g-Proteobacteria	mi3-8-27	6	<i>Oceanospirillum</i> sp. ME101	OSP302699	Oceanospirillaceae	<i>Oceanospirillum</i>	91,3
	mi3-8-90	5	<i>Pseudomonas</i> sp. AS-33	PSP391194	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	97,1
	mi3-8-62	2	<i>Pseudomonas</i> sp. PE1	AB052968	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	97,9
	mi3-8-64	25	<i>Alcanivorax</i> sp. Nag1	AB053122	Alcanivoraceae	<i>Alcanivorax</i>	98,6
CFB group	mi3-8-58	3	<i>Cytophaga</i> sp. strain:J18-M01	AB017046	Flexibacteriaceae	<i>Cytophaga</i>	98,4

Tabella 32

Microcosmo 3 – time 12 days –

Bacterial Division	Representative clone	N° of sequences	Best-matched organism	Accession N°	Family	Genus	%, Identity
a-Proteobacteria	mi3-12-21	1	Unc. a Proteobacterium Cl-3-TB8 II	AY599672	Other	Other	98,3
	mi3-12-68	2	<i>Roseobacter</i> sp. HYL-SA-18	DQ008594	Rhodobacteraceae	<i>Roseobacter</i>	97,7
	mi3-12-72	1	Alpha proteobacterium MGP-6	AF530148	Other	Other	95,6
g-Proteobacteria	mi3-12-02	2	Unc. g prot. S.Ionian-G06	AJ609571	Other	Other	95,0
	mi3-12-54	1	Unc. bacterium clone JWBH-4	AY584745	Other	Other	96,5
	mi3-12-67	1	<i>Cycloclasticus spirillensis</i>	AY026915	Oceanospirillaceae	<i>Cycloclasticus</i>	98,2
	mi3-12-94	1	Uncultured <i>Burkholderia</i> sp.	AB196446	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	98,5
	mi3-12-44	8	<i>Alcanivorax</i> sp. Nag1	AB053122	Alcanivoraceae	<i>Alcanivorax</i>	99,6
	mi3-12-61	10	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	AF062642	Alcanivoraceae	<i>Alcanivorax</i>	97,5
	mi3-12-01	9	<i>Alcanivorax</i> sp. Oha-1	AB053130	Alcanivoraceae	<i>Alcanivorax</i>	97,6
CFB group	mi3-12-05	3	<i>Flavobacterium</i> sp. GCM6	DQ028335	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	96,5

Tabella 33

Microcosmo 3 – time 15 days –

Bacterial Division	Representative clone	N° of sequences	Best-matched organism	Accession N°	Family	Genus	%, Identity
a-Proteobacteria	mi3-15-28	1	Arctic sea ice bacterium ARK10036	AF468358	Rhodobacteraceae	Other	98,3
	mi3-15-10	1	<i>Rhodobacter veldkampii</i>	Y14150	Rhodobacteraceae	<i>Rhodobacter</i>	997,6
g-Proteobacteria	mi3-15-30	7	<i>Alcanivorax</i> sp. Nag1	AB053122	Alcanivoraceae	<i>Alcanivorax</i>	96,8
	mi3-15-08	14	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	Y12579	Alcanivoraceae	<i>Alcanivorax</i>	97,3
	mi3-15-74	2	<i>Colwellia</i> sp. ANT8258	AY167266	Colwelliaceae	<i>Colwellia</i>	98,4
	mi3-15-20	1	uncultured Colwelliaceae bacterium	AY933256	Other	Other	97,3
	mi3-15-10	1	antibiotic-resistant bacterium RD3	AB194580	Other	Other	97,0
	mi3-15-75	1	adp. facult. oligotrophic PAF-1	AB022707	Other	Other	96,5
CFB group	mi3-15-48	1	Arctic sea ice bacterium ARK10136	AF468417	Flavobacteriaceae	Other	94,3
	mi3-15-61	2	marine bacterium MBIC1357	AB032514	Flavobacteriaceae	Other	98,3

Tabella 34

Analisi di diversità. Gli indici di diversità sono stati calcolati utilizzando i dati delle sequenze ottenute dalle librerie di cloni. I cloni che hanno mostrato una similarità maggiore del 97% con le sequenze presente in database (Fasta Nucleotide Database Query, <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/nucleotide.html>) sono state raggruppate in OTU specifici e normalizzate a 100 cloni (Brown *et al.*, 2001) per una corretta comparazione delle stesse e per il calcolo degli indici di diversità (figura 105).

I valori di coverage (%), osservati durante la sperimentazione nel microcosmo 1, sono del 90, 75, 60, 67 e 73% rispettivamente all'inizio, al secondo, all'ottavo, al dodicesimo e quindicesimo giorno di analisi. Il calcolo degli indici di diversità rivela inoltre una popolazione microbica altamente differenziata con patterns differenti nelle differenti librerie di cloni analizzate (tabella 35).

Condizioni simili sono osservabili anche nella seconda sperimentazione (*microcosmo 2*) in cui comunque è possibile rilevare un aumento dei valori (0.2934) della Dominance (S') ed una diminuzione dell'indice di Shannon (1.685) che sottolineano una presenza di generi batterici specifici, come rilevato d'altronde dalle analisi tassonomiche (tabella 36).

Nella terza sperimentazione la dinamica della popolazione microbica, misurata come coverage (%), appare sostanzialmente invariata per tutto il periodo di analisi. Anche i valori degli indici di diversità mostrano una certa omogeneità anche se un accurata analisi dei gruppi batterici rivela un cambiamento fondamentale nei gruppi costitutivi (tabella 37).

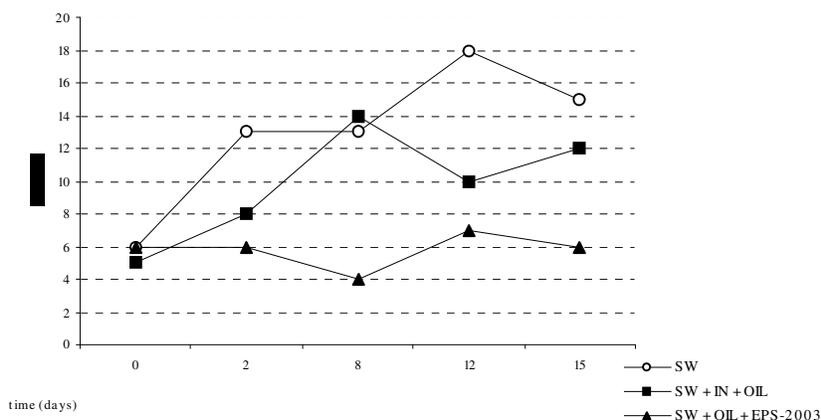


Fig. 105. Distribuzione dei gruppi tassonomici durante le sperimentazioni realizzate in microscala.

GENUS	Time (days)				
	zero	2	8	12	15
Taxa S	6	13	13	18	15
Individuals	100	100	100	100	100
Dominance (S')	0.4434	0.2322	0.171	0.099	0.1354
Shannon (H')	1.18	1.918	2.115	2.583	2.305

Simpson (1-S')	0.5566	0.7678	0.829	0.901	0.8646
Evenness (J')	0.5424	0.5237	0.6377	0.7351	0.6682
Coverage (%)	90	75	60	67	73

GENUS	Time (days)				
	zero	2	8	12	15
Taxa S	5	8	14	10	12
Individuals	100	100	100	100	100
Dominance (S')	0.5728	0.2354	0.1856	0.158	0.2934
Shannon (H')	0.864	1.625	2.105	2.018	1.685
Simpson (1-S')	0.4272	0.7646	0.8144	0.842	0.7066
Evenness (J')	0.4745	0.6351	0.5863	0.7522	0.4495
Coverage (%)	90	86	75	86	88

GENUS	Time (days)				
	zero	2	8	12	15
Taxa S	6	6	4	7	6
Individuals	100	100	100	100	100
Dominance (S')	0.4434	0.2214	0.4284	0.482	0.5116
Shannon (H')	1.18	1.626	1.073	1.176	1.063
Simpson (1-S')	0.5566	0.7786	0.5716	0.518	0.4884
Evenness (J')	0.5424	0.8476	0.7314	0.4632	0.4823
Coverage (%)	89	87	86	84	87

Tab. 35, 36 e 37. Calcolo degli indici di diversità durante le sperimentazioni realizzate in *microcosmo 1* (pagina precedente in alto), *microcosmo 2* (pagina precedente in al centro) e *microcosmo 3* (pagina precedente in basso).

Misure Relative al Metabolismo Batterico

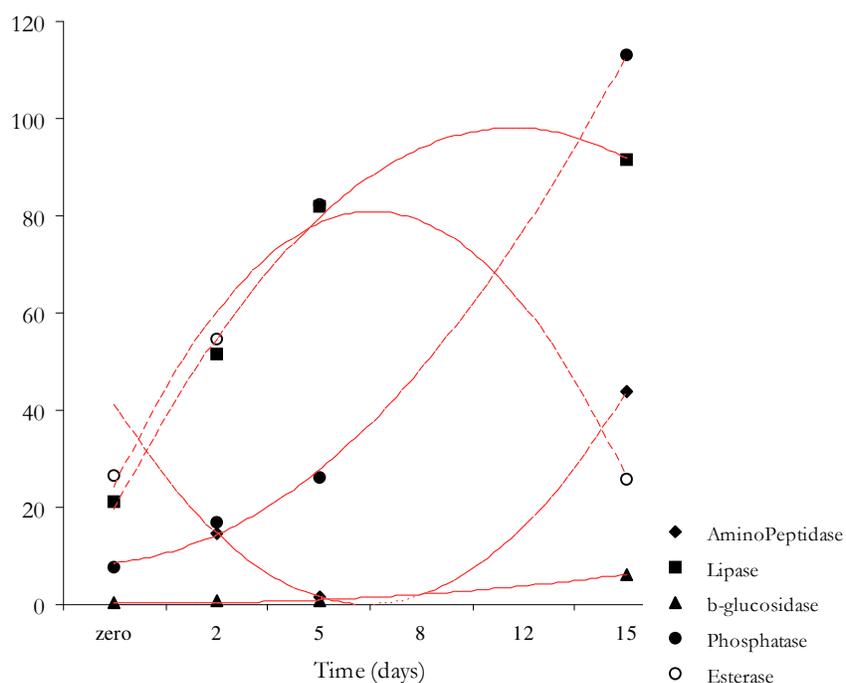
Attività enzimatica.

Microcosmo 1. I valori dell'attività enzimatica ottenuti durante la sperimentazione sono mostrati in [figura 106](#). L'analisi di questi risultati rileva valori generalmente più bassi di quelli ottenuti durante le sperimentazioni realizzate aggiungendo petrolio e/o nutrienti inorganici. Alla fine della sperimentazioni i valori di tutte le attività enzimatiche tendono a incrementare arrivando a valori di 43.75 nmol l⁻¹h⁻¹ (LAP), 91.54 nmol l⁻¹h⁻¹ (lipasi), 6.18 nmol l⁻¹h⁻¹ (□-glucosidasi), 113.17 nmol l⁻¹h⁻¹ (fosfatasi alcalina) e di 25.896 per l'esterasi.

Microcosmo 2. I risultati ottenuti durante questa sperimentazione ci mostrano che l'aggiunta contemporanea di petrolio greggio e nutrienti inorganici influenza drasticamente l'attività enzimatica. L'alta concentrazione di nutrienti inorganici inibisce l'attività eso-enzimatica anche se picchi di 589.13 e 502.89 nmol l⁻¹h⁻¹, rispettivamente della leucina aminopeptidasi (LAP) e della fosfatasi alcalina (AP), sono registrati al secondo giorno di sperimentazione. L'apporto di nutrienti non sembra influenzare

nemmeno l'attività della β -glucosidasi (β -glu), della lipasi e dell'esterasi, sebbene picchi di 24.5, 476.3 e 432.8 $\text{nmol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ sono registrati durante i primi 4-8 giorni dopo l'apporto del petrolio e dei nutrienti (figura 107).

Microcosmo 3. La presenza del biosurfattante EPS-2003 e la conseguente maggiore disponibilità del petrolio greggio per i processi biodegradativi determina un incremento nell'attività enzimatica che si registra già dal secondo giorno di sperimentazione. Solo al quindicesimo giorno di sperimentazioni è possibile regista re un decremento dell'attività della lipasi con valori che passano da 124.57 $\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ a valori di 99.81 $\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$, anche l'attività della β -glucosidasi si mostra in decremento passando da 89.77 a 57.78 $\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$, per contro l'esterasi si presenta costante (figura 108).



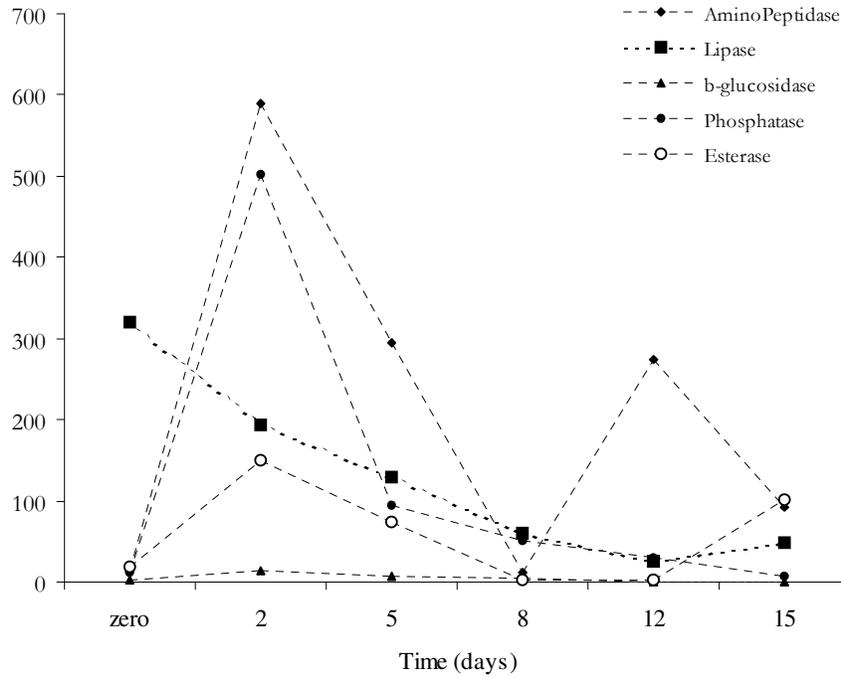


Fig. 106 e 107. Dinamica dell'attività enzimatica analizzata durante le sperimentazione in microscala *microcosmo 1* (sopra) e del *microcosmo 2* (sotto). Le linee rosse identificano le linee di tendenza di tali attività esoenzimatiche, mentre in nero sono rappresentate le linee reali di andamento.

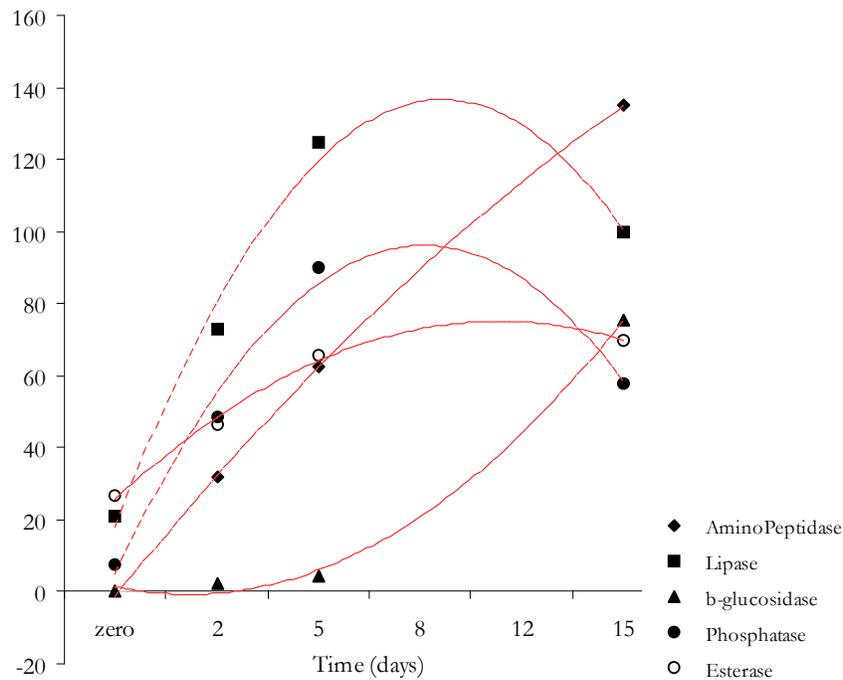


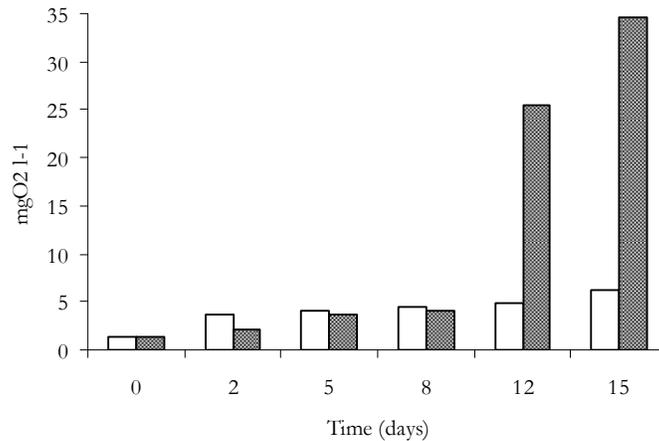
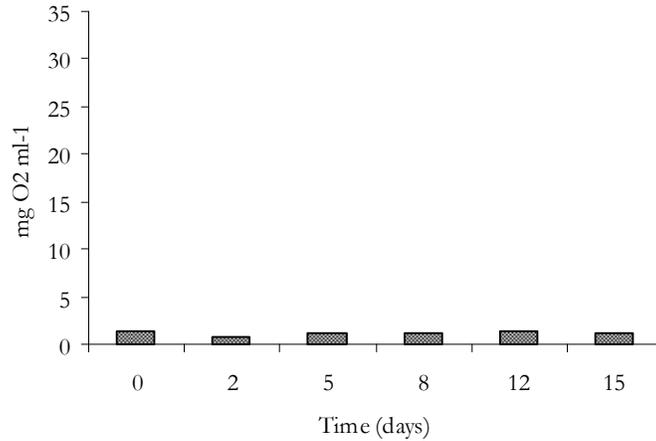
Fig. 108. *Microcosmo 3*. Attività esoenzimatica le linee rosse rappresentano le linee di tendenza in riferimento ai risultati ottenuti.

Biochemical Oxygen Demand (BOD)

Microcosmo 1. Durante questa i valori della Biochemical Oxygen Demand hanno mostrato un andamento che si è mantenuto costante per tutto il periodo di analisi con valori medi di $1.3 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ (figura 109).

Microcosmo 2. Nella sperimentazione realizzata aggiungendo all'acqua di mare dei nutrienti inorganici e petrolio greggio è possibile evidenziare, nei primi otto giorni di sperimentazione, un lieve incremento con valori iniziali passando da $1.3 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ a $4.1 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$. Tali valori aumentano dopo il dodicesimo giorno ($25.5 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$) raggiungendo al quindicesimo giorno il massimo valore di $34.7 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ (figura 110).

Microcosmo 3. Un rapido incremento registrato nei primi cinque giorni di incubazione con valori della BOD che passano da 1.1 a $15.4 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$. Dopo il quinto giorno tali valori tendono ad incrementare ulteriormente raggiungendo il massimo al quindicesimo giorno ($32.7 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$) (figura 111).



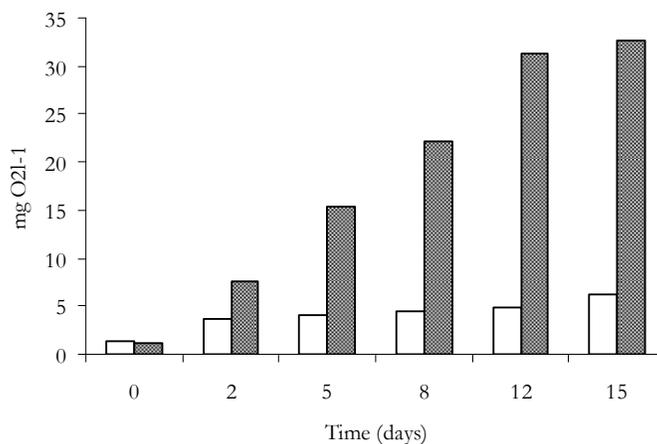


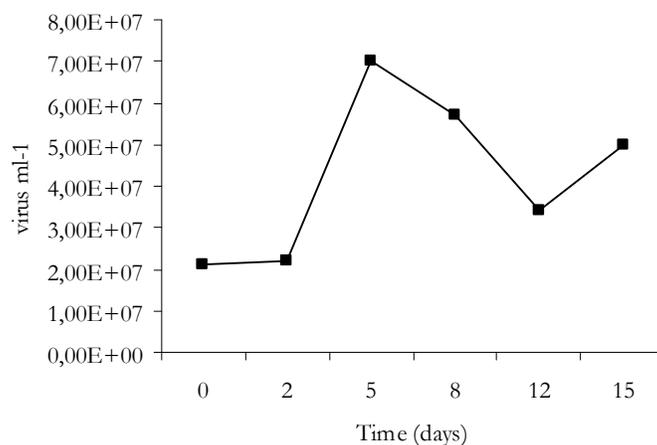
Fig. 109, 110 e 111. Misura della Biochemical Oxygen Demand durante le sperimentazione condotte in *microcosmo 1* (in alto), *microcosmo 2* (al centro) e *microcosmo 3* (in basso). Le barre con il riempimento in nero indicano la sperimentazione in studio mentre con il riempimento in bianco è rappresentato il controllo (rappresentata dalla sperimentazione condotta aggiungendo del petrolio grigio all'acqua di mare. *Microcosmo B* – Capitolo I).

Misure di Abbondanza Virale

Microcosmo 1. Durante tutto il periodo di questa sperimentazione l'abbondanza virale si è mantenuta costante su valori medi di 4.2×10^7 virus ml⁻¹ (figura 112).

Microcosmo 2. Dopo un incremento di un ordine di misura registrato nelle prime 48 ore (1.1×10^8 virus ml⁻¹) i colori dell'abbondanza virale sembrano decrescere nuovamente (time 5 days) per arrivare a valori simili a quelli iniziali per aumentare successivamente e raggiungere il massimo valore (2.5×10^8 cell ml⁻¹) alla fine della sperimentazione (figura 113).

Microcosmo 3. Non sono state realizzate misurazione per questa sperimentazione.



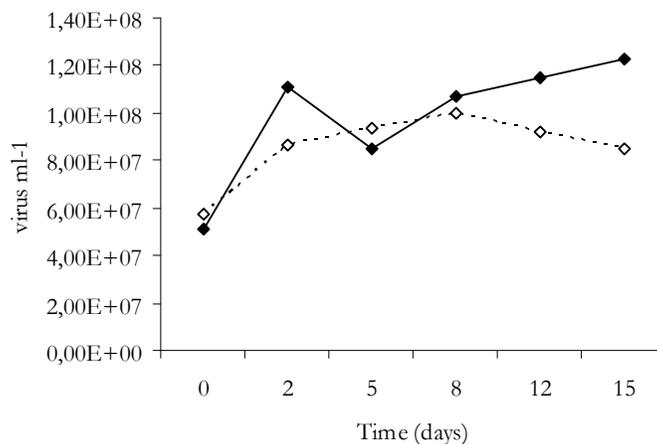


Fig. 112 e 113. Quantitativo delle particelle virali durante le sperimentazioni in *microcosmo 1* (seawater) e nel *microcosmo 2* (seawater con petrolio greggio e nutrienti inorganici). Le linee continue nere indicano il microcosmo in studio, mentre le linee bianche tratteggiate si riferiscono alla condizione del *microcosmo B* (Capitolo I) utilizzato come controllo.

Misure di Abbondanza degli Heterotrophic Nano Flagellates

Microcosmo 1. Durante questa sperimentazione il quantitativo dei protozoi eterotrofi nano flagellati (HNF) tende a mantenersi costante con valori medi di 2500 cellule ml⁻¹, come mostrato in [figura 114](#).

Microcosmo 2. La misura dell'abbondanza degli HNF è mostrato in [figura 115](#). Dopo le prime 48 ore è possibile osservare un rapido e continuo aumento della concentrazione del HNF, che passa da valori di 28000 cell. ml⁻¹ (time 3 days) a valori massimi di 50000 cell. ml⁻¹ (time 5 days). Tale valore tenderà successivamente ad decrementare ritornando fino a valori simili a quelli presenti all'inizio della sperimentazione.

Microcosmo 3. L'andamento del quantitativo protozoi per il *microcosmo 3* (acqua di mare con petrolio greggio ed EPS-2003) è simile a quello registrato nel *microcosmo 2*. Dopo le prime 48 ore caratterizzate da un andamento costante con valori medi di 2000 cell. ml⁻¹ un forte incremento è registrato al terzo giorno con valori che raggiungono circa le 79000 cell ml⁻¹, subito dopo il raggiungimento durante il quarto giorno di sperimentazione del picco massimo (86000 cell ml⁻¹) si può assistere ad una progressiva e rapida diminuzione di questi valori ([figura 116](#)).

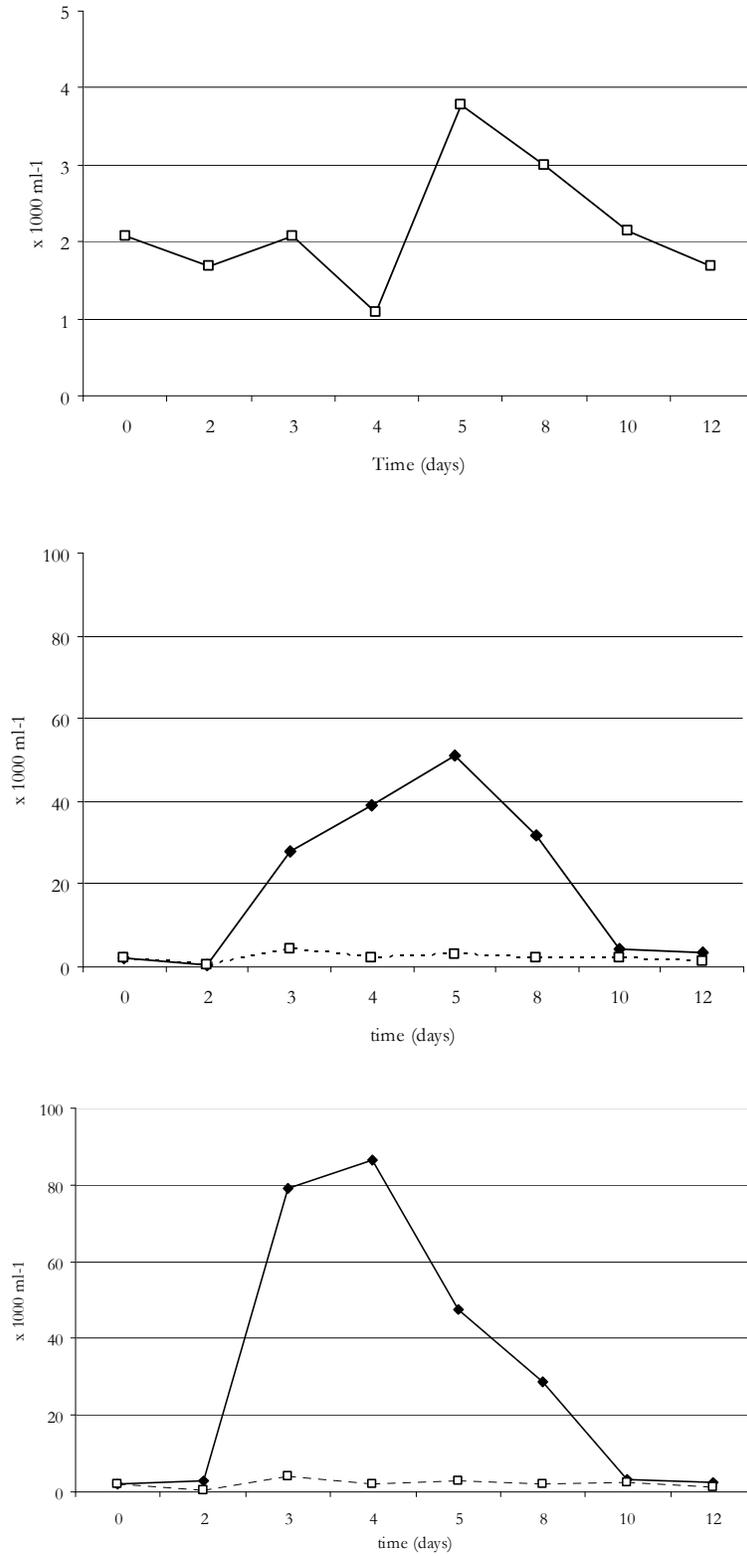


Fig. 114, 115, 116 Conta dei protozoi HNF durante le sperimentazione condotta in *Microcosmo 1*. (figura in alto), in *microcosmo 2* (figura centrale) e nel *microcosmo 3* (figura in basso). Le linee continue nere indicano il microcosmo in studio, mentre le linee bianche tratteggiate si riferiscono alla condizione del *microcosmo B* (Capitolo I) utilizzato come controllo.

PUBBLICAZIONE n° 4

Questo lavoro è stato sottomesso per la pubblicazione su *Journal Applied Microbiology* in data 26 settembre 2005 (Manuscript ID: JAM-2005-1121)

1 **Microbial community dynamics during assays of an harbour oil spill bioremediation: a**
2 **microscale simulation study**

3 S. Cappello^{1*}, G. Caruso¹, D. Zampino², M. Yakimov¹, L. S. Monticelli¹, G. Maimone¹, B.
4 Tripodo¹, M. Troussellier³ and L. Giuliano¹

5 1. Istituto per l'Ambiente Marino Costiero (IAMC) IST-CNR Section of Messina, Messina,
6 Italy.

7 2. Istituto di Chimica e di Tecnologia dei Polimeri (ICTP) CNR – Section of Catania, Italy.

8 3. Université de Montpellier II – Department de Biologie Evolution Environment CNRS –
9 Montpellier, France.

10 **SUMMARY**

11 **Aims:** We aimed at evaluating the dynamics of the microbial community and the effects of oil
12 on both microbial abundance, structure and function, in a microcosm simulating a spill event.

13 **Methods and Results:** An experimental harbour seawater microcosm, biostimulated with
14 nutrients and crude oil, was monitored over 15 days in comparison with a control unpolluted
15 one. Bacterial cells were counted with a Live/Dead BacLight viability kit; leucine
16 aminopeptidase, β -glucosidase, alkaline phosphatase, lipase and esterase enzymes were
17 measured using fluorogenic substrates. The genetic diversity of the community was studied
18 through 16S rDNA analysis. Oil addition stimulated an increase of the total bacterial
19 abundance, leucine aminopeptidase and phosphatase activity rates, as well as a change in the
20 community structure; this suggested a prompt response of microorganisms to hydrocarbons
21 presence.

1 **Conclusions:** The study of the viability, specific composition and metabolic characteristics of
2 the microbial community allows a more precise assessment of oil pollution. Both structural
3 and functional parameters offer interesting perspectives as indicators to monitor changes
4 induced by hydrocarbons.

5 **Significance and Impact of the Study:** A better knowledge of microbial structural changes
6 in oil-polluted sites is essential for environmental bioremediation. Data obtained on
7 microscale improve understanding of natural processes occurring during oil spills.

8 **Running headline:** Microbial dynamics in microcosms

9 **Correspondence to:** Dr. Simone Cappello, Istituto per l' Ambiente Marino Costiero IST-CNR
10 Section of Messina, Italy (e-mail: simone.cappello@iamc.cnr.it). Phone: +39-090-669003,
11 Fax +39-090-669007

12 **Keywords:** Oil spill, harbour, bioremediation, microcosms, microbial biodiversity,
13 hydrocarbonoclastic bacteria, microbial enzymes.

14

SPERIMENTAZIONI in MESOSCALA

L'utilizzo dei mesocosmi per lo studio dei sistemi ambientali fornisce dei modelli test in mesoscala (Odum E. P., 1984; Reilly T. J. *et al.*, 1994) in cui è possibile, tramite un controllo ed un'interazione sufficiente fra delle variabili indipendenti e i parametri chimici, fisici o biologici (Santas S. *et al.* 1999; Reilly T. J. 1999), lo studio dei sistemi dinamici in diverse regioni dello spazio e del tempo (Vallino J. J., 1999). Differenti lavori hanno dimostrato la grande versatilità e potenzialità di tali sistemi nel ricreare i processi naturali (Alldredge A. L., *et al.* 1995; Lebaron P., *et al.* 2001; Sangallo R., *et al.* 1999; Takeuchi K., *et al.* 2002 ecc.).

Strutture di forma cilindrica (Alldredge A. L., *et al.* 1995; Engel A., *et al.* 2002; Reilly T. J. 1999), rettangolare (Reilly T. J., 1999; Shaker H., *et al.* 2001; Lebaron P., *et al.* 2001; Santas R., *et al.* 1999) o a vasca (Santas R., *et al.* 1998); dalla capacità di poche centinaia di litri (Takeuchi K., *et al.* 2002; Engel A., *et al.* 2002) ad alcune migliaia (Reilly T. J., 1999); di differente materiale come vetroresina (Engel A. *et al.* 2002; Santas R., *et al.* 1999), plexiglass (Santas R., *et al.* 1998) o acciaio (Lebaron P., *et al.* 2001; Reilly T. J., 1999) sono state proposte per ottimizzare la riproduzione degli ambienti naturali. Comunque sia il design e le dimensioni della camera di reazione, il materiale di costruzione e i parametri di regolazione possono essere, dunque, estremamente vari e dipendono, per un dato esperimento, dal tipo di ambiente che deve essere riprodotto, e dai processi chimico-fisici e biologici in studio.

Per esempio, modelli di mesocosmi sono stati costruiti e progettati per lo studio della dinamica delle popolazioni microbiche in ambiente marino (Lebaron P., *et al.* 2001; Pukall R., *et al.* 1999; Shaker H., *et al.* 2001; Takeuchi K., *et al.* 2000), per l'analisi dei bloom di diatomee (Engel A., *et al.* 2002; Alldredge A. L., *et al.* 1995), per studiare gli effetti delle radiazioni ultraviolette (Santas R. *et al.* 1998) e dell'impatto di inquinanti nell'ecosistema (Delille D., *et al.* 1998; Santas R., *et al.* 1999).

Risulta difficile, pertanto, fare un elenco generale di tutte le possibili combinazioni dei parametri sopra detti. Tuttavia le caratteristiche essenziali per la realizzazione di sistemi in scala che permettano lo studio di fenomeni di inquinamento da petrolio su aree marine e di quelle costiere sono state ampiamente delineate dal Marine Spill Response Organization in collaborazione con il Marine Ecosystem Research Laboratory (MERL). In generale le vasche di reazione devono presentare una taglia minima che è stabilita in relazione agli eventi chimico-fisici che si vogliono riprodurre, ma che in ogni caso non può essere mai inferiore ai 3000 litri di capacità volumetrica; tali vasche devono presentare un sistema di simulazione di onde, che si identificano come il principale fenomeno che controlla lo sviluppo delle spiagge, e devono

presentare un sistema di ricircolo interno, necessario per la simulazione degli effetti delle onde e delle correnti e che provvedono ad una ossigenazione del sistema; infine si dovrà considerare la presenza di sistemi meccanici che permettano di simulare i cicli di marea, fenomeni particolarmente importante per gli ambienti di confine. Le vasche, e le componenti annesse, dovranno essere costruiti con materiali inerti e atossici o comunque incapaci di rilasciare, col tempo, sostanze inibenti per la crescita delle componenti biologiche; al tempo stesso i materiali da costruzione dovranno evitare, per quanto possibile, la possibilità di adesione del petrolio, dei batteri o di sostanze chimiche (ad esempio biodisperdente) utilizzate durante le sperimentazioni (Reilly *et al.*, 1999).

L'entrata e l'uscita dell'acqua dalle vasche dovrà essere regola da un sistema filtrante che permetterà una regolazione delle caratteristiche chimico fisiche dell'acqua utilizzata. Inoltre particolarmente importante sarà la presenza di una specifica strumentazione capace di monitorare e regolare (secondo le necessità sperimentali) i parametri chimico e fisici del sistema in studio.

Accanto a queste queste caratteristiche chiave vanno considerati anche i parametri funzionali identificati da molti studi come come indici più o meno diretti per ottenere informazioni fondamentali relative all'efficacia e all'impatto degli interventi di bioremediation. Misure biotiche come l'abbondanza microbica, la vitalità della popolazione batterica, la misura e la selezione di batteri idrocarburo degradanti (Yakimov *et al.*, 2004), l'analisi della struttura della popolazione o misure abiotiche come l'analisi della composizione del petrolio, la domanda biochimica di ossigeno o la concentrazione dei nutrienti sono solo alcuni dei parametri definiti fondamentali e necessari per meglio comprendere questi fenomeni ed intervenire per una loro ottimizzazione; anche se questo non sempre risulta facile per gli ecosistemi esterni.

Alla luce delle sperimentazioni realizzate in microscala (microcosmi) abbiamo voluto vedere se cambiamenti di scala potessero influenzare drasticamente i processi di biodegradazione del petrolio e lo sviluppo di popolazione batteriche selezionate. Le stesse sperimentazioni realizzate in microscala sono state realizzate in una scala maggiore (mesocosmi), durante le quali A tal fine sono state realizzate tre sperimentazioni in mesoscala durante i quali sono stati misurati tutti quei parametri biotici che abiotici che abbiamo ritenuto fondamentali per monitorare i processi sopra detti.

MATERIALI e METODI

Ingegneria dei Mesocosmi

Le sperimentazioni in mesoscala sono state condotte su una “Mesocosm Facility” progettata e costruita presso l’Istituto per l’Ambiente Marino Costiero (IAMC) IST-CNR di Messina in collaborazione con l’Università della Tuscia di Viterbo (Italia).

Tale “Mesocom Facility” è costituita da due vasche di sperimentazione dalla forma rettangolare.

La prima vasca presenta una capacità volumetrica di 15.000 litri con dimensioni di 500 cm (lunghezza), 150 cm (altezza) e 150 cm (profondità), mentre la seconda pur presentando le stesse capacità di carico e le stesse dimensioni è divisa in tre compartimenti indipendenti ad opera di paratie interne (figura 117, 118 e 119).

Ogni vasca è costituita nell’insieme dai rispettivi disoleatori, collettori d’aspirazione, elettropompe, filtri biologico-meccanici, perifiltri, varie valvole ed elettrovalvole e tubi in pvc che collegano tra loro i vari componenti.

Struttura della vasca principale

Carico dell’acqua. I mesocosmi sono stati caricati tramite una presa a mare con acqua dello Stretto di Messina.

La vasca. La vasca è costituita da un traliccio d’acciaio scatolato ricoperto da vetroresina. La scelta della vetroresina come materiale utilizzato è stata determinata rispetto ad esempio all’acciaio o al teflon non solo da un migliore rapporto qualità-prezzo, ma anche da una facilità di lavorazione superiore. Tale struttura è inoltre rivestita da un gel coat e top coat a base isoftalica la cui struttura chimica permette di evitare l’adesione del petrolio alle pareti interne della vasca ed il rilascio di sostanze potenzialmente tossiche per la flora microbica marina.

Il collettore di aspirazione. Il flusso dell’acqua all’interno della vasca entra nel sistema del ricircolo attraverso il collettore d’aspirazione: l’acqua viene aspirata da tre condotte (tutte in pvc-u pn10 di 750 mm Ø) posizionate lateralmente lungo la vasca (figura 120) e da una condotta verticale di 75 mm di diametro posta all’interno del pozzetto per le prove di sedimentazione (figura 121).

Le condotte ed il pozzetto hanno ognuno un misuratore di portata con un rotore a cinque pale in halar che verifica l'esatto flusso uscente dalla vasca (figura 122).

Il disoleatore. Le quattro aspirazioni si uniscono in un tubo in pvc-u pn10 con diametro di 110 mm e vanno ad confluire in un disoleatore in vetroresina, con una flangia di 110 mm Ø in entrata e di 75 mm Ø in uscita.

Il disoleatore ha una struttura tale da rallentare il flusso all'interno affinché la pellicola oleosa rimanga in superficie e vengano trattenuti i corpi solidi (figura 123).

Il tempo di permanenza dell'acqua è di 3.1 minuti con la pompa in massima aspirazione.

Nella prima camera di sedimentazione è prevista una valvola da 20 mm Ø per il campionamento dell'acqua durante le sperimentazioni (figura 124).

La pompa di aspirazione. Il disoleatore in uscita ha una valvola a farfalla che si allaccia all'aspirazione effettuata da una elettropompa costituita da una pompa centrifuga tipo FNM4 50 EEEP accoppiata a mezzo giunto rigido a motore elettrico, potenza 1.5 Kw 3phase con 6-10 m³h⁻¹ a 12 metri di prevalenza e aspirazione e mandata entrambe con flangia Dn 50 (figura 125).

La pompa d'aspirazione ha un rivestimento in halar di tutte le sue parti che vengono a contatto con l'acqua; tale materiale garantisce una resistenza al petrolio superiore rispetto ad altri materiali. In particolare, la girante aperta, anch'essa rivestita in halar, evita un possibile blocco della pompa in caso di presenza di corpi solidi nell'acqua.

Filtrazione biologica-meccanica. In uscita dalla mandata della pompa. (dopo una struttura complessa costituita da una valvola di non ritorno, una valvola a farfalla 63 mm Ø ed un misuratore di portata) c'è il filtro a sabbia di quarzo con di granulometria di 0.4-0.8 mm. Questo filtro è costituito da un bobinato di 800 mm in poliestere rinforzato ad alto rendimento con un altezza del letto filtrante di 1 metro ed una velocità di filtrazione di 40 m³ h⁻¹. Questa velocità di flusso permette l'insediamento dei batteri nitrificanti e attua una filtrazione meccanica a 60 micron (figura 126).

Il filtro può contenere circa 780 kg di sabbia ed è regolato da una valvola selettiva a sei vie: filtrazione, svuotamento, chiusura, lavaggio, ricircolo e risciacquo, tutti processi che coinvolgono un buon funzionamento del sistema di ricircolo (figura 127).

Mandata in vasca. La mandata in vasca è formata da un circuito perimetrale al bordo della vasca costituito di valvole in pvc-u 20 mm che assolvono anche alla funzione di lavare le pareti della vasca del film oleoso (figura 128).

Le valvole del sistema sono tutte a farfalla in pvc-u con guarnizione in epdm o viton, più affidabili e resistenti agli oli rispetto alle valvole a sfera radiali in pvc-u.

Struttura della vasca secondaria

Carico dell'acqua. La seconda vasca è una vasca compartimentata che ha tre carichi indipendenti, collegati con la presa a mare.

La vasca. La vasca è sempre composta da un traliccio in acciaio scatolato ricoperto da vetroresina. Il rivestimento interno è di gel coat e top coat a base isoftalica.

Tale mesocosmo è diviso in tre parti da tre paratie in vetroresina dove ogni parte di vasca ha un circuito separato di ricircolo dell'acqua. Le paratie sono inserite nelle sedi e sigillate con materiale sigillante Sicaflex 211 per evitare lo scambio di acqua tra i tre sistemi.

Il collettore di aspirazione. L'acqua di ogni terzo di vasca è aspirata da una condotta laterale di 75 mm di diametro e una delle tre parti di vasca ha la doppia mandata a pozzetto per le prove di sedimentazione.

L'aspirazione del pozzetto anche qui ha un misuratore di portata con un rotore a cinque pale in e-ctfe in halar per verificare l'esatto flusso che passa attraverso il pozzetto.

Il disoleatore. La singola aspirazione confluisce in un disoleatore in acciaio scatolato ricoperto di vetroresina con una flangia del 110 mm Ø in entrata e del 75 mm Ø in uscita.

Il tempo di permanenza dell'acqua nel disoleatore è di 3.1 minuti con la pompa in massima aspirazione; in questo periodo i corpi solidi e il film oleoso sono trattenuti.

La pompa di aspirazione. Il disoleatore in uscita ha una valvola a farfalla che si allaccia all'aspirazione effettuata da una elettropompa centrifuga (tipo FNM4 50 EEEP) accoppiata a mezzo giunto rigido a motore elettrico, potenza 1.5 Kw 3 phase con 6-10 m³/h a 12m di prevalenza e aspirazione e mandata entrambe con flangia Dn 50. Le pompe sono tutte uguali per poter meglio standardizzare gli impianti.

Filtrazione biologica-meccanica. Il filtro a sabbia di quarzo (granulometria 0.4-0.8 mm) è un bobinato di 500mm in poliestere rinforzato ad alto rendimento con passo d'uomo laterale in ABS 200 mm. I filtri delle tre parti di vasca sono più piccoli ma hanno sempre un letto filtrante di 1m ed una velocità di filtrazione di $40\text{m}^3 \text{h}^{-1}$. Questa velocità di flusso permette l'insediamento dei batteri nitrificanti e attua una filtrazione meccanica a 60 micron.

Il filtro può contenere circa 290 kg di sabbia ed è regolato da una valvola selettiva a sei vie: filtrazione, svuotamento, chiusura, lavaggio, ricircolo e risciacquo.

Mandata in vasca. Le tre mandate in vasca sono formate da un circuito perimetrale al bordo della vasca costituito da valvole in pvc-u 20 mm \varnothing che assolvono anche la funzione di lavare le pareti della vasca dal film oleoso.

Sistema di Condizionamento. In tutti e quattro gli impianti di ricircolo dopo il filtro a sabbia, sono montati degli scambiatori di calore a fascio tubiero in titanio, guarnizioni in epdm speciale e attacchi in inox che:

- i. raffreddano l'acqua delle vasche, tramite scambio diretto con l'acqua fredda prelevata dalla presa a mare dello Stretto di Messina. Tale acqua è inoltre filtrata da un microfiltro in acciaio aisi 316 da 50 μm per evitare l'intasamento dello scambiatore ad opera di particelle in sospensione;
- ii. riscaldano l'acqua delle vasche, scambiando con un primario d'acqua calda di una caldaia.

Nel progetto finale è prevista una caldaia per riscaldare l'acqua delle vasche durante il periodo invernale, mentre è possibile gestire la temperatura dell'acqua con il primario nello scambiatore negli altri periodi dell'anno con lo stesso procedimento del raffreddamento.

Il passaggio dell'acqua del primario nello scambiatore è regolato da un termostato di controllo che agisce semplicemente su un'elettrovalvola a 24 volts.

Trattamento dell'acqua in entrata ed in uscita. Sulla presa a mare è montato in by-pass due microfiltri in acciaio, aisi 316 T, filtrazione $15 \text{m}^3 \text{h}^{-1}$ a 100 e 5 micron (figura 129) ed uno sterilizzatore a raggi UV, portata $15 \text{m}^3 \text{h}^{-1}$ con grado di sterilizzazione $40.000 \text{microwatt cm s}^{-1}$ in acciaio aisi 316 trattato per l'acqua di mare (potenza di quattro lampade da 40 watt).

La sterilizzazione permette di caricare acqua di mare per le prove sterili e per le varie richieste che il sistema di ricircolo dell'acqua possa avere.

Anche in uscita è stato montato un sistema in by-pass simile, costituito da un microfiltro e da uno sterilizzatore con le stesse caratteristiche dei precedenti. Questo sistema permette per permettere lo scarico diretto dell'acqua priva di residui chimici e batteriologici alla fine delle sperimentazioni.

Vasche di Marea. A quota zero del locale dei mesocosmi vi sono le quattro vasche di marea, con un volume lordo di 600 litri.

Il loro riempimento avviene con l'acqua di mandata dei mesocosmi e il ritorno in vasca dell'acqua avviene tramite delle piccole pompe accessoriate con dei piccoli misuratori di flusso per monitorare la montata della marea.

Set-up dei Mesocosmi

Le vasche sono state riempite con circa 10.000 litri di acqua costiera prelevata direttamente dal sito antistante il suddetto Istituto. Per favorire l'eliminazione dei metazoi, di particellato e/o detriti eventualmente presente nell'acqua, questa è stata da prima filtrata attraverso un sistema filtrante con porosità di 100 μm .

La temperatura dell'acqua è stata mantenuta per tutto il periodo della sperimentazione a circa 20°C con fluttuazioni giornaliere che non hanno mai superato i 2°C.

Sperimentazioni in mesoscala (Mesocosmi)

In questo lavoro sono state realizzate tre sperimentazioni in mesoscala.

Il Mesocosmo 1 è stato utilizzato come vasca di controllo e pertanto è stato allestito solo con acqua di mare a cui non sono stati aggiunti né nutrienti inorganici né petrolio.

Il Mesocosmo 2 è stata allestito riempiendo la vasca di analisi con un volume di 10.000 litri di acqua marina a cui è stata addizionata del petrolio greggio del tipo Arabian Ligth Crude Oil (0,01 gr/L) e nutrienti inorganici KH_2PO_4 (0.077 gr/L), NH_4Cl (0.2 gr/L) e NaNO_3 (0,1 gr/L).

Una terza sperimentazione, identificata come **Mesoscosmo 3**, è stata realizzata addizionando all'acqua marina (10.000 litri) del petrolio greggio alla concentrazione di 0.01 gr/L e del biosurfattante naturale EPS-2003 alla concentrazione di 1/10 di quella del petrolio aggiunto.

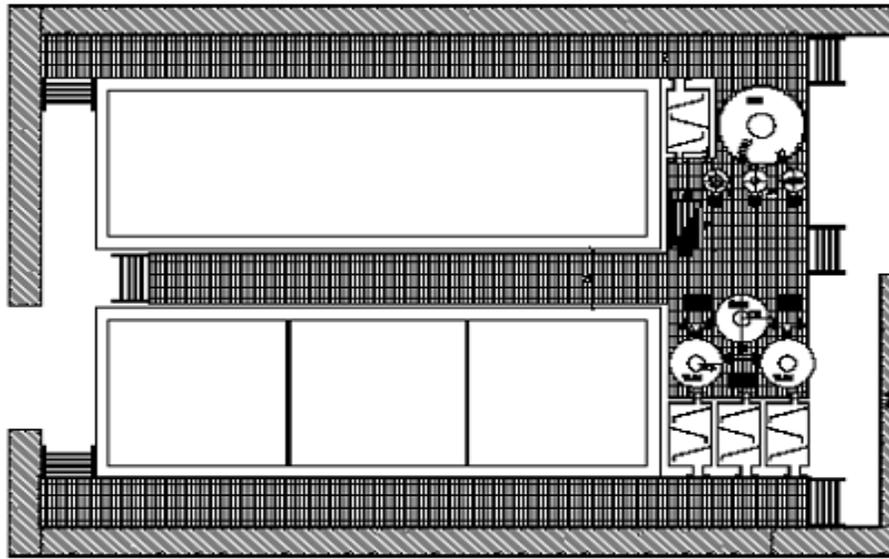


Figura 117. Schema delle vasche di sperimentazione (visione dall'alto)

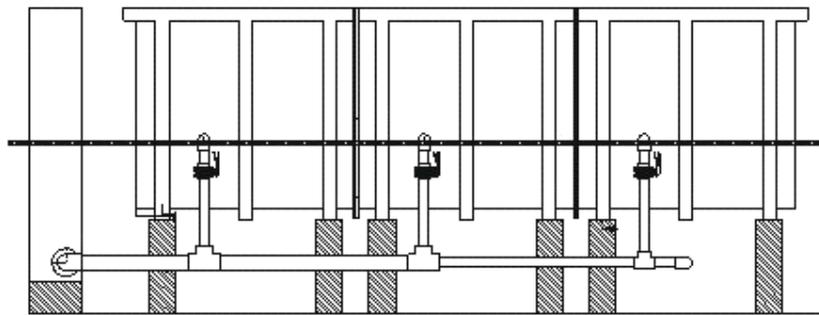


Figura 118. Schema delle vasche (sopra e sotto) di sperimentazione (visione laterale)

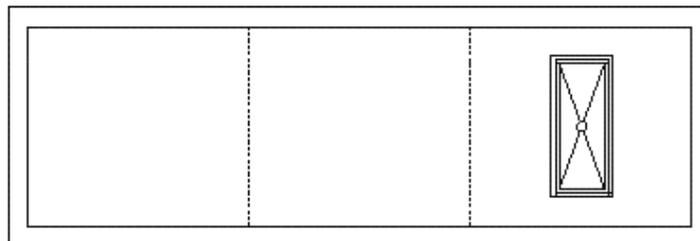




Figura 119. Visione delle vasche di sperimentazione.



Figura 120. Particolare delle condotte di aspirazioni laterali.



Figura 121. Particolare della condotta di aspirazione verticale.



Figura 122. Particolare del rotore in halar per la misurazione del flusso all'interno delle vasche di sperimentazione.



Figura 123. Disoleatore e particolare della zona superiore dello stesso.



Figura 124. Particolare della valvola di campionamento posta alla base del disoleatore.



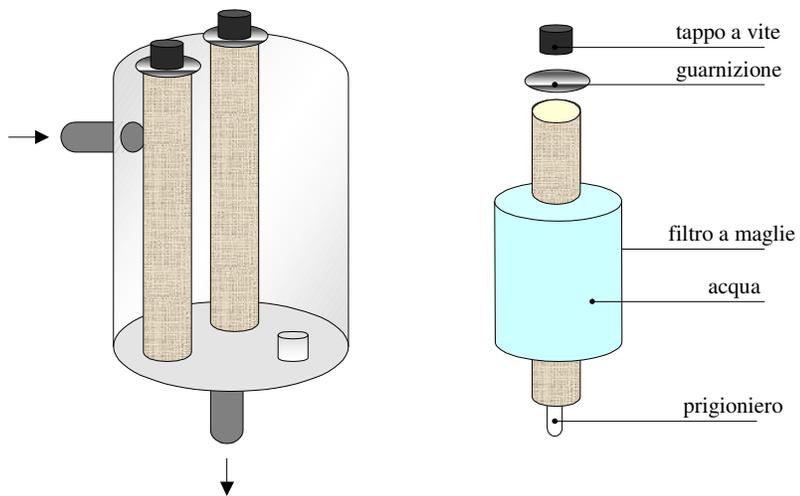
Figura 125. Elettropompa centrifuga (tipo FNM4 50 EEEP).



Figura 126 e 127. Filtro a sabbia di quarzo e particolare della valvola a 6 vie annessa.



Figura 128. Particolare delle valvole per la pulitura delle pareti.



s.cappello 2004 ©

Figura 129. Sistema di filtrazione e di debatterizzazione. Struttura schematica dei filtri.

Tempistica e Campionamento

Le sperimentazioni in mesoscala sono state condotte per un periodo di tempo di 15 giorni. Ad intervalli di 2, 5, 8, 12 e 15 giorni a partire dal momento dell'inoculo (tempo zero) sub-campioni d'acqua sono stati raccolti direttamente dalle vasche di reazioni per la misura dei parametri funzionali biotici e abiotici.

Misura dei Parametri Funzionali

Durante queste sperimentazioni i parametri biotici e abiotici sono stati misurati tramite le metodiche riportate in questo lavoro, nel “Capitolo I: Paragrafo II: Sperimentazione in Microscala”.

Analisi dei Parametri Abiotici “Chiave”

RISULTATI

Determinazione dei nutrienti: Ammoniaca, Nitrati, Nitriti, Fosfati.

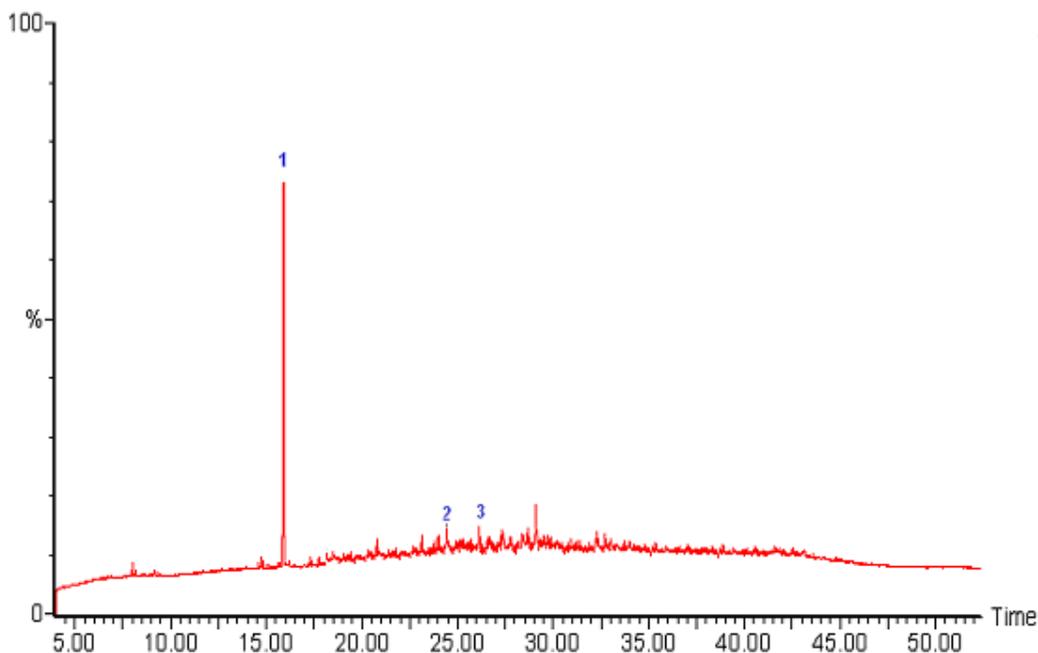
Al fine di misurare la disponibilità dei nutrienti inorganici (per la componente microbica) e analizzare il flusso degli stessi durante le sperimentazioni di bioremediation realizzate in mesoscala sono state misurate le concentrazioni del fosfato, dell'ammonio e dell'azoto (nitriti e nitrati) come mostrato nelle tabelle corrispondenti.

I risultati ottenuti (non mostrati) sono stati direttamente impiegati per lo sviluppo e la calibrazione del modello matematico.

Analisi quali quantitativa del petrolio.

La [figura 130](#) mostra il cromatogramma realizzato, tramite analisi CG-MS, su di un campione di acqua di mare prelevato prima dell'inizio delle sperimentazioni. I risultati ottenuti mostrano la totale assenza di contaminazioni idrocarburiche o di altre sostanze chimiche che avrebbero potuto influenzare il corretto svolgimento delle sperimentazioni.

Mesoscosmo 3. Per contro nella [figura 131](#) è mostrata la composizione del petrolio greggio all'inizio della sperimentazione realizzata durante il *mesocosmo 3*, previa aggiunta di biodispersente EPS-2003 e dopo un periodo di quindici giorni di analisi ([figura 132](#)).



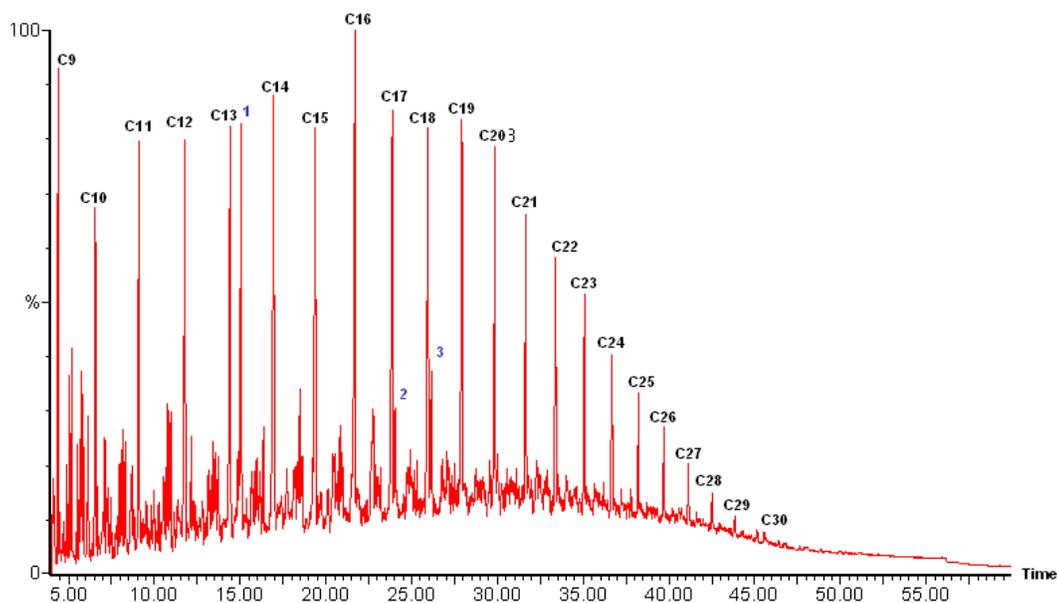


Fig. 130 e 131. Cromatogrammi, realizzati tramite analisi CG-MS, che mostrano la presenza e la distribuzione degli n-alcani in un campione di acqua marina naturale (sopra) e del petrolio Arabian Ligth Crude Oil (sotto). I picchi corrispondenti agli n-alcani sono stati opportunamente nominati, mentre con il numero 1 viene indicato il picco corrispondente al nonano (standar interno di processo), e con i numeri 2 e 3 sono identificati rispettivamente il fitano e il pristano (standard di analisi).

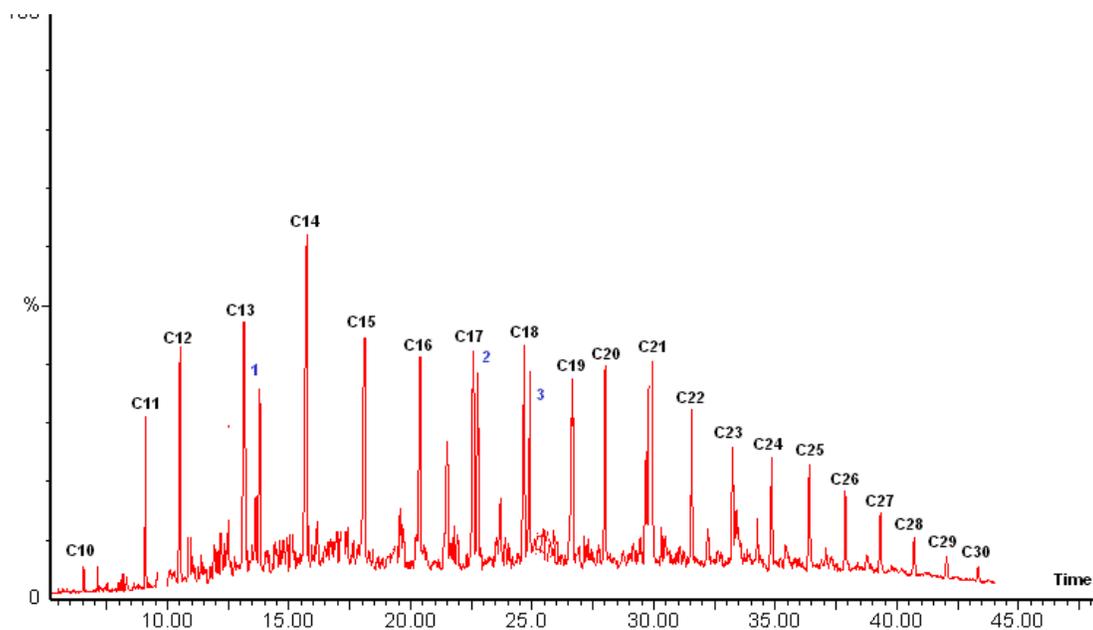


Figura 132. Cromatogramma dell'evoluzione degli idrocarburi lineari dopo quindici giorni di sperimentazione in scala identificata come *Mesocosmo 3*. I picchi corrispondenti agli n-alcani sono stati opportunamente nominati, mentre con il numero 1 viene indicato il picco corrispondente al nonano (standar interno di processo), e con i numeri 2 e 3 sono identificati rispettivamente il fitano e il pristano (standard di analisi).

Calcolo dell'indice $(C_{17}/Pr+C_{18}/Ph)/2$. Con riferimento al lavoro di Marty (1994) è stato calcolato il rapporto tra la quota del *fitano* (2,6,10,14- C_{20}) e quella del *pristano* (n- C_{18}) al fine di normalizzare i risultati ottenuti dall'analisi CG-MS e misurare l'intensità della degradazione microbica del petrolio greggio (tabella 39).

Experimentation	Time (days)	C17/Pr	C18/Ph	$(C17/Pr + C18/Ph)/2$
<i>Mesocosm 3</i>				
	zero	3,18	2,37	2,775
	15	2,58	2,81	2,695

Tab. 39. Calcolo del rapporto *fitano/pristano*.

Durante il periodo di questa sperimentazione il 28% del petrolio greggio presente nella vasca di reazione presentava veniva degradato, come evidenziato in [figura 132](#).

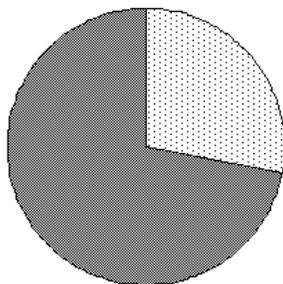


Fig. 132. Degradazione del petrolio dopo quindici giorni di sperimentazione (*Mesocosmi 3*). La porzione rappresentata con il riempimento pieno indica la parte non degradata del greggio (circa 72%), con il riempimento chiaro viene indicata la porzione di petrolio interessato da fenomeni di biodegradazione (circa il 28%).

L'analisi tramite GS-MS rivela che frazione di idrocarburi degradati risultata costituito per il 53% da alcani lineari, per il 27% da idrocarburi ramificati mentre il restante 20% era costituito da idrocarburi ciclici ([figura 133](#)).

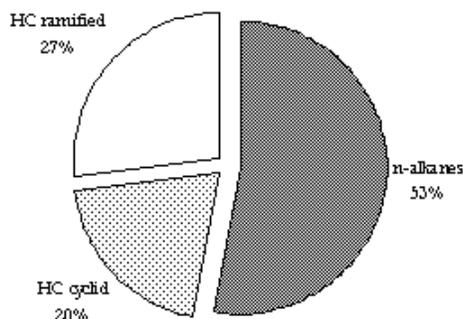


Fig. 133. *Mesocosmi 3.* Rappresentazione delle differenti frazioni del greggio interessate ai fenomeni di degradazione (circa 28% del petrolio totale). Per facilità di visualizzazione ogni frazione a tempo iniziale è stata rappresentata in percentuale assoluta con riempimento scuro, per contro con riempimento chiaro sono state indicate il quantitativo delle frazioni corrispondenti alla fine della sperimentazione.

Misura del pH e della Temperatura.

Le variazioni di pH e di temperatura sono state monitorate ad intervalli regolari di 24 ore nelle sperimentazioni realizzate.

I valori di pH si sono sempre mantenuti costanti con valori medi di 8.7; mentre la temperatura, all'interno delle vasche di analisi, si è mantenuta costante con valori di circa 20°C con escursioni termiche giornaliere che non hanno mai ecceduto i 2°C.

Misure batteriologiche di Abbondanza

Conta delle cellule totali (DAPI)

Mesocosmo 1. All'inizio della sperimentazione la conta del bacterioplankton totale presenta valori di 5.4×10^5 cell. ml⁻¹ che si mantengono stabili fino all'ottavo giorno quando aumentano di un ordine di grandezza e si mantengono costanti fino alla fine della sperimentazione con valori medi di 3.8×10^6 cell ml⁻¹ (figura 134).

Mesocosmo 2. L'aggiunta del petrolio greggio e dei nutrienti inorganici nell'acqua marina determinano nei primi cinque giorni di sperimentazione un incremento della popolazione microbica che passa da valori iniziali di 4.3×10^5 a valori di 2.8×10^8 cell ml⁻¹ (time 5 days). Raggiunti tali valori le quote del bacterioplankton totale presentano una fase stazionaria che si mantiene quasi fino alla fine del periodo di analisi quando è osservabile un decremento di un ordine di misura (5.2×10^9 cell ml⁻¹) (figura 135).

Mesocosmo 3. Durante questa sperimentazione un progressivo aumento della densità batterica è mostrato nelle prime 48 ore di analisi (figura 136) quando si passa da valori di

4.5×10^5 cell ml⁻¹ a valori di 5.1×10^7 cell ml⁻¹. Solo al dodicesimo giorno è possibile osservare un nuovo incremento con valori che si mantengono stabili fino alla fine (6.3×10^8 cell ml⁻¹).

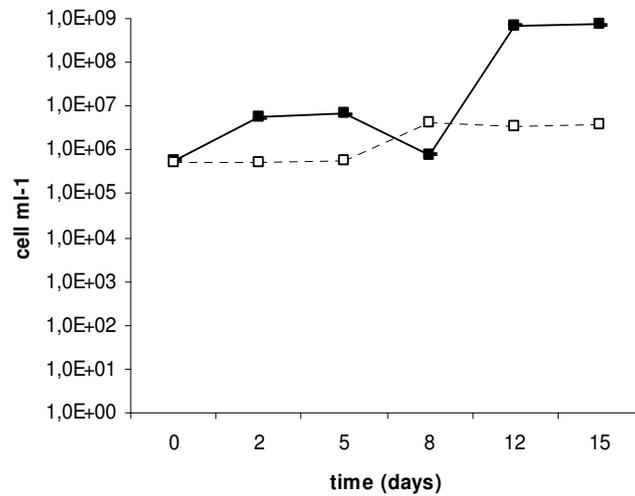
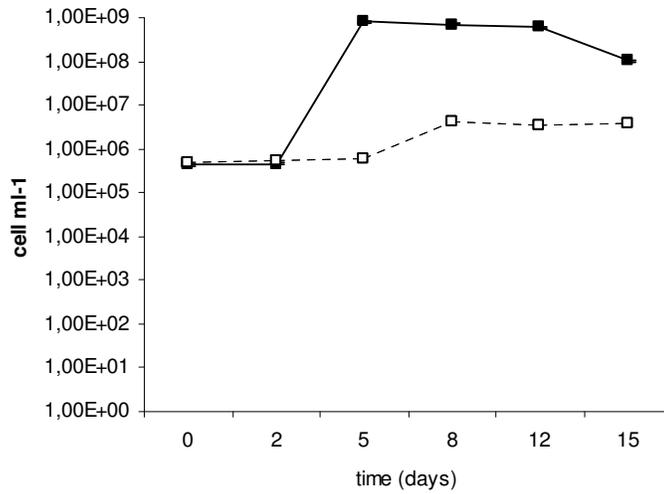
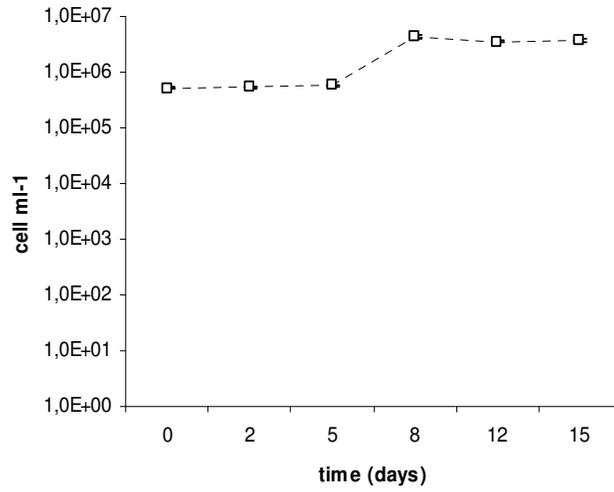


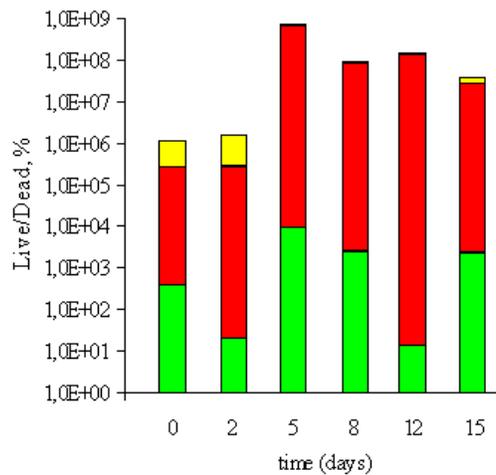
Fig. 134, 135 e 136. Nella pagina precedente sono mostrati i risultati dell'abbondanza batterica (DAPI) durante le sperimentazioni in mesoscala. *Mesocosmo 1* (in alto) e *Mesocosmo 2* (al centro) e *Mesocosmo 3* (in basso). Le linee nere indicano la sperimentazione in studio, mentre le linee tratteggiate in bianco si riferiscono al controllo.

Misure delle cellule vitali (LIVE/DEAD staining).

Mesocosmo 1. Non sono state fatte misure per questa sperimentazione.

Mesocosmo 2. La misura della popolazione batterica totale presenta durante i primi due giorni di sperimentazione un andamento omogeneo con valori delle cellule totali di circa 5.6×10^6 cell ml^{-1} . Il rapporto tra la percentuale delle cellule vive con quelle cellule morte si mostra sempre omogeneo ad esclusione del quinto e del dodicesimo girone di analisi in cui le cellule vive si mostrano, rispettivamente, pari al 45 e al 10% delle cellule totali ([figura 137](#)).

Mesocosmo 3. La risposta della popolazione microbica all'aggiunta di disperdente si riflette chiaramente nell'alternanza cellulare tra cellule vive e cellule morte durante questa sperimentazione. L'abbondanza cellulare tende ad aumentare progressivamente passando da valori di 1.5×10^5 cell. ml^{-1} a valori di 2.9×10^8 cell. ml^{-1} e il rapporto tra cellule vive e cellule morte si mantiene presso che costante e mostrando una popolazione ben distribuita ([figura 138](#)).



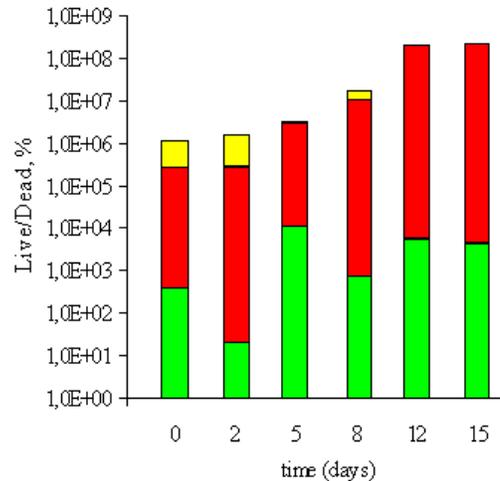


Fig. 137 e 138. Misura delle cellule vitali realizzata tramite conta diretta con colorazione fluorescente Live/Dead. Nella pagina precedente è mostrata l'andamento espresso in percentuale (in riferimento alla concentrazione delle cellule totali) nella sperimentazione identificata *Mesocosmo 2*. In basso è mostrata la distribuzione delle cellule vive e delle cellule morte misurate durante la sperimentazione detta *Mesocosmo 3*.

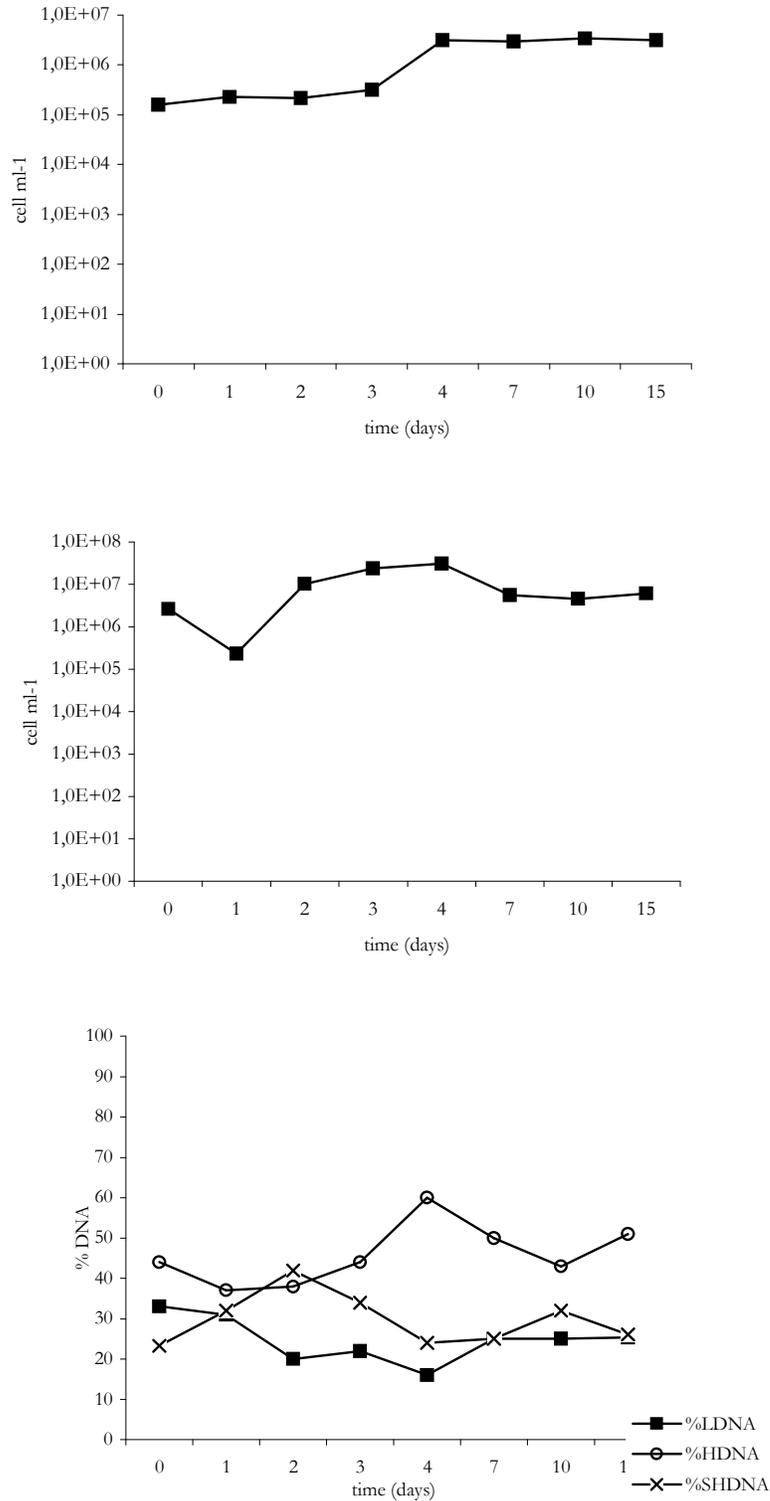
Conteggio cellulare tramite Citometria a Flusso.

Mesocosmo 1. La misura delle cellule totali realizzata tramite citometria flusso mostrava una popolazione microbica quantitativamente omogenea. Come mostrato in [figura 139](#), l'analisi della curva di abbondanza rileva la presenza di due fasi stazionarie consecutive, una che si estende per i primi tre giorni di analisi (valore medio di 10^5 cell ml^{-1}) e un'altra, dopo l'incremento di un ordine di grandezza, dal quarto alla fine della sperimentazione (valore medio di 10^6 cell ml^{-1}). Anche la dinamica della concentrazione del DNA batterico si mostra abbastanza omogenea non evidenziando bruschi cambiamenti nelle quote di concentrazione dei diversi stati aggregazionali ([figura 140](#)).

Mesocosmo 2. Non sono realizzate misure per questa sperimentazione.

Mesocosmi 3. L'abbondanza della popolazione microbica si mantiene generalmente a valori medi di circa 10^7 cellule ml^{-1} mostrando comunque dei decrementi di circa un ordine di grandezza dopo il primo e il quinto giorno di analisi ([figura 141](#)). Particolarmente interessante si rivela l'analisi della concentrazione di DNA cellulare. Dopo le prime 24 ore la popolazione microbica sembra raggiungere una propria stabilità caratterizzata da un incremento nella concentrazione del DNA che raggiunge rispettivamente valori di 80% (HDNA) e 40% (SHDNA) dopo quattro giorni, a discapito del DNA a basso peso molecolare inferiore (LDNA). Solo al quinto giorno, in concomitanza di un abbassamento della concentrazione batterica è possibile osservare un ulteriore cambiamento nella concentrazione cellulare degli acidi nucleici; tale cambiamento si traduce nel decremento della quota del HDNA, che passa

da valori dell'80% a valori del 60% a favore di un incremento quantitativo del SHDNA e LDNA fino alla fine della sperimentazione (figura 142).



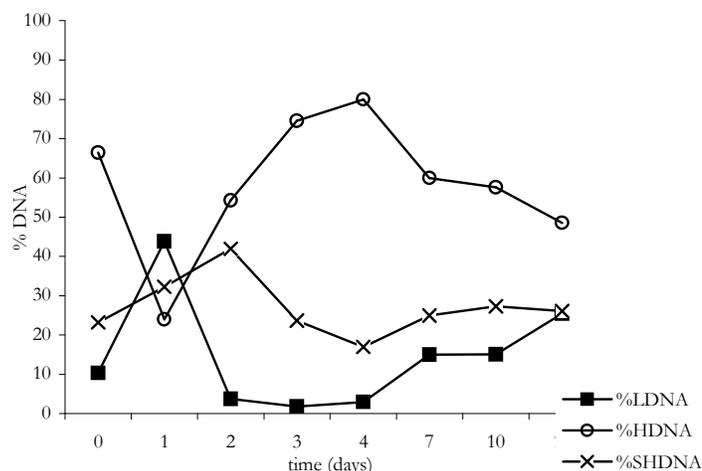


Fig. 139, 140, 141 e 142. Misura dell'abbondanza batterica e misura del quali-, quantitativa del DNA cellulare tramite Citometria a Flusso.

Nella pagina precedente nella figura in alto è mostrato l'andamento della popolazione microbica durante la sperimentazione condotta nel *Mesoscosmo 1*, al centro quella nel *Mesoscosmi 3*.

La figura in basso (sempre nella pagina precedente) mostra l'andamento del DNA, durante la sperimentazione realizzata nel *Mesoscosmo 1*, ad alto (high DNA, HDNA), a basso (low DNA, LDNA) ed altissimo peso molecolare (super high DNA, SHDNA).

In questa pagina è mostrata la situazione del *Mesoscosmo 3*; tutti i valori sono stati espressi come valore percentuale (come mostrato nella legenda).

Misure Batteriologiche di Diversità.

Conteggio dei batteri eterotrofi coltivabili (CFU)

Mesoscosmo 1. All'inizio della sperimentazione il numero dei batteri eterotrofi coltivabili presenta valori di 2.7×10^3 CFU ml⁻¹. Questi valori, costanti fino al secondo giorno, aumentano di un ordine di grandezza dopo il quinto giorno quando si stabilizzano su valori di 5×10^4 CFU ml⁻¹ (figura 143).

Mesoscosmo 2. Un aumento di 3 ordini di grandezza (da valori di 2.7×10^3 CFU ml⁻¹ a 2×10^6 CFU ml⁻¹) è osservato, durante questa sperimentazione. Un ulteriore incremento è visto dopo l'ottavo giorno di sperimentazione raggiungendo valori di 3.6×10^7 cell ml⁻¹ mantenuti fino alla fine della sperimentazione (figura 144).

Mesoscosmo 3. Nel mesocosmo allestito aggiungendo del petrolio greggio e del biosurfattante EPS-2003 il numero delle cellule eterotrofe coltivabili (CFU) aumenta durante i primi cinque giorni passando da valori di 3.1×10^3 CFU ml⁻¹ a valori di 5.6×10^5 CFU ml⁻¹. Al dodicesimo giorno è osservato il valore massimo (7.1×10^7 CFU ml⁻¹) che si mantiene quasi invariato fino alla fine (figura 145).

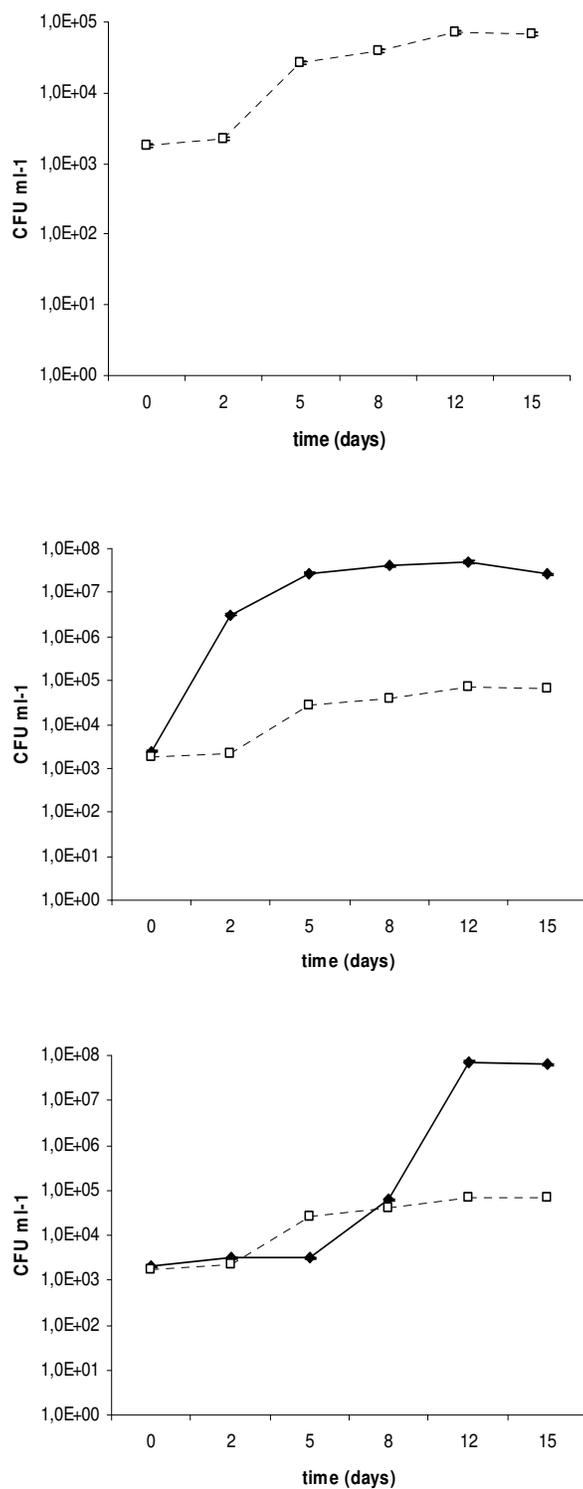


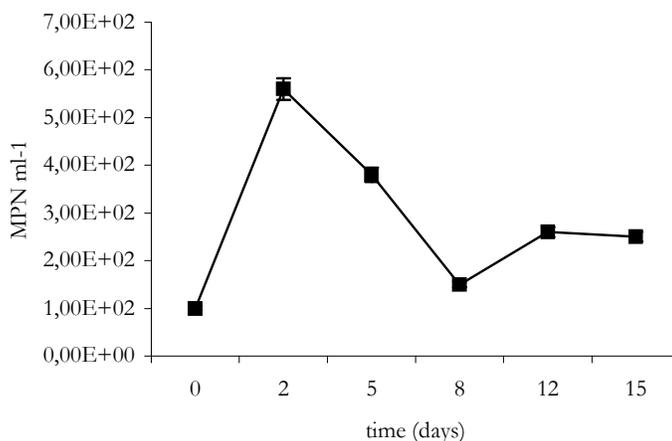
Fig. 143, 144 e 145. Conteggio dei batteri eterotrofi coltivabili (CFU) durante le sperimentazioni nel *Mesoscosmo 1* è (in alto) e dei *Mesoscosmo 2* (al centro) e in *Mesoscosmo 3* (in basso). La linea nera indica la sperimentazione in analisi, mentre le linee tratteggiate in bianco si riferiscono al controllo.

Conteggio dei batteri capaci di utilizzare il petrolio (MPN).

Mesocosmo 1. Durante queste sperimentazioni la coltivazione diretta dei batteri idrocarburodegradanti (HCB) mostra valori pressoché costanti (circa 2.5×10^5 MPN ml⁻¹) per tutto il tempo della sperimentazione (figura 146).

Mesocosmo 2. Un incremento di quattro ordini di grandezza è stato registrato durante i primi cinque giorni di analisi quando il numero dei batteri coltivabili è passato da valori di 1×10^2 MPN ml⁻¹ a valori di 5.4×10^4 ml⁻¹. Una volta raggiunto il massimo valore all'ottavo giorno (6.8×10^7 MPN ml⁻¹) questo si mantiene costante per il resto della sperimentazione (figura 147).

Mesocosmo 3. La tecnica del MPN rileva incremento di tre ordini di grandezza nella conta dei batteri degradanti gli idrocarburi (figura 148) con valori che passano da 2.7×10^3 MPN ml⁻¹ a 2.7×10^6 MPN ml⁻¹. Una volta raggiunti tali valori la curva presenterà un andamento stazionario fino alla fine del tempo di analisi (valori medi di 4.2×10^8 MPN ml⁻¹).



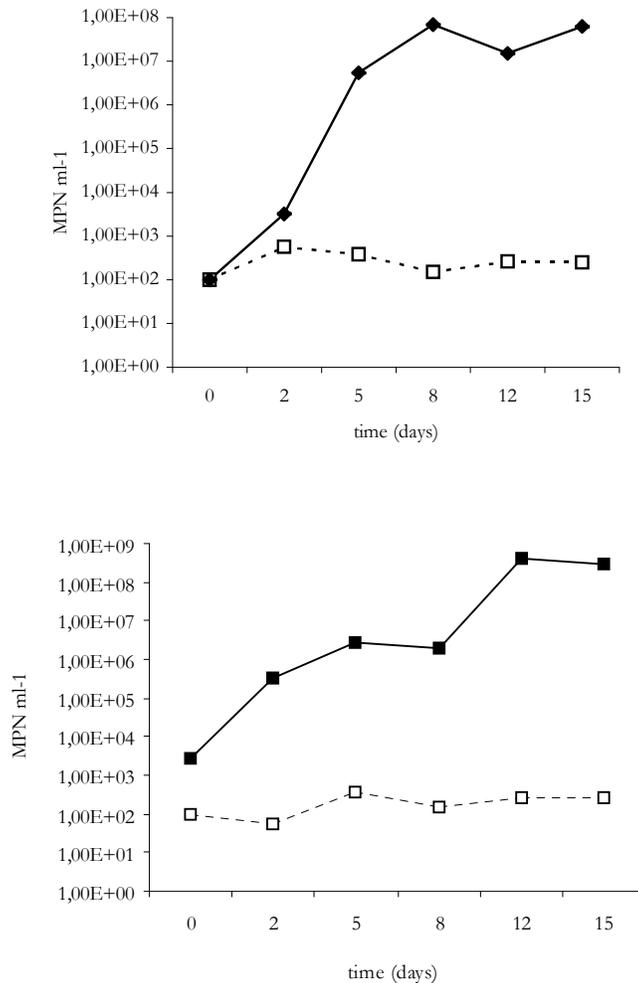


Fig. 146, 147 e 148. Misura del MPN durante sperimentazioni condotte in mesoscala. Nella pagina precedente (in alto) è riportato l'andamento registrato durante la sperimentazione chiamata *Mesocosmo 1*, in basso la condizione del *Mesocosmo 2*. In questa pagina è riportata l'andamento delle misura effettuata per la sperimentazione *Mesocosmo 3*. Le linee nere indicano la sperimentazione in studio, mentre le linee tratteggiate in bianco si riferiscono al controllo.

Analisi tassonomica del 16crDNA.

Mesocosmo 1. All'inizio della sperimentazione l'analisi tassonomica della popolazione mostra cinque gruppi filogenetici costituiti dagli α - (26%), dai β - (6%), dai δ - (11%) e γ -Proteobacteria (34%) e dal CFB group (22%).

Gli α -Proteobacteria sono costituiti da tre gruppi specifici quali *Terasakiella* (6%), *Roseobacter* (3%) e *Sulfitobacter* (3%), mentre le restanti sequenze erano correlabili con batteri ambientali non coltivabili e non classificati (α -Other).

Membri appartenenti al genere *Alteromonas* (17%), *Alcanivorax* (11%) e *Pseudomonas* costituiscono il gruppo dei γ -Proteobacteria; mentre sequenze correlate con il genere *Bacteriovorax* sono le

uniche rappresentanti dei δ -Proteobacteria. Mentre sequenze affiliate ai generi *Oceanobacillus* (3%), *Pibocella* (3%), *Cellulophaga* (14%) e *Arenibacter* (3%) sono costitutivi del CFB group.

L'analisi tassonomica di 61 sequenze durante il dodicesimo giorno mostra una riduzione dei gruppi tassonomici a favore comunque di un aumento della diversità all'interno dei gruppi. Come mostrato in figura 149 (tabella 40) la popolazione microbica si presenta estremamente eterogenea caratterizzate da sequenze appartenenti al gruppo degli α - (21%) e dei γ -Proteobacteria (50%) e dei CFB group (29%)

Nel quindicesimo giorno di analisi la maggior parte delle sequenze ottenute appartenenti ai γ -Proteobacteria costituiscono il 40% (32 cloni) a cui appartengo i generi batterici di *Vibrio*, *Alteromonas* e sono principalmente rappresentati da sequenze associate ad *unidentified* ed *unclassified* γ -Proteobacteria (γ -Other) e al genere *Halothiobacillus* (16%). A sono altresì presenti sequenze appartenenti a batteri non coltivati e non identificati della classe dei β -Proteobacteria (4 cloni).

Flavobacterium Cellulophaga (5%), *Marinicola* (4%), rappresentano per contro i rappresentanti principali della CFB group (tabella 41, 42, figura 150, 151 e 152)

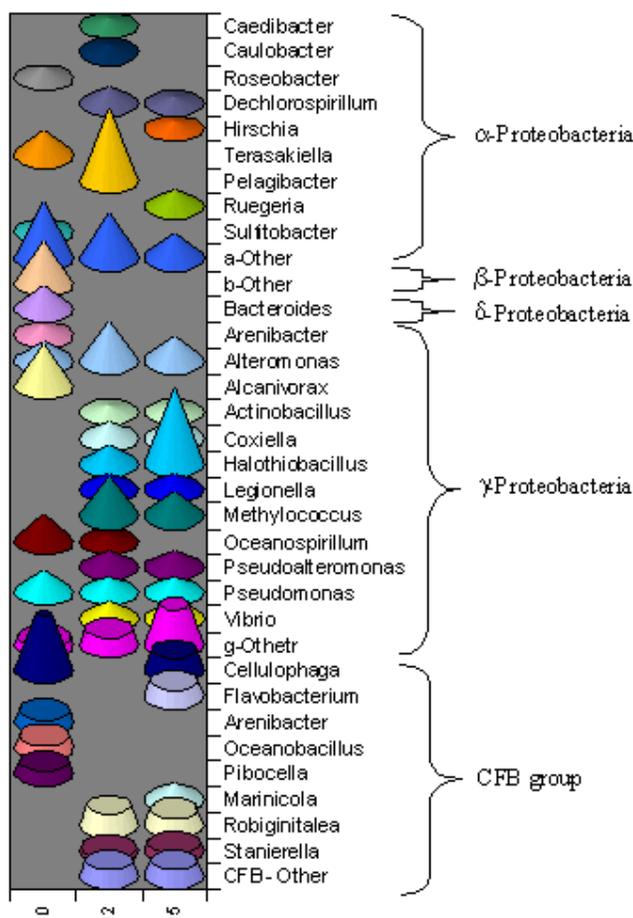
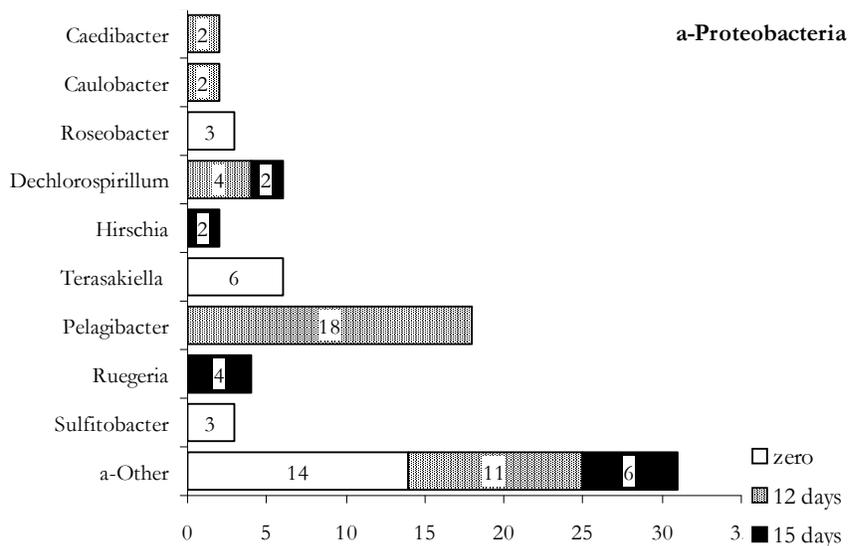


Fig. 149 Distribuzione della popolazione microbica durante la sperimentazione condotta nel *mesocomo 1*. La percentuale delle diverse specie batteriche è stata realizzata tramite normalizzazione (in base 100) dei cloni ottenuti tramite l'analisi tassonomica del 16S crDNA



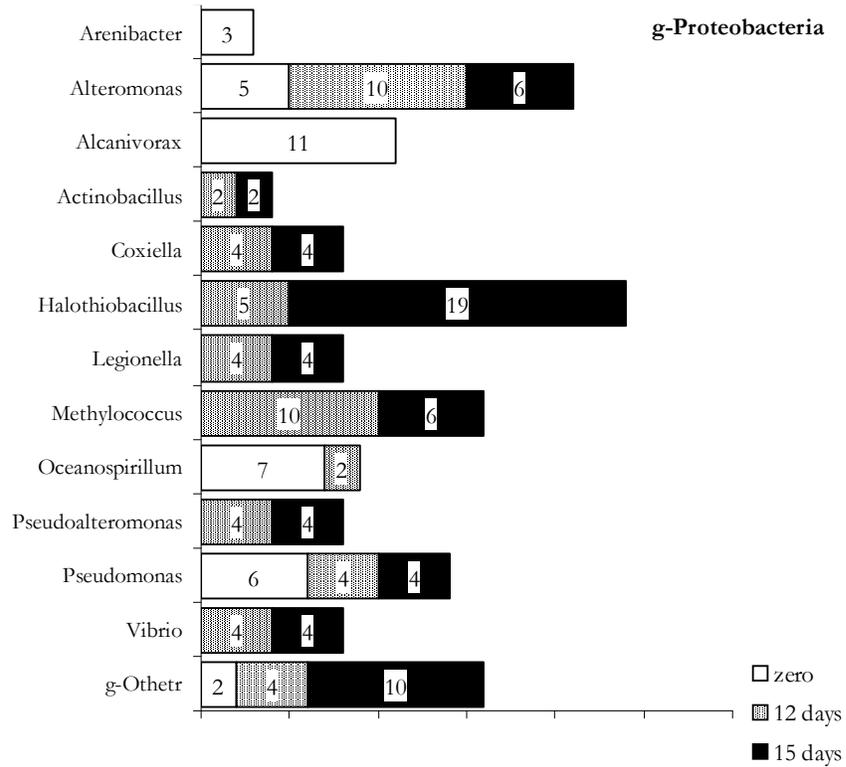


Fig. 149 e 150. Distribuzione dei differenti gruppi filogenetici appartenenti agli α -Proteobacteria (sopra) durante la sperimentazione realizzata nel *Mesocosmo 2* e delle sequenze affilia ai g-Proteobacteria (sotto) durante la stessa sperimentazione. La presenza dei cloni è stata espressa in percentuale e posta all'interno della barra temporale corrispondente..

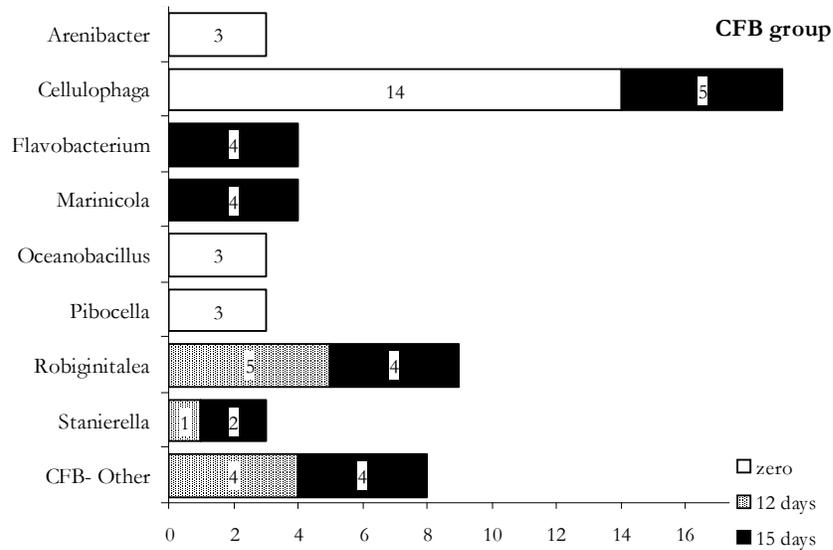


Fig. 151 e 152. *Mesocosmo 1*. Distribuzione temporale delle sequenze affiliate ai cloni appartenenti al phylum *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB).

Mesocosmo 2. All'inizio della sperimentazione (time zero), l'analisi tassonomica dei cloni rivela la presenza di tre gruppi filogenetici principali costituiti dagli α -(26%) , dai γ -Proteobacteria (34%) e dal CFB group (22%); accanto a questi è stata osservata la presenza di gruppi quantitativamente minoritari quali i β -(6%) e i δ -Proteobacteria (11%).

All'interno dei α -Proteobacteria si rivela la presenza di tre gruppi specifici costituiti da *Terasakiella* (6%), *Roseobacter* (3%) e *Sulfitobacter* (3%), mentre le restanti sequenze erano correlabili con batteri ambientali non coltivabili e non classificati (α -Other).

Membri appartenenti al genere *Alteromonas* (17%), *Alcanivorax* (11%) e *Pseudomonas* costituiscono il gruppo dei γ -Proteobacteria. Sequenze correlate con *Bacteriovorax* sono le uniche rappresentanti dei δ -Proteobacteria. Mentre sequenze affiliate ai generi *Oceanobacillus* (3%), *Pibocella* (3%), *Cellulophaga* (14%) e *Arenibacter* (3%) sono costitutivi del CFB group.

Dopo il secondo giorno di analisi (time 2 days) l'analisi delle sequenze (44 totali) evidenzia la predominanza del gruppo dei γ -Proteobacteria (71%), rappresentato da filotipi quali *Alteromonas* (32%), *Alcanivorax* (32%), *Pseudomonas* (5%) e *Oceanospirillum* (2%). Contemporaneamente la percentuale totale del numero delle sequenze affiliate ai gruppi tassonomici degli α - e dei β -Proteobacteria tende a diminuire.

Durante l'ottavo giorno di analisi (time 8 days) le sequenze correlate al genere *Alcanivorax* costituiscono il gruppo più numeroso con valori del 68% (time 8 days), del 65% (time 12 days) e del 78% (time 15 days).

Accanto a queste sequenze dopo il dodicesimo giorno è evidente la comparsa di cloni affiliati al genere *Cycloclasticus*.

L'affermazione dei γ -Proteobacteria corrisponde ad una progressiva riduzione delle sequenze affiliabili ai gruppi dei δ -Proteobacteria (presenti solo all'inizio della sperimentazione), dei β -Proteobacteria (presenti fino all'ottavo giorno) e dei *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* group. Sequenze correlate al genere *Fucophilus* (Verrucomicrobia) sono osservate all'ottavo e al dodicesimo giorno di analisi (tabella 43, 44, 45, 46 e 47 e figura 153, 154, 155, 156 e 157)

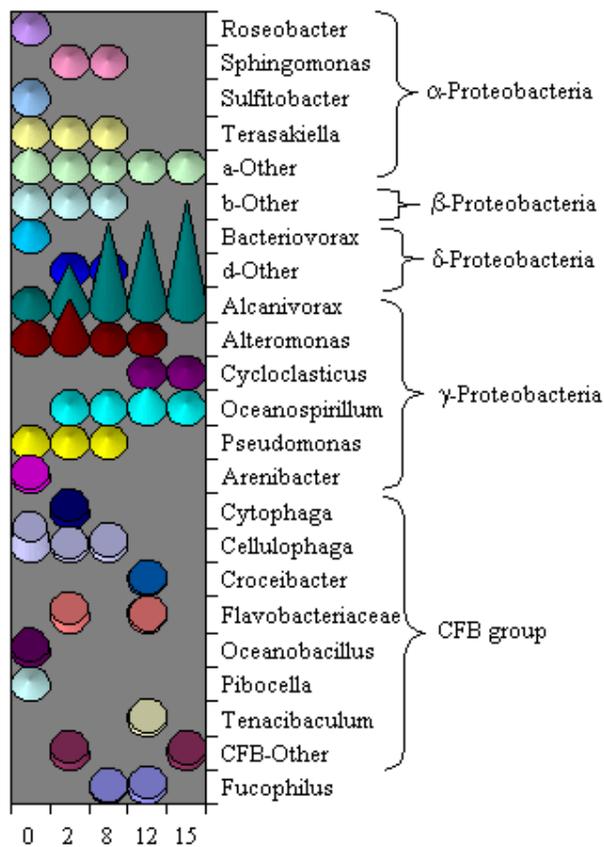
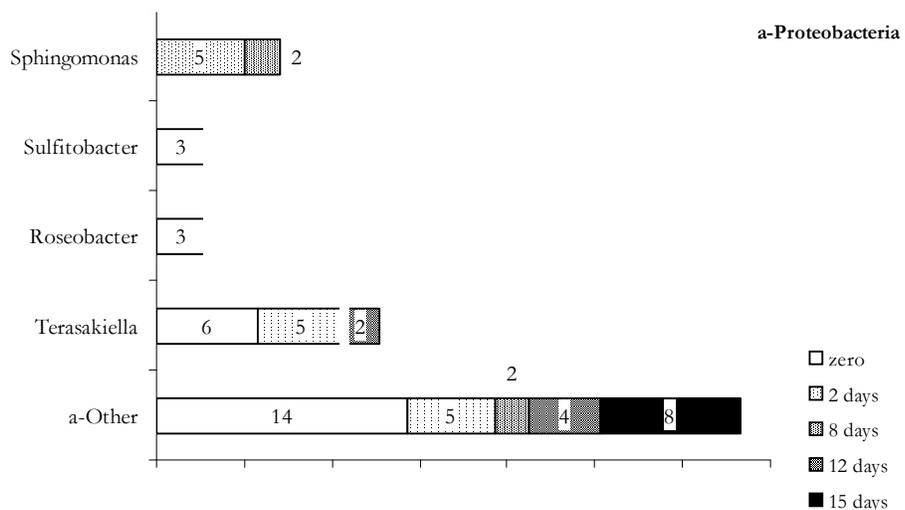


Fig. 153 Distribuzione della popolazione microbica durante la sperimentazione condotta nel *Mesoscosmo 2*. La percentuale delle diverse specie batteriche è stata realizzata tramite normalizzazione (in base 100) dei cloni ottenuti tramite l'analisi tassonomica del 16S crDNA



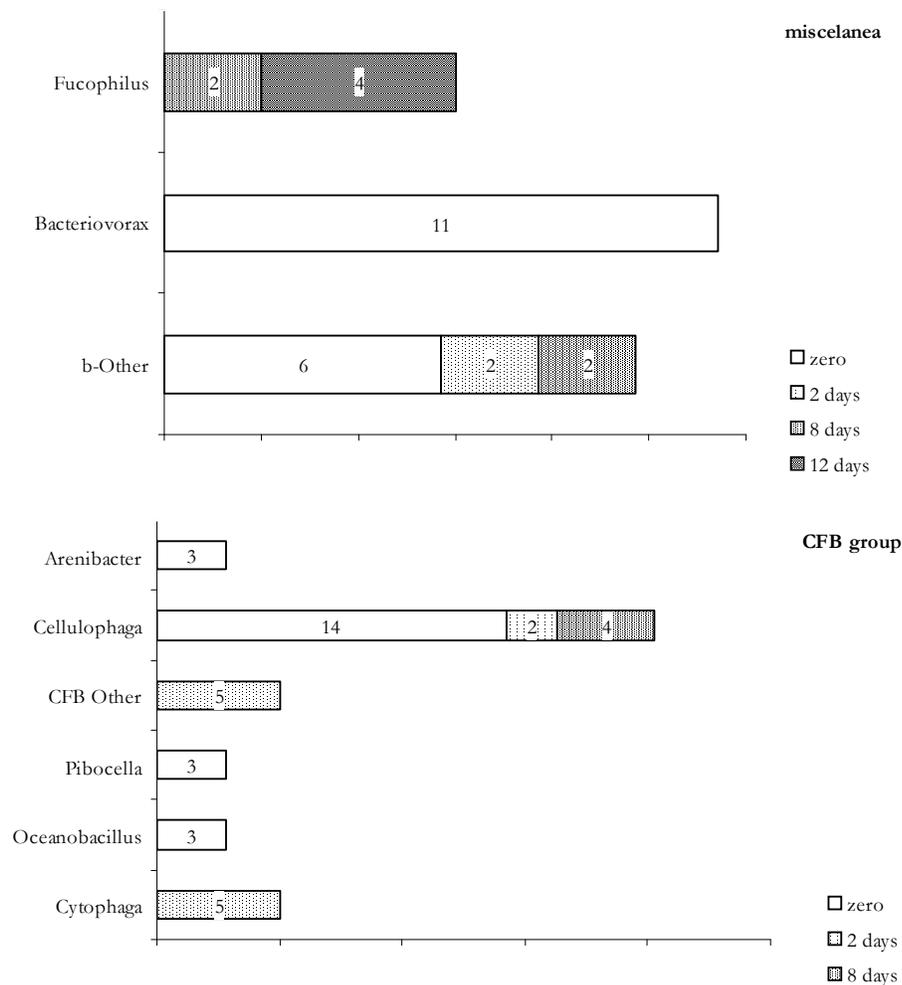


Fig. 154, 155 e 156. Distribuzione delle sequenze ottenute durante l'analisi delle librerie di cloni del 16S crDNA estratto dalla popolazione microbica durante la sperimentazione identificata *Mesoscosmo 2*. In altro sono mostrate cloni riconducibili al genere α -Proteobacteria, al centro quelle appartenenti ai β -Proteobacteria e alle Verrucomicrobia (identificato come Miscellanea), in basso sono mostrate tutte le sequenze appartenenti al gruppo dei CFB

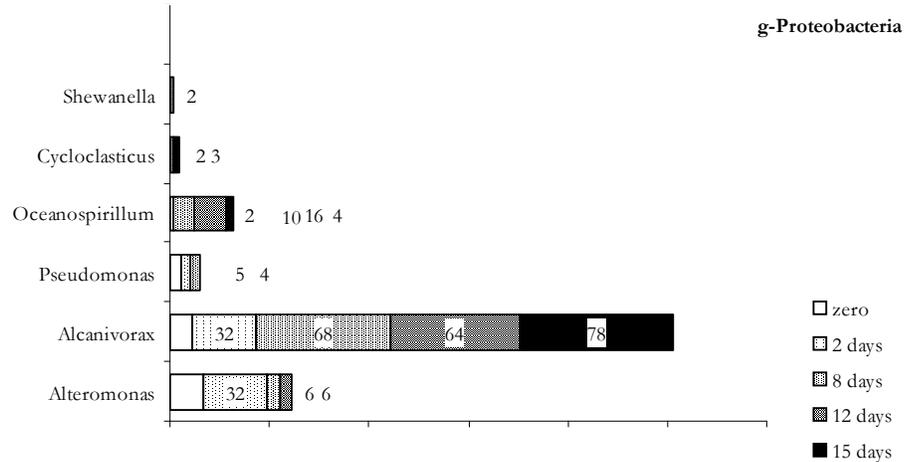


Fig. 157. *Microcosmo 2*. Distribuzione delle sequenze appartenenti alla classe dei γ -Proteobacteria.

Mesocosmo 3.

L'analisi delle librerie di cloni realizzate all'inizio della sperimentazione e al dodicesimo e al quindicesimo giorno (time 12 e 15 days) rivelano un'attiva dinamica di popolazione. I γ -Proteobacteria si rivelano, per tutte le condizioni in studio, il gruppo predominante con valori percentuali del 36 (time zero), 78 (12 days) e 86% (15 days). Sequenze affiliate ai generi *Pseudomonas* e *Marinobacter* risultano sempre presenti in presenza quasi costante, solo sequenze affiliate al genere *Alcanivorax* incrementano progressivamente e raggiungono il massimo (70%) alla fine della sperimentazione e sequenze affiliate ad *Alteromonas* diminuiscono. Le sequenze riconducibili al *Cytophaga-Bacteroides-Flexibacter group* risultano costituite, all'inizio della sperimentazione, dai generi di *Cytophaga* (3%), *Oceanobacillus* (3%), *Cellulophaga* (14%) e da sequenze non correlabili con generi identificati (3%). Al dodicesimo giorno questa classe è rappresentata unicamente dagli ultimi due generi elencati (entrambi al 5%). Solo sequenze affiliate al gruppo da noi indicato come CFB Other (4%) sono presenti al quindicesimo giorno. Anche le sequenze appartenenti al gruppo degli α -Proteobacteria mostra una lenta ma progressiva riduzione quantitativa e qualitativa delle sequenze (tabella 48, 49 e 50 e figura 158, 159, 160 e 161).

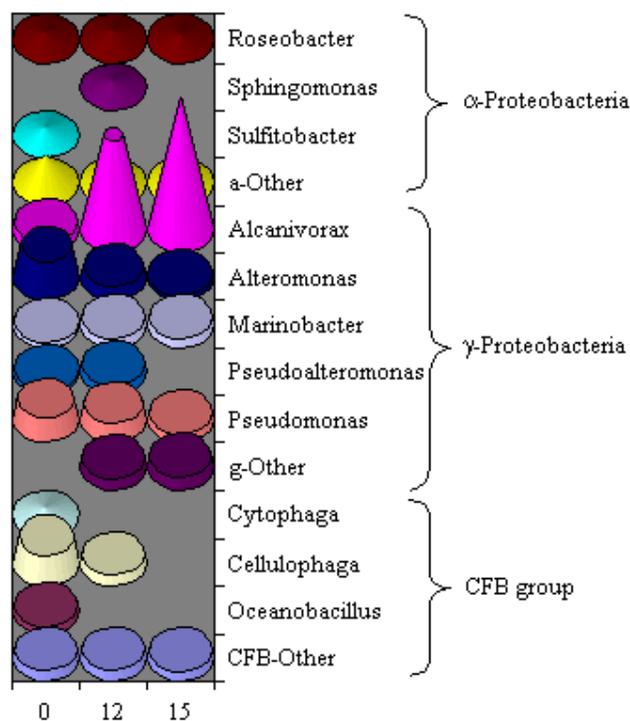


Fig. 158. Distribuzione schematica della popolazione microbica tramite analisi della variazione percentuale delle sequenze ottenute durante la sperimentazione Mesocosmo 3.

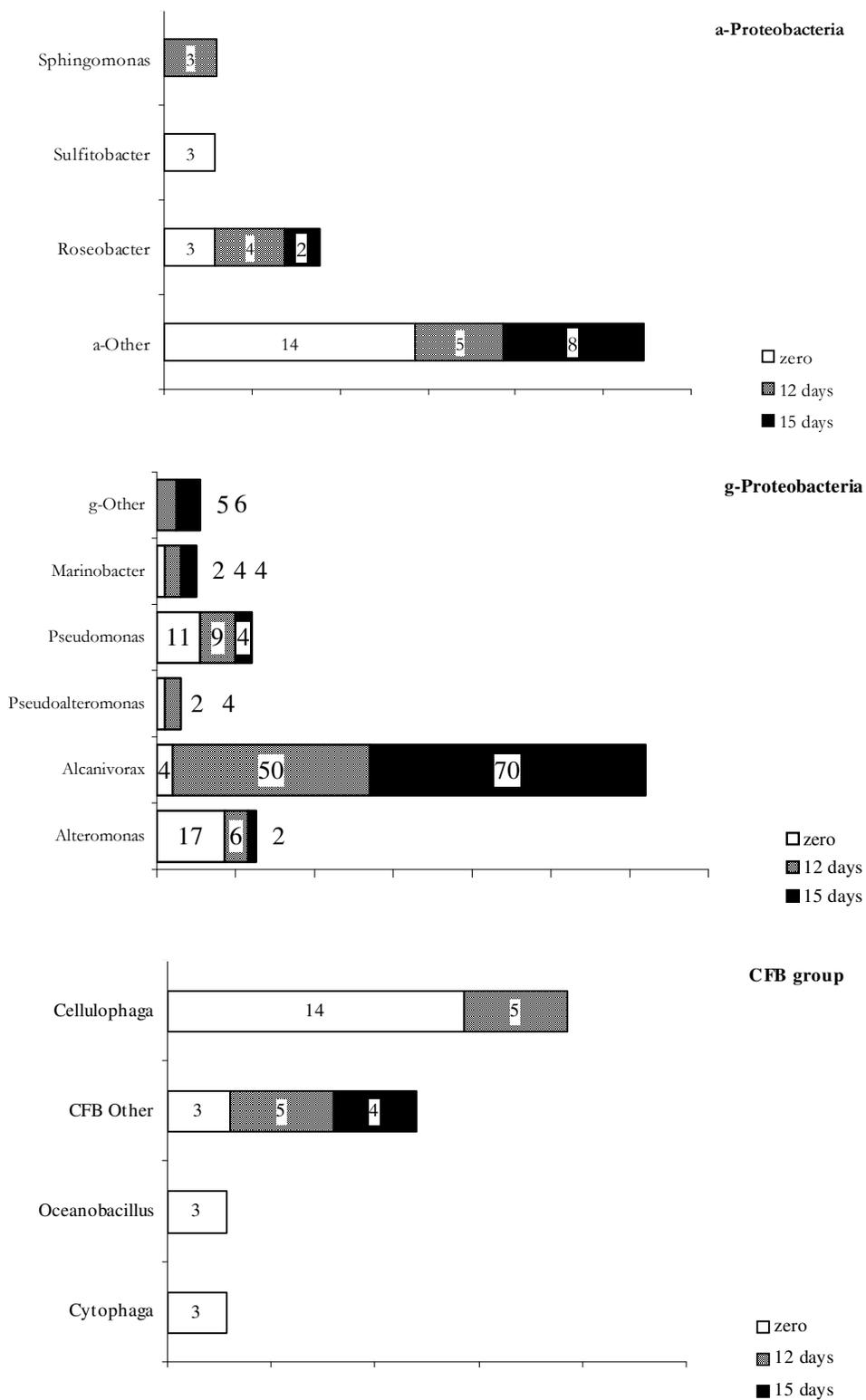


Fig. 159, 160 e 161. Distribuzione delle sequenze ottenute durante l'analisi delle librerie di cloni del 16S crDNA estratto dalla popolazione microbica durante la sperimentazione identificata *Mesoscosmo 3*. Nella pagina precedente (figura centrale) è mostrata la distribuzione dei cloni affiliati genere degli α -Proteobacteria. In questa pagina in alto e in basso sono identificate tutte le sequenze appartenenti al group dei γ -Proteobacteria., mentre in basso sono evidenziate le sequenze appartenenti al *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* group.

Analisi di diversità.

Gli indici di diversità sono stati calcolati utilizzando i dati delle sequenze ottenute dalle librerie di cloni. I cloni che hanno mostrato una similarità maggiore del 97% con le sequenze presente in database (Fasta Nucleotide Database Query, <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/nucleotide.html>) sono state raggruppate in OTU specifici e normalizzate a 100 cloni (Brown *et al.*, 2001) per una corretta comparazione delle stesse e per il calcolo degli indici di diversità (figura 162).

I valori di coverage (%), osservati durante la prima sperimentazione, sono del 73, 81 rispettivamente all'inizio della sperimentazione al dodicesimo e quindicesimo giorno di analisi. Il calcolo degli indici di diversità rivela inoltre una popolazione microbica altamente differenziata senza la presenza di una popolazione dominante (tabella 51).

Nella seconda e nella terza sperimentazione (*Mesoscosmo 2 e 3*) per contro è possibile assistere ad una diminuzione dei gruppi tassonomici a favore di gruppi batterici dominanti come tra l'altro evidenziano i risultati ottenuti della misura della Dominance (S') ed dell'indice di Shannon (tabella 52 e 53).

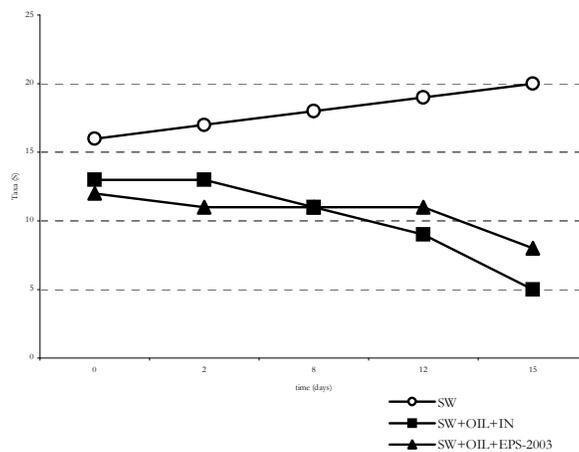


Fig. 162. Distribuzione dei gruppi tassonomici durante le sperimentazioni realizzate in mesoscala.

GENUS	Time (days)		
	zero	12	15
Taxa S	16	19	20
Individuals	100	100	100
Dominance (S')	0,0874	0,084	0,077
Shannon (H')	2,588	2,701	2,803
Simpson (1-S')	0,9126	0,916	0,923
Evenness (J')	0,8313	0,7836	0,8243
Coverage (%)	73	81	85

Tab. 51. Calcolo degli indici di diversità calcolati durante le sperimentazioni realizzate in *mesocosmo 1*. Per realizzare la misura di questi valori i risultati ottenuti dall'analisi tassonomica del 16ScdDNA (numero di sequenze) sono stati normalizzati ad un numero di 100 cloni al fine di poter ottenere dei valori tra loro comparabili.

GENUS	Time (days)				
	zero	2	8	12	15
Taxa S	13	13	11	9	5
Individuals	100	100	100	100	100
Dominance (S')	0,1027	0,2005	0,4347	0,4266	0,6512
Shannon (H')	2,398	2,005	1,407	1,307	0,767
Simpson (1-S')	0,897	0,799	0,565	0,573	0,348
Evenness (J')	0,846	0,571	0,371	0,410	0,430
Coverage (%)	90	90	91	86	91

GENUS	Time (days)		
	zero	12	15
Taxa S	12	11	8
Individuals	100	100	100
Dominance (S')	0,135	0,277	0,505
Shannon (H')	2,197	1,823	1,163
Simpson (1-S')	0,864	0,722	0,494
Evenness (J')	0,749	0,562	0,400
Coverage (%)	91	86	89

Tab. 52 e 53. Calcolo degli indici di diversità durante le sperimentazioni realizzate in *Mesocosmo 1* (pagina precedente in alto), *Mesocosmo 2* (pagina precedente in al centro) e *Mesocosmo 3* (pagina precedente in basso).

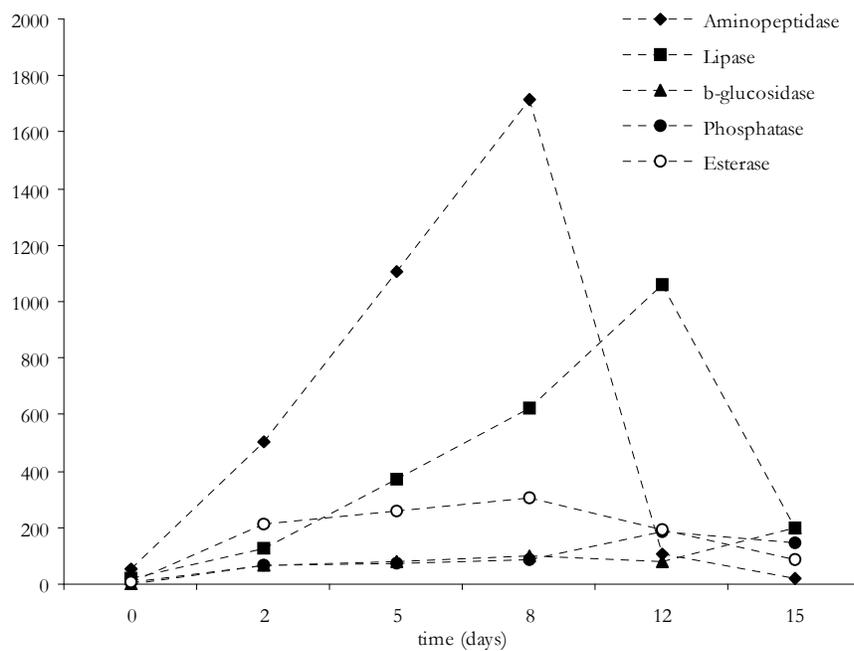
Misure Relative al Metabolismo Batterico

Attività enzimatica.

Mesocosmo 1. L'analisi delle attività enzimatiche della lipasi, esterasi, b-glucosidase, leucinamminopeptidase e fostafasi condotte durante questa sperimentazione rivelano, già nelle prime 48 ore, un forte incremento delle attività in comparazione con l'inizio della sperimentazione. Come mostrato in [figura 163](#) dopo l'ottavo giorno di sperimentazione le attività esoenzimatiche cambiano mostrando comportamenti differenti.

Mesocosmo 2. L'analisi delle attività esoenzimatiche per questa sperimentazione sono mostrati in [figura 164](#).

Mesocosmo 3. Non sono state fatte misurare per questa sperimentazione.



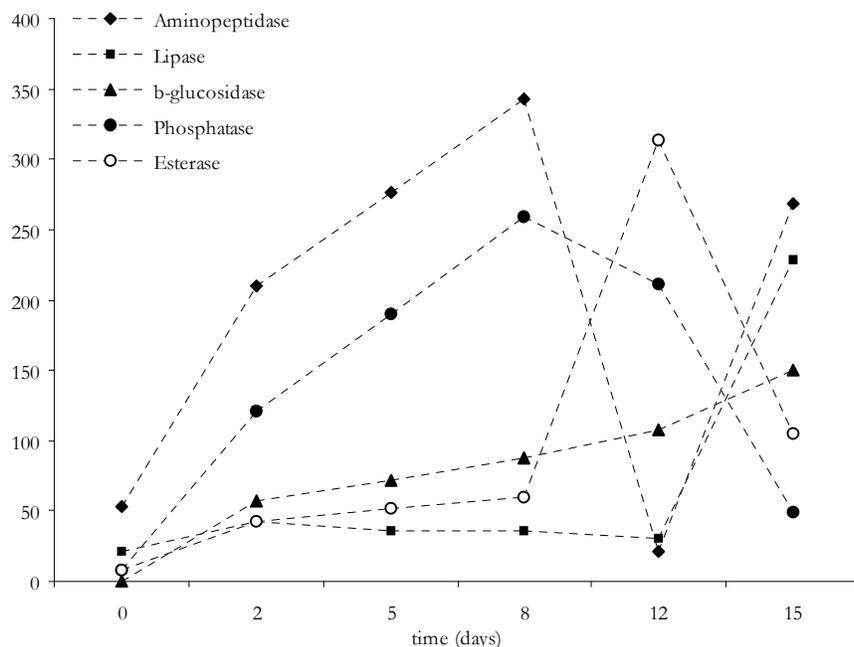


Fig. 163 e 164. Dinamica dell'attività enzimatica analizzata durante le sperimentazioni in mesoscala *Mesoscosmi 1* (sopra) e *Mesoscosmo 2* (sotto). Nella legenda sono illustrate le attività enzimatiche misurate considerate in questo lavoro.

Biochemical Oxygen Demand (BOD)

Mesoscosmo 1. Come mostrato in [figura 165](#), durante questa sperimentazione la domanda biochimica di ossigeno aumenta progressivamente passando da valori di $1.4 \text{ mgO}_2\text{l}^{-1}$, registrato all'inizio della sperimentazione, a valori di $15.5 \text{ mgO}_2\text{l}^{-1}$ al dodicesimo giorno di analisi. Alla fine della sperimentazione (time 15 days) è registrato un valore di $14.1 \text{ mgO}_2\text{l}^{-1}$.

Mesoscosmo 2. Un incremento di circa 20 volte è registrato durante i primi due giorni di analisi passando da valori di 1.30 a valori di $19.7 \text{ mgO}_2\text{l}^{-1}$. Un ulteriore incremento è registrato dall'ottavo giorno ($41.5 \text{ mgO}_2\text{l}^{-1}$) che tende a raggiungere il massimo valore ($55.9 \text{ mgO}_2\text{l}^{-1}$) verso la fine del periodo di studio ([figura 166](#)).

Mesoscosmo 3. L'aggiunta del biosurfattante EPS-2003 aumenta indubbiamente la capacità della naturale popolazione batterica di degradare il petrolio. Questa caratteristica viene indirettamente evidenziata dall'aumento della richiesta di ossigeno disciolto già durante le prime ore di sperimentazione che passa da valori di $1.1 \text{ mgO}_2\text{l}^{-1}$ (time zero) a valori di $23.1 \text{ mgO}_2\text{l}^{-1}$ (time 2 days) e a valori di $43.6 \text{ mgO}_2\text{l}^{-1}$ (time 8 days). Il dodicesimo e il quindicesimo giorno per contro sono caratterizzati da valori medi $52.8 \text{ mgO}_2\text{ml}^{-1}$ che tendono a mantenersi costanti ([figura 167](#)).

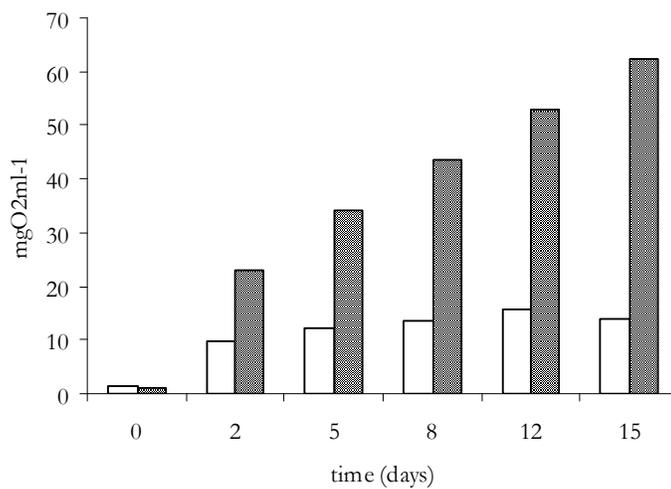
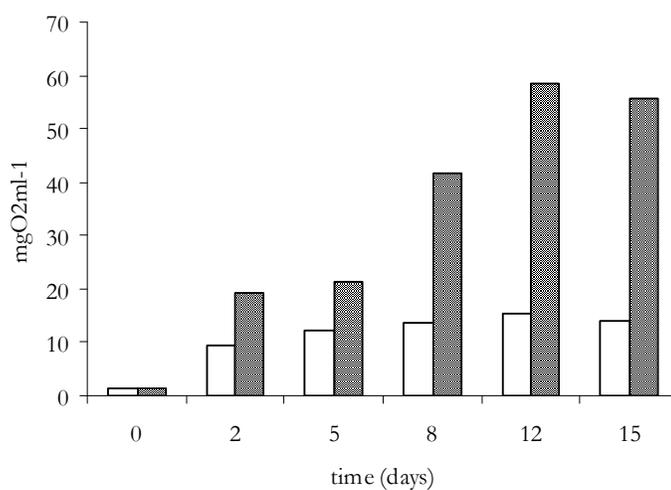
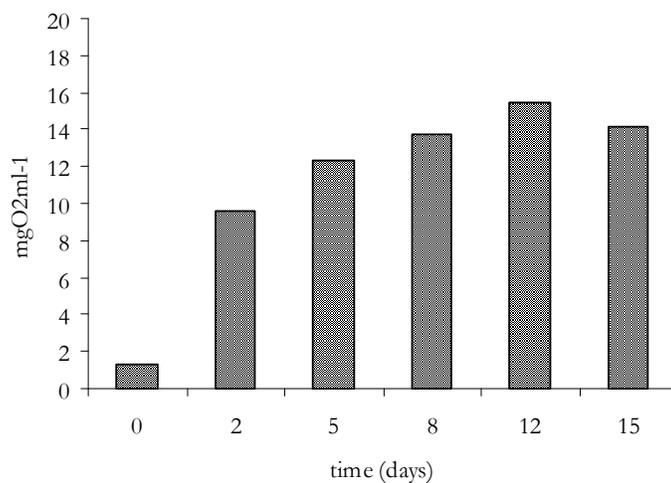


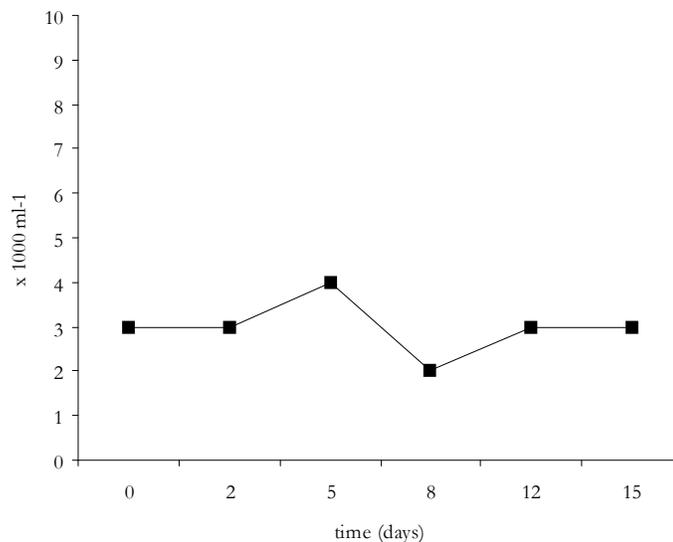
Fig. 165, 166 e 167. Misura della Biochemical Oxygen Demand (BOD) della popolazione microbica durante le sperimentazioni in *Mesoscosmo 1* (nella pagina precedente); mentre in questa pagina sono mostrate le condizioni realizzate nel *Mesoscosmo 2* (in alto) e *Mesoscosmo 3* (in basso).

Misure di Abbondanza degli Heterotrophic NanoFlagellates (HNF)

Mesoscosmo 1. La concentrazione degli nanoflagellati eterotrofi (NHF) mostra un picco di abbondanza durante il quinto giorno di sperimentazione (time 5 days) con valori di 4000 cell. ml⁻¹. Per contro già all'ottavo giorno la quantità tende a decrescere con valori di 2000 cell. ml⁻¹ (figura 168).

Mesoscosmo 2. L'aggiunta dei nutrienti inorganici e del petrolio mostra una certa influenza sulle cellule protozoiche tanto che queste aumentano di circa dieci ordini di grandezza nei primi 2 giorni di analisi, passando da valori di 3000 cell ml⁻¹ a 30000 cell ml⁻¹. Tali valori vengono mantenuti durante tutta la sperimentazione, pur presentando il massimo picco (68000 cell ml⁻¹) durante l'ottavo giorno di studio (figura 169).

Mesoscosmo 3. Nella figura 170 è mostrato l'andamento del quantitativo degli heterotrophic nanoflagellates (HNF) nel mesocosmo allestito aggiungendo all'acqua di mare petrolio e biosurfattante EPS-2003. In questa sperimentazione è stato osservato un progressivo e costante incremento dei protozoi che raggiungono il massimo valore (52000 cell ml⁻¹) durante l'ottavo giorno di sperimentazione per poi decrescere fino alla fine della sperimentazione (39000 cell ml⁻¹).



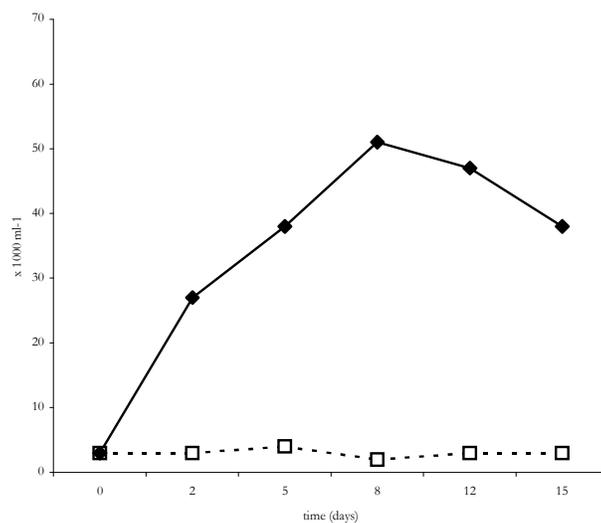
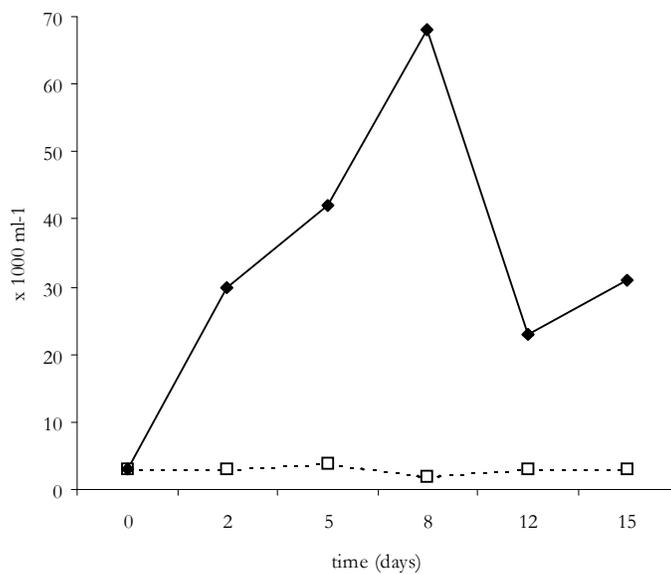


Fig. 168, 169 e 170. Misura dell'abbondanza degli Heterotrophic Nano Flagellates (HNF) durante le sperimentazioni condotte nel *mesocosmo* 1 (figura in alto nella pagina precedente), nel *mesocosmo* 2 (figura in basso nella pagina precedente) e nel *mesocosmo* 3 (sopra). Le linee continue nere indicano il microcosmo in studio, mentre le linee bianche tratteggiate si riferiscono al controllo.

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

L'utilizzo di ecosistemi artificiali è stato ampiamente comprovato essere uno dei metodi migliori per lo studio dei processi ecologici, in quanto forniscono degli strumenti per la riproduzione (controllata, replicabile e ripetibile) degli ecosistemi naturali.

Pur tuttavia nella loro stessa definizione di “sistemi in scala” si evidenzia la loro caratteristica di sistemi ridotti in cui i limiti spaziali e temporali possono influire sull'extrapolazione della realtà ambientale. Le pareti di contenimento, gli scambi energetici e di materiale, il volume e la profondità delle vasche di analisi sono, difatti, tutti fattori che possono determinare delle dinamiche biologiche (e non) diverse da quelle normalmente presenti in natura.

Si è visto inoltre che tali differenze tendono ad aumentare in dipendenza della variazione della scala, fino ad arrivare disperatamente ad un limite critico tale da generare degli “artefatti di scala” che possono compromettere irrimediabilmente la veridicità dei risultati e dei fenomeni analizzati.

Effettivamente un certo numero di critici ha sostenuto che gli esperimenti realizzati in sistemi pilota sono generalmente troppo ristretti per includere dei processi chiave fondamentali (Schindler 1987; Carpenter *et al.*, 1995); per esempio, studi condotti parallelamente sia *in loco* che in vasche di simulazione hanno dimostrato che un incremento della durata della sperimentazione determina una diminuzione della replicabilità (Kareiva e Andersen 1988; Lodge *et al.*, 1998); per contro, una sperimentazione condotta in una scala temporale ridotta può determinare un'errata interpretazione dei cicli alimentari e dei nutrienti, specie quando la frazione temporale in analisi rappresenta solo una minima parte del ciclo vitale degli organismi o degli eventi riprodotti (Lodge *et al.*, 1998).

Petersen (1999) ha evidenziato come, per ottimizzare questo tipo di sperimentazioni, sia necessario considerare i fenomeni legati alla scala stessa; proponendo due linee di attività per la ricerca e la definizione della scala ottimale basate sulla comprensione dei (i) “parametri sensibili alla scala” e della (ii) “scienza della scala” (Meentemeyer *et al.*, 1987).

Al primo gruppo fanno parte tutte le informazioni teoriche o empiriche (attualmente disponibili) che ci possono permettere di correlare ad una sperimentazione da realizzare la giusta scala di analisi. Dati sulla fisiologia, il tasso di generazione, i cicli vitali degli organismi, compresi i rapporti preda-predatore degli organismi in studio dovranno essere correlate con le scalette temporali sperimentali come la durata dell'esperimento, la frequenza di campionamento e i tassi di cambiamento del volume dell'acqua. In questo senso le scale ecologiche relative allo spazio includono il formato dell'organismo, la gamma di popolazione e comunque devono essere abbinate a parametri come il volume, la profondità e le

caratteristiche del sistema sperimentale, ovvero in base al disegno sperimentale delle vasche di reazione.

Lo studio della “scienza della scala” si basa, per contro, sulla considerazione che la maggior parte dei meccanismi siano influenzati dalla scala stessa (Wiens *et al.*, 1986; Levin 1992) su questa considerazione l’unica opportunità è data dalla realizzazione di sperimentazioni in scala multipla tali da identificare le discontinuità spaziali e temporali specifiche fra “i domini della scala”.

La comprensione di questi due metodi si pone pertanto particolarmente importante per identificare quelle regole che possono permettere di confrontare risultati ottenuti in scale diverse, ottimizzare tali scale per le singole sperimentazioni ed inoltre definire i “manufatti della recinzione” (Petersen *et al.*, 1997) che costituiscono quelle differenze dovute alla limitazione spaziale delle vasche.

Relativamente poco è conosciuto sull’effetto che le variazioni di scala possano avere sulla dinamica e sulla funzionalità di una popolazione microbica durante processi simulati di degradazione del petrolio.

L’attenzione di questa parte di lavoro è stata incentrata sullo studio della dinamica funzionale e strutturale della popolazione microbica durante la simulazione di un processo di biostimulation tramite l’aggiunta di nutrienti inorganici e/o di biodisperdente naturale.

Le nostre sperimentazioni sono state realizzate in sistemi in microscala (capacità volumetrica 100 litri) e mesoscala (capacità volumetrica 10.000 litri) con un rapporto volumetrico di 1/10 tra di loro. Al fine di standardizzare il più possibile queste sperimentazioni alcuni parametri come la temperatura e la pre-filtrazione dell’acqua (per eliminare i metazoi e i detriti presenti in sospensione) sono stati mantenuti costanti per entrambi i sistemi in analisi; altri parametri, come la velocità di circolazione dell’acqua, l’ossigenazione e la concentrazione del petrolio sono stati opportunamente scalati.

Gli esperimenti realizzati sono stati programmati e progettati cercando di rispondere alle necessità di quei “parametri sensibili” e di quella “scienza” della scala precedentemente esposti.

In riferimento ai “parametri sensibili alla scala”, la nostra attenzione è stata focalizzata sulla componente batterica, che presenta generalmente tempi generazionali mediamente di 20 minuti e cicli vitali altamente ridotti. Le caratteristiche fisiologiche di tali organismi si presentano estremamente versatili in riferimento al processo in studio e numerose sperimentazioni in loco hanno dimostrato che la risposta della popolazione microbica ad inquinati idrocarburi si verifica già dopo poche ore dall’introduzione dell’inquinante e che la

sua risposta completa avviene nell'arco di poche settimane; inoltre la popolazione microbica utilizzata per questi studi è quella naturalmente presente in un ambiente costiero la cui struttura e abbondanza (come dimostrato in studi precedenti) non è direttamente dipendente dal volume di analisi essendo i batteri stessi sono ubiquitari dell'ambiente marino.

Nel nostro lavoro il rapporto tra tempo di generazione (dei batteri) e durata sperimentale (tempo di degradazione) diviene un sistema di regolazione metrica migliore di quella della scala. A sostegno di questa affermazione, studi recenti hanno dimostrato che questo rapporto (in riferimento alla componente microbica) non differisce significativamente tra sperimentazioni realizzate in loco e sperimentazioni realizzate in mesocosmi. Infatti come mostrato da Fee e Hecky (1992) la differenza, durante la misura della domanda biochimica di ossigeno (BOD) della componente microbica presente, tra il più piccolo lago sperimentale dell'Experimental Lake Area (ELA L.227) e il lago più grande della stessa area ha mostrato essere corrispondenti alla differenza esistente sempre tra il lago minore ed una bottiglia di laboratorio da 300 ml di volume.

La scelta di scala temporale della durata di 15 giorni si dimostra pertanto ampiamente soddisfacente per i nostri scopi.

Nelle nostre sperimentazione l'ambiente in simulazione è quello di un zona costiera, a pochi metri della riva, per questo anche le caratteristiche spaziali e geometriche delle vasche utilizzate (profondità 1.5 metri) si sono (anche in questo caso) dimostrate idonee al nostro studio.

I dati sperimentali ottenuti durante le nostre sperimentazione mostrano tra loro una grande omogeneità tra loro.

La misura dell'abbondanza batterica, misurata tramite come conta diretta DAPI, evidenzia forti corrispondenze per le diverse scale in analisi.

Nelle sperimentazioni allestite solo con acqua di mare la biomassa batterica si mantiene costante per tutto il periodo di analisi. Per contro, l'aggiunta di nutrienti inorganici e/o biodisperdente determinano un incremento cellulare che fa supporre una popolazione microbica ampiamente dinamica indubbiamente avvantaggiata nel suo sviluppo dalla disponibilità di fonti nutrizionali e di carbonio.

Anche i risultati ottenuti dalle analisi delle cellule coltivabili eterotrofe (CFU) e di quelle idrocarburo degradanti (MPN) mostrano un andamento parallelo se non in alcuni casi sovrapponibile.

Dopo un periodo di adattamento di due o cinque giorni, rispettivamente per la seconda e la terza sperimentazione questi valori mostrano un rapido incremento.

Ad esclusione della prima sperimentazione in cui è visibile una popolazione microbica altamente eterogenea caratterizzata da generi batterici appartenenti alle classi degli α -, β - e γ -Proteobacteria con particolare riferimento a generi batterici tipici dell'ambiente marino come *Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Caulobacter* ecc; particolarmente importante è invece la comparsa, nelle altre sperimentazioni realizzate, di batteri appartenenti ai gruppi batterici degli idrocarburodegradi, con particolare riferimento al genere *Alcanivorax*.

Nelle sperimentazioni in microscala l'analisi tassonomica della popolazione rivela, dopo l'ottavo giorno di analisi, un progressivo incremento di sequenze correlate al genere di *Alcanivorax* e di *Cycloclasticus*. Numerosi studi (Kasai et al., 2002; Roling et al., 2002; Yakimov et al. 2004) hanno dimostrato che questi due generi batterici sono direttamente implicati nei processi di degradazione del petrolio in ambiente marino. *Alcanivorax* gioca un ruolo fondamentale nella degradazione degli idrocarburi lineari negli ambienti contaminati da petrolio, anche se non interviene efficacemente nella degradazione dei composti aromatici. Membri del gruppo di *Alcanivorax* sono, difatti, capaci di utilizzare, come unica fonte di carbonio, alcuni substrati organici come n-alcani, gruppi alchilici appartenenti ad n-alchilbenzeni e n-alchilcicloalcani. Per contro, batteri appartenenti al genere *Cycloclasticus*, sono implicati nella degradazione dei composti aromatici, includendo molecole come naftalene, alchilnaftalene, bifenile, fenantrene e antracene (Kasai et al. 2002; Dysterhouse et al., 1995; Geiselbrecht et al., 1998).

Accanto a questi generi batterici è osservabile anche la presenza di sequenze correlate di taxa come *Marinobacter*, *Oceanospirillum* e *Shewanella* anche loro identificati come batteri idrocarburo degradanti impegnati nella degradazione di idrocarburi lineari.

L'aumento delle sequenze appartenenti a queste classi batteriche si osservano in maniera preponderante nelle sperimentazioni in microscala solo dopo l'ottavo giorno di analisi, per contro lo stesso aumento è osservabile nelle sperimentazione realizzate in mesoscala già dal secondo giorno di sperimentazioni. Questo fenomeno è facilmente giustificabile se si considera la differente composizione microbica presente nell'acqua in esame che mostra già al tempo iniziale del pre inoculo una presenza di batteri appartenenti a questo genere attivi, mentre non sono presenti nelle sperimentazioni in microscala dove queste diventano attive solo dopo l'ottavo giorno.

La presenza di batteri affiliati al genere di *Alcanivorax* si presentano predominanti in acque marine petrolio quando i nutrienti inorganici sono opportunamente supplementari. Kasai (2002) e Harayama (2004) hanno dimostrato che al predominanza di *Alcanivorax* è stata

ampiamente documentata in sperimentazione di laboratorio ed in superfici marine interessate dal versamento di idrocarburi. La crescita di *Alcanivorax* su petrolio greggio non è particolarmente rapida in comparazione a quella di altri batteri idrocarburo degradanti presenti nell'ambiente marino, pur tuttavia ancora poco si sa sulle reali caratteristiche che permettono una predominanza di questo batterio rispetto alla restante componente ambientale microbica. Due spiegazioni sono state incentrate (i) sulla capacità di questo batterio di utilizzare un ampio numero di composti del petrolio come fonte energetica e nutrizionale preferenziale e (ii) e sulle proprietà del biosurfattante di origine lipidica prodotto dallo stesso *Alcanivorax* che incrementa la disponibilità degli idrocarburi del petrolio per l'organismo stesso.

La comparsa di queste specie batteriche coincide con un cambiamento diretto sia nell'attività enzimatica che in particolar modo nelle tasso di BOD che nella degradazione del petrolio che diviene effettivamente preponderante in coincidenza della comparsa di queste specie batteriche.

Sperimentazioni su diversa scala rappresentano un metodo logico per identificare le variazioni e gli andamenti dei meccanismi biologici; d'altro canto capire questi meccanismi si pone come un obiettivo cruciale per migliorare la capacità dei ricercatori di estrapolare sistematicamente i risultati ottenuti dai sistemi pilota ed applicarli agli ecosistemi interi in natura.

È importante comunque considerare che i sistemi di sperimentazioni utilizzati sono delle vasche chiuse, in cui gli scambi con l'ambiente esterno sono limitati esclusivamente all'ingresso dell'acqua all'inizio della sperimentazione e a potenziali fenomeni di evaporazione. Il continuo ricircolo dei parametri biologici (es. batteri, virus, protozoi) e chimici (es. nutrienti) che non vengano mai a disperdersi o diluiti per effetti fisici come le correnti, le onde ecc possono portare pertanto alla formazione di artefatti.

Tuttavia i risultati sperimentali ottenuti sono perfettamente comparabili con quelli presenti in letteratura quindi questo ci porta a identificare alcuni punti cruciali sia per un ottimizzazione che per l'utilizzo di sistemi pilota artificiali per i processi di bioremediation; in particolar modo:

- i. Grazie alla particolare fisiologia batterica, l'utilizzo di sistemi in scala (microcosmi e/o mesocosmi) si propone come uno strumento ottimale per studi correlati ai processi di bioremediation microbica.
- ii. Una corretto processo di scaling può portare alla realizzazione di sistemi dinamici omogenei e confrontabili; che permettono di ottenere una “finestra sperimentale” in cui le reali dinamiche biologiche possono essere spesso determinate.

- iii. Il confronto tra le sperimentazioni in microscala e quelle in mesoscala evidenzia che le variazioni dimensionali di scala non sembrano influire sulla dinamica, la struttura e la funzionalità della componente batterica.
- iv. Le strutture idrauliche ed ingegneristiche delle vasche di reazione non sembrano influire sugli scambi di energia e di materiale (petrolio e nutrienti) con l'esterno.
- v. Le considerazioni geometriche ed ingegneristiche semplici sono una buona base per le ipotesi di sviluppo di scaling. Difatti la progettazione e sviluppo delle vasche da noi realizzate/utilizzate si è dimostrato pienamente soddisfacente. La minima riduzione delle distorsioni sperimentali ne è la prova.
- vi. Bisogna aumentare al massimo la possibilità di controllo di alcuni parametri del sistema (es. temperatura, luminosità, ossigenazione) senza comunque rendere eccessivamente artificioso il sistema stesso.

CAPITOLO III:
MODELLIZZAZIONE

CAPITOLO III: MODELLIZZAZIONE

INTRODUZIONE

1.1 STRUTTURA DEL MODELLO

1.2 COMPARTIMENTAZIONE

Petrolio.

Batteri.

Assimilazione dei composti.

Tasso di crescita batterica.

Batteri Morti.

Protozoi.

Nutrienti Disciolti.

Prodotti secreti.

Carbonio organico disciolto.

Azoto e Fosforo.

BILANCIO DELLE VARIABILI

EQUAZIONI

Petrolio Utilizzabile

Petrolio Refrattario.

Batteri Idrocarburo degradanti (HCB).

Batteri non Idrocarburo degradanti (NHCB).

Batteri Morti.

Protozoa.

Prodotti Escreti.

Equazioni dei Nutrienti.

VALORI ADOTTATI NELLE SIMULAZIONI

RISULTATI di SIMULAZIONE

DISCUSSIONI e CONCLUSIONI

La modellizzazione è uno strumento principale, forse lo strumento primario, per lo studio del comportamento di sistemi grandi e complessi come quelli ambientali. Le indagini ecologiche richiedono difatti delle analisi dei vari processi su di un livello dettagliato, sui modelli integrati che possono predire la risposta ambientale sopra una vasta gamma di spazio e scala temporale.

Gli obiettivi di tutti i modelli possono essere divisi in due categorie: previsione (e controllo) e spiegazione (che include la simulazione del comportamento del sistema in circostanze diverse da quelle prevalse durante l'esercitazione della raccolta dati, la valutazione dei parametri che hanno un'interpretazione fisica e la valutazione delle strategie differenti di controllo).

Rispetto ai sistemi costruiti, per esempio, queste risultano da parecchi fattori. Uno è la complessità dipendente dal comportamento interno del sistema in seguito alle interazioni dinamiche e dimensionali così come le azioni esterne di tipo fisico, chimico e biologico. Un altro fattore sono le interazioni che possono intervenire su punti di un sistema o tra più variabili in studio.

Uno degli obiettivi di questo lavoro è lo sviluppo di un modello matematico per lo studio della dinamica delle popolazioni batteriche implicate nella degradazione del petrolio in ambiente marino. In generale la modellizzazione di un fenomeno ambientale necessita obbligatoriamente di una semplificazione, tenendo soprattutto conto della complessità del sistema naturale in studio. A questo punto ci si potrebbe domandare pertanto in cosa consiste l'interesse della modellizzazione.

A questa domanda è bene ricordare che un tale procedimento permette di:

Definire elementi di riflessione sul fenomeno in esame. La comprensione dell'intimo funzionamento del sistema al fine di tradurre tale fenomeno ecologico in una forma soggetta ad una descrizione precisa (equazione matematica).

Analizzare gli effetti delle variabili sperimentali in simulazione. Questo permette la comprensione di processi nascosti equalche volta, di far luce su situazioni ecologiche complesse.

Di trovare delle nuove vie di sperimentazione per un'eventuale ottimizzazione.

Il processo di modellizzazione passa attraverso una serie di tappe fondamentali.

La prima consiste nell'elaborazione di un modello concettuale, ovvero nella definizione della presunta struttura del sistema in analisi. Come sottolineato da Legay (1973) sviluppare un modello concettuale significa "definire due o più compartimenti che comunicano tra di loro entro i quali circolano uno o più elementi".

Una seconda tappa è data dalla necessità di tradurre come equazioni matematiche le leggi che regolano questi trasferimenti, utilizzando delle cinetiche spesso descritte per delle variabili di stato (Monod, Michaelis-Menten...).

La terza tappa sarà caratterizzata dalla calibrazione dei parametri in cui si dovranno ricercare, definire e ottimizzare le costanti e gli indici utilizzati nelle equazioni sopradette.

Infine si potrà procedere con la validazione del modello in cui sarà realizzata una comparazione tra i valori simulati e di quelli sperimentali. In questa fase sarà possibile analizzare il comportamento del sistema in differenti condizioni e simulazioni numeriche; identificando le condizioni di condotta ottimale del fenomeno tanto in sistema chiuso che in quelli aperti.

STRUTTURA DEL MODELLO

Per facilità di analisi, il modello concettuale in studio è stato organizzato considerando cinque compartimenti (o variabili di stato) quali: il Petrolio, i Batteri, i Batteri Morti, i Protozoi e i Nutrienti Disciolti.

A loro volta ognuna di queste variabili è costituita da sotto-compartimenti, come illustrato in tabella 64.

Petrolio	Degradable Hydrocarbons (DH)
	Refractory Hydrocarbons (RH)
Batteri	Hydrocarbonoclastic Bacteria (HCB)
	Non Hydrocarbonoclastic Bacteria (NHCB)
Batteri Morti	Dead Bacteria (DB)
Protozoi	Protozoa (HNF)
Nutrienti Disciolti	Excreted Product (EP)
	Dissolved Organic Carbon (DOC)
	Dissolved Inorganic Nitrogen (DIN)
	Dissolved Inorganic Phosphate (DIP)
	Dissolved Organic Nitrogen (DON)
	Dissolved Organic Phosphate (DOP)

Tab. 64. Variabili di Stato e sotto variabili considerate nello sviluppo del modello concettuale.

La struttura di tale modello concettuale e le interconnessioni presenti tra le differenti variabili di stato sono rappresentate schematicamente in figura 171.

I fenomeni di persistenza e di degradazione idrocarburica da parte delle comunità microbiche sono processi multifattoriali in cui il petrolio e i batteri risultano strettamente correlati ed influenzati da parametri chimico-fisici (es. pH, temperatura, concentrazioni di nutrienti, ecc.) dell'ambiente marino.

Numerosi studi hanno evidenziato che una delle cause di maggiore persistenza degli idrocarburi in mare è da ricercarsi alla scarsa concentrazione di nutrienti, caratteristica degli ambienti marini (Harayama *et al.*, 1999) e che l'aggiunta *in situ* di nutrienti o altri substrati (biostimulation) comporta un incremento nella crescita di batteri autoctoni marini ristabilendo il bilancio nel quantitativo C:N:P (che in caso di inquinamento da petrolio risulta profondamente alterato) e favorendo i processi biodegradativi.

L'elaborazione del modello matematico necessita pertanto della definizione delle relazioni (quindi delle funzioni biologiche quali la crescita, la mortalità, l'escrezione...) esistenti tra i diversi elementi (petrolio, batteri, protozoi...), che intervengono nella dinamica del sistema.

Tali relazioni saranno intese come flussi di carbonio, di azoto e di fosforo attraverso le differenti variabili di stato che costituiscono il modello.

e le equazioni esprimono i trasferimenti di materia (flussi) esistenti tra i compartimenti.

Per stabilire le equazioni di questi scambi, abbiamo considerato che l'assunzione del carbonio, dell'azoto e del fosforo fossero dei fenomeni simultanei e parzialmente indipendenti. La dinamica propria di questi composti dipende dunque dai rapporti C/N e C/P degli elementi del sistema.

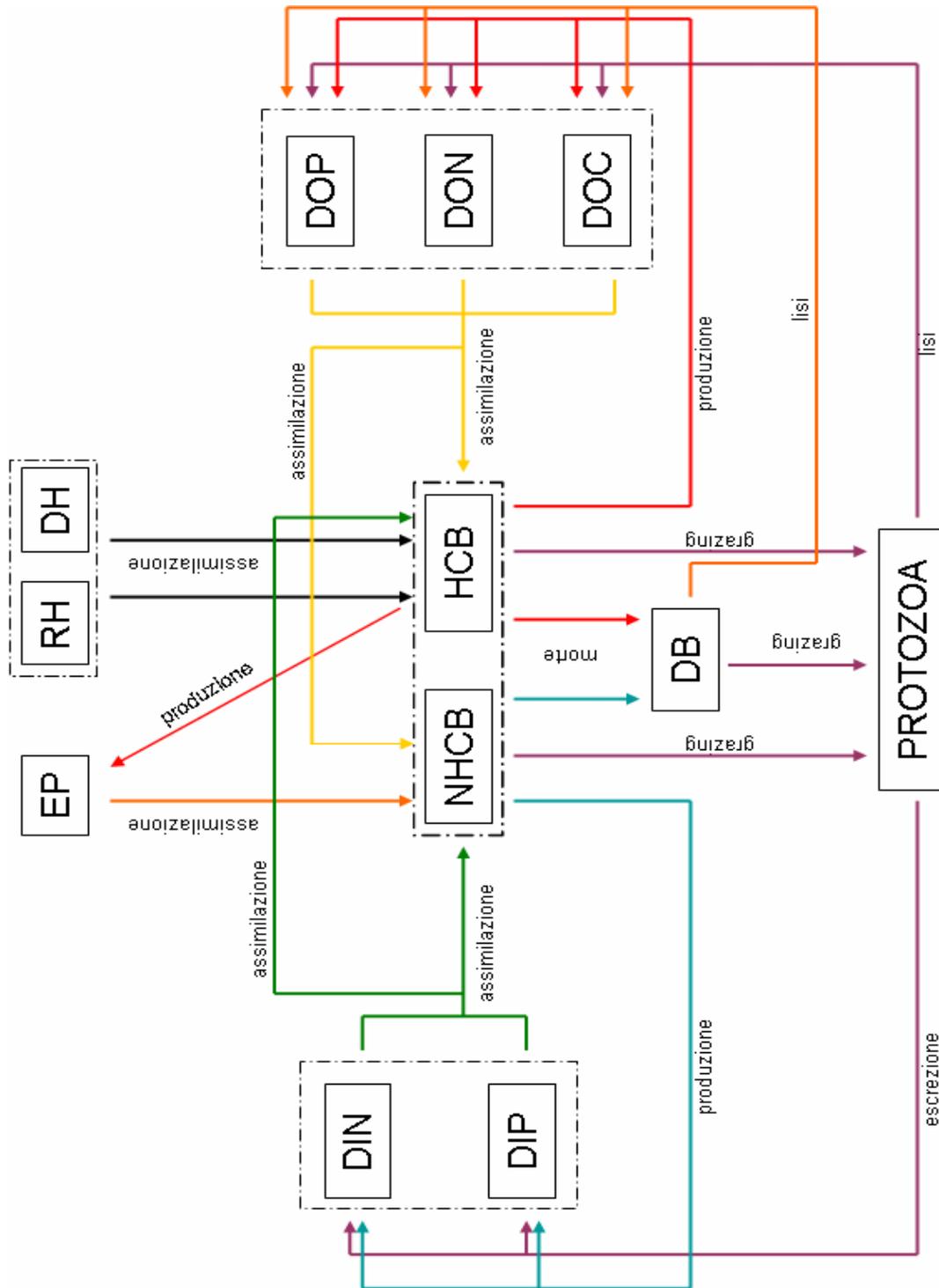


Fig. 171. Rappresentazione del modello concettuale della degradazione degli idrocarburi durante le sperimentazioni in microscala e mesoscala. Spiegazione della figura nel testo.

COMPARTIMENTAZIONE

Petrolio

La prima variabile del modello in studio è stato identificato con quello del “Petrolio”. Come precedentemente detto questo si presenta come un amalgama non regolare di numerosi composti. In un ottica di semplificazione, e perchè non è bene conosciuto il destino delle sue differenti frazioni durante i processi di degradazione microbica, lo abbiamo considerato costituito da due sotto compartimentazioni, in riferimento alle loro facilità degradativa.

Il primo sotto compartimento è stato chiamato Petrolio Utilizzabile (Degradable Hydrocarbons, HC) a cui corrispondono tutte quelle frazioni interessate dai processi biodegradativi batterici.

La seconda sotto compartimentazione detta Petrolio Refrattario (Refractory Hydrocarbons, RH) è costituita da frazioni poco o per nulla degradabili.

I risultati ottenuti dall’analisi quali-quantitativa del petrolio ci hanno permesso di definire che, in questo lavoro, il petrolio utilizzabile dai batteri è circa il 60% del totale, mentre il petrolio refrattario (RH), poco o affatto degradabile rappresenta il 40% del petrolio greggio.

Queste due frazioni portano alla formazione di un film superficiale non soggetto a processi di diluizione.

Sempre per semplificazione fenomeni come l’evaporazione, la fotoossidazione, l’emulsificazione e la dissoluzione non sono stati presi in considerazione.

Batteri

Il compartimento del modello identificato come “Batteri” identifica l’insieme della biomassa microbica presente nel sistema in studio. Anche in questo caso sono stati considerati due variabili di stato.

Il primo è quello dei batteri idrocarburoclasti (Hydrocarburoclastic Bacteria, HCB) a cui, come detto, fanno parte tutti quei batteri, ubiquitari dell’ambiente marino, capaci di degradare il petrolio e/o le sue frazioni.

Il secondo è quello dei batteri non idrocarburoclasti (Non hydrocarbonoclastic bacteria, NHCB), a cui fanno parte tutti quei batteri che per le loro caratteristiche metaboliche non sono capaci di intervenire nelle catene sintrofiche di degradazione diretta.

Per definizione la microflora microbica posta in prossimità o associata al film di petrolio è considerata come un sistema fisico altamente stabile che non é virtualmente sottoposta a fenomeni di diluizione.

La dinamica di questi due gruppi della popolazione batterica è il risultato combinato di differenti processi di "guadagno" e di "perdita" che sono in stretta relazione alla cinetica assimilativa di composti come il carbonio, l'azoto e il fosforo.

1.2.2.1 Assimilazione dei composti

L'assimilazione dei diversi substrati è stata considerata conforme al modello di Monod (1942). Nel caso del carbonio l'equazione (Marty, 1994) corrispondente è:

$$- dC/dt = \mu_{MAX}/Y * (C/(K_C+C)) * X_C$$

dove con $\mu_{MAX} * (C/(K_C+C))$ è indicato il tasso di crescita batterica, in cui

X_C = biomassa batterica

μ_{MAX} = tasso di crescita massimale

K_C = costante di Michaelis dei batteri per il carbonio del substrato considerato

C = concentrazione in carbonio del substrato.

Y = resa d'utilizzazione del substrato considerato secondo la formula:

$$dX = -YdC$$

Le costanti di Michaelis dei batteri per l'azoto (K_N) e per il fosforo (K_P) sono valori molto più deboli di quelli del carbonio (K_C) e in generale le velocità di assimilazione e di crescita dipendono da questi composti.

Delle concentrazioni piccole di azoto e di fosforo vanno ad influenzare la cinetica di assimilazione e di crescita pertanto è giustificato tenere conto delle concentrazioni e delle costanti di Michaelis per queste due sostanze.

L'equazione di assimilazione dei substrati con questi fattori limitanti diviene pertanto:

$$- dC/dt = \mu_{MAX}/Y * (C/(K_C+C)) * (N/(K_N+N)) * (P/(K_P+P)) * X_C$$

Tasso di crescita batterica

Come Martin e Lelong (1981) anche noi abbiamo considerato che la degradazione di un substrato contenente carbonio, azoto e fosforo si dovesse realizzare tramite l'assimilazione contemporanea di questi tre elementi, in modo da conservare costante il rapporto C/N/P

presente nei batteri, gli eccessi eventuali di azoto e di fosforo saranno destinati ad alimentare il compartimento dei composti disciolti.

Per contro l'assimilazione di un substrato in cui non è presente né azoto né fosforo è realizzato cercando questi composti nel mezzo esterno (composti organici ed inorganici disciolti).

Gli stessi fabbisogni energetici diversi legati al funzionamento della cellula batterica (mantenimento) sono stati ugualmente considerati come hanno fatto Martin e Lelong per un tasso di assunzione specifica, con liberazione di azoto e di fosforo per mantenere il rapporto C/N/P costante nei batteri.

In base a queste considerazioni l'equazione del tasso di crescita microbica può essere ottenuto tramite una derivazione della cinetica di Michaelis-Menten in dipendenza del quantitativo di C, N e P presente, ovvero:

$$\mu = \mu_{\text{MAX}} * (C/(K_C + C)) * (N/(K_N + N)) * (P/(K_P + P))$$

E' da sottolineare come in questo tipo di equazione i batteri idrocarburoclasti (HCB) possano utilizzare sia il petrolio utilizzabile (DH) che quello refrattario (per quanto possibile) come principale fonte di carbonio ed eventualmente utilizzare il carbonio proveniente dai nutrienti disciolti e dall'ambiente. In questo caso una parte della loro energia è utilizzata inoltre l'escrezione di prodotti legati al catabolismo dei substrati.

I batteri non idrocarburoclasti (NHCB), per contro, possono degradare questi prodotti secreti ma ugualmente il carbonio disciolto.

Batteri Morti

Con tale compartimento sono state identificate tutte quelle cellule batteriche "naturalmente" morte (Dead Bacteria, DB) ad esclusione di quelle interessate ai fenomeni di autolisi batteri e di grazing protozoico.

Tale compartimentazione è regolata dalla seguente equazione:

$$dDB/dt = yX - bDB - \text{grazDB}$$

in cui vengono indicati

y = il tasso di mortalità specifico

X = la popolazione batterica

b = il tasso di lisi dei batteri morti

$graz$ = il tasso di grazing dei batteri morti

In questo caso il carbonio, l'azoto e il fosforo liberati dai processi di autolisi sono rilasciati nel mezzo ed entrano a far parte ugualmente nel compartimento dei composti organici ed inorganici disciolti.

Protozoi

Numerosi studi hanno dimostrato che il grazing ha un'importante funzione nella regolazione della biomassa microbica. Inoltre lo stesso può essere identificato come una forzante capace di influenzare la composizione e nella struttura delle comunità microbica (per esempio nella selezione di specie batteriche resistenti al grazing o di gruppi con una più rapida capacità di crescita). Al tempo stesso l'effetto dei protozoi contribuisce alla rigenerazione dei nutrienti all'interno del sistema in studio tramite fenomeni di escrezione e di lisi. Le condizioni sperimentali realizzate hanno permesso di identificare che la componente protozoica presa in esame è stata quella degli eterotrofi nano flagellati (Heterotrophic Nano-Flagellates, HNF).

Nutrienti Disciolti

A questo compartimento sono stati correlati quattro diverse variabili di stato, quali: i prodotti secreti dai batteri HCB (EP), il carbonio, l'azoto e il fosforo.

Prodotti secreti

L'escrezione di questi prodotti (Excreted Product, EP) dipende dalla concentrazione dei batteri HCB ed il loro tasso di escrezione viene considerato come costante. Per facilità di modellizzazione abbiamo considerato questi composti come l'insieme di molecole derivanti dai processi catabolici della degradazione degli idrocarburi (DH e RH) più complessi formatesi in prossimità del film di petrolio; zona supposta fisicamente come stabile. La quota di produzione dei prodotti EP è correlata con la costante C_{EP} . La loro scomparsa è correlata essenzialmente all'assimilazione dei batteri NHCB.

Carbonio organico disciolto

Differenti fonti di Dissolved Organic Carbon (DOC) possono essere identificate. Nel nostro modello, l'origine di tale carbonio è riconducibile sia alla lisi dei batteri morti (dDB) che dei protozoi (dPR) sia dall'apporto esterno di nutrienti. La diluizione e l'assimilazione di tale

carbonio, nelle sue diverse forme, ad opera batterica (HCB e NHCB) determina un flusso uscente da questa variabile di stato.

Azoto e Fosforo

Tali nutrienti sono presenti nel sistema in studio sia in forma organica (Dissolved Organic Nitrogen e Dissolved Organic Phosphate) che in forma inorganica (Dissolved Inorganic Nitrogen e Dissolved Inorganic Phosphate). Per le forme inorganiche la loro origine è la stessa di quella del carbonio, a cui bisogna aggiungere l'escrezione batterica dovuta all'assimilazione di taluni composti e al metabolismo endogeno. Per le forme organiche per contro la rigenerazione è da attribuire esclusivamente ai processi di autolisi cellulare batterica e protozoica. I processi di "perdita" sono identificabili principalmente nell'assimilazione batterica necessaria per mantenere costante il rapporto C:N e C:P durante la crescita.

BILANCIO DELLE VARIABILI

Così come è stato strutturato il modello prevede l'utilizzo di dodici equazioni che esprimono in termini di "guadagno" o di "perdita" la dinamica del carbonio, dell'azoto e del fosforo, per ogni variabile di stato in analisi.

Le equazioni considerate sono espresse di seguito:

1. **Degradable Hydrocarbons (DH):** Apporto iniziale - Assimilazione Batterica (HCB).
2. **Refractory Hydrocarbons (RH):** Apporto iniziale - Assimilazione Batterica (HCB).
3. **Hydrocarbonoclastic bacteria (HCB):** Crescita batterica - Mortalità (HCB) - Grazing (HCB) – Mantenimento (HCB).
4. **Non hydrocarbonoclastic bacteria (NHCB):** Crescita batterica - Mortalità (NHCB) - Grazing (NHCB) – Mantenimento (HCB).
5. **Dead Bacteria (DB):** Mortalità batterica (HCB e NHCB) – Lisi (DB) – Grazing (DB).
6. **Protozoa:** Crescita batterica (HCB e NHCB) – Lisi (PR)
7. **Dissolved Organic Carbon (DOC):** Lisi (HCB, NHCB e PR) - Assimilazione Batterica (HCB e NHCB).
8. **Dissolved Organic Nitrogen (DON):** Lisi (HCB, NHCB e PR) - Assimilazione Batterica (HCB e NHCB).

9. **Dissolved Organic Phosphate (DOP):** Lisi (HCB, NHCB e PR) - Assimilazione Batterica (HCB e NHCB).
10. **Dissolved Inorganic Nitrogen (DIN):** Lisi (HCB, NHCB e PR) + Produzione cellulare (HCB, NHCB e PR) + Produzione Assimilazione Batterica (HCB e NHCB) - Assimilazione Batterica (HCB e NHCB).
11. **Dissolve Inorganic Phosphate (DIP):** Lisi (HCB, NHCB e PR) + Produzione cellulare (HCB, NHCB e PR) +Produzione Assimilazione Batterica (HCB e NHCB) - Assimilazione Batterica (HCB e NHCB).
12. **Excreted Product (EP):** Escrezione batterica (HCB) - Degradazione batterica (NHCB)

EQUAZIONI

Petrolio Utilizzabile

Per la misura del quantitativo di petrolio utilizzabile (Degradable Hydrocarbons, DH) da parte dei microrganismi idrocarburoclasti (HCB) è stata utilizzata la seguente equazione:

$$dDH/dt = -A_{HCB} * HCB$$

con:

A_{HCB} : assimilazione del DH da parte dei HCB

$$A_{HCB} = \left(\mu_{mAHCB} / Y_{AHCB} \right) * \left(DH / (K_{DH} + DH) \right) * \left((DIN / (K_{DIN} + DIN)) + (DON / (K_{DON} + DON)) \right) * \left((DIP / (K_{DIP} + DIP)) + (DOP / (K_{DOP} + DOP)) \right)$$

1.3.1 Petrolio Refrattario

Per la misura del quantitativo di petrolio refrattario (Refractory Hydrocarbon, RH) da parte dei microrganismi idrocarburoclasti (HCB) è stata utilizzata la seguente equazione:

$$dRH/dt = -B_{HCB} * HCB$$

con:

B_{HCB} : assimilazione del RH da parte dei HCB

$$B_{HCB} = \left(\mu_{mBHCB} / Y_{BHCB} \right) * \left(RH / (K_{RH} + RH) \right) * \left((DIN / (K_{DIN} + DIN)) + (DON / (K_{DON} + DON)) \right) * \left((DIP / (K_{DIP} + DIP)) + (DOP / (K_{DOP} + DOP)) \right)$$

Batteri Idrocarburo degradanti (HCB)

La dinamica dei batteri idrocarburodegradanti (Hydrocarburoclastic Bacteria, HCB) è stata rappresentata dalla seguente equazione:

$$\frac{dHCB}{dt} = (1 - C_{EP}) * (A_{HCB} * Y_{AHCB} + B_{HCB} * Y_{BHCB} + D_{HCB} * Y_{DHCB}) * HCB - m_{HCB} * HCB - a_{HCB} * HCB - g_{HCB} * HCB - C_{EP} (A_{HCB} * Y_{AHCB} + B_{HCB} * Y_{BHCB}) * HCB$$

dove:

A_{HCB} : assimilazione del DH da parte dei HCB

$$A_{HCB} = (\mu_{mAHCB} / Y_{AHCB}) * (DH / (K_{DH} + DH)) * ((DIN / (K_{DIN} + DIN)) + (DON / (K_{DON} + DON))) * ((DIP / (K_{DIP} + DIP)) + (DOP / (K_{DOP} + DOP)))$$

B_{HCB} : assimilazione del RH da parte dei HCB

$$B_{HCB} = (\mu_{mBHCB} / Y_{BHCB}) * (RH / (K_{RH} + RH)) * ((DIN / K_{DIN} + DIN)) + (DON / K_{DON} + DON))) * ((DIP / (K_{DIP} + DIP)) + (DOP / K_{DOP} + DOP)))$$

D_{HCB} : DOC assimilation by HCB

$$D_{HCB} = (\mu_{mDHCB} / Y_{DHCB}) * (DOC / (K_{DOC} + DOC)) * ((DIN / K_{DIN} + DIN)) + (DON / K_{DON} + DON))) * ((DIP / (K_{DIP} + DIP)) + (DOP / K_{DOP} + DOP)))$$

C_{EP} = coefficiente di produttività dei prodotti escreti (EP)

m_{HCB} = coefficiente di mortalità batterica

a_{HCB} = coefficiente di mantenimento batterico

g_{HCB} : grazing protozoico degli HCB

$$g_{HCB} = (g_{MAX} (fut_{HCB} / K_g + fut_{HCB})) * PR$$

dove fut_{HCB} : la biomassa di HCB che può essere predata dai protozoi

$$fut_{HCB} = HCB - tresh$$

1.3.2 Batteri non Idrocarburo degradanti (NHCB)

I flussi di materia nella variabile di stato identificata con il gruppo dei batteri non idrocarburo degradanti (Non Hydrocarburoclastic Bacteria, NHCB) è stata rappresentata dalla seguente equazione:

$$\frac{dNHCB}{dt} = (D_{NHCB} * Y_{DNHCB} + E_{NHCB} * Y_{ENHCB}) * NHCB - m_{NHCB} * NHCB - a_{NHCB} * NHCB - g_{NHCB} * NHCB$$

dove:

D_{NHCB} : assimilazione del DOC da parte dei NHCB

$$D_{\text{NHCB}} = (\mu_{\text{mDNHCB}}/Y_{\text{DNHCB}}) * (\text{DOC}/(K_{\text{DOC}} + \text{DOC})) * ((\text{DIN}/K_{\text{DIN}} + \text{DIN})) + (\text{DON}/K_{\text{DON}} + \text{DON})) * ((\text{DIP}/(K_{\text{DIP}} + \text{DIP})) + (\text{DOP}/K_{\text{DOP}} + \text{DOP}))$$

E_{NHCB} : assimilazione dei EP da parte dei NHCB

$$E_{\text{NHCB}} = (\mu_{\text{mENHCB}}/Y_{\text{ENHCB}}) * (\text{EP}/(K_{\text{EP}} + \text{EP})) * ((\text{DIN}/K_{\text{DIN}} + \text{DIN})) + (\text{DON}/K_{\text{DON}} + \text{DON})) * ((\text{DIP}/(K_{\text{DIP}} + \text{DIP})) + (\text{DOP}/K_{\text{DOP}} + \text{DOP}))$$

m_{HCB} = coefficiente di mortalità batterica

a_{HCB} = coefficiente di mantenimento batterico

g_{NHCB} : grazing protozoico degli NHCB (guardare equazione 4.4.3)

1.3.3 Batteri Morti

La compartimentazione dei Batteri Morti (Dead Bacteria, DB) è regolata dalla seguente equazione:

$$d\text{DB}/dt = (m_{\text{HCB}} * \text{HCB}) + (m_{\text{NHCB}} * \text{NHCB}) - (b_{\text{DB}} * \text{DB}) - (g_{\text{DB}} * \text{DB})$$

dove:

g_{DB} : grazing protozoico dei DB (guardare equazione 4.4.3)

1.3.4 Protozoa

L'equazione utilizzata per esprimere il comportamento degli Heterotrophic Nanoflagellates (HNF) è stata:

$$d\text{PR}/dt = ((H_{\text{PR}} * Y_{\text{HPR}}) + (NH_{\text{PR}} * Y_{\text{NHPR}}) + (DB_{\text{PR}} * Y_{\text{DBPR}})) * \text{PR} - b_{\text{PR}} * \text{PR}$$

dove:

H_{PR} : grazing protozoico dei HCB

$$H_{\text{PR}} = g_{\text{MAX}} (\text{fut}_{\text{HCB}} / (K_{\text{HCB}} + \text{fut}_{\text{HCB}}))$$

NH_{PR} : grazing protozoico dei NHCB

$$NH_{\text{PR}} = g_{\text{MAX}} (\text{fut}_{\text{NHCB}} / (K_{\text{NHCB}} + \text{fut}_{\text{NHCB}}))$$

DB_{PR} : grazing protozoico dei DB

$$DB_{\text{PR}} = g_{\text{MAX}} (\text{fut}_{\text{DB}} / (K_{\text{DB}} + \text{fut}_{\text{DB}}))$$

e $\text{fut}_{\text{HCB}} = \text{HCB} - \text{thresh}_{\text{HCB}}$; la stessa espressione utilizzata per le altre tre categorie batteriche.

Prodotti Escreti

L'equazione per la modellizzazione dei prodotti secreti (Excreted Product, PE) si sviluppa come segue:

$$dEP/dt = C_{EP} * (A_{HCB} * Y_{AHCB} + B_{HCB} * Y_{BHCB} + D_{HCB} * Y_{DHCB}) - E_{NHCB} * NHCB$$

dove:

A_{HCB} : assimilazione del DH da parte dei HCB

$$A_{HCB} = (\mu_{mAHCB}/Y_{AHCB}) * (DH/(K_{DH}+DH)) * ((DIN/(K_{DIN}+DIN)) + (DON/(K_{DON}+DON))) * ((DIP/(K_{DIP}+DIP)) + (DOP/(K_{DOP}+DOP)))$$

B_{HCB} : assimilazione del RH da parte dei HCB

$$B_{HCB} = (\mu_{mBHCB}/Y_{BHCB}) * (RH/(K_{RH}+RH)) * ((DIN/K_{DIN}+DIN)) + (DON/K_{DON}+DON))) * ((DIP/(K_{DIP}+DIP)) + (DOP/K_{DOP}+DOP)))$$

D_{HCB} : assimilazione del DOC da parte dei HCB

$$D_{HCB} = (\mu_{mDHCB}/Y_{DHCB}) * (DOC/(K_{DOC} + DOC)) * ((DIN/K_{DIN}+DIN)) + (DON/K_{DON}+DON))) * ((DIP/(K_{DIP}+DIP)) + (DOP/K_{DOP}+DOP)))$$

E_{NHCB} : assimilazione del EP da parte dei NHCB

$$E_{NHCB} = (\mu_{mENHCB}/Y_{ENHCB}) * (EP/(K_{EP} + EP)) * ((DIN/K_{DIN}+DIN)) + (DON/K_{DON}+DON))) * ((DIP/(K_{DIP}+DIP)) + (DOP/K_{DOP}+DOP)))$$

C_{EP} = coefficiente di produttività dei prodotti escreti (EP)

Equazioni dei nutrienti

L'equazione per la modellizzazione dei nutrienti organici ed inorganici disciolti o in sospensione sono state sviluppate come segue:

Dissolved Organic Carbon (DOC)

$$dDOC/dt = bDB + bPR - D_{HCB} * Y_{DHCB} - D_{NHCB} * Y_{NHCB}$$

Dissolved Organic Nitrogen (DON)

$$dDON/dt = (b_{DB} * DB)/X + (b_{PR} * PR)/H - ((A_{HCB} + B_{HCB} + D_{HCB}) * HCB)/X - (D_{NHCB} * NHCB)/X$$

Dissolved Organic Phosphate (DOP)

$$dDOP/dt = (b_{DB} * DB)/U + (b_{PR} * PR)/F - ((A_{HCB} + B_{HCB} + D_{HCB}) * HCB)/U - (D_{NHCB} * NHCB)/U$$

Dissolved Inorganic Nitrogen (DIN)

$$dDIN/dt = C_{EP} * (A_{HCB} * Y_{AHCB} + B_{HCB} * Y_{BHCB}) * HCB/X + (D_{HCB} * Y_{DHCB}) * HCB/X + (D_{NHCB} * Y_{CNHCB}) * NHCB/X + (a_{HCB} * HCB)/X + (a_{NHCB} * NHCB)/X + ((H_{PR} * Y_{HPR}) + (NH_{PR} * Y_{NHPR}) + (DB_{PR} * Y_{DBPR})) * PR/H - (1 - C_{EP}) * (A_{HCB} * Y_{AHCB} + B_{HCB} * Y_{BHCB} + D_{HCB} * Y_{DHCB}) * HCB/X - (D_{NHCB} * Y_{DNHCB} + E_{NHCB} * Y_{ENHCB}) * NHCB/X$$

Dissolved Inorganic Phosphate (DIP)

$$dDIP/dt = C_{EP} * (A_{HCB} * Y_{AHCB} + B_{HCB} * Y_{BHCB}) * HCB/U + (D_{HCB} * Y_{DHCB}) * HCB/U + (D_{NHCB} * Y_{CNHCB}) * NHCB/U + (a_{HCB} * HCB)/U + (a_{NHCB} * NHCB)/U + ((H_{PR} * Y_{HPR}) + (NH_{PR} * Y_{NHPR}) + (DB_{PR} * Y_{DBPR})) * PR/F - (1 - C_{EP}) * (A_{HCB} * Y_{AHCB} + B_{HCB} * Y_{BHCB} + D_{HCB} * Y_{DHCB}) * HCB/U - (D_{NHCB} * Y_{DNHCB} + E_{NHCB} * Y_{ENHCB}) * NHCB/U$$

dove:

U = rapporto C:P presente nelle cellule batteriche - $31 \text{ mgC}(\text{mgN})^{-1}$

X = rapporto C:N presente nelle cellule batteriche - $3.8 \text{ mgC}(\text{mgN})^{-1}$

F = rapporto C:P presente nelle cellule procariotiche - $31 \text{ mgC}(\text{mgN})^{-1}$

H = rapporto C:N presente nelle cellule procariotiche - $3.8 \text{ mgC}(\text{mgN})^{-1}$

Gli altri parametri presenti in queste equazioni sono stati precedentemente sviluppati.

VALORI ADOTTATI NELLE SIMULAZIONI

Durante l'elaborazione del modello matematico la scelta dei valori delle costanti da applicare nelle equazioni che regolano gli interscambi tra le variabili di stato è stata effettuata attraverso un accurata ricerca bibliografica (tabella 64).

Abbreviation	Definition	Unit	value	reference
<i>Bacterial growth yield</i>				
Y_{AHCB}	HCB growth yield for DH	-	0.12	Billen and Servais, 1989
Y_{BHCB}	HCB growth yield for RH	-	0.05	Billen and Servais, 1989
Y_{DHCB}	HCB growth yield for DOC	-	0.2	Billen and Servais, 1989
Y_{DNHCB}	NHCB growth yield for DOC	-	0.2	Billen and Servais, 1989
Y_{ENHCB}	NHCB growth yield for EP	-	0.3	Billen and Servais, 1989
<i>Bacterial nutrient uptake</i>				
K_{DH}	HCB 1/2 saturation constant for DH uptake	mgCL ⁻¹	80	Marty, 1994
K_{RH}	HCB 1/2 saturation constant for RH uptake	mgCL ⁻¹	100000	Marty, 1994
K_{DOCHCB}	HCB 1/2 saturation constant for DOC uptake	mgCL ⁻¹	3	Marty, 1994
$K_{DOCNHCB}$	NHCB 1/2 saturation constant for DOC uptake	mgCL ⁻¹	0.5	Marty, 1994
K_{EP}	1/2 saturation constant for EP uptake	mgCL ⁻¹	0.25	Marty, 1994
K_{DIN}	1/2 saturation constant for DIN uptake	mgNL ⁻¹	0.002	Martin and Lelong, 1981
K_{DIP}	1/2 saturation constant for DIP uptake	mgPL ⁻¹	0.0005	Marty, 1994
K_{DON}	1/2 saturation constant for DON uptake	mgNL ⁻¹	0.002	Martin and Lelong, 1981
K_{DOP}	1/2 saturation constant for DOP uptake	mgPL ⁻¹	0.0005	Marty, 1994
<i>Bacterial max growth rates</i>				
μ_{mAHCB}	HCB max growth rate for DH	h ⁻¹	0.2	Marty, 1994
μ_{mBHCB}	HCB max growth rate for RH	h ⁻¹	0.0001	Marty, 1994
μ_{mDHCB}	HCB max growth rate for DOC	h ⁻¹	0.08	Marty, 1994
μ_{mDNHCB}	NHCB max growth rate for DOC	h ⁻¹	0.25	Marty, 1994
μ_{mENHCB}	HCB max growth rate for E	h ⁻¹	0.25	Marty, 1994
<i>Bacterial loss processes</i>				
a_{HCB}	HCB maintenance rate	h ⁻¹	0.015	Martin and Musso, 1982
a_{NHCB}	NHCB maintenance rate	h ⁻¹	0.002	Martin and Musso, 1982
m_{HCB}	HCB mortality rate	h ⁻¹	0.002	Martin and Lelong, 1981
m_{NHCB}	NHCB mortality rate	h ⁻¹	0.002	Martin and Lelong, 1981
C_{EP}	EP production coefficient	-	0.1	Marty, 1994
b_{DB}	DB autolysis specific rate	h ⁻¹	0.01	Billen and Servais, 1989
<i>Bacterial grazing</i>				
$K_{HCB}, K_{NHCB}, K_{DB}$	PR 1/2 saturation constant of HCB, NHCB, DB ingestion	mgCL ⁻¹	0.003	Becquevort, 1999

thresh _{HCB} , thresh _{NHCB} , thresh _{DB}	HCB, NHCB, DB threshold for PR ingestion	mgCL ⁻¹	0.004	Becquevort, 1999
g _{MAX}	PR max ingestion rate	h ⁻¹	0.03	Becquevort, 1999
Protozoan metabolism				
Y _{HPR} , Y _{NHPR} , Y _{DB}	PR growth yield on HCB, NHCB, DB	-	0.38	Bjornsen and Kuparinen, 1991
b _{PR}	PR autolysis specific rate	h ⁻¹	0.001	Lancelot et al. 1986
Cellular stoichiometry				
X	C:N ratio bacteria	mgC (mgN) ⁻¹	3.8	Billen and Servais, 1989
U	C:P ratio bacteria	mgC (mgP) ⁻¹	31	Redfield et al. 1963
H	C:N ratio protozoa	mgC (mgN) ⁻¹	3.8	Tortell et al. 1996
F	C:P ratio protozoa	mgC (mgP) ⁻¹	31	Redfiel et al. 1963

Tab. 64. Abbreviazioni, definizione, unità, valori e bibliografia relativa dei parametri utilizzati nelle equazioni sviluppate (vedi testo).

Tra i valori in studio particolare attenzione è stata attribuita al coefficiente di crescita batterica per i batteri idrocarburo degradanti ($\mu_{m\text{HCB}}$), tanto che per la sua definizione oltre a dati ottenuti da una attenta ricerca bibliografica sono state realizzate delle misure sperimentali.

Dati ottenuti dall'analisi tassonomica (16S rDNA) della popolazione microbica attiva (durante le simulazioni di bioremediation) ha rivelato una predominanza, all'interno della popolazione microbica attiva, di sequenze correlate al genere *Alcanivorax*.

Pertanto è stato calcolato il coefficiente di crescita dei batteri HCB sulla base dei risultati ottenuti dalla coltivazione, in cultura pura, di un ceppo di *Alcanivorax borkumensis* SK2 in acqua di mare addizionata con petrolio greggio.

Per un periodo di 5 giorni la crescita microbica è stata misurata come conteggio dei batteri capaci di formare colonia (CFU); su questi dati è stato calcolato il tasso di crescita microbica.

Misura del coefficiente di crescita dei batteri HCB

Terreni e condizioni di crescita.

Durante questa sperimentazione è stato utilizzato un ceppo di *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Yakimov *et al.* 2005).

Le cellule sono state cresciute in terreno salino ONR7a addizionato con tetradecano (C₁₄H₃₀) alla concentrazione di 0.1 % (volume/volume). Durante la fase semi esponenziale di crescita le cellule sono state raccolte tramite centrifugazione a 4.000 xg per 10 minuti, lavate due volte con acqua di mare (SW) sterile al fine di eliminare qualsiasi potenziale contaminazione di

tetradecano e inoculate, ad una concentrazione finale di 3×10^8 cell ml⁻¹ ($A_{600nm} = 0.3$), in SW a addizionata con 0.01 gr/L di petrolio greggio (del tipo Arabian Ligth Crude Oil).

La coltura così preparata è stata messa ad incubare per 5 giorni a 20°C.

Conteggio dei batteri coltivabili (CFU).

Ogni 24 ore la vitalità della coltura batterica è stata misurata tramite conta diretta delle colonie ottenuta tramite coltivazione su terreno salino ONR7a agarizzato addizionato con petrolio greggio (lo stesso utilizzato nelle sperimentazioni in scala).

Aliquote dal volume di 100 ml, sono state prelevate direttamente dalle beute di coltura e seminate, in doppio, tramite diluizioni seriali.

Le piastre, così preparate, sono state incubate alla temperatura di 20°C per un periodo di 12-15 giorni.

Per il conteggio e il calcolo delle colonie sviluppate sono state scelte le diluizioni che hanno prodotto fra 30 e 150 colonie per piastra. I risultati sono stati espressi come Unita' Formanti Colonia (CFU) ml⁻¹ del campione.

Misura del tasso di crescita batterico

La caratteristica più evidente del quantitativo batterico, in una coltura in terreno liquido, è il suo carattere rigorosamente esponenziale, che può mantenersi inalterato dalla fine della fase lag (dopo l'inoculazione) fino al raggiungimento della saturazione (plateau).

La velocità di crescita viene spesso misurata assegnando il valore del relativo tasso di crescita, definito come l'aumento relativo (o percentuale) della grandezza che sta crescendo per unità di tempo. Nel nostro caso, se due piastrature consecutive eseguite la prima a tempo T_1 e la seconda a tempo T_2 ($= T_1 + \Delta T$) hanno dato valore N_1 e N_2 rispettivamente per il numero dei batteri nella coltura, il tasso di crescita medio nell'intervallo di tempo T_1 a T_2 sarà dunque, approssimativamente:

$$\mu_{mHCB} = (N_2 - N_1) / N_M * \Delta T$$

Durante questa sperimentazione il valore delle CFU si è mostrato avere un andamento pressoché costante durante i primi due giorni di coltivazione. Dopo il secondo giorno è stato possibile osservare un incremento di un ordine di misura con valori che passano da 38×10^8 cell ml⁻¹ a 53×10^9 cell ml⁻¹. Questi valori aumentano ulteriormente raggiungendo al quinto giorno il picco massimo di 89×10^{10} cell ml⁻¹.

La misura del tasso di crescita è stato calcolato ad intervalli di 24 ore durante il periodo di coltivazione, rivelando un μmHCB medio di circa 0.05.

Nel processo di sviluppo del modello matematico, sono stati utilizzati i dati ottenuti dalla sperimentazione in mesocosca identificata come *mesocosmo 3* (corrispondente alla sperimentazione realizzata aggiungendo all'acqua di mare petrolio greggio e biodispersente).

I risultati ottenuti (Capitolo II – *Paragrafo II*) sono stati trasformati come valori di mg di carbonio (mg C), mg di fosfato (mg P) e di azoto (mg N).

Le variabili di stato considerate per la calibrazione corrispondono a quelle definite nel corso della progettazione del modello concettuale. Per semplicità queste possono essere divise in variabili biotiche e abiotiche. Alle prime fanno le misure dei batteri totali, dei batteri morti, dei batteri eterotrofi, dei batteri idrocarburodegradanti e degli heretotrophic nano-flagellates; tra le variabili abiotiche sono considerati i nutrienti inorganici e organici nelle loro diverse forme e il petrolio.

Questo modello matematico è stato sviluppato grazie all'utilizzo del software STELLA® prodotto dalla High Performance Systems (www.hps-inc.com).

Petrolio

La progressiva degradazione del petrolio nell'arco dei quindici giorni di sperimentazione è, sia nel caso dell'aggiunta dei nutrienti inorganici che in quello del biodispersente comparabile. Nel corso della sperimentazione è apparso essenziale considerare la velocità di scomparsa del petrolio nelle vasche di reazione. Essendo soggetto ad attacco diretto sia dei batteri idrocarburo degradanti “*in sensu stricto*” che di quelli facoltativi anche il petrolio è stato immesso nel modello matematico considerando che ad un grammo di carbonio corrispondono 730,15 mg C l⁻¹. Analisi hanno rivelato che circa il 60% del petrolio si presentava costituito da frazioni potenzialmente degradabili del petrolio, mentre solo il 40% era costituito da componenti refrattarie alla degradazione (Capitolo I - *Paragrafo II*).

In base a queste considerazioni, la quota di Degradable Hydrocarbons (DH) e di Refractory Hydrocarbons (RH) immessa nel modello è stata rispettivamente di 3066.63 e di 2044.42.

Batteri HCB

Per il calcolo dei batteri idrocarburo degradanti sono stati utilizzati i risultati ottenuti dalla misura del Most Probable Number durante questa sperimentazione. Considerando che una cellula batterica presenta 5.1×10^{-13} gr di carbonio I valori sperimentali ottenuti (MPN ml⁻¹) sono stati trasformati tutti mg C, tramite una semplice proporzione. Contemporaneamente alla

misura della quantità di carbonio della biomassa batterica è stato calcolato il quantitativo in azoto e fosforo (tabella 67) ottenuti dividendo il risultati ottenuti, rispettivamente, per costanti espresse nel modello come X pari a 3.8 (Billen and Servais, 1989; Tortell *et al.* 1996) ed U pari a 31 (Redfield *et al.* 1963).

I valori iniziali utilizzati sono stati di 0.00000102 (mg C), di 0.000000268 (mg N) e di 0.0000000329 (mg P).

Batteri NON-HCB

La misura dei batteri non idrocarburo degradanti è stata ottenuta in maniera indiretta, sottraendo al quantitativo delle cellule batteriche vive (ottenuto tramite conta diretta Live/Dead) il quantitativo dei batteri appartenenti alla classe degli HCB.

I valori iniziali utilizzati sono stati di 0.00003978 (mg C), di 0.00001046 (mg N) e di 0.00000128 (mg P).

Batteri Morti (BD)

I batteri morti sono stati calcolati in base ai risultati ottenuti dalla conta microscopia Live/Dead. I valori utilizzati per calibrare questa variabile di stato all'interno del modello matematico sono stati: 0.0000408 (mg C), 0.0000107 (mg N) e di 0.00000131 (mg N).

Protozoi

Al fine di un corretto processo di modellizzazione anche per la concentrazione dei protozoi è stata convertita in mg di carbonio, azoto e fosfato

Nel modello utilizzato la variabile di stato identificata come "Protozoi" è stata rappresentata dal numero di protozoi appartenenti agli Heterotrophic Nano Flagellates (HNF). I valori ottenuti tramite conta diretta microscopia sono stati convertiti in mg di carbonio considerando il valore di $6,5 \times 10^{-12}$ come il quantitativo in grammi di carbonio presente in una singola cellula. Anche per gli HNF sono state utilizzate delle costanti (mostarte precedente in questo lavoro) quali F dal valore di 3.8 (Billen and Servais, 1989; Tortell *et al.* 1996) e H del valore di 31 (Redfield *et al.*, 1963) sono state utilizzate per convertire i mg di C rispettivamente in mg di azoto e fosfato. I valori utilizzati all'inizio della simulazioni sono stati di : 0.0000195 (mg C), 0.000005 (mg N) e 0.000001 (mg P).

RISULTATI di SIMULAZIONE

I risultati ottenuti dalle prime simulazioni sono mostrati nelle [figure 171, 172 e 173](#). L'andamento di queste curve che identifica la dinamica della componente dei batteri HCB, dei batteri NHCB e del petrolio (riferito sia alla parte degradabile che a quella refrattaria, DH e RH) mostrano un andamento simile a quello ottenuto attraverso l'analisi dei dati sperimentali e in accordo con la bibliografia di riferimento.



Fig. 171. Curva di simulazione riferita alla crescita dei batteri idrocarburo degrading (HCB), il periodo di simulazione (15 giorni) è stato espresso in ore.

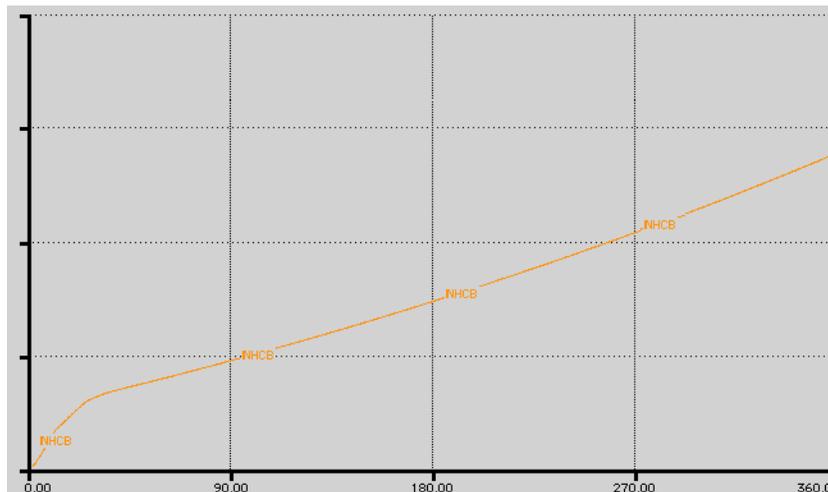


Fig. 172. Risultato della simulazione della crescita dei batteri non idrocarburo degrading (NHCB) durante la modellizzazione matematica; il periodo di simulazione (15 giorni) è stato espresso in ore.

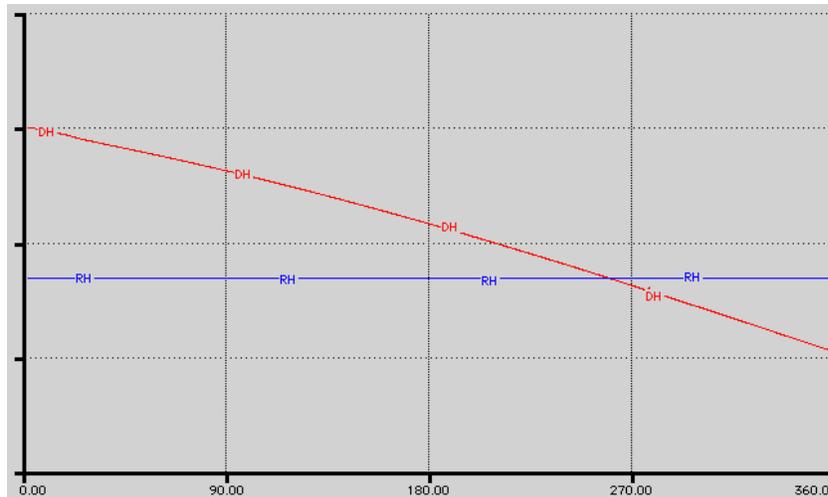


Fig. 173. Degradazione del petrolio. Risultati di simulazione della degradazione del greggio durante la sperimentazioni di bioremediation; nel grafico sono messe in confronto l'andamento della componente degradabile (DH) e della componente refrattaria (RH) del petrolio.

Le curve simulanti l'andamento della diamiche dei batteri HCB e NHCB si trovano in accordo con i risultati sperimentali ottenuti rispettivamente nella misura del MPN e delle cellule CFU che mostrano andamenti di curve esponenziali.

L'analisi delle simulazione della degradazione del petrolio evidenziano due andamenti, uno rappresentato da un andamento costante che identifica il comportamento del petrolio refrattario che per definizione non è interessato da fenomeni di degradazione e la cui concentrazione si mantiene, pertanto, inalterata per tutta la durata della sperimentazione; per contro la curva corrispondente alla frazione del petrolio degradabile mostra un decremento che corrisponde effettivamente alla degradazione osservata durante le misure sperimentali.

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Il modello matematico realizzato in questo lavoro può essere considerato come un valido strumento per una migliore comprensione dei processi di bioremediation; i risultati presentati sono solo alcuni esempi di quello che può essere realizzato con un modello di questo tipo.

In generale è bene ricordare che la complessità dell'ecosistema naturale ha portato alla necessità di utilizzare delle ipotesi di lavoro semplificate per la struttura del modello concettuale tale da permettere un approccio più semplice del fenomeno.

Innanzitutto la composizione della popolazione microbica è stata enormemente semplificata, definendo solo due classi batteriche quella dei batteri idrocarburo degradanti (HCB) e quella dei batteri non idrocarburo degradanti (NHCB).

Questa suddivisione non tiene pertanto in considerazione tutte quelle specie batteri con un metabolismo che potremmo definire "opportunista" cioè a dire di quei batteri le cui proprietà fisiologiche e metaboliche sono in diretta dipendenza della concentrazione del substrato e che sono pertanto capaci in determinate condizioni di immagazzinare una certa quantità di materiale di riserva da utilizzare per il mantenimento cellulare.

L'accumulo di queste sostanze può determinare, inoltre, una variazione del rapporto cellulare interno del C:N:P che considerato come costante, forse non è così in questi batteri.

In un concetto di semplificazione tutti i batteri, sia HCB che NHCB, sono stati considerati in uno stato vitale omogeneo. Non sono stati pertanto considerati i differenti stati fisiologici dipendenti dalle condizioni ambientali come le forme delle cellule dormienti, le forme di vitali ma non coltivabili (*viable but not cultivable*, VNBC) o quelle di ultra microbacteria (UMB) o di tutte quelle cellule batteriche in stato di stress o starvation condizione tipica degli ambienti marini che possono ridurre drasticamente la loro attività se non sopprimerla del tutto.

Il petrolio greggio è una miscela di diverse sostanze con composizione chimica e cinetiche degradative differenti.

Per contro il nostro modello concettuale prevedeva solo due frazioni (gli idrocarburi degradabili e refrattari, DH e RH) che presentavano parametri cinetici identici anche se costituiti da composti chimici differenti.

La categoria degli idrocarburi degradabili è stata globalmente assimilata agli alcani, sebbene varie sperimentazioni (anche realizzate nell'ambito di questo lavoro) hanno suggerito che una parte importate della biodegradazione interessa anche la frazione degli idrocarburi aromatici e ciclici.

Inoltre il sistema di confine “acqua-petrolio” è stato trattato come una zona fisicamente stabile, anche se numerosi studi la identificano come una zona dotata di un’alta dinamicità.

Comunque sia, la semplificazione del sistema naturale si poneva come una tappa obbligata per lo sviluppo del modello matematico che altrimenti sarebbe divenuto di difficile gestione e controllo.

Il modello matematico pur permettendoci di analizzare i fenomeni biologici legati alla degradazione del petrolio, non può comunque definirsi come uno strumento finito o completo e la sua stessa natura di modello sperimentale ne prevede un’evoluzione ed una migioria continua.

La comparazione dei risultati reali (ottenuti in via sperimentale) e quelli virtuali (ottenuti dalle simulazioni), per la dinamica di crescita della popolazione batterica eterotrofa, dei batteri idrocarburo degradanti e della degradazione del petrolio si sono mostrate corrispondenti.

Il ruolo giocato dal carbonio di partenza, come fonte primaria di carbonio per la crescita microbica, ha determinati inoltre una selezione specifica di una popolazione batterica costituita da organismi idrocarburo degradanti.

Nello stato attuale del modello, le simulazioni realizzate in un tempo di quindici giorni, hanno messo in evidenza alcuni punti fondamentali, quali:

- i. L’importanza del biodisperdente come una sostanza capace di aumentare la disponibilità del petrolio all’azione di degradazione dei batteri.
- ii. L’effetto della combinazione tra apporto di petrolio e biodisperdente determina un aumento della selezione di popolazioni microbiche atte alla degradazione del petrolio.

Al fine di migliorare il modello proposto è poterlo pienamente utilizzare come uno strumento per lo studio degli ecosistemi marini è fondamentale acquisire maggiori informazioni su alcuni punti ed implementare la complessità del modello stesso; in particolare bisognerà:

- i. Avere una conoscenza maggiore delle cinetiche di crescita dei batteri sui diversi costituenti del petrolio greggio. Questo potrà essere utile al fine di seguire per esempio, la degradazione dei composti alifatici (dritti o ramificati) e aromatici (ad uno o a più anelli), di conoscere esattamente la loro proporzione nel petrolio utilizzato e dunque dividere il petrolio utilizzabile in diverse frazioni variando nella loro attitudine ad essere utilizzate.
- ii. Definire alcuni stati fisiologici cellulari particolare ed evidenziare se è possibile determinare una corrispondenza tra stato fisiologico e attività cellulare degradativa.

Questo sarà particolarmente importante per meglio comprendere la funzionalità dei batteri in ambiente naturale.

- iii. Conoscere meglio le relazioni preda-predatore che intercorrono nei vari livelli trofici del sistema in studio; soffermandoci in modo particolare a quelli che intercorrono tra i protozoi e i batteri e tra quest'ultimi e la componente virale. Particolarmente interessante sarà inoltre analizzare l'influenza che gli inquinanti idrocarburi possano avere effetto su queste dinamiche dal punto di vista quantitativo e qualitativo.
- iv. Implementare il modello con l'aggiunta della componente virale, che come più volte detto si presenta come un fattore di importantissimo nella regolazione dell'abbondanza e della qualità della popolazione microbica.
- v. Aumentare la conoscenza su tutta quella parte di composti del metabolismo secondario da noi identificati come "prodotti escreti" (EP) e a cui abbiamo, arbitrariamente, attribuito un effetto positivo per sviluppo della popolazione microbica, senza tenere in considerazione di un oro potenziale effetto tossico.

CONCLUSIONI GENERALI

La bioremediation è una tecnologia emergente basata sull'aggiunta, in ambienti contaminati, di materiali (per esempio di nutrienti o di substrati) per accelerare i naturali processi degradativi (OAT, 1991). Questa tecnologia è stata riconosciuta come uno dei metodi di ripristino ambientale meno intrusivi ed è stata indicata per essere un strumento efficace per il trattamento dei versamenti di petrolio negli ambienti marini costieri (Lee *et al.*, 1997; Swannell *et al.*, 1996; Venosa *et al.*, 1996, Zhu *et al.*, 2001).

Gli approcci più utilizzati a tale scopo sono (i) la bioaugmentation, che consiste nell'aggiunta al sistema di elevate densità di popolazioni batteriche idrocarburo degradanti e (ii) la biostimulation, che consiste nella stimolazione dei tassi di crescita e/o biodegradazione delle popolazioni batteriche naturali con capacità idrocarburo degradanti. Studi in campo ed in laboratorio hanno dimostrato ampiamente che gli interventi di biostimulation sono i più efficaci (Prince, 1993; Swannell *et al.*, 1996; Venosa *et al.*, 1996).

Numerose ricerche sono state incentrate sullo studio del comportamento del petrolio in mare e sulla comprensione della fitta rete di interscambi (basati principalmente sul concetto di "azione e reazione") tra i diversi compartimenti dell'ecosistema (Garcia-Blanco *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 1999).

Il successo dei processi di biostimulation dipende pertanto dall'abilità di stabilire e mantenere delle condizioni che favoriscono le quote di degradazione e fattori ambientali (ad esempio temperatura, disponibilità di ossigeno, concentrazioni di nutrienti ecc.) e biologici (composizione qualitativa e quantitativa delle popolazioni microbiche) che hanno un ruolo fondamentale in questo fenomeno.

Un maggiore input a questo tipo di ricerche è stato fornito dallo sviluppo e dal sempre maggior utilizzo di ecosistemi artificiali in scala, che sono stati ampiamente comprovati essere uno degli strumenti migliori per lo studio dei processi ecologici; questi difatti non solo permettono la riproduzione dell'ecosistema naturale ma anche un'ampia capacità di controllo con caratteristiche di replica e di ripetibilità uniche (Kemp *et al.*, 1980; Odum 1984).

Sulla base di queste considerazioni l'ottimizzazione delle tecniche di biostimulation si sono fondate su tre ipotesi chiave:

- i. La presenza nell'ambiente marino di microrganismi dalle particolari vie metaboliche e degradative che rendono possibile un attacco specifico degli idrocarburi e il loro utilizzo come fonte preferenziale (se non unica) di carbonio.

- ii. La costante carenza nell'ambiente marino di elementi necessari (come l'azoto e il fosforo) per lo sviluppo microbico che si traducono anche come fattori limitanti anche per l'assunzione del carbonio.
- iii. La possibilità di utilizzare dei sistemi artificiali *ex situ* che, grazie ad uno sviluppo ingegneristico sempre crescente, forniscono dei validi degli strumenti per lo studio dei processi biologici presenti nell'ambiente naturali.

La prima ipotesi è ampiamente dimostrata sia dalla recente letteratura scientifica sia nei risultati sperimentali ottenuti in questo lavoro. I batteri idrocarburodegradanti sono ubiquitari dell'ambiente marino e grazie alla loro capacità di emulsificare gli idrocarburi e di utilizzarli come singola fonte di carbonio ed energia si mostrano avere un ruolo chiave nelle catene alimentari correlate alla degradazione del petrolio. Un ambiente marino, pur se non interessato da diretti fenomeni di inquinamento, presenta in se delle altissime capacità auto degradative. Questo si evidenzia dal naturale cambiamento strutturale e metabolico della popolazione microbica a seguito di eventi di inquinamento simulato.

Anche la considerazione della necessità di arricchire l'ambiente marino di azoto e fosforo, non è più da dimostrare, essendo una condizione ampiamente studiata e comprovata. Negli ultimi anni numerosi studi realizzati in loco e in laboratorio hanno portato ad un sempre maggiore uso di fertilizzanti come fonti nutrizionali, come i fertilizzanti solubili dell'azoto, quelli a basso rilascio (SFRs) o ancora quelli oleofili (Marty, 1983; Lee *et al.*, 1995; Young-Sook *et al.*, 2001) o tramite apporto dei nutrienti solubili in acqua tutti impiegati al fine di supportare lo sviluppo della popolazioni indigene di batteri idrocarburo degradanti.

Per ultimo le sperimentazioni in scala (condotte nei microcomi e/o mesocosmi) si sono dimostrati essere uno degli ultimi traguardi per lo studio degli ecosistemi naturali. I sempre più numerosi studi ed i continui sviluppi strutturali e progettuali hanno portato alla realizzazione di sistemi artificiali altamente specializzati capaci di riprodurre perfettamente le condizioni base di un ecosistema naturale.

Pertanto il raggiungimento degli obiettivi prefissateci in questo lavoro non potevano non passare attraverso un'attenta valutazione di questi tre aspetti.

In conclusione, le sperimentazioni realizzate, hanno permesso di ampliare la nostra conoscenza su questi fenomeni permettendoci di evidenziare alcuni aspetti concettuali e pratici fondamentali (taluni già precedentemente illustrati), quali:

- i. La selezione di una popolazione microbica con potenzialità biodegradative è basata principalmente sulla pressione imposta dalla presenza dell'inquinante idrocarburico e sulla disponibilità di nutrienti che non trovandosi in concentrazioni limitanti determinano uno per lo sviluppo della biomassa batterica.
- ii. L' utilizzo di biodispersanti determina un aumento della superficie del petrolio disponibile all'attacco microbico. In questa condizione i batteri idrocarburo degradanti aderiscono (tramite carica superficiale, fimbriae, pili, strutture idrofobiche ecc..) alla superficie inquinate determinando la formazione di micro nicchie in cui svilupparsi.
- iii. La selezione effettuata dall'introduzione esclusiva del petrolio si basa principalmente sull'effetto tossico di quest'ultimo sulle naturali popolazioni microbiche. La morte dei batteri eterotrofi determina un aumento delle concentrazioni di micro- e macronutrienti che diventano disponibili per specie microbiche meglio adatte a sostenere la nuova situazione ambientale (quella dell'inquinamento).
- iv. Lo sviluppo di una popolazione microbica specializzata nella degradazione degli idrocarburi, passa necessariamente da una riduzione della biodiversità microbica e nella selezione di alcuni generi che diventano (per loro caratteristiche loro intrinseche) dominanti (come *Alcanivorax* sp.).
- v. È possibile osservare una risposta globale della popolazione batterica in un tempo relativamente breve, dopo il quale cambi nella composizione microbica sembrano profondamente limitati.
- vi. La fisiologia, il metabolismo e il ciclo vitale dei batteri, permette di proporre i sistemi in scala (microcosmi e/o mesocosmi) come strumenti ideali per studi correlati ai processi di bioremediation microbica.
- vii. Il confronto tra le sperimentazioni in microscala e quelle in mesoscala evidenzia che le variazioni dimensionali di scala non sembrano influire sulla dinamica, la struttura e la funzionalità della componente batterica.
- viii. Nell'utilizzo di sistemi in scala la minima riduzione delle distorsioni sperimentali si realizza tramite lo sviluppo di considerazioni geometriche ed ingegneristiche semplici che sono sempre una buona base per le ipotesi di sviluppo di scaling.
- ix. Una corretto processo di scaling può portare alla realizzazione di sistemi dinamici omogenei e confrontabili; che permettono di ottenere una "finestra sperimentale" in cui le reali dinamiche biologiche possono essere spesso determinate.

- x. Un accurata analisi di tutti i parametri possibili permette di ottenere importanti informazioni per la comprensione degli eventi presenti all'interno delle vasche di sperimentazione.

Infine, a partire da un certo numero di ipotesi semplificate e da un accurata analisi delle sperimentazioni realizzate in mesoscala, si è tentato di elaborare un modello matematico per l'analisi della dinamica dei batteri e dei processi di bioremediation negli ecosistemi simulati, di cui la validità dovrà essere verificata.

Questa prova di modellizzazione, anche se non molto elaborata, ha permesso di ottenere e chiarificare alcuni punti fondamentali (dinamiche di crescita dei batteri eterotrofi, dei batteri idrocarburodegradanti, evoluzione del petrolio di partenza) e di evidenziare dei flussi o comunque delle correlazioni biologiche che sarà bene approfondire per migliorare l'affidabilità del modello e le sue capacità di predizione.

Allo stato delle nostre conoscenze, il nostro modello ha prettamente un valore dimostrativo mostando quello che è possibile realizzare attraverso l'utilizzo di certe informazioni essenziali ottenute per analisi e per sperimentazioni.

Nei paragrafi precedenti sono state già messe in evidenza alcune limitazioni o semplificazioni apportate al sistema utilizzato e come queste dovranno essere superate e migliorate.

Come continuazione di questa linea di ricerca potrà essere particolarmente interessante incentrare la nostra attenzione su alcuni punti rimasti in sospeso e che, una volta completati, ci potranno certamente dare una visione più completa di questi fenomeni.

Realizzare sperimentazioni simulate con un tempo di osservazioni maggiore.

Un allungamento del tempo di analisi potrebbe aprire importanti scenari per:

- i. Una migliore comprensione delle dinamiche batteriche e dell'alternanza delle popolazioni microbiche in lunghi periodi.
- ii. Analizzare il comportamento fisiologico e metabolico dei batteri HCB alla fine del processo di bioremediation.
- iii. Studiare l'evoluzione temporale della degradazione delle diverse frazioni del petrolio.

Ottimizzare ulteriormente le condizioni di biostimulation

Un miglioramento delle condizioni sperimentali si traduce necessariamente in cambiamenti dei parametri chimico e fisici utilizzati; in quest'ottica importanti risultati si potrebbero realizzare tramite:

- i. Utilizzo di nutrienti oleofili (in sostituzione di quelli disciolti) i quali, legandosi con la componente idrofoba del petrolio, possono favorire selettivamente lo sviluppo solo dei microrganismi interessati dai processi di attacco idrocarburico.
- ii. Variazione delle condizioni di controllo (quali la temperatura) che possono influire più o meno direttamente sull'evoluzione di questi processi.

Implementare la struttura delle vasche di reazioni

Un aumento della struttura ingegneristica dei sistemi in mesoscala, tramite aggiunta di nuove compartimentazioni o il semplice utilizzo di quelle strutture già esistenti ma non utilizzate per questo studio (es. vasche di marea), se da una parte si può tradurre certamente con una maggiore complessità idraulica e di controllo dall'altra determina inequivocabilmente un maggiore realismo ambientale.

Aumentare il numero dei parametri analizzabili

Un aumento delle misure da realizzare all'interno delle vasche corrisponde ad un incremento della conoscenza dei fenomeni biologici e ad una migliore conoscenza di quel network di flussi di materia esistente tra le diverse "variabili di stato" del sistema in studio.

In particolare la nostra attenzione potrà essere a:

- i. Valutare la componente virale, con particolare riferimento allo studio e all'identificazione di particelle virali specifiche per gruppi batterici come quelli degli idrocarburo degradanti.
- ii. Studiare le relazioni esistenti tra grazing e batteri e anche per questo identificare la possibile presenza di fenomeni di predazione specie specifica.
- iii. Studiare le caratteristiche metaboliche su singola cellula e verificare le relazioni funzionali all'interno dei movimenti strutturali della popolazione microbica complessiva.
- iv. Analisi della produzione primaria.

Implementare il modello matematico

Questo potrà avvenire conseguentemente all'aggiunta di nuovi parametri chiave per porteranno ad aumentare e migliorare l'affidabilità del modello e le sue capacità di predizione.

Sviluppo di sistemi in macroscale (o *in situ*)

Dopo l'utilizzo di sistemi in microscala e mesoscala il passo evolutivo impone lo sviluppo di sistemi aperti *in situ*; Pur essendo ingegneristicamente e concettualmente diversi risulterebbero necessari per permettere un confronto tra i dati ottenuti dalle sperimentazioni *ex situ* e quelle realizzate negli ecosistemi aperti.

BIBLIOGRAFIA

1. Alldredge A. L., Gotschalk C., Passow U. and Riebbessel U. (1995). Mass aggregation of diatome blooms: insights from a mesocosm study. *Deep-Sea research II* 42(1): 9-27.
2. Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman, D. J., (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
3. Aminot A, Chaussepied M (1983) Manuel des analyses chimiques en milieu marin. *CNEXO* (Centre National pour l'Exploitation des Océans).
4. Andersson L., Strandberg L. and S-O. Enfors. 1996. Cell segregation and lysis have profound effects on the growth of *Escherichia coli* in high cell density fed batch cultures. *Biotechnol. Prog.* 12: 190-195.
5. Aronstein B. N., Alexander M. (1993). Effect of a non-ionic surfactant added to the soil surface on the biodegradation of aromatic hydrocarbons within the soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39: 386-390.
6. Atlas R. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons : an environmental perspective. *45(1) : 180-209.*
7. Atlas R. M., and Cerniglia C. E. (1995). Bioremediation of Petroleum Pollutants. *Bioscience*, 45:332-338.
8. Atlas R.M. (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45, 180-209.
9. Atlas R.M. (1995). Bioremediation of petroleum pollutants. *Internation Bioremediation e Biodegradation.* 317-327
10. Bai G., Brusseau M.L., Miller M.R. (1997). Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. *Journal Contaminated Hydrology.* 25: 157-170.
11. Banata I. M. (1995). Biosurfactants production and possible use in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation. A review *Biosource Technol.* 51: 1-12.
12. Barkay T., Navon-Venezia S., Ron Z., Rosemberg E. (1999). Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier Alasan. *Applied and Environmental Microbiology.* 65(6): 2697-2702.
13. Bartha R. (1986). Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. *Microbial Ecology* 12: 155-172.
14. Becquevort S. 1999. Importance du réseau trophique microbien dans l'Océan Antarctique: role du protozooplancton. Ph. D. dissertation, Université Libre de Bruxelles.

15. Beilen J. B., Li Z., Duetz W. A., Smits T., Without B. (2003). Diversity of alkanes hydroxylase systems in the environment. 58(4): 427-440.
16. Belsky I., Gutnick D. L. Rosenberg E. (1979). Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: determination of emulsifier-bound fatty acids. FEBS Letters. 101: 175-178.
17. Bergamasco A., Cappello S., Giuliano L., Yakimov M., Marcelli M., Crisafi E., Zappalà G. (2004) Design and building of a “Mesocosm facility” to study physical and ecological process in coastal ecosystems. Congresso Nazionale CoNiSMA Terracini (PA): Ottobre 2004
18. Berhe-Corti L. and Ebenhöf W. 1999. A mathematical model of cell growth and alkane degradation in Wadden Sea sediment suspensions. Biosystems, 49: 161-189.
19. Billen G. and Servais P. 1989. Modélisation des processus de dégradation bactérienne de la matière organique en milieu aquatique. In: Bianchi M. et al. (eds.), Microorganismes dans les écosystèmes océaniques, Masson, Paris, pp: 219-242.
20. Bjørnsen P.K. and Kuparinen J. 1991. Growth and herbivory by heterotrophic dinoflagellates in the Southern Ocean studied by microcosm experiments. Mar. Biol. 109: 397-405.
21. Blumenshine S. C., Vadeboncoeur Y., Lodge D. M., Cottingham K. L. Knight S. E. (1997). Benthic-pelagic links: responses of benthos to water-column nutrient enrichment. J. N. A. Benthol. Soc. 16: 466-479.
22. Bowman J. P., McCuaig R. D. (2003) Biodiversity, Community Structural Shifts, and Biogeography of Prokaryotes within antarctic continental shelf sediment. Applied and Environmental Microbiology, 69(5): 2463-2483.
23. Bragg J.R., Prince R.C., Harner E.J. and Atlas R.M. (1994) Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. Nature, 368: 413-418.
24. Browder J. A. (2004). Review of ecological microcosms by Robert J. Beyers and Howard T. Odum. Ecological Modelling 178: 77-80.
25. Brown M. V., Bowman J. P. (2001). A molecular phylogenetic survey of sea-ice microbial communities (SIMCO). FEMS Microbiology Ecology. 35: 267-275.
26. Bruheim P., Bredholt H., Eimhjellen K. (1999). Effects of surfactant mixtures, including corexit 9527, on bacterial oxidation of acetate and alkanes in crude oil. Applied and Environmental Microbiology. 65(4): 1658-1661.
27. Button D. K. (1998). Nutrient uptake by microorganisms according to kinetic parameters from theory as related to cyoarchitecture. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62(3): 636-645.

28. Capelli S. M., Busalmen J. P., de Sanchez S.R. (2001). Hydrocarbon bioremediation of a mineral-base contaminated waste from crude oil extraction by indigenous bacteria. *International Biodegradation e Biodegradation*. 47: 233-238.
29. Cappello S. Caruso G., Yakimov M.M., Monticelli M., Zampino D., Maimone G. Tamburini C., Tripodo B., Mancuso M., Troussellier M., Giuliano L. (2005). Dinamica della popolazione microbica durante prove di "oil spill bioremediation": studio in micro- e mesoscala. Congresso Nazionale CoNisma Terracini (PA): Ottobre 2004
30. Carpenter S. R., Kitchell J. F., Hodgon J. R (1985). Cascading trophic interactions and lake productivity. *BioScience* 35: 634-639.
31. Carpenters S. R., Chisholm S. W., Krebs C. J., Schindler D. W. E Wrighth R. F. (1995). Ecosystem experiments. *Science* 269: 324-327.
32. Cerniglia C.E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion Biotechnology*. 4: 331-338.
33. Chen C., Peteresen J. E., Kemp W. M. (1997). Spatial and temporal scaling of periphyton growth on walls of estuarine mesocosms. *Marine Ecology Progress Series*. 155: 1-15.
34. Chen C., Petersen J. E. And Kemp W. M: (1997). Spatial and temporal scaling of periphyton growth on walls of estuarie mesocosms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 155:1-15.
35. Chen C., Petersen J. E., Kemp W. M. (2000). Nutrient uptake in experiment estuarine ecosystems: scaling and partioning rates. *Marine Pollution Bulletin*. 44(10): 1201-1211.
36. Chen C., Petersen J. E., Kemp W. M. (2000). Nutrient uptake in experimental estuarine ecosystems: scaling and partitioning rates. *Marine Ecology Progress Series*. 200: 103-116.
37. Chhatre S., Purohit H., Shanker R., Khanna P. (1996). Bacterial consortia for crude oil spill remediation. *Wat. Sci. Tech.* 34(10): 187-193.
38. Cho J., Giovannoni S. J. Cultivation and Growth characteristics of a diverse groupo of oligotrophic marine g-Prpteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1): 432-440.
39. Crescenzi F., Camilli M., Fascetti E., Porcelli F., Prosperi G., Saceddu P., 2003. Microbial degradation of biosurfactant dispersed oil. #499, International Oil Spill Conference.
40. Danovaro E., Dell'Anno A., Trucco A., Serresi M., Vanucci S. (2001). Determiantion of virus abundance in marine seiments. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(3): 1384-1387.
41. Delille D., Basseres A., Dessommes A. (1998). Effectiveness of bioremediation for oil-polluted Antarctic seawater. *Polar Biology* 19: 237-241.

42. Desai J. D., Banat I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology Molecular Review*. 61: 47-64.
43. Dicks B. (1999). The environmental impact of marine oil spills: Effects, recovery and compensation. International Seminar on Tankers Safety, Pollution Prevention, Spill response and compensation 6th November 1999. The International Tankers Owners Pollution Federation Ltd.
44. Drever J.I. 1982. *The Geochemistry of Natural Waters*, Prentice-Hall, Inc., Englewoods Cliffs, N.J., pp. 388.
45. Dutta T. K., Harayama S. (2001). Analysis of long-side-chain alkyloaromatics in crude oil for evaluation of their fate in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 35: 102-107.
46. Dyksterhouse S. E., Gray J. P., Herwig R. P., Lara J. C., Staley J. T. (1995). *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *Int J Syst Bacteriol.* 45: 116–123.
47. Ebenhöh W. and Berthe-Corti L. 2001. Modelling of hexadecane degradation in continuous-flow cultures. *Biosystems*, 59: 159-183.
48. Engel A., Goldthwait S., Passow U. and Alldredge A. (2002). Temporal coupling of carbon and nitrogen dynamics in a mesocosm diatom bloom. *Limnology Oceanographic* 47(3): 753-761.
49. Engel A., Goldthwait S., Passow U., Alldredge A. (2002). Temporal decoupling of carbon and nitrogen dynamics in a mesocosm diatom bloom. *Limnol. Oceanogr.* 42(3): 753-761.
50. Evans F. F., Rosado A. S., Sebastian G. V., Casella R., Machado P. L. O. A., Holmstrom C., Kjelleberg S. van Elsas Jan D., Seldin L. (2004). Impact of oil contamination and bistimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*. 49: 295-305.
51. Foght J.M. and Westlake D.W.S. (1987) Biodegradation of hydrocarbons in freshwater. In: Vandermeulen and Hrudey (Ed), *Oil in Freshwater: Chemistry, Biology, Countermeasure Technology*. Pergamon Press, New York, pp217-230.
52. Fuse H., Takimura O., Murakami K., Inouse H., Yamaoka Y. (2003). Degradation of chlorinated biphenyl, dibenzofuran and dibenzo-p-dioxin by marine bacteria that degrade biphenyl, Carbazole or Dibenzofuran. *Biosi. Biotechnol. Biochem.* 67(5): 1121-1125.
53. Georgiou G., Lin S. C., Sharma M. M. (1992). Surface-active compounds from microorganisms. *Bio/Technology*. 10: 60-65.

54. Golyshtin P. N., Chernikova, T. N., Abraham W. R., Lunsdorf H., Timmis K. N. e Yakimov, M. M. (2002) Oleiphilaceae fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *Int. J.Syst. Evol. Microbiol.* 52: 901–911.
55. Grimberg S. J., Nagel J., Aitken M. D. (1995). Kinetics of phenanthren dissolution into water in the presence of nonionic surfactants. *Environmental Scientifics Technology.* 29: 1480-1487.
56. Guha S., Jaffé P. R. (1996). Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. *Environemtal Scientifics Technology.* 30: 605-611.
57. Hagstrom A., Pommier T., Rohwer F., Simu K., Stolte W., Svensson D., Li Zweifel, U. (2002). Use of 16S Ribosomal DNA for Delineation of Marine Bacterioplankton Species. *Applied and Environmental Microbiology.* 68(7): 3628-3633.
58. Harayama S. (1997). Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. *Current Opinion in Biotechnology* 8, 268-273.
59. Harayama S., Kasai Y., Hara A. (2004). Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Current Opinion in Biotechnology.* 15: 205-214.
60. Harte J., Levy D., Rees J., Saegebarth E. (1980). Making microcosms an effective assessment tool. – In: Geisy J. P. J. (ed). *Microcosms in ecological research.* National Technical Information Service, Springfield, VA, pp. 105-137.
61. Harvey S., Elashvili I., Valdes J. J., Kamely D., Chakrabarty A. M. (1990). Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. *Bio/Technology.* 8: 228-230.
62. Impallomeni G., Guglielmino S. P. P., Carnazza S., Ferreri A. e Ballistreri A. (2000). Tween 20 and Its Major Free Fatty Acids as Carbon Substrates for the Production of Polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *Journal of Polymers and the Environment* 8(2):97 – 102.
63. Ives A.R, Foufopoulos J., Klopfer E. D., Klug J. L., Palmer T. M. (1996). Bottle or big-scale studies: how do we do ecology 77: 681-685.
64. Iwabuchi N., Sunairi M., Urai M., Itoh C., Anzai H., Nakajima M., Harayama S., (2002). Extracellular polysaccharides of *Rhodococcus rhodochrous* S-2 stimulate the degradation of aromatic components in crude oil by indigenous marine bacteria. *Applied Environmental Microbiology.* 68: 2337-2343.
65. Jorgensen S.E. 1995. State of the art of ecological modelling in limnology. *Ecol. Model.* 78: 101-115.
66. Kanaly R. A., Harayama S. (2000). Biodegradation of High-Molecular- Weight polycyclic aromatic hydrocarbon by bacteria. *Journal of Bacteriology.* 182(8); 2059-2067.

67. Kanaly R., Harayama S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology* 182(8): 2059-2067.
68. Kangas P., Adey W. (1996). Mesocosms and ecological engineering. *Ecological Engineering* 6: 1-5.
69. Kaplan N., Rosenberg E. (1982). Exopolysaccharide distribution and bioemulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413. *Applied Environmental Microbiology*. 44: 1335-1341.
70. Kaplan N., Rosenberg E., Jann B., and Jann K. (1985). Structural studies of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4. *European Journal of Biochemistry*. 152: 453-458.
71. Kaplan N., Zosim Z., Rosenberg E. (1987). Reconstitution of emulsifying activity of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 by using pure polysaccharide and protein. *Applied Environmental Microbiology*. 53: 440-446.
72. Kareiva P., Andersen M. (1998). Spatial aspects of species interactions: The wedding of models and experiments. Pages 38-54 in Hasting A. ed. *Community Ecology*. New York: Springer-Verlag.
73. Kasai Y., Kishira H., Sasaki T., Syusubo K., Watanabe K., Harayama S. (2002). Predominant growth of *Alcanivorax* strains in oil-contaminated and nutrient-supplemented sea water. *Environmental Microbiology*. 4(3): 141-147.
74. Kaufmann K., Chriphorsen M., Buttler A., Harms H., Hohener P. (2004). Microbial community response to petroleum hydrocarbon contamination in the unsaturated zone at the experimental field site Vaelose, Denmark. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 387-399.
75. Kemop W. N., Petersen J. E., Gardner R. H. (2001). Scale-dependence and the problem of extrapolation: Implications for experimental and natural coastal ecosystems. Page 3-57 in Gardner RH *Scaling Relations in experimental ecology*. New York: Columbia University Press.
76. Klekner V., Kosaric N. (1993). Biosurfactants for cosmetics. P.329-372. In N. Kosaric (ed.), *Biosurfactants: production, properties, application*. Surfactant Science Series, vol. 48. Marcel Dekker, New York, N.Y.
77. Laha S., Luthy R. G. (1991). Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil-water systems. *Environ. Sci. Technol.* 25 : 1920-1930.
78. Laha S., Luthy R. G. (1992). Effect of nonionic surfactants on the mineralization of phenanthrene in soil-water systems. *Biotechnol. Bioeng.* 40: 1367-1380.
79. Lancelot C. and Billen G. 1985. Carbon-nitrogen relationships in nutrient metabolism of coastal marine ecosystems. *Adv. Aquat. Microbiol.* 3: 263-321.

80. Lancelot C., Billen G., Veth C., Mathot S. and Becquevort S. 1986. Modelling carbon cycling through phytoplankton and microbes in the Scotia-Weddell Sea area during sea ice retreat. *Mar. Chem.* 35: 305-324.
81. Lancelot C., Hannon E., Becquevort S., Veth C. and De Baar H.J.W. 2000. Modeling phytoplankton blooms and carbon export production in the Southern Ocean: dominant controls by light and iron in the Atlantic sector in Austral spring 1992. *Deep-Sea Res I*, 47: 1621-1662.
82. Lane D. J. (1991). 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, New York, pp.115-175.
83. Lane D.J. (1991). 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, New York, pp.115-175.
84. Lazar S., Dobrota A., Voicu M., Stefanescu M., Sandulescu L., Tetrisor I. G. (1999). Microbial degradation of waste hydrocarbons *Journal of Petroleum Science and Engineering*. 151-160.
85. Leahy J.G., Colwell R.R. (1990) Microbial Degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbial Reviews*, 53(3): 305-315.
86. Lebaron P., Servais P., Troussellier M., et al. (1999). Changes in bacterial community structure in seawater mesocosms differing in their nutrient status. *Aquatic Microbial Ecology* 19, 255-267.
87. Lebaron P., Servais P., Troussellier M., et al. (2001). Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: change in abundances, activity and composition. *FEMS Microbiology Ecology* 34, 255-266.
88. Lepo J. E., Cripe C. R. (1999). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) from crude oil in sandy-beach microcosms. *Bioremediation*
89. Lipson D. A., Schmidt S. K. (2004). Seasonal changes in an alpine soil bacterial community in the Colorado Rocky mountains. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5): 2867-2879.
90. Lodge D. M., Blumenshine S. C. e Vadedoncoeur Y. (1998). Insights and applications of large-scale, long-term ecological observations and experiments. In: Reserits, W. J. e Bernardo J (eds), *The state of experimental ecology: questions, levels and approaches*. Oxford Univ. Press, New York.
91. Margesin R., Labbè D., Schinner F., Greer C. W., Whyte L. G. (2003). Characterisation of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6): 3085-3092.
92. Martin A. P. (2002). Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8): 3673-3682.

93. Martin Y. Troussellier M. and Bonnefont J.L. 1998. Adaptative response of *E. coli* to marine environmental stresses: a modelling approach based on viability and dormancy concepts. *Oceanol. Acta*, 21: 951-964.
94. Martin Y.P. and Lelong P. 1981. Modélisation de la dynamique des communautés bactériennes d'un écosystème planctonique marin experimental. *Oceanol. Acta*, 4: 433-443.
95. Martin Y.P. and Musso J. 1982. Simulations numériques de la dynamique des microorganismes d'un mélange effluent urbain-eau de mer. Matière organique et survie des coliformes fécaux. *Rev. Int. Oceanogr. Med.* 66: 77-89.
96. Marty P. (1994). Utilisation d'un nutriment oléophile associé à une biodégradation pour accélérer la biodégradation d'un pétrole brut en milieu marin. Thèse Doctorat Univ. Aix-Marseille III.
97. Marty P. (1994). Utilisation d'un nutriment olephili associé à une bioaugmentation pour accélérer la biodegradation d'un pétrole brut en milieu marin. Thesis of Ph.D Biologie des Organismes et des ecosystemes.
98. McNaughton S. J., Stephen J. R., Nenosa A. D., Davis G. A., Chang Y., White D. C. (1999). Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology.* 65(8): 3566-3574.
99. Mearns A. J. (1997) Cleaning oiled shores: putting bioremediation to the test. *Spill Science & Technology Bulletin*, 4(4):209-217.
100. Mearns A. J. Cleaning oiled shores: putting bioremediation to the test. *Spill Science e Technology Bulletin* 4(4): 209-217.
101. Miller R. M. (1995). Surfactant-enhanced bioavailability of slightly soluble organic compounds, p.33-54. In H. Skipper and R. Turco (ed.), *Soil Science Society of America special publication 43. Bioremediation: science and applications.* Soil Science Society of America, Madison, Wis.
102. Miller R. M., Bartha R. (1989). Evidence from liposome encapsulation for transport- limited microbial metabolism of solid alkanes. *Applied Environmental Microbiology* 55: 269-274.
103. Muller-Hurtig R.F., Wagner F., Blaszyk R., Kosaric N., (1993). Biosurfactants for environmental control, p. 447-469. In N. Kosaric (ed.), *Biosurfactants: production, properties, application.* Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
104. Navon-Venezia S., Banin E., Ron E. Z., Rosenberg E. (1998). The bioemulsifier alasin: role of protein in maintaining structure and activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 382-384.

105. Navon-Venezia, S., Zosim Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E. Z., Rosenberg, E., 1995. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3240-3244.
106. Neu T. R. (1996). Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological Review* 60: 151-166.
107. Noble R. T., Fuhrman J. A. (1997). Virus decay and its causes in coastal waters. *Applied and Environmental Microbiology.* 63(1): 77-83.
108. Odum E. P. (1961). The role of tidal marshes in estuarine production. *Conservationist* 15: 12-15.
109. Oh Y, Sim D., Kim S. (2001). Effects of nutrients on crude oil biodegradation in the upper intertidal zone. *Marine Pollution Bulletin.* 42(12): 1367-1372.
110. Ohwada K., Nishimura M., Wada M., Nomura H., Shibata A., Okamoto K., Toyoda A., Tkada H., Yamada M. (2003). *Marine Pollution Bulletin* 47: 78-84.
111. Otremba Z., Toczek H. (2002) Degradation of crude oil film on the surface of seawater: the role of luminous, biological and abiotic factors. *Polish Journal of Environmental Studies* 11(5): 555-559.
112. Otremba Z., Toczek H. (2002). Degradation of crude oil film on the surface of seawater: the role of luminous, biological and abiotic factors. *Polish Journal of Environmental Studies* 11(5): 555-559
113. Patel M. N., Gopinathan, K. P. (1986). Lysozyme-sensitive bioemulsifier for immiscible organophosphorus pesticides. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 1224-1226.
114. Petersen J. E. (2001). Adding artificial feedback to a simple aquatic ecosystem: the cybernetic nature of ecosystems revisited. *OIKOS* 94: 533-547.
115. Petersen J. E., Chen C. C. (1999). A method for measuring depth-integrated community metabolism in experimental planktonic-benthic ecosystems. *Hydrobiologia* 391: 23-32.
116. Petersen J. E., Chen C., Kemp W. M. (1997). Scaling Aquatic primary productivity: experiments under nutrient and light-limited conditions. *Ecology* 78(8): 2326-2338.
117. Petersen J. E., Cornwell J. C. Kemp W. M. (1999). Implicit scaling in the design of experimental aquatic ecosystems. *Oikos* 85: 3-18.
118. Petersen J. E., Hastings Alan. (2001). Dimensional approaches to scaling experimental ecosystems: designing mousetraps to catch elephants. *The American Naturalist.* 157(3): 324-331.
119. Petersen J. E., Kemp W. M., Bartleson R., Boynton W. R., Chen C., Cornwell J. C., Gardner R. H., Hinkle D. C., Houde E. D., Malone T. C.,... (2003). Multiscale experiments in coastal ecology: improving realism and advancing theory. *Bioscience* 53(12): 1181-1197.

120. Petersen J. E., Sanford L. P., Kemp W. M. (1998). Coastal plankton responses to turbulent mixing in experimental ecosystems. *Marine Ecology Progress Series* 171: 23-41.
121. Petersen J. E., Sanford L. P., Kemp W. M. (1998). Coastal plankton responses to turbulent mixing in experimental ecosystems.
122. Petersen J., Hasting A. (2001). Dimensional approaches to scaling experimental ecosystems: designing mousetraps to catch elephants. *The American Naturalist* 157(3): 324-333.
123. Petersen J. E., Cornell J. C., Kemp W. M. (1999). Implicit scaling in the design of experimental aquatic ecosystems. *OIKOS* 85: 3-18.
124. Petersen J. E., Sanford L. P., Kemp W. M. (1998). Coastal plankton responses to turbulent mixing in experimental ecosystems. *Marine Ecology Progress Series*. 171: 23-41.
125. Porter K.G., Feig G. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 14:799-801.
126. Prince R. (1993). Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Crit. Rev. Microbiol.* 19: 217-242.
127. Prince R. C., Elmendorf D. L., Lute J. R., Hsu C. S., Haith C. E., Senius J. D., Dechert G.J., Douglas G. S. and Butler E. L. (1994) 17 α (H), 21 β (H)-Hopane as a conserved internal marker for estimating the biodegradation of crude oil. *Environmental Science and Technology*, 28:142-145.
128. Prince, R.C. (1993) Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Critical Rev. Microbiol.* 19:217-242.
129. Prince R.C., Lessard R.R., Clark J.R. Bioremediation of marine oil spills. *Oil & Gas Science and Technology* 58(4): 463-468.
130. Pukall R., Pauker O., BuntfuB D., Ilich G., Lebaron P., Bernard L., Guindulain T., Vives-Rego J., Stackebrandt E. (1999). High sequence diversity of *Alteromonas macleodii*-related cloned and cellular 16S rDNAs from Mediterranean seawater mesocosm experiment. *FEMS Microbiology Ecology*. 28: 335-344.
131. Redfield A.C., Ketchum B.H. and Richards F.A. 1963. The influence of organisms on the composition of seawater. In: Hill M.N. (Ed.), *The Sea* (2). Interscience, New York, pp. 26-77.
132. Reilly T. J. (1999). The use of mesocosm in marine oil spill-ecological research and development. *Pure Appl. Chem.* 71(1): 153-160.
133. Reilly T.J. (1999). The use of mesocosms in marine oil spill. *Pure Applied Chemistry*, 71: 153-160.

134. Robinson K., Gosh M., Shu Z. (1996). Mineralization enhancement of non-aqueous phase and soil-bound PCB using biosurfactant. *Water Sci. Technol.* 34 : 303-309.
135. Roling W. F., Milner M. G., Jones, D. M., Fratapietro F., Swannell R. P. J., Daniel F., Head I. (2004). Bacterial community dynamics and hydrocarbon degradation during a field-scale evaluation of bioremediation on a mudflat beach contaminated with buried oil. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(5): 2603-2613.
136. Rosenberg E., Ron E. Z. (1997). BioEmulsans: microbial polymeric emulsifiers. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8 : 313-316.
137. Rosenberg E., Ron. E. Z. (1999). Surface active polymers of *Acinetobacter*. In: *Biopolymers from Renewable Sources*. D.Kaplan (ed.) pp.281-291. Springer-Verlag, Berlin.
138. Rosenberg, E. (1986). Microbial surfactants. *Crit. Rev. Biotechnol.* 3: 109-132.
139. Rubinovitz C., Gutnick D. L., Rosenberg E. (1982). Emulsan production by *Acinetobacter calcoaceticus* in the presence of chloramphenicol. *Journal Bacteriology.* 152, 126-132.
140. Santas R., Korda A., Lianou Ch., Santas Ph. (1998). Community responses to UV radiation. Enhanced UVB effects on biomass and community structure of filamentous algal assemblages growing in a coral reef mesocosm. *Marine Biology* 131: 153-162.
141. Santas R., Korda A., Lianou Ch., Santas Ph. (1998). Community response to UV radiation. I. Enhanced UVB effects on biomass and community structure of filamentous algal assemblages growing in a coral reef mesocosm. *Marine Biology* 131:153-162.
142. Santas R., Korda A., Tenente A., Buchholz K. And Santas Ph. (1999). Mesocosm assays of oil spill bioremediation with oleophilic fertilizers: Inipol, F1 or Both? *Marine Pollution Bulletin* 38(1): 44-48.
143. Sar N., Rosenberg E. (1983). Emulsan production by *Acinetobacter calcoaceticus* strains. *Curr. Microbiol.* 9: 309-314.
144. Sarnelle O. (1999). Zooplankton effects on vertical particulate flux: testable models and experimental results. *Limnology and Oceanography* 44: 357-370.
145. Schafer H., Bernad L., Courties C., Lebaron P., Servais P., Pukall R., Stackebrandt E., Troussellier M., Guindulain T., Vives-Rego J., Muyzer G. (2001). Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiology Ecology* 34: 243-253.

146. Schafer H., Bernard L., Courties C., et al. (2001). Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiology Ecology* 34, 243-253.
147. Schindler D. W. (1987). Detecting ecosystem responses to antropogenic strss. *Can. J. Fish Aquat. Sci* 44(Suppl. 1): 6-25.
148. Schindler D.W. (1998). Replication versus realism: The need for ecosystem-scale experimentas. *Ecosystems* 1: 323-334.
149. Shepherd R., Rockey J., Sutherland I. W., Roller S. (1995). Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. *J. Biotechnol.* 40: 207-217.
150. Sonderkamp S., Vomberg A., Schmitz C., Fabbender U., Kliner U. (2001). Intercations between bacterial populations during degradation of a lubricant base oil. *FEMS Micrbiology Ecology* 38: 97-104.
151. Southam G., Whitney M., Knickerbocker C. (2001). Structural characterization of the hydrocarbon degrading bacteria-oil interface: implications for bioremediation. *International Bioremediation e Biodegradations*, 47: 197-201.
152. Strickland J. D., Parsons T. R.. (1972). A practical handbook of seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Board Can.* 167: 310.
153. Swannel R. P., Lee K., McDonagh M. (1996). Field evalutation of oil spill bioremediation. *Microbiological Reviews.* 60(2): 342-365.
154. Swannell R.P.J., Lee K. and Mcdonagh, M. (1996) Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiological Reviews*, 60(2):342-365.
155. Takeuchi K., Sugimori M., Furukawa S. Fujioka Y. And Ishizaka (2000).Impacts of CO2 on microbial communities in a mesocosm experiment. E3-5
156. Teske A., Hinrichs K., Edgcomb V., de Vera Gomez A., Kysela D., Sylva S. P., Sogin M. L., Jannasch H. W. (2002). Microbial diversity of hydrothermal sediment in the sediments in the Guayamas Basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4): 1994-2007.
157. Tezuka Y.1990. Bacterial rgeneration of ammonium and phosphate as affected by carbon:nitrogen:phosphorus ratio of organic substrates. *Microb. Ecol.* 19: 227-238.
158. Toren A., Navon-Venezia S., Ron E.Z., Rosenberg, E. (2001). Emulsifying activities of purified alasan proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1102-1106.

159. Tortell P.D., Maldonado M.T. and Price N.D. 1996. The role of heterotrophic bacteria in iron-limited ocean ecosystems. *Nature*, 383: 330-332.
160. Touratier F., Field J.G. and Moloney C.L. 2001. A stoichiometric model relating growth substrate quality (C:N:P ratios) to N:P ratios in the products of heterotrophic release and excretion. *Ecol. Model.* 139: 265-291.
161. Vallino J. J. (1999). Improving marine ecosystem models: use of data assimilation and mesocosm experiments. *Journal Marine Research*.
162. Vallino J. J. (1999). Improving marine ecosystem models: use of data assimilation and mesocosm experiments. Submitted a *Journal of Marine Research*.
163. Van Dyke, M.I., Couture P., Brauer, M., Lee H., Trevors, T. J. (1993). *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Canadian Journal Microbiology*. 39: 1071-1078.
164. Velimirov B., Walenta-Simon M. (1992). Seasonal changes in specific growth rates, production and biomass of a bacterial community in the water column above a Mediterranean seagrass system. *Marine Ecology Progress Series*. 80: 237-248.
165. Venosa A. D., Suidan M. T., Wrenn B. A., Strohmeier K. L., Haines J. R. Eberhart B. L., King, D.W., and Holder E. (1996) Bioremediation of experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. *Environmental Science and Technology*, 30: 1764-1775.
166. Venosa A.D. (1998) Oil spill bioremediation on coastal shorelines: a critique. In: S.K. Sikdar & R.I. Irvine(Eds.), *Bioremediation: Principles and Practice*. Vol. III. *Bioremediation Technologies*. Technomic, Lancaster, PA, pp259-301.
167. Vogel H. J. e Bonner D. M. (1956). Acetylornithase of *Escherichia coli*: partial purification nad some properties. *J. Biol. Chem.* 218, 97-106.
168. Volkering F., Breure A. M., Rulkens W. H. (1997). Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation*. 8: 401-417.
169. Volkering F., Breure A.M., van Andel, J.G. Rulkens, W. H. (1995). Influence of nonionic surfactants on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1699-1705.
170. Wagner-Dobler I., Pipke R., Timmis K. N., Dwyer D. F., (1992). Evaluation of Aquatic sediment microcosms and their use in assessing possible effects of introduced microorganisms on ecosystem parameters. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(4): 1249-1258.

171. Wang Z., Li K., Fingas M., Sigouin L., Menard L. (2002). Characterisation and source identification of hydrocarbon in water samples using multiple analytical techniques. *Journal of Chromatography A*. 971, 173-184.
172. Wichels A., Biel S. S., Gelderblom H. R., Brinkhoff T., Muyzer G., Scutt C. (1998). Bacterio-phage diversity in the north sea. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(11): 4128-4133.
173. Wihelm S. W. , Suttle C. A. (1999). Viruses as regulators of nutrient cycles in aquatic environments. *Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceeding of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*.
174. Wihelm S. W., Brigden S. M., Suttle C. A. (2001). A dilution technique for the direct measurement of viral production: a comparison in stratified and tidally mixed coastal waters. *Microbial Ecology* 43: 168-173.
175. Willumsen P. A., Karlson U., Pritchard P. H. (1998). Response of fluoranthene-degrading bacteria to surfactant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 475-482.
176. Yakimov M. M., Fredrickson H. L., Timmis K. N. (1996). Effect of heterogeneity of hydrophobic moieties on surface activity of lichenysin A, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus licheminiiformis* BAS50. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 23: 13-18.
177. Yakimov M. M., Gentile G., Bruni V., Cappello S., D'Auria G., Golyshin P.N., Giuliano L. (2004). Crude oil-induced structural shift of coastal bacterial communities of Rod Bay (Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica) and characterization of cultured cold-adapted hydrocarbonoclastic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 49(3): 419-432.
178. Yakimov M. M., Giuliano L., Bruni V., Scarfi S. e Golyshin, P.N. (1999). Characterization of Antarctic hydrocarbon-degrading bacteria capable of producing bioemulsifiers. *New Microbiol.* 22: 249–256.
179. Yakimov M. M., Giuliano L., Crisafi E., Chernikova T.N., Timmis, K.N., Golyshin P. N. (2002). Microbial community of a saline mud volcano at San Biagio-Belpasso, Mt. Etna (Italy). *Environmental Microbiology* 4(5): 249-256.
180. Yakimov M. M., Giuliano L., Denaro R., Crisafi E., Chernikova T.N., Abraham W.-R., Leunsdorf H., Timmis K.N. e Golyshin, P.N. (2003) *Thalassolituus oleivorans* gen. nov. sp. nov., a marine bacterium confined to the utilization of hydrocarbons. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 141–148.
181. Yakimov M. M., Giuliano L., Timmis K. N., Golyshin P.N. (2001). Upstream-independent ribosomal RNA amplification analysis (URA): a new approach to characterizing the diversity of natural microbial communities. *Environmental Microbiology* 3(10): 662-666.

182. Yakimov M. M., Golyshin P. N., Lang S., Moore E.R.B., Abraham W.R., Lunsdorf, H. e Timmis K.N. (1998). *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbondegrading and surfactant-producing marine bacterium. Int. J.Syst. Bacteriol. 48: 339–348.
183. Zhu X., Venosa A. D., Suidan M. T. and Lee Kenneth (2001). Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater wetland. U.S. Environmental Protection Agency - Office of Research and Development National Risk - Management Research Laboratory Land remediation and Pollution Control Division.
184. Zuckerberg A., Diver A., Peeri Z., Gutnick D. L., Rosenberg E. (1979). Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: chemical and physical properties. Appl. Environ. Microbiol. 37: 414-420.

