

## **BIOTECNOLOGIE AMBIENTALI**

Possono essere definite come:

"l'applicazione delle biotecnologie alla soluzione dei problemi ambientali"

o come:

"l'uso integrato di scienze naturali e scienze ingegneristiche allo scopo di realizzare l'applicazione di organismi, cellule, parti di essi e analoghi molecolari per uno sviluppo sostenibile" (European Federation of Biotechnology)

## **OBIETTIVI**

- Proteggere le risorse naturali
- Prevenire i danni ambientali
- Trattare rifiuti solidi e liquidi
- Trattare le emissioni gassose
- Biorisanare le aree contaminate
- Sviluppare prodotti e processi che generano meno rifiuti e riducono il consumo energetico

## Settori principali delle biotecnologie ambientali

### PROBLEMA

- Rifiuti solidi
- Effluenti industriali e acque di scarico
- Emissioni gassose
- Suoli contaminati

### PROCESSO BIOTECNOLOGICO

- } Processi di biodegradazione, detossificazione, biofiltrazione
- } Processi di biorisanamento in situ e ex situ
- } Trattamenti biologici (denitrificazione)
- } Biosensori
- } Sonde molecolari
- } Processi di chimica pulita
- } Processi di bioconversione in prodotti ad alto valore aggiunto
- } Bioinsetticidi e Biofertilizzanti

## EVOLUZIONE DEL MONDO MICROBICO

I microrganismi hanno governato la biosfera, colonizzando qualsiasi nicchia ecologica accessibile.

Che cosa hanno fatto?

- Hanno sviluppato le principali vie metaboliche caratteristiche di tutti gli attuali organismi viventi.
- Hanno modificato la terra trasformando l'atmosfera da anaerobica a aerobica.
- Hanno creato un ambiente favorevole alle più complesse forme di vita.
- Si sono adattati ad ogni cambiamento ambientale attraverso la selezione di nuove attività metaboliche

**Lisciviazione microbica:  
estrazione di metalli da minerali grezzi**  
**Trasformazione microbiologica di metalli presenti in tracce**

**Biorisanamento**

**Biodegradazione di xenobiotici**

**Lisciviazione microbica:  
estrazione di metalli da minerali grezzi**

**UTILIZZO DEI MICRORGANISMI PER FACILITARE  
L'ESTRAZIONE MINERARIA**

La produzione di acidi e la solubilizzazione dei metalli da parte di batteri acidofili possono venire sfruttati per facilitare l'estrazione mineraria, soprattutto quando la concentrazione del metallo nel materiale di partenza è bassa

LISCIVIAZIONE MICROBICA utilizzata soprattutto per i materiali contenenti rame

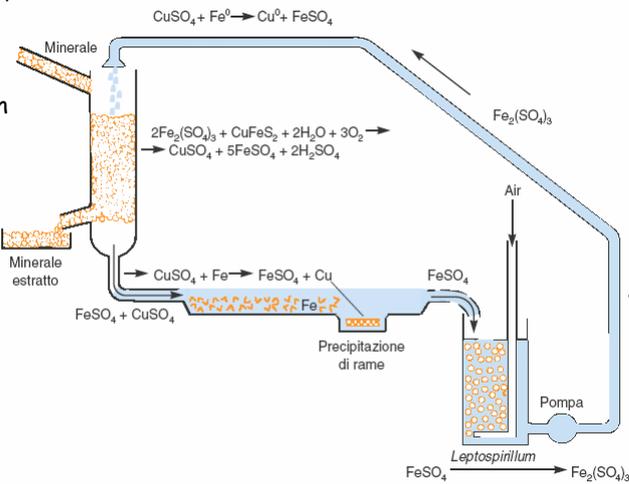
## Lisciviazione microbica: rame

-I minerali contenenti metalli in bassa concentrazione vengono raccolti in grandi ammassi (MASSA DI LISCIVIAZIONE)

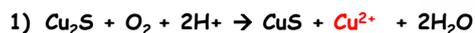
-Attraverso di essi viene fatta percolare una soluzione diluita di acido solforico (pH 2)

- Il liquido che fuoriesce, ricco di minerale, viene raccolto e trasportato ad un impianto di precipitazione

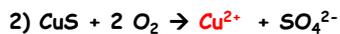
- Il liquido viene di nuovo pompato in cima alla massa di minerale e il ciclo viene ripetuto con eventuale aggiunta di acido per tenere basso il pH



Il minerale di rame puo' essere solubilizzato con tre reazioni differenti che solubilizzano il rame:



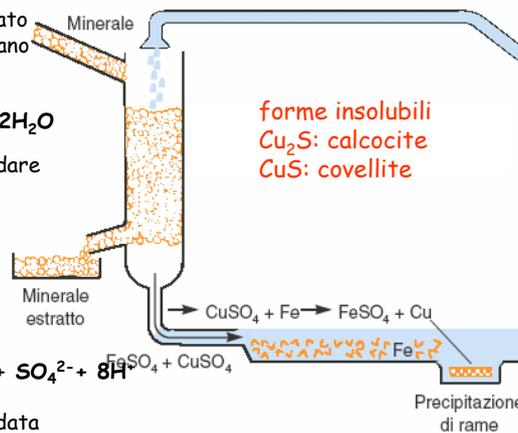
*Thiobacillus ferroxidans* è capace di ossidare il rame della calcocite provocando la solubilizzazione di parte del metallo e la formazione di covellite

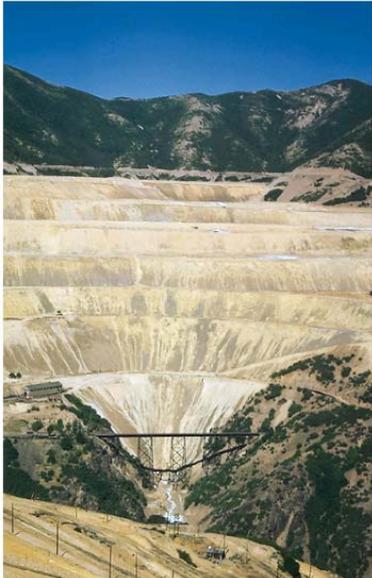
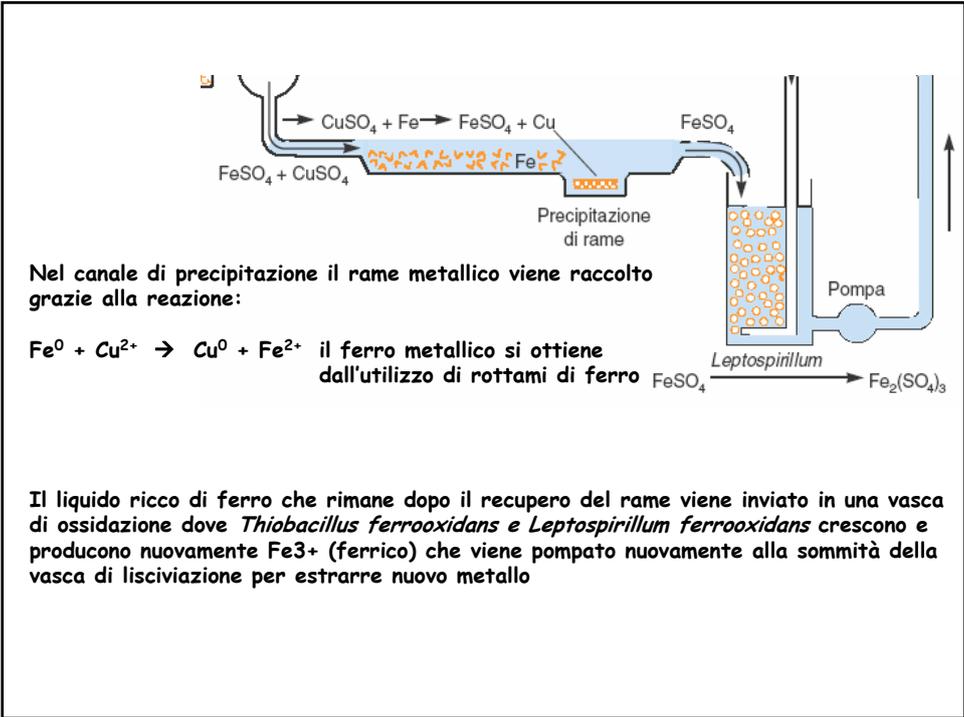


la covellite puo' venire ulteriormente ossidata liberando solfato e rame solubile sia per via biologica che per via chimica

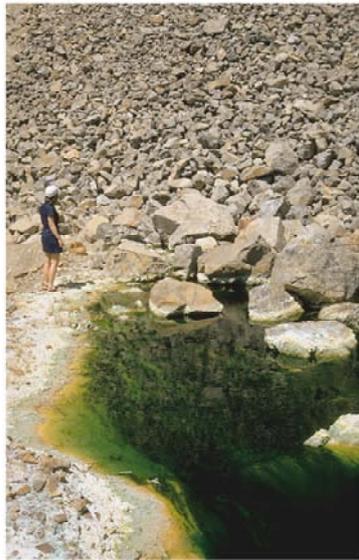
In quasi tutti i minerali è presente pirite ( $\text{FeS}_2$ ) la cui ossidazione porta alla formazione di ferro ferrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) che è un ottimo accettore di elettroni e la sua reazione con  $\text{CuS}$  provoca la solubilizzazione del rame e la formazione di ferro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ )

In presenza di ossigeno, ai valori acidi in queste condizioni, *Thiobacillus ferroxidans* ossida nuovamente il ferro ferroso alla forma ferrica rendendolo nuovamente disponibile per l'ossidazione di altro  $\text{CuS}$





Massa di minerali da lisciviare

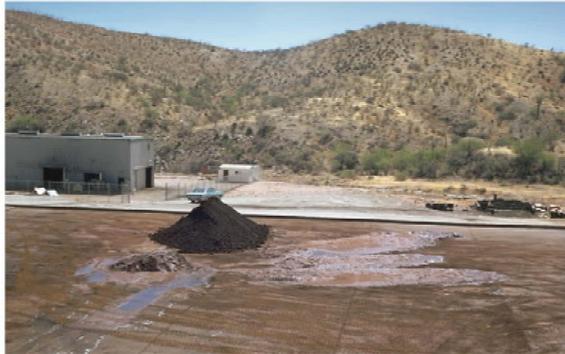


Effluente dal sito di lisciviazione ricco di rame disciolto e fortemente acido



Recupero del rame disciolto  
mediante passaggio in un canale  
contenente ferro metallico

Rame metallico recuperato dal  
canale e pronto per  
ulteriore purificazione



**BIOREMEDIATION (biorisanamento):**

tecnologia che utilizza il potenziale metabolico dei microrganismi per risanare gli ambienti contaminati.

Viene svolta in ambienti naturali, non sterili che contengono grandi quantità di microrganismi, alcuni dei quali sono in grado di degradare i contaminanti.

Può essere un processo aerobico o anaerobico a seconda del tipo di organismo coinvolto;

Questo concetto comprende la:

**BIODEGRADAZIONE  
MINERALIZZAZIONE  
COMETABOLISMO**

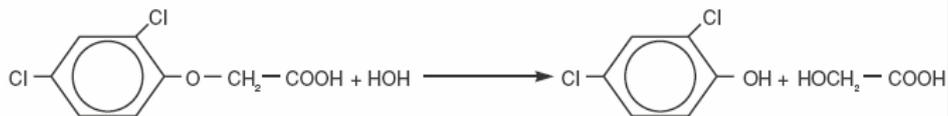
**BIODEGRADAZIONE:** trasformazione parziale, o a volte totale, di contaminanti da parte di microrganismi e piante;

(a) Alterazione di lieve entità (dealogenazione)



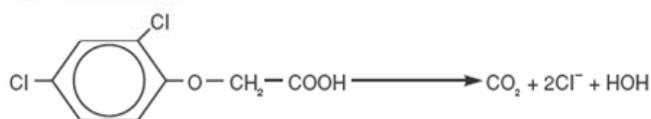
Una piccola variazione nei gruppi funzionali legati ad un composto organico, come la sostituzione di un gruppo ossidrilico al posto di un cloruro

(b) Frammentazione



Una effettiva scissione del composto organico in frammenti organici

(c) Mineralizzazione



**MINERALIZZAZIONE:** conversione completa di un contaminante organico nei suoi costituenti inorganici da una singola specie o da più specie microbiche;

**COMETABOLISMO:** trasformazione di un contaminante da parte di un microrganismo che non è in grado di utilizzare il composto come fonte di energia o come substrato per le biosintesi

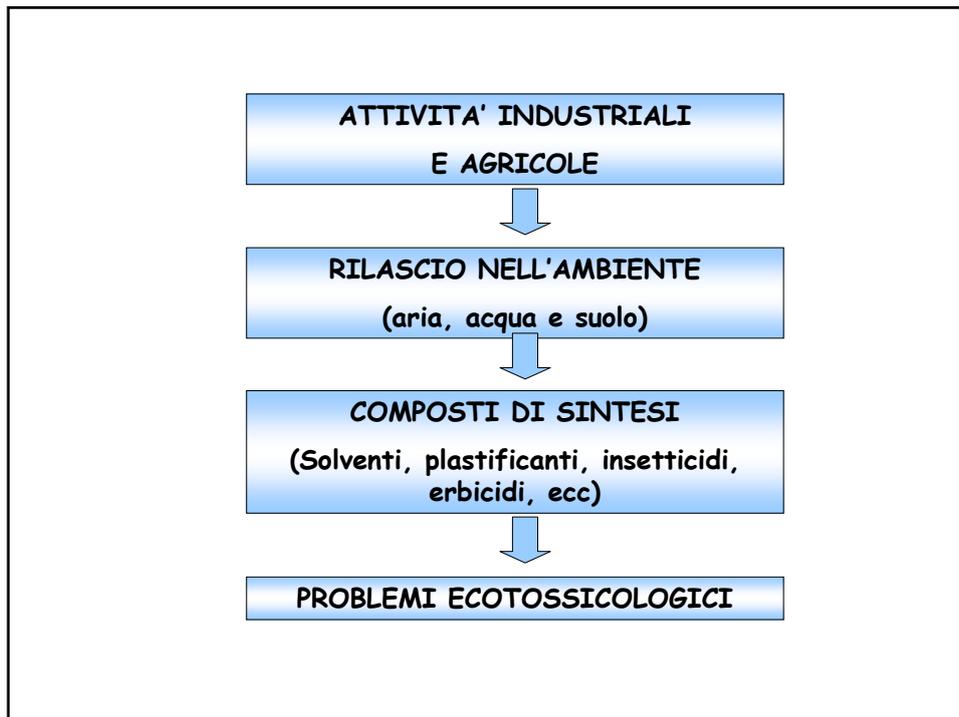
## SINERGISMO

- o Interazioni in cui due o più microrganismi determinano la trasformazione di un contaminante che non può essere condotta dalle singole specie
- o La biodegradazione condotta da una miscela di più specie è più rapida della somma della velocità delle reazioni condotte dalle specie separatamente
- o Può coinvolgere più organismi che traggono energia dal parziale metabolismo del composto oppure una combinazione di cometabolismo e biodegradazione che produce energia

I principali contaminanti degli ambienti naturali sono:

- Idrocarburi
- Metalli pesanti
- Radionuclidi
- Sostanze xenobiotiche

Tipicamente si tratta di sostanze chimiche introdotte dall'attività umana e potenzialmente pericolose.



1 . Monitoraggio dell'attività naturale di degradazione delle molecole contaminanti - risk assesment (Natural Attenuation)

2 . Stimolazione attività degradative del microbiota autoctono mediante aggiunta di nutrienti e/o altri fattori limitanti

3 . Aggiunta di microorganismi degradativi per aumentare l'attività totale di degradazione

**I criteri per considerare la bioremediation una tecnica realizzabile sono:**

- 1) il microrganismo deve poter degradare il contaminante con una efficienza tale da riportare la sua concentrazione a livelli che siano quelli standard;
- 2) il contaminante target deve essere "biodisponibile";
- 3) il sito contaminato deve poter consentire la sopravvivenza ed attività enzimatica di microrganismi e piante;
- 4) i costi della bioremediation devono essere inferiori o non molto più costosi di altre tecnologie.

**FATTORI LIMITANTI: BIODISPONIBILITA' possibilità di essere accessibile ad un microrganismo**

E' spesso un fattore limitante alla biodegradabilità specie in matrici complesse come il suolo. Molecole apolari vengono adsorbite su superfici apolari con processi lenti di diffusione e adsorbimento. Anche i processi opposti di deadsorbimento e migrazione all'esterno sono lenti

I batteri dispongono di un fattore che può facilitare l'aumento di biodisponibilità di possibili fonti di carbonio: *la sintesi di biosurfattanti*

I biosurfattanti sono polimeri naturali che vengono prodotti direttamente dai batteri attraverso un processo di fermentazione che si sviluppa in presenza di idrocarburi o di altre sostanze (e.g. glucosio) utilizzate come fonte di carbonio. Microrganismi diversi producono molecole di biosurfattanti diverse tra le quali *glicolipidi, lipopeptidi, lipopolisaccaridi, fosfolipidi, acidi grassi/lipidi neutri e proteine.*

I biosurfattanti, grazie alle loro caratteristiche anfipatiche; aumentano la superficie di interfaccia tra fase organica/acquosa, facilitando la formazione di emulsioni e in generale l'interazione tra batteri e molecole facilmente solubili in fase organica

## Fattori che influiscono sulla biodegradabilità

### A) Molecole:

- struttura chimica:
- concentrazione
- solubilità in acqua
- proprietà fisiche
- tossicità

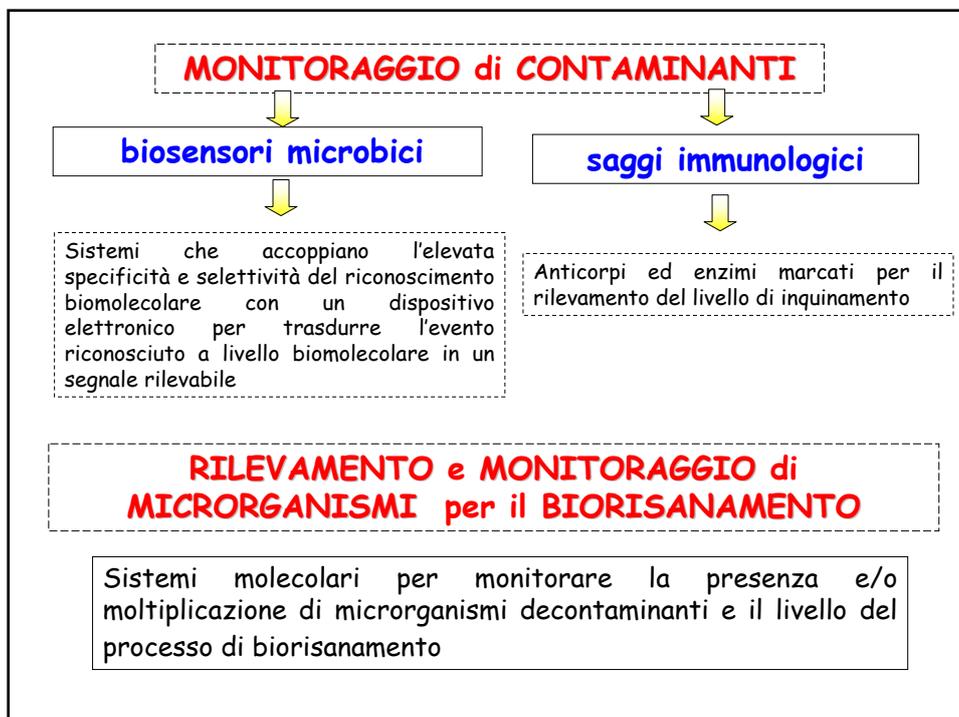
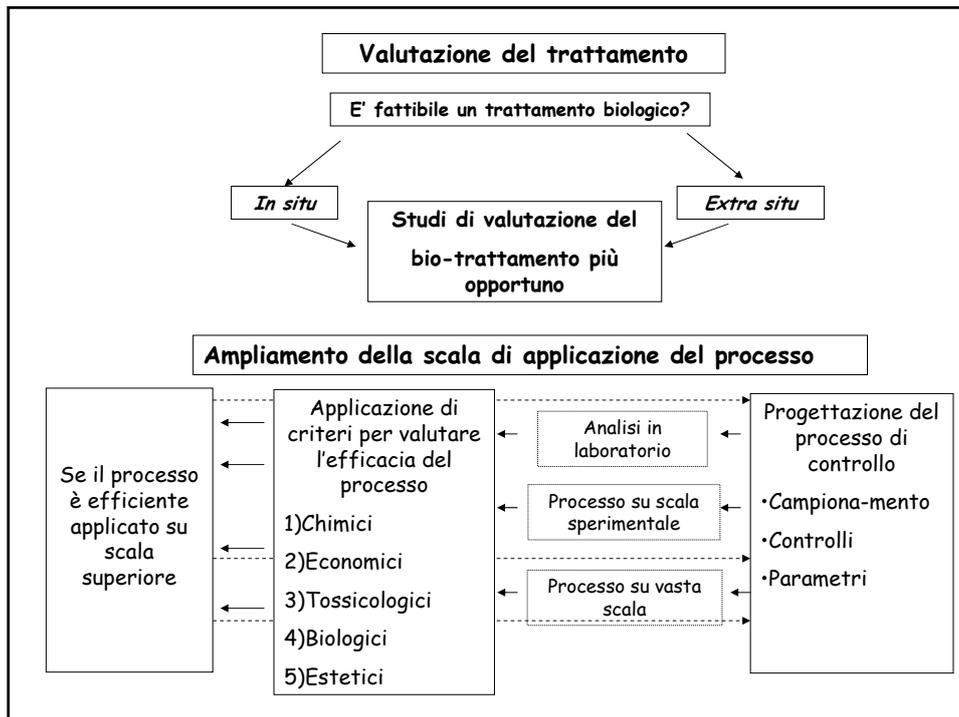
- polimerizzazione e ramificazione
- presenza di legami resistenti all'idrolisi
- residui eterociclici, aromatici e policiclici
- sostituenti cloro e nitro

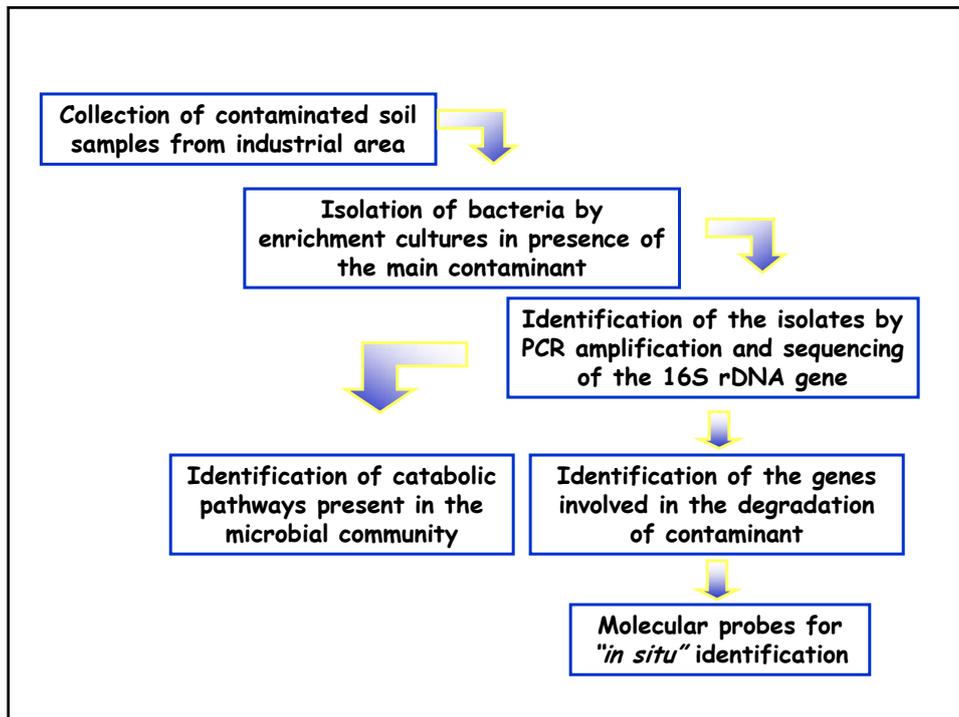
### B) Ambiente:

- biodisponibilità
- pH, pO<sub>2</sub>, temperatura, potenziale redox
- concentrazione e composizione ionica
- presenza di nutrienti organici e inorganici
- presenza di un'adeguata popolazione microbica

## Livelli di sviluppo caratteristici di un processo di biorisanamento e strategia generale con cui se ne valuta l'efficacia

Caratterizzazione dell'inquinante	Caratterizzazione idrogeochimica	Caratterizzazione microbiologica
<p><b>PARAMETRI CONTROLLATI:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-composizione</li> <li>-concentrazione</li> <li>-tossicità</li> <li>-disponibilità</li> <li>-solubilità</li> <li>-volatilizzazione</li> </ul>	<p><b>PARAMETRI CONTROLLATI:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-proprietà geologiche</li> <li>-conduttività idraulica</li> <li>-direzione del flusso</li> <li>-entità del flusso</li> <li>-presenza di NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub>, ecc.</li> <li>-presenza di accettori di elettroni</li> <li>-pH, temperatura</li> </ul>	<p><b>PARAMETRI CONTROLLATI:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-specificità diversità catabolica</li> <li>-dimensioni della popolazione</li> <li>-specifiche attività cataboliche</li> </ul>
<p><b>DOMANDE IMPORTANTI:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Le sostanze inquinanti sono biodegradabili?</li> <li>-E' possibile un trattamento ecologico?</li> <li>-Il processo è cometabolico?</li> <li>-La biodegradazione può essere migliorata?</li> </ul>	<p><b>DOMANDE IMPORTANTI:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Le condizioni idrogeologiche sono favorevoli?</li> <li>-Le condizioni ambientali sono favorevoli per la crescita e l'attività?</li> <li>-E' richiesta l'aggiunta di sostanze nutritive?</li> <li>-L'ambiente può essere modificato (migliorato)?</li> </ul>	<p><b>DOMANDE IMPORTANTI:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-C'è il potenziale biologico per la biodegradazione?</li> <li>-Si può stimolare la popolazione saprofiti?</li> </ul>





## STRATEGIE PER LA BIOREMEDIATION

### Bioremediation passiva (o intrinseca):

è quella naturale ad opera dei microrganismi indigeni e può richiedere tempi piuttosto lunghi;

### Biostimolazione:

consiste nell'aggiunta di nutrienti, come azoto o fosforo, per stimolare i microrganismi indigeni del suolo;

### Bioventilazione:

ossigeno o metano possono essere aggiunti per migliorare l'attività microbica;

### Bioaugmentation

Consiste nell'inoculazione dei siti contaminati con dei microrganismi specifici che facilitano la biodegradazione. L'inoculo può contenere organismi naturali o geneticamente modificati, una singola specie microbica o una miscela di varie specie;

### Compostaggio

Utilizzo di microrganismi, mesofili e termofili, in pile di rifiuti che vengono periodicamente mescolate

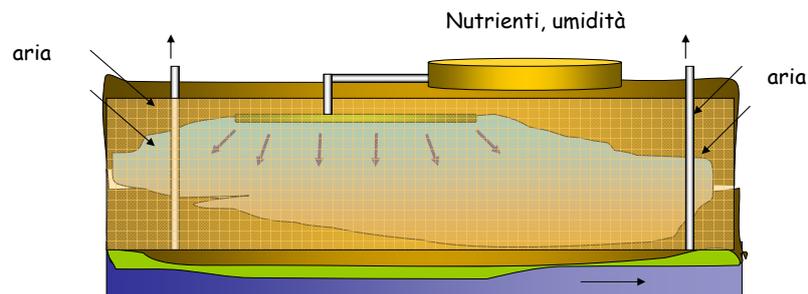
Il processo di bioremediation può essere condotto:

**IN SITU** - la matrice contaminata viene trattata sul posto senza essere rimossa

**ON SITE** - parte della matrice contaminata viene rimossa e trattata nelle vicinanze del sito dopo adeguata preparazione. Quest'alternativa viene preferita quando le condizioni di eterogeneità della matrice, le esigenze nutrizionali, o altro non permettono il processo in-situ

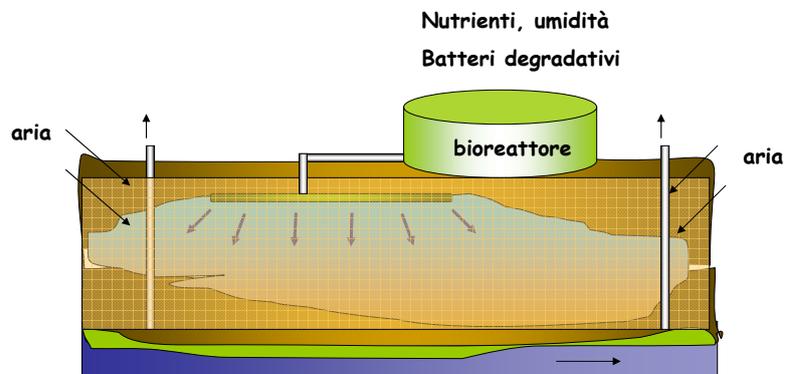
### Tecniche di bioremediation - BIOVENTING

Tecnologia in-situ per la quale, per favorire l'attività degradativa della flora batterica vengono immessi aria e nutrienti nel sottosuolo, nella zona insatura.



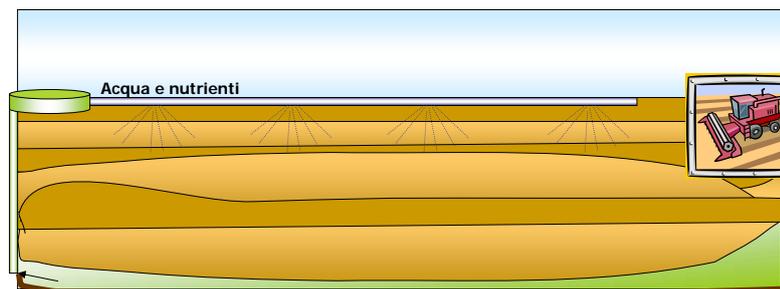
Non può essere utilizzata per terreni a bassa permeabilità, molto eterogenei, a livelli troppo alti di contaminazione locale, in vicinanza della falda acquifera.

### Tecniche di bioremediation - Bioaugmentation



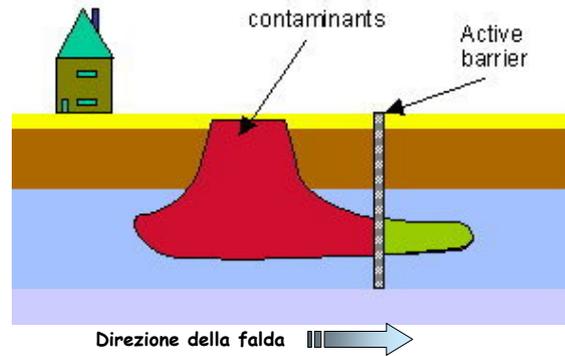
Tecnica che prevede l'inserimento nel processo di trattamento di popolazioni batteriche non originariamente presenti nel sito da trattare. Applicabile soprattutto in condizioni facilmente controllabili

### Tecniche di bioremediation - LANDFARMING



Tecnica di bonifica *on-site* che consiste nell'effettuare sul suolo rimosso operazioni agricole quali aratura, fresatura e fertilizzazione che permettono l'ossigenazione del suolo e l'apporto di nutrienti. Applicabile per inquinanti poco volatili e in condizioni di disponibilità di ampie superfici.

### Tecniche di bioremediation - BARRIERE MICROBIOLOGICHE



Trattamento in-situ delle acque di falda. La barriera è costituita da un supporto solido e permeabile all'acqua a cui sono adesi i microrganismi degradativi ed è posta trasversalmente alla falda. Utilizzata per composti solubili in acqua, BTEX

### ORGANISMI COMUNEMENTE UTILIZZATI PER LA BIOREMEDIATION

Tipo di contaminante	Genere
Petroli	Pseudomonas, Proteus, Bacillus, Penicillium.
Anelli Aromatici	Pseudomonas, Achromobacter, Bacillus, Arthrobacter, Penicillium, Aspergillus
Cadmio	Staphylococcus, Bacillus, Pseudomonas, Citrobacter, Klebsiella
Cromo	Alcaligenes, Pseudomonas

- ◆ TRASFORMAZIONE DEL MERCURIO E DI ALTRI METALLI PESANTI;
- ◆ BIODEGRADAZIONE DEGLI IDROCARBURI;
- ◆ BIODEGRADAZIONE DELLE SOSTANZE XENOBIOTICHE

Ambienti contaminati generalmente contengono due tipi di inquinanti:

- COMPOSTI ORGANICI
- COMPOSTI INORGANICI

Che richiedono diverse strategie per essere allontanati dall'ambiente

Composti organici: possono essere eliminati trattando il suolo con microrganismi capaci di degradare i composti inquinanti;

Composti inorganici: possono essere rimossi attraverso grazie alla capacità di sequestrare queste sostanze di alcuni microrganismi

**ACCUMULO**  
**PRECIPITAZIONE**  
**SOLUBILIZZAZIONE**

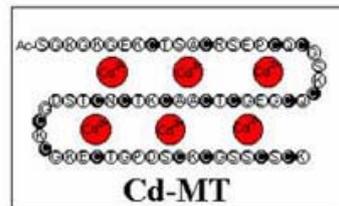
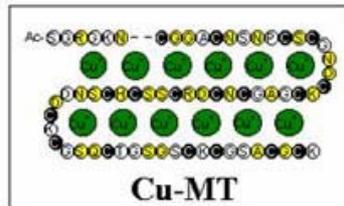
### **BIOREMEDIATION DELLE CONTAMINAZIONI DA METALLI**

- **BIO-ADSORBIMENTO:** processo per cui i metalli vengono adsorbiti e/o complessati sulla superficie della biomassa.

- 1) Stimolando la crescita di microrganismi indigeni in grado di adsorbire metalli è possibile immobilizzare metalli pesanti ed evitare ad es. che possano contaminare gli strati sottostanti e le falde acquifere.
- 2) Si cercano nuove specie con capacità di adsorbimento uniche;
- 3) Si cerca di utilizzare specie facilmente reperibili e poco costose da utilizzare (*Saccharomyces cerevisiae*);
- 4) Si utilizzano le tecniche del DNA ricombinante per migliorare la naturale capacità di alcune specie di legare metalli.

- **CAMBIAMENTO DELLO STATO DI OSSIDAZIONE DEI METALLI**

- **UTILIZZO DI MICRORGANISMI RESISTENTI AI METALLI**



Le **METALLOTIONEINE (MT)** sono proteine a basso peso molecolare (6-8kDa), ricche di residui cisteinici in grado di formare complessi con i metalli pesanti. La chelazione di cationi mono e divalenti è mediata dai residui cisteinici spesso altamente conservativi tra le specie.

- Il ruolo biologico delle metallotioneine è sequestrare metalli dal citoplasma per prevenire la loro interazione con componenti cellulari.
- Le metallotioneine sono inducibili.
- Ampiamente distribuite tra i viventi, ben conservate tra mammiferi, piante, funghi.
  - CLASSE I proprie dei mammiferi
  - CLASSE II divergenti ma ancora in grado di chelare ioni metallici. Presenti in diversi lieviti (*S. cerevisiae*, *Candida albicans*, in alcune alghe e cianobatteri).

### Le metallotioneine(MT)

Le metallotioneine dei mammiferi contengono 60-62 amino acids di cui circa 20 sono cisteine. Questi residui sono arrangiati in una serie di motivi conservativi: C-X-C, C-X-X-C e C-X-C-C (dove X è un aminoacido non cisteina).

Tutti i residui cisteinici sono coinvolti nella complessazione dei metalli ma non sono tutti equivalenti.

Metallotioneine totalmente chelate sono composte da due domini (C-terminale e N-terminale) strutturalmente e funzionalmente distinti legati da un peptide. Ioni di circa 18 specie metalliche diverse possono legarsi alle metallotioneine con diversa affinità.

Nelle piante tali proteine prendono il nome di **fitochelatine**.

- Metallothioneine eucariotiche (YMT yeast e HMT human) sono state espresse sulla superficie di *E. coli* moltiplicando la capacità naturale di *E. coli* di accumulare ioni metallici (come il cadmio o il rame) di 15-20 volte.

Le proteine eterologhe sono state fuse alla proteina LamB di *E. coli*, una maltoporina (trasportatore del maltosio e delle maltodestrine) localizzata nella membrana esterna.

- Anche l'espressione sulla superficie di *E. coli* di brevi peptidi costituiti da residui di istidina, consente di migliorare la capacità di adsorbire metalli.

#### Expression of mouse metallothionein in the cyanobacterium *Synechococcus PCC7942*

Abstract: A cDNA encoding mouse metallothionein was cloned into the shuttle vector pUC303, creating a translational fusion with the bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene. The resulting fusion protein has been expressed in the cyanobacterium *Synechococcus PCC7942*. Cyanobacterial transformants expressed mouse metallothionein-specific mRNA species as detected by RNA slot blots. In addition, the transformants expressed a unique cadmium ionbinding protein corresponding to the predicted size of the mouse metallothionein fusion protein. Expression of this fusion protein conferred a two-to five-fold increase in cadmium ion tolerance and accumulation on *Synechococcus PCC7942*.

## RIDUZIONE DISSIMILATIVA DEI METALLI

Lo scopo delle strategie di risanamento da metalli pesanti è quello di minimizzare la tossicità della contaminazione. Questo può essere fatto attraverso due vie:

- la precipitazione *in situ* del contaminante
- la rimozione *ex situ* del contaminante

Nelle condizioni ambientali opportune, i processi di ossido-riduzione da parte di diversi microrganismi hanno un enorme potenziale sia per l'*in situ* che per l'*ex situ* bioremediation dei siti contaminati da metalli pesanti.

Alcuni microrganismi, utilizzando metalli e metalloidi come *accettori finali della respirazione anaerobica*, modificano lo stato di ossidazione di questi elementi e quindi la loro solubilità e/o tossicità.

- RIDUZIONE MICROBICA di  $Cr^{6+}$  a  $Cr^{3+}$  (*Pseudomonas fluorescens* e altri Fe(III)riduttori)
- RIDUZIONE DISSIMILATIVA del  $Fe^{3+}$  (*Geobacter metallireducens*, *Shewanella putrefaciens*)
- RIDUZIONE del U(VI) a U(IV) (*Desulfovibrio desulfuricans* un batterio solfato-riduttore)

## DETOSSIFICAZIONE DA METALLI PESANTI

Oltre ai microrganismi che svolgono la riduzione dissimilativa di vari metalli, i batteri che ossidano lo zolfo (*Thiobacillus*, *Beggiatoa*) utilizzano i composti ridotti dello zolfo o del ferro come fonte di energia per la *crescita chemiolitotrofa*, producendo solfati di metalli solubili e acido solforico.

Per allontanare metalli pesanti da un sito contaminato è possibile utilizzare i due processi microbici integrati utilizzando:

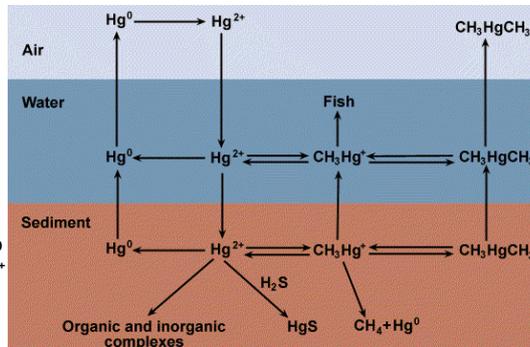
- i batteri che ossidano lo zolfo per mobilizzare
  - i solfato riduttori per poi precipitare i metalli tossici presenti nell'ambiente.
- Inizialmente i contaminanti (Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Zn) vengono solubilizzati utilizzando l'acido solforico prodotto dai batteri che ossidano lo zolfo;
- Successivamente il prodotto di questa prima fase viene introdotto in un bio-reattore in cui viene privato dei metalli tossici da una coltura mista di batteri solfato riduttori che precipitano i metalli come solfuri solidi.

Il risultato di questo processo è un effluente in cui la concentrazione di metalli è sufficientemente bassa da poter essere immesso nell'ambiente senza rischi.

### CICLO BIOGEOCHIMICO DEL MERCURIO

La forma principale presente nell'ambiente è  $Hg^0$  (mercurio elementare) che viene ossidato a  $Hg^{2+}$ . L'attività microbica trasforma per trasferimento di gruppi metilici dalla  $CH_3-B_{12}$  in **METILMERCURIO** e **DIMETILMERCURIO**

Il metil-mercurio è 100 volte più tossico della forma elementare e degli ioni  $Hg^{2+}$  attraversa la pelle e si concentra negli animali, soprattutto nei pesci, a livello muscolare



Fortunatamente diversi batteri sono in grado di operare la trasformazione delle forme tossiche del mercurio in forme non tossiche (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* e *Vibrio*).

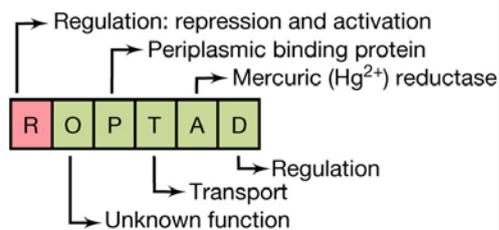
I batteri Gram- resistenti al mercurio, possiedono un enzima, la **Mercurico riduttasi**, legata all'**NADPH**, che trasferisce due elettroni a  $Hg^{2+}$  riducendolo alla forma elementare, volatile e non tossica.

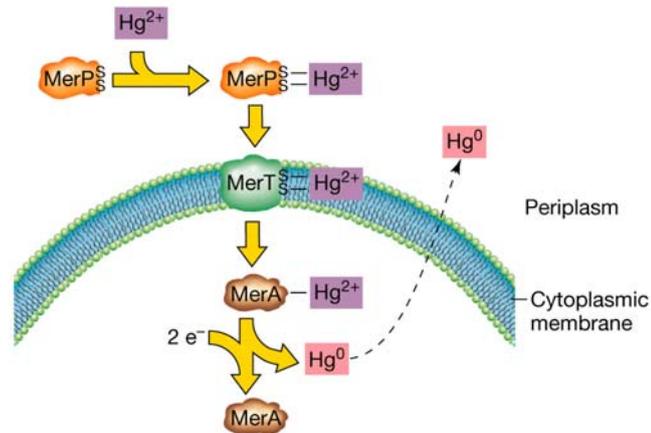
I geni che conferiscono la resistenza al mercurio in *P. aeruginosa* risiedono su un plasmide e sono detti geni **mer**

Essi costituiscono un operone e sono sotto il controllo della proteina **MerR** (prodotto del gene *merR*). Questa proteina funziona sia da repressore che da attivatore:

- in assenza di  $Hg^{2+}$  la proteina MerR si lega all'operatore impedendo la trascrizione degli altri geni del promotore;
- in presenza di  $Hg^{2+}$  questo si lega a MerR che quindi funziona da attivatore trascrizionale dell'operone *mer*.

Gli altri geni dell'operone codificano per altre proteine implicate nel legame e nel trasporto degli ioni  $Hg^{2+}$





**MerP** è una proteina del periplasma che lega gli ioni  $Hg^{2+}$  e li trasferisce ad una proteina di membrana **MerT** che li trasporta nella cellula. Gli ioni  $Hg^{2+}$  sono legati a dei residui di cisteina sia in MerP che in MerT.

All'interno della cellula la **Mercurico Riduttasi (MerA)** riduce gli  $Hg^{2+}$  in  $Hg^0$  che è una forma volatile e viene rilasciata dalla cellula

## DEGRADAZIONE DEGLI IDROCARBURI

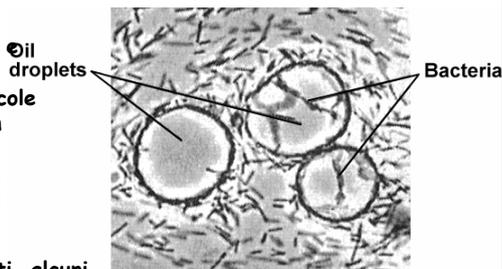
Gli idrocarburi sono composti organici contenenti soltanto carbonio ed idrogeno e sono altamente insolubili in acqua.

Gli idrocarburi alifatici sono lunghe molecole in cui gli atomi di C sono uniti tra loro in catene aperte, mentre gli idrocarburi aromatici contengono un anello aromatico e possono essere considerati derivati del benzene.

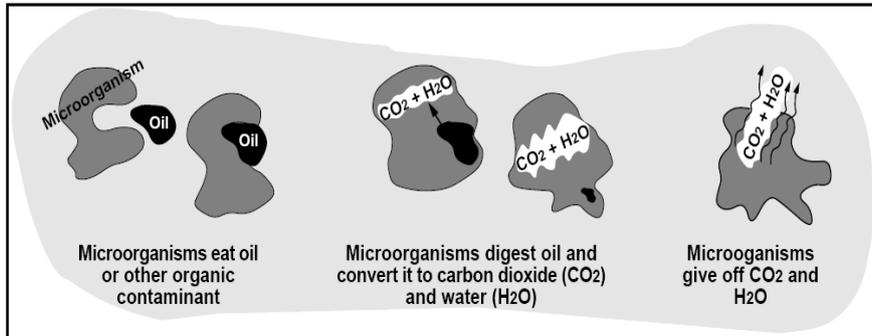
Diverse specie batteriche, muffe e lieviti, alcuni Cianobatteri ed alghe verdi hanno mostrato la capacità di ossidare idrocarburi in maniera aerobica

Questi microrganismi si sviluppano rapidamente sugli strati oleosi e la loro attività ossidativa è molto efficace se le condizioni (temperatura e nutrienti inorganici come N e P) sono favorevoli.

I batteri sono in grado di attaccare le goccioline di olio insolubili determinando la decomposizione e la dispersione delle goccioline.



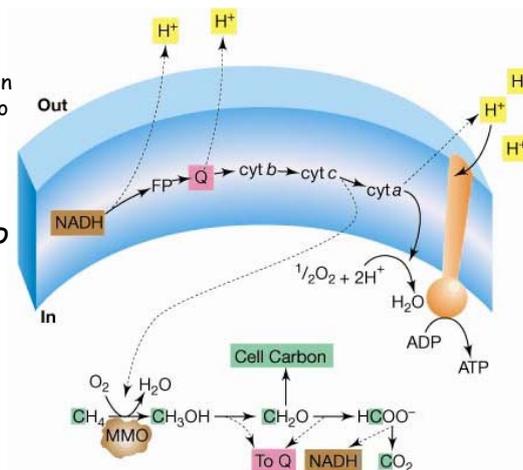
Schematic Diagram of Aerobic Biodegradation in Soil



Il **METANO (CH<sub>4</sub>)** è l'idrocarburo più semplice e viene degradato soltanto da un gruppo di batteri altamente specializzato i **METANOTROFI**, questi organismi non ossidano idrocarburi superiori.

La prima tappa della trasformazione del metano avviene ad opera di una **METANO MONOSSIGENASI** che catalizza l'incorporazione di un ossigeno dall' O<sub>2</sub>

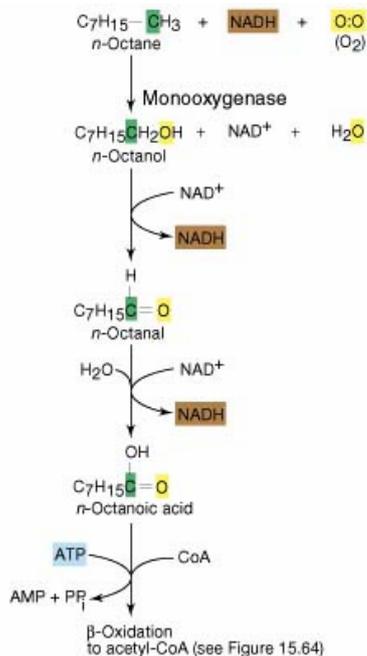
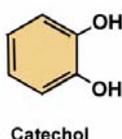
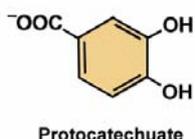
Gli elettroni necessari per questa reazione vengono dal citocromo C. Le reazioni successive forniscono elettroni alla catena di trasporto con produzione di ATP.



La prima tappa della ossidazione degli idrocarburi alifatici avviene ad opera di una **MONOSSIGENASI**, un enzima che catalizza l'incorporazione di un solo atomo di ossigeno.

Il prodotto finale della reazione è l'acetil-CoA.

I composti aromatici possono essere utilizzati come donatori di elettroni in condizioni aerobiche da microrganismi come *Pseudomonas*. Il catabolismo ossidativo comincia soltanto quando le grandi molecole aromatiche vengono convertite in composti più semplici come il **CATECOLO** e il **ACIDO PROTOCATECHICO**

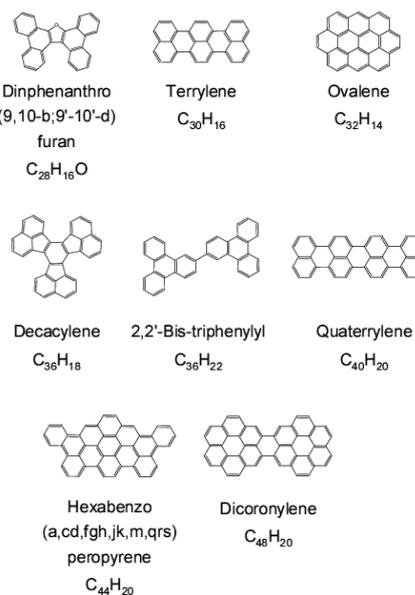


**Gli IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI (PHA)** ad alto peso molecolare contengono tre o più anelli aromatici fusi in diverse configurazioni strutturali.

La **stabilità** di queste molecole e la loro **idrofobicità** costituiscono i due motivi principali della loro persistenza nell'ambiente. Grazie alla loro natura lipofila queste molecole hanno un elevato grado di penetrazione nelle catene alimentari esercitando gravi effetti tossici e/o attività mutagena, teratogena, carcinogena.

Il meccanismo della degradazione di queste molecole prevede sempre la loro **ossidazione ad intermedi diidrossilati** che poi possono essere processati attraverso tagli successivi negli anelli aromatici, fino a catecolo e acido protocatechico.

Dai siti contaminati con questo tipo di molecole sono state isolate specie batteriche in grado di degradarle: *Pseudomonas paucimobilis*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, risultano in grado di degradare composti a quattro e cinque anelli.

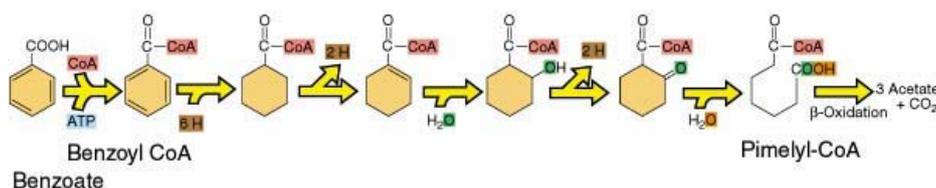


## DEGRADAZIONE ANAEROBICA DEGLI IDROCARBURI

Idrocarburi alifatici ed aromatici possono essere anche degradati in maniera anaerobica da diverse specie batteriche (batteri denitrificanti, ferro o zolfo-riduttori)

Questa forma di metabolismo potrebbe essere utile in ambienti contaminati anossici.

Da un punto di vista biochimico si tratta di un **processo riduttivo** piuttosto che ossidativo e prevede prima la riduzione dell'anello aromatico, seguita dalla **rottura dell'anello** con la formazione di acidi grassi o acidi dicarbossilici che possono essere convertiti in acetil-CoA ed utilizzati sia per le biosintesi che per la produzione di energia



Sono stati isolati ed identificati sia nuove specie di batteri marini (*Alcanivorax* sp.) in grado di utilizzare idrocarburi alifatici lineari e ramificati come unica sorgente di carbonio ed energia, sia nuove specie (*Psychroserpens* sp. e *Cycloclasticus* sp.) in grado di crescere in presenza di idrocarburi aromatici.

Per le loro caratteristiche uniche da un punto di vista metabolico e per la loro elevatissima affinità per il substrato (i.e. gli idrocarburi), questi nuovi batteri denominati batteri **idrocarburo-clastici** costituiscono la base applicativa per lo sviluppo di strategie biotecnologiche future per il recupero di ambienti contaminati da petrolio

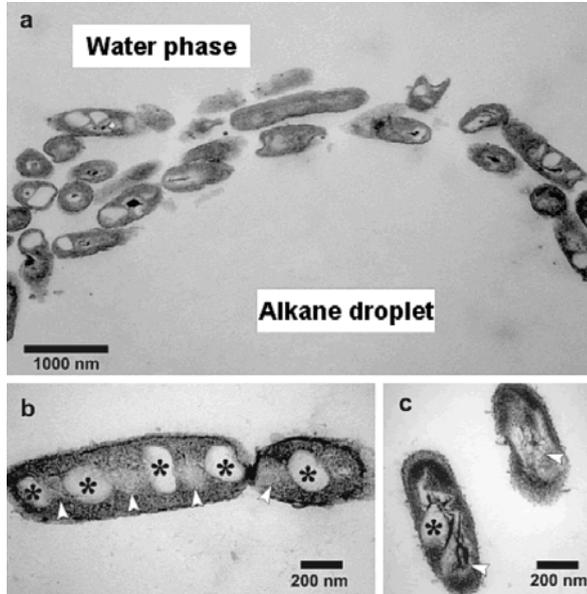
Per esempio, attraverso la **"biofissazione"** questi microrganismi possono essere fissati in forme attive in cavità microscopiche di supporti porosi naturali ed inerti (carbonato di calcio di origine planctonica).

- Una volta immessi nell'ambiente, i microrganismi all'interno delle cavità libere del supporto poroso (in parte occupate da molecole d'acqua) sono in grado di degradare i contaminanti organici con cui vengono a contatto.

- I microrganismi, fissati nei micropori con un processo di scambio ionico attivo, da un lato mostrano una maggiore capacità degradativa, dall'altro sono maggiormente protetti rispetto ai microrganismi liberi da potenziali predatori.

- Inoltre attraverso tale procedura è possibile biofissare un elevato numero di differenti microrganismi in grado di degradare il più ampio spettro di sostanze inquinanti.

Crescita di *Alcanivorax* sulla superficie di gocce di olio



(a). Alkane-grown cells (b) have a larger cell volume than their pyruvate-grown counterparts (c), and more inclusions (asterisks) often associated with the nucleoplasm (white arrowheads).

Conseguenze ambientali di ampie fuoriuscite di petrolio ed effetto della bioremediation.

L'area indicata con la freccia è stata inoculata con nutrienti inorganici per stimolare il risanamento da parte dei microrganismi.

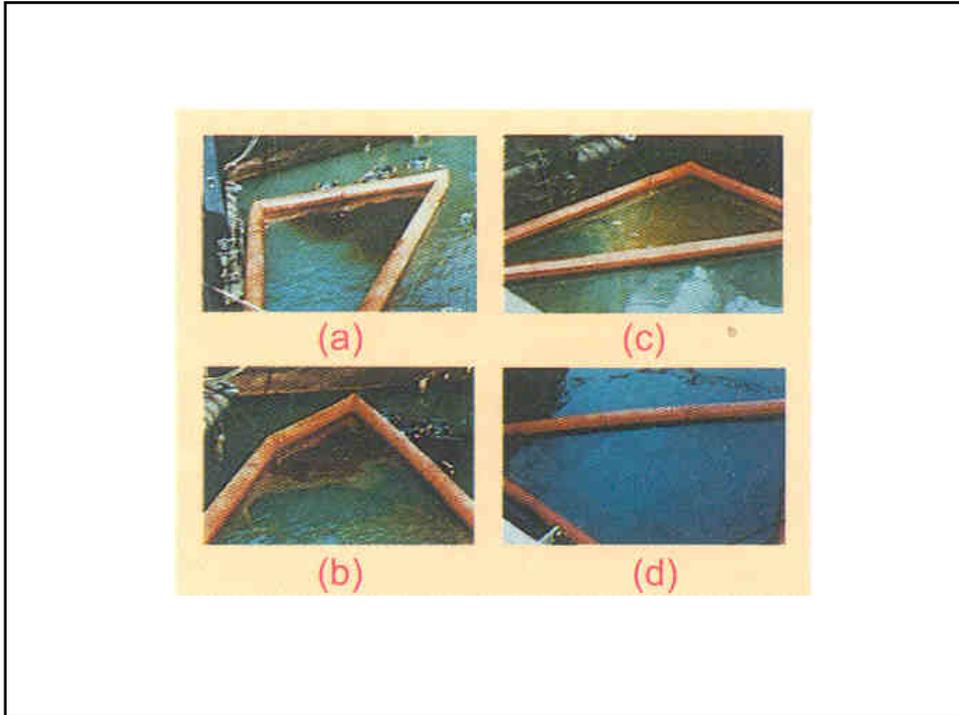
Si è visto infatti che l'aggiunta di azoto e fosforo alle aree contaminate può aumentare significativamente la velocità del risanamento

Uno dei metodi utilizzati storicamente per accelerare il processo di biodegradazione è rappresentato dall'aggiunta di nutrienti inorganici. Infatti, i batteri necessitano, per una crescita "bilanciata", di concentrazioni di carbonio, azoto e fosforo in ben definite proporzioni stechiometriche; quando si verifica la perdita di un'ingente quantità di petrolio, si ha uno sbilanciamento della quantità di carbonio disponibile rispetto a quello di azoto e fosforo. Pertanto, l'aggiunta di fertilizzanti (e.g. composti azotati e fosfati) è tesa a ristabilire il bilancio dei rapporti carbonio:azoto:fosforo e ad aumentare la capacità degradativa dei microrganismi presenti nel sistema



US Environmental Protection Agency





**CASE STUDY - Exxon Valdez - Trattamento di oil spills**



North Shore of Smith Island during cleanup and two years after the spill.



Alaska 1989 - L'incidente più controverso e studiato in termini ecologici della storia. Exxon e la guardia marina US hanno assunto gli oneri delle operazioni di clean-up.

Nel 1992 i livelli di olio rimasto dopo il clean-up erano abbastanza bassi da non essere più tossici per l'ecosistema. Una specie di crostaceo residente utilizzato come bioindicatore per gli studi di tossicità.

Esistono ancora piccoli residui dall'olio della Exxon-Valdez, in sedimenti nella zona tra le linee di marea, sotto forma di asfalteni, la componente più recalcitrante del greggio.



## *Pseudomonas*

-Genere estremamente eterogeneo costituito da batteri di forma bastoncellare, Gram -, con flagelli polari.

- Batteri saprofiti praticamente ubiquitari, si trovano nella maggior parte dei suoli aerobici e semi aerobici, così come in ambienti acquatici;

- Organismi estremamente versatili da un punto di vista metabolico, fisiologico e genetico e sono coinvolti in molte importanti attività, come i cicli degli elementi, degradazione e riutilizzo di composti xenobiotici organici;

- In grado di metabolizzare oltre 100 differenti composti come fonti di carbonio ed energia svolgendo un ruolo essenziale nel mantenimento della qualità dell'ambiente;

- Alcuni ceppi sono resistenti ad antibiotici, disinfettanti, detergenti, metalli pesanti e sono in grado di sviluppare resistenza nei confronti di solventi organici che normalmente distruggono le membrane in altre specie;

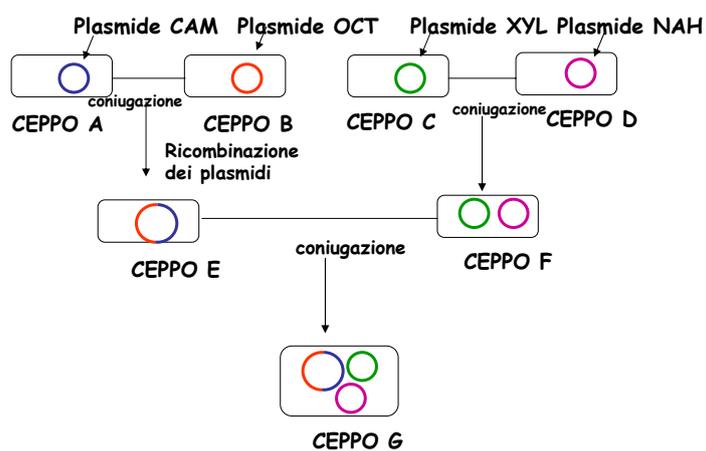
-Alcune specie sono patogene per le piante o per gli animali come *P. aeruginosa* spesso associata ad Infezioni delle vie urinarie e respiratorie nell'uomo, o in pazienti con Ustioni gravi o lesioni della cute in cui si comporta da patogeno opportunisto



**Table 13.1** *Pseudomonas* plasmids, their degradative pathways, and their sizes

Name of plasmid	Compound(s) degraded	Plasmid size (kb)
SAL	Salicylate	60
SAL	Salicylate	72
SAL	Salicylate	83
TOL	Xylene and toluene	113
pJP1	2,4-D	87
pJP2	2,4-D	54
pJP3	2,4-D	78
CAM	Camphor	225
XYL	Xylene	15
pAC31	3,5-Dichlorobenzoate	108
pAC25	3-Chlorobenzoate	102
pWWO	Xylene and toluene	176
NAH	Naphthalene	69
XYL-K	Xylene and Toluene	135

Adapted from Cork and Krueger, *Adv. Appl. Microbiol.* 36:1-66, 1991.  
 Plasmids with the same name encode a similar degradative pathway even though they have different sizes and were described in different laboratories. 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.



Negli anni '70 vennero creati i primi ceppi batterici dotati di capacità degradative accresciute, in grado cioè di degradare una serie di componenti idrocarburici presenti nel petrolio.

Il risultato è una specie batterica che cresce nel petrolio grezzo meglio di qualunque altro ceppo con plasmidi singoli.

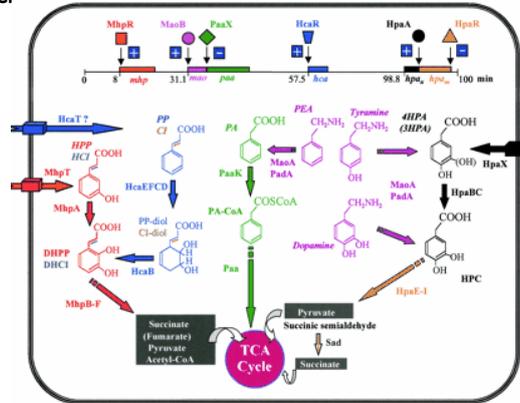
Il ceppo così ottenuto è stato oggetto del primo brevetto concesso ad un organismo manipolato geneticamente.

Sebbene *E. coli* non sia un tipico abitante del suolo, ma colonizza generalmente l'intestino animale, si è scoperta la sua abilità di degradare composti aromatici che può incontrare sia nell'habitat intestinale che extraintestinale.

Il suolo, l'acqua, i sedimenti sono altri habitat possibili per *E. coli* pertanto i composti aromatici possono essere una importante fonte di carbonio nell'ambiente extraintestinale.

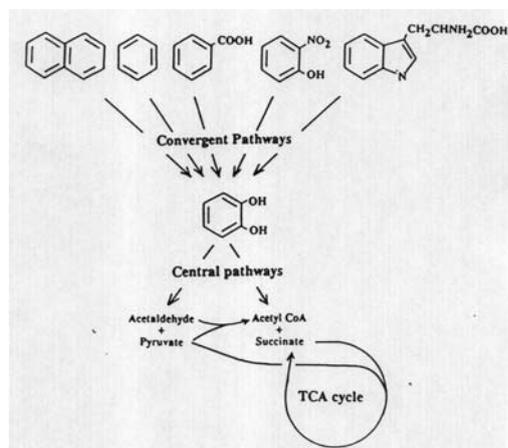
Questa caratteristica fanno di *E. coli* un organismo molto importante per diverse ragioni:

- può essere utilizzato per rimuovere inquinanti dall'ambiente
- alcuni ceppi mostrano anche resistenza a metalli pesanti
- è un batterio aerobio facoltativo e quindi può essere utilizzato in quei processi che richiedono un trattamento in due fasi aerobico/anaerobico
- sulla superficie di *E. coli* vengono comunemente espresse numerose molecole (bioadsorbimento dei metalli)



Rappresentazione schematica dei geni e dei pathway catabolici da essi codificati per la degradazione aerobica di composti aromatici in *E. coli*

Biodegradability of a substituted aromatic compounds is affected by the modification or removal of one or more substituent groups in order to allow the hydroxylation of two adjacent carbons, followed by the ring cleavage.



## Proprietà delle Ossigenasi

**MONOSSIGENASI:** catalizzano l'incorporazione di un solo atomo di ossigeno molecolare nella molecola del substrato.

Esempi:

- 1) Ossidrilasi aromatiche (toluene e fenolo monoossigenasi)
- 2) Ossidrilasi di gruppi alchilici (Xilene monoossigenasi, alcani monoossigenasi)

**DIOSSIGENASI:** 1) catalizzano l'incorporazione di entrambi gli atomi di una molecola di ossigeno sull'anello aromatico.

Esempi:

- benzene 1,2-diossigenasi
- 2) catalizzano l'incorporazione dei due atomi di una molecola di ossigeno su due carboni adiacenti di un difenolo, provocando l'apertura dell'anello aromatico.

Esempi:

- 1) Catecolo 1,2-diossigenasi
- 2) Catecolo 2,3-diossigenasi

### XENOBIOTICI

composti sintetizzati chimicamente che non esistono in natura.

Il termine deriva dal greco dove *xeno-bios* significa essenzialmente "estraneo alla vita".

Appartengono a questa categoria molti composti tra cui:

**Pesticidi**

**Bifenili policlorurati (PCB)**

**Esplosivi (TNT)**

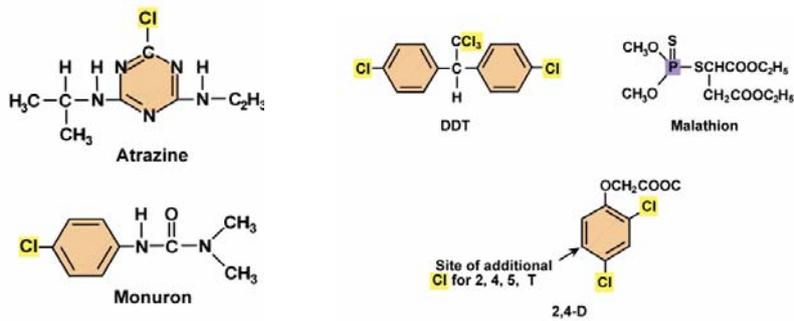
**Coloranti**

**Solventi clorurati (tricloroetilene TCE, tetracloroetilene PCE)**

Molti xenobiotici sono strutturalmente correlati ad alcuni composti naturali e quindi possono essere lentamente degradati da enzimi che normalmente degradano questi composti.

Altri sono strutturalmente differenti da altre molecole per cui la loro degradazione è estremamente difficile.

Sono stati isolati diversi microrganismi che tuttavia sono in grado di degradare alcuni xenobiotici come nel caso dei pesticidi.



I pesticidi comprendono ERBICIDI, INSETTICIDI e FUNGICIDI e sono composti clorurati contenenti anelli aromatici, azoto o fosforo.

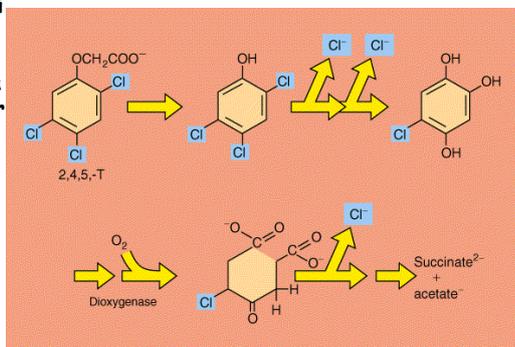
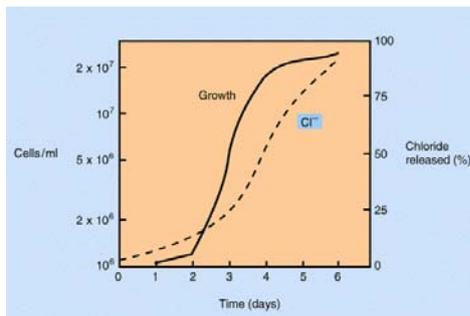
Alcune di queste sostanze sono fonte di carbonio e donatori di elettroni per alcuni microrganismi del suolo (sia batteri che funghi) che sono in grado di ossidarli fino a  $CO_2$

I composti più recalcitranti possono essere degradati solo se è presente un'altra fonte di energia. (Un fenomeno detto **COMETABOLISMO**)

**DEGRADAZIONE AEROBICA DEL  
2,4,5-T  
(acido 2,4,5-TRICLOROFENOSSIAETICO)  
da *Pseudomonas***

Durante la crescita di un ceppo di *Pseudomonas* utilizzando come unica fonte di carbonio ed energia il 2,4,5-T si osserva il rilascio di cloruro, indice di un processo di biodegradazione.

Successivamente alla dechlorurazione una diossigenasi rompe l'anello aromatico per generare composti che possono essere metabolizzati dalle vie metaboliche principali

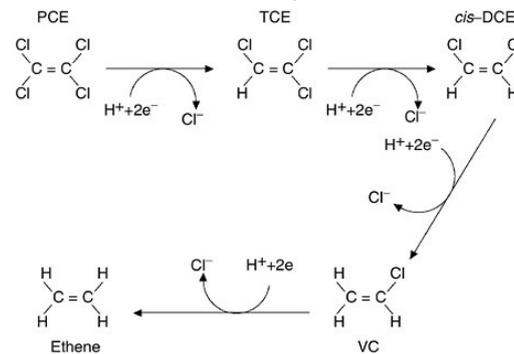


## DECLORURAZIONE RIDUTTIVA

La degradazione dei pesticidi clorurati avviene efficacemente in ambienti anossici.

La biodegradazione anaerobica è legata in questi casi alla dechlorurazione riduttiva della molecola. Il derivato privo di cloro è molto meno tossico della molecola originaria.

Sono note diverse specie batteriche che possono utilizzare solo i composti clorurati come accettori di elettroni nella respirazione anaerobica, ad esempio: *Dehalococcoides* è in grado di rimuovere tutti i cloruri dai composti policlorurati producendo **ETENE** come composto finale.



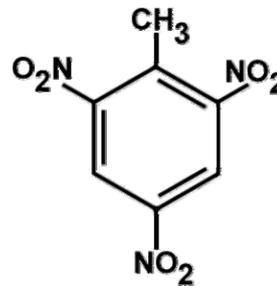
*Dehalobacterium* è in grado di utilizzare solo il DICLOROMETANO e la  $\text{CO}_2$  per il suo metabolismo energetico. È un anaerobio obbligato e converte questi due substrati in acido formico ed acido acetico. È un batterio altamente specializzato dal punto di vista nutrizionale e vive negli ambienti contaminati da diclorometano.

Diversi composti nitroaromatici come NITROBENZENI, o- e p-NITROTOLUENE e NITROBENZOATI vengono mineralizzati molto lentamente dai microrganismi.

Questi composti chimici trovano applicazione nella produzione di erbicidi insetticidi, prodotti farmaceutici ed esplosivi.

Il composto nitroaromatico più diffuso è il TNT (2,4,6-TRINITROTOLUENE) più recalcitrante di mono- e di-nitrotoluene a causa della disposizione simmetrica dei gruppi azotati sull'anello, che limita l'attacco da parte delle diossigenasi coinvolte nel metabolismo microbico dei composti aromatici.

Diversi microrganismi possono degradare il TNT sia aerobicamente che anaerobicamente



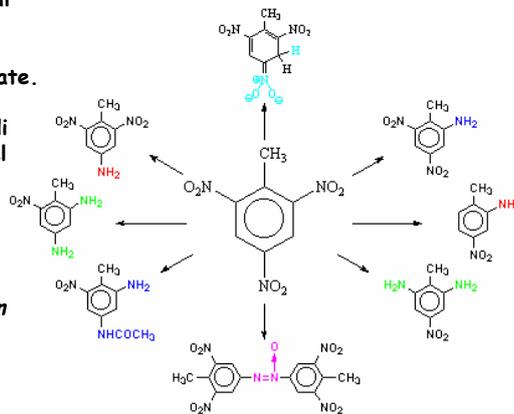
Diversi ceppi di *Pseudomonas* e alcuni funghi sono in grado di utilizzare TNT come fonte di azoto in condizioni aerobiche.

La trasformazione microbica del TNT solitamente comincia con la riduzione di uno dei nitrogruppi ad opera di NITROREDUTTASI- NAD(P)H dipendenti non ancora ben caratterizzate.

I microrganismi aerobi sono in grado di ridurre solo due dei tre nitrogruppi del TNT, la riduzione del terzo richiede condizioni anaerobiche.

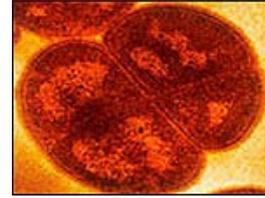
Le due specie meglio studiate in grado di metabolizzare il TNT in condizioni anaerobiche sono *Clostridium* e *Desulfovibrio* formando TRIAMINOTOLUENE (TAT) che può essere successivamente metabolizzato.

Examples of aerobic TNT biotransformation products



*Deinococcus radiodurans* è il microrganismo più resistente alle radiazioni finora noto.

Ciò è reso possibile grazie ad un sistema di riparo del DNA particolarmente efficiente evolutosi probabilmente in condizioni di disidratazione prolungata.

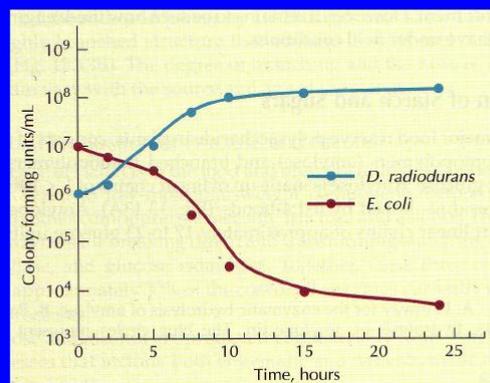


Presenta un metabolismo strettamente aerobico ma in condizioni anaerobiche è in grado di ridurre il Cr(IV), e U(VI) e Tc(VII). La riduzione di metalli multivalenti e radionuclidi può modificare la loro solubilità.

Questo processo può essere quindi utile nella loro rimozione o per solubilizzazione oppure per immobilizzazione dei contaminanti *in situ*

Inoltre sono stati costruiti ceppi che esprimono una TOLUENE DIOSSIGENASI in grado quindi di ossidare diversi composti organici come toluene, clorobenzene, 3,4-dicloro-1-butene, indolo, spesso presenti nei luoghi contaminati da scorie radioattive.

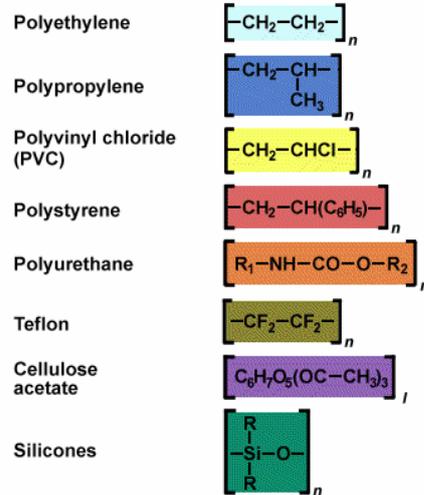
Fig 13.12 Effect of  $\gamma$ -irradiation of growth of *E. coli* and *D. radiodurans*



Tra le sostanze xenobiotiche le plastiche costituiscono un altro esempio di materiale recalcitrante, che può rimanere nell'ambiente per molti decenni.

Una alternativa ai polimeri tradizionalmente usati sono le plastiche **BIODEGRADABILI**:

- **FOTODEGRADABILI** polimeri la cui struttura è alterata in seguito alla esposizione alla luce UV;
- Polimeri che contengono molecole di amido che fanno da linker tra corti frammenti di un altro polimero biodegradabile
- Plastiche sintetizzate dai microrganismi

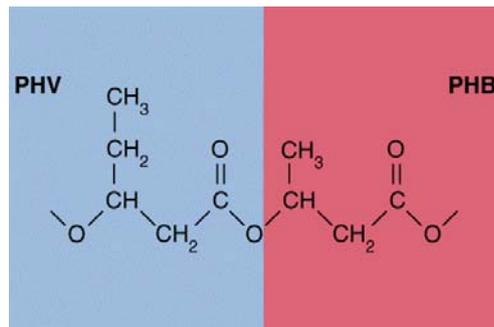


Polimeri sintetici, struttura dei monomeri che costituiscono i più comuni polimeri sintetici

Diverse specie di microrganismi producono come materiale di riserva, che accumulano nelle cellule sotto forma di granuli, vari polimeri come:  
 Poli-b-idrossialcanoato (PHA)  
 Poli-b-idrossibutirrato (PHB)  
 Poli-b-idrossivalerato (PHV)  
 Queste molecole e copolimeri possono essere utilizzati per produrre plastiche biodegradabili.

Diverse specie batteriche contengono infatti **DEPOLIMERASI** in grado di degradare queste molecole.

Esistono tuttavia microrganismi che riescono a degradare polimeri di sintesi come il **POLI-VINILALCOL (PVA)** da parte di *Pseudomonas putida*.  
 Da questa specie è stato clonato anche il gene della **PVA deidrogenasi**, *pvaA* che codifica per una proteina di superficie.





## Proprietà delle Ossigenasi

**MONOSSIGENASI:** catalizzano l'incorporazione di un solo atomo di ossigeno molecolare nella molecola del substrato.

Esempi:

- 1) Ossidrilasi aromatiche (toluene e fenolo monoossigenasi)
- 2) Ossidrilasi di gruppi alchilici (Xilene monoossigenasi, alcani monoossigenasi)

**DIOSSIGENASI:** 1) catalizzano l'incorporazione di entrambi gli atomi di una molecola di ossigeno sull'anello aromatico.

Esempi:

- benzene 1,2-diossigenasi
- 2) catalizzano l'incorporazione dei due atomi di una molecola di ossigeno su due carboni adiacenti di un difenolo, provocando l'apertura dell'anello aromatico.

Esempi:

- 1) Catecolo 1,2-diossigenasi
- 2) Catecolo 2,3-diossigenasi

L'organizzazione modulare dei geni catabolici e la loro localizzazione plasmidica o cromosomale all'interno di trasposoni, insieme a una bassa specificità di substrato degli enzimi coinvolti nelle attività cataboliche, consente a microrganismi di interesse ambientale di metabolizzare un grande numero di composti organici e contribuisce alla rapida evoluzione di nuove vie metaboliche in risposta a modificazioni ambientali

Diversi meccanismi genetici possono essere coinvolti nell'evoluzione delle vie metaboliche in generale e nei processi di adattamento dei microrganismi ai composti "xenobiotici" in particolare :

Eventi mutazionali

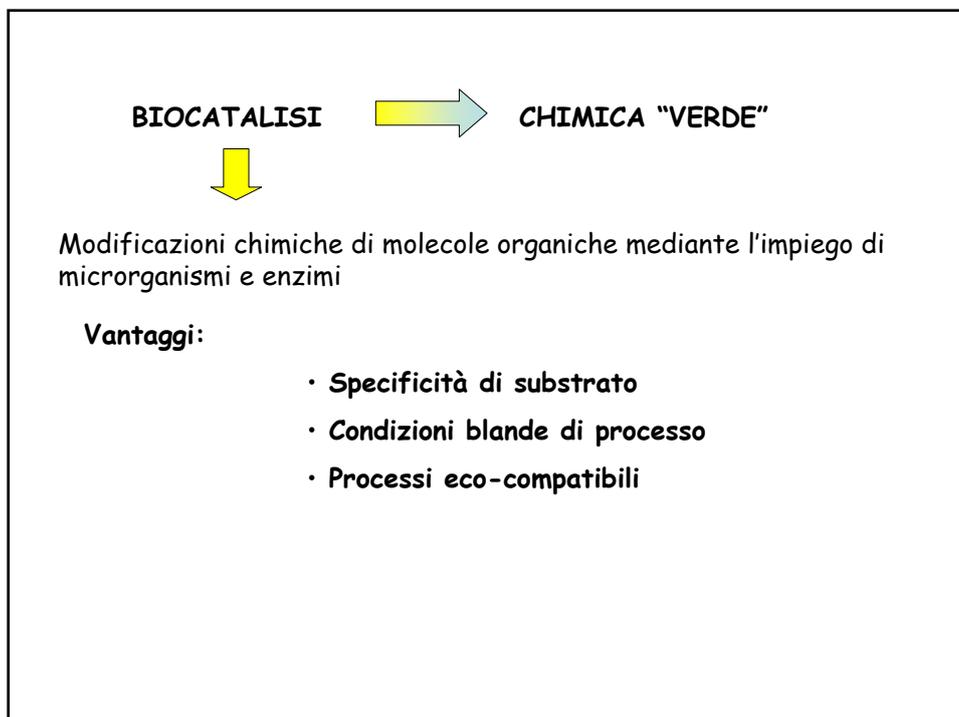
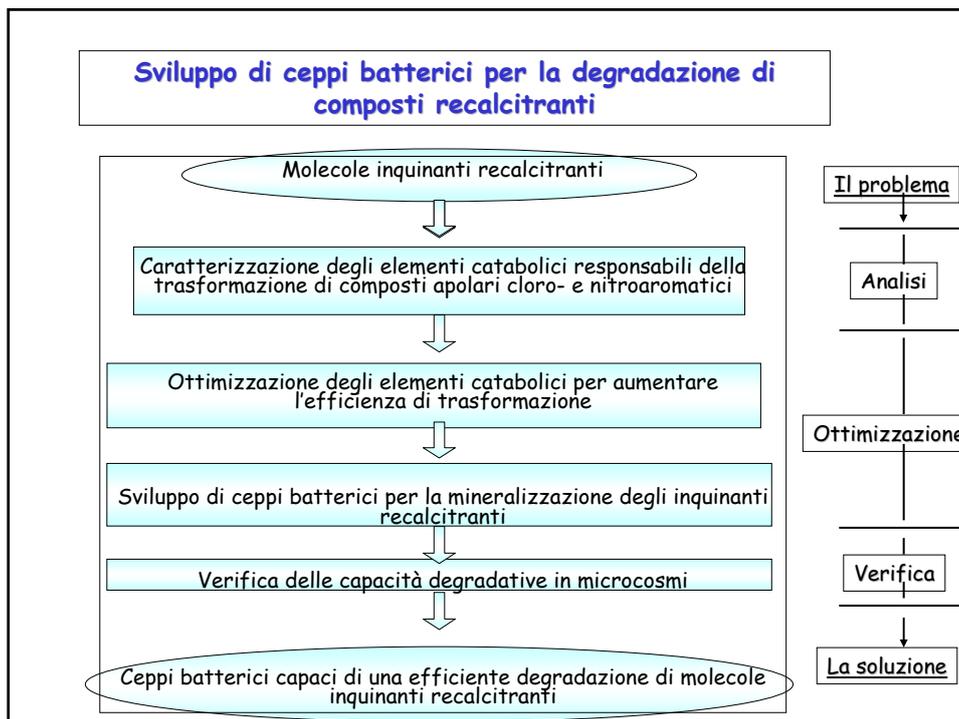
- Trasferimento di geni
- Ricombinazione genica
- Trasposizione

### PROCEDURE PER IL MIGLIORAMENTO DI CEPPI BATTERICI PER PROCESSI DI BIORISANAMENTO

- Espandere la gamma di substrati di vie degradative esistenti
- Evitare l'incanalamento del substrato in vie cataboliche inutili che producono intermedi tossici, eliminando "colli di bottiglia" nel percorso degradativo
- Creare nuove vie degradative

### STRATEGIA PER SVILUPPARE BATTERI CON NUOVE CAPACITA' DEGRADATIVE

- Arricchimento di batteri da campioni di suolo o di sedimenti, capaci di degradare un composto "recalcitrante"
- Creazione "*in vivo*" di vie degradative ibride mediante l'assemblaggio di segmenti catabolici pre-esistenti trasferiti da un ceppo batterico ad un altro tramite coniugazione
- Costruzione "*in vitro*" di nuove vie degradative mediante le tecniche dell'ingegneria genetica



## Bioconversioni e Biocatalisi

Biocatalizzatore	Forma	Vantaggi	Svantaggi
Enzimi isolati	sciolti in acqua	•Alta attività enzimatica	•Possibilità di reazioni indesiderate •Substrati insolubili •Necessità di estrazione
	Sospesi in solventi organici	•Facile realizzazione del processo •Solubilizzazione dei substrati •Facile recupero degli enzimi	•Bassa attività
	Immobilizzati	•Facile recupero degli enzimi •Uniformità nelle conversioni •Ridotto rischio di contaminazioni	•Parziale perdita dell'attività durante l'immobilizzazione •Elevato costo dell'immobilizzazione
Cellule intere	Cellule in crescita	•Elevata attività •Possibilità di catalizzare reazioni multienzimatiche o richiedenti cofattori	•Grande quantità di biomassa •Prodotti secondari •Composizione chimica meno definita •Difficoltà nel controllo del processo
	Cellule non proliferanti	•Semplicità del sistema •Pochi prodotti secondari •Possibilità di catalizzare reazioni multienzimatiche o richiedenti cofattori	•Bassa attività •Composizione chimica meno definita
	Cellule immobilizzate	•Possibilità di riciclo di cellule •Possibilità di catalizzare reazioni multienzimatiche o richiedenti cofattori •Modificazioni graduali nelle condizioni di reazione consentono adattamenti a nuovi livelli in processi continui	•Bassa attività •Composizione chimica meno definita

## Sviluppo di un processo di BIOCATALISI



- **Isolamento di microrganismi con attività metaboliche "interessanti"**
- **Studio e caratterizzazione dei geni e delle attività coinvolte**
- **Sviluppo del Biocatalizzatore:**
  - ⇒ ricerca Ospite (GRAS, Generally Recognized As Safe)
  - ⇒ sviluppo ed ottimizzazione del sistema di espressione dell'attività catalitica (Biologia Molecolare)
  - ⇒ caratterizzazione dell'attività catalitica (specificità di substrato)
  - ⇒ ricerca ed ottimizzazione delle condizioni culturali (composizione, parametri chimico-fisici)
  - ⇒ scale-up