



**INDAGINE PRELIMINARE
SULLE CAPACITÀ DI BIOTRASFORMAZIONE
DI SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS)
DA PARTE DI ISOLATI BATTERICI
OTTENUTI DA MATRICI AMBIENTALI CONTAMINATE**

Silvia Lampis, Giovanni Vallini





REGIONE DEL VENETO



PROGETTO **M.I. P.REME.** (**M**ICROBIALLY **I**NDUCED **P**FA**S** **R**EMEDIATION)

BONIFICA BIOLOGICA: L'impiego di organismi viventi (*biota*) per degradare o mitigare l'effetto dei contaminanti ambientali

dal punto di vista tecnologico, con
BONIFICA BIOLOGICA

si intende

l'insieme degli interventi finalizzati a
incrementare i processi biologici
di degradazione, detossificazione o rimozione
a carico di contaminanti organici o inorganici,
indipendentemente dal fatto che siano
di origine naturale o sintetica,
presenti nei terreni, nelle acque superficiali e marine,
negli acquiferi sotterranei e nei sedimenti
come conseguenza di sversamenti accidentali o cronici



BONIFICA BIOLOGICA – IL RUOLO DEI MICROORGANISMI

1) I microorganismi traggono **energia** e **carbonio** per le biosintesi dai contaminanti organici oggetto della degradazione

2) I microorganismi producono enzimi (cioè catalizzatori proteici) che oltre a consentire l'utilizzazione dei comuni substrati di crescita possono trasformare/degradare i composti inquinanti (**cometabolismo**)

Metabolismo e **Cometabolismo** di microrganismi in grado di biodegradare o biotrasformare xenobiotici.

AEROBICO


ANAEROBICO

(Hazen et al., 2010)

Cosubstrates	Methane, Methanol, Propane, Propylene (aerobic)	Ammonia, Nitrate (aerobic)	Toluene, butane, phenol, citral, cumin aldehyde, cumene, and limonene (aerobic)	Methanol (anaerobic)	Glucose, Acetate, Lactate, Sulfate, Pyruvate (anaerobic)
Enzymes (microbes)	Methane Monooxygenase, Methanol Dehydrogenase, Alkene monooxygenase, catechol dioxygenase (Methylosinus)	Ammonia Monooxygenase (<i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrobacter</i>)	Toluene Monooxygenase, Toluene Dioxygenase (<i>Rhodococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Arthrobacter</i>)	Alcohol Dehydrogenases (<i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Corynebacterium</i>)	Dehalogenase, AtzA, Dichloromethane Dehalogenase (<i>Dehalococcoides</i> , <i>Methanogens</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Geobacter</i> , <i>Clavibacter</i>)
Contaminants	TCE, DCE, VC, PAHs, PCBs, MTBE, creosote, >300 different compounds	TCE, DCE, VC, TNT	TCE, DCE, VC, 1,1-DCE, 1,1,1-TCA, MTBE	PCE, TCE, DCE, VC, Hexachloro-cyclohexane	BTEX, PCE, PAHs, Pyrene, Atrazine, TNT, etc.

OBIETTIVI della RICERCA

Valutazione della capacità di **degradare/biotrasformare** le PFAS da parte di isolati microbici

- Isolamento in coltura pura di ceppi batterici da matrici ambientali contaminate con PFAS (suolo e acque) attraverso **enrichment cultures** con **PFAS mix**
 - Identificazione degli isolati ottenuti mediante **sequenziamento del 16S rDNA**
 - **Analisi fisiologiche e biochimiche** per lo screening delle capacità metaboliche degli isolati ambientali su **substrati primari** e **co-substrati**
 - **Analisi della rimozione di PFHxS** mediante HPLC-MS/MS da coltura liquida di **2 isolati**
- 

Ottenimento di isolati batterici da matrici ambientali contaminate

Soil and **groundwater** matrices deriving from an industrial site – located in the Veneto region (Italy) – highly contaminated by PFASs were provided by the regional agency for prevention and protection of the environment of Veneto (ARPAV).

Enrichment cultures

- **Soil**/DM 1:4 (p/V)
- **200 ng/L di PFAS-mix**
- **DMYE 0.01%**
- **T= 27°C**

- **Groundwater** 90 ml in 10 ml (10x) DM
- **200 ng/L di PFAS-mix**
- **DMYE 0.01%**
- **T= 27°C**

Composto	Sigla	Conc. [ng/L]
Acido perfluoroesansulfonico	PFHxS	200
Acido perfluoroottansulfonico	PFOS	
Acido perfluorobutanoico	PFBA	
Acido perfluoroesanoico	PFHxA	
Acido perfluoroottanoico	PFOA	
Acido perfluorononanoico	PFNA	
Acido perfluorodecanoico	PFDA	
Acido perfluoroundecanoico	PFUda	

- shaking (150 rpm) under microaerophilic conditions for 3 weeks, being the cultures re-inoculated (1% v/v) at the end of every week in fresh media
- **ISOLATION of BACTERIAL STRAINS:** Proper dilutions were plated on different growth media:
 - PCA
 - R2A
 - Waksman

BACTERIAL ISOLATES

Bacterial isolates	Identity (%)	Type reference strains	Accession number	Taxonomy
RS11	99	<i>Pseudomonas delhiensis</i>	JGI.1118306	Gammaproteobacteria
RS12	99	<i>Pseudomonas veronii</i>	JYLL01000074	Gammaproteobacteria
RS15	99	<i>Enterobacter ludwigii</i>	JTLO01000001	Gammaproteobacteria
RS16	99	<i>Pseudomonas veronii</i>	JYLL01000074	Gammaproteobacteria
RS17	98	<i>Pseudomonas delhiensis</i>	JGI.1118306	Gammaproteobacteria
RS18	99	<i>Bordetella petrii</i>	AM902716	Betaproteobacteria
RS21	99	<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	AHIP01000073	Gammaproteobacteria
RS23	99	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BAMA01000316	Gammaproteobacteria
RS25	99	<i>Pseudomonas veronii</i>	JYLL01000074	Gammaproteobacteria
RS26	99	<i>Starkeya novella</i>	CP002026	Alphaproteobacteria
RS31	98	<i>Citrobacter farmeri</i>	AF025371	Gammaproteobacteria
RS33	99	<i>Achromobacter dolens</i>	HF586509	Betaproteobacteria
RS34	99	<i>Citrobacter farmeri</i>	AF025371	Gammaproteobacteria
RS36	99	<i>Bordetella petrii</i>	AM902716	Betaproteobacteria
RS37	99	<i>Achromobacter insolitus</i>	CP019325	Betaproteobacteria
PS11	98	<i>Pseudomonas nitrireducens</i>	HM246143	Gammaproteobacteria
PS12	99	<i>Pseudomonas simiae</i>	AJ936933	Gammaproteobacteria
PS13	99	<i>Enterobacter ludwigii</i>	JTLO01000001	Gammaproteobacteria
PS16	99	<i>Starkeya novella</i>	CP002026	Alphaproteobacteria
PS17	99	<i>Starkeya novella</i>	CP002026	Alphaproteobacteria
PS18	100	<i>Pseudomonas delhiensis</i>	JGI.1118306	Gammaproteobacteria
PS21	99	<i>Pseudomonas veronii</i>	JYLL01000074	Gammaproteobacteria
PS23	99	<i>Citrobacter farmeri</i>	AF025371	Gammaproteobacteria
PS25	98	<i>Citrobacter farmeri</i>	AF025371	Gammaproteobacteria
PS27	99	<i>Pseudomonas humi</i> ; <i>Pseudomonas delhiensis</i>	LC145037 JGI.1118306	Gammaproteobacteria
PS28	99	<i>Starkeya novella</i>	CP002026	Alphaproteobacteria
PS29	98	<i>Starkeya novella</i>	CP002026	Alphaproteobacteria
PS33	99	<i>Achromobacter insolitus</i>	CP019325	Betaproteobacteria
PS34	99	<i>Pseudomonas delhiensis</i>	JGI.1118306	Gammaproteobacteria
PS35	99	<i>Pseudomonas veronii</i>	JYLL01000074	Gammaproteobacteria
PS38	99	<i>Starkeya novella</i>	CP002026	Alphaproteobacteria
PS39	99	<i>Starkeya novella</i>	CP002026	Alphaproteobacteria
WS11	99	<i>Serratia proteamaculans</i>	AJ233434	Gammaproteobacteria
WS12	99	<i>Pseudomonas veronii</i>	JYLL01000074	Gammaproteobacteria
WS15	99	<i>Pseudomonas simiae</i>	AJ936933	Gammaproteobacteria
WS16	99	<i>Enterobacter ludwigii</i>	JTLO01000001	Gammaproteobacteria
WS22	99	<i>Enterobacter ludwigii</i>	JTLO01000001	Gammaproteobacteria
WS25	94	<i>Rhodanobacter rhizosphaerae</i>	FJ772032	Gammaproteobacteria
WS31	99	<i>Serratia liquefaciens</i>	CP006252	Gammaproteobacteria
WS32	99	<i>Enterobacter ludwigii</i>	JTLO01000001	Gammaproteobacteria

SOIL

32 Isolati batterici

Tutti appartenenti al Phylum dei Proteobatteri
La classe maggiormente rappresentata è quella
dei Gamma-Proteobatteri
Il genere più rappresentato è *Pseudomonas*



Bacterial isolates	Identity (%)	Type reference strains	Accession number	Taxonomy
RDM2	99	<i>Comamonas thiooxydans</i>	BBVD01000034;	Betaproteobacteria
RDM11	99	<i>Variovorax bronnicumulans</i>	AB300597	Betaproteobacteria
RDM14	99	<i>Acidovorax soli</i>	JGI.1085893	Betaproteobacteria
RDMF2	99	<i>Aeromonas taiwansis</i>	CDDD01000060	Gammaproteobacteria
RDMF5	93	<i>Pseudomonas marginalis</i>	AJ308309	Gammaproteobacteria
RDMF10	97	<i>Pseudomonas granadiensis</i>	LT629778	Gammaproteobacteria
RDMF14	98	<i>Albidiferax ferrireducens</i>	CP000267	Betaproteobacteria
RDMF15	99	<i>Pseudomonas gessardii</i>	MNPU01000117	Gammaproteobacteria
RDMYE2	99	<i>Aeromonas caviae</i>	CDBK01000019	Gammaproteobacteria
RDMYE6	99	<i>Aeromonas taiwansis</i>	CDDD01000060	Gammaproteobacteria
RDMYE7	97	<i>Pseudomonas baetica</i>	FM201274	Gammaproteobacteria
RDMYE8	92	<i>Aeromonas caviae</i>	CDBK01000019	Gammaproteobacteria
PDM1	99	<i>Pseudomonas veronii</i>	JYLL01000074	Gammaproteobacteria
PDM2	98	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	APQQ01000002	Gammaproteobacteria
PDM10	99	<i>Variovorax boronicumulans</i>	AB300597	Betaproteobacteria
PDM11	93	<i>Flavobacterium tilapiae</i>	HQ111525	Flavobacteria
PDMF1	99	<i>Pseudomonas nitrireducens</i>	HM246143	Gammaproteobacteria
PDMF2	99	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	FR870441	Gammaproteobacteria
PDMF3	99	<i>Pseudomonas donghuensis</i>	AJJP01000212	Gammaproteobacteria
PDMF7	99	<i>Pseudomonas marginalis</i>	AJ308309	Gammaproteobacteria
PDMF9	99	<i>Flavobacterium resistens</i>	EF575563	Flavobacteria
PDMF10	98	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	BATI01000076	Gammaproteobacteria
PDMF11	99	<i>Pseudoxanthomonas japonensis</i>	AB008507	Gammaproteobacteria
PDMYE1	99	<i>Pseudomonas mosselii</i>	AF072688	Gammaproteobacteria
PDMYE5	99	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i>	CP009048	Gammaproteobacteria
PDMYE8	99	<i>Aeromonas media</i>	CDBZ01000012	Gammaproteobacteria
WDM8	99	<i>Pseudomonas veronii</i>	JYLL01000074	Gammaproteobacteria
WDMF2	99	<i>Delftia acidovorans</i>	JOUB01000005	Betaproteobacteria
WDMF6	99	<i>Pseudomonas saponiphila</i>	FNTJ01000001	Gammaproteobacteria
WDMF7	99	<i>Pseudomonas protegens</i>	CP003190	Gammaproteobacteria
WDMF8	99	<i>Pseudomonas protegens</i>	CP003190	Gammaproteobacteria
WDMF10	99	<i>Rhizobium oryzae</i>	KX129901	Alphaproteobacteria
WDMF11	99	<i>Rhodanobacter thiooxydans</i>	AJXW01000099	Gammaproteobacteria
WDMF12	98	<i>Shinella kummerowiae</i>	EF070131	Alphaproteobacteria
WDMYE1	98	<i>Bacillus proteolyticus</i>	MACH01000033	Bacilli
WDMYE3	99	<i>Delftia lacustris</i>	JGI.1102360	Betaproteobacteria
WDMYE4	98	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	APQQ01000002	Gammaproteobacteria
WDMYE7	98	<i>Aeromonas salmonicida</i>	LSGW01000109	Gammaproteobacteria
WDMYE8	94	<i>Bacillus gaemokensis</i>	LTAQ01000012	Bacilli

GROUNDWATER

39 Isolati batterici

La maggioranza appartiene al Phylum dei Proteobatteri

Presenza di Flavobacteria e Bacillus

La classe maggiormente rappresentata è quella dei Gamma-Proteobatteri

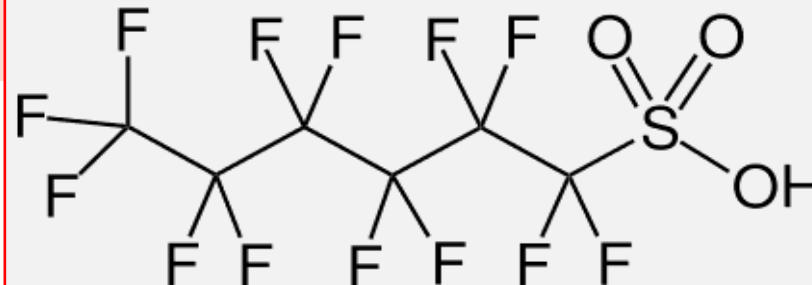
Il genere più rappresentato è *Pseudomonas*



ANALISI FISILOGICHE E BIOCHIMICHE IN COLTURA PURA

Analisi Tossicità su
PFAS-mix

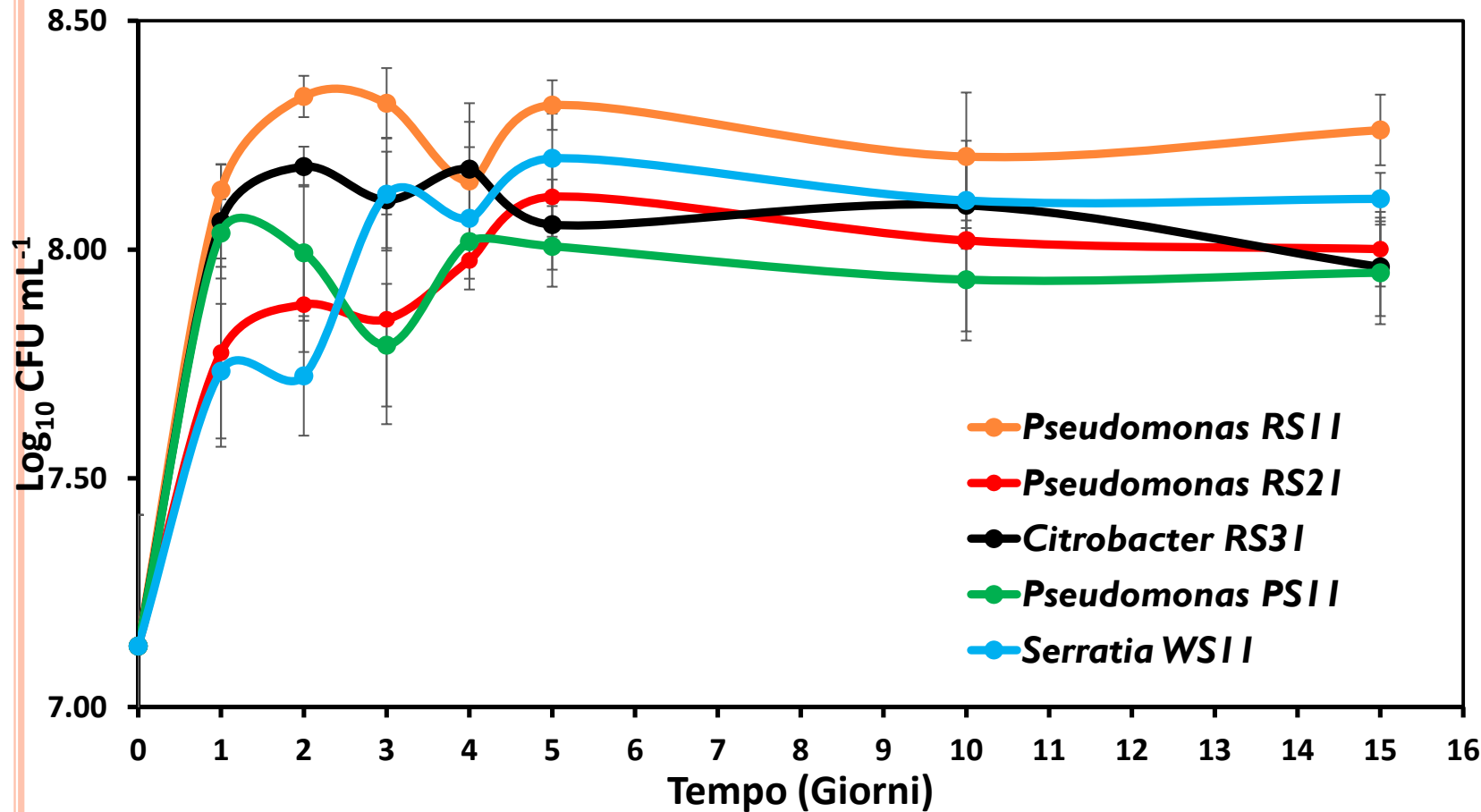
Valutazione crescita su
PFHxS 20mg/L (50 μ M)
come substrato
carbonioso



Acido Tridecafluoroesansulfonico, PFHxS

Valutazione crescita
su co-substrati
carboniosi:
alcoli e alcani

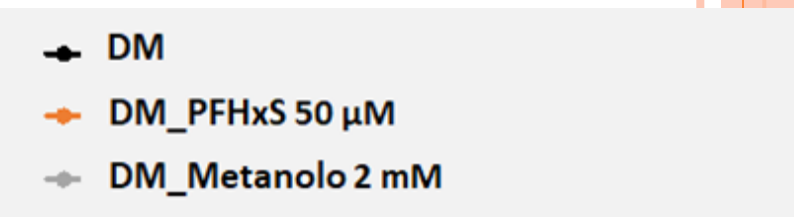
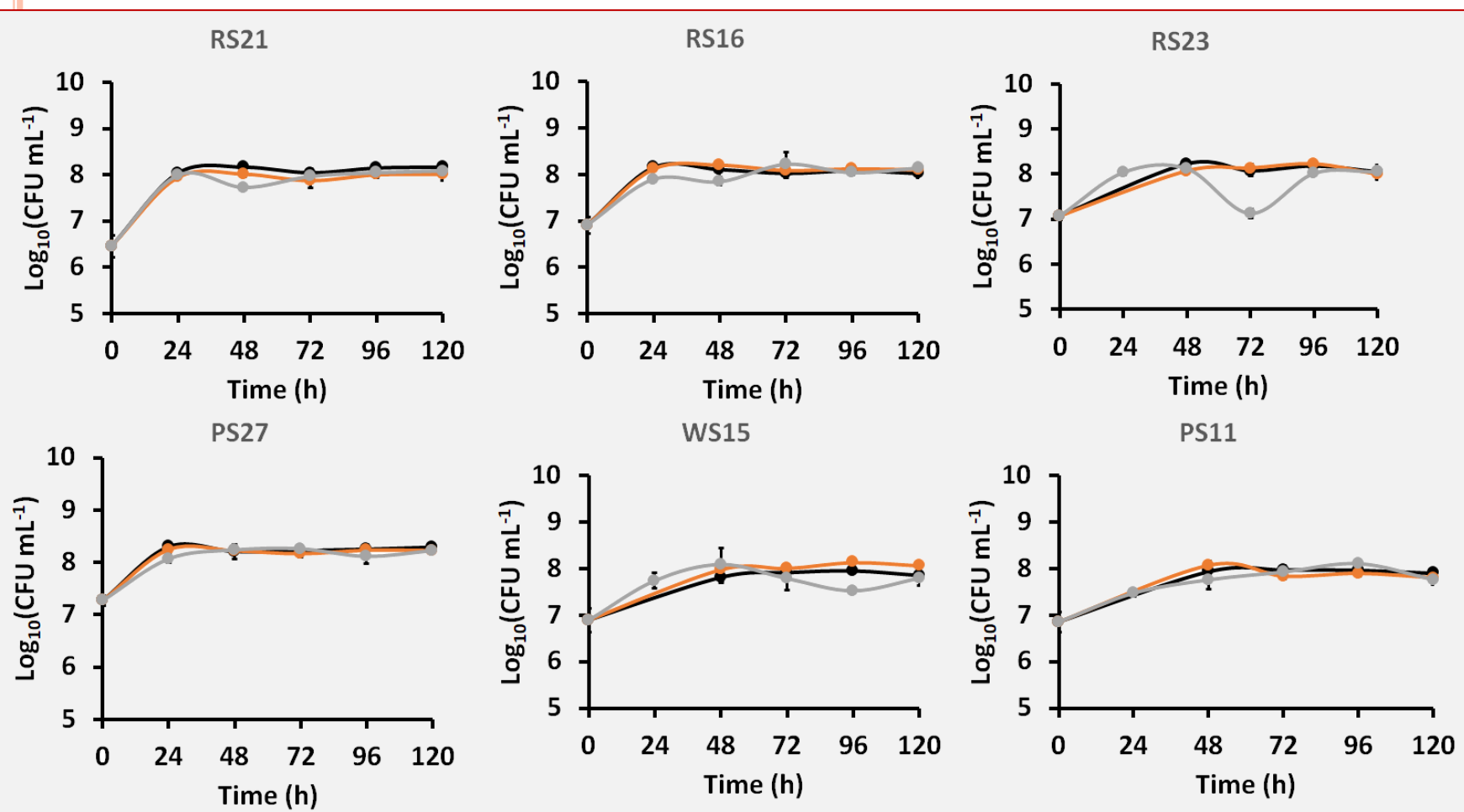
**Analisi della tossicità sugli isolati batterici
cresciuti in mezzo definito (DM) addizionato con 200 ng/L di PFAS-Mix**



- Ceppi coltivati su DM+PFAS-mix 200ng/L per 15 giorni,
- Nonostante lievi differenze, tutti i ceppi testati riescono a tollerare tale concentrazione di PFAS.



Curve di crescita per *Pseudomonas sp.* SU PFHxS 50 μ M



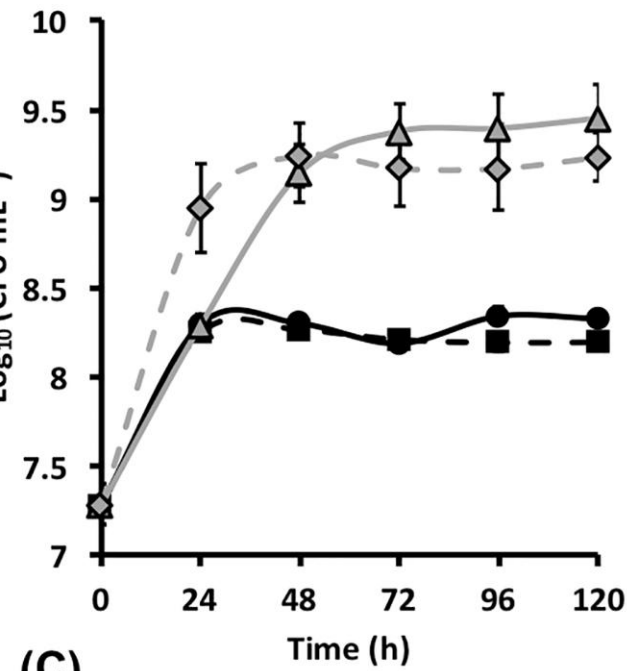
- Il PFHxS a tali concentrazioni non risulta tossico per la crescita
- **Nessun ceppo** riesce ad utilizzare PFHxS come fonte di C primaria

ANALISI DELL'ABBATTIMENTO di PFHxS con co-substrati in coltura liquida

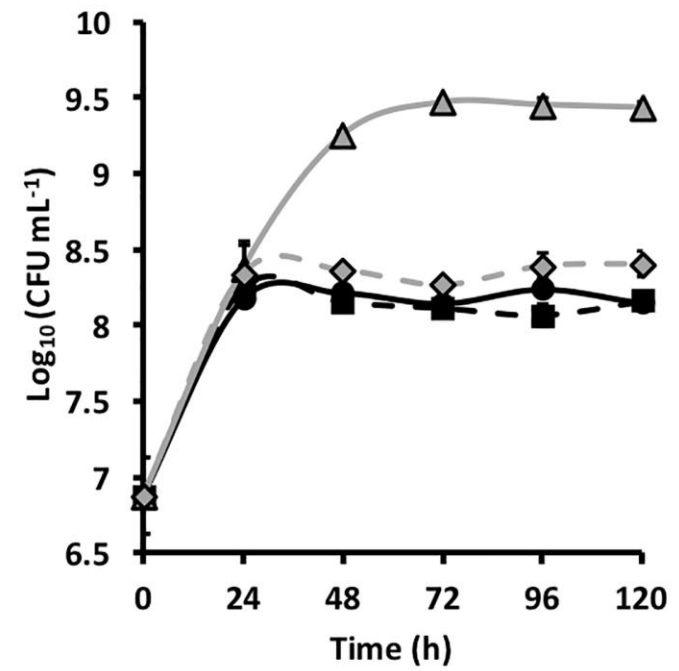
1- Ottano 61,5 mM
2- Mix EtOh:Ottano
1:1 (V/V)

Growing cell
VS
Resting cell

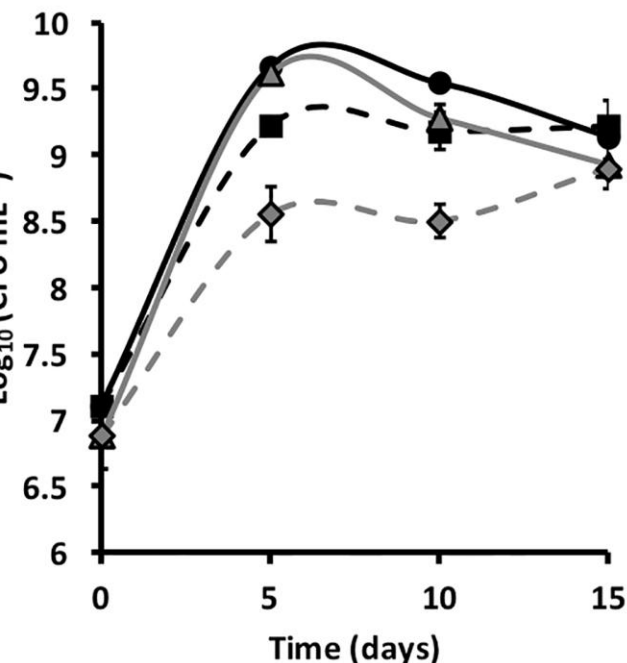
PS27 – *Pseudomonas* sp. from soil (99% identity to *P. humi* / *P. delhiensis*)
PDMF10 – *Pseudomonas* sp. from groundwater (98% identity to *P. alcaligenes*)

(A)**PS27****(B)****PDMF10** CIRCE2020: La depurazione dei PFAS nell'ottica dell'economia circolare.

11 Maggio 2020



- DM
- PFHxS
- ▲ Octane
- ◆ EtOH-Octane

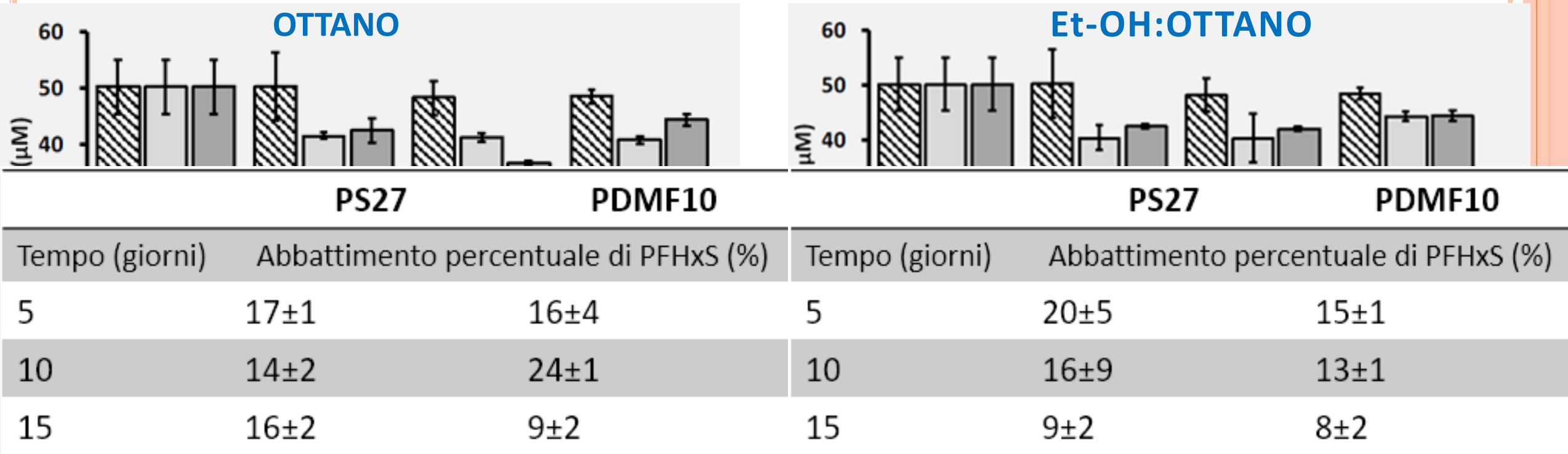
(C)

- PS27 Octane/PFHxS
- PS27 EtOH-Octane/PFHxS
- ▲ PDMF10 Octane/PFHxS
- ◆ PDMF10 EtOH-Octane/PFHxS

- Una concentrazione di $50 \mu\text{M}$ di PFHxS non risulta tossica per PDMF10 e PS27
- PDMF10 e PS27 crescono attivamente su ottano $61,5 \text{ mM}$ e su etanolo:ottano (con qualche differenza).

Growth profiles of **PS27** (A) and **PDMF10** (B) environmental isolates cultured in DM only or supplied with PFHxS, octane, or the mixture ethanol-octane as the only source of carbon and energy. In (C) is shown the trend of bacterial growth while the cells are incubated in DM amended with organic solvents alongside PFHxS

RIMOZIONE DI PFHxS da parte di PS27 E PDMF10 cresciuti come GROWING CELLS



■ DM_PFHxS 50 μM

□ PS27 DM_Ottano 61,5 mM_PFHxS 50 μM

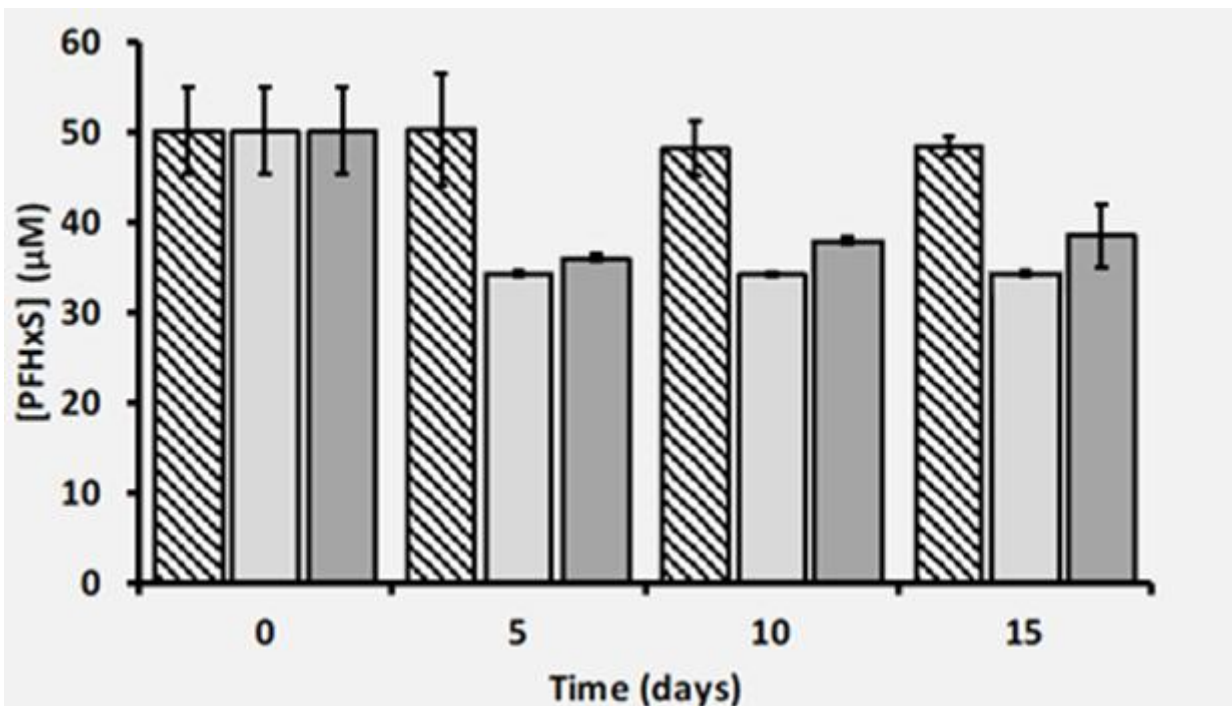
■ PDMF10 DM_Ottano 61,5 mM_PFHxS 50 μM

■ DM_PFHxS 50 μM

□ PS27 DM_EtOh:Ottano_1:1_17,4 mM : 6 mM_PFHxS 50 μM

■ PDMF10 DM_EtOh:Ottano_1:1_17,4 mM : 6 mM_PFHxS 50 μM

RIMOZIONE DI PFHxS da parte di PS27 E PDMF10 cresciuti come RESTING CELLS

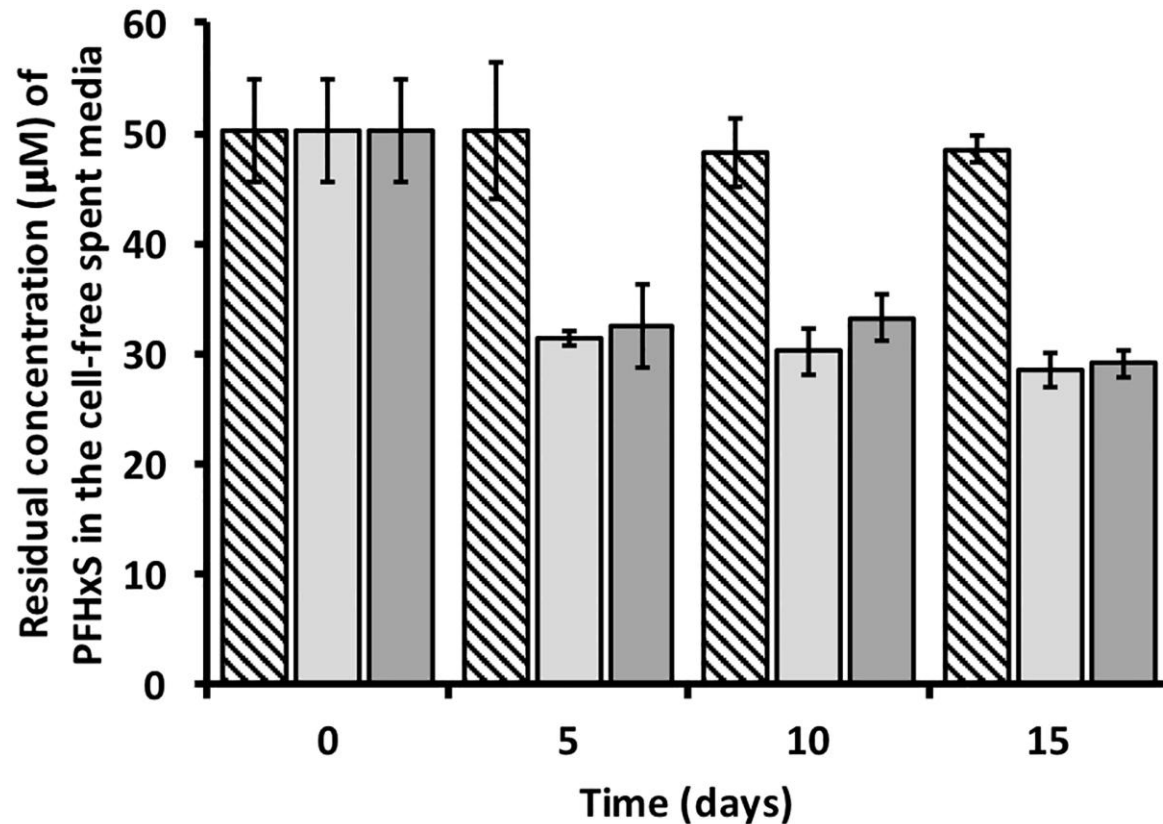


- ▨ DM_PFHxS 50 µM
- PS27 DM_EtOh:Ottano_1:1_17,4 mM : 6 mM_PFHxS 50 µM
- PDMF10 DM_Ottano 61,5 mM_PFHxS 50 µM

	PS27	PDMF10
Tempo (giorni)	Abbattimento percentuale di PFHxS (%)	
5	32±1	28±1
10	29±1	21±1
15	29±1	21±7

Removal efficacy of PFHxS performed by **PS27** and **PDMF10 resting cells** under ethanol-octane and octane conditioning, respectively.

RIMOZIONE DI PFHxS da parte di PS27 E PDMF10 IN COLTURA MISTA



Rimozione/accumulo di 40 ± 3 %

- Abiotic control
- Ethanol-octane conditioning
- Octane conditioning

Removal efficacy of PFHxS performed by the **mixed microbial culture** under either ethanol-octane or octane conditioning.

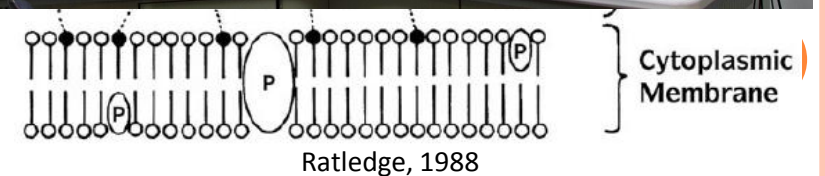
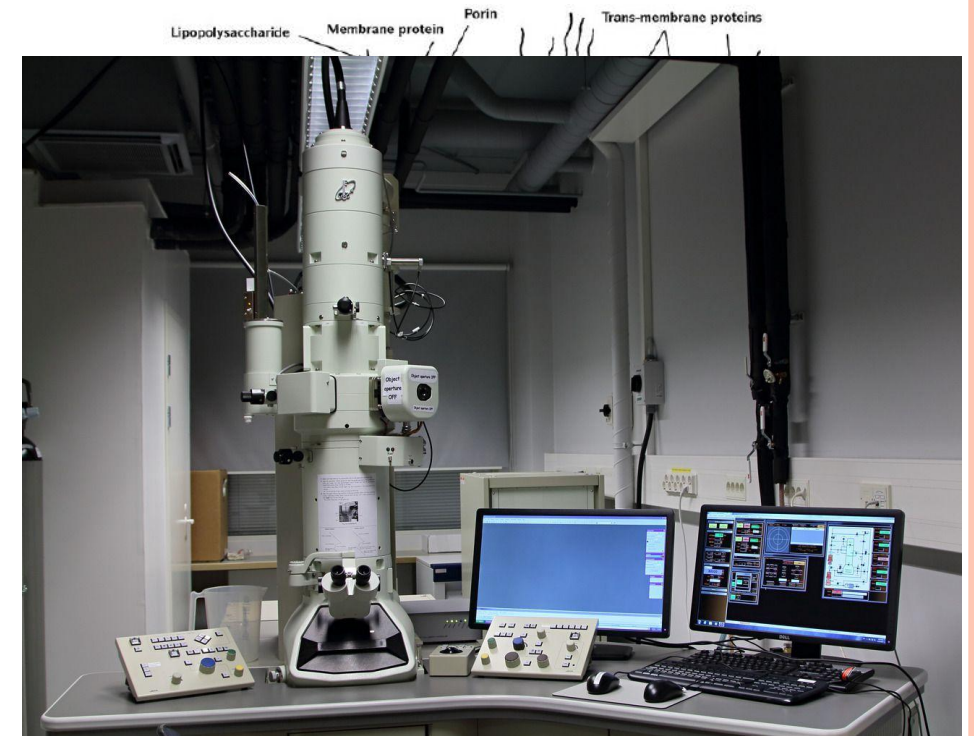
CONCLUSIONI

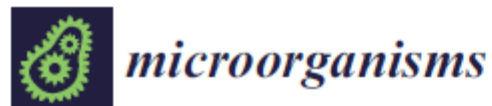
- Mediante *enrichment cultures* da matrici ambientali contaminate da PFAS sono stati ottenuti in coltura pura 32 e 39 isolati batterici, rispettivamente per suolo e acqua.
- Gli isolati appartengono principalmente al phylum dei Proteobacteria di cui circa il 50% appartiene al genere *Pseudomonas sp.*
- Tutti gli isolati ambientali analizzati tollerano il PFHxS alla concentrazione testata di 20 mg/L (50 µM),
- Il PFHxS **non** viene utilizzato come fonte di carbonio primaria.
- In condizioni ottano-inducenti e EtOH-ottano-inducenti si è rilevato per ***Pseudomonas sp. PS27*** e **PDMF10** una rimozione/accumulo di **PFHxS** pari a $24 \pm 1\%$ (PDMF10) and $16 \pm 9\%$ (PS27) in condizione di ***Growing cells***.
- In condizioni di ***Resting cell*** si sono ottenute le performance di rimozione/accumulo del PFHxS migliori e stabili nei 15 giorni fa parte di *Pseudomonas sp. PS27* e PDMF10
- In condizioni di Resting cells e utilizzando una mixed culture di PS27 e PDMF10 si ottiene una **rimozione/accumulo di $40\% \pm 3$ di PFHxS**
- In tutte le prove di abbattimento non sono stati rilevati intermedi del PFHxS



PROSPETTIVE FUTURE



- Analisi fisiologiche e morfologiche dei ceppi PS27 e PDMF10 esposti alle PFAS: lipidomica, TEM
- Implementazione prove in mesocosmo su scala di laboratorio da PS27 e PDMF10
- Isolamento ed indagine sulla biomassa fungina





Article

On the Ability of Perfluorohexane Sulfonate (PFHxS) Bioaccumulation by Two *Pseudomonas* sp. Strains Isolated from PFAS-Contaminated Environmental Matrices

Alessandro Presentato ¹, Silvia Lampis ^{2,*}, Andrea Vantini ³, Flavio Manea ³, Francesca Daprà ³, Stefano Zuccoli ² and Giovanni Vallini ²

¹ Department of Biological, Chemical and Pharmaceutical Sciences and Technologies (STEBICEF), University of Palermo, 90128 Palermo, Italy; alessandro.presentato@unipa.it

² Department of Biotechnology, University of Verona, 37134 Verona, Italy; stefano.zuccoli@studenti.univr.it (S.Z.); giovanni.vallini@univr.it (G.V.)

³ Regional Agency for Environmental Prevention and Protection of Veneto (ARPAV), Regional Laboratories, 37135 Verona, Italy; andrea.vantini@arpa.veneto.it (A.V.); flavio.manea@arpa.veneto.it (F.M.); francesca.dapra@arpa.veneto.it (F.D.)

* Correspondence: silvia.lampis@univr.it; Tel.: +39-045-8027095

Received: 29 November 2019; Accepted: 7 January 2020; Published: 9 January 2020



check for updates

