

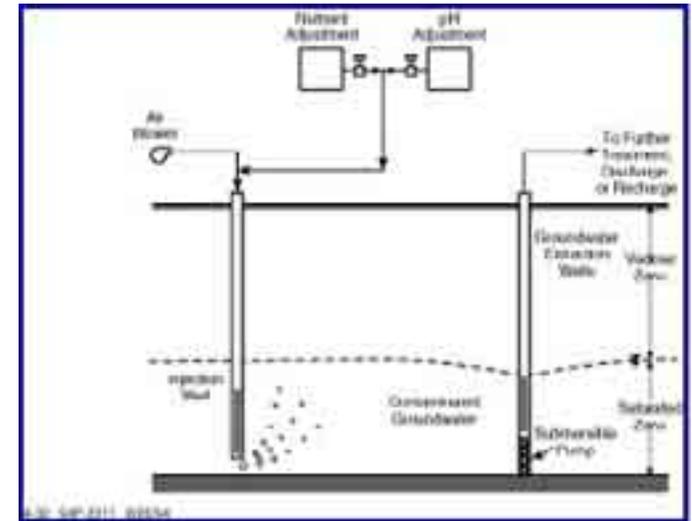
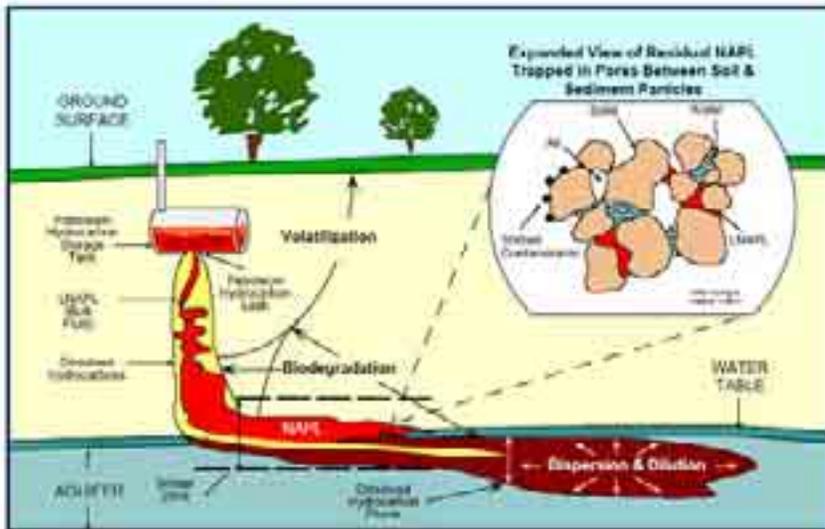
# PROCESSI BIOLOGICI NEL DESTINO DEGLI INQUINANTI NEL SOTTOSUOLO

*Federico Aulenta*

*Dipartimento di Chimica*

*Università degli Studi di Roma “La Sapienza”*

# BIORISANAMENTO IN SITU (ATTENUAZIONE NATURALE E/O BIORISANAMENTO “ASSISTITO”)



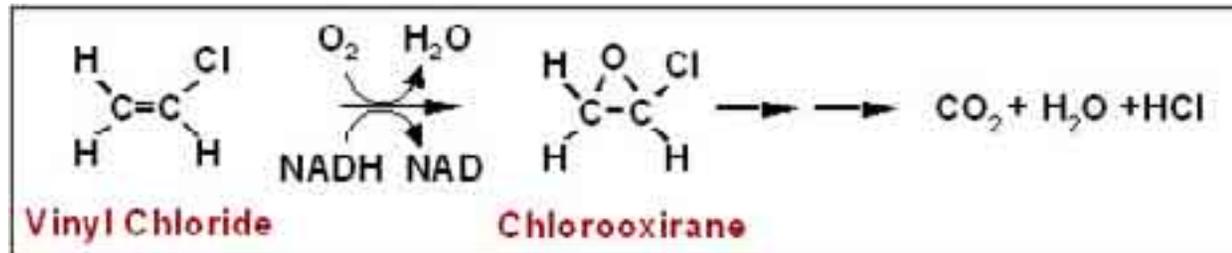
“Utilizzo di microrganismi (batteri) presenti naturalmente nel sottosuolo per trasformare, distruggere o immobilizzare sostanze contaminanti”

Obiettivi: detossificare il composto di partenza e convertirlo in prodotti innocui per l’ambiente e l’uomo

# BIODEGRADAZIONI & BIOTRASFORMAZIONI

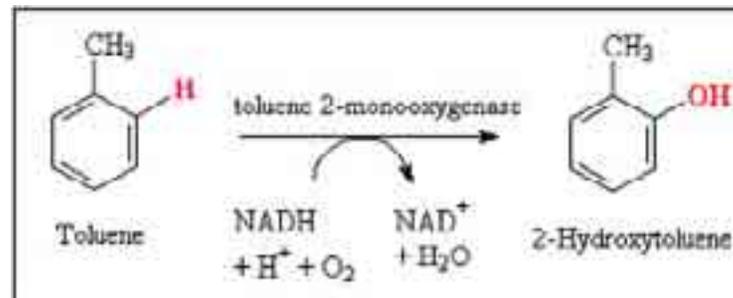
-La “biodegradazione” è il processo attraverso il quale un composto organico (contaminante) viene **demolito** da parte di microrganismi e scomposto in molecole più semplici (ad es.  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_4$ )

Esempio:



-La biotrasformazione è una reazione o insieme di reazioni catalizzate da microrganismi o enzimi che comportano alla **conversione** di un composto chimico in un altro

Esempio:



# BIORISANAMENTO

- Tecnologia** che sfrutta processi di biodegradazione/biotrasformazione per distruggere i contaminanti presenti nell'ambiente o convertirli in prodotti innocui
- Per progettare e ottimizzare sistemi di biorisanamento è necessario conoscere fattori e condizioni che influenzano i processi di biodegradazione/biotrasformazione

# BIODEGRADABILITÀ DI SOSTANZE ORGANICHE

“La biodegradabilità di un composto è una caratteristica potenziale che mette in relazione la struttura chimica della molecola in rapporto alla sua affinità biologica”

“La biodegradazione è invece l’espressione di tale potenzialità”

## Definizione:

**Tempo di dimezzamento o tempo di emivita ( $t_{50}$ ,  $t_{1/2}$ ):** “Tempo (in giorni) necessario per la scomparsa del 50% in peso del composto originario”

Fornisce una indicazione QUALITATIVA sulla persistenza di una sostanza nell’ambiente

**$t_{50}$  ~ qualche giorno » rapidamente biodegradabile**

(in genere sono molecole di struttura semplice contenenti Carbonio, Idrogeno ed Ossigeno largamente presenti in natura e facilmente utilizzate dai microrganismi come fonte di carbonio ed energia)

**$t_{50}$  > qualche anno » persistenti o recalcitranti**

(in genere molecole con strutture complesse [ad es. Lignina] o sostanze di origine antropica [ad es. Organoclorurati])

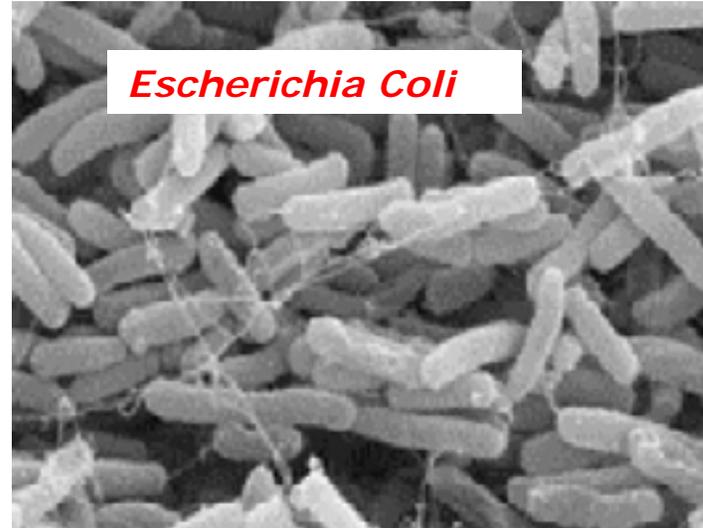
# MICROORGANISMI IMPLICATI NEI PROCESSI DI BIODEGRADAZIONE

- I **BATTERI** sono i principali microrganismi responsabili dei processi di biodegradazione e biotrasformazione delle sostanze nell'ambiente (acqua, suolo, sottosuolo, acquiferi)
- Procarioti (unicellulari) con dimensioni comprese tra 0.5-3  $\mu\text{M}$
- Specie differenti hanno forme differenti: sferiche o coccoideali (ad es. *Stafilococco*), cilindriche o a bastoncino (*E. Coli*), a spirale o a spirillo (*Rhodospirillum*)
- Batteri crescono rapidamente (tempi di duplicazione 0.5-10 h)
- Capacità di trasformare una grande varietà di sostanze organiche ed inorganiche: ad es. capacità di ossidare in presenza di ossigeno sostanze chimiche inquinanti convertendole in  $\text{CO}_2$  ed acqua; in assenza di ossigeno di trasformare rifiuti organici in metano (fonte di energia); trasformare sostanze inorganiche (in alcuni casi pericolose) come l'ammoniaca ed i nitrati in azoto molecolare (sostanza innocua, costituente dell'aria)

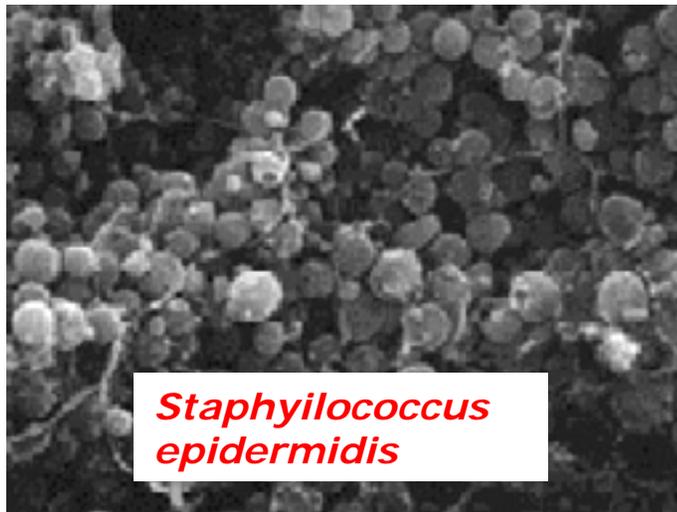
# MORFOLOGIE BATTERICHE



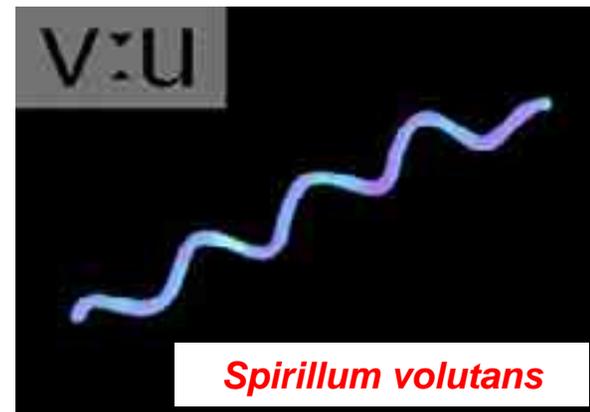
*Bacilli in catena*



*Escherichia Coli*



*Staphylococcus  
epidermidis*



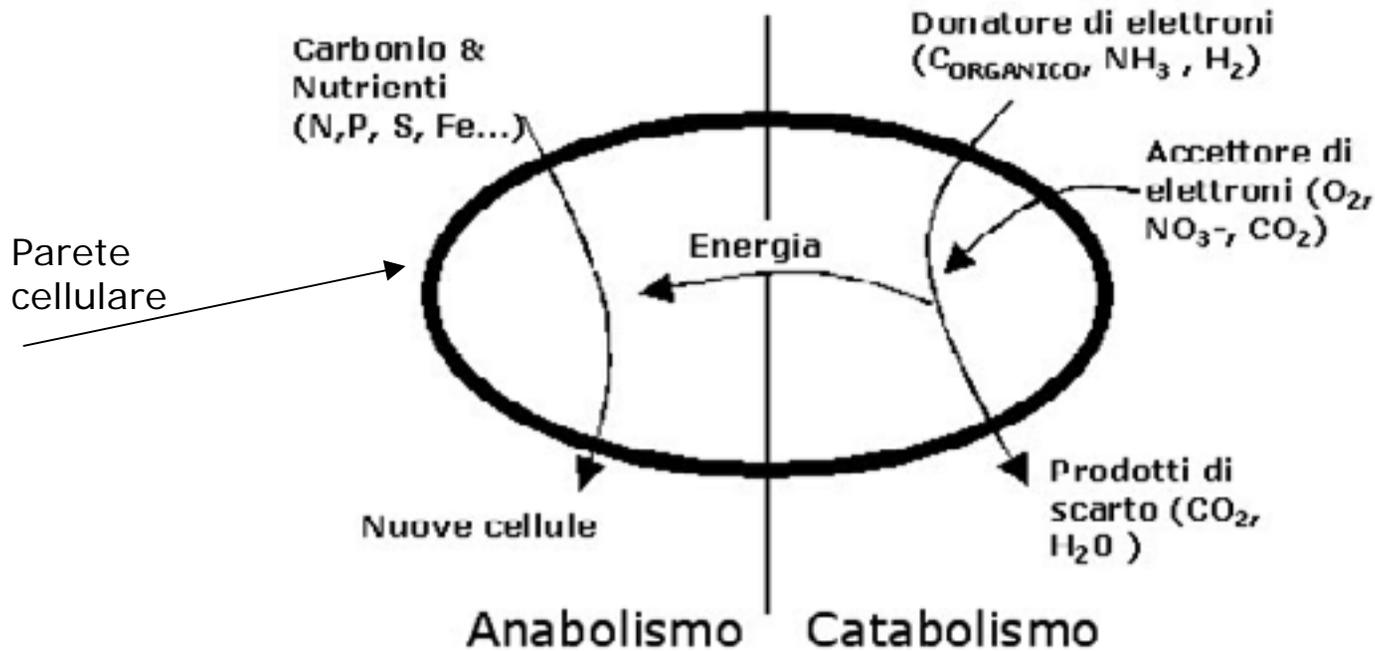
*Spirillum volutans*

# COMPOSIZIONE CHIMICA DELLA CELLULA BATTERICA

Costituente		Percentuale
Acqua		75
Sostanza secca		25
	Organica	90
	-C	- 45-55
	-O	- 22-28
	-H	- 5-7
	-N	- 8-13
	Inorganica	10
	-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	- 50
	-K <sub>2</sub> O	- 6.5
	-Na <sub>2</sub> O	- 10
	-MgO	- 8.5
	-CaO	- 10
	-SO <sub>3</sub>	- 15

Fonte: BE Rittmann & PL McCarty (2001) "Environmental Biotechnology, Principles and Applications" McGraw-Hill, New York

# SCHEMA CONCETTUALE DEL METABOLISMO CELLULARE



Le cellule necessitano una fonte di carbonio (+ macro/micro nutrienti) ed una fonte di elettroni per sostenere il loro metabolismo

Carbonio/energia possono derivare dalla stessa fonte (i.e. unico substrato: glucosio, benzene) o da fonti separate (i.e.  $CO_2$  per il carbonio e  $H_2$  per l'energia)

# CLASSIFICAZIONE DEI (MICRO)ORGANISMI SULLA BASE DELLE FONTI DI CARBONIO ED ENERGIA UTILIZZATI

	<i>Fonte di carbonio</i>	<i>Fonte di energia</i>	
		<i>Chimica</i>	<i>Luce</i>
Eterotrofi	Sostanza organica	Chemo-eterotrofi	Fotoeterotrofi
Autotrofi	CO <sub>2</sub>	Chemoautotrofi	Fotoautotrofi

# CATABOLISMO NEI MICRORGANISMI CHEMO-ETEROTROFI

-Per produrre energia i microrganismi chemo-eterotrofi ossidano sostanze chimiche (donatore di elettroni) presenti nell'ambiente con accettori esterni di elettroni

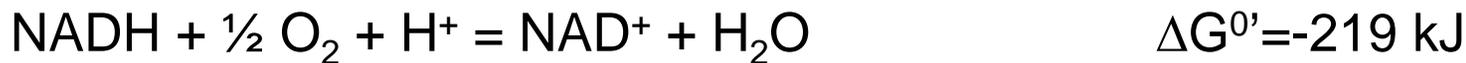
Donatori di elettroni	Accettori di elettroni	
Sostanza organica	$O_2$ , $(NO_3^-)$	Respirazione aerobica (denitrificazione)
$NH_3$ e $NO_2^-$	$O_2$	Respirazione aerobica
Sostanza organica, $H_2$	$SO_4^{--}$	Respirazione anaerobica
$H_2$	$CO_2$	Respirazione anaerobica
Sostanza organica	Sostanza organica	Fermentazione

# MECCANISMI DI CONSERVAZIONE DELL'ENERGIA

Tutti gli organismi viventi (inclusi i microrganismi) *catturano* l'energia rilasciata da reazioni di ossidoriduzione

-Gli elettroni sono rimossi dal *donatore di elettroni* (e.g. sostanza organica) e trasferiti a trasportatori (*carriers*) di elettroni intracellulari ( $2e^- + 2H^+ + NAD^+ = NADH + H^+$ )

-I *carriers* trasportano gli elettroni ad un accettore di elettroni (e.g.  $O_2$ ) che si riduce rigenerando il carrier stesso



-L'energia rilasciata durante gli stadi di trasferimento degli elettroni viene catturata dagli organismi sotto forma di ATP



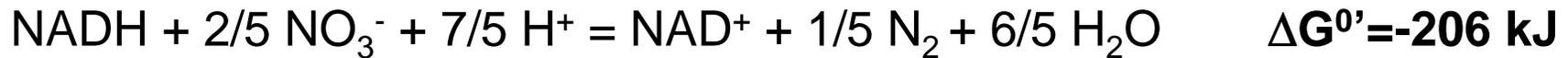
(In condizioni aerobiche per ogni mole di NADH si possono potenzialmente produrre 6 moli di ATP, di fatto se ne producono meno)

## RIOSSIDAZIONE DEL NADH

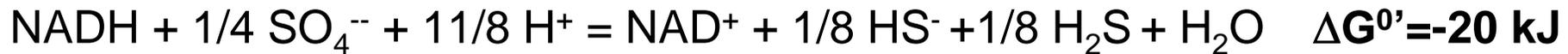
### Accettore di esterno di elettroni O<sub>2</sub> [Respirazione aerobica]



### Accettore di esterno di elettroni NO<sub>3</sub><sup>-</sup> [Respirazione anaerobica]



### Accettore di esterno di elettroni SO<sub>4</sub><sup>-</sup> [Respirazione anaerobica]



### Accettore di esterno di elettroni CO<sub>2</sub> [Respirazione anaerobica]



### In assenza di accettori esterni di elettroni?

La sostanza organica svolge la funzione di donatore di elettroni e accettore di elettroni. Tali reazioni prendono il nome di fermentazioni

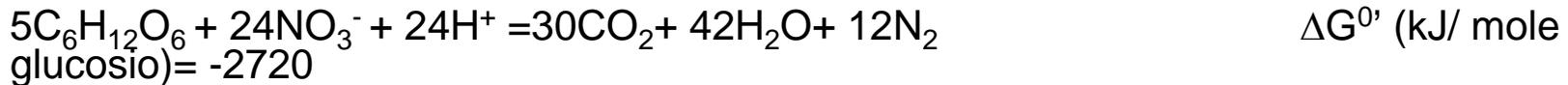
## ALCUNI ESEMPI

Alcune reazioni cataboliche in cui il glucosio ( $C_6H_{12}O_6$ ) è utilizzato come donatore di elettroni

### Ossidazione aerobica:



### Denitrificazione:



### Solfato riduzione:



### Metanogenesi:

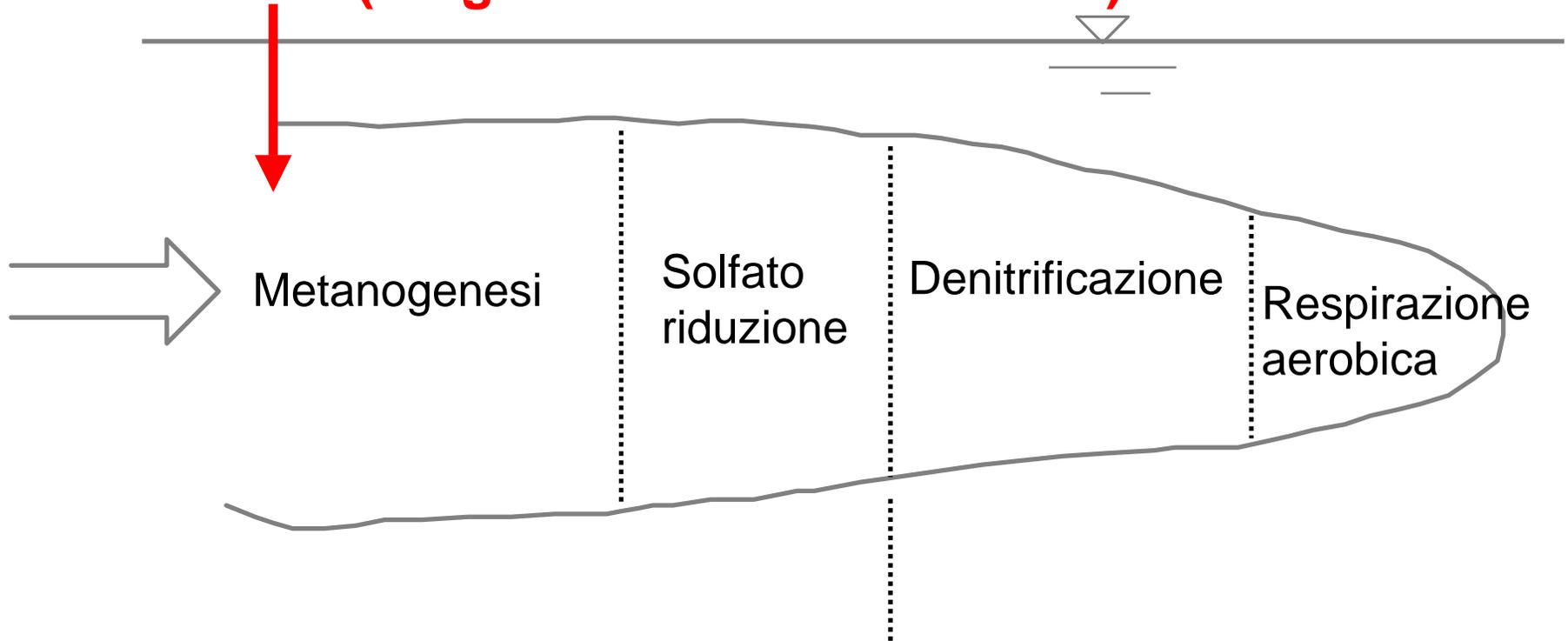


### Fermentazione:

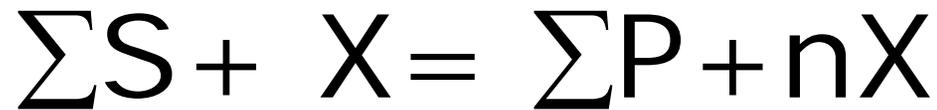
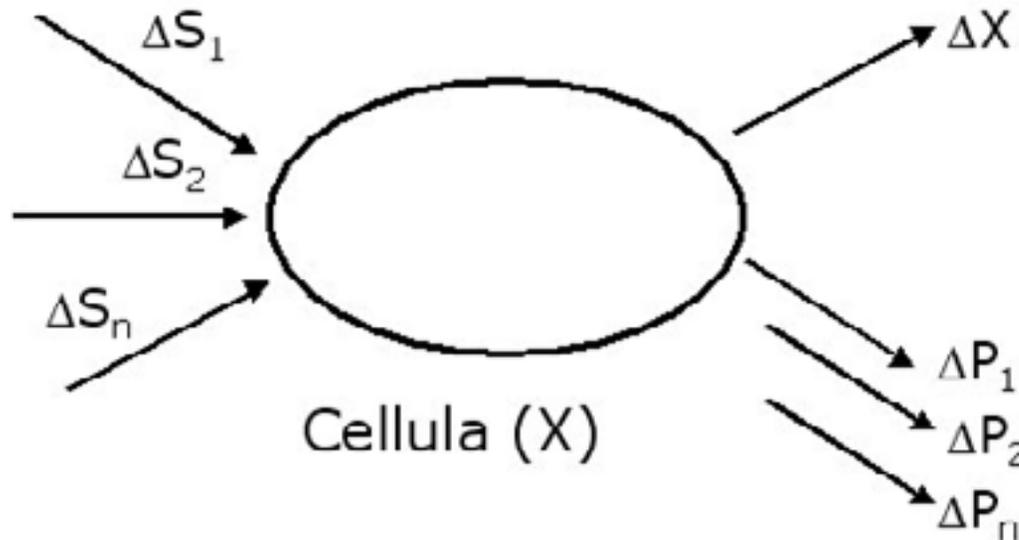


# ZONE BIOGEOCHIMICHE IN UN ACQUIFERO CONTAMINATO DA BTEX

**BTEX (sorgente di contaminazione)**



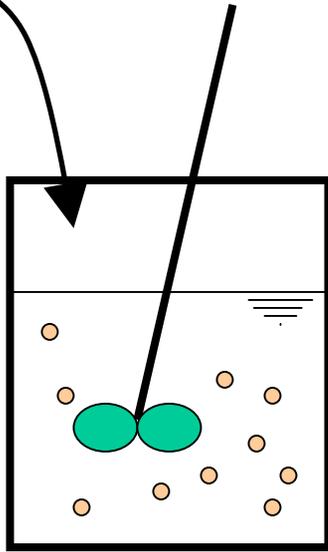
# MODELLI DI CRESCITA CELLULARE



La crescita cellulare è una reazione autocatalitica, in cui la concentrazione di biomassa (X) è sia un reagente che un prodotto di reazione

# MODELLI DI CRESCITA CELLULARE

$S_1, S_2, S_3, \text{ etc...}$

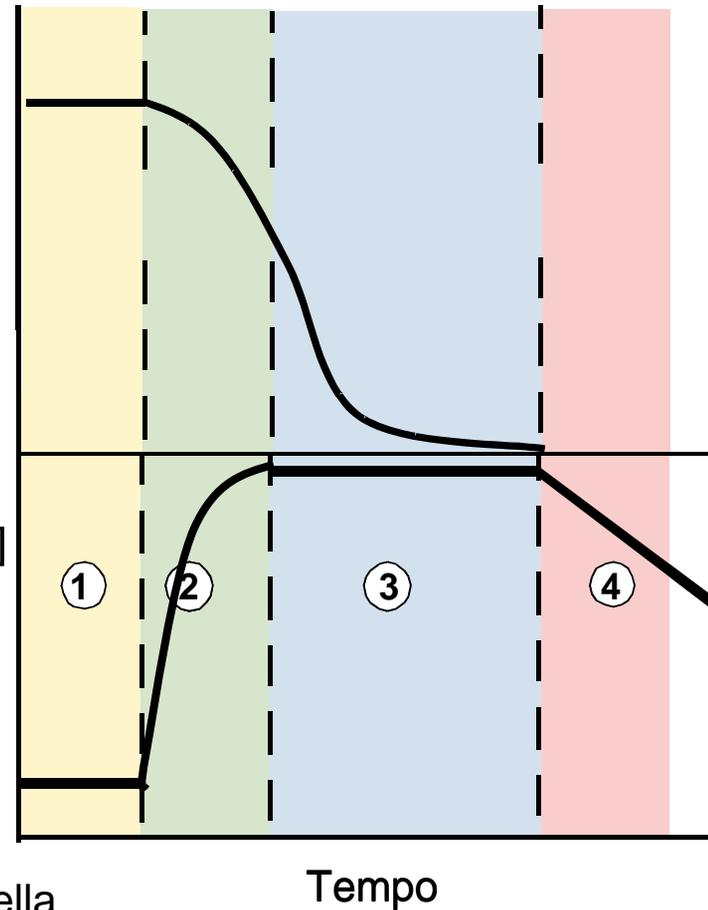


Andamento nel tempo della  
concentrazione del substrato  
limitante

$[S]$

$\log [X]$

Andamento nel tempo della  
concentrazione della  
biomassa

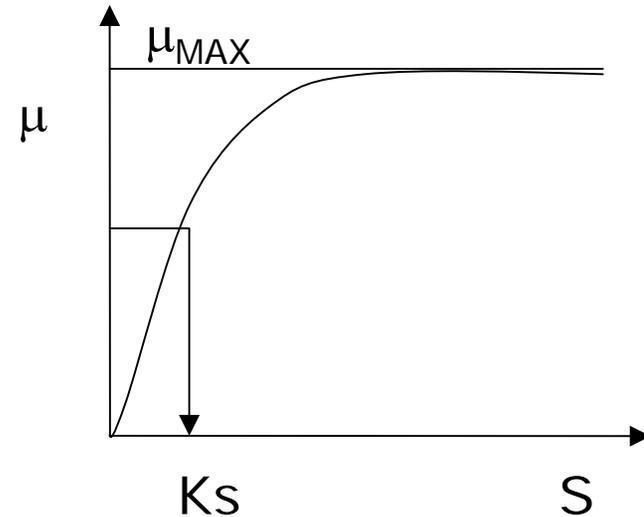


# MODELLO DI MONOD: ESPRESSIONI CINETICHE

$$(r_x) = \mu \cdot X$$

$$\mu = \frac{(r_x)}{X} = \mu_{MAX} \cdot \frac{S}{K_S + S}$$

**Crescita della  
biomassa**



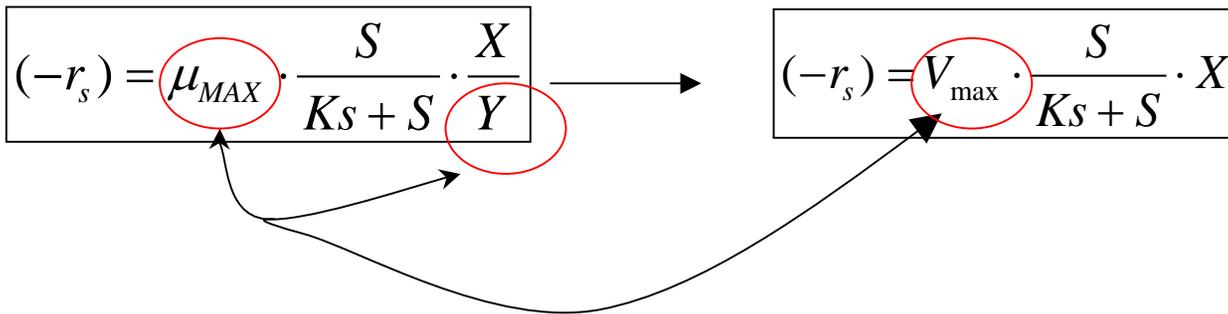
$$(-r_s) = \mu_{MAX} \cdot \frac{S}{K_S + S} \cdot \frac{X}{Y}$$

**Consumo  
(biodegradazione) del  
substrato**

$$\frac{(r_x)}{(-r_s)} = Y = \text{rendimento (termodinamico) di crescita}$$

# ...UN ALTRO MODO DI SCRIVERE IL MODELLO DI MONOD

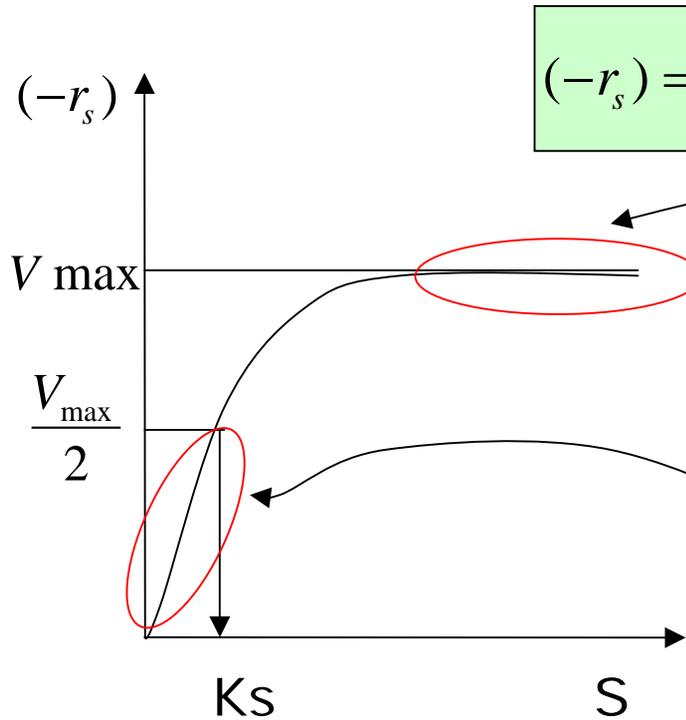
In alcuni casi l'interesse è rivolto al consumo del substrato (biodegradazione del contaminante) piuttosto che alla crescita cellulare

$$(-r_s) = \mu_{MAX} \cdot \frac{S}{K_S + S} \cdot \frac{X}{Y} \longrightarrow (-r_s) = V_{max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \cdot X$$


Tipicamente  $\mu_{MAX}$  e  $Y$  sono “costanti” caratteristiche del microrganismo (non dipendono dalla concentrazione del substrato)

# CARATTERISTICHE DELL'EQUAZIONE CINETICA DI MONOD

$$(-r_s) = V_{\max} \cdot \frac{S}{K_s + S} \cdot X$$



### Quando $S \gg K_s$ :

$$(-r_s) = V_{\max}$$

Ovvero la velocità di scomparsa del substrato non dipende dalla concentrazione del substrato stesso (cinetica di ordine zero)

### Quando $S \ll K_s$ :

$$(-r_s) = \frac{V_{\max} \cdot X}{K_s} \cdot S$$

Ovvero la velocità di scomparsa del substrato non dipende dalla concentrazione del substrato stesso (cinetica di ordine zero)

$(-r_s)$  = velocità di scomparsa del substrato ( $M/L^3T$ )

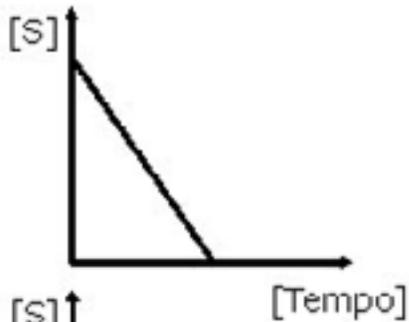
$V_{\max}$  = massima velocità di consumo del substrato ( $M/L^3T$ )

$S$  = concentrazione del substrato ( $M/L^3$ )

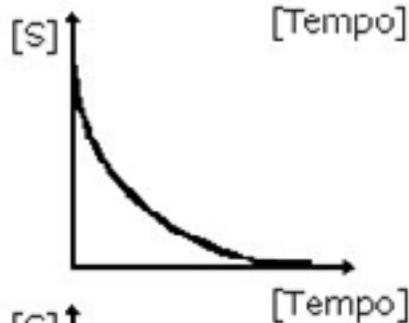
$K_s$  = costante di semi-saturazione ( $M/L^3$ )

# BIODEGRADAZIONE DEL SUBSTRATO

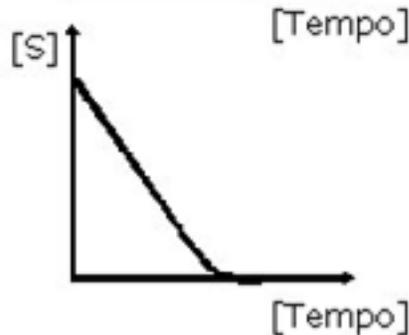
## CONFRONTO TRA ESPRESSIONI CINETICHE DI ORDINE ZERO, 1° ORDINE E ORDINE VARIABILE (TIPO-MONOD)



$$(-r_s) = -\frac{dS}{dt} = k \quad (\text{ordine zero})$$



$$(-r_s) = -\frac{dS}{dt} = k \cdot S \quad (1^\circ \text{ ordine})$$



$$(-r_s) = -\frac{dS}{dt} = k \frac{S}{K_s + S} \quad (\text{ordine variabile})$$

# MODELLI DI MONOD CORRETTO PER IL DECADIMENTO CELLULARE

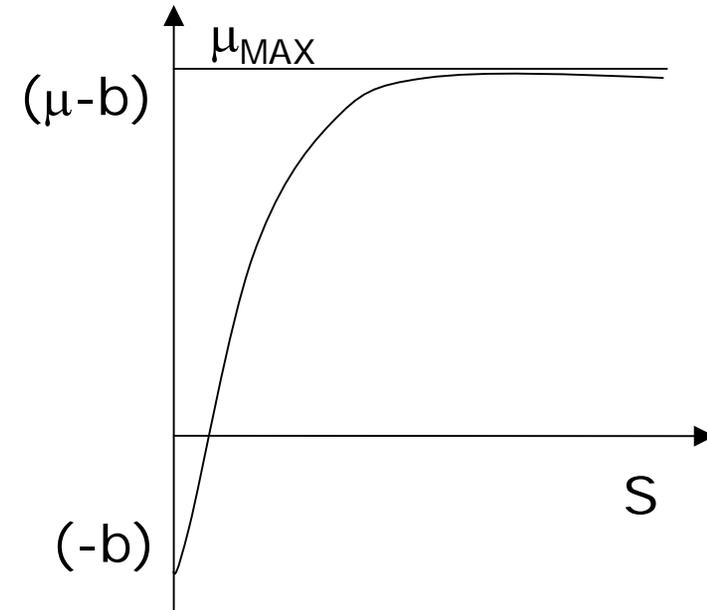
$$(r_x) = (\mu - b) \cdot X$$

$$\mu = \frac{(r_x)}{X} = \mu_{MAX} \cdot \frac{S}{K_S + S}$$

**Crescita della  
biomassa**

$$(-r_s) = \mu_{MAX} \cdot \frac{S}{K_S + S} \cdot \frac{X}{Y}$$

**Consumo  
(biodegradazione) del  
substrato**



$$\frac{(r_x)}{(-r_s)} = Y_{obs} = Y \cdot \frac{(\mu - b)}{\mu} = \text{rendimento (osservato) di crescita}$$

Quando  $\mu \rightarrow \mu_{max}$   $Y_{obs} \rightarrow Y$

# FATTORI AMBIENTALI CHE INFLUENZANO LA CRESCITA CELLULARE ED IL CONSUMO (BIODEGRADAZIONE) DEL SUBSTRATO

**-Concentrazione e (bio)disponibilità del substrato (e di tutti gli elementi necessari alla crescita cellulare)**

(Tipicamente le sostanze (substrati) sono accessibili ai microrganismi quando sono disciolti in acqua mentre non sono biodisponibili quando sono adsorbite su solidi, insolubili in acqua, o quando si trovano in fase gas)

**-pH, Temperatura**

(Tipicamente la  $\mu_{MAX}$  presenta un massimo per determinati valori di pH e temperatura)

**-Presenza di sostanze inibenti**

(Esistono molti differenti tipi di inibizione, ad es: inibizione da substrato, inibizione competitiva, inibizione non-competitiva etc...)

**-Presenza di resistenze controllanti al trasporto dei substrati**

(Si osservano ad esempio nel caso di Biofilm microbici)

# INIBIZIONE

**-Le velocità di consumo del substrato e di crescita cellulare possono essere rallentate dalla presenza nell'ambiente di sostanze inibenti**

Alcune sostanze inibenti sono:

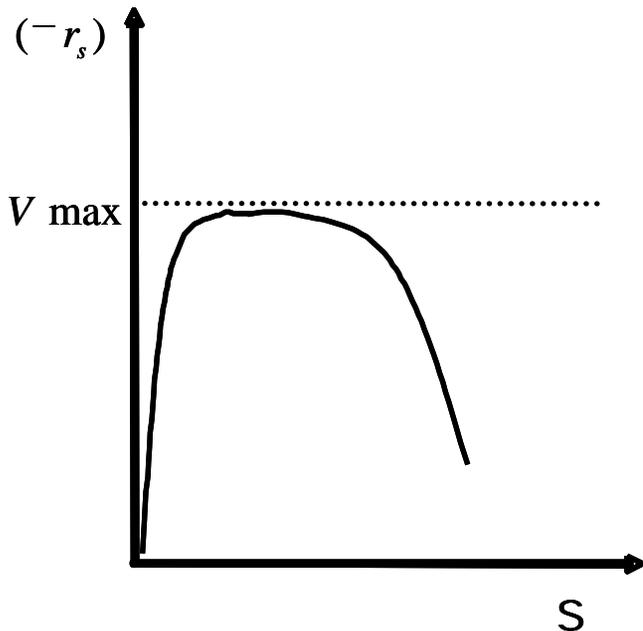
-metalli pesanti, pesticidi, antibiotici, idrocarburi aromatici, solventi clorurati etc...

-I meccanismi biochimici con cui le sostanze inibenti agiscono sul metabolismo e gli effetti di tali sostanze possono essere molto vari

(ad es. danneggiamento di enzimi e/o altre macromolecole, riduzione dell'affinità dell'enzima per il substrato...)

# INIBIZIONE DA SUBSTRATO

Quando presenti ad alte concentrazioni alcuni substrati risultano essere tossici (ad es. idrocarburi aromatici)



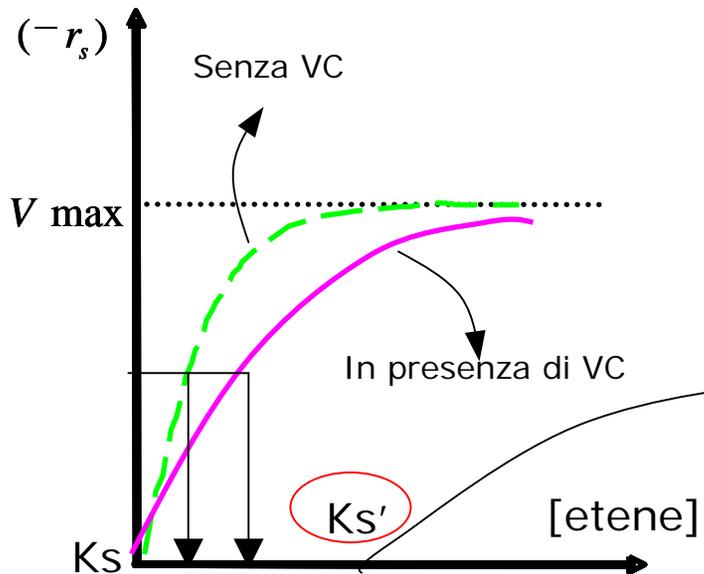
## Modello cinetico di Haldane

$$(-r_s) = V_{max} \cdot \frac{S}{\left(K_s + S + \frac{S^2}{K_i}\right)} \cdot X$$

# INIBIZIONE COMPETITIVA

**Inibizione competitiva:** dovuta a sostanze strutturalmente simili al substrato che competono con lo stesso per reagire con l'enzima responsabile della degradazione del substrato

Velocità di degradazione di etilene da parte di *Mycobacterium aerum* in presenza ed in assenza di cloruro di vinile (VC)



**Modello di inibizione competitiva**

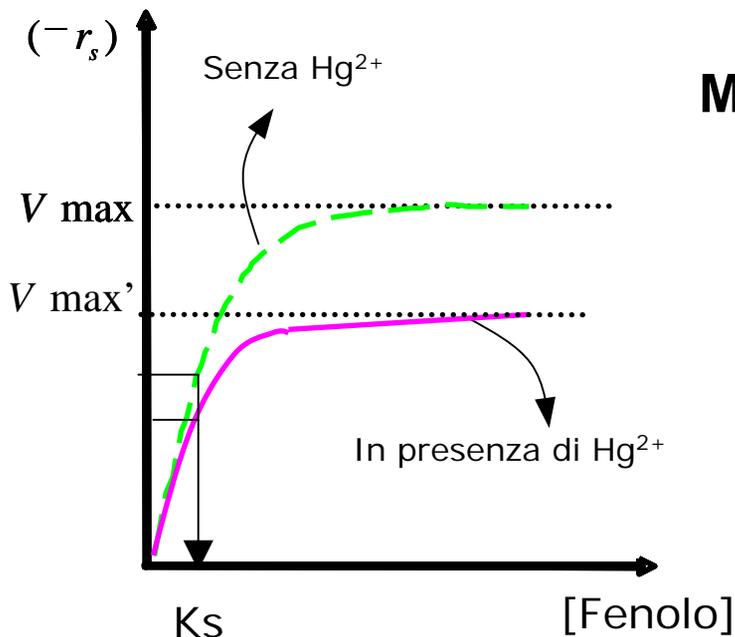
$$(-r_s) = V_{max} \cdot \frac{S}{\left( K_s \cdot \left[ 1 + \frac{I}{K_i} \right] + S \right)} \cdot X$$

$$Ks' = Ks \cdot (1 + I/K_i)$$

# INIBIZIONE NON-COMPETITIVA

**Inibizione noncompetitiva:** dovuta a sostanze che alterano la conformazione dell'enzima riducendone l'attività nei confronti del substrato

Velocità di degradazione del fenolo da parte di *Pseudomonas putida* in presenza ed in assenza di  $Hg^{2+}$



**Modello di inibizione non-competitiva**

$$(-r_s) = V_{\max} \cdot \frac{S}{(K_s + S) \cdot (1 + K_i)} \cdot X$$

$$V_{\max}' = V_{\max} / (1 + I/K_i)$$

## MODELLO DI MONOD CASO DI PIÙ SUBSTRATI LIMITANTI

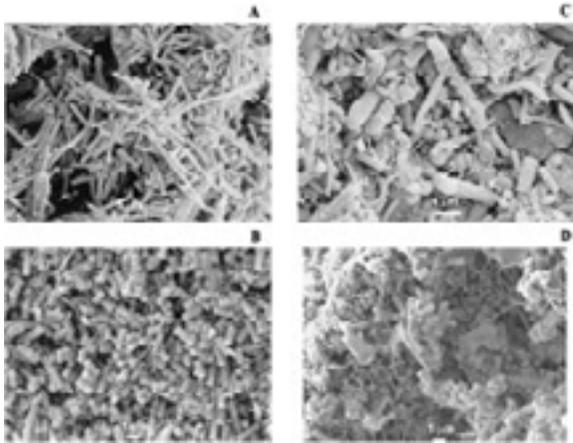
...nel caso in cui la velocità di crescita cellulare (e quindi la biodegradazione del substrato) è influenzata dalla concentrazione di più di un substrato...

$$(-r_s) = V_{\max} \cdot \sum_{i=1}^n \frac{S_i}{K_{S_i} + S_i} \cdot X$$

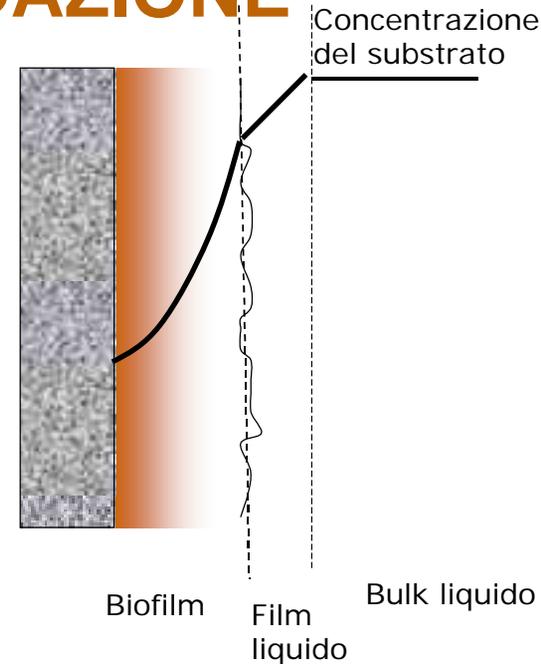
Un caso tipico è quando sia il donatore di elettroni (ad es, sostanza organica, S) che l'accettore di elettroni (ad es, ossigeno) sono presenti a concentrazioni limitanti

$$(-r_s) = V_{\max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \cdot \frac{O_2}{K_{O_2} + O_2} \cdot X$$

# INFLUENZA DEI FENOMENI DI TRASPORTO DI MATERIA SULLA VELOCITÀ DI BIODEGADAZIONE



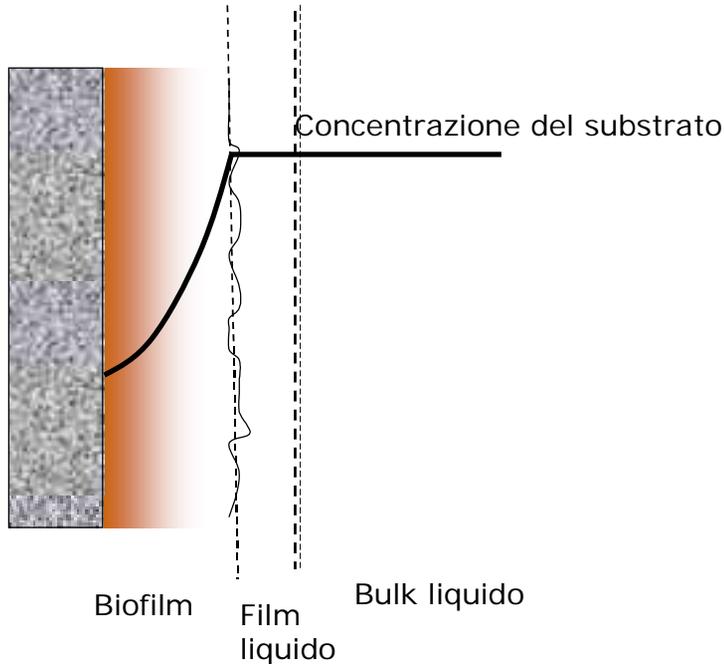
**Esempi di biofilm microbici**



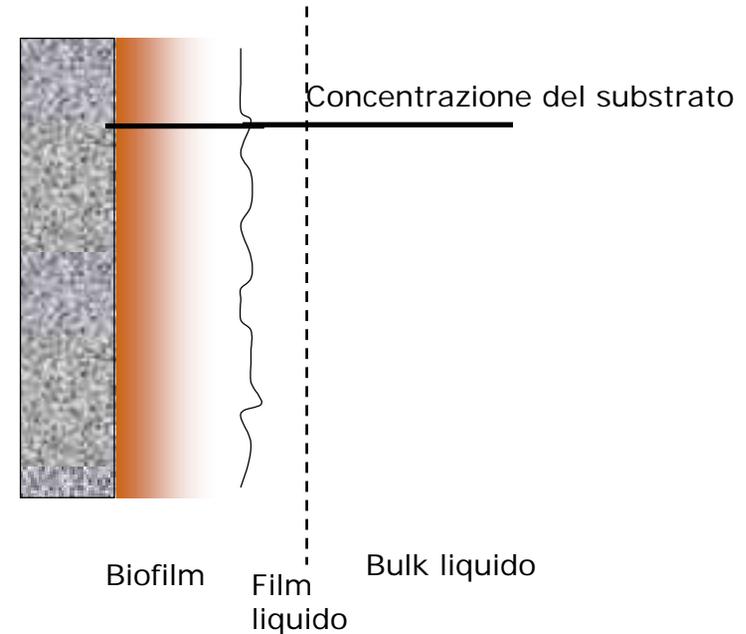
-Per poter essere biodegradato il substrato (contaminante) deve essere prima **trasportato** dalla fase liquida al biofilm, laddove avviene la biodegradazione

-Quando la velocità con cui il contaminante viene trasportato è bassa rispetto alla velocità di biodegradazione il processo si dice sotto controllo dinamico (cineticamente limitato dalla velocità di trasporto di materia)

# INFLUENZA DEI FENOMENI DI TRASPORTO DI MATERIA SULLA VELOCITÀ DI BIODEGRADAZIONE (DUE CONDIZIONI LIMITANTI)



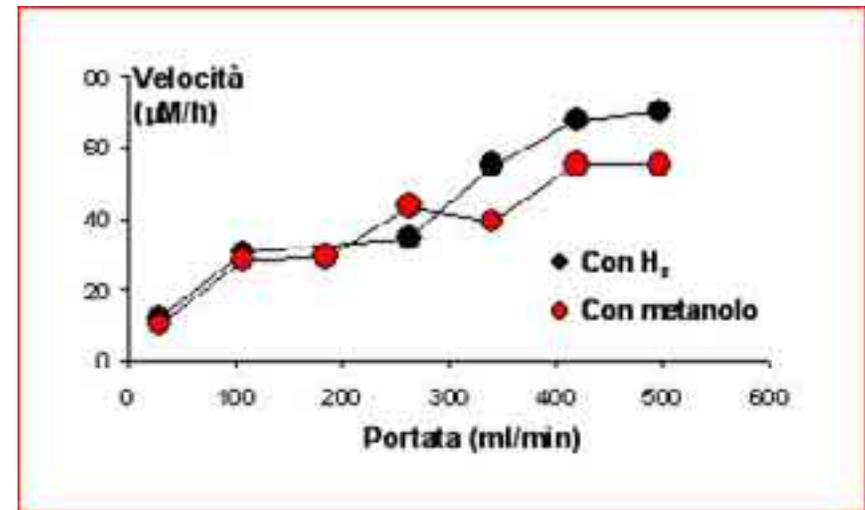
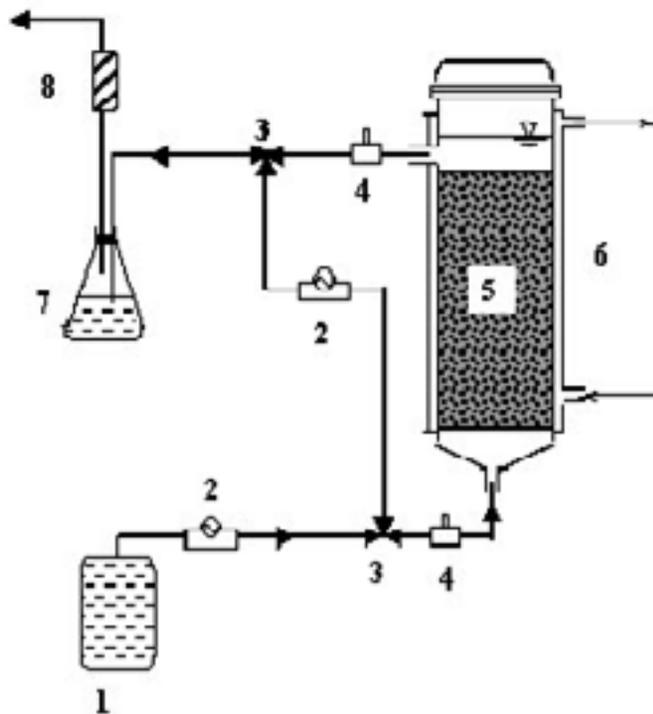
Trasporto esterno **non** è limitante  
(un aumento della turbolenza non  
comporta un aumento della velocità di  
biodegradazione)



Né trasporto esterno né trasporto  
interno sono limitanti

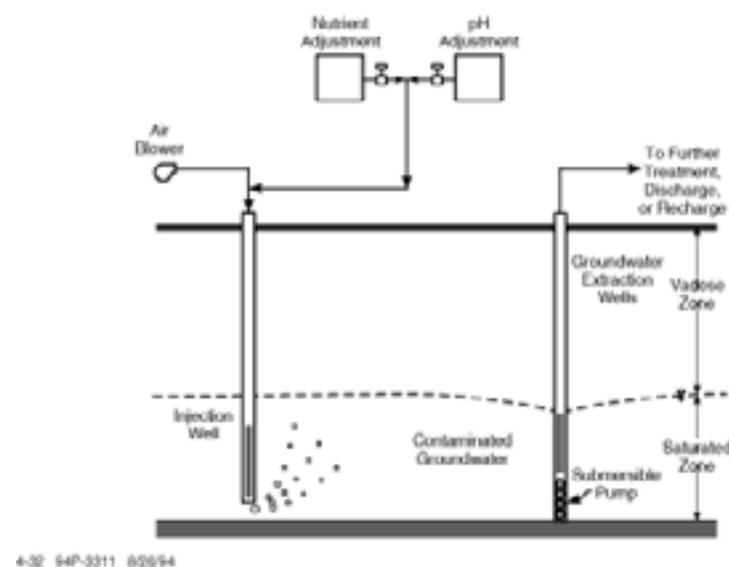
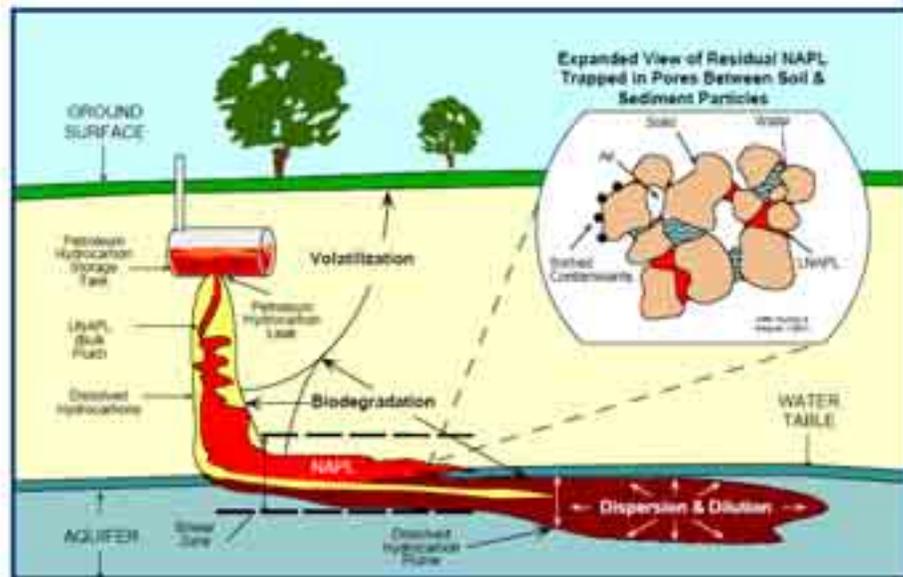
La velocità di biodegradazione è solo  
funzione dell'attività del biofilm

# INFLUENZA DEL TRASPORTO ESTERNO SULLA VELOCITÀ DI DEGRADAZIONE DEL PCE IN UN REATTORE ANAEROBICO A BIOFILM



# BIORISANAMENTO IN SITU

## (ATTENUAZIONE NATURALE E/O BIORISANAMENTO "ASSISTITO")



“Utilizzo di microrganismi (batteri) presenti naturalmente nel sottosuolo per trasformare, distruggere o immobilizzare sostanze contaminanti”

Obiettivi: detossificare il composto di partenza e convertirlo in prodotti innocui per l'ambiente e l'uomo

# PRINCIPALI CLASSI DI CONTAMINANTI DI SUOLO E SOTTOSUOLO DI RILEVANZA AMBIENTALE

<b>Classe chimica</b>	<b>Esempio di composto</b>	<b>Caratteristiche</b>
Idrocarburi (derivati del petrolio, carbone etc..)	Benzene, xilene, toluene, (BTEX); alcani, MTBE, PAH	Da molto solubili a praticamente insolubili; generalmente biodegradabili
Idrocarburi clorurati alifatici	PCE, trielina (TCE), 1,1,2-TCA, cloroformio, 1,2-dicloroetano	Biodegradabili solo in condizioni opportune
Idrocarburi clorurati aromatici	Clorobenzeni, clorofenoli, PCB, diossine	Poco solubili, difficilmente biodegradabili
Metalli	Cd, Zn, Hg, Cr, Ni	Possono essere immobilizzati sotto forma di solfuri insolubili in presenza di solfato riduzione
Pesticidi	DDT, atrazina, Lindane	Il loro utilizzo è stato ampiamente ristretto rispetto al passato, sono tossici e biorecalcitranti

# UTILIZZO DEI CONTAMINANTI ORGANICI DA PARTE DI MICRORGANISMI

## **Donatori di elettroni:**

Il contaminante organico (ad es, benzene) viene ossidato da un accettore di elettroni esterno (ad es, ossigeno) ed eventualmente mineralizzato fino a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$

## **Accettori di elettroni:**

In presenza di un opportuno donatore di elettroni (ad es, idrogeno) il contaminante organico viene ridotto essendo utilizzato dai batteri come accettore esterno di elettroni (respirazione anaerobica). Questo è il caso dei solventi clorurati (ad es, percloroetilene, cloroformio). Le riduzioni (addizioni di idrogeno) comportano la sostituzione degli atomi di cloro sulla molecola con idrogeni

## **Fermentazioni:**

Il contaminante organico è utilizzato simultaneamente come donatore ed accettore di elettroni allo stesso tempo

# METABOLISMO VS. 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.

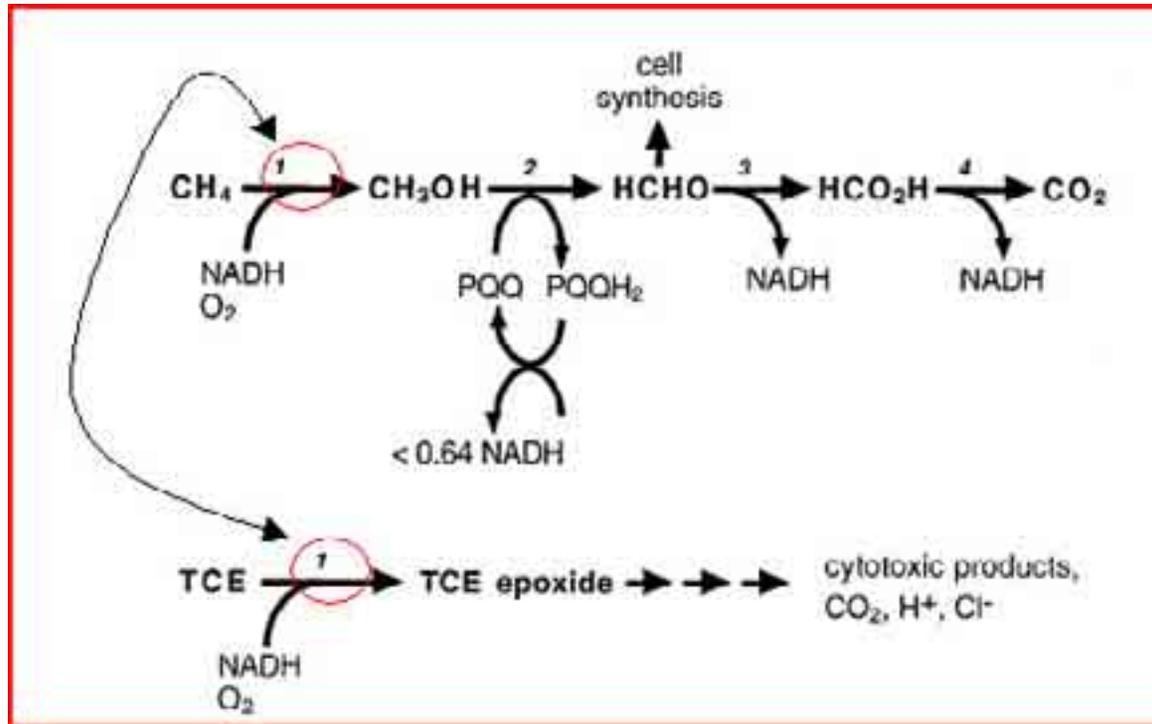
## Degradazioni co-metaboliche

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

Tipicamente le biodegradazioni Cometaboliche avvengono con velocità e rese ordini di grandezza inferiori rispetto alle reazioni metaboliche

## ESEMPI DI COMETABOLISMO (1)

Biodegradazione aerobica cometabolica del TCE da parte di batteri metanotrofi (*Methylosinus trichosporium* OB3b)

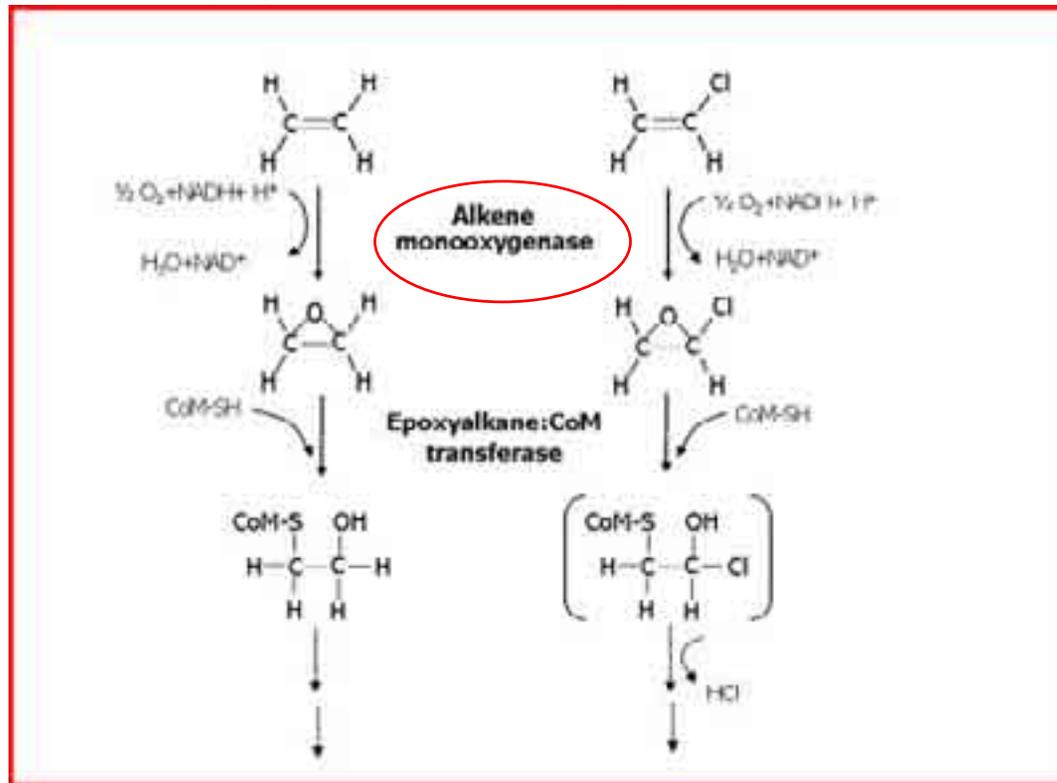


-Il 1° stadio nella ossidazione del metano è catalizzato da una monossigenasi (NADH- e O<sub>2</sub>- dipendente) che catalizza anche l'iniziale degradazione del TCE

-La degradazione del TCE richiede energia e produce prodotti citotossici che danneggiano le cellule

## ESEMPI DI COMETABOLISMO (2)

Biodegradazione aerobica cometabolica del cloruro di vinile (VC) da parte di batteri etilene- utilizzatori (*Mycobacterium sp.*)

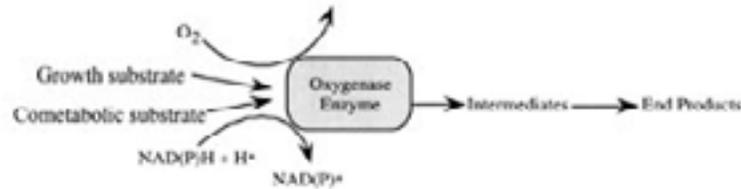


-Il 1° stadio nella ossidazione dell'etilene è catalizzato da una monossigenasi (NADH- e O<sub>2</sub>- dipendente) che catalizza anche l'iniziale degradazione del TCE

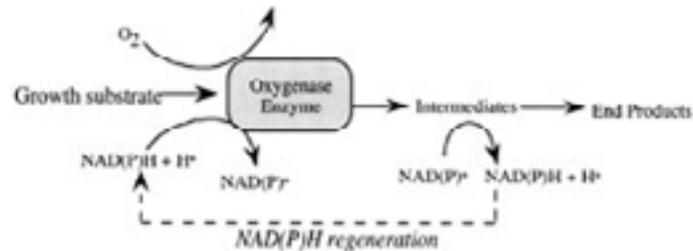
-Anche in questo caso la degradazione del VC richiede energia e produce prodotti tossici per il microrganismo

# MODELLI CINETICI PER IL COMETABOLISMO DI CONTAMINANTI ORGANICI

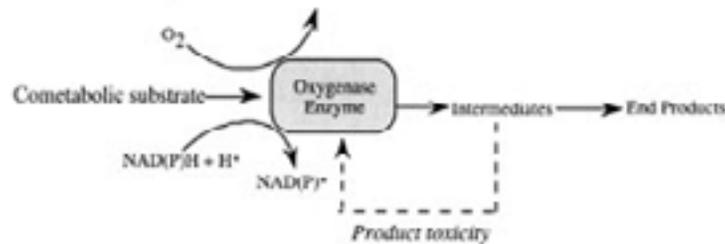
a) Competitive inhibition:



b) Reductant consumption and regeneration:



c) Product toxicity:



# MODELLI CINETICI PER IL COMETABOLISMO DI CONTAMINANTI ORGANICI

$$r_g = -\frac{Xk_g S_g}{K_{sg}(1 + S_c/K_{isc}) + S_g}$$

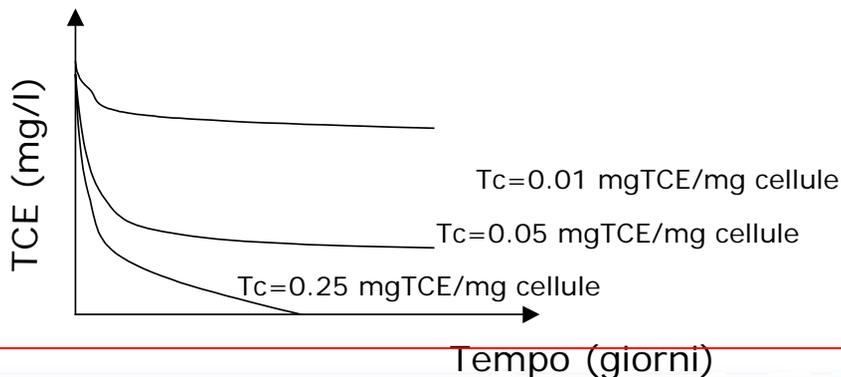
$$r_c = -\frac{Xk_c S_c}{K_{sc}(1 + S_g/K_{isg}) + S_c}$$

*La biodegradazione simultanea del substrato di crescita e del cosubstrato possono essere descritti utilizzando il modello dell'inibizione competitiva*

$$\frac{dS_c}{dX} = T_c,$$

$$\mu = \frac{r_x}{X} = Y \frac{r_g}{X} - \frac{1}{T_c} \frac{r_c}{X} - b.$$

*Per modellizzare la tossicità da prodotto è possibile definire la quantità  $T_c$  che rappresenta il rapporto tra cosubstrato degradato e cellule inattivate*



Effetto della capacità di trasformazione sulla trasformazione cometabolica del TCE

# ALCUNI ESEMPI DI METABOLISMO DI CONTAMINANTI ORGANICI

***-IDROCARBURI (BTEX, MTBE, PAH)***

***-IDROCARBURI CLORURATI ALIFATICI***