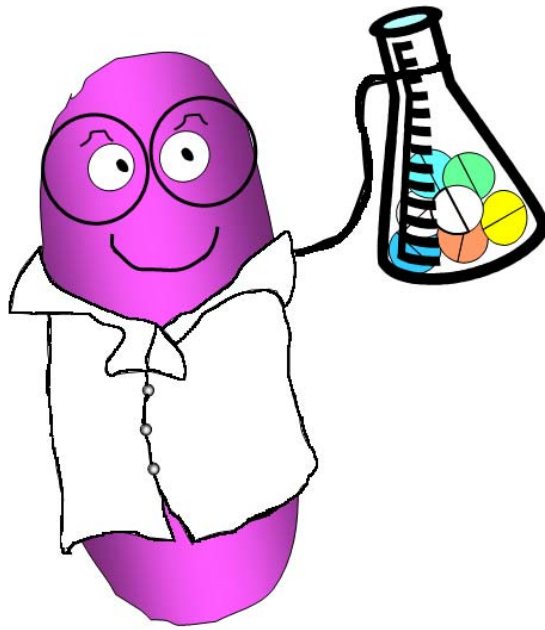


M.C. THALLER



MICROBIOLOGIA APPLICATA

CORSO DI LAUREA TRIENNALE "BIOTECNOLOGIE"

A.A. 2010-2011

La Microbiologia applicata tratta delle attività microbiche che interessano l'uomo e si dirama in diverse branche che approfondiscono aspetti particolari (microbiologia medica, agraria, industriale, alimentare, veterinaria, ambientale..).

Lo studio delle attività microbiche porta alla comprensione del ruolo svolto dai microrganismi nel proprio ambiente, sia in relazione alla componente abiotica (effetti dell'attività microbica) sia in relazione alla componente biotica (interazioni con altri esseri viventi). Dalla comprensione scaturisce la consapevolezza delle possibili applicazioni delle conoscenze acquisite, che rappresenta un impulso allo studio di tecniche e prodotti che possano migliorare l'efficienza dei processi in cui i microrganismi vengono utilizzati. Dalla Microbiologia Applicata nascono quindi le Biotecnologie microbiche.

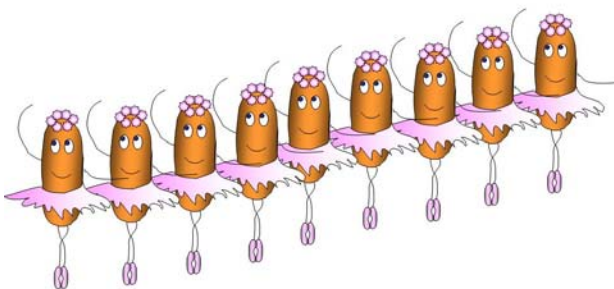
INTERAZIONI CON ESSERI VIVENTI

Nella maggior parte delle interazioni tra viventi, assume una notevole importanza la particolare regolazione che viene definita "Quorum sensing"

LA REGOLAZIONE DA DENSITÀ

il "quorum sensing"

I batteri vengono considerati in genere come organismi unicellulari indipendenti e autosufficienti, ma in alcuni casi, intere popolazioni batteriche possono svolgere una particolare funzione all'unisono, o modificare l'attività individuale in risposta alla grandezza o all'attività della colonia.



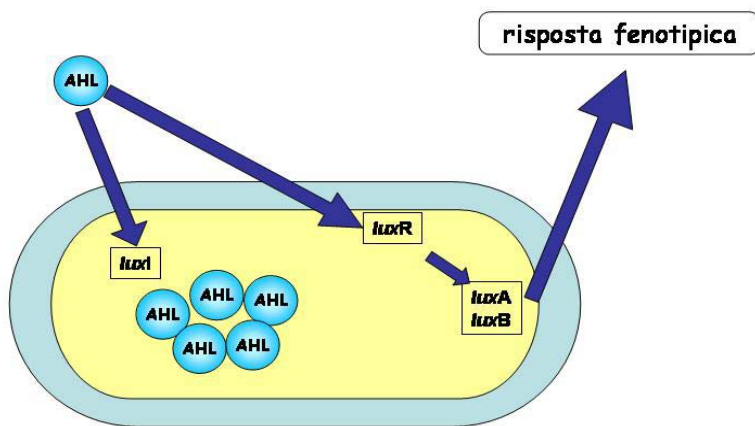
Questo tipo di regolazione che dipende dalla densità cellulare viene definito "Quorum sensing". La singola cellula batterica percepisce la quantità delle altre cellule batteriche presenti nell'ambiente intorno, e indirizza la propria attività in risposta.

La nutrizione e la sporulazione di mixobatteri e attinomiceti¹ sono modulate per funzionare meglio in grandi popolazioni: i loro modelli comportamentali assomigliano a quelli associati con gli organismi multicellulari più semplici.

Il primo sistema legato al "Quorum sensing" scoperto e studiato in dettaglio, è stato quello di della luminescenza di *Vibrio fischeri*.

¹ almeno per curiosità, cercate qualche fotografia sui vostri libri...

Cercando di capire il meccanismo alla base della bioluminescenza di questi *Vibrio* marini, alcuni ricercatori scoprirono che il filtrato ottenuto da una coltura luminescente di alta densità cellulare, era in grado di indurre luminescenza in una coltura non luminescente a bassa densità. In seguito si scoprì che gli agenti in grado di indurre la luminescenza nelle colture erano derivati di omoserina lattoni, coniugati con una catena laterale acilica.



Nel modello di *Vibrio*, queste molecole entrano liberamente nella cellula e interagiscono con la proteina di regolazione LuxR, inducendo sia la trascrizione di un operone in cui si trovano i geni responsabili della risposta fenotipica (luminescenza) sia quella di un altro gene (*luxI*) che

determina la sintesi di nuove molecole di autoinduttore, in modo da mantenerne costante il livello. In altre specie batteriche sono stati scoperti sistemi analoghi, in cui il mediatore chimico è un N-acyl omoserina-lattone (N-AHL), che interagisce con un attivatore trascrizionale (omologo di *luxR*) e con un gene (omologo di *luxI*) implicato nella sintesi dell' N-AHL.

Le ricerche sui sistemi di QS hanno dimostrato l'importanza delle piccole molecole nella funzionalità dei sistemi biologici; per molto tempo, infatti, tutte le funzioni principali sono state considerate prerogativa esclusiva di macromolecole (principalmente aminoacidi e proteine).

I caratteri espressi in risposta al segnale della risposta QS variano da specie a specie e in alcuni casi non sono stati ancora individuati. Per citare solo qualcuno degli esempi che si conoscono, sistemi di regolazione di tipo "quorum sensing" sono implicati: nella coniugazione associata con il trasferimento del plasmide Ti in *Agrobacterium tumefaciens*, nella produzione e l'escrezione di fattori di virulenza in *Pseudomonas aeruginosa* (occasionale patogeno per uomo e animali), e *Erwinia carotovora* (fitopatogeno); nella regolazione di geni della rizosfera in *Rhizobium leguminosarum*, nella divisione cellulare in *Escherichia coli*.

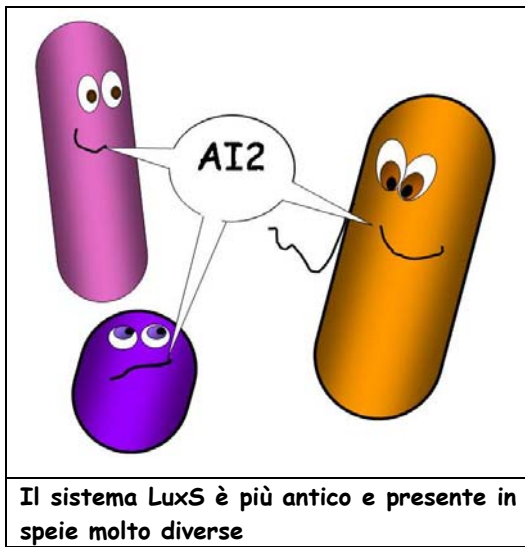
Nel caso di *V. fischeri*, la risposta ha probabilmente a che fare con la relazione simbiotica che il batterio contrae. La densità della coltura, impossibile da raggiungere nell'ambiente esterno, indica alla cellula batterica che l'ambiente esterno è quello giusto per la produzione di bioluminescenza e che un dispendio di energia in questo senso non è quindi sfavorevole.

Una situazione simile può verificarsi per i batteri che modulano l'espressione della propria virulenza a seconda della densità della coltura. Una popolazione esigua, all'interno di un ospite, potrebbe produrre una quantità di tossina insufficiente a creare un effetto biologico. Anche la produzione di antibiotici in molti batteri è controllata da un sistema densità dipendente. È possibile che composti che antagonizzano altri batteri vengano prodotti solo quando la densità cellulare ne assicura l'efficacia ed è anche possibile che alcune specie producano antibiotici solo quando la densità cellulare di specie che potrebbero rappresentare una minaccia, supera un determinato livello. Il meccanismo "Quorum Sensing" capta stimoli dall'ambiente e induce l'espressione di geni che determinano un fenotipo complementare alla condizione ambientale dominante.

Il modello di *Vibrio fischeri* è quello dominante nei microrganismi didermi (Gram-negativi) in cui gli autoinduttori del sistema LuxI-LuxR appartengono alla classe degli N-acil-omoserina-lattoni. I batteri monodermi (Gram-positivi) invece, usano peptidi o peptidi modificati come autoinduttori e sono stati individuati molti meccanismi differenti per ottenere una risposta di tipo quorum sensing.

Il meccanismo più diffuso è rappresentato da una trasduzione del segnale attraverso un sistema a due componenti. La molecola segnale è un oligopeptide il cui precursore viene prodotto e processato all'interno della cellula. Il peptide-segnale ottenuto è poi secreto nell'ambiente circostante, dove può essere avvertito dalle altre cellule batteriche. Il peptide si lega ad sensore (una istidino-kinasi), situata nella membrana cellulare; l'attivazione dell'istidino-kinasi porta alla fosforilazione della proteina che regola la risposta e l'interazione con un'altra proteina regolatoria facilita l'attivazione trascrizionale. In alternativa, il peptide segnale può essere captato grazie a una oligopeptide permeasi che lo veicola all'interno della cellula batterica, dove può anche agire direttamente come induttore.

COMUNICAZIONE INTERSPECIFICA



La comunicazione tra specie distanti è affidata a un altro sistema in cui gli enzimi che sintetizzano gli autoinduttori non sono omologhi di LuxI e l'autoinduttore è un idrossimetilfurano (sistemi LuxS). Il gene *luxS* è stato individuato in un'ampia varietà di microrganismi Gram-negativi e Gram-negativi filogeneticamente distanti e la sua larga diffusione ha suggerito che la molecola segnale (AI2) possa essere impiegata per comunicare tra specie differenti, e il

sistema sia evolutivamente più antico del sistema LuxI-LuxR.

La produzione di LuxS è di per sé un vantaggio per la cellula che lo possiede: l'enzima infatti agisce in sinergia con un altro enzima e converte S-adenosilomocisteina (SAH), un composto molto tossico che si forma durante il metabolismo della S-adenosil-L-metionina (SAM), in adenina, omocisteina e molecola segnale.

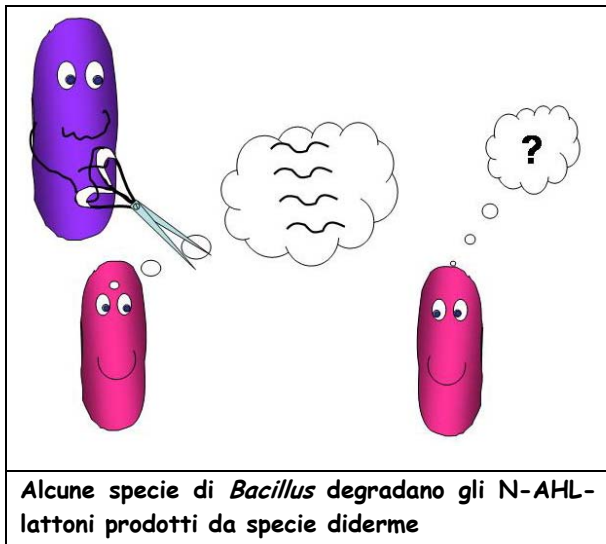
Molte specie batteriche possiedono più di un sistema QS e le reti possono interagire in vari modi: in alcuni casi i sistemi sono sinergici e inducono lo stesso fenotipo; in altri casi i circuiti possono intervenire in sequenza come accade in *Pseudomonas aeruginosa* dove il "Quorum sensing" si attua con una complessa cascata gerarchica che coinvolge tre differenti sistemi importanti per la sintesi di enzimi degradativi, fattori di virulenza e formazione di biofilm. La gerarchia nei sistemi QS regola in modo fine l'espressione degli enzimi degradativi, modulandoli a seconda della densità della popolazione, che a sua volta dipende dalla disponibilità dei nutrienti nell'ambiente: la regolazione QS permette quindi a *Pseudomonas* di reagire con estrema precisione alle variazioni, anche improvvise, di nutrienti. Molto recentemente è stato scoperto un quarto sistema che agisce bloccando uno dei principali sistemi di restrizione e aumenta quindi le probabilità di successo dei trasferimenti genici orizzontali.

Quando la densità di popolazione diminuisce, la concentrazione degli N-AHL nell'ambiente decresce e lo stimolo trasmesso dalla loro presenza cessa. In ambienti con pH neutro gli N-AHL sono instabili e si degradano facilmente, permettendo l'uscita dalla risposta "Quorum sensing". In ambienti debolmente acidi (pH circa 6) i mediatori chimici sono più stabili e

alcune specie, possono facilitare l'uscita dalla risposta attraverso l'espressione di enzimi (AHL-lattonasi) che degradano gli N-AHL lattoni.

"QUORUM QUENCHING"

Le funzioni biologiche regolate dal "Quorum Sensing" sono di importanza considerevole, non



solo scientifica ma anche economica: nuovi approcci per incrementare o limitare la regolazione dei sistemi QS sarebbero di notevole anche per applicazioni pratiche. Recentemente, in un ceppo di *Bacillus* isolato dal suolo, è stato scoperto un gene (*aihA240B1*) che codifica un enzima in grado di inattivare gli AHL degradandone il legame lattonico. Il prodotto di *aihA240B1* è stato quindi classificato come "AHL-lattonasi". Ingegnerizzando un ceppo di

Pectobacterium carotovorum (agente del marciume molle delle radici in molte piante) con il gene *aihA240B1*, si assiste a un significativo decremento del rilascio di autoinduttori; la produzione di enzimi pectinolitici (regolati dal QS) diminuisce di conseguenza, e il ceppo mostra una minore aggressività nei confronti di carote, patate melanzane, cavoli sedano e tabacco.

Piante transgeniche che esprimono AHL lattonasi aumentano in modo significativo la propria resistenza nei confronti delle infezioni provocate da *P. carotovorum* e i sintomi della malattia appaiono con considerevole ritardo.

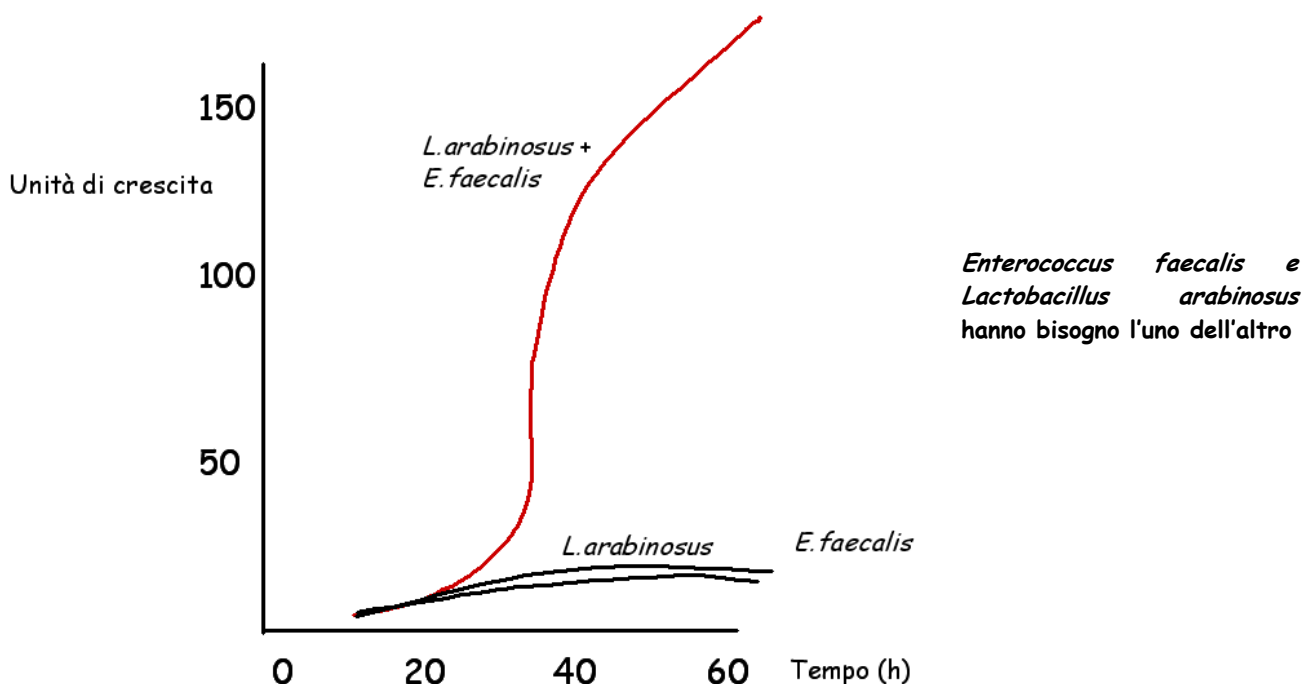
La presenza di AHL-lattonasi è stata dimostrata in *Agrobacterium tumefaciens* e in alcune specie appartenenti al genere *Bacillus*. Il genere *Bacillus* (formato da batteri gram-positivi, aerobi, sporigeni) è piuttosto disperso e suddiviso in "gruppi". Le specie in cui è stata scoperta la presenza di AHL-lattonasi appartengono al "gruppo di *B. cereus*" e sono *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. mycoides*, strettamente correlate tra loro. In altre specie del genere *Bacillus* (*B. fusiformis*, *B. sphaericus*) non sono invece presenti enzimi di questo tipo. Il possibile ruolo fisiologico delle AHL lattonasi in *Bacillus* non è chiaro. A differenza delle specie diderme, infatti, i monodermi impiegano peptidi o, in qualche caso γ -butirrolattoni come segnali per il quorum-sensing; è possibile che questi enzimi svolgano un ruolo nella interazione tra

microrganismi (impedendo, per esempio, il raggiungimento della massima efficienza in una specie che compete per gli stessi nutrienti). Il meccanismo con cui un microrganismo interferisce con la regolazione QS di altri batteri, viene chiamato "Quorum Quenching".

Il fenomeno del Quorum Quenching è considerato con interesse per le sue possibili applicazioni pratiche: come esempio si può citare quello di *B. thuringiensis*, che è comunemente usato come insetticida microbico² per controllare le larve di lepidotteri, ma non è adatto a prevenire malattie batteriche o fungine delle piante. Dal momento che *B. thuringiensis* è in grado di degradare le molecole segnale che le specie patogene usano per attivare i geni di virulenza, potrebbe essere usato contemporaneamente come insetticida e come agente di biocontrollo nei confronti di malattie batteriche causate da patogeni la cui virulenza sia mediata da segnali AHL di Quorum Sensing.

INTERAZIONI TRA MICRORGANISMI

Nelle interazioni tra microrganismi il vantaggio, reciproco o meno, è in genere collegato alla nutrizione.

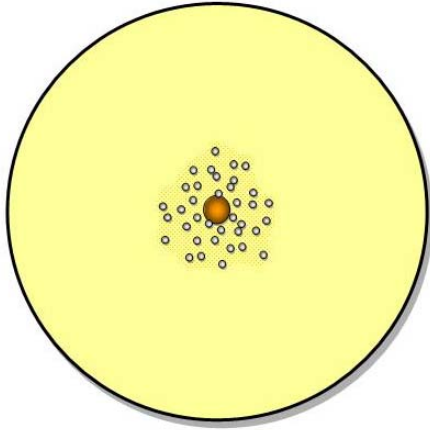


mutualismo: Un esempio classico è quello fornito da *Enterococcus faecalis* e *Lactobacillus arabinosus*: le due specie crescono in coltura axenica senza problemi quando vengono coltivate in un terreno di coltura ricco, ma non crescono in terreno minimo. Per ottenere una crescita abbondante è necessario coltivarle insieme: entrambe, infatti, hanno bisogno di un fattore di

² vedi "Controllo biologico"

accrescimento che non è presente nel terreno minimo (*E. faecalis* di acido folico; *L. arabinosus* di fenilalanina) ma che viene secreto dall'altra specie.

Commensalismo: Un esempio di commensalismo tra microrganismi è quello del satellitismo, che



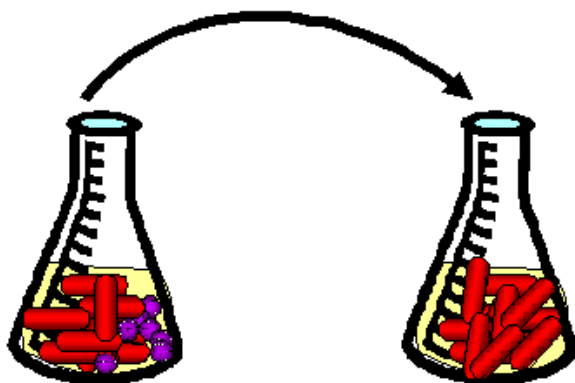
Se è disponibile eme ma non NAD, *H. influenzae* cresce solo intorno a *S. aureus* quelle di *S. aureus*.

si osserva tra *Haemophilus influenzae* (che ha bisogno di eme e di NAD come fattori di accrescimento) e *Staphylococcus aureus*.

H. influenzae non cresce su terreno con aggiunta di sangue, perché in questo tipo di terreno non è disponibile sufficiente NAD; *S. aureus* produce NAD e lo secerne nel terreno: in una coltura mista su piastra, quindi, le piccole colonie di *H. influenzae* si trovano solo intorno a

competizione: La competizione si instaura tra popolazioni che utilizzano gli stessi nutrienti; il vantaggio in questo caso deriva dalla velocità di moltiplicazione, dall'affinità degli enzimi per il substrato, dalla velocità delle reazioni enzimatiche e, in qualche caso, dalla capacità di creare riserve. Una specie che compete con un'altra interferisce con le sue possibilità di sfruttare liberamente i nutrienti.

La competizione è un'interazione molto comune tra microrganismi, e ha risvolti pratici che

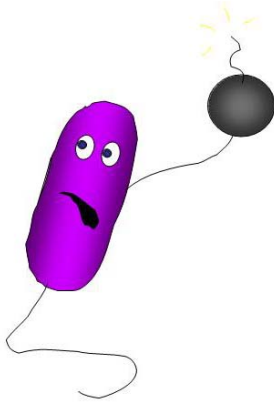


La competizione può fare brutti scherzi in laboratorio.

batteri presenti, nel giro di due o tre successivi passaggi *S. aureus* sarà praticamente sparito dalla coltura.

riguardano la necessità di lavorare sterilmente e su colture axeniche in laboratorio. Coltivando *S. aureus* e *Escherichia coli* nella stessa coltura liquida, *E. coli*, che ha un tempo generazionale minore di quello di *S. aureus*, aumenterà in proporzione maggiormente il numero delle sue cellule. Partendo da una situazione in cui ogni specie rappresenti il 50% dei

Antagonismo: l'antagonismo è una forma avanzata di competizione, in cui uno dei partner ostacola attivamente la crescita dell'altro. Un tipico esempio di interazione di antagonismo è



quello della produzione di antibiotici o di batteriocine (sostanze tossiche nei confronti di altri microrganismi). Nella maggior parte dei casi gli antibiotici sono prodotti durante la fase stazionaria della crescita, quando i nutrienti cominciano a scarseggiare, e i prodotti di scarto si accumulano.

Spesso la regolazione dei geni responsabili della sintesi dei fattori dell'antagonismo tra microrganismi è del tipo "Quorum Sensing" e talvolta il fattore di antagonismo è prodotto in risposta alla presenza di un'altra specie (probabilmente una specie in grado di

competere).

Predazione

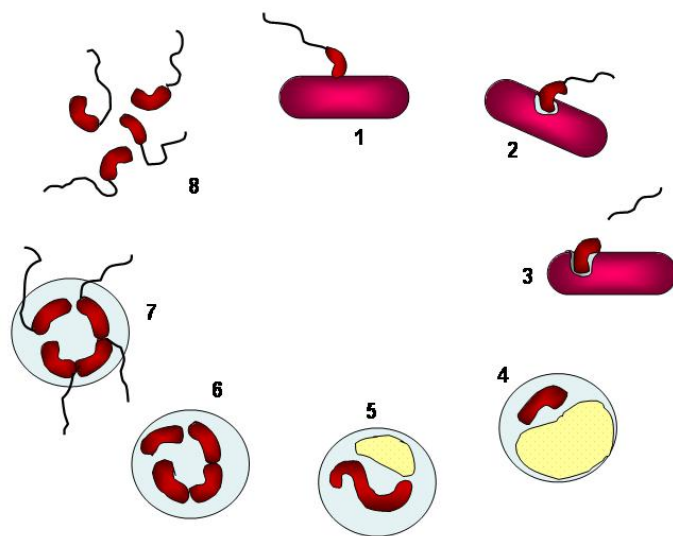


La predazione non è un'interazione molto diffusa tra i batteri, ma esiste: uno degli esempi più noti e studiati è quello di *Bdellovibrio bacteriovorus*, nel cui ciclo vitale si distinguono due fasi: una di attacco e una di crescita.. Nella fase di attacco le cellule (circa 1,5 μm) hanno una forma incurvata e

sono dotate di un flagello inguainato, che ruota con un movimento a cavatappi e sposta la cellula con velocità molto elevata (circa 70-100 lunghezze/sec). La direzione del nuoto è casuale e la probabilità di incontrare una preda dipende dalla densità delle possibili prede presenti. Quando entra in contatto con la preda, (qualunque Gram-negativo), *Bdellovibrio* continua a ruotare, scavandosi una via attraverso la parete, fino a penetrare nel periplasma; a questo punto la cellula predata muore e perde la propria forma trasformandosi in un corpo sferico che prende il nome di "bdelloplasto".

Bdellovibrio perde il flagello e inizia la fase di crescita periplasmica, allungandosi in un filamento; una volta esaurite le fonti di nutrimento (proteine, lipidi, polimeri strutturali, RNA, DNA), il filamento si divide in cellule figlie (le cellule della fase di attacco) che si liberano nell'ambiente. La morte pressoché istantanea della preda, e la capacità di *Bdellovibrio* di crescere nel periplasma pur nutrendosi dei componenti citoplasmatici della preda, hanno suscitato interesse nei confronti dei meccanismi implicati.

ciclo vitale di *Bdellovibrio bacteriovorus* (2,5-4 ore dal contatto)



1-3: fase di attacco:

1 attacco (5-20');

2-3: penetrazione (40-60' dal contatto)

4-7 crescita intraperiplasmatica
4 bdelloplasto;

5 crescita;

6 frammentazione,

7 formazione del flagello

8 rilascio delle cellule figlie

Nella membrana citoplasmica della preda attaccata da *Bdellovibrio* è stata trovata una proteina che mostra omologie con la porina OmpF (membrana esterna). Si ritiene che *Bdellovibrio* agisca impiantando una propria porina nella membrana citoplasmica della preda, oppure traslocando una porina dalla membrana esterna della preda alla membrana citoplasmica; alcune osservazioni suggeriscono che la porina sia traslocata dalla membrana esterna a quella interna della preda attraverso un passaggio per la membrana esterna del predatore. L'inserimento della porina provoca in un collasso immediato e completo del potenziale di membrana, che uccide la preda permettendo alle sostanze del citoplasma di diffondere nel periplasma per nutrire la cellula di *Bdellovibrio* che cresce. Aggiungendo al terreno un estratto ottenuto dalla preda, è possibile coltivare *Bdellovibrio* in laboratorio in coltura axenica (pura); altri predatori, invece, crescono solo in presenza di preda viva (*Vampirovibrio chlorellavorus*, che preda l'alga *Chlorella*) o non si replicano se non sono attaccati alla cellula della preda (*Micavibrio aeruginosavorus*, che preda *Pseudomonas aeruginosa*).

interazioni nel tempo (successioni)

Un altro tipo di interazione è quella con cui un microrganismo, con la propria attività, modifica favorevolmente (facilitazione) o sfavorevolmente l'ambiente per un'altra specie. Un esempio di facilitazione è quello che si osserva nel corso della fermentazione dei crauti, quando *Leuconostoc mesenteroides*, con i prodotti del proprio metabolismo, abbassa il pH del mezzo,

limitando la propria crescita ma favorendo quella di *Lactobacillus*. Un caso di interazione sfavorevole invece, è quello in cui i lattobacilli vengono usati per prevenire il botulismo. Nel caso in cui la corretta conservazione degli alimenti inscatolati non possa essere garantita con certezza (alimenti destinati ad aree dove la temperatura di immagazzinamento può essere un problema), è pratica diffusa aggiungere all'alimento uno zucchero fermentabile (in genere lattosio) e inoculare l'alimento con un ceppo di lattobacillo. Se la temperatura di immagazzinamento resta controllata il lattobacillo non si sviluppa, ma se la temperatura arriva a valori che potrebbero favorire la crescita e la produzione di tossina da parte di cellule di *Clostridium botulinum* eventualmente presenti, il lattobacillo si sviluppa, attacca lo zucchero fermentandolo, abbassa il pH del mezzo e impedisce la tossinogenesi, (la tossina botulinica non viene prodotta e non è attiva a pH inferiori a 4,8) garantendo così la sicurezza dell'alimento.

INTERAZIONI MICRORGANISMI-PIANTE

I microrganismi interagiscono con la vita delle piante in molti modi, già attraverso i processi che si verificano nel corso del ciclo dell'azoto. Ci sono esempi di mutualismo, di parassitismo, e un caso molto particolare di commensalismo (*Agrobacterium*) in cui si assiste a un processo di coniugazione, con trasferimento di DNA, tra microrganismo e piante. In alcuni casi l'interazione è particolarmente stretta e può essere rappresentata da una simbiosi vera e propria o da patologie vegetali, o ancora, come nel caso di *Agrobacterium* da una patologia, il tumore del colletto, che in realtà non danneggia la pianta se non dal punto di vista estetico e sotto il profilo commerciale.

licheni

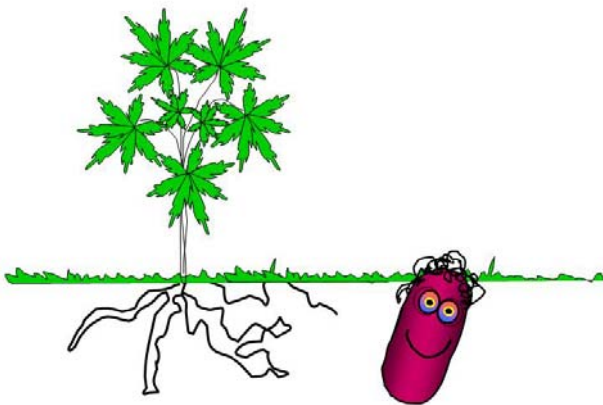
I licheni sono associazioni tra un partner fungino e un partner fotosintetico (alga o ciano batterio). Queste associazioni sono tanto stabili da ricevere una collocazione tassonomica, come se si trattasse di un solo individuo. I licheni crescono lentamente e si trovano anche in ambienti con A_w^3 relativamente bassa: la presenza di cianobatteri come fotobionti nei licheni si osserva spesso in ambienti particolarmente sfavorevoli, come i deserti freddi, dove le capacità di azoto-fissazione dei particolari cianobatteri coinvolti sono particolarmente importanti. Negli ambienti desertici a clima freddo, infatti, la loro presenza è essenziale per l'istaurarsi della "crosta microbica" che tiene insieme la sabbia evitando che venga

³ A_w : valore che rappresenta la quantità di acqua effettivamente disponibile per le attività microbiche. Si ottiene con il rapporto tra la pressione di vapore del substrato in esame e la pressione di vapore dell'acqua pura. I batteri crescono in genere a valori compresi tra 0,98 e 1

asportata al vento e che vada a svolgere un'azione di erosione sulle aree circostanti. Allo stesso tempo, la crosta microbica dà inizio al processo di pedogenesi (formazione del suolo) permettendo così il successivo sviluppo di piante superiori. In queste situazioni, in particolare, il ficobionte è rappresentato spesso dal cianobatterio inguainato "*Microcoleus*".

Rhizobium-leguminose

Il modello di simbiosi più conosciuto è quello che si instaura tra le leguminose ed i microrganismi del genere *Rhizobium*, che effettuano la fissazione biologica dell'azoto all'interno della pianta stessa.



nella rizosfera le attività chimiche delle piante influenzano il comportamento dei microrganismi

I *Rhizobium* si trovano nella rizosfera: la regione del suolo dove si trovano le radici delle piante, che influenzano con le loro attività anche i microrganismi. La simbiosi tra *Rhizobium* e le leguminose è il risultato di una "conversazione molecolare" tra batterio e pianta. Quando conduce vita libera nel suolo, *Rhizobium* è aerobio e microaerofilo, mobile e incapace di effettuare la fissazione dell' azoto: compie questa funzione

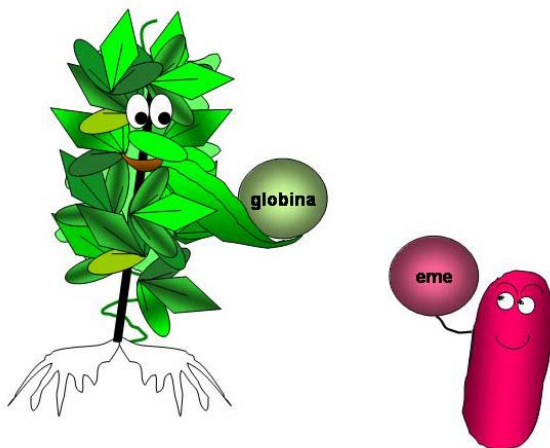
essenziale solo quando è in simbiosi con una leguminosa. L'associazione pianta-*Rhizobium* è un processo specifico: ogni specie di *Rhizobium* entra in simbiosi con una particolare specie vegetale. In questa associazione mutualistica i microrganismi forniscono all'ospite una forma di azoto facilmente assimilabile (arginina e derivati) mentre la pianta rifornisce i batteri di cibo (carboidrati). Si calcola che quasi il 40% del fotosintato della pianta sia ceduto ai microrganismi come sorgente energetica per scindere il triplo legame della molecola di azoto. In sintesi il processo consta di tre eventi principali, che si svolgono in diverse fasi:

1) riconoscimento pianta-batterio:	a) risposta del batterio al segnale chimico della pianta b) invasione attraverso il filamento di infezione c) penetrazione fino alla radice principale
2) sviluppo del nodulo radicale	a) modificazione dei batteri in batterioidi all'interno delle cellule della radice b) risposta della pianta con formazione del nodulo per proliferazione delle cellule tetraploidi
3) azotofissazione	la pianta fornisce fotosintato ai batterioidi e ne riceve azoto organico sotto forma di aminoacidi

Ognuno di questi eventi e' caratterizzato dall'espressione simultanea di geni della pianta e geni del batterio e richiede un processo di differenziamento concertato del microrganismo e della cellula vegetale. La «conversazione» molecolare comincia ancora prima che i due organismi entrino in contatto tra loro. La pianta emette un metabolita ciclico (flavonoide) che richiama solo i *Rhizobium* specifici per quella particolare simbiosi. Il flavonoide penetra nelle cellule batteriche e stimola una proteina (NodD) che attiva diversi geni. I geni attivati da NodD servono a sintetizzare, modificare e secernere il "fattore Nod", che agisce a distanza come un ormone, inducendo il re-inizio delle divisioni cellulari in cellule corticali tetraploidi della radice che si trovavano in uno stato quiescente.

I batteri, attratti dai segnali biochimici inviati dalla pianta, si legano ai peli radicali e producono sostanze che stimolano la crescita asimmetrica del pelo stesso provocandone l'arrotolamento. Nei peli radicali si formano passaggi simili a gallerie, i canali di infezione, in cui i batteri avanzano per divisione cellulare. I canali d'infezione procedono verso il centro della radice e si ramificano liberando nel citoplasma delle cellule dei noduli radicali i batteri che subiscono cambiamenti spettacolari di forma e dimensione, diventando "batterioidi" (fino a 20.000 per cellula vegetale).

Una volta raggiunta la concentrazione critica, le divisioni cellulari cessano e i batterioidi aumentano di volume fino a raggiungere un volume più di 30 volte maggiore di quello dei batteri liberi nel suolo. La reazione di riduzione $N_2 \rightarrow NH_4$ avviene grazie all'azione catalitica della nitrogenasi, la cui attività e' strettamente dipendente dalla pressione di ossigeno presente nel nodulo.



la leghemoglobina è frutto di uno sforzo di cooperazione tra pianta e batterio

Nella zona di fissazione e' presente una molecola molto simile, per struttura e per ruolo, all'emoglobina umana. Questa molecola, che prende il nome di "leghemoglobina", è formata da un gruppo eme (che contiene il ferro responsabile del legame con O_2) sintetizzato dal batterioide, e da una regione proteica (globulare) prodotta dalla cellula vegetale. La leghemoglobina tiene sotto

controllo la concentrazione di ossigeno, bilanciando la necessita' di O_2 per la respirazione

mitocondriale con la necessità di evitare l'inibizione della nitrogenasi. La tensione di ossigeno ha anche un ruolo regolativo contribuendo ad abbassare la trascrizione dei geni che codificano la nitrogenasi. Il caratteristico colore rosato che si può osservare nel nodulo in corrispondenza della zona di fissazione, è dovuto proprio alla presenza della leghemoglobina.

Agrobacterium

Agrobacterium tumefaciens è l'agente etiological del tumore del colletto, malattia che colpisce un gran numero di dicotiledoni a foglia larga, e che prende il nome dal grosso

rigonfiamento, simile ad un tumore (galla) che si forma al colletto della pianta, subito al disopra del suolo. Per quanto riduca il valore commerciale delle piantine nei vivai, la malattia non causa seri danni alle piante più vecchie. Ciò nonostante è una delle malattie vegetali più note, grazie alle peculiarità del meccanismo biologico.



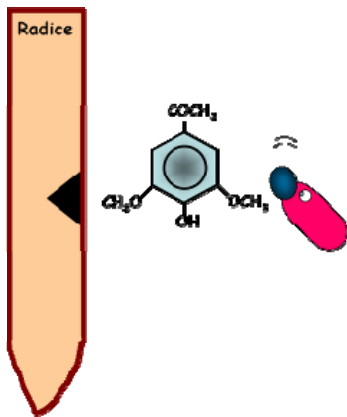
Agrobacterium svolge una vera coniugazione con la cellula vegetale e inietta il T-DNA

Il batterio trasferisce alla pianta parte del proprio DNA che si integra nel genoma della cellula ospite, provocando l'esocrescita delle galle e le modificazioni metaboliche che l'accompagnano. Questo meccanismo d'azione ha fatto di *A. tumefaciens* uno strumento prezioso non solo per

l'ibridazione ma anche per la creazione di piante geneticamente modificate, nelle quali è possibile inserire anche geni eterologhi come per esempio quelli che codificano le tossine insetticide di (*Bacillus thuringensis*⁴), o geni che conferiscano alla pianta la resistenza agli erbicidi.

A. tumefaciens è comune sulle superfici delle radici e nei loro dintorni (la rizosfera) dove vive utilizzando nutrienti rilasciati dalle radici stesse e infetta solo in presenza di ferite (naturali o causate da procedimenti di coltivazione). La maggior parte dei geni coinvolti nella formazione del tumore risiede su un grande plasmide (plasmide Ti, tumour-inducing).

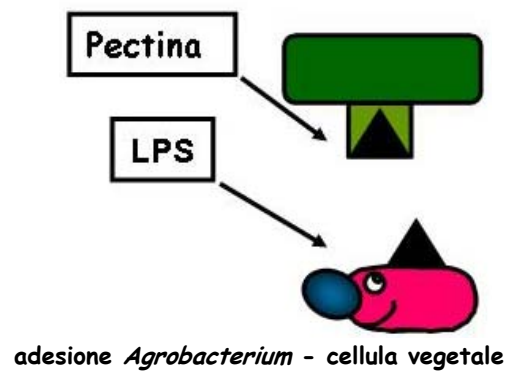
⁴ vedi : "CONTROLLO BIOLOGICO"



Agrobacterium risponde alle ferite del tessuto radicale

In prossimità della radice la

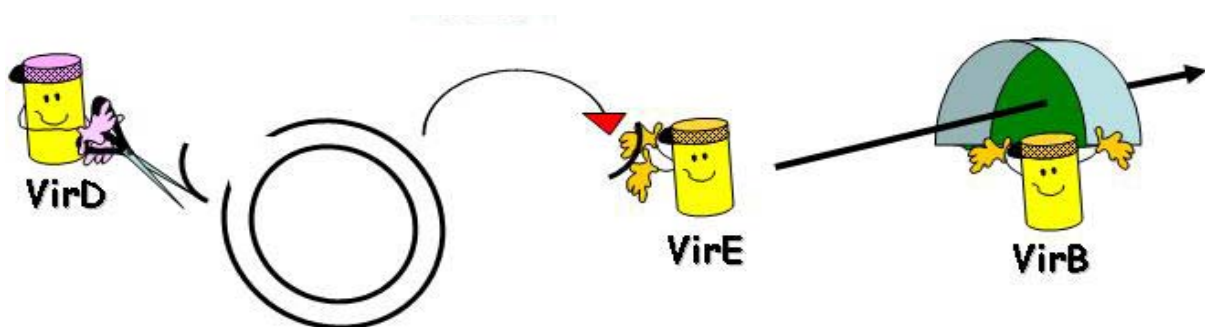
concentrazione di acetosiringone è più elevata (10^{-5} e 10^{-4} Molare) e attiva il gene *virG* che, a sua volta, induce gli altri geni di virulenza (*vir*), localizzati sul plasmide, che coordinano il processo di infezione attraverso i loro



adesione *Agrobacterium* - cellula vegetale

prodotti. In particolare, VirD excide uno dei due filamenti del T-DNA (Transferred DNA), VirE si lega al ssDNA e lo trasferisce nella cellula attraverso il ponte creato da VirB che fa parte di un sistema di secrezione di tipo IV.

A concentrazioni più elevate (10^{-5} e 10^{-4} Molare), l'acetosiringone attiva i geni di virulenza (*vir*) che sono sul plasmide e che coordinano il processo di infezione.



i prodotti dei geni *vir* trasferiscono ssDNA alla cellula vegetale con un sistema di secrezione di tipo IV

Una porzione del plasmide Ti (T-DNA= Transferred DNA) si excide dal batterio, entra nella cellula vegetale grazie a un sistema di secrezione di tipo IV e ne guida il funzionamento,

provocando la formazione del tumore e la produzione di composti (opine e agrocinopine) che solo *Agrobacterium* è in grado di utilizzare come nutrienti.

Il T-DNA si integra in diversi punti dei cromosomi della cellula vegetale, e ne guida il funzionamento codificando la produzione di citochinine e di acido indolacetico, ormoni vegetali che sbilanciano la crescita delle cellule, provocando il tumore, che fornirà nutrienti al batterio: altri geni, infatti, dirigono la sintesi e il rilascio di nuovi metaboliti vegetali: le opine (derivati di aminoacidi) e le agrocinopine (zuccheri fosforilati).



solo *Agrobacterium* può utilizzare le opine

Entrambi i composti sono diversi da quelli prodotti normalmente dalle piante e costituiscono una fonte di nutrimento riservata per *A. tumefaciens*, che li utilizza come unica fonte di carbonio e di energia, grazie a permeasi e geni metabolici dedicati, mentre gli altri batteri non possono usarli. I geni che si trovano sulla porzione di plasmide rimasta

nel batterio, infatti, codificano la permeasi necessaria per il trasporto dei metaboliti particolari e gli enzimi utili per metabolizzarli. Esistono diversi tipi di plasmidi Ti, che permettono la produzione di opine differenti: uno dei tipi più comuni codifica la produzione di nopalina e agrocinopina A, mentre altri codificano la produzione di ottopina e agropina.

INTERAZIONI MICRORGANISMI-INVERTEBRATI

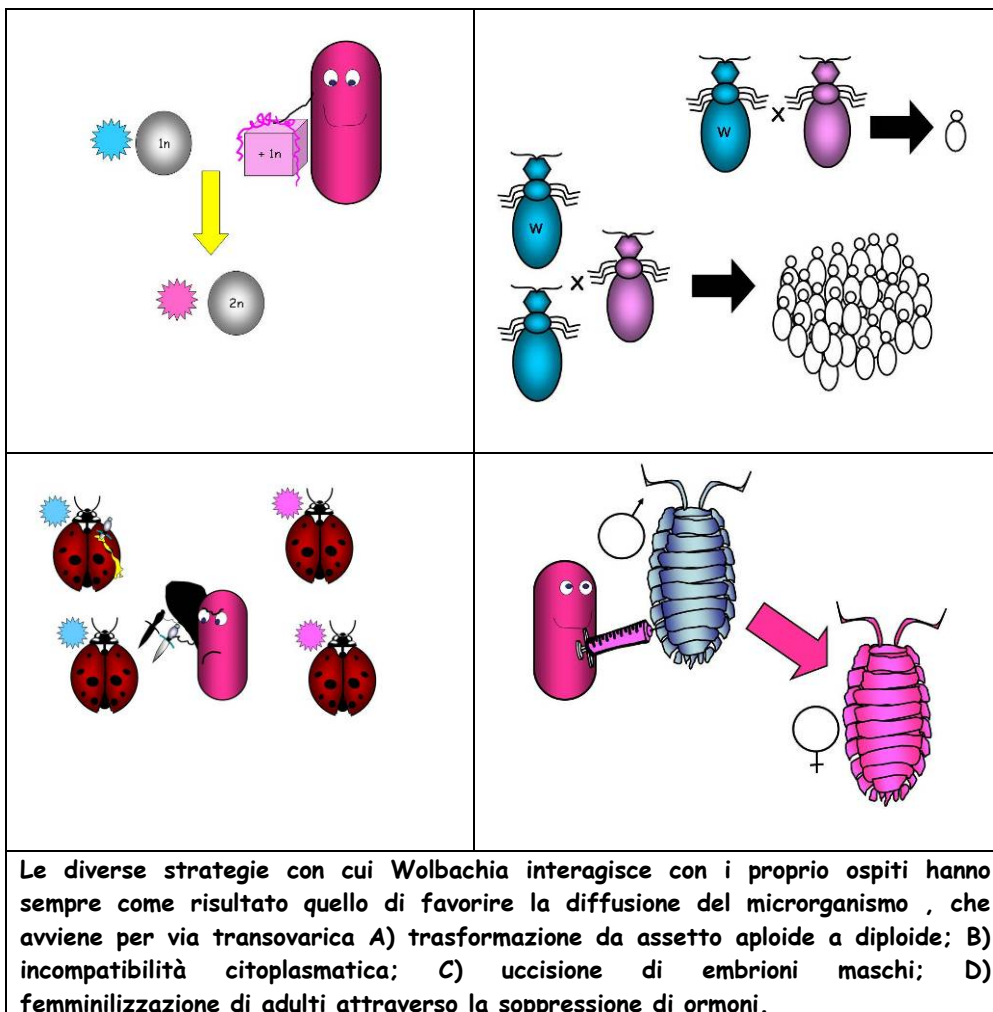
microrganismi-insetti:

I microrganismi intraprendono molte relazioni con gli invertebrati; spesso come endosimbionti. Un esempio di questo tipo di interazione è quello degli afidi che, nutrendosi della linfa delle piante, a contenuto quasi esclusivamente zuccherino, hanno un endosimbionte batterico (*Buchnera apidicola*), che sintetizza gli aminoacidi per loro. Per poter sintetizzare aminoacidi in quantità sufficiente a entrambi, *Buchnera* deve superare l'inibizione da feedback. Questo scopo è stato ottenuto attraverso lo spostamento dei geni deputati alla sintesi degli aminoacidi su di un plasmide multicopia. In questo modo la quantità di aminoacidi necessaria per bloccare la sintesi aumenta considerevolmente e, dal momento che l'insetto continua a consumare regolarmente gli aminoacidi, non si determina accumulo e la sintesi non viene mai

interrotta. In altri casi la relazione può essere di parassitismo, con effetti diversi, a seconda della specie di invertebrato interessata.

Wolbachia

Le associazioni simbiotiche con microrganismi sono particolarmente diffuse tra gli insetti, riflettendo anche l'enorme diversità di questi ultimi negli ambienti terrestri, e influenzano la fisiologia, la biochimica, la morfogenesi la riproduzione dei loro ospiti. Negli invertebrati, i microrganismi endosimbionti possono influenzare la determinazione del sesso e la riproduzione. Un esempio paradigmatico è quello di *Wolbachia*, un microrganismo che vive all'interno delle cellule. Gli endosimbionti sono trasmessi verticalmente per via materna nel citoplasma delle uova e appartengono al gruppo degli α -proteobatteri. Come regola generale, i microrganismi trasmessi verticalmente tendono a evolvere verso relazioni neutre o benefiche, dato che la loro sopravvivenza è legata in modo inestricabile al successo dell'ospite, ma è raro che *Wolbachia* avvantaggi il proprio ospite, almeno a quanto si è potuto stabilire finora.



Questo microrganismo, tuttavia, è in grado di mantenere la propria circolazione all'interno delle popolazioni ospiti, modificandone la biologia riproduttiva. Nella maggior parte degli insetti il sesso è determinato geneticamente, in modi diversi: nei ditteri gli zigoti XX sono femmine e quelli XY maschi; nei lepidotteri sono le femmine a svilupparsi dagli zigoti eterogametici ZW, mentre i maschi si sviluppano da quelli omogametici ZZ; negli imenotteri, invece, la determinazione del sesso è aploidiplode e le femmine nascono dalle uova fecondate ($2n$) i maschi da quelle non fecondate (n). In questi schemi *Wolbachia* si inserisce in vario modo, ottenendo tuttavia lo stesso risultato: quello di favorire la nascita di femmine in grado di mantenere e espandere il livello di infezione nella popolazione dell'ospite. Nelle vespe parassite e nei tripidi infettati le uova aploidi, normalmente destinate a svilupparsi come maschi, diventano diploidi e danno origine a individui femmina; in questo caso quindi, *Wolbachia* induce la partenogenesi. In molti altri insetti e in alcuni artropodi terrestri, invece, la presenza di *Wolbachia* provoca una incompatibilità citoplasmatica che fa sì che gli zigoti formati da un gamete maschile infetto e da un gamete femminile non infetto vadano incontro a un'elevata mortalità embrionale. Nelle drosofile, in molte farfalle e nelle coccinelle, *Wolbachia* uccide in modo selettivo gli embrioni maschi.

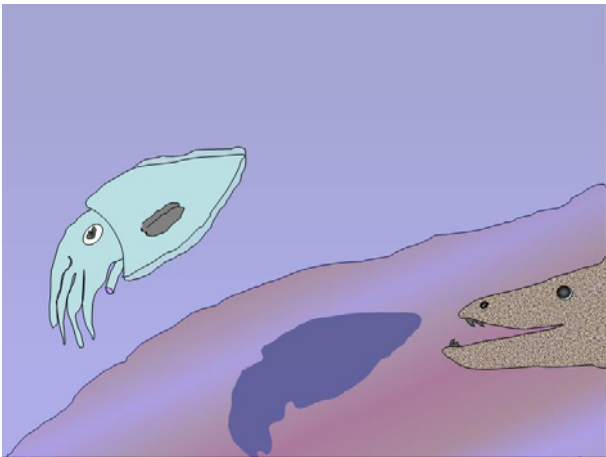
Tutti questi fenotipi riproduttivi incrementano la diffusione del microrganismo nella popolazione dell'ospite, che avviene per trasmissione femminile; il bersaglio su cui agisce *Wolbachia* è probabilmente qualche componente cellulare o molecolare, implicato nella determinazione del sesso durante l'embriogenesi. In qualche caso l'endosimbionte può agire con un ulteriore meccanismo, determinando la femminilizzazione di individui geneticamente maschi. Questa strategia è stata osservata nel porcellino di terra, il crostaceo terrestre *Armadillidium vulgare*, e in alcuni lepidotteri come la farfalla gialla *Eurema hecabe*. Esperimenti condotti trattando le farfalle con antibiotici e iniziando il trattamento a stadi diversi dello sviluppo, fino all'impupamento, hanno dimostrato che nel caso della femminilizzazione, *Wolbachia* esercita la propria azione sugli individui geneticamente maschi durante tutto il processo di sviluppo.

La simbiosi con *Wolbachia* non è irrinunciabile perché individui curati dal simbionte (aposimbiotici) non mostrano alterazioni fisiologiche. Nel caso della vespa *Asobara tabida*, tuttavia, non è possibile ottenere linee aposimbionti perché le femmine aposimbiotiche sono incapaci di portare a maturazione gli oociti e non possono riprodursi. In questa specie di

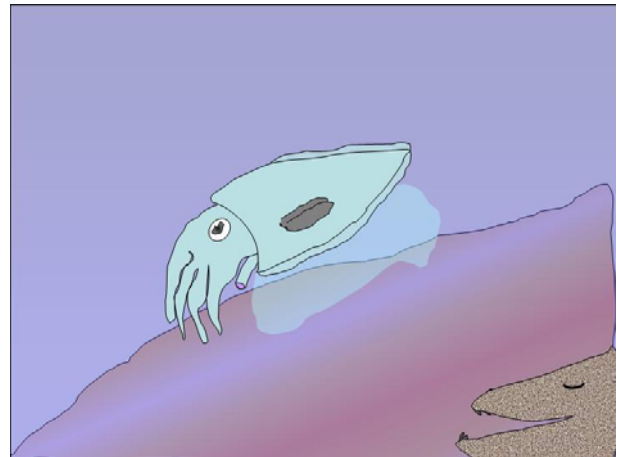
vespe, quindi, la simbiosi con *Wolbachia* sembra abbia cessato di essere facoltativa per evolvere verso l'irrinunciabilità.

Anche *Bacillus thuringensis* e *Paenibacillus popilliae* (bastoncelli monodermi, sporigeni, aerobi) si comportano da patogeni nei confronti di alcune specie di insetti; le loro interazioni con i rispettivi ospiti saranno discusse sotto la voce "controllo biologico".

Calamaro-*Vibrio fischeri*



la sagoma scura del calamaro potrebbe denunciarlo ai predatori,



ma la luminescenza emanata dal *Vibrio* simbionte provvede a mimetizzarlo

Una delle simbiosi più note tra un batterio e un organismo invertebrato, è quella tra il calamaro *Euprymna scolopes* che vive in acque basse nei mari delle Hawaii e caccia di notte. La sua ombra sarebbe un indizio sicuro per i predatori, ma *Euprymna* ospita in un organo particolare (organo luminoso) un batterio simbionte luminescente: *Vibrio fischeri*. Il debole chiarore emesso dal *Vibrio* mimetizza il calamaro, facendolo apparire simile alla luce del cielo stellato. Nell'organo luminoso, *V. fischeri* si trova in coltura pura: viene infatti "selezionato" dal calamaro per mezzo dell'affinità per un gel mucoso che solo *V. fischeri* e poche altre specie riescono ad attraversare per raggiungere l'organo luminoso. All'interno dell'organo luminoso il calamaro secerne poi una mieloperossidasi (simile all'enzima deputato a uccidere i patogeni all'interno dei globuli bianchi umani) fatale per la maggior parte dei batteri ma non per *V. fischeri* che è il solo "ammesso" nell'organo luminoso.

V. fischeri è in grado di svolgere vita libera (ma in questo caso non è luminescente), e i vantaggi che trae dall'associazione con il calamaro stanno probabilmente nella amplificazione indisturbata della popolazione e nella possibilità di trasporto offerti dal calamaro. Le cellule batteriche producono luce solo quando si trovano all'interno dell'organo luminoso, dove possono raggiungere una elevata concentrazione. Questo accade perché il gene della luciferasi è

regolato da un sistema di tipo "Quorum sensing" (la risposta QS è stata scoperta proprio grazie al fenomeno della chemioluminescenza di *V. fischeri*). La densità della popolazione di *Vibrio* all'interno dell'organo luminoso è regolata attivamente dal calamaro, che espelle regolarmente aliquote di batteri, durante il giorno, mediante contrazioni dell'organo luminoso. L'emissione di luce da parte del *Vibrio* è dovuta alla produzione di luciferasi. La luciferasi di *V. fischeri* è estremamente sensibile alla mancanza di ossigeno e viene impiegata in test tossicologici per valutare la qualità ambientale.

ASSOCIAZIONE MICRORGANISMI-VERTEBRATI

L'associazione eucariota-procariota che possiamo osservare oggi, è frutto di un lungo cammino: i batteri erano già evoluti nella loro complessità metabolica nel momento in cui piante ed animali cominciarono ad apparire e hanno quindi colonizzato gli eucarioti nel corso di tutta la storia evolutiva di questi ultimi. Gli eucarioti forniscono ai microrganismi una notevole varietà di possibili ambienti e si sono quindi create molte e diverse relazioni, più o meno strette, che sono in genere di commensalismo o in qualche caso mutualismo. Le capacità peculiari dei batteri che possono venire utilizzate dagli eucarioti, sono soprattutto due: l'azoto fissazione e l'idrolisi della cellulosa. La prima capacità è utilizzata soprattutto dalle piante, con cui gli azoto-fissatori entrano in relazione come ecto o endo-simbionti. Gli animali non traggono vantaggio in genere da questa proprietà, tanto che fenomeni di azoto-fissazione sono stati osservati solo nell'intestino delle termiti e di umani la cui dieta sia molto ricca in carboidrati. La capacità di idrolizzare la cellulosa manca negli animali evolutivamente superiori ai molluschi (con l'unica eccezione del *Lepisma lineata*) e quindi si sono instaurate diverse simbiosi mutualistiche con batteri e protozoi cellulosolitici, a causa dell'abbondante contenuto in cellulosa di molti alimenti.

Negli erbivori, vertebrati o invertebrati, il tratto intestinale è allungato, rispetto a quello degli omnivori e dei carnivori, in modo da favorire l'insediamento dei microrganismi, e provvedere così una specie di "contenitore" per le fermentazioni procariotiche.

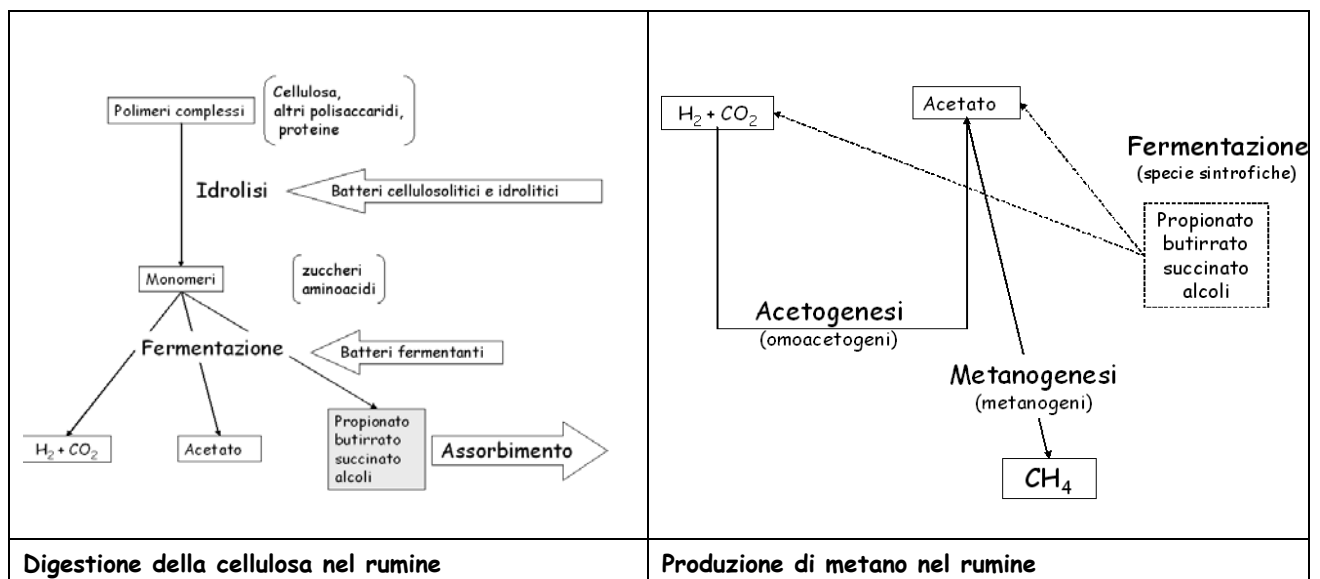
La simbiosi nel rumine

I ruminanti, come gli altri mammiferi, non sono in grado di digerire la cellulosa e dipendono dai microrganismi ectosimbionti, per vivere con una dieta in cui la fonte principale di carboidrati è la cellulosa. Il tratto digerente di un ruminante contiene quattro stomaci successivi: i primi due formano il rumine e sono essenzialmente delle ampie camere di fermentazione. Il

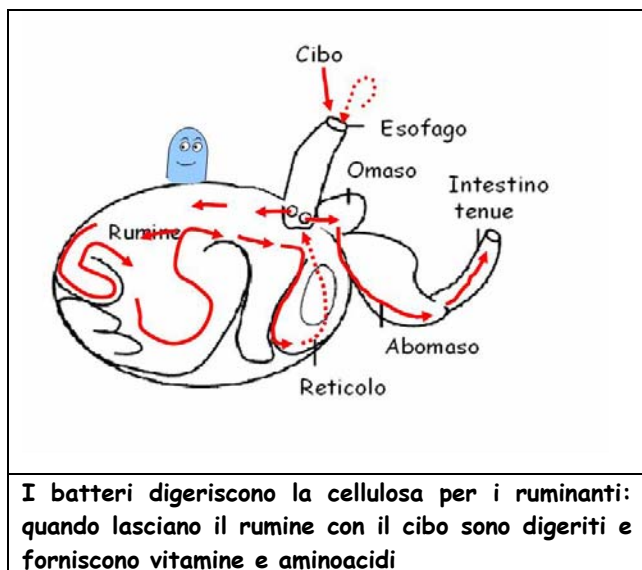
materiale vegetale ingerito si mescola con la saliva e passa nel rumine dove è rapidamente attaccato da batteri e protozoi (10^{10} cellule/ml). Il ruolo dei protozoi (per la maggior parte ciliati) è importante non solo per la degradazione dei prodotti della cellulosa, ma soprattutto per il controllo della popolazione batterica, effettuato attraverso la predazione. La saliva dei ruminanti non contiene enzimi digestivi; è semplicemente una soluzione diluita di sali (carbonato e fosfato di sodio) che provvede una buona base nutritiva per i microrganismi del rumine. In ogni millilitro del contenuto del rumine sono presenti circa $1-5 \times 10^{10}$ batteri, 1 milione di protozoi ed un numero variabile di lieviti e funghi. Tutti i processi che avvengono nel rumine sono anaerobi.

Il materiale vegetale è costituito soprattutto da cellulosa, pectina e amido, insieme a peptidi e lipidi. Il processo digestivo inizia con la degradazione delle macromolecole polimeriche.

I microrganismi fermentanti interagiscono tra loro, supportandosi in una complessa rete trofica in cui i prodotti di scarto di una specie possono servire come nutrienti per altre specie.



Classificandoli in gruppi a seconda della funzione svolta nel rumine, troviamo microrganismi che scindono la cellulosa (cellulosolitici); che degradano le emicellulose (emicellulosolitici); che digeriscono l'amido (amilolitici); che attaccano le proteine (proteolitici); che utilizzano zuccheri- mono e disaccaridi (saccarolitici); specie batteriche che utilizzano come substrati



gli acidi lattico, succinico, malico (prodotti di altre fermentazioni); batteri che producono ammoniaca, batteri che sintetizzano vitamine, e microrganismi (archibatteri) metanogeni.

La percentuale di batteri cellulosolitici nel rumine è compresa tra l'1 ed il 5%. L'idrolisi della cellulosa è svolta da cellulasi extracellulari che la degradano a cellobiosio e glucosio. Le specie più rappresentate sono *Bacteroides succinogenes* e *Ruminococcus*,

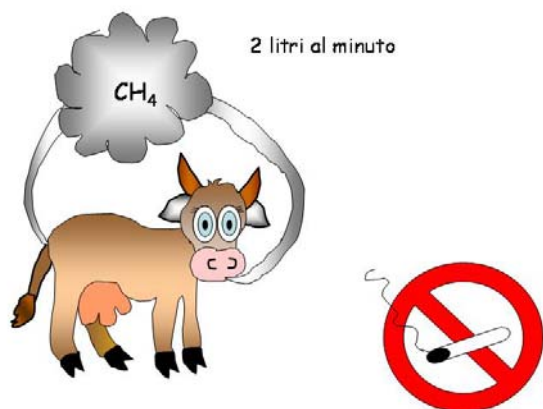
entrambe anaerobie.

Altri microrganismi fermentano rapidamente sia il glucosio che il cellobiosio, producendo acetato, acidi grassi (propionico, butirrico) e gas (idrogeno e CO_2).

Gli acidi grassi vengono assorbiti attraverso le pareti del rumine e passano nel sangue giungendo ai vari organi, dove vengono utilizzati nella respirazione cellulare; solo una piccola percentuale viene riconvertita in idrogeno, anidride carbonica e acetato dalle specie sintrofiche⁵. La popolazione microbica del rumine aumenta rapidamente e le cellule microbiche passano nelle regioni inferiori dell'apparato digerente insieme al materiale vegetale ancora indigerito. Il rumine non produce enzimi digestivi, ma nel tratto inferiore dello stomaco vengono prodotte proteasi che uccidono e digeriscono i microrganismi che vi giungono con il cibo. I composti azotati e le vitamine che ne derivano vengono assorbiti dal ruminante.

All'interno del rumine, le specie metanogene (es: *Methanobrevibacter ruminantium*) trasformano idrogeno, acetato e CO_2 in CH_4 .

⁵ Le specie sintrofiche svolgono reazioni chimiche caratterizzate da un ΔG positivo, che non sarebbero possibili se il loro prodotto non rappresentasse il substrato per il metabolismo dei metanogeni e non fosse quindi continuamente allontanato con alta efficienza.



Dal punto di vista economico la produzione di metano è indesiderabile perché sottrae parte del carbonio che potrebbe contribuire all'accrescimento dell'animale.

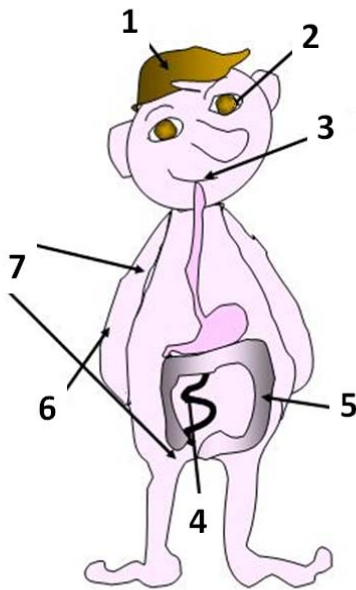
La conoscenza delle esigenze nutrizionali e delle vie metaboliche del microbiota del rumine riveste un'importanza notevolissima per lo studio dell'alimentazione del bestiame.

Variazioni nell'alimentazione possono influenzare la composizione del microbiota e alterare i rapporti tra i prodotti delle fermentazioni, che a loro volta hanno una ricaduta immediata sulla resa.

Gli studi sul microbiota del rumine hanno messo in evidenza, ad esempio, la diversa influenza di differenti alimentazioni sulla resa preferenziale in carne o latte.

A partire dagli anni '70, a Cuba e più tardi in Messico e nella Repubblica Dominicana, la necessità di utilizzare i residui della lavorazione della canna da zucchero, ha dato impulso alla sperimentazione di alimenti non convenzionali, a base di melasse. Questi alimenti tuttavia non hanno ottenuto i risultati desiderati. L'aggiunta di piccole quantità di proteine preformate (farine di pesce peruviane) ha aumentato drasticamente la resa della crescita del bestiame. Questo sistema di alimentazione non era invece in grado di supportare livelli elevati di produzione di latte. La dieta basata sulle melasse provoca uno spostamento delle reazioni nel rumine, verso una maggiore produzione di acido butirrico e una minore produzione di acido propionico, questo spostamento, a sua volta, determina un apporto insufficiente di composti glucogenici, necessari per il processo di lattazione. Una sostituzione delle melasse con grani di mais migliorava nettamente la produzione di latte.

il microbiota normale del corpo umano

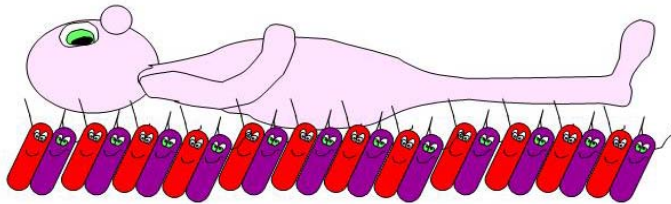


1. cuoio capelluto 10^5-10^6
2. occhi (protetti) $<10-10^3$
3. cavo orale 10^9
4. intestino tenue 10^5-10^6
(lattobacilli enterococchi)
5. intestino crasso 10^9-10^{11}
(pH alcalino, Gram-negativi)
6. cute secca 10^3
7. cute umida 10^6-10^7

microrganismi/ grammo di tessuto o cm² di superficie

Gli eucarioti forniscono ai microrganismi una notevole varietà di possibili ambienti, tanto che, nel corso dell'evoluzione, si sono create relazioni più o meno strette tra eucarioti e batteri. Queste interazioni sono in genere di commensalismo o in qualche caso mutualismo. Nei casi di mutualismo il vantaggio per l'eucariota è evidente; in altri casi può non essere apparente ma è reale se si considera che i microrganismi colonizzatori rappresentano una protezione nei confronti di specie patogene di cui ostacolano l'attecchimento. Un esempio di batteri commensali può essere quello delle specie saprofiti che risiedono nell'orecchio o sui genitali. Un esempio di una relazione simbiotica positiva è quella della comunità microbica che riceve nutrimento e riparo nell'intestino e che produce vitamina K e vitamine del complesso B, che vengono assorbite e fanno parte della nutrizione umana. In qualche caso alcuni microrganismi possono diventare pericolosi in situazioni particolari: si definiscono specie opportuniste. *Staphylococcus aureus* può essere indicato come un esempio di opportuniste: normalmente presente nel naso e nella gola di più del 50% della popolazione, può approfittare di altre malattie, di interventi chirurgici o di depressione delle difese immunitarie, per invadere i tessuti e comportarsi da patogeno.

La quantità di microrganismi presenti sul corpo umano è sbalorditiva: una persona "media" ha circa 10^{13} cellule proprie, 10^{14} cellule batteriche nell' intestino e 10^{11} cellule batteriche sulla pelle. Aree colonizzate da specie saprofite sono: il tratto respiratorio superiore (stafilococchi, streptococchi alfa-emolitici, micrococchi, neisserie saprofite..), il primo tratto



dell'uretra, la vagina (lattobacilli, che ne mantengono il pH acido), il meato uditivo esterno; alcuni microrganismi sono

In termini percentuali, il 90% delle cellule presenti in un corpo umano è procariotico normalmente presenti anche

sulla congiuntiva, dove il loro numero viene tenuto sotto controllo dalle lacrime che contengono lisozima (ad azione antibatterica) e svolgono un'azione costante di detersione meccanica. Le aree più densamente colonizzate sono intestino e cute.

INTESTINO: Il tratto gastro-enterico umano comprende: il cavo orale, l'esofago, lo stomaco, l'intestino tenue, il ceco, il crasso. Ognuno di questi segmenti può essere ulteriormente suddiviso in ecosistemi differenti (es epiteli, lume, cripte).

Nel cavo orale e si trovano molte specie sia aerobie che anaerobie; lo stomaco, a causa del pH acido non è popolato da microrganismi colonizzatori. Nell'intestino superiore, i microrganismi sono pochi (soprattutto lattobacilli e enterococchi) ma man mano che il pH del contenuto intestinale si alcalinizza aumentano fino a raggiungere una densità di 10^{11} per grammo di feci e sono soprattutto Gram-negativi. *E. coli* rappresenta circa l'1% della popolazione che è costituita prevalentemente da anaerobi (*Bacteroides* e altri). Il processo di colonizzazione del tratto intestinale avviene mediante una normale successione di specie e nell'età infantile, anche in correlazione al tipo di alimentazione; i microrganismi stanziali mantengono livelli di colonizzazione più o meno costanti e possono essere intimamente associati alle cellule epiteliali nell'area colonizzata.

Le osservazioni sull'effetto protettivo della flora intestinale contro i patogeni è stato all'origine degli studi sull'impiego di microrganismi probiotici (bifidobatteri e lattobacilli) come additivi per gli alimenti.

CUTE: la cute umana è un ambiente omogeneo rispetto alla temperatura ma il tasso di umidità è variabile e definisce ambienti differenti dove si trovano specie diverse. L'acqua disponibile, infatti, rappresenta il fattore abiotico più importante nel limitare la quantità di flora presente. Se si occlude un'area della cute dell'avambraccio (secca) con un cerotto a tenuta, nel giro di 4 giorni la popolazione microbica passa da 3×10^3 a 3×10^8 cellule batteriche /cm². Le densità microbiche più alte si hanno nel cavo ascellare, che è la zona maggiormente umida. Tra le specie stanziali si possono citare micrococchi, stafilococchi streptococchi, difteroidi e micobatteri saprofiti. Il nutrimento per i batteri è fornito dal sebo. I microrganismi che risiedono nelle ghiandole sebacee e nei follicoli di peli e capelli non possono essere raggiunti con la normale pulizia, e provvedono al rapido ripopolamento delle aree, immediatamente dopo la detersione.

animali germ-free

Molte informazioni sull'importanza e sul significato della comunità microbica si sono potute ottenere facendo nascere animali in sterilità (con parto cesareo o sterilizzando il guscio dell'uovo prima della schiusa) in modo che non fossero colonizzati alla nascita, e facendoli crescere in camere sterili, con cibo sterilizzato. Animali nati e allevati con questa tecnica si dicono "germ free". E' stato possibile osservare che hanno difese immunitarie meno efficienti, stati di avitaminosi che devono essere bilanciati con la dieta, processi digestivi più lenti e meno efficienti. Animali germ-free possono essere fatti colonizzare sperimentalmente con una singola specie batterica, in modo da poter studiare le interazioni in assenza di interferenze da parte di altre specie microbiche; in questo caso si definiscono "GNOTOBIOTICI". Lo studio su animali gnotobiotici, per esempio, ha permesso di dimostrare l'importanza di *Streptococcus mutans* e di una dieta a elevato tenore zuccherino nel causare la carie dentaria.

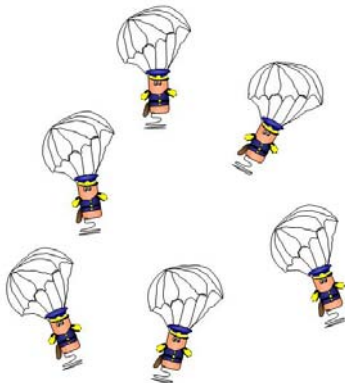
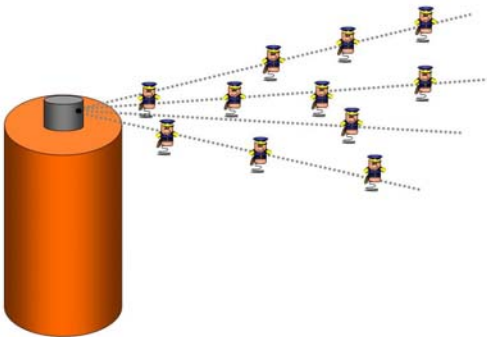
USO DELLE INTERAZIONI CON VIVENTI

IL CONTROLLO BIOLOGICO



Gli ambienti naturali tendono ad essere bilanciati: gli organismi dipendono e sono limitati gli uni dagli altri attraverso diverse interazioni. L'influenza umana può spostare questi equilibri e questo è particolarmente evidente quando venga introdotto in un ambiente un organismo "estraneo", di proposito o incidentalmente. Il nuovo organismo può trovare un ambiente favorevole, privo di alcune restrizioni ("il complesso dei nemici naturali") che potevano essere applicate nel suo ambiente originario, e può accadere che si moltiplichi indisturbato diventando invasivo.. Con il termine "controllo biologico" si indicano le pratiche o i processi che permettono di controllare un organismo dannoso grazie a un organismo benefico.

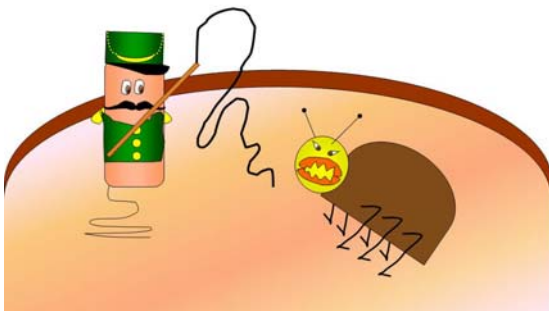
:Ci sono tre diversi modi di ottenere un controllo biologico :

	RILASCIO "A INONDAZIONE" (controllo biologico classico) in cui un nemico naturale di un organismo-invasivo, viene introdotto in una regione in cui non era presente in precedenza, per controllare a lungo termine il problema. Un esempio di questa tattica è quello dell'uso di <i>Paenibacillus popilliae</i> per il controllo dello scarafaggio giapponese negli USA.
	APPROCCIO DI TIPO BIOPESTICIDA: (es. <i>Bacillus thuringensis</i> e <i>Agrobacterium K84</i>) l'agente di controllo viene applicato nella misura in cui e quando è necessario, come se si trattasse di un insetticida.



RILASCIO A INONDAZIONE: *Paenibacillus popilliae*

Lo scarafaggio giapponese, *Popillia japonica* fu introdotto accidentalmente negli USA all'inizio del secolo scorso. L'insetto, che non rappresenta un problema nella sua area di origine, ha causato danni molto gravi nel nuovo ambiente, diffondendosi dal sito dei primi avvistamenti (New Jersey, 1916) a quasi tutti gli stati ad est del Mississippi, dove attualmente è presente. L'insetto adulto attacca le foglie, distruggendone il tessuto tra le nervature e si accumula sui frutti che maturano; le larve



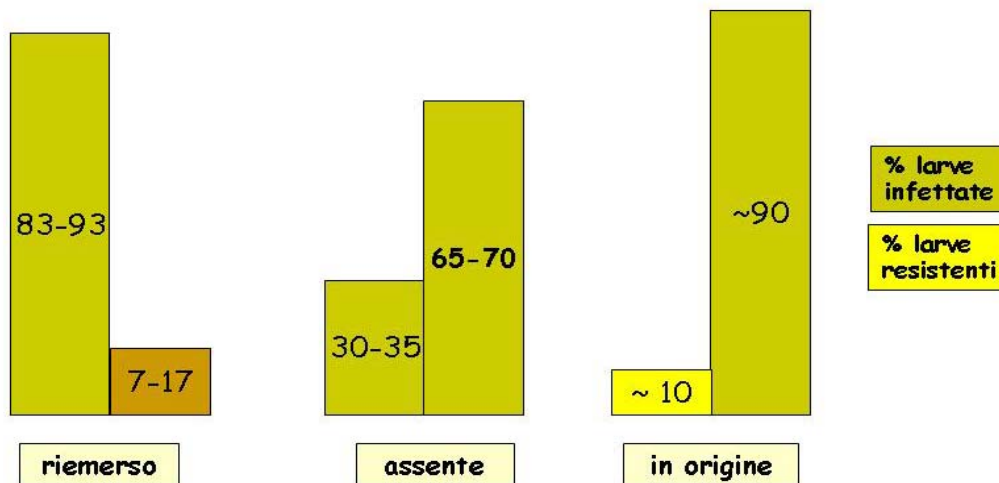
distruggono le radici del manto erboso in cui vengono deposte le uova, in particolar modo nelle aree di nuova colonizzazione, dove non sono presenti nemici naturali. Dal 1930 il problema è divenuto talmente serio da suscitare intense ricerche sulla possibilità di un controllo biologico. I risultati di queste ricerche hanno portato alla scoperta di una malattia naturale delle larve (Milky disease) caratterizzata dalla presenza di spore batteriche, molto rifrangenti, nell'emolinfa delle larve. L'agente eziologico della malattia è un batterio gram-positivo, sporigeno, aerobio: *Paenibacillus popilliae*.

P. popilliae è stato quindi introdotto nell'uso per controllare lo scarafaggio giapponese negli Usa; in Europa viene a volte usato per contrastare un altro coleottero: *Amphimallon majalis*. Oltre a essere molto virulento, *P. popilliae* persiste a lungo nel terreno e può quindi essere usato con somministrazioni massicce per ottenere un controllo definitivo. Sfortunatamente non cresce bene su terreni di coltura e deve essere propagato sulle larve.

Interazione con l'ospite: le spore, ingerite dalle larve nel suolo, germinano nell'intestino entro due giorni; e le forme vegetative (cellule batteriche) proliferano, raggiungendo il numero massimo in 3-5 giorni; in questo tempo, alcuni batteri penetrano attraverso le pareti intestinali, raggiungono l'emolinfa e vi si moltiplicano. In 14 - 21 giorni ha luogo una massiccia sporulazione, che conferisce alla larva la tipica apparenza, biancastra e lattiginosa che ha dato il nome alla malattia (Milky disease). In condizioni di laboratorio le larve restano vive fino a questo stadio e quando muoiono rilasciano nel terreno le spore, mantenendo un buon livello di protezione nel sito trattato. A volte, ceppi troppo virulenti possono causare la morte anticipata delle larve. Questo è un danno perché il processo di sporulazione si ferma con la morte dell'ospite e una morte precoce della larva non permette il rilascio di una quantità di spore sufficiente a garantire la protezione del sito.

I vantaggi	Gli svantaggi
(1) uno spettro d'ospite molto stretto (che riduce la possibilità di danni ad altri insetti non dannosi, e quindi l'interferenza con le reti trofiche) (2) la completa sicurezza per l'uomo e per gli altri vertebrati (per esempio non cresce a 37°C); (3) la compatibilità con altri agenti di controllo (4) la persistenza nel sito, che garantisce un controllo prolungato nel tempo	(1) Il costo elevato, dovuto alla produzione in vivo (2) l'azione lenta (3) la mancanza di effetto sugli scarafaggi adulti, che causano i danni più evidenti (4) la relativa mancanza di convenienza per i piccoli proprietari.

Problemi emergenti: ci sono dati che dimostrano come lo scarafaggio giapponese stia riemergendo in regioni dove era stato controllato in modo efficace dall'iniziale applicazione delle spore fin dal 1940. Le spore raccolte dai siti in cui si è verificato questo fenomeno riescono ad infettare solo il 7-17% delle larve in test di laboratorio. Spore provenienti dallo stato di New York, dove questo fenomeno non si è verificato, ne infettano il 65-70%. Anche queste cifre tuttavia, sono ben lontane dal 90% atteso in base ai dati originali. E' molto probabile che il calo di virulenza sia l'effetto combinato di una riduzione di virulenza in *B. popilliae* e di un'aumentata resistenza dell'insetto.

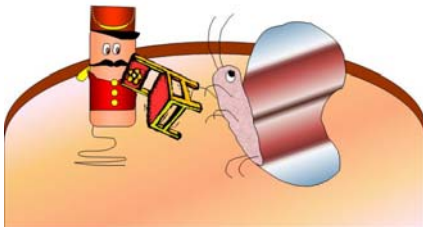


L'efficacia del controllo su *Popillia japonica* va diminuendo

Un'evenienza di questo tipo è facilmente effetto di un naturale processo di adattamento e selezione (un patogeno obbligato che uccida il suo ospite con un'eccessiva rapidità va incontro ad uno svantaggio selettivo).

rilascio a biopesticida

1) B. THURINGIENSIS



B. thuringiensis è largamente usato come insetticida biologico in tutto il mondo

B. thuringiensis è alla base di insetticidi microbici, brevettati ed usati in tutto il mondo per il controllo di molti parassiti delle piante, in particolar modo larve di lepidotteri Scoperto nel 1911 come patogeno della tignola della farina in Turingia (Germania) è stato usato come insetticida commerciale per la prima volta in Francia nel 1938. Dal 1960 sono state introdotte nell'uso varianti particolarmente virulente e con uno spettro d'ospite più

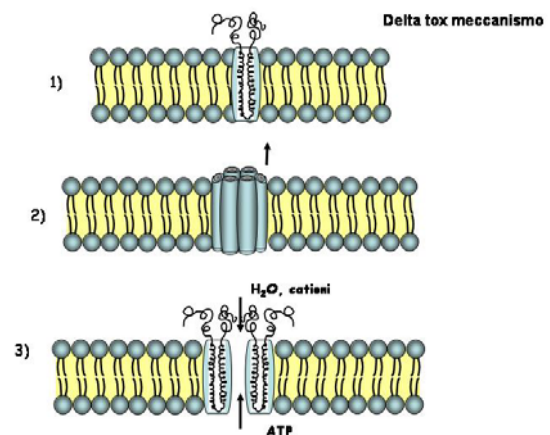
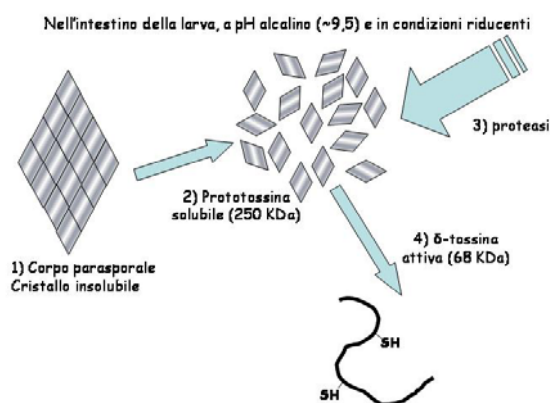
vasto. La più comune è la varietà "*kurstaki*" la varietà "*israelensis*" è usata contro le zanzare *Culex* spp. e *Anopheles* spp per la prevenzione della malaria, e contro le mosche nere simulidi che sono i vettori dell'oncocercosi (cecità del fiume-Africa).

Le varietà *san diego* o *tenebrionis* sono efficaci nel controllo di coleotteri

La maggior parte dei ceppi possiede lo stesso tipo di tossina ma differisce per lo spettro d'ospite, probabilmente grazie a differenti gradi di affinità di legame ai recettori per la tossina nell'intestino degli insetti.

Meccanismo d'azione: I cristalli (corpi parasporali) sono aggregati di una proteina che è una prototossina e deve essere attivata per acquistare attività biologica. La proteina cristallizzata è fortemente insolubile in condizioni normali, così da essere perfettamente sicura per l'uomo, gli animali superiori e la maggior parte degli insetti. Viene tuttavia solubilizzata in condizioni riducenti (anaerobiosi) a pH elevato (sopra 9.5) - queste sono le condizioni presenti normalmente nell'intestino delle larve dei Lepidotteri. Per questo motivo il Bt è altamente specifico.

Una volta solubilizzata, la proteina viene tagliata da una proteasi dell'ospite e dà origine ad una tossina di circa 60kD, chiamata delta-tossina.



la tossina CRY si attiva solo nell'intestino della larva

la tossina si inserisce nella membrana degli enterociti, formando canali

La tossina si lega alle cellule epiteliali intestinali e determina la formazione di pori nelle membrane cellulari, che portano all'equilibrio la concentrazione ionica all'esterno ed all'interno dell'intestino. L'intestino si immobilizza ed il pH interno si abbassa, equilibrandosi con quello del sangue. In questa nuova situazione le spore germinano e le forme vegetative invadono la larva, provocando una setticemia fatale.

Studi recenti sulla struttura della delta-tossina hanno dimostrato l'esistenza di tre domini: il dominio I (un fascio di alfa eliche) ha la funzione di inserirsi nella membrana delle cellule intestinali, formando dei pori che permettono il passaggio libero di ioni. Il dominio II, costituito da tre foglietti beta, è deputato a legarsi al recettore, mentre il dominio III è formato da foglietti beta strettamente impaccati, che proteggono l'estremità

carbossiterminale della tossina attiva da ulteriori azioni delle proteasi intestinali. (struttura essenzialmente simile alla tossina difterica)

Bt produce due tipi di tossine: il tipo principale è rappresentato dal gruppo delle tossine Cry (cristallina), codificate da diversi geni *cry*, il secondo tipo è costituito dal gruppo delle tossine citolitiche (Cyt), che possono rafforzare l'effetto delle tossine Cry.

Le tossine Cry sono codificate da geni plasmidici; in un singolo ceppo possono coesistere 5 o 6 plasmidi differenti, che possono codificare tipi di tossina diversi e scambiarsi tra ceppi grazie a processi coniugativi. Le possibili combinazioni di varietà di tossina sono quindi molto ampie, e la presenza di trasposoni nel genoma aumenta ancora le possibilità di ricombinazione e pongono le basi per le compagnie commerciali, per ottenere ceppi ricombinanti con combinazioni di tossine più efficaci. Il primo di questi prodotti è stato un ceppo che possiede due tossine CryIII, con diverse affinità di legame per lo scarafaggio del Colorado, e due tossine Cry di tipo I, attive contro i bruchi dei lepidotteri.

Questo approccio ha lo scopo di ritardare lo sviluppo della resistenza negli insetti bersaglio che, in questo modo, dovrebbe svilupparsi simultaneamente nei confronti di molte tossine. La resistenza a una singola tossina può infatti svilupparsi con relativa rapidità come è stato effettivamente osservato, in Paesi tropicali, con ceppi attivi sulle zanzare, che hanno perso la loro efficacia 1-2 anni dopo l'introduzione su larga scala. Le basi per la resistenza sono complesse e coinvolgono tutta una serie di fattori. Un dato incoraggiante, tuttavia, è che almeno in alcuni insetti, il recettore per la tossina è un enzima intestinale (aminopeptidasi-N) indispensabile per la vita così che una modificazione del recettore, (che porterebbe alla resistenza) potrebbe anche interferire con lo stato generale dell'insetto.

I prodotti a base di *B.thuringensis* rappresentano circa l'1% del mercato e sono costituiti da polveri a base di spore essiccate e cristalli di tossina, che vengono sparse nell'ambiente dove le larve si nutrono.

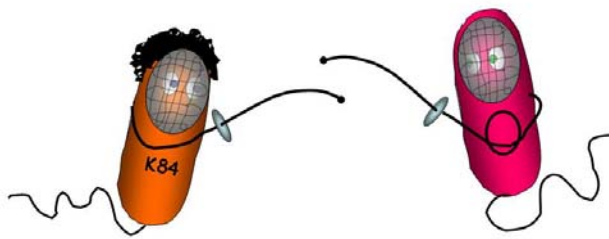
I geni che codificano la tossina "Cry" sono stati anche introdotti in diverse piante per mezzo delle tecniche di ingegneria genetica.

Uno dei limiti di questo metodo, per quanto riguarda la lotta alle zanzare, è la tendenza delle spore ad affondare, restando quindi disponibili per l'ingestione da parte delle larve, che si nutrono in superficie. Per ovviare a questo inconveniente alcuni ricercatori hanno

sperimentato l'ingegnerizzazione di batteri acquatici, su cui le larve si nutrono, con la tossina Cry. Buoni risultati si sono avuti con *Caulobacter* e *Asticcacaulis*.

2) AGROBACTERIUM CONTRO AGROBACTERIUM

Le malattie delle piante sono difficili da controllare: gli antibiotici, che potrebbero essere efficaci, sono molto costosi e comunque i composti che sono utilizzati in terapia umana non sono permessi in agricoltura. L'alternativa più efficace è il rame che è però potenzialmente fitotossico.



A. tumefaciens K84 è un buon antagonista contro i ceppi virulenti

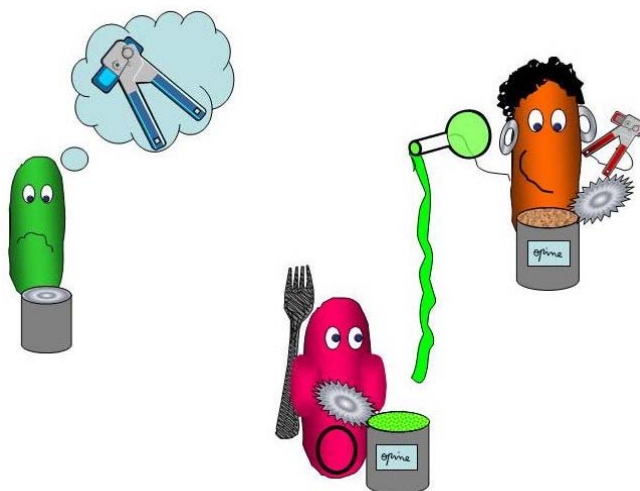
Per i ceppi di *A. tumefaciens* che producono nopalina, tuttavia, esiste un sistema di controllo biologico molto efficiente, scoperto da Allan Kerr in Australia, che viene usato già dal 1973. Kerr scoprì che un ceppo non patogeno di *A. tumefaciens* (il ceppo

K84) isolato da un sito infettato da un ceppo virulento, era in grado di prevenire completamente l'infezione quando veniva aggiunto alla pianta in modo da avere un rapporto 1:1 tra i due ceppi. Il ceppo K84 si usa sospendendo in acqua le cellule batteriche e immergendo nella sospensione i semi, le piantine o le talee prima di piantarle. Questo tipo di controllo agisce solo in via preventiva.

L'efficienza di questo ceppo nel biocontrollo è dovuto alla produzione di un inibitore che agisce solo sui ceppi che producono nopalina (la maggioranza) e non sui ceppi che producono ottopina-agropina, né su batteri diversi da *A. tumefaciens*. Un'azione di questo tipo escludeva che potesse trattarsi di un antibiotico a largo spettro e sembrava più coerente con il meccanismo di azione delle batteriocine. A differenza delle batteriocine che sono di natura proteica, il principio attivo del ceppo K84 (agrocina 84) è un nucleotide simile all'adenina a cui sono attaccati due gruppi laterali.

La tossicità selettiva dell'agrocina 84 nei confronti dei ceppi che producono nopalina è dovuta al fatto che questi ceppi inducono la pianta a produrre agrocinopine, e per poterle utilizzare, esprimono una agrocinopina permeasi codificata da un gene localizzato sulla porzione del plasmide Ti che resta nel microrganismo. L'agrocinopina-permeasi riconosce il gruppo glucofurano fosfato dell' Agrocina 84 e la introduce nella cellula batterica. Una volta entrata,

l'Agrocina 84 si comporta come analogo dell'adenina e blocca la sintesi del DNA nel patogeno. La sintesi di agrocina 84 in *Agrobacterium* K84 è codificata da geni che si trovano sul plasmide "pAgK84" il ceppo però contiene anche un altro plasmide (pNOC), su cui si trovano i geni deputati all'assunzione e all'uso della nopalina. In un sito infetto, in condizioni naturali, il ceppo K84 può proliferare approfittando della fonte di nutrienti dedicata al patogeno e contemporaneamente, producendo l'agrocina 84, lo uccide. Un altro vantaggio di K84 è rappresentato dall'ottima capacità di colonizzazione delle radici sia sane che ferite.



A differenza degli altri batteri del suolo, che non possono utilizzare la nopalina, sintetizzata dalla pianta a seguito dell'interazione con *A. tumefaciens*, il ceppo K84 ne è capace e produce agrocina 84, con cui uccide *A. tumefaciens*

Questa capacità non viene trasferita con i plasmidi e quindi è dovuta, almeno in parte, a geni cromosomici.

Un problema potenziale potrebbe essere costituito dalla possibilità di un trasferimento del plasmide pAgK84 ad altri batteri. Per quanto pAgK84 non sia un plasmide coniugativo, può capitare che venga mobilizzato nel corso del trasferimento di pNoc, che invece lo è. Se pAgK84 fosse trasferito in ceppi patogeni, questi diverrebbero resistenti all'agrocina 84: per evitare questa possibilità, il ceppo K84 è stato ingegnerizzato creando una delezione che ha asportato da pAgK84 la regione Tra (transfer) che ne aiuta il trasferimento. Il mutante che è stato ottenuto (*Agrobacterium* K1026), attualmente usato al posto del ceppo naturale, è stato il primo organismo geneticamente modificato rilasciato nell'ambiente. E' infatti assolutamente sicuro per uomo, animali (non cresce a 37°C) e piante e differisce dal ceppo naturale solo per la delezione sul plasmide.

3) PSEUDOMONAS NEL CONTROLLO DI "TAKE-ALL"

Gaeumannomyces graminis è un ascomicete molto aggressivo che attacca le radici di erba e cereali, distruggendole completamente: rappresenta un problema, non solo per l'agricoltura,

ma anche per impianti sportivi, come ad esempio i campi da golf. Alcuni batteri possiedono un'abilità straordinaria per riprodursi sulle radici e combattere la malattia provocata da *G. graminis*. Questa scoperta risale agli anni '60 e, negli anni '70, i microrganismi coinvolti furono identificati come pseudomonadi fluorescenti. Negli anni '90 è stato dimostrato che i ceppi responsabili della soppressione di take-all nei terreni colonizzati, producono due tipi di antibiotici attivi sul fungo patogeno: 2,4-diacetilfluoroglucinolo (Phl) e fenazina-1-acido carbossilico (PCA). I geni responsabili della sintesi di questi antibiotici sono stati anche trasferiti ad altri microrganismi. Per molto tempo il limite, nell'uso di questi ceppi, è stato rappresentato dalla competizione dei batteri del suolo, che provocava un brusca diminuzione dei ceppi "primer", aggiunti alle sementi con la medesima tecnica impiegata per *A. radiobacter* K84. Recentemente, tuttavia, sono stati isolati alcuni ceppi particolarmente efficienti nel colonizzare le radici e molto persistenti nel terreno. Questi ceppi particolari (premier) producono naturalmente il Phl e sono stati ingegnerizzati per renderli in grado di produrre anche il PCA. Attualmente sono in atto test preliminari su campo negli USA. I ceppi premier sono sicuri: fanno parte dell'ambiente naturale dell'avena e dell'erba, e prosperano solo finché l'avena cresce.

A differenza di quanto accade con altri ceppi la popolazione dei ceppi premier regge bene la competizione con le specie stanziali e si moltiplica rapidamente. Anche partendo da quantità molto esigue (solo 10.000 microrganismi per seme), questi ceppi raggiungono ben presto la quantità necessaria (qualche milione) per contrastare efficacemente *G. graminis*, e si mantengono ai livelli necessari per tutta la stagione della crescita delle piante. La rapidità e la persistenza di questi ceppi costituiscono un ulteriore vantaggio economico.

I ceppi premier sono considerati promettenti anche per altre colture e si spera che ulteriori ricerche portino alla scoperta di ceppi premier specifici per altre piante (sono già in corso esperimenti sulle fragole) che possano efficacemente sostituire il metilbromuro, uscito dall'uso nel 2005.

manipolazione dell'ambiente

Un esempio di questo approccio è il caso del controllo di *G. graminis* favorendo la crescita di *Phialophora graminicola*. Anche *P. graminicola* è un patogeno dell'apparato radicale, ma a differenza di *G. graminis*, non è in grado di invadere le cellule vive della corteccia radicale e di penetrare nell'endoderma; non entra quindi nel sistema vascolare e non causa una malattia

diffusa. Quando i suoi tentativi di penetrazione vengono fermati dalle difese dell'ospite, *P. graminicola* produce gruppi caratteristici di cellule rigonfie e pigmentate, che rendono facile identificarne la presenza sulle radici.

Phialophora non ha alcun effetto su *G. graminis* in condizioni di laboratorio: non danneggia e non distrugge le ife della specie patogena, non produce composti inibitori. La sua quindi è

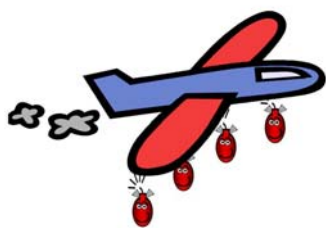
influenza del pH su attecchimento e crescita di <i>Phialophora graminicola</i>	
pH del Turf	% di radici di avena colonizzate da <i>Phialophora</i>
< 4,0	<1
4,0 - 4,5	3
4,5 - 5,0	21
5,0 - 5,5	25
5,5 - 6,0	48
> 6,0	100

un'azione indiretta, che si svolge attraverso una relazione di competizione e viene infatti definita "biocontrollo attraverso l'esclusione competitiva dalla nicchia". *P. graminicola* vive sulle radici e colonizza molto velocemente le cellule radicali che invecchiano e muoiono; sfruttando queste risorse, impedisce l'accesso alle ascospore

di *G. graminis*, che non hanno riserve sufficienti a sopravvivere se ne viene ostacolato l'accesso all'apparato radicale.

E' stato dimostrato che una leggera modificazione del pH del terreno può favorire notevolmente l'attecchimento di *P. graminicola* sulle radici, impedendone così l'invasione e la distruzione da parte del patogeno distruttivo *G. graminis*.

USO IMPROPRIO DEI MICRORGANISMI: LA GUERRA BIOLOGICA



Un'infezione è in genere causata da un incontro non programmato tra il patogeno e, di solito, la microbiologia si occupa di tentare di risolvere il problema a favore dell'ospite. Anche la microbiologia però ha il suo lato oscuro, e le conoscenze in questo campo possono essere impiegate nel tentativo di ottenere

e usare microrganismi patogeni come armi biologiche. Quando si parla di guerra biologica ci si riferisce all'impiego di microrganismi per neutralizzare o uccidere esseri umani. La maggior parte dei batteri patogeni o dei virus sono potenzialmente adatti all'impiego come armi biologiche ma, fortunatamente, non tutti presentano le caratteristiche "ideali" di un'arma biologica che deve essere:

facile da produrre e da liberare

sicura per chi intende usarla

efficace nel neutralizzare o uccidere i bersagli.

Le armi biologiche possono essere rappresentate da microrganismi (batteri o virus) naturali o modificati attraverso l'ingegneria genetica, o tossine.

La storia della guerra biologica affonda le sue radici nell'antichità: durante gli assedi era uso comune dell'esercito assediante catapultare cadaveri nella cerchia delle mura delle città sotto assedio o inquinare i pozzi con carogne di animali; anche in assenza di cognizioni precise sui motivi biologici, l'osservazione dei risultati aveva già sortito i suoi effetti.

La prima documentazione precisa risale alla guerra con gli indiani americani (1754-67) durante la quale gli inglesi distribuirono coperte provenienti da un ospedale per pazienti vaiolosi, scatenando un'epidemia devastante tra le tribù.

Per quanto i microrganismi potenzialmente utilizzabili siano moltissimi, la conoscenza sull'origine, i meccanismi di patogenesi e di trasmissione di molte malattie, insieme ai progressi in campo vaccinale e chemioterapico, hanno molto limitato il campo delle possibili applicazioni del bioterrorismo.

La rosa dei possibili candidati comprende *Bacillus anthracis* (carbonchio) *Yersinia pestis* (peste), *Francisella tularensis* (tularemia), *Clostridium botulinum* (o la sua tossina) e *Coxiella burnetii* (agente della febbre Q). Tra i virus si possono citare i *Poxvirus* (vaiolo), i virus dell'encefalite equina venezuelana, il virus Ebola. Alcuni di questi agenti sono dotati di un'elevata virulenza ma sono difficili da tenere sotto controllo e da disperdere. Gli agenti infettivi più "idonei" sono *B. anthracis* e il virus del vaiolo. Entrambi sono facili da preparare e da disperdere e stabili; in entrambi i casi la popolazione bersaglio non ha livelli di immunità adeguati (la vaccinazione antivaiolosa è stata sospesa all'inizio degli anni 80, quando l'infezione naturale è stata considerata eradicata). Sia il carbonchio che il vaiolo possono essere facilmente diffusi per via inalatoria. *Bacillus anthracis* è facile da reperire in luoghi dove l'infezione di ovini o bovini sia ancora comune e facile da coltivare e da conservare (produce anche spore) e può essere manipolato con relativa facilità. Il virus del vaiolo richiede attrezzature un po' più complesse ma è estremamente infettivo, altamente letale e, in una popolazione non vaccinata, non ci sono trattamenti efficaci per contrastarlo. La pericolosità e l'efficienza di questi due agenti è stata dimostrata da due incidenti:

nel 1962 in Germania una persona contrasse il vaiolo in Pakistan; messo immediatamente in quarantena, contagiò 19 persone vaccinate, una delle quali morì.

nel 1979 spore di antrace furono accidentalmente rilasciate da uno stabilimento per le armi biologiche a Sverdlovsk, in Russia. La zona fu immediatamente messa sotto controllo, ma 77 persone si ammalarono di carbonchio polmonare e 66 morirono.

Le tossine, per quanto potenti, sono spesso poco stabili e il loro uso bioterroristico è meno probabile.

INTERAZIONI CON LE COMPONENTI ABIOTICHE

CICLI BIOGEOCHIMICI

Grazie alla loro ubiquità, alla vasta gamma delle loro capacità metaboliche ed alla quantità di enzimi che producono, i microrganismi svolgono un ruolo chiave nei cicli biogeochimici. (trasformazioni cicliche di composti, nel corso delle quali un elemento viene trasferito in diversi comparti). Quando un composto inorganico viene ridotto per essere usato come nutriente si parla di **assimilazione**, e il processo riduttivo viene chiamato **metabolismo assimilativo**. Nel caso in cui gli stessi composti vengano ridotti nel corso della produzione di energia, (usati come accettori di elettroni) si parla invece di **metabolismo dissimilativo**.

Metabolismo assimilativo e dissimilativo sono molto diversi tra loro:

- nel metabolismo assimilativo viene ridotta solo la quantità di composto (NO_3^- , SO_4^{2-} e CO_2) necessaria per soddisfare le esigenze della crescita e gli atomi che subiscono la riduzione vengono incorporati in macromolecole e convertiti in materiale cellulare.
- nel metabolismo dissimilativo, viene ridotta una quantità di composto molto maggiore e il prodotto di riduzione viene *escreto* dalla cellula nell'ambiente esterno. Il metabolismo assimilativo è comune a molti organismi, ma solo i procarioti sono capaci di metabolismo dissimilativo, che ha una importanza particolare nei cicli dell'azoto e dello zolfo.

CICLO DEL CARBONIO

Nel ciclo del carbonio (il più importante dal punto di vista quantitativo) coesistono un passaggio inorganico $\rightarrow$ organico (fissazione di CO_2) e un passaggio organico $\rightarrow$ inorganico (produzione di CO_2). La fissazione di CO_2 è operata attraverso la fotosintesi (in prevalenza piante sulla terraferma, cianobatteri in mare e batteri fotosintetici anaerobi in zone anossiche) o la chemiosintesi (solo procarioti).

Fotosintesi ossigenica $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 1/2 \text{O}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$

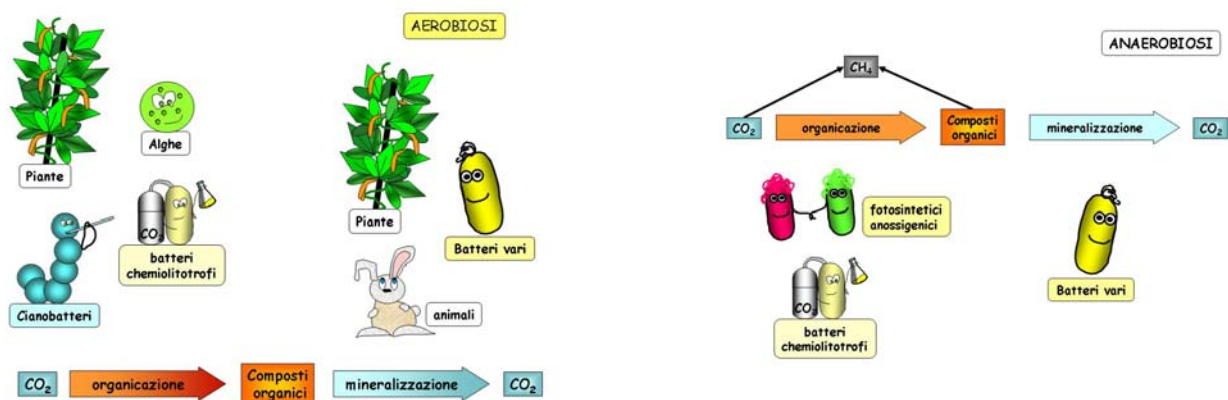
Fotosintesi anossigenica $\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{S}^0 + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$

La fotosintesi ossigenica (non ciclica) è tipica degli ambienti aerobi e caratteristica di piante

verdi, alghe e cianobatteri; la fotosintesi anossigenica (ciclica) è opera dei batteri sulfurei

verdi e rossi, anaerobi che possono impiegare donatori di elettroni alternativi entrando così nei cicli di diversi elementi (in particolare lo zolfo) oltre che in quello del carbonio.

La chemiosintesi è un processo esclusivamente procariotico con cui i microrganismi (chemioautotrofi) producono energia ossidando composti inorganici, tra cui ammoniaca, nitriti, sali ferrosi, acido solfidrico. I batteri chemiosintetici sono suddivisi, in base al prodotto della ossidazione, in : Nitrosobatteri (ossidano ammoniaca ad acido nitroso (che forma poi nitriti combinandosi con i minerali presenti nel suolo); Nitrobatteri (ossidano i nitriti a nitrati); Ferrobatteri (ossidano i sali ferrosi Fe^{2+} a sali ferrici Fe^{3+}); Solfobatteri «bianchi» (da non confondersi con i solfobatteri rossi e verdi, fotosintetici), che ossidano H_2S a zolfo elementare e possono, in qualche caso, ossidare ulteriormente lo zolfo elementare a solfato.



Aerobiosi: i microrganismi che partecipano all'organizzazione sono fotosintetici (ciano batteri) e chemiosintetici

Anaerobiosi: organizzazione e mineralizzazione sono svolte dai procarioti (fotosintetici: rossi e verdi sulfurei - chemiosintetici anaerobi)

La chemiosintesi è un processo quantitativamente modesto in confronto alla fotosintesi, ma svolge un ruolo significativo nell'equilibrio biologico tra le varie forme viventi, particolarmente importante in ambienti estremi.

Il carbonio organico (ridotto) viene poi degradato da diversi organismi che lo ossidano

ottenendo principalmente CO_2 e CH_4 .

Quando il metano passa in ambienti dove è disponibile ossigeno viene utilizzato dai batteri metanotrofi e ossidato a CO_2 che, quindi, è il prodotto finale della fase ossidativa, quello da cui gli organismi

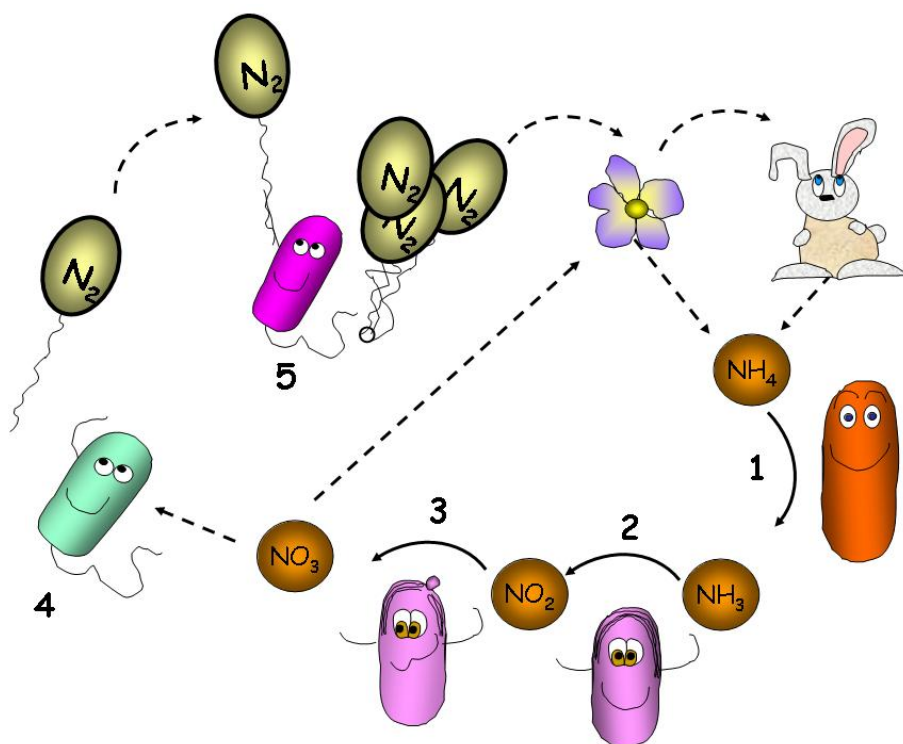


La CO_2 organicata come cellulosa può essere remineralizzata solo dai microrganismi cellulosolitici

autotrofi possono re-iniziare la fase di riduzione (fissazione). La ciclicità assicura la relativa costanza della concentrazione di CO_2 nell'aria.

Va notato che la sintesi di cellulosa nelle piante verdi causerebbe una progressiva perdita di CO_2 atmosferica senza l'intervento dei microrganismi. La cellulosa rappresenta circa il 30% del carbonio organicato, dalle piante e può essere mineralizzata solo attraverso l'azione di batteri, provvisti di enzimi cellulolitici, che la demoliscono per trarne energia e la trasformano in CO_2 . I processi implicati nella degradazione del carbonio organico sono: respirazione aerobia, respirazione anaerobia e fermentazione. Nei processi fermentativi però una quantità di carbonio rimane in composti organici e la restituzione completa all'atmosfera sotto forma di CO_2 si ottiene soltanto con la mineralizzazione di tutti i residui organici nel corso di altre reazioni chimiche.

CICLO DELL' AZOTO



1) ammonificazione, batteri vari; 2) Nitrificazione primo passo-*Nitrosobacter* 3) Nitrificazione secondo passo-*Nitrobacter*; 4) Denitrificazione es; 5) Fissazione

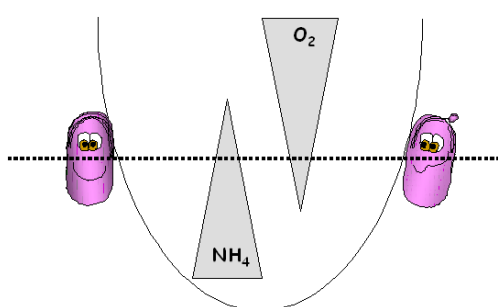
L'azoto è uno dei gas più rappresentati nell'atmosfera (78%) e i batteri hanno un ruolo molto importante nel ciclo di questo elemento. L'azoto organico viene rilasciato nel suolo da diverse matrici (parti di piante, animali morti, scorie animali..) sotto forma di composti complessi (proteine, acidi nucleici, amminoacidi, ecc.), che non possono essere assimilati direttamente dalle piante. Per poter essere riutilizzato, è necessario quindi che l'azoto sia mineralizzato

dall'azione dei microrganismi. Nel ciclo dell'azoto si distinguono varie fasi: ammonificazione, nitrificazione, denitrificazione, fissazione, anammox.

Ammonificazione

I microrganismi eterotrofi responsabili della degradazione di molecole organiche azotate favoriscono la liberazione dell'azoto in eccesso sotto forma di sali di ammonio, in particolar modo carbonati.

NITRIFICAZIONE



I batteri nitrificanti si trovano dove O_2 e NH_4 sono entrambi disponibili

I sali di ammonio sono in parte assorbiti ed utilizzati dalle piante, e parte ossidati a nitriti (I tappa-*Nitrosomonas*) e poi a nitrati (II tappa-*Nitrobacter*) da parte di batteri della rizosfera che svolgono un'azione di nitrificazione. Il processo di nitrificazione si svolge in aerobiosi, i composti di azoto vengono usati come donatori di elettroni e l'ossigeno come accettore.

Nitrobacter e *Nitrosomonas* si trovano nel suolo e nell'acqua, ovunque sia largamente disponibile l'ammoniaca: crescono bene nei laghi e nei fiumi che ricevono immissioni di liquami, trattati e non trattati, e si trovano più facilmente in aree con pH neutro o alcalino perché il pH acido inibisce la nitrificazione. Dal momento che l'ammonio si accumula nelle zone anossiche dove manca l'ossigeno per ossidarlo, i batteri nitrificanti tendono a localizzarsi dove NH_4 ed O_2 coesistono.

DENITRIFICAZIONE

Nei terreni poco aerati, i nitrati sono in parte utilizzati da microrganismi che, con un processo inverso, li riducono a nitriti, e poi a ossidi di azoto e azoto molecolare, che si disperdono nell'atmosfera. I batteri denitrificanti sono anaerobi che utilizzano nitrati, al posto dell'ossigeno, come accettori finali degli elettroni (dissimilazione). Il processo di denitrificazione sottrae azoto al suolo, restituendolo all'atmosfera. L'equilibrio del ciclo viene garantito dall'attività di altri batteri che fissano l'azoto elementare presente nell'atmosfera: i batteri azotofissatori.

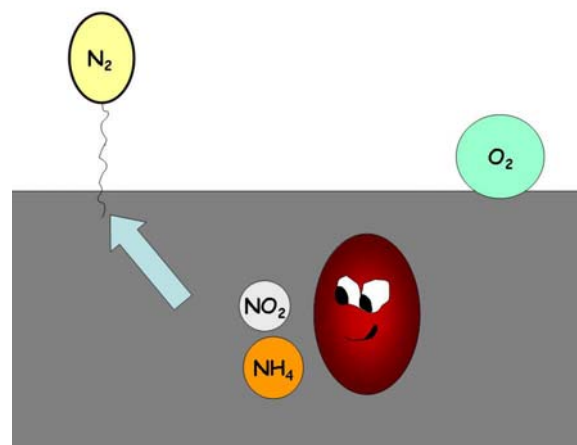
FISSAZIONE

L'azoto molecolare (gassoso) possiede un triplo legame molto stabile e difficile da spezzare: la fissazione (riduzione) dell'azoto gassoso è quindi un processo dispendioso dal punto di vista

energetico e solo pochi procarioti sono in grado di svolgerlo, producendo sali azotati organici che arricchiscono il suolo. L'enzima che permette il processo di fissazione è la nitrogenasi, particolarmente sensibile all'ossigeno. In qualche caso il gene che codifica una nitrogenasi (*nif*) si trova su plasmidi e può essere trasferito orizzontalmente. I batteri azotofissatori possono vivere in rapporti di simbiosi con piante superiori (es. *Rhizobium*, *Frankia*) o fare vita libera (es. *Clostridium* - anaerobi o *Azotobacter* - aerobi).

ANAMMOX

Nelle zone anossiche degli ambienti acquatici l'ammonio si accumula a causa della mancanza dell'ossigeno necessario ai processi di nitrificazione. Un microrganismo scoperto recentemente (*Brocadia anammoxidans*) è in grado di utilizzare l'ammonio impiegando come accettori terminali i nitriti, che hanno una penetrazione nell'acqua molto superiore a quella dell'ossigeno, trasformandolo in azoto molecolare. *B. anammoxidans* è oggetto di studi intensi perché



Il processo anammox è altamente desiderabile nel trattamento di liquami da zootecnia ricchi di azoto (es suini)

abbatte non solo la percentuale di azoto organico, ma anche quella dei nitriti, risolvendo due tipi di inquinamento con un solo processo.

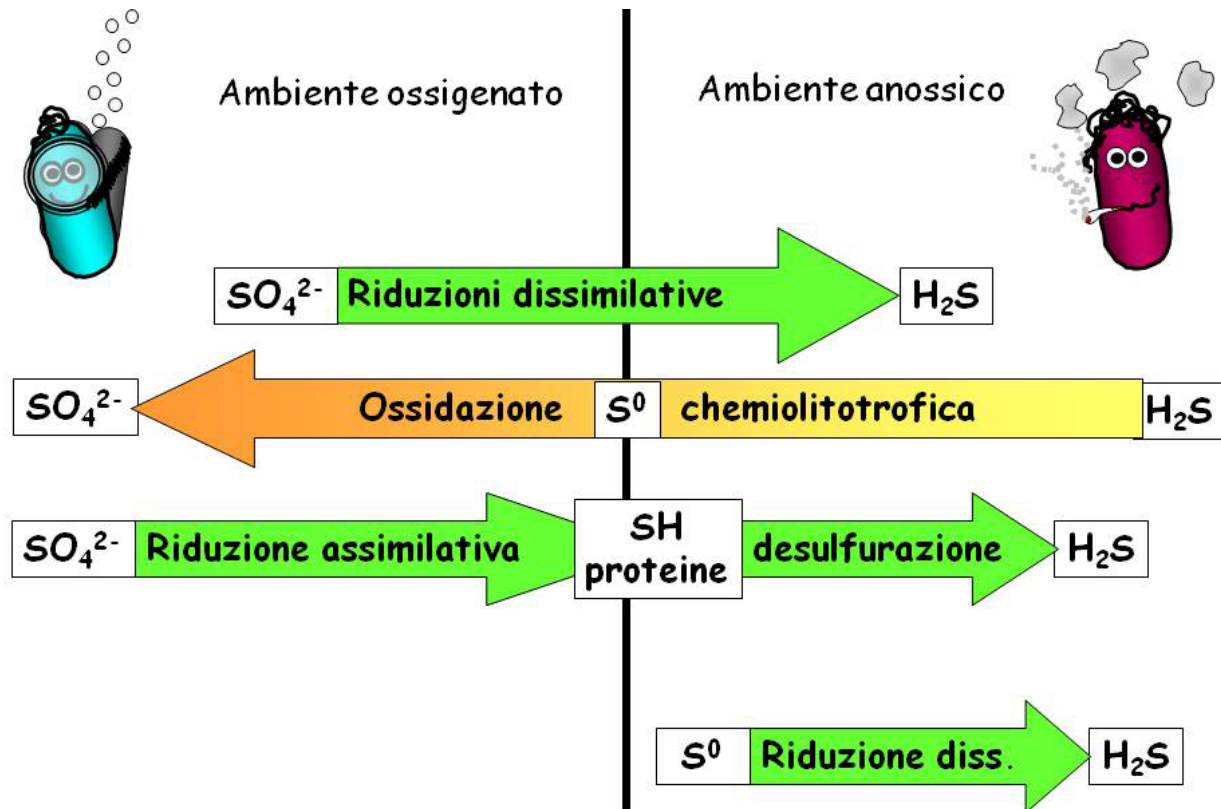
CICLO DELLO ZOLFO

Lo zolfo si trova, in natura, in diversi stati di ossidazione: zolfo elementare (S^0), solfuri e tiosolfati (-2) e solfati ($+6$) e va incontro a reazioni fotochimiche spontanee con una certa rapidità, specialmente a pH neutro. Questo è il motivo per cui alcuni microrganismi che utilizzano composti dello zolfo (ad. es. solfuro) crescono bene solo a pH acido (sono acidofili obbligati): a pH neutro, infatti, il loro substrato scompare spontaneamente. L'apporto dei microrganismi al ciclo dello zolfo, tuttavia, è importante e si verifica in aerobiosi e in anaerobiosi, con la partecipazione sia di batteri fotosintetici sia di batteri chemiosintetici.

Riduzione di solfati

I solfati possono essere usati come fonte di zolfo e ridotti in modo assimilativo da molti microrganismi e, in questo caso, lo zolfo che viene incorporato sotto forma di R-SH nei

composti organici, da cui verrà nuovamente liberato nel corso dei processi di degradazione (putrefazione e desolforazione).



Nel ciclo dello zolfo le attività microbiche sono fortemente condizionate dal pH e dallo stato di ossigenazione
Ossidazione di solfuro e zolfo elementare

In ambienti aerobici a pH neutro il solfuro si ossida spontaneamente. Un gruppo di batteri (zolfo-ossidanti/solfobatteri bianchi) può comunque intervenire in aree dove il solfuro prodotto dal fondo incontra l'ossigeno che diffonde dall'alto. Questi batteri sono in grado di ossidare anche lo zolfo elementare che a differenza del solfuro è stabile anche in presenza di ossigeno. Lo zolfo elementare è insolubile e i batteri che lo ossidano si trovano adesi ai cristalli; oltre ai solfobatteri bianchi (*Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Thiobacillus*) è importante in questa reazione *Sulfolobus* un archibatterio termo-acidofilo e aerobio. Il solfuro può anche essere ossidato in anaerobiosi, in presenza di luce, dai batteri fotosintetici anossigenici

Lo zolfo elementare può anche essere ridotto con produzione di solfuro: questa reazione, che si svolge solo in ambienti anossici, è tipica di pochi batteri (*Desulfuromonas*) e degli archibatteri ipertermofili.

Composti organici dello zolfo

Anche molti composti organici dello zolfo, sintetizzati da organismi viventi, entrano nella ciclizzazione. Il composto più abbondante in natura è il dimetilsolfuro (DMS), prodotto in

particolar modo negli ambienti marini come risultato della degradazione del composto osmoregolatore principale delle alghe, il dimetilsolfonpropionato, che rappresenta una fonte di energia e carbonio per molti microrganismi. Dai composti organici, lo zolfo viene nuovamente liberato durante i processi degradativi (putrefazione e desolfurazione). La partecipazione ai cicli biogeochimici è una diretta conseguenza della versatilità metabolica dei microrganismi, che si trovano praticamente ovunque: tutte le condizioni compatibili con la vita di organismi eucarioti lo sono anche con la vita dei procarioti che, in aggiunta, sono in grado di sfruttare le risorse di ambienti nei quali la vita degli eucarioti non è possibile a causa di condizioni fisiche o chimiche estreme.

L'USO DELLE INTERAZIONI CON IL COMPARTO ABIOTICO

Le attività microbiche trovano vaste applicazioni in diversi campi: nella depurazione di rifiuti (trattamento dei reflui) o nella trasformazione dei rifiuti solidi (compostaggio); nei processi di biolisciviazione, con cui si ottengono minerali la cui estrazione sarebbe difficile o economicamente svantaggiosa con altri procedimenti e, infine, per ottenere la degradazione di composti inquinanti e tossici, e la bio-riparazione ("bioremediation") di siti contaminati.

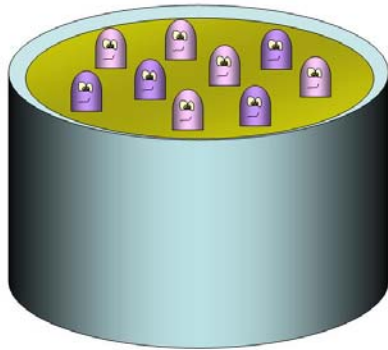
Trattamento dei reflui

I microrganismi hanno un ruolo chiave nel trattamento delle acque di scarico. La parte inorganica dei detriti viene rimossa da trattamenti fisici e/o chimici, ma per il trattamento della parte organica ci si affida ai microrganismi che ossidano e mineralizzano la "EBOM" (Easily Biodegradable Organic Matter). Per digerire la sostanza organica disciolta, i batteri hanno bisogno di ossigeno; questa necessità determina il BOD di un campione da trattare BOD (Biochemical Oxygen Demand) il cui valore è dato dalla quantità di ossigeno necessaria perchè i microrganismi digeriscano in 5 giorni una certa quantità di liquame.



Il fabbisogno biologico di ossigeno (BOD) è direttamente proporzionale alla quantità di EBOM

Un impianto di trattamento dei liquami può essere considerato un'enorme coltura microbica, in cui i microrganismi ossidano i componenti del "terreno" per ottenere energia e moltiplicarsi: nel corso del processo la maggior parte dei nutrienti è convertita in composti chimici semplici

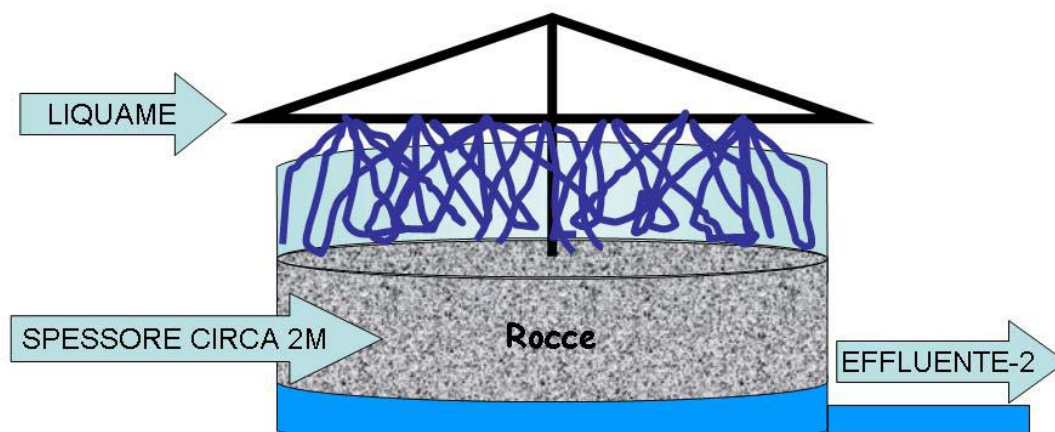


come CO_2 , NO_3 , SO_4 e PO_4 . Lo scopo di un impianto di trattamento di liquami è quello di provvedere le condizioni ottimali per selezionare e utilizzare i microrganismi più idonei a convertire le EBOM in minerali, l'utilizzazione dei nutrienti è più efficiente in aerobiosi: gli impianti di trattamento dei liquami sono progettati per fornire O_2 in eccesso.

Il liquame non trattato è lasciato sedimentare per eliminare i detriti più pesanti e setacciato attraverso grate che fermano i detriti galleggianti più grandi. Passa poi attraverso vasche di sedimentazione in cui viene man mano rimosso il fango che si deposita.

A questo punto la EBOM viene ossidata in aerobiosi, grazie al metabolismo microbico. Le possibili strategie da impiegare sono due: Filtri percolatori o Fanghi attivati

I filtri percolatori sfruttano la crescita di biofilm microbici, in cui sono presenti batteri,

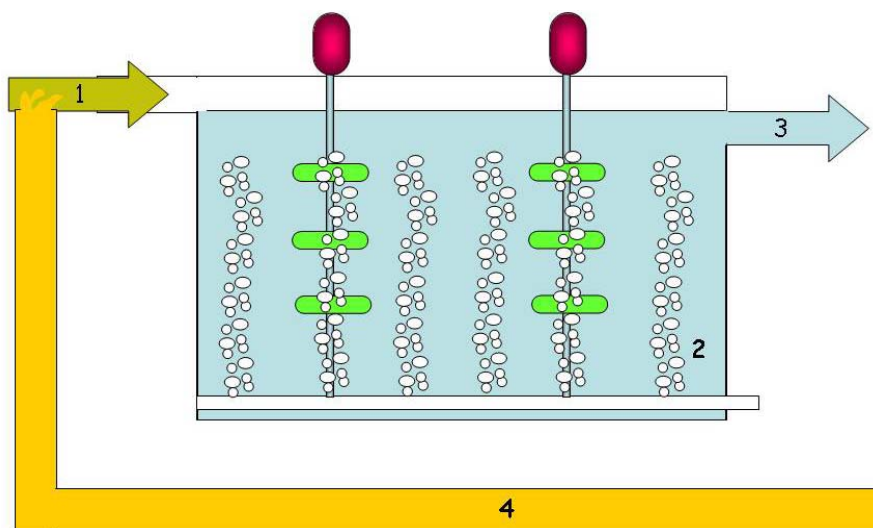


muffe, alghe, protozoi e anche larve di insetti, su rocce frantumate o altro materiale inerte; il liquame percola lentamente attraverso le rocce ricoperte di microbi, che si nutrono della EBOM. L'effluente dalla vasca di sedimentazione primaria fluisce lungo bracci che ruotano lentamente al disopra del letto di rocce, spruzzando il liquame in modo da saturarlo di

ossigeno. I prodotti ossidati del metabolismo microbico passano, con l'effluente, nella vasca di sedimentazione secondaria, insieme con frammenti di EPS che si staccano dal biofilm.

Fanghi attivi: questo sistema sfrutta un inoculo microbico che viene aggiunto al liquame che effluisce dalla prima vasca. L'inoculo è composto da microrganismi che si sono auto-selezionati per la loro capacità di crescere rigogliosamente nel liquame grezzo e si ottiene semplicemente raccogliendo il fango depositato nella vasca di sedimentazione secondaria e mischiandolo (10% finale circa) con l'effluente che arriva dalla prima vasca di sedimentazione.

Il fango è costituito da grossi ammassi gelatinosi (fiocchi) di microrganismi cresciuti nei serbatoi di aerazione e che, essendo stressati dalla carenza di nutrienti, rispondono immediatamente all'aggiunta di sostanza organica degradabile.



- 1) I reflui arrivano dalla vasca di sedimentazione primaria
- 2) vasca di aerazione
- 3) l'effluente è avviato verso la IIa vasca di sedimentazione
- 4) fanghi attivati dalla vasca secondaria sono mischiati al liquame fresco

Il liquame inoculato viene immesso nei serbatoi di aerazione dove vengono insufflate enormi quantità di aria; i microrganismi crescono velocemente e convertono (ossidandole) le sostanze EBOM in minerali. Nel corso di questo procedimento la maggior parte dei patogeni muore.

Il liquame è poi convogliato in bacini di clorazione dove si aggiunge cloro per uccidere i patogeni rimanenti, prima di immettere l'effluente nell'ambiente. Nel corso del trattamento, che dura 5-10 ore, il BOD della fase liquida si riduce del 75-90% ma, nella fase solida associata ai fiocchi, l'ossidazione è scarsa, perché la permanenza del liquame è troppo breve.

Il fango raccolto dalle varie parti dell'impianto viene concentrato e poi spostato nel digestore anaerobio dove il processo verrà poi completato con una fermentazione che dura diverse

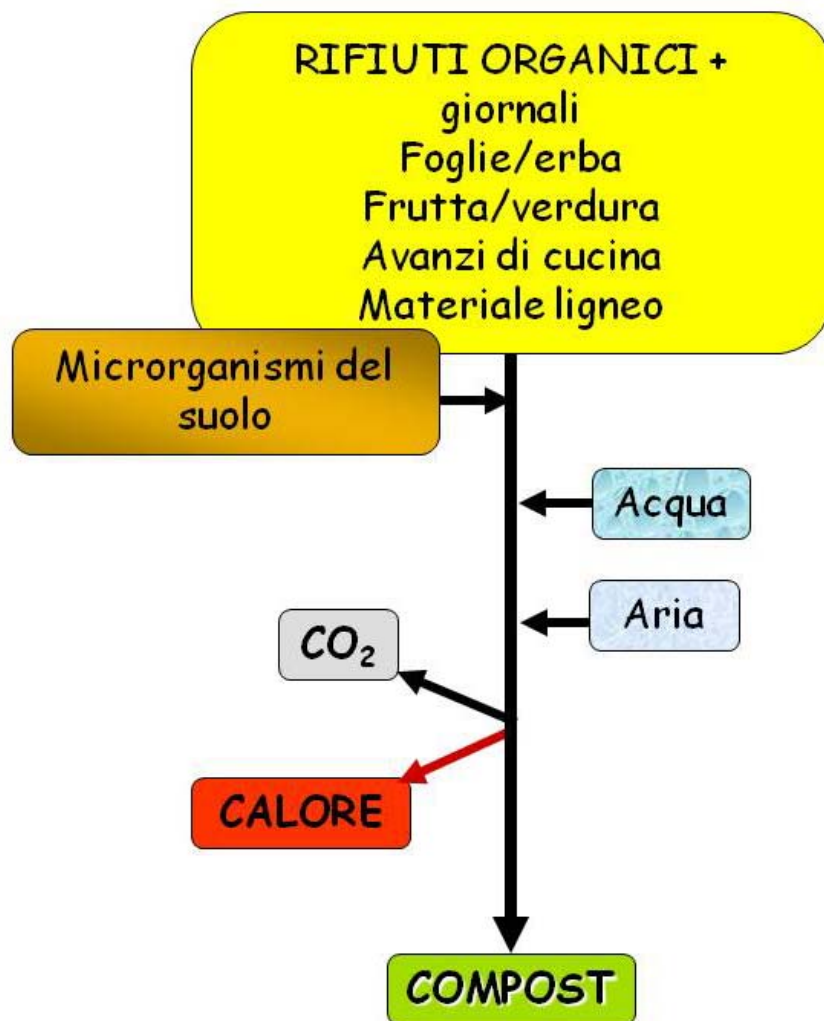
settimane e producendo metano e anidride carbonica. Il fango residuo (stabilizzato) viene raccolto e avviato ai letti di essiccamento.

Compostaggio

Processo di trasformazione della frazione organica biodegradabile del rifiuto solido urbano, da parte del microbiota indigeno, per ottenere del fertilizzante organico. Durante il compostaggio si sfruttano i processi naturali provvedendo alle condizioni ideali per accelerarli. Il procedimento passa attraverso diversi stadi: Stadio mesofilo : l'inizio della degradazione aumenta il calore della massa (reazioni esoergoniche) il calore aumenta fino a raggiungere i 60°C; il pH diminuisce (4-5). La composizione della comunità microbica si modifica con l'alterarsi delle condizioni abiotiche. Nel corso della successiva fase prendono il sopravvento i microrganismi termofili (stadio termofilo) in questa fase è necessario sorvegliare il calore e mantenerlo entro i 70°C. Il rilascio di ammoniaca, prodotta nel corso dei metabolismi di degradazione (ammonificazione, cnfr. ciclo dell'azoto) rialza il pH fino a raggiungere valori di circa 8. La composizione della comunità si modifica nuovamente. La temperatura e il pH elevati eliminano la maggior parte dei batteri patogeni, le uova e le larve di parassiti e i semi di piante infestanti: la massa va incontro a una auto-sanitizzazione. Finite le fermentazioni rapide la temperatura si abbassa e ha inizio la fase di maturazione, in cui funghi e batteri attaccano lentamente i nutrienti meno degradabili (es. cellulosa e lignina) trasformando la massa in "compost" finito.

I parametri da tenere sotto controllo nel corso del processo sono:

- l'acqua che deve garantire la disponibilità di acqua libera necessaria ai microrganismi, ma non interferire con la circolazione dell'aria (il contenuto ottimale è 50 - 70%);
- l'aria che deve avere un flusso costante e regolare; se l'aria è insufficiente, prendono il sopravvento specie anaerobie che producono NH_3 , H_2S e acidi organici, responsabili di cattivi odori e tossici verso piante e organismi del suolo;
- un corretto rapporto tra carbonio e azoto nel materiale da degradare. Il rapporto C/N ottimale è 15/1: rapporti inferiori (eccesso di materiali vegetali) rallentano eccessivamente il procedimento; rapporti superiori (eccesso di materiali animali-praticamente teorici) portano a sviluppo di ammoniaca.



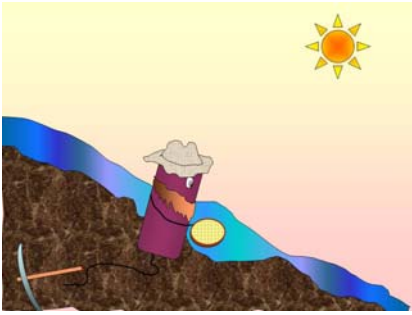
A

B



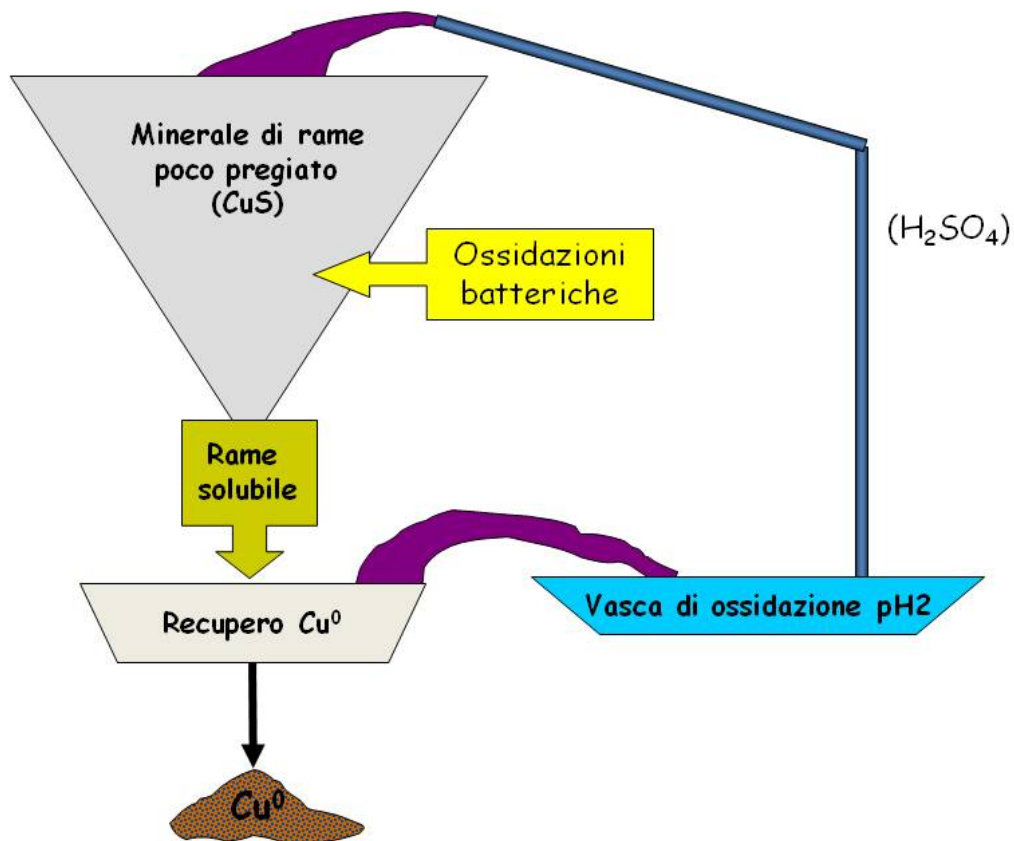
A) schema del processo di compostaggio; B), stadi mesofilo, termofilo e di maturazione della massa di compostaggio

Biolisciviazione



La capacità microbica di produrre acidi, e di portare in soluzione i metalli presenti nei minerali, può essere utilizzata nelle procedure di biolisciviazione. Molti minerali grezzi contengono percentuali anche elevate di solfuri che formano composti insolubili con i metalli; quando la concentrazione del metallo è bassa l'estrazione chimica o per fusione diventano antieconomiche, ma alcuni batteri come per esempio *Thiobacillus ferrooxidans* sono in grado di ossidare i solfuri con una velocità molto più elevata di quella che si potrebbe ottenere con l'ossidazione spontanea.

fusione diventano antieconomiche, ma alcuni batteri come per esempio *Thiobacillus ferrooxidans* sono in grado di ossidare i solfuri con una velocità molto più elevata di quella che si potrebbe ottenere con l'ossidazione spontanea.



Schema di un impianto di biolisciviazione

I processi di biolisciviazione sono comunemente impiegati per minerali di rame, ferro, uranio e oro: i minerali sono raccolti in ammassi di grandi dimensioni su cui si fa percolare una soluzione diluita di H₂SO₄ (pH circa 2); il metallo solubilizzato viene poi convogliato alle vasche di precipitazione da cui viene raccolto. Il liquido della biolisciviazione è usato per ricominciare il

ciclo di estrazione. I microrganismi possono agire con l'ossidazione diretta del minerale oppure riossidando un ossidante chimico (es: si può impiegare come ossidante chimico Fe^{3+} , che viene ridotto a Fe^{2+} ; i batteri ossidano nuovamente Fe^{2+} a Fe^{3+} , in modo da ottenere un processo continuo.

Bioriparazione



Molti composti organici possono essere biodegradati dai microrganismi (biodegradazione) alcuni possono essere degradati completamente, fino ad ottenerne acqua e CO_2 (processo di biomineralizzazione) ma spesso la biomineralizzazione non può essere ottenuta e i prodotti di degradazione possono, a volte, essere più tossici di quelli di partenza: un caso di questo tipo è quello degli insetticidi a base di DDT.

Con il termine bioriparazione si definisce l'uso di processi biologici per rimuovere contaminanti da siti contaminati. La decontaminazione per mezzo di agenti biologici (come microbi, piante e funghi) avviene spesso in modo naturale ma è in genere troppo lenta per essere utile: la tecnologia quindi cerca il modo di catalizzare i processi naturali, stimolando le attività di riparazione di questi organismi.

I microbi possono operare la bioriparazione:

usando il composto inquinante come donatore di elettroni (ossidandolo)

usando il composto inquinante come accettore terminale di elettroni (riducendolo)

usando il composto inquinante come fonte di carbonio o azoto

attraverso strategie di co-metabolismo.

Si definisce co-metabolismo un fenomeno che avviene quando un composto è trasformato da un microrganismo che non cresce su di esso e non ottiene carbonio o energia o altri nutrienti dalla trasformazione. Le trasformazioni co-metaboliche si verificano quando un enzima, prodotto da un microrganismo che cresce sul substrato "A", riconosce come substrato anche il composto "B" e lo trasforma in un prodotto. Le trasformazioni ottenute per via co-metabolica sono limitate perché la cascata enzimatica non prosegue, sul prodotto ottenuto dal composto "B", come avrebbe fatto sul prodotto del substrato "A" (la specificità dell'enzima che segue, nella via metabolica, è più elevata di quella dell'enzima che opera la trasformazione). È comunque benefica per l'ambiente perché altri microrganismi possono intervenire sul prodotto ottenuto

TECNICHE DI BIORIPARAZIONE

La maggior parte dei processi di bioriparazione che vedono coinvolti i microrganismi avviene attraverso una reazione di ossido-riduzione che detossica il contaminante, e che può essere ostacolata da condizioni ambientali limitanti. Modificare i parametri chimici e fisici può avere come effetto il miglioramento dell'intero processo.

Aggiungere un accettore di elettroni

Per la bioriparazione di alcuni contaminanti il fattore limitante può essere l'accettore di elettroni per la reazione, perchè il donatore è facilmente disponibile. É il caso di molti composti organici che possono essere ossidati nei processi di produzione di energia se il livello di accettore (es. ossigeno o nitrato) è adeguata.

Aggiungere un donatore di elettroni

In altri casi l'accettore è disponibile ma il donatore non è sufficiente a garantire la degradazione. Un esempio di questo caso è quello dei contaminanti metallici o dei nitrati, che svolgono facilmente il ruolo di accettori terminali di elettroni, se è presente una sufficiente quantità di sostanze ossidabili.

Aggiungere un nutriente limitante.

anche se le altre condizioni necessarie sono soddisfatte, il processo può essere ancora essere reso difficoltoso da qualche nutriente, presente in quantità limitante. In questi casi è possibile adoperare fertilizzanti, ricchi in nutrienti come azoto e fosforo, per cercare di promuovere la crescita dei microrganismi coinvolti nella bioriparazione

Aumentare la biodisponibilità del contaminante

Ci sono casi in cui tutte le condizioni ambientali sono ottimali ma la bioriparazione è resa difficile perché il microrganismo non ha un accesso facile al contaminante. In questi casi si parla di scarsa biodisponibilità del contaminante. Metalli e alcuni composti organici possono legarsi a suoli e sedimenti. In questi casi l'uso di tensioattivi e di chelanti può facilitare il processo.

Stimolare la produzione di un enzima specifico

A volte la bioriparazione di alcune molecole organiche dipende da enzimi batterici che possono metabolizzare il contaminante. L'aggiunta all'ambiente di composti in grado di indurre la produzione dell'enzima, può migliorare la situazione. Il composto induttore può anche non essere lo stesso che è necessario eliminare, se ne può usare anche un altro (per esempio meno

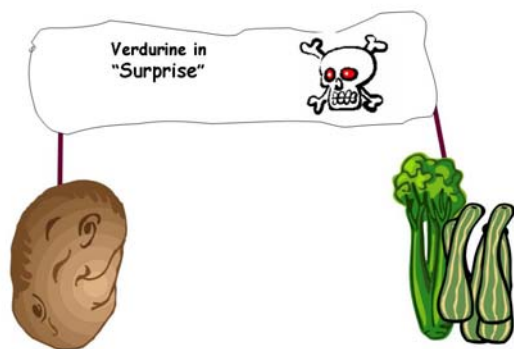
tossico) purch  inneschi la risposta della regolazione batterica e l'espressione dell'enzima desiderato.

Una importante distinzione da operare tra le differenti strategie di decontaminazione   quella tra tecniche *in situ* o tecniche *ex situ*. I trattamenti *ex situ* richiedono che il contaminante sia trasportato altrove per essere trattato. Al momento attuale i trattamenti *ex situ* rappresentano l'approccio meglio compreso e sviluppato per la bioriparazione anche se, recentemente, le tecniche *in situ* stanno attirando pi  attenzione. Le tecniche *in situ*, infatti, sono pi  vantaggiose dal punto di vista economico, richiedono meno attrezzatura e lavoro e hanno un impatto ambientale minore.

MICRORGANISMI COME PRODUTTORI: LA MICROBIOLOGIA INDUSTRIALE

La microbiologia industriale prevede l'utilizzo dei microrganismi per la produzione di composti di valore commerciale o la catalizzazione di processi di trasformazione chimica per lo stesso scopo; la microbiologia industriale tradizionale si occupa di migliorare la resa di prodotti naturali, facendo ricorso a tecniche "classiche", rappresentate dall'isolamento di ceppi naturali promettenti e dalla successiva selezione di mutanti in grado di fornire prestazioni ottimali, a partire dai ceppi ambientali individuati. I mutanti sono ottenuti con tecniche di genetica "classica" o applicando composti mutageni attraverso tecniche non mirate.

Tra le tecniche classiche della genetica microbica che trovano ancora larga applicazione, va citata quella della fusione dei protoplasti che aumenta considerevolmente la gamma dei mutanti che si possono ottenere da quei lieviti o muffe che, essendo asessuati o di un solo tipo sessuale, hanno minori probabilit  di scambiare materiale genetico. La mutagenesi non mirata si effettua esponendo i microrganismi all'azione di agenti mutageni chimici e analizzando i possibili mutanti per l'eventuale comparsa dei caratteri desiderati. Questa tecnica pu  comportare problemi di sicurezza: non c'  modo di controllare quante e quali mutazioni possano essersi prodotte sul genoma dei microrganismi trattati, accanto a quella selezionata.



Dimostrazioni dell'intrinseca pericolosità di questo metodo e dell'uso di mutanti non del tutto controllabili si sono avute durante la produzione di triptofano da parte di una ditta (che non esiste più): i mutanti iperproduttori selezionati con mutagenesi random, producevano composti tossici che provocarono diversi casi di paralisi e morte prima che il prodotto fosse ritirato.

La mutagenesi non mirata può avere effetti imprevisti

Analogamente, nel 1969, fu prodotta e messa in commercio una varietà di patata (Lenape) con livelli di glicoalcaloidi pericolosamente elevati: molte varietà di piante officinali, infatti producono naturalmente sostanze che possono essere tossiche per l'uomo. Nel selezionare le varietà più idonee per l'alimentazione questo inconveniente è stato limitato ma, praticando una mutagenesi random, è possibile selezionare inavvertitamente piante in cui una maggiore resistenza agli insetti si accompagna a un maggior tenore di tossine naturali. Le tecniche dell'ingegneria genetica hanno permesso di evitare questi inconvenienti, ottenendo delle modificazioni conosciute e controllate.

SELEZIONE DEI CEPPI

La fase di selezione del ceppo ha una notevole importanza in tutti i procedimenti della microbiologia industriale. Un buon ceppo deve essere in grado di produrre la sostanza desiderata, in buona quantità e su larga scala; deve crescere rapidamente e sintetizzare il prodotto in un tempo relativamente breve; deve poter essere coltivato in terreni poco costosi, preferibilmente scarti di altre lavorazioni (sciroppo di mais, siero di latte...); deve poter essere manipolato con facilità (aumenti di produzione si ottengono tramite mutazioni e selezioni) e non essere patogeno per uomo, animali, piante economicamente importanti.

Una delle tecniche più usate è quella dell'approccio ecologico (cercare di raffigurarsi quale sarebbe l'ambiente ideale per un microrganismo dotato dell'attività che si sta cercando e campionare in ambienti simili). L'uso dell'approccio ecologico per l'isolamento, può dar luogo a un processo di screening che coinvolge un gran numero e un'ampia varietà di microrganismi. Anche nel caso in cui i microrganismi siano fortemente adattati, tipi microbici specifici sono associati con nicchie differenti all'interno di diversi ecosistemi. Campionando in modo sistematico le diverse nicchie di un ecosistema è possibile isolare una più ampia varietà di tipi

microbici. Le modalità di trattamento dei campioni, la scelta dei terreni, le condizioni di incubazione ed il tipo di diluenti usati determineranno il numero ed il tipo di microrganismi isolati ad es. dalle piante, dal suolo, dall'acqua, dagli insetti etc.

Ciò che viene isolato dipende sia dalle fluttuazioni delle diverse popolazioni microbiche, che dal set di condizioni stabilite dal microbiologo. In linea generale, le regole per applicare con successo un approccio ecologico all'isolamento sono le seguenti:

APPROCCIO ECOLOGICO

Fare l'elenco dei microrganismi che devono essere isolati

descrivere l'ecosistema o l'habitat da cui devono essere raccolti campioni

Raggruppare i campioni per tipi (es. piante, parti di piante suolo (e tipi), rocce etc.

Elencare i parametri ambientali che devono essere considerati e misurati (salinità, pH, potenziale redox, temperatura)

Elencare i substrati naturali disponibili nell'ecosistema (es chitina nel suolo delle foreste..)

Decidere le tecniche di isolamento sulla base dei punti 1-5

Valutare le tecniche così definite confrontandole a metodi standard

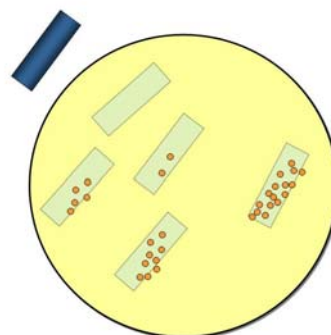
Modificare tecniche già note per adattarle ai parametri ecologici del materiale da esaminare

Impiegare procedure di arricchimento specifico per i gruppi microbici che possono essere oggetto di screening.

TRAPPOLE PER MICROBI



Preparazione del baiting



Semina per progressivo scaricamento

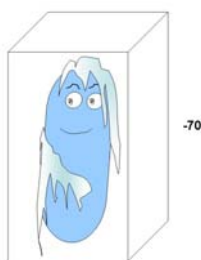
In alcuni casi l'arricchimento può essere effettuato già al momento del campionamento, attraverso la tecnica del "baiting" (attrazione), che prevede l'uso di substrati specifici, collocati nell'ambiente con il compito di attrarre e catturare i microrganismi desiderati.

Ad esempio, per isolare dall'ambiente microrganismi cheratinolitici, si possono usare "gabbiette" di filo metallico riempite di lana ed immergerle nel flusso di un corso d'acqua.

Una tecnica di baiting usata per isolare attinomiceti dalle piante prevede l'impiego di una doccia di vetro sterilizzata e riempita di terreno idoneo alla crescita degli attinomiceti. Alle estremità della doccia viene posta una membrana di Nylon (100 μm), per prevenire l'ingresso di insetti o grossi protozoi. Le docce si applicano, con il lato dell'agar in basso, a diversi punti della pianta e si lasciano "in situ" per 2-5 giorni, fermandole con nastro isolante. Dopo questo tempo vengono rimosse e trattate lavandole in agitazione in tampone o terreno liquido e poi piastrando diluizioni seriali del lavaggio. In alternativa le strisce di agar possono essere poste sulla superficie di piastre di terreni idonei, lasciate 12-18 ore a 28°C e poi rimosse procedendo ad incubare le piastre per 10-15 giorni.

CONSERVAZIONE DEI CEPPI

Una volta selezionato il ceppo ottimale è necessario mantenerlo in modo che sia stabile. Le tecniche di mantenimento sono molte e vanno dalla conservazione a temperature molto basse (-70°C) in brodo glicerolato, alla liofilizzazione. Una tecnica che non prevede l'utilizzo di apparecchiature sofisticate, è quella di conservare i batteri in terreni di crescita molto diluiti, sotto paraffina, al buio ed a temperatura ambiente (sopravvivenza 15-30 anni).



Congelati in glicerolo



liofilizzati



Sotto paraffina

I FERMENTATORI

I tipi di fermentatore più comuni sono quelli ad agitazione, in cui la massa della fermentazione è agitata costantemente da ventole che girano intorno ad un asse.

Un fermentatore è un cilindro di acciaio chiuso alle estremità e dotato di valvole e tubi per l'ingresso o l'uscita di sostanze o vapore, o acqua. È presente una camicia di raffreddamento per la dispersione del calore. Nel caso di fermentatori molto grandi è necessario aggiungere serpentine interne per garantire la dispersione del calore. Per il mantenimento dell'aerazione è prevista la presenza di un diffusore, dal quale viene introdotta a pressione aria sterile sotto forma di bollicine, e di un agitatore, in genere a pale, che rimescola la massa della coltura. Le dimensioni dei fermentatori sono varie e dipendono dal tipo di produzione e dalle necessità di aerazione.

Si va da piccole unità per uso di laboratorio (5-10 litri) a fermentatori che possono arrivare a contenere anche 500.000 litri di terreno.

capacità in litri	produzione di:
1-20.000	enzimi diagnostici o reagenti per biologia molecolare
40.000-80.000	antibiotici, alcuni enzimi
100.000-150.000	vino, birra, aminoacidi, proteasi, amilasi, penicillina, antibiotici aminoglicosidici, trasformazioni di steroidi
200.000-500.000	acido glutammico; vino; birra

Dimensioni così imponenti comportano la necessità di una gestione molto accurata; i problemi principali sono quelli che riguardano la sterilizzazione del terreno, l'aerazione e l'agitazione della massa di fermentazione, il controllo della temperatura e della diffusione del calore, la qualità dei nutrienti e il processo di "scaling up" delle colture.

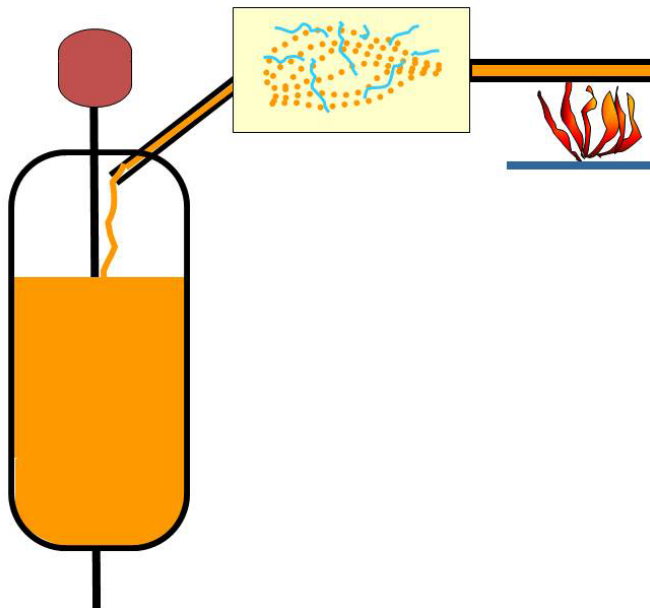
Sterilizzazione del terreno

Le tecniche più impiegate sono due: quella "in batch" e quella "continua".

Con la tecnica in batch, l'intero volume del terreno portata e mantenuta alla temperatura di sterilizzazione quando si trova già nel fermentatore. Alla fine del processo si passa ad una fase di raffreddamento fino a raggiungere la temperatura ottimale per la fermentazione. (In pratica l'intero tank viene usato come una gigantesca autoclave). La fase dell'innalzamento della temperatura, come anche quella del raffreddamento, sono funzioni della grandezza del fermentatore. Il calore infatti viene scambiato attraverso le pareti del tank e, mentre la superficie disponibile per lo scambio aumenta in relazione al quadrato della dimensione lineare,

il volume del liquido contenuto nel fermentatore aumenta in relazione al cubo della stessa dimensione. così che il rapporto tra superficie e volume (e quindi lo scambio di calore) diminuisce con l'aumentare delle dimensioni lineari del fermentatore.

La sterilizzazione in batch è pratica ma ha il limite di non tener conto della possibile presenza di componenti termolabili (in genere fattori di accrescimento indispensabili per alcuni microrganismi) nel terreno.



Nella sterilizzazione continua il terreno è esposto al calore in strati sottili e raffreddato in una camera di espansione prima di immetterlo nel fermentatore

Se esiste un problema di questo tipo si presta meglio la tecnica di sterilizzazione "continua".

I passi principali di questa tecnica sono:

- 1) Il terreno fluisce nel fermentatore attraverso una condotta e viene riscaldato rapidamente attraverso scambio di calore o iniezione di vapore
- 2) la temperatura di sterilizzazione viene mantenuta per il tempo necessario (giocando sulla velocità del flusso e sulla lunghezza della condotta)
- 3) il raffreddamento rapido viene poi ottenuto scambiando calore attraverso tubature, oppure passando il terreno in una camera di espansione (processo che causa l'evaporazione istantanea di parte dell'acqua presente, e la perdita di calore)

Il vantaggio principale di questa tecnica è che è possibile aumentare il volume del terreno mantenendo pressoché costanti sia il tempo che la temperatura di sterilizzazione, dato che i tempi di riscaldamento e di raffreddamento sono virtualmente assenti

La tecnica continua permette anche un approccio di tipo quantitativo al problema della distruzione di composti termolabili ed indispensabili, se è nota la costante di inattivazione termica della sostanza, attraverso la relazione:

$$L = \ln(C_0/C) = Kt$$

dove L è il criterio di qualità del nutriente desiderato, C_0/C il rapporto tra la concentrazione iniziale e quella finale, K la costante di inattivazione termica della sostanza considerata e t il tempo.

A volta tuttavia non sono note né le caratteristiche né la concentrazione della sostanza termolabile (spesso, nel caso di terreni organici complessi, neppure la sua natura)

In situazioni del genere si usa un approccio empirico su piccola scala per determinare le condizioni di sterilizzazione migliori per il mantenimento dell'efficienza del terreno.

La sterilizzazione del terreno contenuto nei tank riduce la probabilità di contaminazione e di insuccesso della fermentazione portandola ad un valore accettabile (1/1000), più che garantire la completa assenza di microrganismi indesiderati. Il successo è tuttavia generalmente assicurato dall'importanza dell'inoculo.

La sterilizzazione continua va seguita con maggiore attenzione di quella in batch perché è maggiormente soggetta a possibilità di inquinamento nel corso del processo.

Aerazione e agitazione all'interno del tank

oltre alla trasformazione del substrato in prodotto, la cellula microbica deve provvedere anche al trasporto del substrato nel citoplasma ed all'escrezione del prodotto nel terreno. L'efficienza della captazione del substrato dal terreno e del rilascio del prodotto nello stesso, dipendono, oltre che dal controllo genico, dalle condizioni ambientali. E' necessario che l'apporto di substrato alla superficie della cellula sia abbastanza alto da garantire la massima efficienza di trasporto all'interno della cellula stessa e che le condizioni ambientali prescelte per il processo siano uniformi in tutta la massa del liquido.

Oltre al mescolamento adeguato, quindi, è necessario garantire che ci sia un certo grado di turbolenza. Il termine turbolenza indica l'esistenza e la forza di variazioni di direzione e di intensità nel moto del liquido, su microscala (scala molto piccola in confronto alle dimensioni del tank). Un grado di turbolenza sufficiente minimizza le differenze di concentrazione delle sostanze tra la superficie della cellula (dove è effettivamente importante) e la massa del liquido (dove è possibile misurarla per controllarla).

Qualità dei nutrienti:

Le dimensioni dei fermentatori rendono necessario un procedimento di scaling up complesso: è quindi consigliabile ridurre al minimo le possibili varianti ed impiegare, fin dalle prime fasi

della sperimentazione, lo stesso tipo di terreno che sarà impiegato nelle fasi produttive. Spesso, nei terreni per le produzioni industriali, si utilizzano residui di lavorazioni agricole; in questo caso è importante tener conto anche del cultivar e delle condizioni di coltivazione; dell'acqua da usare, e delle dimensioni granulari di eventuali parti solide presenti nel terreno.

Controllo della temperatura e diffusione del calore.

Durante una fermentazione viene prodotto calore (metabolico e meccanico) Il calore metabolico deriva dai processi di produzione di energia e la quantità sviluppata è direttamente proporzionale alla loro efficienza.

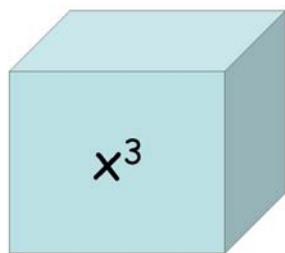
Per le fermentazioni aerobiche, esiste una correlazione tra il calore metabolico prodotto e la quantità di ossigeno consumata da un numero noto di microrganismi. E' quindi possibile risalire alla quantità di calore metabolico misurando il consumo di ossigeno di una coltura e quantizzandone il numero di cellule/ml. Il calore prodotto dai procedimenti meccanici è dovuto alle ventole degli agitatori, agli sparger di gas. Per mantenere costante la temperatura nel corso della fermentazione è necessario che si verifichi

$$Q(\text{metabolismo}) + Q(\text{agitazione}) - Q(\text{evaporazione}) - Q(\text{scambio}) = 0$$

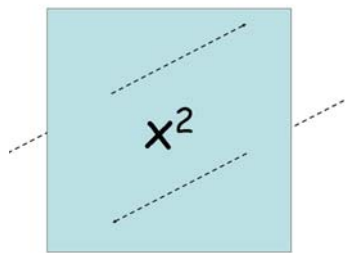
Il calore prodotto dall'agitazione può essere calcolato facilmente; la quantità di calore persa per evaporazione è funzione del contenuto d'acqua dell'aria che entra nel fermentatore e della sua temperatura (l'aria che si trova già all'interno del fermentatore, viene considerata satura).

Per soddisfare l'equilibrio termico bisogna quindi sottrarre calore attraverso le superfici di scambio che vengono poste a contatto con acqua di refrigerazione. limitato da questa necessità, perché lo sviluppo di calore in un fermentatore aumenta con il cubo delle sue dimensioni lineari, mentre la superficie di scambio aumenta con il quadrato di queste.

Questa necessità pone un limite alle dimensioni possibili per un fermentatore, che non possono



Il calore aumenta con il volume



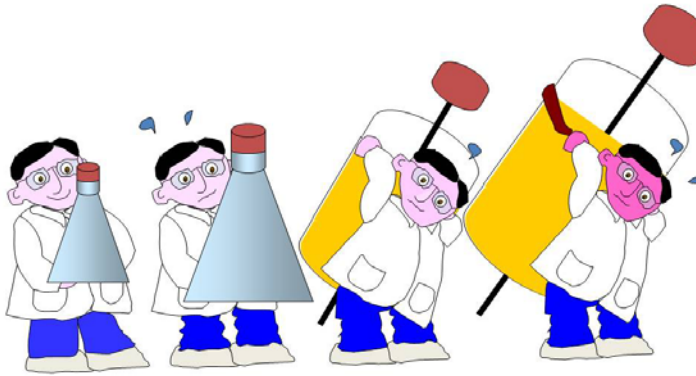
Lo scambio aumenta con la superficie

superare quelle in cui il calore sviluppato e quello che è possibile sottrarre si equivalgono.

Qualunque sia la tecnica impiegata per ottenere il ceppo produttore, le modalità

di crescita al momento della fase di produzione vera e propria sono estremamente importanti ed influiscono non poco sulla resa. Vanno quindi tenute presenti già dalle fasi iniziali degli studi, che arrivano alle grandi dimensioni dei fermentatori per la produzione attraverso un processo che viene definito *scaling up* delle colture.

Scaling Up Delle Colture



Lo *scaling up* delle colture va determinato all'inizio di ogni ciclo di produzione

Il processo di *Scaling-up* deve tener conto di tutti questi aspetti per arrivare alle condizioni ottimali per la produzione. Il procedimento deve avvenire attraverso diversi stadi, il numero e le condizioni dei quali sono tra le cose da stabilire volta per volta. Normalmente si provano diversi gradi,

aumentando le dimensioni del fermentatore a poco a poco, prima in laboratorio, poi (uno o due stadi) in impianti pilota, prima di passare alla produzione. La scelta di passare attraverso molti stadi è dettata essenzialmente da considerazioni economiche (non rischiare di variare troppo bruscamente un processo i cui aspetti quantitativi sono, in pratica, sconosciuti, può essere più economico che puntare sul successo della costruzione di tutto un impianto su basi insufficienti). Gli impianti pilota in genere sono pochi (uno o due) ed è consigliabile che il più grande dei due abbia le maggiori dimensioni possibili, in modo da poter servire come modello per i fermentatori della fase di produzione, ancora più grandi. Questo è particolarmente importante con i miceti che danno origine a liquidi viscosi, per poter fare una stima accurata dei possibili problemi di mescolamento.

ALTRI TIPI DI FERMENTATORE

Esistono altri tipi di fermentatori, che possono rispondere a problemi particolari.

-quelli ad insufflazione d'aria, in cui il rimescolamento è garantito da bolle d'aria introdotte dal fondo (questi fermentatori eliminano i problemi correlati con l'agitazione durante le fermentazioni sostenute da miceti filamentosi)



I miceti filamentosi sono difficili da agitare

-quelli in cui i microrganismi sono adesi a particelle di supporto che possono a loro volta essere mantenute in sospensione nel terreno liquido da una circolazione ascensionale di liquido o di gas, oppure essere fisse e bagnate dal terreno che viene introdotto con un flusso discendente o ascendente.

Esistono anche reattori in cui le fermentazioni vengono fatte svolgere su strato solido (senza acqua libera) oppure in unità di dialisi, in cui il flusso del substrato viene garantito per osmosi, come anche l'allontanamento dei prodotti tossici.

Le unità in cui si ottiene una crescita continua delle colture, non sono in genere usate nelle produzioni industriali a causa dei problemi di controllo del sistema e delle possibili conseguenze sulla stabilità della coltura, come l'apparire di mutanti indesiderati, che possono competere con il ceppo iperproduttore. Problemi di questo tipo si sono verificati nel corso di produzioni di antibiotici effettuate per mezzo di ceppi industriali ingegnerizzati.

La possibilità di portare avanti fermentazioni in assenza di gravità è uno dei soggetti di studio più attuali nel campo della microbiologia industriale: l'assenza di gravità favorisce la dispersione del substrato aumentandone la concentrazione alla superficie delle cellule; evita la necessità delle procedure di agitazione meccanica che sviluppino calore. I primi esperimenti sono stati effettuati studiando il comportamento delle cellule di lievito in assenza di gravità nel corso di un procedimento di birrificazione su piccola scala, su stazioni spaziali in orbita.

PRODOTTI MICROBICI

I prodotti microbici da ottenere vengono spesso classificati in metaboliti primari (aminoacidi, nucleotidi e prodotti finali della fermentazione come etanolo o acidi organici, eso o endoenzimi) che vengono prodotti durante la prima fase della crescita e sono in relazione con la sintesi dei componenti della cellula microbica, e metaboliti secondari che si accumulano durante la fase stazionaria (Idiofase) e non hanno relazione con i componenti normali della cellula (antibiotici, micotossine). La maggior parte dei metaboliti interessanti dal punto di vista industriale fa parte di questo secondo gruppo. Nella maggior parte dei casi, la sintesi di prodotti secondari è regolata in modo complesso dal microrganismo; oltre a evitare condizioni di crescita che sfavoriscono la produzione si cerca in genere di impiegare mutanti deregolati. Il metabolita secondario che rappresenta il prodotto della fermentazione può essere ottenuto

senza ulteriori interventi (le cellule crescendo producono un Metabolita primario precursore e in fase stazionaria lo convertono nel secondario), oppure aggiungendo nuovo substrato da convertire una volta che le cellule hanno raggiunto l'idiofase

Per ottenere il prodotto desiderato è necessario studiare attentamente le condizioni in cui si fanno crescere i microrganismi: condizioni che favoriscono una crescita rapida con formazione di abbondante biomassa possono essere non ottimali per l'ottenimento del prodotto. Un esempio tipico di questo è la produzione di penicillina: nelle condizioni ottimali (presenza di glucosio ed azoto abbondante) la produzione di penicillina è scarsa, ma usando lattosio (che viene utilizzato più lentamente) come fonte di carbonio e limitando la disponibilità di azoto, si ottiene la massima resa in prodotto. Anche la resa di streptomicina è strettamente correlata alla disponibilità di azoto, che non deve essere eccessiva.

Per la produzione ottimale di aminoacidi è in genere necessario disporre di mutanti di regolazione nei quali la sintesi non venga più inibita dalla presenza del prodotto. Acido glutamico ed altri aminoacidi vengono in genere ottenuti da mutanti di *Corynebacterium glutamicum* in cui un basso livello di biotina e la presenza di derivati di acidi grassi provoca una accentuata permeabilità di membrana con la conseguente escrezione degli aminoacidi prodotti; la produzione di lisina è portata avanti con mutanti di *Brevibacterium flavus* (i mutanti AEC) l'aspartochinasi è modificata, in modo da essere insensibile al legame con l'Amino-Etil-Cisteina (analogo della lisina) o con la lisina che, normalmente si legano all'asparto-chinasi, bloccandone l'attività. Acidi organici vengono in genere ottenuti da *Aspergillus* controllando molto strettamente la disponibilità dei metalli in tracce come manganese e ferro (i terreni vengono preparati trattandoli con resine a scambio ionico).

BIOCONVERSIONI

Si definiscono bioconversioni le reazioni di trasformazione di composti organici operate da organismi viventi (biocatalizzatori). I vantaggi delle bioconversioni sono molti: l'azione degli enzimi è specifica, con un bersaglio definito (si possono evitare i gruppi protettivi, necessari in molte reazioni chimiche); le reazioni enzimatiche si svolgono a temperature comprese tra 20 e 70°C (con minor dispendio d'energia rispetto alle reazioni chimiche) e possono realizzarsi in ambienti con contenuto d'acqua relativamente basso (anche partendo da materiale lipofilico). Le bioconversioni microbiche sono reazioni catalizzate da microrganismi a partire da substrati organici. Naturalmente il catalizzatore in senso stretto è un enzima e non

l'intera cellula: le reazioni anaboliche e cataboliche necessarie ai processi vitali del microrganismo sono controllate dal corredo enzimatico del microrganismo. Gli enzimi anabolici sono normalmente substrato-specifici ma quelli catabolici sembrano aver acquisito, nel corso dell'evoluzione, una maggiore "elasticità" e quindi uno spettro di substrati più ampio. Di conseguenza, la maggior parte dei composti organici esistenti (con l'eccezione di quelli particolarmente instabili o fortemente reattivi) possono essere oggetto di bioconversione. Questo dato di fatto è ampiamente dimostrato dalla degradazione naturale dei composti organici e dai ripetuti isolamenti, in svariati ambienti, di microrganismi capaci di degradare completamente molti composti di questo tipo. Gli enzimi responsabili di una bioconversione possono trovarsi tanto all'interno che all'esterno della cellula; la loro localizzazione varia con i diversi tipi di microrganismi. Nei batteri gli enzimi solubili (estraibili quindi con diversi metodi) si trovano nel citoplasma o nel periplasma e gli enzimi particolati sono legati alle membrane. Funghi e lieviti sono più complessi: i loro enzimi sono nella maggior parte dei casi associati con i vari organelli.

A volte, la localizzazione precisa di un enzima utile per una bioconversione non è nota e si rende necessario stabilire protocolli sperimentali per individuare le condizioni ottimali perché i siti catalitici vengano in contatto con i reagenti. A questo scopo si favorisce al massimo la dispersione e la solubilizzazione dei reagenti stessi, e si permeabilizzano quanto più possibile le cellule.

Gli enzimi usati nelle bioconversioni possono essere costitutivi (caso più frequente nei funghi o nei lieviti) o indotti dalla presenza di diversi composti organici (caso più frequente nei batteri). Molto spesso, quando c'è un'induzione, vengono attivate vie multienzimatiche e, variando oculatamente le condizioni di crescita, è possibile usare gli enzimi da soli o in cooperazione tra loro per catalizzare diverse reazioni utili.

In natura la comunità microbica agisce sinergicamente nell'utilizzare le risorse: è comune che il prodotto di scarto di una specie costituisca il nutrimento di un'altra. In questo modo anche specie con richieste nutrizionali molto specifiche possono crescere e moltiplicarsi nell'ecosistema, ma possono essere difficili da coltivare in laboratorio. Generalmente è preferibile lavorare con le specie che possono essere coltivate senza problemi in coltura pura, perché mantenere il controllo e l'equilibrio di un inoculo misto è molto difficile.

I BIOCATALIZZATORI

Nei processi industriali i microrganismi possono essere usati in molti modi diversi

colture in crescita



Si possono usare sia colture in batch (discontinue) che colture continue. Nella coltura in batch il microrganismo viene coltivato nel terreno più adatto e il substrato si aggiunge nel momento migliore della curva di crescita (determinato sperimentalmente) proseguendo poi l'incubazione fino a che la trasformazione del substrato non si fermi o la comparsa di prodotti secondari non metta a rischio la resa. In questo processo il biocatalizzatore viene utilizzato una volta

sola e poi scartato. La coltura in batch è utile e veloce per le procedure di screening ma comporta il dover mettere in coltura le cellule ogni volta per preparare l'inoculo e la purificazione del prodotto finale da terreni di fermentazione complessi come quelli usati di solito, può non essere agevole. Inoltre, lo stato fisiologico delle cellule varia di continuo durante l'incubazione. Questo non succede con le colture continue che, tuttavia, non sono molto usate per le biotrasformazioni, a causa di tre svantaggi intrinseci del sistema.

- 1) La necessità di mantenere un flusso continuo di nutrienti aumenta di molto le probabilità di contaminazione
- 2) L'equipaggiamento e la strumentazione necessari a mettere in opera e controllare il processo dovrebbero poter essere a prova di guasti e rotture, pur essendo in funzione per tempi molto lunghi e in modo continuativo.
- 3) Il principale problema è rappresentato dalla degenerazione dei ceppi: una perdita graduale ed irreversibile dell'espressione del prodotto. La degenerazione di un ceppo avviene quando appaiono mutazioni spontanee che conferiscono vantaggi selettivi di crescita ma minore capacità di formare il prodotto.

I ceppi iperproduttori che si usano per la produzione industriale di biopolimeri, aminoacidi, antibiotici, sono in gran parte risultato di mutazioni e selezioni, e sono spesso instabili, con un'elevata probabilità di revertire allo stato di produttori meno efficienti ma in grado di crescere meglio. Una popolazione di produttori insufficienti potrebbe prendere il sopravvento, diventare dominante e soppiantare completamente nella coltura i mutanti produttori. L'instabilità genetica, quindi, costituisce l'ostacolo principale all'impiego di colture continue nei processi di produzione.

Cellule quiescenti.



Nel corso delle biotrasformazioni operate da cellule che crescono attivamente in terreni complessi, la purificazione del prodotto finale può essere complicata dalla presenza di acidi organici, fenoli, aminoacidi, lipidi e altri metaboliti prodotti dalla coltura. L'uso di cellule quiescenti (cellule vive, che non crescono ma che mantengono lo stesso corredo enzimatico della cellula in

crescita) permette di evitare questi problemi.

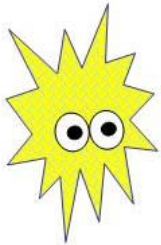
Le cellule quiescenti si ottengono allontanandole dal terreno di coltura nel momento in cui la produzione dell'enzima responsabile della biotrasformazione è massima o almeno soddisfacente. Le cellule vengono poi risospese in tamponi, in terreni di coltura modificati (privi di un nutriente limitante), in acqua distillata o perfino in miscele di solventi non acquosi, per essere impiegati come biocatalizzatori. Rispetto agli enzimi purificati, le celle quiescenti offrono una maggiore stabilità e sono economicamente convenienti, perchè evitano costosi processi di estrazione e purificazione. L'uso di questi particolari biocatalizzatori permette anche di usare sostanze utili per evitare indesiderate reazioni secondarie, ma che non potrebbero essere usate nel caso di colture attive perché provocano inibizione della crescita. La praticità delle cellule quiescenti è notevole nelle reazioni in cui siano implicati cometabolismi o induzioni enzimatiche. Infatti, perché avvengano certe reazioni, è necessario usare un cometabolita come glucosio, glicerolo o acido succinico (o altri metaboliti ossidabili), insieme al substrato da trasformare.

D'altro canto, in alcuni casi le cellule in crescita aumentano enormemente la resa enzimatica quando sono in presenza del substrato organico da trasformare (enzimi inducibili). In questi casi particolari l'uso delle cellule quiescenti non è consigliabile a meno che non siano state appositamente indotte prima della preparazione.

Le cellule quiescenti vengono impiegate in una gran quantità di applicazioni come ad es. le trasformazioni di steroli (*Nocardia*, *Septomyxa*), e quasi tutte le riduzioni specifiche di chetoni (svolte dai lieviti es. sintesi asimmetrica di L-carnitina). Le cellule quiescenti possono venir usate a densità che sarebbero irraggiungibili per le colture in crescita e, di conseguenza, i tempi necessari per le trasformazioni sono significativamente minori purché si ponga attenzione ai livelli di O_2 nel corso della trasformazione, che sono critici. Nel caso della trasformazione degli steroidi, per ottenere la stessa quantità di prodotto servono 12 colture

in batch consecutive se si adoperano le colture in crescita, mentre ne basta uno con le cellule quiescenti.

Cellule essiccate



In qualche caso l'enzima responsabile della trasformazione può essere in grado di resistere, senza subire alterazioni, al trattamento necessario per essiccare le cellule. E' possibile così ottenere polveri che funzionino in maniera efficace come biocatalizzatori. Alcuni degli enzimi che presentano questa caratteristica sono: Esterasi, Amidasi,

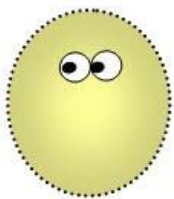
Ossidoreduttasi, Deidrogenasi.

I metodi possibili per ottenere cellule essiccate sono due:

- 1) Liofilizzazione (che sfrutta la sublimazione sotto vuoto dell'acqua contenuta nel campione dopo congelamento)
- 2) Essiccamento ottenuto tuffando le paste dense o i pani cellulari in acetone freddo (-20°C), dopo aver allontanato tutta l'acqua per centrifugazione o per filtrazione. Si raccolgono poi per mezzo di una filtrazione aspirata, ripetendo per due volte la procedura e trattando infine con etere per allontanare l'acetone. Quando le cellule essiccate vengono usate come biocatalizzatori non è necessario operare in condizioni di asepsi.

Cellule permeabilizzate

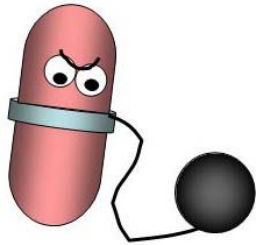
Esiste un'ampia varietà di sostanze che possono alterare la permeabilità delle cellule microbiche, in modo da facilitare il contatto con il substrato e l'escrezione del prodotto. Gli agenti permeabilizzanti sono tensioattivi e solventi che vengono messi a contatto con le cellule dopo l'inizio della fase stazionaria. Un'alternativa per aumentare la permeabilità è quella di aggiungere inibitori della sintesi della parete durante la crescita.



Alcuni antibiotici, come penicillina o cicloserina (un analogo della D-alanina) usati a dosi sub-inibenti possono servire a questo scopo. Altri composti permeabilizzanti sono dimetilformamide (DMF) e Dimetilsolfossido (DMSO) impiegati per disperdere steroidi e altri composti lipofili; devono essere usati con cautela perché alle concentrazioni più alte interferiscono con la vitalità delle cellule. Un processo in cui l'uso delle cellule permeabilizzate si è dimostrato vantaggioso rispetto sia alle cellule quiescenti o alle

preparazioni acellulari, è la trasformazione di Rifamicina S in Rifamicina B e/o Rifamicina L (*Cephalosporium acremonium*).

SISTEMI IMMOBILIZZATI



I sistemi discussi finora prevedono che dopo il processo di bioconversione il biocatalizzatore vada perduto. L'unica eccezione è il sistema delle cellule quiescenti, dalle quali può essere riavviata la crescita per preparare altre cellule quiescenti, senza dover necessariamente ripartire sempre dall'allestimento di un nuovo inoculo. Negli ultimi 15 anni sono stati studiati sistemi che permettano di immobilizzare

le cellule o gli enzimi, in modo da poterli recuperare ed usare nuovamente. I bioreattori che contengono materiali immobilizzati sono adatti a processi continuativi. In condizioni ideali, le soluzioni di substrati organici, passate continuamente sul biocatalizzatore immobilizzato, emergono nell'effluente sotto forma di prodotto. Questi reattori a colonna sono molto più efficienti ed economici dei reattori batch ed i biocatalizzatori sono spesso maggiormente stabili quando sono protetti dalla matrice polimerica in cui sono immobilizzati.

Immobilizzazione Di Cellule

Se il materiale immobilizzato è rappresentato da cellule viventi, esse possono essere in qualche caso anche ringiovanite attraverso prolungati passaggi di nutrienti freschi attraverso il reattore e, comunque, tendono a riempire tutti i possibili spazi vuoti della matrice, moltiplicandosi ed aumentando quindi l'attività catalitica del reattore. Quando si usano cellule immobilizzate ci può essere una limitazione nella permeabilità del substrato e del prodotto attraverso la membrana cellulare e, inoltre, la presenza di molti enzimi nella cellula può portare a reazioni collaterali. Questi problemi comunque possono essere risolti.

Le reazioni a cellule immobilizzate sono vantaggiose quando

- a) gli enzimi sono intracellulari,
- b) gli enzimi purificati sono instabili,
- c) i microrganismi non contengono enzimi in grado di interferire con la reazione (o se presenti, possono essere allontanati facilmente)
- d) i composti da trasformare o i prodotti da ottenere sono a basso peso molecolare. Se queste premesse sono rispettate ci si possono aspettare diversi vantaggi:

- il processo di estrazione, o purificazione o entrambi non sono necessari
- la resa dell'attività enzimatica è alta
- la stabilità è buona durante il corso dell'intera operazione
- il costo è basso
- i volumi richiesti, come anche le possibilità di inquinamento dell'impianto sono minori.

Per quanto sia stato pubblicato molto, su questo argomento, in realtà un metodo di immobilizzazione adatto a qualunque circostanza non esiste: è necessario scegliere volta per volta il sistema più adatto.

I sistemi attualmente in uso possono essere classificati in due gruppi:

a) Le cellule sono legate direttamente a supporti insolubili, tramite legami idrogeno o ionici tra la superficie della cellula e quella del supporto. I supporti possono essere polisaccaridi (cellulosa, destrano, carragenani) o proteine (gelatina, albumina) o polimeri sintetici (resine, cloruro di polivinile) o materiali inorganici (sabbie o argille porose) quelli più usati sono silica-gel e ceramiche (inorganici) e agarosio (organici). Uno dei primi tentativi di immobilizzazione di cellule batteriche è stato effettuato adsorbendo cellule di *E. coli* e *Azotobacter* per ottenere l'ossidazione dell'acido succinico.

b) intrappolamento in matrici polimeriche: le cellule vengono mescolate a composti che polimerizzano in seguito. I polimeri più usati sono poliacrilamide, alginato, carragenani.

Le cellule immobilizzate vengono usate per moltissime biotrasformazioni : produzione di aminoacidi (*E. coli*, acido L-aspartico; *Pseudomonas dactinolytica* L-alanina); di antibiotici (*Streptomyces*, macrolidi; *Bacillus*, bacitracina; *E. coli*, 6-APA, un intermedio della sintesi delle penicilline, importante per la costruzione di penicilline semisintetiche). Gli acidi organici, impiegati nel campo biomedico e per uso alimentare, sono di solito prodotti con fermentazioni convenzionali ma a volte si impiegano cellule immobilizzate per migliorare la resa dei processi (*Achromobacter liquidum*: acido urocanico dalla L-istidina; *Brevibacterium ammoniagenes*: acido L-malico dall'acido fumarico); alcoli (soprattutto etanolo da *Saccharomyces cerevisiae*, ma anche glicerolo da *Clostridium butyricum*).

MISCELE DI REAZIONE CON SUBSTRATI ORGANICI

Molte reazioni organiche si svolgono in solventi non acquosi ma la crescita microbica e le reazioni biologiche hanno bisogno di acqua. Questa osservazione porterebbe a pensare che il campo delle bioconversioni sia limitato ai soli substrati idrosolubili. In realtà è sufficiente

aumentare la disponibilità del substrato per il sito attivo dell'enzima per ottenere bioconversioni efficienti anche da substrati idrosolubili che liposolubili (es. idrossilazione del progesterone da parte di *Aspergillus ochraceus*). Sono state studiate tecniche che aumentano la solubilità e la dispersione dei solventi in acqua. Se l'accessibilità alla superficie cellulare (e all'enzima) aumenta, aumenta anche la resa in prodotto bioconvertito; Una volta ottenuto il contatto con la cellula, il substrato può penetrare la parete e le membrane cellulari, grazie al trasporto attivo o passivo. Le superfici cellulari e gli enzimi, hanno domini idrofobi che facilitano le reazioni con i lipidi. Oltre a questo, i microrganismi stessi producono spesso una varietà di emulsionanti endogeni.

FORMA FISICA DEI SUBSTRATI ORGANICI

Praticamente ogni classe di composti organici può essere trattata con un processo di bioconversione. I composti idrosolubili, con gruppi funzionali ionizzabili o idrofili (acidi carbossilici, amine, alcaloidi, alcoli, zuccheri, fenoli e sostanze polifunzionali) possono essere aggiunti direttamente alla reazione a meno che non provochino effetti tossici o bruschi cambiamenti nel pH o nella forza ionica. I composti lipofili devono invece essere resi accessibili al biocatalizzatore. Osservazioni effettuate sulle curve di crescita di batteri coltivati in terreni contenenti naftalene, fenantrene o antracene hanno dimostrato che il tempo generazionale del biocatalizzatore è inversamente proporzionale all'idrosolubilità del substrato ma indipendente dalla sua quantità totale: la crescita è quindi legata al ritmo di dissoluzione del substrato nell'acqua. Esperimenti successivi hanno permesso di osservare rese migliori quando il substrato è preparato con solventi caldi. In questo caso le particelle hanno struttura amorfa e dimensioni comprese tra 0,5 e 2 μm mentre con la preparazione a freddo le dimensioni delle particelle sono superiori (10-100 μm) e la struttura è cristallina.

É possibile aumentare la solubilità dei substrati con il polivinilpirrolidone (PVP), la cui presenza, per esempio, raddoppia la resa della idrossilazione dell'ellitticina (alcaloide praticamente insolubile in acqua) da parte di *Aspergillus alliaceus*; o con detergenti anionici (i tensioattivi cationici e non ionici inibiscono notevolmente la crescita batterica).

Composti tossici : per operare una bioconversione su composti tossici come antibiotici o antitumorali la scelta del momento per l'aggiunta del substrato è critica. Se aggiunti in un momento precoce del ciclo di crescita, infatti, questi composti inibiscono la crescita e/o la produzione enzimatica. In alcuni casi si può aggiungere una piccola quantità di substrato

all'inizio della crescita, perché faccia da induttore, riservando il resto per la tarda fase logaritmica, quando le cellule sono ancora inducibili ma gli effetti della tossicità del substrato sulla massa cellulare sono meno importanti che non all'inizio della crescita. Le stesse considerazioni valgono per i substrati che sono disciolti in solventi tossici. La soluzione migliore in caso di tossicità diretta o indiretta, è aggiungere il substrato in quantità costantemente crescenti, evitando così anche il fenomeno dell'inibizione da substrato, frequente quando il substrato è aggiunto in eccesso in un'unica soluzione. Naturalmente la scelta del momento migliore in cui aggiungere il substrato dipende anche dalla regolazione dell'enzima che lo deve trasformare, che potrebbe essere prodotto in alcuni momenti particolari della crescita e non in altri.

REAZIONI IN MISCELE DI SOLVENTI

Una dei più recenti sviluppi nel campo delle bioconversioni è rappresentato dalla pratica di condurre i processi in un'emulsione di solventi (organico e acquoso) in cui il solvente principale è quello organico. La fase acquosa garantisce la presenza dell'acqua necessaria per il mantenimento dell'integrità spaziale del sito attivo e per alcune reazioni catalitiche, mentre la fase organica fa da solvente per substrato e prodotto. Un esempio di questo tipo di reazione è la deidrogenazione enzimatica del testosterone per ottenere androstenedione (*Pseudomonas testosteroni*). La reazione viene accoppiata con quella mediata dalla lattato deidrogenasi, che rigenera l' NAD^+ necessario alla steroide-deidrogenasi. Il piruvato necessario come co-substrato è dissolto nella fase acquosa con enzimi e NAD^+ ; gli steroidi (substrato e prodotto) si trovano nella fase organica.

MICRORGANISMI NEGLI ALIMENTI

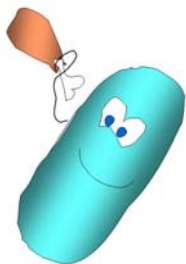
I microrganismi entrano nel campo dell'alimentazione umana in diversi modi:

Consumando in proprio il cibo che vorremmo consumare noi (deterioramento)

Provocando malattie e/o intossicazioni attraverso gli alimenti (i patogeni)

modificando materie prime in modo da ottenere altri alimenti (produzione)

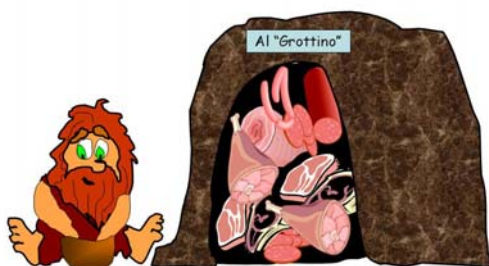
DETERIORAMENTO



Il deterioramento degli alimenti è opera di molte e diverse specie batteriche e fungine, che sfruttano i nutrienti presenti negli alimenti. Gli alimenti ricchi di proteine vanno incontro a processi di putrefazione causati da batteri; in particolare, il pesce può deteriorarsi rapidamente anche in frigorifero: le specie batteriche che vi si trovano, infatti, sono adattate a

vivere alle temperature, relativamente basse, dell'acqua di mare. Il deterioramento del latte non pastorizzato procede attraverso quattro diverse fasi a) acidificazione dovuta a *Lactococcus*, b) crescita di *Lactobacillus* con ulteriore acidificazione c) degradazione dell'acido lattico prodotto in "a" e "b" (lieviti e muffe) e innalzamento del pH d) proteolisi e putrefazione delle proteine (batteri). Frutta e verdura sono generalmente intaccati prima da muffe e lieviti, che aggrediscono la buccia che li protegge, e solo in seguito da batteri (batteri del marciume molle) che producono enzimi idrolitici.

CONSERVAZIONE DEGLI ALIMENTI



Conservarli, questo era il problema !

La possibilità di deterioramento implica la necessità di conservazione. L'acquisizione della capacità di produrre e di immagazzinare grandi quantità di cibo è probabilmente stata essenziale per l'inizio del processo di civilizzazione:

le società basate su "caccia e raccolta" vivevano alla giornata, attraversando periodi di mancanza di cibo o ingozzandosi, a seconda della quantità di cibo che riuscivano a trovare in una giornata. Nel momento in cui divenne possibile produrre una quantità di cibo maggiore di quella necessaria, parte del tempo prima dedicato all'incessante approvvigionamento poté essere riservata al progresso personale e sociale. L'immagazzinamento del cibo tuttavia ha sempre dovuto fare i conti con il deterioramento degli alimenti conservati.

Una delle prime evidenze di un processo di conservazione del cibo risale all'era post-Glaciale (15.000-10.000 a.C.). A quel tempo, armi migliori e strategie di caccia più avanzate, avevano messo gli esseri umani in grado di uccidere grossi animali, come mammut e cervi reali. La maggiore efficienza permetteva di ottenere più carne di quanta non ne potesse essere

conservata in un giorno e questa carne veniva congelata in pozzi o conservata nella parte più fredda delle caverne. Il primo uso di un metodo di conservazione biologico risale al 6000-10000 a.C. con i processi di fermentazione usati per produrre birra, pane, vino, aceto, yogurt, formaggio e burro. Venivano già impiegate anche spezie ed erbe.

Solo nel 1864, tuttavia, Louis Pasteur dimostrò come la causa del deterioramento degli alimenti fossero i microrganismi presenti nel cibo e come un trattamento al calore, che li uccidesse, associato alla conservazione in contenitori sigillati, per evitare una nuova contaminazione da parte dell'aria atmosferica, potesse prevenire il deterioramento in modo efficace. I principali metodi per la conservazione degli alimenti sono fisici, chimici, naturali o biologici; ne prenderemo in considerazione alcuni esempi.

TRATTAMENTI FISICI

Disidratazione e Temperature Sotto Lo Zero

impediscono la replicazione dei microrganismi, ma non li uccidono. Quando l'alimento viene reidratato o scongelato ha la stessa carica microbica che aveva al momento del trattamento. Il processo di scongelamento può favorire la crescita dei microrganismi rendendo le sostanze nutritive più accessibili ai batteri. Una volta scongelati, quindi, i cibi vanno consumati o cucinati subito.

Trattamenti con il calore

Alcuni trattamenti al calore uccidono i microrganismi e, se i processi che seguono mantengono la sterilità ottenuta, gli alimenti possono essere conservati con successo a tempi lunghi. La sterilizzazione propriamente detta può essere ottenuta solo abbinando temperature superiori ai 100°C e tempi di trattamento sicuramente efficaci (per assicurarsi di aver eliminato eventuali spore termoresistenti). Alimenti (vino, birra, latte) che non possono sopportare queste temperature possono essere pastorizzati (63°C 30' o 72°C 15") in modo da eliminare i patogeni e abbattere la carica microbica, garantendo una conservazione che tuttavia è limitata nel tempo.

Atmosfere modificate (basso O₂ ed alta CO₂; vuoto)

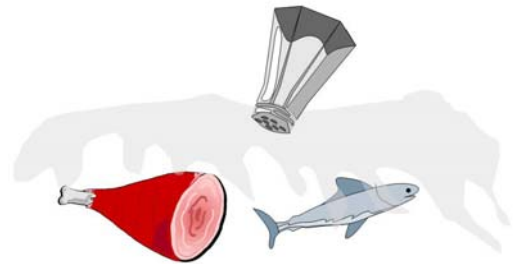
Sono inefficaci su *C. botulinum* e ceppi di *Listeria* possono essere resistenti; poichè impediscono il deterioramento, un alimento potrebbe essere contaminato da livelli anche alti di questi due patogeni ed apparire tuttavia in stato di perfetta conservazione.

Irradiazione

Provoca danni a DNA e membrane; è abbastanza efficace ma la presenza di additivi nei cibi irradiati può interferire con il processo.

TRATTAMENTI CHIMICI

Salagione: il sale è probabilmente il più antico dei conservanti: abbassa la A_w dell'alimento, limita la solubilità dell'ossigeno e causa la perdita di ioni Mg^{2+} . Come unico agente viene usato solo per la salagione di carni e pesce; in altri trattamenti viene impiegato come adiuvante. I miceti in genere e batteri come stafilococchi e *Listeria* possono essere alotolleranti.



La salagione abbassa fortemente la quantità di acqua disponibile per i microrganismi (valore di A_w)

Acidi organici: molti sono usati come additivi ma non tutti hanno effetti antimicrobici. La forma attiva è quella non dissociata, che si mantiene tra pH 3 e 5. Si usano quindi per alimenti con $pH < 5,5$. Eventuali cellule sopravvissute al trattamento (specialmente *Listeria*) possono adattarsi agli acidi organici e diventare tolleranti anche nei confronti di etanolo e acqua ossigenata. Gli acidi organici sono impiegati nelle salamoie in cui la carne viene tenuta subito dopo la macellazione (il momento a maggior rischio di contaminazione). Se la carne non è già contaminata al momento in cui viene immessa nella salamoia, il trattamento è efficace e protegge l'alimento anche nel corso del successivo confezionamento; in caso contrario la carica microbica viene abbattuta di uno o due logaritmi ma non eliminata.

Nitriti : si usano particolarmente per la carne, di cui contribuiscono a mantenere le qualità organolettiche (formano nitrosomioglobina, rossa) e agendo come antiossidanti. L'uso dei nitriti è combinato con quello di diverse spezie, (soprattutto eritrorbato o isoascorbato) per prevenire la formazione di nitrosamine, composti cancerogeni.

COMPOSTI NATURALI

Lisozima

È attivo nei confronti di batteri Gram-positivi, in cui causa la lisi del peptidoglicano e di conseguenza quella batterica se la soluzione è ipotonica. E' stabile al calore (anche $100^{\circ}C$) a pH basso ($< 5,3$) ma si inattiva a temperature più basse se il pH è superiore.

Estratti da vegetali

rosmarino, cumino, cannella, distillato di rafano, estratto di foglie di peperoncino, salvia, timo, origano, chiodi di garofano, possono essere usati con successo tanto maggiore quanto minore è il contenuto di grasso se si usano per le carni; gli agenti attivi sono oli essenziali contenenti terpeni; l'aldeide cinnamica per la cannella, l'eugenolo (derivato fenolico) per i chiodi di garofano. Succhi e vapori di aglio e cipolla sono attivi contro la crescita e la produzione di tossine di diversi microrganismi. Il principio attivo è l'allicina (diallil-tiosulfonato) che inibisce l'azione di enzimi contenenti gruppi sulfidrilici. La cipolla contiene anche composti fenolici (catecolo e acido protocatecuico) che coadiuvano l'effetto antimicrobico.

Fumo o Fumo liquido

abbastanza efficiente nel tenere sotto controllo *Listeria*. Il principio attivo è l'isoeugenolo e la sua azione è coadiuvata dall'acido acetico. L'efficienza è correlata al contenuto in fenoli.

CONSERVAZIONE ATTRAVERSO AGENTI BIOLOGICI

L'aumentata richiesta di mercato per cibi "naturali" ha innalzata la tendenza ad affidarsi, per la conservazione, soprattutto a procedimenti di congelamento-surgelazione di alimenti non pretrattati. In assenza di altri procedimenti però questi alimenti possono non essere sicuri, specialmente considerando che la maggior parte dei congelatori "domestici" non raggiunge temperature sufficienti a garantire la stasi microbica.

La ricerca di nuove barriere si è concentrata su metodi di conservazione "biologica" attraverso l'uso dei "LAB" (Lactic Acid Bacteria) o dei loro prodotti metabolici, o di entrambi.

Biopreservazione attraverso l'acidificazione controllata

La produzione di acidi organici in situ, da parte dei LAB, è una forma di bio-preservazione importante e la sua efficacia è influenzata da svariati fattori come la capacità tamponante dell'alimento, il suo pH iniziale, la natura e la quantità di carboidrati fermentabili, la presenza di ingredienti che possano interferire con la vitalità del LAB impiegato; il tipo e la quantità dei microrganismi da contrastare e il rapporto dei loro tassi di crescita con quello del LAB, a diverse temperature. Tutto ciò richiede un elevato livello tecnico ed una buona standardizzazione.

Le condizioni per una fermentazione acido-lattica ottimale sono tre:

la presenza di una quantità sufficiente di carboidrati fermentabili

Una ridotta pressione di O_2 nel corso del processo di fermentazione e durante la conservazione dell'alimento fermentato

La rapida moltiplicazione del microrganismo starter e quindi una produzione sufficiente di acido lattico

Un esempio può essere il trattamento del foraggio che deve essere conservato nei sili. La fermentazione si svolge grazie ai batteri acido-lattici, naturalmente presenti sul foraggio. L'abbassamento del pH e la tossicità degli acidi non dissociati assicurano una buona conservazione, limitando le possibilità di crescita di batteri indesiderati. Per l'alfalfa, in cui la quantità di carboidrati solubili e fermentabili non è sufficiente per una buona fermentazione, bisogna usare un ceppo starter amilolitico (*Lactobacillus plantarum*) che è in grado di utilizzare l'amido di cui la pianta è ricca.

L'impiego dei LAB per conservare gli alimenti fu introdotto negli anni 50 per prevenire la formazione di tossina botulinica in caso di immagazzinamento degli alimenti a temperature non idonee. L'acidificazione controllata viene anche usata per poter ridurre la percentuale di nitriti nel bacon ed è entrata ufficialmente in uso negli Stati Uniti già dal 1986.

BATTERI E LORO PRODOTTI COME ADDITIVI

i lantibiotici

Alcuni dei LAB associati con cibi fermentati producono batteriocine che interagiscono negativamente con altri batteri, senza modificare la natura fisica e chimica del cibo (né acidificando né denaturando proteine). Si tratta di piccole proteine (3-10 kDa) che vengono raggruppate in quattro gruppi.

Gruppo I: contengono aminoacidi inusuali prodotti per modificazioni post-traslazionali da serina e treonina; questi aminoacidi reagiscono con un residuo di cisteina e formano un anello (lantionina). Le batteriocine che presentano questa struttura sono anche chiamate lantibiotici. Il primo e più caratterizzato tra questi è la Nisina, attiva sui batteri Gram-positivi incluso *C. botulinum*. A differenza di altre batteriocine, prodotte durante la fase esponenziale, la Nisina viene prodotta durante la fase stazionaria e può essere usata anche per gli alimenti in cui non è previsto che il LAB debba crescere dopo il trattamento.

Gruppo II: termostabili, sono caratterizzate da un consensus conservato nella leader. In questo gruppo si trovano batteriocine attive nei confronti di *Listeria*.

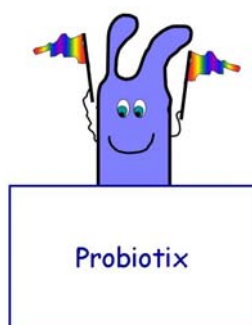
Gruppo III: comprende proteine più grandi (>30 kDa) termolabili

Gruppo IV: batteriocine con una porzione lipidica o glicidica. Il significato e la composizione delle porzioni non proteiche non sono ancora noti. Le batteriocine possono essere aggiunte direttamente agli alimenti (la nisina è l'unica ad essere disponibile pura in commercio, ma l'efficacia di altre è stata già dimostrata) sono usate soprattutto per latte e prodotti correlati, maionese, cibi per bambini, alimenti in scatola. La nisina predispone le spore di *C. botulinum* alla termoinattivazione, permettendo di abbassare il trattamento termico e viene anche impiegata in trattamenti che prevedono l'uso di atmosfere modificate.

I LAB che producono batteriocine possono essere usati direttamente come colture starter (ad esempio per la produzione di insaccati). Oltre che contrastare i patogeni prevengono il deterioramento dell'alimento. Alcuni lattobacilli non producono batteriocine a basse temperature e vengono scelti per procedimenti che si avvalgono di temperature più elevate. Molto recentemente è stata isolata, clonata e caratterizzata una batteriocina (Boticina B) prodotta da un ceppo di *C. botulinum* di tipo B ed attiva nel contrastare la crescita e la tossinogenesi di altri ceppi di *C. botulinum* A,B ed E.

i "probiotici"

I batteri che contribuiscono a mantenere in salute e in equilibrio funzionale il tratto intestinale riuscendo a proteggere l'organismo dalle malattie e facilitando una corretta nutrizione, sono definiti "probiotici", sia che si trovino naturalmente negli alimenti sia che vengano introdotti sotto forma di prodotti farmaceutici. Un altro modo usato comunemente per definirli è quello di Fermenti e/o Fermenti lattici. I batteri probiotici sono principalmente bifidobatteri e lattobacilli (monodermi che utilizzano gli zuccheri come fonte di energia e producono acido lattico) oltre a alcuni enterococchi, streptococchi e saccaromiceti. Attualmente se ne conoscono oltre 160 ceppi.



I batteri probiotici (specialmente i bifidobatteri) agiscono sul sistema immunitario aiutando l'attività di macrofagi e linfociti; producono acido lattico e acetico e mantengono il pH intestinale leggermente acido inibendo la crescita di molti batteri patogeni e favorendo quella dei lattobacilli. Si riduce di conseguenza la produzione di tossine putrefattive originate dal metabolismo di altri batteri, come fenolo (prodotto putrefattivo della tirosina), indolo (di derivazione del triptofano), ammoniaca e amine vasocostrittive come istamina,

cadaverina, tiramina ed agmatina. Le specie di *Bifidobacterium* più conosciute e/o usate come probiotici per ristabilire l'equilibrio di un microbiota intestinale alterato sono: *Bifidobacterium infantis* e *Bifidobacterium breve*, presenti nell'intestino dei neonati, e *Bifidobacterium longum* che subentra ai primi durante l'adolescenza e l'età adulta.

Composti frutto-oligosaccaridici (FOS) sono considerati prebiotici, perché promuovono la crescita dei batteri probiotici. Sono oligosaccaridi naturali che si trovano in molte piante: radici di cicoria, aglio, cipolla, banana, asparagi, e nel miele. I FOS sfuggono alla digestione, poiché l'uomo non possiede gli enzimi necessari per scindere il legame tra le molecole di fruttosio che li costituiscono, rappresentano quindi in genere solo una fonte di fibre. Le specie di *Bifidobacterium* possono produrre nell'intestino l'enzima necessario alla digestione dei FOS che quindi favoriscono la colonizzazione intestinale da parte dei batteri probiotici.

PATOLOGIE LEGATE AL CONSUMO DI ALIMENTI

Nella maggior parte dei casi il deterioramento comporta la perdita dell'alimento, ma in alcuni casi particolari esiste un rischio reale per la salute, legato al consumo di un alimento deteriorato o contaminato.

Intossicazioni



Le intossicazioni sono stati di malessere che derivano dall'ingestione e dalla successiva azione di tossine microbiche già presenti nell'alimento al momento del consumo. Non è necessario che il microrganismo si moltiplichi nell'ospite, né che sia ancora vivo nell'alimento. Le intossicazioni alimentari più diffuse sono quelle causate da stafilococchi o da clostridi. I ceppi enterotossici di *Staphylococcus aureus* sono

tra i più comuni agenti di intossicazioni alimentari, gli alimenti più frequentemente chiamati in causa sono quelli a base di latte e uova. I sintomi, che si manifestano dopo 1-6 ore, sono una forte nausea, vomito e diarrea; l'intossicazione si risolve poi spontaneamente. Le enterotossine (se ne conoscono 7 diversi tipi antigenici) sono peptidi codificati da geni correlati, che possono trovarsi sul cromosoma o su elementi mobili come plasmidi, trasposoni, fagi lisogeni. Un controllo efficiente della catena del freddo è di solito sufficiente a prevenire l'intossicazione: i ceppi enterotossici non si moltiplicano a temperature basse.

L'esposizione a temperature più elevate, tuttavia (feste, pic-nic) può causare la moltiplicazione dei batteri e il rilascio di enterotossine nei cibi. Le enterotossine sono termostabili, e il riscaldamento degli alimenti non è sufficiente a inattivarle una volta che siano state prodotte.

Le specie di *Clostridium* che possono provocare intossicazioni alimentari sono *C. perfringens* e *C. botulinum*. *C. perfringens* è una delle cause più frequenti di intossicazione da consumo di carne, specialmente quando il calore non penetra bene all'interno della pietanza durante la cottura e l'alimento viene poi mantenuto tra 20 e 40°C. La quantità di cellule batteriche ingerite deve essere elevata (almeno 10^8). Nell'ambiente povero di ossigeno dell'intestino *C. perfringens* sporula e produce enterotossina. I sintomi si manifestano dopo 7-15 ore dall'ingestione con diarrea e crampi, ma senza vomito o nausea; si risolve in genere spontaneamente entro 24h e i casi di morte sono molto rari.

L'intossicazione da *C. botulinum* è meno frequente ma molto pericolosa. Gli alimenti a rischio sono quelli destinati ad essere mangiati senza preventiva cottura, conservati con spezie, affumicati, confezionati sotto vuoto o inscatolati in ambiente alcalino. In queste condizioni le spore germinano e la neurotossina è attiva (viene inattivata dal pH acido). Le tossine (sette tipi antigenici A → G) bloccano il rilascio di acetilcolina a livello delle sinapsi e delle giunzioni neuromuscolari, causando una paralisi flaccida acuta che inizia dalla testa e discende in modo simmetrico. La durata dell'incubazione (fino ad 8 giorni) è dose-dipendente e la gravità dell'intossicazione è inversamente proporzionale al tempo di incubazione. I primi segni neurologici sono: ptosi palpebrale, diplopia, disfonia e perdita del riflesso della deglutizione. Nei casi non trattati il coinvolgimento della muscolatura respiratoria può rendere necessaria l'intubazione e/o portare a morte per insufficienza respiratoria acuta (70-/80% dei casi). Botulismo infantile: si verifica per ingestione di alimenti contaminati dalle spore, che germinano a livello intestinale e producono tossina. Si manifesta nei bambini di età inferiore ai 6 mesi; il veicolo più frequente è il miele contaminato dalle spore.

Da non dimenticare, tra le intossicazioni alimentari, quelle provocate dalle muffe. Le pericolosissime aflatossine, prodotte da *Aspergillus flavus* (o da *Aspergillum parasiticus*, meno frequente) epato e nefrotossiche, sono potenzialmente mortali. Le aflatossine sono un notevole rischio per la salute umana nei paesi in via di sviluppo, a causa degli alti livelli di prodotti contaminati che vengono consumati. La prevenzione deve essere svolta attraverso

controlli ripetuti ed accurati che portino ad escludere le materie prime contaminate, da tutti i processi dell'industria alimentare.

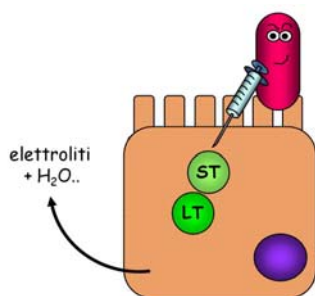
Infezioni alimentari:

Perché si manifestino i sintomi di un' infezione alimentare, è necessario che un certo numero di patogeni attivi siano ingeriti con l'alimento e che attecchiscano. Esempi di infezioni alimentari sono: il tifo o le salmonellosi minori, le malattie gastro-enteriche provocate da ceppi patogeni di *Escherichia coli*, la gastro-enterite da *Campylobacter*, la listeriosi.

Salmonellosi: I sintomi compaiono solo dopo che il patogeno ha colonizzato l'epitelio intestinale; il tifo è una infezione sistemica grave, trasmessa da acqua o alimenti contaminati; le salmonellosi minori (gastroenteriti) possono essere causate da molti sierotipi; il più frequente è *S. typhimurium*. La fonte di contaminazione sono gli animali a sangue caldo per produzioni alimentari (polli, bestiame) che possono albergare le salmonelle nel tratto intestinale. Gli alimenti maggiormente a rischio sono pollame, carni, insaccati da consumare crudi, preparazioni a base di uova crude. La carica microbica necessaria è di 10^5 - 10^8 cellule batteriche; l'incubazione varia tra 8 e 48h, i sintomi sono mal di testa, diarrea, vomito, spesso febbre che dura 2-3 giorni. La risoluzione è in genere spontanea, ma le salmonelle continuano a essere escrete nelle feci per un certo tempo. In qualche caso si instaura lo stato di portatore sano (le salmonelle si stabiliscono nella cistifellea).

Infezioni intestinali causate da *E. coli*

Diversi gruppi (virotipi) di *E. coli* si comportano da patogeni enterici.



ETEC: (EnteroToxicogenic E. coli)

provocano diarrea senza febbre; colonizzano il tratto GI per mezzo di fimbrie. L'infezione è veicolata da cibo o acqua contaminati; nelle aree endemiche gli adulti sviluppano immunità. La malattia dipende dalla colonizzazione e dall'elaborazione di una o più enterotossine; entrambe queste

caratteristiche sono codificate da geni che si trovano su plasmide. I ceppi ETEC producono una tossina LT (heat-labile) e/o la tossina ST (heat-stable), i geni che codificano queste tossine possono essere localizzati sullo stesso plasmide o su plasmidi diversi. La enterotossina LT è molto simile alla tossina colerica sia come struttura (A-5B) sia come meccanismo d'azione. L'enterotossina ST è in realtà una famiglia di peptidi di circa 2000 dalton. La

mancata inattivazione da parte del calore è dovuta proprio alle loro piccole dimensioni. Le ST causano un aumento del GMP ciclico nel citoplasma delle cellule ospiti, provocando la secrezione di fluidi e di elettroliti, e di conseguenza, la diarrea (secretorica), in modo analogo a quanto accade per il cAMP.

EPEC (Enteropathogenic *E. coli*)



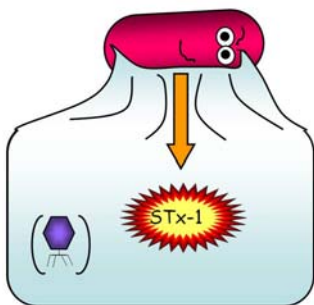
I ceppi EPEC non producono tossine e provocano una diarrea acquosa da malassorbimento. Il fattore di colonizzazione non è rappresentato da una fimbria, ma da una proteina di membrana esterna, l'intimina, responsabile degli stadi finali dell'adesione. L'aderenza dei ceppi EPEC alla mucosa intestinale è un processo complicato, mediato da un sistema di secrezione

di tipo III, che trasferisce un recettore (Tir) nella membrana dell'enterocita. L'intimina si lega al recettore portando la cellula batterica in contatto intimo con l'enterocita; il citoscheletro di actina si riarrangia in prossimità della cellula batterica adesa e si forma un piedistallo. I ceppi EPEC provocano diarrea principalmente nei neonati e nei bambini.

EIEC (Enteroinvasive *E. coli*)

penetrano nelle cellule epiteliali del colon, dove si moltiplicano causando una necrosi cellulare massiva, e una diarrea di tipo dissenterico (acquosa, con sangue) e febbre. Non producono tossine, hanno un meccanismo di invasione delle cellule simile a quello delle shigelle, e il loro stesso megaplasmide di virulenza.

EHEC (Enterohemorrhagic *E. coli*)

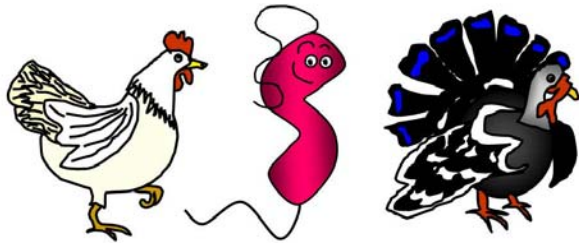


Il gruppo EHEC è rappresentato da un solo ceppo (serotype O157:H7), che causa una sindrome diarroica caratterizzata dalla presenza copiosa di sangue nelle feci e dall'assenza di febbre. Una complicanza frequente, che mette in pericolo la vita della persona affetta, è una insufficienza renale acuta (sindrome uremico-emolitica, HUS), causata dall'effetto tossico che questo ceppo ha

sui reni. L'infezione è associata con l'ingestione di hamburger cotti in modo insufficiente; la fonte di contaminazione è stata individuata a volte nei centri di distribuzione, altre volte nei centri di macellazione; in ogni caso è associata alle carcasse di manzo. I ceppi EHEC non invadono le cellule mucosali ma producono una tossina (Shiga-like) codificata da un

batteriofago temperato, la cui produzione aumenta in condizioni di scarsa disponibilità di ferro.

Campylobacter jejuni è probabilmente una delle principali cause di diarrea nei paesi



Dal pollame non solo le uova...

industrializzati: nei soli USA si calcolano circa 4 milioni di casi l'anno. Provoca diarrea accompagnata da forti dolori addominali, mal di testa, nausea, malessere generale e febbre alta, che può durare 7-10 giorni. Il recupero è spontaneo. Una piccola

percentuale di persone può andare incontro alla sindrome di Guillain-Barre (complicazioni su base autoimmune) che si manifesta con una paralisi generalizzata e può anche causare la morte. L'incidenza di *C. jejuni* è senz'altro superiore a quella del più noto *E. coli* O157-H7: negli anni 1996-97, in Inghilterra, un'indagine su polli freschi interi rivelò la presenza di *C. jejuni* nel 100% dei casi. La normativa per ridurre la possibilità di contaminazione da *Salmonella* è di aiuto nel contenere quella da *Campylobacter*, ma non è risolutiva. Una cottura adeguata è efficace nell'uccidere il microrganismo, che però può contaminare superfici di cucina e altri alimenti destinati ad essere consumati crudi. *Campylobacter* non sopravvive bene al congelamento, che quindi abbassa notevolmente la contaminazione.

Listeria monocytogenes



Listeria scivola da una cellula all'altra

La listeriosi si trasmette attraverso prodotti lattiero caseari non pastorizzati e conservati a lungo a 4°C, o alimenti a base di carne pronti all'uso. *L. monocytogenes* ha una pericolosità intrinseca dovuta alla sua notevole resistenza a

molti disinfettanti e a diversi fattori ambientali come concentrazione salina e temperatura (è una specie psicrofila). Produce internaline che le permettono di entrare in fagociti non professionali, e si sposta da una cellula all'altra polimerizzando l'actina dell'ospite. Persone con sistema immunitario inefficiente e gestanti sono categorie particolarmente a rischio. Per quanto l'esposizione al patogeno sia abbastanza comune, la malattia acuta, che provoca granulomi diffusi, batteriemia e meningite, è rara; sono sempre necessarie, tuttavia, cure ospedaliere e il tasso di mortalità è di circa il 20%. In caso di episodi di listeriosi gli alimenti

contaminati vanno individuati e ritirati e tutti gli impianti coinvolti nella loro preparazione devono essere sterilizzati con calore e radiazioni.

IL CONTROLLO DEGLI ALIMENTI

Il controllo microbiologico degli alimenti è praticato allo scopo di

- a) escludere la presenza dei patogeni
- b) verificare che la carica microbica totale si mantenga al di sotto di una certa soglia, stabilita per legge per ogni categoria di alimenti.

Durante le procedure di controllo vanno tenuti presenti i problemi correlati alla eventuale presenza di cellule danneggiate, o di cellule in uno stato che viene definito Vitale Non Coltivabile (VNC).

Cellule danneggiate:



Durante i trattamenti di conservazione, le cellule microbiche possono essere danneggiate anziché uccise. Il danno si manifesta come diminuita resistenza agli agenti selettivi che si aggiungono nei terreni di coltura, o come aumentate richieste nutrizionali. Ad esempio: se il controllo di un alimento trattato con un conservante viene effettuato seminandolo su un normale terreno di coltura, si può avere l'impressione che il conservante abbia eliminato del tutto le cellule di *Listeria*. Se si usa un terreno particolare ("Listeria repair broth") tuttavia, è possibile osservare la crescita di cellule danneggiate che, in quel terreno, riparano velocemente il danno subito e riprendono a crescere. Il rapporto tra cellule effettivamente uccise e cellule semplicemente danneggiate varia a seconda delle condizioni del trattamento di conservazione e della capacità di adattamento della specie batterica in oggetto. Cellule di *Listeria* coltivate a temperature inferiori a 28°C e portate improvvisamente a 52°C, vengono uccise nella misura di 3-4 log, ma se le stesse cellule sono coltivate a 37 - 42°C e poi portate a 52°C, la percentuale di morte è praticamente nulla e le cellule vengono solo danneggiate in misura di 2-3 log.

Il concetto di danneggiamento è molto importante nella microbiologia degli alimenti per i seguenti motivi:

1) se le cellule danneggiate vengono erroneamente considerate morte nel corso di un test per la determinazione della sensibilità termica, la sensibilità stessa sarà sovrastimata ed il trattamento al calore risulterà insufficiente ad assicurare la sicurezza del cibo o a prevenirne il deterioramento.

2) cellule danneggiate possono sfuggire al controllo post trattamento ma riparare i danni prima della consumazione del cibo.

3) l'agente selettivo che frena la crescita delle cellule danneggiate può essere un comune componente del cibo (es. sale) che agisce in sinergia con una temperatura subottimale: cellule di *S. aureus* danneggiate dall'acido durante la fermentazione di salumi, non saranno in grado di ripararsi finché l'alimento è mantenuto a 5°C, a causa del sale contenuto nell'alimento ma, se il prodotto finito è esposto a temperature più elevate, ripareranno, cresceranno e potrebbero produrre enterotossina. Il processo di "riparazione" richiede sintesi de novo di RNA e di proteine e può rendersi evidente come un allungamento della fase di latenza della crescita. La quantità di riparazione e il ritmo con cui si verifica, sono influenzate da una serie di fattori ambientali: cellule di *L. monocytogenes* che siano state danneggiate dall'esposizione a una temperatura di 55°C per 20', iniziano immediatamente il processo di riparazione (e lo completano in circa 9h) se sono coltivate a 37°C ma non nel latte conservato a 4°C (in queste condizioni il processo di riparazione inizia 8-10 giorni dopo il trattamento e richiede 16-19 giorni per completarsi). Le cellule danneggiate da calore, congelamento e detergenti tendono a perdere componenti cellulari attraverso le membrane danneggiate e il ripristino dell'integrità della membrana è un evento importante per la riparazione del danno. La presenza di osmoprotettivi previene o minimizza il danno da congelamento in *Listeria*. La revitalizzazione di cellule danneggiate da O₂ può essere facilitata da condizioni che limitino l'apporto di ossigeno (aggiunta di catalasi, di composti che riducano l'ossigeno per via enzimatica; condizioni di anaerobiosi).

Il processo di danneggiamento nelle spore è complesso: i vari passi della sporulazione, germinazione ed esocrescita forniscono una serie di bersagli per un possibile danneggiamento da calore, agenti chimici o radiazioni. Il danno si può manifestare sotto forma di aumentata

sensibilità al sale, a tensioattivi, al pH acido, a certe temperature di incubazione o alla tossicità da O₂.

Le radiazioni provocano la formazione di single strand nel DNA, che possono essere riparate dai sistemi "rec". Il danno da calore riguarda in genere il peptidoglicano del cortex sporale e possono essere necessarie settimane o mesi prima che sia riparato. Le spore danneggiate possono essere revitalizzate in diversi modi: se il danno è localizzato alla membrana citoplasmica si aggiungono al terreno amido o carbone che legano i tensioattivi; anche l'innalzamento dell'osmolarità del terreno stabilizza le spore danneggiate e favorisce il processo di riparazione. Se il danno concerne i sistemi di germinazione, l'aggiunta di lisozima al terreno permette di recuperare le spore danneggiate.

Cellule Vitali Non Coltivabili:

Molte specie di microrganismi (*Salmonella*, *E. coli*, *Campylobacter*, *Vibrio* e probabilmente molti altri generi) possono entrare in uno stato che viene definito VNC, nel quale le cellule sono Vitali ma Non Coltivabili con le normali tecniche microbiologiche. Questa differenziazione in cellule "dormienti" rappresenta una strategia di sopravvivenza per molte delle specie che non sono in grado di sporulare. La cellula nello stato VNC è diversa dalla cellula vegetativa "normale": durante la transizione le cellule a forma di bastoncino si raggrinzano e diventano piccoli corpi sferici completamente diversi dalle spore batteriche di *Clostridium* o di *Bacillus*. Perché una popolazione di cellule vegetative completi il processo che la porterà ad un totale stato VNC occorrono da 2 giorni fino a diverse settimane.

Le cellule VNC possono essere distinte dalle cellule morte attraverso l'osservazione diretta al microscopio in presenza del colorante arancio di acridina, che interagisce in modo diverso con il DNA e con l'RNA. L'RNA è predominante nelle cellule vive, anche se VNC, e si lega al colorante provocandone la fluorescenza in campo rosso. Se si osserva invece una fluorescenza in campo verde, dovuta all'interazione del colorante con il DNA, si può considerare la cellula morta, in quanto manca attività trascrizionale e l'RNA ha un'emivita molto breve, specialmente nei procarioti. La transizione allo stato VNC è nella maggior parte dei casi indotta dalla limitazione dei nutrienti in ambienti acquatici, ma può essere provocata anche da modificazioni della concentrazione salina, esposizione a ipocloriti e cambiamenti di temperatura: tutte condizioni che si verificano spesso nel corso dei trattamenti per la conservazione degli alimenti.

Le modalità di transizione allo stato VNC variano da specie a specie: *E. coli* tenuto a 30°C per un mese entra in stato VNC mentre muore nelle stesse condizioni ad una temperatura di 4°C; *Vibrio harvey* si comporta esattamente al contrario, morendo se lasciato a 30°C ma entrando in stato VNC se tenuto a 4°C. I microrganismi responsabili di patologie trasmesse con gli alimenti possono entrare in VNC quando l'alimento viene portato alla temperatura di refrigerazione, il che comporta implicazioni preoccupanti riguardo alla sicurezza dei cibi refrigerati. Il ritorno alla coltivabilità può essere indotto da cambiamenti nella temperatura o dalla graduale aggiunta di nutrienti e non sempre si accompagna ad un aumento del numero di cellule. L'aggiunta di inibitori della sintesi di peptidoglicano e/o proteine può impedire il ritorno allo stato coltivabile. La crescente consapevolezza dell'esistenza dello stato VNC ha portato al riesame del concetto di attendibilità dei metodi colturali e/o di arricchimento per il monitoraggio dei microrganismi nell'ambiente e negli alimenti, e del concetto di vitalità.

microrganismi indicatori.

Nell'analizzare la qualità di un alimento è possibile basarsi sulla presenza di alcuni "microrganismi indicatori", scelti in base ai seguenti criteri:

devono essere presenti e rivelabili nei cibi da esaminare

devono essere (presenza e conta) correlati negativamente alla qualità del prodotto

devono essere facili da coltivare, contare e distinguere da altri microrganismi

la stima della loro quantità deve essere rapida (entro una giornata lavorativa)

la crescita non deve essere inibita dal microflora concomitante.

Questo è possibile per alcuni prodotti, di cui si conosce il principale agente di deterioramento e nel caso in cui questo agente risponda ai requisiti elencati.

In altri casi è possibile determinare la presenza di prodotti metabolici se ne sia stata determinata la correlazione con la perdita di qualità del cibo. Per quanto riguarda i microrganismi patogeni, con l'eccezione di *Staphylococcus* e *Salmonella*, che vengono cercati direttamente, in genere si fa ricorso a microrganismi indicatori come *E. coli* che, se presente in un prodotto pronto al consumo, indica una contaminazione incompatibile con la sicurezza perché condivide gli stessi ambienti dei patogeni enterici, o *Enterococcus*, più resistente, la cui presenza rivela in genere procedimenti di produzione inaccurati. In casi sospetti viene controllata l'assenza di enzimi (termonucleasi di *S. aureus*) o fosfatasi alcalina nel latte pastorizzato (la fosfatasi alcalina bovina viene distrutta dalla pastorizzazione: se un'attività

di questo tipo è presente indica una contaminazione batterica dopo il trattamento o la contaminazione di latte trattato con latte crudo) o di tossine (esame delle granaglie all'UV per le tossine di *Aspergillus flavus*).



MICRORGANISMI E PRODUZIONE DI ALIMENTI

PRODUZIONE DI BIRRA (BRASSAGGIO)

La birra è una delle prime bevande fermentate. La prima testimonianza scritta risale all'epoca dei sumeri (3700 A.C): nel codice di Hammurabi si decretava la morte per chi la producesse diversamente dalle regole stabilite, o ne vendesse senza autorizzazione. In alcuni paesi la birra si prepara secondo usanze diverse dalle nostre, come quella di masticare i chicchi d'orzo o sputare nella miscela (il motivo "scientifico" dietro a questa usanza è l'effetto della ptialina della saliva che accelera la degradazione dell'amido). Ma nella maggior parte del mondo, lo stesso effetto si ottiene in altro modo e le materie prime di un birrificio sono orzo, acqua, luppolo, lievito.

Per ottenere la birra si usa un lievito per fermentare malto e luppolo. L'amido dell'orzo è degradato a glucosio e poi fermentato con produzione di etanolo. Il procedimento si svolge in sei passi successivi, iniziando dalla formazione del malto a partire dall'orzo.

1) Preparazione del Malto - l'orzo viene tenuto a mollo in acqua per 5 - 7 giorni. In questo tempo i grani germinano e producono amilasi e proteasi, essenziali per il brassaggio: le amilasi forniscono lo zucchero da fermentare e le proteasi solubilizzano composti dell'orzo e del luppolo che conferiscono sapore e aroma alla birra.

2) "Cottura" - La germinazione viene interrotta quando le radichette raggiungono circa 1,5 volte la lunghezza del chicco, e i grani vengono portati al "forno" per essere essiccati. Nella stufa il malto acquista colore e aroma. Il colore dipende dalle melanoidine (composti glucosidici che si formano al di sopra di 60°C e si colorano intorno a 80°C). Il malto essiccato viene frantumato per rompere i chicchi esponendo così l'amido all'azione del complesso enzimatico, che non è inattivato dal trattamento in forno. Vengono anche estratti dei composti aromatici, utili nel preservare il prodotto finito. La macinatura non deve danneggiare le vecce, che contengono sostanze aromatiche non desiderabili, ma che sono indispensabili nel processo di filtrazione. Il malto così preparato viene mischiato con additivi bolliti (altri chicchi, carboidrati) e messo a incubare a 65-70°C per breve tempo per permettere alle

amilasi di convertire l'amido in glucosio. Dopo aver portato la temperatura a 75°C per inattivare gli enzimi, si lascia sedimentare la miscela: il materiale insolubile si deposita al fondo e serve come filtro per il mosto di malto che si estrae dal fermentatore.

3) Bollitura con il luppolo - si mescola il luppolo con il mosto di malto e si fa bollire per 2 ore e mezza. Il liquido che si ottiene è il substrato per la fermentazione. La bollitura con il luppolo serve a concentrare il mosto di malto; a uccidere molti microrganismi che potrebbero deteriorare la birra; a completare l'inattivazione degli enzimi e a portare in soluzione composti, del luppolo e della miscela, importanti per il sapore e/o dotati di qualità antisettiche (luppolo) utili per preservare il prodotto finito.

4) Fermentazione - dopo aver fatto raffreddare la massa alla temperatura più adatta, si dà inizio alla fermentazione aggiungendo il lievito al mosto di malto. La coltura starter, ottenuta da una fermentazione precedente, va aggiunta a concentrazioni molto alte (500 grammi per 120 litri). La temperatura dipende dalla varietà di lievito che si usa. La varietà *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* è la più antica, l'unica conosciuta fino al 1700: si usa per le tutte le birre

Fermentazione alta 16-23
°C (S. cerevisiae)



Fermentazione bassa 5-10°
(S. carlsbergensis)

invece, si usa per la fermentazione delle birre Lager, svolge una fermentazione "bassa" con optimum di temperatura tra 5 e 10°C e oltre i 10 gradi conferisce al prodotto un gusto sgradevole; durante la fermentazione il lievito si deposita sul fondo del tino e, verso la fine del processo, tende a dividersi in grossi fiocchi che salgono verso la superficie e cellule di sfaldamento che si depositano sul fondo.

inglesi, le birre tedesche speciali (non lager) e le birre olandesi. Questa varietà svolge una fermentazione "alta" con temperatura ottimale tra 16 e 23°C; dopo tre o quattro giorni di fermentazione le cellule risalgono in superficie e possono essere recuperate. Questo aspetto è vantaggioso dal punto di vista economico, poiché il lievito si riproduce nella birra stessa e può essere riutilizzato per inoculi successivi. La varietà *S. cerevisiae carlsbergensis*

I processi di fermentazione sono favoriti dal calore, per cui la fermentazione alta è più rapida di quella bassa. Nel corso della fermentazione il glucosio viene convertito in etanolo e CO₂. Altri composti fermentabili aggiungono alla birra l'aroma caratteristico.

5) Invecchiamento- il mosto fermentato (birra verde) invecchia a 0°C per settimane o mesi, a seconda del tipo di birrificazione. Il lievito si deposita al fondo del recipiente; si formano altri composti che contribuiscono all'aroma finale.

6) Finitura - la birra è filtrata, pastorizzata, carbonata con l'aggiunta di 0,45 - 0,52% CO₂, e infine chiarificata e imbottigliata.

Esistono anche specialità che si ottengono con fermentazioni diverse: si tratta delle birre a fermentazione spontanea (lambic, gueuze, kriek e frambozen) che sono prodotte nel Payottenland, una regione di 10 chilometri quadrati a sud di Bruxelles. Si tratta di birre di frumento senza l'aggiunta di lievito di coltura, che sfruttano i lieviti presenti nell'aria in quella regione, particolarmente adatti per il brassaggio, che si stabiliscono nei tini di legno delle fabbriche di birra.

i contaminanti della birra

Le procedure di brassaggio possono essere danneggiate dalla presenza di contaminanti, fino al punto da causare la perdita del prodotto. Solo pochi generi batterici sono abbastanza diffusi da poter provocare un danno di questa entità.

MONODERMI

batteri acidolattici (*Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp.): sono resistenti all'etanolo, non richiedono ossigeno e a differenza dei batteri che attaccano il mosto di malto, si riproducono bene a pH basso. (3,5-5,5). Le fonti di contaminazione sono l'inoculo di lievito o l'aria. I batteri acidolattici provocano intorbidamento, acidità e aromi indesiderabili come quello dolciastro vanigliato o di miele, provocati dal diacetile. Alcuni ceppi producono glicocalice e danno una crescita gelatinosa. *Pediococcus* è il contaminante più comune e prevale alla fine della fermentazione e durante la maturazione. Più frequente nelle birre fermentate a basse temperature, se prende il sopravvento è molto difficile da eliminare dalla linea di produzione.

DIDERMI : *Acetobacter* e *Acetomonas*

Sono aerobi o microaerofili e attaccano il mosto prima che il lievito abbia consumato l'ossigeno disponibile, producendo acido acetico e quindi un deterioramento simile a quello che si verifica nel vino. La contaminazione è superficiale e si manifesta sotto forma di un film oleoso o simile

a una muffa. I batteri acidoacetici possono essere portati dai moscerini della frutta o essere presenti come contaminanti nell'inoculo. Non sono disturbati dal pH basso né dalle resine del luppolo.

Zymomonas : è il principale agente anaerobio di deterioramento della birra. La fonte di contaminazione è il terreno (scavi nei punti dove il terreno è impregnato di birra o contaminazione del macchinario). Attacca soprattutto le birre fermentate a temperature più alte (Ale). Molto spesso provoca danni nel corso della fase di imbottigliamento.

Enterobacteriaceae: I batteri "coliformi" attaccano il mosto nelle fasi di raffreddamento o durante la fase lag del lievito all'inizio della fermentazione.

Pectinatus specie strettamente anaerobie, provocano torbidità, producono idrogeno solforato, acido acetico e acido propionico nel mosto e nelle birre già confezionate. La birra diventa torbida con un forte odore di uova marce. Le specie di *Pectinatus* sono capaci di replicarsi tra 15 e 40°C e a pH compreso tra 4,5 a 6. La contaminazione avviene in genere durante la fase di imbottigliamento e si può prevenire con pastorizzazione e clorazione. Le possibili fonti sono acqua, sistemi di drenaggio, macchinari (olio lubrificante accidentalmente in contatto con la birra o con l'acqua).

Altri contaminanti (lieviti): Come per il vino, problemi nella fermentazione possono essere causati dalla presenza di lieviti selvaggi, che possono sostituirsi a *Saccharomyces* nella fermentazione del mosto di malto, ottenendo un contenuto in alcol non ottimale, aromi particolari, torbidità.

VINO

Nei processi di vinificazione possono essere coinvolti lieviti e batteri, con effetti positivi o negativi sulla qualità del prodotto.

Lieviti del vino: si definiscono così i ceppi di lievito capaci fermentare completamente il succo di uva (in grado quindi di tollerare alte concentrazioni di etanolo e di zucchero) ottenendo un prodotto con caratteristiche vinose e privo di aromi indesiderabili. Sono in genere ceppi appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. La definizione legata alle caratteristiche del prodotto si rende necessaria perché anche altri lieviti sono capaci di svolgere una fermentazione completa ma danno luogo a prodotti con qualità organolettiche scarse e possono anche provocare alterazioni nel processo di vinificazione. I soli batteri che abbiano un ruolo "desiderabile" in alcuni processi di vinificazione sono quelli malolattici

(batteri lattici che producono acido lattico anche a partire dall'acido malico). Vengono infatti talvolta usati per fermentazioni secondarie allo scopo di correggere l'eccessiva acidità di alcuni mosti.

Un processo di vinificazione è un evento biologico complesso che scaturisce da un delicato equilibrio tra forze diverse. Nel corso della vinificazione ci sono molti passi importanti, ancora prima dell'avvio della fermentazione vera e propria

1) Raccolta: la vendemmia va effettuata quando i grappoli sono giunti a piena maturazione sulla pianta ed il contenuto zuccherino è massimo. 2) Spremitura: si ottiene con apparecchiature che schiacciano l'uva triturlandola grossolanamente, e separano contemporaneamente i raspi dagli acini. La separazione è importante perché i raspi sono particolarmente ricchi in tannino (0,8-4%). Per alcuni vini bianchi (Champagne) ottenuti da uve rosse viene adottato un metodo più delicato, che prevede la spremitura esclusivamente per pressione. 3) Trattamento preliminare del mosto: i mosti bianchi sono spesso torbidi e si lasciano decantare per allontanare il materiale sospeso. Bisogna evitare che la fermentazione alcolica inizi in condizioni non ottimali, durante il processo di decantazione. L'avvio della fermentazione può essere impedito in diversi modi: aggiungendo SO_2 al mosto, tenendo bassa la temperatura o facendo uso di centrifughe per allontanare le particelle sospese senza effettuare un processo di decantazione prolungato. Quando si usano uve bianche o uve rosse per ottenere vini bianchi, il succo deve essere immediatamente separato dalle vinacce e dal seme. In qualche caso si permette un contatto di 12-24h con le bucce per aumentare l'aroma ma questo procedimento aumenta anche l'estrazione del colore e la sua opportunità va valutata caso per caso a seconda delle caratteristiche desiderate. Un altro procedimento che precede la fermentazione vera e propria è quello, adottato per facilitare l'estrazione del colore per i vini rossi, di porre i grappoli ancora interi in recipienti chiusi. In questo modo il processo di respirazione consuma ossigeno e produce CO_2 provocando la morte delle cellule della buccia (epicarpo) e di conseguenza aumentandone la semipermeabilità e facilitando l'estrazione del colore. Questo tuttavia è un procedimento lento che, in regioni calde, può portare a vini con colore ed acidità scarsi ed odore particolare. Tutti questi passi servono a garantire la qualità del mosto; il corretto rapporto di nutrienti per il lievito infatti, è indispensabile per il successo della fermentazione. 4) Controllo della fermentazione: perché una fermentazione si svolga in modo ottimale è necessario sopprimere la crescita degli organismi indesiderabili. Già in passato, per

evitare che il vino diventasse una zuppa di diversi organismi unicellulari, venivano prese alcune precauzioni. I tini venivano puliti accuratamente per evitare le muffe, e vi venivano bruciati dentro dei bastoncini di zolfo (di questo si occupò anche G. Mendel). Questo procedimento rilasciava anidride solforosa che, sciogliendosi nel succo d'uva, inibiva la crescita microbica. Anche al giorno d'oggi la soppressione degli organismi indesiderabili si ottiene con un trattamento con SO_2 (100-150 mg/l) non più bruciando zolfo, ma aggiungendo metabisolfito di potassio a cui *Saccharomyces* è più resistente di altri lieviti. L'aggiunta di SO_2 subito dopo la pigiatura aiuta anche a solubilizzare le antocianine (pigmenti rossi) ed a prevenire l'azione delle polifenolo-ossidasi.

IMPIEGO DI COLTURE "STARTER"

Un tempo il vino veniva fatto affidandosi ai lieviti "selvatici" già presenti sulla superficie dei grappoli (le bucce degli acini sono ricoperte da batteri, muffe e lieviti). Questo procedimento favoriva la varietà ma era esposto alla possibilità che qualcosa andasse male. I vinificatori conoscevano poco della varietà di organismi presenti sulla superficie del frutto: immettevano nel mosto da fermentare una notevole gamma di lieviti diversi, ma anche una pleora di batteri, muffe ed altri contaminanti dal suolo.

Questo problema può essere aggirato oggi con l'impiego di colture starter: ceppi selezionati che vengono aggiunti al mosto in quantità tale (circa 10^6 cellule/mL) da portare le probabilità di successo praticamente al 100% a meno che il mosto non sia gravemente carente in nutrienti. Esistono diversi starter con differenze nelle caratteristiche di crescita e di fermentazione (relativa tolleranza all'etanolo allo zucchero, caldo o freddo etc.).

QUALITÀ DEI NUTRIENTI

L'apporto adeguato di nutrienti dipende dalla qualità dell'uva raccolta.

Il momento della raccolta è molto importante: se i grappoli vengono raccolti troppo presto, il loro contenuto in zuccheri sarà insufficiente e si otterranno vini acquosi a basso contenuto alcolico, facilmente soggetti a deviazioni indesiderate della fermentazione; se la raccolta viene ritardata, gli acini andranno incontro ad un processo di appassimento, con perdita di acqua e, di conseguenza maggiore percentuale di zuccheri: si avranno quindi vini molto alcolici, ma a bassa acidità. Sia il contenuto alcolico che l'acidità sono fattori che servono a mantenere il controllo della fermentazione. Oltre alla fonte di carboidrati è importante la presenza di ossigeno all'inizio della fermentazione; in genere è più che sufficiente l' O_2 disciolto presente

subito dopo la pigiatura; può essere necessario aggiungerne solo nel caso di mosti molto dolci. In seguito, nel corso della fermentazione è necessario prevenire l'ossidazione dei diversi componenti, mantenendo il mosto al riparo dall'aria.

CONTROLLO DELLA TEMPERATURA

Il controllo della temperatura è uno dei passi più delicati durante un procedimento di vinificazione. La temperatura, infatti, deve essere modulata per facilitare la crescita del lievito e la conseguente trasformazione dello zucchero in alcool; estrarre in modo ottimale aromi e colore, permettere l'accumulo di prodotti desiderabili, e impedire che il calore metabolico sviluppato dal lievito stesso innalzi la temperatura del tino causando il rallentamento eccessivo della crescita o addirittura la morte del lievito.

L'optimum di temperatura per la crescita di *Saccharomyces* è di 25°C ma la fermentazione non viene mai iniziata in a questo valore perché sarebbe altrimenti quasi impossibile impedirle di raggiungere i 30°C, temperatura alla quale la fermentazione può diventare incontrollabile e che causa la morte delle cellule di lievito, inducendo una marcata sensibilità agli effetti tossici dell'alcol. Se la temperatura si alza eccessivamente, inoltre, i batteri ambientali termoresistenti possono prendere il sopravvento, produrre inibitori del processo di fermentazione e causarne l'arresto definitivo. La pigiatura viene spesso eseguita ad una temperatura inferiore a 18°C (nelle aree più calde anche di notte). Per quanto riguarda i vini bianchi, la temperatura alla quale si formano e si mantengono in modo ottimale i prodotti secondari desiderabili è compresa tra i 10 ed i 20°C ma temperature così basse rallentano la fermentazione prolungandola per 6-10 settimane contro le 1-4 necessarie a temperature più elevate. Se la fermentazione è troppo lenta, spesso lo zucchero non viene trasformato completamente e altera il sapore del vino prodotto. Al di sotto dei 10°C esiste anche il rischio della morte del lievito. La maggior parte delle fermentazioni per la produzione di vini bianchi quindi, viene avviata a 20°C e mantenuta entro i 25°C. Nel caso dei vini rossi la situazione è più complessa perché l'estrazione ottimale del colore non avviene a temperature troppo basse. Le fermentazioni per i vini rossi quindi vengono avviate e mantenute a temperature comprese tra 22 e 28°C, esercitando uno stretto controllo sul procedimento, mediante scambiatori di calore, per impedire che la temperatura della massa superi i 28°C. Nel caso dei vini rossi, ancor più che per i bianchi, va particolarmente curato l'aspetto microbiologico della fermentazione perché la temperatura di fermentazione è permissiva per i procarioti.

TRATTAMENTO DEL "CAPPUCCIO" (VINI ROSSI)

Quando il prodotto da ottenere è un vino rosso, la fermentazione viene eseguita in presenza delle vinacce che tendono a salire sulla superficie del mosto. Questo "cappuccio" però ostacola la fermentazione, inibisce l'estrazione di pigmenti e aromi, e può causare un eccessivo aumento della temperatura. Per prevenire questi effetti indesiderati, il cappuccio deve essere immerso nella massa almeno due volte al giorno. L'operazione, relativamente semplice in fermentatori piccoli, diventa complessa con i recipienti con capacità maggiore di 380 litri. In questo caso si interviene con pompe che pescano dal fondo il mosto e lo ri-immettono dall'alto sommergendo il cappuccio e rimescolando la massa.

alterazioni microbiche

Qualunque batterio, lievito selvatico o muffa che cresca nel mosto può condurre ad alterazioni nel processo di vinificazione, un fatto noto già prima dell'epoca romana. In teoria non si dovrebbe avere alcuna crescita se non quella del *Saccharomyces*, ma la contaminazione può venire da moltissime fonti: i recipienti, le bottiglie, i tini, le botti. I contaminanti sono in genere lieviti selvatici, muffe e diversi batteri come, ad es. *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus* e *Pediococcus*

Fioretta: si verifica in vini in cui la fermentazione non abbia dato luogo ad un tenore alcolico sufficiente, a causa del sopravvento di *Mycoderma vini* e si manifesta con la formazione un velo superficiale sul mosto. Il *M. vini* ossida l'alcol e quindi causa il deterioramento del prodotto.

Spunto (acescenza) vini poco alcolici e ad elevata acidità possono favorire la crescita di *Acetobacter aceti* e *Acetobacter oxydans* che trasformano l'alcol in acido acetico ed etil-acetato (la principale componente sensoria dell'aceto) rovinando irrimediabilmente il prodotto ed il glucosio in acido gluconico.

Amarore: si può verificare in vini già imbottigliati se le uve non erano state sufficientemente selezionate (acini guasti) o se la vite era stata attaccata dalla peronospora. Quest'alterazione è causata dalla presenza di *B. amaracrylus* e si manifesta con un sapore scipito che poi diventa amaro (simile al chinino). In questa alterazione il fruttosio viene fermentato a mannitolo e può essere fermentato anche il glicerolo.

Girato: (Mercorella, Cercone) alterazione dovuta essenzialmente ad una fermentazione tartarica portata avanti da diversi procarioti, che si manifesta con una fermentazione

tumultuosa (sobbollimento) incontrollabile. Le specie più comuni sono quelle del genere *Lactobacillus* che intorbidano il vino e producono acido lattico ed acido acetico.

In questo tipo di alterazione sono spesso implicati i cosiddetti "ceppi feroci" che producono acido acetico con una rapidità impressionante e che di conseguenza interrompono la fermentazione alcolica visto che *S. cerevisiae* è inibito dall'1% di acido acetico. Il problema riguarda in genere mosti con un alto pH di partenza; alcune specie di *Lactobacillus* sono molto resistenti all'etanolo e possono resistere anche in vini ad alto contenuto alcolico (fino al 20%). Le alterazioni che causano sono particolarmente minacciose per vini come il porto ma sono facilmente evitabili con l' SO_2 .

Lieviti: Anche alcune specie di lieviti, che competono per il substrato con *Saccharomyces* e possono provocare cattivo sapore, cattivo odore, gas o torbidità possono essere causa di alterazioni nel corso della vinificazione.

Schizosaccharomyces pombe: è capace di metabolizzare completamente l'acido malico e per questo motivo è stato sperimentato come lievito da vino per fermentare mosti acidi. La qualità dei prodotti però è stata deludente e si preferisce ricorrere ai batteri malolattici per una seconda fermentazione che corregga l'eccessiva acidità.

Zygosaccharomyces La provenienza di questo contaminante è spesso correlata a succhi d'uva concentrati usati per dolcificare il mosto; le alterazioni si verificano in vini semi-secchi stabilizzati con sorbato (*Zygosaccharomyces* infatti è resistente) piuttosto che con filtrazione sterile e pratiche in asepsi all'atto dell'imbottigliamento. *Brettanomyces* e *Dekkera* sono considerati lieviti di deterioramento a causa dell'odore sgradevole associato alle loro fermentazioni. Questa infezione può verificarsi con tutti i vitigni e tutte le qualità di vino.

Muffe: le muffe sono organismi aerobi: è raro che abbiano importanza nelle alterazioni del vino. I loro effetti però diventano evidenti se i grappoli sono pesantemente intaccati al tempo della raccolta. La rottura della buccia causata dalle muffe, infatti, permette il contatto prematuro del succo con il microbiota presente sulla buccia e scatenare una fermentazione alcolica non controllata. La fermentazione prematura a sua volta favorisce un attacco da parte di microrganismi ossidanti, con la formazione di quantità inaccettabili di acido acetico, etil-acetato ed acetaldeide. La muffa *Botrytis cinerea* può causare l'alterazione detta "casé" (browning) che si manifesta con un colorito brunastro e può essere prevenuta con la

pastorizzazione prima dell'avvio del processo fermentativo. La stessa muffa ha un ruolo speciale e positivo in alcune fermentazioni particolari (vini " *Sauternes* "): i grappoli affetti dalla muffa "nobile" sono raccolti tardi, parzialmente appassiti, e il loro contenuto zuccherino è molto alto.

CRAUTI

Sauerkraut significa letteralmente "cavolo acido": i crauti infatti si ottengono per fermentazione da parte di microrganismi naturalmente presenti sulle foglie, con la sola aggiunta di sale (2-3%). Il principale prodotto della fermentazione è l'acido lattico che, insieme a prodotti minori, conferisce al cavolo il sapore e la consistenza caratteristici.

Le foglie di cavoli maturi vengono lavate, affettate, mescolate al sale e pressate in contenitori progettati per proteggere il contenuto dall'ossigeno ma lasciare uscire il gas che si forma durante la fermentazione. L'intero processo (che si svolge a circa 21°C) richiede circa 5 settimane. L'aggiunta di sale ha la duplice funzione di provocare la fuoriuscita di liquido e nutrienti dalle foglie e impedire lo sviluppo di microrganismi indesiderati; deve quindi essere molto omogenea per impedire che si formino sacche poco o troppo salate che potrebbero causare, rispettivamente, deterioramento o mancata fermentazione. La successione delle specie microbiche è determinata dal pH della fermentazione, che inizia ad opera di coliformi. I coliformi, crescendo e fermentando gli zuccheri, abbassano il pH, e stabiliscono un ambiente favorevole per *Leuconostoc*, che diventa la specie dominante mentre la popolazione dei coliformi declina. A sua volta *Leuconostoc* continua ad abbassare il pH e crea condizioni favorevoli alla crescita di *Lactobacillus* (a volte *Pediococcus*) che portano a termine la fermentazione. L'esclusione dell'ossigeno è critica per evitare la crescita di muffe e lieviti acidofili.