

Risanamento di falde acquifere contaminate da solventi clorurati mediante impiego di batteri dealogenanti.

Il problema.

Numerosi siti acquiferi risultano oggi pesantemente contaminati da solventi clorurati, per anni utilizzati in vari settori industriali e pervenuti nelle acque sotterranee a seguito di impropri metodi di manipolazione e smaltimento. Tali contaminazioni sono iniziate sin dagli anni 50, si sono protratte per alcuni decenni, e riguardano oggi acquiferi di numerosi Paesi industrializzati, compresi l'Italia. La legislazione in Italia è oggi molto restrittiva e prevede la decontaminazione del sito da parte dei responsabili della contaminazione o, nell'impossibilità di individuarli, da parte degli attuali proprietari o della Amministrazione Pubblica (D.L. 471, 1998).

A differenza degli idrocarburi alifatici, che galleggiano sugli acquiferi e sono facilmente degradati per via aerobica, gli idrocarburi alogenati alifatici hanno densità nettamente maggiore di quella dell'acqua, mentre la loro viscosità è considerevolmente minore. Entrambe queste proprietà favoriscono una loro veloce migrazione attraverso il suolo con il conseguente raggiungimento delle falde acquifere, dove questi composti tendono a depositarsi sulla base impermeabile della falda stessa a causa della differenza di densità con l'acqua, disperdendosi così lungo la direzione del flusso dell'acqua. I composti organo-alogenati, specie se ad elevato grado di alogenazione (quali il tri ed il tetra cloroetilene), difficilmente vanno incontro a demolizioni microbiche di tipo ossidativo, mentre è favorita la loro riduzione: possono essere degradati cioè solo in condizioni anaerobiche, quando si registrano nella falda condizioni redox estremamente basse. Numerosi di questi composti, ma soprattutto alcuni dei loro prodotti di decomposizione presentano una elevata tossicità: è il caso ad esempio del dicloroetilene e del cloruro di vinile (il tristemente noto CVM) che tendono a formarsi per riduzione parziale del PCE. In presenza però di appropriati microrganismi e di idonei substrati e condizioni, il processo biologico di decontaminazione si spinge fino alla completa riduzione degli eteni clorurati, con formazione dell'innocuo etilene a partire dai vari intermedi clorurati ad alta tossicità; anche il CVM può venire quindi completamente ridotto ad etilene.

I microrganismi coinvolti nel processo di formazione dell'etilene.

Estremamente complesso è il funzionamento delle comunità microbiche coinvolte nel processo di dealogenazione riduttiva, con numerose microrganismi all'opera in serie, secondo processi metabolici e cometabolici. I tradizionali metodi microbiologici di isolamento dei vari componenti i consorzi batterici, sono molto spesso non idonei, date le particolari esigenze nutrizionali dei loro componenti. Conoscere i componenti delle biomasse microbiche dealogenanti, è fondamentale al fine della conduzione del processo di bonifica delle falde, che può avvenire o all'interno di reattori biologici esterni al sito contaminato, o all'interno degli acquiferi stessi (biorisanamento in situ).

*Individuazione del batterio dealogenante *Dehalococcoides ethenogenes* in biomasse derivate da siti contaminati del Nord Italia*

E' stato possibile rilevare all'interno di vari consorzi microbici anaerobici dealogenanti, sviluppati da canali industriali della Zona Lagunare di Venezia e da carote di terreno provenienti da un sito acquifero contaminato situato in Provincia di Milano, la presenza del batterio *Dehalococcoides ethenogenes*, che è al momento l'unico batterio conosciuto, in grado di condurre la dealogenazione riduttiva del TCE fino ad etilene. La tecnica utilizzata, nota come "Ibridazione fluorescente *is situ* (FISH)" consente di avere una risposta visiva nell'arco di tre ore ed è basata sull'impiego di una sonda biomolecolare annessa ad un fluorocromo, evidenziabile tramite microscopia ottica in epifluorescenza. La sonda biomolecolare (Figura 1) è costituita da una breve ma specifica sequenza di basi, in grado di legarsi all'RNA ribosomiale, trovando la complementarità che consente il legame, e poi la successiva evidenziazione del fluorocromo in microscopia ad epifluorescenza. La Figura 2 evidenzia i tipici cocci di *Dehalococcoides ethenogenes* che appaiono in colore giallo (in seguito al legame contemporaneo con la sonda generale per gli Eubatteri, marcata con un fluorocromo che emette fluorescenza rossa, e la sonda specifica per il genere *Dehalococcoides*, marcata con fluoresceina che emette fluorescenza verde), all'interno di un arricchimento microbico proveniente da un canale industriale. La possibilità di identificare rapidamente la presenza di tale batterio, riscontrata per ora solo negli USA ed in alcuni Paesi Europei, rappresenta un passo importante per l'avvio di processi di biorisanamento, che possono quindi essere efficacemente monitorati.

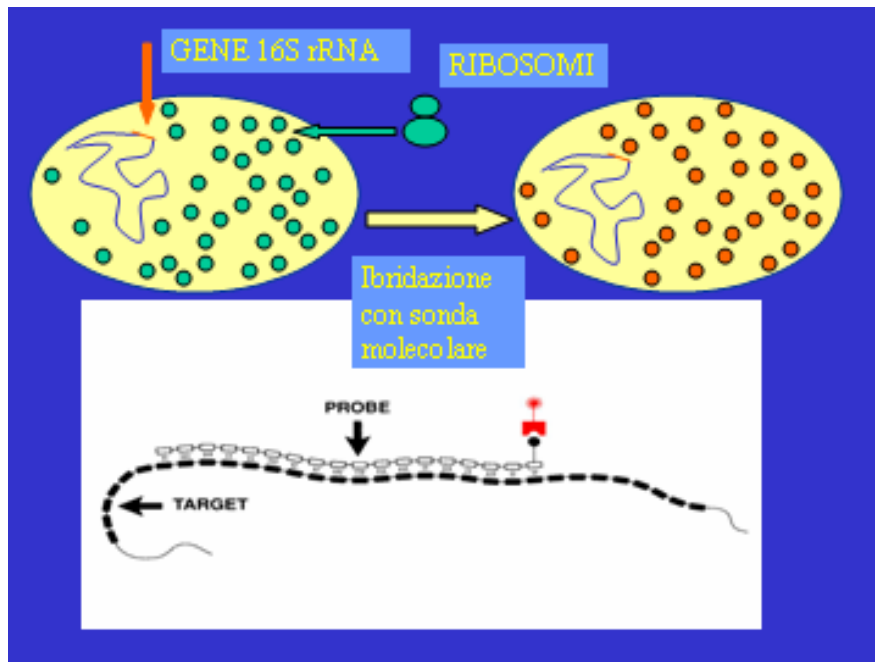


Figura 1. Principio della tecnica di Ibridazione Fluorescente *in situ* (FISH)

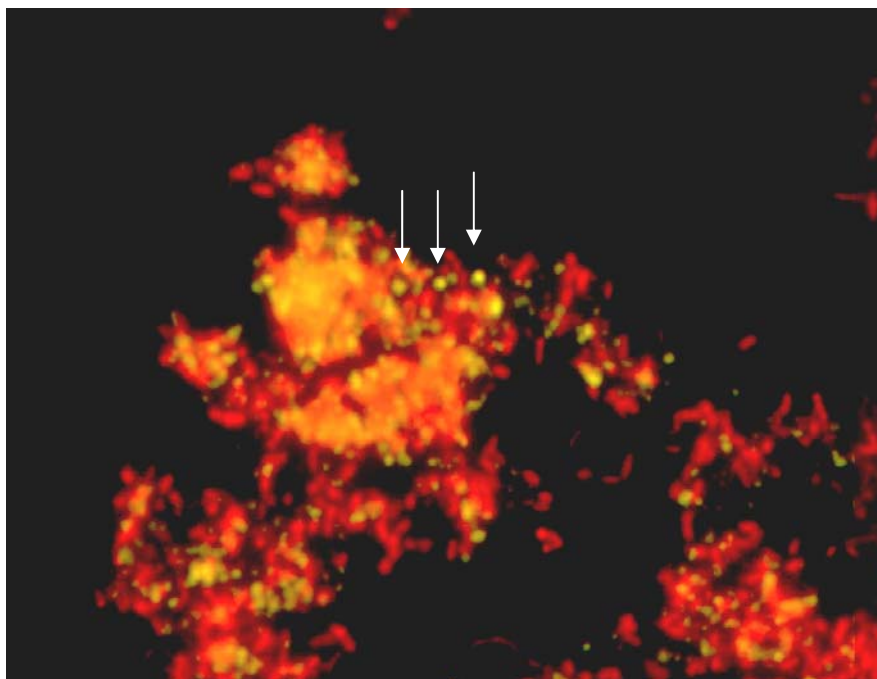


Figura 2. Cellule di *Dehalococcoides ethenogenes* (di colore giallo) messe in evidenza tramite FISH e microscopia ad epifluorescenza.

Uses of dechlorinating bacteria for bioremediation of ground water contaminated by organo-halogenated compounds.

Object of the study

The contamination of aquifers by chlorinated solvents, caused by their widespread use in industrial processes and their improper handling and disposal, is today a major problem. The pollution of water resources by organo-halogenated compounds, started during 50s and continued for several decades, and is common to all the industrialised countries, including Italy. For the Italian legislation the decontamination of the polluted site by the responsible of the pollution or, if unknown, preliminarily by the public administration, is mandatory (D.L. 471, 1998).

Differently from homologous aliphatic compounds, that floats on the water surface and are easily aerobically degraded, the halogenated hydrocarbon are denser and less viscous than water and therefore can rapidly reach the aquifer percolating through the ground and depositing on the aquifer bottom. Highly chlorinated compounds, such as trichloroethene (TCE) and tetrachloroethene (PCE), for their oxidised nature cannot be aerobically degraded by microbial actions while they can be dehalogenated in anaerobic condition by reductive dechlorination (RD). The reduced compounds, as dichloroethylene and vinyl chloride particularly, are of major concern for their suspected or ascertained carcinogenicity, leading to the setting of very low maximum admissible limits in drinking water.

However the presence of appropriate microorganisms, suitable substrates and conditions, can lead to the complete microbial degradation of these toxic chlorinated ethenes to the innocuous ethylene, a compound environmentally quite acceptable.

Microorganisms of anaerobic dechlorinating consortia involved in the ethylene production process.

Complex metabolic and cometabolic, processes, catalyzed by many different bacterial populations, are involved in the reductive dehalogenation of chloroethenes by microbial consortia. The knowledge of these dehalogenating consortia composition is crucial for bioremediation of polluted ground water either by *in situ* (directly in the aquifer) or *ex situ* (in biological reactors) processes. Traditional microbiological methods for the identification of bacteria, thought their isolation, are not suitable for description of dechlorinating communities considering the particular microbial components nutritional requirements.

*Detection of the dechlorinating bacterium *Dehalococcoides ethenogenes* in mixed microbial biomasses enriched from contaminated sites in Northern Italy*

Dehalococcoides ethenogenes is, at present, the only known bacterium able to perform the complete dechlorination of PCE to ethylene. The presence of this eclectic microorganism has been detected in anaerobic dehalogenating consortia developed from samples of contaminated sites: polluted industrial channels and ground water aquifers in Venice and Milan areas.

The approach utilised, known as fluorescent *in situ* hybridization (FISH analysis) is a rapid methodology (the response is obtained within three hours) based on the use of a molecular probe connected to a fluorescent compound that can be visualised by optic/fluorescent microscopy. The molecular probe (Figure 1) is a short synthetic nucleotide strand whose sequence is exactly complementary to a specific sequence present in the bacterial ribosomal

RNA, characteristic of each microorganisms. The specific binding of the fluorescent probe to the complementary site in the target microorganisms allows its detection within a complex biomass by optic/fluorescent microscopy. In Figure 2 the characteristic cells of *Dehalococcoides ethenogenes* appear as yellow cocci in a mixed biomass. The yellow colour of this bacterium is the out-come of the contemporaneous binding on its cells of the probe specific for Eubacteria (in red) and that specific for the genus *Dehalococcoides* (in green). The rapid identification, by molecular methods, of *Dehalococcoides ethenogenes* in complex microbial communities represent an extremely valuable tools for monitoring the proper course of bioremediation process.

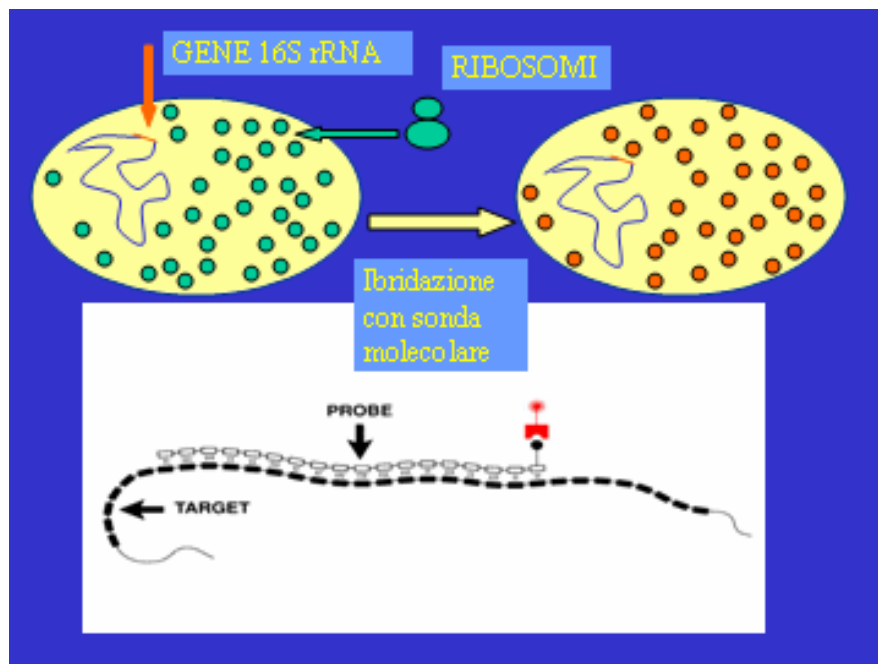


Figure 1. The Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) approach.

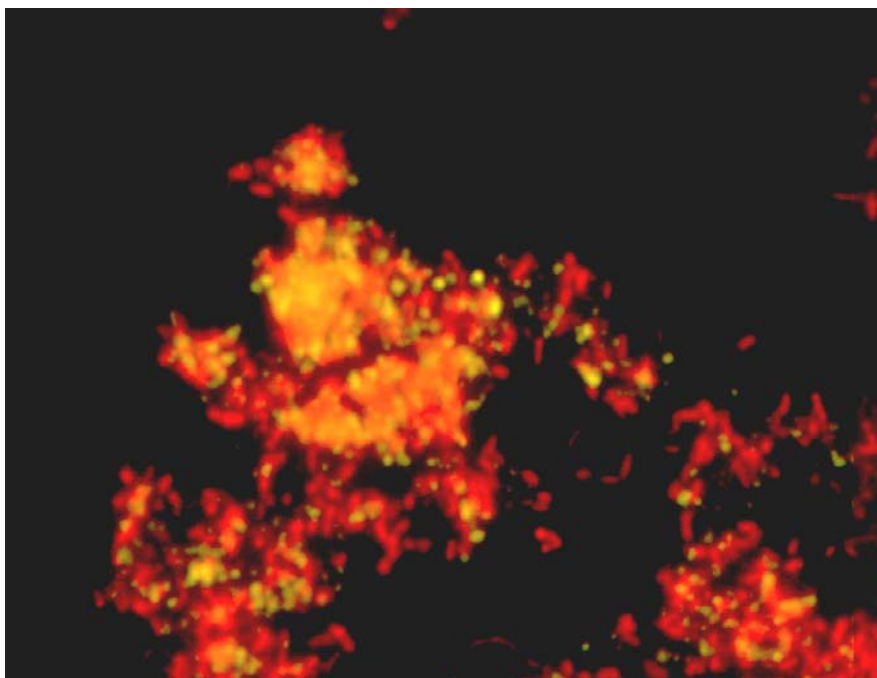


Figure 2. Cells of *Dehalococcoides ethenogenes* (in yellow) detected by FISH and visualised with fluorescent microscopy.