



Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

Corso di Laurea in Biologia

Curriculum Biologia Generale

Elaborato di Laurea

**LA RISPOSTA ALL'IMPATTO ANTROPICO
DELLE COMUNITÀ MICROBICHE IDROCARBURO
DEGRADANTI IN AMBIENTE MARINO: IL CASO DI
DEEPWATER HORIZON**

*A response at the human impact of deep-sea hydrocarbon
degrading bacteria: the case of Deepwater Horizon*

TUTOR: Dott. Lorenzo Zane
Dipartimento di Biologia-Padova

LAUREANDA: Cinzia Calma

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1 <u>Impatto della contaminazione da idrocarburi in ambiente marino</u>	5
1.2 <u>Maree nere: immissioni accidentali in mare di petrolio o derivati</u>	6
1.3 <u>Il disastro ambientale causato da Deepwater Horizon</u>	7

2. IL LAVORO "DEEP-SEA OIL PLUME ENRICHES INDIGENOUS OIL-DEGRADING BACTERIA" (HAZEN et al., 2010)

2.1 <u>Area di studio e metodo di campionamento</u>	9
2.2 <u>PhyloChip</u>	13
2.3 <u>GeoChip</u>	15

3. CONCLUSIONI

4. BIBLIOGRAFIA ed altre fonti	18
---------------------------------------	-----------

1. INTRODUZIONE

I microrganismi rappresentano una componente biologica importante dell'ambiente marino (DeLong & Karl, 2005). Le comunità di eubatteri, archeobatteri, protisti e funghi unicellulari sono una componente essenziale dell'ecosistema, in quanto responsabili del 98% della produzione primaria, e sono catalizzatori di molti cicli biogeochimici (Whitman *et al.*, 1998). L'oceano intero è un sistema integrato in cui le trasformazioni energetiche sono regolate da processi fisici, chimici e biotici interdipendenti (DeLong, 2005). Se da un lato la maggior parte dei principi chimici e fisici è ormai nota, solamente ora si stanno mettendo a punto degli approcci molecolari che permettono una caratterizzazione accurata della diversità biologica presente a livello di microrganismi ed una descrizione dei processi biologici sostenuti dalla comunità batterica. Infatti, al fine di una migliore comprensione del funzionamento dell'ecosistema marino, fondamentale nelle sue interazioni con l'atmosfera per la regolazione del clima mondiale (Azam *et al.*, 2004), è necessario avere la stima dell'abbondanza microbica, della sua diversità, delle sue dinamiche e della loro influenza sulla chimica oceanica.

Tra i processi biologici attuati dalla comunità microbica, sono di particolare interesse quelli legati alla degradazione di sostanze di origine antropica, tra cui gli idrocarburi.

1.1 Impatto della contaminazione da idrocarburi in ambiente marino

Uno sversamento accidentale di petrolio nel mare può alterare l'ecosistema, con un impatto legato alla velocità di degradazione e di dispersione che dipende da molti fattori come il tipo di idrocarburi, il clima, il tipo di ambiente (USFWS, 1998). I danni sono dati soprattutto dal comportamento della sostanza contaminante una volta sversatasi: il petrolio avendo un peso specifico minore dell'acqua, si sparge sulla superficie del mare a contatto con l'aria, formando una sottile pellicola che cambia di spessore e di composizione a seconda della temperatura e del movimento del mare. All'evaporazione si aggiungono vari processi quali emulsione, aerosol, fotossidazione, che portano alla formazione di masserelle di catrame che galleggiando arrivano presso la costa fino alle spiagge. In questo modo oltre agli evidenti danni per fenomeni fisici e tossici diretti sulla macrofauna, si instaurano processi di anaerobiosi che uccidono il plancton. La successiva precipitazione delle masserelle sul fondale replica l'effetto sugli organismi bentonici. Contemporaneamente a questo, avviene un'evaporazione della porzione più volatile dei composti tossici e un'azione di biodegradazione degli idrocarburi da parte dei microrganismi marini (Kostka *et al.*, 2011).

La bonifica dell'ambiente contaminato può richiedere mesi o anni, e ciò va a ripercuotersi oltre che sulla comunità biologica marina, anche sulla salute della popolazione umana, ad esempio con un potenziale rischio d'incremento di malattie respiratorie e patologie da contatto con i contaminanti nelle aree costiere inquinate (Solomon *et al.*, 2010) e con effetto negativo sulle attività legate all'industria ittica (Kerr *et al.*, 2010).

1.2 Maree nere: immissioni accidentali in mare di petrolio o derivati

Le vie attraverso le quali gli idrocarburi raggiungono il mare, sono le più svariate ed il loro indicativo apporto percentuale è riportato nel grafico a torta seguente (Figura 1) :

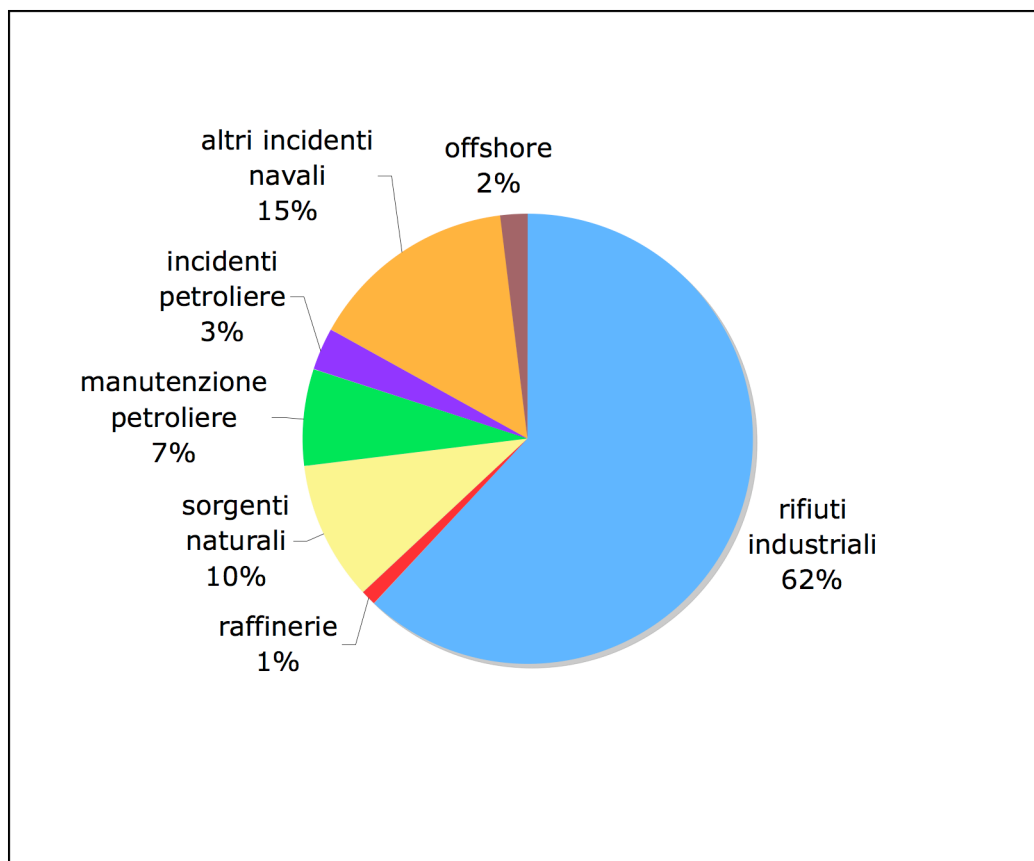


Figura 1 - Sorgenti di sversamento accidentale di petrolio, (UN Environmental programme, 1990) modificato

I dati estratti da questo grafico misurano, per ogni fattore accidentale, la percentuale di petrolio sversato in mare all'anno. Gli scarichi in mare di petrolio dalle navi costituiscono la causa più documentata delle "maree nere". Le altre possibili origini possono essere: incidenti in operazioni di perforazione off-shore, oleodotti marini e fluviali, raffinerie, rifiuti industriali e trasudamento naturale. Sebbene le fonti di sversamenti offshore e gli incidenti alle petroliere (in figura rappresentano il 2% ed il 3% rispettivamente) sembrano poco importanti, in casi particolari possono incidere in modo molto elevato. In tabella 1 sono riportati i maggiori incidenti petroliferi in ambiente acquatico degli ultimi anni, che hanno provocato danni a delicati ecosistemi come quello delle Galapagos avvenuto con l'incidente del 2001 della petroliera Jessica. Per quanto riguarda i disastri offshore il più recente ed importante è avvenuto nel Golfo del Messico nell'aprile del 2010 presso la piattaforma di estrazione petrolifera Deepwater Horizon. Tale incidente è avvenuto in un'area che fornisce il 30% della produzione di greggio degli USA ed è quindi oggetto di intensa attività di estrazione. Si stima che i fondali del

Golfo del Messico possano contenere circa 45 miliardi di barili di greggio, che rappresentano quindi una risorsa economica molto interessante ma difficilmente raggiungibile a causa delle elevate profondità. Lo sfruttamento dei fondali del Golfo del Messico oltre i 300 metri di profondità rappresenta un'attività relativamente nuova per l'industria petrolifera, che solo in tempi recenti ha avuto a disposizione le tecnologie necessarie per perforare i fondali a livello abissale, come nel caso della Deepwater Horizon che, nel 2010, trivellò il pozzo di idrocarburi più profondo al mondo, lungo 10.685 metri, su un fondale profondo 400 metri (Camilli *et al.*, 2010).

Tabella 1. Maggiori disastri petroliferi prima del 2010, CEDRE

Anno	Dove	Tipo di incidente	Quantità di petrolio riversato (in tonnellate)
1983	Golfo Persico (Nowruz)	Collisione e bombardamento nave cisterna	260,000
1988	Canada (Nova Scotia)	Esplosione nave cisterna	132,000
1989	Golfo dell'Alaska	Collisione della petroliera Exxon Valdez	38,500
1993	Isole Shetland	Collisione della petroliera Braer	84,500
1996	Galles, Regno Unito	Collisione della petroliera Sea Empress	73,000
2001	Isole Galapagos	Collisione della petroliera Jessica	600

1.3 Il disastro ambientale causato da Deepwater Horizon

Molte delle più famose perdite di petrolio della storia sono state frutto di incidenti avvenuti alle petroliere, caratterizzati dal rilascio di petrolio sulla superficie dell'acqua. Al contrario, nel disastro del 2010, la perdita che avvenne fu a circa 400 metri di profondità, dove la pressione è molto forte.

Deepwater Horizon era un impianto di perforazione (piattaforma petrolifera), costruito nel 2001 a posizionamento dinamico (necessario per poter operare nelle acque burrascose del Golfo del Messico), semi-sommerso, adatto per pozzi di petrolio in profondità, ed in grado di spostarsi da un luogo all'altro, se necessario. L'incidente avvenne il 20 aprile 2010 a causa di un'esplosione e di un incendio che causò l'affondamento della Deepwater Horizon che, dopo 2 giorni, trascinò in profondità il tubo perforatore e causandone la rottura in più punti.

E' stato reputato il più grande sversamento accidentale di petrolio in mare della storia, poichè il giacimento emetteva, al momento della trivellazione, 62000 barili di greggio al giorno (Camilli *et al.*, 2010).

Inizialmente per risolvere il problema, la British Petroleum, società proprietaria della piattaforma, utilizzò diversi tipi di solventi, tra cui l'agente disperdente Corexit 9500, contestato per la tossicità. Per mitigare invece l'importante perdita di petrolio e gas che fuoriuscivano dal giacimento a 1500 metri di profondità, furono pompate centinaia di migliaia di litri di agenti chimici disperdenti direttamente all'interno del pozzo MC252, contribuendo così alla formazione di nubi di petrolio (Hazen *et al.*, 2010). In un'intervista, l'oceanografo Ian MacDonald della Florida State University dichiarò che: «C'è un'enorme quantità di sostanze altamente tossiche nelle colonne d'acqua, sia sopra che sotto la superficie» e dimostrò preoccupazione per il volume stesso di petrolio fuoriuscito, il quale potenzialmente poteva causare un forte impatto sulla fauna marina del Golfo, dallo zooplancton ai capodogli (Bourne, 2010).

Ben otto parchi nazionali degli Stati Uniti furono compromessi (Than, 2010). Furono messe a rischio più di 400 specie presenti nelle isole del Golfo e nelle paludi, tra cui la tartaruga Ridley Kemp (*Lepidochelys kempii*) già in via di estinzione, la tartaruga verde (*Chelonia mydas*), la tartaruga embricata (*Eretmochelys imbricata*) e la tartaruga liuto (*Dermochelys coriacea*). I rifugi nazionali più in difficoltà, contavano circa 34000 uccelli, tra cui gabbiani, pellicani, spatole rosa, aironi, sternidi, aironi blu. Per fare una sorta di inventario delle specie viventi nell'area contaminata dalla fuoriuscita di petrolio, erano presenti più di 1200 specie di pesci, 200 di uccelli, 1400 di molluschi, 1500 crostacei, 4 di tartarughe marine, e 29 di mammiferi marini.

A partire da novembre 2010, vennero raccolti 6814 animali morti, tra uccelli, tartarughe marine, delfini e altri mammiferi (U.S. Fish & Wildlife Service, 2010). Steve Ross, ricercatore dell'UNC-Wilmington affermò che le barriere coralline rischiavano d'essere soffocate dato che a profondità tra i 900 e i 1200 metri, alcuni batteri sono in grado di assimilare petrolio e metano, ma nel farlo privano l'acqua dell'ossigeno necessario ai coralli.

Arrivati al giugno 2011, Harry Roberts, professore alla Louisiana State University, dichiarò che 4 milioni di barili di petrolio sarebbero sufficienti a "cancellare la vita dei fondali marini, nei pressi della perdita e in altre parti del Golfo e lungo centinaia di chilometri di costa". In una dichiarazione al National Geographic, Mak Saito, scienziato associato alla Woods Hole Oceanographic Institution del Massachusetts indicò che una tale quantità di petrolio poteva alterare la chimica del mare, con risultati imprevedibili (Henderson, 2010).

In conclusione quello della Deepwater Horizon è stato uno dei più recenti sversamenti di petrolio in mare, e per la sua grandezza rappresenta una sorta di "esperimento involontario" in ambiente naturale permettendo, in questo modo, lo studio dell'impatto a livello ambientale e dei processi batterici legati alla degradazione degli idrocarburi da parte della comunità microbica marina indigena. Su questo aspetto si concentra il lavoro tempestivo del team di Terry C. Hazen "Deep-Sea Oil Plume Enriches Indigenous Oil-Degrading Bacteria" del 2010 su cui la mia tesi verte.

2. IL LAVORO "DEEP-SEA OIL PLUME ENRICHES INDIGENOUS OIL-DEGRADING BACTERIA" (HAZEN *ET AL.*, 2010)

Le comunità batteriche presenti nell'ambiente marino contaminato da petrolio, come appunto nel caso dello sversamento nel Golfo del Messico, possono essere studiate mediante tecniche molecolari. Ad esempio, alcune analisi condotte per il biorisanamento delle acque marine hanno dimostrato che i tipi di rDNA 16S risultati appartenere alla sottoclasse γ -Proteobacteria, sono abbondanti sulla sabbia inquinata e la loro crescita in acqua marina è molto più sviluppata nel caso in cui siano aggiunti "nutrienti" quali petrolio e prodotti inorganici (Chang *et al.*, 2000). Quindi una strategia opzionale per la bonifica delle acque contaminate è usare l'intrinseco potenziale di biorisanamento dei microrganismi idrocarburoclastici. Questa strategia dipende da una serie di fattori ambientali, da una risposta favorevole dei microrganismi autoctoni ad un aumento della concentrazione di idrocarburi e/o disperdenti (Hazen *et al.*, 2010). Nel lavoro di Hazen *et al.* (2010) sono state utilizzate diverse tecniche molecolari per caratterizzare la comunità batterica presente a livello di campioni di acque inquinate o meno dagli idrocarburi sversati nell'incidente.

2.1 Area di studio e metodo di campionamento

Sono state analizzate le caratteristiche fisiche, chimiche e microbiologiche di diversi campioni provenienti da siti del Golfo del Messico interessati o meno dalla presenza della presenza di idrocarburi (Figura 2).



Figura 2. Mappa dei siti di campionamento Si può notare il punto dell'esplosione denominato MC252 (Macondo), ad una distanza di circa 66 km dalla costa della Louisiana; in giallo sono indicati i siti dove si sono raccolti campioni arricchiti da idrocarburi (BM053, BM054, BM057, BM058) ed in rosso quelli non contaminati (tratto da Hazen *et al.*, 2010 modificata).

I campioni sono stati prelevati nell'intervallo di tempo che va dal 25 maggio 2010 (quindi circa un mese dopo l'incidente) al 2 giugno 2010, a diverse profondità. I campionamenti di acque profonde sono stati possibili grazie all'utilizzo di bottiglie Niskin legate ad una rosetta, un apparato che monta più bottiglie di

prelievo su un unico castello metallico attaccato ad un cavo d'acciaio e collegato ad un verricello. Le bottiglie Niskin possono essere chiuse alla profondità voluta con un comando trasmesso attraverso un cavo di controllo (Figura 3), permettendo successive analisi dell'acqua prelevata e dei microrganismi presenti. Nello specifico, per ogni prelievo, un volume di acqua variabile da 800 a 2000 ml è stato filtrato attraverso una membrana da 0.22 μm ; i filtri sono stati immediatamente congelati e conservati per le analisi del DNA e per l'identificazione dei fosfolipidi presenti. Inoltre, una parte dell'acqua prelevata è stata conservata mediante aggiunta di formaldeide e successivamente usata per il conteggio diretto delle cellule presenti e per la microscopia a scansione.

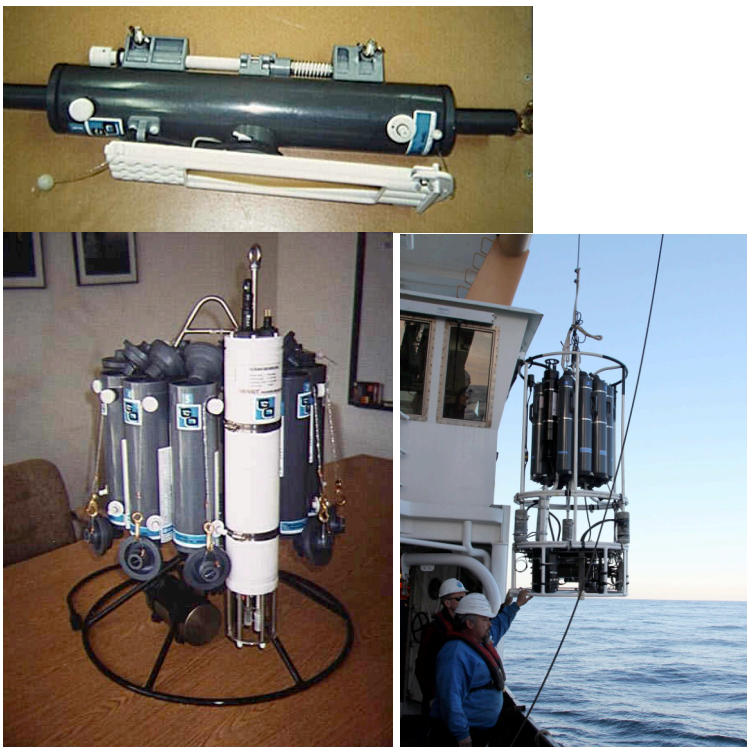


Figura 3. Esempio di bottiglia Niskin (in alto), e rosetta CTD con bottiglie Niskin. (NEFSC, 2010)

Sulla rosetta era stato montato un CTD (Sonda di Conducibilità, Temperatura, Profondità), per trasmettere in "tempo reale" all'unità di superficie i dati rilevati lungo il profilo verticale. Il CTD inoltre aveva un sensore per il rilevamento dell'ossigeno disciolto e un fluorimetro per il rilevamento della materia organica disciolta in grado di individuare la presenza di idrocarburi.

Grazie a questo apparato sperimentale è stato possibile identificare i campioni inquinati, provenienti o meno dal *plume* di idrocarburi. In idrogeologia, il *plume*, detto anche pennacchio, è quella parte di un acquifero sotterraneo che in una situazione di contaminazione da sostanze pericolose trasporta le sostanze contaminanti. Nello specifico il *plume* è stato rilevato in campioni prelevati ad una profondità di raccolta che variava da 1099 a 1219 m e ad una distanza massima di 10 km dal pozzo principale.

In figura 4 sono riportati degli esempi dei profili di fluorescenza, in rapporto alla profondità, di 4 campioni (BM053, BM057, BM058 e BM061) ed è evidente come si noti un incremento di fluorescenza, legato alla presenza del *plume*, nei

primi tre campioni e non in BM061. E' inoltre possibile notare come per i campioni BM057 e BM058, si è rilevata una maggiore densità cellulare proprio in corrispondenza dei valori elevati di fluorescenza, che potrebbe indicare un arricchimento in batteri coinvolti nella degradazione degli idrocarburi. Inoltre un'ulteriore confronto tra la misurazione della saturazione di ossigeno e la densità cellulare ha mostrato che nei campioni BM057 e BM058 si rileva una diminuzione della concentrazione di ossigeno proprio in corrispondenza delle profondità interessate dal *plume*. Questo andamento si osserva nella maggioranza dei campioni di acque contaminate provenienti dai diversi siti; infatti, mediamente la saturazione di ossigeno all'interno del plume era di 59% mentre al di fuori era del 67%, con un andamento indicativo della presenza di respirazione microbica.

Questo consumo di ossigeno suggerì come da aspettativa che gli idrocarburi fossero catabolizzati. L'incremento di fluorescenza nell'intervallo di profondità che comprende i 1000-1200 m indica la presenza di idrocarburi nei campioni prelevati dai plumen (BM053, BM057, BM058), come infatti conferma il campione di controllo BM061 con la totale mancanza di dati rilevanti. Gli autori hanno inoltre riportato che la densità cellulare misurata all'interno dei campioni dei plumen era di $5,51 \pm 0,33 \times 10^4$ cell/ml, molto più elevata rispetto ai campioni al di fuori, dove è stata rilevata una densità di $2,73 \pm 0,05 \times 10^4$ cell/ml.

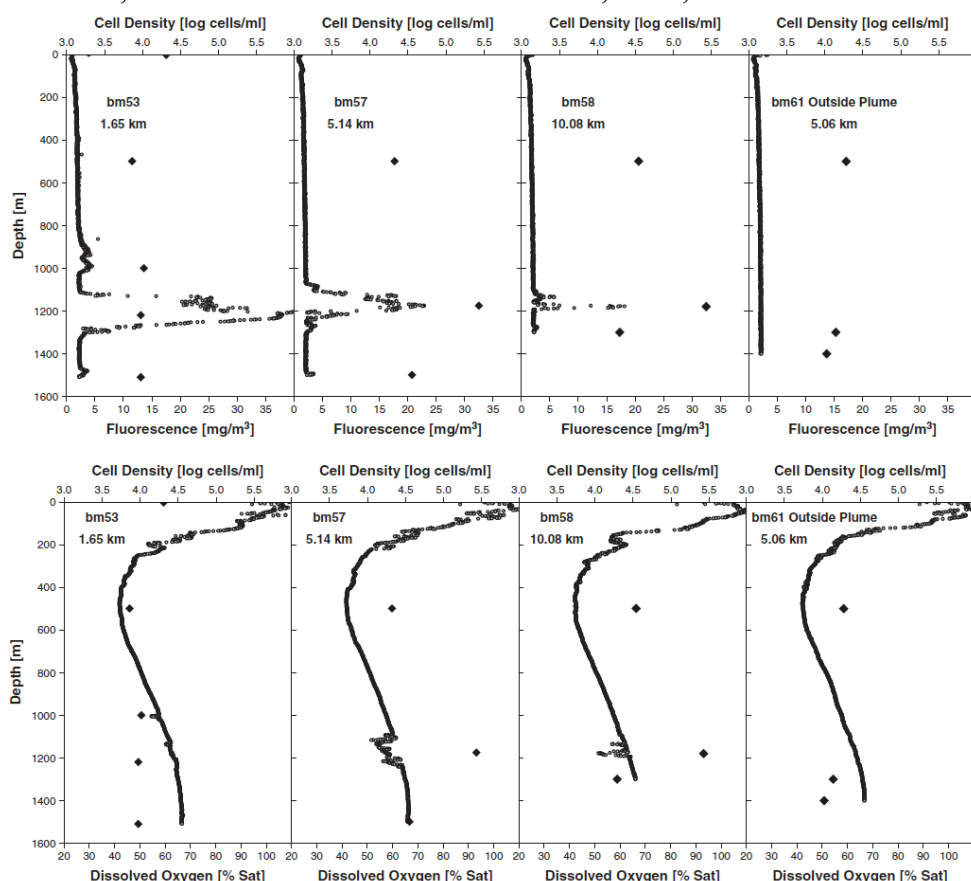


Figura 4. Fluorescenza ed ossigeno disciolto in relazione alla profondità, in tre siti a diverse distanze dalla sorgente (BM053, BM057, BM058) e su un campione di controllo (BM061). I rombi indicano la densità cellulare rilevata in corrispondenza di campioni d'acqua prelevati a diverse profondità.

Successivamente per confermare che il consumo di ossigeno fosse dovuto ad un aumento della densità cellulare della comunità batterica arricchita dalla presenza di idrocarburi a determinate profondità, si sono analizzate la natura e la distribuzione dei PLFA, *Phospholipids fatty acids*, i quali grazie alle loro diverse caratteristiche permettono di identificare i microrganismi da cui derivano.

L'analisi dei PLFA ha confermato un aumento della biomassa microbica in presenza del plume (0,57 lipidi pmol/ml) rispetto ai campioni esterni al plume (0,23 pmol/ml) quindi il risultato della fluorimetria è stato confermato dalla presenza di fosfolipidi. Tre tipi di acidi grassi in particolare sono risultati essere i lipidi caratteristici della membrana cellulare in *Oleispira antarctica* ed in alcuni ceppi di *Oceaniserpentilla haliolitis*, oltre che in batteri marini idrocarburoclastici.

Gli autori hanno esaminato ulteriori parametri fisico-chimici per confermare i risultati precedenti. Tra questi parametri, l'azoto ammoniacale, la cui quantità è diminuita nei campioni contaminati rispetto quelli di controllo. Per quanto riguarda i parametri biologici, l'analisi dei nutrienti indica la presenza di una forte quantità di idrocarburi volatili aromatici all'interno dei campioni del plume: gli idrocarburi estraibili (ad esempio l'ottadecano) misurati nei campioni con plume erano di 9,21µg/litro contro un "non rilevabile" dei campioni di controllo.

I campioni con idrocarburi dai siti BM058 e BM054, i quali distano dal pozzo MC252 circa 10,04 km e 1,3 km rispettivamente, sono stati sottoposti a filtrazione per ottenere materiale batterico per ulteriori analisi. Dopo esser state trattati con il colorante arancio di acridina in modo da rendere visibili le singole cellule, l'osservazione con microscopio elettronico a scansione ha permesso la visualizzazione degli organismi presenti nei campioni raccolti. Nei campioni contaminati, l'esame microscopico delle cellule estratte ha rivelato che il tipo di cellula dominante esibisce una particolare morfologia tipica della specie degli *Oceanospirillales* (Figura 5).

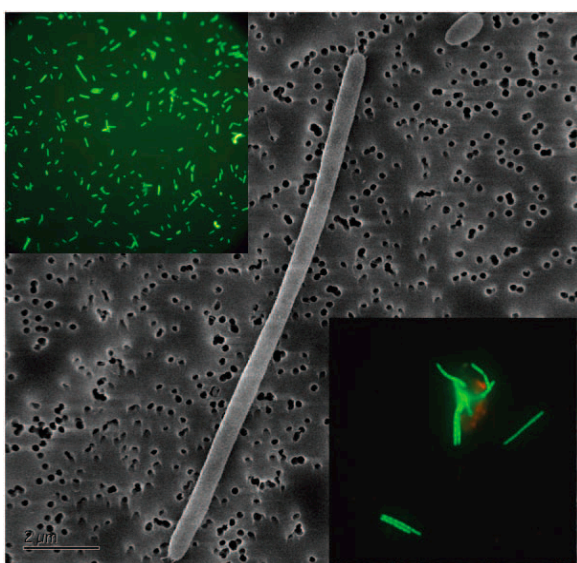


Figura 5. Morfologia dei batteri dominanti nei campioni prelevati da 1099 m a 1219 m; nei riquadri le colture colorate con arancio di acridina: in alto il campione BM058, in basso il campione BM054. (Hazen et al., 2010)

2.2 PhyloChip

Per cercare le sequenze geniche all'interno del campione d'acqua da analizzare, è stato utilizzato un microarray, Phylochip. Questo microarray è stato sviluppato per determinare e quantificare l'abbondanza di taxa di batteri e archeobatteri presenti in un campione tramite la ricerca di sequenze geniche dei 16S rRNA corrispondenti a quelle già note presenti all'interno delle sonde (Schatz *et al.*, 2010)

Essendo in grado di rilevare fino a 32.000 diverse sequenze di 16S rRNA ed avendo più livelli di controllo errori, è in grado di rilevare i batteri che non crescono in un metodo tradizionale di coltura batterica, che può essere fino al 99% dei batteri in un campione. Le analisi dimostrarono che v'era un aumento osservato nella densità cellulare dei campioni contaminati, e che in questi campioni erano notevolmente modificate sia la composizione genica della comunità microbica che la sua struttura. Sono stati infatti identificati due diversi gruppi di campioni: uno composto interamente dai campioni presenti nei plume e l'altro dei campioni non contaminati (Figura 6).

In Figura 6 possiamo vedere le differenze di composizione delle sequenze geniche dei 16S rRNA misurate da PhyloChip (A) e quelle degli acidi grassi (B) analizzate con una matrice non metrica dimensionale (NMDS). Le comunità rilevate all'interno dei plumen erano significativamente differenti da quelle dei campioni di controllo: la distanza dei punti rappresenta la similarità dei campioni.

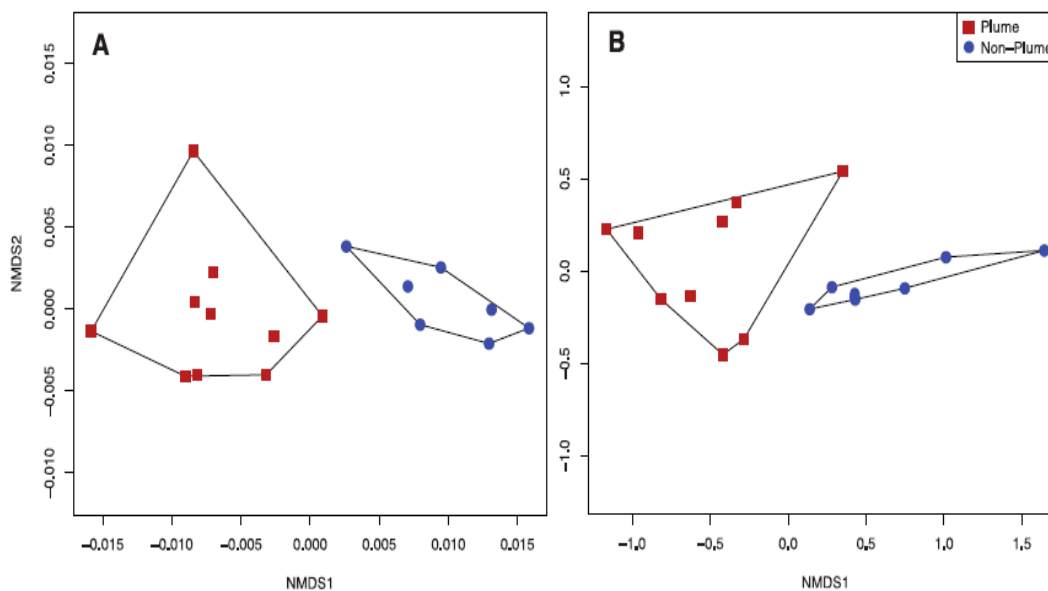


Figura 6. Analisi della comunità microbica delle acque profonde contaminate e nei campioni di controllo. Le distanze dei vari punti indicano le differenze misurate da PhyloChip nella composizione delle sequenze geniche dei 16S rRNA (A) e nei fosfolipidi grassi (B).

Nessun'altro fattore, fisico o chimico, era significativamente differente fra questi gruppi, indicando che i microrganismi stavano rispondendo direttamente alla presenza del petrolio sversato. Nei campioni arricchiti dal plume, l'analisi di PhyloChip rivelò che erano presenti 951 distinti taxa di batteri di 62 phyla, ma di questi, solo 16 taxa ben distinti e tutti classificati come γ -Proteobacteria, erano significativamente arricchiti nel plume rispetto ai campioni di controllo.

Di questi 16 taxa, quasi tutti hanno rappresentanti che degradano idrocarburi o sono stimolati dalla presenza di petrolio in ambienti freddi. Questi batteri arricchiti comprendono molte specie di psicofili e psicofili facoltativi che sono stati osservati in condizioni di basse temperature marine. Anche se la densità cellulare è maggiore all'interno dei campioni contaminati da petrolio, la ricchezza tassonomica era più bassa e la diversità dei batteri arricchiti è stata limitata a pochi γ -Proteobacteria.

Un'ulteriore analisi è stata svolta nei campioni d'acqua provenienti dal plume della stazione BM058 (~ 10,08 km dal giacimento principale MC252) e della stazione di OV011 (~ 1,5 km), attraverso il clonaggio del DNA presente nel campione, il sequenziamento e l'allineamento delle sequenze più interessanti. L'analisi ha evidenziato la presenza dell'ordine delle *Oceanospirillales* dei γ -Proteobacteria. Infatti più del 90% di tutte le sequenze di entrambi i campioni contaminati (tra le due stazioni di campionamento c'era una distanza di 10 km) apparteneva ad una singola unità tassonomica operativa (OTU), che è strettamente correlata agli *Oceanospirillales*. In un campione di controllo (il sito OV003) raccolto a 39,1 km a sud ovest dal giacimento, questa stessa OTU rappresentava solo il 5% di tutte le sequenze analizzate. Inoltre, questo taxon è stato rilevato in tutti i 10 campioni d'acqua contaminata analizzati da PhyloChip ed è risultato significativamente arricchito rispetto ai campioni non contaminati. Le colture più strettamente connesse con l' OTU dei campioni contaminati erano *Spongiispira norvegica* (simile al 95%) e *Oceaniserpentilla haliotidis* (94%) (Figura 7). Le sequenze osservate nei campioni contaminati formano un clade con due distinti gruppi di *Oceanospirillales*. Uno di questi gruppi è composto per la maggior parte da noti psicofili degradatori d'idrocarburi e da microrganismi tipici d'ambiente contaminato dagli idrocarburi, tra cui *Oleispira antarctica*, *Thalassolituus oleivorans* e *Oleiphilus messinensis*.

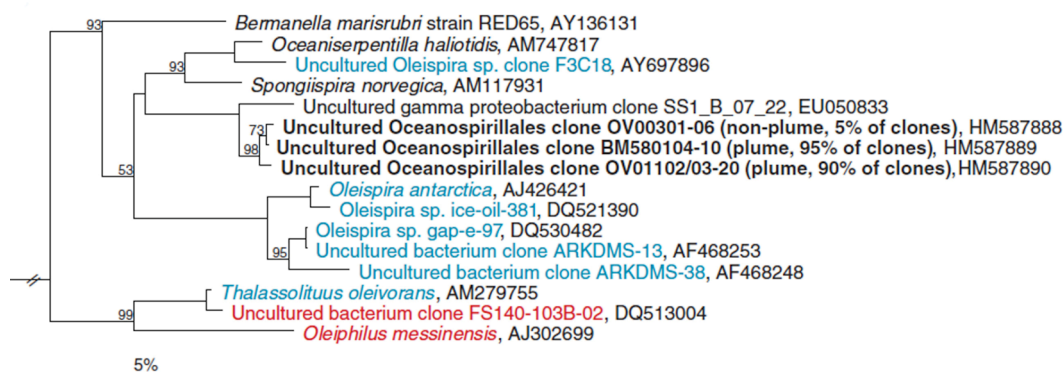


Figura 7. Albero filogenetico con le relazioni tra i batteri dominanti nei campioni raccolti nei plume. L'abbondanza va dal 90 al 95% nei campioni contaminati e del 5%

nei campioni di controllo (nelle parentesi). In grassetto i campioni analizzati. Psicrofili, batteri idrocarburoclastici d'ambienti freddi sono titolati in blu. I degradatori noti o batteri dominanti degli ecosistemi ricchi di idrocarburi, ma non appartenenti ad ambienti di basse temperature, in rosso. Il numero di cambiamenti di caratteri che intercorrono fra le ramificazioni è indicato a livello del nodo. Per ogni OTU è indicato il codice di riconoscimento di GenBank.

2.3 GeoChip

Per capire la distribuzione dei geni all'interno dei campioni contaminati dal petrolio, sono stati analizzati cinque campioni (BM053, BM054, BM057, BM058, BM064) provenienti dal sito del pozzo principale MC252, e come riscontro altri cinque campioni di controllo incontaminati (OV003, OV004, OV009, OV013 e OV014) con l'utilizzo di GeoChip. Questo è il primo microarray completo attualmente disponibile per lo studio dei processi biogeochimici e delle attività funzionali delle comunità microbiche importanti per la salute umana, agricoltura, energia, cambiamento climatico globale, la gestione degli ecosistemi, e di pulizia e ripristino ambientale (Zhili *et al.*, 2007).

E' stato sviluppato con successo per il monitoraggio delle dinamiche dei batteri metallo-riduttori e per le comunità ad esse associate, per uno studio in situ sul biorisanamento. È particolarmente utile per fornire collegamenti diretti tra geni microbici/popolazioni. Contiene 410 categorie di geni funzionali per i differenti processi microbici e biogeochimici inclusi i cicli del carbonio, azoto, fosforo, zolfo e processi di energia, ossidoriduzione di metalli, degradazione dei contaminanti organici, resistenza agli antibiotici, fagi, ed importanti agenti patogeni umani. GeoChip rilevò per ogni campione dai 4000 ai 5000 geni funzionali, tra i quali 1.652 geni coinvolti nella degradazione d'idrocarburi. L'analisi delle corrispondenze ha mostrato che la composizione e la struttura funzionale della comunità microbica era notevolmente differente dai campioni contaminati a quelli di controllo, il che è coerente con l'analisi di PhyloChip. Molti dei geni coinvolti nella degradazione degli idrocarburi erano significativamente aumentati nei campioni contenenti petrolio.

L'analisi basata su singoli geni ha mostrato che i cambiamenti di molti geni degradatori sono significativamente correlati con le concentrazioni di contaminanti del petrolio. Per esempio, il gene *phdCI* che codifica la degradazione del naftalene si correla con diversi idrocarburi (tra isopropylbenzene, n-propilbenzene, terz-butylbenzene, 1,2,4-trimetilbenzene, p-isopropyltoluene, n-butylbenzene, e naftalene). Questi risultati indicavano che una varietà di popolazioni degradatrici era presente nei plumen e che le comunità microbiche sembravano essere in fase di rapido adattamento dinamico in risposta alla contaminazione del petrolio.

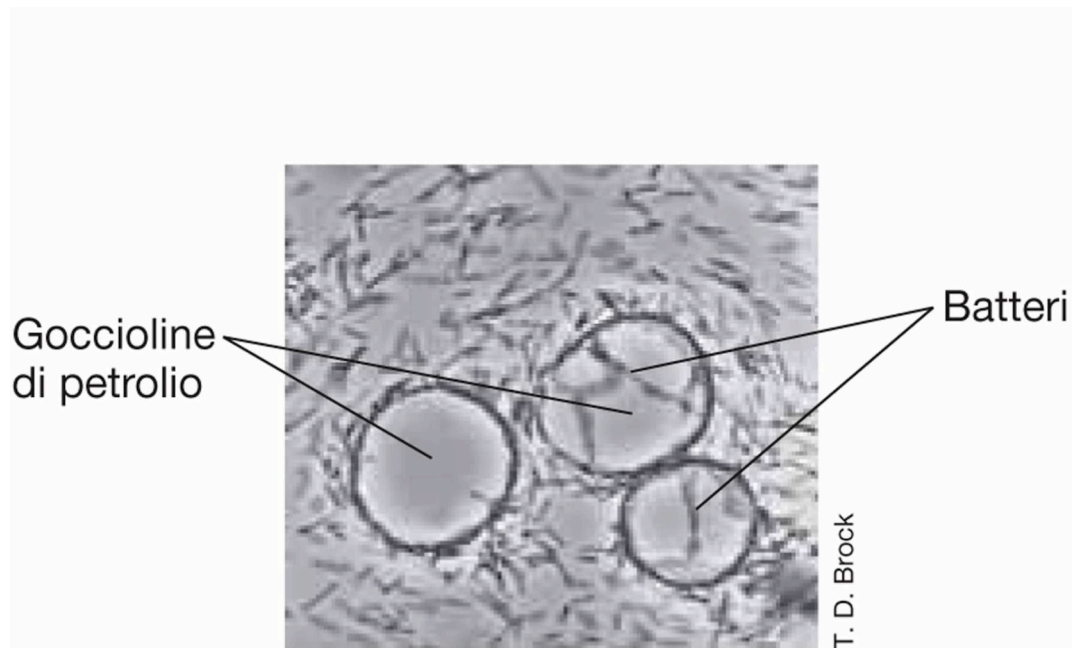


Figura 8: Il biorisanamento non è altro che l'accelerazione di processi naturali biodegradativi in ambienti contaminati mediante la disponibilità di condizioni e dei microrganismi prevalenti. Il greggio stimola la comunità batterica bic, batteri idrocarburoclastici, una sorta di squadra di "operatori ecologici": Alcanivorax, Oleiphilus, Thalassolitus e Oleispira sono alcuni esempi noti.

3. Conclusioni

Questi risultati implicano che esista un potenziale di biorisanamento intrinseco del petrolio sversatosi nella profondità del mare e che le comunità di batteri degradatori potrebbero svolgere un ruolo importante nel controllare la degradazione del petrolio sversato nel Golfo. Il potenziale di biorisanamento dipende in gran parte dai tassi di biodegradazione dei plumen. Le velocità di biodegradazione sono spiegate sulla base di diversi fattori che insieme contribuiscono alla rapidità dell'evento: dalla natura relativamente volatile degli idrocarburi (che contengono una grande componente evaporabile che si degrada facilmente), dal modo di disperdersi dei plumen in particelle piccolissime ad elevate profondità e dalla frequenza degli sversamenti o dalle episodiche infiltrazioni naturali che possono aver adattato durante un lungo intervallo di tempo la comunità microbica di questa zona.

Uno dei campi di applicazione delle tecniche del biorisanamento è il processo di recupero delle coste contaminate a causa degli sversamenti accidentali di petrolio in ambiente marino: si tratta dell'utilizzo di microrganismi o alghe capaci di degradare un determinato inquinante con pochi rischi di effetti secondari sugli ecosistemi terrestri o marini. In pratica il processo si basa sulle conoscenze delle diversità metaboliche delle comunità microbiche naturali: si utilizzano tecniche che stimolano alcuni batteri a produrre enzimi capaci di degradare gli idrocarburi di cui è composto il petrolio. I batteri usati nel biorisanamento sono detti batteri idrocarburoclastici (BIC) e sono batteri che si nutrono di petrolio utilizzandolo per i loro processi metabolici (figura 7).

Il biorisanamento offre molti vantaggi rispetto alle tecnologie chimico-fisiche, in particolar modo per il trattamento di contaminanti diluiti e sparsi su una vasta superficie (Boopathy, 2000). Una delle maggiori difficoltà è che il biorisanamento è condotto in ambienti naturali, i quali contengono molti organismi non ancora caratterizzati. Un altro impedimento consiste nel fatto dell'unicità degli eventi, poichè quasi mai avvengono in condizioni ambientali completamente identiche: solitamente, infatti, la tipologia e l'abbondanza di inquinanti, le circostanze climatiche e le dinamiche idrogeochimiche sono sempre diverse. In compenso, la conoscenza sulle comunità microbiche d'interesse per il biorisanamento aumentano in modo rapido grazie all'aiuto di metodi ecologici molecolari. Un elemento importante nella progettazione di organismi con nuove vie metaboliche sarebbe la creazione di una banca di geni codificanti enzimi utili a vasta specificità o di segmenti di vie metaboliche che possono essere combinate a piacimento per generare attività nuove o migliorate.

In questo contesto, lo studio della comunità microbica che si instaura in ambiente naturale nei campioni contaminati da idrocarburi, come quella svolta da Hazen e colleghi (2010), potrebbe rappresentare il primo passo per la caratterizzazione di ceppi batterici o di vie metaboliche di particolare interesse per il biorisanamento.

Bibliografia

- Azam F, Worden AZ (2004) *Microbes, Molecules, and Marine Ecosystems*, Science 303:1622-1624
- Bootpathy R (2000) *Factors limiting bioremediation technologies*, Bioresource Technology 74:63-67
- Camilli R, Reddy CM, Yoerger DR, Van Mooy BAS, Jakuba MV, Kinsey JC, McIntyre CP, Sylva SP, Maloney JV (2010) *Tracking Hydrocarbon Plume Transport and Biodegradation at Deepwater Horizon*, Science 330(6001):201-204
- Chang YJ, Stephen JR, Richter AP, Venosa AD, Brüggemann J, Macnaughton SJ, Kowalchuk GA, Haines JR, Kline E, White DC (2000) *Phylogenetic analysis of aerobic freshwater and marine enrichment cultures efficient in hydrocarbon degradation: effect of profiling method*, Journal of microbiological method 40(1):19-31
- DeLong EF (2005) *Microbial community genomics in the ocean*, Nature Review Microbiology 3:459-469.
- DeLong EF, Karl DM (2005) *Genomic perspectives in microbial oceanography*, Nature 437(15):336-342
- Dorigo U, Volatier L, Humbert J (2005) *Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities*, Water Research 39(11):2207-2218
- Hazen TC, Dubinsky EA, DeSantis TZ, Andersen GL, Piceno YM, Singh N, Jansson JK, Probst A, Borglin SE, Fortney JL, Stringfellow WT, Bill M, Conrad ME, Tom LM, Chavarria KL, Alusi TR, Lamendella R, Joyner DC, Spier C, Baelum J, Auer M, Zemla ML, Chakraborty R, Sonnenthal EL, D'haeseleer P, Holman HYN, Osman S, Lu Z, Van Nostrand JD, Deng Y, Zhou J, Mason OU (2010) *Deep-Sea Oil Plume Enriches Indigenous Oil-Degrading Bacteria*, Science 330(6001):204-208
- Kerr R, Kintisch E, Schenkman L, Stokstad E (2010) *Five Questions on the Spill*, Science 328(5981):962-963
- Kostka JE, Prakash O, Overholt WA, Green SJ, Freyer G, Canion A, Delgardio J, Norton N, Hazen TC, Huettel M (2011) *Hydrocarbon-Degrading Bacteria and the Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by the Deepwater Horizon Oil Spill*, Applied and Environmental Microbiology 77(22):7962-7974
- MacNaughton SJ, Stephen JR, Venosa AD, Davis GA, Chang YJ, White DC (1999) *Microbial population changes during bioremediation of an experimental*

oil spill, Applied and Environmental Microbiology 65(8):3566-3574

- Misko AL, Germida JJ (2002) **Taxonomic and functional diversity of Pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola**, FEMS Microbiology Ecology 42(3):399-407

- Shatz MC, Phillippy AM, Gajer P, DeSantis TZ, Andersen GL, Ravel J (2010) **Integrated microbial survey analysis of prokaryotic communities for the phylochip microarray**, Applied and Environmental microbiology 76(16):5636-5638

- Solomon GM, Janssen S (2010) **Health Effects of the Gulf Oil Spill**, Journal of the American Medical Association 304(10):1118-1119

- Whitman WB, Coleman DC, and Wiebe WJ (1998) **Prokaryotes: The unseen majority**, Proceedings of the National Academy of Science USA, 95(12):6578-6583

- Zhili H, Gentry TJ, Schadt CW, Wu L, Liebich J, Chong SC, Huang Z, Wu W, Gu B, Jardine P, Criddle C, Zhou J (2007) **Geochip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes**, International Society for Microbial Ecology, 1:67-77

Altre fonti utilizzate

- Biello D (2010) **The BP Spill's Growing Toll On the Sea Life of the Gulf**, <http://e360.yale.edu/content/feature.msp?id=2284>

- Bourne JK (2010) **Golfo nero: dilemma abissale**, National Geographic Italia http://www.nationalgeographic.it/dal-giornale/2010/10/08/news/golfo_nero-120178/

- CEDRE (Centre of Documentation, Research and Experimentation on Accidental Water Pollution) **Chronological classification**, <http://www.cedre.fr/en/spill/chronological-classification.php>

- Henderson B (2010) **Oil may harm sea life in N.C.**, News & Observer <http://www.newsobserver.com/2010/05/22/494596/oil-may-harm-sea-life-in-nc.html>

- NEFSC (The Northeast Fisheries Science Center) (2010) <http://nefsc.files.wordpress.com/2013/02/niskin-rosette-1-rd1.jpg>

- Than K (2010) **Eight National Parks Threatened by Oil Spill**, National Geographic <http://news.nationalgeographic.com/news/2010/06/photogalleries/100611-gulf-oil-spill-national-parks-environment-science-pictures/>

- USFWS (U.S. Fish & Wildlife Service) (1998) **Oil and Nature**, <http://www.fws.gov/contaminants/Documents/OilAndNature.pdf>

- USFWS (U.S. Fish & Wildlife Service) (2010) **Deepwater Horizon Response Consolidated Fish and Wildlife Collection Report**, <http://www.restorethegulf.gov/sites/default/files/documents/pdf/Consolidated%20Wildlife%20Table%20110210.pdf>

- UN Environmental programme (UNEP) (1990) **Source of oil pollution into the sea**, <http://oils.gpa.unep.org/facts/sources.htm>