Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
125° (2007), Vol. XXXI, P. II, t. I, pp. 229-249

DANIELA LIPPI * – ISABELLA CACCIARI **

Microbiologia ambientale

Riassunto – In questo intervento vengono brevemente descritte le ricerche condotte da un gruppo di microbiologi formatosi sotto la guida del Prof. Giovannozzi-Sermanni in un primo tempo al CNR e all'Università della Tuscia più recentemente. Il gruppo nell'arco di più di quaranta anni si è differenziato con linee di ricerca distinte, pur mantenendo sempre una stretta collaborazione. La fisiologia della crescita batterica, l'azotofissazione libera e in simbiosi con la pianta, le relazioni intermicrobiche ed i rapporti pianta-microrganismi in vitro e in campo sono state le linee di ricerca più importanti affrontate nell'ambito della microbiologia ambientale. Inoltre, anche lo studio della degradazione di sostanze recalcitranti, naturali o di sintesi, ha spesso avuto un ruolo preminente: dai primi studi sugli erbicidi alle ricerche sui microrganismi responsabili della degradazione della plastica, degli idrocarburi, della carta.

Abstract – This report follows the steps of a group of microbiologists and their researches during the past forty years. This team was directed by Prof. Giovannozzi-Sermanni firstly at the CNR and more recently at University of Tuscia. Great interest has been always given to the physiology of bacterial growth, to free and symbiotic nitrogen fixation, to bacterial interactions and to plant-microbe relationships both *in vitro* and in the field. Moreover, during these years studies on the degradation of recalcitrant substances (herbicides, plastic material, hydrocarbons, paper) have been also performed.

Parole chiave: Azotofissazione; Biodegradazioni; Fisiologia batterica; Interazioni batteriche; Microbiologia ambientale; Rizosfera.

* Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale del CNR. Area della Ricerca di Roma 1, Via Salaria Km. 29,300, 00016 Monterotondo Scalo (RM). E-mail: daniela.lippi@ibaf.cnr.it

** Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica, Università La Tuscia, Via S. Camillo De Lellis, Viterbo.

Introduzione

Per il convegno organizzato in onore del Prof. Giovannozzi Sermanni noi, che siamo state la sua prima allieva l'una e una giovane tesista l'altra, abbiamo voluto ripercorrere il lungo cammino scientifico iniziato nei primi anni '60 sotto la sua guida. Data la vastità della materia e il particolare contesto di questo convegno, il nostro intervento e la bibliografia riportata riguardano solo gli indirizzi di ricerca che hanno rappresentato per tanti anni il «filo rosso» della nostra vita scientifica cominciata, allora, con il Prof. Giovannozzi e continuata, poi, a volte con la sua collaborazione e sempre con il suo sostegno e il suo incoraggiamento.

1. L'ambiente suolo

La Microbiologia ambientale è la disciplina che studia l'insieme delle interazioni che si stabiliscono tra i microrganismi ed i molteplici ambienti terrestri, marini e di acque dolci, siano essi favorevoli alla crescita microbica oppure estremi, inospitali e quindi inadatti alla vita della maggioranza delle popolazioni microbiche. Lo studio della microbiologia ambientale presuppone la conoscenza della crescita, della fisiologia e della sopravvivenza delle specie microbiche al fine di ottenere quelle informazioni necessarie per migliorare o risanare l'ambiente attraverso trattamenti con ceppi batterici o fungini.

Nei lontani anni '60, la microbiologia ambientale e l'ecologia microbica non esistevano ancora, né come discipline né come approcci concettuali, e le nostre prime ricerche si orientarono verso la microbiologia del suolo. Il suolo, per definizione, consiste nello strato più superficiale della crosta terrestre, la parte esplorata dalle radici delle piante e nella quale operano i microrganismi; è un sottile strato di materiali che costituiscono il substrato della vita terrestre. L'ecosistema suolo è un sistema complesso: le proprietà chimiche, fisiche e biologiche gli conferiscono la capacità di svolgere molteplici funzioni e la sua qualità dipende in larga misura dall'equilibrio delle sue componenti abiotiche e biotiche.

Il suolo è una comunità di organismi ricca di relazioni, nella quale la biodiversità e la funzionalità delle popolazioni sono essenziali per l'efficienza dell'intero ecosistema. Potremmo definire il suolo stesso un organismo vivente, dal momento che il numero di organismi contenuto in circa 10 grammi di suolo può superare i 9 miliardi di individui, vale a dire una volta e mezzo l'intera popolazione umana.

Le popolazioni microbiche del suolo vivono in uno stato di «equilibrio instabile», uno stato cioè in cui ogni individuo è costantemente in equilibrio con gli altri, ma in cui ogni cambiamento ambientale provoca un cambiamento nell'equilibrio stesso. Una grande influenza sull'equilibrio dei suoli viene esercitata dalla presenza della vegetazione perchè le piante sono le maggiori fonti di nutrienti per i microrganismi che vivono associati ad esse. L'interazione pianta-microrganismi è condizionata e mediata dalle condizioni nutrizionali e ambientali che si stabiliscono

nella rizosfera ed ogni intervento esterno provoca alterazioni nello stato fisiologico dei microrganismi, nelle attività metaboliche della pianta e conseguentemente nei delicati processi di interazione a livello della radice.

Per molti anni le tecniche sperimentali per lo studio dei microrganismi del suolo si sono basate su piastrazioni e valutazioni quali-quantitative delle attività metaboliche di un particolare campione di suolo. Un'analisi completa presupponeva un lungo lavoro sperimentale e consentiva di ottenere una sorta di fotografia di quel particolare sito che forniva, però, solo un'immagine statica dell'ecosistema. Fino agli anni '50 la crescita dei microrganismi veniva esclusivamente studiata in sistemi chiusi con tutti i nutrienti in eccesso, senza considerare che gli ambienti naturali solo raramente contengono i nutrienti essenziali in concentrazioni tali da consentire crescita e attività metaboliche ottimali. Questo tipo di studio è stato da noi condotto utilizzando il termoturbidimetro aerato, apparecchio ideato dal Prof. Giovannozzi e dall'Ing. Saviano e più volte modificato e modernizzato negli anni [32].

Proprio attraverso questi primi esperimenti ci siamo rese conto della necessità e dell'importanza di poter operare in condizioni controllate per studiare la crescita batterica. Ogni ecosistema va considerato, da un punto di vista termodinamico, un *sistema aperto* caratterizzato da un *input* e da un *output* di energia e materia. In tal senso le colture continue consentono di costruire una cosiddetta situazione modello, un microsistema in cui può essere mantenuto tra l'ambiente e la fase biotica un equilibrio dinamico. Specialmente quando si debbano studiare popolazioni naturali miste, è necessario ricorrere a questi sistemi controllati di coltura che forniscono un ambiente ben definito che può prendere in esame sia l'intero sistema, e i processi che in esso avvengono, sia le conseguenze dei cambiamenti ambientali sulla comunità nella sua unità e complessità. Il sistema sperimentale delle colture continue, che noi tra i primi abbiamo utilizzato in Italia, ci ha consentito di studiare molteplici attività metaboliche di microrganismi del suolo e della rizosfera in colture singole e miste, con diversi gradi di limitazione dei nutrienti fino ai limiti dell'oligotrofia [2, 5, 7, 9, 10, 12-14, 16, 21, 41, 42].

2. I BATTERI «MODELLO»

Le comunità microbiche sono le principali responsabili della «salute» e dell'«efficienza» dei suoli nei quali esplicano numerose funzioni tra cui le trasformazioni biologiche nei cicli biogeochimici, la mineralizzazione e il ripristino della sostanza organica, la degradazione di sostanze naturali e xenobiotiche.

L'Arthrobacter

Fra tutti i generi batterici da noi studiati, il primo in ordine sia di tempo che di importanza è stato il genere *Arthrobacter*, genere del quale il Prof. Giovannozzi nei suoi primi anni di studio ebbe la ventura di isolarne una specie capace di degradare la nicotina: l'*Arthrobacter nicotianae* [29].

Le specie del genere *Arthrobacter* sono tra le più diffuse nei suoli e hanno caratteristiche di resistenza ed adattamento all'aridità, alle variazioni di temperatura, di pH e di potenziale idrico e alla carenza di nutrienti che le rendono particolarmente interessanti sia da un punto di vista fisiologico che ecologico. Un'indagine approfondita su questo genere batterico ebbe inizio quando fu messo in evidenza che due nuove specie isolate nel nostro laboratorio, *A. fluorescens* e *A. giacomelloi*, erano in grado di crescere in assenza di una fonte di azoto fissato [4, 39]. La capacità azotofissatrice dell'*Arthrobacter*, se pure inferiore a quella dell'*Azotobacter* e dell'*Azospirillum*, considerati gli azotofissatori liberi di riferimento, non era mai stata descritta in modo scientificamente valido. Uno screening di numerosi ceppi isolati da un terreno di giardino dimostrò che tale capacità era una caratteristica assai diffusa tra le specie di questo genere [6]. Inoltre fu messo in evidenza che, come per gli altri azotofissatori, anche la nitrogenasi dell'*A. fluorescens* era sensibile alla pressione dell'ossigeno e la massima attività nitrogenasica si otteneva a pO_2 = 0,025 atm, corrispondente alla concentrazione di ossigeno disciolto di circa 47μM (Fig. 1) [9].

Particolarmente interessanti sono stati gli studi condotti con l'*Arthrobacter* in associazione con l'*Azospirillum*, forte azotofissatore, che quando venivano coltivati in coltura mista al chemostato coesistevano in un ampio spettro di velocità di crescita [2]. La presenza di *A. giacomelloi* determinava, inoltre, non solo un incremento dell'attività nitrogenasica dell'*Azospirillum brasilense* a tutte le pressioni di ossigeno studiate, comprese quelle più alte generalmente non tollerate (Fig. 2) [11], ma ne stimolava la funzionalità [40] come, per es., la produzione di fitormoni [15].

L'*Arthrobacter* è stato per molti anni il genere modello utilizzato in numerose ricerche che hanno riguardato non solo la capacità azotofissatrice ma anche l'attività respiratoria [10, 12], l'assimilazione dell'ammonio [13, 14], il metabolismo endogeno [16], la capacità di chelare i metalli pesanti [35] e gli effetti prodotti sulle piante in esperimenti di batterizzazione in vitro e in campo [18, 22, 37].

Adriana Grappelli dimostrò che l'*A. giacomelloi*, ceppo da lei isolato, poteva produrre le tre classi di fitormoni: acido indolacetico, gibberelline e citochinine [34, 36] e per questa sua proprietà, approfondita in uno studio al chemostato [5], il ceppo è stato utilizzato in numerosi esperimenti per valutare l'effetto dei fitormoni prodotti sul metabolismo di alcune piante [22, 37]. Inoltre l'*A. giacomelloi* inoculato nei sacchi di compost per la coltivazione di *Agaricus bisporus* esercitava sul fungo un effetto stimolante: ne aumentava la resa, ne anticipava i tempi delle volate e ne incrementava l'attività laccasica [30, 33].

Tutti gli studi condotti con l'*Arthrobacter* hanno fatto sì che ci venisse richiesto dal Prof. Skujiņš, del Department of Biology della Utah State University, di compilare una review su questi batteri del suolo per la pubblicazione sul primo numero di Arid Soil Research and Rehabilitation, in occasione dell'apertura di questo nuovo giornale scientifico [8].

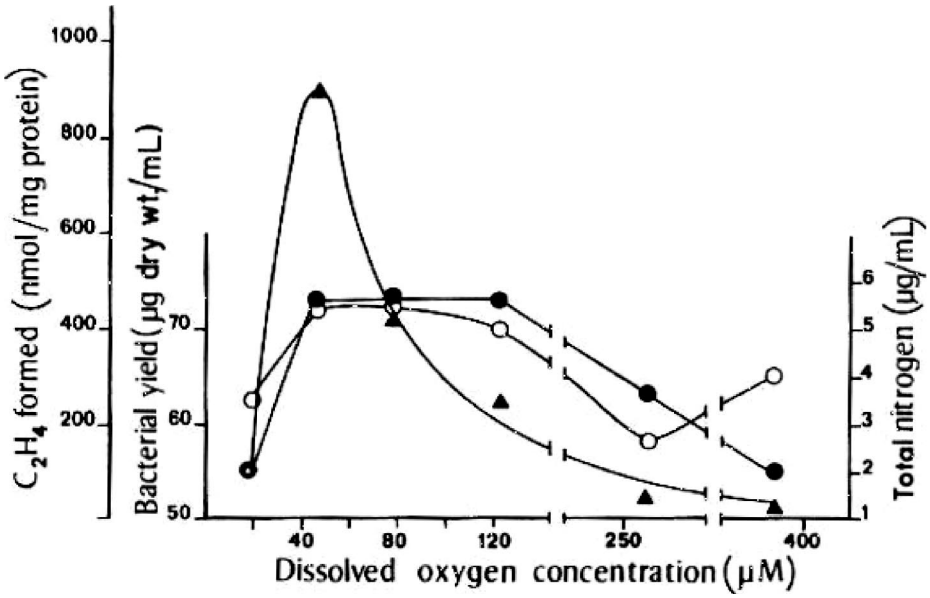

Fig. 1. Attività nitrogenasica (▲), resa batterica (○) e azoto totale (●) di *A. fluorescens* in coltura continua N_2-limitata a diverse pressioni di O_2 [9].

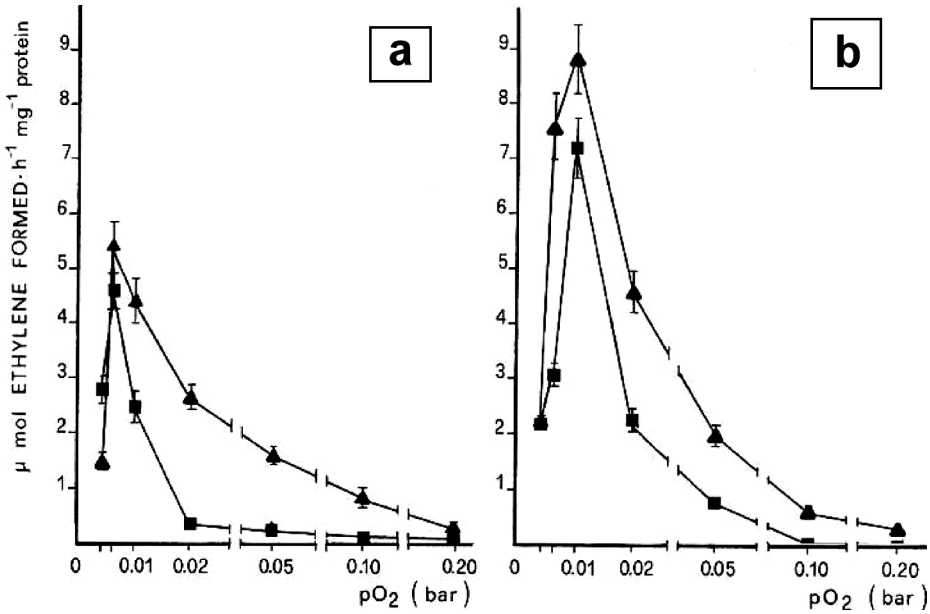

Fig. 2. Attività nitrogenasica di *Azospirillum brasilense* in coltura pura (■) e in presenza di *Arthrobacter giacomelloi* (▲) dopo 24 (**a**) e 48 (**b**) ore di crescita in colture batch a diverse pressioni parziali di O_2 [11].

L'Azospirillum

Da molti anni particolare interesse è stato rivolto ad alcuni microrganismi della rizosfera selezionati per la loro abilità a promuovere la crescita delle piante. Questi organismi, generalmente chiamati PGPR dall'inglese Plant Growth Promoting Rhizobacteria, sono usati come fertilizzanti oppure come agenti del controllo biologico.

Da ormai più di trenta anni, l'azotofissatore libero più utilizzato in tutto il mondo come fertilizzante biologico, soprattutto di cereali, è il genere *Azospirillum*. Si è spesso riscontrata, però, una colonizzazione non efficiente della radice da parte di questo batterio e, conseguentemente, un mancato effetto stimolante sulla pianta. Tra i diversi fattori che possono influenzare l'insediamento, la proliferazione, l'attività e la sopravvivenza nell'ambiente di un microrganismo PGPR, molto importante è la sua capacità di competere per il substrato disponibile con la microflora indigena, più adattata all'ambiente stesso.

Nell'ambito dei nostri studi di ecologia microbica, in particolare delle interazioni tra *Azospirillum* e batteri autoctoni, oltre alle colture miste con *Arthrobacter* [2, 11, 15, 40], è stato studiato un modello che potesse simulare la flora caratteristica del sistema pianta-suolo. Abbiamo isolato alcuni ceppi batterici direttamente dalla rizosfera del sorgo ed il loro studio tassonomico, effettuato anche con il sequenziamento del gene 16S rDNA, ha indicato che gli isolati erano ceppi appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Stenotrophomonas*, generi frequentemente presenti nella rizosfera del sorgo [42]. L'*Azospirillum* in presenza di questi tre ceppi declinava rapidamente, sia quando veniva inoculato sulla piantina di sorgo in un sistema gnotobiotico [48], sia quando era coltivato in chemostato [42], nel quale diventava competitivo solamente quando il flusso dei nutrienti era abbondante (Fig. 3). Dato che le fonti di carbonio, specialmente carboidrati, utilizzate da *A. brasilense* sono in numero molto inferiore rispetto a quelle utilizzate dagli altri tre batteri, si può ipotizzare che sia la qualità che la quantità del substrato siano tra i fattori più importanti per la proliferazione di questo batterio sulla radice [42].

Il Rhizobium

La capacità delle Leguminose di mantenere o ristabilire la fertilità del suolo era nota fin dal tempo dell'antica Roma, ma solo negli ultimi centocinquanta anni è stato accertato che il guadagno di azoto deriva da particolari strutture nodulari delle radici nelle quali sono presenti batteri appartenenti al genere *Rhizobium*, o ad altri generi ad esso correlati. L'inoculazione delle varie specie di Leguminose con rizobi specifici è diventata una pratica agronomica a volte indispensabile nelle coltivazioni di molte piante di interesse sia agroforestale che alimentare: piante agronomicamente importanti, se nodulate efficientemente, possono fissare fino a 100-175 Kg N/ettaro/anno.

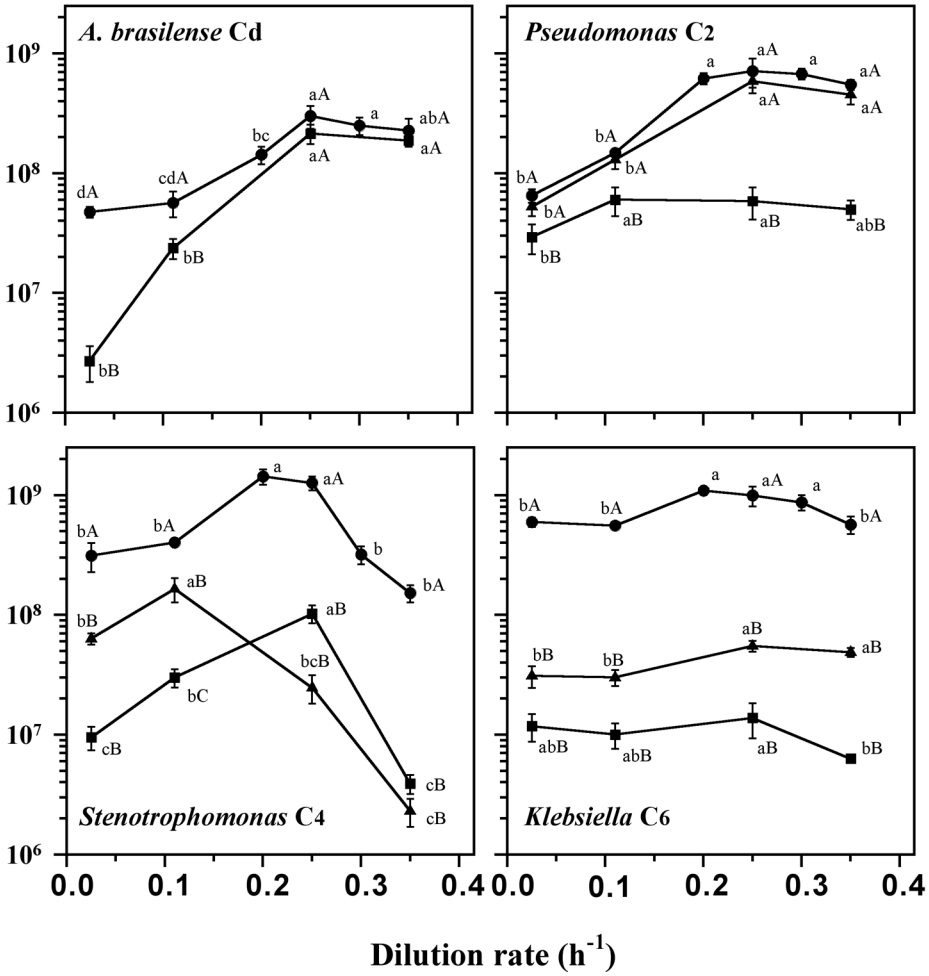

Fig. 3. Numero di cellule di *A. brasilense* Cd, *Pseudomonas* C2, *Klebsiella* C6 e *Stenotrophomonas* C4 cresciuti in colture continue singole (●) e miste (▲, ■) a diverse velocità di crescita. Colture miste costituite dai 3 rizobatteri del sorgo (▲) o dai 3 rizobatteri più *A. brasilense* Cd (■). Differenze significative ($P \leq 0,05$) sulla stessa linea sono indicate dalle lettere minuscole mentre le differenze tra i dati di uguale dilution rate sono indicate dalle lettere maiuscole. I valori sono medie ± DS di 4 campioni analizzati con ANOVA ad una via e con test di Tukey [42].

L'incremento della capacità azotofissatrice ottenuta con la batterizzazione ed il conseguente guadagno di azoto derivante dalla simbiosi comportano per la pianta la possibilità di aumentare anche l'efficienza fotosintetica. A tal proposito è stato condotto un esperimento in vaso su piante di cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] inoculate con un ceppo di *Rhizobium* NA936 che ha mostrato come durante la fase vegetativa di crescita delle piante le due attività fisiologiche fossero strettamente correlate (Fig. 4) [43]. Nei campioni batterizzati si è osservata, oltre ad un incremento della capacità fotosintetica, anche un'anticipazione della fase vegetativa della pianta rispetto ai campioni non inoculati. Un simile effetto positivo della batterizzazione si ottiene anche quando la pianta sia sottoposta a condizioni di stress: la presenza del simbionte può ridurre l'effetto nocivo della causa stressante, come per esempio nel caso di piante di cowpea soggette a condizioni di salinità nelle quali l'azione del rizobio viene ulteriormente potenziata dalla coinoculazione con *Azospirillum* (Fig. 5) [44].

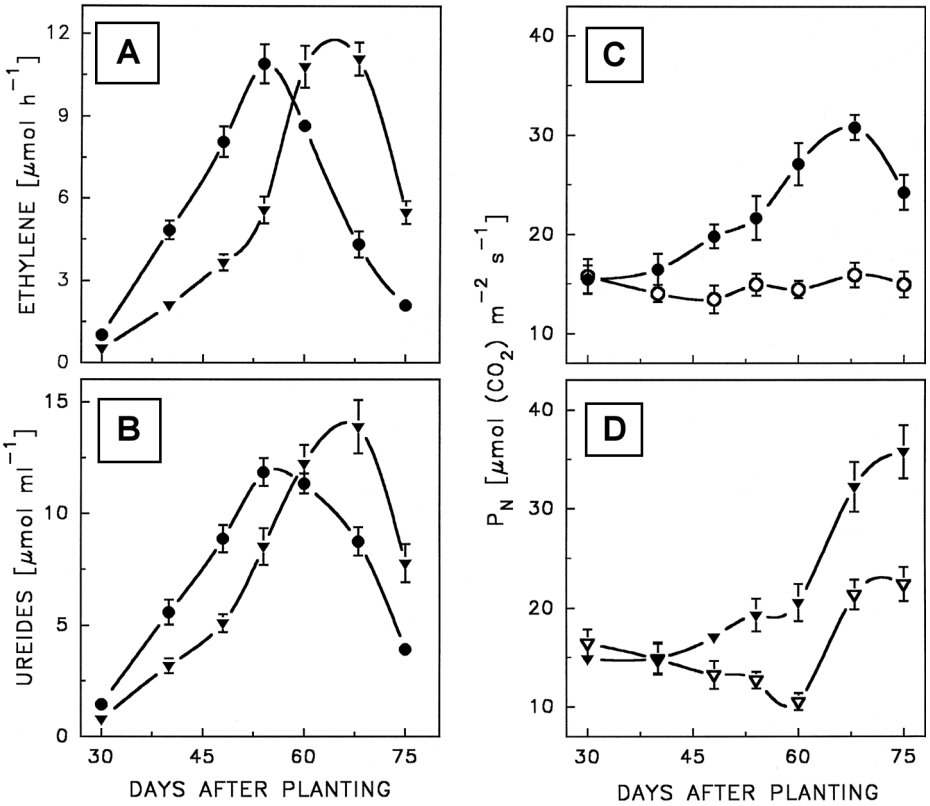

Fig. 4. Azotofissazione simbiotica (A, B) e fotosintesi (C, D) durante la fase vegetativa di crescita di due genotipi di cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] inoculati (●, ▼) o non inoculati (○, ▽) con il *Rhizobium* NA936 [43].

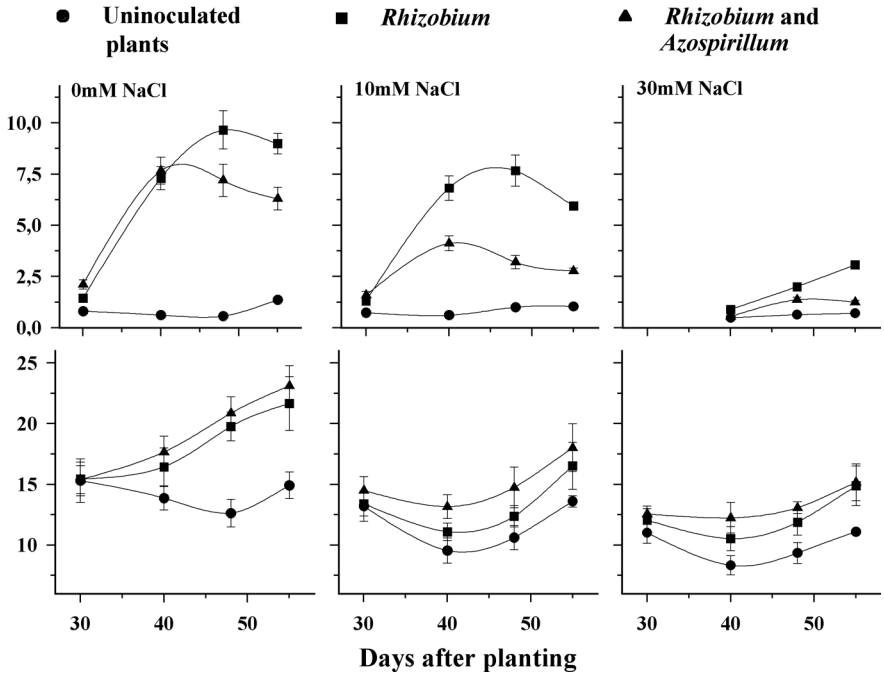

Fig. 5. Attività di azotofissazione determinata come concentrazione di ureidi nel succo xilematico e fotosintesi di piante di cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] non inoculate (●), inoculate con *Rhizobium* NA936 (■) e con doppio inoculo di *Rhizobium* e *Azospirillum brasilense* Cd (▲) cresciute in vaso in diverse condizioni di salinità [44].

Nei suoli salini, o comunque soggetti ad alti livelli di siccità, è necessario utilizzare per le batterizzazioni ceppi di rizobio capaci di sopravvivere, riprodursi e nodulare la pianta ospite anche in tali condizioni ambientali sfavorevoli. Una strategia che si è dimostrata efficace è quella di isolare direttamente dai siti in esame quei ceppi che meglio si siano adattati alle condizioni dell'ambiente. In questa ottica, sono stati isolati, e caratterizzati, dalla rizosfera di diverse specie endemiche di *Acacia* nel Sahel numerosi ceppi di *Rhizobium* che tolleravano alti valori di pressione osmotica e di concentrazioni di sale [3, 38] e che erano capaci di nodulare ed azotofissare quando venivano reinoculati sulla plantula (Fig. 6) [46]. Un ceppo alotollerante isolato dalla rizosfera di *Acacia tortilis*, sia quando veniva inoculato direttamente in campioni di suolo [3], sia quando era coltivato in chemostato in presenza di sale e incubato in assenza di nutrienti era capace di sopravvivere per lunghi periodi e mostrava una capacità di recupero sorprendente, se paragonata a quella dello stesso batterio cresciuto alle condizioni normali di salinità [41].

Questi studi della fisiologia dei rizobi in condizioni di stress ambientali possono fornire importanti informazioni sui meccanismi vitali dei rizobi che si rivelano neces-

Fig. 6. Piantine di *Acacia tortilis* batterizzate con *Rhizobium* sp. 1230, alotollerante, cresciuto in condizioni normali (A, B) o di alta salinità (C, D) ed incubato 20 giorni in condizioni di completa carenza nutrizionale in assenza (A, C) o in presenza (B, D) di alta salinità [46].

sarie per l'utilizzazione di questi simbionti come inoculanti delle Leguminose arboree, piante che costituiscono spesso l'unica soluzione economicamente sostenibile per recuperare i terreni all'agricoltura e porre un freno al processo di desertificazione.

3. Degradazione di molecole recalcitranti

I problemi di carattere economico, sociale e sanitario collegati all'inquinamento ambientale sono sempre più gravi e sempre più urgente è diventata la necessità di interventi mirati a ridurne e/o a prevenirne i danni.

Pertanto, sia all'IBAF-CNR di Montelibretti che al DABAC dell'Università della Tuscia di Viterbo, gli studi sulla degradazione di sostanze recalcitranti naturali o di sintesi hanno avuto spesso la prevalenza.

Degradazione dei pesticidi

Sebbene la maggior parte delle nostre ricerche siano state orientate verso la fisiologia batterica, l'azotofissazione e le interazioni piante-microrganismi, nei primi anni di attività del Gruppo di Microbiologia iniziarono anche alcune ricerche sulla degradazione degli erbicidi. Il primo erbicida esaminato fu il 2,4 D (acido 2, 4 diclorofenossiacetico) e lo studio della sua degradazione da parte di uno dei «nostri» ceppi di *Arthrbacter*, l'*A. fluorescens*, fu oggetto della tesi di laurea di Daniela Lippi, con relatore il Prof. Giovannozzi (Fig. 7) [50].

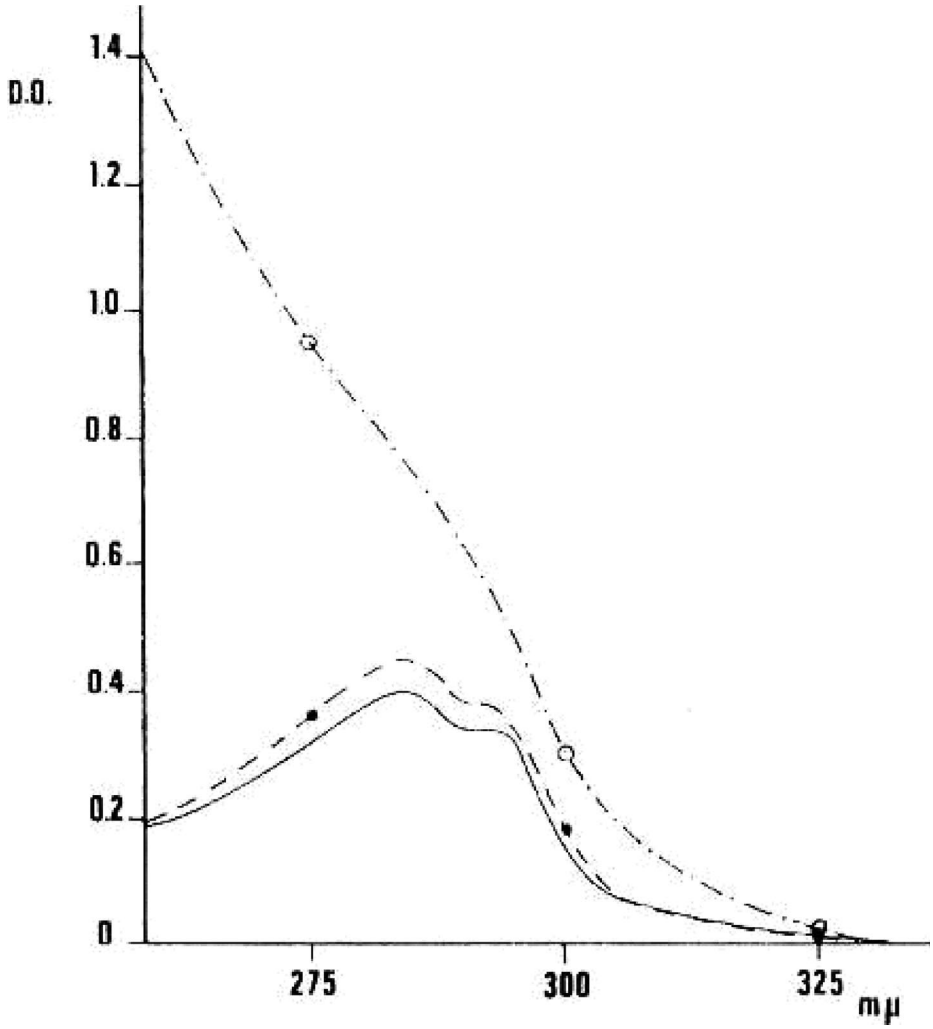

Fig. 7. Alterazione dello spettro UV del 2, 4 D: —, spettro di riferimento; –●–, spettro dopo 6 ore di incubazione in presenza di cellule inattivate di *Arthrobacter fluorescens*; – · ○ · –, spettro dopo 6 ore di incubazione in presenza di cellule vitali di *A. fluorescens* [50].

Le ricerche sulla degradazione di vari erbicidi furono successivamente proseguite da Leila Giardina [25, 28], soprattutto con gli studi sulla degradazione delle triazine, ed in particolare dell'atrazina, a quel tempo considerate particolarmente recalcitranti all'attacco microbico. Un ceppo di *Nocardia*, da lei isolato, era capace di dealchilare e deaminare la molecola dell'atrazina (Fig. 8) [26]. La caratterizzazione dei metaboliti prodotti [27] e lo studio in particolare di uno di essi portò all'evidenza che il batterio degradava l'atrazina fino alla rottura dell'anello [24].

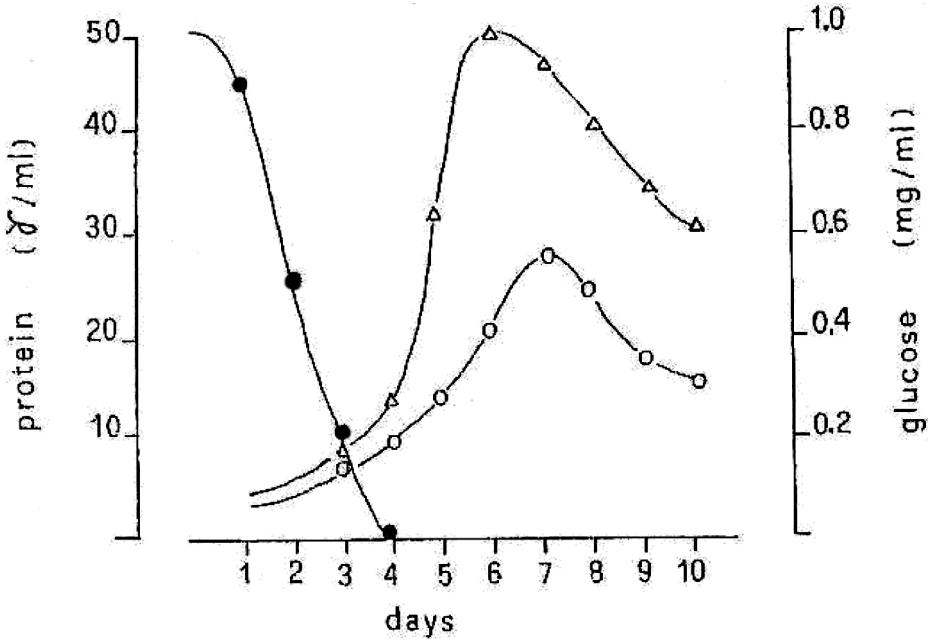

Fig. 8. Crescita di *Nocardia* in presenza di atrazina: –○– , mezzo minerale + atrazina (30 ppm); –△–, mezzo minerale + atrazina (30 ppm) + glucosio (0,1%); –●–, scomparsa del glucosio [26].

In quegli stessi anni, Adriana Grappelli affrontava il problema dello smaltimento dei materiali di risulta e iniziava le prime ricerche che proseguì con la sua passione e il suo entusiasmo fino all'ultimo giorno della sua vita [23, 49].

Erano quelli gli anni in cui il gruppo di Microbiologia cominciava a diversificarsi con linee di ricerca distinte e stabiliva le proprie collaborazioni.

Degradazione della plastica

L'inquinamento ambientale da plastica, che sempre più ha sostituito i materiali tradizionali, è dovuto alla recalcitranza all'attacco microbico da parte dei polimeri (polietilene e polipropilene) in essa contenuti. Lo studio della degradazione della plastica, condotto con il Prof. Giovannozzi e il Prof Mincione, è iniziato con l'isolamento di quattro comunità microbiche stabili ottenute da colture di arricchimento in condizioni di semi-anaerobiosi di campioni di suoli di diversa provenienza incubati in presenza di foglietti di polietilene a bassa densità e contenenti amido. Le quattro comunità microbiche, pur provenendo da suoli differenti, erano molto simili e contenevano uno o più batteri aerobi (in genere ceppi di *Pseudomonas*), un anaerobio facoltativo (*Bacillus* sp.), un solfatoriduttore ed un metanogeno [1, 17]. Per mezzo della microscopia elettronica a scansione è stato possibile met-

tere in evidenza l'attacco del polietilene da parte di una delle comunità batteriche (Fig. 9). La degradazione del polimero è stata confermata mediante analisi gas cromatografica ad alta temperatura che ha mostrato una diminuzione del peso molecolare medio e un marcato spostamento verso i pesi molecolari bassi, indice della modificazione della struttura del polimero, come poi è stato confermato dalle intensità relative di alcune risonanze nello spettro C-NMR [1].

La stessa comunità microbica è stata successivamente incubata in presenza di foglietti di polipropilene isottatico puro e di una piccola quantità di substrato facilmente metabolizzabile dimostrando, anche in questo caso, che le specie aerobiche ed anaerobiche con diverse capacità cataboliche potevano agire in stretta cooperazione per degradare anche il polipropilene. Analisi cromatografiche e spettrali hanno dimostrato sia la perdita di peso che la formazione di prodotti a più basso peso molecolare, costituiti per lo più da idrocarburi (Fig. 10) [17].

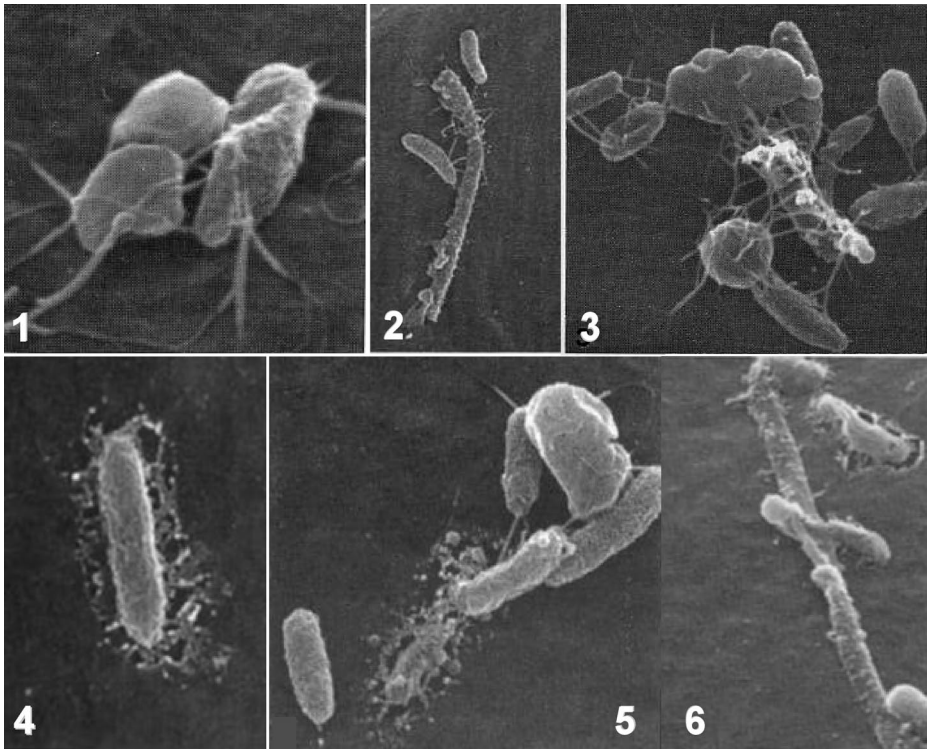

Fig. 9. Popolazioni batteriche aderenti al film di polietilene (1, 2, 3) ed esempi di lisi del polietilene in corrispondenza di un tipo di cellule (4, 5, 6). Osservazioni al SEM: 1) 35000x; 2) 10000x; 3), 4), 5) 20000x; 6) 15000x [1].

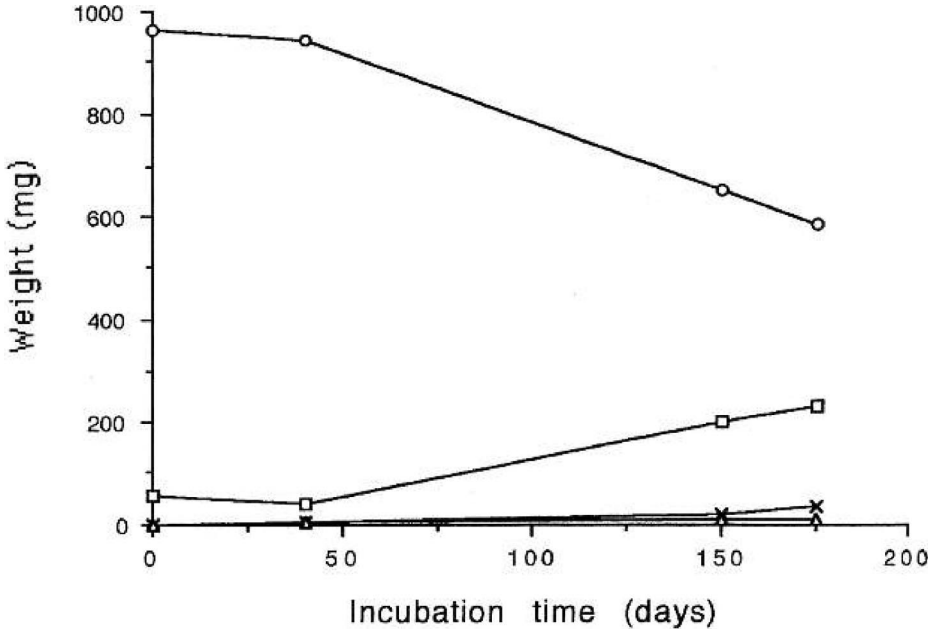

Fig. 10. Time course della degradazione del polipropilene isotattico: (○), residuo ponderale del polipropilene; (○, ×, △) metaboliti prodotti [17].

Degradazione degli idrocarburi

Durante i processi di estrazione petrolifera, il rilascio accidentale dell'olio grezzo nell'ambiente comporta gravi rischi di contaminazione. Gli oli grezzi sono costituiti da miscele di sostanze inquinanti, riconducibili principalmente alle classi di idrocarburi saturi, aromatici, resine e asfalteni.

Le tecniche di biorisanamento possono rappresentare una valida alternativa ai metodi tradizionali di rimozione dei contaminanti idrocarburici, consentendo di ottenerne la degradazione a costi ridotti con l'ausilio di microrganismi indigeni o di ceppi selezionati e introdotti nell'ambiente inquinato in esame.

Nel laboratorio di Microbiologia del suolo del DABAC dell'Università della Tuscia di Viterbo Elena Di Mattia, in collaborazione con il Prof. Giovannozzi ed il Prof. Mincione, ha isolato da colture di arricchimento inoculate con campioni di acqua di mare provenienti dal porto di Civitavecchia un ceppo di *Pseudomonas aeruginosa* capace di degradare i fanghi ad olio [20, 31]. Esperimenti condotti sia in mezzo minerale liquido che in fase solida su cippato di castagno (Fig. 11), hanno dimostrato che il batterio in presenza dell'olio grezzo, anche ad alte concentrazioni, si moltiplicava rapidamente e non declinava nel tempo (Fig. 12).

Le analisi gas-massa hanno messo in evidenza che, sia in fase liquida che in fase solida, il ceppo di *Pseudomonas* era capace di degradare velocemente, già dopo

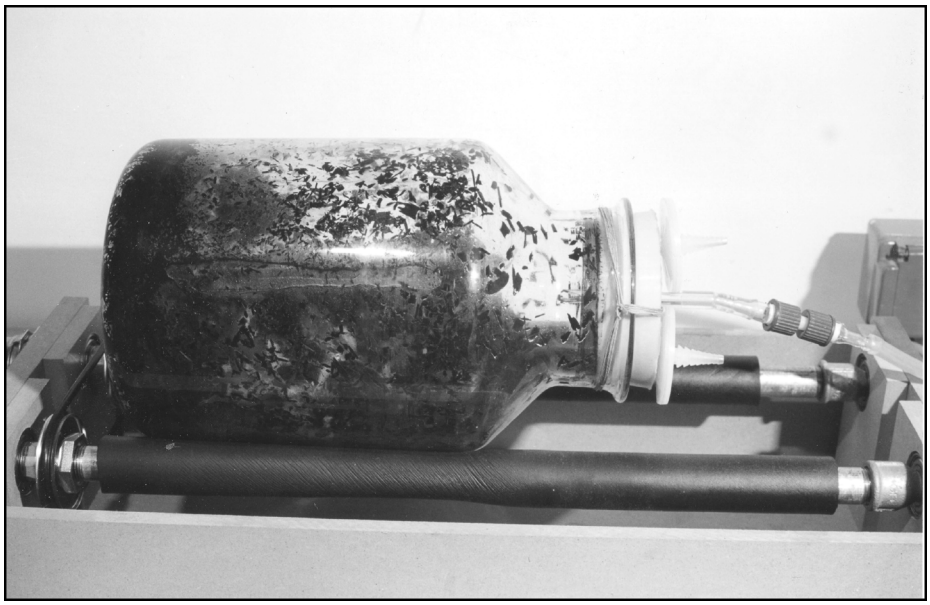

Fig. 11. Reattore a tamburo rotante per lo studio in fase solida della degradazione di fanghi ad olio [31].

7-10 giorni di incubazione, le strutture alifatiche lineari, mentre le strutture idrocarburiche ramificate apparivano più resistenti al biotrattamento [31].

Degradazione della carta

In anni recenti l'inquinamento ambientale ha coinvolto anche, direttamente o indirettamente, il patrimonio culturale ed artistico e sono stati descritti vari fenomeni di deterioramento di origine microbiologica sia di materiali che di manufatti. Tra gli altri, la degradazione microbiologica della carta può portare a gravi danni in opere grafiche e in documenti cartacei di inestimabile valore artistico e storico.

Nell'ambito del Progetto Finalizzato «Beni culturali», in collaborazione con altri Istituti del CNR, è iniziato nei primi anni '90 uno studio sui fenomeni degradativi della carta con lo scopo di individuare eventuali batteri responsabili, o corresponsabili, di tali fenomeni e di arrivare alla possibile sintesi di molecole inibitrici dell'attività batterica.

Il nostro studio si è interessato in particolare al fenomeno noto con il nome di foxing, condizione complessa che deriva dall'interazione di fattori fisici, chimici e biologici, e che si presenta spesso sulla carta antica nella forma di macchie irregolari, giallo-brune e talvolta fluorescenti. Le cause di questo fenomeno non sono ancora del tutto chiarite, data la difficoltà di ottenere sperimentalmente la riproduzione del

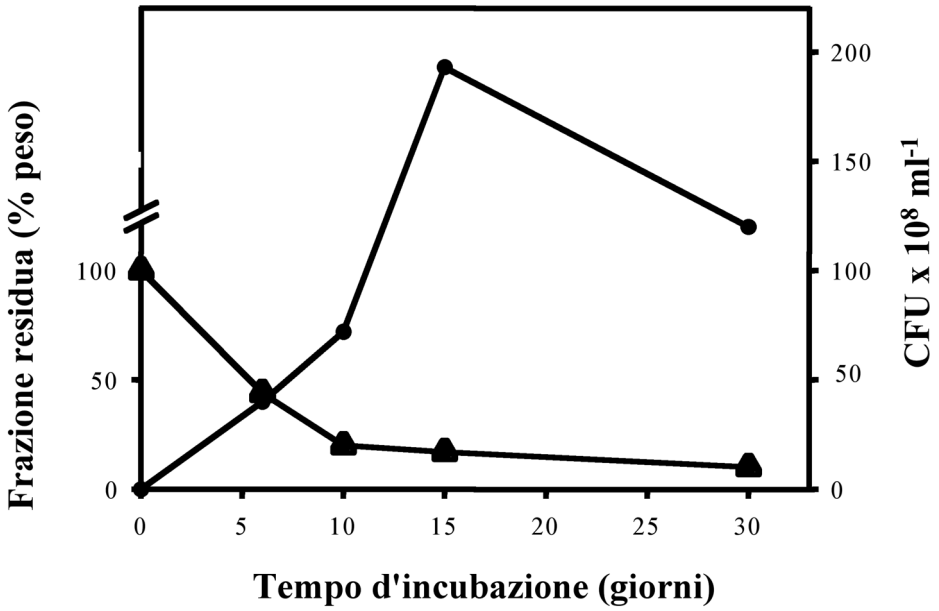

Fig. 12. Biotrattamento di olio grezzo in coltura liquida in presenza di *Pseudomonas aeruginosa* str. *tusciae* (DMSZ 13324) [dati non pubblicati].

fenomeno stesso. È stato tuttavia riconosciuto che un'infezione microbiologica può dare inizio al deterioramento della carta, dal momento che molte specie di funghi ed alcune specie di batteri sono state isolate da carte danneggiate da foxing.

Sebbene la maggior parte delle ricerche sia stata spesso indirizzata all'attività degradativa dei microfunghi, non mancano tuttavia specie batteriche, tra cui molte appartenenti al genere *Bacillus*, in grado di utilizzare la cellulosa come unica sorgente di carbonio. Ci è sembrato quindi interessante approfondire lo studio, sia tassonomico che biochimico, di alcuni ceppi batterici cellulosolitici isolati da campioni di carte affette da foxing [47]. Sono state determinate le attività dell'eso- e dell'endo-1-4β-glucanasi della comunità batterica e dei singoli ceppi cresciuti in coltura liquida a diverse temperature su cellulosa granulare come unica sorgente di carbonio (Fig. 13) [45]. Il ceppo C13, dimostratosi il più attivo, è stato identificato come *Paenibacillus polymyxa* utilizzando sia metodi metabolici che molecolari [19].

Inoltre, poiché per l'utilizzazione della cellulosa è essenziale l'adesione delle cellule alle fibre della carta, è stato condotto uno studio su campioni di carta Whatman sterile, inoculati con cellule batteriche ed incubati a 20°C per diversi mesi. Le osservazioni al SEM hanno messo in evidenza, oltre alla proliferazione delle cellule batteriche sulla superficie dei campioni di carta, la formazione di fibrille ed in alcuni casi l'instaurarsi di stretti legami con il substrato fin quasi ad avere una compenetrazione dei batteri nella carta (Fig. 14) [45].

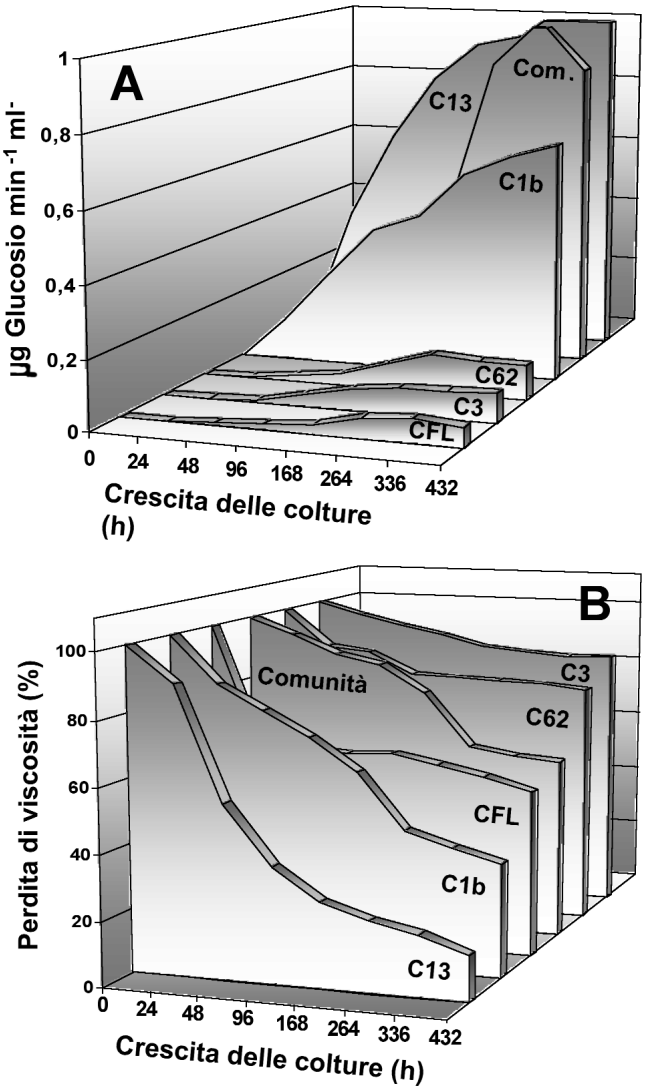

Fig. 13. Attività dell'eso- (**A**) e dell'endo-1,4-β-glucanasi (**B**) di una comunità batterica e dei singoli ceppi isolati da carta affetta da foxing, cresciuti a 20°C su mezzo minerale liquido con carbossimetilcellulosa come unica fonte di carbonio [45].

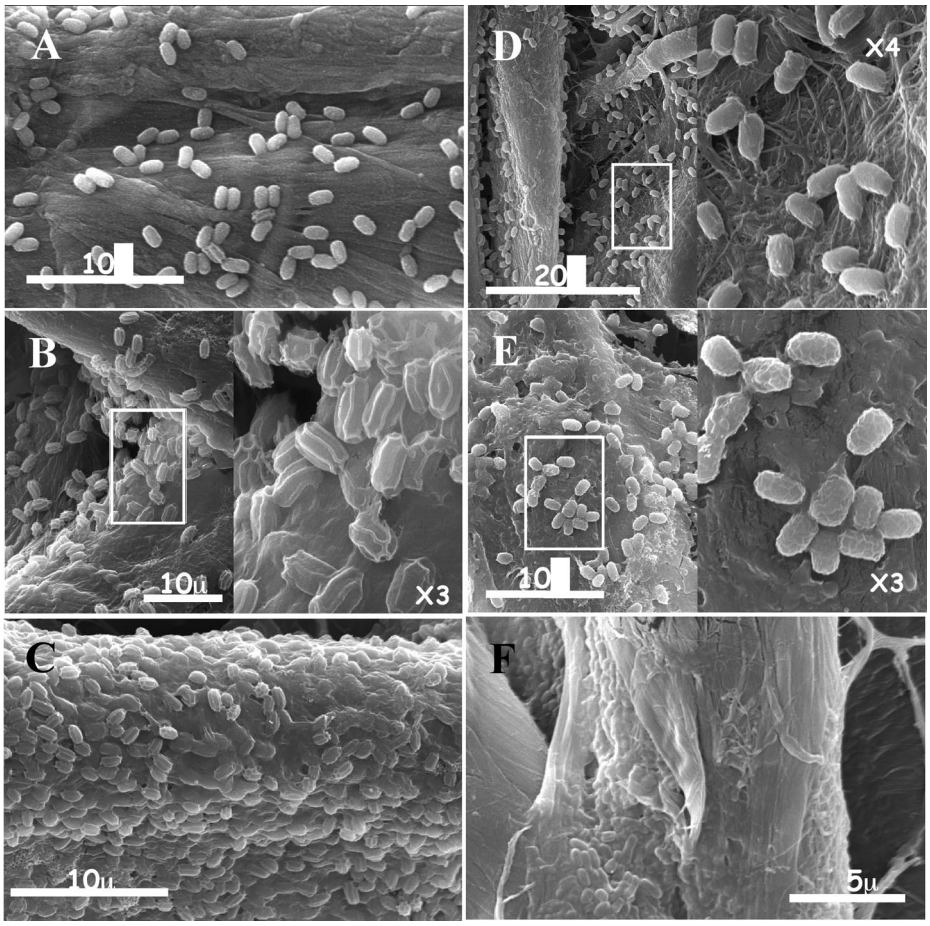

Fig. 14. Osservazioni SEM di campioni di carta sterile inoculati con cellule batteriche ed incubati a 20°C per diversi mesi. **A**, comunità batterica dopo 9 mesi; **B**, ceppo C13 dopo 13 mesi; **C**, ceppo C1b dopo 13 mesi; **D**, ceppo C62 dopo 13 mesi; **E**, ceppo C3 dopo 13 mesi; **F**, ceppo CFL dopo 17 mesi [45].

4. Conclusioni

Questo nostro intervento non vuole essere una "relazione dell'attività svolta", come potrebbe sembrare da una prima analisi, ma piuttosto un tentativo di raccontare attraverso lo sviluppo delle nostre ricerche la storia di un gruppo di microbiologi formatosi sotto la guida del Prof. Giovannozzi. 60 tubi e un ceppo di *Chlorella* furono l'inizio, nella lontana primavera del 1961, di questo lungo cammino che continuerà ancora con Daniela Lippi e Maria Rita De Paolis a Montelibretti ed Elena Di Mattia a Viterbo.

Numerosi sono stati i ricercatori, i tesisti, i tecnici che ci hanno accompagnato di volta in volta in tutti questi anni, ma costanti e fondamentali sono sempre stati l'aiuto e la professionalità dei fratelli Tito e Walter Pietrosanti.

L'esposizione dei risultati da noi ottenuti nell'arco di tutti questi anni e le relative pubblicazioni, vogliono essere anche e soprattutto un modo di dire grazie.

BIBLIOGRAFIA

[1] Cacciari I., M. Carcupino, G. Giovannozzi-Sermanni, M. Mazzini, P. Quatrini, A.L. Segre, M. Speranza, 1991. Persistence of polyethylene in the environment. Macplas International, 4, 111.

[2] Cacciari I., M. Del Gallo, S. Ippoliti, D. Lippi, T. Pietrosanti, W. Pietrosanti, 1986. Growth and survival of *Azospirillum brasilense* and *Arthrobacter giacomelloi* in binary continuous culture. Plant and Soil, 90, 107-116.

[3] Cacciari I., E. Di Mattia, P. Quatrini, M.C. Moscatelli, S. Grego, D. Lippi, M.R. De Paolis, 2003. Réponses adaptatives des isolats de *Rhizobium* aux stress. In: *Un arbre au désert: Acacia raddiana.* Ed. M. Grouzis, E. Le Floc'h. IRD Éditions, Paris, 183-200.

[4] Cacciari I., G. Giovannozzi-Sermanni, A. Grappelli, D. Lippi, 1971. Nitrogen fixation by *Arthrobacter* sp. I- Taxonomic study and evidence of nitrogenase activity of two new strains. Annali di Microbiologia, 21, 97-105.

[5] Cacciari I., A. Grappelli, D. Lippi, W. Pietrosanti, 1980. Effect of growth rate on the production of phythormone-like substances by an *Arthrobacter* sp. in chemostat culture. Journal of General Microbiology, 118, 549-551.

[6] Cacciari I., D. Lippi, 1973. Nitrogen fixation by *Arthrobacter* sp. II- Ability to fix nitrogen by some *Arthrobacter* sp. isolated from soil. Annali di Microbiologia, 23, 69-73.

[7] Cacciari I., D. Lippi, 1978. Aspetti fisiologici e morfologici della crescita in coltura continua dell'*Arthrobacter*. In: *Atti del XVIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia*, Giugno 2-4, 1978, Fiuggi, Italia, 316-320.

[8] Cacciari I., D. Lippi, 1987. Arthrobacters: successful arid soil bacteria. A review. Arid Soil Research and Rehabilitation, 1, 1-30.

[9] Cacciari I., D. Lippi, L.M. Bordeleau, 1979. Effect of oxygen on batch and continuous cultures of a nitrogen-fixing *Arthrobacter* sp. Canadian Journal of Microbiology, 25, 746-751.

[10] Cacciari I., D. Lippi, S. Ippoliti, T. Pietrosanti, W. Pietrosanti. 1985. Regulation of respiratory activity by oxygen in *Arthrobacter fluorescens* ammonium-limited chemostat culture. Canadian Journal of Microbiology, 31, 896-899.

[11] Cacciari I., D. Lippi, S. Ippoliti, T. Pietrosanti, W. Pietrosanti, 1989. Response to oxygen of diazotrophic *Azospirillum brasilense-Arthrobacter giacomelloi* mixed batch culture. Archives of Microbiology, 152, 111-114.

[12] Cacciari I., D. Lippi, S. Ippoliti, W. Pietrosanti. 1983. Respiratory activity, molar growth yields and ATP content in an *Arthrobacter* sp. ammonium-limited chemostat culture. Canadian Journal of Microbiology, 29, 1136-1140.

[13] Cacciari I., D. Lippi, T. Pietrosanti, 1994. Regulation by ammonium and glucose of *Arthrobacter fluorescens* alanine dehydrogenase. Archives of Microbiology, 161, 11-16.

[14] Cacciari I., D. Lippi, T. Pietrosanti, W. Pietrosanti, 1986. Ammonium assimilation in an *Arthrobacter sp «fluorescens»*. Archives of Microbiology, 145, 113-115.

[15] Cacciari I., D. Lippi, T. Pietrosanti, W. Pietrosanti, 1989. Phythormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. Plant and Soil, 115, 151-153.

[16] Cacciari I., D. Lippi, T. Pietrosanti, W. Pietrosanti, 1995. Effect of previous growth conditions on starvation survival and endogenous metabolism rate of *Arthrobacter fluorescens*. Journal of Basic Microbiology, 35, 359-366.

[17] Cacciari I., P. Quatrini, G. Zirletta, E. Mincione, V. Vinciguerra, P. Lupattelli, G. Giovannozzi-Sermanni, 1993. Isotactic polypropylene biodegradation by a microbial community: physicochemical characterization of metabolites produced. Applied Environmental Microbiology, 59, 3695-3700.

[18] Del Gallo M., I. Cacciari, D. Lippi, T. Pietrosanti, W. Pietrosanti, M. Cirilli, 1989. Primi risultati della batterizzazione di *Zea mays* in campo con colture singole e miste di azotofissatori. Rivista di Agronomia, 23, 116-120.

[19] De Paolis M.R., D. Lippi, 2008. Use of metabolic and molecular methods for the identification of a *Bacillus* strain isolated from paper affected by foxing. Microbiological Research 163, 121-131.

[20] Di Mattia E., I. Cacciari, E. Mincione, G. Giovannozzi-Sermanni, M. Mezzetti, 1996. Isolation of surfactant-biodegrading microorganisms in order to recover oils from drilling muds. In: *Proceedings, International Congress on Environment/Climate*, March 4-8, 1996, Roma, Italia.

[21] Di Mattia E., S. Grego, I. Cacciari, 2002. Eco-physiological characterization of soil bacterial populations in different states of growth. Microbial Ecology, 43, 34-43.

[22] Galli E., A. Grappelli, U. Tomati, 1980. Nitrate reductase activity in corn seedlings as influenced by *Arthrobacter* sp. Plant and Soil, 57, 481-485.

[23] Galli E., U. Tomati, A. Grappelli, G. Di Lena, W. Pietrosanti, 1991. Solid state degradation of agricultural wastes by *Pleurotus* species. In: *Proceedings, 13th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi,* September 1-6, 1991, Dublin, Ireland, 705-708.

[24] Giardi M.T., M.C. Giardina, G. Filacchioni, 1985. Chemical and biological degradation of primary metabolites of atrazine by a *Nocardia* strain. Agricultural and Biological Chemistry, 49, 1551-1558.

[25] Giardina M.C., R. Buffone, 1977. Pathway of initial prometryn degradation by a soil bacterium. Chemosphere, 9, 589-594.

[26] Giardina M.C., M.T. Giardi, G. Filacchioni, 1980. 4-Amino-2-chloro-1,3,5-triazine: a new metabolite of atrazine by a soil bacterium. Agricultural and Biological Chemistry, 44, 2067-2072.

[27] Giardina, M.C., M.T. Giardi, G. Filacchioni, 1982. Atrazine metabolism by *Nocardia*: Elucidation of initial pathway and synthesis of potential metabolites. Agricultural and Biological Chemistry, 46, 1439-1445.

[28] Giardina M.C., U. Tomati, W. Pietrosanti, 1973. Effetti del paraquat su alcuni batteri del suolo responsabili di attività idrolitiche. Nuovi Annali di Igiene e Microbiologia, XXIV, 191-196.

[29] Giovannozzi-Sermanni, G., 1959. Una nuova specie di *Arthrobacter* determinante la degradazione della nicotina: *Arthrobacter nicotianae.* Il Tabacco, 690, 83-86.

[30] Giovannozzi-Sermanni G., A. Grappelli, I. Cacciari, W. Pietrosanti, 1976. Influence of *Arthrobacter* sp on microflora, phythormones of the compost and on sporophores formation of *Agaricus bisporus*. Annali di Microbiologia, 26, 129-138.

[31] Giovannozzi-Sermanni G., E. Mincione, I. Cacciari, M. Mezzetti, E. Di Mattia,. 2000. Batterio per il disinquinamento da idrocarburi e suo impiego. Brevetto di Invenzione Industriale, codice 58 RM2000 A000381.

[32] Giovannozzi-Sermanni G., R. Saviano, M. Brandolini, 1965. Il termoturbidimetro areato in ricerche microbiologiche. La Ricerca Scientifica, 35, (II-B), 23-30.

[33] Grappelli A., I. Cacciari, D. Lippi, W. Pietrosanti, 1978. Influence of bacterial metabolites on the growth of *Agaricus bisporus* in submerged cultures. Mushrooms Science, X-I, 335-345.

[34] Grappelli A., G. Giovannozzi-Sermanni, W. Pietrosanti, 1972. Determinazioni spettrofluorimetriche di sostanze fito-ormonali prodotte da un *Arthrobacter.* In: *Atti del 16° Congresso Nazionale di Microbiologia*, II, 269-277.

[35] Grappelli A., J.S. Hard, W. Pietrosanti, U. Tomati, L. Campanella, E. Cardarelli, M. Cordatore, 1989. Cadmium decontamination of liquid streams by *Arthrobacter* species. Water Science and Technology, 21, 1759-1762.

[36] Grappelli A., W. Pietrosanti, 1977. Effetto dell'adenina sulla produzione di citochinine in colture di *Arthrobacter* sp. azotofissatore. Annali di Microbiologia, 27, 151-155.

[37] Grappelli A., W. Rossi, 1981. The effect of phytohormones produced by *Arthrobacter* sp. on the phosphatase activity in plant roots. Folia Microbiologica, 26, 137-141.

[38] Grego S., P. Quatrini, L. Badalucco, F. De Cesare, C. Zanotti, I. Cacciari, 1995. Souches rèsistantes de *Rhizobium* dans une rhizosphère caractérisée d'Acacia au Nord et au Sud du Sahara. In: *L'homme peut-il refaire ce qu'il a défait?* Ed. R. Pontanier, A. M'Hiri, N. Akrimi, J. Aronson, E. Le Floc'h. John Libbey Eurotext, Paris, 201-210.

[39] Lippi D., I. Cacciari, 1978. Fattori nutrizionali che influenzano l'azotofissazione di un ceppo di *Arthrobacter*. In: *Atti del XVIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia*, Giugno 2-4, 1978, Fiuggi, Italia, 308-315.

[40] Lippi D., I. Cacciari, T. Pietrosanti, W. Pietrosanti, 1992. Interactions between *Azospirillum* and *Arthrobacter* in diazotrophic mixed cultures. Symbiosis, 13, 107-114.

[41] Lippi D., M.R. De Paolis, E. Di Mattia, S. Grego, T. Pietrosanti, I. Cacciari, 2000. Effect of salinity on growth and starvation-survival of a tropical *Rhizobium* strain. Biology and Fertility of Soils, 30, 276-283.

[42] Lippi D., M.R. De Paolis, E. Di Mattia, T. Pietrosanti, I. Cacciari, 2004. Influence of substrate composition and flow rate on growth of *Azospirillum brasilense* Cd in a co-culture with 3 sorghum rhizobacteria. Canadian Journal of Microbiology, 50, 861-867.

[43] Lippi D., M.R. De Paolis, M. Osmi, F. Pietrini, T. Pietrosanti, M.C. Villani, A. Massacci, 1999. Effect of *Rhizobium* sp. inoculation on N_2-fixing and photosynthetic activities of two cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] genotypes. Photosynthetica, 37, 413-422.

[44] Lippi, D., M.R. De Paolis, A. Massacci, F. Pietrini, T. Pietrosanti, M.C. Villani, 2000. Inoculation of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] with a salt-tolerant *Rhizobium* sp. and *Azospirillum brasilense* Cd under saline soil conditions. In: *Proceedings of the COST Action 831 meeting «Biotechnology of soil: monitoring, conservation and remediation»*, Dicembre, 10-11, 1998, Roma, Italia, 72-78.

[45] Lippi, D., M.R. De Paolis, C. Pellegrino, 2006. Coexistence and adhesion to paper fibers of a cellulose-degrading bacterial community. In: *Abstracts, 11th International Symposium on Microbial Ecology,* August 20-25, 2006, Vienna, Austria, PO, A308.

[46] Lippi, D., E. Di Mattia, M.R. De Paolis, T. Pietrosanti, I. Cacciari, 2000. Nodulation of Acacia tortilis by a tropial Rhizobium sp. strain during starvation under saline conditions. In: *Abstracts, International Workshop on Methods to monitor microbial inoculants to improve their success*, April 6-8, 2000, Wageningen, The Netherlands, A9, 9-10.

[47] Lippi, D., M. Osmi, L. Pasetti, M.R. De Paolis, 1998. First observations on bacterial strains isolated from paper affected by foxing. In: *Proceedings of the 1st International Congress Science and Technology for the Safeguard of Cultural Heritage in the Mediterranean Basin*, November 26-December 2, 1995, Catania, Italia, 1287-1290.

[48] Quatrini P., A.M. Vettraino, M. Carcupino, M. Mazzini, D. Lippi, T. Pietrosanti, I. Cacciari, 1992. Colonization of *Sorghum* roots by *Azospirillum* and three bacteria isolated from sorghum rhizosphere. Symbiosis, 13, 255-269.

[49] Tomati U., A. Grappelli, E. Galli, V. Rossi, 1983. Valutazione del valore fertilizzante dei fanghi. Effetti sul sistema pianta-suolo. Rivista di Agronomia, 17, 45-54.

[50] Tomati, U., D. Lippi, W. Pietrosanti, 1970. Un complexe enzimatique capable de degrader le 2,4-D. In: *Mededelingen Faculteit Landbouw– Wetenschappen.* Gent, 35, 829-838.