



**UNIVERSITÀ  
DI PARMA**



# Studi idrogeologici in siti contaminati: le potenzialità delle indagini metagenomiche

Dott. Rizzo Pietro

Università di Parma

Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale

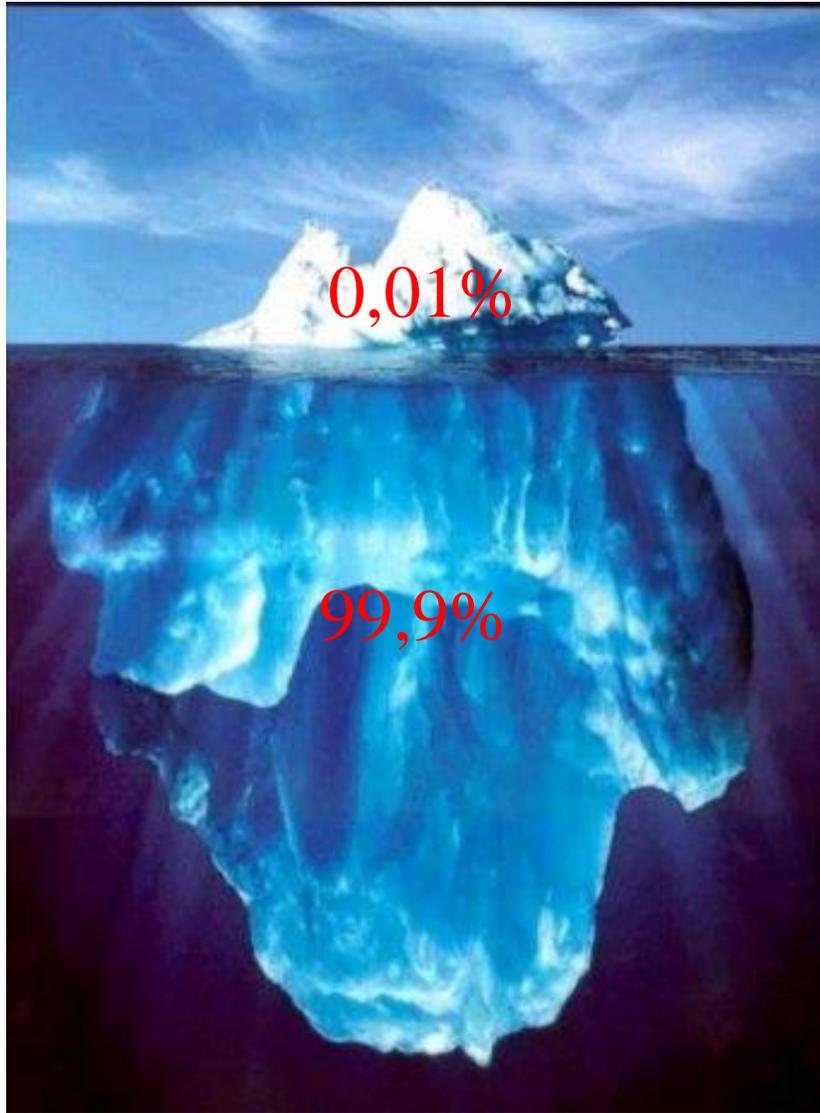
E-mail: [pietro.rizzo2@studenti.unipr.it](mailto:pietro.rizzo2@studenti.unipr.it)

# Biorimediazione

- È una tecnica che sfrutta il metabolismo di batteri per degradare contaminanti presenti nell'ambiente
- Sfruttando questa tecnica di bonifica si creano minori disturbi alle matrici da trattare (acqua/suolo) rispetto all'utilizzo di trattamenti come l'escavazione



# Indagini metagenomiche



## ICEBERG della BIODIVERSITA' MICROBICA

Il 99,9% delle specie microbiche viventi è sconosciuta e incoltivabile, ma esiste ed è attiva nell'ambiente.

Oggi, con lo sviluppo delle tecniche di sequenziamento NGS (Next Generation Sequencing), possiamo mettere in luce tutta questa biodiversità nascosta

# Analisi metagenomiche

## Possibilità

- Attraverso l'analisi delle comunità batteriche si può ottenere un quadro del potenziale biodegradativo in un ambiente contaminato
- Si possono selezionare batteri particolarmente efficaci nella biodegradazione ed utilizzarli per la BIOAUGMENTATION oppure, semplicemente, incentivarne l'attività tramite l'aggiunta nutrienti e/o ossigeno
- Si possono individuare le funzioni metaboliche e biochimiche di una comunità microbica in siti contaminati

# Approccio molecolare microbiologico

- Campionamento
- Estrazione ed amplificazione del DNA
- Sequenziamento del 16S rRNA ed analisi bioinformatiche
- Elaborazione dei dati



# Campionamento

- Materiale sterile
- Scelta del tipo di campione da prelevare

Matrice: Suolo/ materiale organico

Acqua

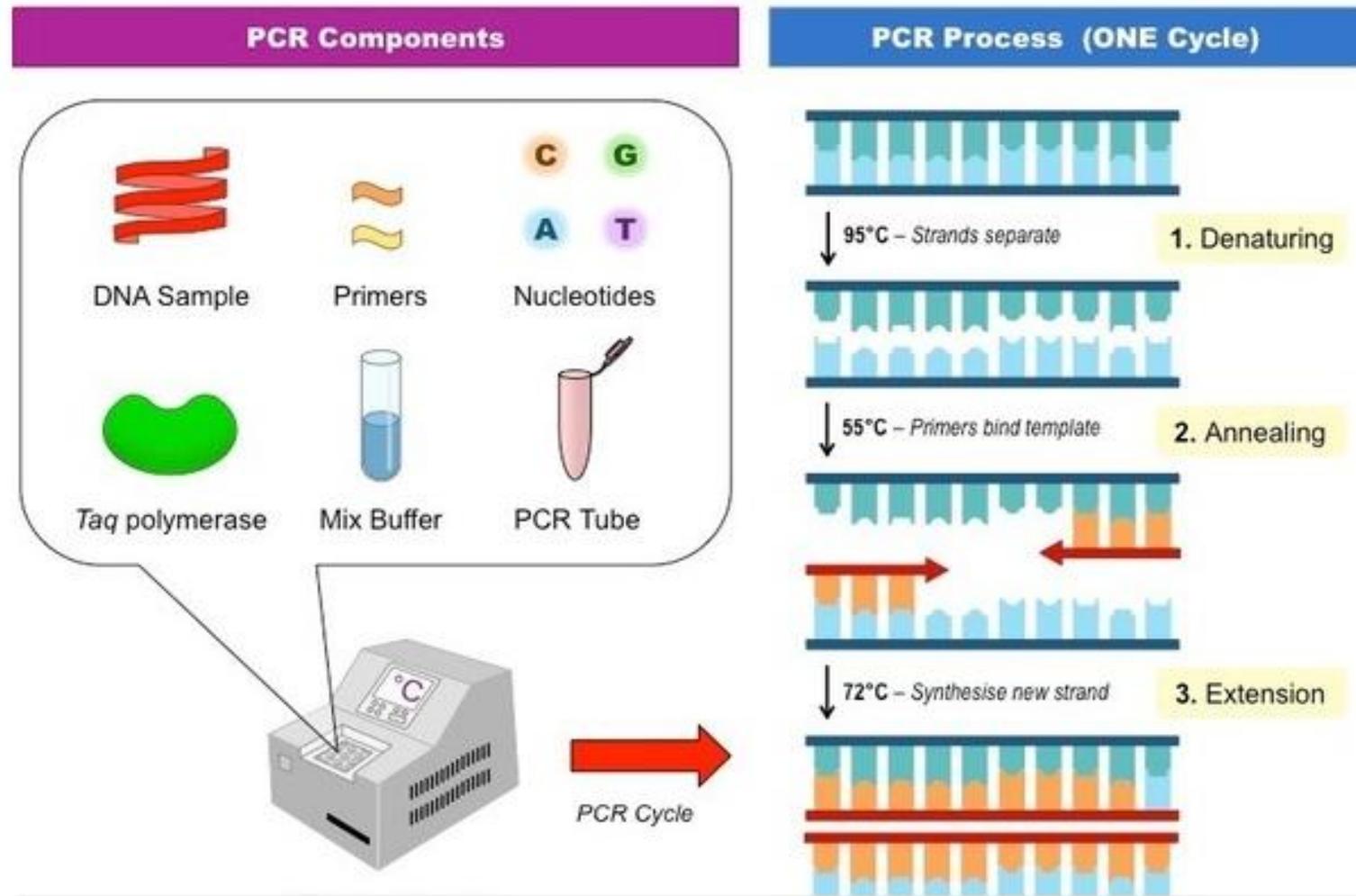


# Estrazione del DNA

- L'estrazione del DNA viene effettuata con il Kit Fast DNA Spin
- Questo DNA è stato utilizzato per il *profiling* del 16S rDNA dei campioni

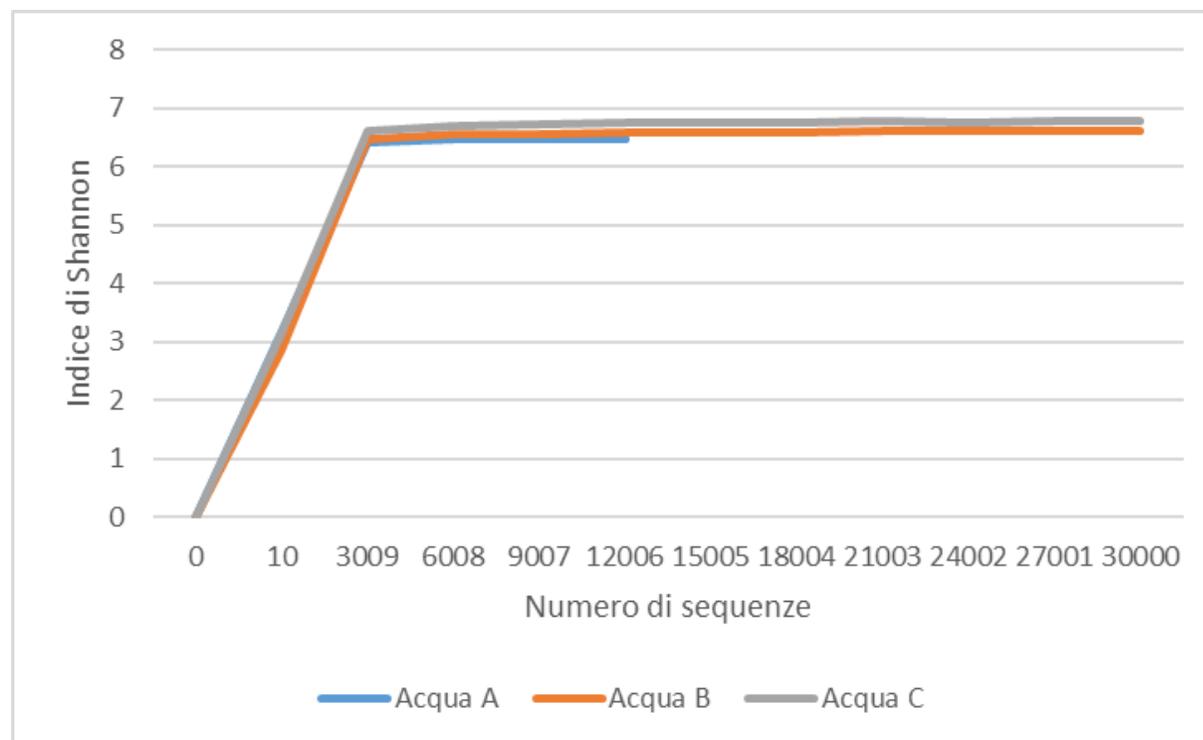


# PCR: Polymerase Chain Reaction



# Analisi bioinformatiche

Sample	Number of sequenced pe reads	Number of pe reads with mean quality > 20	Number of merged pe reads	No bacterial sequences	Length outside bounds of 100 and 400	Ambiguous bases	Homopolymers > 7	Mismatch in primers >1	Reverse primer not found	Final Read Number
Acqua A	77868	18528	17501	128	0	0	2	333	8	17030
Acqua B	97457	92336	89040	677	0	0	17	1746	67	86533
Acqua C	115126	109872	106433	230	0	0	36	2070	48	104049



# Banche dati

- National Center for Biotechnology Information (NCBI) gestisce varie banche dati di genomica
- Attraverso il BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), che permette il confronto tra sequenze di nucleotidi è possibile risalire, se presente in archivio, al phylum, famiglia o genere dei batteri presenti nel campione

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

# Analisi bioinformatiche

1	Taxonomy	Taxonomy	1	2	3	4	5	6	7
2	D_0__Archaea;D_1__Diapherotrites;D_3__Unkn	Candidatus Iainarchaeum	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
3	D_0__Archaea;D_1__Thaumarchaeota;D_3__Unk	Candidatus Nitrosoarchaeum	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
4	D_0__Archaea;D_1__Thaumarchaeota;Other;Oth	U. m. of Thaumarchaeota phylum	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
5	D_0__Archaea;D_1__Woeseearchaeota (DHVEG-6	U. m. of Woeseearchaeota (DHVEG-6) phylum	0,09%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	0,04%	0,00%
6	D_0__Archaea;Other;Other;Other;Other	U. m. of Archaea phylum	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
7	D_0__Bacteria;D_1__AC1;Ambiguous_taxa;Ambig	U. m. of AC1 phylum	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,04%
8	D_0__Bacteria;D_1__Acetothermia;D_3__uncultu	U. m. of Acetothermia phylum	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
9	D_0__Bacteria;D_1__Acetothermia;D_3__Unkno	Candidatus Acetothermus	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
10	D_0__Bacteria;D_1__Acidobacteria;Ambiguous_t	U. m. of Acidobacteria phylum	0,83%	0,11%	0,73%	0,62%	0,00%	0,03%	0,00%
11	D_0__Bacteria;D_1__Acidobacteria;D_3__Acidob	Acidobacteria bacterium IGE-011	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
12	D_0__Bacteria;D_1__Acidobacteria;D_3__Acidob	Acidobacteria bacterium WX22	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,05%	0,00%
13	D_0__Bacteria;D_1__Acidobacteria;D_3__Acidob	U. m. of Acidobacteriaceae (Subgroup 1) family	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
14	D_0__Bacteria;D_1__Acidobacteria;D_3__Blasto	11-24	0,07%	0,03%	0,14%	0,41%	0,00%	0,00%	0,00%
15	D_0__Bacteria;D_1__Acidobacteria;D_3__Blasto	Aridibacter	0,01%	0,01%	0,02%	0,07%	0,00%	0,00%	0,00%
1230	D_0__Bacteria;D_1__Verrucomicrobia;D_3__Ver	U. m. of Verrucomicrobiaceae family	0,09%	0,02%	0,15%	0,07%	0,00%	0,00%	0,00%
1231	D_0__Bacteria;D_1__Verrucomicrobia;D_3__Ver	Verrucomicrobium	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
1232	D_0__Bacteria;D_1__Verrucomicrobia;D_3__Ver	U. m. of Verrucomicrobiales order	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
1233	D_0__Bacteria;D_1__WS2;D_3__uncultured Firmi	U. m. of WS2 phylum	0,12%	0,01%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,07%
1234	D_0__Bacteria;Other;Other;Other;Other	U. m. of Bacteria kingdom	2,38%	1,08%	0,61%	0,42%	1,67%	0,65%	1,39%
1235	Unclassified;Other;Other;Other;Other	Others	0,02%	0,00%	0,00%	0,02%	0,02%	0,02%	0,05%

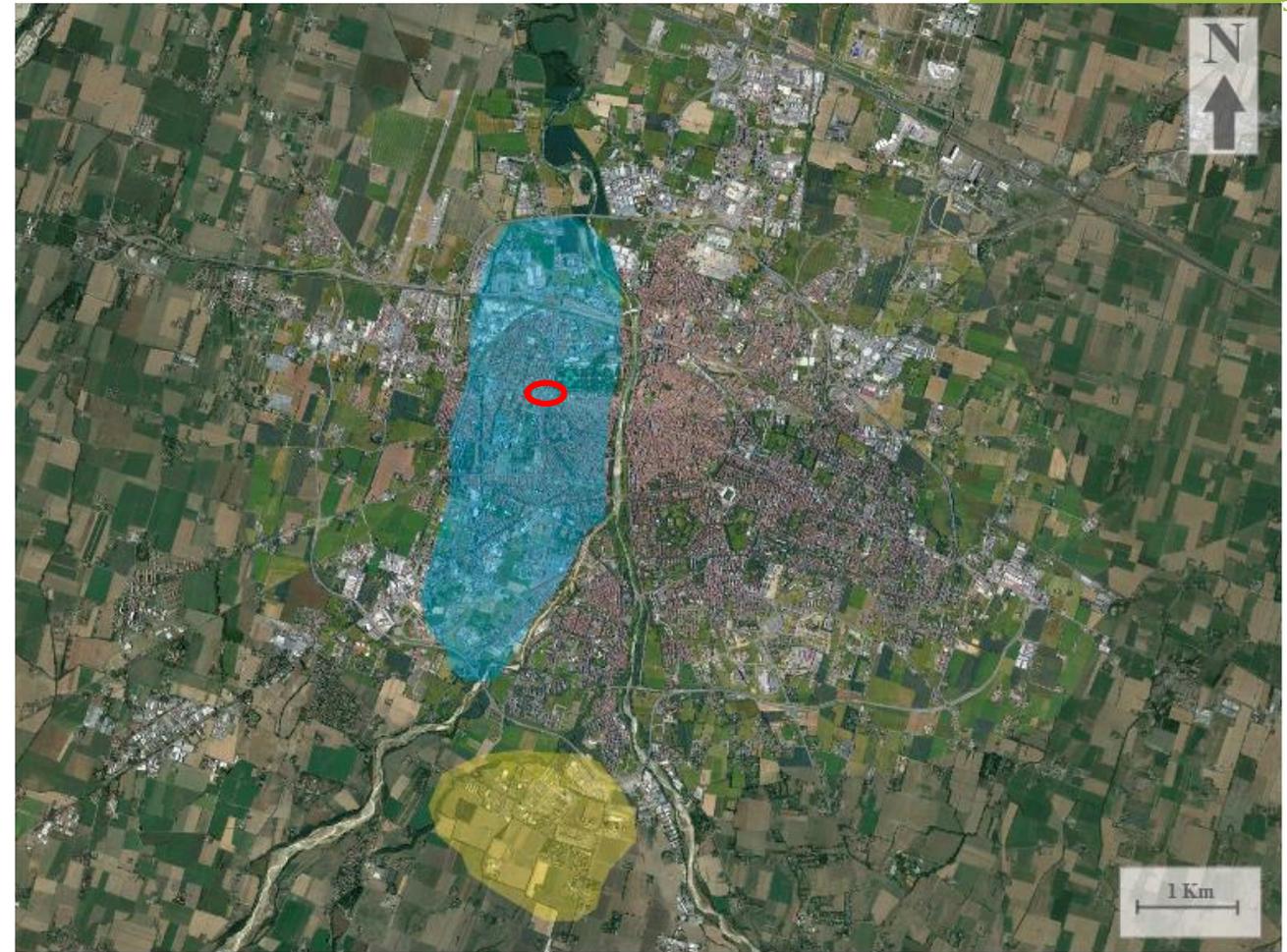
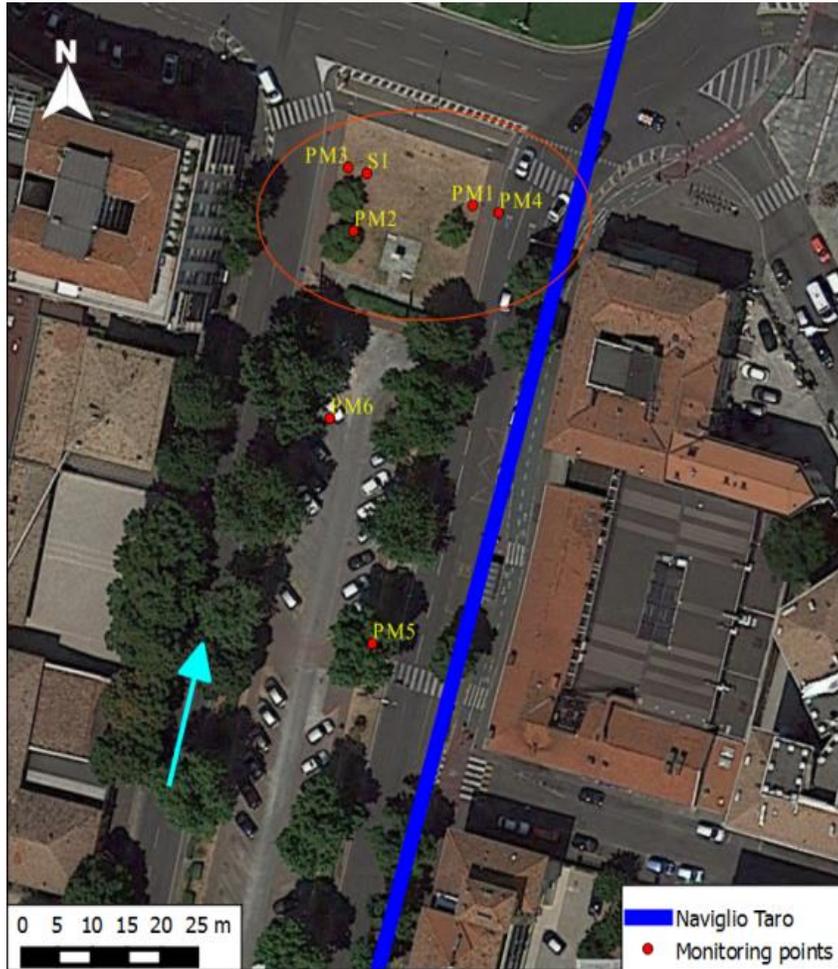
# Analisi metagenomiche

## Limiti

- La presenza del DNA di un determinato genere batterico non garantisce la sua vitalità all'interno della matrice campionata
- Una bassa quantità di sequenze può portare ad un'errata interpretazione della struttura della comunità batterica

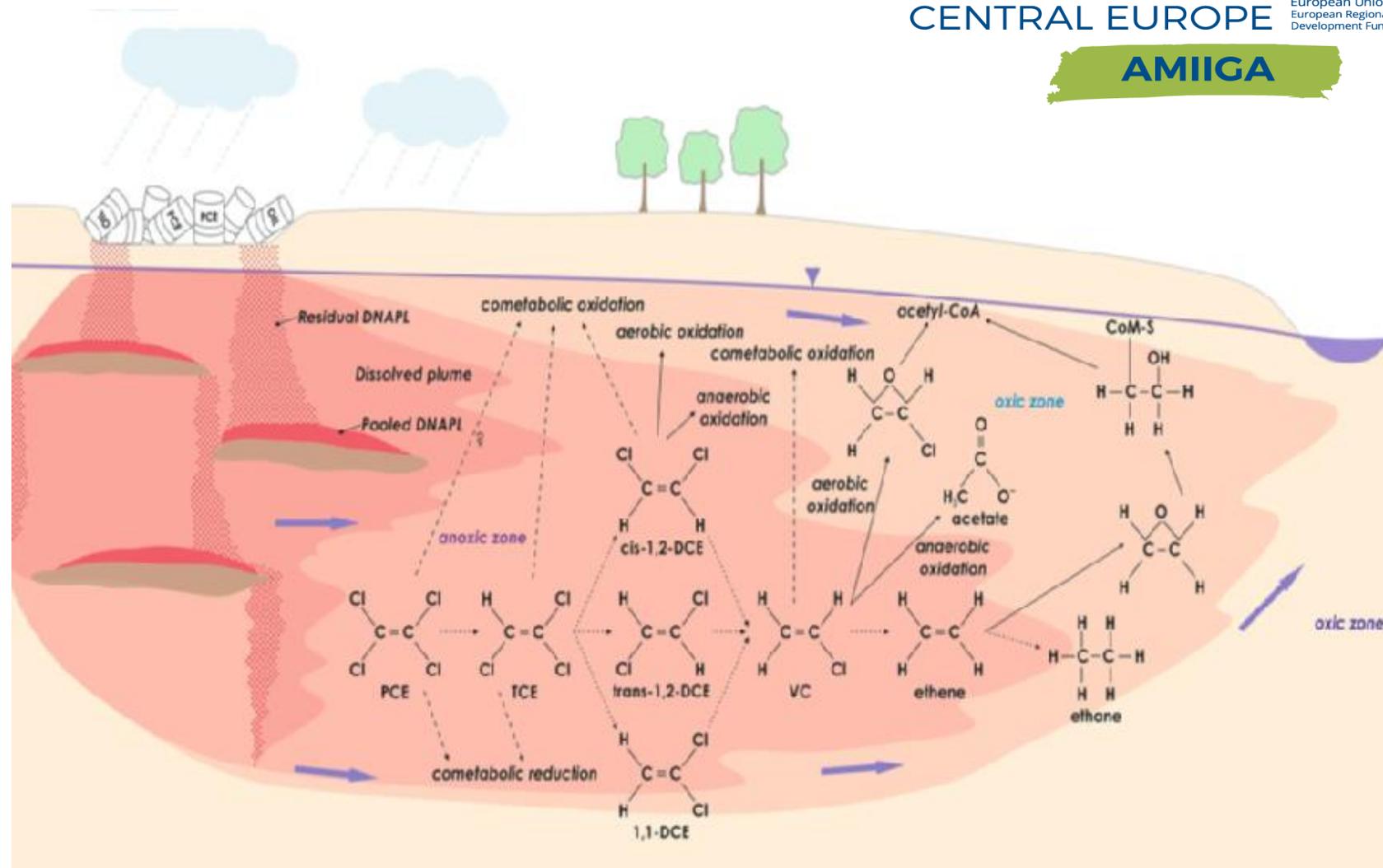
# Caso di studio

# Caso di studio



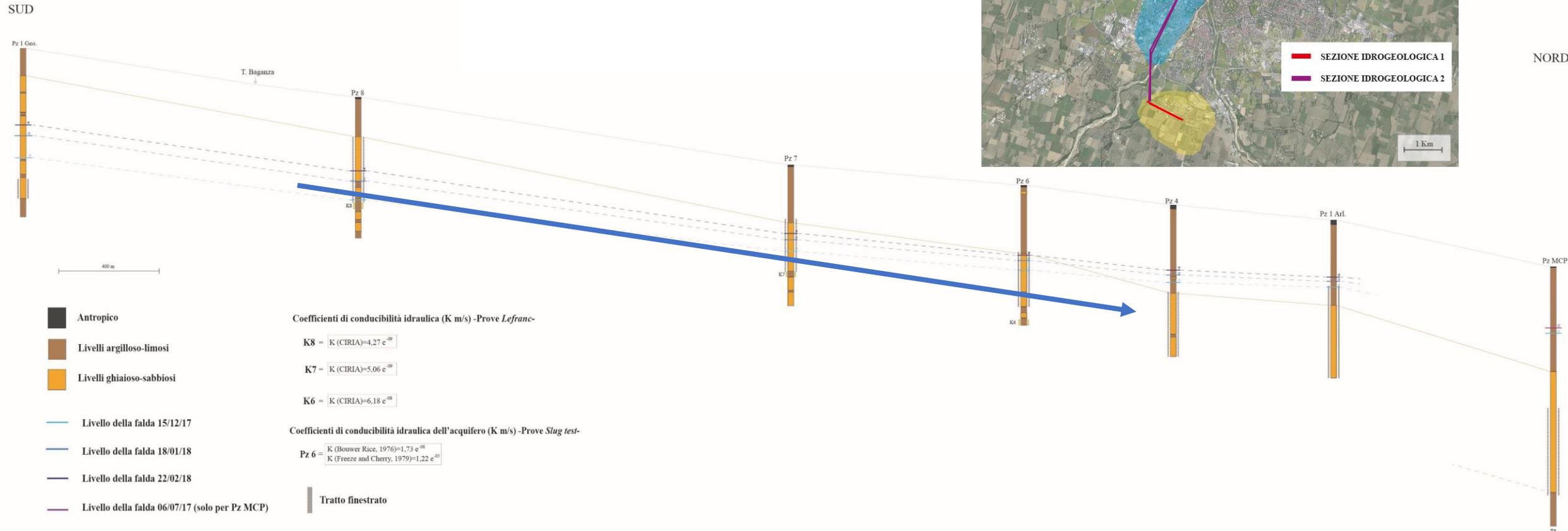
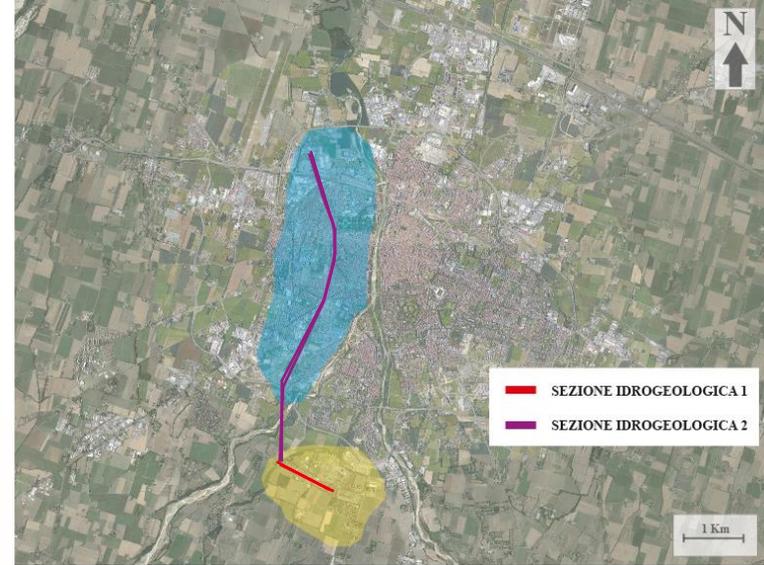
# Solventi clorurati

- sono idrocarburi alifatici, alogeno-sostituiti contenenti almeno un atomo di cloro (composti di sintesi)
- bassa degradabilità chimica e biologica
- degradazione biologica in condizioni anaerobiche, aerobiche oppure per co-metabolismo



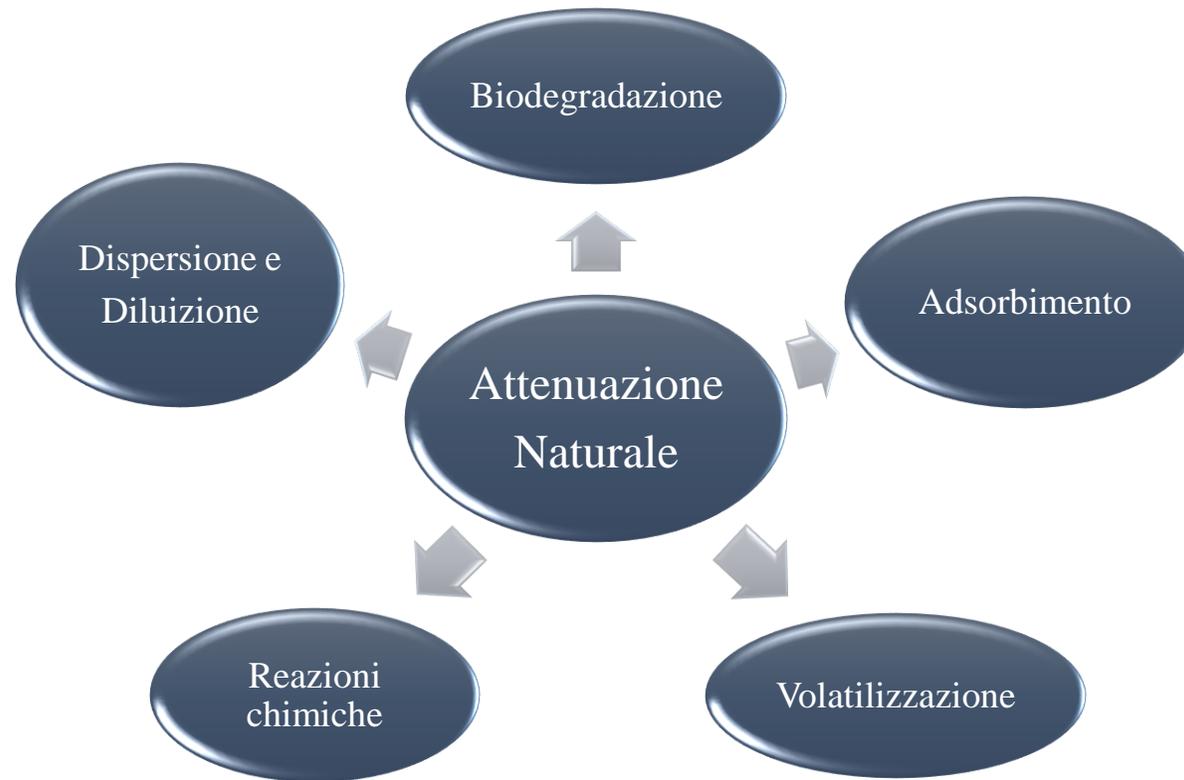
(Dolinovà et al.2017)

# Sezione idrogeologica 2



# Attenuazione naturale

Meccanismo naturale volto a ridurre la massa, la tossicità, la mobilità, il volume e la concentrazione dei contaminanti.



# Materiali e Metodi

## Campionamenti

### 1° camp. luglio 2017

- 17 punti di campionamento
  - 11 piezometri
  - 6 corpi idrici superficiali



### 2° camp. settembre 2017

- 5 punti di campionamento
  - 4 piezometri
  - 1 corpo idrico superficiale

### 3° camp. maggio 2018

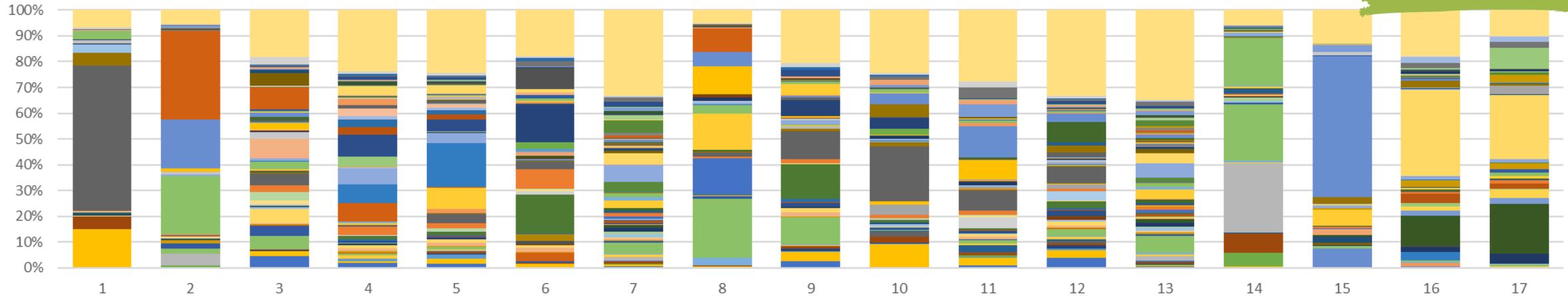
- 9 punti di campionamento
  - 9 piezometri



# Risultati

## Analisi bioinformatiche

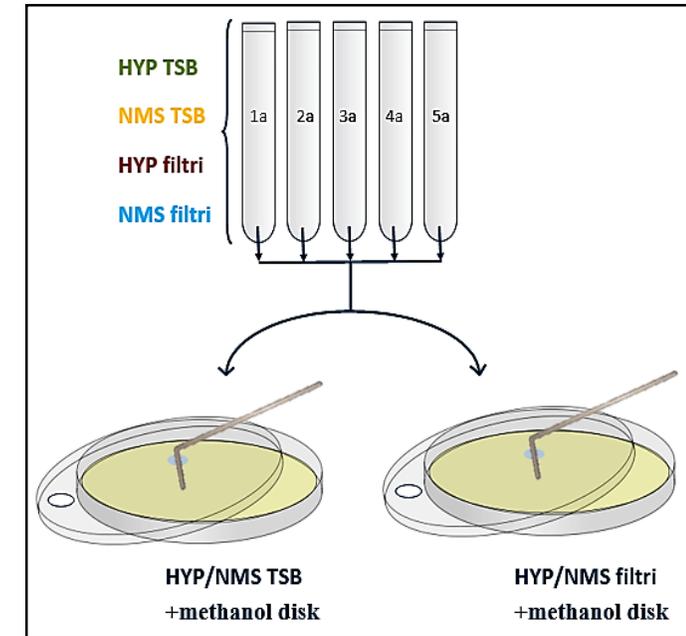
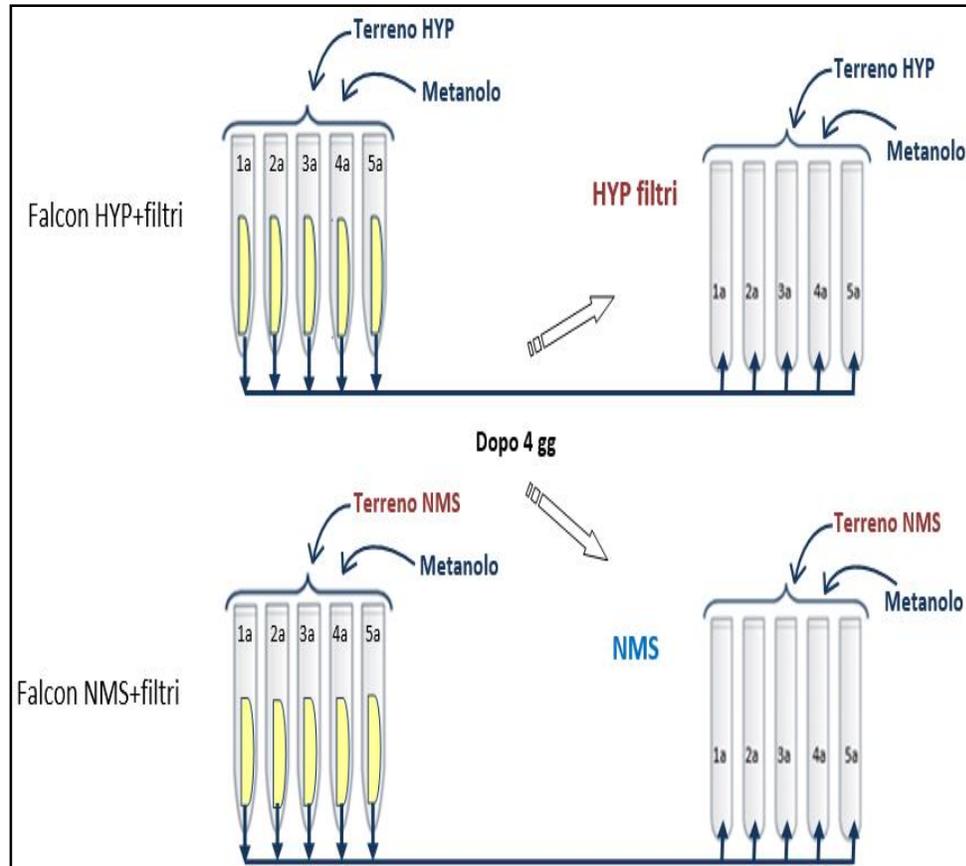
**AMIIGA**



- |  |  |  |   |  |
|--|--|--|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>■ U. m. of Acidobacteria phylum</li> <li>■ U. m. of Microbacteriaceae family</li> <li>■ Pseudarcicella</li> <li>■ U. m. of Chitinophagaceae family</li> <li>■ U. m. of Cyanobacteria phylum</li> <li>■ Blautia</li> <li>■ Turicibacter</li> <li>■ U. m. of Latescibacteria phylum</li> <li>■ U. m. of 4-Org1-14 order</li> <li>■ Achromobacter</li> <li>■ Comamonas</li> <li>■ Methylibium</li> <li>■ U. m. of Oxalobacteraceae family</li> <li>■ Phenyllobacterium</li> <li>■ Escherichia-Shigella</li> <li>■ U. m. of Methylococcales order</li> <li>■ Sideroxydans</li> <li>■ PerLucidibaca</li> <li>■ Ensifer</li> <li>■ Dechloromonas</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ U. m. of Actinobacteria phylum</li> <li>■ Nocardioides</li> <li>■ U. m. of Cytophagaceae family</li> <li>■ U. m. of Saprospiraceae family</li> <li>■ Virgulinella fragilis</li> <li>■ U. m. of Lachnospiraceae family</li> <li>■ Streptococcus</li> <li>■ Nitrospira</li> <li>■ Aeromonas</li> <li>■ Pusillimonas</li> <li>■ Hydrogenophaga</li> <li>■ Pseudorhodoferrax</li> <li>■ Undibacterium</li> <li>■ Cellvibrio</li> <li>■ U. m. of CAB2E06 family</li> <li>■ U. m. of Methylophilaceae family</li> <li>■ U. m. of Gallionellaceae family</li> <li>■ Pseudomonas</li> <li>■ U. m. of Rhizobiales order</li> <li>■ Ferribacterium</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Mycobacterium</li> <li>■ U. m. of Elev-16S-1332 family</li> <li>■ Fluviicola</li> <li>■ U. m. of Chlorobiaceae family</li> <li>■ Clostridium sensu stricto 1</li> <li>■ Romboutsia</li> <li>■ Gemmatimonadaceae family</li> <li>■ U. m. of Parcubacteria phylum</li> <li>■ U. m. of Proteobacteria phylum</li> <li>■ Polynucleobacter</li> <li>■ Leptothrix</li> <li>■ Rhodoferrax</li> <li>■ Arcobacter</li> <li>■ Rheinheimera</li> <li>■ <b>Crenothrix</b></li> <li>■ U. m. of Neisseriaceae family</li> <li>■ U. m. of Nitrosomonadaceae family</li> <li>■ U. m. of A0839 family</li> <li>■ Albirhodobacter</li> <li>■ Methyloversatilis</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ hgcl clade</li> <li>■ Prevotella 9</li> <li>■ Flavobacterium</li> <li>■ U. m. of Anaerolineaceae family</li> <li>■ Clostridium sensu stricto 2</li> <li>■ U. m. of Peptostreptococcaceae family</li> <li>■ U. m. of Gracilibacteria phylum</li> <li>■ U. m. of Peregrinibacteria phylum</li> <li>■ Pseudoalteromonas</li> <li>■ Acidovorax</li> <li>■ Limnohabitans</li> <li>■ Sphaerotilus</li> <li>■ Helicobacter</li> <li>■ Desulfatirhabdium</li> <li>■ <b>Methylobacter</b></li> <li>■ Vogesella</li> <li>■ Acinetobacter</li> <li>■ Methylocella</li> <li>■ Gemmobacter</li> <li>■ Sulfuritalea</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Gaiella</li> <li>■ U. m. of Rikenellaceae family</li> <li>■ Sediminibacterium</li> <li>■ U. m. of Chloroflexi phylum</li> <li>■ Clostridium sensu stricto 5</li> <li>■ Faecalibacterium</li> <li>■ U. m. of SR-FBR-L83 family</li> <li>■ U. m. of 195up order</li> <li>■ Shewanella</li> <li>■ Caenimonas</li> <li>■ Macromonas</li> <li>■ U. m. of Comamonadaceae family</li> <li>■ Caulobacter</li> <li>■ Geobacter</li> <li>■ U. m. of Methylococcaceae family</li> <li>■ Candidatus Nitrotoga</li> <li>■ Alkanindiges</li> <li>■ <b>Hyphomicrobium</b></li> <li>■ 12up</li> <li>■ U. m. of Rhodocyclaceae family</li> </ul> |
|--|--|--|---|--|

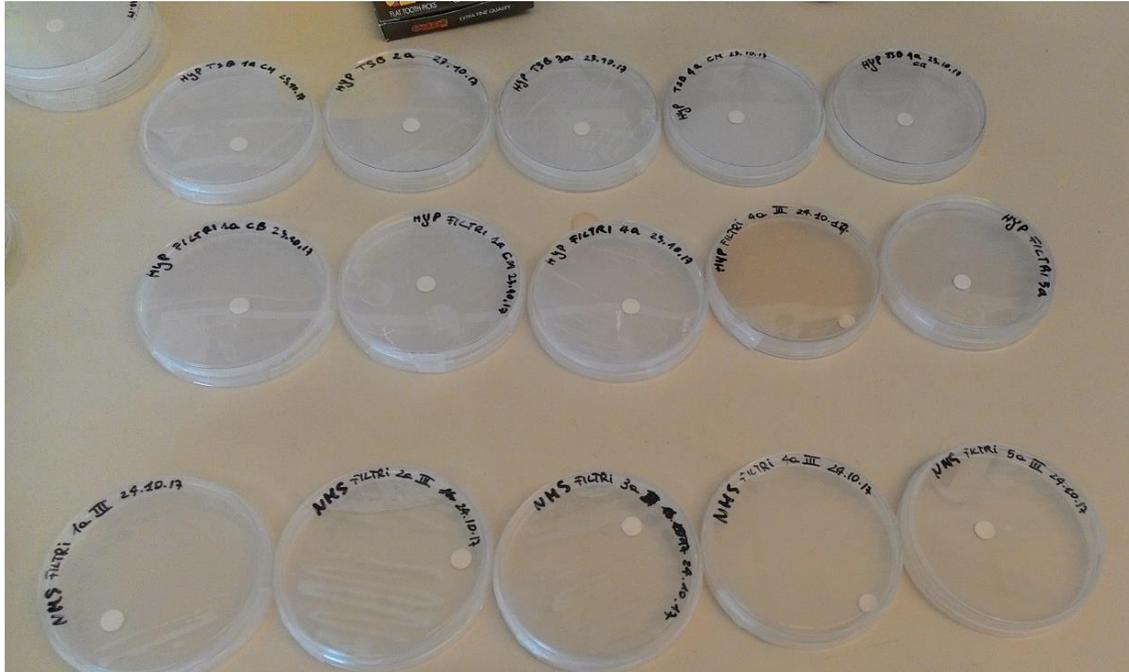
# Isolamento dei ceppi batterici

- Filtrazione dei campioni
- Inoculo in due terreni selettivi: HYP e NMS
- 5 cicli di arricchimento
- Isolamento su piastra

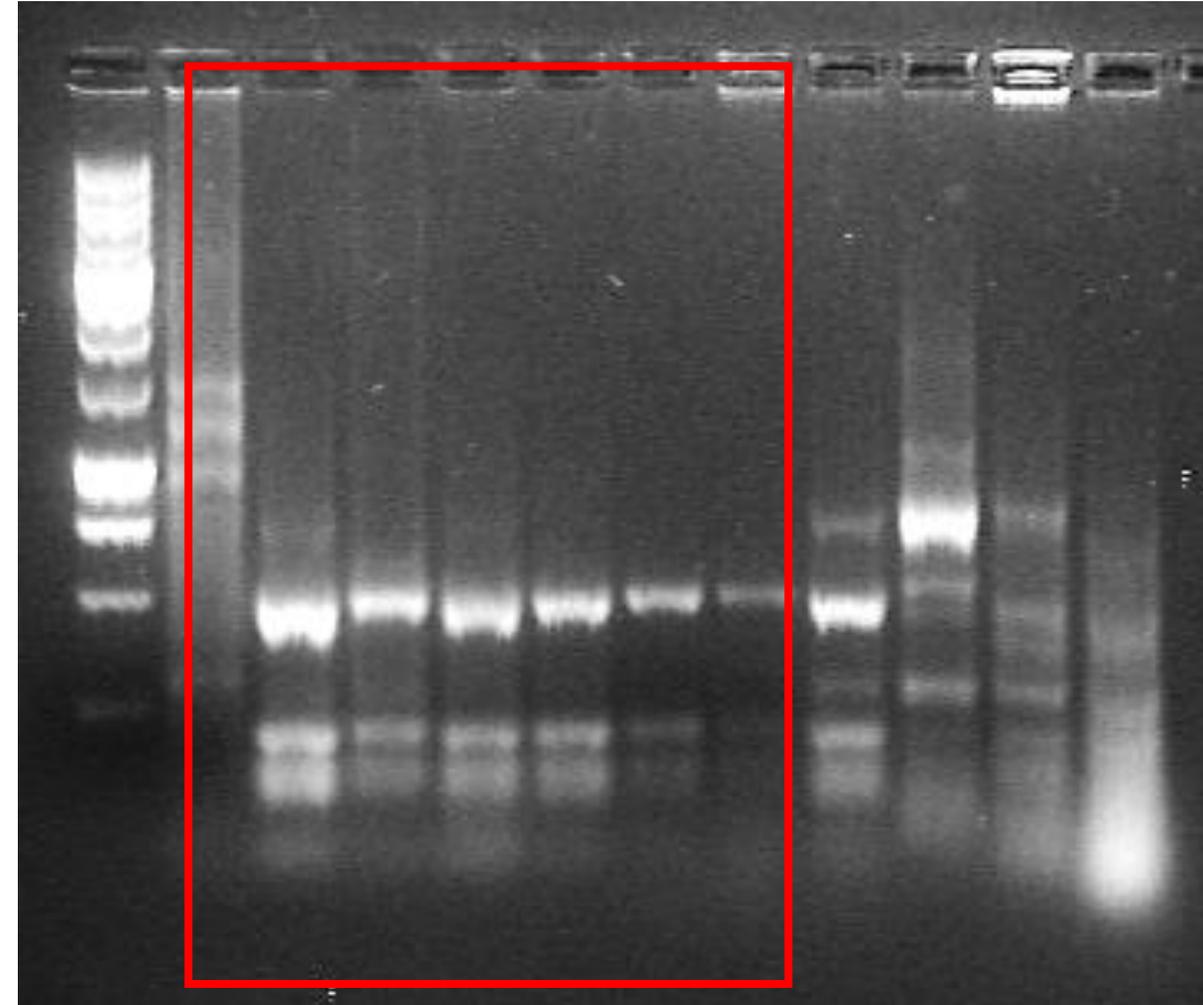


# Risultati

## Isolamento ceppi batterici d'interesse



Famiglia delle Methylophilaceae



# Conclusioni

- Dai risultati ottenuti con le analisi molecolari (*profiling* delle comunità mediante sequenziamento NGS), si può affermare che la comunità batterica, presente nelle acque di falda prelevate nei vari piezometri, è principalmente costituita da batteri aerobi
- La via più probabile per la biodegradazione dei contaminanti più abbondanti (PCE e TCE) potrebbe essere una dealogenazione ossidativa (co-metabolica) svolta da alcuni generi batterici come *Methylobacter*, *Methylocella*, *Methylococcus*, *Crenothrix*
- Dalle analisi è emersa anche la presenza del genere batterico *Rhodoferrax*, che è stato associato alla degradazione del vinil cloruro e del *Dechloromonas* che è in grado di utilizzare PCE e nitrati come accettori di elettroni in un processo di respirazione anaerobia

Kittelmann, S. and Friedrich, M. W. (2007)

Paes et al.(2015)

Zanini et al. (2018)

Grazie per l'attenzione

# Bibliografia

- Kittelmann, S., & Friedrich, M. W. (2007). Identification of novel perchloroethene-respiring microorganisms in anoxic river sediment by RNA-based stable isotope probing. *Environmental Microbiology*, <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01427.x>
- Paes F, Liu X, Mattes TE, Cupples Alison M (2015) Elucidating carbon uptake from vinyl chloride using stable isotope probing and Illumina sequencing. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:7735–7743. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6606->.
- Zanini, A., Petrella, E., Sanangelantoni, A.M. et al. *Rend. Fis. Acc. Lincei* (2018). [doi:10.1007/s12210-018-0748-x](https://doi.org/10.1007/s12210-018-0748-x)