



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PERUGIA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA CELLULARE E AMBIENTALE

Corso di Dottorato di Ricerca in

SCIENZE AMBIENTALI - XXV Ciclo.

**ASPETTI DI ECOLOGIA MICROBICA DELLA
VALORIZZAZIONE DEGLI SCARTI DEI FRANTOI OLEARI:
DINAMICHE DELLE COMUNITA' MICROBICHE DURANTE IL
PROCESSO DI COMPOSTAGGIO E APPLICAZIONE IN
STRATEGIE DI BIORISANAMENTO**

s.s.d. BIO/19

Tesi di dottorato di:

Dott. Silvia Scargetta

Coordinatore del corso

Prof. Maurizio Petruccioli

Tutore

Dott. Ermanno Federici

Dedicata a mio padre.....

INDICE

INTRODUZIONE	1
1. INDUSTRIA OLEARIA	2
1.1 SOTTOPRODOTTI DELL'INDUSTRIA OLEARIA	3
1.2 GESTIONE DEI REFLUI OLEARI	5
1.3 RECUPERO E VALORIZZAZIONE DEI REFLUI DERIVANTI DAI FRANTOI A DUE FASI (TPOMW).	6
2 COMPOSTAGGIO	9
2.1 PROCESSO COMPOSTAGGIO	9
2.2 APPLICAZIONI DEL COMPOST	11
3. INQUINAMENTO	14
3.1 FARMACI	16
3.2 IDROCARBURI	23
4. BIORISANAMENTO	30
4.1 ASPETTI MICROBIOLOGICI DEL BIORISANAMENTO	31
4.2 TECNICHE DI BIORISANAMENTO.	34
4.3. UTILIZZO DEL COMPOST NEL BIORISANAMENTO.	40
5. STUDIO DELLE COMUNITA' MICROBICHE.	42
 SCOPO DELLA TESI	 50
 MATERIALI E METODI	 51
 1. MATERIALI	 52
1.1 MATRICI CONTAMINATE	52
1.2 COMPOST	53

2. ALLESTIMENTO PROVE SPERIMENTALI	55
2.1 PROVA DI COMPOSTAGGIO	55
2.2 PROVE DI BIORISANAMENTO	55
3. METODI DI ANALISI	58
3.1 ANALISI MICROBIOLOGICHE COLTURA-DIPENDENTI	58
3.2. ANALISI MICROBIOLOGICHE COLTURA-INDIPENDENTI	60
3.3 ANALISI CHIMICHE	69
3.4 ANALISI STATISTICA	70
 RISULTATI E DISCUSSIONE	 72
 1. APPROFONDIMENTI DI ECOLOGIA MICROBICA DEL PROCESSO DI COMPOSTAGGIO DEGLI SCARTI DERIVANTI DAI FRANTOI OLEARI.	 73
1.1 CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA E MICROBIOLOGICA DEL PROCESSO DI COMPOSTAGGIO di <i>TPOMW</i>	74
1.1.1 RISULTATI	74
1.1.2 DISCUSSIONE	92
1.2 CARATTERIZZAZIONE DELLA DIVERSITA MICROBICA DI COMPOST DA <i>TPOMW</i> OTTENUTI CON DIVERSE STRATEGIE TECNOLOGICHE.	97
1.2.1 RISULTATI.	98
1.2.2 DISCUSSIONE	107
1.3 CONCLUSIONI	109
 2. IMPLICAZIONI ECOLOGICHE DELL'APPLICAZIONE DEL COMPOST IN STRATEGIE DI BIORISANAMENTO.	 110
2.1 PROVA DI BIORISANAMENTO DI UN SUOLO STORICAMENTE CONTAMINATO DA <i>DIESEL-OIL</i> .	111
2.1.1 RISULTATI	112
2.1.2 DISCUSSIONE	129

2.2 PROVA DI BIORISANAMENTO DI UN FANGO CONTAMINATO <i>ad hoc</i> CON CARBAMAZEPINA.	133
2.2.1 RISULTATI	134
2.2.2 DISCUSSIONE	145
2.3 CONCLUSIONI	148
 CONCLUSIONI GENERALI	 150
 BIBLIOGRAFIA	 152

INTRODUZIONE

1. INDUSTRIA OLEARIA

Nello scenario mediterraneo, l'industria olearia rappresenta un settore molto importante sia in termini di tradizione che di ricchezza. Da una stima effettuata dal Consiglio Oleicolo Internazionale (C.O.I.)(IOOC 2011) per la campagna 2011/2012 risulta che tre quarti della produzione mondiale di olio d'oliva viene garantita dall'Unione Europea con 2,18 milioni di tonnellate. Spagna, Italia, Grecia e Portogallo sono responsabili rispettivamente del 62, 20, 14 e 3% della produzione europea. In particolare il patrimonio olivicolo italiano è stimato in 150 milioni di piante distribuite su una superficie di 1.165.458 ha e con una produzione media annua di 600.000 t.

Uno dei maggiori problemi legato a questo settore, è lo smaltimento degli scarti dei frantoi oleari, pari a più del 60% del volume iniziale di olive molite e il cui costo di smaltimento è pari al 50% delle spese di produzione.

Le tecnologie oggi disponibili per l'estrazione dell'olio d'oliva offrono un'ampia varietà in termini d'impianti e sistemi di estrazione, ciascuno dei quali condiziona la qualità dell'olio e la tipologia di sottoprodotto (Fig. 1).

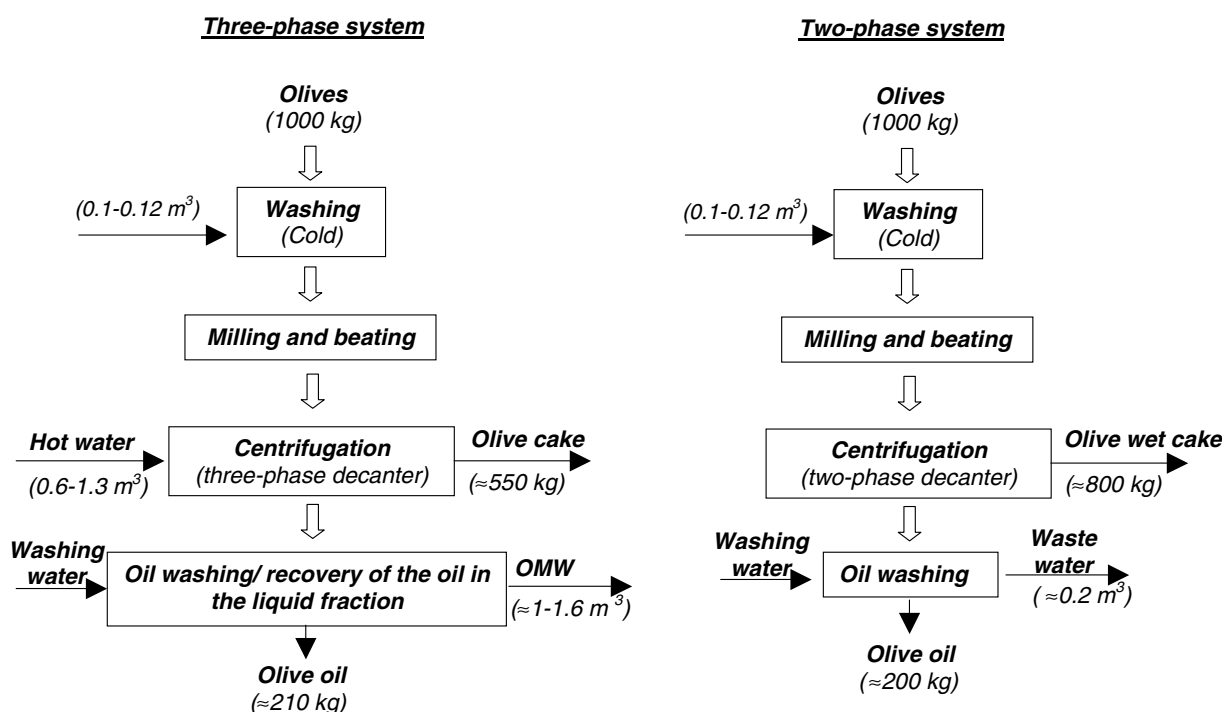


Fig. 1. Metodi di estrazione a due e a tre fasi e relativi sottoprodotti.

In Italia, il *sistema traduzione* di estrazione a pressa è stato la tecnologia più diffusa fino agli inizi degli anni '90. Questo sistema richiede una quantità di acqua, variabile tra i 40 e i 120 litri per quintale di olive molite, da aggiungere in fase di gramolatura; si genera quindi una notevole quantità di refluo costituito dalle acque inerenti alla drupa, dalle acque di lavaggio e da quelle di processo. L'evoluzione tecnologica ha determinato una notevole riduzione dell'impiego degli impianti a pressione, per cui attualmente si tende a privilegiare "impianti continui", a tre fasi e a due fasi, che puntano all'utilizzo del sistema centrifugo per la separazione delle fasi, cioè dell'olio d'oliva, dell'acqua di vegetazione e della sansa. Il *sistema a tre fasi*, rispetto alla pressatura tradizionale offre alcuni vantaggi, tra i quali, la completa automazione e miglioramento delle qualità organolettiche dell'olio, ma lo svantaggio è rappresentato dalla notevole quantità d'acqua necessaria per il processo, con il conseguente aumento dell'acqua di vegetazione prodotta (Roig et al., 2006). Negli ultimi anni l'immissione sul mercato di un nuovo sistema d'estrazione per centrifugazione chiamato a "*due fasi*", dal quale si ottengono olio d'oliva e sansa umida, ha portato ad una drastica riduzione dell'acqua di processo. Le rese di estrazione dell'olio sono maggiori rispetto al processo a tre fasi poiché non viene aggiunta acqua calda per diluire la pasta di olive. Inoltre anche la qualità del prodotto è, in genere, ritenuta migliore grazie ad una maggiore concentrazione di polifenoli che aumenta la stabilità dell'olio. Sfortunatamente anche tale sistema a due fasi produce come sottoprodotto, la sansa umida, di difficile utilizzo e smaltimento a causa dell'elevata umidità. Infatti, mentre le sanse prodotte con il sistema tradizionale a pressione e a tre fasi hanno, che hanno un'umidità di circa il 50%, vengono utilizzate per l'estrazione dell'olio di sansa mediante solventi organici dopo opportuno essiccamento, le sanse umide prodotte dal sistema a due fasi hanno un'umidità superiore, dal 60 al 70%. Ciò rende la successiva estrazione dell'olio residuo poco economica, a causa dell'elevata energia richiesta per l'essiccamento, e l'olio stesso è di scarsa qualità, in quanto, le più alte temperature necessarie per il processo d'essiccamento ne alterano, in genere, la composizione (Roig et al., 2006).

1.1 SOTTOPRODOTTI DELL'INDUSTRIA OLEARIA

L'estrazione dell'olio d'oliva tramite l'impiego del *sistema tradizionale* e a *tre fasi* produce la stessa tipologia di sottoprodotti: ACQUE DI VEGETAZIONE e SANSA VERGINE.

La quantità di acque di vegetazione prodotta, in funzione del ciclo di estrazione impiegato, varia dai 40-55 litri per quintale di olive lavorate con il sistema a pressione, agli 80-120 litri per quintale con il sistema di centrifugazione a tre fasi. Lo smaltimento di questi volumi di refluo rappresenta un costo non indifferente per gli oleifici per le severe leggi emanate a tutela dell'ambiente, che impediscono lo scarico dei reflui provenienti dai processi di lavorazione agroindustriale nei corsi d'acqua o nella rete fognaria urbana (legge Merli n° 319/76 e successive modifiche ed aggiornamenti). Le acque di vegetazione hanno natura prevalentemente organica e, pertanto, oltre a possedere un elevato potere inquinante, risultano difficilmente depurabili con gli impianti usati per il trattamento dei liquami, visto l'elevato valore di residuo secco. Queste difficoltà unite ad una logica di riporto al terreno delle biomasse, ha indotto i legislatori di alcuni Paesi produttori olivicoli a consentire lo spandimento controllato e limitato delle acque di vegetazione sul terreno agrario (vedi legge italiana 574/96). Tale pratica ha la finalità di riportare alla matrice, una parte di quella sostanza organica che il terreno stesso ha contribuito a formare, risultando benefica dal punto di vista agronomico. Questo refluo, del resto, contiene alte concentrazioni di proteine, zuccheri, lipidi, e particolari composti aromatici e alifatici e, perciò, può essere considerato fonte conveniente ed abbondante di sostanze chimiche eccellenti e biomateriale (Federici et al., 2009) apportando, così, al suolo materia organica ed elementi minerali fertilizzanti.

Il sottoprodotto solido della lavorazione meccanica delle olive è rappresentato dalla sansa vergine. Normalmente, attraverso un processo di estrazione dell'olio dalle sanse vergini con solvente (esano) si ottengono: olio di sansa e sansa esausta. Tuttavia, l'estrazione dell'olio di sansa richiede una spesa energetica dieci volte superiore a quella necessaria per l'estrazione meccanica dell'olio dalle olive. Le sanse esauste possono essere utilizzate, poi, come fonte di energia termica, o possono trovare utile impiego nel settore mangimistico.

L'avvento degli impianti a *due fasi*, sta modificando la tipologia dei reflui prodotti dall'industria di prima trasformazione; infatti, con questa tecnica viene prodotta sansa umida, la quale ha sostituito la precedente sansa vergine ed ha eliminato, o ridotto notevolmente, il problema dello smaltimento delle acque di vegetazione. A causa dell'elevato contenuto in acqua delle sanse, l'estrazione dell'olio residuo diventa difficile e costosa, richiedendo un preliminare processo di essiccamento o l'uso di macchine centrifughe, tanto che i sansifici sempre più frequentemente rifiutano questo tipo di prodotto. In questi ultimi anni il mercato è precipitato anche a causa della riduzione dei consumi, e quindi del valore commerciale, dell'olio di sansa. Di conseguenza, mentre in

passato la sansa costituiva una fonte di reddito per il frantoiano, attualmente, sta diventando, al pari delle acque di vegetazione, un sottoprodotto da smaltire, e quindi un onere.

1.2 GESTIONE DEI REFLUI OLEARI

La gestione delle acque di vegetazione dei frantoi è stata regolata per lungo tempo dalla Legge Merli (Legge 10 maggio 1976, n. 319) che, assimilandole alle acque reflue di altra provenienza, ne proibiva lo spargimento sui terreni agrari a causa dell'elevato carico organico, decretando l'obbligo di provvedere alla depurazione o di ricorrere allo smaltimento in discarica.

Dopo numerosi decreti la materia è stata regolamentata ex novo dalla Legge 11 novembre 1996, n. 574 recante norme in materia di utilizzazione agronomica delle acque di vegetazione e di scarichi dei frantoi oleari e dal Decreto Ministeriale del 6 luglio 2005 che stabilisce i criteri e le norme tecniche generali per l'utilizzazione agronomica delle acque di vegetazione e delle sanse umide.

In base alla legge n. 574/1996 le sanse umide e le acque di vegetazione, residue dalla lavorazione meccanica delle olive che non hanno subito alcun trattamento né ricevuto alcun additivo, possono essere oggetto di utilizzazione agronomica attraverso lo spargimento controllato su terreni adibiti ad usi agricoli.

Per quanto riguarda la sansa umida, in riferimento alla legge n.574 del 1996, questa viene considerata come un ammendante vegetale semplice non compostato (quindi applicata al terreno senza specifici limiti quantitativi) se risponde ai requisiti di umidità (massimo 50%), pH (compreso tra 6 e 8,5), carbonio organico sul secco (minimo 40%), azoto organico sul secco (almeno 80% dell'azoto totale), rame totale sul secco (massimo 150 ppm), zinco totale sul secco (massimo 500 ppm), contenuto in torba sul tal quale (massimo 20% sul tal quale). Sono altresì fissati i seguenti tenori massimi in metalli pesanti, espressi sulla sostanza secca: piombo totale 140 ppm, cadmio totale 1,5 ppm, nichel totale 50 ppm, mercurio totale 1,5 ppm. Lo spandimento delle sanse umide sui terreni aventi destinazione agricola, deve avvenire secondo le modalità previste dall'articolo 4 della legge 11 novembre 1996, n. 574 (citato in precedenza per la modalità di spandimento delle acque di vegetazione). L'utilizzo agronomico dei residui oleari deve essere inoltre condizionato da

un attento controllo della composizione chimica di tali reflui, al fine di individuare eventuali sostanze tossiche o nocive e quindi evitare fenomeni di inquinamento del terreno che possano dar luogo ad alterazioni irreversibili (Amirante P., 1998; Amirante & Montel, 1999).

Per quanto riguarda lo stoccaggio delle acque di vegetazione e delle sanse in base al Decreto Ministeriale del 6 luglio 2005 è stata vietata la miscelazione con effluenti zootecnici, agroindustriali o con i rifiuti di cui al D.Lgs n. 152/06. Il criterio guida per la fissazione da parte delle regioni del periodo di stoccaggio è quello d'impedire gli spargimenti fino a quando perdurano le piogge e fino a quando i terreni si presentano saturi d'acqua. Questo viene stabilito al fine di tutelare i corpi idrici superficiali e sotterranei.

I contenitori di stoccaggio devono quindi avere capacità sufficiente a contenere le acque di vegetazione nei periodi in cui l'impiego agricolo è impedito da motivazioni agronomiche, climatiche o da disposizioni normative; essi devono altresì essere adeguatamente impermeabilizzati mediante materiale naturale o artificiale.

1.3 RECUPERO E VALORIZZAZIONE DEI REFLUI DERIVANTI DAI FRANTOI A DUE FASI (TPOMW).

Spandimento in campo

La composizione chimica dei residui oleari, condiziona l'effetto dello spandimento diretto; per questo è necessario un attento controllo della loro composizione, per evitare l'istaurarsi di fenomeni inquinanti irreversibili. E' necessario valutare, inoltre, lo stato evolutivo e la qualità delle componenti organiche presenti in questi scarti e considerare i rischi agronomici e sanitari, se durante la preparazione dell'ammendante vengono usati prodotti ricchi di cationi metallici o di microrganismi patogeni per l'uomo (De Bertoldi, 1992). Per ridurre i rischi ambientali legati allo spandimento in campo di questi sottoprodotti, la legge 574/96 prevede l'applicazione di limiti quali e quantitativi che vengono riportati in tabella 1.

Tab. 1. Schematizzazione degli aspetti normativi sull'impiego agronomico dei reflui oleari

Riferimenti normativi	▪ decreto del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali del 6 luglio 2005 ▪ decreto legislativo n. 152 del 1999 ▪ legge n. 574 del 1996 ▪ legge n. 748 del 1984	
Limiti di accessibilità	Acque di vegetazione 50 m ³ /ha e 80 m ³ /ha per anno rispettivamente per le acque di vegetazione proveniente dai frantoi a ciclo tradizionale e frantoi a ciclo continuo.	Sanse Senza specifici limiti quantitativi se la sansa risponde ai requisiti stabiliti dalla legge 19 ottobre 1984, n.748 (ammendante semplice non compostato).
Esclusione di alcune categorie di terreno	Le acque di vegetazione e le sanse non si possono spandere su terreni: 1. Non adibiti a usi agricoli; 2. Con distanza inferiore a 10 m da corsi d'acqua e, lungo le coste, con distanza inferiore a 10 m dall'inizio dell'arenile; 3. Con pendenza superiore al 15% privi di sistemazione idraulico agraria; 4. Boschivi; 5. Con giardini, aree di suolo pubblico e aree di cava;	
Comunicazione preventiva	Comunicazione annuale, da parte del rappresentante legale del frantoio al sindaco almeno trenta giorni prima dell'inizio dello spandimento, comprendente una relazione tecnica (modelli negli allegati 1 e 2 del DM 6/07/2005).	
Stoccaggio	Acque di vegetazione • Le regioni definiscono la capacità dei contenitori di stoccaggio delle acque di vegetazione. • Il fondo e le pareti dei contenitori di stoccaggio devono essere impermeabilizzati; nel caso di contenitori in terra, gli stessi devono essere dotati di un fosso di guardia perimetrale adeguatamente dimensionato e • Le regioni individuano gli accorgimenti tecnici e gestionali atti a limitare le emissioni di odori molesti e la produzione di aerosol. • Divieto di spandimento fino a quando perdurano le piogge e i terreni sono saturi d'acqua.	Sanse ▪ Contenitori di stoccaggio capaci di contenere le sanse nei periodi in cui l'impiego agricolo è impedito da motivazioni agronomiche, climatiche o disposizioni normative. ▪ I contenitori per lo stoccaggio devono essere adeguatamente impermeabilizzati e coperti al fine di evitare fenomeni di percolazione ed infiltrazione.
Trasporto	La documentazione di trasporto deve riportare: a) estremi identificativi del frantoio e del legale rappresentante dello stesso; b) quantità delle acque trasportate; c) identificazione del mezzo di trasporto; d) estremi identificativi del destinatario e ubicazione del sito di spandimento; e) estremi della comunicazione.	
Controlli e Inosservanze	Le regioni prevedono l'adozione di sanzioni secondo la gravità delle violazioni delle norme. Il sindaco, sulla base dei risultati di controlli, può impartire specifiche prescrizioni, ivi inclusa la riduzione dei limiti di accettabilità.	

Alcuni studi hanno dimostrato che, anche se i TPOMW sono meno fitotossici delle acque di vegetazione, provocano, comunque, un forte sbilanciamento nutrizionale tale da indurre modificazioni nel ciclo dell'azoto nel suolo, conseguenza dell'alto valore del rapporto C/N (Thompson & Nogales, 1999).

Saviozzi e collaboratori (2001) nel valutare l'idoneità del TPOWM come ammendante, con l'aggiunta di azoto minerale, hanno concluso che la mineralizzazione dell'azoto dipende in gran parte dalla tipologia di suolo, in particolare il processo viene temporaneamente inibito in terreni acidi.

Dato il difficile reperimento, nei pressi dei frantoi, di suoli idonei allo spandimento in campo di questi sottoprodotti, lo spandimento avviene, in molti casi, in maniera incontrollata senza mezzi adeguati e in condizioni climatiche sfavorevoli. Per questo motivo, anche se questa pratica risulta vantaggiosa da un punto di vista economico, non sempre ha risvolti agro-ambientali positivi.

Compostaggio.

A causa della loro consistenza semisolida, i TPOMW richiedono l'aggiunta di materiale igroscopico prima di essere sottoposti al processo di compostaggio. Molti studi sono stati condotti sul co-compostaggio di questo sottoprodotto con altri scarti derivanti da attività agricole. Alcuni materiali igroscopici utilizzati sono stati paglia (Altieri et al 2011), cascami di cotone (Cegarra et al., 2000) e segatura di pioppo (Filippi et al., 2002). In tutti i casi, il prodotto finale mostrava un buon grado di umificazione, assenza di effetti fitotossici e un notevole livello di nutrienti minerali.

A differenza di altri tipi di trasformazioni biotecnologiche, come la digestione anaerobica e la fermentazione, il compostaggio è considerato una strategia sostenibile e poco costosa per il riciclaggio di questi sottoprodotti che porta ad una completa detossificazione del materiale di partenza (Roig et al., 2006).

2 COMPOSTAGGIO

2.1 PROCESSO COMPOSTAGGIO

Il compostaggio è un processo naturale e controllato di trasformazione biologica della frazione organica e inorganica della matrice, che produce un materiale stabilizzato, mineralizzato, igienizzato e fitocompatibile. Il processo avviene a carico delle comunità microbiche le cui attività metaboliche catalizzano: una parziale degradazione aerobica della sostanza organica, la trasformazione ossido-riduttiva di alcuni composti inorganici e la sintesi di nuovi composti organici stabili. La capacità dei microrganismi di utilizzare la sostanza organica dipende dalla loro capacità di produrre gli enzimi necessari per la degradazione del substrato; si hanno quindi, durante la progressiva trasformazione del materiale di partenza, modificazioni della composizione delle comunità microbiche (Tuomela et al., 2000; Vargas-García et al., 2010).

Il processo di biostabilizzazione viene di solito suddiviso in stadi temporali distinti: il periodo di attiva trasformazione (*active composting*) e il periodo di maturazione (*cooling & maturation*). Questi stadi comprendono diverse fasi del compostaggio che possono essere definite sulla base delle temperature raggiunte ed alle popolazioni di microrganismi che vi si affermano (Fig. 2).

Funghi e batteri mesofili sono dominanti nella prima fase del processo (fase mesofila) in cui la matrice di partenza è a temperatura ambiente e il pH è di solito leggermente acido. Questi microrganismi, abbattendo rapidamente le fonti di carbonio facilmente degradabili, causano un'acidificazione del pH dovuta alla liberazione di acidi organici (Beffa et al., 1996b; Beck-Friis et al., 2003). Il processo di ammonificazione, invece, comporta un aumento del pH favorendo i batteri che entrano in competizione con i funghi già durante le primissime fasi del processo.

I batteri sono, da un punto di vista metabolico, il gruppo con maggiore biodiversità rispetto a tutti gli altri organismi presenti nella matrice in trasformazione; questi possiedono un'ampia gamma di enzimi che permettono di degradare chimicamente una grande varietà di molecole organiche. Inoltre, il tempo medio di generazione dei batteri è più breve rispetto a quello dei funghi, e rappresenta, quindi, un vantaggio durante queste fasi che

sono caratterizzate da rapide variazioni del substrato disponibile e degli altri parametri di processo (temperatura, umidità, ecc.).

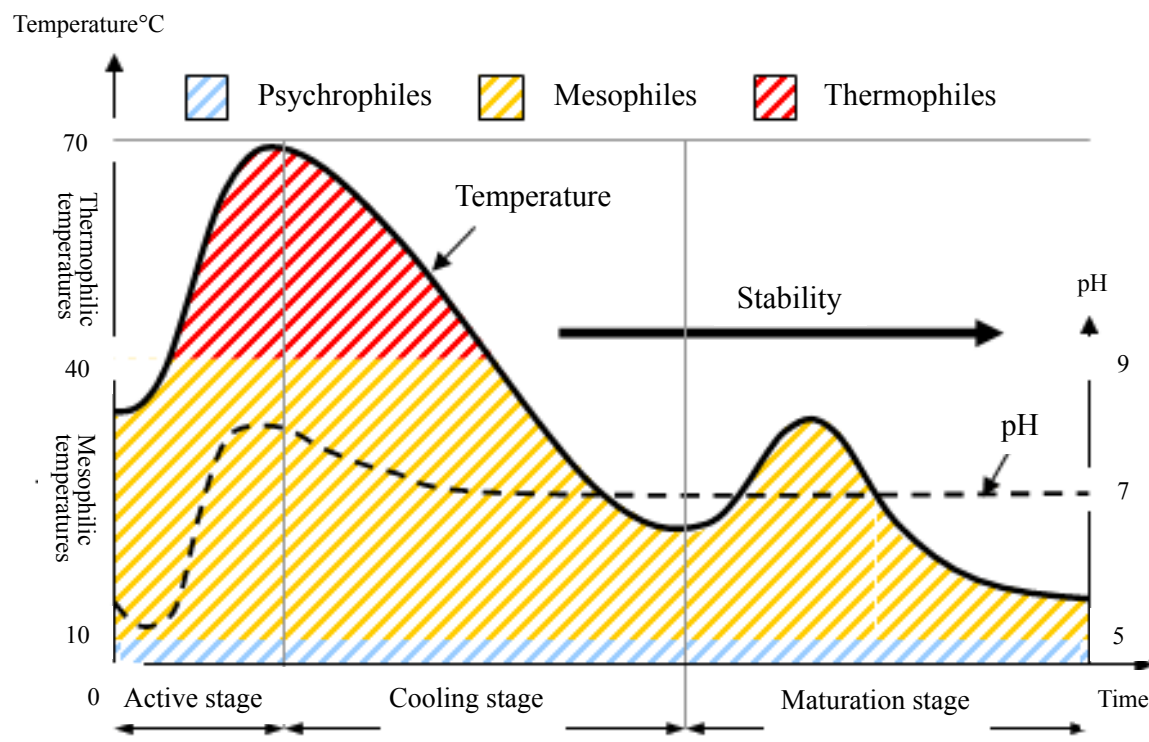


Fig. 2. Fasi del compostaggio e relativi microorganismi presenti.

Come risultato, l'abbondanza e la biodiversità batterica (compresi gli attinomiceti) sono solitamente molto più alte anche rispetto a quelle dei funghi, essendo i maggiori responsabili della decomposizione iniziale e dell'aumento della temperatura del cumulo.

A questa prima fase mesofila seguono la fase termofila e la fase di raffreddamento e maturazione.

Nella fase termofila iniziale, il numero e la diversità degli attinomiceti, dei batteri e dei funghi aumentano (Beffa et al., 1996b) fino a quando le temperature non superano i 60°C.

In genere, la capacità dei funghi nel degradare la cellulosa e la lignina è superiore a quella di attinomiceti e batteri. Sono in grado di produrre enzimi extracellulari la cui attività è favorita in presenza di bassi livelli di azoto (Huang et al 2010). La maggior parte dei funghi è mesofila e predilige temperature di 25-30°C, e un ambiente acido (Fogarty & Tuovinen, 1991), anche se spesso tollera una vasta gamma di pH (Tuomela et al., 2000).

Grazie alla loro abbondante rete ifale, possono attaccare i residui organici che sono troppo secchi, troppo acidi, o con livelli troppo bassi di azoto per la decomposizione batterica. I funghi termofili sono in genere meno tolleranti degli attinomiceti alle temperature elevate, infatti, la loro temperatura ottimale è 40-55 °C, con un massimo a 60°C. Con temperature superiori ai 60°C, i funghi vengono uccisi o rimangono, temporaneamente, presenti come spore (Ryckeboer et al., 2003; Van Gestel et al., 2003). Le alte temperature raggiunte dal cumulo (maggiori di 60°C), diventano così un fattore limitante per i funghi (Agnolucci et al., 2013) venendo, così, favorita l'attività degradativa eseguita essenzialmente da batteri termofili (Beffa et al., 1996b).

Una volta che l'attività dei microrganismi termofili cessa a causa dell'esaurimento dei substrati, la temperatura diminuisce.

In quest'ultima fase di raffreddamento e maturazione gli organismi mesofili iniziano a ricolonizzare il substrato. Il calo della temperatura, la diminuzione del contenuto d'acqua, e la capacità di attaccare e degradare polimeri naturali complessi (ad esempio cellulosa, emicellulosa, lignocellulosa, lignina) vengono così a favorire i funghi mesofili e termotolleranti durante quest'ultima fase (Breitenbach, 1998; Chamuris et al., 2000; Ryckeboer et al., 2003). Inoltre, compaiono diverse specie batteriche che sono proprie di questa fase insieme anche ad un numero elevato di specie di attinomiceti mesofili e lieviti. Gli attinomiceti riescono a colonizzare il materiale organico dopo che batteri e funghi hanno consumato le frazioni facilmente degradabili, contribuendo all'unificazione della matrice.

Al termine di questo processo, la sansa, da scarto problematico, diventa un compost di buona qualità.

2.2 APPLICAZIONI DEL COMPOST

Il compostaggio è una tecnologia consolidata, eco-compatibile ed economicamente sostenibile in grado di produrre ottimi ammendanti da matrici organiche di scarto quali, appunto, i reflui oleari (Paredes et al., 2005).

La trasformazione dello scarto in un ammendante di buona qualità offre numerosi risvolti applicativi, alcuni dei quali vengono di seguito presentati.

Spandimento in campo

L'intensificazione delle pratiche agricole comporta una diminuzione della sostanza organica e quindi una diminuzione della fertilità, nonché processi degradativi del suolo quali l'erosione e la compattazione. In questo senso, l'utilizzo di questo tipo di ammendante, ricco di sostanza organica umificata, può rappresentare non solo una fonte di nutrimento per le piante, ma anche un mezzo per il miglioramento della struttura fisica del terreno (aumento della porosità, della ritenzione idrica e della lavorabilità) e un incremento della flora microbica necessaria per la "circolazione" delle sostanze nutritive presenti, con un miglior utilizzo di elementi minerali. Il compost apporta, oltre alle sostanze nutritive anche biomassa microbica che interagendo con quella autoctona, gioca un ruolo chiave nel mantenimento delle qualità e dell'integrità dell'ecosistema.

L'impovertimento dei suoli può essere, quindi, evitato attraverso l'applicazione di queste matrici che vengono anche considerate fertilizzanti naturali (Rinaldi et al., 2003; Albuquerque et al., 2006; Altieri & Esposito, 2008).

In letteratura, numerosi sono i riferimenti ai reali effetti positivi derivanti da questo tipo di applicazione. Sperimentazioni in pieno campo condotte da Tomati e collaboratori (1996) su mais, lattuga e spinacio, dove è stato previsto l'impiego di compost da reflui oleari alle dosi di 60 t/ha e 80 t/ha, hanno dimostrato produttività comparabili a quelle ottenute nei controlli con fertilizzazione minerale standard delle piante. Senesi e collaboratori (2007) hanno riportato che il compost da reflui oleari presenta sostanze umiche simili a quelle presenti nel suolo: ciò indicherebbe che l'apporto costante di compost può incrementare la quantità e la qualità della sostanza organica del suolo.

Substrato da invasatura: sostitutivo della torba

Altra possibile applicazione del compost riguarda il suo impiego nel settore florovivaistico come sostituto della torba nei substrati da invasatura.

La torba è una risorsa non rinnovabile che si trova in giacimenti naturali, per cui molti Paesi ne limitano l'uso al fine di salvaguardare le torbiere e di contenere i costi energetici e le emissioni inquinanti nell'atmosfera dovute al trasporto dai Paesi produttori al resto del mondo. In più, l'uso della sansa compostata permetterebbe alle aziende florovivaistiche di

ottenere la prestigiosa certificazione volontaria ambientale “Ecolabel” da parte della Comunità Europea che dal 2001 ha escluso il rilascio di tale marchio di qualità ecologica per i substrati di coltivazione che contengono torba o prodotti derivati; inoltre, in base a sperimentazioni riguardanti la valutazione degli effetti della sostituzione della torba con il compost sono stati riscontrati, su piante di pomodoro, effetti benefici sulla crescita della pianta e sulla qualità dei frutti (Zaller, 2007).

Bioremediation

Un importante potenziale utilizzo del compost è quello nel biorisanamento di suoli contaminati da inquinanti organici ed inorganici (Nogales et al., 2006; Moreno et al., 2009). L’ammendamento di un suolo con compost, si presenta come una tecnologia piuttosto semplice da attuare e relativamente economica che consiste nell’apporto di nuove popolazioni microbiche presenti nel compost stesso e nella degradazione degli inquinanti, attraverso l’attivazione di microrganismi che naturalmente si trovano nel suolo inquinato. Il compost rappresenta, quindi, non solo una fonte nutritiva per la comunità microbica già presente nel terreno, ma anche un’ingente risorsa di biomassa microbica che viene incorporata nel suolo stesso (Hamdi et al., 2006; Ros et al., 2010). L’applicazione del compost in strategie di biorisanamento risulta essere efficace poiché questo ammendante contiene livelli elevati di carbonio e nutrienti altamente disponibili che stimolano il metabolismo dei microrganismi autoctoni del suolo e, di conseguenza, le attività enzimatiche che catalizzano la degradazione del contaminante.

3. INQUINAMENTO

Negli ultimi anni, l'immissione nell'ambiente di grandi quantità di prodotti chimici, organici e inorganici, provenienti da attività urbane (Simcik et al., 1999; Venkataraman et al., 2002), industriali (Ballarin-Denti et al., 1999; Lee et al., 2002; Kiem et al., 2003) e agrarie, ha portato ad un'alterazione profonda degli equilibri chimici e biologici dei suoli interessati. Molti contaminanti presenti nel suolo derivano anche dal riciclaggio di fanghi provenienti dagli impianti di depurazione di acque reflue così come dai rifiuti e dagli effluenti di allevamenti zootecnici o provenienti da vari tipi di attività terziarie.

Il fenomeno, esteso a livello europeo, fu messo bene in evidenza dagli studi effettuati da diversi gruppi di ricerca alla fine degli anni '90; indagini da cui emerse che i siti potenzialmente contaminati erano alcune centinaia di migliaia, mentre quelli sicuramente contaminati erano almeno diverse decine di migliaia ("*Contaminated Sites*" predisposto dall'ETC Soil nel 1998). Studi analitici condotti su molti siti industriali (attivi e dismessi), su aree interessate da sversamenti ed incidenti rilevanti e su aree soggette a smaltimenti abusivi di rifiuti, hanno evidenziato come questi siti e queste aree rilevino un pericoloso degrado della qualità del suolo e degli ecosistemi ad esso legati. Una compromissione tale da impedire, totalmente o parzialmente, la normale funzionalità che il suolo stesso dovrebbe svolgere, sia a livello chimico-nutrizionale sia biochimico-funzionale. L'inquinamento del suolo da parte di sostanze con caratteristiche di tossicità e mutagenicità, può inoltre rappresentare una fonte di grave pericolo per la salute umana e per gli organismi viventi in generale.

Quando le sostanze vengono rilasciate nel terreno, vanno incontro a una serie di trasformazioni chimiche, fotochimiche e biologiche tali da influenzare i fenomeni di migrazione e ripartizione tra le varie fasi del suolo stesso (gassosa, liquida e solida); processi, questi, che determinano sia l'estensione spaziale e temporale della contaminazione, sia la possibilità che i contaminanti vengano in contatto con l'uomo e con gli altri organismi viventi.

In particolare, gli inquinanti presenti nei siti con contaminazione diffusa, esibiscono spesso proprietà critiche, quali la tossicità, l'alta persistenza ambientale, alta mobilità incline alla contaminazione delle falde e, inoltre, alta lipofilità che potenzialmente può portare a fenomeni di bioaccumulo e biomagnificazione (Mackay & Fraser, 2000) (Fig. 3). La situazione appare ancora più complessa se si considera che nei siti contaminati, si è spesso in presenza di una miscela di composti, di natura e complessità diverse, le cui interazioni

possono assumere una importanza rilevante.

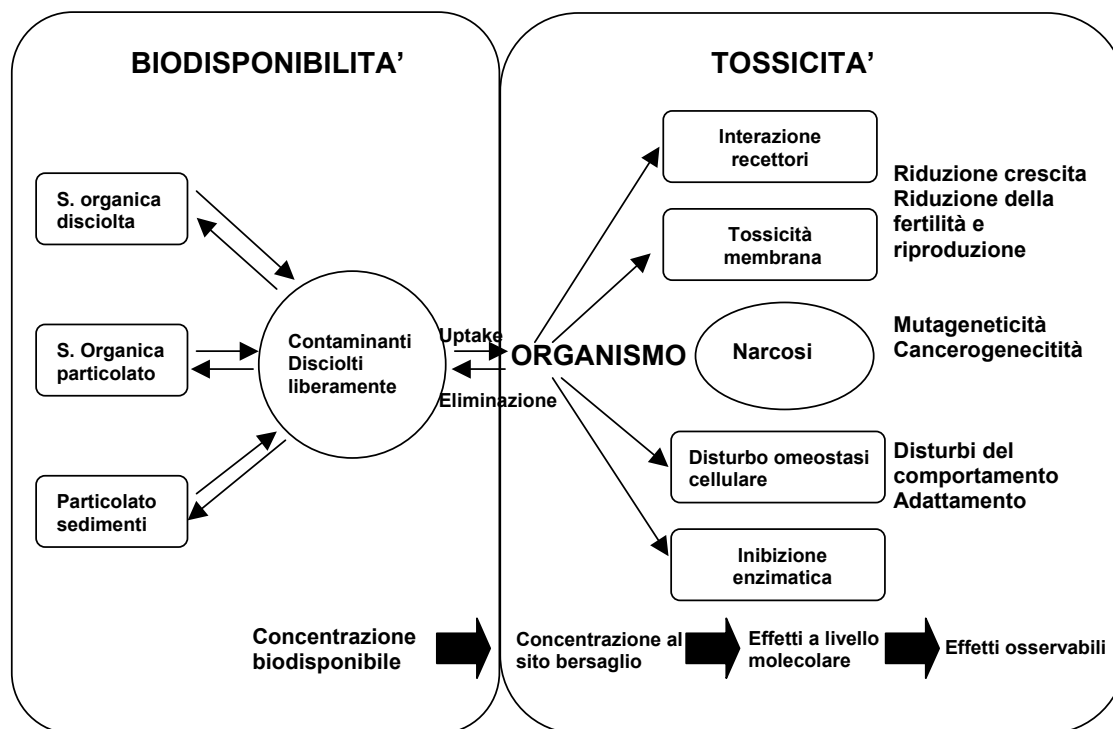


Fig. 3. Effetti ecotossicologici dipendenti dalla frazione biodisponibile dei contaminanti e la cui concentrazione finale nell'organismo induce effetti molecolari che si propagano fino a una varietà di manifestazioni tossiche negli organismi (Mackay & Fraser, 2000)

Perciò si è resa necessaria la ricerca di metodologie per il disinquinamento e il recupero di siti contaminati. Ovviamente, lo scopo di ogni strategia di decontaminazione, dovrebbe essere quello di ripristinare, nel sito trattato, livelli di qualità compatibili con la sopravvivenza degli esseri viventi, rispondendo nel frattempo a principi di economicità, facile applicabilità e bassi o nulli rischi d'impatto ambientale. Fondamentalmente sono possibili due tipi di strategie: strategie di tipo ingegneristico, basate principalmente su metodologie chimiche, fisiche e termiche e strategie biologiche (*bioremediation*), che si avvalgono di agenti biologici per la decontaminazione con il vantaggio di avere uno scarso impatto ambientale (Bollag e Bollag, 1995).

3.1 FARMACI

Negli ultimi dieci anni c'è stato un crescente interesse riguardante una classe emergente di contaminanti: i farmaci.

Questi comprendono un gruppo eterogeneo di composti terapeutici (medici e veterinari) destinati a migliorare la salute. La popolazione mondiale in espansione, la scoperta di nuovi farmaci, sono alcuni dei motivi del crescente uso di queste sostanze (Daughton, 2003).

Dopo il loro consumo ed escrezione, questi composti e i loro metaboliti raggiungono gli impianti di trattamento delle acque (WWTPs). La rimozione di molti farmaci, negli impianti, è risultata essere incompleta (Stumpf et al., 1996; Ternes, 1998; Heberer et al., 2002; Quintana e Reemtsma, 2004; Carballa et al., 2004; Ashton et al., 2004). Come risultato, residui di questi composti sono stati rilevati nelle acque superficiali in concentrazioni comprese tra il ng/L fino al livello mg/L (Stumpf et al., 1996; Ternes, 1998. Buser et al., 1999; Tixier et al., 2003; Ashton et al., 2004).

Inoltre importanti quantità di alcuni di questi composti rimangono adsorbiti sui fanghi, e questo rappresenta, per alcuni di loro, il percorso principale di rimozione (Golet et al., 2002). Per questo motivo, i fanghi diventano un altro importante veicolo per l'ingresso dei farmaci nell'ambiente (Kinney et al., 2006).

Questi fanghi, costituiscono un residuo finale del processo di depurazione e la loro applicazione in agricoltura come ammendanti, rappresenta una delle soluzioni più usate per il loro smaltimento (La Guardia et al., 2001; Ødegaard et al., 2002). La legislazione riguardante la gestione di questi scarti, infatti, pone limiti riguardanti solo metalli pesanti e agenti patogeni e più di recente sono stati inclusi anche alcuni inquinanti organici quali policlorobifenili, idrocarburi policiclici aromatici, diossine e composti alogenati, senza considerare i prodotti farmaceutici (fig. 4).

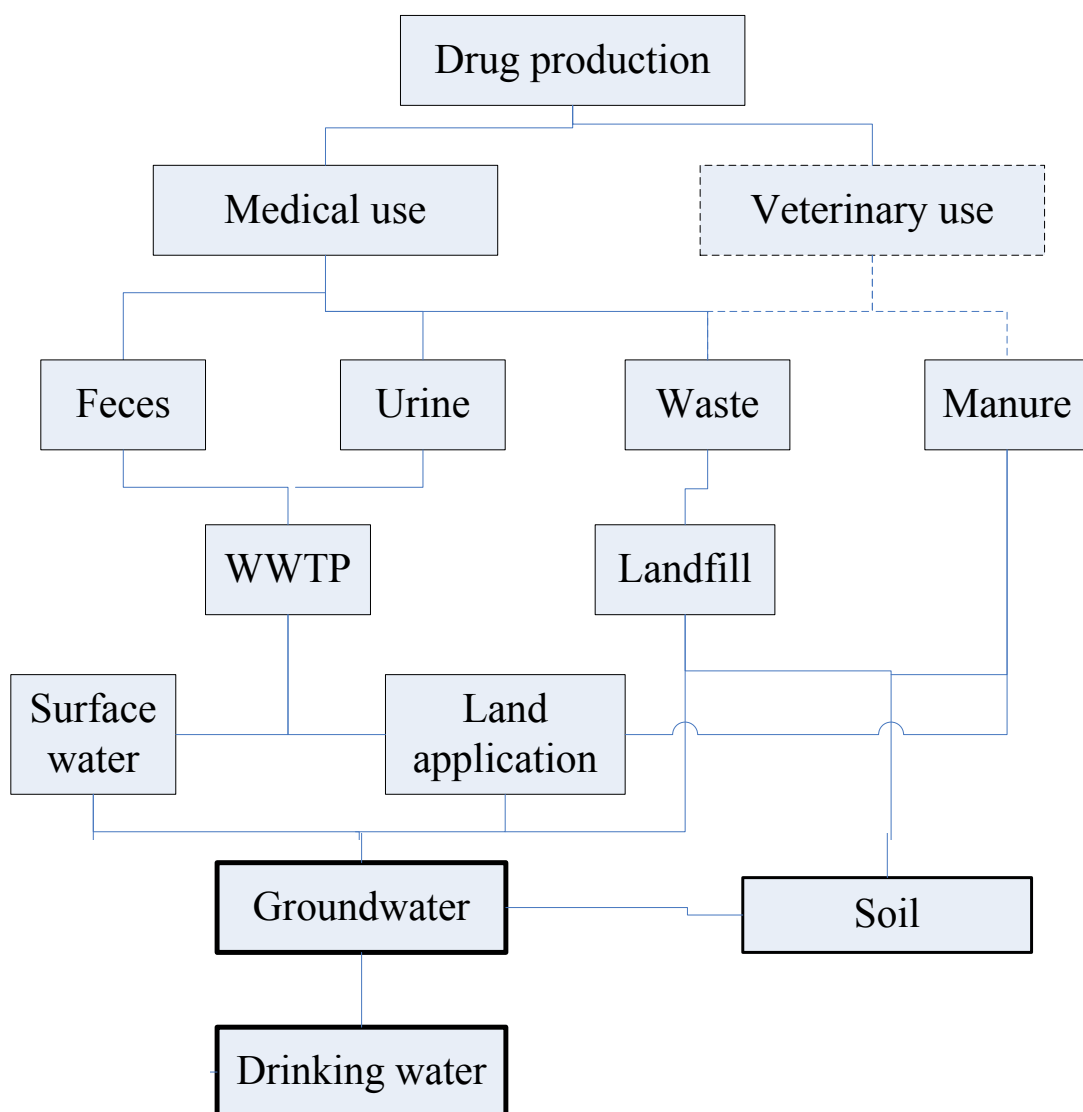


Fig. 4. Destino dei farmaci. Dalla loro assunzione al loro ritrovamento nei comparti ambientali.

Classificazione farmaci e tossicità

In genere, i farmaci sono classificati in base al loro scopo terapeutico (ad esempio, antibiotici, antinfiammatori ecc.) (Tab. 2). Una classificazione in base alla struttura chimica è meno comune, anche se potrebbe essere più utile per studiare il loro destino ambientale. Un tale sistema di classificazione consente un confronto tra sostanze con strutture strettamente connesse che potrebbero comportarsi in modo simile.

Tab. 2. Classificazione farmaci e relativi rischi.

Drug	Examples	Risk (Exposure and Toxicity)
Antibiotics	Penicillins, sulfamethoxazole	High volumes (About 23 000 tons of antibiotics/year in the U.S. ^a); concerns over toxicity and antibacterial resistance.
Painkiller	Ibuprofen, naproxen, ketoprofen	Very high prescription and over-the-counter volumes (70 million prescriptions and 30 billion over-the-counter doses sold annually in the U.S. ^b); toxicity has not been claimed.
Antiepileptics	Carbamazepine, Phenobarbital	Detected in the environment ^c ; persistent ^{c,d}
Lipid regulators	Clofibric acid, gemfibrozil	Long-term prescriptions; commonly detected ^a
β -blockers	Propranolol, metoprolol	High volumes; detected in the environment ^{e,f}
Antidepressants	Fluoxetine, risperidone	High volumes ^a ; Subject of toxicity testing
Antihistamines	Loratadine, cetirizine	Commonly held nonprescription medicine
Others	Contraceptive pills, estradiol	Associated with endocrine disruptions

a. Khetan and Collins (2007), b. Green (2001), c. Tixier et al.(2003), d. Miao et al. (2005), e. Liu and Williams (2007), f. Miege et al. (2006)

Molti studi si sono focalizzati sulla determinazione degli impatti tossicologici di questi composti per valutarne la loro minaccia per l'ambiente. Gli organismi usati per i test di tossicità sono stati molteplici: microrganismi (ad esempio, *Escherichia coli*, *Vibrio fischeri*), alghe e piante superiori (ad es *Microcystis aeruginosa*), invertebrati (ad esempio *Daphnia*) e pesci (*Oryzias latipes*) su cui si sono valutate sia tossicità acuta che cronica (Jones et al., 2001; Crane et al., 2006). I dati dei test sono soprattutto relativi alla classe degli antibiotici. Molti di questi, sono stati segnalati per avere una tossicità acuta o cronica e possono rappresentare un potenziale pericolo per la salute umana in quanto alcuni patogeni riescono a sviluppare resistenza agli antibiotici. Per esempio, levofloxacina e claritromicina testate sulle microalghe e sui crostacei hanno mostrato un'elevata tossicità

cronica (Yamashita et al., 2006). Anche gli interferenti endocrini sono un altro gruppo di sostanze che hanno ricevuto molta attenzione. Questa classe di composti ha profondi impatti ecologici in quanto mimando un ormone naturale, vanno a compromettere e bloccare i recettori per quell'ormone.

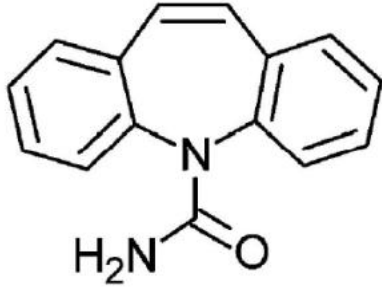
Carbamazepina

In questo lavoro di tesi l'attenzione è stata focalizzata sulla carbamazepina (CBZ), un farmaco di largo consumo, che è stato ritrovato in alte concentrazioni sia nell'ambiente, sia negli effluenti di impianti di depurazione, nonché nelle acque potabili.

La carbamazepina (5H-dibenzo[b,f]azepina-5-carbossammide) è una molecola solubile in acqua, molto stabile ai processi fotolitici e scarsamente biodegradabile. Possiede un valore di Log K_{OW} pari a 2.45 (indice di una mediocre adsorbibilità su fase solida) e tende a presentarsi in forma prevalentemente indissociata nei comparti acquatici (pKa di 0.37).

La struttura molecolare e le altre caratteristiche della carbamazepina sono riassunte nella tabella seguente (Tab.3).

Tab. 3. Sintesi delle proprietà chimico-fisiche della molecola di carbamazepina.

	Carbamazepina
Struttura	
Formula Chimica	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O
MW [g mol⁻¹]	236.3
Solubilità [mg L⁻¹]	18
Log K_{ow}	2.45
pKa	0.37

Commercializzata a partire dagli anni sessanta, la Carbamazepina è un analgesico anticonvulsivante e specifico per nevralgia del trigemino. Tale principio attivo è utilizzato come agente terapeutico per il trattamento di epilessia, nevralgia del trigemino, depressione bipolare, psicosi e manie.

Dalle ricerche bibliografiche (2001-2007) di numerose fonti analizzate nello studio di Zhang e collaboratori (2008) è riportato un consumo annuo globale di carbamazepina pari a 1014 tonnellate.

Impatto ambientale.

Da un dettagliato rapporto sulla qualità delle acque europee e americane emerge quanto segue: Su un totale di 2046 fonti di acque superficiali le concentrazioni di carbamazepina in Europa variano da livelli inferiori al limite di rilevabilità (1-30 ng/L) sino a valori massimi di 11.6 µg/L, mentre per i corpi idrici di Canada e Stati Uniti si osservano delle variazioni da alcuni ng/L sino a 1.5 µg/L (Cunningham et al., 2010).

Dati sul territorio italiano riportano, per le acque del fiume Po, livelli di carbamazepina compresi in un intervallo tra 126 e 182 ng/L per lo studio di Pojana e collaboratori (2011) e con concentrazioni di 20 ng/L.

Il suo ritrovamento nell'ambiente è dovuto alla sua scarsa biodegradabilità che può essere ipotizzata sul basso tasso di rimozione negli impianti di trattamento (<10%) in cui teoricamente si è in presenza di microrganismi che hanno una maggiore attività degradativa rispetto a quelli normalmente presenti nell'ambiente naturale (Metcalf et al., 2003; Joss, 2005; Radjenovic et al., 2007). Questo composto, ha dimostrato di essere recalcitrante sia nei bioreattori a membrana sia nei sistemi a fanghi attivati (Radjenovic et al., 2007). Inoltre, anche un aumento del tempo di ritenzione nei fanghi non ne migliora la rimozione (Bernhard et al., 2006).

Conseguenza diretta dell'inefficacia dei trattamenti subiti negli impianti, negli scarichi dai depuratori delle acque reflue, la carbamazepina è presente in concentrazioni variabili tra 500 e 3000 ng/L, mentre in acque superficiali tale intervallo si riduce tra 2 e 500 ng/L. Il farmaco viene rinvenuto anche in acque sotterranee a concentrazioni comprese tra 20 e 135 ng/L (Zhang et al., 2008) e nelle acque potabili tra 0.8 a 258 ng/L (Cunningham et al.,

2010).

Da vari studi ecotossicologici effettuati, risulta che anche se esistono bassi livelli di citotossicità (Caminada et al., 2006), viene riscontrato un potenziale rischio di fenomeni di bioaccumulo e di biomagnificazione (Andreozzi et al., 2002); inoltre Lawrence e collaboratori (2005), hanno riscontrato nei procarioti che concentrazioni di 10mg/L di carbamazepina inducono una riduzione della biomassa batterica prodotta su *biofilm* fluviale.

Biodegradazione

La carbamazepina (CBZ), è uno dei farmaci ritrovati nell'ambiente con la più alta frequenza in tutto il mondo (Zhang & Geissen, 2010b). Le sue caratteristiche chimico-fisiche lo rendono difficilmente biodegradabile. Negli impianti di trattamento delle acque reflue generalmente, il tasso di eliminazione è intorno al 10%.

Dai dati disponibili in letteratura sembrerebbe che gli organismi più idonei alla degradazione del farmaco non siano i batteri ma i funghi.

Zhou e collaboratori (2013) hanno condotto uno studio riguardante la caratterizzazione dei batteri, isolati dai fanghi attivi, capaci di degradare alcuni farmaci tra cui la carbamazepina. Mentre sono state isolate ed identificate specie capaci di degradare tutti gli altri farmaci oggetto di studio, per la carbamazepina non sono state trovate specie in grado di utilizzare questo farmaco come fonte di carbonio. Tran e collaboratori (2009) analizzando le performance degradative della comunità batterica derivante da un fango di un depuratore, hanno riscontrato una maggiore efficienza di rimozione della carbamazepina che risultava direttamente proporzionale alla quantità iniziale di ammonio presente nel mezzo di coltura. Questo probabilmente comporta una maggiore stimolazione dei fenomeni di cometabolismo. Al contrario, studi condotti su specie fungine, in particolare appartenenti alla categoria dei “*white-rot*”, hanno dimostrato la maggiore idoneità di questi microrganismi per l'abbattimento della carbamazepina.

Zhang e collaboratori (2012) in uno studio di degradazione con il fungo *Phanerochaete chrysosporium*, riporta una riduzione del farmaco intorno al 70%. Rodriguez e collaboratori (2010) testando l'attività degradativa del fungo *Tremetes versicolor* su un fango proveniente da depuratore e contaminato *ad hoc* con carbamazepina hanno riscontrato risultati simili a quelli ottenuti dall'autore sopra citato.

Le uniche informazioni riguardanti un possibile *pathway* di degradazione di questo farmaco vengono fornite da Marco-Urrea e collaboratori (2009) che studiando il meccanismo di metabolizzazione adottato da *T.versicolor* hanno dimostrato come, almeno nelle primissime fasi, la degradazione non sia a carico degli enzimi extracellulari quali laccasi e Mn perossidasi, ma del sistema intracellulare del citocromo *P450*.

3.2 IDROCARBURI

Gli idrocarburi sono sostanze diffusamente presenti in tutti i comparti ambientali, specialmente nelle aree urbane e industriali. Tale diffusione è dovuta sia al fatto che il petrolio, ed i suoi prodotti derivati, fanno oramai parte dei naturali cicli biologici e chimico-fisici, sia al loro massiccio utilizzo da parte dell'uomo come combustibile e come fonte di molecole di base per la sintesi chimica. Sono prodotti che si ottengono dalla raffinazione del petrolio attraverso il processo di distillazione frazionata (Davini et al., 2001). In Tabella 4 sono riportati i principali prodotti petroliferi in funzione delle loro componenti e della temperatura di distillazione a cui vengono prodotti.

Tab. 4. Principali prodotti petroliferi, loro componenti e temperature di distillazione.

Prodotto Petrolifero	Componenti Maggioritarie	Temperatura di Distillazione (°C)
Gas	Alcani lineari e ramificati di 1-5 atomi di carbonio	< 30
Benzina	Idrocarburi lineari e ramificati di 6-10 atomi di carbonio. Sono presenti anche cicloalcani ed alchil benzeni	30-200
Cherosene e carburanti avio	Principalmente idrocarburi di 11-13 atomi di carbonio. Sono presenti cicloalcani ed idrocarburi lineari, ramificati e aromatici monociclici	150-250
Gasoli leggeri	Idrocarburi con 13-17 atomi di carbonio, cicloalcani, olefine, aromatici con 2-3 anelli.	160-300
Gasoli pesanti ed oli lubrificanti leggeri	Idrocarburi lineari, ramificati e aromatici con 18-25 atomi di carbonio	250-350
Oli lubrificanti pesanti	Idrocarburi lineari, ramificati e aromatici con 20-30 atomi di carbonio	400-500
Asfalti	Idrocarburi policiclici pesanti (4-7 anelli) con più di 30 atomi di carbonio	> 500

Questi rappresentano i contaminanti maggiormente presenti nelle matrici ambientali e costituiscono circa i 2/3 delle cause di inquinamento (Fig. 5).

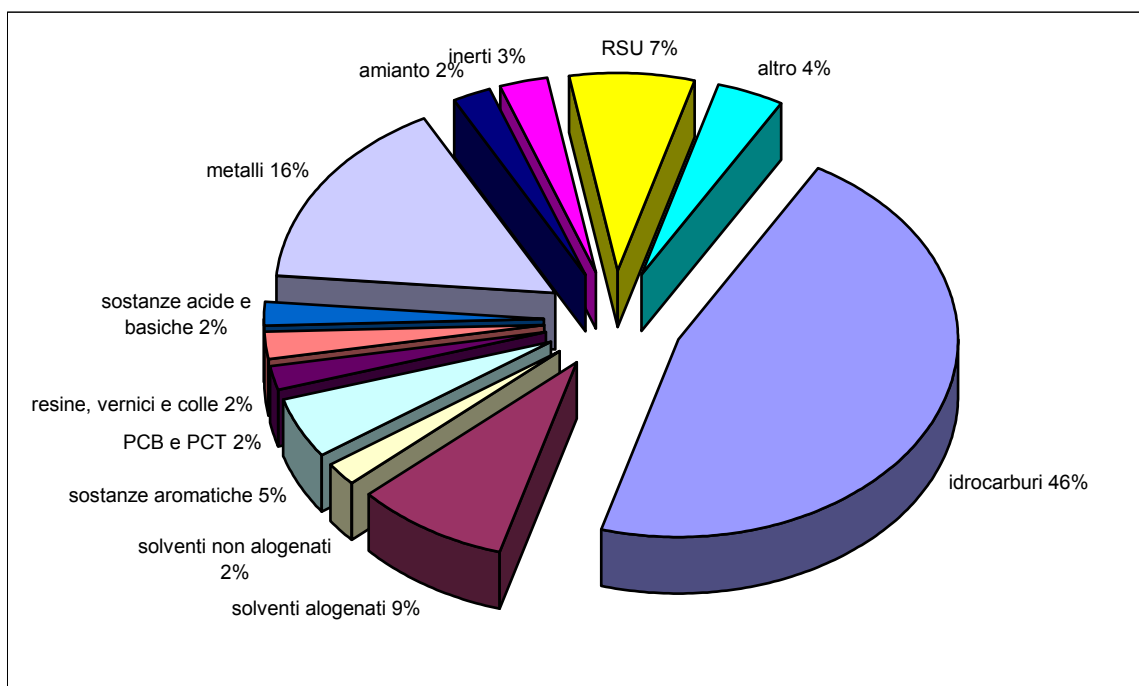


Fig. 5. Cause d'inquinamento in Italia.

Gli idrocarburi sono un insieme eterogeneo di circa un migliaio di molecole organiche naturali e di sintesi composte essenzialmente da carbonio e idrogeno, anche se possono includere eteroatomi come ossigeno zolfo azoto alogeni o metalli (Whyte et al., 1999).

In funzione della loro struttura vengono suddivisi in:

- Idrocarburi alifatici. Classe di sostanze organiche lineari, ramificate o cicliche e sature o insature, composte da carbonio ed idrogeno, nel caso dei derivati alogenati, alogeni. Sono molecole a basso o medio peso molecolare e tendono a trovarsi allo stato gassoso o liquido, in funzione della tensione di vapore e del punto di ebollizione che hanno.
- Idrocarburi aromatici. Classe eterogenea di molecole organiche naturali e di sintesi, costituiti da uno a sette anelli aromatici condensati. Sono sostanze presenti in natura allo stato liquido e solido. Presentano una ridotta solubilità e un'elevata tensione di vapore e possono avere reazioni di sostituzione con composti alogenati

e presentare gruppi alchilici laterali. Tra essi vengono ricordati gli idrocarburi monoaromatici, i BTEXS (Benzene, Toluene, Etilbenzene, Xileni, Stirene), e gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA);

- Idrocarburi eteroatomici. Sono particolari molecole che contengono uno o più atomi diversi da carbonio, idrogeno e alogeni.
- Asfalteni e metallorganici. Gruppo di sostanze organiche ad elevato peso molecolare ed altamente idrofobiche, che possono avere legate a se metalli di transizione.

Nella valutazione di un fenomeno d'inquinamento da prodotti petroliferi non si può seguire la sorte di ogni singolo componente e perciò, oltre a ricercare il dato complessivo "Idrocarburi Totali" o (TPH, *Total Petroleum Hydrocarbons*), ci si concentra su un certo numero di contaminanti indicatori, che risultano rappresentativi delle proprietà chimico-fisico e tossicologiche delle varie classi idrocarburiche. Per i prodotti più leggeri come le benzine, sono utilizzati i BTEXS, per i composti più pesanti come gli oli lubrificanti, vengono usati gli IPA, mentre nel caso in cui i contaminanti siano di peso intermedio come per i gasoli, sono considerati sia i BTEXS sia gli IPA (Ronchi, 2002).

Per tali sostanze rappresentative, vi sono in letteratura, innumerevoli studi di tossicità, sia di tipo acuto, sia cronico. Le sostanze a basso peso molecolare, con una minor idrofobicità e bassa tensione di vapore, rappresentano un pericolo a carico dell'apparato respiratorio dove manifestano effetti di elevata tossicità acuta sulle mucose (p.e. ustioni chimiche); non hanno ne azione mutagena, ne effetti cancerogeni. Le sostanze a medio-alto peso molecolare, caratterizzati da un'elevata, idrofobicità e tensione di vapore, inducono sia effetti acuti sia cronici sulle zone colpite (per contatto o ingestione) e, per le sostanze aromatiche, sia mono sia poli-cicliche, si ha la certezza di una loro azione mutagena, carcinogena e genotossica.

Impatto ambientale.

Gli idrocarburi sono sostanze immiscibili con l'acqua e per questo vengono chiamati *Non-Aqueous Phase Liquids* (NAPLs). La migrazione di questi composti nei vari comparti

ambientali viene condizionata anche dalla loro densità; in funzione di questa vengono distinti due classi di composti:

1. *Light Non-Aqueous Phase Liquids* (LNAPLs). Sono caratterizzati dall'aver una densità inferiore dell'acqua. A questa classe appartengono la maggior parte dei prodotti petroliferi come benzine, carburanti avio, cherosene e gasolio da autotrazione.
2. *Dense Non-Aqueous Phase Liquids* (DNAPLs). Sono caratterizzati da una densità maggiore rispetto all'acqua e ne fanno parte oli combustibili ed asfalteni (Mariotti e Merlo, 2003).

Quando sono rilasciati nel suolo, i NAPLs si muovono attraverso della zona insatura, restando in parte adesi alle particelle del suolo (saturazione residua). Proseguendo nella loro migrazione, essi arrivano nella zona satura e, in vicinanza della frangia capillare, i LNAPLs si espandono orizzontalmente, con una minima penetrazione al di sotto del livello di falda, e vengono trascinati da essa lungo la direzione di deflusso di falda. I DNAPLs invece penetrano nella falda sino a raggiungere lo strato impermeabile che la delimita (Kremesec, 2005). Data la loro scarsa solubilità in acqua, essi si trovano negli ambienti acquatici essenzialmente nei sedimenti nei quali vengono immobilizzati ed accumulati. Vanno così a costituire una riserva inquinante che, tramite un continuo e lento rilascio, determina, nelle acque superficiali e del sottosuolo, una cronica presenza di idrocarburi pesanti.

Nel tempo, la composizione della fase idrocarburica cambia continuamente: ogni specie chimica si ripartisce, infatti, tra le fasi del sistema, in funzione dei coefficienti di ripartizione dettati da leggi termodinamiche e muovendosi tra esse. Il contatto con la falda e l'accumulo per infiltrazione degli inquinanti, causano una lenta e continua dissoluzione di alcuni costituenti chimici della massa idrocarburica nell'acqua; i costituenti volatili possono muoversi nella fase gassosa interstiziale e quindi liberarsi nell'atmosfera, mentre gli idrocarburi trattenuti dal suolo tendono ad accumularsi. A causa di questo complesso insieme di processi chimico-fisici, nel tempo i NAPLs di partenza si arricchiscono di componenti meno solubili e volatili, cioè delle frazioni più pesanti, che risultano più difficili da trattare.

Biodegradazione

L'esteso inquinamento derivato dai prodotti petroliferi, ne ha determinato la loro presenza in tutti i comparti ambientali. Il processo evolutivo ha portato alcuni microrganismi a sviluppare dei sistemi enzimatici adatti a degradarli ed utilizzarli come substrato di crescita: oggi tali microrganismi risultano essi stessi ubiquitari (Smith & Hinchee 1993).

Nel corso degli anni, un numero sempre maggiore di autori (Atlas e Bartha, 1997; Juck et al., 2000; Bundy et al., 2002) ha studiato l'effetto della contaminazione da idrocarburi sulla comunità microbica dimostrandone il ruolo chiave durante la metabolizzazione delle sostanze organiche sia nel terreno sia nelle acque sotterranee.

In suoli o acque contaminate da composti derivati dal petrolio sono state individuate numerose popolazioni microbiche appartenenti a diversi generi (Sarkhoh et al., 1999). La degradazione del petrolio e dei suoi derivati sembra coinvolgere microrganismi sia eucarioti che procarioti, tra cui ricordiamo *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Candida* e *Sporobolomyces* (Atlas, 1981; Sarkhoh et al., 1990).

Un importante fattore che condiziona la biodegradazione d'inquinanti organici è rappresentato dal potenziale di ossido-riduzione che si stabilisce nella matrice contaminata. Nella maggior parte dei casi, soprattutto in presenza di idrocarburi, il metabolismo microbico ossidativo (quello cioè che impiega l'ossigeno come accettore finale di elettroni) si è rivelato il più efficiente per la degradazione. In carenza di ossigeno, è fondamentale l'azione svolta dai microrganismi anaerobi che si sono dimostrati in grado, quantomeno, di trasformare le sostanze inquinanti in modo tale da renderle più suscettibili al successivo attacco per via ossidativa.

I processi di biodegradazione in condizioni anaerobiche, sono più lenti e la maggior parte dei meccanismi biochimici non sono stati ancora descritti (Meckenstock & Mouttaki, 2011). Recentemente, comunque, sono stati proposti nuovi percorsi di biodegradazione anaerobica da parte dei batteri solfato-riduttori per il fluorene e fenantrene (Tsai et al., 2009). Ad oggi i processi aerobici di metabolizzazione degli idrocarburi alifatici e aromatici (fino a tre anelli) sono stati ben caratterizzati. In presenza di ossigeno, sia nei funghi che nei batteri, le reazioni chiave sono catalizzate dalle ossigenasi che agiscono incorporando atomi di ossigeno, dall'ossigeno molecolare (O₂), al substrato. Le monoossigenasi permettono l'incorporazione di un singolo atomo di ossigeno, mentre

l'altro viene ridotto ad acqua. Le diossigenasi, invece, incorporano entrambi gli atomi di ossigeno. Pertanto, in condizione aerobie l'ossigeno richiesto dai microrganismi viene utilizzato sia per l'ossidazione iniziale del substrato, sia come accettore finale di elettroni della catena respiratoria.

Degradazione degli alcani

In una miscela idrocarburica, gli N-alcani sono i composti alifatici che vengono degradati più rapidamente (Atlas, 1981). Sia nei funghi e nei batteri, il passaggio chiave nella biodegradazione di questa tipologia d'idrocarburi è la monossigenazione iniziale della catena idrocarburica. A seconda della posizione in cui si verifica tale ossidazione, vengono descritte tre differenti vie metaboliche (Figura 6).

Nella via principale, l'ossidazione terminale della molecola, per formare un gruppo alcolico, è seguita da una seconda ossidazione con conseguente formazione di un gruppo aldeidico e una terza ossigenazione che porta alla formazione dell'acido grasso corrispondente. Questi acidi grassi possono essere incorporati nel metabolismo centrale tramite β -ossidazione, dove vengono generati altri acidi grassi a catena più corta. Gli N-alcani da C10-C20 sono i più facilmente biodegradabili, ma con l'aumento del peso molecolare, diminuisce la solubilità in acqua e quindi diventano più persistenti (Watkinson & Morgan, 1990; Kremer & Anke, 1997).

A parità di numero di atomi di carbonio, gli alcani ramificati, come gli isoprenoidi, hanno una biodegradabilità inferiore (Alexander, 1999), come anche i cicloalcani (Trower et al., 1985). I complessi coinvolti nella degradazione, possono prevedere il coinvolgimento di enzimi extracellulari o sistemi enzimatici interni.

Anche se bene descritto il meccanismo d'azione degli enzimi extracellulari prodotti dai "white-rot" durante la degradazione degli anelli aromatici, si hanno poche informazioni sul loro meccanismo d'azione, durante la degradazione dei composti alifatici. Infine, sia negli eucarioti che nei procarioti, anche gli enzimi del complesso citocromo P450 possono svolgere un ruolo importante nella degradazione d'idrocarburi alifatici (van Beilen & Funhoff, 2005). Un esempio, molto ben studiato, effettuato su una specie di *Candida*, è l'assimilazione degli alcani relazionata all'attività del citocromo P450; il sistema monossigenasico richiesto, comprende diversi enzimi del citocromo P450 che vengono indotti dagli alcani (Seghezzi et al 1991; Scheller et al 1996).

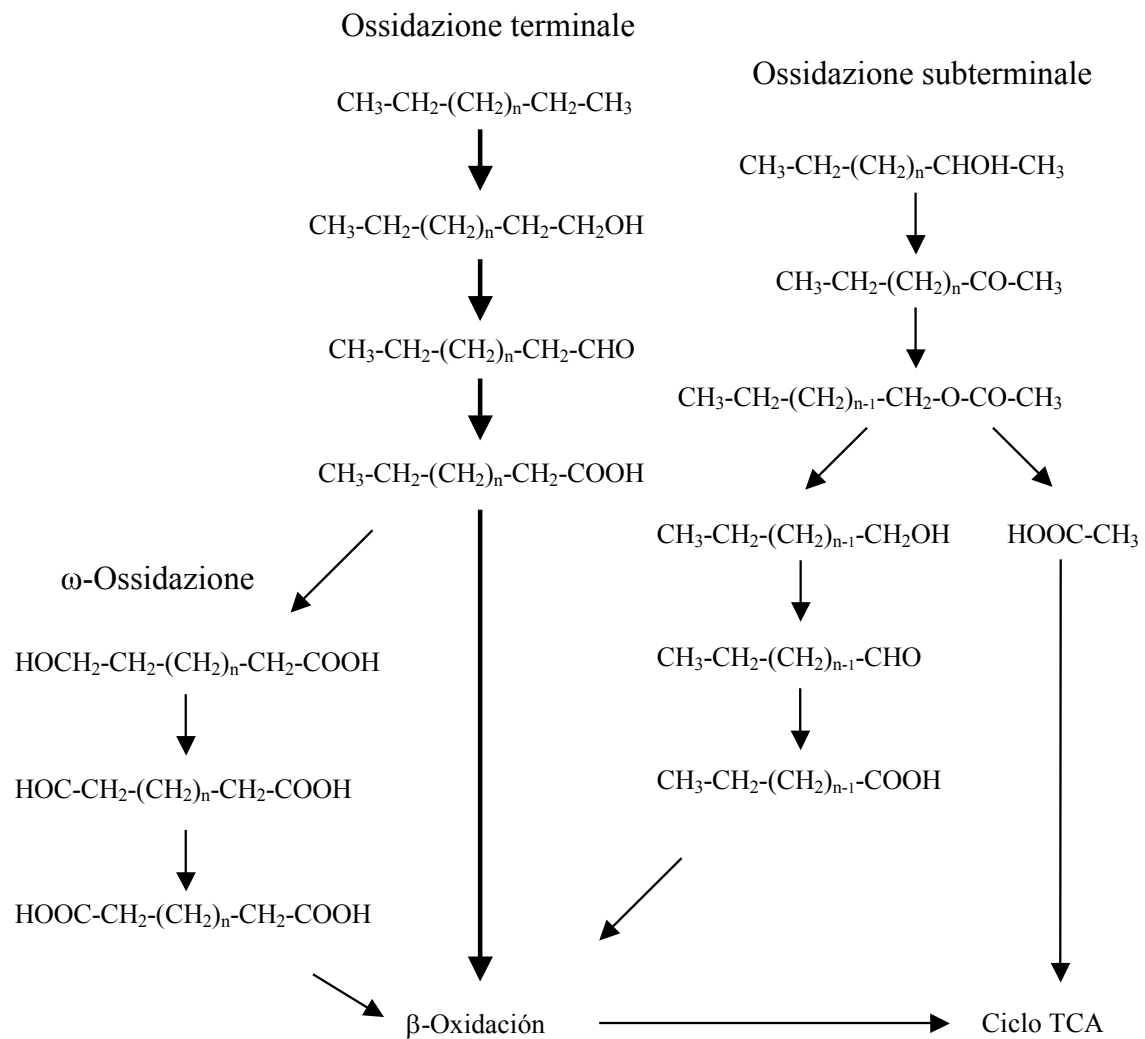


Fig. 6. Vie di degradazione microbica degli n-alcani (Van Beilen & Witholt, 2003).

4. BIORISANAMENTO

Il biorisanamento (*Bioremediation*) è un processo che prevede la rimozione del contaminante attraverso la stimolazione delle capacità cataboliche dei microrganismi eterotrofi aerobi e anaerobi responsabili della degradazione dell'inquinante. I microrganismi adsorbiti sulle particelle della matrice contaminata sono potenzialmente in grado di utilizzare lo xenobiotico come fonte di nutrienti; possono utilizzare la fonte di carbonio dal contaminante organico ed usarne gli elettroni, forniti dallo stesso, per ricavarne energia.

La biodegradazione delle molecole organiche può essere rappresentata da reazioni di ossidoriduzione, catalizzate dagli enzimi prodotti dai microrganismi. L'intero processo è finalizzato al trasferimento di uno o più elettroni da composti ad alta energia (donatori di elettroni, che vengono, quindi, ossidati), a composti a minor energia, (accettori di elettroni, che vengono, quindi, ridotti), con immagazzinamento finale di energia nelle molecole di ATP.

Esistono due categorie di trasformazioni: nella prima, la biodegradazione fornisce carbonio ed energia per supportare la crescita cellulare; i processi sono perciò "crescita-collegati". Nella seconda, la biodegradazione non è legata alla moltiplicazione cellulare e tutto, o quasi tutto, il carbonio viene mineralizzato, ovvero trasformato completamente in forme inorganiche (p. es., anidride carbonica) oppure in composti ricchi di energia (p. es., metano), e non accumulato in biomassa.

4.1 ASPETTI MICROBIOLOGICI DEL BIORISANAMENTO

I microrganismi, per la loro biodiversità e per le loro grandi potenzialità cataboliche, vengono sfruttati per la degradazione di inquinanti tossici. Le diverse attività cataboliche sono dovute alla presenza di geni catabolici ed enzimi (Van der Geize & Dijkhuizen 2004; de Carvalho & da Fonseca 2005; Khomenkov et al., 2008). Inoltre, i microorganismi possiedono altre strategie di adattamento, come la possibilità di modificare la membrana cellulare per mantenere le funzioni biologiche necessarie (Isken & de Bont 1998; de Carvalho et al., 2009), la produzione di composti tensioattivi come biosurfattanti (Ron & Rosenberg, 2002) e l'uso di pompe di efflusso per diminuire la concentrazione di composti tossici all'interno delle cellule (Isken & de Bont 1998; Van Hamme et al., 2003).

Tutti questi meccanismi e le capacità metaboliche dei microrganismi, li rendono uno strumento interessante per il ripristino di siti contaminati.

Per la maggior parte, sono i funghi e i batteri, gli organismi in grado di metabolizzare gli xenobiotici:

- ❖ I funghi svolgono un ruolo importante nella decomposizione di polimeri organici semplici e complessi (come la cellulosa e la lignina); alcuni funghi sono capaci di degradare il contaminante grazie alla produzione di enzimi extracellulari aspecifici che possono attaccare la molecola inquinante di partenza (Cerniglia, 1997), non accessibile per esempio ai batteri, portando alla formazione di un altro composto disponibile per altre classi di organismi che ne garantiscono una completa mineralizzazione.

- ❖ I batteri possiedono una capacità che viene negata a tutte le altre forme viventi, quella di poter colonizzare qualsiasi ambiente naturale. Questa loro capacità di sopravvivere in ambienti tanto diversi, è dovuta all'enorme biodiversità del mondo batterico e a quella che viene definita "plasticità metabolica". Per plasticità metabolica s'intende la capacità di adattarsi a qualsiasi condizione ambientale, anche la più impervia. Un'ulteriore prova di questa loro caratteristica straordinaria, che si lega al problema del disinquinamento ambientale, è l'esistenza di specie batteriche capaci di utilizzare, per la loro crescita, sostanze che risultano tossiche per gli altri esseri viventi.

E' importante sottolineare che durante la degradazione di un contaminante, comunque, i microrganismi cooperano tra loro in un processo metabolico integrato, principalmente per due motivi:

1. La metabolizzazione anche di una singola molecola può richiedere diversi passaggi per ognuno dei quali è necessario uno specifico enzima.

2. Non esiste un microrganismo capace di degradare completamente una o più molecole specifiche diverse.

Il risultato finale sarà la rimozione del contaminante dal sito d'interesse, grazie all'intervento di un consorzio microbico, in cui ogni popolazione interviene ad un preciso *step* del *pathway* degradativo della sostanza.

Successione ecologica di un sito contaminato.

La comunità presente nel sito contaminato, esplica la sua attività attraverso una sequenza di eventi che porta ad una continua trasformazione delle molecole e della microflora presente, per cui ogni fase è diversa dalla precedente e dalla successiva.

In seguito al fenomeno dell'inquinamento di una matrice, sia questa, suolo o falda sotterranea, si possono osservare importanti cambiamenti nelle popolazioni microbiche e gli equilibri in esse esistenti vengono profondamente perturbati: i generi e le specie più sensibili rapidamente scompaiono, altri perdono la capacità di riprodursi o assumono condizioni di vita latente.

In forma attiva, sopravvivono solo gli organismi per i quali il contaminante non rappresenta un substrato tossico o, spesso, solo una fonte di C. Per questi consorzi microbici, si vengono a creare condizioni molto favorevoli per il loro sviluppo poiché hanno accesso ad una grande quantità di nutrienti che porta quindi ad una diminuzione della competizione.

L'attività metabolica degli organismi, per i quali il contaminante rappresenta la fonte di carbonio, porta ad un aumento della biomassa microbica e una progressiva diminuzione della concentrazione dell'inquinante, con conseguente calo degli effetti tossici da esso esercitati sull'ecosistema. Questa situazione permette che si riformino le condizioni per cui almeno un gruppo di predatori possa moltiplicarsi a scapito dei degradatori dell'inquinante. Il ristabilirsi dell'equilibrio preda-predatore e l'aumento della biomassa microbica portano indirettamente a fornire materiale nutritivo (rappresentato da cellule morte) riconosciuto come tale da tutti i gruppi trofici. Il risultato finale di una successione ecologica è il

ripristino di una comunità molto simile a quella presente nel sito prima dell'evento contaminazione.

4.2 TECNICHE DI BIORISANAMENTO.

Fino a relativamente pochi anni fa, nel descrivere i possibili trattamenti di risanamento di suoli contaminati, i processi biologici erano citati solo marginalmente, come tecnologie adatte a pochi casi particolari. Oggi, per alcuni tipi di contaminazione, e grazie alla possibilità di ottenere un terreno biologicamente vivo in tempi accettabili e con costi sensibilmente inferiori rispetto a quelli necessari per l'applicazione di altre tecniche, si è sviluppato un considerevole interesse nei confronti della loro applicazione.

Il risanamento biologico (biorisanamento o *bioremediation*) di siti inquinati sta quindi acquisendo un crescente interesse poiché l'impiego di microrganismi si è rivelato vantaggioso sia da un punto di vista tecnico che economico (Šašek et al., 1993). La *bioremediation* rappresenta un'alternativa alle tecnologie convenzionali (chimiche e fisiche) di bonifica e la ricerca in questo settore è in continua espansione in tutto il mondo.

L'assioma fondamentale che sta alla base del concetto di *bioremediation* è che i microrganismi, adattandosi all'ambiente, hanno acquisito nel tempo la capacità di decomporre i composti chimici comunemente reperibili nel loro habitat. Hanno quindi evoluto i propri complessi enzimatici, responsabili della biodegradazione delle specie contaminanti, in funzione della disponibilità di substrati nutritivi. In questo modo hanno acquisito anche la capacità di degradare le specie xenobiotiche ossia le sostanze di sintesi prodotte dall'uomo.

In funzione del luogo in cui avverrà il trattamento della matrice contaminata, le strategie di biorisanamento vengono distinte in: *in situ* ed *ex situ*.

Nel processo *in-situ*, area contaminata e luogo di trattamento coincidono, contrariamente alla tecnica *ex-situ* nella quale il materiale contaminato viene rimosso e trattato altrove.

Trattamenti di biorisanamento in situ

I trattamenti di biorisanamento *in situ* hanno come scopo quello di stimolare l'attività degradativa della flora microbica indigena così da aumentare l'efficienza e la velocità di rimozione del contaminante rispetto a quelle ottenibili senza interventi.

Per migliorare il processo di biorisanamento, oltre alla necessaria presenza di una comunità microbica competente, in grado di degradare il contaminante, devono essere presi in

considerazione anche altri parametri come, ad esempio, acqua, ossigeno, e fonti di azoto e fosforo (Rosenberg et al., 1992). La mancanza delle condizioni ottimali di anche solo uno di questi parametri potrebbe rendere il risanamento, in condizioni naturali, inefficiente. L'applicazione di strategie che prevedono l'aggiunta di microrganismi, *bioaugmentation*, o l'aggiunta di nutrienti, *biostimulation*, garantisce un'accelerazione dei processi naturali di detossificazione della matrice contaminata. (Pritchard et al., 1992; Atlas, 1995; Jimenez et al., 2006).

Bioaugmentation

La *Bioaugmentation* consiste nell'arricchire una matrice inquinata con popolazioni microbiche altamente specializzate (singoli ceppi o consorzi) capaci di degradare il contaminante d'interesse (Leahy & Colwell 1990; Gentry et al., 2004). Questa tecnica è più adatta ai siti caratterizzati da una ridotta flora microbica endogena o caratterizzati da una comunità autoctona che non possiede le vie metaboliche necessarie a metabolizzare il contaminante.

I microrganismi inoculati possono essere selezionati sia dalla fonte stessa da bonificare, sia da materiali provenienti da siti diversi (inoculi alloctoni). I microrganismi selezionati vengono messi in coltura per la loro proliferazione; questi, una volta introdotti nella matrice, consumeranno selettivamente i composti inquinanti in presenza di ossigeno e di altri elementi nutrienti, convertendoli in anidride carbonica, in acqua ed in biomassa microbica. Condizione necessaria per la riuscita di questa strategia è che i microrganismi introdotti devono rimanere vitali e competere con gli organismi già esistenti nel sistema (Top et al., 2002; Teng et al., 2010).

Tra gli interventi di *bioaugmentation*, particolare attenzione va dedicata al micorisanamento, un trattamento biologico basato sull'utilizzo di funghi, soprattutto appartenenti alla classe dei “*white-rot*” fung. Questi funghi, infatti, si sono dimostrati particolarmente abili nel degradare e mineralizzare molti contaminanti organici, quali oli ed affini, prodotti petroliferi, clorofenoli e idrocarburi policiclici aromatici (Alexander, 1994; Juhasz & Naidu, 2000; Federici et al., 2012). I funghi filamentosi hanno delle peculiarità che li distinguono dai batteri dal punto di vista della possibile applicabilità a suoli inquinati e alla rimozione dei contaminanti. I “*white-rot*” sono dotati di un *set* di enzimi extracellulari aspecifici, tra cui varie perossidasi, attraverso i quali possono

degradare molti xenobiotici non accessibili agli enzimi substrato-specifici dei batteri.

Biostimulation

La *biostimulation*, invece, comporta l'identificazione e la regolazione di quei fattori come per esempio i nutrienti, che possono condizionare il tasso di biodegradazione dei contaminanti da parte del microbiota presente nel sito d'interesse (Swannell et al., 1996).

Lo scopo, infatti, è di aumentare il potenziale degradativo intrinseco di una matrice inquinata attraverso il controllo di tutti quei fattori che possono risultare limitanti per l'attività degradativa dei microrganismi. Nonostante la diversità delle popolazioni microbiche indigene mostri, apparentemente, il potenziale per la rimozione del contaminante, alcuni fattori possono inibire o ritardare la bonifica. La mancata degradazione del contaminante può essere imputata, per esempio, alla mancanza di accettori di elettroni o donatori, alla bassa disponibilità di azoto e fosforo, o alla mancanza di stimolazione delle vie metaboliche responsabili della degradazione. E' in questo contesto che va ad agire la biostimolazione. L'apporto di accettori e donatori di elettroni (Scow & Hicks, 2005) e l'introduzione di adeguate quantità di acqua, nutrienti e ossigeno nel terreno garantiscono il miglioramento dell'attività degradativa delle comunità microbiche indigene (Couto et al., 2010) e possono promuovere il co-metabolismo (de Lorenzo, 2008). In questi casi, l'introduzione di nutrienti esogeni può migliorare la degradazione dei materiali tossici.

La sua efficienza è stata testata su un'ampia varietà di xenobiotici (Kadian et al., 2008). Oltre a fornire nutrienti, un'altra strategia valida è la bioventilazione o *biosparging*. Questa mira a stimolare ed ottimizzare i processi spontanei di biodegradazione aerobica, con l'apporto di aria e ossigeno ai microrganismi autoctoni della zona insatura del terreno. Nel caso in cui l'insufflazione di aria sia effettuata nello strato saturo, la tecnologia è conosciuta come *biosparging*. L'obiettivo di questa tecnica non è la volatilizzazione dei contaminanti, ma l'ottimizzazione dei processi di biodegradazione aerobica dei composti organici nei quali l'ossigeno funge da accettore finale di elettroni.

Tutti i composti biodegradabili in condizioni aerobiche possono essere potenzialmente rimossi mediante l'applicazione di questa tecnica. Uno dei parametri più significativi per l'individuazione dei composti adatti ad essere trattati mediante tale tecnica è la volatilità.

In generale, composti con bassa pressione di vapore ($<10^{-3}$ atm) non possono essere rimossi facilmente per volatilizzazione, ma possono essere biodegradati aerobicamente; composti con pressione di vapore superiore ad 1 atm volatilizzano troppo rapidamente per poter essere degradati.

Questa tecnologia di bonifica è generalmente utilizzata per composti petroliferi e idrocarburi (benzina, oli combustibili, oli lubrificanti, gasolio, IPA), composti organici alogenati (PCB, cloruro di metilene, cloruro di vinile, tricloroetilene) e altri composti organici (fenoli, pentaclorofenoli, chetoni, alcoli).

Le principali caratteristiche che condizionano l'applicabilità della bioventilazione *in situ* sono le proprietà del suolo, le caratteristiche dei contaminanti e della flora microbica e i parametri ambientali che ne influenzano l'attività.

Trattamenti di biorisanamento ex situ

Tali trattamenti comportano la rimozione del terreno contaminato che in seguito viene trattato biologicamente *on site* (se trattato in loco) oppure *off site* (se l'impianto è localizzato altrove).

Il vantaggio dell'applicazione di queste tecniche è che i parametri di processo, durante la decontaminazione, vengono controllati e monitorati al fine di garantire il mantenimento delle condizioni ottimali che favoriscono l'attività metabolica dei microrganismi.

Le tecniche principalmente impiegate possono essere descritte come segue.

Bioreattori

Vengono classificati in:

- *reattori in fase semisolida (slurry)*, operanti con sospensioni di suolo in acqua al 10-40% in peso.
- *reattori in fase solida (dry matter reactor)* operanti con suolo insaturo con un contenuto d'acqua compreso nell'intervallo 10-20%.

I bioreattori trovano applicazione nella rimozione di composti recalcitranti e nei casi urgenti di decontaminazione. Il loro utilizzo consente di massimizzare la velocità e la resa in *bioremediation* di un terreno contaminato poiché permettono il controllo e la gestione

dei principali parametri di processo, un elevato grado di miscelazione e di omogeneità all'interno della matrice, la possibilità di introdurre microrganismi esogeni specializzati ed eventuali tensioattivi e non ultima, la capacità di monitorare la produzione e di contenere eventuali metaboliti della degradazione degli inquinanti.

In base alla loro modalità di carico e scarico, i reattori possono essere di tipo *batch* o continui. Nei primi, non essendo presenti correnti in entrata, si ha un controllo di processo più efficace, ma tempi di trattamento più lunghi e stoccaggi di grandi quantità di materiale. Nei secondi si ha possibilità di trattare maggiori quantità di matrice contaminata, ma risultano difficilmente controllabili nel tempo, a causa dei parametri variabili delle correnti in entrata. Se necessario, nei reattori, si possono creare condizioni anaerobiche per facilitare la degradazione degli inquinanti da parte delle popolazioni microbiche anaerobiche; inoltre la digestione anaerobica di suoli inquinati da materiale organico porta alla produzione di biogas, composto da CH₄, CO₂, H₂O e H₂S e, potenzialmente, utilizzabile come combustibile (Khan et al., 2004).

Land farming

Il *Land farming* è una tecnologia che prevede la disposizione di strati di suolo contaminato su una superficie impermeabile e l'attuazione di procedure idonee a creare e mantenere le condizioni ottimali per lo sviluppo dei microrganismi. Durante il processo devono essere assicurati: il corretto apporto di nutrienti (carbonio, azoto e fosforo), l'apporto di ossigeno alle popolazioni microbiche attraverso il rivoltamento del materiale o aggiunta di materiali ("*bulking agents*") atti a facilitare il passaggio dell'aria e dei gas prodotti durante il metabolismo microbico, e infine un tenore di umidità e pH ideali per i processi naturali (Hejazi et al., 2003; McCarthy, 2004).

In molti casi durante la preparazione del suolo per il *land farming*, viene prevista l'aggiunta di compost che funge sia da "*bulking agent*" che da fonte di nutrienti e da inoculo di una comunità microbica potenzialmente in grado di utilizzare il contaminante come fonte di carbonio.

Compostaggio

Il compostaggio prevede l'escavazione del suolo e il suo mescolamento con materiali correttivi organici quali trucioli, fieno e ammendanti, che forniscono una porosità sufficiente ed un equilibrio tra carbonio ed azoto adatto a promuovere l'attività termofila e microbica che si sviluppa in condizioni aerobiche. L'efficienza massima di degradazione è realizzata in pile statiche o areate controllando l'ossigenazione, il tenore d'acqua e la temperatura attraverso l'utilizzo di tubazioni forate immerse nel cumulo. Le biopile vengono coperte con dei teli impermeabili che convogliano opportunamente i gas prodotti in modo da sottoporli a trattamenti specifici. Per quanto riguarda le potenzialità del processo, il compostaggio è stato applicato con successo nel trattamento di terreni contaminati da composti aromatici volatili, fenoli, idrocarburi policiclici aromatici fino a quattro anelli benzenici e nitro-composti esplosivi (TNT e RDX), con rendimenti di rimozione superiori al 90% (Jorgensen et al., 2000).

4.3. UTILIZZO DEL COMPOST NEL BIORISANAMENTO.

Il compost è una matrice stabilizzata mineralizzata, derivante da un processo naturale e controllato di trasformazione biologica della frazione organica ed inorganica della matrice. In quanto tale, è ricco di elementi fertilizzanti a rilascio graduale e presenta una comunità microbica con ampie potenzialità metaboliche di tipo degradativo. L'apporto di questi materiali stabili, ad elevato contenuto di sostanza organica, determina un effetto positivo sulle condizioni generali del suolo e in particolare sul rapido sviluppo delle popolazioni microbiche autoctone che, vivendo a carico della sostanza organica, trovano nel compost un substrato idoneo alla crescita e allo sviluppo.

Per queste sue caratteristiche, il compost viene impiegato, oltre che in agricoltura, anche nel *landfarming*, strategia di biorisanamento di quei siti contaminati in cui si richiede una stimolazione dell'attività degradativa della comunità microbica autoctona. Il compost, utilizzato nel *landfarming* favorisce la rimozione del contaminante in quanto può agire come fonte di microrganismi degradativi, fonte di nutrienti e come stabilizzatore della struttura del terreno, migliorandone la diffusione di ossigeno e disponibilità di acqua.

Questa tecnologia è stata ampiamente impiegata nel risanamento dei suoli inquinati da idrocarburi aromatici (Ceccanti, et al., 2006; Di Gennaro et al., 2009), da *diesel-oil* (Tejada et al., 2008; Taccari et al., 2012), erbicidi (Delgado-Moreno et al., 2007; Cabrera et al., 2007), metalli pesanti (Moreno et al., 1999) e altri composti organici recalcitranti (Alexander et al., 2000). Il *landfarming* con compost derivante dai sottoprodotti dell'industria olearia rappresenta una strategia di biorisanamento efficace poiché questo ammendante contiene livelli elevati di carbonio e nutrienti altamente disponibili che stimolano il co-metabolismo dei microrganismi autoctoni del suolo e, di conseguenza, le attività enzimatiche che catalizzano l'idrolisi del contaminante. Inoltre una frazione di questi enzimi viene stabilizzata quando si trova a contatto con il materiale umificato per cui la loro attività viene liberata dalle condizioni non ottimali che caratterizzano un suolo inquinato (Benitez et al., 2005).

Tuttavia, prima del loro reale impiego, devono essere condotti studi specifici sulla fattibilità del trattamento, poiché sono possibili risvolti negativi dovuti al fatto che:

- il compost è una matrice complessa, molto ricca di sostanza organica, soprattutto in acidi umici, che sono noti per influenzare pesantemente la biodisponibilità di contaminanti (Semple et al., 2001; Plaza et al., 2009);
- la ricca comunità microbica del compost influenza, almeno in modo transitorio, l'attività e la composizione della comunità microbica autoctona (Ros et al., 2006; Saison et al., 2006; Chu et al., 2007), e questo può ripercuotersi sulla portata di rimozione dei contaminanti.
- in alcuni casi, i processi di biodegradazione possono causare un aumento della tossicità del suolo invece che una diminuzione (Phillips et al., 2000).

5. STUDIO DELLE COMUNITA' MICROBICHE.

I microrganismi sono la chiave di volta dei processi di valorizzazione di questi scarti e del loro impiego nella *bioremediation*.

E' importante considerare che la trasformazione di uno scarto in un compost di alta qualità è diretta conseguenza dell'attività dei microrganismi presenti e quindi della composizione stessa delle comunità microbiche autoctone. Quando il compost, matrice ricca di nutrienti e biomassa microbica, viene utilizzato in strategie di biorisanamento, gli effetti del trattamento non dipendono solo dall'azione dei microrganismi del compost, ma dal tipo d'interazione che si viene ad instaurare tra queste e il microbiota indigeno.

In questo contesto, quindi, sono di fondamentale importanza gli studi di ecologia microbica in grado di chiarire come l'effetto dell'applicazione di una strategia biotecnologica venga mediato dalle comunità microbiche e quindi se necessario tali studi possono consigliare e/o fornire anche strumenti adatti per ottimizzare il processo.

Nonostante l'importanza che rivestono i microrganismi, si hanno ancora conoscenze limitate riguardanti le specie microbiche che compongono le diverse comunità. Per lungo tempo, infatti, gli studi di biodiversità microbica sono stati condotti utilizzando le tecniche della microbiologia classica, cioè dipendenti dalla coltivazione.

Queste prevedono l'isolamento e la crescita su terreni solidi o liquidi, tecniche per quantificare i microrganismi, attraverso conta vitale o MPN (*Most Probable Number*) e test biochimici miniaturizzati per l'identificazione batterica (Biolog o Api) (El Fantroussi et al., 1999). Alcuni studi riportano che in un unico grammo di suolo possono essere presenti da 10^2 a 10^7 specie distinte di microrganismi (Gans et al., 2005; Schloss & Handelsman, 2006). Bisogna anche considerare che solo una bassissima percentuale di microrganismi, non superiore al 5% può essere coltivato in laboratorio (Torsvik et al., 2003). Conseguenza di quanto detto, quindi, è che l'uso delle sole tecniche dipendenti dalla coltivazione fornisce informazioni parziali che tendono a sottostimare la reale biodiversità. Nonostante i loro limiti, l'uso di queste tecniche presenta alcuni vantaggi e sono, pertanto, ancora comunemente utilizzate in studi di microbiologia ambientale, in quanto, grazie al loro impiego è possibile ottenere colture pure utili per caratterizzarne le attività metaboliche d'interesse e per ulteriori studi, anche di carattere biotecnologico.

Una svolta cruciale nello studio dei microrganismi nelle matrici ambientali è stata fornita dall'applicazione di metodi coltura-indipendenti, che consistono nell'uso di tecniche molecolari che permettono di ovviare ai problemi legati alla microbiologia classica (Fig.7).

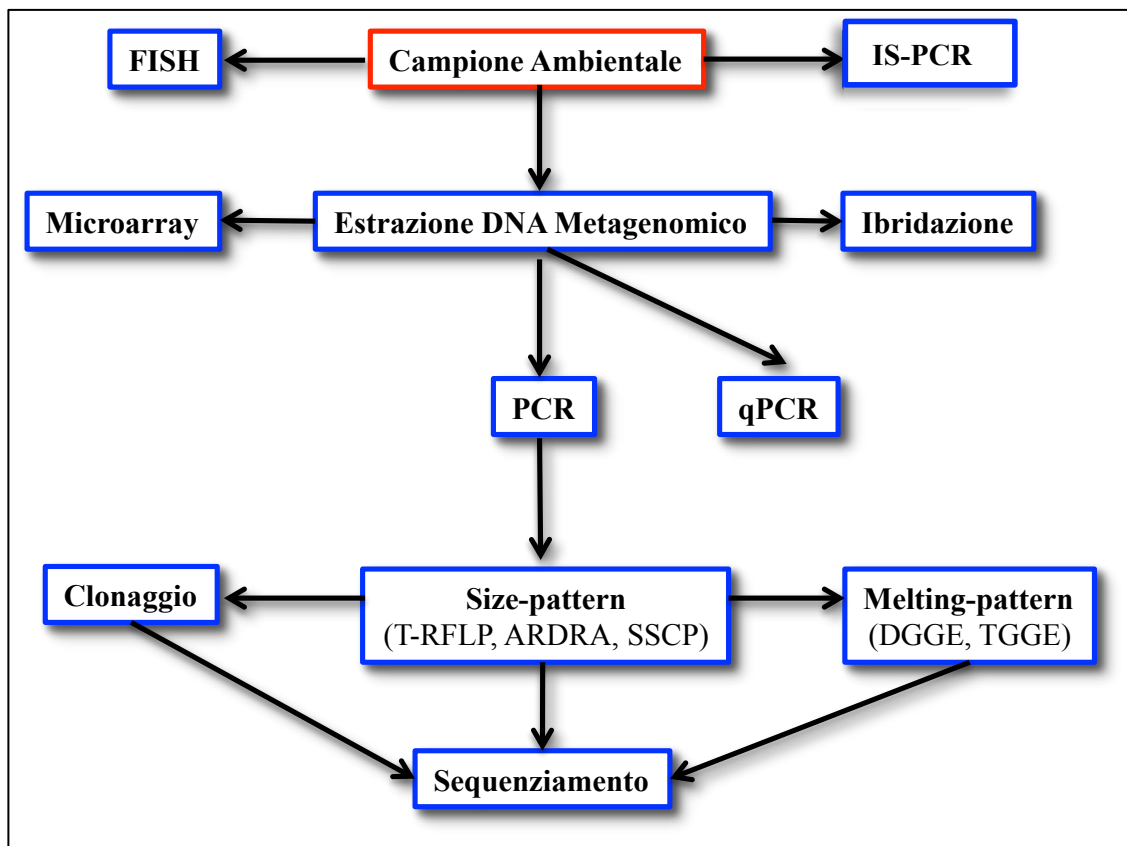


Fig. 7. Comuni approcci per lo studio della diversità genetica delle comunità microbiche: **PCR**: Polimerase Chain Reaction; **IS-PCR**: In situ Polimerase Chain Reaction; **FISH**: Fluorescence In Situ Hybridisation; **qPCR**: Quantitative Polimerase Chain Reaction; **T-RFLP**: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism; **ARDRA**: Amplified rDNA Restriction Analysis; **SSCP**: Single-Stranded Conformation Polymorphism; **DGGE**: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; **TGGE**: Temperature Gradient Gel Electrophoresis. (Dahllof 2002).

La maggior parte di questi metodi si basa sull'estrazione del DNA metagenomico dalla matrice ambientale. Per DNA metagenomico s'intende il DNA di tutti gli organismi presenti nel campione (batteri, funghi, piante, animali ecc...). Dal metagenoma si è poi in grado di isolare delle sequenze uniche che inequivocabilmente permettono di amplificare,

tramite PCR (*Polymerase chain reaction*) solo porzioni di DNA marker d'interesse. Questi frammenti di DNA, utilizzati per lo studio delle comunità microbiche e la classificazione tassonomica dei microrganismi, corrispondono ai geni codificanti l'RNA ribosomale (16s per i procarioti e 18s per gli eucarioti) .

Il prodotto di PCR è costituito da una miscela eterogenea di molecole di 16S di diversa provenienza tassonomica. La loro separazione e analisi può essere effettuata in diversi modi tra cui di grande utilizzo la *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE).

La DGGE è una tecnica che si basa sulla separazione dei frammenti di DNA aventi stessa taglia ma diversa sequenza, mediante una corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide contenente un gradiente lineare di agenti denaturanti di tipo chimico. Il risultato ottenuto dall'applicazione di questa metodologia è un “*fingerprinting*” della comunità microbica presente nel campione.

Il principio su cui si basa è che ciascun DNA a doppia elica presenta un proprio punto di denaturazione strettamente correlato alla sua composizione in basi. La separazione avviene mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide, che contiene un gradiente chimico denaturante costituito da urea e formamide. Nel momento in cui il frammento di DNA raggiunge il punto del gel in cui la concentrazione del denaturante causa l'apertura parziale della doppia elica, si ha un rallentamento della sua migrazione fino quasi a fermarsi. Per evitare che la doppia elica venga completamente denaturata, durante la PCR viene utilizzato un *primer* a cui viene aggiunta una sequenza ripetuta di G-C (30-40) definita *G-C clump*, responsabile del rallentamento della migrazione stessa. Dopo la corsa elettroforetica i vari DNA separati nel gel vengono colorati con specifici fluorocromi che ne permettono la visualizzazione al transilluminatore. Il campione, a questo punto, risulta essere costituito da una serie di bande ognuna delle quali rappresenta una popolazione differente, e l' intensità fornisce informazioni generali sull'abbondanza relativa di ciascuna popolazione. In questo modo si ottengono dei *fingerprint* molecolari, una sorta d'impronta molecolare, che fornisce informazioni circa la composizione e la biodiversità di ogni comunità.

Altri autori hanno utilizzato la *DGGE* per analizzare i profili di comunità di popolazioni presenti in campioni di matrici ambientali di varia origine, confermandone quindi la validità dei risultati ottenuti (Klammer et al., 2008; Vivas et al., 2008; Noviscak et al., 2009).

I metodi molecolari possono anche essere utilizzati per la quantificazione di un determinato gene, attraverso l'uso della PCR quantitativa (*qPCR*), in cui l'amplificazione

del DNA avviene come in una normale reazione di PCR, ma la caratteristica fondamentale che distingue la *qPCR* risiede nel fatto che il DNA prodotto ad ogni ciclo di amplificazione viene quantificato in tempo reale grazie all'uso di fluorocromi che si intercalano nella doppia elica di DNA. Questa tecnica è stata largamente impiegata anche nella quantificazione del numero di batteri, utilizzando come gene marcatore quello del 16S rRNA, sia nel caso di ceppi batterici puri che di comunità, avvalendosi dell'amplificazione diretta del DNA metagenomico. In studi di questo tipo, la *qPCR* è stata applicata nella quantificazione dei batteri totali, facendo uso di *primer* "universali" (Stubner et al., 2000; Nadkarni et al., 2002; Park & Crowley, 2006; Smith et al., 2006).

Il principio su cui si basa la *qPCR* è che l'intensità della fluorescenza emessa ad ogni ciclo è proporzionale alla concentrazione del prodotto di PCR ottenendo come risultato finale delle curve sigmoidali, come quelle mostrate in Figura 8, che rispecchiano perfettamente l'andamento della stessa reazione di amplificazione.

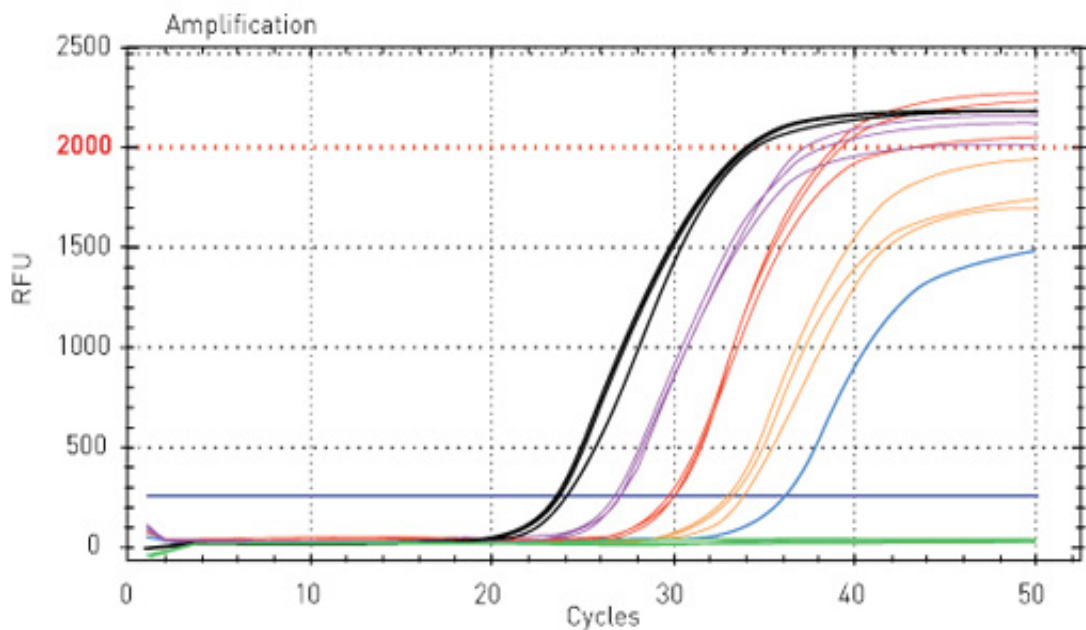


Fig. 8. Curve di amplificazione in *qPCR*.

Il primo ciclo nel quale lo strumento riesce a rilevare un valore di fluorescenza significativamente più alto rispetto al rumore di fondo (*background*) è definito ciclo soglia (Ct), e rappresenta l'inizio della fase esponenziale della reazione. Il valore del Ct dipende

dalla concentrazione iniziale del gene che si sta quantificando, per cui più alta è la concentrazione iniziale del gene, più basso sarà il relativo Ct.

I metodi molecolari possono anche essere utilizzati a supporto della microbiologia classica per l'identificazione dei microrganismi coltivabili. Ad esempio, per poter ottenere l'identificazione tassonomica di isolati microbici, è possibile sequenziare i loro geni ribosomali; ma è importante non sequenziare più volte la stessa specie. La tecnica ARDRA (*Amplified rDNA restriction analysis*) permette di raggruppare gli isolati in OTU (unità tassonomiche operative) in funzione dei profili di restrizione. Per ogni coltura pura viene estratto il DNA genomico di cui viene amplificato, tramite PCR, il gene codificante il 16S rRNA. Il prodotto di amplificazione viene digerito da un enzima di restrizione, o endonucleasi, che effettua il taglio unicamente in corrispondenza di particolari sequenze nucleotidiche che variano a seconda dell'enzima utilizzato. Poiché la sequenza nucleotidica del 16S risulta specie specifica, i siti di taglio per l'enzima si troveranno in numero e posizione diverse nel 16S. Con la digestione enzimatica e la successiva corsa elettroforetica in gel d'agarosio si ottengono profili di restrizione diversi per le diverse specie. A questo punto viene sequenziato un singolo rappresentante di ogni OTU.

Uno dei modi più diretti per identificare le specie (coltivabili e non coltivabili) presenti in un campione è il clonaggio e sequenziamento del frammento di rDNA amplificato tramite PCR. Il clonaggio dei prodotti amplificati all'interno di un vettore (solitamente un plasmide) permette di separare le sequenze multiple generalmente presenti in un campione naturale.

La prima fase del procedimento di clonaggio è la *ligazione*, in cui il frammento che si desidera clonare viene inserito, enzimaticamente, all'interno di un vettore plasmidico, molecola circolare di DNA a doppio filamento a replicazione autonoma. Con la *trasformazione*, poi, tramite *shock* termico, il plasmide viene inglobato all'interno di cellule competenti del batterio *Escherichia Coli*, che si replica su piastre di coltura selettive arricchite con ampicillina. Tale antibiotico fa sì che solo le cellule che hanno inglobato il vettore sopravvivano, poiché esso contiene geni per la resistenza all'ampicillina.

Viene quindi effettuato uno *screening* delle singole colonie cresciute in piastra, in seguito al quale vengono scelti i campioni da sequenziare.

Negli studi di ecologia microbica, il gene *target* per lo studio delle popolazioni microbiche è quello codificante gli rRNA.

In base al coefficiente di sedimentazione, negli organismi procariotici gli rRNA vengono

distinti, in 5S, 16S e 23S; negli eucarioti si distinguono invece gli rRNA, 18S, 28S e 5,8S.

I geni, in entrambe le classi di organismi sono organizzati in operoni che consistono di una regione promotrice seguita dalla sequenza codificante per l'rRNA 16S/18S, una regione spaziatrice (*intergenic spacer region*, ITS), che può contenere un numero variabile di geni per l'rRNA *transfer*, la sequenza dell'rRNA 23S/28S e, dopo un secondo breve spaziatore, quella per il 5S/5,8S.

Gli rRNA sono molecole essenziali per la vita delle cellule poiché costituiscono la parte non proteica dei ribosomi e sono un elemento chiave della sintesi proteica. In quanto tali sono presenti nelle cellule di tutti gli organismi viventi, tanto che i loro geni codificanti vengono considerati come “geni universali”.

Questi geni sono definiti “orologi molecolari” perché sono presenti in tutti gli organismi (16S per i procarioti e 18S per gli eucarioti) e poiché le sequenze codificanti cambiano a causa di mutazioni che avvengono con un tasso costante nel tempo, sono una misura diretta della divergenza avvenuta tra organismi con l'evoluzione.

Altro fattore determinante per la preferenza di questo gene, rispetto ad altri potenziali marcatori molecolari, risiede nel fatto che la sua dimensione è compatibile con l'amplificazione PCR e con uno sforzo di sequenziamento non eccessivo.

In particolare, come riportato in figura 5, i geni codificanti il 16S rRNA (1550 pb) dei procarioti e 18S (1870 pb) degli eucarioti contengono regioni altamente conservate, alternate a regioni ipervariabili; quest'ultime assumono una rilevanza filogenetica e tassonomica poiché sono regioni che possono accettare le mutazioni e che differiscono perciò tra organismi diversi. Inoltre, la presenza di regioni molto conservate ne permette l'amplificazione *in vitro* mediante PCR, attraverso l'utilizzo di diverse coppie di *primers* “universali” che sono stati sviluppati ed ampiamente utilizzati negli ultimi anni (Muyzer et al., 1993, 1995; Amann et al., 1995; Marchesi et al., 1998; Vivas et al 2009).

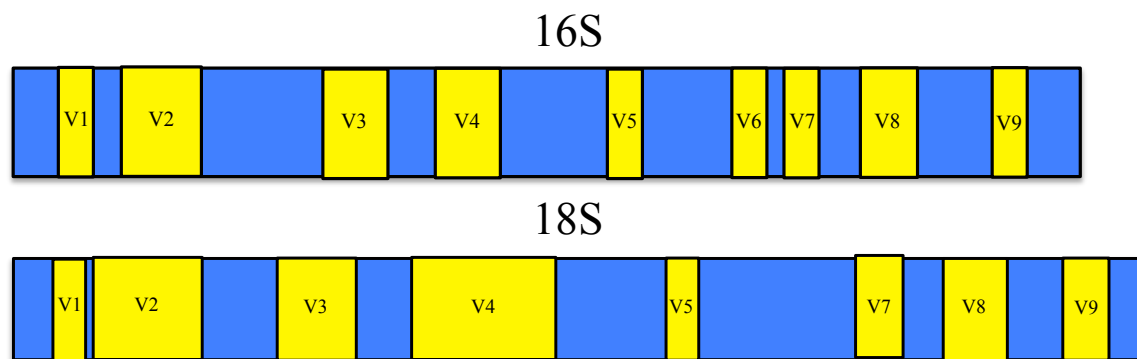


Fig. 9. Rappresentazione schematica delle sequenze del gene codificante per l'rRNA 16S dei batteri e 18S per i funghi. Le regioni in giallo rappresentano le sequenze "ipervariabili" mentre quelle in blu le sequenze conservate su cui vengono costruiti i *primers* "universali".

Mentre variazioni nelle sequenze del rDNA 16S hanno permesso di aumentare notevolmente le conoscenze sulla diversità e l'ecologia delle comunità batteriche nel suolo, l'identificazione tassonomica dei funghi, basata sulla sequenza del rDNA 18S, risulta più problematica e limitata a livello di genere o famiglia. Questo è dovuto principalmente al fatto che non esistono vere differenze nell'rDNA 18S di specie fungine strettamente correlate, in quanto nel regno dei funghi, il periodo evolutivo è relativamente breve se comparato a quello dei batteri (Hugenholtz e Pace, 1996). Come risultato, le banche dati di rDNA 18S sono scarse e, comunque, non esaustive.

Un'ulteriore limitazione nello studio della diversità fungina in campioni di suolo è dovuta alla mancanza di *primers* altamente specifici in grado di amplificare solo l'rDNA fungino, discriminando, nel DNA metagenomico estratto direttamente dal suolo, sequenze ribosomiali derivate da altri organismi eucariotici. La sfida dei ricercatori, in questi anni, è stata quindi quella di costruire dei *primers* in grado di amplificare il maggior *range* tassonomico possibile di specie fungine ma, allo stesso tempo, in grado di prevenire la co-amplificazione di sequenze derivate da altri organismi eucariotici strettamente correlati (Anderson et al., 2003).

Alcune volte, per studi tassonomici sulla biodiversità fungina, si ricorre a un'altra regione target, compresa tra il gene del rRNA 18S e quello del rRNA 23S, che comprende anche

l'rRNA 5,8S e che viene detta *Internal Transcribed spacer* (ITS).

Tale regione, così come altre sequenze non codificanti del rDNA, ha subito il maggior grado di mutazione durante l'evoluzione e quindi notevoli variazioni di sequenza sono riscontrabili anche in specie strettamente correlate. Per questo motivo, la regione ITS è quella che fornisce, generalmente, la maggiore risoluzione tassonomica rispetto a sequenze derivate, invece, da regioni codificanti (Lord et al., 2002).

Importante sottolineare che anche l'uso del gene 16S per i procarioti presenta delle limitazioni da tenere sempre in considerazione durante l'analisi dei risultati.

L'errore possibile a cui si può andare in contro, è quello di una sovrastima della biodiversità. Questa può essere determinata da due fattori: copie multiple dei geni ribosomiali e formazione di "chimere".

Da vari autori è stato riscontrato che le copie multiple dei geni ribosomiali dello stesso organismo possono presentare un'eterogeneità superiore al 5%, (Amann, 2000; Klappenbach et al., 2001; Shimizu et al., 2001). Inoltre un rischio potenziale legato all'amplificazione di questo gene, direttamente dal DNA metagenomico estratto da campioni ambientali, deriva dal fatto che spesso si ha la formazione di sequenze "chimeriche" dovute all'associazione di sequenze derivate da specie diverse (Liesack et al., 1992).

L'amplificazione delle sequenze chimeriche, una volta originatesi, risulta avere la stessa efficienza delle altre sequenze di rDNA 16S presenti nel DNA metagenomico iniziale e quindi, anche in tal caso, si ha una sovrastima della reale biodiversità di un campione oltre ad essere, comunque, difficile il confronto di queste sequenze con quelle depositate nelle banche dati.

Nel caso in cui si vogliano studiare sub-popolazioni, con capacità metaboliche e fisiologiche specifiche, possono essere impiegati come marcatori diversi tipi di geni funzionali come ad esempio: il gene *amoA* che codifica l'ammonio monoossigenasi nei batteri nitrificanti (Rotthauwe et al., 1997; Sakano & Kerkhof, 1998), il gene *amoA* codificante la metano monoossigenasi nei batteri metanotrofici (Olsen et al., 1998) o il gene *nifH* che codifica la nitrato reduttasi nei batteri denitrificanti (Church et al., 2005).

SCOPO DELLA TESI

Da quanto illustrato nel capitolo introduttivo di questo lavoro di tesi, appare chiaro come nei processi biotecnologici applicati alla salvaguardia dell'ambiente, quali il riciclo e la valorizzazione degli scarti agro-industriali e il risanamento dei siti inquinati, i microrganismi giochino un ruolo chiave per la riuscita delle strategie implementate. Studi di ecologia microbica, quindi, possono fornire un supporto fondamentale sia per la comprensione dei meccanismi di base sia per l'ottimizzazione di questi processi.

L'obiettivo principale di questo lavoro di tesi è stato, quindi, quello di approfondire gli aspetti di ecologia microbica della valorizzazione degli scarti derivanti dai frantoi oleari con particolare riferimento al processo di compostaggio e all'applicazione di questi materiali in strategie di biorisanamento.

La prima parte del lavoro di tesi è stata dedicata alla caratterizzazione chimico-fisica e microbiologica dell'intero processo di compostaggio dei residui dei frantoi oleari derivanti da un impianto a due fasi (TPOMW), e alla caratterizzazione di una serie di compost derivanti da questo sottoprodotto e ottenuti con diverse strategie tecnologiche.

Nella seconda parte, poi, sono stati valutati gli effetti dell'aggiunta di compost sul microbiota indigeno di matrici contaminate. A questo scopo, sono state allestite due prove di biorisanamento su scala di laboratorio utilizzando un suolo storicamente contaminato da *diesel-oil*, ed un fango attivo contaminato da farmaci.

MATERIALI E METODI

1. MATERIALI

1.1 MATRICI CONTAMINATE

Suolo storicamente contaminato da diesel-oil.

In un sito italiano che si trova lungo la costa siciliana, è stata rilevata, una decina di anni fa, una diffusa contaminazione da petrolio greggio nei pressi delle aree adiacenti ad alcuni pozzi di estrazione del petrolio e lungo le condotte. Dato l'elevato contenuto d'argilla della zona vadosa dell'area contaminata, non è stato possibile procedere, neanche per le contaminazioni successive, alla rimozione dell'inquinante. Nel corso di questo decennio, a seguito di fenomeni di biodegradazione e volatilizzazione della frazione di petrolio leggero nel terreno, la composizione idrocarburica corrente consiste in un 70% di idrocarburi alifatici medio pesanti e pesanti (C13-18 e C19-36), e un 30% di una frazione aromatica medio-pesante (C13-C22). Il profilo idrocarburico riflette sia la contaminazione da petrolio greggio estratto in questa zona, sia l'età della fuoriuscita. I volumi di grandi dimensioni (alcune migliaia di metri cubi), la profondità elevata (fino a 8 m sotto la superficie del suolo) e, soprattutto, il predominio della frazione argillosa del terreno contaminato, ostacola l'applicazione di un trattamento *in situ*.

I campioni di suolo erano raccolti nelle vicinanze di una raffineria petrolifera, essiccati all'aria e setacciati (<2 mm). Il terreno aveva un pH di 7,96. La tessitura del suolo era costituita da (w/w): sabbia, 15,72%, limo 40,19% e argilla 44,1%, mentre la capacità di trattenere l'acqua (WHC) era del 37,2% (w/w). La contaminazione del suolo (9600 mg/kg d'idrocarburi totali del petrolio) era rappresentata da idrocarburi alifatici lineari o ramificati (13<C<36) e, in misura minore, di idrocarburi aromatici (13 <C <22).

Fango derivante da impianto di trattamento di acque reflue.

I fanghi, utilizzati per la prova di biorisanamento di una matrice contaminata “*ad hoc*” in laboratorio, derivano dall'impianto di trattamento di acque reflue di El Prat de Llobregat. Si tratta di un tipico impianto biologico a fanghi attivi, situato nei pressi di Barcellona

(Spagna) avente una capacità di trattamento di due milioni di abitanti equivalenti. Il fango è stato ottenuto dalla fase finale di trattamento della linea fanghi, cioè dopo digestione anaerobia e disidratazione termica (70°C) con un contenuto di acqua residua minore del 10%. Il fango è stato conservato a -20°C fino al suo utilizzo per l'allestimento della prova.

1.2. COMPOST

Compost derivanti da scarti dei frantoi oleari

Sono stati caratterizzati 15 diversi compost maturi derivanti dagli scarti di frantoi oleari. I compost sono stati ottenuti variando parametri tecnologici quali: tempi di maturazione, metodo di maturazione e formulazione delle miscele da avviare a maturazione.

Tempi di maturazione:

I tempi variano da 84 a 249 giorni.

Metodi di maturazione:

- *Passive Composting Simplified* (PCS):

Il compostaggio viene effettuato in contenitori di plastica da 800 l; le miscele preparate vengono stoccate fino a maturazione all'interno di questi contenitori.

- *Active Composting Composite* (ACC):

Il compostaggio viene effettuato in reattori nei quali la maturazione avviene in tre fasi: ACT (*Active Composting Time*), Curing (cumuli statici ad areazione forzata) e Maturazione finale (cumuli statici ad areazione naturale).

Formulazione delle miscele da avviare a maturazione:

In funzione del materiale addizionato alla sansa nella formulazione della miscela di partenza, vengono realizzati compost misti e compost verdi. Come prevede la normativa nazionale (D.lgs 75/2010) nel compost misto, la miscela di partenza contiene dei residui animali (lana grezza), mentre nel compost verde vengono addizionati solo materiali di origine vegetale.

Two Phase Olive Mill Waste Compost (TPOMW)

Il compost utilizzato è quello derivante dall'esperimento pilota di compostaggio effettuato presso un frantoio a due fasi di Tuoro sul Trasimeno (PG), ottenuto con metodo tradizionale di compostaggio che prevedeva un periodico rivoltamento del cumulo al fine di garantire una corretta e omogenea areazione. Il processo di compostaggio di questa matrice è stato monitorato e caratterizzato durante la prima parte della presente tesi. Questo compost veniva utilizzato nelle diverse prove di biorisanamento.

Big Bag

Questo è un compost innovativo derivante da un processo di compostaggio statico realizzato in sacchi di polietilene gas-permeabile.

Spent mushroom compost (Smc)

I due *Spent mushroom* compost, fornitoci da una ditta locale, sono dei compost esausti derivanti da processi di funghicoltura industriale dei funghi *Agaricus bisporus* e *Pleurotus ostreatus*.

2. ALLESTIMENTO PROVE SPERIMENTALI

2.1 PROVA DI COMPOSTAGGIO

L'esperimento pilota di compostaggio ha avuto luogo presso un frantoio di Tuoro sul Trasimeno (PG) ed è stato coordinato dal Dr. Roberto Altieri e dal Dr. Alessandro Esposito dell'Istituto per i Sistemi Agricoli e Forestali del Mediterraneo (ISAFoM) del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

Per la prova è stata allestita una pila trapezoidale di 3,5 m³ costituita principalmente da sansa umida proveniente da un frantoio a due fasi (84%) a cui veniva aggiunto cascame di lana (5%), paglia (3%), pollina di colombe (3%) ed altri residui di frangitura quali foglie e rametti (5%). Per garantire l'omogeneizzazione della matrice e la buona aerazione del cumulo, questo veniva rivoltato due volte a settimana mentre l'umidità veniva mantenuta intorno al 40-45%.

2.2 PROVE DI BIORISANAMENTO

Prova di biorisanamento su scala di laboratorio del suolo storicamente contaminato da diesel-oil.

Barattoli di vetro da 500 ml erano riempiti con 40 g di suolo cui si aggiungevano 20 g di compost, ad eccezione del controllo in cui il microcosmo era costituito da 60 g di suolo.

Cinque sono le tesi sperimentali che sono state allestite per questa prova; ad eccezione del controllo (suolo), le altre tesi prevedevano l'ammendamento del suolo contaminato con due tipi di compost diversi; ogni trattamento con compost prevedeva l'applicazione di quest'ultimo sia tal quale che sterilizzato (due cicli di sterilizzazione a 121°C per 15 minuti). In Tabella 5 vengono riportate le tesi sperimentali allestite.

L'umidità finale veniva portata al 50% della capacità di campo e mantenuta costante per tutto il periodo della sperimentazione aggiungendo acqua sterile quando necessario.

I microcosmi erano incubati al buio a temperatura ambiente ma non venivano chiusi ermeticamente per evitare di mantenere i microcosmi in condizioni di sterilità. Ogni tesi è stata condotta in duplicato.

Tab. 5 Tesi della prova di *bioremediation* del suolo contaminato da *diesel-oil*.

TESI	MICROCOSMI
<i>Controllo (Cntr.)</i>	Suolo (60 g)
<i>Tuoro (TPOMW)</i>	Suolo (40 g)+ Compost Tuoro (20g)
<i>Tuoro sterile (TPOMW St.)</i>	Suolo (40 g)+ Compost Tuoro sterile (20g)
<i>SMC Agaricus (Smc A.)</i>	Suolo (40 g)+ Spent mushroom compost <i>Agaricus</i> (20g)
<i>SMC Agaricus sterile (Smc A. St.)</i>	Suolo (40 g)+ Spent mushroom compost <i>Agaricus</i> sterile (20g)
<i>SMC Pleorotus (Smc P.)</i>	Suolo (40 g)+ Spent mushroom compost <i>Pleorotus</i> (20g)
<i>SMC Pleorotus sterile (Smc P. St.)</i>	Suolo (40 g)+ Spent mushroom compost <i>Pleorotus</i> sterile (20g)

La prova è stata seguita nel tempo eseguendo prelievi dei campioni diversamente trattati all'inizio e dopo 10, 30, 60 e 120 giorni di incubazione (T0, T1, T2, T3 e T4). I campioni prelevati venivano omogeneizzati, setacciati, aliquotati in falcon sterili e congelati a -80°C sino al momento delle successive analisi prima delle quali i campioni venivano liofilizzati.

Prova di biorisanamento su scala di laboratorio del fango proveniente da un depuratore e contaminato ad hoc con carbamazepina.

In Tabella 6 vengono riportate le tesi e la loro composizione. In barattoli di vetro da 150 g venivano allestiti i microcosmi da 9 g di un mix di fango e compost in rapporto 2:1 (il controllo era costituito solo da fango) contaminato con una soluzione *stock* di carbamazepina (600 ppm in metanolo) per ottenere una concentrazione finale di 0,1 mg/g di peso secco.

Tab. 6 Tesi della prova di *bioremediation* del fango contaminato *ad hoc* con carbamazepina.

TESI	MICROCOSMI
<i>Controllo (Cntr.)</i>	Fango (9 g)
<i>Tuoro (TPOMW)</i>	Fango (6 g)+ Compost Tuoro (3 g)
<i>Tuoro sterile (TPOMW St.)</i>	Fango (6 g)+ Compost Tuoro sterile (3 g)
<i>Big bag (BB)</i>	Fango (6 g)+ Big bag (3 g)
<i>Big bag sterile (BB St.)</i>	Fango (6 g)+ Big bag sterile (3 g)

I microcosmi, mantenuti ad una umidità costante del 60%, venivano incubati al buio. La prova, della durata di trenta giorni, prevedeva campionamenti al tempo iniziale (T0) e dopo 5, 10, 20, 30 giorni (T1, T2, T3 e T4). I campioni, conservati a -80°C, prima delle analisi venivano liofilizzati.

3. METODI DI ANALISI

3.1 ANALISI MICROBIOLOGICHE CULTURA-DIPENDENTI

Conte vitali

Per la conta vitale su piastra, i microrganismi mesofili e termofili erano coltivati su terreni agarizzati specifici per funghi e batteri. Il terreno utilizzato per la crescita batterica era il PCA (Fluka) che era preparato dissolvendo 7 g di terreno in 400 ml di acqua distillata e aggiungendo poi 2,8 ml di una soluzione di *cycloheximide* (Fluka) come antifungino. Per la crescita dei funghi era utilizzato invece il terreno *Rose Bengal Chloramphenicol* (Fluka), preparato dissolvendo 12,8 g di terreno in 400 ml di acqua distillata. Quest'ultimo terreno conteneva il cloramfenicolo come antibatterico. I terreni venivano poi autoclavati a 121 °C per 15 min. e colati in piastre Petri sterili.

Per preparare l'inoculo, venivano sospesi 10 g di campione in 200 ml di una soluzione di acqua distillata e acqua peptonata (1:1) e poi effettuate diluizioni seriali per ottenere la diluizione ottimale di inoculo che forniva una piastra con un numero di colonie contabili. Le aliquote venivano piastrate in triplicato sui due terreni prima menzionati e incubati per 72 h a 28°C per la determinazione degli organismi mesofili e a 55°C per quella dei termofili. Il numero dei microorganismi presenti in ciascun campione analizzato veniva calcolato in base alle colonie contate e alla diluizione effettuata e espresso come UFC/g (unità formanti colonia per grammo di campione).

Isolamento.

Dalle piastre inoculate con ciascun campione e dove erano presenti colonie isolate si procedeva all'isolamento dei microrganismi passandoli su piastre contenenti lo stesso terreno per ottenere colture pure. Tutti i passaggi caratterizzanti l'isolamento avvenivano all'interno di un cono di sterilità generato dalla fiamma di un becco *Bunsen*. Prelevata una piccola aliquota di massa batterica (con un'ansa sterile), questa veniva distribuita con

strisci continui e angolati per diminuirne la densità fino ad ottenere colonie distinte e le piastre incubate a 28 o 55°C per 24 - 48h. Ogni isolato veniva in seguito sottoposto ad identificazione tassonomica grazie all'impiego di tecniche molecolari. In particolare, ne veniva estratto il DNA da cui era amplificato il gene codificante il 16S rRNA. Questi amplificati venivano poi sottoposti a *screening* ARDRA per individuare gli isolati simili e per scegliere quelli da sequenziale.

Test dell'attività tannasica

L'attività enzimatica degli isolati è stata testata utilizzando i metodi di lettura spettrofotometrica e visuale, descritti da Osawa e Walsh (1993). Le colture cresciute su piastra contenente terreno minimo e acido tannico, venivano risospese in 1 ml su terreno liquido (pH 5) contenente 33 mM NaH₂PO₄ e 20 mM di metil-gallato (Fluka Chemie, Germany) al fine di ottenere una sospensione sufficientemente torbida (equivalente al livello di torbidità 3 dello standard di torbidità di McFarland). Le colture venivano incubate a 37°C per 24h. Dopo l'incubazione il campione veniva alcalinizzato con uguale volume di soluzione NaHCO₃ (pH 8.6) e lasciato a temperatura ambiente per 1 h. Il viraggio di colore da verde a marrone del campione veniva considerato come indicatore positivo di attività tannasica (metodo visivo di lettura). 1 ml della stessa sospensione veniva centrifugato e il sopranatante veniva letto a 440 nm (jenway, mod 6505) allo spettrofotometro (metodo di lettura spettrofotometrico). Ogni campione veniva analizzato in triplicato.

Gli isolati che mostravano una forte attività tannasica venivano coltivati su terreno minimo arricchito con la soluzione di oligoelementi di Pfenning e contenente 5 mg/ml di acido tannico usato come unica fonte di carbonio. I triplicati delle colture con i controlli abiotici venivano incubati a 30°C per 24h al buio. I campioni venivano prelevati ogni 6 h per testare la crescita batterica, calcolata come la concentrazione di proteine totali determinata attraverso il metodo di Bradford.

3.2. ANALISI MICROBIOLOGICHE COLTURA-INDIPENDENTI

Estrazione DNA metagenomico

Il DNA metagenomico veniva utilizzato per l'analisi coltura-indipendente delle comunità microbiche.

Per l'estrazione del DNA veniva usato il kit *PowerSoil DNA* (MoBio)

Il protocollo di estrazione prevedeva tre passaggi chiave:

1. La lisi cellulare era resa possibile dall'effetto combinato di calore, detergenti chimici e forza meccanica prodotta da micro-biglie.
2. L'estrazione del DNA dal lisato, veniva garantita dall'aggiunta di una soluzione in grado di far precipitare tutto ciò che non era DNA. Grazie all'utilizzo di una centrifuga si otteneva quindi la netta separazione tra il *pellet* e il sopranatante contenente il DNA.
3. La purificazione avveniva grazie al passaggio del sopranatante attraverso un filtro di silice; per far sì che il DNA venisse immobilizzato su filtro, si aggiungeva una soluzione fortemente salina in grado di aumentare l'affinità tra la silice e il DNA stesso. Il filtro veniva lavato con etanolo per rimuovere eventuali contaminanti. Il DNA era quindi eluito dal filtro con una soluzione tampone e conservato a -20°C.

Amplificazione PCR dei geni ribosomali 16S & 18S.

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è un metodo attraverso cui una sequenza di acido nucleico può essere amplificata esponenzialmente *in vitro*. È necessario che le estremità della sequenza da amplificare siano conosciute con sufficiente precisione per sintetizzare degli oligonucleotidi (*primers*) che saranno ibridizzati ad esse, e che una piccola quantità della sequenza (*DNA template*) sia disponibile per dare inizio alla reazione. La sequenza da sintetizzare può essere presente inizialmente come una molecola discreta oppure può essere parte di una molecola più grande. In entrambi i casi, il prodotto della reazione sarà una molecola discreta di dsDNA con estremità corrispondenti a quelle 5' degli oligomeri utilizzati. Un tipico ciclo di PCR prevede le seguenti fasi:

- ❖ Denaturazione del *DNA template* a 95°C

- ❖ Appaiamento (*annealing*) dei *primers* alla sequenza specifica del *DNA template* ad una temperatura compresa tra 50 – 65 °C calcolata sulla base della sequenza stessa.
- ❖ Sintesi della sequenza da parte dell'enzima Taq DNA polimerasi a 72 °C.

In questo lavoro di Tesi la PCR è stata utilizzata per l'identificazione tassonomica degli isolati batterici, dei cloni fungini e per l'analisi coltura-indipendente delle comunità microbiche. Nel primo caso veniva amplificato il gene 16S batterico nella sua interezza utilizzando i *primers forward* 8F e *reverse* 1507R.

Nel secondo caso, per costruire la libreria di cloni, veniva amplificato un frammento interno al 18S utilizzando i *primers* EF4 e Fung5; questa regione è stata considerata quella che permette di identificare il maggior numero di gruppi fungini (Anderson et al., 2003; Hagn et al., 2003; He et al., 2005). E' importante ricordare che una parte della regione amplificata da questi *primers* è in comune con quella amplificata per l'analisi dgge (frammento comune di 173 bp).

Nel terzo caso, invece, l'analisi era basata sulla metodica della *DGGE*, che verrà descritta di seguito, e veniva amplificata una porzione dei geni ribosomiali batterici e fungini utilizzando, rispettivamente le coppie di *primers forward* 341F_GC e *reverse* 534R e *forward* FUN_NS e *reverse* GC_fung (Tab. 7).

Tab. 7. Sequenze dei *primers* utilizzati.

<i>PRIMERS</i>	<i>SEQUENZA</i>	<i>CONCENTRAZIONE FINALE</i>	<i>SPECIFICITA'</i>
<i>8 F</i>	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	0,4 µM	Sequenza intera del 16S batterico
<i>1507 R</i>	TACCTTGTTACGACTT	0,4 µM	
<i>EF4</i>	GGAAGGGRGTGATTATTAG	0,3 µM	Regione ipervariabile 18S fungino
<i>Fung 5</i>	GTAAAAGTCCTCGGTTCCCC	0,3 µM	
<i>534R</i>	ATTACCGCGGCTGCTGG	0,4 µM	Regione ipervariabile 16S batterico
<i>341F GC</i>	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGGCC TACGGGAGGCAACGAG	0,4 µM	
<i>FUN_NSI</i>	GTAGTCATATGCTTGTCTC	0,8 µM	Regione ipervariabile 18S fungino
<i>GCfung</i>	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCATTC CCGCTTACCGGTG	0,8 µM	

E' importante notare che nel caso dei *primers* utilizzati per la *DGGE*, uno dei due conteneva sempre una lunga sequenza di C e C (*GC clamp*) necessaria alla corretta separazione delle bande nel gradiente di denaturante.

Per le varie reazioni di PCR venivano utilizzati due diversi kit:

1. 5X HOT FIREPol (A&B Professional)
2. DreamTaq (Fermentas)

Il primo kit utilizzava un *mastermix* già pronto, contenete enzima, dNTPs e *buffer*, alla concentrazione di 5X che doveva quindi essere diluito aggiungendo H₂O (Tab. 8a) mentre il secondo andava preparato aggiungendo ogni singola componente della reazione (Tab. 8b).

Tab. 8a. Mix di reazione per il kit 5X HOT FIREPol.

DNA 5µl TQ + 20 MasterMix			
MIX	Conc. Iniziale	Conc. Finale	Volume in 25 µl
5X HOT FIREPol	5 X	1 X	5
Forward Primer	4 µM	0,4 µM	2,5
Reverse Primer	4 µM	0,4 µM	2,5
H ₂ O	qb	qb	10

Tab. 8b. Mix di reazione per il kit DreamTaq.

DNA 5µl TQ + 20 MasterMix			
MIX	Conc. Iniziale	Conc. Finale	Volume in 25 µl
10x GreenTaq Buffer	10 X	1 X	2,5
dNTP Mix	2.5mM	0.2	2
Forward Primer	3 µM	0,3 µM	2,5
Reverse Primer	3 µM	0,3 µM	2,5
DreamTaq DNA polymerase	5U/µl	1 U	0,2
H ₂ O	qb	qb	10,3

In entrambi i casi si otteneva un mix di reazione di 20 µl a cui andavano aggiunti 5 µl di *DNA template* ottenendo una soluzione finale di 25 µl. Le reazioni di PCR venivano poi effettuate in un termociclatore utilizzando i programmi specifici per ogni sequenza *target* così come descritti nella tabella 9.

Tab. 9. Programmi di amplificazione PCR. A: regione ipervariabile 18S rRNA per clonaggio; B: regione ipervariabile 18S rRNA per *DGGE*; C: regione ipervariabile 16S rRNA per *DGGE*; D: gene 16S rRNA intero.

Programma: CLOFUN			Programma: 18SDAS		
94°C - 3'	94°C - 1'	4°C - ind	95°C - 15'	95°C - 30"	4°C - ind
	48°C - 45"			55°C - 30"	
	72°C - 1'			72°C - 1'	
	X40			X35	
	72°C - 11'	A		72°C - 1'	B
Smit et al 1999 modificato			Das et al 2007		
Programma: DGGE-DOW			Programma: EF_16S_full2		
1	2	3	1	2	3
95°C - 15'	94°C - 1'	4°C - ind	95°C - 3'	95°C - 1'	4°C - ind
	touch down 65-55°C - 45"			50°C - 45"	
	72°C - 1'			72°C - 2'	
	X20			X35	
	94°C - 1'			72°C - 30'	D
	55°C - 45"				
	72°C - 1'				
	X10				
	72°C - 10'	C			

Analisi di restrizione del DNA ribosomiale amplificato (ARDRA)

La metodica ARDRA (*Amplified ribosomal DNA restriction analysis*) rappresenta un metodo d'indagine molecolare, impiegato per studi filogenetici e caratterizzazioni tassonomiche basate generalmente sull'analisi del gene che codifica il rRNA. I campioni amplificati tramite PCR vengono digeriti con enzimi di restrizione in grado di riconoscere specifiche sequenze nucleotidiche in modo da generare un *set* di frammenti più piccoli di varia lunghezza. Considerando che specie o ceppi microbici differenti possiedono geni rRNA di sequenza nucleotidica diversa, i frammenti generati saranno diversi sia in numero che in dimensione. Si ottengono quindi profili differenti e unici per ciascuna specie o ceppo batterico.

Nel presente lavoro di Tesi questa tecnica è stata applicata per effettuare uno *screening* sia

di cloni che degli isolati batteri. Una volta ottenuto il frammento d'interesse tramite PCR, 5 µl di ciascun amplificato veniva digerito con 2 enzimi di restrizione *HaeIII* e *RsaI* (Promega) in un tampone specifico con un volume finale di reazione pari a 10 µl. La scelta di utilizzare due diversi enzimi aveva lo scopo di aumentare il grado di discriminazione tra i campioni. Ogni campione veniva digerito a 37°C per 2h. I *fingerprintings* venivano resi visibili mediante elettroforesi su gel di agarosio come verrà spiegato nel paragrafo successivo. Dal confronto dei bandeggi ottenuti per i vari amplificati, era possibile raggrupparli in OTU (*operational taxonomic units*) i cui rappresentanti venivano sequenziati per ottenere l'identificazione tassonomica.

Elettroforesi su gel d'agarosio.

L'elettroforesi su gel d'agarosio è stata utilizzata per analizzare i prodotti di PCR in modo da verificare che si fosse ottenuto il frammento di DNA atteso senza altri prodotti aspecifici. Il principio su cui si basa la tecnica è che la molecola del DNA, carica negativamente, in un campo elettrico migra verso il polo positivo mentre la matrice porosa del gel ne ritarda la migrazione, consentendo ai frammenti più piccoli di spostarsi più velocemente rispetto a quelli più grandi. Il risultato è che i frammenti di DNA si separeranno nella matrice in funzione del loro peso molecolare.

Il tampone di elettroforesi utilizzato era il TAE 0,5x (una soluzione salina) e serviva sia a condurre la corrente elettrica sia a controllare il pH durante l'elettroforesi. I prodotti amplificati già contenevano un *loading buffer*, che facilitava il caricamento stesso e permetteva di seguire la migrazione. Venivano utilizzati gel all'1% per l'analisi del 16S intero e al 2,5% per frammenti (fino a 500 pb) utilizzati nelle analisi di DGGE e ARDRA. A corsa avvenuta i frammenti erano visibili ai raggi UV grazie alla presenza del *sybr safe*, un colorante analogo all'etidio bromuro aggiunto durante la preparazione del gel. Per rivelare le dimensioni dei frammenti, veniva utilizzato un *ladder* caricato e fatto correre insieme ai campioni. Il *ladder* appropriato veniva scelto in funzione dalle dimensioni attese dei frammenti. Per frammenti compresi tra 250 e 10000 pb il *ladder* adeguato era "GeneRuler 1Kb" (Fermentas), per frammenti compresi tra 25 e 700 pb il *ladder* usato era il "FastRulerLowRange" (Fermentas) e per l'analisi ARDRA era il *GeneRuler LowRange* (Fermentas).

L'elettroforesi su gel a gradiente denaturante (DGGE).

L'elettroforesi su gel a gradiente denaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE*) permette la separazione di piccoli frammenti di DNA (200-700bp), della stessa taglia ma di differente sequenza. La separazione avviene su gel di poliacrilammide e si basa sulla diminuzione di mobilità elettroforetica di frammenti di DNA a doppio filamento che vengono parzialmente denaturati dal gel chimico (miscela di Urea e Formamide) presente nel gel stesso. Questa tecnica è stata utilizzata nel presente lavoro di Tesi per ottenere un *fingerprinting* molecolare dei microorganismi presenti nei vari microcosmi. I frammenti analizzati con *DGGE* venivano ottenuti amplificando, dal DNA genomico, una regione ipervariabile (V3) del gene 16S utilizzando la coppia di *primers* 341 *forward* e 534 *reverse* (Muyzer et al., 1993) per i batteri. Per quanto riguarda i funghi venivano utilizzati i *primers* FUN_NS1 (Gomes et al., 2003; Oros Sichler et al., 2005) e CGfung (Das et al., 2007). All'estremità 5' del *primer forward* era unita una sequenza di 40bp ricca di C e G, definita *GC clamp*, necessaria per migliorare la stabilità degli *amplicons* durante la corsa. L'analisi dei frammenti veniva effettuata con il sistema INGENY phorU-2 con gel di poliacrilammide al 6% in TAE 0,5X (20mM Tris, 10mM acetato, 0,5 mM Na₂EDTA; pH 7.8) contenente un gradiente lineare di Urea-Formamide da 40% a 60% (il 100% di denaturante è definito come urea 7M e formammide deionizzata 40%). La scelta del gradiente veniva effettuata dopo una serie di prove dove venivano testate diverse concentrazioni di Urea-Formamide. Il gradiente veniva realizzato attraverso un apposito "gradientformer" collegato ad una pompa peristaltica che flussa il gel alla velocità costante di 5ml/min all'interno di un sistema elettroforetico verticale, miscelando le due seguenti soluzioni:

Per i batteri veniva utilizzato un gradiente compreso tra 40 e 60% mentre per i funghi uno compreso tra il 20 e 35%. La corsa elettroforetica era condotta per 16h a 100V mantenendo la temperatura costante a 60°C. Il gel veniva quindi colorato con SYBR Gold (Invitrogen) in TAE 0,5X per 30 minuti a temperatura ambiente e poi visualizzato con trans illuminatore UV dotato di macchina fotografica (ChemiDoc, BioRad).

L'analisi delle immagini relativa ai profili DGGE veniva effettuata attraverso l'utilizzo del software *Quantity-one image analysis* (Bio-RadLaboratories, Hercules, CA) stimando la biodiversità delle specie batteriche o fungine nei diversi campioni e calcolando gli indici ecologici quali:

- *Richness(S)*: numero di bande in ogni linea
- Indice di *Shannon-Weaver(H)* = $-\sum (n_i/N) \log(n_i/N)$, dove:
 n_i = altezza del picco relativo ad ogni banda;
 N = somma di tutti i picchi relativi alle bande di una linea.

Inoltre, attraverso l'analisi dell'immagine era possibile generare dei dendrogrammi sulla base della matrice di similarità calcolata utilizzando l'algoritmo UPGAMA.

PCR quantitativa (qPCR).

Questa tecnica, è un metodo di amplificazione e quantificazione simultanee di un frammento *target* del DNA, la quantificazione è visibile grazie all'uso di fluorocromi che si intercalano nella doppia elica di DNA. Il punto in cui viene rilevato il segnale di fluorescenza è ad ogni ciclo di amplificazione, cioè nella fase esponenziale della reazione, quando ancora tutti i reagenti si trovano in concentrazioni ottimali. L'intensità della fluorescenza aumenta proporzionalmente per ciascun ciclo in funzione della concentrazione di *amplicon*. Il primo ciclo al quale lo strumento riesce a discriminare il valore della fluorescenza prodotta e rilevarne il livello al di sopra del rumore di fondo, è definito *Ct* o ciclo soglia. Maggiore è la quantità di *template* di DNA presente inizialmente nel campione, minore sarà il valore di *Ct* ad esso relativo. Tale tecnica, veniva usata per quantificare il numero di copie del gene 16S per i batteri e il numero di copie dello spaziatore intergenico ITS per i funghi.

In tabella 10 vengono riportati i *primers* utilizzati nelle reazioni di *qPCR*, rispettivamente per i batteri e i funghi, e nelle figure 10a e 10b vengono riportati i profili termici.

Tab. 10. Sequenze utilizzate in *qPCR*.

<i>PRIMERS</i>	<i>SEQUENZA</i>	<i>CONCENTRAZIONE FINALE</i>	<i>SPECIFICITA'</i>
<i>341F_hplc</i>	CCTACGGGAGGCAGCAG	0,05 µM	regione ipervariabile 16S batterico
<i>534R_hplc</i>	ATTACCGCGGCTGCTGG	0,9 µM	
<i>efITS1F</i>	CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA	0,2 µM	spaziatore intergenico ITS1-ITS4 fungino
<i>efITS4</i>	TCCTCCGCTTATTGATATGC	0,2 µM	

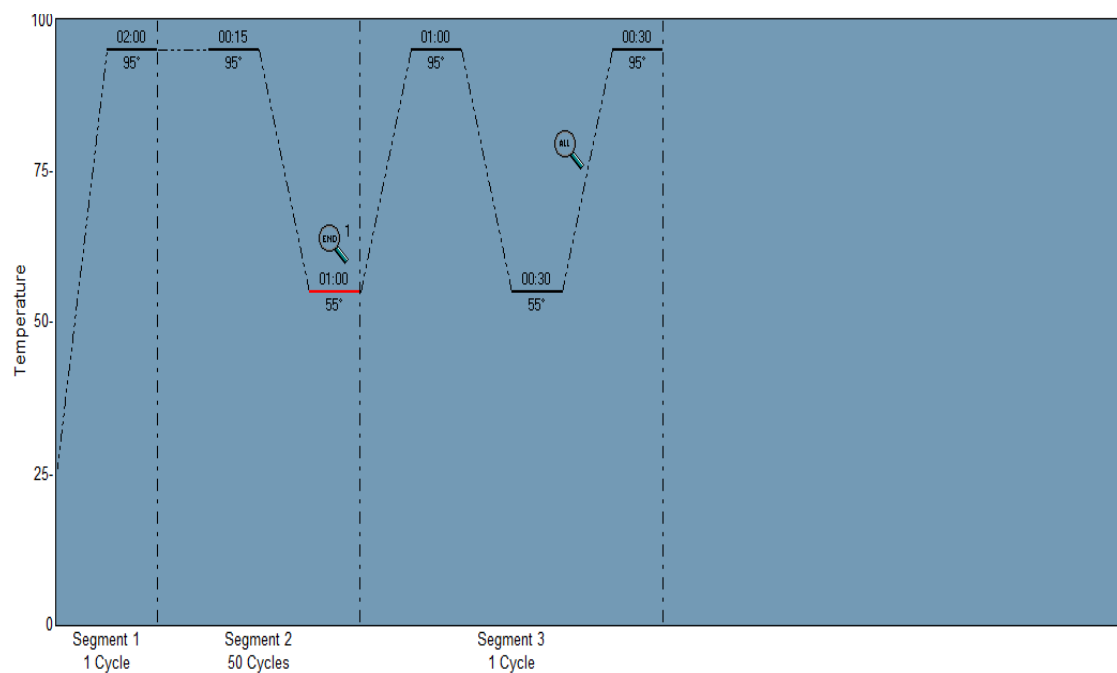


Fig. 10a. Profilo termico per la *qPCR* per i batteri.

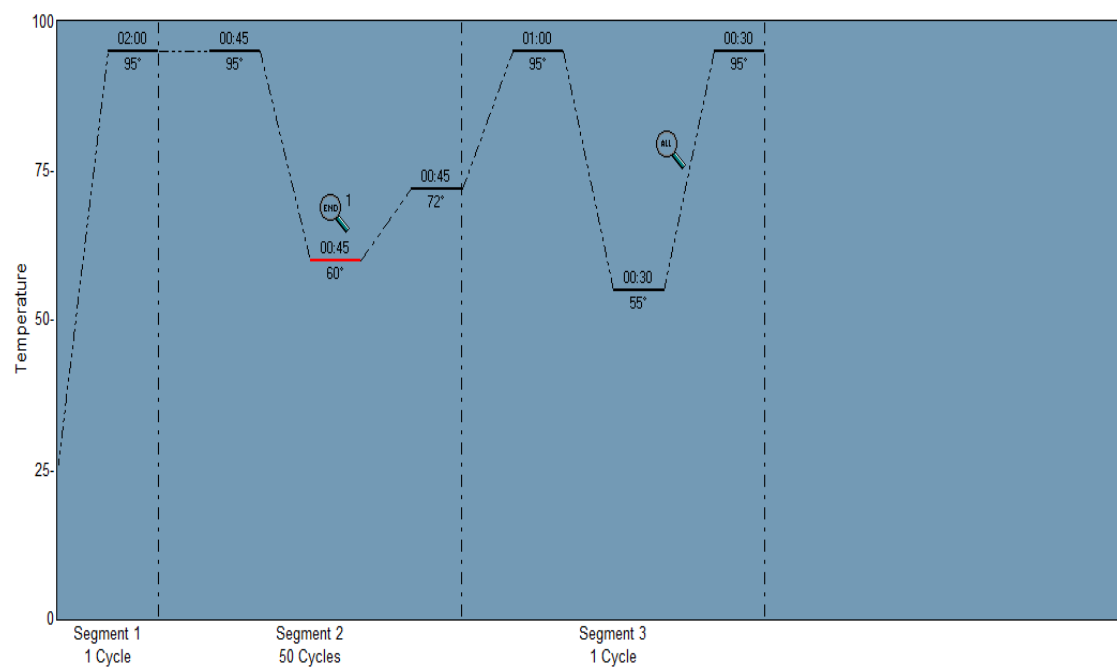


Fig. 10b. Profilo termico per la *qPCR* per i funghi.

Per la reazione di amplificazione veniva usato il kit GoTaq qPCR (Promega), il quale forniva tutti i reagenti fatta eccezione della coppia di *primers* e dell'H₂O per diluire i reagenti. Il volume della reazione era di 25µl (2µl di Dna e 23µl di mix) ed ogni amplificazione era effettuata in duplicato. La reazione era effettuata impiegando lo strumento Mx3000P (Stratagene) gestito dal *software* MxPro QPCR.

In questo lavoro di tesi vengono usate le metodologie di quantificazione in qPCR, ciascuna adatta ad una diversa applicazione: la quantificazione assoluta e la quantificazione relativa. Nel primo caso, la quantità assoluta, incognita, del *template* da misurare viene dedotta per interpolazione con i valori di una curva “*standard*” ottenuta dai Ct relativi all’amplificazione di un *template*, a concentrazione nota, diluito serialmente. Nella quantificazione relativa invece, vengono paragonati i valori di Ct ottenuti nell’amplificazione del gene di interesse, con quelli ottenuti dall’amplificazione di un gene di riferimento detto “*housekeeping gene*”.

Il calcolo delle variazioni relative dell’abbondanza delle copie geniche vengono espresse come *fold* applicando la seguente formula:

$$\textbf{Fold} = 2^{\Delta\text{Ct}}$$

Dove **Fold** indica la quantità di copie relativa al campione controllo mentre, ΔCt è la differenza tra i Ct campione *target* e i Ct relativi al campione.

Tramite questa formula è possibile ottenere il numero di copie in più o in meno del gene target.

Clonaggio e sequenziamento

Una parte del gene 18S è stato amplificato utilizzando la coppia di *primers* EF4 (GGAAGGGRTGTATTATTAG) e Fung5 (GTAAAAGTCCTGGTTCCCC).

I prodotti di PCR erano purificati con il EuroGold Gel Extraction Kit seguendo il protocollo del kit. I prodotti purificati venivano clonati utilizzando pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) seguendo le istruzioni fornite dal kit stesso e lo *screening* dei cloni ottenuti, è stato eseguito attraverso ARDRA. I cloni venivano sottoposti a PCR al fine di identificare quelli contenenti l’inserito d’interesse e per il successivo *screening* attraverso l’uso di enzimi di restrizione.

Nella reazione di amplificazione si utilizzava come *template* una colonia “picchettata”

casualmente dalle piastre su cui venivano fatti sviluppare i cloni derivati dalle librerie di clonaggio. Le colonie venivano amplificate direttamente (senza essere sospese nel tampone) utilizzando sempre i *primers* EF4 e Fung5. Dei prodotti di PCR ottenuti, 5 µl venivano sottoposti ad una digestione multienzimatica con gli enzimi di restrizione *HaeIII* e *RsaI* (Promega) a 37°C per 2h. I frammenti così ottenuti venivano separati su gel d'agarosio al 2,5%. I cloni da cui si ottenevano profili differenti venivano selezionati per il successivo sequenziamento.

Il DNA plasmidico dei cloni di nostro interesse è stato estratto utilizzando Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) seguendo le istruzioni fornite dal produttore del kit.

Gli inserti sono stati amplificati utilizzando il *primer* T7 attraverso il servizio fornito da BMR Genomics.

Le sequenze ottenute sono state “ripulite” dalle sequenze del plasmide tramite il *software* VecScreen e quindi confrontate con quelle depositate nelle banche dati GenBank al fine di ottenere una loro assegnazione tassonomica.

3.3 ANALISI CHIMICHE

Quantificazione acido tannico residuo in colture batteriche.

Da ciascuna coltura batterica venivano prelevati 5 µl e trattati per l'estrazione liquido / liquido con 12 ml di alcool etilico (Carlo Erba, Milano, Italia) e tenendo in agitazione per 5 minuti. L'estrazione per ogni campione veniva eseguita in doppio, e gli estratti venivano combinati e trasferiti in una *vial* da 25 ml; il precipitato era disgregato tramite sonicazione per 30 min (Eia, CP823 mod.). Le analisi venivano effettuate da un sistema ad alta prestazione Liquid Chromatography-DAD (HPLC-DAD), secondo le metodologie proposte da Cawthray (2003). La separazione avveniva su colonna a fase inversa Nova-pack C18 a temperatura ambiente. Il gradiente usato, costituito da solvente A (acqua / acido acetico, 98:2, v / v) e il solvente B (acqua / acetonitrile / acido acetico, 78:20:2, v / v / v) veniva applicato come segue: 0 - 80% B lineare da 0 a 55 min ad una portata di 1,1 ml/min; 80-90% B lineare 55-57 min, con flusso di 1,2 ml/min; 90% B isocratica da 57 a

70 min, 1,2 ml/min; 90-95% B lineare da 70 a 80 min, 1,2 ml/min; da 95 a 100% B da 80 a 90 min, 1,2 ml/min. La rilevazione era eseguita mediante la scansione 190-400 nm, registrato durante l'intero processo. Identificazione di acido tannico era effettuato confrontando il tempo di ritenzione e dati spettrali di ciascun picco con quelli standard da Extrasynthese (Milano, Italia).

Determinazione della concentrazione residua di Carbamazepina nel fango contaminato “ad hoc”

L'estrazione del farmaco avveniva tramite ASE (Accelerated Solvent Extraction) seguendo la procedura suggerita da Barron e collaboratori (2008).

Nella cella di estrazione erano trasferiti 9 g di campione precedentemente mescolati con sabbia

Il solvente di estrazione era MeOH: H₂O 50:50 v/v. Temperature e pressioni per l'estrazione del *target* analitico erano rispettivamente di 60 °C e 1 500 psi.

La quantificazione della carbamazepina avveniva utilizzando Dionex 3000 Ultimate HPLC con rilevatore UV a 230 nm. La separazione cromatografica veniva effettuata iniettando 20 µl di campione in una colonna Grace Smart RP18 (250nm x 4mm). La fase mobile era costituita per un 65% da acido acetico 6.9 mmol/L (pH4) e 35% da acetonitrile aggiunti isocraticamente a 1ml/min (Stafiej et al., 2007). Il tempo di ritenzione per la carbamazepina era di circa 8,4 min.

3.4 ANALISI STATISTICA

Analisi della coinertia.

L'analisi della coinertia (COIA) è un metodo di ordinamento lineare basato sull'analisi di una matrice di covarianza, che permette un ordinamento simmetrico di due serie di dati (ter Braak & Verdonschot, 1995). E' considerato uno strumento particolarmente versatile perché permette l'ordinamento anche di matrici con un diverso numero di variabili e di

utilizzare qualsiasi tipo di *data-set* e ordinamento (*Principal Component Analysis*, *Canonical Analysis*, *Multiple Correspondence Analysis*). La versatilità dell'utilizzo della COIA è dimostrata dal suo largo utilizzo in campo ecologico su serie storiche, in studi su comunità di ambienti lotici e di aree umide (Statzner et al., 1997; Dray et al., 2003).

Prima di procedere con la COIA, ciascuna matrice è stata ordinata separatamente mediante una PCA (*Principal Component Analysis*). La COIA ha quindi ordinato simultaneamente le due matrici ed ha definito gli assi che spiegano simultaneamente la maggiore varianza possibile di entrambi i *data-set* descrivendo la co-struttura più vicina possibile ad entrambi i singoli ordinamenti.

La correlazione tra i due ordinamenti è data dal coefficiente RV che può essere considerato come un equivalente multidimensionale del coefficiente di correlazione tra due variabili (Robert & Escoufier, 1976). Sulla matrice di coinertia è stato eseguito infine il test di permutazione di Monte Carlo per verificare che la distribuzione dei due data-set non fosse casuale ($P < 0.05$).

RISULTATI E DISCUSSIONE

1. APPROFONDIMENTI DI ECOLOGIA MICROBICA DEL PROCESSO DI COMPOSTAGGIO DEGLI SCARTI DERIVANTI DAI FRANTOI OLEARI.

Date le grandi potenzialità del compostaggio come strumento per la valorizzazione e il riciclaggio degli scarti dei frantoi oleari a due fasi (*TPOMW*), in questa prima parte della tesi verranno approfonditi gli aspetti di ecologia microbica legati alla trasformazione della matrice di partenza in un compost di buona qualità.

In particolare il compostaggio di questo sottoprodotto verrà monitorato nel tempo al fine di ottenere una caratterizzazione chimico fisica e microbiologica del processo, focalizzando l'attenzione sugli aspetti ecologici legati alle dinamiche delle comunità microbiche ed al loro ruolo funzionale, durante le varie fasi del processo.

Si passerà quindi all'analisi della biodiversità microbica di un *set* di compost derivanti da TPOMW ma ottenuti con diverse strategie tecnologiche e che presentavano caratteristiche chimico-fisiche molto diverse tra loro.

1.1 CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA E MICROBIOLOGICA DEL PROCESSO DI COMPOSTAGGIO di *TPOMW*

Lo scopo di questo studio era di monitorare le modificazioni dei parametri chimico-fisici parallelamente allo studio delle dinamiche di comunità microbiche per meglio comprenderne il ruolo funzionale durante il compostaggio.

1.1.1 RISULTATI

Cambiamenti chimico-fisici durante il processo di compostaggio.

Durante il processo di compostaggio, durato 140 giorni, venivano monitorati i parametri chimico fisici. Periodicamente venivano quindi prelevati campioni di compost sui quali l'Istituto per i Sistemi Agricoli e Forestali del Mediterraneo (ISAFoM) del Consiglio Nazionale delle Ricerche provvedeva a fornire i dati chimico-fisici. I parametri che meglio spiegano l'evoluzione del processo di compostaggio erano la temperatura, il contenuto in sostanza organica e il pH. Inoltre, nel caso del compostaggio della sansa era anche interessante valutare il contenuto in polifenoli, considerati responsabili della fitotossicità di questi scarti. (Hachicha et al., 2009a).

Come si può osservare dal grafico in figura 11, l'andamento della temperatura mostrava un iniziale aumento che già dopo trenta giorni sfiorava i 60°C per raggiungere un picco di temperatura intorno ai 70°C verificatosi dopo circa due mesi e mezzo dall'inizio della sperimentazione. Raggiunto il picco massimo, si assisteva ad una progressiva diminuzione della temperatura che a fine processo si stabilizzava tra i 45 e i 35°C. In funzione delle modificazioni della temperatura del cumulo durante la sperimentazione, era possibile distinguere le tipiche fasi del compostaggio quali: una prima fase mesofila di attivazione (0-25 giorni) a cui seguiva una fase termofila (45-90 giorni) e una fase mesofila finale di raffreddamento e maturazione (118-139 giorni).

L'andamento della sostanza organica riportato nel grafico in figura 12, rilevava la trasformazione della matrice soprattutto durante la fase termofila, infatti, nei primi venti giorni non si avevano diminuzioni importanti della sostanza organica come quelli che

avvenivano invece tra i venticinque e i cento giorni in cui la perdita era di circa il 60 %.

In Fig. 13 viene riportato il grafico relativo al pH. Si osservava una progressiva alcalinizzazione del cumulo di partenza; la matrice, infatti, era caratterizzata da un iniziale pH acido di 4.4 che durante l'intero processo subiva un progressivo aumento fino a stabilizzarsi intorno a valori compresi tra 8 e 9.

E' interessante notare come il contenuto in polifenoli della matrice, veniva abbattuto per più del 60% già dopo il primo mese, e a cui poi seguiva una diminuzione più lenta ma costante che si protraeva fino alla quasi completa scomparsa osservata alla fine processo (Fig. 14).

Per valutare l'abbattimento della fitotossicità, tipico della sansa, venivano effettuate prove di germinabilità su semi di *Lepidium sativum*. I risultati mostrano un abbattimento della fitotossicità dal giorno novanta, quando il **Germination Index** riportava valori superiori al 70%. (Tab. 11).

Tab. 11. Evoluzione dei parametri chimico-fisici durante il processo di compostaggio.

	Time (d)						
	0	24	45	69	90	118	139
Moisture (%)	59,9	57,5	51,3	32,1	46,9	48,3	48,0
pH	4,41	6,22	6,87	8,41	9,14	7,97	8,45
EC (dS m ⁻¹)	2,24	1,74	2,02	2,24	2,51	2,14	1,87
Ash (%)	6,78	6,84	10,34	11,69	14,18	14,50	14,99
C/N	28,21	25,92	18,92	20,01	13,05	14,52	13,86
OM loss (%)	0,00	0,98	36,98	45,07	56,00	56,83	58,78
N-Mineral (%N-tot)	1,88	0,88	0,45	6,31	5,37	1,28	0,52
WSOC (%)	4,96	4,24	4,61	3,68	4,08	2,90	2,82
TEC (%)	25,72	24,02	23,29	16,14	19,32	15,66	17,04
HA + FA (%)	17,78	18,55	16,72	13,31	15,82	12,12	13,16
DH (%)	69,13	77,21	71,79	82,50	81,90	77,39	77,23
HR (%)	36,54	36,96	36,03	31,39	38,37	32,01	33,85
HI	0,45	0,30	0,39	0,21	0,22	0,29	0,29
Polyphenols (g kg ⁻¹)	4,85	2,01	1,40	0,98	0,44	0,22	0,16
GI (%)	0	0,50	2,40	5,10	70,9	42,5	73,5

OM = Organic Matter, **WSOC** = Water Soluble Organic Carbon, **TOC** = Total Organic Carbon; **TEC** = Total Extracted organic Carbon; **HA** = Humic Acid; **FA** = Fulvic Acid, **DH** = Degree of Humification = (HA+FA)x100/TEC; **HR** = Humification Rate = (HA+FA)x100/TOC; **HI** = Humification Index = [TEC – (HA+FA)]/(HA+FA); **GI** = Germination index, expressed as % of control; **EC** = Electrical conductivity

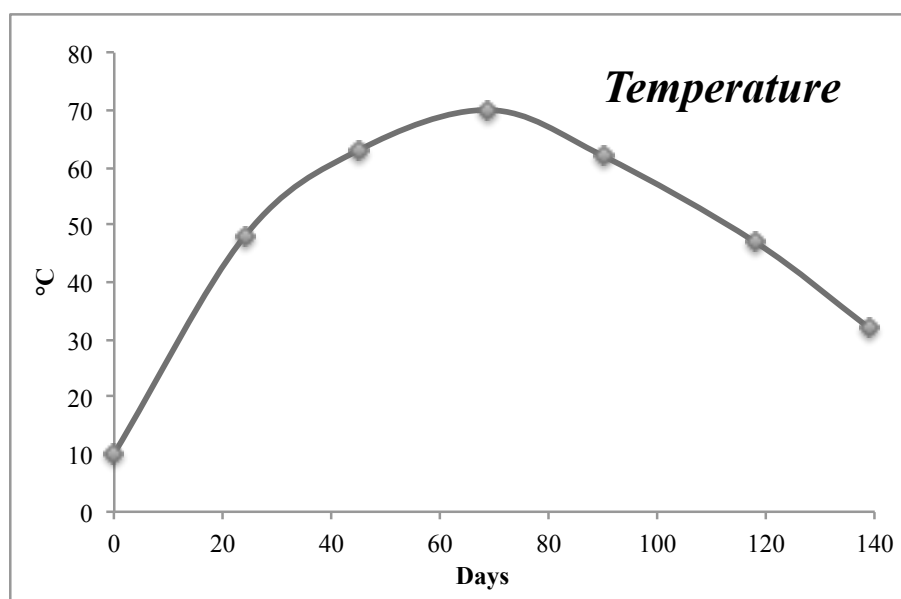


Fig. 11. Temperatura registrata durante il processo di compostaggio del *TPOMW*.

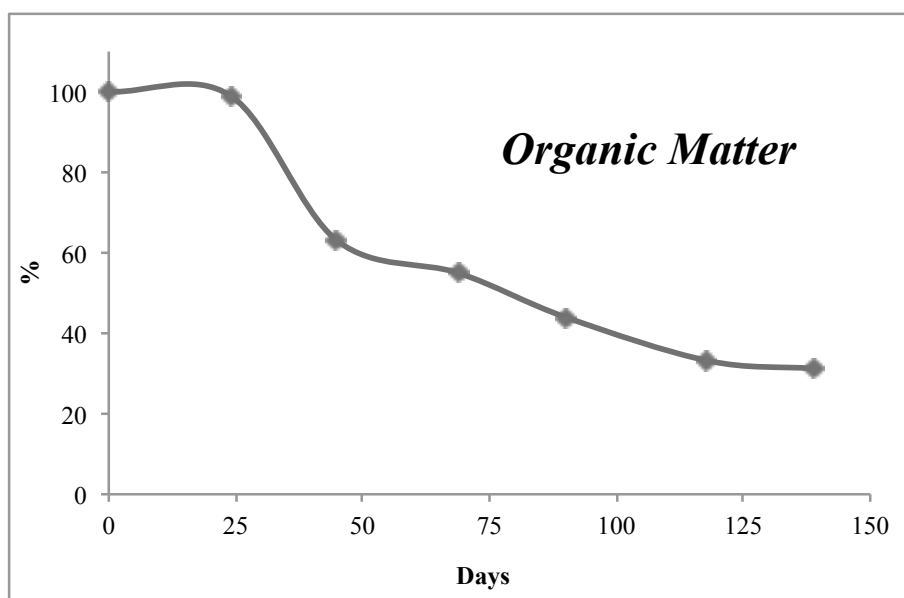


Fig. 12. Percentuale di degradazione della sostanza organica registrata durante il processo di compostaggio del *TPOMW*.

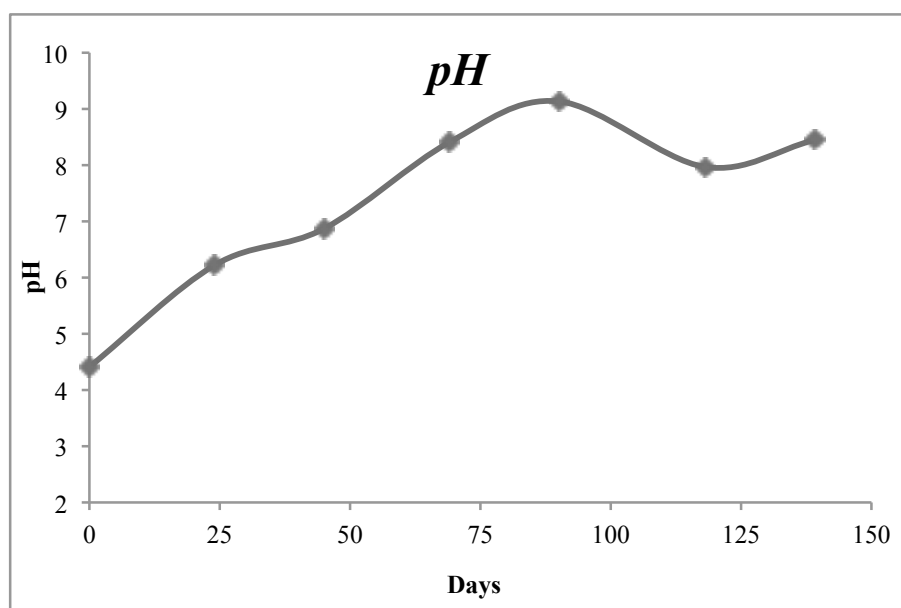


Fig. 13. Valori di pH registrati durante il processo di compostaggio del *TPOMW*.

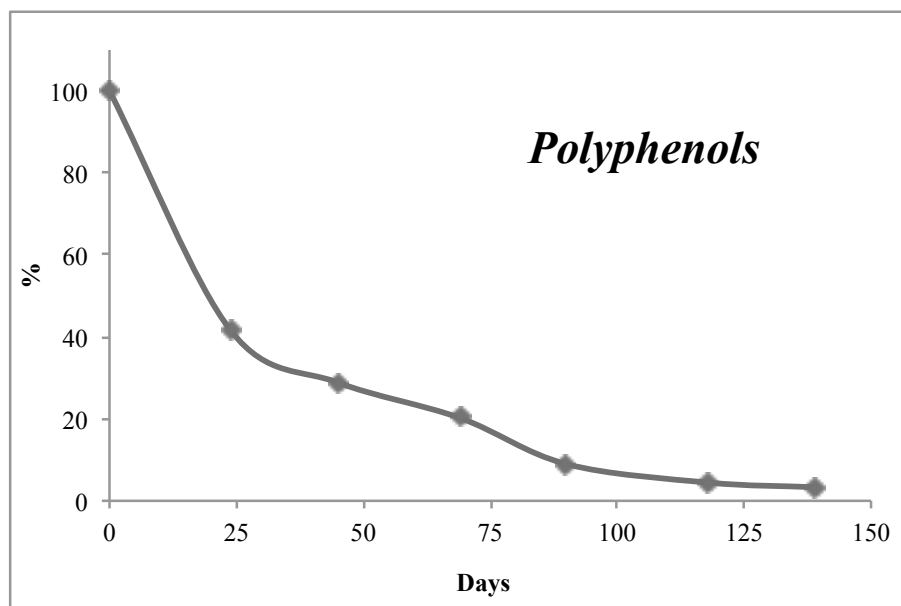


Fig. 14. Percentuale di abbattimento dei polifenoli registrati durante il processo di compostaggio del *TPOMW*.

Dinamiche della comunità batterica durante il compostaggio

Per studiare le dinamiche delle popolazioni batteriche durante il compostaggio, veniva per prima cosa valutata l'abbondanza dei batteri mesofili e termofili presenti nelle varie fasi del processo (Fig. 15).

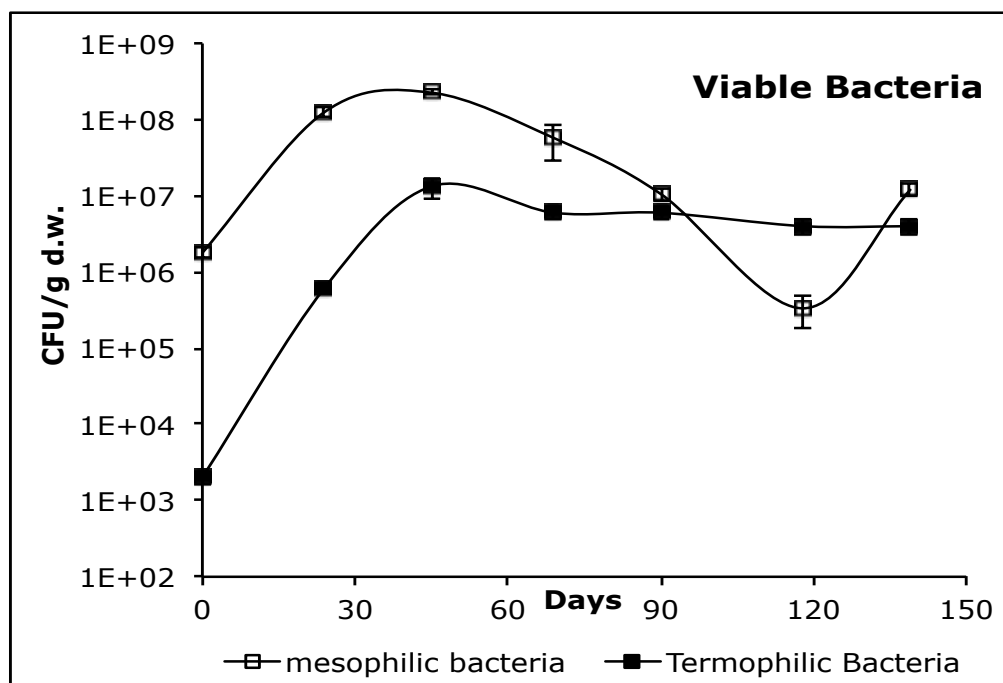


Fig. 15. Concentrazione dei batteri eterotrofi mesofili e termofili durante il compostaggio. I valori, espressi come CFU g⁻¹ d.w. rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti e le barre d'errore indicano la deviazione standard.

I batteri mesofili e termofili avevano due *trend* diversi. I batteri mesofili erano predominanti durante la fase iniziale del compostaggio ed aumentavano di circa due ordini di grandezza nei primi quarantacinque giorni, quando la temperatura era ancora intorno ai 60°C. Durante la fase termofila, le temperature raggiunte dal cumulo, con un picco massimo di 70°C, causavano un crollo del numero di batteri che passavano da $2,2 \times 10^8$ a $3,3 \times 10^5$ CFU/g registrato al giorno 118. Solo durante la fase mesofila finale, quando le temperature si ristabilivano sotto i 50 °C si aveva un riaumento della biomassa batterica che raggiungeva approssimativamente gli stessi valori osservati all'inizio del processo. I batteri termofili, al contrario, mostravano già da subito un aumento progressivo del loro numero passando rapidamente da 2×10^3 a $1,33 \times 10^7$ nei primi quarantacinque giorni, e mantenendosi stabili durante l'intera fase termofila e fino alla fine del processo.

Per studiare le trasformazioni della struttura della comunità e quindi la sua evoluzione durante il processo, veniva applicata l'analisi *DGGE* che ne permetteva il monitoraggio nel tempo, restituendo un *fingerprinting* della comunità visualizzato come da una serie di bande ogn'una delle quali rappresentava una specifica popolazione (Fig. 16).

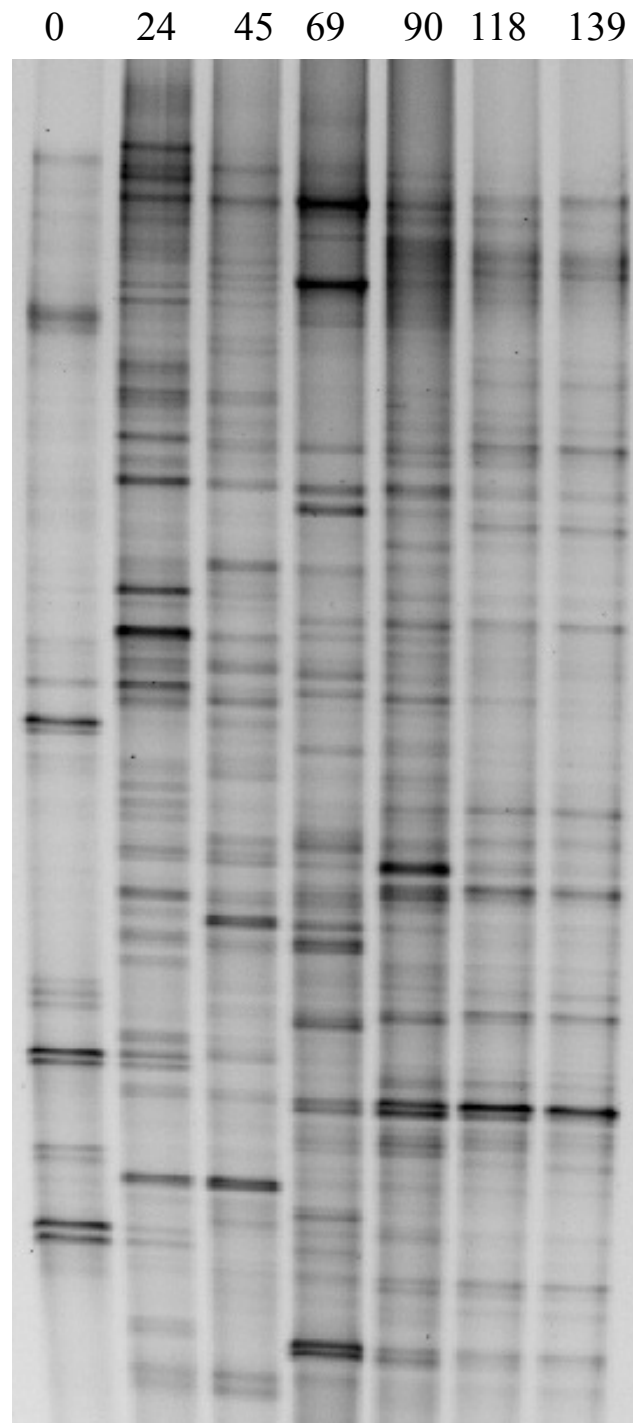


Fig. 16. Profili DGGE del frammento del gene 16S rRNA amplificato dei campioni prelevati durante il processo di compostaggio.

I risultati mostravano un'alta biodiversità della matrice compostata e una rapida successione di differenti popolazioni microbiche durante il processo. In particolare, durante i primi ventiquattro giorni si assisteva a profonde modificazioni nella composizione della comunità in cui si aveva un rapido aumento della biodiversità come indicato dall'aumento dei valori riportati dagli indici di *Richness* e *Shannon-Weaver* riportati in tabella 12 (S e H passavano rispettivamente da 25 a 46 e da 2,75 a 3,53) e la diminuzione dei valori dell'indice di dominanza di *Simpson* (da 0,083 a 0,037). Inoltre i profili ottenuti durante questa fase erano estremamente diversi gli uni dagli altri. Nella fase termofila (45-90 giorni), durante la quale veniva registrata la più importante attività di biotrasformazione, la biodiversità rimaneva elevata e i profili mostravano una alta variabilità. Al contrario, nella fase mesofila (dal giorno 118 a 139), la biodiversità diminuiva e la struttura di comunità tendeva a stabilizzarsi, tanto che gli ultimi due campioni mostravano lo stesso profilo.

Tab. 12. Indici ecologici ottenuti dall'analisi dei profili DGGE delle comunità batteriche dei campioni prelevati durante il compostaggio. (**S**): Richness; (**H**) indice di diversità Shannon-Weaver; (**D**) indice di dominanza di Simpson; (**E**) Evenness.

	Time (day)						
	0	24	45	69	90	118	139
<i>S</i>	25	46	44	40	41	36	34
<i>H</i>	2,75	3,53	3,44	3,30	3,39	3,18	3,08
<i>D</i>	0,08	0,03	0,04	0,04	0,04	0,06	0,07
<i>E</i>	0,85	0,92	0,90	0,89	0,91	0,88	0,87

Ruolo funzionale di popolazioni batteriche isolate durante il processo di compostaggio.

Per meglio comprendere il ruolo funzionale dei batteri durante le due fasi del processo, veniva valutata l'attività tannasica dagli isolati ottenuti dalla fase termofila (69 giorno) e da quella mesofila (139 giorno e fine del processo). E' stata scelta la tannasi come modello dell'attività enzimatica per identificare le popolazioni batteriche responsabili della degradazione dei polifenoli che veniva osservata durante il processo di compostaggio.

La tabella 13 riporta la lista dei ventidue isolati tannasi positivi, la fase da cui sono stati isolati, la loro attività tannasica e la loro identificazione filogenetica.

I ceppi positivi mostravano un viraggio di colore dal verde al marrone del terreno di coltura e un'assorbanza (A_{440}) compresa tra 0,620 a 1,410.

Solo nove isolati mostravano una forte attività tannasica con i valori di assorbanza maggiori di uno. Sette dei nove isolati derivava dalla fase termofila ed appartenevano alle specie: *Staphylococcus pasteurii*, *Microbacterium esteraromaticum*, *Microbacterium indicum*, *Kocuria palustris*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Tetrathiobacter kashmirensis* e *Pseudomonas stutzeri*.

I ventidue isolati tannasi positivi identificati, appartenevano a sedici differenti specie dei phyla *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Firmicutes*. Gli isolati ottenuti dalla fase termofila erano di nove differenti specie, di cui il phylum *Actinobacteria* era quello maggiormente rappresentato.

Sui quattro isolati (cT184, cT220, cT234 and cT246) con una forte attività tannasica, appartenenti a generi per cui fino ad ora non era stata costatata quest'attività, veniva testata la capacità di crescere con acido tannico come unica fonte di carbonio.

Le curve di crescita, insieme alle curve di degradazione dell'acido tannico, vengono riportate in figura 17. In tutti i ceppi veniva confermata la loro capacità di degradare l'acido tannico e livelli massimi di crescita dopo 12-18h.

Tab. 13. Attività tannasica e identificazione filogenetica degli isolati batterici ottenuti dalla fase termofila e mesofila del compostaggio di TPOMW.

Bacterial isolate ^a	Tannase (A ₄₄₀) ^b	Length (bp) ^c	Accession number	Closest match ^d	Similarity (%) ^e	Phylum
<i>Thermophilic phase</i>						
cT253	0.972	928	JF303046	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.8	Firmicutes
cT259	0.998	821	JF303041	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.6	Firmicutes
cT260	0.577	885	JF303047	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.8	Firmicutes
cT218	1.180	932	JF303035	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	100	Firmicutes
cT219	1.110	958	JF303044	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	98.6	Actinobacteria
cT222	1.260	978	JF303037	<i>Microbacterium indicum</i>	96.9	Actinobacteria
cT242	0.654	908	JF303045	<i>Microbacterium foliorum</i>	98.5	Actinobacteria
cT220	1.160	949	JF303036	<i>Kocuria palustris</i>	99.9	Actinobacteria
cT246	1.270	903	JF303040	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	99.9	Actinobacteria
cT224	1.410	925	JF303038	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99.7	Proteobacteria
cT234	1.180	974	JF303039	<i>Tetrathobacter kashmirensis</i>	99.7	Proteobacteria
<i>Mesophilic phase</i>						
cT168	0.628	934	JF303026	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.9	Firmicutes
cT170	0.681	932	JF303027	<i>Bacillus mojavensis</i>	100	Firmicutes
cT179	0.675	884	JF303028	<i>Bacillus cereus</i>	99.9	Firmicutes
cT182	0.763	977	JF303030	<i>Bacillus cereus</i>	99.9	Firmicutes
cT184	1.165	936	JF303031	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	100	Firmicutes
cT185	1.104	977	JF303032	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	100	Firmicutes
cT201	0.747	937	JF303034	<i>Staphylococcus caprae</i>	99.9	Firmicutes
cT209	0.660	981	JF303043	<i>Micrococcus luteus</i>	99.7	Actinobacteria
cT194	0.709	963	JF303033	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	100	Proteobacteria
cT171	0.658	890	JF303042	<i>Pseudomonas terrae</i>	97.3	Proteobacteria
cT180	0.621	911	JF303029	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99.8	Proteobacteria

a: Batteri isolati al giorno 69 (fase termofila) e al giorno 139 (fase mesofila) del compostaggio di TPOMW.

b: Attività tannasica espressa come assorbanza a 440 nm.

c: Lunghezza del frammento del gene 16S rRNA amplificato con i *primers* 8F e 1507 e sequenziati con primer 8F.

d: Identificazione ottenuta con ricerca con BLAST del database GenBank e con Seqmatch del Ribosomal Database Project.

e: Percentuale di similarità tra la sequenza e il ceppo di riferimento trovato in GenBank.

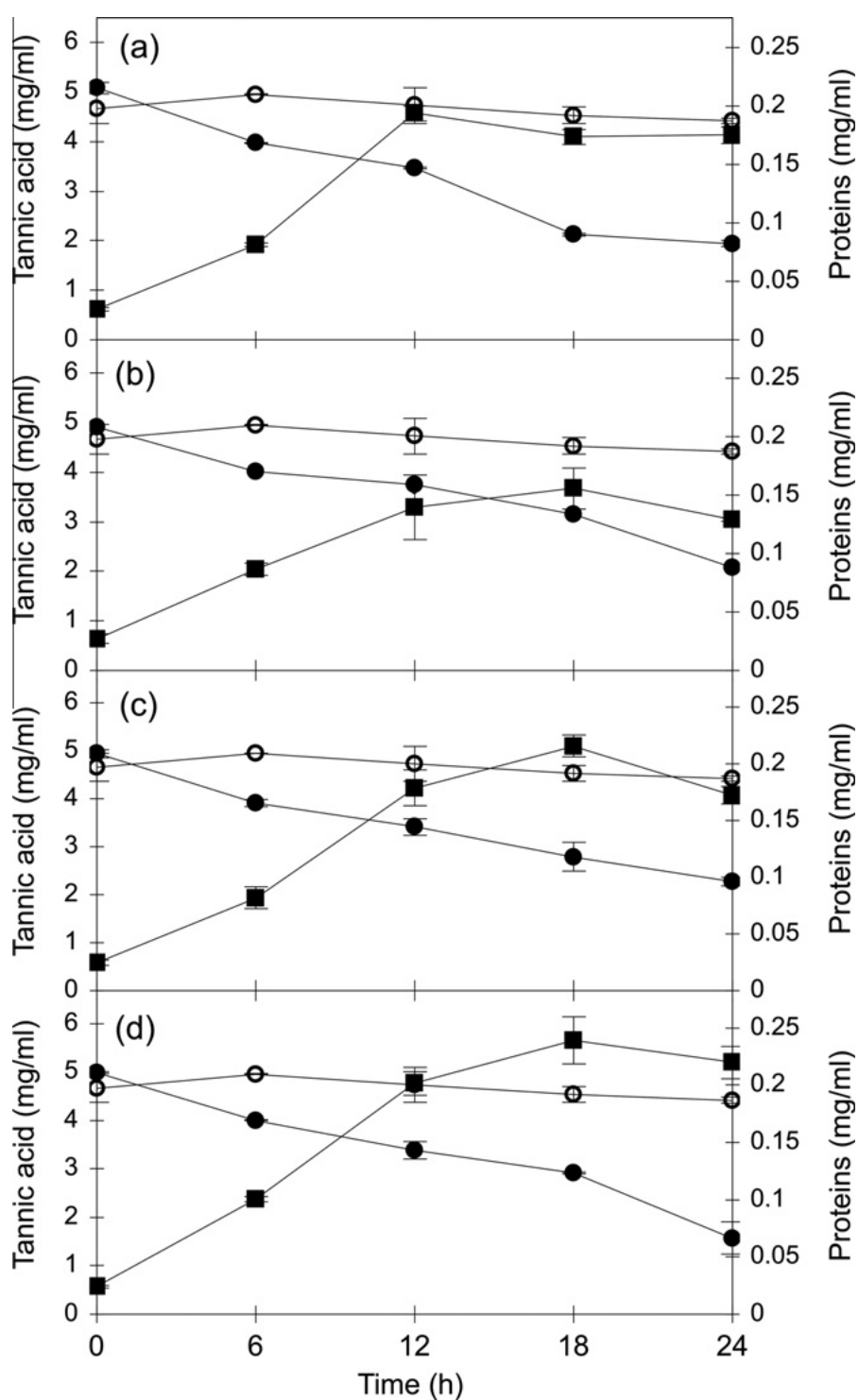


Fig.17. Crescita batterica stimata come concentrazione delle proteine totali (■) e degradazione in presenza (●) o assenza (○) dell'isolato: *L. fusiformis* cT184(a), *K. palustris* cT220 (b), *T. kashmirensis* cT 234 (c) and *R. rhodochrous* cT246 (d). I valori rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti e le barre d'errore indicano la deviazione standard.

Dinamiche della comunità fungina durante il compostaggio

Anche per lo studio delle comunità fungine ci si avvaleva di metodi coltura dipendenti per la quantificazione dei microrganismi e metodi molecolari quali l'analisi *DGGE* per lo studio delle variazioni della struttura di comunità durante il processo.

Sia i funghi mesofili che termofili, presentavano un andamento molto simile (Fig 18). Nelle prime fasi del processo si assisteva ad un aumento del numero di individui che era particolarmente marcato per i funghi termofili che passavano da 1×10^2 CFU/g *d.w.* a 1×10^5 CFU/g *d.w.* E' interessante notare come il numero dei funghi subiva un marcato calo in corrispondenza dell'inizio della fase termofila quando le temperature cominciavano a salire. In particolare i funghi mesofili cominciavano a diminuire già dopo trenta giorni quando ancora le temperature erano intorno ai 45-50°C, mentre i funghi termofili diminuivano quando la temperatura registrata era di circa 60°C. Un comportamento di questo tipo, facilmente spiegabile per i microrganismi mesofili, suggeriva che i funghi termofili presentano un *range* di tolleranza al calore più basso rispetto a quello dei batteri termofili, e quindi lo *shock* termico veniva subito da entrambe le comunità fungine portando ad un calo del loro numero. La successiva fase mesofila, in cui si aveva una diminuzione della temperatura, permetteva ai funghi, sia mesofili sia termofili, un aumento del loro numero fino a raggiungere un'abbondanza paragonabile a quella di partenza.

I profili *DGGE*, riportati in Figura 19, della comunità fungina durante il processo di compostaggio permettono di costatare una vera e propria trasformazione della struttura di comunità durante il processo. In questo rispetto, l'analisi numerica dell'immagine fornisce la possibilità di calcolare gli indici ecologici di diversità (Tab. 14) e di rappresentare la similarità delle comunità attraverso un dendrogramma (Fig. 20).

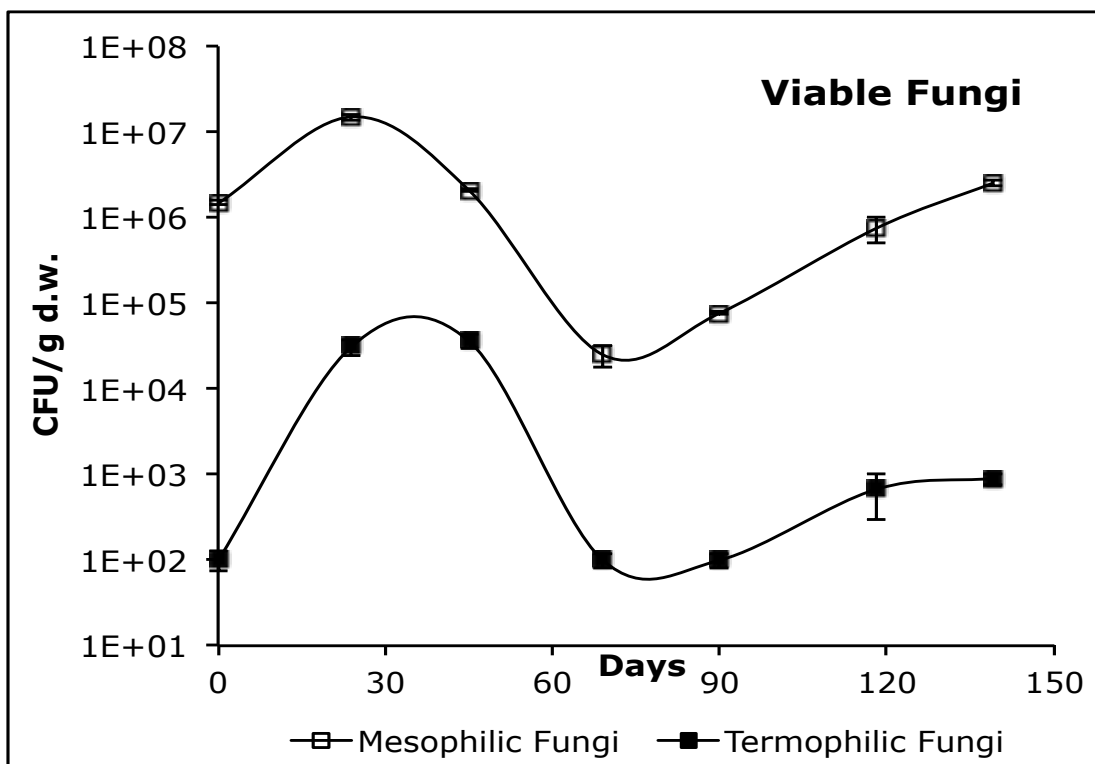


Fig.18. Concentrazione dei batteri eterotrofi mesofili e termofili durante il compostaggio. I valori, espressi come CFU g⁻¹ d.w. rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti e le barre d'errore indicano la deviazione standard.

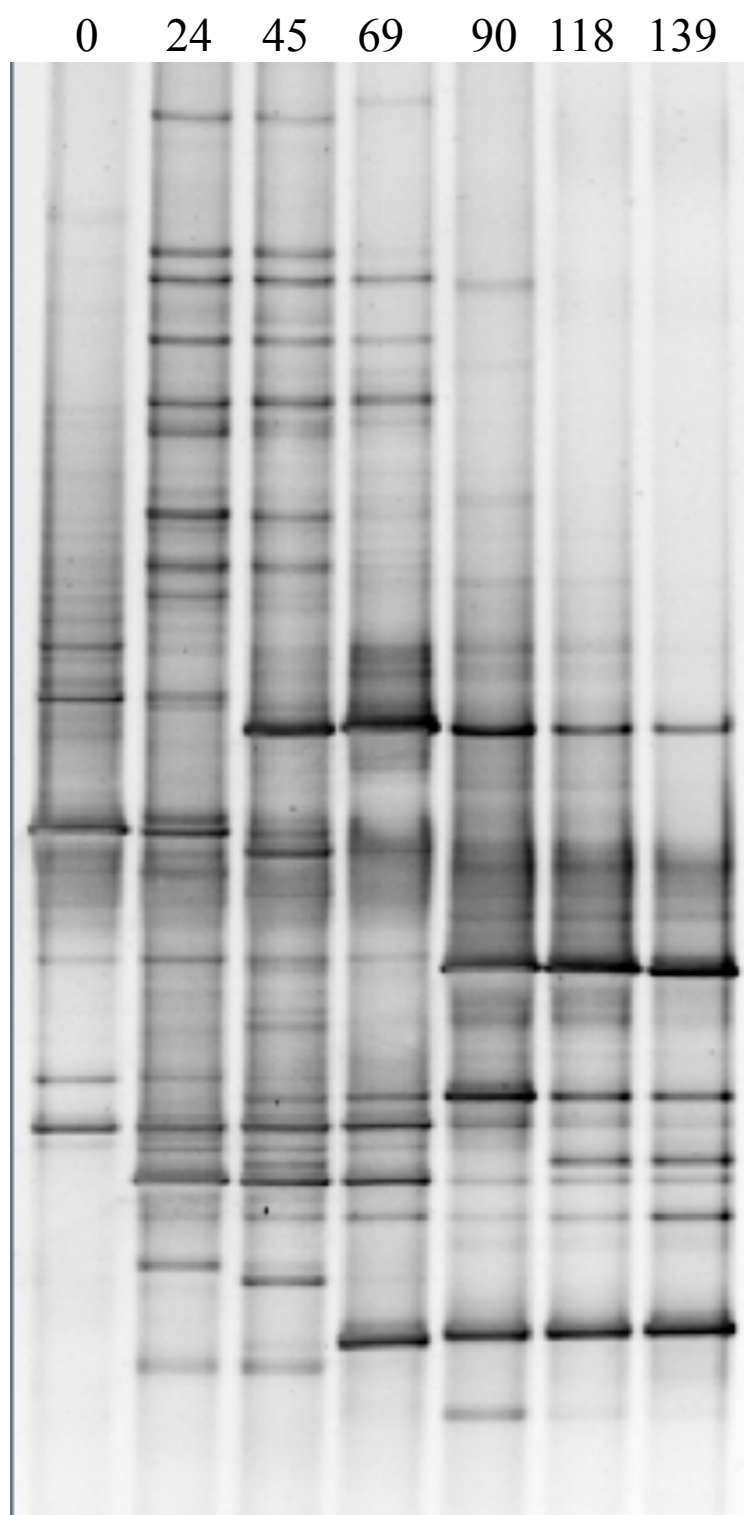


Fig. 19. Profili DGGE del frammento del gene 18S rRNA amplificato dei campioni prelevati durante il processo di compostaggio.

Al tempo iniziale, la comunità era caratterizzata da una bassa biodiversità imputabile alle popolazioni naturalmente presenti nella matrice di partenza. Già dopo venticinque giorni e soprattutto dopo quarantacinque, si aveva una completa e continua trasformazione della comunità con un importante aumento della biodiversità soprattutto in corrispondenza dell'inizio della fase termofila (45 giorni). Al sessantanovesimo giorno, si assisteva ad una drastica riduzione del numero di specie presenti, come indicato dagli indici di *Richness* e *Shannon-Weaver* (*S* e *H* passavano rispettivamente da 24 a 18 e da 3,02 a 2,51) (Tab. 14), probabilmente dovuta alle alte temperature che raggiungevano un picco di 70°C. La fase mesofila finale, registrava, invece una stabilizzazione della composizione della comunità, infatti, i profili al tempo 118 e 139 erano praticamente identici con una similarità superiore al 90% (Fig. 20).

Tab. 14. Indici ecologici ottenuti dall'analisi dei profili DGGE delle comunità fungine dei campioni prelevati durante il compostaggio. (**S**): Richeness; (**H**) indice di diversità Shannon-Weaver; (**D**) indice di dominanza di Simpson; (**E**) Evenness.

	Time (day)						
	0	24	45	69	90	118	139
<i>S</i>	10	25	24	18	17	15	14
<i>H</i>	1,94	3,06	3,02	2,51	2,43	2,31	2,25
<i>D</i>	0,17	0,05	0,06	0,10	0,11	0,13	0,13
<i>E</i>	0,84	0,95	0,95	0,87	0,86	0,85	0,85

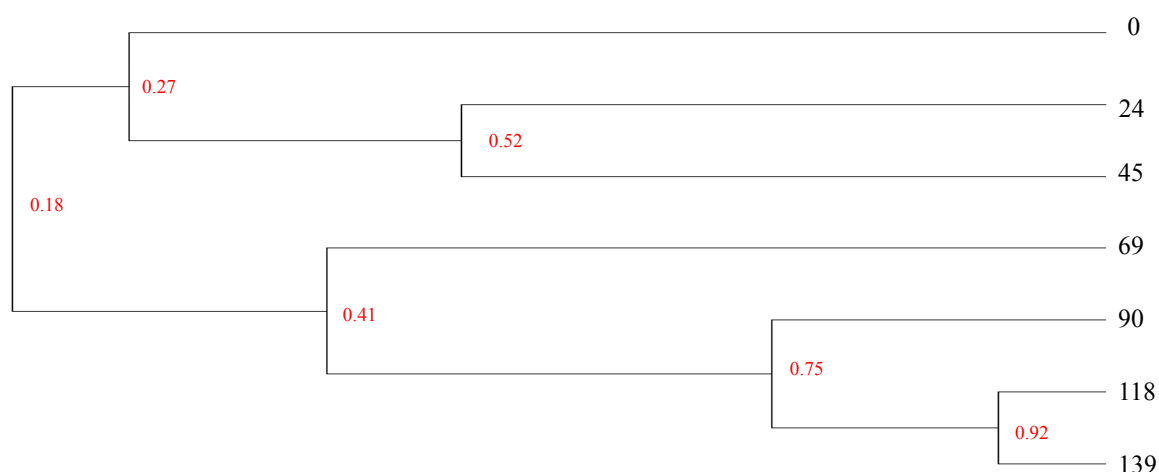


Fig. 20. Dendrogramma di similarità delle comunità fungine ottenute dai profili DGGE usando il metodo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means*). I numeri sui nodi rappresentano il grado di somiglianza.

Identificazione delle specie fungine coinvolte nelle fasi del processo di compostaggio.

Per meglio comprendere le dinamiche della comunità fungina, venivano identificate, attraverso il clonaggio e il sequenziamento, le specie presenti nelle diverse fasi del compostaggio, in particolare: nella fase iniziale (giorno 0), fase termofila (giorno 45) e fase di mesofila finale (giorno 118). Per ogni campione veniva costruita una libreria di 100 cloni. Lo screening dei 300 cloni totali, attraverso doppia digestione enzimatica (Hae III & RsaI), generava venti OTU (Unità tassonomiche operative). Ogni rappresentante di OTU veniva sequenziato, e la sequenza (520 pb) veniva comparata direttamente con quelle presenti in GenBank usando BlastN. In tabella 15 vengono riportati i risultati dei cloni identificati. Erano stati trovati 15 differenti generi di cui quattordici appartenenti al phylum *Ascomycota* e uno appartenente al phylum *Basidiomycota*.

La collocazione filogenetica delle sequenze fungine ottenute dalle librerie di cloni vengono riportate in figura 21. L'albero era caratterizzato da due grandi gruppi *Ascomycota* e *Basidiomycota*. Nel gruppo degli *ascomyceti*, le specie appartenevano a due subphylum diversi: il subphylum *Saccharomycotina*, di cui facevano parte alcune specie di lieviti dei generi *Candida* e *Saccharomyces*, e il subphylum *Pezizomycota* costituito principalmente dalle classi *Eurotiomycetes*, *Sordariomycetes* e *Leotiomycetes*.

Al giorno 0 la comunità fungina era costituita per la maggior parte da lieviti. Al giorno 45 si assisteva ad una loro netta diminuzione, mentre si aveva un aumento delle specie appartenenti al subphylum *Pezizomycotina*; in particolare si riscontrava un'alta diversità soprattutto a livello di specie appartenenti al genere *Aspergillus*. Nella fase mesofila di maturazione si aveva la comparsa di basidiomyceti rappresentati dal genere *Coprinopsis*, che comunque non era il gruppo dominante; infatti, la maggior parte delle specie identificate apparteneva agli ascomyceti ed in particolare al subphylum *Pezizomycotina*, mentre non venivano ritrovate specie appartenenti al subphylum *Saccharomycotina*.

Come riportato in figura 22 le comunità fungine dei tre campioni erano strutturate in maniera diversa. La comunità fungina, nella fase termofila (45 gg) era caratterizzata da una più alta diversità rispetto agli altri due campioni, e si osservava la dominanza di 3 generi quali *Thermomyces* (33%), *Chaetomium* (31%) e *Aspergillus* (27%). Le comunità presenti nella fase iniziale e finale del compostaggio erano caratterizzate da una più bassa biodiversità e la dominanza di un unico genere che nella fase iniziale era rappresentato dal genere *Candida* (66%) e nella fase mesofila finale dal genere *Basipetospora* (73%).

Tab. 15. Identificazione tassonomica dei cloni con BLAST del *database* GenBank.

Clone	bp	Time (days)	Identity (%)	Specie	Genus	GenBank
7	554	0	99	<i>Candida pomicola</i>	<i>Candida</i>	FJ153127
8	552	0	99	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces</i>	JX021604
9	556	0	98	<i>Chaetosphaeria ciliata</i>	<i>Chaetosphaeria</i>	GU180614
13	555	0	99	<i>Phialosimplex chlamydosporus</i>	<i>Phialosimplex</i>	GQ169326
18	551	0	98	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Torulaspora</i>	AY964120
23	555	0	99	<i>Eurotium herbariorum</i>	<i>Aspergillus</i>	JX839684
28	553	0	99	<i>Candida pomicola</i>	<i>Candida</i>	FJ153127
33	555	0	97	<i>Candida pomicola</i>	<i>Candida</i>	FJ153127
34	554	0	98	<i>Candida pomicola</i>	<i>Candida</i>	FJ153127
36	555	0	99	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces</i>	JX021604
55	552	0	99	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces</i>	JX021604
56	554	0	99	<i>Candida pomicola</i>	<i>Candida</i>	FJ153127
63	554	0	99	<i>Candida pomicola</i>	<i>Candida</i>	FJ153127
1	555	45	99	<i>Chaetomium thermophilum</i>	<i>Chaetomium</i>	JQ067904
2	556	45	99	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	<i>Aspergillus</i>	GQ398088
5	555	45	98	<i>Aspergillus nomius</i>	<i>Aspergillus</i>	JF416646
35	556	45	100	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	<i>Thermomyces</i>	EF468714
40	556	45	99	<i>Chaetomium thermophilum</i>	<i>Chaetomium</i>	JQ067904
41	553	45	95	<i>Candida zeylanoides</i>	<i>Candida</i>	EF687772
54	556	45	97	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	<i>Thermomyces</i>	EF468714
56	556	45	98	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	<i>Thermomyces</i>	EF468714
58	554	45	99	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	<i>Thermomyces</i>	EF468714
60	556	45	99	<i>Trichocladium asperum</i>	<i>Trichocladium</i>	AM292054
62	555	45	99	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus</i>	JQ425074
65	552	45	99	<i>Candida zeylanoides</i>	<i>Candida</i>	EF687772
72	557	45	99	<i>Aspergillus nomius</i>	<i>Aspergillus</i>	JF416646
73	557	45	99	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus</i>	JQ425074
77	555	45	99	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium</i>	JX480902
80	537	45	99	<i>Candida boidii</i>	<i>Candida</i>	JQ698882
85	556	45	99	<i>Chaetomium thermophilum</i>	<i>Chaetomium</i>	JQ067904
102	555	45	99	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus</i>	JQ425074
4	563	118	98	<i>Microascus manginii</i>	<i>Microascus</i>	JN939033
5	556	118	98	<i>Microascus manginii</i>	<i>Microascus</i>	JN939033
6	554	118	97	<i>Chalara siamense</i>	<i>Chalara</i>	FJ176284
20	558	118	99	<i>Coprinopsis cinerea</i>	<i>Coprinopsis</i>	JN939901
23	556	118	99	<i>Microascus manginii</i>	<i>Microascus</i>	JN939033
28	557	118	98	<i>Cephalotheca foveolata</i>	<i>Cephalotheca</i>	AB278171
41	554	118	98	<i>Chalara siamense</i>	<i>Chalara</i>	FJ176284
42	557	118	95	<i>Basipetospora chlamydospora</i>	<i>Basipetospora</i>	AB024046
43	465	118	97	<i>Basipetospora chlamydospora</i>	<i>Basipetospora</i>	AB024046
44	556	118	99	<i>Basipetospora chlamydospora</i>	<i>Basipetospora</i>	AB024046
46	523	118	98	<i>Chalara siamense</i>	<i>Chalara</i>	FJ176284
48	556	118	99	<i>Basipetospora chlamydospora</i>	<i>Basipetospora</i>	AB024046
51	556	118	98	<i>Microascus manginii</i>	<i>Microascus</i>	JN939033
53	556	118	99	<i>Basipetospora chlamydospora</i>	<i>Basipetospora</i>	AB024046
61	556	118	99	<i>Basipetospora chlamydospora</i>	<i>Basipetospora</i>	AB024046

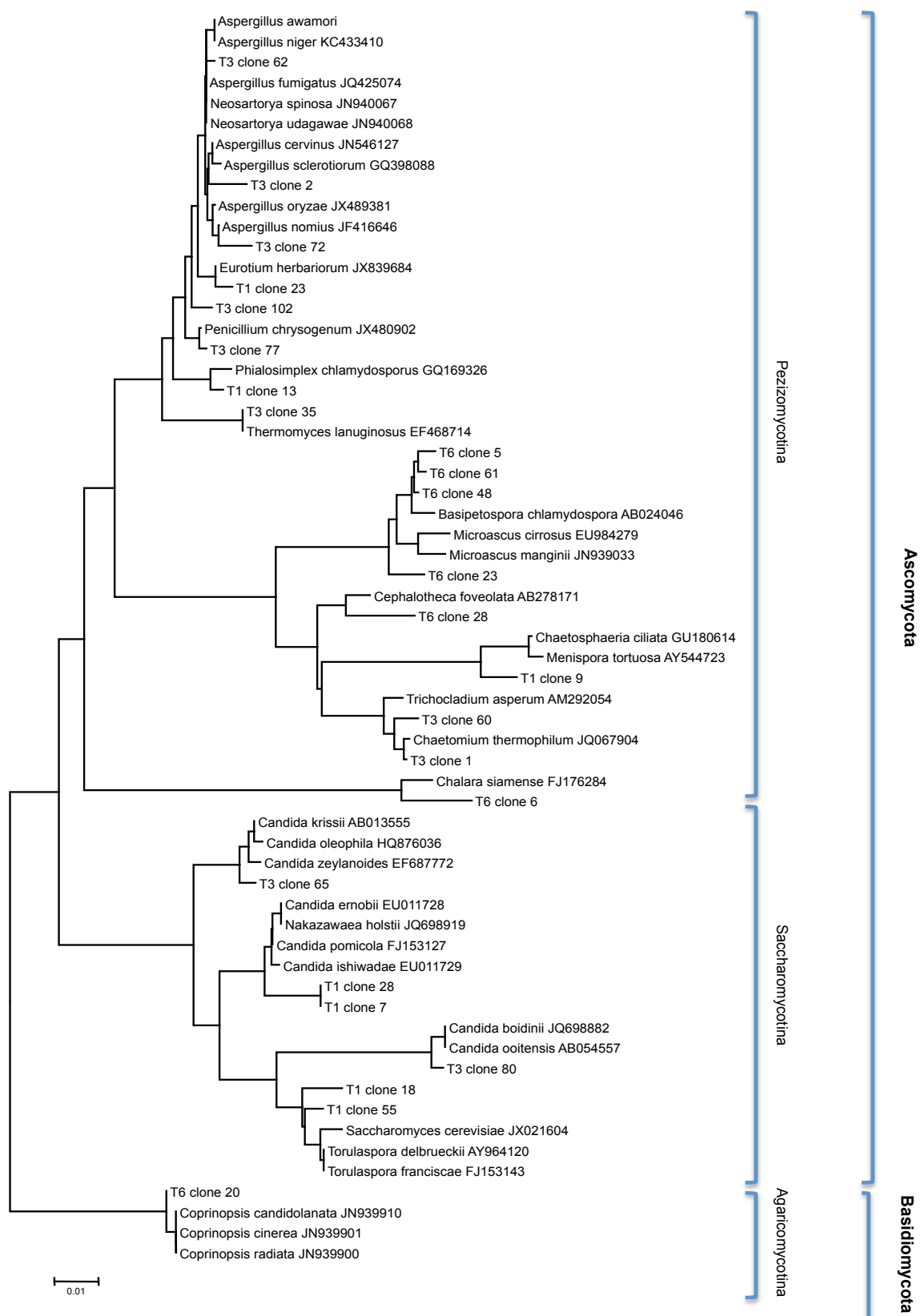


Fig. 21. Albero *Neighbour-joining* che mostra le relazioni filogenetiche dei cloni ottenuti al giorno 0 (T1), 45 (T3) e 118 (T6) del processo di compostaggio di *TPOMW*.

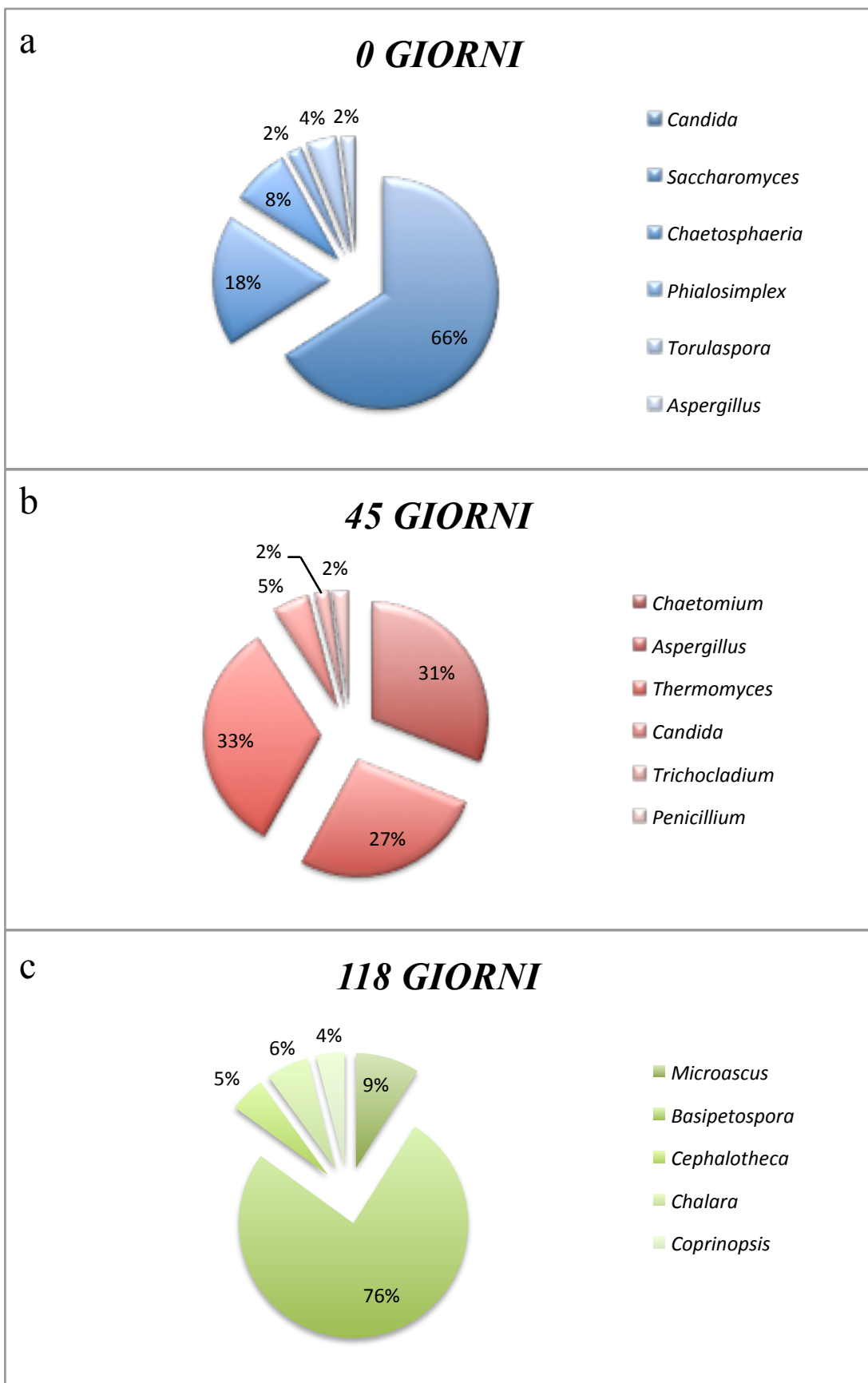


Fig. 22. Composizione della comunità fungina al giorno 0 (a), 45 (b) e 118 (c) del processo di compostaggio *TPOMW*. Vengono riportati i generi presenti in ciascuna comunità.

1.1.2 DISCUSSIONE

Durante il processo di compostaggio monitorato per 140 giorni, la temperatura del cumulo seguiva il tipico *trend* del compostaggio, caratterizzato da una breve fase di attivazione, seguito da un rapido aumento della temperatura che raggiungeva un picco di 70°C dopo settanta giorni. La fase termofila, durata circa tre mesi, veniva stimolata attraverso il rivoltamento meccanico del cumulo. Dopo circa 100 giorni la matrice entrava nella fase mesofila in cui la temperatura diminuiva e raggiungeva i 40-50 °C, suggerendo che l'attività microbica e la trasformazione della sostanza organica stavano rallentando. Una fase termofila così prolungata può essere tipica del compostaggio di questo tipo di scarto, come riportato anche da altri autori che confermano questo andamento (Cayuela et al., 2006; Hachicha et al., 2009a,b). L'iniziale acidità del pH, tipico di questo tipo di residui, in pochi giorni raggiungeva valori prossimi all'optimum previsto per il compostaggio (Miller, 1992). La liberazione di azoto ammoniacale prodottosi nelle prime fasi del processo, induceva un notevole aumento di pH che tendeva a stabilizzarsi in corrispondenza della fase di maturazione quando ormai l'attività degradativa della sostanza organica era giunta al termine. Questo tipo di andamento è stato già in precedenza osservato per il compostaggio dei residui solidi dei frantoi spagnoli (Alburquerque et al., 2006).

Come risultato della mineralizzazione, il rapporto C/N diminuiva drasticamente determinando un apparente arricchimento di azoto nel compost in quanto, molto dell'azoto ritrovato durante tutto il processo, era N-organico. Per quanto concerne la degradazione della sostanza organica, il processo di mineralizzazione sembrava interessare maggiormente la frazione di carbonio organico solubile (WSOC) rispetto alla frazione umificata. Questo comportamento poteva essere spiegato dal fatto che la frazione WSOC include composti a basso peso molecolare che sono maggiormente accessibili alla degradazione microbica rispetto alla frazione umificata.

E' interessante notare come il contenuto in polifenoli della matrice, veniva abbattuto per più del 60% già dopo il primo mese e dopo il quale seguiva una diminuzione più lenta ma costante, che si protraeva fino alla quasi completa scomparsa dei polifenoli che si verificava in corrispondenza della fine del processo. Ciò potrebbe trovare spiegazione nel fatto che i microrganismi presenti nella prima fase del processo erano in grado di utilizzare i fenoli come fonte di nutrimento causandone, quindi, la scomparsa. Questo dato è particolarmente interessante considerando che la sansa viene definita comunemente un

antibatterico, mentre questo viene smentito da queste analisi in cui si registrava un abbattimento dei polifenoli nei primissimi stadi del processo. Una possibile spiegazione potrebbe essere che la sansa viene considerata un antibatterico in riferimento alle comuni specie patogene, che in effetti non sono mai stati ritrovati in questa matrice. Al contrario, tra i microrganismi ambientali esistono specie che riescono a vivere anche alle alte concentrazioni di queste componenti antibatteriche e che sono anche in grado di degradarle, rendendo poi possibile la colonizzazione della matrice ad altre specie che non occupano la loro stessa nicchia ecologica. La scomparsa dei polifenoli comportava inoltre una diminuzione della fitotossicità, permettendo l'impiego di questo compost come ammendante per piante.

Per esplorare la diversità microbica durante il compostaggio venivano utilizzati metodi coltura-dipendenti e molecolari.

In particolare mentre l'isolamento delle specie batteriche permetteva di effettuare uno studio del ruolo funzionale dei batteri durante il processo, l'uso della *DGGE* consentiva di valutare i cambiamenti della struttura delle due comunità. Il clonaggio e sequenziamento usati per i funghi, ha permesso l'identificazione anche di *taxa* fungini che non era possibile ottenere con gli approcci coltura dipendenti (Ivors et al., 2002). E' importante specificare che entrambe le coppie di *primers* usati in *DGGE* e clonaggio dei funghi, amplificavano parte del gene rRNA18S e che un frammento di circa 170 pb veniva amplificato da entrambe le coppie di *primers*.

I risultati ottenuti rivelavano una continua trasformazione della comunità durante tutto il processo di compostaggio.

La fase iniziale, caratterizzata dall'abbondanza di batteri e funghi mesofili, indicava il loro importante ruolo di attivi degradatori della sostanza organica fresca; L'attività metabolica di questi microrganismi, modificando il substrato iniziale, creava le condizioni adatte per altre specie microbiche assenti nella matrice di partenza. Questo veniva dimostrato sia dal progressivo aumento della biomassa batterica e fungina, sia dall'aumento della biodiversità e variabilità dei profili riscontrati in *DGGE*. In particolare per quanto concerne i funghi, la comunità era caratterizzata dalla presenza di poche specie mesofile, soprattutto lieviti appartenenti al genere *Candida* e *Saccharomyces*. Altri autori hanno riscontrato la presenza di lieviti nella fase iniziale del processo (Hansgate et al., 2005) di compostaggio ed in particolare Bonito e collaboratori (2010) attraverso il clonaggio e il sequenziamento hanno potuto riscontrare la netta dominanza del genere *Candida* nella fase iniziale del compostaggio dei rifiuti solidi urbani.

Hultman e collaboratori (2010), nel determinare la successione della comunità fungina durante il compostaggio di rifiuti solidi urbani, sottolinea l'importanza dei lieviti appartenenti al subphylum *Saccaromycotina*. Questi, vengono considerati fondamentali in questa fase, per il compostaggio di materiale acido, in quanto, essendo in grado di crescere a pH basso, possono promuovere la riduzione dell'acidità e un aumento dei batteri termofili come riportato anche da Choi et Park (1998).

In concomitanza con la trasformazione della sostanza organica e l'aumento di temperatura, si assisteva ad una trasformazione delle comunità microbiche; sia quella batterica che fungina mostravano una netta diminuzione dell'abbondanza degli organismi mesofili, ma un aumento della biodiversità; In particolare, per quanto riguarda i batteri, veniva riscontrata una dominanza di specie appartenenti al phylum *Actinobacteria*. E' noto in letteratura che gli *Actinobacteria* giocano un ruolo chiave durante la fase termofila del compostaggio poiché sono in grado di tollerare le alte temperature, il pH basico e sono noti per la loro capacità di degradare le sostanze ligninolitiche e cellulosiche (Ryckeboer et al., 2003; Tuomela et al., 2000). Inoltre le nove specie isolate in questa fase erano caratterizzate da una forte attività tannasica. La tannasi, veniva usata come modello per identificare le popolazioni batteriche responsabili della degradazione dei polifenoli che si registrava durante il compostaggio. Questo suggeriva il coinvolgimento di queste popolazioni nell'abbattimento della fitotossicità propria della matrice di partenza. Tra le specie tannasi positive identificate, *Staphylococcus*, *Microbacterium* and *Pseudomonas* sono già note per la loro attività tannasica (Chowdhury et al., 2004; Noguchi et al., 2007; Belur et al., 2011), mentre i generi *Kocuria*, *Rhodococcus* e *Tetrathiobacter* vengono riportati da noi per la prima volta. Per quanto riguarda la comunità fungina, questa fase termofila iniziale (45 giorni) era caratterizzata da una più alta biodiversità con dominanza di specie termotolleranti e termofile, appartenenti ai generi *Chaetomium*, *Thermomyces* e *Aspergillus*; in particolare quest'ultimo mostrava una più alta diversità di specie. Molti funghi termofili, da noi ritrovati, come *Aspergillus fumigatus*, *Chaetomium thermophile*, *Thermomyces lanuginosus* sono stati isolati da altri autori durante il compostaggio di differenti matrici, quali per esempio *mushroom compost* (Straatsma et al., 1994), *municipal waste compost* (Kane e Mullins 1973) e *pig manure compost* (Klamer e Söchting 1998). Considerando che la temperatura è uno dei fattori limitanti della crescita fungina e che la maggior parte dei funghi è mesofila con un optimum di 25-30°C, la comparsa di specie termofile e/o termotollerante evidenziava l'importanza del ruolo di questi organismi in questa fase.

In particolare la loro presenza sembrava essere associata alla degradazione di sostanze ligninolitiche, (Tuomela et al., 2000), infatti, *Thermomyces lanuginosus* e *Chaetomium thermophilum* sono già noti per la loro capacità di degradare questa tipologia di sostanze (Sharma et al., 2008)

In natura, i più efficienti degradatori delle sostanze ligninolitiche sono i *Basidiomycotina*, ma in accordo con quanto riportato da Mouchacca (1997), questi, essendo soprattutto mesofili sono difficilmente rintracciabili nella fase termofila.

In concomitanza del periodo in cui veniva registrato il picco massimo di temperatura, 73°C al 68 giorno, si notava che mentre la quantità di batteri termofili rimaneva costante, come anche la biodiversità della comunità, nei funghi si osservava una brusca diminuzione sia della quantità di biomassa ma anche della biodiversità. Cahyani e collaboratori (2004) descrivendo l'evoluzione della comunità fungina durante il compostaggio di paglia di riso, distinguono la comunità in due gruppi, uno predominante prima del raggiungimento del picco di temperatura, e uno predominante nel periodo successivo al raggiungimento della temperatura massima. Anche se i nostri risultati mostrano una costante trasformazione della comunità durante tutto il processo, è chiaro che in questa fase termofila il picco di temperatura raggiunto dal cumulo (70°C) crea una selezione delle popolazioni presenti. Alla luce di quanto detto sopra, sembra chiaro che la comunità fungina risulta essere molto più sensibile alle alte temperature rispetto ai batteri come già riportato da altri autori. In particolare Hassen e collaboratori (2001) osservavano che la comunità fungina, diminuiva significativamente a temperature intorno ai 55-60°C, durante il compostaggio dei rifiuti solidi urbani.

Entrando nella fase di raffreddamento e maturazione, l'attività microbica si riduce, le caratteristiche chimico-fisiche del compost si stabilizzano e le temperature ricominciano a scendere. In questa fase si riscontra un aumento della biomassa microbica mesofila. Interessante notare la persistenza delle alte concentrazioni dei batteri termofili durante quest'ultima fase che può essere tipico del processo di compostaggio della sansa umida (Baeta-Hall et al., 2005) ma non degli altri scarti dell'industria olearia come per esempio l'acqua di vegetazione (Hachicha et al., 2009b). In questa fase sia per la comunità batterica sia per la comunità fungina si osservava una diminuzione della biodiversità e una stabilizzazione dei profili. La maggior parte delle specie batteriche isolate ed identificate in questa fase appartenevano al phylum *Firmicutes* ed in particolare alla famiglia delle *Bacillaceae*. I Bacilli spesso sono stati trovati nel compost anche se considerati tipici della fase termofila (Ryckeboer et al., 2003). Data la persistenza dell'alta concentrazione di

batteri termofili nella fase mesofila, il nostro risultato è coerente con quanto riportato in letteratura. È interessante notare che, mentre due dei bacilli tannasi-positivo, *B. licheniformis* e *B. cereus*, erano già noti per possedere attività tannasica (Mondal et al., 2000, 2001), i due ceppi che mostrano una forte attività tannasica erano entrambi identificati come *Lysinibacillus fusiformis*, una specie batterica trovata, per la prima volta ad avere una tale attività enzimatica.

Per quanto riguarda la comunità fungina, durante questa fase venivano identificate specie appartenenti agli *ascomyceti* ed una sola appartenente ai *basidiomyceti*. In letteratura le specie da noi identificate, quali *Cephalotheca foveolata*, *Chalara siamense* non erano mai state ritrovate durante il compostaggio, mentre *Coprinopsis cinerea* (basidiomycota), *Microascus manginii* e *Basipetospora chlamydospora* venivano identificati in altri studi sul compostaggio (Tuomela et al., 2000; Anastasi et al., 2002; Li et al., 2012). Importante sottolineare, inoltre, che la presenza di basidiomiceti solo in questa ultima fase, è in accordo con quanto riportato da altri autori, in cui i basidiomiceti, apparivano durante il compostaggio solo durante la fase di raffreddamento o maturazione (Nusbaumer et al., 1996; Tuomela et al 2000).

Le analisi riguardanti la struttura delle comunità microbiche durante il compostaggio indicano chiaramente che sia il numero di batteri e funghi sia la loro diversità sono legate alle differenti fasi del processo di compostaggio. Questo suggerisce anche che i cambiamenti chimico-fisici relativi alla biotrasformazione della sostanza organica, avvenuti soprattutto durante la fase termofila, sono guidati da una rapida successione di molte popolazioni batteriche e fungine specializzate.

1.2 CARATTERIZZAZIONE DELLA DIVERSITÀ MICROBICA DI COMPOST DA *TPOMW* OTTENUTI CON DIVERSE STRATEGIE TECNOLOGICHE.

Avendo chiarito nel capitolo precedente le dinamiche delle popolazioni microbiche durante il processo di compostaggio, in questa parte verrà analizzato il microbiota presente in un *set* di compost tutti derivanti dal compostaggio dei residui dei frantoi oleari ma ottenuti mediante metodi biotecnologici differenti.

L'obiettivo di questo studio, svolto in collaborazione con il “Centro Sperimentale di Compostaggio” del Parco del Cilento e Vallo di Diano, era quello di verificare la possibile relazione tra la diversità microbica, le tecnologie di compostaggio e le caratteristiche chimiche del compost prodotto.

Come viene riportato in tabella 16 le principali differenze nella tecnologia usata per la realizzazioni di questi compost consisteva sia nella diversa formulazione delle matrici da compostare, sia nella tipologia del metodo di maturazione adottato.

In funzione del materiale addizionato alla sansa per la preparazione della miscela da compostare, si definiva “verde” il compost derivante dalla sansa arricchita solo con materiale di origine vegetale, mentre si definiva “misto” il compost in cui alla sansa veniva addizionato materiale di origine animale (p. es. lana grezza).

Per quanto riguarda la strategia adottata per la maturazione, venivano utilizzati metodi denominati “BINS”, “QRING” “REATTORI”, e “PIAZZOLA” che verranno di seguito spiegati.

- BINS: il compostaggio è di tipo statico e viene condotto in contenitori di plastica da 800 l.
- QRING: il compostaggio avviene in cumuli statici ad areazione forzata.
- REATTORI, la maturazione è suddivisa in tre fasi: ACT (*Active Composting Time*), in cui il cumulo subisce una certa movimentazione meccanica tale da permettere una migliore ossigenazione della matrice, seguita da una fase denominata Curing in cui i cumuli sono statici ad areazione forzata e una fase finale di Maturazione in cumuli statici ad areazione naturale.
- PIAZZOLA, il cumulo statico subisce una prima areazione forzata seguita da una fase finale in cui si ha un'areazione naturale.

1.2.1 RISULTATI.

Caratteristiche chimico-fisiche dei diversi compost.

In tabella 16 vengono riportati, insieme alla descrizione della strategia tecnologica utilizzata, i dati chimici dei quindici compost analizzati.

Tab.16. Dati chimico-fisici e tecnologici dei 15 compost TPOMW. Nomi e numeri in neretto e dentro parantesi si riferiscono alla nomenclatura usata nell'analisi COIA (*Co-Inertia Analysis*) effettuata con programma statistico R.

<i>CAMPIONI</i>	<i>metodo di maturazione (method)</i>	<i>giorni (days)</i>	<i>tipologia di ammendante (ammendante)</i>	<i>% Umidità totale (Utot)</i>	<i>pH (pH)</i>	<i>%TOC (TOC)</i>	<i>% Ntot (Azotototale)</i>	<i>C/N (CN)</i>	<i>Temperatura °C (T)</i>
QR2150611OUT-I-P (2)	QRING (3)	123	VERDE (2)	45,15	6,03	42	1,05	40	5,7
UTR190711BOUT-R (3)	BINS (1)	88	VERDE (2)	41,8	7,03	39,79	0,72	55,26	7,2
UTR050711BOUT-Q (4)	BINS (1)	98	VERDE (2)	24,17	6,57	42,21	1,03	40,98	8,8
UTR220711BOUT-R (5)	BINS (1)	92	VERDE (2)	41,43	6,48	40,32	1,08	37,33	6,6
UTR280711BOUT-S (6)	BINS (1)	88	VERDE (2)	38,61	6,33	39,56	1,19	33,24	5,4
UTR040811BOUT-T (7)	BINS (1)	84	VERDE (2)	46,42	6,79	39,05	1,22	32,01	6,1
MON120511BOUT-M (8)	BINS (1)	117	VERDE (2)	56,85	7,74	38,86	1,44	26,99	7,9
MON110511BOUT-I (9)	BINS (1)	118	VERDE (2)	36,07	7,13	37,81	1,45	26,08	6,9
MON120511BOUT15-M (10)	BINS (1)	118	VERDE (2)	35,71	7,52	36,76	1,74	21,13	5,2
UTR111210 (11)	BINS (1)	214	MISTO (1)	17,46	8,35	34,69	2,29	15,15	5,8
NAT231110BIS (12)	REATTORI (5)	284	MISTO (1)	33,06	7,88	40,58	2,24	18,12	5
NAT280211 (13)	REATTORI (5)	249	MISTO (1)	31,27	7,89	40,73	2,5	16,29	7
NAT150411 (14)	REATTORI (5)	189	MISTO (1)	32,41	7,37	38,35	2,35	16,32	5,2
NAT300611 (15)	REATTORE 8 (4)	134	MISTO (1)	31,8	6,69	39,76	1,44	27,61	6,3
QN040711OUT-Q (18)	PIAZZOLA (2)	100	VERDE (2)	39,35	6,16	40,49	1,04	38,93	6

I campioni presentavano parametri chimici i cui valori variavano molto gli uni dagli altri. Infatti, il pH andava da un minimo di 6,03 e un massimo di 8,35; l'azoto totale (% Ntot) tra un minimo di 0,72 e un massimo di 2,35; il rapporto tra carbonio e azoto (C/N) presentava valori compresi tra 15,15 e 55,6. Anche i giorni di maturazione erano molto differenti tra loro ad indicare che la durata del processo dipendeva dalla strategia tecnologica utilizzata per la trasformazione dello scarto in compost di qualità.

Comunità batteriche dei diversi compost

In figura 23 vengono riportati i profili *DGGE* delle comunità batteriche dei 15 compost e della sansa da cui questi derivano.

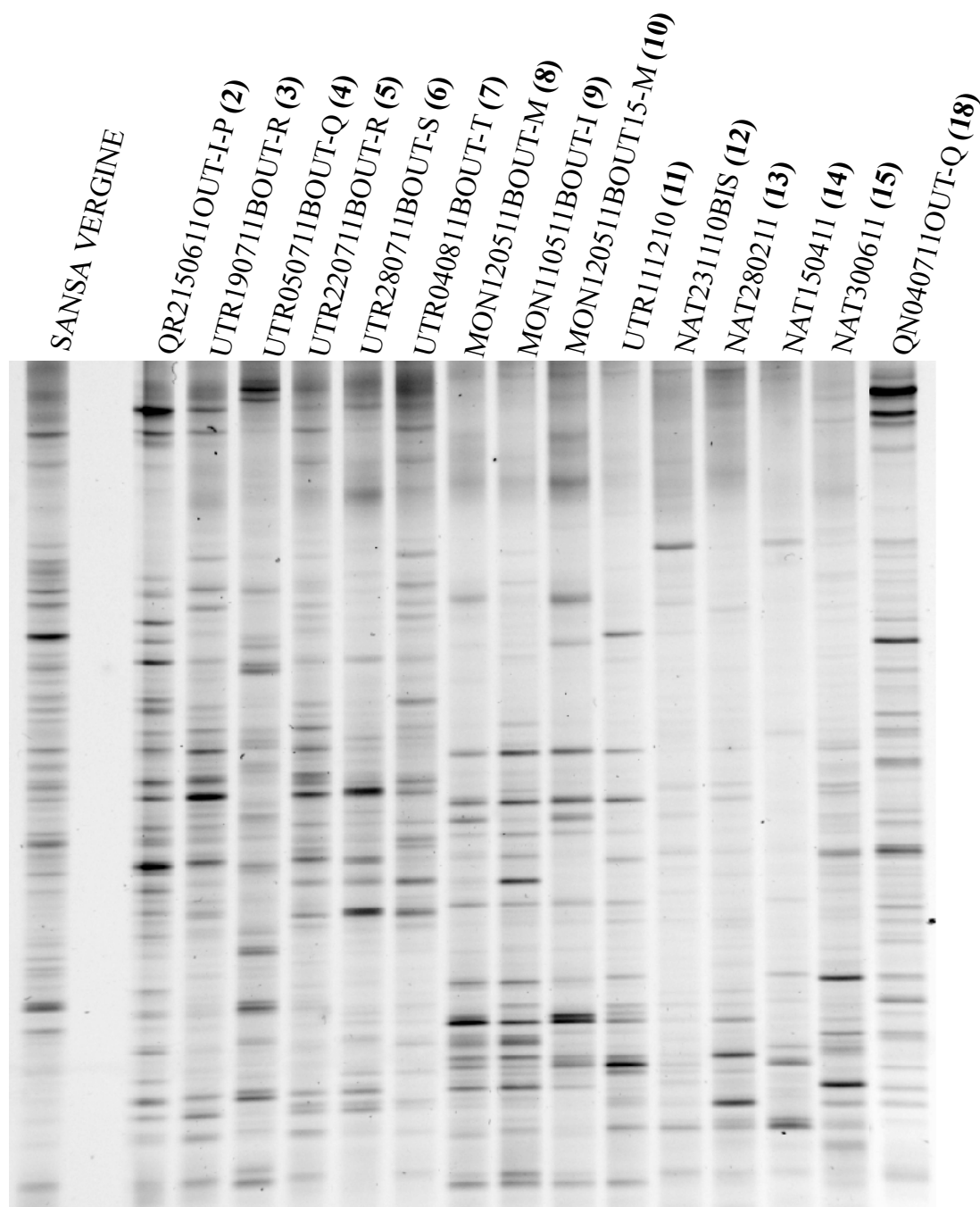


Fig. 23. Profili *DGGE* del frammento del gene 16S rRNA amplificato dai diversi compost TPOMW. I numeri tra parentesi e in neretto si riferiscono alla nomenclatura usata nell'analisi COIA (*Co-Inertia Analysis*) effettuata con programma statistico R.

I risultati mostravano come le comunità batteriche erano molto diverse tra loro ma anche dalla matrice di partenza. Oltre alla composizione, anche la biodiversità e la complessità delle comunità era estremamente variabile tra i campioni, infatti gli indici ecologici, soprattutto quelli relativi alla *Richeness* e *Shannon-Weaver* variavano rispettivamente tra 9 e 34 per il primo, e tra 1,65 e 3,15 per il secondo (Tab.17).

Tab. 17. Indici ecologici ottenuti dall'analisi dei profili DGGE delle comunità batteriche dei compost TPOMW. (**S**): Richeness; (**H**) indice di diversità Shannon-Weaver; (**D**) indice di dominanza di Simpson; (**E**) Evenness.

	<i>S</i>	<i>H</i>	<i>D</i>	<i>E</i>
<i>CAMPIONI</i>				
QR2150611OUT-I-P (2)	34	3,15	0,06	0,89
UTR190711BOUT-R (3)	30	2,98	0,07	0,87
UTR050711BOUT-Q (4)	24	2,89	0,07	0,91
UTR220711BOUT-R (5)	30	3,06	0,06	0,90
UTR280711BOUT-S (6)	20	2,49	0,12	0,83
UTR040811BOUT-T (7)	30	3,15	0,05	0,93
MON120511BOUT-M (8)	20	2,53	0,12	0,85
MON110511BOUT-I (9)	27	2,89	0,07	0,88
MON120511BOUT15-M (10)	19	2,56	0,10	0,87
UTR111210 (11)	16	2,41	0,12	0,87
NAT231110BIS (12)	18	2,42	0,13	0,84
NAT280211 (13)	20	2,29	0,16	0,76
NAT150411 (14)	9	1,65	0,25	0,75
NAT300611 (15)	28	2,59	0,12	0,78
QN040711OUT-Q (18)	33	3,13	0,06	0,89

Analisi di correlazione tra parametri chimico-biotecnologici e indici ecologici

La notevole disomogeneità tra i parametri caratterizzanti i diversi compost ci induceva a cercare una correlazione tra i parametri chimici e gli indici ecologici.

L'analisi di correlazione evidenziava come alcuni parametri chimici, quali pH, Azoto totale (% Ntot) e rapporto carbonio e azoto (C/N) influenzavano soprattutto la ricchezza (*Richeness* = S) e la biodiversità (*Shannon-Weaver* =H) delle comunità batteriche.

In particolare la *Richeness* e l'indice di *Shannon-Weaver* correlavano negativamente con pH (Fig. 24 a; Fig 25 a) e positivamente con il rapporto C/N (fig 24 c; fig 25 c).

La correlazione con C/N sembrava principalmente dovuta alla forte correlazione inversa degli indici con l'azoto totale (Fig. 24 c; Fig.25 c) mentre il carbonio organico totale non sembrava avere una correlazione statisticamente significativa con gli indici ecologici ($P > 0,05$).

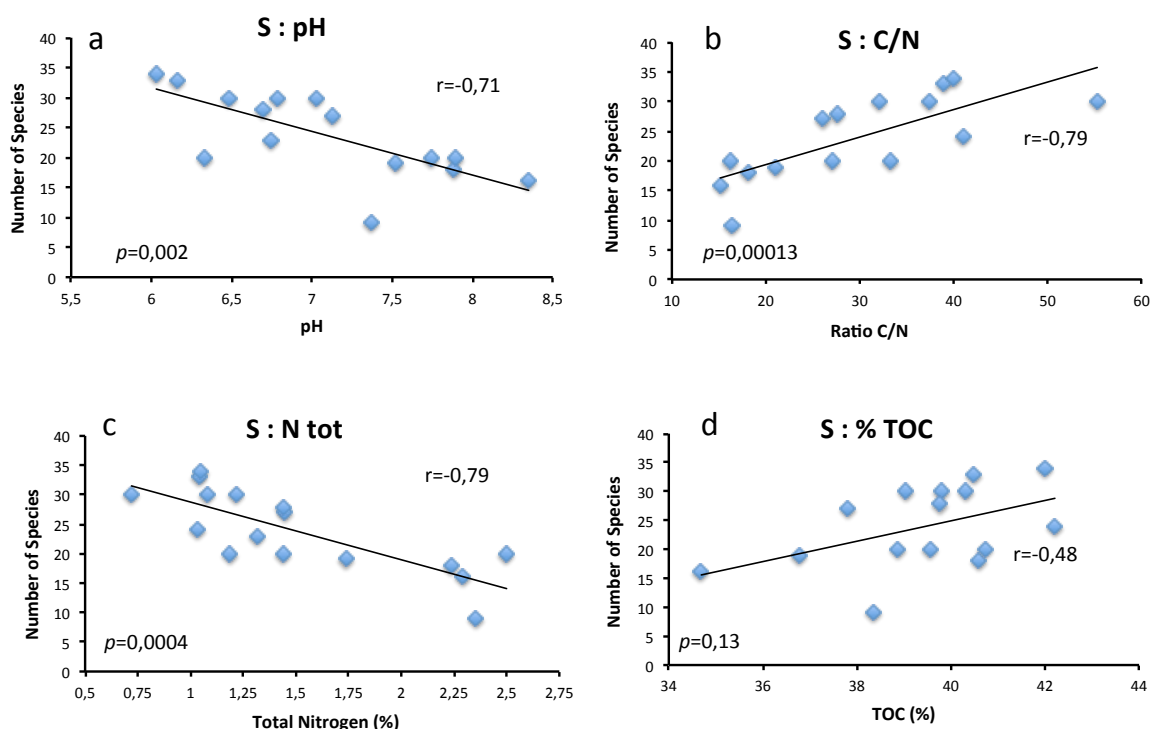


Fig. 24. Grafici di correlazione della ricchezza (S) con pH (a), rapporto C/N (b), azoto totale (c) e carbonio organico totale (d). r indica il coefficiente di correlazione e p rappresenta il p -value .

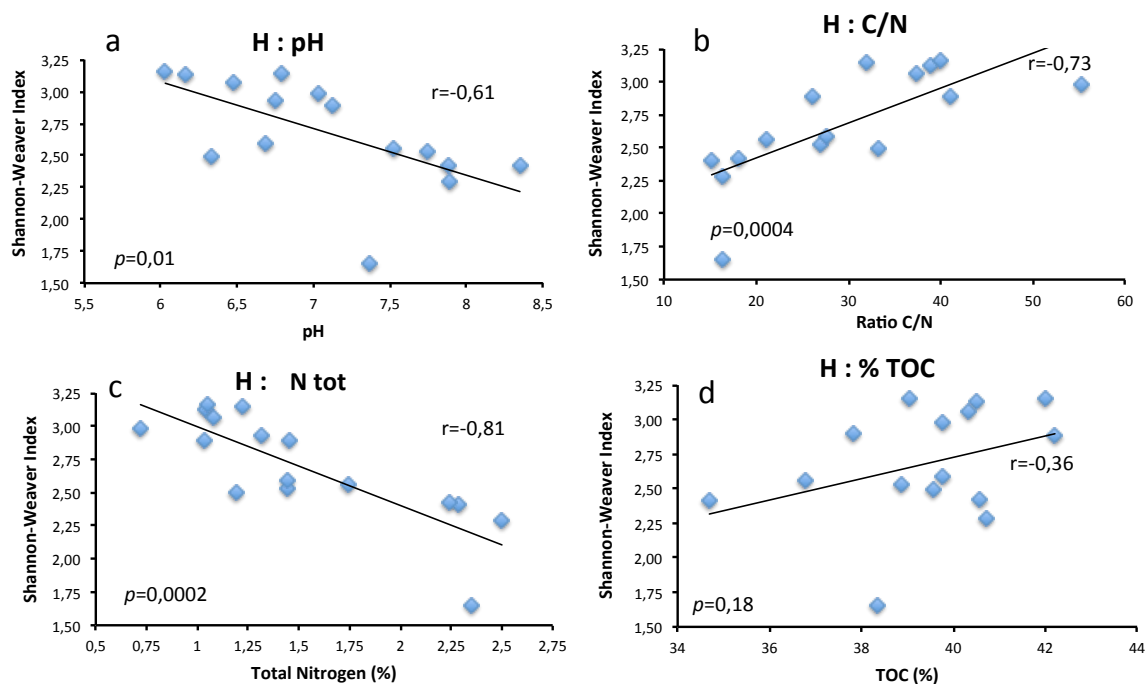


Fig. 25. Grafici di correlazione della biodiversità espressa come indice di Shannon-Weaver (H) con pH (a), rapporto C/N (b), azoto totale (c) e carbonio organico totale (d). *r* indica il coefficiente di correlazione e *p* rappresenta il *p-value*.

Analisi della coinerzia

Quest'analisi statistica avanzata, aveva come obiettivo quello di chiarire la possibile esistenza di una qualche componente che più delle altre "governava" l'instaurarsi delle diverse popolazioni batteriche in un compost maturo. Prima di procedere con l'analisi della coinerzia, ciascuna matrice (dati chimico-biotecnologici e dati biologici ottenuti dai profili DGGE) veniva ordinata separatamente mediante analisi PCA (*Principal Component Analysis*).

E' importante specificare che il *data set* relativo ai parametri biologici (nominati nell'analisi come "*species*") derivavano dall'analisi DGGE che permetteva di segnalare,

per ogni *fingerprinting* di comunità (indicata come *LANE*), la presenza/assenza di ogni popolazione (banda) presente nel gel e l'eventuale abbondanza relativa.

I dati chimici utilizzati per l'analisi erano quelli riportati in tabella 16 (nominati nell'analisi come "*environment*").

Alcuni passaggi chiave dell'analisi della coinerzia verranno di seguito descritti per meglio comprendere il risultato finale di questo studio.

Nell'analisi delle componenti principali (PCA) riguardante i parametri chimico-tecnologici, venivano considerate le prime due componenti che giustificavano il 75% circa della varianza totale.

La prima componente da sola, giustificava quasi il 60% della variabilità, mentre la seconda componente solo il 15%. Il *plot* dei *loadings* sulla circonferenza unitaria di correlazione (Fig. 26), evidenziava come, per la PC1 i parametri di maggior peso erano il pH, i giorni e l'azoto totale, che correlavano positivamente tra loro e negativamente con il tipo di ammendante e il rapporto C/N. Le relazioni determinate tra i parametri, in funzione di questa prima componente, sembrano delineare un gradiente di maturità dei compost, in cui gli alti valori di pH e azoto totale venivano associati ad un compost tipicamente maturo, mentre alti valori del rapporto carbonio azoto erano associati ad un processo di maturazione ancora in corso. Il fatto che anche il tipo di ammendante e i giorni (trascorsi dall'inizio del processo di compostaggio) influivano sul livello di maturità del compost, sembrava indicare che maggiore era la durata del processo di compostaggio, maggiore era il livello di maturità raggiunto dal compost; inoltre la forte correlazione inversa con il tipo d'ammendante, potrebbe essere un indice di una diversa velocità di maturazione delle due tipologie di compost (compost verde con maturazione più lenta e un compost misto con maturazione più rapida).

Il *biplot* delle matrici (Fig. 27) restituiva un'associazione, sulla prima componente principale, tra le comunità batteriche (indicate con "*lane*") dei campioni 11, 12, 13, 14 e gli alti valori positivi dei *loadings* di PC1 (*Azotototale*, *days*, *ph*), mentre le comunità dei campioni 3, 4, 5 e 18 erano da associare agli elevati *loadings* di CN (C/N) e ammendante. Inoltre era possibile evidenziare due gruppi di comunità: il primo era costituito dai campioni 12, 13, 14 e 15, tutti derivanti dal processo di compostaggio realizzato in reattori; Il secondo gruppo era costituito dai campioni 3, 5, 6, 7,8 e 9 che derivavano da un processo di compostaggio realizzato in *bings*.

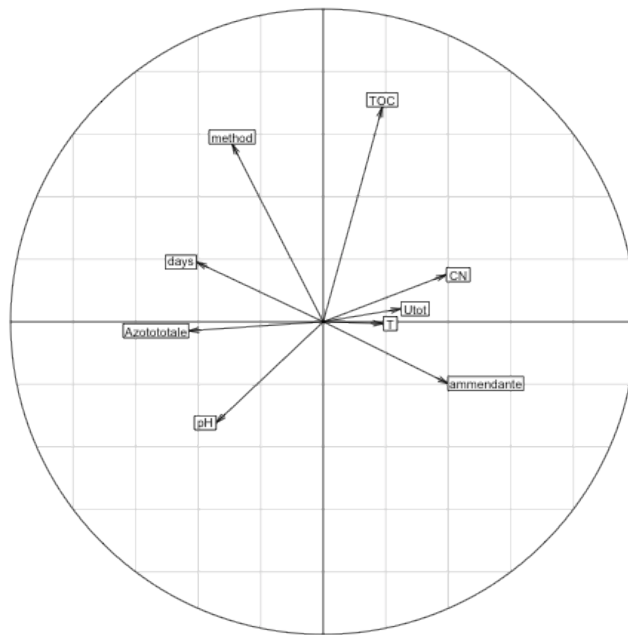


Fig. 26. Il *plot* dei *loadings* sulla circonferenza unitaria di correlazione relativa ai parametri chimici; PC1 spiga il 60% della variabilità, PC2 spiga il 15% della variabilità.

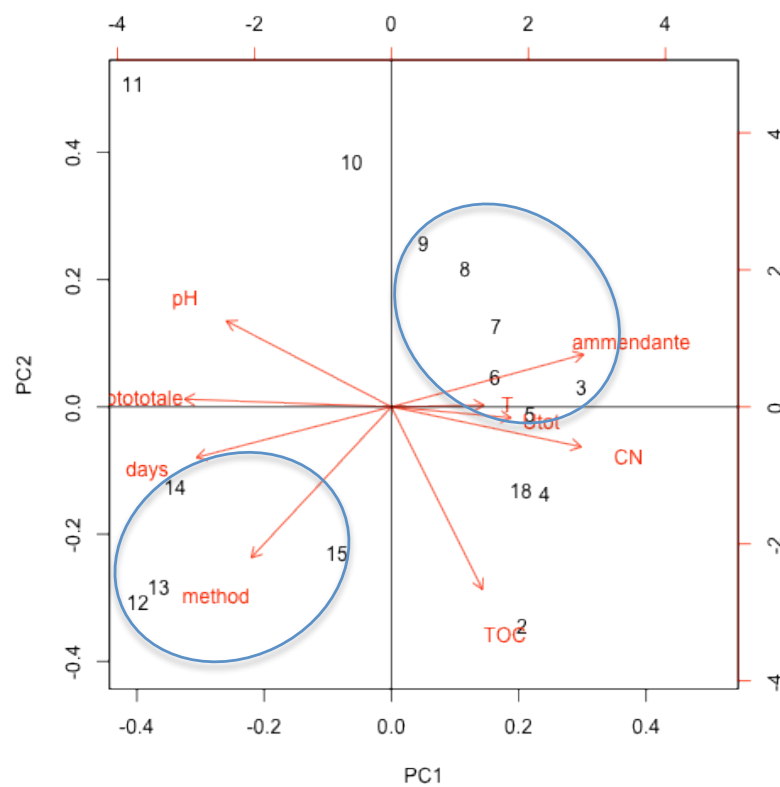


Fig. 27. *Biplot* di dati chimici e comunità batteriche (esprese in numeri). I numeri corrispondono alle comunità dei compost di cui le caratteristiche vengono riportate in Tab.16.

L'analisi della matrice di covarianza *species X environment*, permetteva di ricercare la massima correlazione tra l'asse F1 delle variabili ambientali (*environment*) con quello delle variabili biologiche (*species*) (Fig. 28).

L'asse *F1 environment* identifica il grado di maturità del compost (con valori negativi associati a compost maturi e valori positivi a compost non ancora giunti a maturazione), l'asse *F1 species* identifica il grado di complessità delle comunità batteriche (con valori negativi per comunità semplici e valori positivi per comunità complesse). In questo grafico i campioni si distribuiscono in tre gruppi:

Il primo gruppo costituito dai campioni 11, 12, 13, 14, era caratterizzato dalla massima correlazione tra l'alto grado di maturità e strutture di comunità semplici.

Il secondo gruppo, con i campioni 8, 9, 10 e 15 presentava una minima correlazione tra struttura di comunità e maturità del compost.

Il terzo gruppo, con i campioni 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 18 era caratterizzato dalla massima correlazione tra bassi livelli di maturità e alta complessità delle comunità batteriche.

Una volta riordinati i due set di dati era possibile calcolare il valore del coefficiente di coinerzia ($RV = 0.51$) risultato statisticamente significativo ($P < 0,005$) e generare il grafico derivante dalla sovrapposizione delle variabili chimiche e biologiche (Fig. 29). Poiché il primo asse determinava il 65,7% dell'inerzia totale, si poteva ipotizzare che la maggior parte delle popolazioni dei compost, e quindi la più alta biodiversità batterica, era propria di un compost caratterizzato da bassi valori di pH e di azoto e alti valori di C/N, quindi di un compost non ancora giunto a maturazione, inoltre alcune specie, quali 55, 56, 57, 61 e 63 (cerchiate in blu nella fig. 29) sembrerebbero tipiche di un compost maturo.

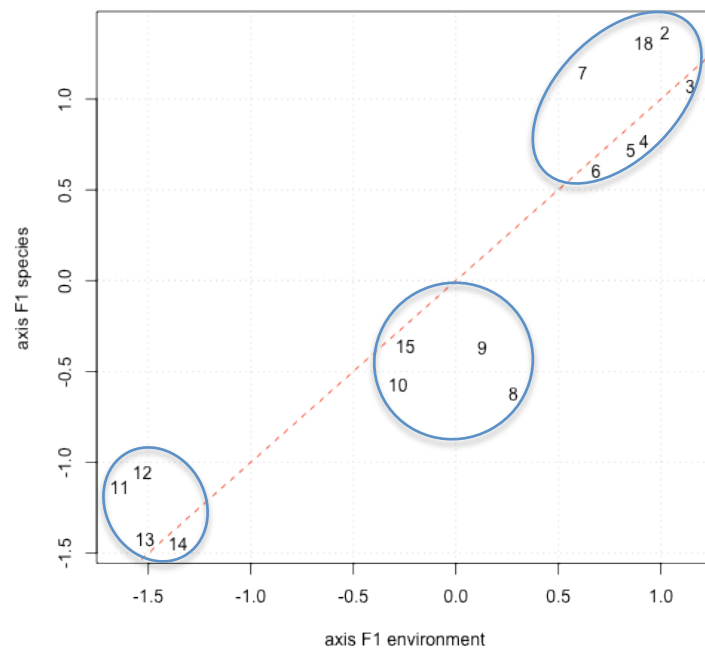


Fig. 28. Plot “species X environment”. *Species* riporta i dati relativi biologici, *environment* riporta i dati chimici. I numeri corrispondono alle comunità dei composti di cui le caratteristiche vengono riportate in tab.16. Il coefficiente di correlazione tra i due assi è pari a 0,82 ($p < 0,01$).

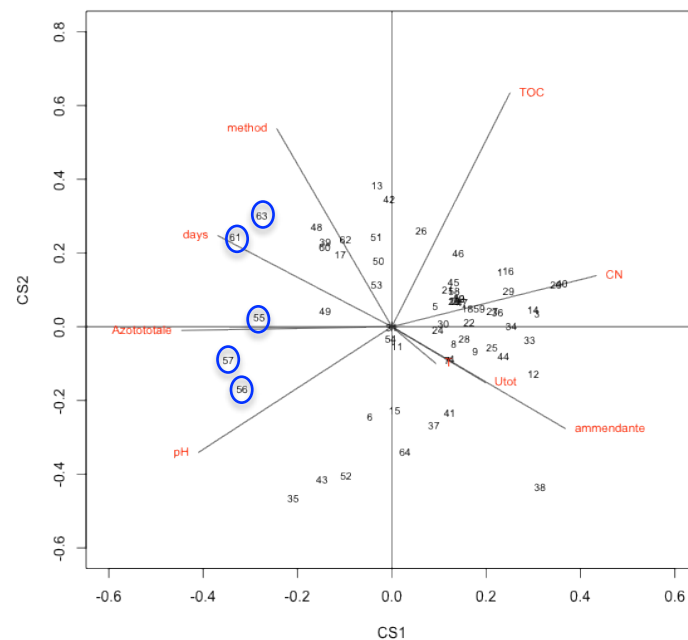


Fig. 29. Plot della coinerzia derivante dalla sovrapposizione delle variabili chimiche e biologiche. I numeri sono riferiti alle popolazioni batteriche complessivamente trovate nelle comunità dei 15 compost.

1.2.2 DISCUSSIONE

I quindici compost analizzati, derivavano dagli scarti dei frantoi a due fasi, ma erano ottenuti variando alcuni parametri tecnologici come per esempio il materiale addizionato alla sansa nella formulazione della miscela di partenza, il metodo di compostaggio e la durata del processo. Condizioni di compostaggio così diverse tra loro causavano anche una grande variabilità sia dei parametri chimico-fisici, sia della composizione e della biodiversità delle comunità batteriche. Era interessante notare come alcuni parametri chimici fossero legati a quelli biologici. In particolare la ricchezza e la diversità batterica risultavano condizionate dal pH, l'azoto totale e rapporto C/N. Infatti, una comunità caratterizzata da alta biodiversità era tipica di compost con bassi valori di pH e azoto e alti valori del rapporto C/N. Come molti autori riportano (Zhang et al., 2011; Agnolucci et al., 2013; Altieri et al., 2011), un compost maturo è caratterizzato da bassi valori di C/N, e valori elevati per pH e azoto totale. Dai nostri risultati ottenuti durante la caratterizzazione chimico fisica e microbiologica del processo di compostaggio (capitolo precedente), il compost maturo era caratterizzato da una diminuzione della biodiversità che risultava essere molto elevata, invece, durante la fase termofila. In funzione di quanto appena detto, l'alta diversità batterica riscontrata in alcuni compost, può essere associata ad una fase di processo in cui si ha ancora un'alta attività microbica di trasformazione della sostanza organica che suggerisce un processo di maturazione ancora in corso. Attraverso l'analisi della coinenrzia è stato possibile confrontare due distinti *set* di parametri: dati chimico-tecnologici e dati biologici. In particolare, per i parametri biologici, venivano utilizzati i dati riferiti ai profili di comunità ottenuti con l'analisi *DGGE*, grazie ai quali era possibile verificare gli effetti delle componenti chimiche sulla composizione della comunità batterica, attraverso l'uso di un'analisi statistica multivariata (Yang and Crowley, 2000). L'intensità relativa di ogni banda veniva usata come parametro da utilizzare per lo studio delle relazioni tra la composizione delle comunità microbiche e i parametri chimici come già altri autori hanno fatto (Zhang et al., 2011).

L'analisi statistica avanzata evidenziava come la complessità della comunità microbica venisse condizionata dal tipo di ammendante e dal metodo di maturazione, infatti mentre l'alta biodiversità era tipica di un compost verde ottenuto con una maturazione in *BINS*, la comunità caratterizzata da bassa biodiversità risultava legata ad un ammendante di tipo misto la cui maturazione avveniva in REATTORI. Inoltre, grazie a questa analisi veniva

chiarito il legame tra i parametri chimici e biologici, infatti si poteva affermare che un compost maturo era caratterizzato da alti valori di pH e azoto, e livelli di C/N bassi ed in cui la comunità batterica, ormai stabilizzata aveva una struttura piuttosto semplice e con una bassa biodiversità.

Inoltre, la presenza di popolazioni fortemente influenzate dai parametri chimici tipici di un compost maturo potrebbero essere usati, insieme alla valutazione della complessità della comunità, come possibili parametri biologici da usare per il monitoraggio del processo di compostaggio degli scarti derivanti dai frantoi oleari a due fasi. L'alta biodiversità trovata in certi compost, a cui era sempre associato un livello di C/N molto alto e bassi valori di pH, indicavano un processo di maturazione ancora in corso. Questi risultati suggeriscono la possibilità di utilizzare un'ulteriore indice per la definizione della maturità del compost basato sulla diversità batterica.

1.3 CONCLUSIONI

Il monitoraggio dei parametri chimico-fisici e microbiologici durante tutto il processo, dimostrava come il compostaggio può essere un buono strumento per la valorizzazione e il riciclaggio dei questo scarto trasformato in un ammendante di qualità.

Lo studio degli aspetti ecologici legati alle dinamiche delle comunità microbiche, evidenziava il ruolo fondamentale dei microrganismi nel compostaggio, infatti, il processo era caratterizzato da una rapida successione di popolazioni microbiche specializzate, sia batteriche sia fungine coinvolte nella trasformazione della sostanza organica; in particolare la fase di intensa attività degradativa era caratterizzata da un'alta biodiversità microbica che diminuiva parallelamente alla progressiva maturazione della matrice.

Avendo chiarito e caratterizzato l'intero processo di compostaggio, si era passati all'analisi della biodiversità microbica di un *set* di compost derivanti da *TPOMW* ma ottenuti con diverse strategie tecnologiche e che presentavano caratteristiche chimico-fisiche molto diverse tra loro. Al fine di comprendere una possibile relazione tra la diversità microbica, le tecnologie di compostaggio e le caratteristiche chimiche del compost prodotto veniva effettuata una analisi statistica avanzata che ha permesso di comprendere come le diversità dei vari compost erano legate al processo di maturazione. Infatti, i compost caratterizzati da una bassa complessità della struttura della comunità batterica indicavano una stabilizzazione del processo e quindi una maturazione della matrice compostata caratterizzata da valori di pH azoto a rapporto C/N tipici di un compost maturo. Quest'analisi, conferma e rafforza i risultati ottenuti durante il monitoraggio del processo di compostaggio nel quale la biodiversità microbica era strettamente legata al livello di maturazione raggiunto dalla matrice. In ragione di quanto appena detto, la valutazione della biodiversità batterica potrebbe essere utilizzata come indicatore per la definizione della maturità del compost. Inoltre l'analisi statistica evidenziava come l'uso di un compost misto maturato in reattori fosse la strategia più efficace.

2. IMPLICAZIONI ECOLOGICHE DELL'APPLICAZIONE DEL COMPOST IN STRATEGIE DI BIORISANAMENTO.

La seconda parte del lavoro di tesi è stata finalizzata alla valutazione degli effetti ecologici conseguenti all'aggiunta di compost, sul microbiota indigeno di ambienti contaminati. Con quest'obiettivo il compost ottenuto da TPOMW, caratterizzato nella prima parte della tesi, è stato utilizzato per realizzare due studi di biorisanamento su scala di laboratorio che coinvolgono un terreno storicamente contaminato da *diesel-oil* e un fango contaminato *ad hoc* con un farmaco (Carbamazepina).

In entrambe le prove, gli effetti ecologici dei vari trattamenti sono stati valutati attraverso metodi molecolari indipendenti dalla coltivazione. Lo studio delle dinamiche delle comunità, infatti, è stato valutato attraverso l'analisi *DGGE* che fornisce il *fingerprinting* delle popolazioni batteriche e fungine presenti nel campione analizzato, mentre gli effetti sull'abbondanza microbica sono stati valutati attraverso la *qPCR* che permette una stima dell'abbondanza espressa o come numero di copie del gene d'interesse per grammo di campione (quantificazione assoluta) o come abbondanza relativa riferita al controllo al tempo iniziale.

2.1 PROVA DI BIORISANAMENTO DI UN SUOLO STORICAMENTE CONTAMINATO DA *DIESEL-OIL*.

Questa prova simulava, su scala di laboratorio, il biorisanamento di un suolo storicamente contaminato da *diesel-oil*. Il suolo veniva ammendato con il compost derivante dai frantoi oleari (*TPOMW*) e due *Spent mushroom compost* (*Smc*) derivanti dalla coltivazione di *Agaricus bisporus* e *Pleurotus ostreatus*, rispettivamente, e incubati per 120 giorni. Gli effetti del compost *TPOMW* sono stati confrontati con quelli degli *Smc* in quanto, essendo ricchi di nutrienti ed enzimi residui, potevano essere utili nello stimolare la microflora autoctona nella degradazione delle sostanze inquinanti (Lau et al., 2003). Per studiare gli effetti ecologici di questo approccio di bonifica sulle comunità microbiche indigene, tutti i compost sono stati utilizzati sia sterilizzati che non sterilizzati, con l'obiettivo di simulare strategie di *biostimulation* (apporto di nutrienti dal compost) e *bioaugmentation* (apporto di microrganismi esogeni provenienti dal compost), rispettivamente. Inoltre, la scelta di due tipologie di compost totalmente differenti è stata compiuta per capire se i reali effetti sulle popolazioni endogene potessero essere paragonabili.

La valutazione dell'impatto dei trattamenti, sulla struttura e le dinamiche delle comunità batteriche e fungine, veniva seguita nel tempo attraverso l'analisi dei profili *DGGE*, mentre l'abbondanza microbica veniva monitorata con un approccio coltura-indipendente (*qPCR*) e non attraverso metodi coltura-dipendenti.

2.1.1 RISULTATI

Effetti dei trattamenti sulla comunità batterica indigena.

L'uso della *DGGE* permetteva di avere un quadro complessivo sulle dinamiche delle popolazioni batteriche che avvenivano durante i vari trattamenti.

In figura 30 vengono riportati i profili *DGGE* delle comunità batteriche del suolo controllo e di quelli trattati con TPOMW sterile e TPOMW, che permettevano di seguire l'evoluzione delle comunità di ogni trattamento nel tempo. Era possibile notare come il profilo del suolo controllo (Ctrl.), durante la prova, subiva piccole variazioni, non tanto riguardanti la composizione della comunità, quanto invece l'intensità di alcune bande, il cui aumento indicava l'aumento del numero d'individui di alcune popolazioni. Modificazioni della comunità, venivano osservate nel suolo trattato con compost sterile (TPOMW St.), in cui si notava una certa trasformazione della comunità con la scomparsa di alcune specie alloctone e la comparsa di specie nuove.

L'aggiunta di compost non sterile (TPOMW), modificava da subito la composizione della comunità del suolo, ma questa modificazione si manteneva nel tempo, tanto che, i profili erano pressoché identici.

Per verificare se il *trend* delle comunità batteriche, durante i vari trattamenti, fosse determinato solo dal tipo di compost, venivano utilizzati altri due compost di provenienza differente: *Spent mushroom compost*; Il primo derivante dalla coltivazione di *Agaricus bisporus* (Smc A.) e il secondo da *Pleurotus ostreatus* (Smc P.). L'evoluzione delle comunità batteriche dei suoli trattati con questa tipologia di compost mostrava lo stesso *trend* osservato con l'utilizzo di compost da TPOMW (Sterilizzato e non). Infatti, come risulta dalle figure 31 e 32, l'unica tipologia di trattamento che causava una continua trasformazione della comunità batterica nel tempo, era quella in cui l'ammendante veniva usato sterile (Smc A. st. & Smc P. st.); al contrario, l'applicazione del compost non sterilizzato portava a un cambiamento radicale del profilo della comunità rispetto al controllo con un aumento della biodiversità.

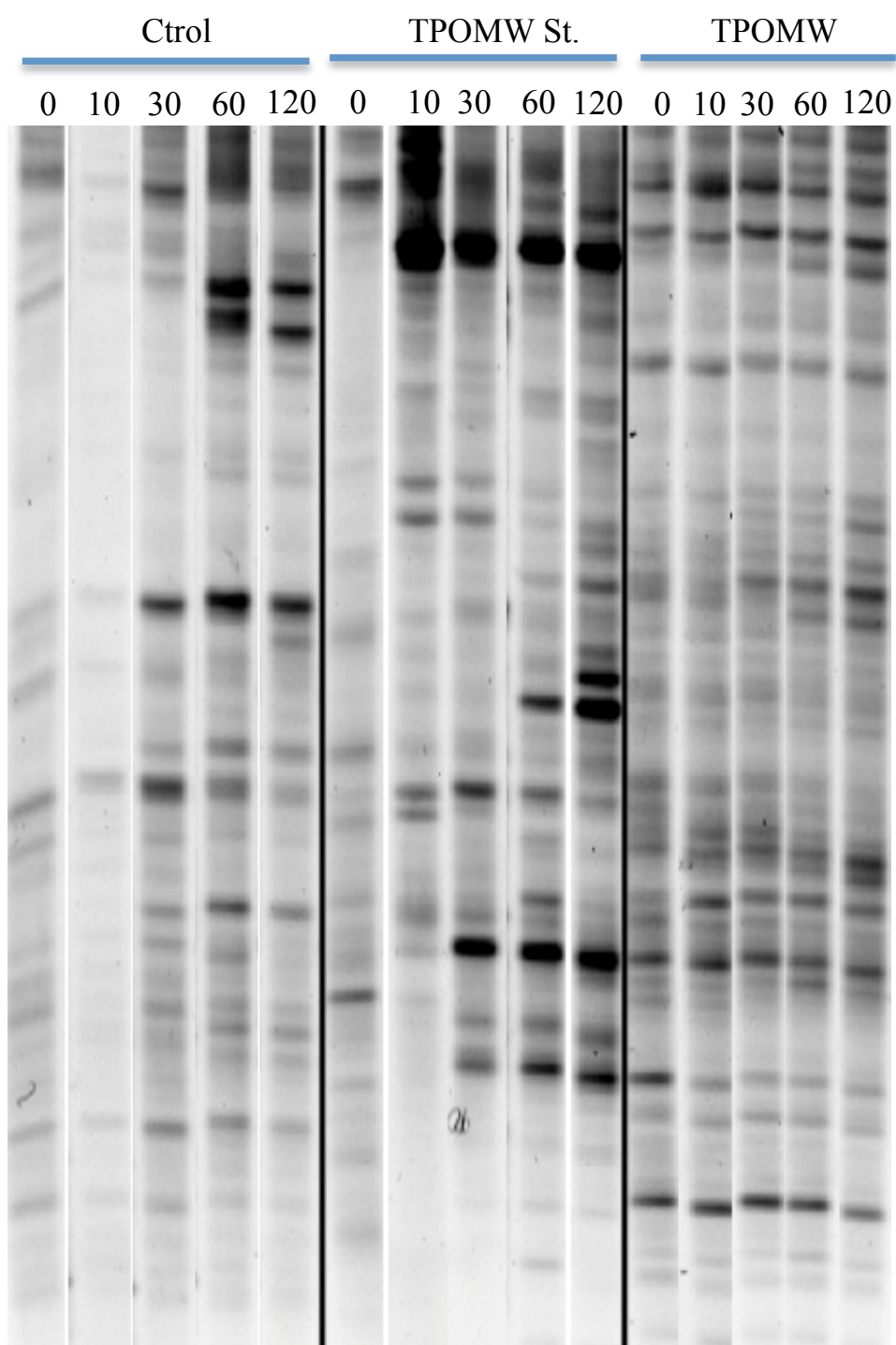


Fig. 30. Profili DGGE del frammento del gene 16S rRNA delle comunità nei suoli trattati. Ctról: controllo; TPOMW St.: trattamento con compost TPOMW sterilizzato; TPOMW: trattamento con compost TPOMW. I numeri riportati sopra ogni *lane* indicano i giorni: giorno 0, giorno 10, giorno 30, giorno 60, giorno 120.

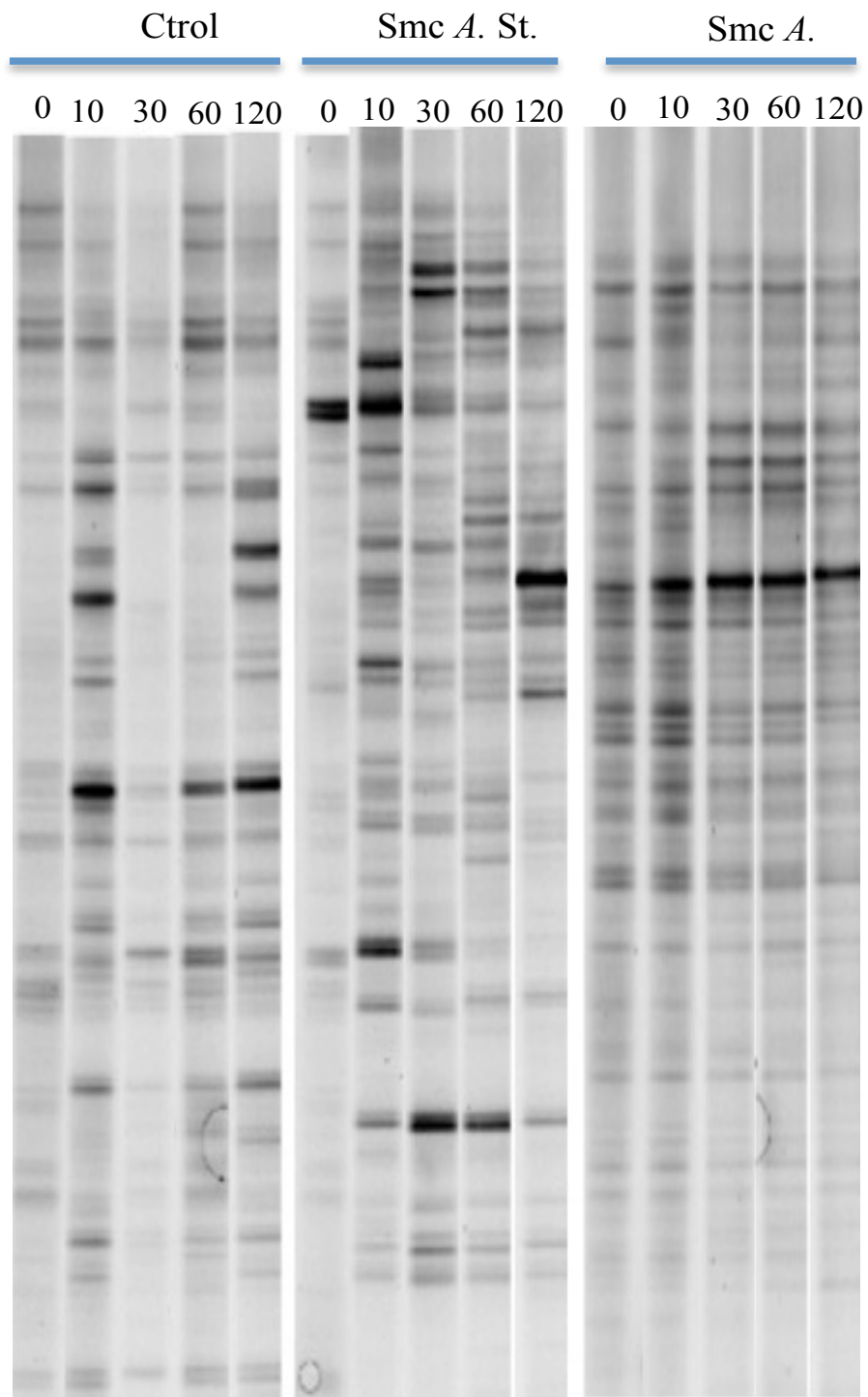


Fig. 31. Profili DGGE del frammento del gene 16S rRNA delle comunità nei suoli trattati. Ctrol: controllo; Smc A. St.: trattamento con *spent mushroom compost* di *Agaricus bisporus* sterilizzato; Smc A.: trattamento con *spent mushroom compost* di *Agaricus bisporus*. I numeri riportati sopra ogni *lane* indicano i giorni: giorno 0, giorno 10, giorno 30, giorno 60, giorno 120.

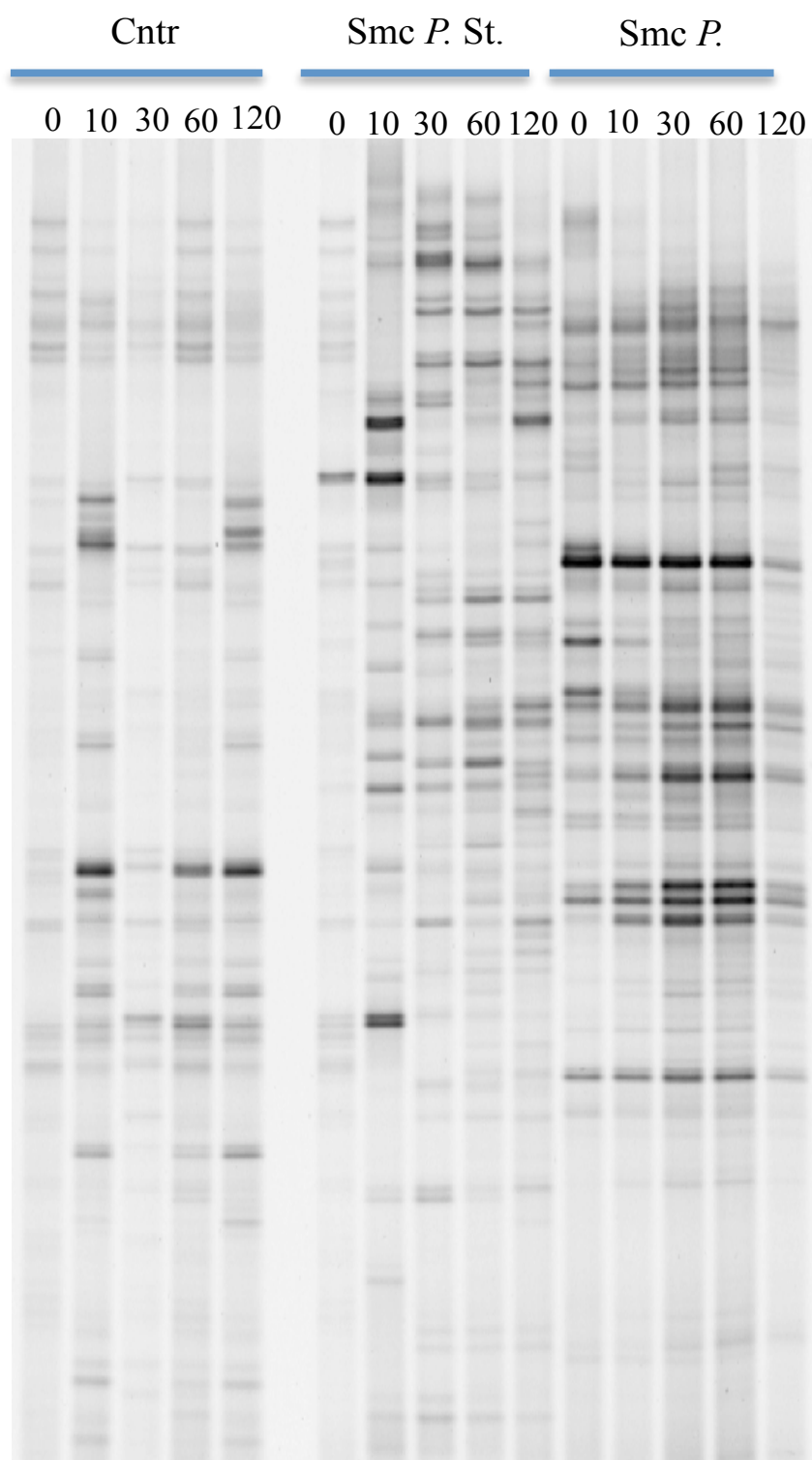


Fig. 32. Profili DGGE del frammento del gene 16S rRNA delle comunità nei suoli trattati. Cntr: controllo; Smc *P. St.*: trattamento con *spent mushroom compost* di *Pleorotus ostreatus* sterilizzato; Smc *P.*: trattamento con *spent mushroom compost* di *Pleorotus ostreatus*. I numeri riportati sopra ogni *lane* indicano i giorni: giorno 0, giorno 10, giorno 30, giorno 60, giorno 120.

Il monitoraggio dell'effetto dei vari trattamenti sulla biomassa batterica totale presente nei campioni di suolo, avveniva mediante l'amplificazione del gene rRNA 16S attraverso *qPCR* e con una quantificazione relativa espressa come *fold*, che indicava la quantità di copie rispetto al campione controllo al tempo iniziale.

In figura 33 viene riportata l'abbondanza relativa nei suoli trattati con TPOMW sterile e non, rispetto al controllo. Si notava che il controllo, nel corso del tempo, aumentava di circa dieci volte, con un picco massimo registrato a 60 giorni, dopo il quale si aveva una leggera diminuzione. Il suolo trattato con TPOMW presentava un'abbondanza relativa di circa 100 volte superiore al controllo già al tempo zero, e si manteneva costante per tutta la durata della sperimentazione con leggere fluttuazioni che avvenivano tra i trenta e i centoventi giorni. Il suolo trattato con TPOMW sterile aveva, invece, al tempo iniziale un'abbondanza paragonabile al controllo, ma già dopo dieci giorni si registrava un aumento progressivo che portava al raggiungimento, al tempo finale, di una quantità relativa, superiore anche a quella raggiunta dal trattamento con TPOMW.

L'ipotesi che il suolo possa essere stato colonizzato dalle popolazioni del compost veniva confermata anche dal confronto tra il profilo *DGGE* del trattamento TPOMW al tempo 0 e quello relativo alla matrice compost TPOMW, da cui si riscontrava la presenza di molte bande comuni (Fig. 34).

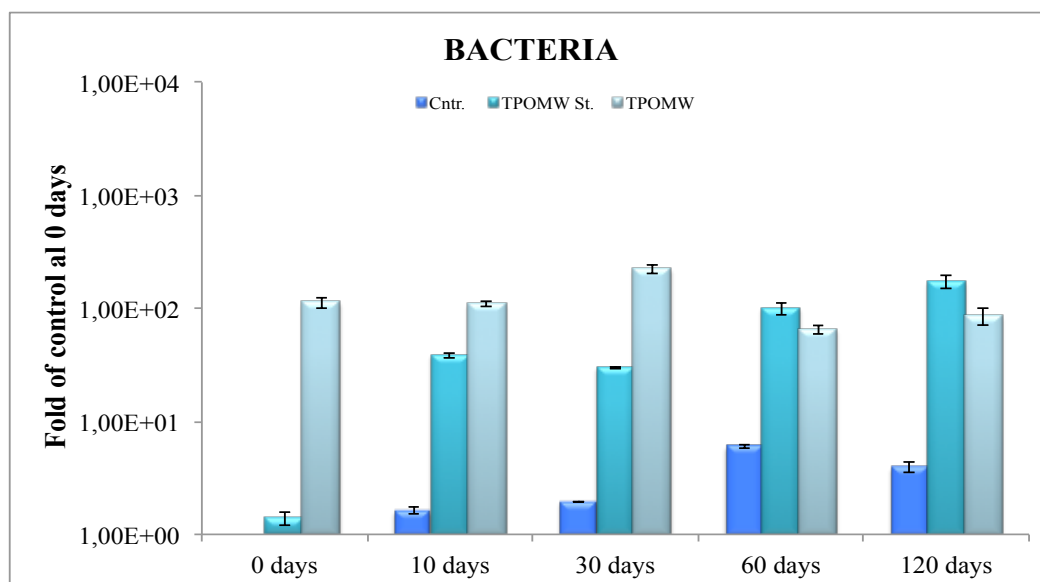


Fig. 33. Numero di copie del gene 16S calcolato nei suoli controllo e trattati con compost TPOMW sterilizzato e con compost TPOMW ed espresso come logaritmo in base 10 rispetto al valore osservato nel controllo al tempo zero.

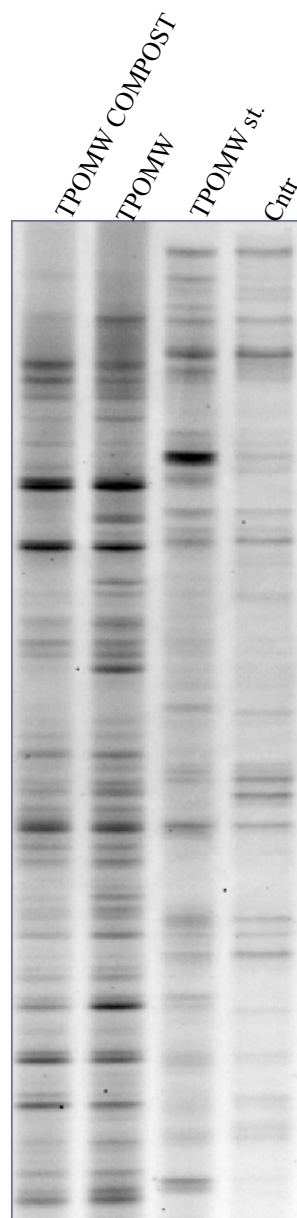


Fig. 34. Confronto tra i profili DGGE del frammento del gene 16S rRNA amplificato delle comunità rispettivamente di: matrice compost TPOMW, trattamento del suolo contaminato da *diesel-oil* con TPOMW, trattamento del suolo contaminato da *diesel-oil* con TPOMW sterilizzato e suolo storicamente contaminato da *diesel-oil* (Ctrl.).

In figura 35 vengono riportate le abbondanze relative ottenute per i due *Spent mushroom compost*. I suoli trattati con compost sterili (Smc A St. e Smc P. St.), che al tempo iniziale avevano un'abbondanza paragonabile al controllo, a fine sperimentazione subivano un incremento di quasi cento volte. I suoli trattati con compost non sterilizzati (Smc A. e Smc P.) erano caratterizzati da un'abbondante biomassa batterica già al tempo iniziale; in particolare lo Smc P. era di 250 volte superiore al controllo, mentre Smc A. di circa 80 volte. Mentre il suolo trattato con Smc A. si manteneva costante nel tempo, quello in cui era aggiunto Smc P. subiva un leggero calo, arrivando al tempo finale ad equiparare i livelli mantenuti dal trattamento con Smc A.

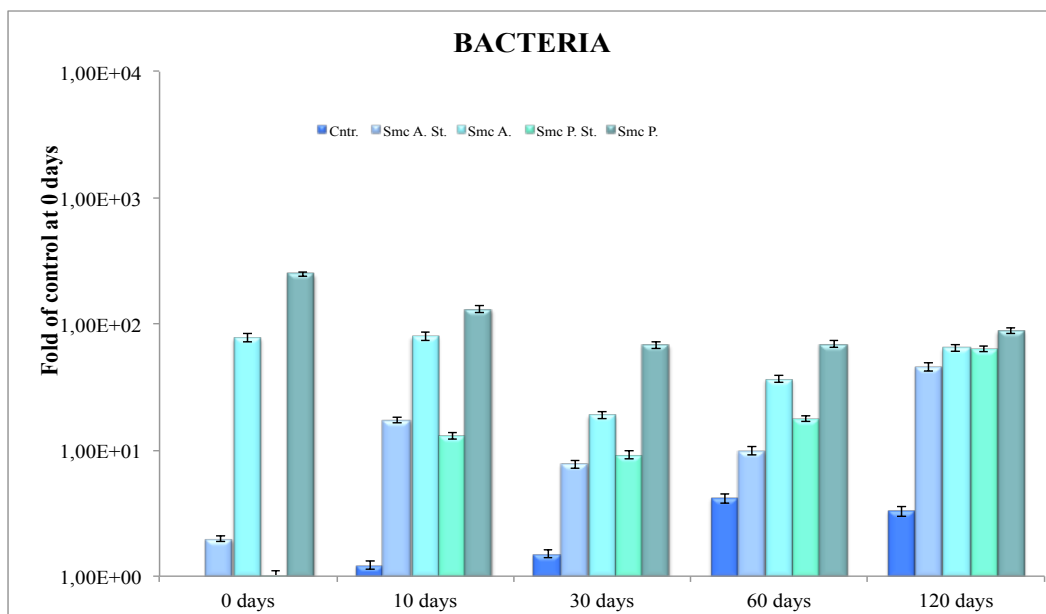


Fig. 35. Numero di copie del gene 16S calcolato nel suolo controllo e trattato con le due tipologie di *spent mushroom compost*: con *spent mushroom compost* di *Agaricus bisporus* sterilizzato (Smc A. St.) e non (Smc A.), e con *spent mushroom compost* di *Pleurotus ostreatus* (Smc P. St.) e non (Smc P.). Valore espresso come logaritmo in base 10 rispetto al valore osservato nel controllo al tempo zero.

Effetti dei trattamenti sulla comunità fungina indigena.

Gli effetti dei trattamenti sulla comunità fungina autoctona, venivano valutati, come per i batteri, utilizzando le tecniche molecolari cultura indipendenti quali *DGGE* per lo studio delle strutture di comunità e la *qPCR* con quantificazione relativa per lo studio dell'abbondanza.

Tutti i suoli trattati erano caratterizzati da una biodiversità molto bassa se confrontata con quella batterica. Nelle figure 36, 38 e 40 vengono riportati i *fingerprinting* delle comunità fungine di tutti i trattamenti durante l'intera prova. Il controllo era caratterizzato da una bassa biodiversità che durante la sperimentazione subiva leggere modificazioni. L'aggiunta di compost TPOMW (Fig. 36) andava a modificare la comunità del suolo controllo aumentandone la complessità e, durante tutta la prova, la composizione della comunità rimaneva pressoché invariata, come illustrato dal dendrogramma di similarità riportato in Fig. 37.

La comunità del suolo trattato con TPOMW sterile, che al tempo iniziale era molto simile a quella del controllo, al tempo finale risultava completamente modificata con la comparsa di nuove bande. Gli effetti del trattamento con compost sterile non erano immediati, infatti, nei primi trenta giorni i profili rimanevano sostanzialmente identici tra loro e molto simili a quelli del controllo. A sessanta giorni, invece, si assisteva ad una profonda modificazione della comunità la cui evoluzione continuava fino al tempo finale.

In figura 38 vengono riportati i profili di comunità dei suoli trattati con Smc di *Agaricus*.

Il suolo in cui era aggiunto il compost sterilizzato, che al giorno 0 era molto simile al controllo, durante il corso della sperimentazione subiva delle piccole ma continue modificazioni tanto che al tempo finale, la similarità tra la comunità del controllo e quella del trattamento, era inferiore al 60% (Fig. 38). Il suolo trattato con Smc *A.* apportava da subito un aumento della biodiversità che si manteneva pressoché invariata per tutto il periodo della prova.

L'evoluzione delle comunità nei suoli trattati con *Spent mushroom compost* di *Pleorotus* riportati in figura 40, mostravano come l'uso dello Smc *P.* sterilizzato causava delle modificazioni del profilo iniziale soprattutto nei primi trenta giorni, dopo i quali la comunità tendeva a stabilizzarsi tanto che la similarità tra i profili ai giorni 60 e 120 presentava una similarità di circa il 90% (Fig. 41). L'applicazione dello Smc *P.*, invece, sembrava causare una diminuzione della biodiversità nei primi dieci giorni, infatti, la comunità era caratterizzata dalla presenza di una popolazione dominante. Dopo dieci giorni dall'inizio del trattamento, fino alla fine della sperimentazione, si assisteva a una trasformazione radicale e stabile della comunità con aumento della biodiversità, evidenziata anche nel dendrogramma (Fig. 41), in cui i profili al giorno 0 e 10 avevano una similarità con i profili del giorno 30, 60 e 120 di circa il 30 %.

E' interessante notare, come, in tutti e tre i dendrogrammi si aveva la stessa modalità di raggruppamento, in cui i profili dei trattamenti con i compost non sterilizzati *clusterizzavano* sempre separatamente dal controllo e il compost sterile.

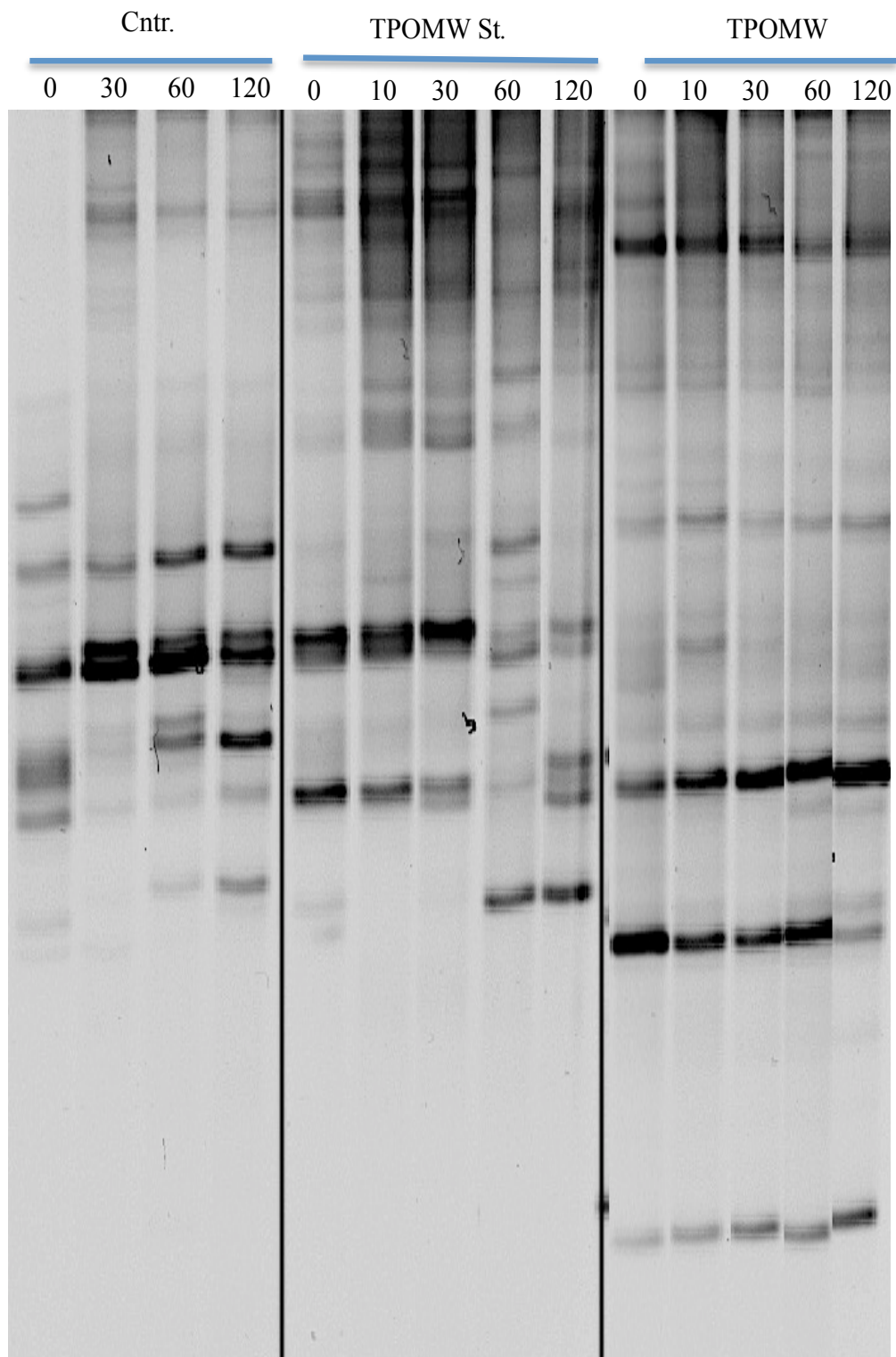


Fig. 36. Profili DGGE del frammento del gene 18S rRNA delle comunità nei suoli trattati. Cntr.: controllo; TPOMW St.: trattamento con compost TPOMW sterilizzato; TPOMW: trattamento con compost TPOMW. I numeri riportati sopra ogni *lane* indicano i giorni: giorno 0, giorno 10, giorno 30, giorno 60, giorno 120.

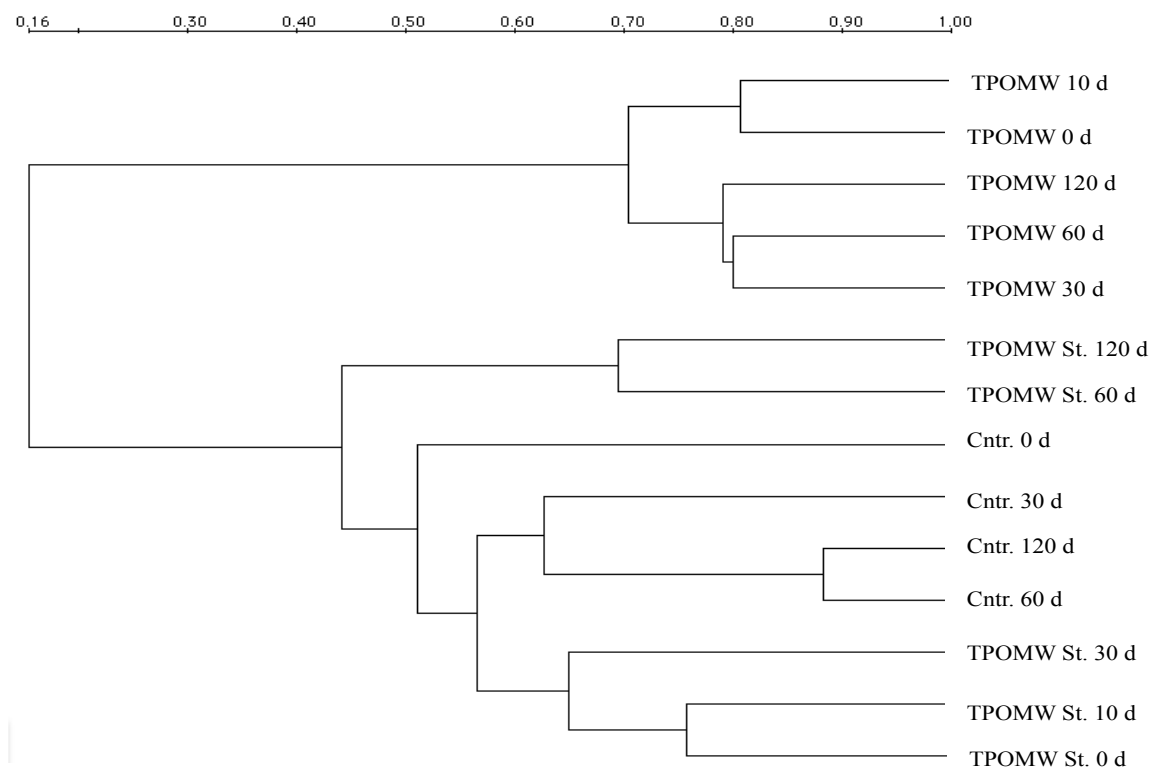


Fig. 37. Dendrogramma di similarità delle comunità fungine ottenute dai profili DGGE dei suoli trattati usando il metodo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means*). Cntr.: controllo; TPOMW St.: trattamento con compost TPOMW sterilizzato; TPOMW: trattamento con compost TPOMW.

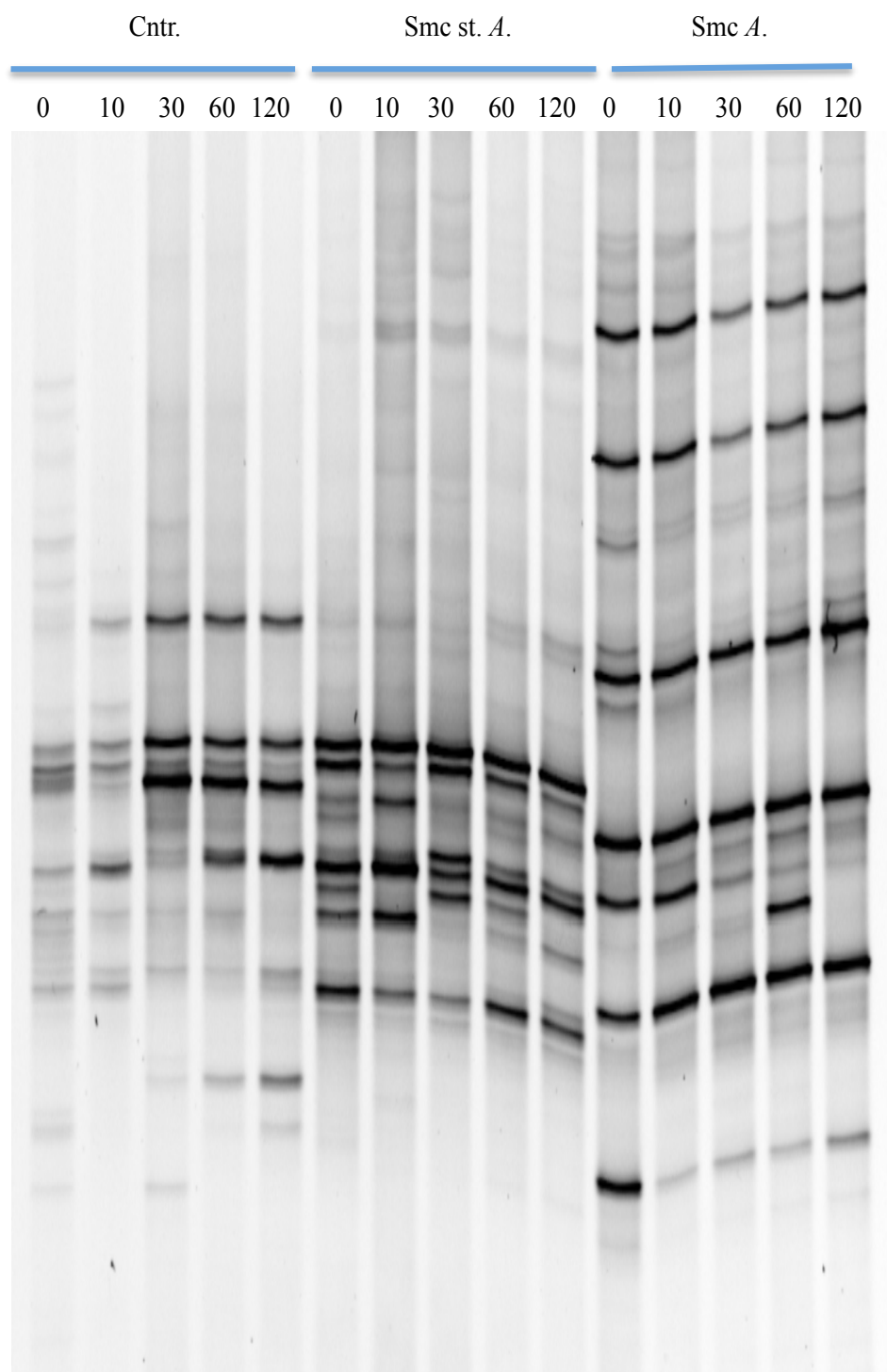


Fig. 38. Profili DGGE del frammento del gene 18S rRNA delle comunità nei suoli trattati. Cntr.: controllo; Smc A. St.: trattamento con *spent mushroom compost* di *Agaricus bisporus* sterilizzato; Smc A.: trattamento con *spent mushroom compost* di *Agaricus bisporus*. I numeri riportati sopra ogni *lane* indicano i giorni: giorno 0, giorno 10, giorno 30, giorno 60, giorno 120.

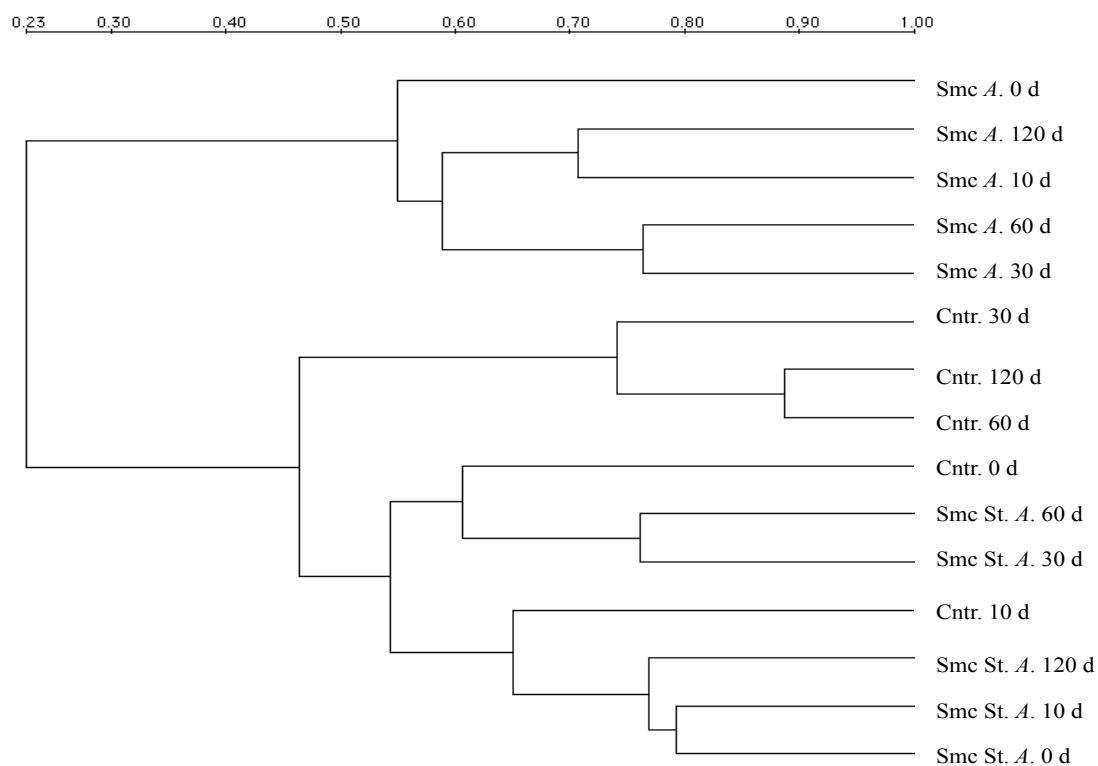


Fig. 39. Dendrogramma di similarità delle comunità fungine ottenute dai profili DGGE dei suoli trattati usando il metodo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means*). Cntr.: controllo; Smc A. St.: trattamento con *spent mushroom compost* di *Agaricus bisporus* sterilizzato; Smc A.: trattamento con *spent mushroom compost* di *Agaricus bisporus*.

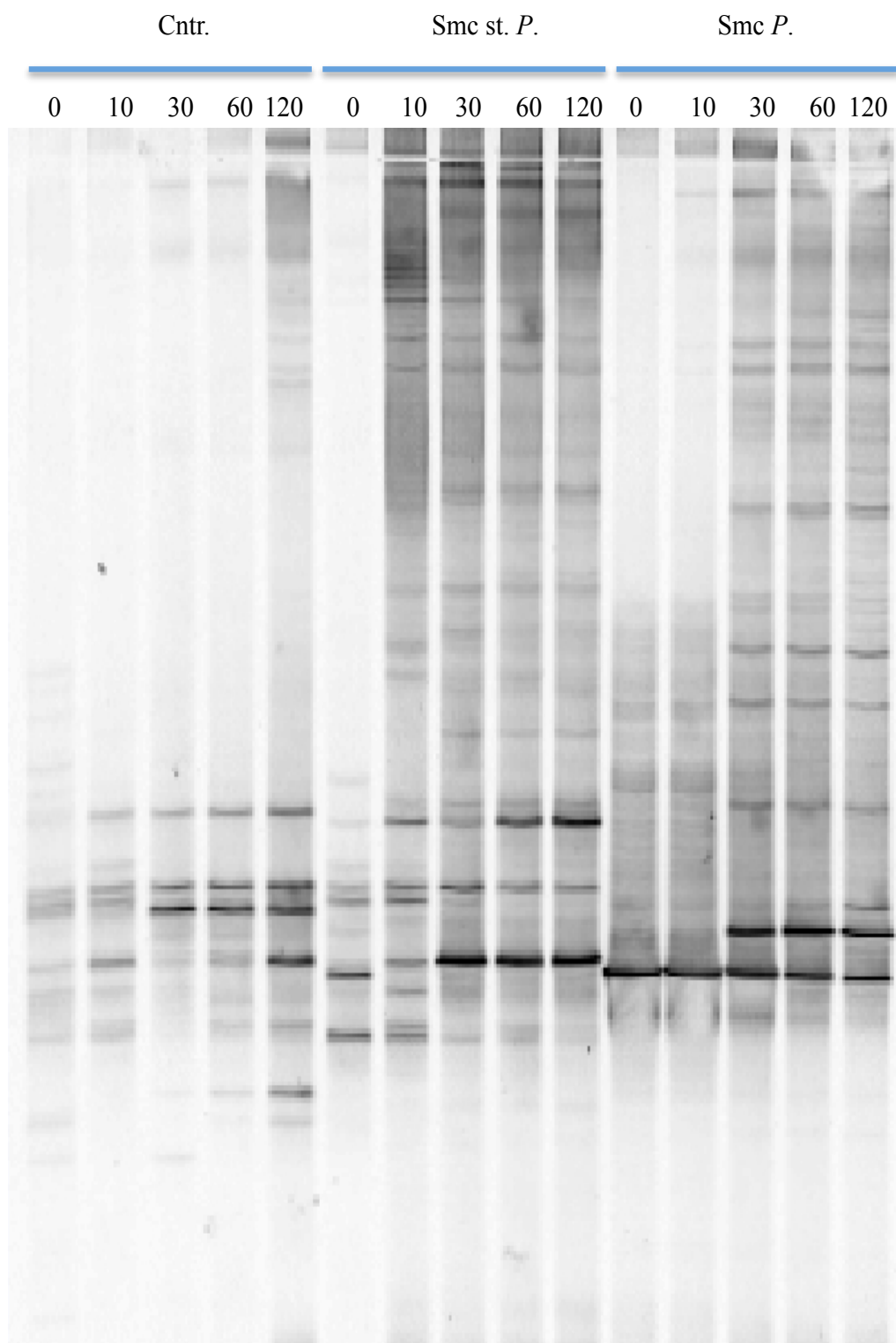


Fig. 40. Profili DGGE del frammento del gene 18S rRNA delle comunità nei suoli trattati. Cntr.: controllo; Smc *P. St.*: trattamento con *spent mushroom compost* di *Pleurotus ostreatus* sterilizzato; Smc *P.*: trattamento con *spent mushroom compost* di *Pleurotus ostreatus*. I numeri riportati sopra ogni *lane* indicano i giorni: giorno 0, giorno 10, giorno 30, giorno 60, giorno 120.

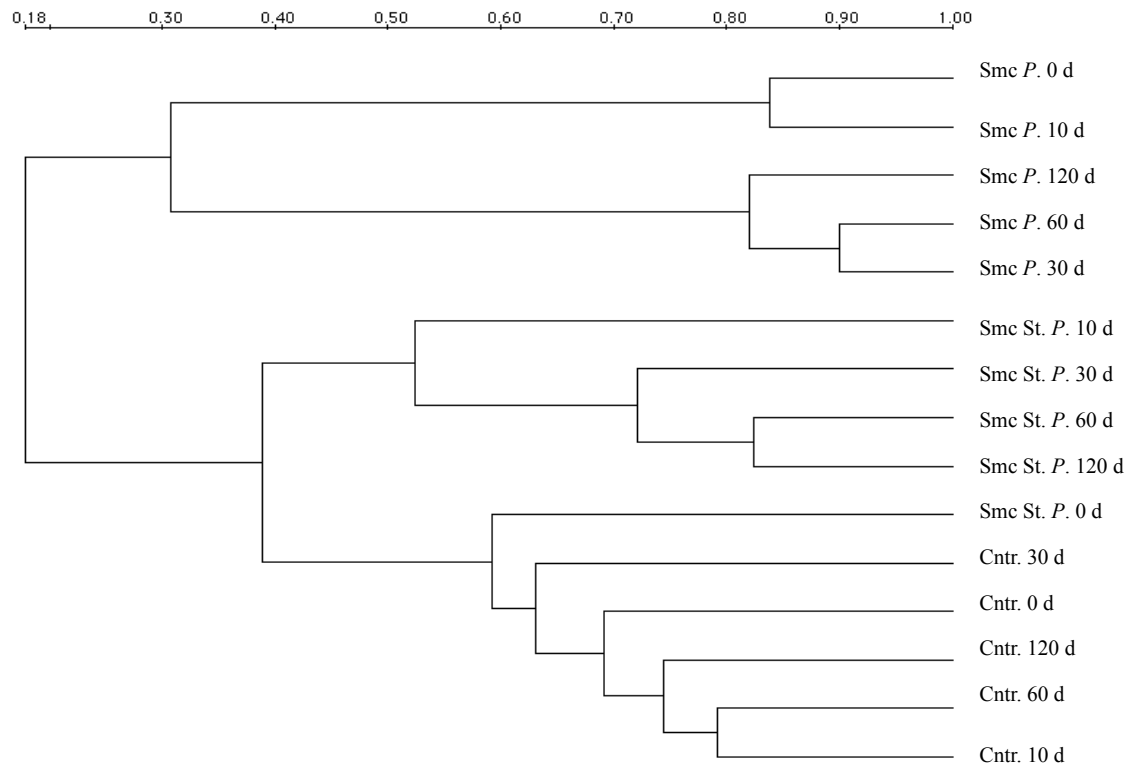


Fig. 41. Dendrogramma di similarità delle comunità fungine ottenute dai profili DGGE dei suoli trattati usando il metodo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means*). Cntr.: controllo; Smc P. St.: trattamento con *spent mushroom compost* di *Pleurotus ostreatus* sterilizzato; Smc P.: trattamento con *spent mushroom compost* di *Pleurotus ostreatus*.

L'effetto dei vari trattamenti sull'abbondanza fungina valutata attraverso la tecnica della qPCR viene riportato in figura 42 e 43.

La biomassa fungina nel suolo trattato con compost da TPOMW, già al tempo iniziale, era quasi 100000 volte superiore a quella presente nel controllo e rimaneva pressoché invariata fino alla fine della prova. Nel controllo, invece, a fine sperimentazione, si aveva un incremento della biomassa, di circa 100 volte, aumento relativamente piccolo se paragonato a quello registrato nel suolo trattato con TPOMW St. in cui la differenza tra il tempo iniziale e quello finale era di 10000 volte (Fig. 42).

In figura 43 vengono riportate le abbondanze relative ottenute durante la prova allestita con i due *Spent mushroom compost*. L'applicazione di queste matrici non sterili causava già al tempo iniziale un aumento della biomassa fungina che per lo Smc A. era di 1000 volte in più rispetto al controllo, mentre per Smc P. registrava un aumento superiore alle 100000. In entrambi i trattamenti, la quantità rimaneva pressoché costante e comunque le variazioni registrate non cambiavano l'ordine di grandezza. Al contrario, i suoli ammendati con i compost sterili mostravano già dopo dieci giorni, un notevole incremento delle biomasse fungine che raggiungevano e superavano le 10000 in più rispetto al controllo. Dopo aver subito una parziale diminuzione durante i successivi cinquanta giorni, al tempo finale, i suoli così trattati, presentavano un'abbondanza equiparabile al suolo trattato con il corrispettivo compost non sterilizzato.

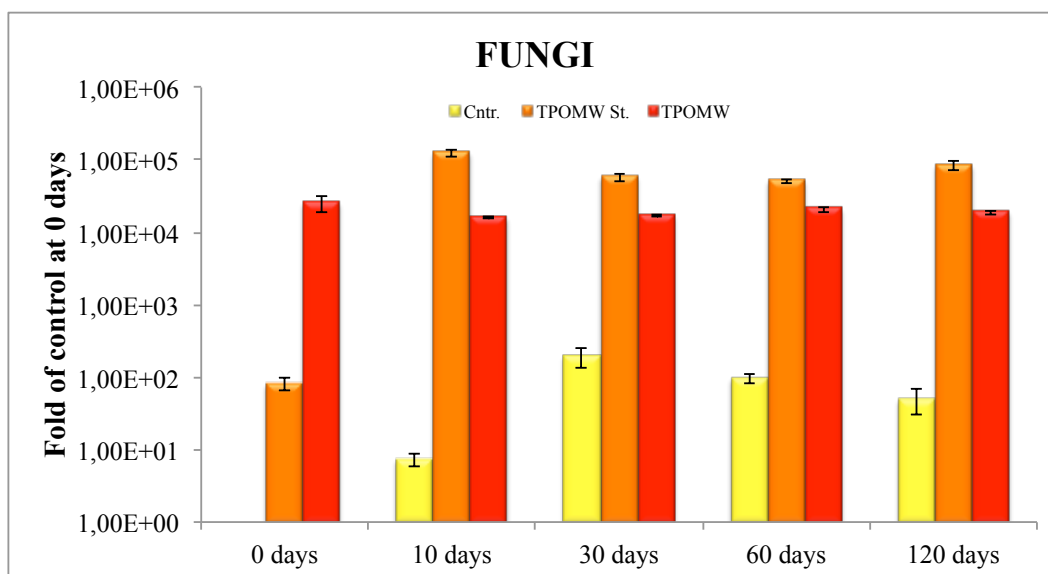


Fig. 42. Numero di copie del gene 16S calcolato nel suolo controllo e nei trattati con compost TPOMW sterilizzato e con compost TPOMW; ed espresso come logaritmo in base 10 rispetto al valore osservato nel controllo al tempo zero.

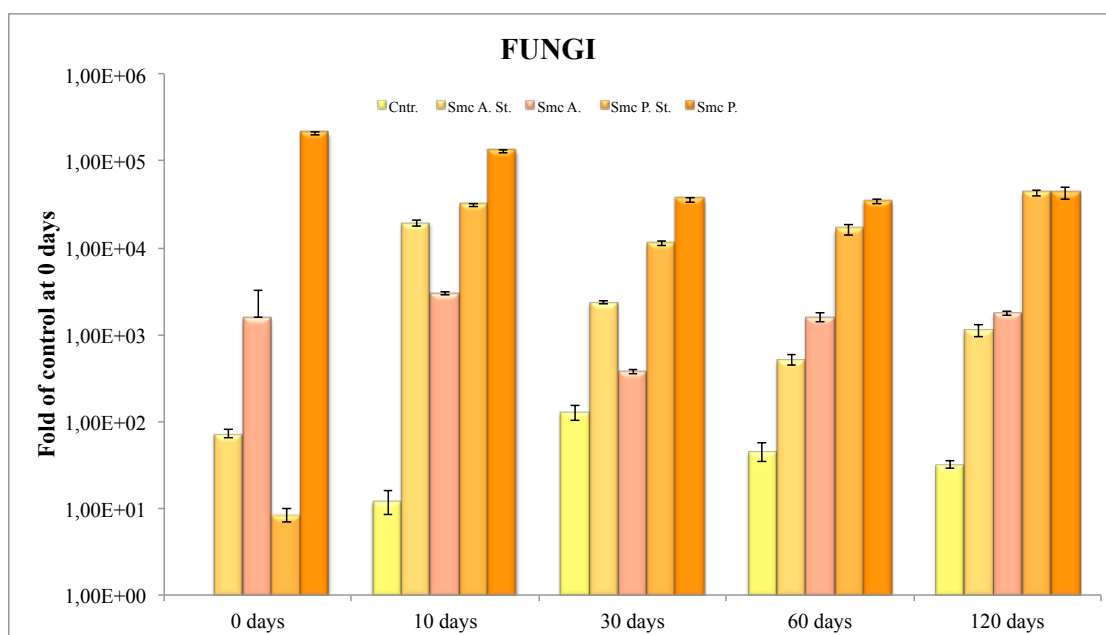


Fig. 43. Numero di copie del gene 16S calcolato nel suolo controllo e nei trattati con le due tipologie di spent mushroom compost: con *spent mushroom compost* di *Agaricus bisporus* sterilizzato (Smc A. St.) e non (Smc A.); e con *spent mushroom compost* di *Pleurotus ostreatus* (Smc P. St.) e non (Smc P.). Espresso come logaritmo in base 10 rispetto al valore osservato nel controllo al tempo zero.

2.1.2 DISCUSSIONE

L'effetto dell'applicazione del compost su una matrice contaminata da idrocarburi alifatici è stato studiato da diversi autori (Kästner e Mahro, 1996; Hesnawl e McCartney, 2006; Kriipsalu et al., 2007.) Alcuni, hanno affrontato aspetti microbiologici che implicavano la valutazione dell'attività biologica, attraverso le attività enzimatiche o respirometriche del suolo, o entrambe (Ceccanti et al., 2006; Tejada et al., 2008; Lee et al; 2008), ma solo pochissimi lavori valutano gli effetti del trattamento direttamente sulle comunità microbiche autoctone e in particolare le implicazioni ecologiche (Gandolfi et al., 2010).

Nel nostro caso la valutazione dell'impatto dei trattamenti, sulla struttura e le dinamiche delle comunità batteriche e fungine, è stata effettuata attraverso l'analisi dei profili *DGGE* a 0, 10, 30, 60 e 120 giorni, mentre l'abbondanza microbica è stata analizzata con un approccio coltura-indipendente (*qPCR*) e non attraverso metodi coltura-dipendenti. Infatti, la quantificazione di microrganismi vitali basata sulla coltivazione in laboratorio, da sola, potrebbe fornire informazioni forvianti (Taccari et al., 2012), poiché è ben noto che solo una piccola parte dei microrganismi del suolo può essere isolata e coltivata su piastra (Becker et al., 2000).

L'applicazione dei compost (TPOMW, e Smc), sterili o tal quali causavano una modificazione della struttura delle comunità batterica e fungina autoctona. Le modificazioni apportate dalle due tipologie di trattamenti, sono il risultato di fenomeni estremamente diversi. L'aggiunta dei compost sterili, che simulavano una *biostimulation* (TPOMW St., Smc A St. e Smc P. St.), comportava sempre un sostanziale incremento della biomassa microbica batterica e fungina, in accordo con quanto riscontrato da altri autori (Margesin, e Schinner, 2001; Viñas et al 2005). Come riportato da Margesin e collaboratori (2000), si può ipotizzare che l'aumento del numero di microrganismi (batteri e funghi) sia indicativo di un processo di biodegradazione. Inoltre questa tipologia di trattamento causava uno *shift* delle comunità batteriche e fungine del suolo durante tutto il periodo della prova. Come evidenziato dai *fingerprinting*, infatti, si registravano profonde differenze tra un tempo e l'altro all'interno di uno stesso trattamento. In particolare al tempo finale, i profili dei trattamenti con i compost sterili risultavano diversi tra loro e diversi da quello del controllo. Questi risultati potrebbero trovare una possibile spiegazione nel fatto che i compost utilizzati, derivando da matrici completamente diverse, erano

caratterizzati da parametri chimico-fisici differenti, quali per esempio le concentrazioni di carbonio, azoto, sostanza organica o micronutrienti che notoriamente influenzano la composizione delle comunità microbiche di un suolo contaminato (Ruberto et al., 2003). Ruberto e collaboratori (2009) riportano che, le comunità autoctone, esposte per lungo tempo ai contaminanti, migliorano l'efficienza di metabolizzazione dell'inquinante, quando C, N, P non rappresentano più un fattore limitante per i microrganismi.

L'ammendamento del suolo con i compost non sterilizzati simulava la *bioaugmentation*, in quanto con l'aggiunta del compost venivano introdotte nel suolo anche le complesse comunità microbiche dell'ammendante. Questa tipologia di trattamento sembra aver condizionato e inibito qualsiasi tipo di evoluzione della comunità autoctona.

Analizzando le comunità durante l'arco della sperimentazione, è stato possibile osservare le interazioni tra la flora microbica del compost e quella indigena. E' stato visto che l'apporto di comunità microbiche caratterizzate da una grande biodiversità, tipica di queste matrici, riusciva a colonizzare fortemente e nel tempo, il suolo contaminato, inibendo l'evoluzione del microbiota indigeno. Questo trovava riscontro dai risultati ottenuti tramite *DGGE*, in cui i profili di ciascuno dei tre trattamenti (TPOMW, Smc A. e Smc P.), nel tempo, rimanevano invariati e molto diversi dal controllo. L'ipotesi che il suolo possa essere stato colonizzato dalle popolazioni del compost veniva confermato anche dal confronto tra il profilo *DGGE* del trattamento TPOMW al tempo 0 e quello relativo alla matrice compost TPOMW, da cui si riscontrava la presenza di molte bande comuni.

L'unica eccezione si osservava per la comunità fungina del trattamento con Smc P. in cui la comunità, nei primi dieci giorni, era caratterizzata da un'unica popolazione dominante, che dopo trenta giorni si evolveva in una comunità più complessa. Un fenomeno di questo tipo potrebbe essere spiegato dal fatto che questa matrice, essendo stata utilizzata come substrato per la crescita del fungo *Pleurotus*, ne presentava ancora abbondanti residui. La dominanza delle popolazioni del compost sul microbiota del suolo, trovato durante questo studio, sembra essere in disaccordo con i risultati ottenuti da altri autori (Ros et al., 2006; Saison et al., 2006; Chu et al., 2007;) in cui veniva dimostrato che il microbiota del compost influenza solo in modo transitorio l'attività e la composizione della comunità autoctona.

Una possibile spiegazione a questi dati apparentemente discordanti veniva data da Gandolfi e collaboratori (2010). In questo lavoro gli autori, analizzando l'effetto del compost sulla flora endogena di due suoli contaminati, uno da IPA e l'altro da *diesel-oil*, avevano trovato che la capacità di colonizzare una matrice contaminata, dipendeva dalla

biodiversità delle comunità microbiche autoctone. Nel suolo contaminato da IPA, in cui la biodiversità era bassa, le comunità del compost avevano colonizzato il suolo, tanto che la composizione della comunità dopo il trattamento era molto simile a quella del compost. Questo effetto non veniva riscontrato per il suolo contaminato da *diesel-oil* in cui la comunità del suolo era molto ricca e abbondante.

L'effetto di colonizzazione delle comunità dei compost veniva confermata anche dai risultati dell'analisi dell'abbondanza batterica e fungina. Infatti, l'applicazione dei compost non sterilizzati causava già al giorno 0 un importante e significativo aumento della biomassa microbica rispetto al controllo e che si manteneva costante fino al termine della sperimentazione. Anche questo *trend* dimostrava e confermava che l'aggiunta di compost apportava una cospicua biomassa microbica al suolo. Quando si interpretano i risultati riguardanti l'abbondanza, è bene valutarne il cambiamento nel tempo e relativamente al controllo; Taccari e collaboratori (2012) commentando la differenza tra il controllo e il suolo ammendato con compost, giustificano l'aumento del numero di batteri nel trattamento con compost solo con il possibile effetto dei nutrienti presenti nell'ammendante che vanno a stimolare le popolazioni autoctone, senza prendere in considerazione che il compost rappresenta una ingente risorsa di biomassa microbica che viene incorporata nel suolo (Hamdi et al., 2006; Ros et al., 2010).

Dopo un'analisi accurata di questi dati si può quindi concludere che i risvolti ecologici dell'applicazione di compost derivanti da matrici completamente diverse, quali quelli utilizzati in questa parte del lavoro di tesi, sul suolo contaminato, ha prodotto risultati analoghi. Secondo quanto osservato possiamo dire che la *bioaugmentation* del suolo, con matrici molto ricche di comunità microbiche, può inibire le popolazioni presenti nel suolo in quanto le complesse comunità alloctone tendono a colonizzare stabilmente la matrice per tutta la durata dell'esperimento, causando una sorta d'inibizione delle popolazioni autoctone. Ben diverso è l'effetto sulle popolazioni del suolo quando sono forniti solo i nutrienti contenuti nei compost (TPOMW e SMCs sterilizzati); in questo caso, infatti, si nota, sia da un punto di vista di composizione di comunità, sia dell'abbondanza di biomassa microbica, una reale stimolazione della microflora indigena la cui evoluzione fa presupporre una possibile biodegradazione del contaminante. Per suffragare quest'ipotesi sono necessari ulteriori approfondimenti, attualmente in corso, che mirano a verificare, attraverso le analisi chimiche degli inquinanti, quali tra le due strategie simulate su scala di laboratorio (*bioaugmentation* o *biostimulation*) sia quella migliore per l'abbattimento degli inquinanti. Allo stato delle cose, è comunque possibile ipotizzare che una strategia di

bioaugmentation così drastica, come quella rappresentata dall'aggiunta di una ricca e diversa comunità microbica come quella del compost, possa inibire le popolazioni autoctone che si sono adattate agli inquinanti presenti e quindi rappresentano potenziali microrganismi degradatori degli inquinati stessi. Al contrario, una strategia di *biostimulation*, come quella rappresentata dall'aggiunta di compost sterile, potrebbe favorire il potenziale degradativo della microflora indigena portando ad un abbattimento dei contaminanti presenti.

2.2 PROVA DI BIORISANAMENTO DI UN FANGO CONTAMINATO *ad hoc* CON CARBAMAZEPINA.

La prova su scala di laboratorio, oggetto di questa parte del lavoro di tesi, consisteva nel biorisanamento di un fango attivo (proveniente da un impianto di depurazione) contaminato da farmaci, attraverso l'uso di compost derivanti da scarti dei frantoi oleari a due fasi.

Per la valutazione della capacità degli ammendanti di stimolare il processo di *remediation*, il fango veniva contaminato *ad hoc* con una concentrazione nota di carbamazepina pari a 0,1 mg/g *dw*. Questo farmaco veniva scelto per la sua già nota elevata persistenza (Rodríguez-Rodríguez et al., 2012) e per la sua frequente presenza in tracce in questa tipologia di matrice.

I compost utilizzati, erano ottenuti con due diverse metodologie di compostaggio: il primo compost, nominato *TPOMW* (il cui processo è stato caratterizzato nella prima parte del presente lavoro di tesi), era ottenuto con il metodo tradizionale di compostaggio che prevede un periodico rivoltamento del cumulo al fine di garantire una corretta e omogenea areazione. Il secondo compost, nominato “Big Bag”, era ottenuto con un processo di compostaggio statico. Per la valutazione degli effetti ecologici dell'applicazione di questi compost sulla matrice contaminata, entrambi i compost venivano utilizzati sia tal quali per simulare una *bioaugmentation*, sia sterilizzati per simulare una *biostimulation*.

2.2.1 RISULTATI

Effetti dei trattamenti sulla comunità batterica indigena.

Tramite l'utilizzo della *DGGE* è stato possibile ottenere i *fingerprinting* di comunità, nel tempo, dei fanghi diversamente trattati.

Come mostrato in figura 44, il controllo presentava una comunità batterica estremamente complessa la cui struttura rimaneva invariata fino al giorno 20, ma fine sperimentazione si assisteva ad una sua evoluzione con un'importante calo della biodiversità ma anche con la comparsa di specie nuove.

Il fango trattato con TPOMW sterile, che al tempo iniziale presentava un *fingerprinting* molto simile a quello del controllo, dopo cinque giorni subiva una trasformazione tale che, confrontato con il giorno 0, come evidenziato anche dal dendrogramma (Fig. 45), aveva una similarità del 30%. Questo *shift* della comunità sembrava essere, però, solo temporaneo, infatti, già dal giorno 10 e fino alla fine della prova, la sua struttura ritornava ad essere molto simile a quella del tempo iniziale.

La comunità del fango ammendato con TPOMW, era caratterizzata sempre da un'alta biodiversità, ma la struttura era diversa da quella del controllo al tempo iniziale, come evidenziato dal dendrogramma per il quale le due comunità avevano una similarità di circa il 50 %. Nel corso della sperimentazione la sua composizione rimaneva piuttosto stabile, ma anche in questo caso, come per il controllo, al tempo finale subiva un'evoluzione tale da presentare una similarità con la comunità iniziale di circa il 40% e con una riduzione della biodiversità.

Era interessante notare come i fanghi trattati con Big Bag sterile e Big Bag presentavano, tra loro, uno stesso *trend* (Fig. 46) ma diverso da quello osservato per TPOMW. Infatti, in entrambi i fanghi trattati con big bag, la comunità di partenza rimaneva invariata fino al giorno 20, ma a fine prova ogni trattamento aveva un profilo molto diverso da quelli precedenti come confermato anche dal dendrogramma (Fig. 47) nel quale viene riportata una similarità tra le rispettive comunità iniziali e finali dei due trattamenti pari a circa al 27%.

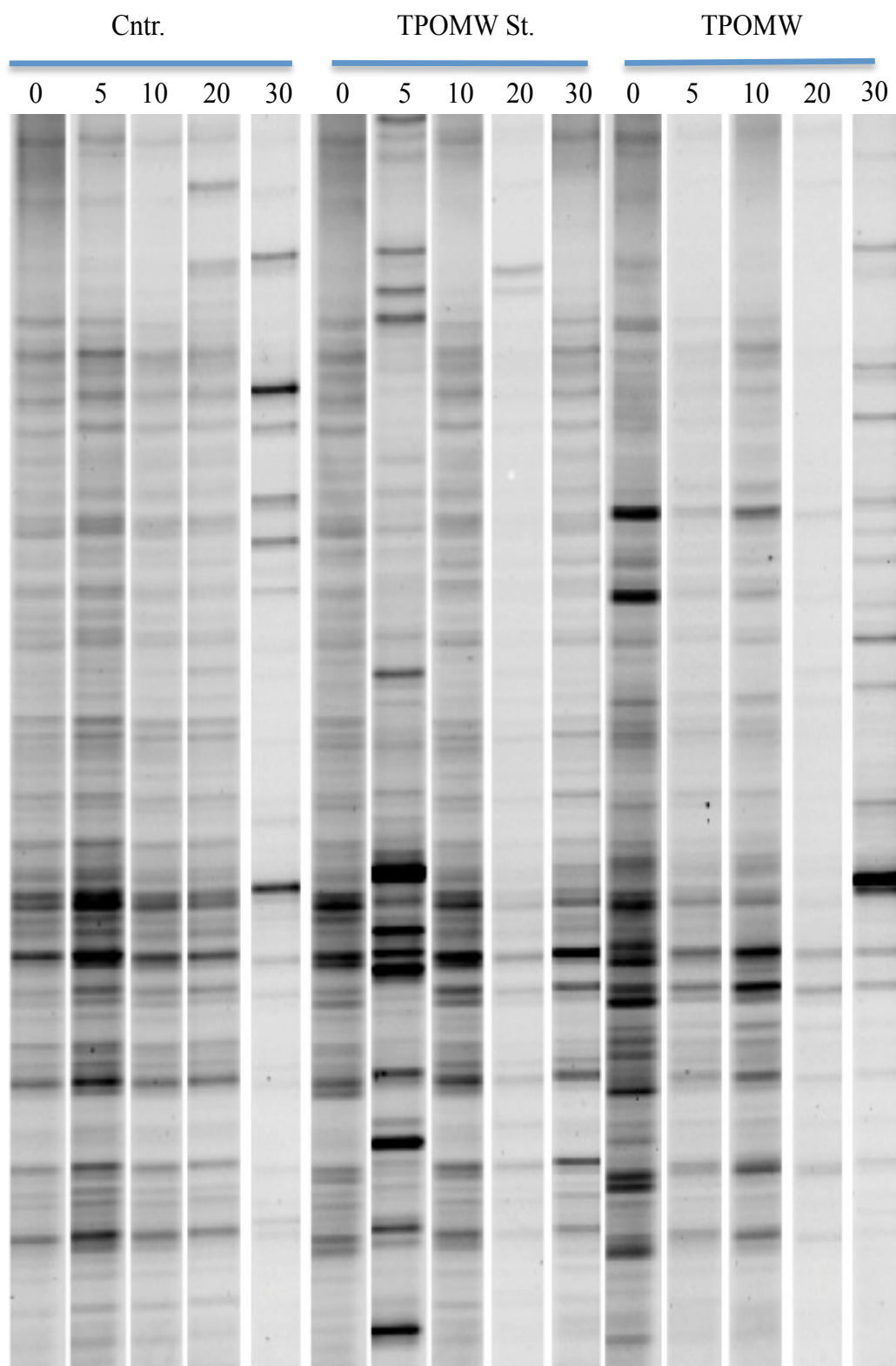


Fig. 44. Profili DGGE del frammento del gene 16S rRNA delle comunità nei fanghi trattati. Cntr.: controllo; TPOMW St.: trattamento con compost TPOMW sterilizzato; TPOMW: trattamento con compost TPOMW. I numeri riportati sopra ogni *lane* indicano i giorni: giorno 0, giorno 5, giorno 10, giorno 20, giorno 30.

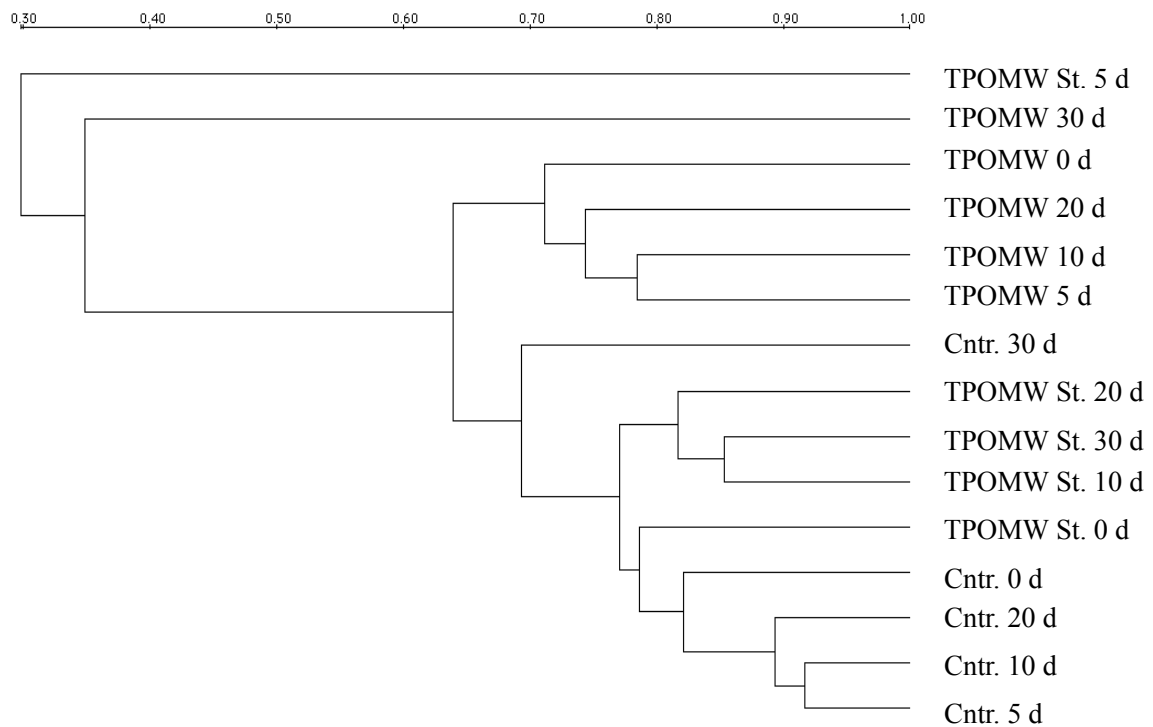


Fig. 45. Dendrogramma di similarità delle comunità batteriche ottenute dai profili DGGE dei fanghi trattati, usando il metodo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means*). Cntr.: controllo; TPOMW St.: trattamento con compost TPOMW sterilizzato; TPOMW: trattamento con compost TPOMW.

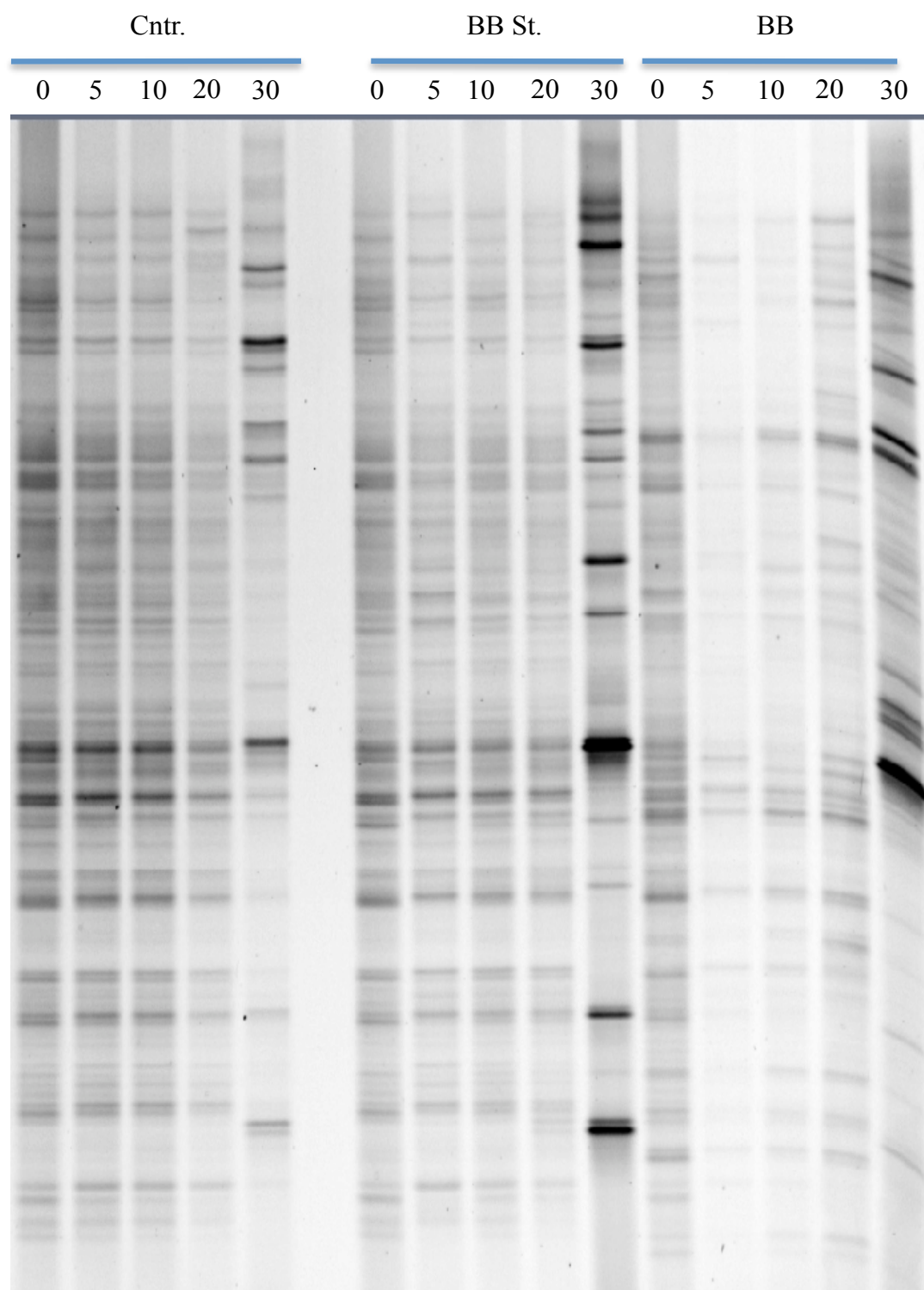


Fig. 46. Profili DGGE del frammento del gene 16S rRNA delle comunità nei fanghi trattati. Cntr.: controllo; BB St.: trattamento con compost Big Bag sterilizzato; BB: trattamento con compost Big Bag. I numeri riportati sopra ogni *lane* indicano i giorni: giorno 0, giorno 5, giorno 10, giorno 20, giorno 30.

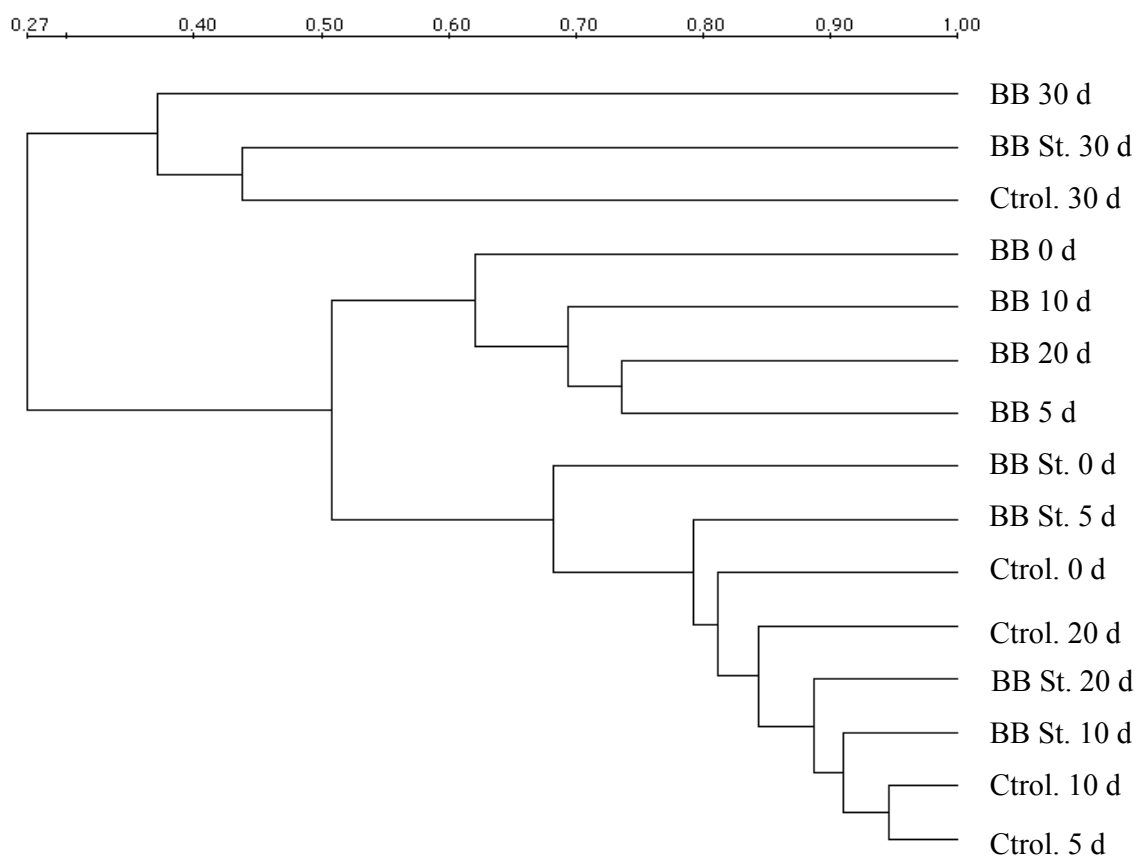


Fig. 47. Dendrogramma di similarità delle comunità batteriche ottenute dai profili DGGE dei fanghi trattati, usando il metodo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means*). Ctrol: controllo; BB St.: trattamento con compost Big Bag sterilizzato; BB: trattamento con compost Big Bag.

L'abbondanza batterica dei fanghi diversamente trattati, veniva valutata tramite *qPCR*.

In figura 48 vengono riportate le quantificazioni assolute dei fanghi ammendati con TPOMW sterile e non.

La quantità di batteri sia nel controllo sia nei due i trattamenti, era elevata, anche se nel trattamento con TPOMW risultava leggermente più abbondante.

Durante la sperimentazione si aveva, in tutte e tre le tesi, una diminuzione della biomassa batterica imputabile alla presenza del contaminante (carbamazepina).

Mentre nel controllo e nel trattamento del fango con TPOMW sterile questa diminuzione era di circa due ordini di grandezza, nel fango trattato con TPOMW si aveva un'importante riduzione di circa cinque ordini di grandezza.

Come mostrato in figura 49, per i due fanghi ammendati con il compost Big Bag, si registrava un andamento diverso da quello osservato con l'altro compost. Infatti, una limitata riduzione della biomassa batterica si osservava solo al tempo intermedio, mentre a fine prova si aveva un aumento dell'abbondanza per la quale, il fango ammendato con il Big Bag sterile ritornava all'ordine di grandezza iniziale, mentre il fango trattato con Big Bag aumentava di circa 100 volte rispetto al tempo iniziale.

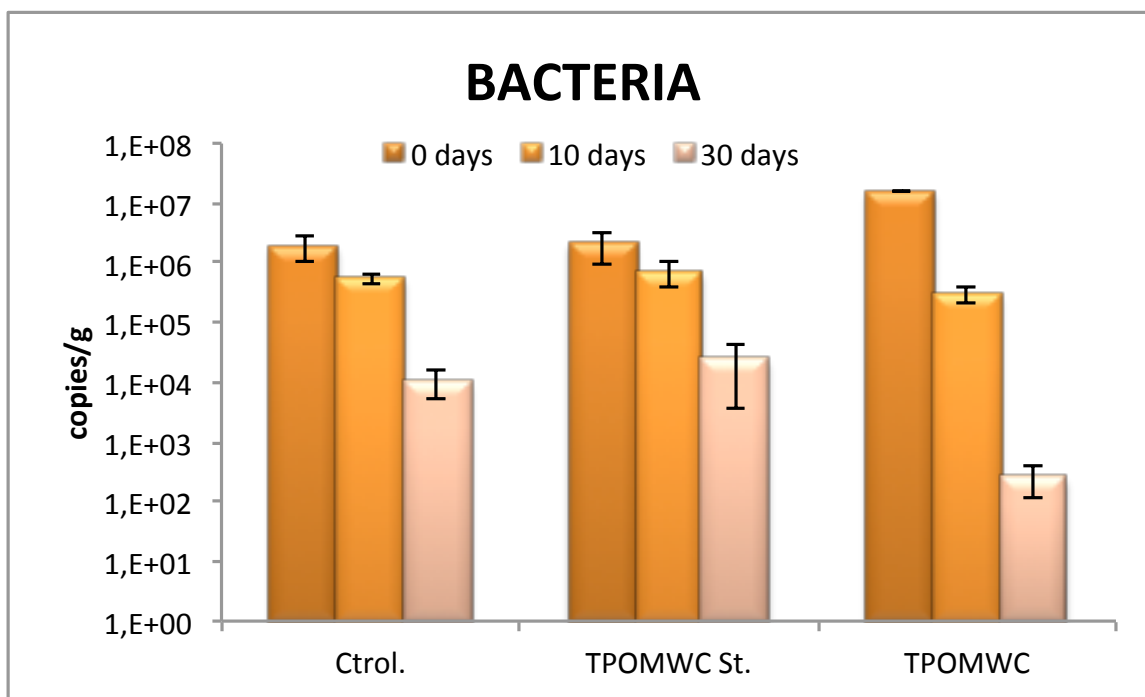


Fig. 48. Numero di copie del gene 16S calcolato nei fanghi controllo e trattati con compost TPOMW sterilizzato e con compost TPOMW.

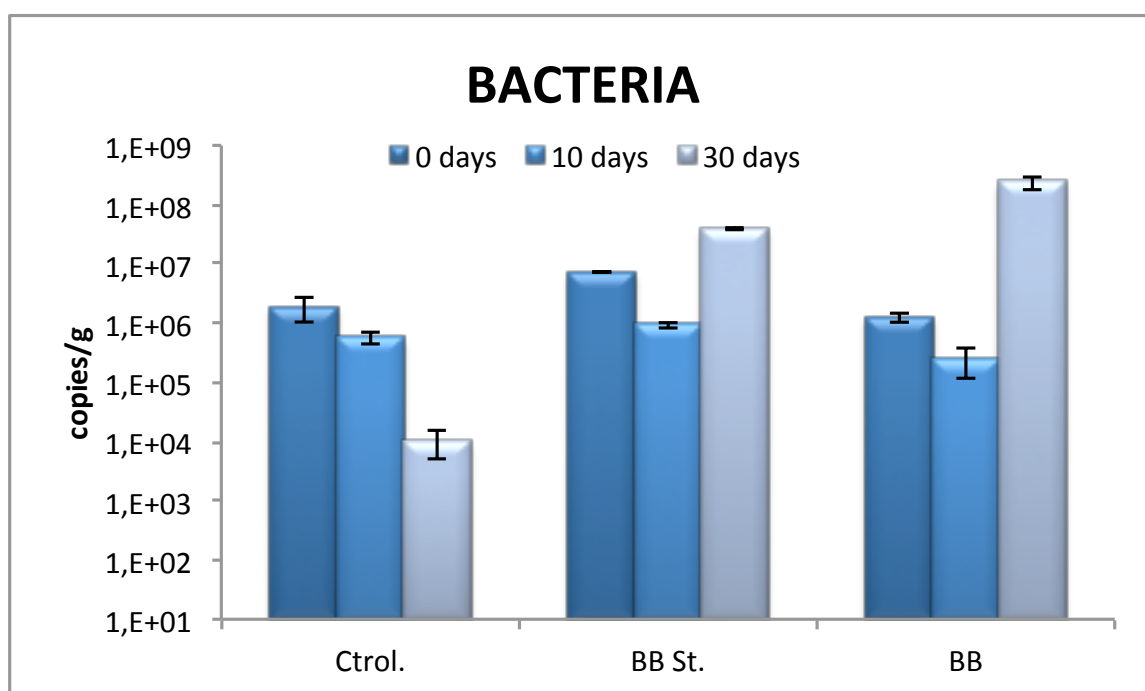


Fig. 49. Numero di copie del gene 16S calcolato nei fanghi controllo e trattati con compost Big Bag sterilizzato e con compost Big Bag.

Effetti dei trattamenti sulla comunità fungina indigena

In figura 50 vengono riportati i *fingerprinting* delle comunità fungine di tutti i trattamenti al tempo iniziale e finale della prova.

Si osservava che al giorno 0, sia il controllo che i fanghi ammendati con i compost sterili (TPOMW St. & BB St.) erano privi di popolazioni fungine, mentre le comunità in cui si utilizzavano TPOMW e Big Bag erano caratterizzati da un'alta biodiversità e presentavano alcune popolazioni comuni. Al tempo finale, sia nel controllo sia nei fanghi trattati con i compost sterili, si aveva la comparsa di popolazioni fungine; in particolare, mentre nel controllo la comunità presentava più popolazioni, i trattati erano caratterizzati da una bassissima biodiversità con la dominanza di un'unica popolazione che era comune ai due trattamenti ma non al controllo. Il TPOMW, invece, subiva una diminuzione della biodiversità e probabilmente anche della biomassa, vista la bassa intensità delle singole bande. Anche la comunità presente nel fango trattato con Big Bag subiva una trasformazione con la presenza di una popolazione fortemente dominante.

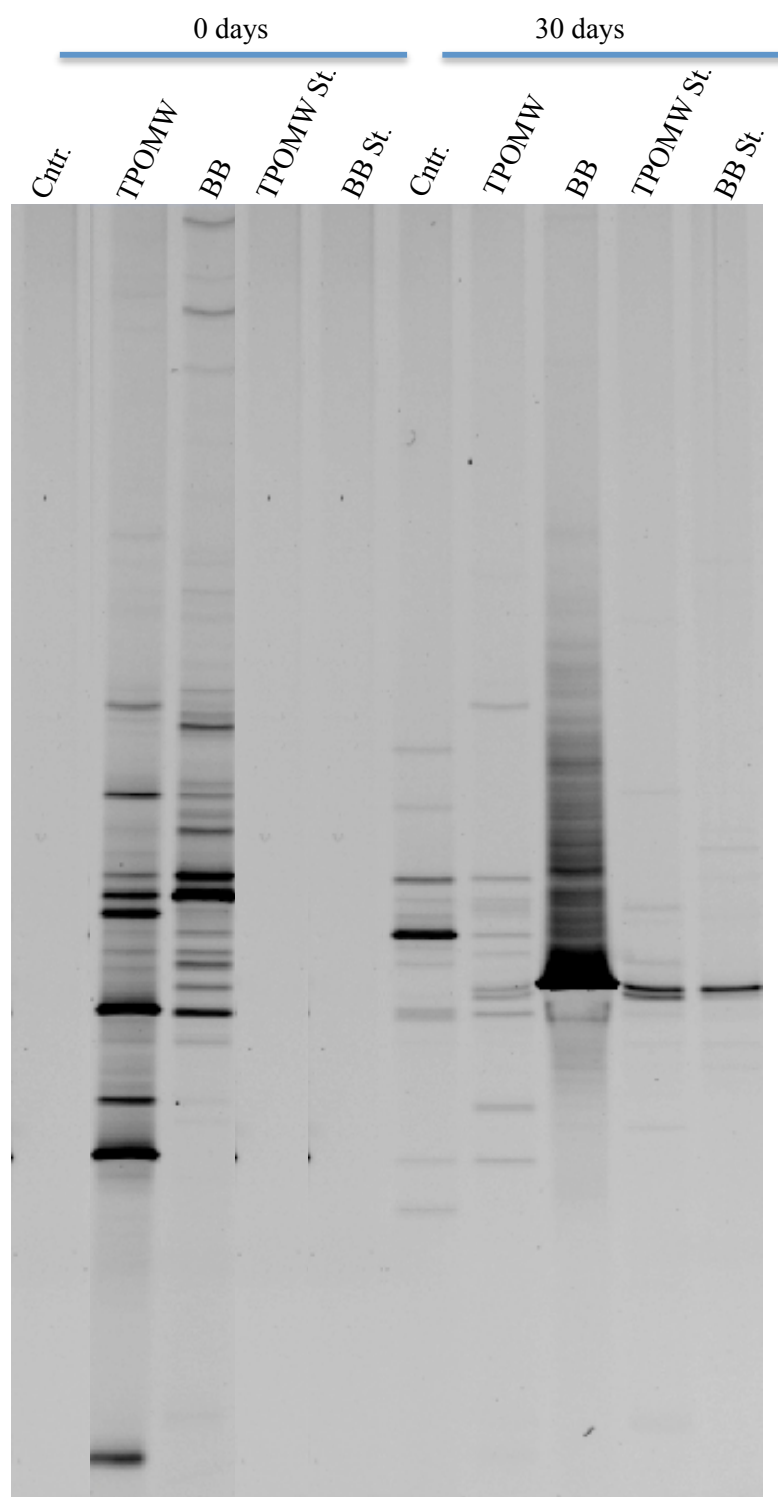


Fig. 50. Profili DGGE del frammento del gene 18S rRNA delle comunità nei fanghi trattati al tempo iniziale e finale. Cntrl: controllo; TPOMW: trattamento con compost TPOMW; BB: trattamento con compost Big Bag; TPOMW St.: trattamento con compost TPOMW sterile; BB St.: trattamento con compost Big Bag sterilizzato.

Effetto dei trattamenti sulla degradazione della carbamazepina

Nelle figure 51 e 52, viene riportata la concentrazione di carbamazepina riscontrata al tempo iniziale e finale di ogni trattamento.

Il controllo sembrava avere buone potenzialità degradative, infatti, la quantità di carbamazepina residua passava da 0,089 mg/g a 0,070 mg/g, con un abbattimento del contaminante del 27% circa.

L'applicazione dei compost tal quali, invece, induceva un abbattimento molto limitato, infatti la concentrazione di carbamazepina nel fango ammendato con TPOMW passava da 0,074 mg/g a 0,068 mg/g con una percentuale di rimozione del 7%, mentre la quantità del farmaco nel fango trattato con Big Bag passava da 0,084 mg/g a 0,073 mg/g e la cui percentuale di abbattimento era di circa il 12% circa. Ottimi risultati, invece, si ottenevano con l'applicazione dei compost sterilizzati, soprattutto con il TPOMW sterile per il quale la quantità di carbamazepina passava da 0,079 mg/g a 0,018 mg/g con la percentuale di degradazione era superiore al 70%, mentre nel fango trattato con il Big Bag sterile la concentrazione passava da 0,106 mg/g a 0,055 mg/g e la percentuale di abbattimento era del 50% circa.

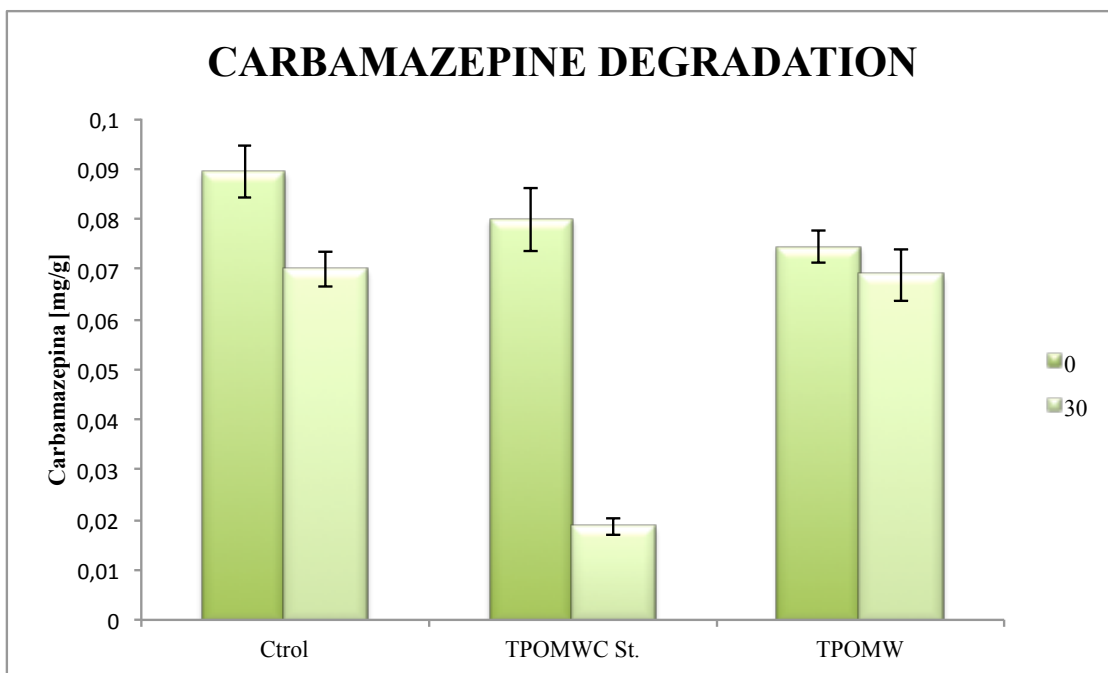


Fig. 51. Degradazione della carbamazepina nel controllo e nei fanghi trattati con TPOMW. Ctrol: controllo; TPOMW St.: trattamento con compost TPOMW sterile; TPOMW: trattamento con compost TPOMW.

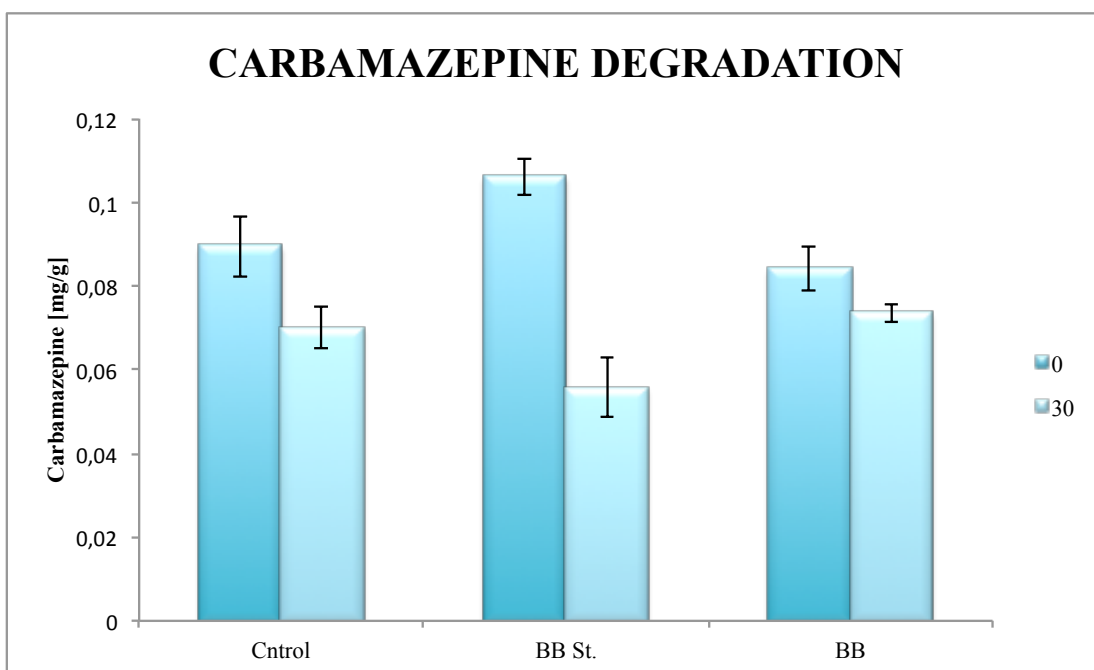


Fig. 52. Degradazione della carbamazepina nel controllo e nei fanghi trattati con TPOMW. Ctrol: controllo; BB St.: trattamento con compost Big Bag sterile; BB: trattamento con compost Big Bag.

2.2.2 DISCUSSIONE

L'eliminazione dei farmaci dai fanghi provenienti da impianti di trattamento delle acque reflue è stata più volte indagata. Alcuni autori riportano che l'efficienza di rimozione dei prodotti farmaceutici durante il trattamento delle acque reflue, dipende dal tipo di farmaco. Infatti, composti quali ibuprofene, naproxene, acido salicilico o paracetamolo vengono facilmente degradati (Beausse, 2004; Tiehm et al., 2010), al contrario, composti come diclofenac, carbamazepina e propyphenazone sono altamente persistenti e la loro rimozione risulta essere dal 5 al 20% circa (Suárez, et al., 2005).

In lavori più recenti, riguardanti la rimozione della carbamazepina dai fanghi, vengono spesso usati funghi ligninolitici, in particolare *Tremetes versicolor* o enzimi da questi derivanti, quali per esempio le laccasi (Marco-Urrea, 2009; Hata, et al., 2010; Rodríguez et al., 2011). Non è mai stato riportato alcun lavoro simile al nostro in cui fossero confrontate diverse strategie quali attenuazione naturale (controllo), *bioaugmentation* con compost o *biostimulation* con compost sterile e in cui si focalizzasse l'attenzione sulle implicazioni ecologiche riguardanti gli effetti dei vari trattamenti sul microbiota indigeno.

Il fango utilizzato in questa prova, prima di lasciare l'impianto di depurazione, era sottoposto a digestione anaerobia seguita da un trattamento termico in cui le temperature raggiungevano i 70°C, subendo così anche una forte disidratazione, a seguito della quale il fango presentava circa un 10 % di umidità (Rodríguez-Rodríguez et al., 2012). In queste condizioni le comunità microbiche sono praticamente inattivate. Durante il trattamento, il fango veniva reidratato e contaminato con una dose elevata del farmaco.

Le comunità batteriche, in tutti i trattati, ad eccezione del TPOMW sterile, risultavano stabili fino all'ultimo tempo, nel quale era possibile vedere una certa evoluzione. Il mantenimento della struttura iniziale per quasi tutta la sperimentazione induce a pensare che durante questo intervallo di tempo, stava avvenendo una “riattivazione” della comunità che una volta acclimatata, riusciva ad evolversi anche in funzione della pressione selettiva esercitata dal farmaco. Nei fanghi trattati con i compost non sterilizzati (TPOMW e Big Bag) ogni comunità, aveva una bassa similarità con quella del controllo; questo indicava che la biomassa batterica contenuta nel compost riusciva in qualche modo a colonizzare il fango, anche se non in maniera così evidente come osservato nella prova riportata nel capitolo precedente (biorisanamento di un suolo storicamente contaminato da

diesel-oil). Questa diversità nella capacità di colonizzazione di una matrice contaminata da parte delle comunità del compost, era causata dall'alta biodiversità della comunità batterica della matrice di partenza (controllo), come riportato da Gandolfi e collaboratori (2010).

Una situazione diversa si osserva nella comunità del fango trattato con TPOMW sterile, in cui i profili rimanevano molto simili tra loro. L'unica modificazione, veniva riscontrata a cinque giorni dall'inizio del trattamento. Si può ipotizzare che i nutrienti contenuti nel TPOMW sterile, abbiano aiutato ad accelerare la riattivazione della comunità del fango e ne abbiano conferito una maggiore resilienza.

Inoltre, le alte concentrazioni del farmaco sembravano influire sull'abbondanza batterica, infatti, in tutti i trattamenti si aveva una diminuzione della biomassa, che risultava molto marcata nel fango ammendato con TPOMW, mentre solo transitoria nei fanghi ammendati con Big Bag (sterile e non).

Nel controllo e nei trattamenti con compost sterili, le popolazioni batteriche erano quelle del fango. Poiché nei fanghi si ritrovano comunemente residui di farmaci, in particolare la carbamazepina, era plausibile, che la maggior parte di queste popolazioni, anche se non capaci di degradare, erano comunque in grado di tollerare questa sostanza. E' possibile che anche le popolazioni della comunità presente nel trattamento con Big Bag potessero risultare tolleranti al farmaco.

Per quanto riguarda le comunità fungine, data l'assenza di popolazioni nel fango e nei fanghi ammendati con compost sterili al tempo iniziale, era possibile che il loro ritrovamento al tempo finale fosse l'effetto di una colonizzazione successiva di organismi ambientali come supposto anche da Rodriguez e collaboratori (2012) che lavorando sullo stesso fango e nello stesso periodo, ha riscontrato quanto anche da noi trovato. Le popolazioni presenti nei fanghi trattati con TPOMW e Big Bag, invece, sembravano aver subito una forte pressione selettiva dovuta alle alte concentrazioni del farmaco. Dati questi risultati, e confrontati con quelli delle comunità batteriche, si può supporre che le comunità fungine non abbiano avuto una forte rilevanza sull'attività di degradazione del farmaco.

Associando i dati ecologici a quelli chimici riguardanti la quantificazione residua della carbamazepina, sembrerebbe che la degradazione sia dipendente da due fattori: co-metabolismo e competizione tra le specie autoctone e quelle alloctone.

In particolare, si è visto che i trattamenti in cui si è avuta un'alta percentuale di degradazione erano quelli in cui i fanghi venivano ammendati con TPOMW sterile con un 76% e con Big Bag sterile del 50%. In questi trattamenti non si ha competizione tra le comunità del fango e quelle del compost; si trovano solo le popolazioni del fango che

sembrerebbero essere stimulate dall'aggiunta di nutrienti (presenti nel compost) che sono fondamentali per un processo co-metabolico di degradazione del contaminante. In questo caso, la diversa composizione chimica dei compost, sembra aver influito sull'attività degradativa. Ciò significa che il farmaco può essere degradato in presenza di un substrato obbligato primario. I lavori pubblicati riguardanti il co-metabolismo di questa tipologia di contaminanti sono attualmente limitati. Diversi studi sulla rimozione di xenobiotici, però, hanno dimostrato che la degradazione può essere migliorata attraverso l'aggiunta di fonti di carbonio organico o altre sostanze nutrienti come azoto e fosfato nonché componenti minerali (Boiesen et al., 1993; Fava et al., 1995). È stato anche suggerito che i substrati primari, non solo servono a sostenere la produzione di biomassa, ma agiscono anche come donatori di elettroni per il co-metabolismo del substrato di crescita (Perkins et al., 1994). Tran, e collaboratori al (2009) hanno inoltre riscontrato che la rimozione di farmaci persistenti come diclofenac, carbamazepina e propyphenazone migliorava a concentrazioni iniziali più elevate di ammoniaca.

E' lecito pensare, quindi, con questa tipologia di trattamento, che l'unico fattore che sembra contribuire al successo degradativo sia il co-metabolismo.

Le popolazioni del fango erano in grado di degradare il contaminante, infatti, la degradazione era del 27% circa; essendo state precedentemente inattivate, si può supporre che il processo di metabolizzazione della carbamazepina sia partito in un secondo momento, dopo la loro riattivazione. In questo caso si potrebbe pensare che il fattore che ha permesso il successo degradativo fosse l'assenza di competizione.

Al contrario, nei fanghi trattati con i compost non sterilizzati, l'evento principale che condizionava la bassa degradazione, poteva essere la competizione. La biomassa microbica dei compost è molto abbondante e molto ricca di popolazioni diverse. In particolare la comunità batterica sembrava aver annullato quella indigena non ancora completamente riattivata. L'effetto dei nutrienti presenti nei compost non ha prodotto gli stessi risultati del trattamento con i compost sterile, poiché l'evento preponderante è stato presumibilmente la competizione. Alcuni autori, hanno dimostrato che l'aggiunta di alcune tipologie di ammendanti organici utilizzati per la rimozione di altri contaminanti, diminuiva l'efficienza di degradazione (Rouchaud et al., 1997). Il calo di biodegradazione veniva spesso attribuito alla ridotta biodisponibilità dell'inquinante a causa dell'assorbimento sulla sostanza organica (Sánchez-Brunete e Tadeo 2000; Fernández 2007). Nel nostro caso però il successo degradativo osservato nel trattamento dei fanghi con compost sterile, smentisce la possibilità della riduzione di biodisponibilità della carbamazepina.

2.3 CONCLUSIONI

La maggior parte degli studi riguardanti prove di biorisanamento va a valutare il successo biotecnologico, cioè l'efficienza di rimozione del contaminante, mentre poca attenzione viene dedicata ai risvolti di ecologia microbica. In particolare, un numero limitato di studi ha verificato come il ricco microbiota del compost proveniente dagli scarti dei frantoi oleari, influisca sull'attività e sulla composizione della comunità microbica autoctona di una matrice contaminata (Di Gennaro et al., 2009; Moreno et al., 2009; Sampedro et al., 2009). Infatti, nonostante esistano numerose evidenze sperimentali riguardanti l'effetto dell'aggiunta di compost sull'abbattimento degli inquinanti, si hanno limitate conoscenze di come quest'effetto venga mediato dalle comunità microbiche alloctone (del compost) ed autoctone (del suolo).

Poiché il successo dell'applicazione di una determinata strategia di biorisanamento è conseguenza diretta dell'attività microbica degradativa, l'obiettivo di questo studio era la valutazione degli effetti ecologici derivanti dall'applicazione del compost *TPOMW* in una matrice contaminata.

L'utilizzo di tecniche molecolari ha permesso di comprendere come la strategia che prevede l'applicazione del compost tal quale in una matrice contaminata, sembra essere non efficace, in quanto le comunità presenti nel compost tendono a colonizzare il substrato andando ad inibire la microflora endogena potenzialmente più efficiente da un punto di vista degradativo. Al contrario, l'apporto di nutrienti, forniti con compost sterile, sembrava stimolare adeguatamente le popolazioni indigene favorendo l'espressione delle loro potenzialità degradative, comportando la rimozione anche solo parziale, del contaminante in tempi relativamente più brevi rispetto ad una attenuazione naturale.

Questi risultati dimostrano come la comprensione degli effetti dei processi di biorisanamento sulle comunità microbiche sia fondamentale per una corretta definizione delle strategie d'intervento per un'efficace rimozione dei contaminanti.

CONCLUSIONI GENERALI.

Una corretta gestione degli scarti delle lavorazioni agro-industriali costituisce un aspetto imprescindibile dello sviluppo economico che ora più che mai mira a diventare eco-sostenibile. Per questo motivo, nel nostro Paese, secondo produttore di olio d'oliva, il compostaggio degli scarti derivanti dai frantoi oleari rappresenta un'interessante forma di riciclaggio e valorizzazione di questi sottoprodotti. Tra i molteplici utilizzi di questa tipologia di compost, di particolare interesse potrebbe essere l'applicazione in strategie di biorisanamento di siti contaminati. L'aggiunta di questi ammendanti a matrici inquinate, infatti, potrebbe facilitare la degradazione dei contaminanti presenti poiché il compost rappresenta sia una fonte di nutrimento che può stimolare l'attività degradativa del microbiota autoctono, sia una fonte di biomassa microbica con grandi potenzialità degradative. In questi processi biotecnologici, i microrganismi ambientali giocano un ruolo chiave. Appare, quindi, chiaro come studi di ecologia microbica possano fornire un supporto fondamentale per la comprensione dei meccanismi di base e per l'ottimizzazione delle strategie applicative. L'approccio sperimentale per lo studio dei microrganismi ambientali è profondamente cambiato in questi anni, passando da metodi tradizionali coltura-dipendenti, che forniscono solo una visione parziale dei microrganismi presenti in natura, a un approccio indipendente dalla coltivazione basato su metodiche molecolari che permettono una visione più ampia della grande biodiversità microbica ambientale.

Questo lavoro di tesi ha dimostrato come un attento studio delle comunità microbiche coinvolte nella valorizzazione degli scarti agro-industriali e nelle strategie di biorisanamento di matrici ambientali inquinate, basandosi su moderne metodiche molecolari coltura-indipendenti, possa diventare un valido strumento per un'approfondita comprensione di questi processi.

Per quanto riguarda la valorizzazione dei sottoprodotti dei frantoi oleari attraverso il processo di compostaggio, è stato possibile dimostrare come la successione di popolazioni batteriche e fungine specializzate sia fondamentale per la trasformazione di questo scarto

in un compost di buona qualità. In particolare, è stato messo in evidenza come la fase termofila del processo, in cui avviene la più intensa attività degradativa, sia associata ad un'alta biodiversità microbica, e come la fase di stabilizzazione chimico-fisica della matrice sia caratterizzata anche da una stabilizzazione della comunità microbica. L'identificazione di specie batteriche e fungine coinvolte nelle diverse fasi del processo di compostaggio ha, inoltre, permesso di comprenderne il ruolo funzionale per la trasformazione di questi scarti.

La correlazione osservata tra comunità batteriche e caratteristiche chimico-fisiche di un *set* di compost derivanti da *TPOMW* ottenuti con approcci tecnologici diversi ha permesso di elaborare l'ipotesi che la misurazione della biodiversità microbica, in quanto strettamente legata al livello di maturazione del compost, possa essere utilizzata come un possibile indicatore per la definizione della maturità del compost. Quest'approccio sperimentale ha, infatti, permesso di mostrare il miglior approccio tecnologico per il processo di compostaggio di questo tipo di scarto che, nel caso analizzato, consisteva nella realizzazione di un ammendante misto portato a maturazione in reattore.

L'utilizzo di questo compost nel biorisanamento di due diverse matrici contaminate, un suolo storicamente inquinato da *diesel-oil* ed un fango attivo contaminato da farmaci, ha permesso di approfondire le due diverse strategie di biorisanamento basate su ammendanti: *bioaugmentation* e *biostimulation*. In particolare, l'aggiunta della complessa e ricca comunità microbica del compost, tipica di strategie di *bioaugmentation*, aveva la capacità di colonizzare completamente il substrato a scapito delle popolazioni autoctone. Un effetto diverso si osservava quando le matrici contaminate venivano ammendate con i compost sterili che fornivano solo i nutrienti contenuti nel compost, come nel caso di strategie di *biostimulation*, infatti, si poteva osservare un'evoluzione della comunità autoctona che aveva come conseguenza la stimolazione delle potenzialità degradative dei microrganismi permettendo così, almeno nel caso del fango contaminato da farmaci, una rimozione dell'inquinante.

Alla luce di quanto detto, si può concludere che il compostaggio dei sottoprodotti dei frantoi oleari si è rivelato un ottimo metodo per riciclare questa tipologia di scarto agro-industriale, ma che l'applicazione di questo compost in strategie di biorisanamento deve essere attentamente valutata, anche in funzione degli aspetti di ecologia microbica relativi alle comunità autoctone e alle loro potenzialità degradative.

BIBLIOGRAFIA

Agnolucci M., Cristani C., Battini F., Palla M., Cardelli R., Saviozzi A., Nuti M. 2013. Microbially-enhanced composting of olive mill solid waste (wet husk): Bacterial and fungal community dynamics at industrial pilot and farm level. *Bioresource technol.* 134: 10-6.

Alburquerque J.A., González J., García D., Cegarra J. 2006. Measuring detoxification and maturity in compost made from “alperujo”, the solid by-product of extracting olive oil by the two-phase centrifugation system. *Chemosphere.* 64:470–477.

Alexander M. 1999. Biodegradation and bioremediation, Academic Press. London.

Alexander M. 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 34: 4259–4265.

Alexander M., 1994. Biodegradation and bioremediation, Academic Press, Inc, San Diego. 248-250.

Ali T.A., Wainwright A.M. 1994. Growth of *Phanerochaete chrysosporium* in soil and its ability to degrade the fungicide benomyl. *Bioresource Technol.* 49: 197-201.

Altieri R., Esposito A. 2008. Olive orchard amended with two experimental olive mill wastes mixtures: effects on soil organic carbon, plant growth and yield. *Bioresour Technol.* 99: 8390-3.

Altieri R., Esposito A., Nair T. 2011. Novel static composting method for bioremediation of olive mill waste. *Int Biodeterior.* 65: 786–789.

Amann R. 2000. Who is out there? Microbial aspects of biodiversity. *Syst. Appl. Microbiol.* 23: 1-8.

Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. 1995. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59: 143-169.

Amirante P., 1998. Utilizzazione agronomica dei sottoprodotti dell'estrazione olearia: aspetti legislativi, tecnologici e risultati sperimentali. *Rs rifiuti solidi*, vol. XII n. 1.

Amirante P., Montel G.L., 1999. Tecnologie ed impianti per il compostaggio intra ed interaziendali in “Il compostaggio in ambito agricolo. Promozione ed impiego del compost in agricoltura biologica”. *I Quaderni di Biopuglia* n.5, Istituto Agronomico Mediterraneo Bari, pp.136-141.

Anastasi A., Varese G.C., Voyron S., Scannerini S., Marchisio V.F. 2002. Systematic and functional characterization of fungal biodiversity in compost and vermicompost. In: Michel F.C.,

Anderson I. C, Campbell C. D, Prosser J. I. 2003. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environ. Microbiol.* 5: 36–47.

Andreozzi R., Marotta R., Pinto G., Pollio A. 2002. Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity. *Water Res.* 36: 2869-2877.

Ashton D., Hilton M., Thomas K.V. 2004. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Sci. Total Environ.* 333: 167–184.

Atlas R.M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45: 108-209.

Atlas R.M. 1995. Bioremediation of petroleum pollutants. *Int. Biodeter. Biodegr.* 35: 317–327.

Atlas R.M., Bartha R. 1997. Microbial Ecology: fundamentals and applications 4th edition, cap14. 110

Baeta-Hall L., Céu Sàágua M., Lourdes Bartolomeu M., Anselmo A.M., Fernanda Rosa M. 2005. Bio-degradation of olive oil husks in composting aerated piles. *Bioresource. Technol.* 96: 69–78.

Ballarin-Denti A., Bertazzi P.A., Facchetti S., Fanelli R., Mocarelli P. 1999 Chemistry, Man and Environment. The Severo accident 20 years on: monitoring, epidemiology and remediation, Elsevier Oxford, UK.

Barron L., Tobin J., Paull B. 2008. Multi-residue determination of pharmaceuticals in sludge and sludge enriched soils using pressurized liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Environ. Monitor.* 10: 353-361.

Beausse J. 2004. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trac- Trend. Anal. Chem.* 23: 753–761.

Beck-Friis B., Smårs S., Jönsson H., Eklind Y., Kirchmann H. 2003. Composting of source-separated household organics at different oxygen levels: Gaining an understanding of the emission dynamics. *Compost Sci Util.* 11: 41–50.

Becker S., Böger P., Oehlmann R., Ernst A. 2000. PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative Taq nuclease assays in analyses of microbial communities. *Appl. Environ. Microb.* 66: 4945e4953.

Beffa T., Blanc M., Marilley L., Fischer J.L., Lyon P.-F., Aragno M. 1996b. Taxonomic and metabolic microbial diversity during composting. In: de Bertoldi M., Sequi P., Lemmes B., Papi T., Eds, “The Science of Composting”. Part 1, Chapman & Hall, London, pp. 149-161.

Belur P.D., Mugeraya G., 2011. Microbial production of tannase: state of the art. *Res. J. Microbiol.* 6: 25–40.

Benitez H. Sainz R. Nogales. 2005. Hydrolytic enzyme activities of extracted humic substances during the vermicomposting of a lignocellulosic olive waste. *Bioresource Technol.* 96: 785–790.

Bernhard M., Muller J., Knepper T. R. 2006. Biodegradation of persistent polar pollutants in wastewater: Comparison of an optimised lab-scale membrane bioreactor and activated sludge treatment. *Water Res.* 40: 3419-3428.

Boiesen. A., Arvin. E., Broholm K. 1993. Effect of mineral nutrients on the kinetics of methane utilization by methanotrophs. *Biodegradation.* 4: 163–170.

Bollag J.M., Bollag W.B. 1995. Soil Contamination and the Feasibility of Biological Remediation. In Bioremediation Science and Application. "Soil Science Society of American, Madison, special publication". 43: 1-12.

Bonito G., Isikhuemhen O. S., Vilgalys, R. 2010. Identification of fungi associated with municipal compost using DNA-based techniques. *Bioresource technol.*, 101: 1021–7.

Breitenbach E. 1998. Phytosanitäre Qualitätsbeurteilung von gewerblich hergestellten Komposten anhand ihres Pilzspektrums. PhD Dissertation. Humboldt-Universität Berlin, Germany, p. 116.

Bundy J.G., Paton G.I., Campbell C.D. 2002. Microbial communities in different soil types do not converge after diesel contamination. *J. Appl. Microbiol.* 92: 276-288.

Buser H.R., Poiger T., Mueller M.D. 1999. Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 33: 2529–2535.

Cabrera, A., Cox L., Velarde P., Koskinen W. C., Cornejo J. 2007. Fate of diuron and terbuthylazine in soils amended with two-phase olive oil mill waste. *J. Agr. Food Chem.* 55: 4828–34.

Cahyani V.R., Matsuya K., Asakawa S., Kimura M. 2004. Succession and phylogenetic profile of eukaryotic communities in the composting process of rice straw estimated by PCR-DGGE analysis. *Biol. Fertil. Soils.* 40: 334-344.

Caminada D., Escher C., Fent K. 2006. Cytotoxicity of pharmaceuticals found in aquatic systems: Comparison of PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines. *Aquat. Toxicol.* 79: 114-123.

Carballa M., Omil F., Lema J.M., Llompart M., Garcia- Jares C., Rodriguez I., Gomez M., Ternes T. 2004. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res.* 38: 2918–2926.

Cawthray G.R. 2003. An improved reversed-phase liquid chromatographic method for the analysis of low-molecular mass organic acids in plant root exudates *J. Chromatogr.* 1011: 233–240

Cayuela M.L., Sanchez-Monedero M.A., Roig A. 2006. Evaluation of two different aeration systems for composting two-phase olive mill wastes. *Process. Biochem.* 41: 616–623.

Ceccanti B., Masciandaro G., Garcia C., Macci C., Doni S. 2006. Soil Bioremediation: Combination of Earthworms and Compost for the Ecological Remediation of a Hydrocarbon Polluted Soil. *Water Air Soil Poll.*, 177: 383–397.

Cegarra J., Amor J.B., González J., Bernal M.P., Roig A. 2000. Characteristics of a new solid olive-mill-by-product (“alperujo”) and its suitability for composting. In: Warman, P.R., Taylor, B.R. (Eds.), “Proceedings of the International Composting Symposium” ICS 99, 1. CBA Press Inc., pp. 124–140

Cerniglia C.E. 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 19: 324–333.

Chamuris G.P., Koziol-Kotch S., Brouse T.M. 2000. Screening fungi isolated from woody compost for lignin-degrading potential. *Compost Sci. Util.* 8: 6-11.

Choi M.H., Park Y.H. 1998. The influence of yeast on thermophilic composting of food waste. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 175–178.

Chowdhury S.P., Khanna S., Verma S.C., Tripathi A.K. 2004. Molecular diversity of tannic acid degrading bacteria isolated from tannery soil. *J. Appl. Microbiol.* 97: 1210–1219.

Chu H., Lin X., Fujii T., Morimoto S., Yagi K., Hu J., Zhang J. 2007. Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. *Soil. Biol. Biochem.* 39: 2971–2976

Church M. J., Short C. M., Jenkins B. D., Karl D. M., Zehr J. P. 2005. Temporal Patterns of Nitrogenase Gene (*nifH*) Expression in the Oligotrophic North Pacific Ocean. *Society*, 71: 5362–5370.

Couto S., Monteiro E., Vasconcelos M.T.S.D. 2010. Mesocosm trials of bioremediation of contaminated soil of a petroleum refinery: comparison of natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Environ. Sci. Pollut. R.* 7: 1339–1346.

Crane M., Watts C., Boucard T. 2006. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Sci Total Environ.* 367: 23-41

Cunningham V, Perino C, D'Aco VJ, Hartmann A, Bechter R. 2010. Human health risk assessment of carbamazepine in surface waters of North America and Europe. *Regul. toxicol. pharm.* 56: 343-351.

Das M., Royer T.V., Leff L.G., 2007. Diversity of fungi, bacteria, and actinomycetes on leaves decomposing in a stream. *Appl Environ Microbiol*, 73(3): 756-767.

Daughton C. G. 2003. Cradle-to-cradle stewardship of drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health. I. Rational for and avenues toward a green pharmacy. *Environ. Health Persp.* 111: 757–774.

Davini E., Di Leo C., Grillo G., Molinari M., Nardella A., Robertiello A. 2001. La bonifica biologica di siti inquinati da idrocarburi. *Eni Tecnologie e Agip Petroli*. Hoepli Editore.

De Bertoldi M., 1992. Microbiological features of sludges and by-products composting. In “Atti del Convegno *Treatment and re-utilization of farm effluents and sludges*”. 10-11-12 dicembre, Lecce, Italy.

De Carvalho C.C.C.R., da Fonseca M.M.R. 2005. The remarkable *Rhodococcus erythropolis*. *Appl. Microbiol. Biot.* 67:715–726.

De Carvalho C.C.C.R., Wick L.Y, Heipieper H.J. 2009. Cell wall adaptations of planktonic and biofilm *Rhodococcus erythropolis* cells to growth on C5 to C16 n-alkane hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biot.* 82:311–320.

De Lorenzo V. 2008. Systems biology approaches to bioremediation. *Curr. Opin. Biotech.* 6: 579– 589.

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

Decreto Ministeriale del 6 luglio 2005. Criteri e norme tecniche generali per la disciplina regionale dell'utilizzazione agronomica delle acque di vegetazione e degli

scarichi dei frantoi oleari, di cui all'articolo 38 del Decreto Legislativo 11 maggio 1999, n.152. *Gazzetta Ufficiale*, Serie generale - n.166 luglio.

Delgado-Moreno L., Almendros G., Peña A. 2007. Raw or incubated olive-mill wastes and its biotransformed products as agricultural soil amendments-effect on sorption-desorption of triazine herbicides. *J. Agr. Food Chem.* 55: 836–43.

Di Gennaro P., Moreno B., Annoni E., García-Rodríguez S., Bestetti G., Benitez E. 2009. Dynamic changes in bacterial community structure and in naphthalene dioxygenase expression in vermicompost-amended PAH-contaminated soils. *J. hazard. Mater.* 172: 1464–9.

Dray S., Chessel D., Thioulouse J. 2003. Co-inertia analysis and the linking of ecological data tables. *Ecology.* 84: 3078-3089.

El Fantroussi S., Verschuere L., Verstraete W., Top E.M. 1999. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprintings and community-level physiological profiles. *Appl. Environ. Microb.*, 65: 982-988.

Fava F., Armenante P.M., Kafkewitz D., Marchetti L. 1995. Influence of organic and inorganic growth supplements on the aerobic biodegradation of chlorobenzoic acids, *Appl. Microbiol. Biot.* 43: 171–177

Federici E., Giubilei M., Santi G., Zanaroli G., Negroni A., Fava F., Petruccioli M, D'Annibale A. 2012. Bioaugmentation of a historically contaminated soil by polychlorinated biphenyls with *Lentinus tigrinus*. *Microbial cell factories*, 11: 1-14.

Federici F, Fava F, Kalogerakis N., Mantzavinos D. 2009. Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill wastewaters. *J. Chem. Technol. Biot.* 84: 895-900.

Fernandez, M. D. 2007. Sa Vol. 55, No. 15.

Filippi C., Bedini S., Levi-Minzi R., Cardelli R., Saviozzi A., 2002. Cocomposting of olive oil mill by-products: Chemical and microbiological evaluations. *Compost Sci Util.* 10: 63–71.

Fogarty A.M., Tuovinen O.H. 1991. Microbial degradation of pesticides in yard waste composting. *Microbiol. Rev.* 55: 225-233.

Gandolfi I., Sicolo M., Franzetti A., Fontanarosa E., Santagostino A., Bestetti G. 2010. Influence of compost amendment on microbial community and ecotoxicity of hydrocarbon-contaminated soils. *Bioresource technol.* 101: 568–75.

Gans J., Wolinsky M., Dunbar J. 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 309: 1387-90.

Gentry T.J., Rensing C., Pepper I.L. 2004. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 34: 447–494.

Golet E. M., Strehler A., Alder A. C., Giger W. 2002. Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge- treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid- phase extraction. *Anal. Chem.* 74: 5455–5462.

Gomes N.C, Fagbola O, Costa R, Rumjanek N.G, Buchner A, Mendona-Hagler L, Smalla K. 2003. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. *Appl Environ Microb.* 69: 3758-66. Erratum in: *Appl Environ Microb.* 2003. 69: 5737

Hachicha S., Cegarra J., Sellami F., Hachicha R., Drira N., Medhioub K., Ammar E. 2009a. Elimination of polyphenols toxicity from olive mill wastewater sludge by its co-composting with sesame bark. *J. Hazard. Mater.* 161: 1131–1139.

Hachicha S., Sellami F., Cegarra J., Hachicha R., Drira N., Medhioub K., Ammar E. 2009b. Biological activity during co-composting of sludge issued from the OMW evaporation ponds with poultry manure. Physico-chemical characterization of the processed organic matter. *J. Hazard. Mater.* 162: 402–409.

Hagn A., Pritsch K., Ludwig W., Schlöter M. 2003. Theoretical and practical approaches to evaluate suitable primer sets for the analysis of soil fungal communities. *Acta Biotechnol.* 4: 373–381.

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: 1153-62

Hansgate A.M., Schloss P.D., Hay A.G., Walker L.P. 2005. Molecular characterization of fungal, community dynamics in the initial stages of composting. *Fems Microbiol. Ecol.* 51: 209–214.

Hassen A., Belguith K., Jedidi N., Cherif A., Cherif M., Boudabous A. 2001. Microbial characterization during composting of municipal solid waste. *Bioresource Technol.* 80: 217-225.

Hata, T., Shintate H., Kawai S., Okamura H., Nishida, T. 2010. Elimination of carbamazepine by repeated treatment with laccase in the presence of 1 hydroxybenzotriazole. *J. hazard. mater.* 181: 1175–8.

He J., Xu Z., Hughes J. 2005. Analyses of soil fungal communities in adjacent natural forest and hoop pine plantation ecosystems of subtropical Australia using molecular approaches based on 18S rRNA genes. *Fems Microbiol. Lett.* 247: 91–100.

Heberer T., Reddersen K., Mechlinski A. 2002. From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. *Water Sci. Technol.* 46: 81–88.

Hejazi R.F., Husain T., Khan F.I. 2003. Landfarming operation of oily sludge in arid region human health risk assessment. *J. Hazard. Mater. B.* 99: 287-302.

Hesnaw R.M., McCartney D.M. 2006. Impact of compost amendments and operating temperature on diesel fuel bioremediation. *J. Environ. Eng. Sci.* 5: 37–45.

Huang D. L., Zeng G. M., Feng C. L., Hu S., Lai C., Zhao M. H., Liu H. L. 2010. Changes of microbial population structure related to lignin degradation during lignocellulosic waste composting. *Bioresource Technol.* 101: 4062-4067.

Hugenholtz P., Pace N.R. 1996. Identifying microbial diversity in the natural environment. *Trends Biotechnol.* 14: 190-197.

Hultman J., Vasara T., Partanen P., Kurola J., Kontro M. H., Paulin L., Auvinen P., Romantschuk M. 2010. Determination of fungal succession during municipal solid waste composting using a cloning-based analysis. *J. appl. microbiol.* 108: 472–87.

International Olive Oil Council (IOOC). 2011 <http://www.internationaloliveoil.org/>

Isken S, de Bont JAM .1998. Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles*. 2: 229–238.

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA' (ISTISAN), Procedimenti analitici adottati per il rilevamento di microinquinanti in sedimenti lagunari, Rapporti ISTISAN 99/28, ISSN 1123-3117, 1999.

Ivors K., Beyer D., Wuest P., Kang S. 2002. Survey of fungal diversity in mushroom compost using sequences of PCR-amplified genes encoding 18S ribosomal RNA. In: Insan, H., Riddeck, N.,

Jimenez N., Vinas M., Sabate J., Diez S., Bayona J.M., Solanas A.M., Albaiges J. 2006. The Prestige oil spill. 2. Enhanced biodegradation of a heavy fuel oil under field conditions by the use of an oleophilic fertilizer. *Environ. Sci. Technol.* 40: 2578–2585.

Jones O. A. H., Voulvoulis N., Lester J. N. 2001. Human pharmaceuticals in the aquatic environment - A review. *Environ. Technol.* 22: 1383-1394.

Jørgensen K. S., Puustinen J., Suortti A.M. 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environ. Pollut.* 107: 245-254.

Joss A. 2005. Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Res.* 39: 4585-4585.

Juck D., Charles T., Whyte L.G., Greer C.W. 2000. Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *Fems Microbiol. Ecol.* 33: 241-249.

Juhasz A.L, Naidu R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int. Biodeter. Biodegr.* 45: 57-88.

Kadian N., Gupta A., Satya S., Mehta R. K., Malik A. 2008. Biodegradation of herbicide (atrazine) in contaminated soil using various bioprocessed materials, *Bioresource Technol.* 11: 4642–4647.

Kane B.E., Mullins J.T. 1973. Thermophilic fungi in a municipal waste compost system. *Mycologia.* 65: 1087–1100

Kästner M., Mahro B. 1996. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost. *Appl. Microbiol. Biot.* 44:668–675.

Khan F. I., Tahir H., Ramzi H. 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *J. Environ. Manage.* 71.: 95-122.

Khomenkov V.G., Shevelev A.B., Zhukov V.G., Zagustina N.A., Bezborodov A.M., Popov V.O. 2008. Organization of metabolic pathways and molecular-genetic mechanisms of xenobiotic degradation in microorganisms: a review. *Appl. Biochem. Micro+*. 44:117–135.

Kiem R., Knicker H., Ligouis B., Kögel-Knabner I. 2003. Airborne contaminants in the refractory organic carbon fraction of arable soils in highly industrialized areas. *Geoderma.* 114: 109– 137

Kinney C. A., Furlong E. T., Zaugg S. D., Burkhardt M. R., Werner S. L., Cahill J. D., Jorgensen G. R. 2006. Survey of organic wastewater contaminants in biosolids destined for land application. *Environ. Sci. Technol.* 40: 7207–7215.

Klamer M, Söchting U. 1998. Fungi in a controlled compost system with special emphasis on the thermophilic fungi. *Acta Hortic.* 469: 405–413

Klammer S., Knapp B., Insam H., Dell'Abete M.T., Ros M. 2008. Bacterial community patterns and thermal analyses of compost of various origins. *Waste Manage. Res.* 26: 173-187.

Klammer, S. (Eds.), "Microbiology of Composting. Springer-Verlag". New York, pp. 17–24.

Klappenbach J.A., Saxman P.R., Cole J.R., Schmidt T.M. 2001. rrnDB: The

ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Res.*, 29: 181-184.

Kremer S., Anke H. 1997. Fungi in bioremediation. in: "*Fungal Biotechnology*", T. Anke (Ed.), Chapman & Hall. Weinheim, pp. 275-295.

Kremesec V. 2005. LNAPL Distribution and recovery in coarse grained soils application of new LNAPL tools, Tecnologie innovative per l'industrializzazione del sistema ambiente – Ecomondo 05 "9th International Trade Fair On Material & Energy Recovery and Sustainable Development" – Atti della IV Conferenza in "Aspetti procedurali ed innovazione (bio)tecnologica nella gestione e bonifica dei siti contaminati, Rimini 26-29 ottobre 2005", Maggioli Editore.

Kriipsalu M., Marques M., Nammari D.R., Hogland W. 2007. Bio-treatment of oily sludge: the contribution of amendment material to the content of target contaminants, and the biodegradation dynamics. *J. Hazard. Mater.* 148: 616–622.

La Guardia M. J., Hale R. C., Harvey E., Matteson Minor T. 2001. Alkylphenol ethoxilate degradation products in land-applied sewage sludge (Biosolids). *Environ. Sci. Technol.* 35: 4798–4804.

Lau K.L., Tsang Y.Y., Chiu S.W. 2003. Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH-contaminated samples. *Chemosphere*. 52: 1539–1546.

Lawrence J. R., Swerhone G. D. W., Wassenaar L. I., Neu T. R. 2005. Effects of selected pharmaceuticals on riverine biofilm communities. *Can. J. Microbiol.* 51: 655-669.

Leahy J.G., Colwell R.R. 1990. Microbial-degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54: 305–315.

Lee D.H., Cody R.D., Kim D.J., Choi S. 2002. Effect of soil texture on surfactant-based Remediation of hydrophobic organic-contaminated soil. *Environ. Int.* 27: 681–688.

Lee S.H., Oh B.I., Kim J.G. 2008. Effect of various amendments on heavy mineral oil bioremediation and soil microbial activity. *Bioresource Technol.* 99: 2578–2587.

Legge 10 maggio 1976, n. 319. Norme per la tutela delle acque dall'inquinamento. Gazzetta Ufficiale - n. 141 maggio., integrata e modificata dalla Legge 24 dicembre 1979, n. 650 ("Gazzetta Ufficiale" - n. 352 dicembre).

Legge 11 novembre 1996, n. 574. Nuove norme in materia di utilizzazione agronomica delle acque di vegetazione e di scarichi di frantoi oleari. Gazzetta Ufficiale, Serie generale - n. 265 novembre .

Li W., Xu X. H., Xiao J. L., Zhang B. X., Li H. T., Lai Y. C. 2012. Analysis of Fungal Diversity in the Composting by Sequencing of Cloned PCR-Amplified 18S rDNA and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Adv. Mater. Res.* 356: 1747-1751.

Liesack W., Stackebrandt E. 1992. Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J. Bacteriol.* 174: 5072-5078.

Lord N.S., Kaplan C.W., Shank P., Kitts C.L., Elrod S.L. 2002. Assessment of fungal diversity using terminal restriction fragment (TRF) pattern analysis: comparison of 18S and ITS ribosomal regions. *Fems Microbiol. Ecol.* 42: 327-337.

Mackay D., Fraser A. 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environ. Pollut.* 110: 375-391

Marchesi J.R., Sato T., Weightman A.J., Martin T.A., Fry J.C., Hiom S.J. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microb.* 64: 795-799.

Marco-Urrea E., Pérez-Trujillo M., Vicent T., Caminal G. 2009. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere.* 74: 765-772.

Margesin R., Schinner F. 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Appl. Environ Microb.* 67: 3127-3133.

Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner F. 2000. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere.* 40: 339-346.

Mariotti C, Merlo C. 2003. Manuale sul disinquinamento “La gestione dei siti inquinati dalle indagini alla bonifica”. AIGA, Pitagora Editrice, Bologna.

McCarthy K., Walker L., Vigoren L., Bartel J. 2004. Remediation of spilled petroleum hydrocarbons by in situ landfarming at an arctic site. *Cold. Reg. Sci. Technol.* 40: 31-39.

Meckenstock R.U., Mouttaki H. 2011. Anaerobic degradation of non-substituted aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotech.*, 22: 406-14.

Metcalfe C. D., Koenig B. G., Bennie D. T., Servos M., Ternes T. A., Hirsch R. 2003. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2872-2880.

Miller F.C. 1992. Composting as a process based on the control of ecologically selective factors. In: Metting, F.B., Jr. (Ed.), "Soil Microbial Ecology, Applications in Agricultural and Environmental Management". Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 515–544.

Mondal K.C., Banerjee D., Banerjee R., Pati B.R. 2001. Production and characterization of tannase from *Bacillus cereus* KBR9. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 47: 263–267.

Mondal K.C., Banerjee R., Pati B.R. 2000. Tannase production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Lett.* 22: 767–769.

Moreno B, Vivas A, Nogales R, Macci C, Masciandaro G, Benitez E. 2009. Restoring biochemical activity and bacterial diversity in a trichloroethylene-contaminated soil: the reclamation effect of vermicomposted olive wastes. *Environ Sci Pollut. R.* 16: 253-64.

Moreno J. L., Hernández T. Garcia C. 1999. Effects of a cadmium-contaminated sewage sludge compost on dynamics of organic matter and microbial activity in an arid soil. *Biol. Fert. Soils.* 28: 230-237.

Mouchacca J. 1997. Thermophilic fungi: Biodiversity and taxonomic status. *Cryptogamie Mycol.* 18: 19±69.

Muyzer G. De Wall E. and Uitterlinden A. 1993. Profiling of complex microbial populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microb.*, 59: 695-700.

Muyzer G., Teske A., Wirsén C.O. 1995. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* 164:165-172.

Nadkarni M.A., Martin F.E., Jacques N.A., Hunter N. 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* +. 148: 257-266.

Nogales R., Benitez E. 2006. Absorption of zinc and lead by *Dittrichia viscosa* grown in a contaminated soil-amended with olive-derived wastes. *B. Environ. Contam. Tox.* 76: 538–544.

Noguchi N., Ohashi T., Shiratori T., Narui K., Hagiwara T., Ko M., Watanabe K., Miyahara T., Taira S., Moriyasu F., Sasatsu M. 2007. Association of tannase- producing *Staphylococcus lugdunensis* with colon cancer and characterization of a novel tannase gene. *J. Gastroenterol.* 42: 346–351.

Novinscak A., DeCoste N., Surette C., Filion M. 2009. Characterization of bacterial and fungal communities in composted biosolids over a 2 year period using denaturing gradient gel electrophoresis. *Can.J.Microbiol.* 55: 375-387.

Nusbaumer C., Job D., Aragno M. 1996. Etude de l'altération par les champignons de l'état physico-chimique des composés ligno-cellulosiques dans un processus naturel de compostage. *Mycologia Helvetica* 8: 51±67.

Ødegaard H., Paulsrud B., Karlsson, I. 2002. Wastewater sludge as a resource: sludge disposal strategies and corresponding treatment technologies aimed at sustainable handling of wastewater sludge. *Water Sci. Technol.* 46: 295–303.

Olsen J.B., Steppe T.F., Litaker R.W., Paerl H.W. 1998. N₂-fixing microbial consortia associated with the ice cover of Lake Bonney, Antarctica. *Microbial Ecol.* 36: 231-238.

Oros-Sichler M, Gomes N.C, Neuber G, Smalla K. 2006. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. *J. Microbiol. Meth.* 65: 63-75.

Osawa R., Walsh T.P 1993. Visual reading method for detection of bacterial tannase. *Appl. Environ. Microb.* 59: 1251–1252

Paredes C., Cegarra J., Bernal M.P., Roig A., 2005. Influence of olive mill wastewater in composting and impact of the compost on a Swiss chard crop and soil properties. *Environ. Int.* 31: 305–312.

Park J.W., Crowley D.E. 2006. Dynamic changes in *nahAc* gene copy numbers during degradation of naphthalene in PAH-contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biot.* 72: 1322-1329.

Perkins P.S., Komisar S.J., Puhakka J.A., Ferguson J.F. 1994. Effects of electron donors and inhibitors on reductive dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol. *Water Res.* 28 : 2101–2107.

Phillips, T.M., Liu, D., Seech, A.G., Lee, H., Trevors, J.T., 2000. Monitoring bioremediation in creosote-contaminated soils using chemical analysis and toxicity tests. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 24: 132–139.

Plaza C., Xing B., Fernández J.M., Senesi N., Polo A. 2009. Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by humic acids formed during composting. *Environ. Pollut.* 157: 257–263.

Pritchard P.H, Mueller J.G., Rogers J.C., Kremer F.V., Glaser J.A. 1992. Oil spill bioremediation: experiences, lessons and results from the Exxon Valdez oil spill Alaska. *Biodegradation.* 3:315–335.

Quintana J.B., Reemtsma T. 2004. Sensitive determination of acidic drugs and triclosan in surface and wastewater by ion- pair reversed-phase liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.* 18: 765–774.

Radjenovic J., Petrovic M., and Barcelo D. 2007. Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor. *Anal. Bioanal. Chem.* 387: 1365-

Rinaldi M., Rana G., Introna M. 2003. Olive mill wastewater spreading in southern Italy: effects on a durum wheat crop. *Field Crop. Res.* 84: 319–326.

Robert P., Escoufier Y. 1976. A unifying tool for linear multivariate statistical methods: the RV-coefficient. *Appl. Statist.* 25: 257-265.

Rodríguez-Rodríguez C. E., Jelić A., Llorca M., Farré M., Caminal G., Petrović M., Barceló D., Vincent T. 2011. Solid-phase treatment with the fungus *Trametes versicolor* substantially reduces pharmaceutical concentrations and toxicity from sewage sludge. *Bioresource technol.* 102: 5602–8.

Rodríguez-Rodríguez C. E., Jelić A., Pereira M. A., Sousa D. Z., Petrović M., Alves M. M., Barceló D., Caminal G., Vincent T. 2012. Bioaugmentation of sewage sludge with *Trametes versicolor* in solid-phase biopiles produces degradation of pharmaceuticals and affects microbial communities. *Environ. Sci. Technol.* 46: 2012–20.

Rodríguez-Rodríguez C. E., Marco-Urrea E., Caminal G. 2010. Degradation of naproxen and carbamazepine in spiked sludge by slurry and solid-phase *Trametes versicolor* systems. *Bioresource technol.* 101: 2259–66.

Roig A., Cayuela M.L., Sánchez-Monedero M.A. 2006. An overview on olive mill wastes and their valorization methods. *Waste Manag.* 26: 960-969.

Ron E.Z., Rosenberg E. 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 249–252.

Ronchi E. 2002. Un Futuro Sostenibile per l'Italia – Rapporto ISSI 2002, Editori Riuniti.

Ros M, Rodríguez I, García C, Hernández T. 2010. Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments. *Bioresource Technol.* 101: 6916-23.

Ros M., Pascual J.A., Garcia C., Hernande, M.T., Insam H. 2006. Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long-term amendment with different composts. *Soil. Biol. Biochem.* 38: 3443–3452.

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

Rotthauwe J.H., Witzel K.P., Liesack W. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microb.* 63: 4704-4712.

Rouchaud J., Gustin F., Cappelen O., Mouraux D. 1997. Pig slurry and cow manure effect on atrazine and metolachlor soil biodegradation in maize. *Bull. Environ. Contam. Tox.* 52: 568-573.

Ruberto L., Dias R., Lo Balbo A., Vazquez S. C., Hernandez, E. A., Mac Cormack, W. P. 2009. Influence of nutrients addition and bioaugmentation on the hydrocarbon biodegradation of a chronically contaminated Antarctic soil. *J. appl. microbiol.* 106: 1101–10.

Ruberto L., Vazquez S.C., Mac Cormack W.P. 2003. Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *Int Biodeter. Biodegr.* 52: 115–125.

Ryckeboer J., Mergaert J., Coosemans J., Deprins K., Swings J. 2003. Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *J. Appl. Microbiol.* 94: 127-137.

Ryckeboer J., Mergaert J., Vaes K., Klammer S., De Clercq D., Coosemans J., Insam H., Swings J. 2003. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Ann. Microbiol.* 53: 349–410.

Rynk R.F., Hoitink H.A.J., Eds, Proceedings of the 2002 International Symposium “Composting and Compost Utilization”. The JG Press Inc., Emmaus, pp. 171-182

Saison C., Degrange V., Oliver R., Millard P., Commeaux C., Montange D., Le Roux X. 2006. Alteration and resilience of the soil microbial community following compost amendment: effects of compost level and compost-borne microbial community. *Environ. Microbiol.* 8: 247–257.

Sakano Y., Kerkhof L. 1998. Assessment of changes in microbial community

structure during operation of an ammonia biofilter with molecular tools. . *Appl. Environ. Microb.* 64: 4077-4082.

Sampedro I., Giubilei M., Cajthaml T., Federici E., Federici F., Petruccioli M., D'annibale A. 2009. Short-term impact of dry olive mill residue addition to soil on the resident microbiota. *Bioresource Technol.* 100: 6098-106.

Sánchez-Brunete C., Tadeo J. L. 2000. Influence of compost addition on the degradation rate of simazine and hexazinone. *Fresen. Environ. Bull.* 9: 652-658.

Sarkhoh N.A., Al-Hasana R.H., Khanafer M., Radwan S.S. 1999. Establishment of oil-degrading bacteria associated with cyanobacteria in oil-polluted soil. *J. Appl. Bacteriol.* 78:194-199.

Sarkhoh N.A., Ghannoum M.A., Ibrahim A.S., Stretton R.J. and Radwan S.S. 1990. Crude oil and hydrocarbon degrading strains of *Rhodococcus*: *Rhodococcus* strains isolated from soil and marine environments in Kuwait. *Environ. Pollut.* 65: 1-18.

Šašek V., Volfová O., Erbanova P., Vyas B.R.M., Matucha M. 1993. Degradation of PCBs by *white-rot* fungi, methylotrophic and hydrocarbon utilizing yeasts and bacteria. *Biotechnol. Lett.* 15: 521-526.

Saviozzi A., Levi-Minzi R., Cardelli R., Biasci A., Riffaldi R., 2001. Suitability of moist olive pomace as soil amendment. *Water Air Soil Poll.* 128: 13–22.

Scheller U., Zimmer T., Kargel E., Schunck W.H. 1996. Characterization of the n-alkane and fatty acid hydroxylating cytochrome P450 forms 52A3 and 52A4. *Arch. Biochem. Biophys.*, 328: 245-54.

Schloss P.D., Handelsman J. 2006. Toward a Census of Bacteria in Soil. *PLoS Comp. Biol.*, 2(7), e 92.

Scow K. M., Hicks K. A. 2005. Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in ground- water. *Curr. Opin. Biotech.* 3: 246–253,.

Seghezzi W., Sanglard D., Fiechter A. 1991. Characterization of a second alkane-inducible cytochrome P450-encoding gene, Cyp52A2, from *Candida tropicalis*. *Gene*, 106: 51-60.

Semple K.T., Reid B.J., Fermor T.R. 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environ. Pollut.* 112: 269–283.

Senesi N., Plaza C., Brunetti G., Polo A. 2007. A comparative survey of recent results on humic-like fractions inorganic amendments and effects on native soil humic substances. *Soil Biol. Biochem.* 39: 1244–1262.

Sharma M., Chadha B. S., Kaur M., Ghatora S. K., Saini H. S. 2008. Molecular characterization of multiple xylanase producing thermophilic/thermotolerant fungi isolated from composting materials. *Lett appl. microbiol.* 46: 526–35.

Shimizu T., Ohshima S., Ohtani K., Hoshino K., Honjo K., Hayashi H. 2001. Sequence heterogeneity of the ten rRNA operons in *Clostridium perfringens*. *Syst. Appl. Microbiol.* 24: 149-156.

Simcik M.F., Eisenreich S.J., Lioy P.J. 1999. Source apportionment and source/sink relationships of PAHs in the coastal atmosphere of Chicago and Lake Michigan. *Atmos. Environ.* 33: 5071-5079

Smith C.J., Nedwell D.B., Dong L.F., Osborn A.M., 2006. Evaluation of quantitative polymerase chain reaction based approaches for determining gene copy and gene transcript numbers in environmental samples. *Environ. Microbiol.* 5: 804-815.

Smith L.A., Hinchey R.E. 1993. In situ thermal technologies for site remediation. Battelle Memorial Institute, Lewis Publishers.

Stafiej A., Pyrzynska K., Regan F. 2007. Determination of anti-inflammatory drugs and estrogens in water by HPLC with UV detection. *J. Sep. Sci.* 30: 985– 991.

Statzner B., Hoppenhaus K., Arens M. F., Richoux, P. 1997. Reproductive traits, habitat use and templet theory: a synthesis of world wide data on aquatic insects. *Freshwater Biol.*, 38: 109-135.

Straatsma G Samson RA, Olijnsma T.W., Op Den Camp H.J.M., Gerrits J.P.G., Van Griensven L.J.L.D. 1994. Ecology of thermophilic fungi in mushroom compost, with emphasis on *Scytalidium thermophilum* and growth stimulation of *Agaricus bisporus* mycelium. *Appl. Environ. Microb.* 60:454–458

Stubner S., Meuser K. 2000. Detection of *Desulfotomaculum* in an Italian rice paddy soil by 16S ribosomal nucleic acid analyses. *Microbial Ecol.* 34: 73-80.

Stumpf M., Ternes T.A., Haberer K., Seel P., Baumann W. 1996. Determination of pharmaceuticals in sewage plants and river water. *Vom Wasser.* 86: 291–303 (in German).

Suárez S., Ramil M., Omil F., Lema J.M. 2005. Removal of pharmaceutically active compounds in nitrifying–denitrifying plants, *Water Sci. Technol.* 52: 9–14.

Swannell R.P.J., Lee K., McDonagh M. 1996. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiol. Rev.* 60:342–365.

Taccari M., Milanovic V., Comitini F., Casucci C., Ciani M. 2012. Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. *Int. Biodeter. Biodegr.* 66: 39–46.

Tejada M., García-Martínez A. M., Gómez I., Parrado, J. 2010. Application of MCPA herbicide on soils amended with biostimulants: short-time effects on soil biological properties. *Chemosphere.* 80: 1088–94.

Tejada M., Gonzalez J. L., Hernandez M. T., Garcia, C. 2008. Application of different organic amendments in a gasoline contaminated soil: effect on soil microbial properties. *Bioresource technol.* 99: 2872–80.

Teng Y., Luo Y., Sun M., Liu Z., Christie P. 2010. Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. Strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. *Biosource technol.* 101: 3437-3443.

Ter Braak C. J., Verdonschot P. F. 1995. Canonical correspondence analysis and related multivariate methods in aquatic ecology. *Aquat. Sci.* 57: 255-289.

Ternes T.A. 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32: 3245–3260.

Thompson R.B., Nogales R., 1999. Nitrogen and carbon mineralization in soil of vermi-composted and unprocessed dry olive cake (“orujo seco”) produced from two-stage centrifugation for olive oil extraction. *J environ Sci Heal B.* 34: 917– 928.

Tiehm A., Augenstein T., Ilieva D., Schell H., Weidlich C., Mangold K. M. 2010. Bio-electro-remediation: electrokinetic transport of nitrate in a flow-through system for enhanced toluene biodegradation. *J. appl. electrochem.* 40: 1263-1268.

Tixier C., Singer H.P., Oellers S., Muller S.R. 2003. Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen and naxoprofen in surface waters. *Environ. Sci. Technol.* 37: 1061–1068.

Tomati U., Galli E., Fiorelli F., Pasetti L. 1996. Fertilizers from Compost of olive mill wastewater *Int. Biodeter. Biodegr.* 38(3):155-162.

Top E.M., Springael D., Boon N. 2002. Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soil and water. *Fems Microbiol. Ecol.* 42: 199-208.

Torsvik V., Ovreas L., Thingstad T.F. 2003. Prokaryotic Diversity - Magnitude, Dynamics and Controlling Factors. *Science*, 296: 1064-1066.

Tran N. H., Urase T., Kusakabe, O. 2009. The characteristics of enriched nitrifier culture in the degradation of selected pharmaceutically active compounds. *J. hazard. mater.* 171: 1051–7.

Trower M.K., Buckland R.M., Higgins R., Griffin M. 1985. Isolation and Characterization of a Cyclohexane-Metabolizing Xanthobacter sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 1282-9.

Tsai, J.C., Kumar, M., Lin, J.G. 2009. Anaerobic biotransformation of fluorene and phenanthrene by sulfate-reducing bacteria and identification of biotransformation pathway. *J. Hazard. Mater.* 164: 847-55.

Tuomela M., Vikman M., Hatakka A., Itävaara M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: A review. *Bioresource Technol.* 72: 169-183.

Van Beilen J.B., Funhoff E.G. 2005. Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications. *Curr. Opin. Biotech.*, 16: 308-314.

Van Beilen J.B., Witholt B. 2003. Diversity, function and biocatalytic applications of alkane oxygenases. in: *Petroleum Microbiology*, "American Society for Microbiology Press. Washington DC", pp. 317-336.

Van Der Geize R, Dijkhuizen L. 2004. Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 255–261.

Van Gestel K., Mergaert J., Swings J., Coosemans J., Ryckeboer J. 2003. Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste. *Environ. Pollut.* 125: 361-368.

Van Hamme J.D, Singh A., Ward O.P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 67: 503–549.

Vargas-García M. C., Suárez-Estrella F., López M. J., & Moreno, J. 2010. Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. *Waste Manage*, 30: 771-778.

Venkataraman C., Negi G., Sardar S.B., Rastogi R. 2002. Size distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol emissions from biofuel combustion. *J.Aerosol Sci.* 33: 503–518

Viñas M., Sabaté J., Espuny M. J., Anna M., Vin M. 2005. Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil . *Appl. Environ. Microb.* 71: 7008-18.

Vivas A., Moreno B., Garcia-Rodriguez S., Benitez E. 2008. Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. *Bioresource Technol*, 3: 1319-1326.

Vivas A., Moreno B., Garcia-Rodriguez S., Benitez E. 2009. Assessing the 491 impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. *Bioresource Technol.* 100: 1319–1326.

Watkinson R.J., Morgan P. 1990. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation*, 1: 79-92.

Whyte L.G., Slagman S.J., Pietrantonio F., Bourbonniere L., Koval S.F., Lawrence J.R., Inniss W.E., Greer C.W. 1999. Physiological adaptations involved in alkane assimilation at a low temperature by *Rhodococcus* sp. Strain Q15. *Appl. Environ Microb.* 65.

Yamashita N., Yasojima M., Nakada N., Miyajima K., Komori K., Suzuki Y., Tanaka H. 2006. Effects of antibacterial agents, levofloxacin and clarithromycin, on aquatic organisms. *Water Sci. Technol.* 53: 65- 72.

Yang C.H., Crowley D.E. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Appl. Environ. Microb.* 66: 345–351.

Zaller J. G. 2007. Vermicompost as a substitute for peat in potting media: Effects on germination, biomass allocation, yields and fruit quality of three tomato varieties. *Sci. Horti-Amsterdam*, 112: 191-199.

Zhang J., Zeng G., Chen Y., Yu M., Yu Z., Li H., Yu Y., Huang H. 2011. Effects of physico-chemical parameters on the bacterial and fungal communities during agricultural waste composting. *Bioresource technol.*, 102: 2950–6.

Zhang Y., Geißen S.-U. 2010b. Prediction of carbamazepine in sewage treatment plant effluents and its implications for control strategies of pharmaceutical aquatic contamination. *Chemosphere* 80: 1345–1352.

Zhang Y., Geissen S., Gal C. 2008. Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*. 73: 1151-1161.

Zhang Yongjun, Sven-Uwe Geißen. 2012 Elimination of carbamazepine in a non-sterile fungal bioreactor. *Bioresource Technol.* 112: 221-227.

Zhou N. A., Lutovsky A. C., Andaker G. L., Gough H. L., Ferguson J. F. 2013. Cultivation and characterization of bacterial isolates capable of degrading pharmaceutical and personal care products for improved removal in activated sludge wastewater treatment.

Biodegradation 1-15.

RINGRAZIAMENTI

Il primo sincero e sentito grazie va sicuramente alla mia famiglia, che come sempre è lì pronta a fare il tifo per me, a farmi rialzare se cado. Grazie mamma Irene e Sergio.....

Nicola.....la prima cosa che riesco a dire.....Santo Subito, soprattutto in questo ultimo periodo è sempre riuscito a supportarmi ma soprattutto a sopportare i miei repentini sbalzi d'umore. L'unico uomo che riesce a farmi ridere anche quando c'è solo da piangere..... Sei unico!

Un sentito grazie va al dottor Ermanno Federici, il quale mi ha sempre dato un valido supporto, durante questi anni e ha sempre garantito un ambiente di lavoro sereno. Inoltre grazie alle sue scelte e al suo modo di fare mi ha costretto a crescere sia da un punto di vista professionale che umano.

Che dire invece della mia compagna di avventure.....Laura.....con la quale si è creato un legame particolare.....E' stato un vero piacere condividere questa esperienza con te....

Ultima, ma solo in ordine di tempo, la new entry: Elena... grazie anche a te per l'aiuto e la disponibilità dimostrata...

Alla fine di questi tre anni e grazie alle persone sopra citate, posso dichiararmi veramente soddisfatta per quello che sono riuscita a fare in ambito lavorativo e per quello che sono diventata.