

A. LUNETTA^{1*}, S. PATANIA², M. GENOVESE¹, M. MAHJOUBI³, A. CHERIF³,
S. CAPPELLO^{1,4}

¹ Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Istituto per le Risorse Biologiche e Biotecnologie Marine (IRBIM) - 98122 Messina, Italia.

² Dip. di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università di Messina, Italia.

³ ISBST, University of Manouba, BVBGR-LR11ES31, Biotechpole Sidi Thabet, Tunisia.

⁴ Centro Universitario per la Gestione e la Tutela degli Ambienti Naturali e degli Agroecosistemi, Università di Catania, Italia.
simone.cappello@cnr.it

RELAZIONE TRA IL BIVALVE *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* E BATTERI IDROCARBURO DEGRADANTI IN AMBIENTE INQUINATO (SIMULATO)

RELATION BETWEEN THE BIVALVE *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* HYDROCARBON BACTERIA DEGRADANT IN POLLUTED ENVIRONMENTS (SIMULATED)

Abstract - The aim of this study was to investigate the presence and relationships between the mollusc *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 and hydrocarbon degrading bacteria, in a mesocosm simulating a polluted environment. Quantitative analysis of microbial abundance and screening of functional metabolic genes involved in biodegradation processes, were performed on the gills of mussels, exposed and not exposed to hydrocarbons. The presence of hydrocarbons influenced the abundance of bacteria inside the mussel gills and determined the selection for specific hydrocarbonoclastic bacteria (e.g. *Alcanivorax* sp.). However, it is still unclear whether the presence of these bacteria inside the mussel is due to symbiosis or a selective enrichment following filtration. These data represent an important starting point for the potential application of this complex biological system (mussels and bacteria) for the recovery of chronically polluted marine environments.

Key-words: *Alcanivorax*, hydrocarbon bacteria, *Mytilus galloprovincialis*, symbiosis

Introduzione - L'ecosistema marino è considerato da sempre un sistema complesso ed importante sia da un punto di vista ecologico che socio-economico, tuttavia negli ultimi decenni ha subito una forte antropizzazione a causa di numerosi inquinanti emergenti e soprattutto di sostanze di origine idrocarburea. Una volta in mare, il petrolio e gli idrocarburi in genere causano danni a differenti livelli della catena trofica producendo sugli organismi marini sia effetti acuti, nel breve termine, che cronici, nel lungo periodo.

Tra gli organismi potenzialmente interessati direttamente dalla contaminazione ambientale, a livello ecologico i bivalvi hanno un ruolo importante. Tali organismi filtrano grandi volumi di acqua per il loro fabbisogno alimentare, catturando seston (1/4 di particolato in sospensione) sulle loro branchie e grazie a questi meccanismi possono potenzialmente influenzare i livelli di batterioplancton (Cole *et al.*, 1988). Pertanto, la relazione tra i batteri ed i filtratori bentonici può essere importante dal punto di vista funzionale per gli ecosistemi acquatici (Kautsky, 1981; Prins *et al.*, 1998), in particolare per quelli inquinati.

Lo scopo di questo studio è quello di indagare le relazioni tra il mollusco *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 e i batteri idrocarburo degradanti, in un mesocosmo che simula un ambiente inquinato da idrocarburi. Misure quantitative dell'abbondanza microbica totale, mediante conta diretta DAPI, della frazione di batteri eterotrofi coltivabile e dei batteri idrocarburoclastici, sono state effettuate sulle branchie degli

organismi presenti negli organismi in studio. Sono stati effettuati inoltre analisi e screening di geni funzionali legati ai processi di biodegradazione.

Materiali e Metodi - Dopo l'acquisto presso un rivenditore privato di Messina, duecento esemplari di *Mytilus galloprovincialis* sono stati lasciati a stabulare in vasche dedicate (1.000 L) per 3 giorni, e successivamente circa 50 esemplari sono stati trasferiti in ciascun mesocosmo contenenti circa 3.000 L di acqua di mare, raccolta direttamente dallo Stretto di Messina (Messina, Italia) dopo filtrazione attraverso membrane con porosità 200 μm (tipo Whatman) per favorire l'eliminazione di eventuali metazoi e detriti di grandi dimensioni. Il mesocosmo di controllo (SW) era costituito solo da acqua di mare e 50 mitili; il mesocosmo sperimentale (OIL) conteneva acqua di mare, 50 mitili e petrolio greggio (0.01% di Arabian Ligth Crude Oil). Il volume è stato mantenuto costante attraverso un sistema di troppo pieno e ad una temperatura media di 16,5-18,5 °C. Un sistema di lampade a fluorescenza (36W, 80 cm) determinava un fotoperiodo (luce/buio - 14/10 ore).

La sperimentazione ha avuto una durata complessiva di 35 giorni. Ad intervalli regolari di 7 giorni, da ciascun mesocosmo (SW e OIL) venivano prelevati campioni di acqua di mare (circa 1000 ml) e organismi (circa 10). Sui campioni prelevati sono state valutate le abbondanze relative a: i) la comunità batterica totale, mediante conteggi delle cellule colorate con il fluorocromo DAPI al microscopio ad epifluorescenza (Cappello *et al.*, 2007; 2012); ii) la frazione batterica eterotrofa coltivabile su terreno Marine Agar, espressa come Unità formanti Colonia (CFU) (Cappello *et al.*, 2007); iii) la frazione di batteri idrocarburo degradanti, in B-H Broth addizionato con il 2% (w/v) di NaCl, mediante il metodo the Most Probable Number (MPN); (Cappello *et al.*, 2007). Parallelamente, sugli stessi campioni di acqua di mare e di branchie prelevate dai mitili, è stato eseguito uno screening (presenza/assenza) dei principali geni metabolici coinvolti nella biodegradazione degli idrocarburi del petrolio: alcani-monoossigenasi di *Alcanivorax borkumensis* SK2 (AlkB-1); (alcani-monoossigenasi di *Thalassolitus* sp. (AlkB-Thal) e benzaldeide deidrogenasi di *Cycloclasticus* sp. (BHF) (Cappello *et al.*, 2012).

Risultati - La densità batterica totale (Fig. 1) è rimasta costante per tutta la sperimentazione nel mesocosmo di controllo (SW) ($2,5 \times 10^5$ cell./mL); mentre nel mesocosmo OIL si è registrato un aumento di un ordine di grandezza che è rimasto costante ($3,1 \times 10^6$ cell./mL) fino al termine degli esperimenti. L'abbondanza batterica nelle branchie dei mitili nel mesocosmo SW ha mostrato un valore medio di 10^9 cell./g (T_5), per contro nelle branchie degli organismi stabulati nel mesocosmo OIL a partire dalla seconda settimana (T_2) si è evidenziato un aumento di un ordine di grandezza passando da $3,2 \times 10^9$ cell./g (T_2) a $3,2 \times 10^{10}$ cell./g (T_3).

Nel mesocosmo SW, la concentrazione di batteri eterotrofi coltivabili è incrementata da $3,3 \times 10^3$ CFU/mL (T_0) a $8,8 \times 10^4$ CFU/mL (T_5) (Fig. 1). Un aumento di un'unità logaritmica è stato osservato anche nel mesocosmo OIL, dove il numero delle CFU è aumentato sino a $4,1 \times 10^5$ CFU/mL dopo 5 settimane. Durante l'intero studio, nel mesocosmo SW, le abbondanze di batteri eterotrofi associati alle branchie di *M. galloprovincialis* sono rimaste costanti ($\sim 10^6$ CFU/g), mentre in quelle contenenti petrolio si sono registrati valori di $4,9 \times 10^6$ CFU/g (T_2) e $2,7 \times 10^7$ CFU/g (T_3), che poi si sono mantenuti costanti fino alla fine dell'esperimento.

In entrambi i mesocosmi (SW and OIL) il numero di batteri capaci di degradare gli idrocarburi nei campioni d'acqua avevano valori costanti fino alla fine degli esperimenti ($3,2 \times 10^1$ MPN/mL) (Fig. 1). Per quanto riguarda i campioni di branchie dei mitili, nella vasca controllo sono stati registrati valori stabili di 10^{-1} MPN/g per tutto l'esperimento; mentre nelle branchie degli organismi stabulati nel mesocosmo OIL è stato possibile osservare un aumento con valori da $1,20 \times 10^2$ MPN/g (T_1) a $2,3 \times 10^3$ MPN/g (T_2) per poi mantenersi costanti fino alla fine dell'esperimento (T_5).

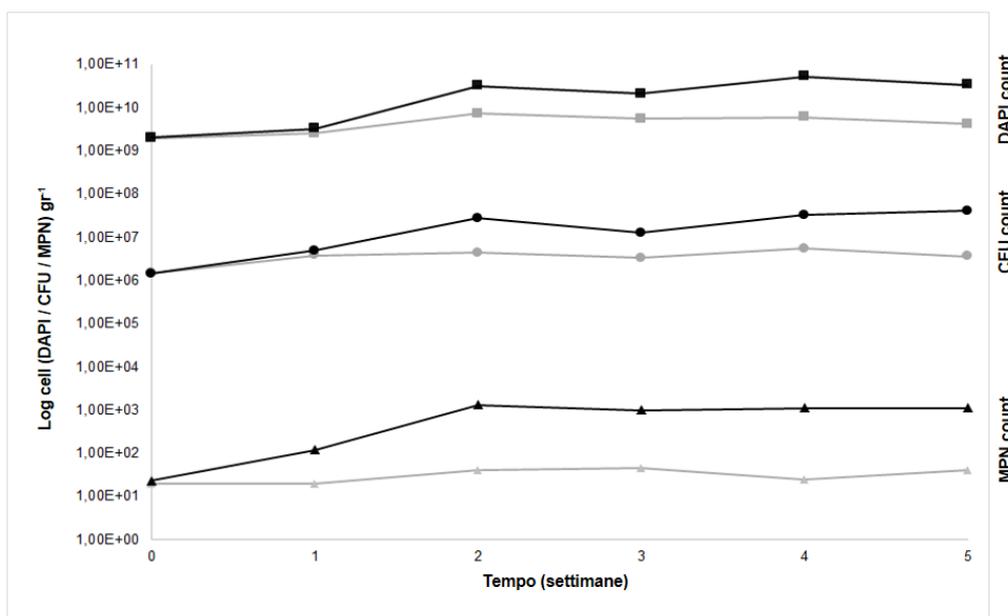


Fig. 1 – Abbondanze microbiche valutate nelle branchie degli organismi in studio. Mesocosmo SW linee grigie, mesocosmo OIL linee nere. DAPI, visualizzato con indicatore quadrato; CFU, visualizzato con indicatore circolare e MPN visualizzato con indicatore triangolare.

Microbial abundances in the branches of the organisms under study. SW mesocosm, grey lines, OIL mesocosm, black lines. DAPI, displayed with square indicator; CFU, displayed with circular indicator and MPN displayed with triangular indicator.

Nessuno dei geni coinvolti nella biodegradazione degli idrocarburi del petrolio è stato rilevato nei campioni (acqua e branchie) prelevati dal mesocosmo di controllo (SW) (Tab. 1). Per contro, nei mesocosmi contenenti petrolio (OIL) la presenza del gene che codifica per l'alcano monossigenasi di *Thalassolitus* sp. (AlkB-Thal) è stata osservata solo nei campioni di acqua, mentre il gene (AlkB-1) di *Alcanivorax* sp. è stato rilevato sia nei campioni di acqua che di branchie. Infine la ricerca del gene che codifica per l'enzima benzaldeide deidrogenasi di *Cycloclasticus* sp. (BHF) ha dato esito negativo in entrambi i campioni prelevati dai mesocosmi OIL.

Conclusioni – Le indagini hanno permesso di evidenziare un aumento del numero di batteri capaci di degradare gli idrocarburi nelle branchie degli organismi esposti al petrolio. I risultati ottenuti hanno evidenziato che l'esposizione agli idrocarburi influenzano la presenza di associazioni batteriche specifiche, come quella con i batteri capaci di degradare gli idrocarburi appartenenti al genere *Alcanivorax*. Questi dati rappresentano un punto di partenza per la potenziale applicazione del sistema biologico complesso (mitili e batteri) per il recupero di ambienti marini cronicamente inquinati.

Tab. 1 - Presenza o assenza di geni funzionali di batteri capaci di degradare gli idrocarburi nell'acqua di mare e nelle branchie di *M. galloprovincialis* nei mesocosmi SW e OIL. 16S rDNA (16S ribosomal DNA); AlkB-1 (alcano-monoossigenasi di *Alcanivorax borkumensis* SK2); AlkB-Thal (alcano-monoossigenasi di *Thalassolitus* sp.) e BHF (benzaaldeide deidrogenase di *Cycloclasticus* sp.). Il segno + indica la presenza del gene, il segno - assenza del gene.

Presence or absence of functional genes of hydrocarbonoclastic bacteria in sea water and in the gills of M. galloprovincialis. 16S rDNA (16S ribosomal DNA); AlkB-1 (alkane monooxygenase of Alcanivorax borkumensis SK2); AlkB-Thal (alkano-monoxygenase of Thalassolitus sp.) and BHF (benzaldehyde dehydrogenase of Cycloclasticus sp.). +: positive amplification (presence of the gene); -: negative amplification (absence of the gene).

	Mesocosmo non contaminato (SW)						Mesocosmo contaminato (OIL)					
	Acqua di Mare						Acqua di Mare					
	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5
16 rDNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AlkB-1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
AlkB-Thal	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
BHF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Branchie (<i>M. galloprovincialis</i>)						Branchie (<i>M. galloprovincialis</i>)					
	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5
16 rDNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AlkB-1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
AlkB-Thal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BHF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Bibliografia

- CAPPELLO S., DENARO R., GENOVESE M., GIULIANO L., YAKIMOV M.M. (2007) - Predominant growth of *Alcanivorax* during experiments on 'oil spill bioremediation' in mesocosms. *Microbiol. Res.*, **162**: 185-190.
- CAPPELLO S., RUSSO D., SANTISI S., CALOGERO R., GERTLER C., CRISAFI F., DE DOMENICO M., YAKIMOV M.M. (2012) - Presence of hydrocarbon-degrading bacteria in the gills of mussel *Mytilus galloprovincialis* in a contaminated environment: a mesoscale simulation study. *Chem. Ecol.*, **28**: 239-252.
- COLE J.J., FINDLAY S., PACE M.L. (1988) - Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: A crosssystem overview. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, **43**: 1-10.
- KAUTSKY N. (1981) - On the trophic role of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) in a Baltic coastal ecosystem and the fate of the organic matter produced by the mussels. *Kieler Meeresforsch. Sonderh.*, **5**: 454-461.
- PRINS T.C., SMAAL A.C., DAME R.F. (1998) - A review of the feedbacks between bivalve grazing and ecosystem processes. *Aquat. Ecol.*, **31**: 349-359.