



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dipartimento di Farmacia

Dottorato di ricerca
in **Biologia dei Sistemi**
Ciclo XIII — Anno di discussione 2015

Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa *Antonella Leone*

Degradazione di idrocarburi policiclici aromatici (IPA) in suoli contaminati

settore scientifico disciplinare di afferenza: **BIO/07**

Dottorando

Dott.ssa *Raffaella Morelli*

Tutore

Chiar.ma Prof.ssa *Anna Alfani*

ABSTRACT

Abstract.....	1
---------------	---

SOMMARIO

Sommario	2
----------------	---

PREMESSA

Premessa.....	3
---------------	---

CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE

1.1 L'inquinamento del suolo	5
1.2 Idrocarburi policiclici aromatici	6
1.2.1 Generalità, fonti e processi di formazione	6
1.2.1 Proprietà chimico-fisiche	8
1.2.1 Tossicità.....	9
1.2.1.1 Tossicità per i microrganismi.....	12
1.2.1 Gli IPA nel suolo	12
1.3 Degradazione degli IPA	13
1.3.1 Gli enzimi IPA-degradatori	16
1.4 Biodisponibilità	18
1.4 Bioremediation	19

CAPITOLO 2 - OBIETTIVO DELLA RICERCA

2.1 Obiettivo della ricerca	21
-----------------------------------	----

CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI

3.1 Identificazione del suolo oggetto di sperimentazione.....	23
3.2 Piano sperimentale e allestimento dei mesocosmi	27
3.3 Prelievo e trattamento dei campioni.....	29
3.4 Procedure analitiche	30
3.4.1 Tenore idrico e sostanza organica	30
3.4.2 pH	31
3.4.3 Concentrazioni totali di IPA.....	31
3.4.4 Concentrazioni biodisponibili di IPA	32
3.4.5 Attività laccasica.....	33
3.4.6 Attività catecolo-ossidasi	34
3.4.7 Attività perossidasi totale.....	35
3.4.8 Profilo degli acidi grassi dei fosfolipidi (PLFA)	45
3.5 Analisi statistica dei dati	38

CAPITOLO 4 - RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Parametri chimico-fisici	40
4.2 Idrocarburi policiclici aromatici	42
4.3 Attività enzimatiche	49
4.4 Biomassa e struttura della comunità microbica	52

CONCLUSIONI

Conclusioni	57
-------------------	----

BIBLIOGRAFIA

Bibliografia	I-XIII
--------------------	--------

RINGRAZIAMENTI

Ringraziamenti

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons are complex compounds produced by incomplete combustion processes in conditions of high temperature and oxygen deficiency. Scientific interest in these compounds is related to their carcinogenic nature that comes from metabolic transformations in diol-epoxides, which bind to DNA inducing genetic mutations and carcinogenicity.

Soil PAH contamination is becoming a significant problem because of accumulation in soil organic-clay fraction due to PAH hydrophobic character.

Bioremediation is one of the techniques can be used to reclaim polluted sites. Soil microbial community is able to degrade these pollutants thanks to ability to synthesize ligninolytic enzymes. These enzymes have a low substrate specificity and can use PAHs as substrates, thanks to chemical similarity with lignin.

The aim of this project was studying PAH degradation in soil in relation with microbial activity. For this purpose ten soils have been characterized and one of them has been chosen for preparation of mesocosms in controlled environmental conditions. This soil has been sampled and polluted with two PAHs, benzo[a]pyrene and anthracene (150 µg/g everyone). Mesocosms have been prepared in three different treatments: the contaminated control, the contaminated compost amended soil, the contaminated fungi (*A. mellea*, *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *S. ferrei*, *S. citrinum*) amended one.

The mesocosms have been incubated for 273 days, during which PAH concentrations, enzymatic activities involved in their degradation (laccase, catechol-oxidase and total peroxidase activities), biomass and structure of microbial community through PLFA profile and some chemical and physical parameters (water and organic contents and pH) have been monitored. In all three soils anthracene decreased very quickly reaching a residue of 4%, instead benzo[a]pyrene was down to 50% more slowly after 273 days of incubation. The rate of degradation was greater in amended soils than in control one. Peroxidase activity is the only enzymatic one that showed higher values in soils amended with fungi and compost compared with control soil. Only laccase activity showed a relation with PAH dynamics. The microbial and fungal biomasses decreased after 273 day in all three soils. Structure of microbial community changed at the end of the experiment in the three soils on behalf of methanotrophic bacteria.

This results provide important information about process of PAH degradation, but more studies are needed depth to be able to apply in field bioremediation interventions.

Sommario

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono composti complessi derivanti principalmente dal processo di combustione incompleta di qualunque materiale organico in carenza di ossigeno. L'interesse scientifico per questa classe di composti è legato principalmente alla loro riconosciuta azione cancerogena che deriva dalle trasformazioni metaboliche degli IPA in diolo-epossidi, molecole in grado di legarsi al DNA e di indurre mutazioni genetiche e cancerogenicità.

La contaminazione di IPA nel suolo sta diventando un problema di grande interesse a causa dell'accumulo nella frazione organo-argillosa, che è attribuibile principalmente al carattere idrofobico di questi contaminanti.

La bioremediation è una delle tecniche che può essere utilizzata per bonificare i siti contaminati da IPA. La comunità microbica del suolo, infatti, è in grado di degradare questi contaminanti organici grazie alla capacità di sintetizzare enzimi ligninolitici con una bassa specificità di substrato. Grazie a questa caratteristica e alla somiglianza chimica degli IPA con la lignina, gli enzimi ligninolitici possono utilizzare gli IPA come substrati.

Lo scopo di questo progetto è stato quello di studiare la degradazione degli IPA nel suolo in funzione dell'attività microbica. A tale proposito sono stati caratterizzati dieci suoli, uno tra i quali è stato selezionato per l'allestimento di mesocosmi in condizioni controllate. Il suolo prescelto è stato campionato e contaminato con due IPA, il benzo[a]pirene e l'antracene (150 µg/g everyone). I mesocosmi sono stati allestiti in tre diversi trattamenti: il suolo tal quale, il suolo addizionato con compost e il suolo addizionato con funghi (*A. mellea*, *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *S. ferrei* e *S. citrinum*).

I mesocosmi sono stati incubati per 273 giorni, nel corso dei quali sono stati monitorati i seguenti parametri: le concentrazioni degli IPA, le attività enzimatiche coinvolte nel processo di degradazione (attività laccasica, catecolo-ossidasi e perossidasi totale), la biomassa e la struttura della comunità microbica mediante lo studio del profilo dei PLFA ed alcuni parametri chimico-fisici (tenore idrico, contenuto di sostanza organica e pH).

In tutti e tre i suoli nel corso dei 273 giorni l'antracene è stato degradato molto velocemente fino a raggiungere una quantità residua intorno al 4%, mentre il benzo[a]pirene si è ridotto circa del 50%, mostrando una dinamica più lenta. La degradazione nei suoli con compost e con funghi è risultata più rapida rispetto al suolo tal quale. L'attività perossidasi totale è l'unica attività enzimatica che ha mostrato valori più alti nei due suoli addizionati rispetto al suolo tal quale. Soltanto l'attività laccasica ha mostrato una relazione con le dinamiche dei due IPA. In tutti e tre i suoli la biomassa microbica e la biomassa fungina si sono ridotte dopo 273 giorni di incubazione. La struttura della comunità a fine esperimento si è modificata in tutti e tre i suoli a favore dei batteri metanotrofi.

Questi risultati hanno fornito importanti informazioni sul processo di degradazione degli IPA, sebbene sia necessario approfondire ulteriormente la tematica al fine di poter applicare in campo interventi efficienti di bioremediation.

Premessa

Come riportato nella Comunicazione COM 179 del 2002 dal titolo “*Towards a Thematic Strategy for Soil Protection*”, il suolo, definito come lo strato superficiale della crosta terrestre, costituito da sostanze minerali, sostanza organica, aria, acqua e organismi viventi, svolge una serie di funzioni chiave indispensabili dal punto di vista ambientale, sociale ed economico. Esso rappresenta l’habitat per numerose specie vegetali, animali e microbiche ed è la sede dei processi di decomposizione che permettono la liberazione dei nutrienti e la chiusura del ciclo della materia; svolge un ruolo essenziale per la protezione della risorsa idrica grazie alle capacità tamponante, filtrante, di immagazzinamento e di trasformazione dei composti chimici; nei sistemi terrestri il suolo rappresenta il substrato di crescita delle radici ed assicura un costante rifornimento di acqua e di nutrienti per le piante; è una fonte di materie prime, un pool genico, un sink di carbonio, un elemento del patrimonio paesaggistico-culturale. Pertanto rappresenta una risorsa indispensabile per la vita, ma al tempo stesso è una risorsa non rinnovabile in quanto i processi naturali di formazione e rigenerazione sono estremamente lenti rispetto ai processi di degradazione cui il suolo è costantemente sottoposto in seguito alle attività antropiche.

Secondo quanto riportato dalla Commissione dell’Unione Europea (2006), a causa dello sfruttamento intensivo e della cattiva gestione, i suoli sono soggetti ad una serie di processi degradativi, talvolta irreversibili, quali: l’erosione, la riduzione del contenuto di sostanza organica, la contaminazione locale o diffusa, la compattazione, l’impermeabilizzazione, la riduzione della biodiversità, la salinizzazione, le inondazioni e gli smottamenti. Tutto questo porta ad una riduzione della capacità del suolo di assolvere alle sue numerose funzioni, ripercuotendosi sulla qualità delle acque e dell’aria, sulla biodiversità e sui cambiamenti climatici, sulla salute dei cittadini, sulla sicurezza dei prodotti destinati all’alimentazione. Attualmente la degradazione dei suoli sta aumentando; la Commissione Europea (2006) stima nell’intero territorio comunitario una superficie di 157 milioni di ettari di suolo soggetti ad erosione, un contenuto di carbonio organico compreso tra lo 0% e il 2% nel 45% dei suoli europei, una superficie di 3.8 milioni di ettari di suolo colpiti dal fenomeno della salinizzazione, 3.5 milioni di siti potenzialmente contaminati. Pertanto la Commissione ha ritenuto opportuno adottare una proposta di direttiva comunitaria (Soil Framework Directive) al fine di istituire un quadro normativo di riferimento per gli Stati Membri indirizzato alla protezione del suolo ed, in particolare, al mantenimento della capacità di assolvere alle proprie funzioni ecologiche e socio-economico-culturali, adottando misure per la riduzione delle minacce precedentemente elencate.

Una delle tematiche meno affrontate e più controverse a livello comunitario è rappresentata dal problema della contaminazione del suolo. Infatti la gestione dei siti contaminati rappresenta uno dei maggiori problemi ambientali in Europa e la presenza di sostanze pericolose in suolo, sottosuolo ed acque sotterranee, derivanti da attività industriali e minerarie, perdite da serbatoi e linee di trasporto di idrocarburi, siti di stoccaggio di rifiuti di ogni genere, è uno dei fattori che mette più a rischio la salute umana e gli interi ecosistemi. Pertanto la proposta di una direttiva sul suolo mira proprio a colmare i vuoti legislativi esistenti soprattutto in merito alla contaminazione, in modo da uniformare gli Stati Membri in materia di bonifica di siti contaminati.

A livello nazionale la prima normativa organica italiana in materia di siti contaminati è il DM 471/99. Il decreto introduce una serie di definizioni sulle tipologie di sito (contaminato, potenzialmente contaminato) e sulle possibili misure da adottare

PREMESSA

in caso di contaminazione (messa in sicurezza d'emergenza, messa in sicurezza permanente, bonifica ecc.), stabilisce le procedure amministrative da attuare negli interventi, definisce i valori limite per circa 100 sostanze chimiche nelle matrici suolo, sottosuolo e acque sotterranee, indica i criteri per la caratterizzazione dei siti, per la scelta delle tecnologie di bonifica da adottare e per l'applicazione dell'analisi del rischio in casi di non fattibilità tecnico-economica degli interventi. Inoltre il decreto specifica che, per gli interventi di bonifica e ripristino ambientale, è necessario favorire quelle tecniche che riducono la movimentazione del materiale contaminato, prediligendone il trattamento *in situ* e il riutilizzo e precisa che i valori di concentrazione da raggiungere in seguito all'intervento sono quelli del fondo naturale. Con l'entrata in vigore del Testo Unico Ambientale (D.lgs. 152/06 e s.m.i.) l'individuazione e la gestione dei siti contaminati subisce alcune modifiche; proprio la definizione di sito potenzialmente contaminato diventa subordinata al superamento delle cosiddette Concentrazioni Soglia di Contaminazione (CSC), che riprendono i valori limite definiti dal DM 471/99, e successivamente, in seguito ad un'analisi del rischio sito-specifica, vengono stabilite le cosiddette Concentrazioni Soglia di Rischio (CSR), che permettono di definire la necessità di un intervento di bonifica sul sito in oggetto. Va sottolineato però che ad oggi la valutazione del rischio prende in considerazione esclusivamente gli effetti della contaminazione sulla salute umana, mentre la valutazione del rischio ecologico, che poi si riflette inevitabilmente sull'uomo, non è contemplata dalla normativa.

Le tecniche di intervento in caso di contaminazione di un sito sono numerose, molte di esse però risultano invasive o potenzialmente pericolose. In particolare interventi che prevedono l'escavazione e il trasporto del materiale *ex situ*, sia nel caso di conferimento in discarica che di trasporto in impianti di trattamento, oltre a risultare costosi, possono comportare rischi legati alla movimentazione di materiale contaminato. Interventi che prevedono la messa in sicurezza, che consistono nell'isolamento dell'area contaminata mediante barriere isolanti, non risolvono il problema in quanto i contaminanti persistono nell'ambiente e in aggiunta comportano un consistente dispendio economico, richiedendo un monitoraggio costante ed una periodica manutenzione delle barriere. Alcune delle tipologie di trattamento convenzionali, applicabili sia *in situ* che *ex situ*, quali quelle di tipo termico, chimico o fisico, possono risultare invasive in relazione alla possibilità di alterare le caratteristiche chimico-fisiche e biologiche del sito, di contaminare altri comparti ambientali e di apportare altre sostanze xenobiotiche. I metodi biologici, che sfruttano le capacità degradative dei microrganismi o quelle di assorbimento delle piante, rappresentano una valida alternativa alle tecnologie convenzionali di bonifica, risultando sicuramente più vantaggiosi sia dal punto di vista economico che in funzione della compatibilità ambientale. Questi metodi consistono prevalentemente nell'accelerazione dei naturali processi di degradazione attraverso la biostimolazione, che prevede l'aggiunta nel sito contaminato di nutrienti limitanti, di acqua e di ossigeno, utili a favorire lo sviluppo dei microrganismi e l'incremento dell'attività microbica (*biosparging* e *bioventing*). Ciò nonostante è frequente che i tempi impiegati per completare il processo di decontaminazione siano estremamente lunghi quando, ad esempio, i contaminanti risultano particolarmente recalcitranti. È per questo motivo che la ricerca in questo settore è in continua attività, al fine di trovare nuove tecniche di risanamento che risultino allo stesso tempo biocompatibili, efficienti ed economiche.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 L'inquinamento del suolo

L'inquinamento del suolo è un fenomeno che si verifica quando sostanze xenobiotiche non presenti in condizioni normali o sostanze naturalmente presenti a basse concentrazioni, raggiungono accidentalmente o volontariamente la matrice suolo, determinando un'alterazione dei naturali equilibri (chimico, fisico, biologico, ecologico, geologico ed idrologico) e provocando fenomeni di tossicità sulle popolazioni.

Il DM 471/99 all'art. 2 definisce come sito contaminato quel *“sito che presenta livelli di contaminazione o alterazioni chimiche, fisiche o biologiche del suolo o del sottosuolo o delle acque superficiali o delle acque sotterranee tali da determinare un pericolo per la salute pubblica o per l'ambiente naturale o costruito. [...] nel quale anche uno solo dei valori di concentrazione delle sostanze inquinanti [...] risulta superiore ai valori di concentrazione limite accettabili stabiliti dal presente regolamento”*. Il D.lgs. 152/06, all'art. 240 (titolo V, parte IV) modifica tale definizione, identificando un sito come contaminato soltanto dopo che sia stato accertato il superamento delle concentrazioni soglia di rischio determinate nella fase di analisi del rischio che segue al piano di caratterizzazione del sito (*“un sito nel quale i valori delle concentrazioni soglia di rischio (CSR), determinati con l'applicazione della procedura di analisi di rischio [...] sulla base dei risultati del piano di caratterizzazione, risultano superati”*).

La contaminazione del suolo e del sottosuolo è attribuibile principalmente alle attività antropiche, nonostante una minore percentuale di inquinanti possa scaturire da processi naturali (eruzioni vulcaniche, incendi, erosione delle rocce del sottosuolo da parte delle acque di falda o delle acque di percolazione, attività biologica in alcuni casi particolari). Le cause principali sono da ricercarsi nei seguenti avvenimenti accidentali o intenzionali: sversamento di reflui industriali nel suolo, percolazione di acqua contaminata, infiltrazione di percolato da discarica, rottura di serbatoi sotterranei di stoccaggio, interrimento di rifiuti pericolosi, abuso di pesticidi, fitofarmaci e fertilizzanti minerali, utilizzo di acque di irrigazione contaminate e di ammendanti organici di scarsa qualità, deposizione atmosferica secca e umida. In quest'ultimo caso si parla di contaminazione indiretta, dovuta principalmente alla ricaduta al suolo, anche a distanze elevate rispetto all'area di emissione, di inquinanti derivanti da fonti diffuse, associate ad attività industriali, traffico veicolare, riscaldamento domestico. Si parla di *deposizione secca* quando il trasferimento dell'inquinante dall'atmosfera al substrato avviene semplicemente per gravità o per intercettazione della superficie del suolo all'interno della traiettoria di moto del contaminante; si parla invece di *deposizione umida* quando gli inquinanti atmosferici vengono trasferiti in fase acquosa durante il processo di nucleazione e trasportati al suolo per impatto diretto (*rainflow*), oppure quando, rimanendo sospesi in aria, vengono trascinati dall'evento meteorico (*washout*). Un'altra via attraverso la quale i contaminanti atmosferici raggiungono il suolo è rappresentata dalla vegetazione; le chiome degli alberi, infatti, intercettano notevoli quantitativi di particolato che

CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE

raggiungono il suolo attraverso la caduta delle foglie oppure in seguito al dilavamento delle chiome (*throughfall*) e dei fusti (*stemflow*) da parte dell'acqua piovana.

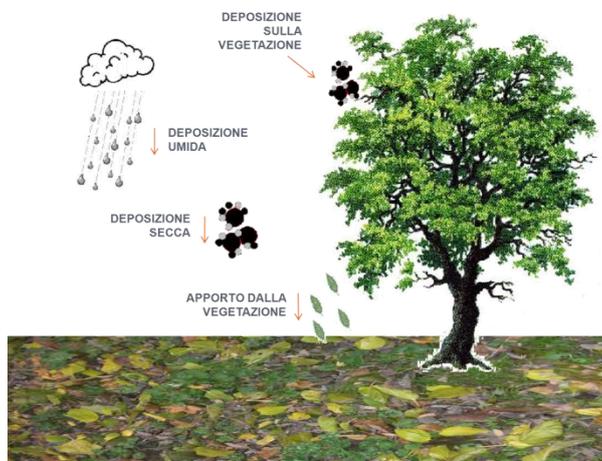


Figura 1.1 - Apporto indiretto di contaminanti al suolo.

Mentre nelle matrici ambientali acqua e aria le concentrazioni degli inquinanti si riducono in seguito al naturale processo di diluizione, ciò non accade per il suolo, dove i contaminanti tendono ad accumularsi in funzione delle loro caratteristiche chimico-fisiche che portano alla formazione di legami con la frazione colloidale del suolo, o in seguito ad interazioni ioniche, come nel caso dei cationi e di alcuni anioni, o in seguito ad interazioni idrofobiche, come nel caso di composti organici apolari che si accumulano nella sostanza organica del suolo. Accumulandosi al suolo queste sostanze xenobiotiche possono facilmente entrare nella catena alimentare e causare fenomeni di bioaccumulo e biomagnificazione, con conseguenti danni fisiologici e morfologici agli organismi, che possono portare anche alla morte.

L'entità delle conseguenze generate dall'inquinamento del suolo può dipendere da diversi fattori: dalla natura chimica del contaminante, dalla sua concentrazione, dalla persistenza nell'ambiente, dalla tossicità dei prodotti secondari originatisi dall'eventuale degradazione/trasformazione dell'inquinante, dall'interazione tra diversi composti chimici, dal percorso seguito dal contaminante nell'ambiente, dal tempo di esposizione e dalla vulnerabilità delle popolazioni esposte.

1.2 Idrocarburi policiclici aromatici

1.2.1 Generalità, fonti e processi di formazione

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) costituiscono un'ampia classe di composti organici formati da due o più anelli benzenici condensati e molecole pentacicliche, organizzati in diverse configurazioni strutturali.

Gli IPA si formano durante processi di combustione incompleta o di pirolisi di materiale organico carbonioso (carbone, derivati del petrolio, legno, rifiuti) in condizioni di temperatura elevata (650-900 °C) e di carenza di ossigeno. I frammenti idrocarburi generati durante le reazioni di demolizione delle frazioni più altobollenti in frazioni più volatili, processo noto come *cracking*, in carenza di ossigeno subiscono una ripolimerizzazione, riarrangiandosi prevalentemente in frammenti radicalici a basso peso molecolare.

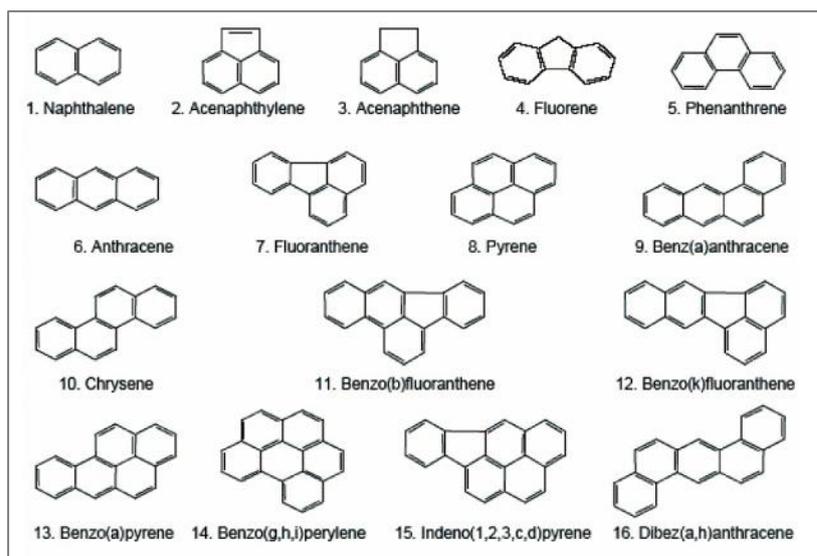


Figura 1.2 - 16 IPA prioritari secondo l'US-EPA.

Un possibile meccanismo di reazione è rappresentato in Figura 1.3. In questo caso un radicale a due atomi di carbonio reagisce con una molecola di acetilene, generando un radicale a quattro atomi di carbonio (Reazione 1), che può addizionare un'altra molecola di acetilene e generare un anello a sei atomi di carbonio (Reazione 2). A tal punto un atomo di idrogeno legato al carbonio terminale non radicalico può staccarsi dando origine ad una molecola di benzene, oppure può addizionare altre molecole di acetilene, dando luogo a catene laterali che formeranno ulteriori anelli benzenici condensati (Reazione 3). Minore è il rapporto ossigeno/combustibile e più rapida sarà la reazione di formazione di questi composti.

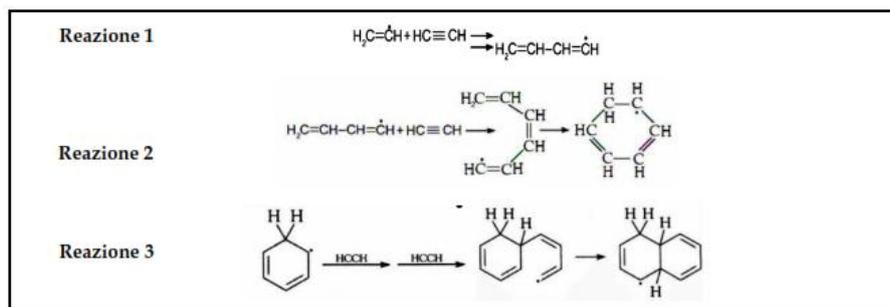


Figura 1.3 - Possibile meccanismo di formazione degli IPA.

Altri meccanismi che portano alla formazione degli IPA possono essere legati a processi di petrogenesi (Stout *et al.*, 2001), come nel caso di formazione di magma vulcanico o di combustibili fossili, che si formano per diagenesi in seguito al sotterramento di materiale organico in condizioni di temperatura (intorno ai 200 °C) e pressione (circa 2-3 bar) relativamente alte. Carbone, petrolio e bitume sono, infatti, ricchi di questi composti, tant'è vero che lo sversamento accidentale di petrolio e suoi derivati in mare rappresenta una delle principali fonti di inquinamento da IPA (Eisler, 1987). Un'altra via che può portare alla sintesi degli IPA è rappresentata dai processi

CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE

di biogenesi, alcuni di essi legati alla biosintesi *de novo* da parte di batteri aerobici ed anaerobici, funghi e piante (Brooks, 2000), altri derivanti da reazioni di riduzione di materia organica in ambienti anossici ad opera di particolari gruppi microbici (Silliman, 2001).

Le principali fonti antropiche che determinano l'immissione di IPA nell'ambiente sono rappresentate da qualsiasi attività industriale, domestica o veicolare, che richiede un processo di combustione ad elevata temperatura: impianti di produzione di energia, inceneritori, industrie di produzione d'asfalto, cokerie, fonderie, acciaierie, riscaldamento domestico, traffico veicolare. Quest'ultima fonte di tipo diffuso è la principale responsabile di emissione di IPA in ambiente urbano.

1.2.2 Proprietà chimico-fisiche

Le proprietà chimico-fisiche degli IPA dipendono principalmente dal numero dei sistemi coniugati di elettroni π . In particolare con l'aumentare del numero di anelli benzenici e di legami coniugati, aumenta la delocalizzazione degli elettroni π e pertanto aumenta la lunghezza d'onda alla quale la molecola assorbe.

Gli IPA sono chimicamente piuttosto stabili, sebbene la loro reattività sia influenzata, oltre che dal peso molecolare, da numerosi fattori ambientali quali temperatura, luce, livelli di ossigeno e di ozono, presenza di co-inquinanti e di materiale capace di adsorbirli, che favoriscono la formazione di numerosi prodotti di ossidazione. Negli IPA la reattività degli atomi di carbonio è diversa in funzione della posizione, sia per quanto riguarda reazioni di sostituzione elettrofila sia nelle reazioni di ossidoriduzione, e le posizioni reattive variano in funzione della dimensione delle molecole.

La distribuzione degli IPA nell'ambiente dipende strettamente dalle loro caratteristiche chimico-fisiche. Tutti gli IPA a temperatura ambiente sono presenti allo stato solido. Hanno una bassa tensione di vapore che è inversamente proporzionale al numero di anelli, e ciò influenza le differenti percentuali con cui i singoli IPA sono assorbiti sul particolato atmosferico. Presentano elevati punti di fusione e di ebollizione e scarsa idrosolubilità, che diminuisce con l'aumentare della superficie di esposizione all'ambiente. In presenza di ioni la solubilità degli IPA in acqua si riduce ulteriormente, effetto noto come "salting out" che si misura mediante il calcolo della costante K_S

$$K_S = \log[C_W / C_{W,SAL}] / [SALI]_{TOT}$$

dove:

C_W = concentrazione della sostanza in acqua pura

$C_{W,SAL}$ = concentrazione in acqua contenente i soluti ionici

$[SALI]_{TOT}$ = concentrazione totale degli ioni

Maggiore è il valore di K_S , più idrofilo sarà il comportamento della sostanza in soluzione.

Al contrario gli IPA sono estremamente lipofili e questa caratteristica ne influenza fortemente il bioaccumulo. Le sostanze idrofobiche tendono a raggiungere un equilibrio tra la fase solida e quella acquosa e le proporzioni di tale ripartizione dipendono da numerosi fattori quali temperatura, concentrazione, quantità di soluti, quantità di sostanza organica, caratteristiche del contaminante. La ripartizione tra acqua e materiale solido è descritta dal coefficiente di ripartizione

$$K_P = C_S / C_W$$

dove C_S è la concentrazione della sostanza in fase solida e C_W la concentrazione in fase acquosa. Poiché la tendenza di una sostanza idrofobica a ripartirsi tra acqua e solidi dipende in particolare dalla quantità totale di carbonio organico (TOC), viene

CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE

introdotto un nuovo coefficiente, K_{OM} , che descrive la ripartizione tra acqua e sostanza organica, con cui si può ridefinire il K_P come

$$K_P = K_{OM} * TOC$$

Poiché K_{OM} è di difficile determinazione può essere sostituito con il coefficiente di ripartizione tra acqua e ottanolo (K_{OW}), solvente organico con comportamento simile a quello della sostanza organica, definito come

$$K_{OW} = C_O / C_W$$

con C_O solubilità del composto in ottanolo e C_W solubilità in acqua. Essendo K_{OW} molto elevato, si esprime come il suo logaritmo e pertanto K_{OM} può essere calcolato mediante l'espressione

$$K_{OM} = A \log K_{OW} + B \quad \text{con A e B costanti}$$

Il coefficiente di ripartizione acqua/materiale solido sarà quindi espresso come

$$K_P = (A \log K_{OW} + B) * TOC$$

Perciò composti più grandi, meno solubili in acqua e meno volatili, a causa di queste proprietà si trovano principalmente accumulati nel suolo e nei sedimenti, ma possono trovarsi anche sospesi in aria e acqua mediante l'adesione superficiale al particolato atmosferico e ai solidi sospesi.

	Solubilità in acqua mmol/l	Pressione di vapore Pa, 25 °C	log K_{OW} 25 °C
Naftalene	2.4×10^{-1}	10.9	-
Antracene	3.7×10^{-4}	7.5×10^{-4}	4.54
Fenantrene	7.2×10^{-3}	1.8×10^{-2}	4.57
Acenaftene	2.9×10^{-2}	5.96×10^{-1}	3.92
Acenaftilene	-	-	-
Fluorene	1.2×10^{-2}	8.86×10^{-2}	4.18
Fluorantene	1.3×10^{-3}	2.54×10^{-1}	-
Crisene	1.3×10^{-5}	5.7×10^{-7}	5.86
Pirene	7.2×10^{-4}	8.86×10^{-4}	5.18
Benzo[a]antracene	1.3×10^{-5}	7.3×10^{-6}	5.91
Benzo[a]pirene	1.5×10^{-5}	8.4×10^{-7}	6.04
Dibenzo[a,h]antracene	1.8×10^{-6}	3.7×10^{-10}	6.75
Benzo[k]fluorantene	-	-	-
Benzo[b]fluorantene	-	-	-
Indeno[1,2,3cd]pirene	-	-	-
Benzo[g,h,i]perilene	2×10^{-5}	6×10^{-8}	6.58

Tabella 1.1 - Alcuni parametri chimico-fisici dei 16 IPA prioritari secondo l'EPA.

1.2.3 Tossicità

È noto che gli IPA hanno effetti negativi sull'ambiente, sulla salute umana e sugli animali, mostrando particolare tossicità per gli uccelli e per gli organismi acquatici (Adami *et al.*, 2000; Piccardo *et al.*, 2001; Stella *et al.*, 2002). Il rischio per la salute umana e per quella dei mammiferi in generale è associato alle loro proprietà tossiche, mutagene, genotossiche, teratogene e cancerogene (Dagher *et al.*, 1997; Guerin, 1999; Villemur *et al.*, 2000). Numerosi studi hanno evidenziato che i composti ad uno, due e tre anelli sono estremamente tossici (Sims e Overcash, 1983), mentre gli IPA a più alto peso molecolare sono considerati genotossici (Lijinsky, 1991; Mersch-Sundermann *et al.*, 1992; Nylund *et al.*, 1992).

Per queste motivazioni l'US-EPA (*United States Environmental Protection Agency*) e la WHO (*World Health Organization*) hanno identificato, all'interno di

CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE

questa classe, 16 composti definiti “*inquinanti prioritari*” (Figura 2): naftalene, acenaftilene, acenaftene, fluorene, fenantrene, antracene, fluorantene, pirene, crisene, benzo[a]antracene, benzo[b]fluorantene, benzo[k]fluorantene, benzo[a]pirene, dibenzo[a,h]antracene, benzo[g,h,i]perilene, indeno[1,2,3-cd]pirene (Samanta *et al.*, 2002).

Gli IPA possono essere introdotti nell'organismo mediante più strade. Benché sia stato stimato che il 75% dell'ammontare totale di IPA assimilati entra nell'organismo attraverso l'assorbimento a livello dell'epidermide (Bamforth e Singleton, 2005), la contaminazione degli alimenti gioca un ruolo fondamentale sul loro accumulo poiché, una volta ingeriti, vengono rapidamente assorbiti a livello gastrointestinale a causa della loro elevata liposolubilità (Cerniglia, 1984). Anche la respirazione rappresenta una strada di accesso degli IPA nell'organismo, in seguito all'ingresso nel sistema respiratorio di fuliggine e particolato atmosferico sul quale sono adsorbiti.

La rimozione degli IPA dall'organismo dipende dalla capacità dello stesso di trasformarli in metaboliti idrosolubili, eliminabili attraverso l'escrezione. Ma è proprio la formazione di questi prodotti metabolici ad essere responsabile degli effetti mutageni e cancerogeni per i mammiferi. Infatti, in seguito ad una reazione enzimatica mediata dalla citocromo P₄₅₀ monossigenasi, gli anelli aromatici vengono ossidati dando origine ad intermedi epossidici, diolici e diolo-epossidici (Bamforth e Singleton, 2005) (Figura 1.4a). Questi intermedi, in particolare i diolo-epossidi, si combinano covalentemente, mediante un attacco nucleofilo, con le molecole di DNA, generando evidenti distorsioni nella struttura del materiale genetico (Figura 1.4b), che provocano mutazioni e, con esse, una maggiore probabilità di cancerogenesi.

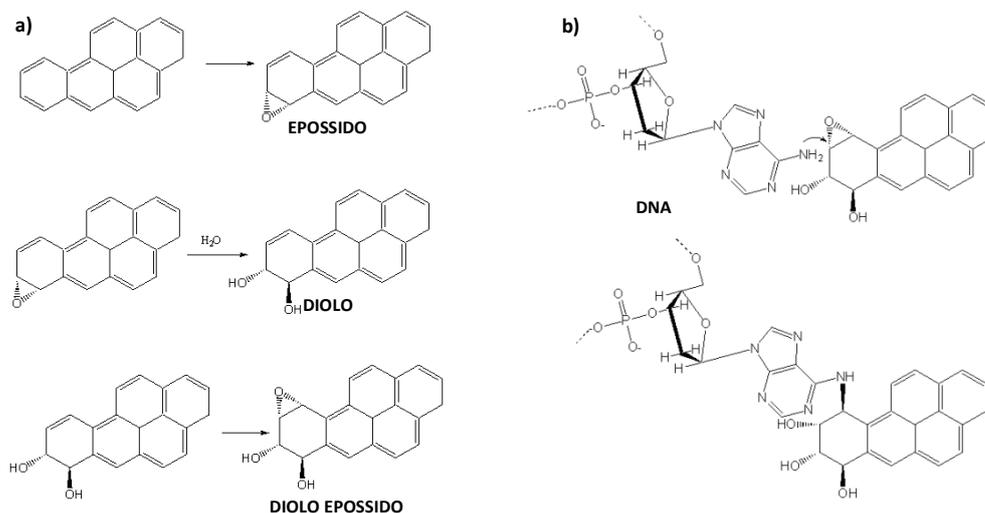


Figura 1.4 - a) Metabolismo del benzo[a]pirene nei mammiferi e b) interazione con il DNA.

Non tutti gli IPA generano danni a livello genetico poiché non tutti sono precursori di questi intermedi di reazione. In particolare la maggior parte degli IPA che mostrano proprietà cancerogene sono formati da più di tre anelli benzenici e possiedono una regione di recesso (*bay region*) formata da una ramificazione nella sequenza di atomi degli anelli benzenici e caratterizzata da un'alta densità elettronica (Goldman *et al.*, 2001).

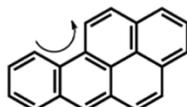


Figura 1.5 - Bay region del benzo[a]pirene.

La IARC (International Agency for Research on Cancer) ha classificato numerosi IPA come "probabili" o "possibili cancerogeni per l'uomo", mentre il benzo[a]pirene è stato riclassificato nel 2008 nel gruppo 1 come "cancerogeno per l'uomo" (Tabella 1.2). Il benzo[a]pirene viene utilizzato come indicatore nella valutazione del rischio sanitario della miscela IPA, sia per quanto riguarda i livelli di contaminazione che in relazione al rischio cancerogeno. Tale scelta è dovuta a due motivazioni principali: la sua potenza cancerogena è più elevata rispetto agli altri IPA; poiché gli IPA sono presenti sempre in miscela, in base alla fonte inquinante il benzo[a]pirene mantiene rapporti di concentrazione costanti con gli altri, in particolare con quelli cancerogeni (IPCS, 1998).

IPA	Grado di cancerogenicità
Benzo[a]pirene	1
Dibenzo[a,l]pirene	2A
Dibenzo[a,h]antracene	2A
Ciclopenta[cd]pirene	2A
6-nitrocrisene	2A
1-nitropirene	2A
Benzo[a]antracene	2B
Benzo[b]fluorantene	2B
Benzo[j]fluorantene	2B
Benzo[k]fluorantene	2B
Indeno[1,2,3-cd]pirene	2B
Dibenzo[a,e]pirene	2B
Dibenzo[a,h]pirene	2B
Dibenzo[a,i]pirene	2B
5-metilcrisene	2B
Benzo[j]aceantrilene	2B
Benzo[c]fenantrene	2B
Crisene	2B
Naftalene	2B
5-nitroacenafte	2B
4-nitropirene	2B
3,7-Dinitrofluoranthene	2B
3,9-Dinitrofluoranthene	2B
1,3-Dinitropyrene	2B
1,6-Dinitropyrene	2B
1,8-Dinitropyrene	2B

Tabella 1.2 - Classificazione degli IPA in funzione del grado di cancerogenicità (IARC, 2014). 1: cancerogeno per l'uomo; 2A: probabile cancerogeno per l'uomo; 2B: possibile cancerogeno per l'uomo.

Le sostituzioni sugli anelli aromatici con alogeni diminuiscono o sopprimono l'attività cancerogena, dato che la reazione di dealogenazione permette di ottenere idrossiderivati senza passare attraverso gli epossidi. I nitroderivati, invece, sono di solito potenti cancerogeni e la nitratura conferisce questo carattere anche a composti normalmente non cancerogeni, come nel caso del pirene e del corrispondente IPA nitroderivato (Bocca *et al.*, 2003).

1.2.3.1 Tossicità per i microrganismi

Gli IPA possono avere effetti negativi anche sui microrganismi. Mastrangelo e collaboratori (1997) hanno riscontrato effetti allergeni e mutageni da parte del fenantrene su alcuni sistemi batterici in specifiche condizioni. Juhasz e Naidu (2000) hanno evidenziato che il benzo[a]pirene può indurre effetti genotossici non soltanto su cellule di mammiferi ma anche su cellule procariotiche. Pothuluri e Cerniglia (1994), effettuando il test di Ames su *Salmonella typhimurium*, hanno trovato che l'1-nitropirene è altamente cancerogeno e mutageno per questo microrganismo, nonostante il suo precursore, il pirene, non mostri cancerogenicità ma soltanto una debole mutagenicità.

Numerosi studi hanno evidenziato che la contaminazione da IPA, sia nel suolo (Rathbone *et al.*, 1998) che nei sedimenti acquatici (Lindgren *et al.*, 2012; Lindgren *et al.*, 2014), determina un'inibizione del processo di nitrificazione; tale processo può, pertanto, essere utilizzato come potenziale indicatore di stress indotto da questo tipo di contaminazione. Si pensa che la modalità di azione degli IPA sulla nitrificazione sia l'inibizione dell'ammonio-monossigenasi (Keener e Arp, 1993) in seguito alla competizione per il sito attivo o all'interazione con la porzione idrofobica dell'enzima, che ne modifica l'attività catalitica (Lindgren *et al.*, 2012).

Diversi autori hanno riscontrato che la presenza di IPA nel suolo altera la struttura della comunità microbica, ne riduce la biomassa ed inibisce alcune attività metaboliche. Su e Yang (2009) hanno determinato la biomassa microbica di suoli contaminati da IPA (in particolare naftalene, fenantrene e pirene) mediante analisi dei PLFA, rilevando un decremento significativo della biomassa totale con l'aumento delle concentrazioni di IPA. Il fenantrene è risultato più tossico del pirene per la comunità microbica a causa di una maggiore accessibilità. È stato, infine, riscontrato che i batteri Gram-positivi sono più sensibili a questi composti rispetto ai batteri Gram-negativi e ai funghi.

Maliszewska-Kordybuch e Smreczek (2003) hanno testato una serie di indicatori biologici (deidrogenasi, fosfatasi, biomassa microbica, respirazione) ed hanno riscontrato che l'attività deidrogenasica risulta essere il parametro biologico maggiormente sensibile alla contaminazione da IPA in diverse tipologie di suolo, dato confermato da Gianfreda *et al.* (2005) che, in un suolo gravemente interessato da contaminazione da IPA da lungo tempo, non hanno rilevato alcuna attività deidrogenasica; esaminando anche suoli interessati da livelli di contaminazione meno gravi e suoli non contaminati, hanno osservato una correlazione negativa significativa tra il contenuto di IPA e le attività enzimatiche ureasi e deidrogenasi. Anche le attività idrolasica totale ed arilsolfatasica sono risultate più basse in corrispondenza di alte concentrazioni di IPA.

1.2.4 Gli IPA nel suolo

La presenza di IPA nel suolo rappresenta una problematica di rilevante importanza a causa della tendenza di questi contaminanti ad accumularsi nella frazione organica per l'affinità strutturale e il loro carattere idrofobico.

Fenomeni di contaminazione severa del suolo sono attribuibili principalmente allo sversamento accidentale o doloso di combustibili fossili e derivati (petrolio, carburante), agli incendi e alla deposizione atmosferica, principalmente in seguito a ricaduta del particolato e accumulo di lettiera.

Una volta raggiunto il suolo gli IPA possono subire diversi destini (Stokes *et al.*, 2006), in seguito a processi di ripartizione tra le fasi solida, liquida e gassosa, determinando possibili fenomeni di migrazione e trasformazione. Gli IPA a più basso

peso molecolare possono volatilizzare in atmosfera o essere lisciviati fino a raggiungere la falda. Quelli ad alto peso molecolare invece sono fortemente adsorbiti alla frazione argillo-umica del suolo. Inoltre questi composti possono subire reazioni di ossidoriduzione di origine abiotica, possono essere assorbiti dagli organismi ed essere biodegradati ad opera dei decompositori del suolo. Un parametro importante per valutare la pericolosità di questi contaminanti è la persistenza, derivante dal risultato complessivo di tutti i meccanismi di trasporto e di degradazione citati (Sutherland *et al.*, 1995; Stokes *et al.*, 2006).



Figura 1.6 - Destino degli IPA nel suolo (Stokes *et al.*, 2006).

1.3 Degradazione degli IPA

A causa delle loro caratteristiche chimico-fisiche gli IPA persistono nell'ambiente per lunghi periodi di tempo e pertanto sono considerati contaminanti recalcitranti.

Ciò nonostante questi composti possono subire processi di trasformazione e di degradazione in seguito a reazioni sia di tipo abiotico che di tipo biologico. Per quanto riguarda i processi di degradazione abiotica, le reazioni di idrolisi non contribuiscono in maniera significativa a causa dell'elevata stabilità degli IPA attribuibile alla loro aromaticità (Howard *et al.*, 1991). Hanno invece un'importante rilevanza nel processo di degradazione i fenomeni di fotodegradazione; gli IPA possono essere fotodegradati attraverso due meccanismi: fotolisi diretta, ad opera delle radiazioni ultraviolette ($\lambda < 290$ nm), e fotolisi indiretta o fotoossidazione, dovuta all'azione di agenti ossidanti fotoprodotti (radicali OH^\bullet , O_3 , NO_x). Queste reazioni, però, possono comportare la produzione di molecole di gran lunga più pericolose dal punto di vista ambientale, come nel caso di nitroderivati formati dall'interazione con gli NO_x (IARC, 1989). Altri processi di trasformazione abiotica di questi contaminanti organici possono essere l'azione ossidante di ioni metallici quali Mn e Fe (Wilk *et al.*, 1966; Periasmy e Vivekananda Bhatt, 1978; Cremonesi *et al.*, 1989), di minerali argillosi, di ossidi e idrossidi di Al, Fe, Mn e Si (Wang *et al.*, 1986), di specie radicaliche dell'ossigeno (Gierer *et al.*, 1992).

La degradazione microbica è considerata uno dei principali meccanismi di rimozione degli IPA dal suolo (Cerniglia, 1984; Jones *et al.*, 1996; Raid *et al.*, 2000; Semple *et al.*, 2001). L'incremento del potenziale di ossidazione delle comunità microbiche in seguito all'esposizione agli idrocarburi è funzione di un processo di adattamento (Spain *et al.*, 1980), che consiste nell'induzione o nella depressione di specifici enzimi, nello sviluppo di nuove abilità metaboliche generate in seguito a mutazioni genetiche e all'arricchimento selettivo di organismi in grado di trasformare inquinanti target (Spain *et al.*, 1980; Spain e Van Veld, 1983). Macleod *et al.* (2006) per la prima volta hanno studiato lo sviluppo dell'attività catabolica di degradazione del pirene in suoli incontaminati: aggiungendo al suolo pirene con applicazioni seriali

CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE

nel tempo, la comunità microbica del suolo ha sviluppato gradualmente la capacità di degradare questo IPA.

È ampiamente dimostrato che la capacità dei microrganismi di degradare gli IPA è dovuta alla sintesi e alla conseguente escrezione nell'ambiente extracellulare di enzimi ad attività ossidoreduttasica (Ahn *et al.*, 1999; Pointing, 2001; Hamdi *et al.*, 2007). In particolare si tratta di enzimi coinvolti nel processo di degradazione di composti organici recalcitranti, come la lignina, complesso polimero organico costituito da unità fenilpropaniche che si ripetono. Grazie alla somiglianza strutturale degli IPA con la lignina, derivante dal loro carattere aromatico, e grazie alla bassa specificità di substrato di cui godono, questi enzimi ligninolitici (fenolossidasi e perossidasi) sono in grado di ossidare gli IPA (Mester e Tien, 2000).

Gli organismi principalmente coinvolti nella degradazione della lignina in quanto produttori di ossidoreduttasi, principalmente perossidasi e laccasi, sono i funghi, in particolare i funghi del marciume bianco (*white-rot*), appartenenti al gruppo dei Basidiomiceti ed in minor misura degli Ascomiceti. Anche alcuni funghi non coinvolti nella produzione del marciume bianco, come i *brown-rot* o i funghi non-ligninolitici, possiedono enzimi "IPA-degradatori", quali alcune specie dei generi *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neosartorya*, *Pseudallescheria*, *Cladosporium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma* e *Paecilomyces*, che hanno mostrato capacità di utilizzare gli IPA come sola fonte di carbonio ed energia in esperimenti in vitro (Naranjo *et al.*, 2007). Inoltre numerosi generi di batteri saprotrofi del suolo sintetizzano enzimi ad attività fenolossidasica: Attinobatteri e Attinomiceti, tra cui alcune specie appartenenti ai generi *Mycobacterium*, *Streptomyces* (Mason *et al.*, 2001; Kizhekkedathu e Parukuttyamma, 2005), i generi *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, alcuni batteri sporigeni, principalmente appartenenti al genere *Bacillus* (Hullo *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2009), alcuni proteobatteri tra cui quelli del genere *Pseudomonas*. In particolare quest'ultimo gruppo è stato frequentemente utilizzato in studi di bioremediation di suoli contaminati da composti organici (idrocarburi alifatici e aromatici, pesticidi) (Arun *et al.*, 2008; Pizzul *et al.*, 2009).

La degradazione degli IPA solitamente dà origine a numerosi metaboliti secondari, talvolta più tossici del composto di partenza. La completa mineralizzazione degli IPA può risultare dalla sinergia tra vari gruppi microbici, in particolare da una degradazione sequenziale funghi-batteri (Meunleberg *et al.*, 1997; Kotterman *et al.*, 1998; Andersson *et al.*, 2003; Sinsabaugh, 2010), secondo la quale alcuni prodotti secondari generati dall'ossidazione degli IPA da parte dei funghi possono essere ulteriormente utilizzati dai batteri, fino a completa decomposizione.

I processi metabolici coinvolti nella degradazione degli IPA sono prevalentemente aerobici e prevedono reazioni di ossidazione. In alcuni casi, però, possono essere degradati in assenza di ossigeno mediante il metabolismo anaerobico, specialmente in casi di contaminazione multipla; ad esempio, in presenza di inquinamento da derivati del petrolio, l'abbondanza di composti facilmente biodegradabili, quali idrocarburi alifatici e BTEX, determina un elevato consumo di ossigeno con conseguente formazione di zone anaerobiche in cui la velocità di rifornimento di ossigeno è minore rispetto al tasso di esaurimento. Pertanto in situazioni di questo tipo composti recalcitranti come gli IPA possono subire una degradazione di tipo anaerobico, che consta inizialmente dell'ossidazione degli anelli aromatici mediante accettori di elettroni diversi dall'ossigeno, quali nitrato, solfato Fe^{3+} , e in seguito di una serie di reazioni di idrogenazione degli anelli, che portano alla perdita del carattere aromatico e alla completa decomposizione (Bamforth e Singleton, 2005). Recenti studi hanno proposto alcuni meccanismi di degradazione anaerobica del naftalene secondo i quali il naftalene viene prima carbossilato e

convertito in acido naftoico e poi idrogenato fino alla formazione di un intermedio non aromatico (Meckenstock *et al.*, 2000; Zang *et al.*, 2000).

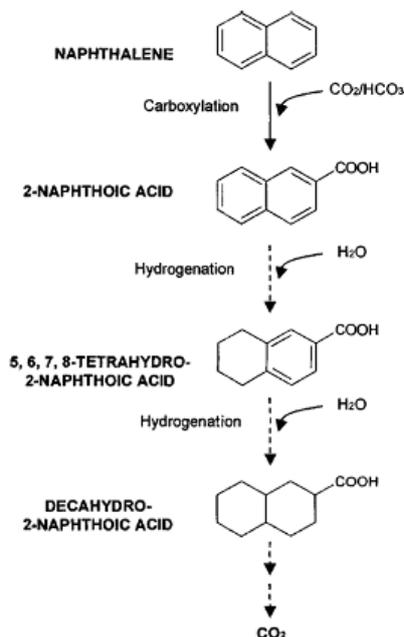


Figura 1.7 - Metabolismo anaerobico del naftalene proposto da Meckenstock *et al.* (2000) e Zang *et al.* (2000) in presenza di solfato come specie ossidante.

Il metabolismo aerobico prevede tre diversi meccanismi di degradazione degli IPA, in funzione del gruppo microbico implicato. I batteri ossidano gli anelli benzenici mediante l'azione delle diossigenasi, da cui si formano *cis*-diidrodiooli; le deidrogenasi trasformano, poi, questi composti in intermedi diidrossilati che possono essere ulteriormente degradati mediante la via metabolica del catecolo, che porta alla liberazione di CO_2 e acqua. Questo processo di degradazione che coinvolge le diossigenasi è stato riscontrato in batteri appartenenti ai generi *Pseudomonas* e *Rhodococcus*, per i quali è stata studiata nel dettaglio la degradazione del naftalene (Cerniglia, 1992; Mueller *et al.*, 1997). È stato dimostrato che un gruppo ristretto di batteri, tra cui specie appartenenti al genere *Mycobacterium* (Kelley *et al.*, 1990) e alcuni metanotrofi marini (Rockne *et al.*, 1998), sono in grado di ossidare gli IPA mediante l'azione della citocromo P_{450} monossigenasi, che porta alla formazione di *trans*-diidrodiooli. Questo meccanismo è però risultato marginale in *Mycobacterium* rispetto al processo che implica l'intervento delle diossigenasi (Heitkamp *et al.*, 1988).

La via metabolica principale impiegata dai funghi ligninolitici è quella che coinvolge laccasi e perossidasi, che, una volta escreti nell'ambiente extracellulare, ossidano gli IPA attraverso l'estrazione di un elettrone e la formazione di radicali liberi, da cui si originano IPA-chinoni e IPA-acidi, che possono in seguito essere completamente decomposti a CO_2 grazie all'azione sinergica dei batteri. Un'altra possibile via metabolica che porta alla completa mineralizzazione degli IPA e che coinvolge esclusivamente i funghi ligninolitici implica l'azione combinata di enzimi ligninolitici e non-ligninolitici, quali citocromo P_{450} monossigenasi ed epossido-idrolasi, come riscontrato in uno studio di degradazione di IPA condotto da Bezalel e collaboratori (1997), in cui la completa mineralizzazione ad opera del fungo

ligninolitico *Pleurotus ostreatus* era funzione dell'azione combinata di enzimi ligninolitici e non-ligninolitici.

Il metabolismo degli IPA operato dai funghi non-ligninolitici è molto simile a quello dei mammiferi; l'azione ossidante della citocromo P₄₅₀ monossigenasi genera, infatti, un arene-eossido, mediante l'incorporazione di un solo atomo di ossigeno nell'anello aromatico, che viene successivamente convertito in *trans*-dihidrodiolo con l'intervento dell'enzima epossido-idrolasi. I funghi non-ligninolitici non sono in grado di portare a termine la mineralizzazione degli IPA; si pensa che la degradazione possa essere completata con l'intervento degli enzimi ligninolitici perossidasi e laccasi (Bezalel *et al.*, 1997). Bamforth e Singleton (2005) riportano alcune specie di funghi in grado di svolgere questo processo metabolico, quali *Aspergillus niger*, *Chrysosporium pannorum* e *Cunninghamella elegans*. Esiste una via abiotica che trasforma gli arene-eossidi in composti IPA-coniugati meno tossici rispetto ai composti progenitori, mediante reazioni di metilazione, di solfatazione o di coniugazione con glucosio, xilosio e acido glucuronico (Mueller *et al.*, 1997).

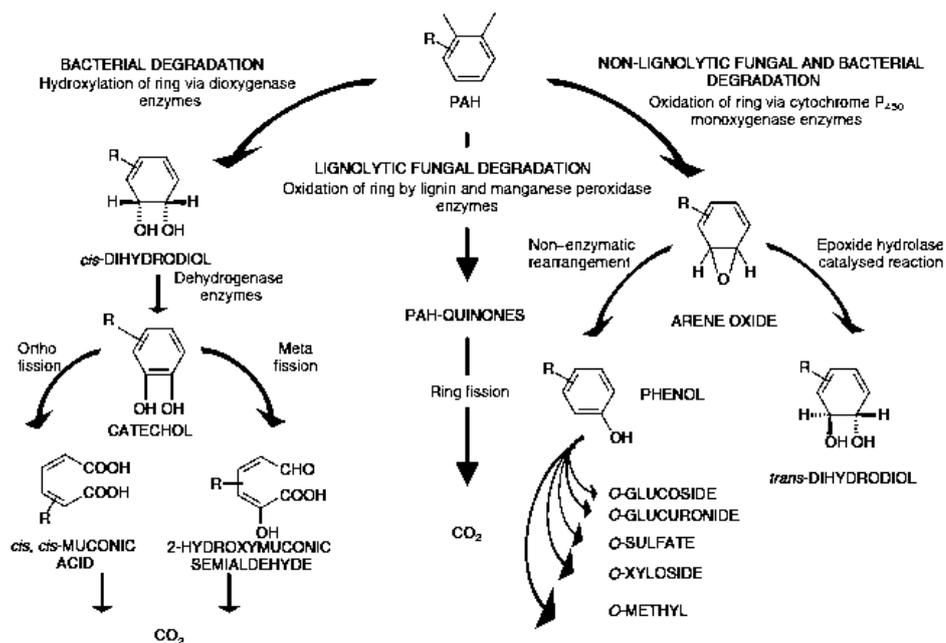


Figura 1.8 – I tre principali meccanismi di biodegradazione degli IPA (Bamforth e Singleton, 2005).

1.3.1 Gli enzimi "IPA-degradatori"

Gli enzimi coinvolti nel processo di degradazione degli IPA appartengono tutti, secondo la classificazione IUPAC della Enzyme Commission, al gruppo EC1, ovvero quello delle ossidoreduttasi, che catalizzano reazioni di trasferimento di elettroni da una specie riducente ad una ossidante. La maggior parte di questi enzimi sono aspecifici e pertanto sono in grado di degradare un'ampia varietà di substrati organici fra cui numerosi composti xenobiotici. Mediante processi di escrezione o lisi cellulare questi enzimi sono trasferiti dalle cellule all'ambiente extracellulare, dove svolgono funzioni chiave per gli ecosistemi, quali la degradazione della lignina, il processo di umificazione, la mineralizzazione della sostanza organica. I microrganismi, ed in particolare i funghi, hanno sviluppato nel corso dell'evoluzione un sistema basato

sulla produzione e l'escrezione di enzimi, che sono sintetizzati in risposta ad una riduzione o ad una limitazione delle fonti azotate e carboniose (Tuor *et al.*, 1995).

Le sottoclassi delle ossidoreduttasi che sono coinvolte nella degradazione degli IPA sono numerose. La classe EC1.10.3 comprende enzimi che utilizzano difenoli e molecole correlate come donatori di elettroni e ossigeno come accettore; rientrano in questa classe le catecolo-ossidasi (EC1.10.3.1) e le laccasi (EC1.10.3.2). Nella classe EC1.13.11 rientrano quegli enzimi che incorporano due atomi di ossigeno nel substrato, ovvero le diossigenasi. La classe EC1.14.18 include quegli enzimi che aggiungono un solo atomo di ossigeno al substrato, come nel caso delle monofenolo monossigenasi (EC1.14.18.1), anche detta tirosinasi. Tutti questi enzimi possono essere indicati più semplicemente come fenolossidasi. Le perossidasi, invece, appartengono alla classe EC1.11.1 e utilizzano come accettore di elettroni il perossido di idrogeno al posto dell'ossigeno. Le perossidasi più comunemente presenti nel suolo sono prodotte dai funghi e sono la manganese perossidasi (EC1.11.1.13) e la lignina perossidasi (EC1.11.1.13).

Fenolossidasi

Sono prodotte da piante e microrganismi sia in ambiente intracellulare che extracellulare. Le fenolossidasi intracellulari vengono utilizzate dalle piante per la sintesi della lignina e dai funghi per la sintesi di sostanze protettive come la melanina. Quelle extracellulari invece vengono prodotte da funghi e batteri saprofiti e rilasciate nell'ambiente mediante escrezione o lisi cellulare, dove intervengono nella degradazione di composti organici recalcitranti.

Le *tirosinasi* catalizzano l'idrossilazione dei monofenoli a *o*-difenoli con il trasferimento di un solo atomo di ossigeno dall'O₂ al substrato e per deidrogenazione trasformano gli *o*-difenoli in *o*-chinoni. Il sito attivo dell'enzima contiene rame che partecipa al trasferimento di elettroni dal substrato all'ossigeno. Sono sintetizzate da un'ampia varietà di batteri, funghi, piante, mammiferi, crostacei ed insetti.

Le *laccasi* appartengono alla famiglia delle glicoproteine multi-rame a bassa specificità, che agiscono prevalentemente sui *para*-fenoli. La maggior parte delle laccasi contiene quattro atomi di Cu(II) nel centro catalitico, distinti in funzione delle proprietà spettroscopiche. In particolare l'atomo a maggiore potenziale redox (definito di tipo 1) è definito rame blu in funzione delle sue proprietà spettroscopiche, conferendo il caratteristico colore cianotico all'enzima. Il ciclo catalitico si compie tramite trasferimenti elettronici a lunga distanza: l'ossidazione del substrato avviene sul rame di tipo 1, gli elettroni vengono quindi trasferiti agli altri atomi di rame mediante una catena redox ed infine raggiungono l'ossigeno che viene ridotto ad acqua. Grazie alla bassa specificità di substrato le laccasi sono enzimi molto versatili; in particolare sono in grado di catalizzare l'ossidazione di *para*-difenoli, polifenoli, metossifenoli, amminofenoli, diammine, poliammine, arilammine, pesticidi, idrocarburi policiclici aromatici, coloranti e anche di alcuni ioni inorganici (Rodriguez Couto *et al.*, 2006). Inoltre è stato osservato che substrati della laccasi, come l'acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico) (ABTS) e l'acido violurico, possono agire da mediatori radicalici, velocizzando notevolmente la reazione catalitica su diversi substrati e rendendo possibile l'ossidazione di composti che altrimenti non sarebbero substrato di questo enzima (Li *et al.*, 1999; Johannes e Majcherczyk, 2000).

Le laccasi sono prodotte da quasi tutti i funghi ligninolitici, da molti funghi non-ligninolitici e da alcuni batteri. Alcune fenolossidasi con caratteristiche laccasiche sono state purificate dalle larve e dalla cuticola degli adulti di alcuni insetti (Miessner *et al.*, 1991).

Perossidasi

Sono enzimi contenenti ferro-eme come centro catalitico e catalizzano l'ossidazione di vari composti organici ed inorganici ad opera di perossido di idrogeno, idroperossidi organici, peracidi, ossidi inorganici, ioni metallici (Dunford, 1999). Le perossidasi vengono suddivise in due famiglie che distinguono gli enzimi di origine animale da quelli di origine fungina, batterica e vegetale. Quest'ultima si suddivide ulteriormente in tre classi: perossidasi intracellulari prodotte da piante e funghi; perossidasi extracellulari prodotte da funghi e batteri; perossidasi extracellulari prodotte dalle piante. Nel suolo sono presenti principalmente perossidasi ligninolitiche, quali *lignina perossidasi (LiP)* e *manganese perossidasi (MnP)*.

La *LiP* ha una bassa specificità di substrato per i composti aromatici e ossida sia strutture fenoliche che non-fenoliche, preferendo quelle metossi-sostituite (Kersten *et al.*, 1990). I composti fenolici sono ossidati a fenossiradicali che, vengono trasformati in chinoni (Odier *et al.*, 1988); i composti aromatici non fenolici sono invece ossidati a cationi radicalici arilici (Shoemaker *et al.*, 1985). Nel dettaglio la *LiP* è una glicoproteina che richiede il perossido d'idrogeno per esprimere la sua attività catalitica (Gold *et al.*, 1984). Il ciclo catalitico della *LiP* consiste nell'ossidazione monoelettronica dell'enzima da parte del perossido d'idrogeno, con formazione di un intermedio catalitico, che a sua volta, viene ridotto da un elettrone fornito dal substrato aromatico.

La *MnP* è anch'essa un enzima glicosilato ed ha un ciclo catalitico simile a quello della *LiP*. Tuttavia, al contrario della *LiP*, la *MnP* agisce preferenzialmente sui substrati fenolici, utilizzando la coppia redox Mn(II)/Mn(III), come intermediario. Diversi studi evidenziano la capacità della *MnP* di ossidare, sia pure con efficienza inferiore rispetto alla *LiP*, anche substrati non fenolici caratterizzati da un alto potenziale redox (D'Annibale *et al.*, 1996).

1.4 La biodisponibilità

Nel valutare la bonifica di un sito contaminato è necessario far riferimento al concetto di biodisponibilità. Tuttavia in letteratura le definizioni di biodisponibilità in parte differiscono. Van Leeuwen e Hermens (1995) hanno definito la biodisponibilità come la capacità di una sostanza di interagire con un organismo; Spacie e Hamelink (1995) come la porzione di una sostanza chimica potenzialmente disponibile per l'attività biologica; Herrchen e collaboratori (1997) hanno considerato la frazione biodisponibile come la percentuale di un composto effettivamente assorbita da un organismo in funzione di un equilibrio dinamico con le particelle del suolo; Alexander (2000) ha indicato la biodisponibilità come l'accessibilità di un contaminante all'assimilazione che ne determina la reale tossicità. Più recentemente Semple e collaboratori (2004) hanno fatto chiarezza tra gli scienziati proponendo due termini: biodisponibilità e bioaccessibilità. La biodisponibilità rappresenterebbe la frazione di sostanza che in un dato momento è libera di attraversare la membrana cellulare di un organismo, mentre la bioaccessibilità è ciò che è effettivamente e potenzialmente biodisponibile, distinguendo tra ciò che viene misurato in un saggio chimico e in un saggio biologico.

Il destino dei contaminati organici nel suolo è funzione della biodisponibilità. Infatti una consistente frazione di contaminanti viene sequestrata dal suolo, interagendo in parte con la matrice minerale a tessitura fine (Ball e Roberts, 1991; Mader *et al.*, 1997), ma venendo adsorbita principalmente dalla sostanza organica (Nam *et al.*, 1998; Alexander 2000). Nam *et al.* (1998) e Yang *et al.* (2010) hanno

riscontrato l'esistenza di una correlazione positiva tra la frazione di IPA sequestrata ed il contenuto di sostanza organica nei suoli indagati. Pertanto il contenuto di sostanza organica influenza fortemente la biodisponibilità dei contaminanti (Luthy *et al.*, 1997; Cornelissen *et al.*, 2005; Schwarzenbach *et al.*, 2006), riducendone l'accessibilità al biota (Alexsander, 2000; Reid *et al.*, 2000).

In conseguenza di ciò l'esposizione degli organismi ai contaminanti organici è solitamente sovrastimata quando si utilizzano metodi analitici che comportano l'utilizzo di procedure estrattive vigorose, poiché non tutta la frazione estratta risulta effettivamente biodisponibile per essere assimilata ed avere effetti negativi sugli organismi (Liste e Alexander, 2002). A tale scopo sono stati proposti diversi metodi analitici per valutare la frazione biodisponibile dei contaminanti organici nel suolo. Nel caso degli IPA, in numerosi esperimenti è stata applicata una procedura estrattiva blanda che prevede l'utilizzo del butanolo, la cui frazione estratta sembra mimarne la biodisponibilità (Liste e Alexander, 2002; Northcott e Jones, 2003; Swindell e Reid, 2006).

Il sequestro degli IPA è anche funzione delle caratteristiche chimico-fisiche del composto. Yang e collaboratori (2010) hanno riscontrato che gli IPA più idrofobici sono quelli più prontamente sequestrati dalla sostanza organica e che la frazione estratta in butanolo è correlata negativamente con il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua. Ciò suggerisce che gli IPA a più alto peso molecolare sono quelli meno disponibili ed anche meno utilizzabili dai microrganismi come risorsa.

Un altro importante fattore da considerare nel valutare la biodisponibilità dei composti organici nel suolo è il cosiddetto processo di *ageing*, ovvero di invecchiamento, mediante il quale molte sostanze inquinanti diminuiscono la loro biodisponibilità con il passare del tempo, proposto per spiegare la differenze nelle velocità di biodegradazione tra un suolo di recente contaminazione ed un suolo storicamente contaminato (Bogan e Sullivan, 2003).

1.5 Bioremediation

Il biorisanamento (o *bioremediation*) si è affermato negli ultimi anni come una delle principali tecnologie di bonifica ambientale. Come citato nel National Research Council del 1993, il principio della bioremediation sostiene l'utilizzo dei microrganismi per la rimozione di agenti contaminanti o per la loro trasformazione in forme meno pericolose.

Il biorisanamento di siti contaminati da composti organici si basa sulla stimolazione dell'attività catabolica di microrganismi capaci di utilizzare questi composti come fonte di carbonio e di energia, in modo da poter essere completamente decomposti in anidride carbonica ed acqua, o trasformati in composti meno tossici (Atlas e Bartha, 1997).

Questa tecnica di risanamento ambientale presenta numerosi vantaggi rispetto alle tecniche tradizionali, legati principalmente ai bassi costi e ai ridotti consumi energetici nonché al basso rischio di contaminazione delle altre matrici ambientali. Di contro ne derivano alcuni svantaggi, quali la necessità di valutare preventivamente l'efficacia del trattamento microbiologico, l'inefficacia dell'intervento in presenza di condizioni ambientali difficili o di scarsità di microrganismi degradatori, la bassa biodisponibilità dei contaminanti, la scarsa conoscenza dei meccanismi di biodegradazione di alcuni composti xenobiotici. L'esito del processo di biorisanamento dipende da numerosi fattori: la natura e la concentrazione del

CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE

contaminante, il tipo di suolo, le condizioni ambientali, la composizione della comunità microbica indigena.

Si possono distinguere tre tipologie di bioremediation: la *monitored natural attenuation*, che prevede l'utilizzo di microrganismi autoctoni naturalmente presenti nel sito, mediante la quale la biodegradazione, insieme ai fenomeni di dispersione, diluizione, adsorbimento, volatilizzazione, ossidazione abiotica sono efficaci nell'indurre, in tempi accettabili e senza l'intervento umano, una riduzione della tossicità delle sostanze inquinanti; la *biostimulation*, che prevede l'aggiunta di nutrienti (Pankrantz, 2001), di matrici organiche (urea, letame, segatura, compost) (Rosenberg *et al.*, 1992; Walworth e Reynolds, 1995; Cho *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1999; Namkoong *et al.*, 2002), di agenti mobilizzanti, di induttori radicalici, utili a potenziare il grado di bioremediation grazie alla stimolazione della comunità indigena; la *bioaugmentation*, che comporta l'aggiunta di microrganismi in grado di velocizzare il processo di degradazione dei contaminanti (Sarkar *et al.*, 2005).

Una particolare metodologia di *bioaugmentation* è rappresentata dalla *mycoremediation*, trattamento biologico basato sull'utilizzo di funghi, principalmente quelli appartenenti alla classe dei *white-rot*. Questa tecnica è attualmente considerata di grande interesse nella bonifica di suoli contaminati da inquinanti organici. I funghi coinvolti nella degradazione di composti recalcitranti, come la lignina o le cellulose, si sono, infatti, dimostrati particolarmente abili nel metabolizzare diversi contaminanti, quali oli ed affini, prodotti petroliferi, clorofenoli, idrocarburi policiclici aromatici (Alexander, 1994; Juhasz e Naidu, 2000). I funghi filamentosi, inoltre, risultano particolarmente efficienti nel processo di rimozione dei contaminanti grazie alla presenza delle ife, che favoriscono la penetrazione nella matrice contaminata, aumentando la superficie di contatto tra i microrganismi e i substrati da degradare.

Matrici complesse come il compost hanno un enorme potenziale nella bioremediation di numerosi contaminanti organici, tra cui gli IPA (Kastner *et al.*, 1995; Kastner e Mahro, 1996; Namkoong *et al.*, 2002). Infatti il compost è al tempo stesso una risorsa per la comunità microbica e un vettore di microrganismi, quali batteri del genere *Bacillus*, funghi del genere *Aspergillus* e attinomiceti del genere *Streptomyces*, per i quali è dimostrata la capacità degradativa di composti organici recalcitranti (Hunter *et al.*, 2005; Naranjo *et al.*, 2007; Chaudhary *et al.*, 2011; Balachandran *et al.*, 2012); allo stesso tempo il compost migliora le caratteristiche abiotiche del suolo, come la capacità di ritenzione idrica, la struttura, il pH (Scelza *et al.*, 2007).

CAPITOLO 2

OBIETTIVO DELLA RICERCA

2.1 Obiettivo della ricerca

Il presente progetto di dottorato ha lo scopo di studiare il ruolo dei microrganismi del suolo nel processo di degradazione degli idrocarburi policiclici aromatici in siti contaminati, andando a valutare nel tempo il tasso di degradazione di questi composti organici e le variazioni strutturali e funzionali della comunità microbica.

L'idea di approfondire questo argomento è nata dai risultati ottenuti in uno studio di biomonitoraggio del grado di contaminazione da IPA nell'area urbana di Napoli (Maisto *et al.*, 2004). In questa ricerca le concentrazioni totali di IPA misurate in foglie di *Quercus ilex* e nel suolo sottostante hanno evidenziato come non ci fosse una corrispondenza tra il trend riscontrato nei suoli e quello ottenuto per le foglie. Infatti, in alcuni siti urbani in cui le concentrazioni di IPA misurate nelle foglie mostravano i valori più alti, non corrispondevano valori altrettanto elevati nel suolo. Questi risultati hanno, pertanto, fatto pensare che nel suolo potessero avvenire processi di degradazione di questi composti recalcitranti ad opera delle comunità microbiche, in funzione del livello di attività dei microrganismi edafici.

Pertanto nel presente progetto di ricerca, al fine di studiare la degradazione degli IPA in funzione dell'attività metabolica dei microrganismi del suolo, sono stati allestiti dei mesocosmi con un suolo prelevato in un'area industriale e poi contaminato mediante l'aggiunta di due IPA, antracene e benzo[a]pirene. I mesocosmi di suolo sono stati incubati per 273 giorni al buio in condizioni di temperatura ed umidità controllate. L'andamento delle concentrazioni degli IPA è stato monitorato nel tempo: in particolare la dinamica è stata studiata sia in funzione delle concentrazioni totali che in relazione alla frazione biodisponibili. Sono stati oggetto di monitoraggio non soltanto l'antracene e il benzo[a]pirene, ma anche altri 14 IPA che, insieme ai due aggiunti, costituiscono quelli prioritari per l'EPA (*Environmental Protection Agency*).

Per comprendere il ruolo dei microrganismi del suolo nel processo, sono state monitorate alcune attività enzimatiche (attività laccasica, catecolo-ossidasi e perossidasi) coinvolte nell'ossidazione di composti recalcitranti lignino-simili. Per valutare l'influenza della presenza degli IPA sulla comunità microbica del suolo, è stata studiata l'evoluzione temporale della struttura della comunità mediante la determinazione del profilo degli acidi grassi dei fosfolipidi (PLFA).

Lo studio è stato condotto in parallelo su altre due tipologie di mesocosmi dello stesso suolo contaminato, di cui una addizionata con un innesco di compost e l'altra addizionata con un consorzio fungino costituito da cinque specie di basidiomiceti. In tal modo si è voluto costatare se le aggiunte di compost e di funghi andassero ad influenzare il processo di degradazione rispetto al suolo tal quale, così da poter valutare la possibilità di utilizzare il consorzio fungino od il compost come una possibile soluzione che permetta di accelerare i processi di decontaminazione di suoli contaminati da IPA.

La comprensione dei meccanismi coinvolti nel processo di degradazione degli IPA è importante per incentivare l'impiego di interventi di risanamento biologico nel campo della bonifica dei siti contaminati. Infatti le metodologie che prevedono il

CAPITOLO 2 - OBIETTIVO DELLA RICERCA

potenziamento dell'attività biologica rappresentano sicuramente un'alternativa vantaggiosa, non invasiva e poco onerosa rispetto ai metodi tradizionali, la cui applicazione porta con sé una serie di problematiche legate all'alterazione delle proprietà chimico-fisiche e biologiche del suolo, alla mobilitazione dei contaminanti e all'immissione di altre sostanze xenobiotiche utilizzate per il trattamento dei suoli.

In particolare la tecnica della *bioaugmentation*, ovvero dell'aggiunta di una o più specie microbiche capaci di metabolizzare particolari composti organici recalcitranti, permette di velocizzare il processo di attenuazione naturale, in maniera ancora più efficiente rispetto a tecniche biologiche che tendono a potenziare l'attività microbica della comunità autoctona mediante l'aggiunta di nutrienti e l'aerazione attiva (*biosparging*, *bioventing*, *bioflushing*).

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 Identificazione del suolo oggetto di sperimentazione

Per la scelta di un suolo da utilizzare per l'allestimento dei mesocosmi sono stati campionati e caratterizzati terreni di diversa tipologia, in funzione dei seguenti parametri: pH, contenuto di sostanza organica, contenuto di elementi (Cd, Pb, Fe, Mn, Cu, Zn, Ni, V, As e Cr) e contenuto di IPA (naftalene, acenafilene, acenafene, fluorene, fenantrene, antracene, fluorantene, pirene, benzo[a]antracene, crisene, benzo[b]fluorantene, benzo[k]fluorantene, benzo[j]fluorantene, benzo[e]pirene, benzo[a]pirene, perilene, indeno[1,2,3-cd]pirene, dibenzo[a,h]antracene, benzo[g,h,i]perilene, dibenzo[a,e]pirene, coronene, dibenzo[a,h]pirene, dibenzo[a,i]pirene, dibenzo[a,l]pirene).

Sono stati campionati nello strato 0-10 cm e sottoposti ad analisi dieci suoli (Figura 3.1): otto provenienti dall'area industriale di Avellino (1-8) e due provenienti da una pineta incendiata in località Spineta di Battipaglia (9-10). Ogni campione è stato ottenuto prelevando quattro carote unite per formare un campione omogeneo rappresentativo del sito. Le analisi di caratterizzazione sono state condotte sul suolo setacciato a 2 mm. Per pH, sostanza organica e concentrazioni totali di IPA sono stati utilizzati i metodi descritti nei paragrafi seguenti; per la determinazione delle concentrazioni totali degli elementi è stata utilizzata la metodica descritta da Baldantoni *et al.* (2010).



Figura 3.1 - Siti di campionamento dei suoli: a) zona industriale di Avellino; b) pineta incendiata in località Spineta (Battipaglia).

I risultati delle analisi di caratterizzazione sono mostrati in Tabella 3.1 e nelle Figure 3.2 e 3.3. Il contenuto di sostanza organica negli otto suoli dell'area industriale è risultato compreso nell'ampio intervallo 8-28%, trattandosi di suoli di natura molto diversa: terreni di riporto prelevati nelle aiuole che costeggiano industrie e strade e terreni naturali campionati in aree boschive. I due suoli della pineta, invece, hanno mostrato un contenuto di sostanza organica pari al 4% e all'8%, rispettivamente per il suolo incendiato e per quello non direttamente attraversato dal fuoco. Anche il pH ha mostrato un'ampia variabilità per i suoli industriali, oscillando tra valori caratteristici di suoli debolmente acidi (6.2) a quelli tipici di suoli neutri (6.8-7.3), fino a valori propri di suoli debolmente alcalini (7.5-7.7). Per i suoli della pineta sono stati misurati valori di pH propri di quest'ultima categoria.

CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI

SITI	S.O. %	pH
1	18.0 ± 0.2	6.2 ± 0.05
2	8.4 ± 0.3	6.8 ± 0.2
3	10.0 ± 0.1	7.3 ± 0.02
4	12.7 ± 0.1	7.2 ± 0.01
5	7.6 ± 0.05	7.3 ± 0.04
6	19.3 ± 0.1	7.0 ± 0.1
7	10.4 ± 0.05	7.5 ± 0.09
8	28.1 ± 0.3	7.7 ± 0.06
9	4.2 ± 0.01	7.8 ± 0.04
10	8.1 ± 0.1	7.7 ± 0.03

Tabella 3.1 - Valori medi ± errore standard di sostanza organica% e pH riscontrati per siti oggetto di indagine.

Le concentrazioni degli elementi analizzati (Figure 3.2 e 3.3) sono state confrontate con intervalli di riferimento per suoli di aree naturali riportati da Allen (1989). Soltanto Cu e V nei suoli dell'area industriale hanno mostrato concentrazioni prossime o più alte del limite superiore dell'intervallo. I valori di concentrazione degli elementi sono stati, inoltre, confrontati con le concentrazioni soglia di contaminazione (CSC) dettate dal D.lgs. 152/2006 in materia di bonifica dei siti contaminati (tabella 1, allegato 5, titolo V, parte IV) in relazione alla specifica destinazione d'uso (Tabella 3.2). Anche in questo caso la situazione è risultata critica soltanto per questi due elementi, Cu e V. Per quanto riguarda il Cu soltanto per il suolo del sito 4, a ridosso di un'azienda che lavora questo metallo, sono state riscontrate concentrazioni 2.5 volte superiori rispetto alla CSC per i siti ad uso verde pubblico, privato e residenziale, mentre per il V tutti i suoli all'interno o in prossimità dell'area industriale hanno mostrato concentrazioni superiori ai valori CSC per i siti ad uso verde pubblico, privato e residenziale; i suoli dei siti industriali 3 e 8 hanno presentato addirittura concentrazioni confrontabili con il valore CSC per i siti ad uso commerciale e industriale. L'indagine sulle concentrazioni degli elementi è di fondamentale importanza in quanto possono interferire con il metabolismo microbico, divenendo tossici se presenti in dosi che superano il limite massimo del range di tolleranza (Kabata-Pendias, 2010).

In Figura 3.4 sono riportate le concentrazioni di IPA totali calcolate come somma delle concentrazioni dei singoli composti. Uno dei valori più alti è stato riscontrato per il suolo del sito 3 (741 ng g⁻¹ p.s.), localizzato nei pressi di un sito di stoccaggio rifiuti all'interno dell'area industriale. Pertanto, in funzione dell'alta concentrazione di IPA totali e della fattibilità di prelievo di ingenti quantitativi di terreno, la scelta del suolo da utilizzare per la sperimentazione e l'allestimento dei mesocosmi è ricaduta sul sito 3.

	A	B
Cd	2	15
Pb	100	1000
Fe	/	/
Mn	/	/
Cu	120	600
Zn	150	1500
Ni	120	500
V	90	250
As	20	50
Cr	150	800
IPA tot	10	100

Tabella 3.2 - CSC (mg kg⁻¹ s.s.) secondo il D.lgs. 152/06 per i siti ad uso verde pubblico, privato e residenziale (A) e ad uso commerciale e industriale (B) in riferimento ai parametri determinati. Gli IPA totali sono dati dalla somma di PY, B[a]ANTH, CH, B[b]FLAN, B[k]FLAN, B[a]P, I[123-cd]PY, D[a,h]AN, B[ghi]PERY, D[a,e]PY, D[a,h]PY, D[a,i]PY, D[a,l]PY.

CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI

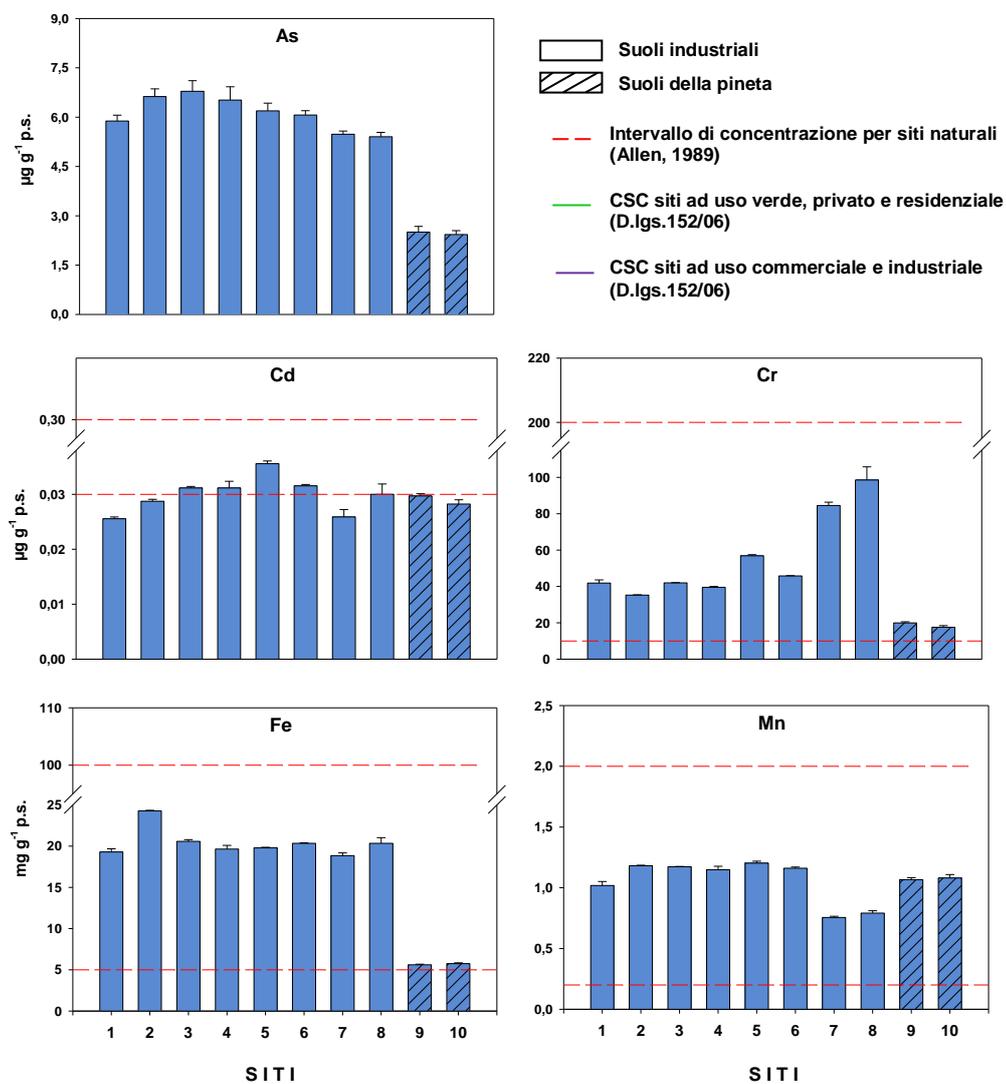


Figura 3.2 - Concentrazioni medie \pm errore standard degli elementi nei suoli oggetto di indagine.

CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI

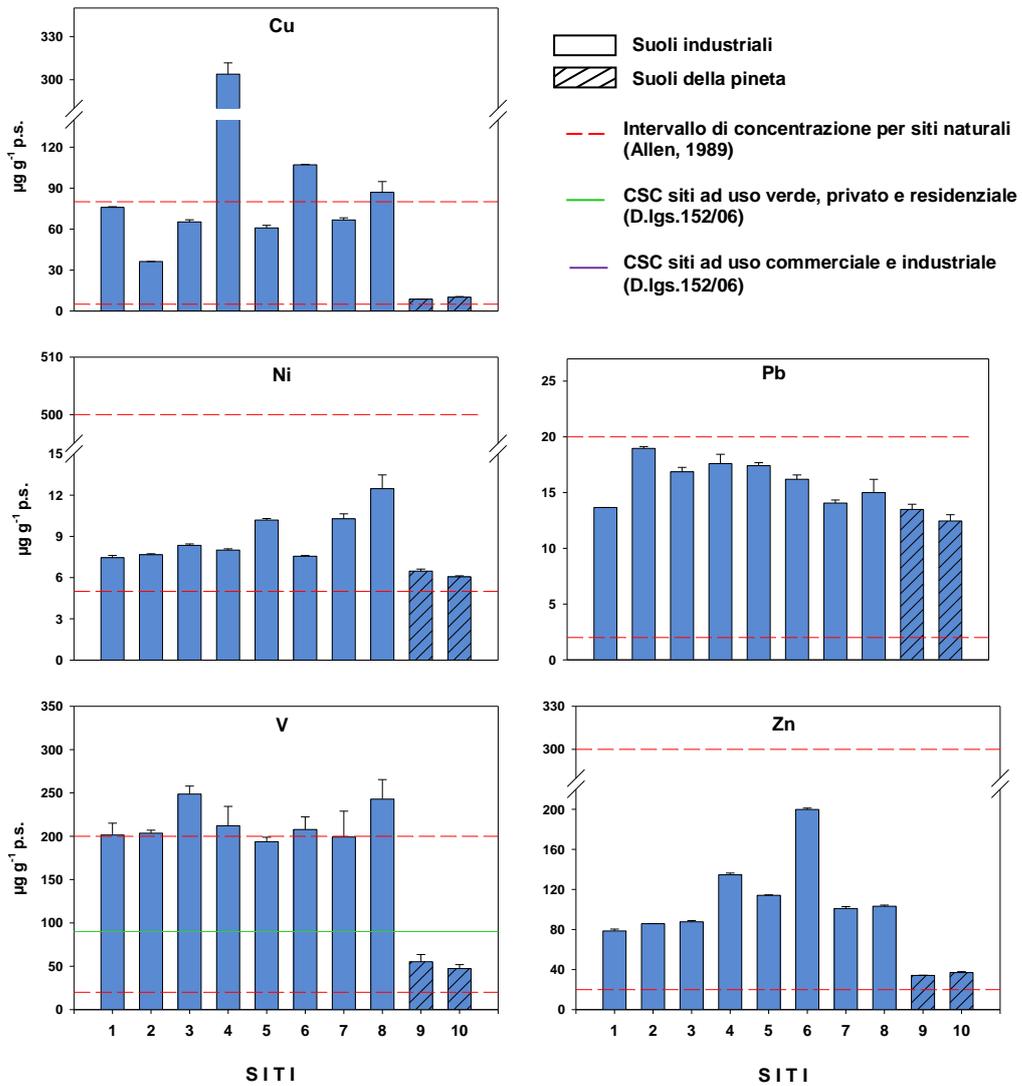


Figura 3.3 - Concentrazioni medie ± errore standard degli elementi nei suoli oggetto di indagine.

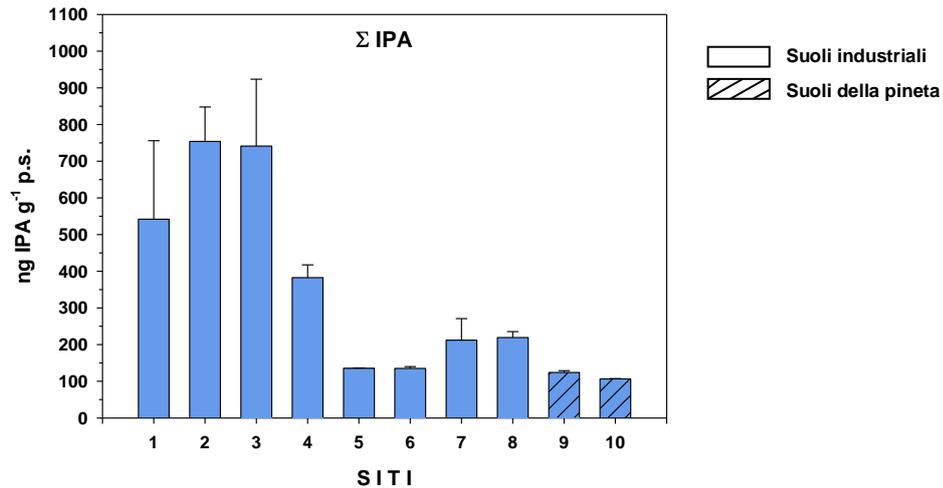


Figura 3.4 - Concentrazioni medie ± errore standard degli IPA totali nei suoli oggetto di indagine.

3.2 Piano sperimentale e allestimento dei mesocosmi

Il suolo da utilizzare per la sperimentazione è stato prelevato a fine ottobre 2013 nella zona industriale di Avellino, nei pressi di un sito di stoccaggio di rifiuti urbani, in un'area incolta ed abbandonata (sito 3 in Figura 3.1a). Sono stati prelevati circa 70 kg di terreno fino ad una profondità di circa 20 cm, servendosi di una pala da giardino. Il terreno è stato conservato all'interno di sacchi in tela al buio a temperatura ambiente. In seguito è stato interamente rivoltato in modo da renderlo omogeneo ed è stato suddiviso in tre aliquote da 23 kg ciascuna.



Figura 3.5 - a) prelievo del suolo da utilizzare per la sperimentazione; b) omogeneizzazione del terreno prelevato; c) le tre aliquote di suolo.

Due settimane prima dell'allestimento dei mesocosmi le tre aliquote di suolo sono state diversamente trattate: un'aliquota è stata addizionata con 140 g di compost da FORSU fornito dall'impianto di compostaggio di Salerno, le cui caratteristiche sono mostrate in Tabella 3.3; un'altra aliquota di suolo è stata addizionata con 5 g di spore del fungo *Sclerotinia citrinum*, prelevato nel campus dell'università di Salerno, e con 100 g di una miscela di micelio fungino costituito dalle specie *Armillaria mellea*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* e *Stropharia Ferii*, alla dose di un quarto ognuna, acquistate dalla ditta Fratelli Ingegneri; l'ultima aliquota è stata lasciata tal quale.

Ognuna delle tre aliquote di suolo avrebbe rappresentato una delle tre tipologie di mesocosmo così definite:

- suolo con compost alla dose dello 0.6% in peso, S_{CMP}

CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI

- suolo con funghi alla dose dello 0.4% in peso di micelio e dello 0.02% in peso di spore, S_{FNG}
- suolo tal quale, S.



Figura 3.6 - a) Spore di *S. Citrinum* nel corpo fruttifero; b) Miceli fungini; c) Mix dei 4 miceli fungini; d) aggiunta del micelio al suolo.

N totale	1.74% s.s.	Materiali inerti (d<3.33mm)	0.013% s.s.
Salinità (NaCl)	0.93% s.s.	Materiali inerti (3.33mm<d<10mm)	<0.010% s.s.
Umidità	11.27%	Materiali plastici (3.33mm<d<10mm)	<0.010% s.s.
pH	7.45	Materiali plastici (d<3.33mm)	<0.010% s.s.
Cd	<0.50 mg/kg s.s.	Materiali plastici, vetro e metalli (d≥2mm)	<0.010% s.s.
Cr	<0.50 mg/kg s.s.	Norg/Ntot %	91.38
Cr(VI)	<0.10 mg/kg s.s.	C/N	14.08
P totale	23215 mg/kg s.s.	Indice di germinazione	80%
Hg	<0.50 mg/kg s.s.	E.coli (1°unità campionaria)	<10 ufc/g
Ni	11.2 mg/kg s.s.	E.coli (2°unità campionaria)	<10 ufc/g
Pb	<0.50 mg/kg s.s.	E.coli (3°unità campionaria)	<10 ufc/g
K	6266 mg/kg s.s.	E.coli (4°unità campionaria)	<10 ufc/g
Cu	59.6 mg/kg s.s.	E.coli (5°unità campionaria)	<10 ufc/g
Zn	182 mg/kg s.s.	Salmonella ssp (1°unità campionaria)	assente in 25 g
N organico	1.59% s.s.	Salmonella ssp (1°unità campionaria)	assente in 25 g
C organico	24.50% s.s.	Salmonella ssp (1°unità campionaria)	assente in 25 g
C umico e fulvico	7.87% s.s.	Salmonella ssp (1°unità campionaria)	assente in 25 g
Inerti litoidi (d≥5mm)	<0.010% s.s.	Salmonella ssp (1°unità campionaria)	assente in 25 g

Tabella 3.3 - Parametri del compost addizionato al suolo.

Nonostante il suolo scelto per la sperimentazione presentasse un contenuto di IPA totali più alto rispetto agli altri suoli indagati (741 ng/g p.s.), la concentrazione è risultata inferiore di diversi ordini di grandezza rispetto ai valori limite di contaminazione riportati nel D.lgs. 152/06.

Pertanto si è deciso di contaminare ognuna delle tre aliquote di suolo con due IPA, uno a basso peso molecolare, l'antracene, recentemente inserito dall'Agenzia Europea per le sostanze chimiche tra le sostanze di alta preoccupazione perché persistente, bioaccumulabile e tossico per gli organismi acquatici, ed uno ad alto peso molecolare, il benzo[a]pirene, riclassificato nel 2008 dalla IARC nel gruppo 1 come cancerogeno per l'uomo. Per la scelta delle dosi da applicare al suolo si è fatto riferimento a quanto riportato in letteratura in ricerche simili (Hamdi *et al.*, 2006; Hamdi *et al.*, 2007; Scelza *et al.*, 2007; Steffan *et al.*, 2007).

CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI

Sono stati preparati 2 litri di soluzione di antracene e benzo[a]pirene in acetone, alla concentrazione di 5 g/l ognuno; la soluzione è stata divisa in tre parti da 730 ml, in modo tale che ognuna venisse utilizzata per contaminare un'aliquota di suolo. Ognuna delle tre aliquote di suolo è stata contaminata introducendo goccia a goccia i 730 ml di soluzione in 5 kg di suolo, che è poi stato diluito e miscelato man mano con 15 kg del restante terreno, fino ad ottenere un suolo omogeneamente contaminato. La concentrazione in peso raggiunta per ognuno dei due IPA per ogni aliquota di terreno era di circa 150 mg/kg di suolo fresco.

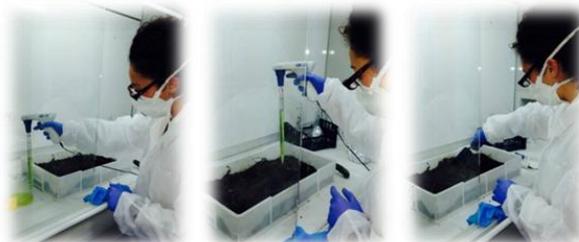


Figura 3.7 - Contaminazione dei suoli con la miscela di antracene e benzo[a]pirene.

Si è così proceduto all'allestimento dei mesocosmi, utilizzando ognuna delle tre aliquote di suolo per riempire 4 ceste di plastica forate da 30x40x8.5 cm³. I mesocosmi, 4 per tipologia (S, S_{CMP} e S_{FNG}), sono stati posti in cella climatica al buio in condizioni di temperatura ed umidità controllate; in particolare la temperatura della cella è stata impostata a (24±2)°C mentre l'umidità relativa è stata regolata al (70±10)%. Prima di procedere con il campionamento al tempo iniziale (T₀), è stato necessario attendere 24 ore per la completa evaporazione dell'acetone utilizzato come vettore per gli IPA.



Figura 3.8 - I mesocosmi nella cella climatica.

3.3 Prelievo e trattamento dei campioni

I campionamenti di suolo dai mesocosmi sono stati effettuati con una cadenza temporale crescente. A partire dal tempo iniziale T₀, sono stati effettuati sette prelievi nell'arco 273 giorni. Nel dettaglio i suoli sono stati prelevati ai tempi:

- T₀, 24 ore dopo l'allestimento dei mesocosmi
- T₁, dopo 14 giorni da T₀

CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI

- T₂, dopo 35 giorni da T₀
- T₃, dopo 67 giorni da T₀
- T₄, dopo 106 giorni da T₀
- T₅, dopo 153 giorni da T₀
- T₆, dopo 208 giorni da T₀
- T₇, dopo 273 giorni da T₀

Ad ogni campionamento, da ognuno dei 12 mesocosmi sono state prelevate in maniera casuale 4 carote di suolo con diametro di 2.5 cm e altezza pari a tutta la profondità della cesta; pertanto per ogni tipologia di mesocosmo (S, S_{CMP} e S_{FNG}) sono state prelevate 16 carote, unite poi a formare un campione omogeneo e rappresentativo di ognuna delle tre tipologie.

I campioni sono stati setacciati a 2 mm per separare scheletro, mesofauna e residui di lettiera dalla frazione fine del terreno. Il suolo da utilizzare per la determinazione degli IPA è stato lasciato essiccare all'aria in vaschette di alluminio al buio per 2 mesi; il suolo per la determinazione dei PLFA è stato congelato a -20 °C; il suolo da utilizzare per la determinazione delle attività enzimatiche e dei parametri chimico-fisici (tenore idrico, sostanza organica e pH) è stato conservato per pochi giorni in frigo a 4 °C.



Figura 3.9 - a) Prelievo di suolo dai mesocosmi e b) setacciamento.

3.4 Procedure analitiche

3.4.1 Tenore idrico e sostanza organica

Per poter esprimere i risultati delle analisi biologiche riferendoli al peso secco del terreno, è stato determinato il tenore idrico per ogni campione. Un'aliquota di suolo setacciato è stata pesata e posta in stufa per 48 ore a 105 °C. Il tenore idrico è stato calcolato come percentuale rispetto al peso fresco, secondo la seguente relazione:

$$t.i.\% = (p.n.f. - p.n.s.) / p.n.f. \times 100$$

dove p.n.f. è il peso netto fresco e p.n.s. è il peso netto secco.

Per avere una stima del contenuto di sostanza organica dei suoli i campioni essiccati sono stati calcinati in muffola a 550 °C per 4 ore. Il contenuto di sostanza organica è stato misurato per differenza di peso ed espresso in percentuale di peso secco come segue:

$$S.O.\% = (p.n.s. - p.n.i.) / p.n.s. \times 100$$

dove p.n.i. è il peso netto incenerito e p.n.s. è il peso netto secco.

La determinazione di questi due parametri è stata effettuata in duplice replica per campione.



Figura 3.10 - Suoli inceneriti.

3.4.2 pH

Il pH dei suoli è stato determinato per via potenziometrica. A 10 g di suolo fresco sono stati aggiunti 25 ml di acqua distillata ed i campioni così preparati sono stati posti in agitazione per 30 minuti e poi lasciati decantare per circa una decina di minuti. È stato infine misurato il pH del surnatante mediante pHmetro Hanna HI 4212, dotato di elettrodo combinato a giunzione singola HI 1131B. La determinazione per ogni campione è avvenuta in duplicato.

3.4.3 Concentrazioni totali di IPA

In questo studio sono state monitorate le concentrazioni dei 16 IPA prioritari per l'EPA. Le concentrazioni totali sono state determinate seguendo il protocollo sviluppato da De Nicola e collaboratori (2003).

In becker da 250 ml sono stati pesati 15 g di suolo essiccato all'aria ai quali sono stati addizionati 15 g di Na_2SO_4 anidro, al fine di eliminare l'interferenza dell'acqua residua, 50 ml di estraente, una miscela composta da diclorometano e acetone in rapporto 1:1, e 125 μl di una miscela di standard deuterati (acenaftene D10, crisene D12, naftalene D8, perilene D12, fenantrene D10) a concentrazione di 1000 $\mu\text{g/ml}$, utile a stimare le perdite di analiti durante le varie fasi di estrazione. I campioni così preparati sono stati sonicati ad elevata frequenza mediante sonicazione pulsata per 3 minuti, al fine di evitarne il surriscaldamento. Gli estratti sono stati filtrati con filtri Whatman 40 ed il suolo residuo è stato sottoposto ad altri due cicli di sonicazione pulsata, aggiungendo prima di ognuna altri 50 ml. Il volume totale di estratto (150 ml) è stato ridotto a circa 2 ml mediante evaporatore rotante ed è stato purificato introducendo il campione concentrato in colonnine preimpaccate con florisil e gel di silice ed eluendolo con 15 ml di esano al fine di purificarlo dagli acidi organici e dagli acidi umici presenti nel suolo. L'eluato è stato portato a secco sotto flusso di azoto ed è stato conservato a 4 °C.

Prima dell'analisi i campioni sono stati ridisciolti in 25 ml di cicloesano. Per la determinazione delle concentrazioni è stato utilizzato un gascromatografo (Agilent 7890B) dotato di uno spettrometro di massa come sistema di rivelazione (Agilent 5977A). Un μl di campione è stato iniettato manualmente in modalità splitless in colonna capillare DB-5MS UI (lunghezza: 30 m; diametro interno 0,25 mm; spessore del film: 0,25 μm). Come gas carrier è stato utilizzato elio, mantenuto in condizioni di flusso costante (1.5 ml/min).

CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI



Figura 3.11 - Sonicazione, filtrazione ed essiccazione dei campioni.

La temperatura dell'iniettore è stata impostata a 75° per 1 minuto e poi è stata fatta aumentare bruscamente a 250 °C, mentre la pressione in testa alla colonna è stata impostata a 14.443 psi. La temperatura iniziale del forno è stata programmata in modo da seguire una rampa lineare da 75 °C a 315 °C. I dettagli della programmata delle temperature sono indicati in tabella 3.4. L'acquisizione dei dati è stata svolta in modalità SIM (*selected ion monitoring*). Per l'analisi quantitativa sono state costruite curve di calibrazione per ogni idrocarburo analizzato a 9 livelli di concentrazione (0, 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 20, 50, 100 µg/ml), utilizzando una miscela dei 16 IPA deuterati. Ogni campione di suolo è stato estratto e determinato in triplicato.

RAMPA (°C/min)	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (min)
	75	1
20	200	2
8	280	6
50	300	5
50	315	5

Tabella 3.4 - Programmata della temperatura del forno del GC durante le analisi degli IPA



Figura 3.12 - GC-MS.

3.4.4 Concentrazioni biodisponibili di IPA

Per la determinazione delle concentrazioni biodisponibili dei 16 IPA prioritari per l'EPA la metodica di estrazione è stata messa a punto facendo riferimento alla letteratura scientifica (Thiele-Bruhn e Brummer, 2004; Yang *et al.*, 2010). Anche in questo caso ogni misura è stata replicata tre volte per ogni tipologia di suolo.

Per ogni campione sono stati pesati 10 g di suolo essiccato all'aria in beute da 250 ml, ai quali sono stati addizionati 10 g di Na₂SO₄ anidro, 100 ml di estraente, il butanolo normale, e 85 µl della miscela di standard deuterati (acenaftene D10, crisene D12, naftalene D8, perilene D12, fenantrene D10) a concentrazione di 1000 µg/ml per la stima del recupero degli analiti. I campioni sono stati posti in agitazione

CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI

al buio a 180 rpm per 16 ore a temperatura ambiente. Gli estratti sono stati filtrati su filtri Whatman 40, ridotti a circa 1 ml in volume mediante evaporatore rotante a 65 °C e portati completamente a secco sotto flusso di azoto. Il materiale essiccato è stato ridisciolti in 2 ml di esano, introdotto nelle colonnine preimpaccate in florisil e gel di silice ed eluito con 15 ml di esano. L'eluato è stato portato a secco sotto flusso di azoto ed è stato conservato a 4 °C.



Figura 3.13 - Preparazione dei saggi, agitazione per 16 h, purificazione e essiccazione dell'estratto.

Al momento della determinazione delle concentrazioni biodisponibili i campioni sono stati sciolti in 10 ml di cicloesano. L'analisi strumentale è avvenuta su 1 µl di campione mediante GC-MS, con la medesima strumentazione con cui sono state determinate le concentrazioni totali degli IPA e con le medesime caratteristiche dei metodi di determinazione e di acquisizione (SIM). Anche per l'analisi quantitativa sono state utilizzate le stesse curve di calibrazione costruite per la determinazione delle concentrazioni totali degli IPA.

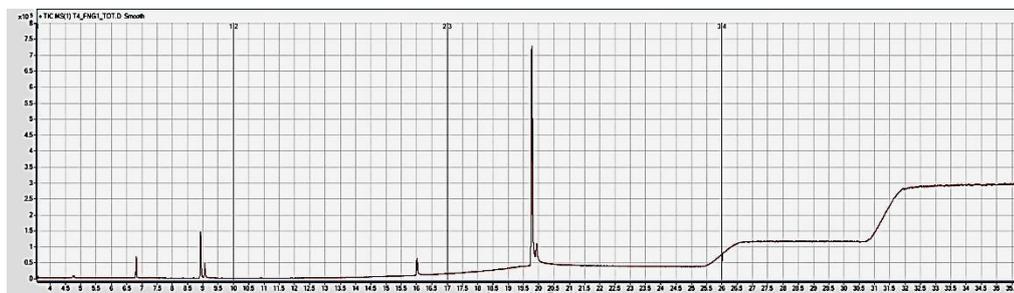


Figura 3.14 - Cromatogramma degli IPA determinati al GC-MS.

3.4.5 Attività laccasica

Per la determinazione dell'attività laccasica è stata utilizzata la procedura sviluppata da Floch e collaboratori (2007), con alcune modifiche, basata sull'ossidazione dell'ABTS [(acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico)] da parte degli enzimi ad attività fenol-ossidasi e sulla conseguente rivelazione spettrofotometrica del prodotto di reazione (ABTS⁺).

A tal fine sono stati pesati 0.1 g di suolo fresco in provette da 50 ml, ai quali sono stati aggiunti 10 ml di tampone MUB a pH 2.0 e 200 µl di soluzione di ABTS 0.1 M. I campioni sono stati incubati per 15 minuti in agitazione, al buio ed ad una temperatura di 30 °C; in parallelo sono stati preparati e incubati i bianchi, per i quali, però, il substrato è stato aggiunto al termine dell'incubazione. La reazione enzimatica è stata bloccata ponendo i campioni in ghiaccio, in modo da portare la temperatura a circa 4 °C; in seguito 1.5 ml di miscela di reazione sono stati trasferiti in eppendorf da 1.5 ml e centrifugati a 12000 rpm per 2 minuti a 4 °C. Infine si è proceduto alla determinazione dell'assorbanza dell'ABTS⁺ a 420 nm mediante spettrofotometro UV-

CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI

VIS a doppio raggio (modello 1800, Shimadzu), dopo aver trasferito 1 ml di miscela in cuvette monouso da 1 ml e cammino ottico di 1 cm. I bianchi sono serviti per l'azzeramento dello strumento. Il saggio enzimatico è stato eseguito su 5 repliche per campione di suolo.

I valori di concentrazione di ABTS ossidato dai campioni di suolo sono stati ricavati dividendo l'assorbanza misurata per il coefficiente di estinzione del substrato a 420 nm ($\epsilon_{420} = 18460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), calcolato da Floch *et al.* (2007) seguendo la procedura di Farnet *et al.* (2004). I risultati sono stati espressi in $\mu\text{mol ABTS}^+ \text{ g}^{-1} \text{ p.s. min}^{-1}$.



Figura 3.15 - Determinazione spettrofotometrica dell'attività laccasica.

3.4.6 Attività catecolo-ossidasi

L'attività catecolo-ossidasi è stata determinata seguendo il protocollo di Perucci e collaboratori (2000), che prevede la determinazione spettrofotometrica del 4-(N-prolina)-o-benzochinone, di colore rosso, che si sviluppa in seguito all'ossidazione del catecolo in presenza di prolina operata dalle o-difenol-ossidasi.

Sono stati pesati 0.5 g di suolo fresco in provette da 50 ml, ai quali sono stati addizionati 1 ml di tampone fosfato 0.1 M a pH 6.5, 750 μl di soluzione di catecolo e 750 μl di soluzione di prolina, entrambe preparate in tampone fosfato ad una concentrazione pari a 0.2 M. I campioni sono stati incubati per 10 minuti in agitazione, al buio, alla temperatura di 30 °C. Al termine dell'incubazione la reazione è stata bloccata raffreddando i campioni in ghiaccio e aggiungendo alle miscele di reazione 2.5 ml di etanolo. 1.5 ml di surnatante sono stati trasferiti in eppendorf da 1.5 ml e sono stati centrifugati a 8000 rpm per 5 minuti. Infine, una volta trasferito 1 ml di miscela di reazione in cuvette da 1 ml, è stata determinata l'assorbanza del prodotto della reazione a 525 nm mediante spettrofotometro UV-VIS a doppio raggio. L'attività enzimatica è stata condotta su 5 repliche per campione di suolo.

In parallelo, il saggio è stato effettuato anche su suolo sterilizzato in autoclave a 121 °C per 20 minuti (uno per tipologia di mesocosmo), così da denaturare gli enzimi e abbattere la carica microbica, in modo tale da poter stimare l'ossidazione abiotica del catecolo in presenza della matrice organo-minerale del suolo. L'assorbanza misurata nei campioni sterilizzati è stata sottratta a quella totale misurata sul suolo non sterilizzato, per ottenere l'effettiva quantità di 4-(N-prolina)-o-benzochinone prodotto ad opera dell'ossidazione enzimatica.

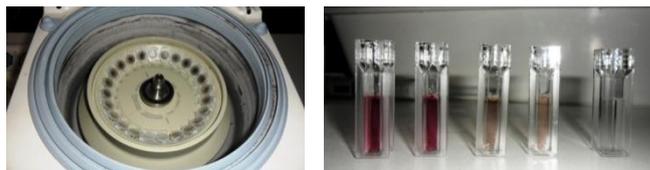


Figura 3.16 - Centrifugazione dei campioni e determinazione dell'attività catecolo-ossidasi (campioni non sterilizzati e campioni sterilizzati).

Per ottenere la concentrazione di catecolo ossidato dalla reazione enzimatica l'assorbanza netta è stata divisa per il coefficiente di estinzione molare del catecolo a 525 nm in presenza dell'enzima (5000), ricavato da Yamaguchi *et al.* (1970). I risultati sono stati espressi in $\mu\text{mol g}^{-1} \text{p.s. min}^{-1}$.

3.4.7 Attività perossidasiica totale

Per la determinazione dell'attività perossidasiica totale è stato utilizzato il protocollo di Jackson e collaboratori (2006) con alcune modifiche. Tale protocollo si basa sulla misura dell'ossidazione dell'L-DOPA (3,4-diidrossi-L-fenilalanina) in presenza di H_2O_2 da parte delle perossidasi, mediante rivelazione spettrofotometrica del prodotto di reazione, il dopachinone.

Sono stati pesati 0.4 g di suolo fresco in eppendorf da 2 ml e vi sono stati addizionati 400 μl di tampone acetato 50 mM a pH 5.3, 800 μl di L-DOPA 15 mM in tampone acetato e 30 μl di H_2O_2 allo 0.6%. I campioni sono stati incubati in agitazione, al buio e a temperatura ambiente per un ora. In parallelo sono stati preparati un bianco senza substrato e un bianco senza suolo, il primo per valutare la formazione di composti che assorbono alla stessa lunghezza d'onda del dopachinone e il secondo per valutare l'ossidazione dell'L-DOPA alla luce e in presenza di ossigeno atmosferico. Dopo l'incubazione i campioni sono stati raffreddati in ghiaccio, al fine di rallentare la reazione, e centrifugati a 8000 rpm per 5 minuti a 4 °C; 200 μl di surnatante sono stati trasferiti in cuvette da 700 μl , vi sono stati addizionati 400 μl di acqua distillata e si è proceduto con la determinazione spettrofotometrica a 460 nm. Il saggio enzimatico è stato eseguito su 5 repliche per campione di suolo.

Per ottenere i valori di concentrazione di dopachinone, le assorbanze nette (assorbanza misurata sottratta dei bianchi) sono state divise per il coefficiente di estinzione molare dell'L-DOPA (0.990), misurato in laboratorio nelle stesse condizioni utilizzate per il saggio enzimatico, impiegando la perossidasi di rafano per ossidare completamente una μmole di L-DOPA. I risultati sono stati espressi in $\mu\text{mol g}^{-1} \text{p.s. h}^{-1}$.



Figura 3.17 - Blocco della reazione enzimatica e determinazione dell'attività perossidasiica.

3.4.8 Profilo degli acidi grassi dei fosfolipidi (PLFA)

L'estrazione e la determinazione cromatografica degli acidi grassi dei fosfolipidi presenti nelle membrane cellulari dei microrganismi fornisce il profilo degli acidi grassi, che consente di caratterizzare la comunità microbica dal punto di vista strutturale (Bååth *et al.*, 1992; Frostegård *et al.*, 1993). Alcuni di essi infatti sono presenti in un numero limitato di microrganismi e pertanto sono stati riconosciuti come marcatori di particolari gruppi microbici (Klamer *et al.*, 2000) (Tabella 3.5).

L'analisi dei PLFA è stata condotta su quattro prelievi, al tempo T_0 , a 14 giorni, a 106 giorni e a 273 giorni ed è stata eseguita su cinque repliche per campione.

La procedura analitica (Bååth *et al.*, 1992) si sviluppa in quattro fasi fondamentali:

1. estrazione dei lipidi dai campioni di terreno

CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI

2. frazionamento dei lipidi in base alla loro polarità
3. transesterificazione (metilazione) degli acidi grassi dei fosfolipidi
4. analisi dei metilesteri gli acidi grassi per gascromatografia.

i14:0	gram-positivi	17:1ω8	funghi (?)
14:0		cy17:0	gram-positivi
i15:0	gram-positivi	17:0	
a15:0	gram-positivi	br18:0	gram-positivi
15:0		10Me17:0	gram-positivi
i16:0	gram-positivi	18:2ω6,9	Funghi
16:1ω9		18:1ω9	Funghi
16:1ω7c	gram-negativi, funghi	18:1ω7	gram-negativi
16:1ω7t	Batteri	18:1	
16:1ω5	gram-negativi, micorrize VA	18:0	
16:0		19:1a	gram-negativi
br17:0	gram-positivi	10Me18:0	Attinomiceti
10Me16:0	batteri, funghi	19:0	Standard
i17:0	gram-positivi	cy19:0	gram-negativi
a17:0	gram-positivi	20:4	funghi, micorrize VA

Tabella 3.5 - PLFA analizzati (in ordine di eluizione) e relativa presenza nei diversi gruppi microbici.

1. I lipidi sono stati inizialmente estratti in una miscela monofasica composta da CHCl_3 , MeOH e tampone citrato, in rapporto volumetrico di 1:2:0.8 (estraente Bligh and Dyer, B&D). A tal fine 1 g di terreno scongelato per ogni campione è stato inserito in provette di teflon in cui sono stati aggiunti 10 ml di B&D; dopo agitazione, i campioni sono stati lasciati a riposo per 2 ore a temperatura ambiente e successivamente centrifugati a 4000 rpm per 10 minuti. Il surnatante è stato trasferito in provettoni di vetro. Il suolo rimanente nelle provette in teflon è stato lavato con altri 5 ml di B&D e la procedura è stata ripetuta. Si è proceduto con l'aggiunta di 4 ml di CHCl_3 e 4 ml di tampone citrato a pH 4.0. Dopo 1 minuto di agitazione su vortex i campioni sono stati lasciati a riposo overnight a temperatura ambiente e, durante quest'arco di tempo, si sono separate due fasi: una in CHCl_3 contenente i lipidi e l'altra, in metanolo ed acqua, contenente sostanze idrosolubili, quali carboidrati, acidi nucleici e proteine. La fase lipidica (quella sottostante) di ogni campione è stata trasferita in provette di vetro ed il solvente è stato allontanato sotto flusso di azoto a 40 °C.

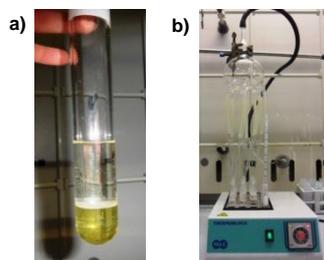


Figura 3.18 - Analisi dei PLFA: a) separazione della fase in cloroformio contenente i lipidi e della fase acquosa contenente le molecole idrofiliche; b) evaporazione sotto flusso di azoto.

2. I lipidi estratti sono stati separati nelle differenti classi tramite LPC (Low Pressure Chromatography) in ordine di polarità crescente. Il materiale essiccato è stato disciolto in 200 μl di cloroformio e, dopo agitazione, è stato introdotto in colonnine preimpaccate con gel di silice. Sono stati eluiti prima i lipidi neutri utilizzando come eluente 1.5 ml di CHCl_3 , poi i glicolipidi con 6 ml di acetone, ed infine i fosfolipidi

CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI

con 1.5 ml di MeOH. L'eluato contenente i fosfolipidi è stato raccolto in provette pulite e si è provveduto all'evaporazione del solvente sotto flusso di azoto a 40 °C.



Figura 3.19 – Purificazione degli estratti.

3. Gli acidi grassi dei fosfolipidi sono stati transesterificati e convertiti in metilesteri. Ad ogni campione essiccato sono stati aggiunti 50 μ l di soluzione di standard interno 19:0 (metil-nonadecanoato) 0.023 mg/ml in esano ed il solvente è stato allontanato sotto flusso di azoto. I campioni così ottenuti sono stati disciolti in 1 ml di soluzione toluene-metanolo (1:1), cui è stato addizionato 1 ml di soluzione 0.2 M di KOH in metanolo, e sono stati successivamente incubati a 37 °C per 15 minuti per favorire il processo di transesterificazione. Una volta raffreddati, sono stati aggiunti 2 ml di soluzione esano:cloroformio (4:1), 0.3 ml di acido acetico glaciale 1 M e 2 ml di acqua ultrapura. Una volta vortexati per pochi secondi, i campioni sono stati centrifugati a 3000 rpm per 5 minuti e la fase superiore è stata trasferita in provette di vetro calcinate. Infine si è provveduto all'evaporazione del solvente sotto flusso di azoto.

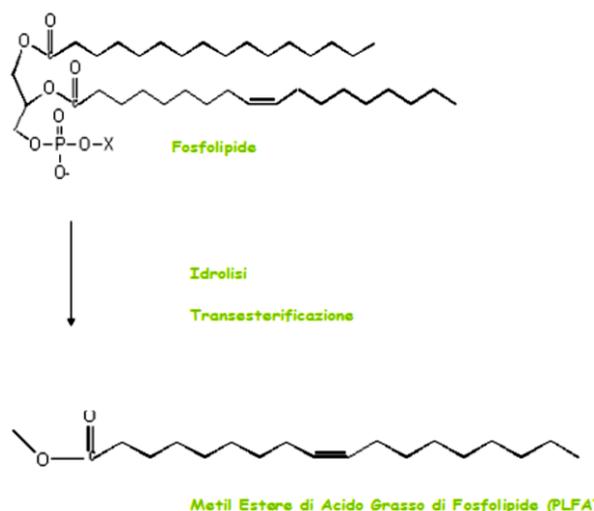


Figura 3.20 - Reazione di transesterificazione.

4. Il materiale essiccato, costituito dai metilesteri degli acidi grassi, è stato ridisciolti in 150 μ l di esano. A questo punto si è proceduto alla lettura dei campioni per via cromatografica, utilizzando un GC 7890A (Agilent Technologies) dotato di FID (Flame Ionization Detector) e di colonna capillare HP5 MS UI (lunghezza = 60 m; diametro interno = 0.25 mm), avente come fase stazionaria metil-fenil-silicone. 1

CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI

µl di campione è stato iniettato mediante autocampionatore in modalità split (5:1) a 230 °C; la temperatura iniziale del forno è stata impostata a 80 °C, mantenuta costante per un minuto e successivamente fatta aumentare di 20 °C al minuto, fino a raggiungere una temperatura di 160 °C, poi di 5 °C al minuto fino a 270 °C e mantenuta in tali condizioni per 23 minuti.



Figura 3.21 - GC-FID dotato di autocampionatore.

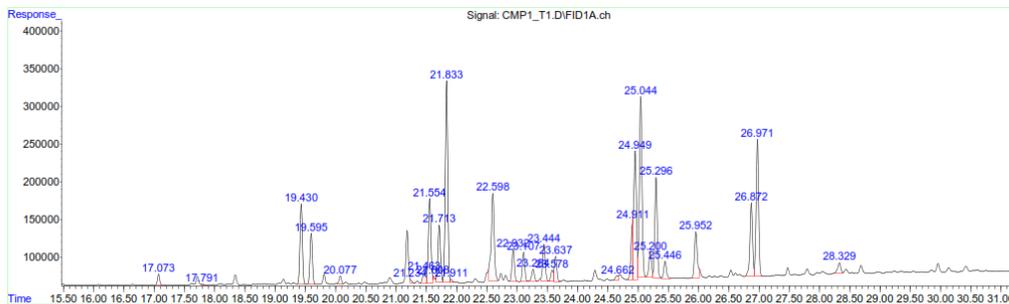


Figura 3.22 – Cromatogramma dei PLFA.

3.5 Analisi statistica dei dati

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il software Sigma Plot 11.0 (SPW11, USA). Per verificare la condizione di normalità dei dati è stato utilizzato il test di Shapiro-Wilk. Per verificare la significatività delle differenze tra le tre tipologie di mesocosmo e tra i campionamenti è stata effettuata l'analisi della varianza mediante il test dell'ANOVA a due vie, considerando come variabili sperimentali il trattamento e il tempo e la loro interazione. Per i parametri risultati significativamente diversi ($\alpha=0.05$) le medie sono state confrontate mediante il test *post hoc* di Holm-Sidak. Sono state considerate significative le differenze con $P<0.05$.

Per i parametri per cui l'ipotesi di omoschedasticità è fallita, è stata effettuata l'ANOVA a una via sui ranghi. Per i parametri risultati significativamente diversi ($\alpha=0.05$) è stato utilizzato il test *post hoc* di Dunn.

Per verificare l'esistenza di relazioni tra parametri i dati sono stati sottoposti ai test di correlazione. Per i dati che hanno mostrato una distribuzione normale la significatività delle correlazioni è stata determinata con il test di Pearson, mentre in caso di distribuzione non normale, è stato utilizzato il test di Spearman. Anche per questo tipo di analisi sono state considerate significative le correlazioni con $P<0.05$.

CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI

Per stimare i tassi di decadimento, le dinamiche degli IPA sono state sottoposte al processo di *curve fitting* utilizzando il software Fityk 0.9.8 e il metodo di Levenberg-Marquardt.

Per valutare il cambiamento nel tempo del pattern di IPA, è stata effettuata un'analisi multivariata di gradiente, utilizzando come metodica di ordinamento delle osservazioni l'analisi NMDS con la sovrainposizione del campo temporale.

Per individuare l'influenza di tutte le variabili determinate sulle dinamiche degli IPA è stata effettuata una *multivariate adaptive regression splines* (MARS), che permette di predire un modello di regressione non parametrico per una variabile in funzione delle altre, attribuendo loro un ordine di importanza nella predizione del modello stesso.

Queste ultime due analisi sono state eseguite con il software R 3.1.1. Per l'analisi NMDS è stato utilizzato il pacchetto Vegan 2.0-10 (Oksanen *et al.*, 2013) e per la MARS il pacchetto Earth 4.2.0 (Hastie e Tibshirani, 2011).

CAPITOLO 4

RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Parametri chimico-fisici

In figura 4.1 sono mostrati gli andamenti nel tempo relativi a pH (a), contenuto di sostanza organica (b) e tenore idrico (c) per i tre suoli oggetto di studio: suolo tal quale S, suolo addizionato con compost S_{CMP} e suolo addizionato con funghi S_{FNG} . Per questi tre parametri non è stato possibile effettuare l'ANOVA a due vie in quanto i dati non sono risultati omoschedastici. Effettuando la One Way ANOVA on Ranks separatamente ad ogni osservazione, non si sono riscontrate differenze tra i trattamenti; valutando separatamente gli andamenti per ognuno dei tre suoli è stato possibile apprezzare differenze temporali soltanto per il tenore idrico ($P < 0.05$).

Il pH (a) mostra un andamento simile fra i tre suoli: si osserva un iniziale decremento dopo 14 giorni di incubazione, dopo il quale si mantiene costante fino alla fine dell'esperimento. L'intervallo di pH del suolo tal quale (7.31-7.47) è leggermente inferiore di quello del suolo con compost (7.41-7.56) e del suolo con funghi (7.39-7.54).

Il contenuto di sostanza organica (b) è rimasto pressoché costante nel tempo, oscillando tra il 14 e il 15% in tutti e tre trattamenti. Pertanto i processi di decomposizione della sostanza organica ad opera dell'attività microbica e i processi di biosintesi, che in questo caso possono essere attribuiti soltanto alla presenza di microrganismi chemioautotrofi in quanto i suoli sono stati incubati al buio, risultano bilanciati.

Il tenore idrico è variato nel tempo in funzione dell'acqua fornita nel corso dell'esperimento. Gli andamenti dei tre suoli sono pressoché simili. I valori più bassi si sono registrati al 67° giorno per tutti e tre i suoli (18.7% in S, 15.4% in S_{CMP} e 17.0% in S_{FNG}).

CAPITOLO 4 - RISULTATI E DISCUSSIONE

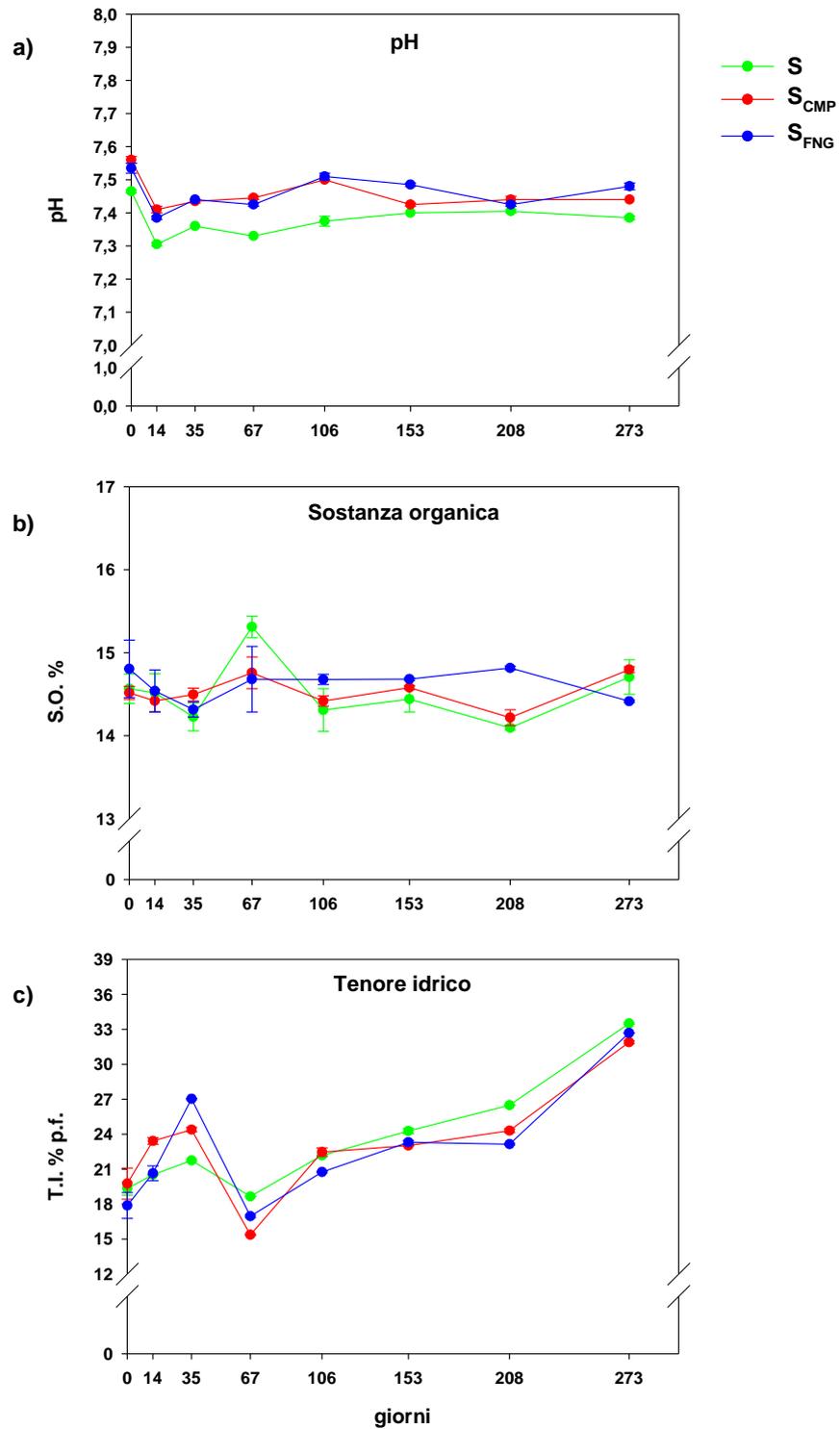


Figura 4.1 - Dinamiche di a) pH, b) sostanza organica% e c) tenore idrico% nelle tre tipologie di mesocosmo. Sono rappresentate le medie \pm errore standard.

4.2 Idrocarburi policiclici aromatici

Le dinamiche di degradazione dei due IPA aggiunti alle tre tipologie di mesocosmo, S, S_{CMP} e S_{FNG}, monitorate nel corso di 273 giorni, sono riportate nelle figure 4.2 e 4.3. I valori per il contenuto totale (a) e per la frazione biodisponibile (b) dell'antracene e del benzo[a]pirene sono espressi come contenuto residuo in percento della concentrazione al tempo T₀.

I risultati mostrano che l'antracene e il benzo[a]pirene sono stati degradati in tutte e tre le tipologie di mesocosmo. Dall'analisi statistica si evince che, indipendentemente dal trattamento, il decremento nel tempo è altamente significativo (P<0.001) per entrambi. Appare però evidente la diversa dinamica di degradazione dei due IPA: mentre per l'antracene si osserva un decadimento di tipo esponenziale, la degradazione del benzo[a]pirene è molto più lenta. Questa evidenza si riscontra sia per il contenuto totale che per la frazione biodisponibile. Dal momento che le quantità totali e biodisponibili non si discostano molto tra loro, i dati saranno discussi soltanto in funzione del contenuto totale.

Le concentrazioni di antracene si riducono drasticamente già dopo il 14° giorno di incubazione, per poi decrementare in maniera più lenta da metà esperimento in poi, raggiungendo al 273° giorno valori di antracene residuo del 4.3, 3.5 e 3.8% rispettivamente per S, S_{CMP} e S_{FNG}. Per il benzo[a]pirene il decremento nel tempo è di gran lunga più lento e alla fine del monitoraggio le concentrazioni sono poco più che dimezzate, con valori residui del 48, 44 e 49% rispettivamente per S, S_{CMP} e S_{FNG}. Ciò mette in evidenza come gli IPA a basso peso molecolare siano facilmente utilizzabili come risorsa dai microrganismi, grazie anche ad una maggiore biodisponibilità rispetto agli IPA ad alto peso molecolare, più recalcitranti perché più complessi e saldamente legati alla componente organica del suolo (Yang *et al.*, 2010).

L'analisi statistica ha confermato che per l'antracene le dinamiche di degradazione in S, S_{CMP} e S_{FNG} si sono differenziate significativamente (P<0.001), mentre per il benzo[a]pirene solo la dinamica nel suolo tal quale risulta statisticamente diversa da quella dei due suoli addizionati con compost e con funghi (P<0.001).

A fine esperimento (273° giorno) l'antracene è stato degradato in misura maggiore nei suoli innescati con compost (P<0.001) e con funghi (P<0.01) rispetto al suolo tal quale. Per quanto riguarda il benzo[a]pirene il processo di degradazione si è rivelato più efficiente (P<0.001) nel suolo con compost.

Nei tre suoli indagati il processo di degradazione non sempre parte dal tempo 0 e si protrae fino a fine esperimento, ma cambia in funzione del trattamento.

La degradazione dell'antracene parte dall'inizio del monitoraggio (P<0.001) nel suolo con compost e nel suolo con funghi, mentre nel suolo tal quale diventa significativa dopo 14 giorni dall'incubazione (P<0.001); per tutte e tre le tipologie di mesocosmo, dal 153° giorno in poi non si riscontra più un decremento significativo. Per il benzo[a]pirene il processo di degradazione in S parte dal 35° giorno di incubazione (P<0.001), in S_{CMP} dalla seconda osservazione (14° giorno) (P<0.001) e in S_{FNG} dall'inizio dell'esperimento (P<0.001); in tutti e tre i suoli i valori di concentrazione di benzo[a]pirene si assestano su valori pressoché costanti a partire dal 153° giorno.

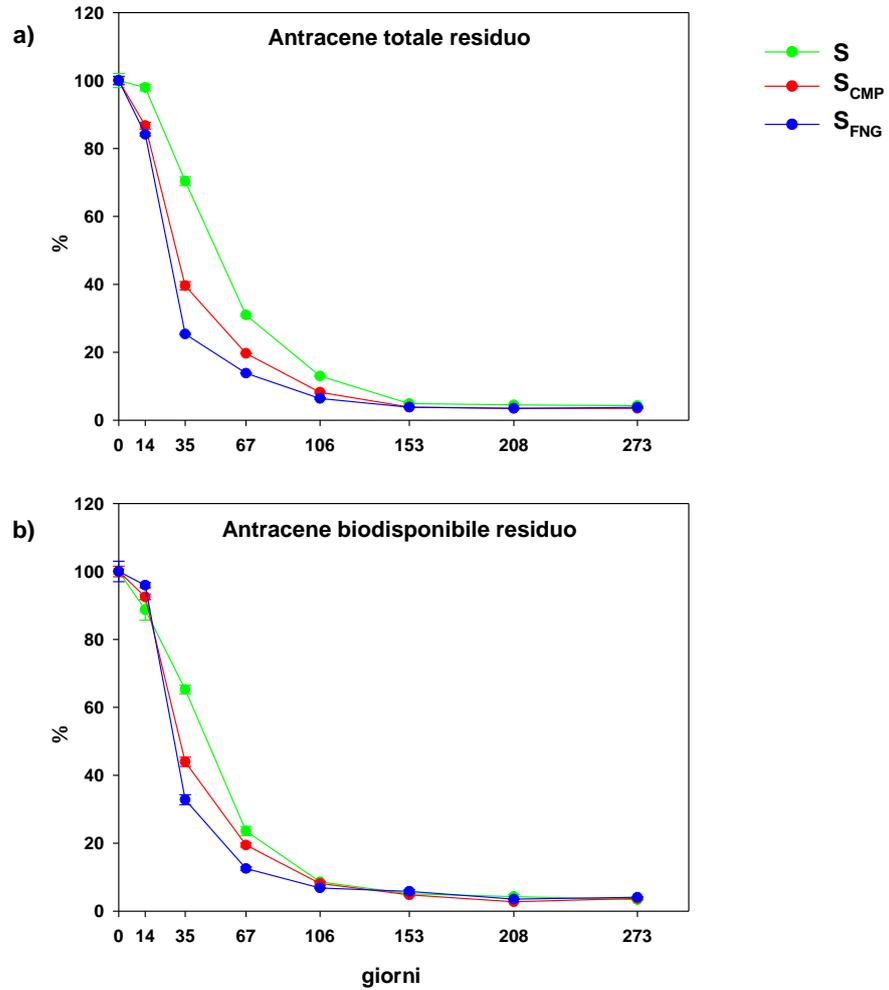


Figura 4.2 - Dinamiche di degradazione dell'antracene a) totale e b) biodisponibile nelle tre tipologie di mesocosmo. Sono rappresentate le medie \pm errore standard.

CAPITOLO 4 - RISULTATI E DISCUSSIONE

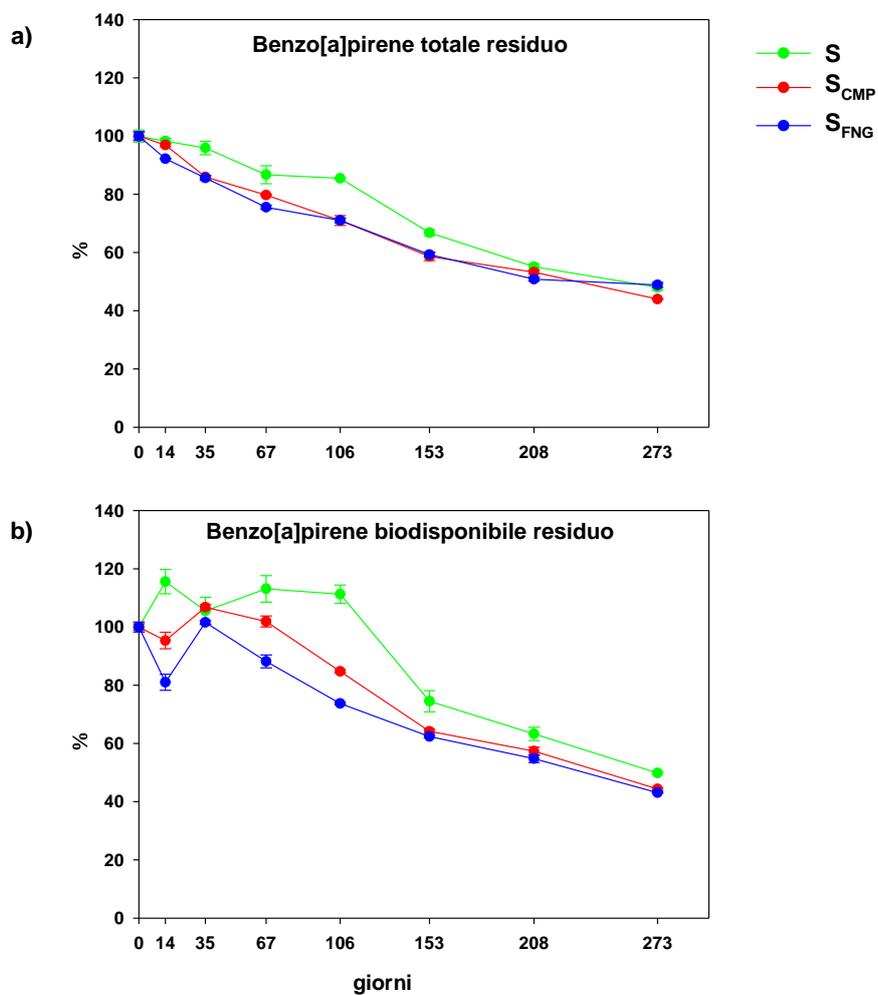


Figura 4.3 - Dinamiche di degradazione del benzo[a]pirene a) totale e b) biodisponibile nelle tre tipologie di mesocosmo. Sono rappresentate le medie \pm errore standard.

CAPITOLO 4 - RISULTATI E DISCUSSIONE

Per valutare la velocità di degradazione dei due IPA nelle tre tipologie di mesocosmo sono stati calcolati i tassi di decadimento. A tal fine è stato applicato un processo di *curve fitting* alle dinamiche di degradazione.

In particolare le dinamiche dell'antracene sono state approssimate ad una funzione di decadimento esponenziale del tipo

$$y(t) = y_0 e^{-kt}$$

I valori di k (tasso di decadimento) sono rappresentati in Tabella 4.1. Ciò che si evince è che il tasso cresce in maniera significativa passando da S a S_{CMP} a S_{FNG}; pertanto l'aggiunta di compost e, ancor di più, l'aggiunta di funghi hanno reso più rapido il processo di degradazione dell'antracene rispetto al processo di attenuazione naturale. Nel dettaglio il tasso di decadimento dell'antracene è risultato maggiore in S_{FNG} rispetto a S_{CMP} e S per $P < 0.001$, mentre S_{CMP} ha mostrato un tasso superiore a S per $P < 0.05$.

		S	S _{CMP}	S _{FNG}
ANTH	k	0.018 ± 0.001	0.023 ± 0.001	0.030 ± 0.002
	R ²	0.96	0.98	0.96

Tabella 4.1 - Tassi di decadimento delle dinamiche di degradazione dell'antracene (media ± errore standard) e valori del coefficiente di determinazione.

Per quanto riguarda il benzo[a]pirene, poiché il decadimento è risultato più lento, l'approssimazione dei valori numerici ad una funzione di decadimento esponenziale non ha permesso di operare un fitting ottimale.

Pertanto la funzione che più approssima le dinamiche dei tre suoli è quella quadratica del tipo

$$y(t) = a*t^2 - b*t + c$$

In questo caso il tasso di decadimento è formato da due contributi: il tasso quadratico a , che aumenta di importanza col crescere della concavità della curva, ed il tasso lineare b . Più a è piccolo rispetto a b e più la curva quadratica tende ad una funzione lineare. In tabella 4.2 sono mostrati i valori del tasso quadratico e del tasso lineare. Per tutte e tre le tipologie di mesocosmo il tasso lineare risulta predominante rispetto al tasso quadratico. Si può notare come sia a che b sono significativamente maggiori nei suoli innescati rispetto al suolo tal quale ($P < 0.001$), dato che suggerisce che la velocità di degradazione del benzo[a]pirene è maggiore per S_{CMP} e S_{FNG} rispetto a S. Tra i due suoli innescati non sono state riscontrate differenze significative.

		S	S _{CMP}	S _{FNG}
B[a]P	A	(0.0001 ± 0.1) * 10 ⁻³	(0.46 ± 0.06) * 10 ⁻³	(0.61 ± 0.06) * 10 ⁻³
	b	0.23 ± 0.03	0.33 ± 0.02	0.35 ± 0.02
	R ²	0.96	0.99	0.99

Tabella 4.2 - Tassi di decadimento delle dinamiche di degradazione del benzo[a]pirene (media ± errore standard) e valori del coefficiente di determinazione.

Per valutare il cambiamento nel tempo del pattern dei 16 IPA monitorati, è stata effettuata un'analisi multivariata di gradiente, utilizzando come metodica di ordinamento delle osservazioni l'analisi NMDS con la sovrapposizione del campo temporale (Figura 4.4). Quest'ultimo è rappresentato nel grafico dalle curve isotemporal in grigio.

CAPITOLO 4 - RISULTATI E DISCUSSIONE

Dall'analisi esplorativa si evince che le osservazioni per le tre diverse tipologie di mesocosmo non si separano, pertanto il gradiente temporale per ognuno dei 16 IPA monitorati è il medesimo per tutti e tre i suoli.

Nel grafico si osserva che i due IPA aggiunti sono abbondanti all'inizio della sperimentazione e decremantano nel tempo, l'antracene molto velocemente, più lentamente il benzo[a]pirene. Anche la maggior parte degli IPA a basso peso molecolare diminuiscono lungo il gradiente temporale, suggerendo che sono stati facilmente utilizzati come risorsa dai microrganismi del suolo. Le concentrazioni degli IPA ad alto peso molecolare sono rimaste pressoché costanti nel corso dell'esperimento, mentre gli IPA a medio peso molecolare sono incrementati nel tempo. È verosimile che la ricondensazione e la ripolimerizzazione di residui aromatici derivanti dalla decomposizione di molecole aromatiche più complesse o di IPA a basso peso molecolare possa aver contribuito all'aumento degli IPA a medio peso molecolare nel tempo (Song, 2009; De Nicola *et al.*, 2014).

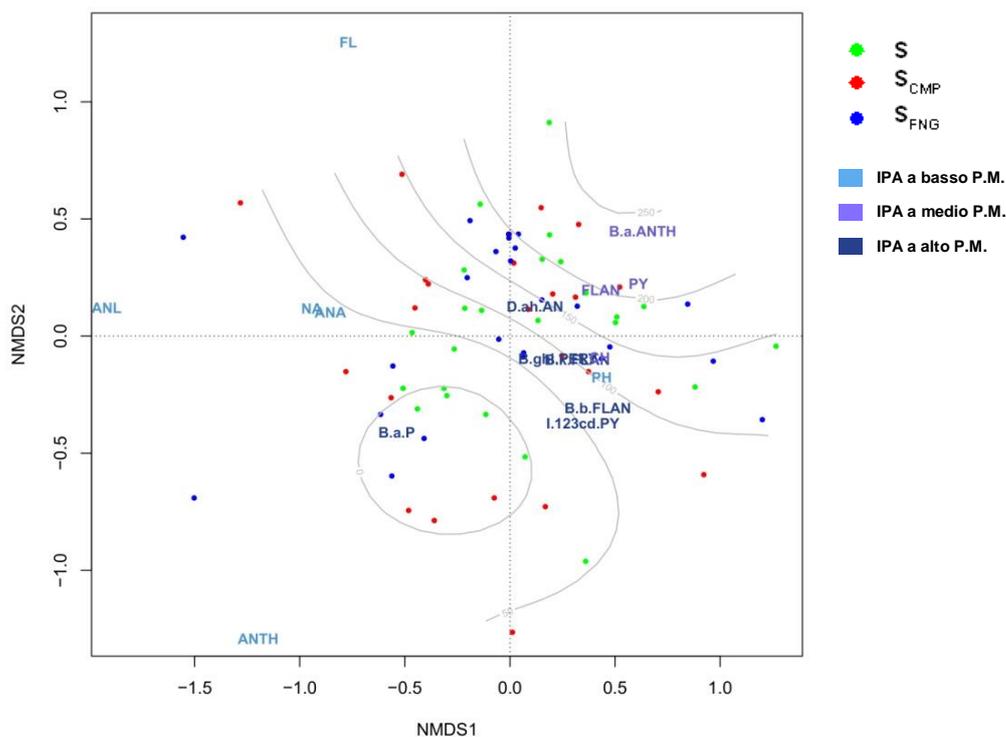


Figura 4.4 - Distribuzione lungo il gradiente temporale dei 16 IPA prioritari nelle tre tipologie di mesocosmo.

Dai risultati ottenuti è stato riscontrato un processo di degradazione biologica dei due IPA aggiunti ai suoli dei mesocosmi nella dose di circa 150 mg/kg ognuno. Per il suolo tal quale si può parlare di processo di attenuazione naturale, in quanto la comunità microbica autoctona del suolo utilizzato per la sperimentazione è stata in grado di ridurre, dopo 273 giorni, i carichi di antracene e di benzo[a]pirene rispettivamente del 96% del 52%. Le aggiunte di compost e di funghi hanno complessivamente migliorato il processo di degradazione. Infatti sia il compost che i funghi hanno accelerato il decremento dell'antracene e del benzo[a]pirene.

CAPITOLO 4 - RISULTATI E DISCUSSIONE

Inoltre la quantità di antracene degradato è aumentata dello 0.8% e dello 0.5% rispettivamente per S_{CMP} e S_{FNG} , mentre per il benzo[a]pirene l'aggiunta di compost ha decisamente favorito la degradazione, incrementando dell'8% il processo di attenuazione naturale; l'aggiunta del consorzio fungino, invece, non ha potenziato la degradazione del benzo[a]pirene, che ha mostrato una concentrazione finale residua simile a quella del suolo tal quale. In diversi studi di bioremediation di suoli contaminati da IPA, l'aggiunta di funghi ligninolitici appartenenti al genere *Pleurotus* non ha mostrato effetti significativi sulla degradazione del benzo[a]pirene (Davis *et al.*, 1993; May *et al.*, 1997).

In letteratura sono stati riscontrati risultati contrastanti sul potenziamento della degradazione degli IPA in funzione dell'aggiunta di microrganismi in suoli contaminati.

Steffen *et al.* (2007) hanno trovato che, in un suolo naturale ammendato con materiale lignocellulosico e addizionato con cinque IPA a diverso peso molecolare, ognuno nella dose di 50 mg/kg di suolo, la microflora autoctona ha degradato, dopo 69 giorni, il 60% di antracene aggiunto e il 26% di benzo[a]pirene, e l'inoculo di *P. ostreatus* nello stesso suolo ammendato ha incrementato il processo di degradazione dei due IPA, portando al 96% la quantità di antracene degradato e all'86% quella di benzo[a]pirene. Lo stesso suolo inoculato separatamente con cinque specie del genere *Stropharia* ha mostrato una degradazione di antracene compresa tra l'85 e il 97% e di benzo[a]pirene compresa tra il 45% e il 70%. Confrontando i risultati ottenuti da Steffen e collaboratori con quelli riscontrati nel presente progetto di ricerca al 67 giorno di monitoraggio, la quantità di antracene degradata dal suolo tal quale è risultata pari al 69% mentre quella di benzo[a]pirene al 13%; il suolo addizionato con il consorzio fungino, contenente, tra tutti, due funghi del genere *Pleurotus* e uno del genere *Stropharia*, dopo 67 giorni ha degradato l'86% di antracene e soltanto il 25% di benzo[a]pirene. Molto probabilmente la discrepanza sulle quantità degradate può essere attribuita alla scarsità di substrati lignocellulosici presenti nel suolo oggetto di questa ricerca. Infatti il contributo dei funghi sul processo di degradazione degli IPA può essere considerato trascurabile in suoli contenenti una scarsa quantità di materiale organico recalcitrante a causa della limitata produzione di enzimi ligninolitici (Gramss *et al.*, 1999).

Gramss *et al.* (1999) hanno trovato che l'aggiunta di funghi ligninolitici in suoli con alti contenuti di sostanza organica non accelera il processo di degradazione degli IPA a tre e quattro anelli aromatici, ma incrementa la degradazione degli IPA a cinque, sei e sette anelli, i quali non sono utilizzati dai batteri autoctoni. In suoli poveri di sostanza organica, invece, gli stessi funghi hanno rallentato l'intero processo in quanto è stato trovato che il micelio di alcune specie di *Pleurotus* hanno soppresso l'attività dei batteri autoctoni IPA-degradatori.

Hamdi e collaboratori (2006), in suoli addizionati con antracene e benzo[a]pirene (100 mg/kg di suolo ognuno) e ammendati con compost da fanghi di depurazione (1.7% in peso), hanno trovato che i valori residui di antracene (17%) e benzo[a]pirene (44%) erano più alti rispetto al suolo non ammendato (11% e 29% rispettivamente). Pertanto l'addizione di compost ha ridotto il processo di degradazione degli IPA; secondo gli autori ciò può essere legato ad un aumento del carico di IPA nel suolo in seguito all'addizione dell'ammendante, ma anche all'apporto di metalli, che possono aver inibito i processi enzimatici.

Scelza *et al.* (2007) hanno valutato l'effetto dell'aggiunta di compost in dosi diverse (0.3 e 0.8%) sulla degradazione del fenantrene (150 mg/kg). Gli autori hanno trovato che, dopo 280 giorni di incubazione, il suolo ammendato con compost nella dose più bassa ha incrementato la degradazione del fenantrene del 13%, mentre nel suolo addizionato con la dose maggiore il processo degradativo è risultato più basso

CAPITOLO 4 - RISULTATI E DISCUSSIONE

dell'8% rispetto al suolo non ammendato. Questi dati sono risultati in accordo con la valutazione delle cinetiche di degradazione e con i parametri biologici determinati nello studio. Probabilmente l'utilizzo di compost in dosi elevati riduce la capacità di degradazione degli IPA perché i microrganismi tendono ad utilizzare risorse più facilmente degradabili apportate con il compost a scapito di molecole recalcitranti. Invece l'aggiunta di un innesco di compost favorisce il processo di degradazione in quanto, in questo caso, prevale la funzione di vettore di microrganismi IPA-degradatori.

Diversi studi hanno dimostrato che la mineralizzazione e la detossificazione degli IPA sono favorite principalmente in situazioni di cometabolismo, laddove vengono utilizzati inoculi di co-colture funghi-batteri (Meulenberg *et al.*, 1997; Kottermann *et al.* 1998; Stanley *et al.*, 1999). Kottermann *et al.* (1998) e Stanley *et al.* (1999) hanno messo in evidenza la riduzione del potenziale mutagenico del benzo[a]pirene degradato nel suolo e in colture in vitro in presenza di co-colture funghi-batteri o di inoculi di funghi, mediante saggi tossicologici su *Salmonella typhimurium*. Inoltre hanno dimostrato che una pre-ossidazione del benzo[a]pirene operata dai funghi può incrementare il tasso di mineralizzazione dei residui di degradazione da parte dei batteri, fenomeno osservato anche per altri IPA (in der Wiesche *et al.*, 1996; Meulenberg *et al.*, 1997).

4.3 Attività enzimatiche

La determinazione delle attività enzimatiche consente una valutazione del potenziale dei processi metabolici che si verificano nel suolo; le misure condotte in laboratorio in condizioni ambientali ottimali esprimono la massima potenzialità degli enzimi e permettono di poter confrontare suoli diversi (Baldrin, 2009).

In figura 4.5 sono mostrate le dinamiche delle attività enzimatiche (laccasica, catecolo-ossidasi e perossidasi totale) misurate nel corso dell'esperimento, per le tre tipologie di mesocosmo.

Per ognuna delle attività enzimatiche si riscontrano andamenti simili nei tre suoli, anche se con diversi livelli di attività, come supportato dall'analisi statistica ($0.001 < P < 0.05$). Le oscillazioni temporali sono statisticamente significative ($P < 0.001$) per tutti e tre le attività.

L'attività laccasica (Figura 4.5a) mostra complessivamente valori più alti nel suolo tal quale rispetto ai due suoli innescati. La differenza tra S e S_{CMP} è significativa per $P < 0.05$, mentre tra S e S_{FNG} l'analisi della varianza non ha rilevato differenze significative, probabilmente a causa dei valori di attività a 35 e 67 giorni, dove si riscontrano tra i due trattamenti situazioni opposte che incidono fortemente sulla valutazione complessiva. L'attività laccasica dopo 273 giorni di incubazione è incrementata in tutte e tre le tipologie di mesocosmo. In particolare è aumentata del 9.3%, del 9.6% e del 13% rispettivamente in S ($P < 0.01$), S_{CMP} ($P < 0.01$) e S_{FNG} ($P < 0.001$). Le differenze tra valori di attività raggiunti a fine esperimento nei tre trattamenti non sono significative.

I valori dell'attività catecolo-ossidasi nel suolo tal quale sono complessivamente diversi da quelli riscontrati nei suoli addizionati con compost ($P < 0.001$) e con funghi ($P < 0.01$). In questo caso le differenze tra i trattamenti dipendono dai valori riscontrati negli ultimi due campionamenti (208° e 273° giorno), dove l'attività del suolo con compost risulta più bassa rispetto all'attività del suolo tal quale ($P < 0.001$) e del suolo con funghi ($P < 0.05$). L'attività catecolo-ossidasi, dopo 273 giorni di incubazione, è incrementata dell'1.3% sia in S ($P < 0.01$) che in S_{FNG} ($P < 0.01$), mentre in S_{CMP} è ritornata al valore iniziale (a T_0).

L'attività perossidasi totale risulta complessivamente più alta nel suolo con funghi, seguita dal suolo con compost e dal suolo tal quale. L'attività in S_{FNG} è significativamente più alta di quella in S ($P < 0.001$) e in S_{CMP} ($P < 0.01$); la differenza tra S_{CMP} e S è significativa per $P < 0.001$. Soltanto per questa attività enzimatica gli inneschi con compost e con funghi hanno avuto un effetto positivo, mostrando un incremento complessivo del 10.6% e del 7% rispettivamente per S_{CMP} e S_{FNG} rispetto a S. L'attività perossidasi dopo 273 giorni di incubazione per tutte e tre le tipologie di mesocosmo è ritornata al valore iniziale al tempo T_0 .

CAPITOLO 4 - RISULTATI E DISCUSSIONE

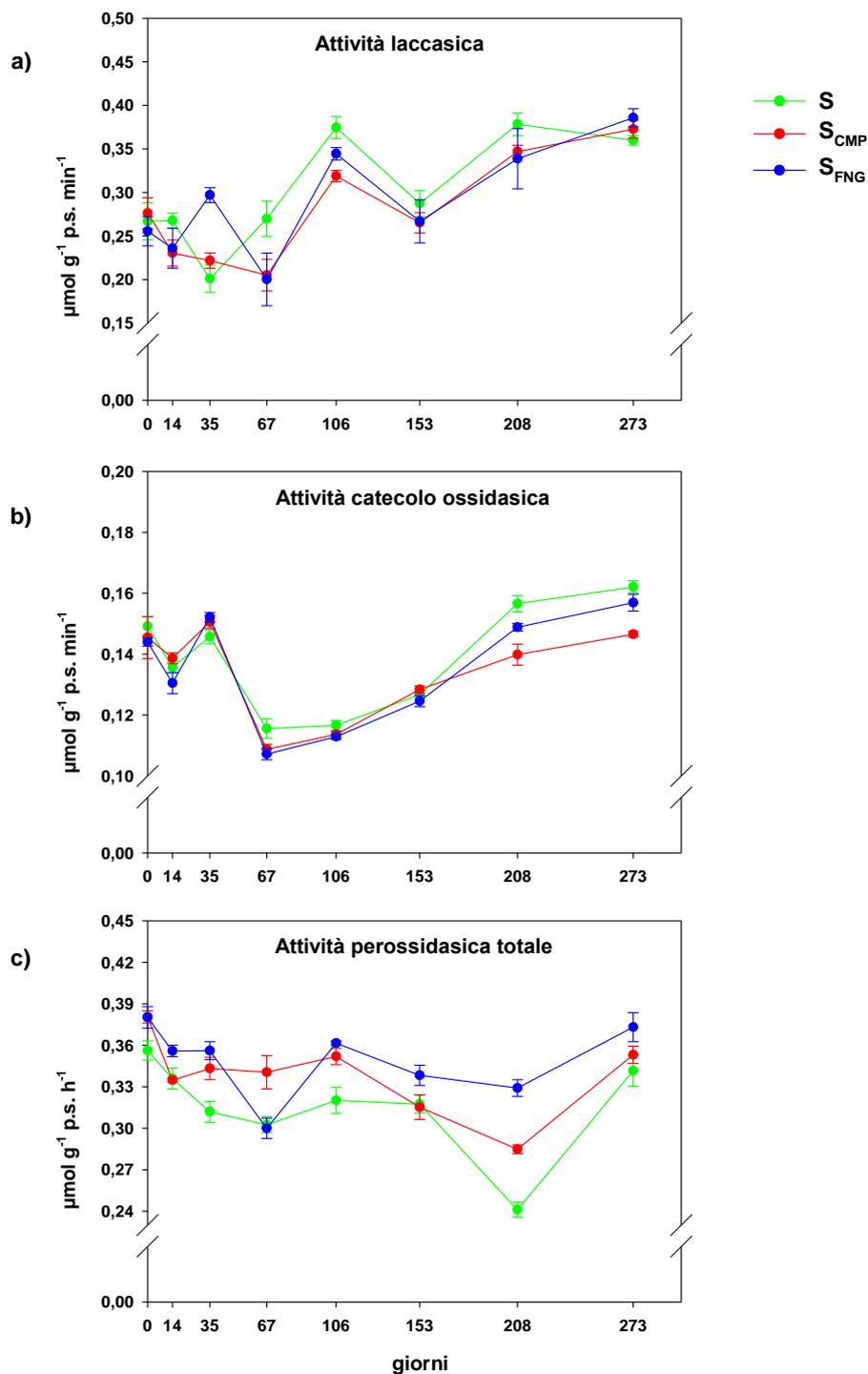


Figura 4.5 - Dinamiche delle attività enzimatiche a) laccasi b) catecolo-ossidasi e c) perossidasi nelle tre tipologie di mesocosmo (medie \pm errore standard).

CAPITOLO 4 - RISULTATI E DISCUSSIONE

Gli andamenti delle tre attività enzimatiche non risultano correlati tra loro, come riscontrato anche da Hamdi *et al.* (2007) in suoli contaminati con antracene, pirene e benzo[a]pirene.

Per l'attività laccasica è evidente un trend opposto ai due IPA aggiunti, l'analisi statistica ha, infatti, evidenziato una correlazione negativa con le dinamiche dell'antracene ($P < 0.001$ e $R = -0.64$) e del benzo[a]pirene ($P < 0.001$ e $R = -0.69$). A differenza dei risultati ottenuti Hamdi *et al.* (2007) non hanno riscontrato alcuna relazione tra l'attività delle laccasi e delle perossidasi e il decremento delle concentrazioni degli IPA nel tempo nei suoli contaminati.

Il ruolo degli enzimi ligninolitici nel processo di degradazione degli IPA è stato ampiamente dimostrato (Sack *et al.*, 1997; Steffen *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 2004). Steffen *et al.* (2007) hanno riscontrato un forte legame tra le attività laccasica e Mn-perossidasi e i funghi decompositori della lettiera. In questo progetto di ricerca l'attività laccasica è risultata correlata negativamente alla biomassa fungina ($P < 0.01$ e $R = -0.70$), e alla biomassa dei batteri gram-negativi ($P < 0.01$ e $R = -0.80$) e degli attinomiceti ($P < 0.05$ e $R = -0.67$). È stata riscontrata una forte correlazione positiva, invece, ($P < 0.001$ e $R = 0.91$) con un PLFA, il 18:0 (acido stearico), che, insieme agli altri acidi grassi a 18 atomi di carbonio, è abbondante nei batteri metanotrofi (Roslev e Iversen, 1999).

Effettuando una *multivariate adaptive regression splines* (MARS), che permette di predire un modello di regressione non parametrico per una variabile in funzione delle altre, attribuendo loro un ordine di importanza nella predizione del modello stesso, è stato possibile identificare i parametri che hanno influenzato le dinamiche di degradazione dell'antracene e del benzo[a]pirene. L'attività laccasica è il parametro che ha influito in misura maggiore sulla degradazione dell'antracene, seguito dalla biomassa dei batteri gram-negativi (GRSq=0.80; $R^2=0.92$). Nessuna attività enzimatica ha influenzato in particolar modo la dinamica del benzo[a]pirene, che, invece, risulta dipendere in primis dall'acido grasso 18:0 e in second'ordine dai batteri gram-negativi (GRSq=0.93; $R^2=0.97$).

L'attività perossidasi è risultata correlata con il pH ($P < 0.01$ e $R = 0.54$); le due attività fenolossidasi mostrano, invece, una correlazione positiva (laccasica: $P < 0.001$ e $R = 0.67$; catecolo-ossidasi: $P < 0.001$ e $R = 0.64$) con il contenuto d'acqua nel suolo. In effetti appare evidente un incremento dell'attività a partire dal 67° giorno, quando il tenore idrico del suolo comincia a risalire, dopo aver raggiunto in assoluto il valore più basso.

È dimostrato che suoli aridi ricchi di sostanza organica sono soggetti a riduzione dell'attività ossidasi (Sinsabaugh, 2010). Decker *et al.* (2005) hanno riscontrato una correlazione tra l'attività fenolossidasi e il pH. In generale le attività fenolossidasi e perossidasi dipendono da numerosi fattori tra cui la concentrazione di composti fenolici, il contenuto di lignina, il pH e l'azoto disponibile (Sinsabaugh, 2010).

4.4 Biomassa e struttura della comunità microbica

La biomassa microbica totale è stata ottenuta come somma dei 29 PLFA determinati. I valori per le tre tipologie di mesocosmo, per quattro osservazioni (T_0 , 14°, 106° e 273° giorno), sono mostrati in Figura 4.6a.

L'analisi della varianza non ha rilevato differenze significative fra i tre trattamenti, mentre le variazioni temporali risultano statisticamente significative ($P < 0.001$). L'evidente riduzione della biomassa microbica riscontrata a 273 giorni dall'incubazione, per tutti e tre i suoli, è altamente significativa ($P < 0.001$). Nel suolo con compost il decremento è anticipato al 106° giorno ($P < 0.05$).

Su e Yang (2009) hanno riscontrato una situazione opposta in suoli contaminati da naftalene, fenantrene e pirene (50-200, 18-72 e 6.6-26.6 mg/kg rispettivamente), in cui la biomassa microbica aumentava nel tempo col decrescere delle concentrazioni degli IPA; la correlazione negativa riscontrata dagli autori tra questi due parametri suggeriva un effetto di tossicità degli IPA sulla comunità microbica.

Al contrario, nel presente studio, la biomassa microbica è correlata positivamente alle dinamiche dell'antracene ($P < 0.01$ e $R = 0.78$) e del benzo[a]pirene ($P = 0.001$ e $R = 0.79$), in quanto si riscontra una riduzione della biomassa in concomitanza della riduzione delle concentrazioni dei due IPA. Probabilmente a determinare il decremento sono stati altri fattori legati alle condizioni ambientali.

La biomassa fungina (Figura 4.6b) è stata valutata in funzione della concentrazione dell'acido linoleico (18:2 ω 6,9), considerato biomarker fungino (Bardgett *et al.*, 1997).

Dall'analisi statistica nel complesso non si riscontrano differenze significative tra i trattamenti, al contrario, rispetto alla variabile tempo le variazioni sono significative ($P < 0.001$) e sono legate principalmente al decremento che si osserva al 273° giorno in tutti e tre i suoli, che, per questo parametro, è molto evidente. Infatti i valori di biomassa fungina a fine esperimento si riducono più della metà rispetto ai valori misurati a 106 giorni. Nel dettaglio, nei due suoli innescati le differenze tra i valori misurati a 273 giorni e quelli misurati negli altri tre periodi di indagine sono risultate significative per $P < 0.001$; per il suolo tal quale il contenuto di 18:2 ω 6,9 è più basso al 273° giorno rispetto alle altre tre osservazioni ($0.01 < P < 0.001$) e anche tra il 14° e il 106° giorno il decremento risulta significativo ($P < 0.01$).

Anche la biomassa fungina è correlata positivamente alle dinamiche dei due IPA ($P < 0.001$ e $R = 0.82$ per l'antracene; $P < 0.001$ e $R = 0.83$ per il benzo[a]pirene).

Nonostante nel suolo S_{FNG} siano state inoculate cinque specie fungine sotto forma di micelio e di spore, non si osservano valori di biomassa fungina più elevati in questo suolo rispetto agli altri. Sembrerebbe quindi che le specie addizionate non si siano sviluppate, probabilmente perché le condizioni ambientali (contenuto d'acqua e contenuto di materiale lignocellulosico) non erano ottimali per permetterne l'attecchimento e la crescita. Allo stesso tempo il suolo S_{FNG} ha mostrato valori più elevati di attività perossidasi e una dinamica di degradazione degli IPA più rapida e più efficiente rispetto al suolo tal quale e al suolo con compost. Pertanto, nonostante il mancato sviluppo del micelio fungino, è verosimile che nel suolo siano state rilasciate perossidasi fungine che hanno incrementato l'attività ossidativa degli IPA. In uno studio condotto sulle perossidasi rilasciate dalle piante nel suolo (Schnoor, 1995) la determinazione dell'emivita di questi enzimi suggerisce che l'attività di degradazione dei contaminanti organici recalcitranti può protrarsi per numerosi giorni.

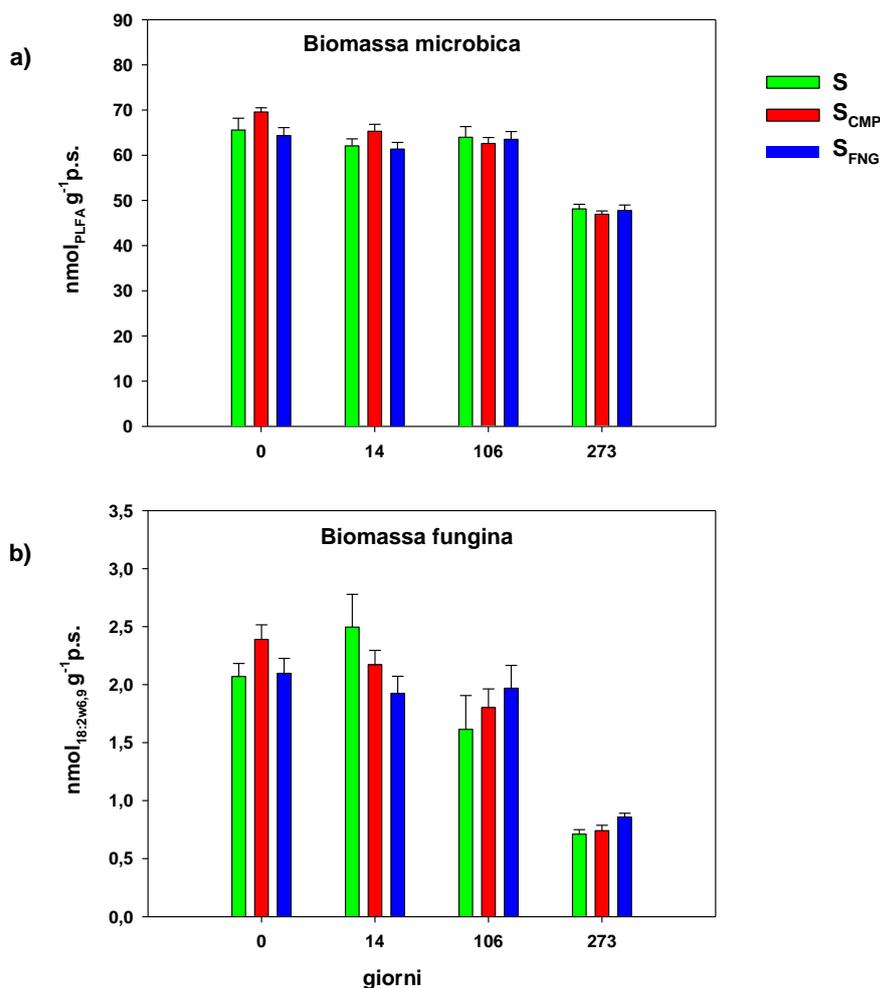


Figura 4.6 - a) Biomassa microbica e b) biomassa fungina nelle tre tipologie di mesocosmo a 0, 14, 106 e 273 giorni. Sono rappresentate le medie \pm errore standard.

I grafici in Figura 4.7 mostrano il contenuto percentuale rispetto alla biomassa totale di quattro gruppi microbici, batteri gram-positivi, batteri gram-negativi, funghi e attinomiceti, nei tre suoli nelle quattro osservazioni. La percentuale per ogni gruppo è stata ottenuta considerando la somma dei PLFA identificativi di quel gruppo microbico.

Complessivamente tra i trattamenti non si riscontrano differenze nella struttura della comunità microbica. Soltanto la percentuale di attinomiceti risulta mediamente più alta nel suolo con compost rispetto agli altri due ($P < 0.05$). Molto probabilmente questo gruppo di microrganismi è stato introdotto con l'inoculo di compost; infatti gli attinomiceti si sviluppano abbondantemente nell'ultima fase di ossidazione del processo di compostaggio e, una volta raggiunta la maturazione, appaiono visibili nei cumuli di compost (Chiumenti e Chiumenti, 2002).

Mentre gli attinomiceti e i batteri gram-positivi rimangono pressoché costanti nel tempo, i batteri gram-negativi e i funghi subiscono un decremento. Nel dettaglio la percentuale di gram-negativi decresce dal 14° giorno in poi ($P < 0.01$) in tutti e tre i

CAPITOLO 4 - RISULTATI E DISCUSSIONE

suoli; la percentuale di funghi mostra in S un andamento decrescente dal 14° giorno ($P < 0.05$), mentre in S_{CMP} e S_{FNG} si abbassa ($0.01 < P < 0.05$) in maniera evidente soltanto alla fine dell'esperimento (273° giorno).

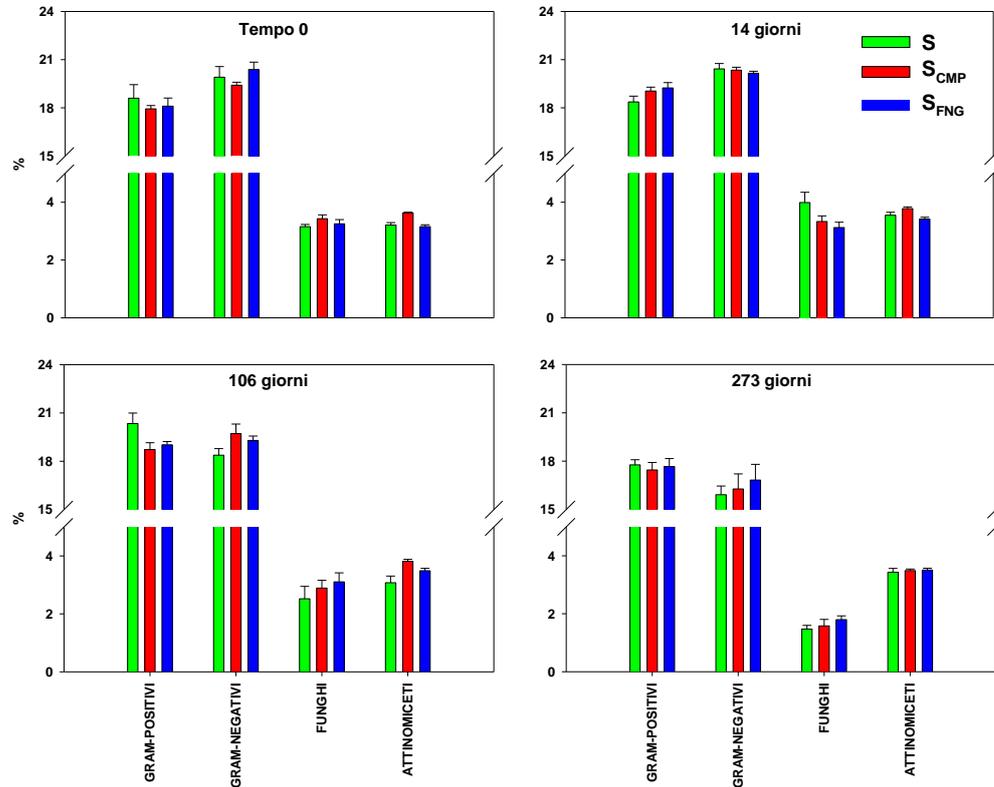


Figura 4.7 - Struttura della comunità microbica nel tempo nelle tre tipologie di mesocosmo. Sono rappresentate le medie \pm errore standard.

Tutti e quattro i gruppi microbici risultano correlati alle dinamiche dei due IPA (Tabella 4.3).

	ANTH	B[a]P
Gram-positivi	P<0.05 R=0.62	P<0.05 R=0.65
Gram-negativi	P<0.001 R=0.94	P<0.001 R=0.95
Funghi	P<0.001 R=0.82	P<0.001 R=0.83
Attinomiceti	P<0.05 R=0.64	P<0.001 R=0.82

Tabella 4.3 – Valori di P e R riscontrati per le correlazioni tra i gruppi microbici e gli IPA.

Dall'analisi della MARS è risultato che i batteri gram-negativi, dopo l'attività laccasica, hanno avuto una importanza rilevante nella predizione del modello della dinamica dell'antracene, mostrando così la forte influenza che questo gruppo esercita sulla degradazione dell'idrocarburo. La dinamica del benzo[a]pirene, invece, è risultata

CAPITOLO 4 - RISULTATI E DISCUSSIONE

influenzata in primis dall'acido grasso 18:0 e in second'ordine dai batteri gram-negativi.

Questi risultati fanno pensare che l'attività metabolica dei batteri gram-negativi è stata predominante rispetto a quella degli altri gruppi microbici nel processo di degradazione degli IPA. D'altro canto in letteratura numerose specie di gram-negativi, principalmente appartenenti ai generi *Pseudomonas* (Pizzul *et al.*, 2009), *Sphingomonas* e *Burkholderia* (Mueller *et al.*, 1996) sono risultate in grado di degradare in maniera efficiente questi composti.

Anche per il profilo dei PLFA è stato valutato il cambiamento nel tempo del pattern dei 29 acidi grassi determinati, effettuando un'analisi multivariata di gradiente; come metodica di ordinamento delle osservazioni è stata utilizzata l'analisi NMDS con la sovrapposizione del campo temporale (Figura 4.8).

Nel grafico si nota che tra le tre tipologie di mesocosmo non c'è una separazione, mentre risulta decisamente evidente quella tra l'ultima osservazione (273° giorno) e le altre. In particolare questa separazione è attribuita agli acidi grassi i14:0, 10Me17:0 e i16:0, caratteristici dei batteri gram-positivi, e al PLFA 18:0. Questi quattro acidi grassi sono gli unici che, invece di decrementare, crescono al 273° giorno.

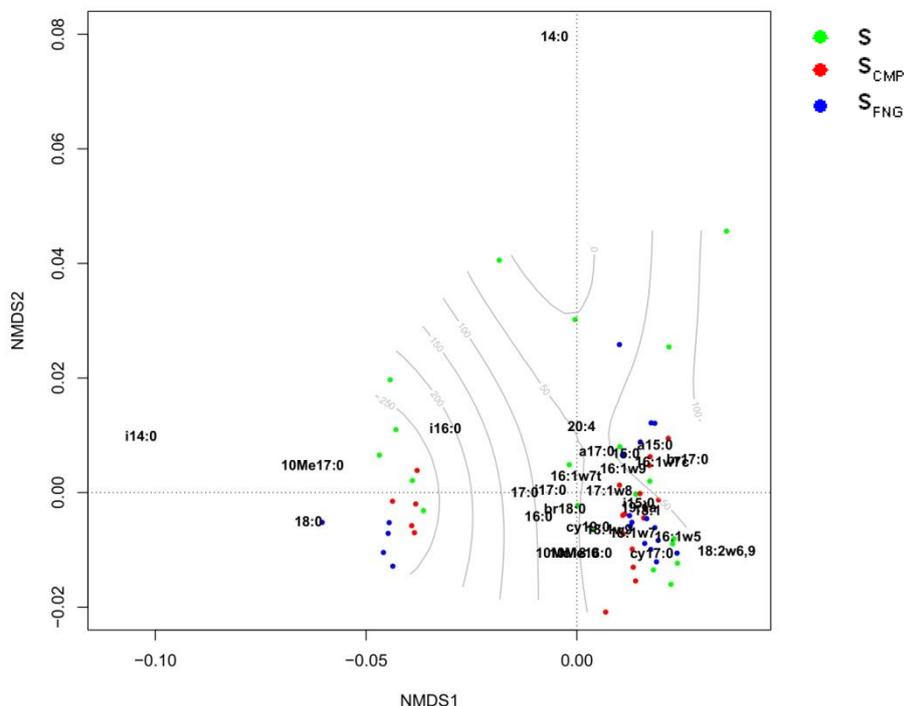


Figura 4.8 - Distribuzione lungo il gradiente temporale dei PLFA nelle tre tipologie di mesocosmo.

È interessante notare come l'acido stearico (18:0) risulti incrementato nell'ultimo periodo delle osservazioni. Questo PLFA è uno di quelli più abbondanti nei batteri metanotrofi (Roslev e Iversen, 1999), che, tra l'altro, appartengono al gruppo dei gram-negativi. È dimostrato che i metanotrofi, grazie alla bassa specificità di alcuni tipi di metano-monoossigenasi, in carenza di metano, sono in grado di utilizzare composti aromatici (Anthony, 1982; Hanson e Hanson, 1996; Semrau, 2011; Pandey *et al.*, 2014). Pertanto l'aumento della concentrazione dell'acido stearico dopo 273

CAPITOLO 4 - RISULTATI E DISCUSSIONE

giorni di incubazione e la conseguente riduzione degli altri PLFA suggerisce che a fine esperimento la struttura della comunità microbica è cambiata a favore dei batteri metanotrofi.

Conclusioni

Il progetto di dottorato aveva lo scopo di studiare il processo di degradazione degli IPA nel suolo e di comprendere il ruolo dei microrganismi nel processo. A tal fine sono stati allestiti mesocosmi di suolo contaminato con antracene e benzo[a]pirene, incubati in condizioni controllate per 273 giorni, nel corso dei quali sono state monitorate le dinamiche di degradazione degli IPA, alcune attività metaboliche coinvolte nel processo e i PLFA che forniscono informazioni sulla biomassa e sulla struttura della comunità microbica. Per studiare i possibili miglioramenti del processo di degradazione, la ricerca è stata condotta in parallelo su tre tipologie di mesocosmo dello stesso suolo contaminato: il suolo tal quale, il suolo addizionato con compost e il suolo addizionato con funghi ligninolitici.

I risultati hanno dimostrato che gli IPA nel suolo, indipendentemente dal peso molecolare, subiscono un processo di degradazione biologica impiegando tempi diversi. Infatti, le dinamiche ottenute hanno dimostrato che il decremento è funzione del tempo, specialmente nel caso degli IPA ad alto peso molecolare. L'incremento della velocità di degradazione riscontrata in seguito alle aggiunte di compost e di funghi è senza dubbio un risultato positivo che può contribuire al miglioramento degli interventi di risanamento ambientale.

Le relazioni riscontrate tra le dinamiche di degradazione e i parametri biologici hanno messo in luce l'esistenza di uno stretto legame tra la comunità microbica e gli IPA, utilizzati dai microrganismi come risorsa.

Al di là della conoscenza sulle possibili reazioni implicate nel processo, dal momento che il suolo è un sistema molto complesso, nel quale le variabili in ballo sono numerosissime, è necessario valutare l'insieme di tutti i fattori abiotici e biotici e le loro possibili combinazioni, che a seconda del caso conducono i processi in una direzione specifica, che può variare da caso a caso.

I risultati ottenuti in questo progetto di ricerca hanno fornito informazioni importanti sul processo di degradazione degli IPA, limitate però al caso specifico, un sistema "chiuso" in cui gli input sono azzerati e gli output sono limitati. E' pertanto importante trovare il sistema adatto per poter applicare in campo le conoscenze raggiunte in sperimentazioni di laboratorio al fine di effettuare interventi di bioremediation in sistemi inquinati da idrocarburi policiclici aromatici.

Bibliografia

Adami G., Barbieri P., Piselli S., Predonzani S., Reisenhofer E. (2000). Detecting and characterizing sources of persistent organic pollutants (PAHs and PCBs) in surface sediments of an industrialized area (harbour of Trieste, Northern Adriatic Sea). *Journal of Environmental Monitoring*, 2: 261-265.

Ahn Y., Sanseverino J., Sayler G.S. (1999). Analyses of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from contaminated soils. *Biodegradation*, 10:149-157.

Alexander M., 1994. *Biodegradation and bioremediation*. Academic Press, 248-250.

Alexander M. (2000). Aging, bioavailability and overestimation of risk from environmental contaminants. *Environmental Science and Technology*, 34: 4259-4265.

Allen S.E. (1989). *Chemical analysis of ecological materials*. Second edition. S.E. Allen (ed.). Blackwell Scientific Publications.

Andersson R.T., Lundstedt S., Tornberg K., Schnurer Y., Oberg L.G., Mattiasson B. (2003). Incomplete degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil inoculated with wood-rotting fungi and their effects on the indigenous soil bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22: 1238-1243.

Anthony C. (1982). *The Biochemistry of Methylootrophs*. London: Academic Press

Arun A., Raja P.P., Arthi R., Ananthi M., Kumar K.S., Eyini M. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation by basidiomycetes fungi, *Pseudomonas* isolate, and their cocultures: comparative in vivo and in silico approach. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151: 132-42.

Atlas R.M. e Bartha R. (1997). *Microbial Ecology: fundamentals and applications*. 4th edition. Benjamin-Cummings Pub. Co., Menlo Park, CA, United States.

Bååth E., Frostegård Å., Fritze H. (1992). Soil bacterial biomass, activity, phospholipid fatty acid pattern, and pH tolerance in an area polluted with alkaline dust deposition. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 4026-4031.

Balachandran C., Duraipandiyar V., Balakrishnan K., Ignacimuthu S. (2012). Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. *Bioresource Technology*, 112: 83-90.

Baldantoni D., De Nicola F., Alfani A. (2010). Can compost applications affect metal and PAH contents in Mediterranean agricultural soils? *Fresenius Environmental Bulletin*, 19: 1735-1740.

BIBLIOGRAFIA

Baldrin P. (2009). Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. *Plant Soil and Environment*, 55: 370-378.

Ball W.P. e Roberts P.V. (1991). Long-term sorption of halogenated organic chemicals by aquifer material. Equilibrium. *Environmental Science and Technology*, 25: 1223-1237.

Bamforth S.M. e Singleton I. (2005). Review - Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80:723-736.

Bardgett R. D., Leemans D. K., Cook R. and Hobbs P. J. (1997). Seasonality of the soil biota of grazed and ungrazed hill grasslands. *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 1285-1294.

Bezalel L., Hadar Y., Cerniglia C.E. (1997). Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2495-2501.

Bocca B., Crebelli R., Menichini E. (2003). Presenza degli idrocarburi policiclici aromatici negli alimenti. Rapporti ISTISAN 03/22: 1-45.

Bogan B.W. e Sullivan W.R. (2003). Physicochemical soil parameters affecting sequestration and mycobacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Chemosphere*, 52: 1717-1726.

Brooks K.M. (2000). Assessment of the environmental effects associated with wooden bridges preserved with creosote, pentachlorophenol, or chromated copper arsenate. Madison, WI: Forest Service, Forest Products Laboratory, US Department of Agriculture; 2000. *Research Paper FPL-RP-587*.

Cerniglia C.E. (1984). Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Advances in Applied Microbiology*, 30: 31-71.

Cerniglia C.E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3: 351-368.

Chaudhary P., Sharma R., Singh S.B., Nain L. (2011). Bioremediation of PAH by *Streptomyces* sp. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 6: 268-271.

Cho B.H., Chino H., Tsuji H., Kunito T., Nagaoka K., Otsuka S., Yamashita K., Matsumoto S., Oyaiz H. (1997). Laboratory-scale bioremediation of oil-contaminated soil of Kuwait with soil amendment materials. *Chemosphere*, 35: 1599-1611.

Chiumenti R. e Chiumenti A. (2002). La tecnologia del compostaggio. Regione Veneto e ARPAV. <http://www.compostiamocibene.it/wp-content/uploads/2013/02/La-tecnologia-del-compostaggio-Arpa-Veneto.pdf>

BIBLIOGRAFIA

Cornelissen G., Gustafsson O., Bucheli T.D., Jonker M.T.O., Koelmans A.A., VanNoort P.C.M. (2005). Extensive sorption of organic compounds to black carbon, coal, and kerogen in sediments and soils: mechanisms and consequences for distribution, bioaccumulation, and biodegradation. *Environmental Science and Technology*, 39: 6881-6895.

Cremonesi P., Cavalieri E.L., Rogan E.G. (1989). One-electron oxidation of 6-substituted benzo[a]pyrenes by manganic acetate. A model for metabolic activation. *The Journal of Organic Chemistry*, 54: 3561-3570.

D'Annibale A., Celletti D., Felici M., Di Mattia E., Giovannozzi Sermanni G. (1996). Substrate specificity and properties of laccase from *Lentinus edodes*. *Acta Biotechnologica*, 16: 257-270.

Dagher F., Deziel E., Lirette P., Pasquette G., Bisallion J.G., Villemur L. (1997). Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial strains isolated from contaminated soils. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 368-377.

Davis M.W., Glaser J.A., Evans J.W., Lamar R.T. (1993). Field evaluation of lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* to treat creosote-contaminated soil. *Environmental Science and Technology*, 27: 2572-2576.

De Nicola F., Maisto G., Alfani A. (2003). Assessment of nutritional status and trace element contamination of holm oak woodlands through analyses of leaves and surrounding soils. *The Science of the Total Environment*, 31: 191-203.

De Nicola F., Baldantoni D., Alfani A. (2014). PAHs in decaying *Quercus ilex* leaf litter: Mutual effects on litter decomposition and PAH dynamics. *Chemosphere*, 114: 35-39.

Decker K.L.M., Boerner R.E.J., Morris S.J. (2005). Scale-dependent patterns of soil enzyme activity in a forested landscape. *Canadian Journal of Forest Research*, 29: 232-241.

Decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152. Norme in materia ambientale. *Gazzetta Ufficiale* 88, 14 Aprile 2006.

Decreto Ministeriale 25 ottobre 1999, n. 471. Regolamento recante criteri, procedure e modalità per la messa in sicurezza, la bonifica e il ripristino ambientale dei siti inquinati, ai sensi dell'articolo 17 del decreto legislativo 5 febbraio 1997, n. 22, e successive modificazioni e integrazioni. *Gazzetta Ufficiale* 293, 15 Dicembre 1999.

Dunford H.B. (1999). *Heme peroxidases*. Wiley-VCH, New York.

Eisler R. (1987). Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report*, 85: 1-11.

BIBLIOGRAFIA

Environmental European Agency (2006). <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/progress-in-management-of-contaminated-sites/progress-in-management-of-contaminated-1>

European Commission (2002). Comunicazione della Commissione al Consiglio e al Parlamento Europeo, al Comitato economico e sociale e al Comitato delle Regioni. *Verso una strategia tematica per la protezione del suolo*. COM 179/2002, Buxelles.

Farnet A.M., Criquet S., Cigna M., Gil G., Ferre E. (2004). Purification of a laccase from *Marasmius quercophilus* induced with ferulic acid: reactivity towards natural and xenobiotic aromatic compounds. *Enzyme and Microbial Technology*, 34: 549-554.

Floch C., Alarcon-Gutiérrez E., Criquet S. (2007). ABTS assay of phenol oxidase activity in soil. *Journal of Microbiological Methods*, 71: 319-324.

Frostegård Å., Tunlid A., Bååth E. (1993). Phospholipid fatty acid composition, biomass and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 3605-3617.

Gianfreda L., Rao M.A., Piotrowska A., Palumbo G., Colombo C. (2005). Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution. *Science of the Total Environment*, 341: 265-279.

Gierer J., Yang E., Reitberger T. (1992). The reaction of hydroxyl radicals with aromatic rings in lignin, studied with cresol and 4-methylveratrol. *Holzforschung*, 46: 495-504.

Gold M.H., Kuwahara M., Chiu A.A., Glenn J.K. (1984). Purification and characterization of an extracellular H₂O₂-requiring enzyme diarylpropane oxygenase from the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 234: 353-362.

Goldman R., Enewold L., Pellizzari E., Beach J.B., Bowman E.D., Krishnan S.S., Shields P.G. (2001). Smoking increase carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in human lung tissue. *Cancer Research*, 61: 6367-6371.

Gramss G., Voigt K.D., Kirsche B. (1999). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with three to seven aromatic rings by higher fungi in sterile and unsterile soils. *Biodegradation*, 10: 51-62.

Guerin T.F. (1999). Bioremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in creosote contaminated soil using ex-situ land treatment. *Journal of Hazardous Materials*, B65:305-315.

Hamdi H., Manusadzianas L., Aoyama I., Jedidi N. (2006). Effects of anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene spiking and sewage sludge compost amendment on soil ecotoxicity during a bioremediation process. *Chemosphere*, 65: 1153-1162.

BIBLIOGRAFIA

- Hamdi H., Benzarti S., Manusadzianas L., Aoyama I., Jedidi N. (2007). Bioaugmentation and biostimulation effect of PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 1926-1935.
- Hanson R.S., Hanson T.E. (1996). Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews*, 60: 439-471.
- Hastie T. e Tibshirani R. (2011). Earth: Multivariate Adaptive Regression Spline Models. R Software Package.
- Heitkamp M.A., Freeman J.P., Miller D.W., Cerniglia C.E. (1988). Pyrene degradation by a Mycobacterium sp.: identification of ring oxidation and ring fission products. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 2556-2565.
- Herrchen M., Debus R., Pramanik-Strehlow R. (1997). *Bioavailability as a key property in terrestrial ecotoxicity assessment and evaluation*. Fraunhofer IRB Verlag Stuttgart Germany.
- Howard P.H., Boethling R.S., Jarvis W.F., Meylan W.M., Michalenko E.M. (1991). *Handbook of Environmental Degradation Rates*. Printup, H.T. (ed). Lewis Publishers, Chelsea, MI.
- Hullo M.F., Moszer I., Danchin A., I. Martin-Verstraete (2001). CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *Journal of Bacteriology*, 183: 5426-5430.
- Hunter R.D., Ekunwe S.I.N., Dodor D.E., Heang H.M., Ekunwe L. (2005). *Bacillus subtilis* is a potential degrader of pyrene and benzo[a]pyrene. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2: 267-271.
- IARC (1989). Diesel and gasoline engine exhausts. *IARC Monographs On The Evaluation Of The Carcinogenic Risks To Humans*, 46: 41-185.
- IARC (2014). Agents Classified by the IARC Monographs, *Volumes 1-111*.
- In Der Wiesche C., Martens R., Zadrazil F. (1996). Two-step degradation of pyrene by white-rot fungi and soil micro-organisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46: 653-659.
- IPCS (1998). Environmental Health Criteria 202: Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. WHO, Geneva.
- Jackson E.F., H.L. Echlin E.F., Jackson. C.R. (2006). Changes in the phyllosphere community of the resurrection fern, *Polypodium polypodioides*, associated with rainfall and wetting. *FEMS Microbiology Ecology*, 58: 236-246.
- Johannes C. e Majcherczyk A. (2000). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 524-528.

BIBLIOGRAFIA

Jones K.C., Alcock R.E., Johnson D.L., Semple K.T., Woolgar P.J. (1996). Organic chemicals in contaminated land: analysis, significance and research priorities. *Land Contamination and Reclamation*, 4: 189-198.

Juhasz A.L. e Naidu R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 45: 57-88.

Kabata-Pendias A. (2010). *Trace Elements in Soils and Plants*, Fourth Edition. CRC Press, Taylor and Francis Group.

Kastner M., Lotter S., Heerenklage J., Breuer-Jammali M., Stegmann R., Mahro B. (1995). Fate of 14 C-labeled anthracene and hexadecane in compost-manured soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43: 1128-1135.

Kastner M. e Mahro B. (1996). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44: 668-675.

Keener W.K. e Arp D.J. (1993). Kinetic-studies of ammonia monooxygenase inhibition in *Nitrosomonas europaea* by hydrocarbons and halogenated hydrocarbons in an optimized whole-cell assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 2501-2510.

Kelley I., Freeman J.P., Evans F.E., Cerniglia C.E. (1990). Identification of metabolites from degradation of naphthalene by a *Mycobacterium* sp. *Biodegradation*, 1: 283-290.

Kersten P.J., Kalyanaraman B., Hammel K.E., Reinhammar B., Kirk T.K. (1990). Comparison of lignin peroxidase and laccase in the oxidation of methoxy benzene. *Biochemical Journal*, 268: 475-480.

Kizhekkedathu N.N. e Parukuttyamma P. (2005). Mangrove actinomycetes as the source of lignolytic enzymes. *Actinomycetologica*, 19: 40-47.

Klamer M., Sponring A., Bååth E. (2000). Microbial biomass and community composition in soils from Surtsey studied using phospholipid fatty acid analysis. *Surtsey Progress Report*, 11: 37-42.

Kotterman M.J.J., Vis E.H., Field J.A. (1998). Successive mineralization and detoxification of benzo[a]pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 and indigenous microflora. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2853-2858.

Li K.C., Xu F., Eriksson K.E.L. (1999). Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of nonphenolic lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2654-2660.

Lijinsky W. (1991). The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food. *Mutation Research*, 259: 251-262.

BIBLIOGRAFIA

Lindgren J.F., Hassellöv I.M., Dahllöf I. (2012). Meiofaunal and bacterial community response to diesel additions in a microcosm study. *Marine Pollution Bulletin*, 64: 595-601.

Lindgren J.F., Hassellöv I.M., Dahllöf I. (2014). PAH effects on meio- and microbial benthic communities strongly depend on bioavailability. *Aquatic Toxicology*, 146: 230-238.

Liste H.H. e Alexander M. (2002). Butanol extraction to predict bioavailability of PAHs in soil. *Chemosphere*, 46:1011-1017.

Luthy R.G., Aiken G.R., Brusseau M.L., Cunningham S.D., Gschwend P.M., Pignatello J.J., Reinhard M., Traina S.J., Weber W.J., Westall J.C. (1997). Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents. *Environmental Science and Technology*, 31: 3341-3347.

Macleod C.J. e Semple K.T. (2006). The influence of single and multiple applications of pyrene on the evolution of pyrene catabolism in soil. *Environmental Pollution*, 139: 455-60.

Maisto G., De Nicola F., Prati M.V., Alfani A. (2004). Leaf and soil accumulation in an urban area of Mediterranean region (Naples-Italy). *Fresenius Environmental Bulletin*, 13: 1263-1268.

Maliszewska-Kordybach B. e Smreczak B. (2003). Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *Environment International*, 28: 719-728.

Mason M.G., Ball A.S., Reeder B.J., Silkstone G., Nicholls P., Wilson M.T. (2001). Extracellular heme peroxidases in *Actinomycetes*: a case of mistaken identity. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4512-4519.

Mastrangelo, G., Fadda E., Marzia V. (1996). Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environmental Health Perspectives*, 104: 1166–1170.

Mader B.T., Uwe-Goss K., Eisenreich S.J. (1997). Sorption of nonionic, hydrophobic organic chemicals to mineral surfaces. *Environmental Science and Technology*, 31: 1079-1086.

Meckenstock R.U., Annweiler E., Michaelis W., Richnow H.H., Schink B. (2000). Anaerobic naphthalene degradation by a sulphate reducing enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2743-2747.

Mersch-Sundermann V., Mochayed S., Kevekordes S. (1992). Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Escherichia coli* PQ37. *Mutation Research*, 278: 1-9.

BIBLIOGRAFIA

Mester T. e Tien M. (2000). Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 46: 51-59.

Meulenberg R., Rijnaarts H.H.M., Doddema H.J., Field J.A. (1997). Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability. *FEMS Microbiology Letters*, 152: 45-49.

Miessner M., Crescenzi O., Napoletano A., Porta G., Andersen S.O., Peter M.G. (1991). Biphenyl-tetrols and dibenzofuranones from oxidative coupling of resorcinol with 4-alkylpyrocatechols: new clues to the mechanism of insect cuticle sclerotization. *Helvetica Chimica Acta*, 74: 1205-1212.

Mueller J.G., Cerniglia C.E., Pritchard P.H. (1996). *Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons, in bioremediation: principles and applications*. Crawford RL and Crawford DL, Cambridge University Press, Idaho, 125-194.

Mueller J.G., Devereux R., Santavy D.L., Lantz S.E., Willis S.G., Pritchard P.H. (1996a). Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soils. *Journal Antonie van Leeuwenhoek*, 71: 329-343.

Nam K., Chung N., Alexander M. (1998). Relationship with organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene. *Environmental Science and Technology*, 32: 3785-3788.

Namkoong W., Hwang E., Park J., Choi J. (2002). Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. *Environmental Pollution*, 119: 23-31.

Naranjo L., Urbina H., De Sisto A., Leon V. (2007). Isolation of autochthonous non-white rot fungi with potential for enzymatic upgrading of Venezuelan extra-heavy crude oil. *Biocatalysis and Biotransformation*, 25: 341-349.

Northcott G.L. e Jones K.C. (2003). Validation of procedures to quantify nonextractable polycyclic aromatic hydrocarbon residues in soil. *Journal of Environmental Quality*, 32: 571-582.

Nylund K., Asplund L., Jansson B., Jonsson P., Litze'n K., Sellström U. (1992). Analysis of some polyhalogenated organic pollutants in sediment and sewage sludge. *Chemosphere*, 24: 1721-1730.

Odier E., Mozuch M.D., Kalyanaraman B., Kirk T.K. (1998). Ligninase-mediated phenoxy radical formation and polymerization unaffected by cellobiose: quinone oxidoreductase. *Biochimie*, 70: 847-852.

Oliveira P.L., Duarte M.C.T., Ponezi A.N., Durrant L.R. (2009). Purification and partial characterization of manganese peroxidase from *Bacillus pumilus* and *Paenibacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40: 818-826.

BIBLIOGRAFIA

Oksanen J., Blanchet F.G., Kindt R., Legendre P., Minchin P.R., O'Hara R.B., Simpson G.L., Solymos P., Stevens M.H.H., Wagner H. (2013). *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.0-10.

Pandey V. C., Singh J. S., Singh D. P., Singh R. P. (2014). Methanotrophs: promising bacteria for environmental remediation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11: 241-250.

Pankrantz, T.M. (2001). *Environmental engineering dictionary and directory*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Periasamy M. e Vivekananda Bhatt M. (1978). Facile oxidation of aromatic rings by $Mn_2(SO_4)_3$. *Tetrahedron Letters*, 46: 4561-4562.

Perucci P., Casucci C., Dumontet S. (2000). An improved method to evaluate the o-diphenol oxidase activity of soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 1927-1933.

Piccardo M.T., Coradeghini R., Valerio F. (2001). Polycyclic aromatic hydrocarbon pollution in native and caged mussels. *Marine Pollution Bulletin*, 42: 951-956.

Pizzul L., del Pilar Castillo M., Stenström J. (2009). Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes. *Biodegradation*, 20: 751-759.

Pointing S.B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 20-33.

Pothuluri J.V. e Cerniglia C.E. (1994). Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Chaudhry G.R. *Biological degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals*. Chapman and Hall. 92-124.

Rathbone K., Fuchs J., Anderson K., Karthikeyan R., Nurhidayat N. (1998). Effects of PAHs on microbial activity and diversity in freshly contaminated and weathered soils. *Proceedings of the 1998 Conference on Hazardous Waste Research*, 383-402.

Reid B.J., Jones K.C., Semple K.T. (2000). Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments - a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environmental Pollution*, 108: 103-112.

Rockne K.J., Stensel H.D., Herwig R.P., Strand S.E. (1998). PAH degradation and bioaugmentation by a marine methanotrophic enrichment. *Bioremediation Journal*, 1: 209-222.

Rodriguez E., Nuero O., Guillen F., Martinez A.T., Martinez M.J. (2004). Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 909-916.

BIBLIOGRAFIA

Rodriguez Couto S., Rodriguez A., Paterson R.R.M., Lima N., Teixeira J.A. (2006). High laccase activity in a 6 l airlift bioreactor by free cells of *Trametes hirsuta*. *Letters in Applied Microbiology*, 42: 612-616.

Rosenberg E., Legmann R., Kushmaro A., Taube R., Adler E., Ron E.Z. (1992). Petroleum bioremediation - a multiphase problem. *Biodegradation*, 3: 337-350.

Roslev P. e Iversen N. (1999). Radioactive fingerprinting of microorganisms that oxidize atmospheric methane in different soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4064-4070.

Sack U. e Fritsche W. (1997). Enhancement of pyrene mineralization in soil by wood-decaying fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 22: 77-83.

Samanta S.K., Singh O.V., Jain R.K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbon: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, 20: 243-248.

Sarkar D., Ferguson M., Datta R., Birnbaum S. (2005). Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Environmental Pollution*, 136: 187-195.

Scelza R., Rao M.A., Gianfreda L. (2007). Effects of compost and of bacterial cells on the decontamination and the chemical and biological properties of an agricultural soil artificially contaminated with phenanthrene. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 1303-1317.

Schnoor J.L., Licht L.A., McCutcheon S.C., Wolfe N.L., Carreira L.H. (1995). Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental Science and Technology*, 29:318-323.

Schwarzenbach R.P., Escher B.I., Fenner K., Hofstetter T.B., Johnson C.A., Von Gunten U., Wehrli B. (2006). The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science*, 313: 1072-1077.

Semple K.T., Reid B.J., Fermor T.R. (2001). Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution*, 112: 269-83.

Semple K.T., Doick K.J., Jones K.C., Burauel P., Craven A., Harms H. (2004). Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environmental Science and Technology*, 38: 228-231.

Semrau J.D. (2011). Bioremediation via Methanotrophy: Overview of Recent Findings and Suggestions for Future Research. *Frontiers in Microbiology*, 2: 209.

Shoemaker H.E., Harvey P.J., Bowen R.M., Palmer J.M. (1985). On the mechanism of enzymatic lignin breakdown. *FEBS Letters*, 187: 7-12.

Sims R.C., Overcash M.R. (1983). Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. *Residue Reviews*, 88: 1-68.

Sinsabaugh R.L. (2010). Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 391-404.

Song, Y.J. (2009). Characterization of aromatic hydrocarbon degrading bacteria isolated from pine litter. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37: 333-339.

Spacie A. e Hamelink J.L. (1995). Bioaccumulation. In: Rand G.M. *Fundamentals of aquatic toxicology, effect, environmental fate an risk assessment*. Taylor and Francis.

Spain J.C., Pritchard P.H., Bourquin A.W. (1980). Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/water cores from estuarine and freshwater environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 40: 726-34.

Spain J.C., Van Veld P.A. (1983). Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum, and chemical structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 428-35.

Stanley G.A., Britz M.L., Boonchan S., Juhasz A.L. (1999). Detoxification of soils containing high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by gram-negative bacteria and bacterial-fungal co-cultures. In: Wise, D.L., Trantolo, D.J., Cichon, E.J., Inyang, H.I., Stottmeister, U. (Eds.), *Remediation of Hazardous Waste Contaminated Soil*. Marcel Dekker, New York, 161-179.

Steffen K.T., Hatakka A., Hofrichter M. (2003). Degradation of benzo[a]pyrene by the litter-decomposing basidiomycete *Stropharia coronilla*: role of manganese peroxidase. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3957-3964.

Steffen K.T., Schubert S., Tuomela M., Hatakka A., Hofrichter M. (2007). Enhancement of bioconversion of high-molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated non-sterile soil by litter-decomposing fungi. *Biodegradation*, 18: 359-369.

Stella A., Piccardo M.T., Coradeghini R., Redaelli A., Lanteri S., Armanino C., Valerio F. (2002). Principal component analysis application in polycyclic aromatic hydrocarbons "mussel watch" analyses for source identification. *Analytica Chimica Acta*, 46: 201-213.

Steffen K.T., Schubert S., Toumela M., Hatakka A., Hofrichter M. (2007). Enhancement of bioconversion of high-molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbon in contaminated non-sterile soil by litter-decomposing fungi. *Biodegradation*, 18: 359-369.

- Stokes J.D., Paton G.I., Semple K.T. (2006). Behavior and assessment of bioavailability of organic contaminants in soil: relevance for risk assessment and remediation. *Soil Use and Management*, 21: 475-486.
- Stout S., Magar V., Uhler R., Ickes J., Abbott J., Brenner R. (2001). Characterization of naturally occurring and anthropogenic PAHs in urban sediments – wycoff/eagle harbor superfund site. *Environmental Forensics*, 2: 287-300.
- Su Y.H. e Yang X.Y. (2009). Interactions between selected PAHs and the microbial community in rhizosphere of a paddy soil. *Science of The Total Environment*, 407: 1027-1034.
- Sutherland J.B., Rafii F., Khan A.A., Cerniglia C.E. (1995). Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. In: Young L.Y. e Cerniglia C.E. *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. Wiley-Liss. 269-306.
- Swindell A.L. e Reid B.J. (2006). Comparison of selected non-exhaustive extraction techniques to assess PAH availability in dissimilar soils. *Chemosphere*, 62: 1126-1134.
- Thiele-Bruhn S. e Brummer G.W. (2004). Fractionated extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from polluted soils: estimation of the PAH fraction degradable through bioremediation. *European Journal of Soil Science*, 55: 567-578.
- Tuor U., Winterhalter K., Fiechter A. (1995). Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants in wood decay. *Journal of Biotechnology*, 41: 1-7.
- Van Leeuwen C.J. e Hermens J.L.M. (1995). Terrestrial toxicity. In: *Risk assessment of chemicals, an introduction*. Kluwer Academic Dordrecht Netherlands. 211-216.
- Villemur R., Déziel E., Benachenhou A., Marcoux J., Gauthier E., Lépine F., Beaudet R., Comeau Y. (2000). Two-liquid-phase slurry bioreactors to enhance the degradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Biotechnology Progress*, 16: 966-72.
- Walworth J.L. e Reynolds C.M. (1995). Bioremediation of a petroleum-contaminated cryic soil: effects of phosphorus, nitrogen, and temperature. *Journal of Soil Contamination*, 4: 299-310.
- Wang T.S.C., Huang P.M., Chou C.H., Chen J.H. (1986). The role of soil minerals in the abiotic polymerization of phenolic compounds and formation of humic substances. In: Huang P.M. e Schnitzer M. *Interactions of soil minerals with natural organics and microbes*, Soil Sci. Soc. of America, Madison. 17: 251–281.
- Wilk M., Bez W., Rochlitz J. (1966). Neue Reaktionen der carcinogenen Kohlenwasserstoffe 3,4-Benzopyren, 9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracen und 20-Methylcholanthren. *Tetrahedron*, 22: 2599-2608.

BIBLIOGRAFIA

Williams C.M., Grimes J.L., Mikkelsen R.L. (1999). The use of poultry litter as co-substrate and source of inorganic nutrients and microorganisms for the ex situ biodegradation of petroleum compounds. *Poultry Litter*, 78: 956-964.

Yamaguchi M., Hwang P.M., Campbell J.D. (1970). Latent o-diphenol oxidase in mushrooms (*Agaricus biporus*). *Canadian Journal of Biochemistry*, 28: 198-202.

Yang Y., Zhang N., Xue M., Tao S. (2010). Impact of soil organic matter on the distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils. *Environmental Pollution*, 158: 2170-74.

Zhang X., Sullivan E.R., Young L.Y. (2000). Evidence for aromatic ring reduction in the biodegradation pathway of carboxylated naphthalene by a sulphate-reducing consortium. *Biodegradation*, 11: 117-124.

Ringraziamenti

Giunta al termine di questi tre intensi anni di dottorato desidero ringraziare di cuore la “*mia Prof.*” Anna Alfani, che oltre ad avermi dato la possibilità di svolgere il lavoro di dottorato ed avermi seguita con dedizione in questi tre anni, è stata la mia preziosa guida sin dall’inizio del mio percorso universitario.

Ringrazio la Dott.ssa Flavia De Nicola, che mi ha seguito durante la realizzazione del progetto e mi ha trasferito le sue conoscenze sulla tematica degli IPA, mostrandosi sempre disponibilissima.

Un sincero ringraziamento va agli ingegneri Prati e Costagliola e al Dott. Perretta dell’Istituto Motori del CNR di Napoli, che mi hanno dato la possibilità di effettuare le analisi degli IPA presso il loro laboratorio, sempre pronti ad aiutarmi nelle difficoltà.

Grazie al Dott. Alessandro Bellino che, oltre ad essere un carissimo amico, è stato un ottimo consigliere durante questi tre anni ed è stato fondamentale per l’elaborazione statistica dei dati di questo progetto.

Ringrazio la Dott.ssa Daniela Baldantoni, che si è sempre mostrata disponibile a darmi suggerimenti di ogni genere.

Ringrazio la Coordinatrice di questo dottorato e il collegio dei docenti, che mi hanno dato la possibilità di vivere questa bella esperienza di lavoro e di vita.

Un ringraziamento speciale va ai miei genitori, che in questi tre anni mi hanno sostenuto economicamente ma soprattutto umanamente, con tanta pazienza e dedizione, come solo la mamma e il papà sanno fare.

Grazie alle mie sorelle Luisa e Paola che sanno sempre come strapparti una risata anche nei momenti più cupi.

Ringrazio le mie amiche Cecilia, Laura e Rossella, sempre presenti nella buona e nella cattiva sorte.

E infine un grazie speciale al mio Adriano, che è stato costantemente presente durante questo percorso, supportandomi emotivamente ed incoraggiandomi a fare sempre di più.