

“Marcatori molecolari per la valutazione del potenziale genetico nel biorisanamento”

MARCATORI MOLECOLARI PER LA VALUTAZIONE DEL POTENZIALE GENETICO IN PROGETTI DI BIORISANAMENTO

Francesca Formicola¹, Silvia Leoci¹, Anna Espinoza¹, Valentina Rivelli¹, Tatiana Stella¹

¹M3R S.r.l., viale Ortles 22/4, 20139, Milano

** francesca.formicola@m3r.it*

** silvia.leoci@m3r.it*

Sommario. Oggigiorno, anche nell’ambito delle bonifiche, la tutela dell’ambiente ha acquisito sempre più importanza; infatti, nella scelta della tecnologia da applicare, è necessario considerare sia il raggiungimento degli obiettivi di bonifica, che il suo potenziale impatto sul contesto ambientale del sito.

Le strategie di bonifica biologica consentono, non solo di rimuovere la contaminazione, ma di ripristinare il sito al suo stato originario, riducendo l’impatto dell’intervento.

Per la loro applicazione è necessario determinare il potenziale biodegradativo della comunità autoctona della matrice contaminata e ciò risulta fondamentale nelle varie fasi del processo di bonifica. A tale scopo, l’approccio biomolecolare risulta il più efficace e in quest’ottica possono essere implementate due strategie analitiche complementari, una qualitativa (Next-Generation Sequencing - NGS) e una quantitativa (PCR quantitativa – qPCR). Entrambe le metodologie si basano sull’utilizzo di marcatori molecolari specifici che rendono questo approccio innovativo, versatile e adattabile alla moltitudine dei contaminanti ad oggi noti.

Per approfondire le modalità del loro utilizzo, sono presentati due casi studio.

Il primo caso riguarda la fase di caratterizzazione di un sito contaminato da idrocarburi alifatici, con focus sulla matrice terreni.

Il secondo caso è inerente alla fase di monitoraggio del processo di attenuazione naturale in acque sotterranee impattate da solventi clorurati.

BIORISANAMENTO

Il biorisanamento si basa sulla naturale capacità dei microrganismi di trasformare i contaminanti ambientali utilizzandoli come substrato di crescita e fonte di energia. Per la sua applicazione è quindi necessario determinare il potenziale biodegradativo della comunità autoctona della matrice contaminata, valutando la presenza di specifiche capacità metaboliche legate alla rimozione degli inquinanti. Questo è fondamentale in fase di caratterizzazione per la scelta della tecnica di bonifica sito-specifica più idonea e, durante il monitoraggio, per analizzare l'evoluzione delle condizioni microbiologiche del sito nel tempo, valutando l'efficacia dell'intervento selezionato.

A tale scopo, l'approccio biomolecolare risulta il più efficace; tramite l'utilizzo di tecniche innovative di biologia molecolare, infatti, è possibile descrivere la struttura della comunità microbica e le specifiche funzioni metaboliche. In quest'ottica, possono essere implementate due strategie analitiche complementari, una qualitativa e una quantitativa. L'analisi qualitativa più utilizzata è il sequenziamento dei marcatori tassonomici; grazie allo sviluppo di nuove tecniche di sequenziamento, come il Next-Generation Sequencing (NGS), è possibile individuare e classificare i gruppi microbici presenti nel campione ambientale e stimarne l'abbondanza relativa all'interno della comunità.

D'altra parte, la tecnica della PCR quantitativa (qPCR) consente la quantificazione assoluta di specifici geni tassonomici e catabolici che vengono utilizzati come biomarcatori di determinati gruppi microbici e/o metabolici.

Come evidenziato, entrambe le metodologie si basano sull'utilizzo di marcatori molecolari che possono essere selezionati in base alle caratteristiche chimico-fisiche del sito e della contaminazione. Questa versatilità fa sì che i biomarkers rappresentino uno strumento adattabile alla moltitudine dei contaminanti ad oggi noti, fornendo, quindi, un approccio innovativo al biorisanamento. Per approfondire le modalità di utilizzo, verranno presentati dei casi studio che mostrano l'applicazione di tali metodologie, a partire dalla selezione dei biomarkers sino alla descrizione e interpretazione dei risultati ottenuti, al fine di supportare l'attività di bonifica nelle sue diverse fasi.

CASI STUDIO

Per approfondire le modalità di utilizzo dei marcatori molecolari sono presentati, di seguito, due casi studio che mostrano l'applicazione di tali metodologie a partire dalla selezione dei biomarkers sino alla descrizione e interpretazione dei risultati ottenuti, al fine di supportare l'attività di bonifica nelle sue diverse fasi. In particolare, il primo caso studio riguarda l'applicazione di tali marcatori in fase di caratterizzazione del sito, mentre il secondo caso studio prende in considerazione il monitoraggio della strategia di bonifica scelta.

CASO STUDIO 1: TERRENI CONTAMINATI DA IDROCARBURI

Nel sito in esame sono state riscontrate concentrazioni di idrocarburi alifatici (C>12) al di sopra delle CSC. Sono stati prelevati campioni in diversi punti del sito: 3 punti in cui è presente una contaminazione da idrocarburi e 4 punti in cui non è presente alcuna contaminazione. Inoltre, ad eccezione di un solo campione, per ciascun punto le analisi sono state condotte su un campione del comparto insaturo, un campione del comparto saturo ed un campione prelevato in corrispondenza della frangia capillare, per n.19 totale di campioni.

Al fine di caratterizzare il sito, valutando le potenzialità degradative della comunità autoctona e l'eventuale selezione, nel tempo, di microrganismi noti per particolari capacità degradative nei confronti dei contaminanti presenti, sono state svolte le analisi microbiologiche, oltre che un'analisi funzionale.

Materiali e metodi

Le analisi microbiologiche-molecolari sono state condotte mediante l'utilizzo di tecniche biomolecolari, Next Generation Sequencing (NGS) e PCR quantitativa (qPCR) che consentono di valutare la presenza e di quantificare specifici microrganismi e/o metabolismi microbici in campioni ambientali.

Queste analisi prevedono l'estrazione del DNA genomico da 0.5 g di terreno utilizzando kit commerciali. Per l'analisi della comunità batterica, il DNA genomico estratto dai campioni è stato amplificato con una coppia specifica di primer al fine di amplificare un frammento genico corrispondente alle regioni ipervariabili V5-V6 del gene 16S rRNA batterico. Il sequenziamento è stato effettuato mediante piattaforma Illumina MiSeq e le sequenze ottenute (.fastQ) sono state elaborate per definire le unità tassonomiche operative (OTU) e la loro abbondanza in ciascun campione. Successivamente, le OTU sono state classificate tassonomicamente utilizzando il database RDP (Ribosomal Database Project). Per quanto riguarda l'analisi di PCR quantitativa (qPCR), il DNA estratto è stato amplificato tramite l'utilizzo di opportune coppie di primer specifici e, in dettaglio, sulla base dei contaminanti presenti nel sito, sono stati quantificati i seguenti geni:

- **qPCR** del gene **16S rRNA** batterico per valutare il numero totale di batteri;
- **qPCR** del gene **alkB** codificante per l'enzima alcano monoossigenasi, marcatore molecolare del processo di degradazione aerobica degli idrocarburi alifatici;
- **qPCR** del gene **todC** codificante per l'enzima toluene diossigenasi, marcatore molecolare del processo di degradazione aerobica degli idrocarburi aromatici a singolo anello -BTEXs;
- **qPCR** del gene **dsrA** codificante per una reduttasi coinvolta nel processo di riduzione dissimilativa del solfato, marcatore molecolare dei

“Marcatori molecolari per la valutazione del potenziale genetico nel biorisanamento”

batteri solforiduttori;

- **qPCR** del gene *narG* codificante per una reduttasi coinvolta nel processo di riduzione del nitrato, marcatore molecolare dei batteri nitrato-riduttori.

L'analisi funzionale dei dati di sequenziamento, infine, consente di attribuire l'appartenenza di specifici gruppi batterici (ordini e/o generi) individuati mediante il sequenziamento NGS a gruppi funzionali definendo anche la loro abbondanza relativa normalizzata (ARN).

Risultati

L'indagine condotta tramite tecniche microbiologiche-molecolari di sequenziamento NGS e relativa analisi funzionale ha messo in luce la presenza di una comunità batterica principalmente anaerobica, soprattutto per quanto concerne i campioni maggiormente impattati dalla contaminazione, sia attuale che passata. In particolare, si tratta di microrganismi anaerobi che utilizzano i composti dello zolfo come accettori finali della catena di trasporto degli elettroni. I processi degradativi aerobici nei confronti degli idrocarburi, infatti, determinano un consumo di ossigeno, con conseguente limitazione della sua concentrazione, condizione che presumibilmente ha portato allo svilupparsi di comunità anaerobiche che utilizzano composti alternativi come accettore finale di elettroni, tra cui in particolare i solfati.

Al contrario, per quanto concerne i campioni non contaminati da idrocarburi organici e i campioni più superficiali, i microrganismi dominanti sono principalmente aerobi; infatti, in superficie questa comunità è favorita dal continuo scambio gassoso, mentre nei punti non contaminati l'ossigeno, non essendo stato consumato, viene utilizzato come accettore finale preferenziale.

Questa differenza è ben visibile nell'analisi funzionale svolta, che mostra una correlazione positiva tra l'abbondanza relativa normalizzata (ARN) dei microrganismi chemioeterotrofi e l'assenza di contaminazione. Tra i metabolismi di respirazione anaerobica sono particolarmente rilevanti quelli inerenti alla riduzione di composti dello zolfo; come atteso, la ARN di queste popolazioni batteriche ha un andamento speculare rispetto alle popolazioni aerobiche.

I risultati del sequenziamento sono confermati anche dalle analisi qPCR che mostrano la predominanza di metabolismi anaerobi nel sito, con una maggiore distribuzione e concentrazione (n° copie/grammo) dei geni correlati al metabolismo anaerobico e in particolare alla riduzione del solfato, i quali potrebbero essere coinvolti in processi biodegradativi dei contaminanti organici.

I dati ottenuti in fase di caratterizzazione descrivono lo stato del sito, dando informazioni sui metabolismi caratteristici della comunità autoctona, che possono supportare la selezione della strategia di bonifica sito-specifica.

“*Marcatori molecolari per la valutazione del potenziale genetico nel biorisanamento*”

CASO STUDIO 2: ACQUE SOTTERRANEE CONTAMINATE DA SOLVENTI CLORURATI

Il sito oggetto del secondo caso studio riguarda il trattamento di un sito contaminato da solventi clorurati. A seguito della caratterizzazione chimica e microbiologica precedentemente effettuata, è stata proposta una strategia di trattamento biologico per l'intero sito. Per l'area centrale del sito è stato scelto il Monitoraggio dell'Attenuazione Naturale (MNA), considerando che i risultati della caratterizzazione mostravano la presenza di specifici microrganismi e metabolismi potenzialmente coinvolti nel processo di dechlorazione anaerobica riduttiva degli etileni clorurati.

Per il monitoraggio di questo processo sono stati selezionati 4 piezometri sui quali eseguire le analisi chimiche, biomolecolari e isotopiche con scadenza semestrale, per la durata di tre anni (2021-2023).

Materiali e metodi

Le analisi microbiologiche-molecolari sono state condotte mediante l'utilizzo di tecniche biomolecolari, Next Generation Sequencing (NGS) e PCR quantitativa (qPCR), come descritto nel primo caso presentato.

La tecnica della qPCR è stata utilizzata per valutare l'abbondanza di batteri totali e di specifici geni funzionali e catabolici coinvolti nei processi di biodegradazione degli etileni clorurati. I geni analizzati sono i seguenti:

- il gene **16S rRNA**, marcatore molecolare utilizzato per la quantificazione del numero totale di batteri;
- il gene **16S rRNA *Dehalococcoides ssp.***, marcatore molecolare utilizzato per la quantificazione dei batteri appartenenti al genere *Dehalococcoides ssp.*, batteri in grado di completare la dechlorazione riduttiva del PCE fino ad etilene;
- il gene ***pceA***, codificante per la dealogenasi riduttiva del tetracloroetilene (PCE) e del tricloroetilene (TCE), marcatore molecolare della degradazione anaerobica del PCE e del TCE;
- il gene ***tceA***, codificante per la dealogenasi riduttiva del tricloroetilene (TCE) e del dicloroetilene (DCE), marcatore molecolare della degradazione anaerobica del TCE e del DCE;
- il gene ***vcrA***, codificante per le dealogenasi riduttiva del dicloroetilene (DCE) e del cloruro di vinile (CVM), marcatore molecolare della degradazione anaerobica di DCE e CVM;

Le analisi chimiche sono state integrate con quelle isotopiche e biomolecolari per l'interpretazione dei dati.

Risultati

Dalle analisi microbiologiche-molecolari effettuate sui campioni prelevati dai 4 piezometri selezionati è stato possibile monitorare nel tempo l'evoluzione della comunità microbica e le potenzialità geniche correlate alla biodegradazione dei contaminanti target. Emerge l'influenza dei contaminanti sulla comunità microbica del sito, che siano essi etileni clorurati o metalli (Fe e Mn). È infatti evidente una forte selezione di batteri legati al ciclo del ferro e coinvolti nella biodegradazione dei composti clorurati, sia per via diretta, tramite la dechlorazione riduttiva anaerobica, che tramite processi co-metabolici aerobici.

I risultati delle analisi di sequenziamento NGS e di qPCR condotte hanno mostrato quindi la presenza di un buon potenziale genetico relativo alla rimozione dei composti clorurati, sia per via anaerobica che aerobica, e dei metalli presenti. In particolare, al termine dei 3 anni di monitoraggio, uno dei piezometri monitorati risulta quello con il potenziale biodegradativo maggiore; questo dato è supportato anche dalle analisi chimiche, che mostrano un generale abbattimento delle concentrazioni dei contaminanti, soprattutto in questo piezometro.

Integrando le analisi chimiche a quelle microbiologico-molecolari, è quindi possibile, anche in fase di monitoraggio, valutare il contributo biologico nella rimozione dei contaminanti, verificando l'andamento della strategia selezionata e valutandone, così, l'efficacia.

Acknowledgements

I casi studio presentati sono inerenti a progetti in collaborazione con le società HPC Italia S.r.l. (caso studio 1) e Tauw Italia S.r.l. (caso studio 2).