

Spazzini biotech

I batteri "mangia petrolio"

Nella società moderna, più dell'80% delle attività dell'uomo sono strettamente legate alla produzione di energia generata dalla combustione del petrolio. L'utilizzo di questa risorsa naturale fossile offre all'uomo moderno irrinunciabili benefici e comodità. Per contro, si rendono necessari determinazione e impegno nel ridurre al minimo le contaminazioni e il degrado ambientale che le immissioni di idrocarburi possono provocare negli ecosistemi terrestri e acquatici.

Il petrolio greggio è costituito da una miscela di sostanze che presentano una differente struttura molecolare mantenendo la stessa struttura chimica: gli idrocarburi, molecole formati da atomi di carbonio e di idrogeno.

Gli sforzi profusi per preservare tutti gli ecosistemi da immissioni d'idrocarburi sono multidisciplinari, coinvolgono diversi settori della scienza e dell'industria e perseguono obiettivi diversi. Ad esempio sono necessarie attività come la prevenzione delle immissioni accidentali e croniche, l'attuazione di strategie d'intervento capaci di minimizzare le conseguenze ambientali ed economiche delle contaminazioni, la bonifica e il recupero d'aree già profondamente compromesse.

In questo scenario d'attenzione per il mondo in cui viviamo, le biotecnologie trovano una naturale applicazione pratica nella soluzione dei problemi ambientali. L' *European Federation of Biotechnology (EFB)* definisce il significato delle biotecnologie ambientali come l'uso combinato di scienze naturali e scienze ingegneristiche allo scopo di utilizzare organismi viventi (come batteri e piante), cellule, parti di essi e molecole simili ad essi per uno sviluppo sostenibile. Questa definizione apparentemente astratta ha invece molte applicazioni concrete. La ricerca nell'ambito delle biotecnologie ambientali è rivolta al raggiungimento di obiettivi che supportano l'attuazione della sostenibilità energetica e ambientale con la protezione delle risorse naturali, la prevenzione di danni ambientali, il trattamento dei rifiuti solidi e liquidi, il trattamento delle emissioni gassose, il biorisanamento di aree contaminate, lo sviluppo di prodotti e processi che generino meno rifiuti e riducano il consumo energetico.

La scoperta

I piani di tutela del territorio si concretizzano anche nelle operazioni di depurazione delle acque marine inquinate e nella bonifica di suoli e sedimenti marini contaminati, i metodi usati si avvalgono dell'utilizzo di tecnologie innovative. In particolare, si sta rivelando emergente un settore all'avanguardia delle biotecnologie ambientali: la Bioremediation o biorisanamento. Con questo termine si definisce l'impiego di microrganismi per la rimozione di contaminanti da sistemi acquatici e terrestri (mare e suolo). Il processo si basa sulla diversità metabolica delle comunità microbiche naturali. Questo vuol significare che si utilizzano tecniche che fanno leva sulla naturale predisposizione di alcuni batteri a produrre enzimi capaci di degradare gli idrocarburi di cui è composto il petrolio.

Gli enzimi sono proteine identificate come tali in base al compito che svolgono, si classificano dunque rispetto a quale substrato (composto) attaccano. Il lavoro degli enzimi è di funzionare da catalizzatori, cioè da promotori, facilitando una determinata reazione. Queste proteine agiscono abbassando la quantità d'energia che serve perché una reazione chimica si compia. Un esempio preso dalla vita quotidiana, la pulizia dei vestiti con un detersivo: molte macchie di sporco sono d'origine naturale e quindi gli enzimi sono presenti nei detersivi per la lavatrice, mentre le macchie d'unto come olio e grasso vengono facilmente rimosse dalle lipasi oppure le macchie di origine proteica (come il sangue) vengono più facilmente lavate via se nel sapone ci sono delle proteasi.

I microrganismi utilizzati nelle pratiche di biorisanamento sono molto interessanti perché si tratta di batteri idrocarburoclastici (da qui la sigla BIC) vale a dire che si "nutrono" di petrolio utilizzandolo per i loro processi metabolici. Inoltre hanno la caratteristica di essere autoctoni degli ecosistemi marini (considerati siti di bonifica da idrocarburi), il che significa che gli spazzini del mare per natura vivono in grande numero nelle acque dove è presente del petrolio perché appunto lo "mangiano".

Fin dall'inizio degli anni '70, vari ricercatori hanno rivolto sempre maggior interesse allo studio di microrganismi capaci di distruggere parzialmente o completamente il petrolio e i suoi derivati che si ritrovano accidentalmente nei mari. In

particolare nell'ultimo decennio, sono avvenuti degli sviluppi decisivi nel campo della bioinformatica (disciplina che si occupa dello studio, dello sviluppo e dell'integrazione di strumenti informatici al servizio della ricerca scientifica in campo biotecnologico), della biochimica e della biologia molecolare. Anche la microbiologia ormai si avvale di tecniche e metodi d'indagine efficaci ed impensabili fino a pochi anni fa.

La nomenclatura dei batteri

La nomenclatura latina usata per i batteri (ed anche per **Lieviti e Muffe**) deve interpretarsi come se i microrganismi avessero cognome e nome, per esempio **Acinetobacter** è il cognome, che corrisponde al genere a cui appartengono numerose specie di batteri, **venetianus** è il nome della specie scoperta nelle acque della Laguna di Venezia.

Una curiosità riguardo alle specie di batteri che appartengono al genere *Acinetobacter* è che riescono a sopravvivere nel sapone e nei composti disinfettanti, inoltre si ritrovano anche sulla nostra pelle con un'incidenza (probabilità) fino al 25% ma ancora non si è scoperto se per l'uomo siano batteri contaminanti o innocui commensali, cioè ospiti innocui.

Addentriamoci maggiormente nei ritrovamenti in acque italiane di questi microrganismi "amici dell'ambiente", avvenuti sia al Nord sia al sud della penisola.

Nella laguna di Venezia

Nel 1996, nelle acque della Laguna di Venezia, è stato isolato un batterio denominato *Acinetobacter venetianus*, in grado di svolgere numerose tappe del processo di degradazione del gasolio-petrolio. Da questa prima scoperta diversi studi sono stati rivolti ai microrganismi originari di quella zona di mare con lo scopo di caratterizzare una comunità microbica costituita oltre che da *Acinetobacter venetianus*, dai ceppi batterici di *Pseudomonas putida* e *Alcaligenes faecalis*.

Studi in laboratorio

In laboratorio i microrganismi delle diverse specie sono studiati in colture batteriche singole, in pratica si riempiono delle provette e delle piastre di Petri (contenitori rotondi di plastica trasparente adatti a far crescere colonie di batteri, lieviti e muffe) con il terreno selettivo specifico adatto e con opportune diluizioni per ogni specie che forma la comunità. Poi, ad intervalli di tempo prefissati, si segue la crescita di colture batteriche miste formate da tutte le diverse specie che popolano la comunità microbica.

Lo scopo è quello di studiare le dinamiche dei microbi in un microcosmo (un ambiente ricreato e semplificato in laboratorio che ha le caratteristiche essenziali di un sistema naturale più grande) che contiene l'idrocarburo che dovrebbe essere metabolizzato.

Questo è il primo passo che viene affrontato dai ricercatori per capire il modo in cui le cellule batteriche aderiscono alle particelle di gasolio o di petrolio anche per conoscere il complicato meccanismo di interazioni che si vengono a creare fra i vari microrganismi che condividono lo stesso habitat.

Se vogliamo addentrarci più specificatamente nella vita quotidiana degli "spazzini marini", gli studi di microbiologia non bastano ed è necessario ricorrere alla biologia molecolare perchè le colture batteriche vengono trattate con varie tecniche di analisi molecolare per studiare l'immagine del DNA. In questo modo alcuni tratti del DNA dei microbi vengono clonati e ne vengono quantificate le dimensioni e la posizione precisa.

Per meglio comprendere il diverso lavoro di questi biologi immaginiamo una cellula batterica come un piccolo paese sorvolato da un aliante: se il pilota è un microbiologo vola a 200 metri d'altezza e scatta una foto a tutto il centro abitato e i suoi dintorni, se invece a sorvolare la zona è un biologo molecolare si abbasserà a 20 metri e nella sua foto si vedranno bene le strade, i tetti e le finestre delle case, e alcune insegne dei negozi saranno leggibili. Entrambe le foto sono ugualmente necessarie per comprendere il nome del paese e come si svolge la vita fuori e dentro di esso.

Lungo le coste siciliane

L'Istituto per l'Ambiente Marino Costiero sezione di Messina (IAMC – ME) si occupa dello studio dei BIC, della loro distribuzione geografica, di approfondire la conoscenza delle caratteristiche genetiche, di capire come funzionano e del loro potenziale utilizzo nei processi d'attenuazione naturale negli ambienti marini contaminati da petrolio. Questo istituto di ricerca italiano coordina diversi progetti nazionali ed internazionali e il loro possibile utilizzo nelle pratiche di

biorisanamento ambientale. In tale contesto, numerose aree costiere siciliane sono monitorate con lo scopo di analizzare la distribuzione dei diversi gruppi tassonomici cioè l'attribuzione di una nomenclatura che permette di classificare i batteri mangia petrolio attraverso le tecniche microbiologiche e di biologia molecolare, come per i batteri scoperti nelle acque marine veneziane. Anche a questi "spazzini" è stato dato un cognome e un nome, conosciamoli meglio. Nel 2003, fra i vari batteri isolati sono stati descritti dei nuovi generi: *Alcanivorax* il cui corredo genetico è stato totalmente sequenziato (si conoscono cioè tutti i tratti del suo DNA), *Oleiphilus*, *Thalassolituus* e *Oleispira*. Tutte le specie di batteri appartenenti a questi quattro generi sono formate da microrganismi marini obbligati capaci di sopravvivere solo nell'acqua del mare e da organismi definiti ubiquitari perché si trovano negli ambienti oceanici ed in particolare dove è presente il petrolio. Un dettaglio della vita dei batteri appartenenti al genere *Oleispira* è che sono organismi psicrofili, questa parola significa che la loro temperatura di crescita ottimale è inferiore ai 15°C, in particolare vivono bene fra i 2 e i 4°C.

La ricerca in Antartide

Da qualche anno l'Antartide è anche meta di ricercatori che svolgono indagini sui batteri in grado di ridurre l'inquinamento da idrocarburi nel mare. E' di febbraio 2005 la notizia di una spedizione di studiosi italiani, della durata di tre anni, con lo scopo di approfondire la conoscenza di batteri e cianobatteri antartici per conoscere la biodiversità e scoprire nuovi composti con potenzialità applicative in biotecnologia. Nei primi 2 anni i ricercatori faranno dei campionamenti e dei trattamenti preliminari dei campioni raccolti in Antartide presso la Stazione "Mario Zucchelli". Durante il terzo anno del progetto si lavorerà in Italia nei laboratori di competenza sul materiale prelevato e trattato. I campionamenti sono le operazioni di prelievo di campioni come colonne d'acqua, acqua di superficie, carote di sedimenti e di ghiaccio, organismi viventi (in particolare batteri e spugne).

Ma perché tanto interesse per i microrganismi marini antartici?

Gli oceani rappresentano più del 70% della terra, ogni goccia d'acqua di mare è animata da microrganismi che per la maggior parte l'uomo non conosce: si stima che 9 specie di batteri su 10 siano sconosciute! I batteri che vivono nei mari freddi sono molto promettenti perché si sono adattati a temperature costantemente basse, quindi per crescere e sopravvivere hanno dovuto ottimizzare il loro. Inoltre per la loro capacità d'adattamento in ambienti estremi, questi batteri non sono stati già trovati in altri ecosistemi e quindi appartengono a generi sconosciuti e nuove specie. Lo studio dei meccanismi con i quali affrontano il "lavoro di mangiare il petrolio" è di estremo interesse dal punto di vista biotecnologico per capire come sono fatti e che tipo d'enzimi e composti producono per degradare il petrolio e i suoi derivati. Infatti questi batteri sono molto efficienti in condizioni climatiche che normalmente provocano un rallentamento del metabolismo. Molto semplicemente le biotecnologie cercano di usare gli strumenti perfetti che nel micro - mondo batterico sono conosciuti da sempre.

Dal laboratorio al mare

A questa domanda fondamentale facciamo virtualmente rispondere Michail Yakimov, il Ricercatore dell'IAMC – ME che coordina il progetto europeo Comode (*Communities of marine microorganisms for oil degradation*) riportando le sue dichiarazioni, rilasciate nel 2003, relative ai nuovi generi di batteri scoperti nelle acque delle coste siciliane (*Alcanivorax*, *Oleiphilus*, *Thalassolituus* e *Oleispira*): "Si tratta di vere e proprie macchine biologiche altamente specializzate, in quanto tali non possono che avere un'elevata affinità verso gli idrocarburi, tanto da utilizzarli come fonte di sostentamento. Il risultato, infatti, è la degradazione dei composti recalcitranti (il petrolio) con produzione di biomassa autoctona, acqua e gas. I nostri esperimenti hanno mostrato che in presenza di nutrienti, i BIC, ovvero i batteri idrocarburoclastici, rispondono in maniera tempestiva all'input di petrolio diventando, in 10 – 15 giorni, la popolazione batterica predominante." Infatti questa unità di ricerca ha condotto negli ultimi anni esperimenti di bioaugmentation (ovvero aumento del numero dei microbi mangia petrolio originari di una zona di mare) che sono stati effettuati aggiungendo all'ambiente naturale, in zone di mare inquinato, densità opportune di batteri BIC. Questo ha permesso agli scienziati di osservare l'eventuale accelerazione dei processi naturali di biodegradazione del petrolio su media scala. Prima che la ricerca effettuasse esperimenti direttamente in mare sono state avviate una serie di prove in laboratorio. Questi esperimenti sono stati condotti su piccola scala in microcosmi che dimostrano come in presenza di nutrienti

adeguati, i BIC degradano tempestivamente il petrolio introdotto nell'ambiente, moltiplicandosi rapidamente e arrivando a rappresentare circa il 90% della popolazione batterica totale. I ricercatori hanno utilizzato come nutrienti adeguati dei composti che contengono azoto e fosforo perché favoriscono lo sviluppo e le attività di questi batteri. Le quantità aggiunte di questi elementi sono utili per rendere più veloce la degradazione del petrolio che apporta all'ambiente una quantità di carbonio maggiore rispetto ad una condizione normale.

Questi esperimenti sono stati l'occasione per approfondire come i batteri degradano il petrolio per mezzo di particolari composti solubili in acqua che essi stessi producono: i biosurfurati. I biosurfurati emulsionano il petrolio in goccioline in modo che la cellula batterica le possa assorbire più facilmente. I prodotti finali della degradazione del petrolio per opera dei BIC sono molecole di anidride carbonica, acqua e nuova biomassa. Infatti trovando nell'ambiente disponibilità di nutrimento le colonie batteriche si producono molto rapidamente.

Gli esperimenti condotti su piccola scala sono stati solo l'antipasto per i batteri mangia petrolio dato che poi le ricerche sono continuate su media scala. Le capacità dei BIC sono state studiate anche in contenitori più capienti, i mesocosmi. Si tratta di vasche che vengono riempite con acqua di mare e sedimenti, prelevati da un'area marina costiera contaminata con petrolio. All'interno viene simulata la corrente marina con un apparecchio adatto. Alcuni parametri sono monitorati con l'aiuto di un sensore che registra la temperatura, il pH e la quantità d'ossigeno presenti nell'acqua. Questi studi hanno permesso di capire come si potrebbe realizzare l'applicazione della tecnica di biorisanamento direttamente in mare.

Il biorisanamento

Sia la terra che alcune zone di mare si possono trovare inquinate da una gran concentrazione di contaminanti d'origine organica di provenienza naturale o da processi industriali.

Che fare, quindi?

Una delle tecniche più attuali è il biorisanamento o bioremediation. Questa tecnica viene considerata anche sostenibile perché la sua applicazione viene definita a basso rischio di effetti secondari negli ecosistemi terrestri e marini.

Si tratta dell'utilizzo di microrganismi o piante per ripulire una zona dalla presenza di composti sgraditi. Il biorisanamento si basa sull'utilizzo di microrganismi o piante che vengono specificatamente individuati in laboratorio perché capaci di degradare un determinato inquinante in determinate condizioni con la massima efficienza.

La realizzazione pratica di questa tecnica viene pianificata attraverso fasi successive:

- si studia lo stato dell'inquinamento individuando il tipo di inquinante, valutando la sua concentrazione nell'ambiente e la sua pericolosità per l'ecosistema in cui si trova. E' necessario valutare l'estensione dell'area inquinate e se questa può variare le sue dimensioni nel tempo;
- capire con quali specie di batteri aggredire l'inquinamento nel modo migliore e più conveniente;
- isolare il ceppo specifico del microrganismo o la comunità microbica necessari allo scopo;
- far aumentare di numero le colonie di batteri nella quantità adatta fornendo loro dei nutrienti;
- inoculare, cioè introdurre fisicamente i batteri nella zona inquinata e monitorare "quanto mangiano", con che velocità lo fanno e mantenere controllati i prodotti che si formano dai processi di degradazione dell'inquinante.

Nel caso l'inquinante sia il petrolio quindi una miscela di idrocarburi, il processo di biodegradazione può avvenire attraverso un meccanismo metabolico sia di tipo aerobico sia anaerobico. Nelle pratiche di biorisanamento, la via aerobica con cui può avvenire la biodegradazione del petrolio da parte dei batteri, si rivela spesso la più significativa in quanto la velocità con cui viene mangiato il petrolio è più rapida. Quando la quantità di ossigeno diminuisce al punto tale che non è più sufficiente per permettere ai batteri di nutrirsi, allora si dice che l'ossigeno diventa il fattore limitante della reazione e la velocità dei processi di biodegradazione rallentano fino a fermarsi.

