

# Argomenti del corso: parte 1

Introduzione alla bioremediation

**Il cometabolismo**

**Il suolo e batteri**

**Bioremediation in situ**

**Phytoremediation**

**Bioremediation ex situ**

# Bioremediation in situ

La bioremediation *in situ* sta ricevendo una grande attenzione giustificata dal fatto che i processi *in situ*:

- non richiedono scavi incredibilmente costosi di grandi quantità di terreni contaminati;
- non richiedono sistemi di protezione delle falde acquifere profonde;
- sono molto economici.

La maggior parte dei processi *in situ* coinvolgono la stimolazione di popolazioni microbiche autoctone in modo che diventino metabolicamente attive e degradino il contaminante di interesse

Vengono iniettati nutrienti (principalmente azoto e fosforo) e accettori di elettroni (generalmente ossigeno, ma talvolta nitrati).

# La bioremediation *in situ* avviene tramite processi di **cometabolismo**.

I microrganismi sono da tempo noti per avere la capacità di trasformare molecole organiche per produrre prodotti organici che si accumulano nei terreni di coltura.

Questa trasformazione di un composto organico fatta da un microrganismo che non è in grado di usare il substrato stesso come fonte di energia è definita **cometabolismo**.

## Degradazioni metaboliche

Biodegradazione accoppiata alla conservazione dell'energia (produzione di ATP) e/o alla crescita cellulare. Il microrganismo trae beneficio dalla dall'utilizzo del contaminante.

## Degradazioni co-metaboliche

Biodegradazione o biotrasformazione "fortuita" da parte di un microrganismo che non ne trae però alcun beneficio. La biodegradazione (biotrasformazione) è mediata da enzimi o co-fattori che vengono utilizzati dal microrganismo per tutt'altri scopi

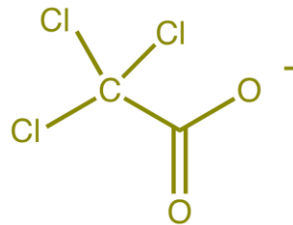
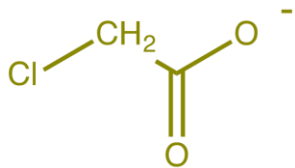
# Un po' di storia...

I primi studi sul cometabolismo osservarono che la *Pseudomonas methanica* ossidava l'etano ma non poteva usarlo come fonte di carbonio. Successivamente è stato osservato che questo batterio, crescendo in un mezzo con metano, potrebbe trasformare diversi idrocarburi.



coossidazione

In seguito è stato osservato che un ceppo di *Pseudomonas* che cresceva su monocloroacetato era in grado di dealogenare il tricloroacetato ma non era in grado di utilizzare quest'ultimo composto come fonte di C per la crescita.



cometabolismo

Il termine cometabolismo deve essere applicato solo alle circostanze in cui un substrato, che non viene utilizzato per la crescita, è metabolizzato in presenza di un secondo substrato che viene utilizzato per supportare la crescita.

Rientrano in questo termine i casi in cui

- l'organismo cresce contemporaneamente su un secondo
- la moltiplicazione non è in atto al momento in cui il composto viene metabolizzato

**Cometabolismo = metabolismo di un substrato organico da parte di un microrganismo che non è in grado di usare quel composto come fonte di energia o come elemento nutritivo.**

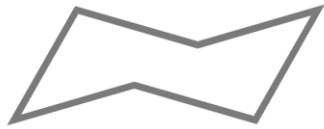
Cometabolismo è un termine diverso da bioconversione o biotrasformazione, poiché diverse sono le conseguenze ambientali.

Le reazioni cometaboliche hanno un impatto in natura diverso dalle biodegradazioni legate alla crescita, e quando le trasformazioni avvengono, di solito non è del tutto chiaro se i microrganismi hanno o non hanno un secondo substrato disponibile sul quale crescere.

## Substrati e reazioni

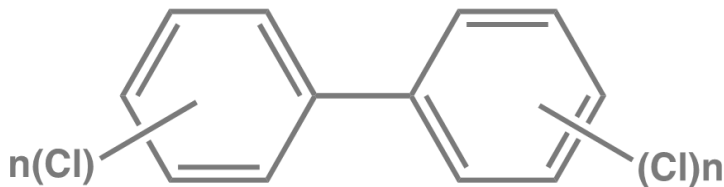
Un gran numero di sostanze chimiche è soggetto a cometabolismo nelle culture.

Tra i composti noti abbiamo:



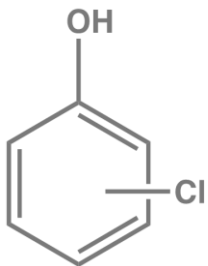
cicloesano

solvente

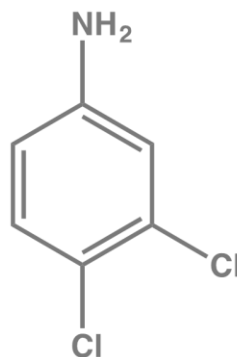


PCB (policlorobifenile)

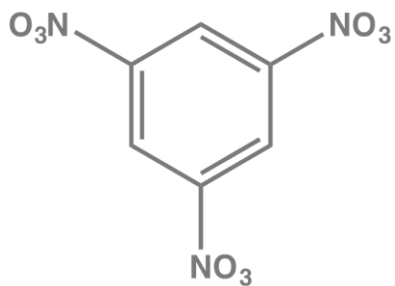
cancerogeno



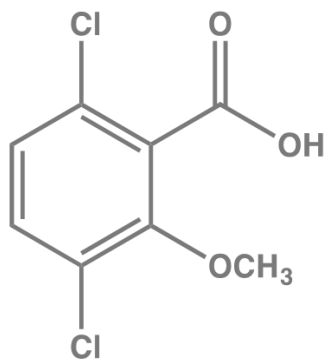
clorofenoli  
pesticidi



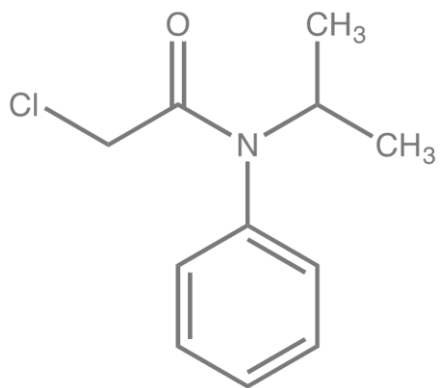
3,4-dicloroanilina  
produzione di coloranti ed erbicidi



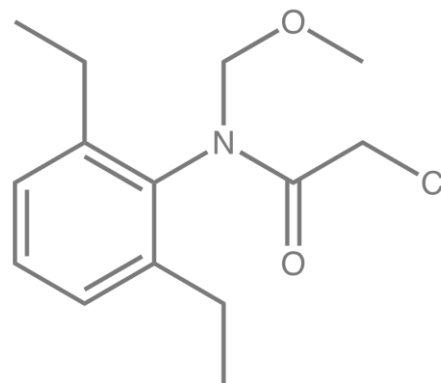
1,3,5-trinitrobenzene  
esplosivo



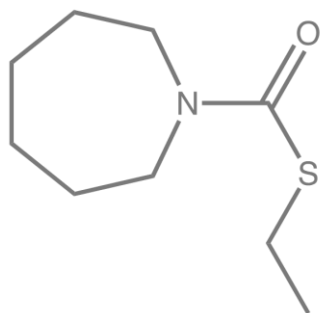
dicamba (acido 3,6-dicloro-2-metossibenzoico)  
erbicida



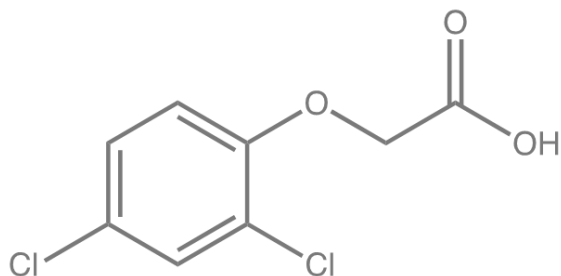
propaclar  
pesticida



alaclor  
erbicida



ordram  
pesticida



2,4-D (acido 2,4-diclorofenossiacetico)  
erbicida



**Gli organismi che danno queste reazioni in laboratorio includono specie di**

*Pseudomonas, Acinetobacter, Nocardia, Bacillus, Mycococcus, Achromobacter, Methylosinus, Alcaligenes, Rhodococcus, Mycobacterium, Xanthobacter, e Nitrosomonas tra i batteri*

**e *Penicillium e Rhizoctonia* tra i funghi.**

Le conversioni cometaboliche che sembrano coinvolgere un singolo enzima sono:

- ossidazioni,
- idrossilazioni,
- denitrazioni,
- deamminazioni,
- idrolisi,
- acilazioni,
- rotture di legami eteri;

ma molte delle conversioni sono complesse e coinvolgono parecchi enzimi.

Diverse ragioni sono state avanzate per spiegare il cometabolismo, cioè, perché un substrato non supporta la crescita, ma è convertito in prodotti che si accumulano.

Tre sono i motivi supportati sperimentalmente:

- l'enzima iniziale o gli enzimi convertono il substrato in un composto che non viene ulteriormente trasformato da altri enzimi in metaboliti intermedi da utilizzare per la biosintesi e la produzione di energia;
- il substrato iniziale è trasformato in prodotti che inibiscono l'attività degli enzimi della mineralizzazione finale o la crescita stessa dei microrganismi;
- l'organismo ha bisogno di un secondo substrato per avere qualche reazione particolare.

La prima spiegazione è la più comune, soprattutto a concentrazioni di prodotti che quando metabolizzati non producono composti che hanno effetti antimicrobici.

La base per questa spiegazione è che molti enzimi agiscono su **diversi substrati strutturalmente correlati**;

pertanto, un enzima naturalmente presente nella cellula può catalizzare reazioni che alterano i prodotti chimici che non sono intermedi tipici cellulari.

Questi enzimi non sono assolutamente specifici per i loro substrati.

Si consideri una normale sequenza metabolica



**Il primo enzima (a) può avere una bassa specificità di substrato e agire su una molecola strutturalmente simile ad A, cioè, A'.**

**Il prodotto (B') sarebbe diverso da B nello stesso modo in cui A differisce da A'.**

**Tuttavia, se l'enzima (b) non è in grado di agire su B', perché le caratteristiche strutturali differiscono da quelli che controllano la specificità di substrato dell'enzima (a), B' si accumulerà.**

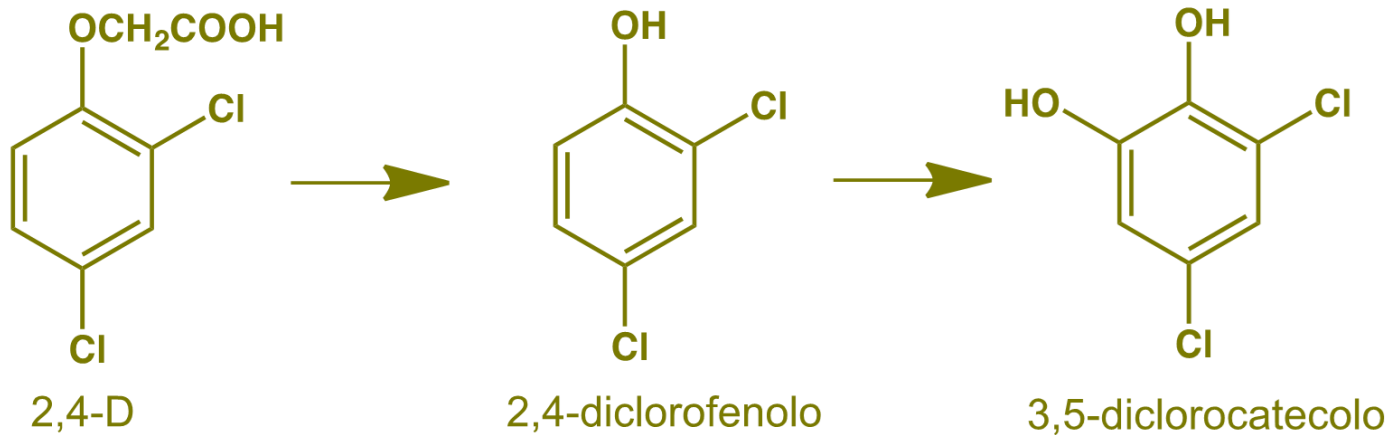


**Inoltre, non si produce CO<sub>2</sub> e nemmeno energia e, poiché i composti cellulari non si formano, gli organismi non crescono.**

**La formazione di B' è dunque del tutto fortuita.**

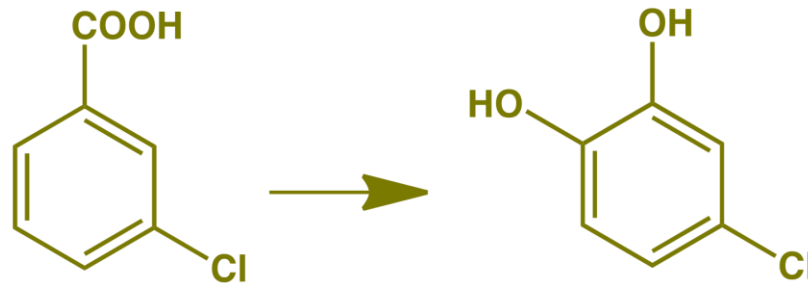
**La prima evidenza di questa spiegazione è data dagli studi del metabolismo di 2,4-D.**

**Questo erbicida è solitamente convertito prima in 2,4-diclorofenolo, ma l'enzima è in grado di metabolizzare anche alcuni fenoli generati dall'enzima iniziale che agisce su altri acidi fenossi-acetici.**



**Quando si verifica questo, il prodotto del cometabolismo si accumula con resa praticamente quantitativa, almeno in coltura pura**

Un caso tipico è la conversione batterica di 3-clorobenzoato a 4-clorocatecolo con la resa 98% rispetto al substrato che si trasforma.



Nella sequenza appena descritta, se la velocità di reazione catalizzata dall'enzima **a** è più veloce rispetto al processo catalizzato dall'enzima **b**, B si accumulerà perché non è metabolizzato altrettanto velocemente rispetto a come viene generato.

**In alcuni casi, in coltura pura, un organismo può non essere in grado di metabolizzare un composto organico perché è necessario un secondo substrato per realizzare una particolare reazione.**

**Il secondo substrato può fornire qualcosa che è presente in quantità insufficiente nelle cellule affinché la reazione possa procedere, ad esempio, un donatore di elettroni per la trasformazione**

**Il cometabolismo è solo un particolare tipo di trasformazione microbica che ha una notevole importanza in natura.**

**Le conseguenze ambientali sono l'incapacità degli organismi di crescere a spese del composto organico e la conversione del substrato in un prodotto organico che spesso si accumula.**

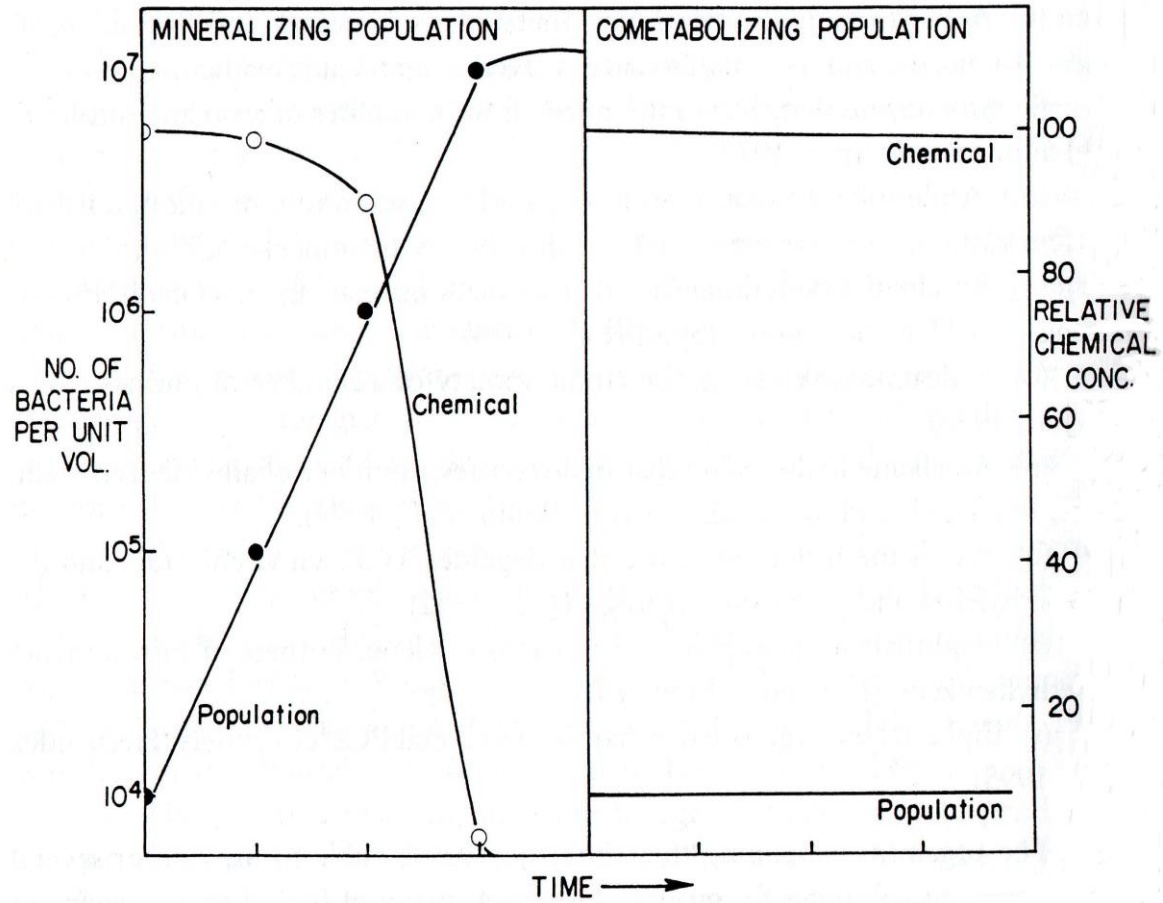
**Due effetti sono immediatamente evidenti.**

**Innanzitutto, poiché la popolazione o la biomassa degli organismi che agiscono sulla maggior parte delle sostanze chimiche di sintesi è piccola sia alla superficie sia sotto la superficie del suolo e dell'acqua, una sostanza chimica soggetta a cometabolismo da parte questi organismi si trasforma lentamente, e il tasso di conversione non aumenta con il tempo.**

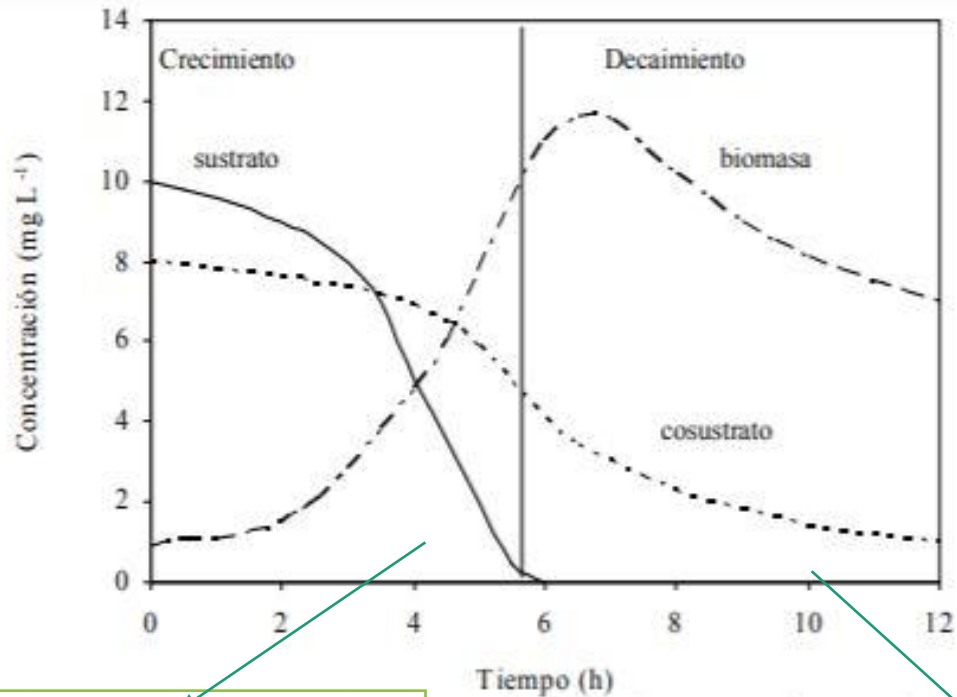
**Questo contrasta con le sostanze chimiche utilizzate come fonti di energia e C perché il tasso di metabolismo di tali substrati aumenta man mano che gli organismi crescono.**

**In secondo luogo, molti prodotti organici si accumulano a causa del cometabolismo, e questi prodotti tendono a persistere.**





# La cinetica del cometabolismo



Se nel sistema il substrato e il cosubstrato coesistono la velocità del consumo di questo dipende dalla velocità del consumo del substrato e alla produzione di prodotti tossici.

In queste condizioni, il tasso di cometabolismo dipende dall'energia generata dal decadimento cellulare prodotto dal metabolismo endogeno, cioè proteolisi che si verifica dopo l'esaurimento dei cofattori.

# La cinetica del cometabolismo

Una prima approssimazione per spiegare il cometabolismo è l'equazione di Monod.

$$\frac{dS}{dt} = \frac{K_{\max} X S}{K_s + S}$$

Nella sua forma tradizionale spiega il consumo di un singolo substrato non tossico utilizzando sistemi di studio indipendenti.

L'equazione di Monod così con spiega gli affetti dovuti:

- i) la perdita di attività microbica dovuta all'esaurimento del substrato utilizzato per la crescita,
- ii) la diminuzione dell'attività microbica per accumulo di prodotti tossici,
- iii) inibizione del consumo del substrato da parte del cosubstrato e viceversa e
- iv) decadimento cellulare in assenza del substrato.

# La cinetica del cometabolismo

## Esempio

Cinetica del cometabolismo del cloroformio di batteri che utilizzano l'acetato come substrato

$$r_c = \frac{KC}{K_{sc} + C + C \left( \frac{C}{K_{ic}} \right)^n} + \frac{K'C}{K_{sc} + C}$$

1                      2

Primo termine: consumo del cosubstrato a spese dell'energia generata dal consumo del substrato.

Secondo termine: consumo del cosubstrato a spese dell'energia generata dal decadimento cellulare.

## Applicazioni della bioremediation in situ: esempi

Kou et al. (2004)

Trattamento aerobico della falda acquifera contaminata da TCE.

Substrato: Toluene iniettato allo stato gassoso (in concentrazioni inferiori a  $10^{-1}$   $\mu\text{L}$ ).

Resa della biodegradazione: 90% del TCE

Mysona e Hughes (2003)

Trattamento del suolo e delle acque sotterranee contaminate con solventi clorurati.

Substrato: Iniezione continua di propano + nebulizzazione di aria

# Argomenti del corso: parte 1

Introduzione alla bioremediation

Il cometabolismo

**Il suolo e batteri**

**Bioremediation in situ**

**Phytoremediation**

**Bioremediation ex situ**

# Riepilogo - Cometabolismo

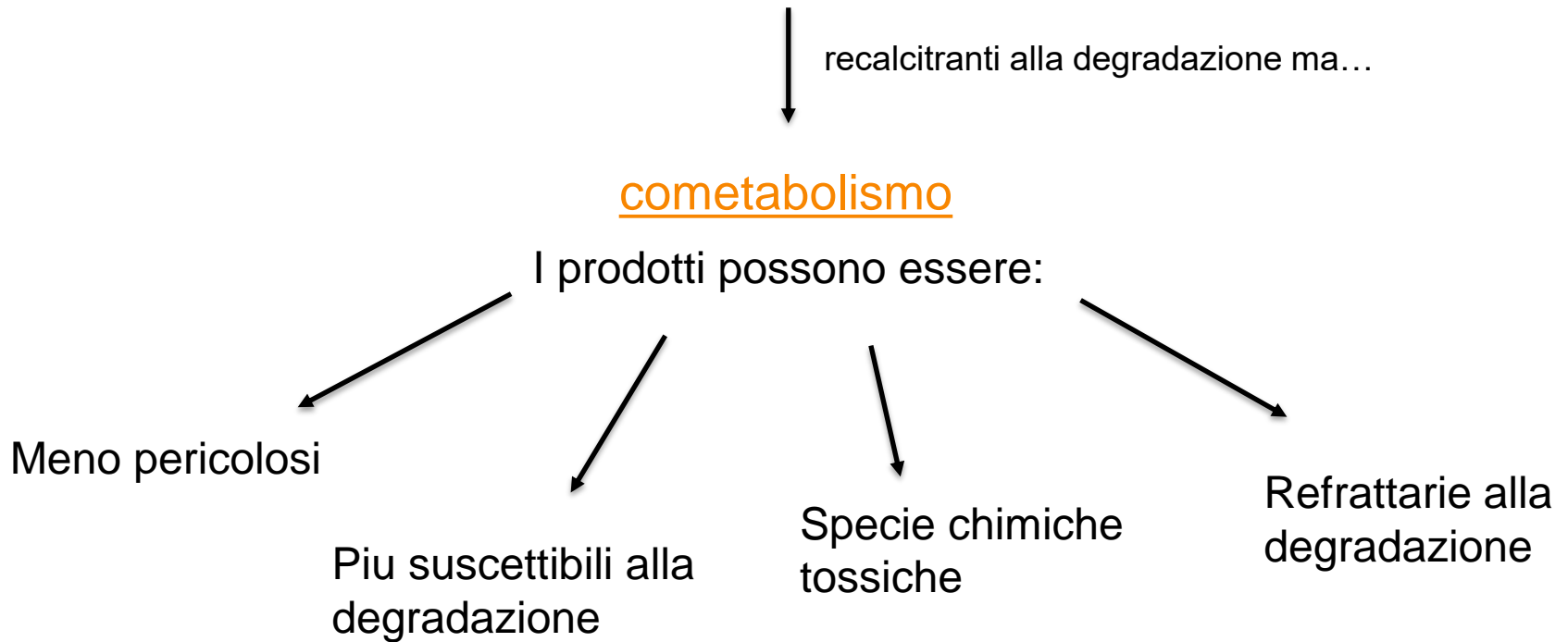
metabolismo di un substrato organico da parte di un microrganismo che non è in grado di usare quel composto come fonte di energia o come elemento nutritivo.

Permette di trasformare una gran varietà di substrati ed è operato da molti microrganismi

Le conseguenze ambientali sono l'incapacità degli organismi di crescere a spese del composto organico e la conversione del substrato in un prodotto organico che spesso si accumula.

# Riassunto: Cometabolismo

**Xenobiotico** = composto chimico con struttura molecolare diversa da quella dei composti naturali



Il cometabolismo xenobiotico negli ambienti naturali si verifica a ritmi lenti