

BIOCHIMICA DEI SISTEMI DI DEPURAZIONE

Introduzione

I rifiuti organici ricchi di biopolimeri di origine industriale, agricola, zootecnica o urbana possono essere depurati con tecniche sia aerobiche sia anaerobiche. Negli ultimi anni è cresciuto l'interesse per i sistemi di depurazione anaerobica che presentano alcuni vantaggi:

- maggiore economicità di esercizio,
- minore quantità di fanghi prodotti,
- migliore qualità come fertilizzanti dei fanghi prodotti,
- produzione di biogas che contiene circa il 65% di metano.

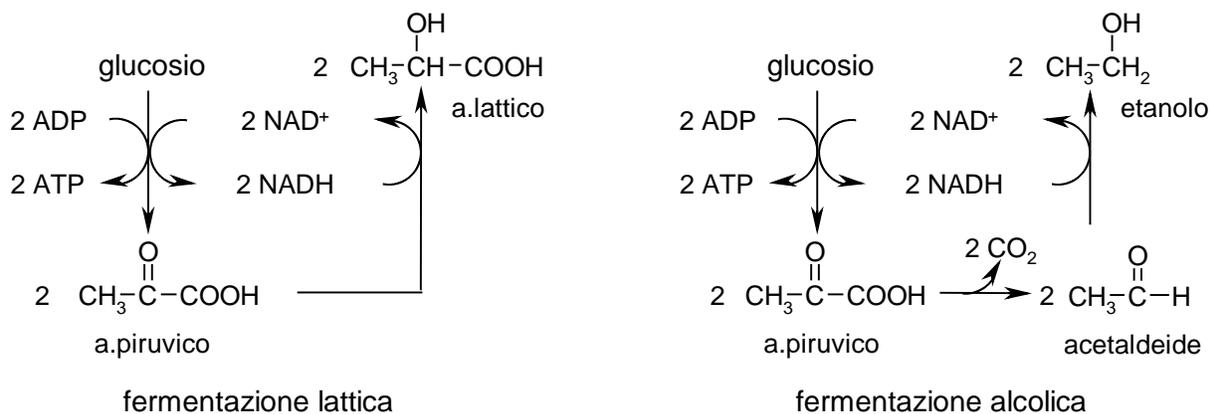
La depurazione consiste nella completa degradazione dei biopolimeri presenti nei liquami di scarico in modo da abbassarne il carico inquinante, espresso come BOD₅, entro i limiti di legge.

Sia nei depuratori aerobici che in quelli anaerobici questo lavoro è svolto essenzialmente da batteri. Esamineremo quindi brevemente le caratteristiche principali del metabolismo degradativo dei batteri per poi descrivere più in dettaglio i **metanobatteri** e la biochimica della produzione di biogas nei depuratori anaerobici.

Il metabolismo degradativo dei batteri, catabolismo, consiste essenzialmente in una serie di ossidazioni che trasformano le biomolecole complesse di cui essi si nutrono, carboidrati, proteine, lipidi, in molecole più semplici. Per condurre queste ossidazioni, i batteri utilizzano i coenzimi NAD⁺ e FAD che vengono ridotti a NADH e FADH₂. I batteri devono poi ossidare i coenzimi ridotti, questa ossidazione può essere fatta, però, in due modi diversi: o riducendo altre sostanze organiche, processo chiamato **fermentazione**, o riducendo sostanze inorganiche, processo chiamato **respirazione**.

Fermentazione

Le reazioni di fermentazione sono complesse reazioni biochimiche di ossidoriduzione che producono energia sotto forma di ATP e avvengono in anaerobiosi, cioè in assenza di ossigeno elementare O₂, e utilizzano come **ossidante finale una molecola organica**. La fermentazione più importante e diffusa è quella del glucosio, se ne conoscono almeno sette diverse che prendono il nome dal loro prodotto finale, così si parla di fermentazione alcolica, lattica, propionica, butirrica, formica, ecc. Ciascuna di esse è caratteristica di un particolare gruppo di batteri e alcune trovano applicazione nell'industria alimentare (birra, vino, yogurt, formaggi, ecc.). Qui ci limiteremo a descrivere brevemente solo il bilancio complessivo delle due fermentazioni più importanti quella lattica e quella alcolica che abbiamo già incontrato nel capitolo della respirazione cellulare.



Le fermentazioni si svolgono nella cellula batterica in due stadi:

Nel primo stadio avviene la **glicolisi** nella quale il glucosio viene spezzato in due frammenti ed ossidato formando due molecole di acido piruvico. Si tratta di una via anaerobica costituita da una sequenza di 10 reazioni enzimatiche. Durante la glicolisi abbiamo la produzione netta di 2 molecole di ATP, ma anche il consumo di 2 molecole di NAD⁺ che viene ridotto a NADH.

Nel secondo stadio i **2 NADH vengono ossidati a NAD⁺** rigenerando la capacità ossidante della cellula batterica che può così continuare ad ottenere energia dall'ossidazione del glucosio nella glicolisi. Nelle fermentazioni non è l'ossigeno elementare (inorganico) che svolge questa ossidazione, ma lo stesso acido piruvico (organico) o una molecola ad esso collegata come la formaldeide della fermentazione alcolica. L'acido piruvico viene ridotto e trasformato in una serie di cataboliti diversi per ogni tipo di fermentazione: acido lattico, alcol etilico, acido propionico, acido butirrico, acido formico, ecc.

Nelle fermentazioni lattica e alcolica vengono prodotti acido lattico ed etanolo che devono poi essere eliminati dalle cellule batteriche. In realtà questi cataboliti contengono ancora molta energia chimica dato che potrebbero essere ulteriormente ossidati. Solo una piccola parte dell'energia contenuta nel glucosio è stata recuperata, 2 ATP, mentre i batteri che operano la respirazione aerobica ottengono ben 38 ATP per ogni molecola di glucosio ossidata a CO₂. L'efficienza energetica della fermentazione è dunque molto bassa, solo il 5.2% rispetto alla respirazione aerobica. Dato che il materiale finale non è completamente ossidato, questi batteri non possono essere usati da soli in un depuratore, ma devono essere associati ad altre specie batteriche come vedremo più avanti parlando dei depuratori anaerobici.

Respirazione

Come le fermentazioni, anche le reazioni di respirazione sono un insieme di complesse ossidoriduzioni che producono energia sotto forma di ATP. Nelle respirazioni, però gli accettori finali di elettroni sono **molecole inorganiche**. Quando l'ossidante inorganico è l'ossigeno atmosferico O₂, che viene ridotto ad H₂O, si ha la **respirazione aerobica** e questo è sicuramente il caso più importante. Nella **respirazione anaerobica** vengono utilizzati altri ossidanti inorganici diversi dall'O₂, come il solfato SO₄²⁻ che viene ridotto ad acido solfidrico H₂S dai batteri desolforanti, il nitrato NO₃⁻ che viene ridotto ad azoto N₂ dai batteri denitrificanti, lo ione H⁺ che viene ridotto ad H₂ dai batteri acetogenici, l'anidride carbonica CO₂ che viene ridotta a metano CH₄ dai metanobatteri, ecc. Le principali respirazioni aerobiche e anaerobiche sono mostrate in tabella:

Riducente	Ossidante	Prodotto	Organismo
Composto organici	O ₂	CO ₂ + H ₂ O	Piante, animali, molti batteri
H ₂	O ₂	H ₂ O	Idrogenobatteri
NH ₃	O ₂	NO ₂ ⁻ + H ₂ O	Batteri nitrificanti
NO ₂ ⁻	O ₂	NO ₃ ⁻ + H ₂ O	Batteri nitrificanti
Fe ²⁺	O ₂	Fe ³⁺	Ferrobacillus
S ²⁻	O ₂	SO ₄ ²⁻ + H ₂ O	Thiobacillus
H ₂	SO ₄ ²⁻	H ₂ O + S ²⁻	Batteri desolforanti
Composto organici	NO ₃ ⁻	N ₂ + CO ₂	Batteri denitrificanti
Acidi grassi, zuccheri	H ⁺	H ₂ + acido acetico	Batteri acetogenici
H ₂	CO ₂	CH ₄	Metanobatteri

Respirazione aerobica

Il processo respiratorio aerobico avviene in tre stadi

- 1) glicolisi
- 2) decarbossilazione ossidativa e ciclo di Krebs
- 3) catena respiratoria e fosforilazione ossidativa.

Questi passaggi sono già stati ampiamente descritti nel capitolo della respirazione cellulare a cui rimandiamo. Qui ci limitiamo ad osservare che nelle cellule eucariote gli stadi 2 e 3 avvengono nei mitocondri. I batteri sono sprovvisti di mitocondri, ma possiedono delle particolari strutture generate dal ripiegamento della membrana cellulare chiamate **mesosomi** che sono considerati dei mitocondri primitivi. I complessi proteici della catene di trasporto degli elettroni si trovano immersi nella membrana cellulare che genera i mesosomi.

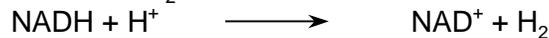
Depuratori anaerobici

Prima di esaminare nei dettagli la respirazione anaerobica compiuta dai metanobatteri, vedremo da quali specie batteriche e attraverso quali tappe è realizzata la depurazione anaerobica.

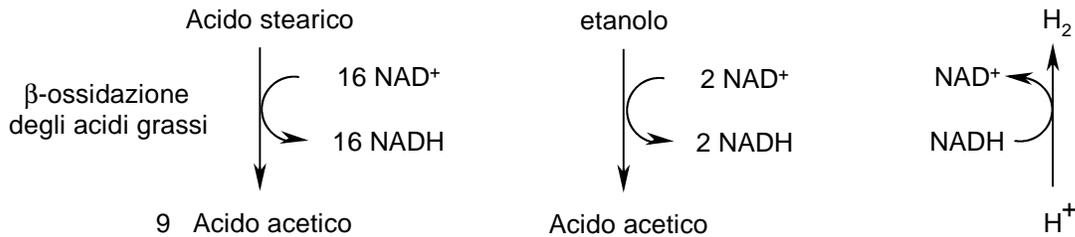
Nei digestori anaerobici vengono introdotte biomolecole complesse, carboidrati, proteine, lipidi, che vengono degradate a CH_4 e CO_2 . Queste trasformazioni biochimiche sono compiute da molte specie batteriche che collaborano insieme. Il processo di digestione anaerobica può infatti essere diviso in tre fasi: idrolisi e fermentazione, acetogenesi, metanogenesi.

1ª fase: idrolisi e fermentazione. Nella prima fase troviamo i batteri idrolitici che sono anaerobi facoltativi cioè vivono normalmente in condizioni anaerobiche eseguendo delle fermentazioni, ma possono vivere anche in presenza di ossigeno O_2 eseguendo la respirazione aerobica. Questi batteri attaccano le biomolecole complesse, amidi, cellulose, proteine, lipidi, ecc. secernendo degli enzimi idrolitici extracellulari che le trasformano in molecole più semplici: monosaccaridi, amminoacidi, acidi grassi. Poi assorbono parte di queste molecole e le degradano attraverso processi fermentativi oppure attraverso processi aerobici, in questo modo consumano tutto l' O_2 disciolto nei liquami rendendo l'ambiente totalmente anaerobico cosa essenziale soprattutto per i metanobatteri che incontreremo più avanti nella terza fase. I prodotti finali dell'azione dei batteri idrolitici sono dunque: **acido acetico, CO_2 , acidi grassi, zuccheri, acidi organici, alcoli.**

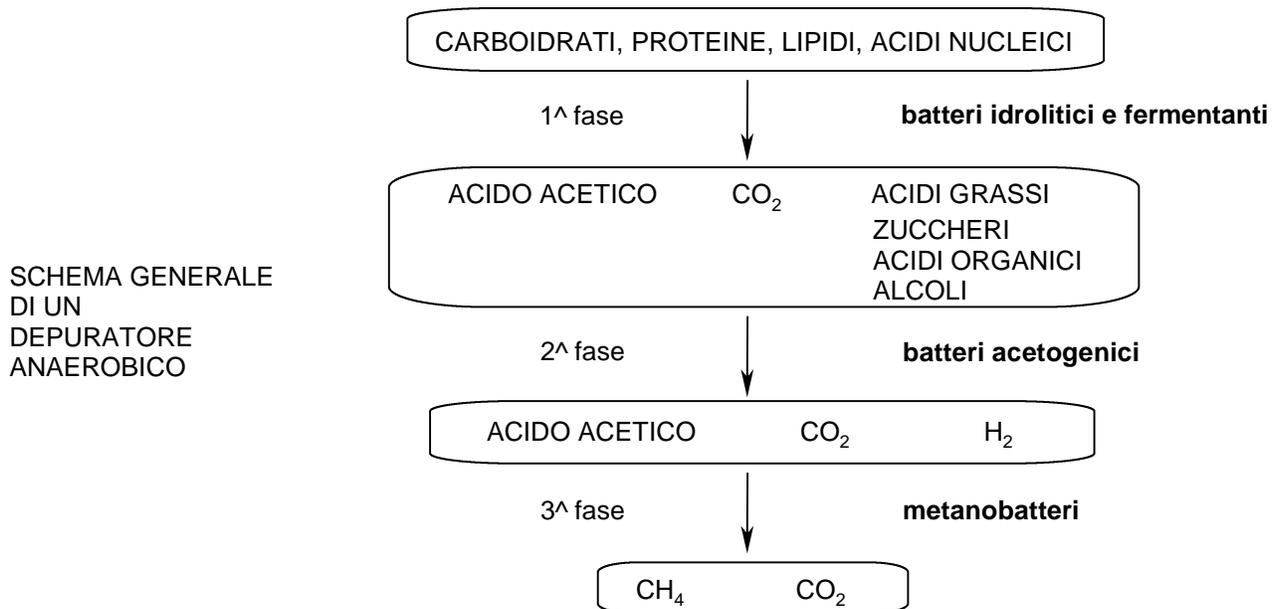
2ª fase: acetogenesi. Nella seconda fase intervengono i batteri acetogenici, anaerobi facoltativi, che operano una serie di ossidoriduzioni a partire da **acidi grassi, zuccheri, acidi organici, alcoli** che vengono ossidati ad **acido acetico** (o CO_2 in presenza di O_2), con produzione di H_2 . È importante osservare che questa loro grande capacità di ossidazione si può realizzare solo perché sono in grado di rigenerare i loro coenzimi ossidati NAD^+ utilizzando come accettore finale di elettroni lo ione H^+ che viene ridotto ad H_2 secondo la reazione:



I batteri acetogenici operano quindi una respirazione anaerobica che può essere così riassunta:



L'accumulo di idrogeno elementare H_2 inibisce la crescita dei batteri acetogenici che per questo dipendono dai metanobatteri che nella terza fase sono in grado di utilizzare H_2 per la riduzione della CO_2 a CH_4 .



3ª fase: Metanogenesi. Nella terza ed ultima fase intervengono i metanobatteri, un gruppo di batteri strettamente anaerobi che appartengono a generi diversi dato che hanno caratteristiche morfologiche molto diverse tra loro, ma sono accomunati da notevoli somiglianze fisiologiche che ne fanno un gruppo omogeneo e molto specializzato. I principali generi conosciuti sono: Methanococcus, Methanosarcina, Methanobacterium, Methanobacillus, Methanospirillum.

Questi batteri sono presenti nel ruminante dei bovini, nelle concimaie, sul fondo delle paludi, ecc. Dal punto di vista nutrizionale sono chemiolitoeterotrofi, cioè ricavano l'energia necessaria per il loro anabolismo degradando sostanze chimiche (chemiotrofi) e possono utilizzare, per costruire le proprie strutture carboniose, sia la CO₂, sia molecole organiche (litoeterotrofi), infine sono anaerobi obbligati, cioè la presenza dell'ossigeno elementare per loro è tossica e la loro crescita è totalmente inibita anche solo da tracce di O₂.

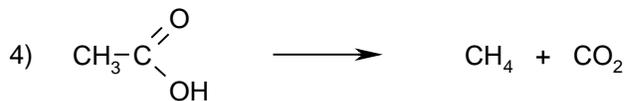
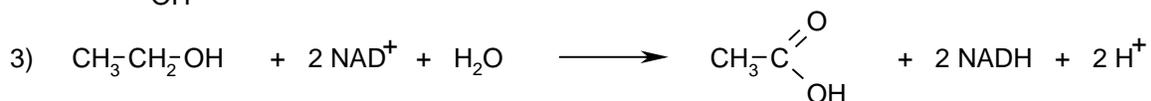
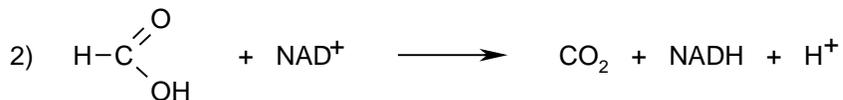
I metanobatteri degradano un numero limitato di molecole, essenzialmente **acido acetico, acido formico, etanolo, CO₂, H₂** e producono **CH₄ e CO₂**. Sottraendo H₂ e acido acetico svolgono un ruolo essenziale nel digestore anaerobico mantenendo il pH a valori ottimali, smaltendo l'H₂ prodotto dai batteri acetogenici e abbassando in modo sostanziale il BOD.

Respirazione anaerobica

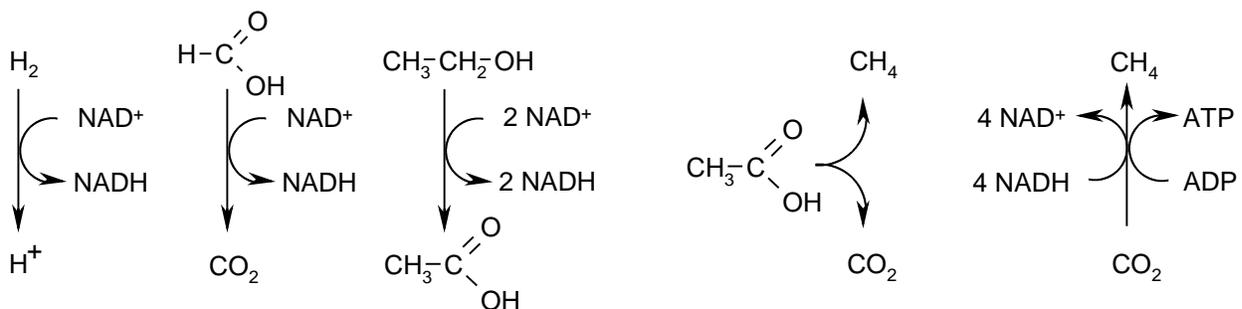
Esamineremo ora in particolare la respirazione anaerobica compiuta dai metano batteri. Questi utilizzano come molecola ossidante inorganica l'anidride carbonica CO₂ che viene ridotta a metano CH₄, come molecole riducenti utilizzano H₂, etanolo, acido formico. La biochimica della metanogenesi non è ancora del tutto chiarita anche se studi compiuti negli ultimi anni hanno permesso di comprenderne i tratti principali. In particolare si è chiarito che i metanobatteri:

- non hanno la glicolisi**, dato che non possono degradare il glucosio
- non hanno il ciclo di Krebs**, dato che non degradano l'acido acetico a CO₂
- non hanno la catena respiratoria e la fosforilazione ossidativa**, dato che non possiedono nè il coenzima Q nè i citocromi;
- sono molto ricchi, invece, di **vitamina B₁₂** e di **acido folico**.

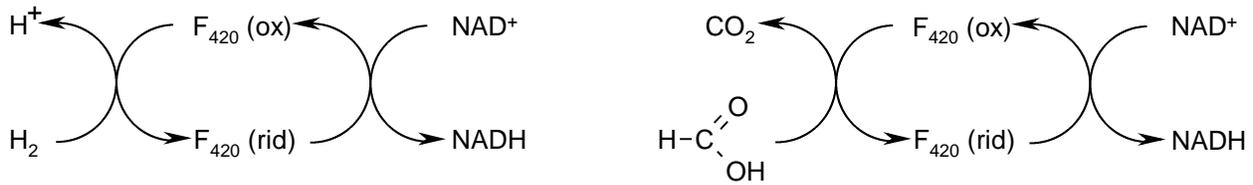
Da tutto questo si deduce che il metabolismo degradativo o catabolismo dei metanobatteri è del tutto diverso da quello proprio degli organismi aerobi. Studi compiuti utilizzando molecole marcate con carbonio radioattivo ¹⁴C hanno dimostrato che le reazioni principali sono le seguenti:



Lo schema riassuntivo per le reazioni compiute dai metanobatteri è dunque il seguente:

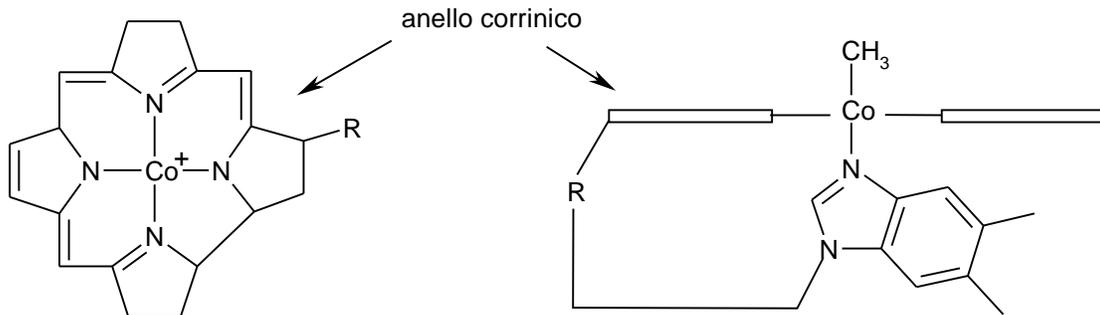


Sembra che le prime due reazioni siano mediate da un coenzima di ossidoriduzione denominato F_{420} di basso peso molecolare e struttura non determinata. Il Fattore 420 è fluorescente, la sua lunghezza d'onda di massimo assorbimento è $\lambda = 420\text{nm}$. Le due reazioni possono essere così schematizzate:

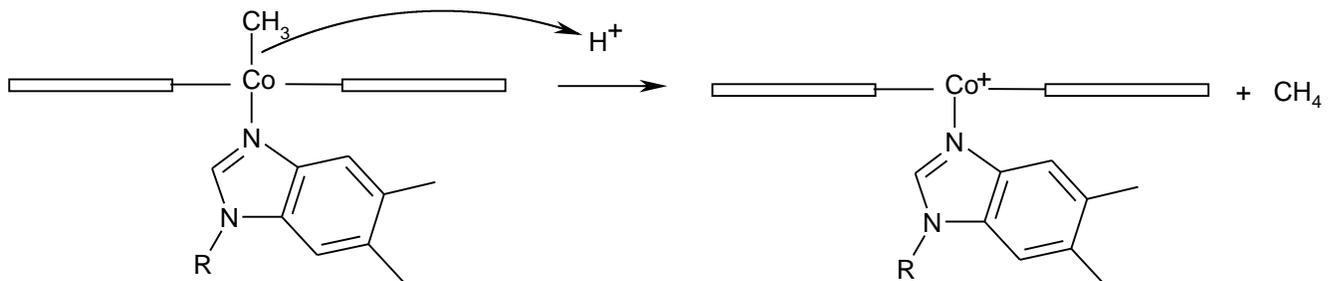


La terza reazione è l'ossidazione dell'etanolo ad acido acetico ed è uguale a quella operata dai batteri acetogenici.

La quarta e la quinta reazione sono quelle che producono direttamente metano. I meccanismi biochimici della produzione del metano non sono ancora del tutto chiariti. Il centro attivo capace di legare i gruppi metilici che poi diventeranno metano è la **vitamina B₁₂** o **cobalammina** di cui i metanobatteri sono molto ricchi. La vitamina B₁₂ è costituita da un **anello corrinico**, simile ad un anello porfirinico, che lega al centro uno **ione cobalto** e assomiglia quindi al gruppo eme dei citocromi e dell'emoglobina dove è presente il ferro e alla clorofilla dove il metallo legato è il magnesio. L'anello corrinico è costituito da quattro anelli pirrolici che con il loro azoto coordinano nel piano l'atomo di cobalto. Ci sono solo tre ponti CH₂ che legano tra loro gli anelli pirrolici, infatti due anelli sono legati direttamente tra loro. Una catena R legata all'anello corrinico termina con una molecola di benzimidazolo che coordina il cobalto sotto il piano dell'anello. La sesta posizione di coordinazione si trova sopra il piano dell'anello e può legare in modo reversibile molecole diverse. La vitamina B₁₂ legata al metile viene chiamata **metilcobalammina**, la sua struttura semplificata è la seguente:



La metilcobalammina, con l'atomo di cobalto nella forma ridotta Co^+ , è un coenzima capace di trasferire reversibilmente il gruppo metilico legato sul cobalto. La reazione di trasferimento del metile all' H^+ con formazione di metano può essere schematizzata per semplicità come segue (anche se avviene attraverso la metilazione di un coenzima intermedio detto coenzima M):

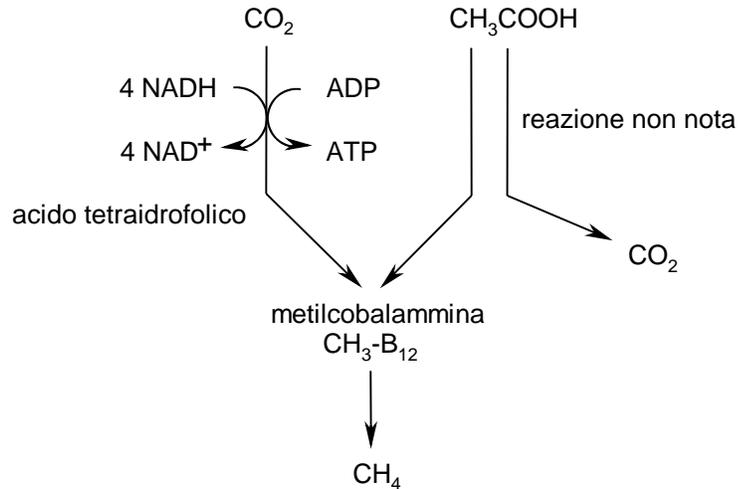


Utilizzando molecole di acido acetico marcate con ^{14}C si è capito che l'acido acetico decarbossila e trasferisce il proprio metile alla cobalammina che poi lo trasforma in metano, non è chiarito però il meccanismo biochimico di questa decarbossilazione. Anche per la reazione di riduzione della CO_2 non è noto con sicurezza il meccanismo, però si è stabilito che nella cellula batterica non vengono

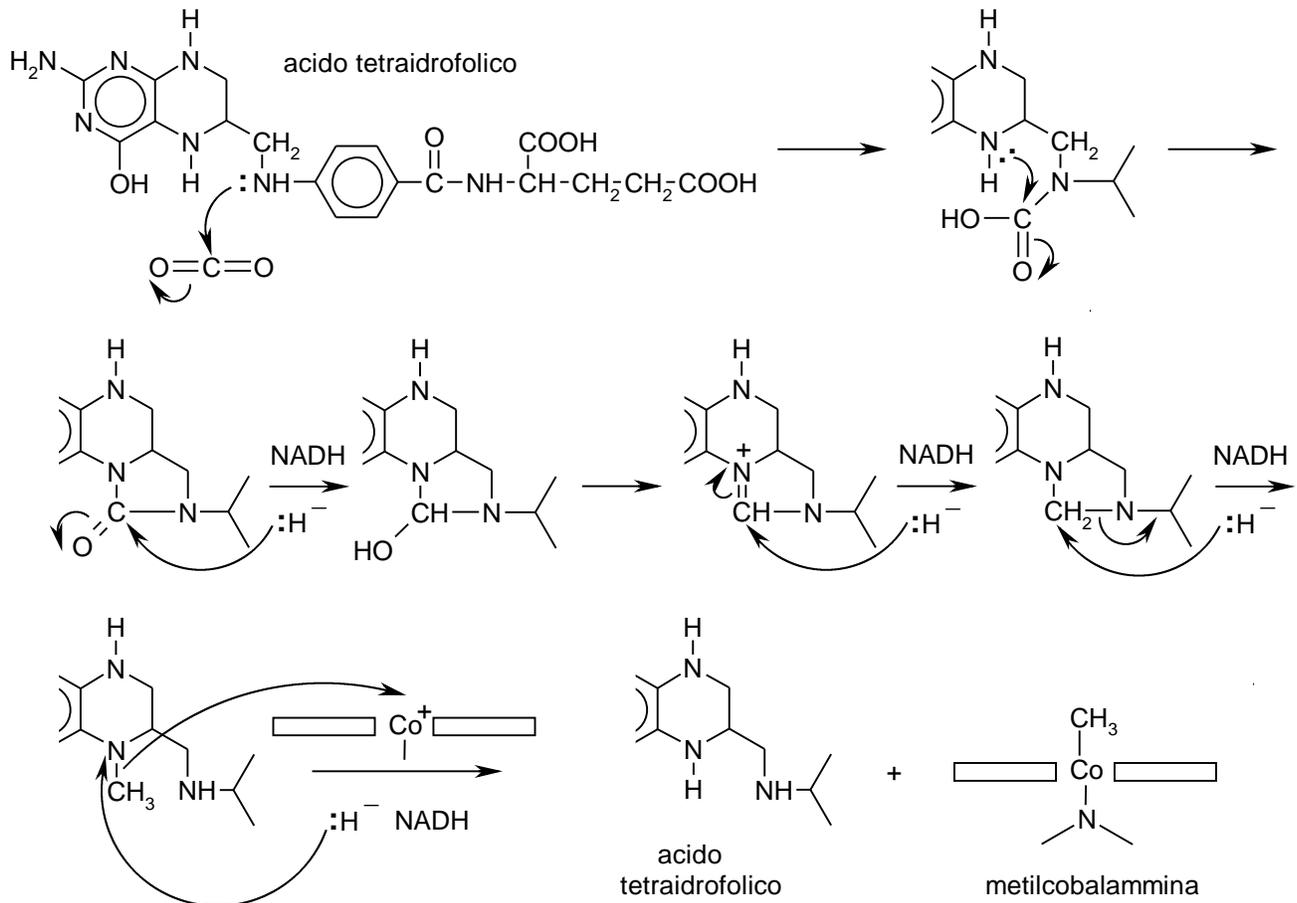
liberati intermedi parzialmente ridotti, questo significa che l'unità C1 resta fermamente legata alla molecola dell'enzima durante le quattro reazioni consecutive di riduzione con 4 NADH. Questo particolare ricorda la riduzione di O_2 ad H_2O sul complesso 4 della catena respiratoria, anche lì non vengono rilasciati atomi di ossigeno parzialmente ridotti che potrebbero scatenare reazioni radicaliche pericolose per la cellula.

Si pensa che il coenzima su cui la CO_2 si fissa e resta legata mentre viene ridotta da 4 NADH consecutivamente sia l'**acido tetraidrofolico** un trasportatore di unità C1 in grado di trasferire poi il metile sulla cobalammina.

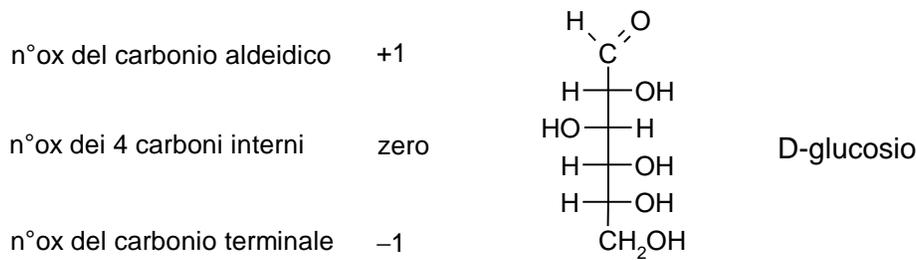
La via di produzione di metano a partire da CO_2 e acido acetico può essere così schematizzata:



La sequenza di reazioni di riduzione della CO_2 sull'acido tetraidrofolico è la seguente:



2) glucosio



Lo stato di ossidazione medio del carbonio nel glucosio è zero e può essere così calcolato:

$$\frac{[-1+1+0(4)]}{6} = \frac{0}{6} = 0$$

L'equazione che dà la percentuale di CH₄ (x) e CO₂ (1-x) nel biogas è la seguente:

$$(-4)x + (+4)(1-x) = 0 \quad -4x + 4 - 4x = 0 \quad -8x = -4 \quad x = 0,5$$

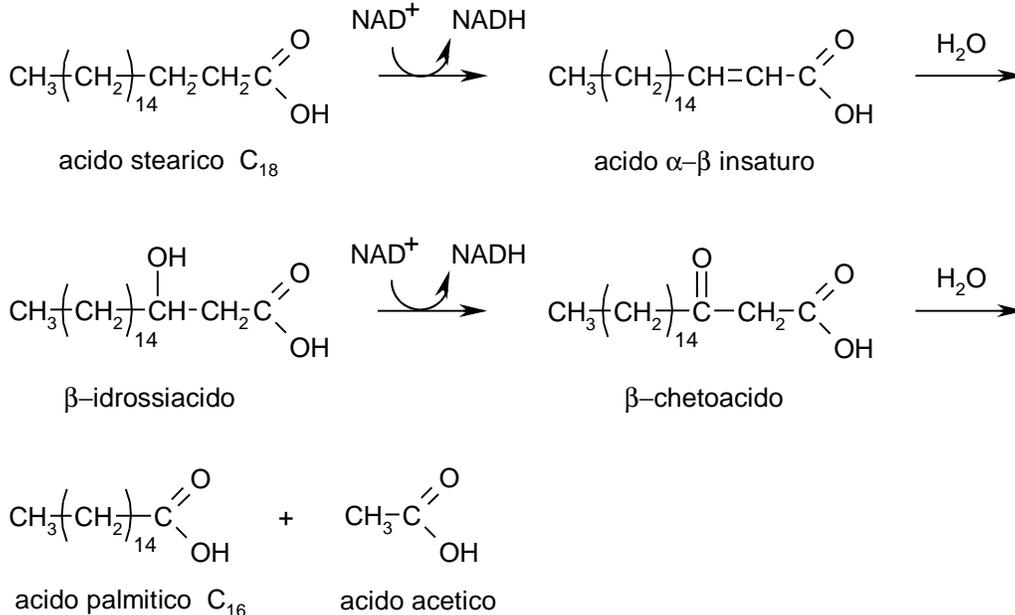
Quindi **la composizione del biogas prevista è 50% CH₄ e 50% CO₂**. Lo stato di ossidazione del glucosio è maggiore di quello dell'acido stearico (0 contro -1,78), quindi è logico che debba essere più ossidato anche il biogas che si ottiene dal depuratore (50% di CH₄ contro 72%).

Metodo chimico.

1) acido stearico

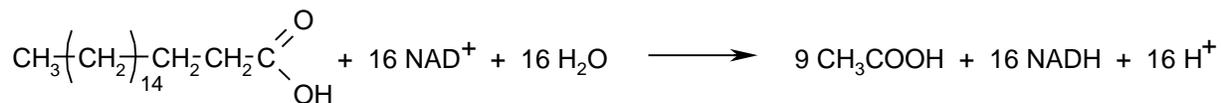
L'acido stearico viene dapprima degradato dai batteri acetogenici attraverso la β-ossidazione degli acidi grassi, una reazione che avviene anche nelle nostre cellule nello spazio della matrice dei mitocondri. Si tratta di una condensazione di Claisen inversa, quindi la prima parte della reazione serve a preparare il β-chetoacido.

Le tappe della reazione sono: acido stearico, acido α-β insaturo, β-idrossiacido, β-chetoacido, condensazione di Claisen inversa che forma l'acido accorciato di due carboni.

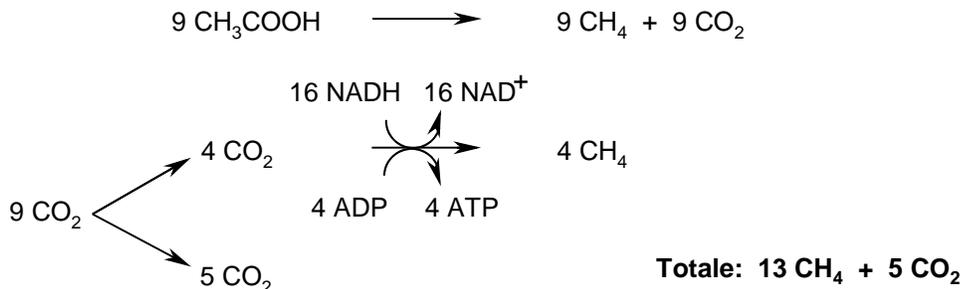


Ogni tappa della β-ossidazione consuma quindi 2 NAD⁺ e 2 molecole di H₂O.

La degradazione dell'acido stearico, C₁₈, produce 9 molecole di acido acetico, ma servono solo 8 tappe di β-ossidazione perché l'ottava tappa produce 2 molecole di acido acetico. La reazione complessiva di β-ossidazione dell'acido stearico è dunque la seguente:



Il NADH viene convertito dai batteri acetogenici in NAD^+ liberando H_2 , poi i metanobatteri riconvertono H_2 in NADH. Se il sistema funziona in modo efficiente, i metanobatteri dispongono di **16 NADH e 9 molecole di acido acetico**. Le reazioni operate sono le seguenti:



Il potere riducente dei metanobatteri è limitato a questi 16 NADH che consentono loro di ridurre a metano solo 4 delle 9 molecole di CO_2 prodotte degradando le 9 molecole di acido acetico. Le molecole di metano generate in tutto sono $9 + 4 = 13 \text{ CH}_4$. Le molecole di CO_2 prodotte in totale sono $9 - 4 = 5 \text{ CO}_2$.

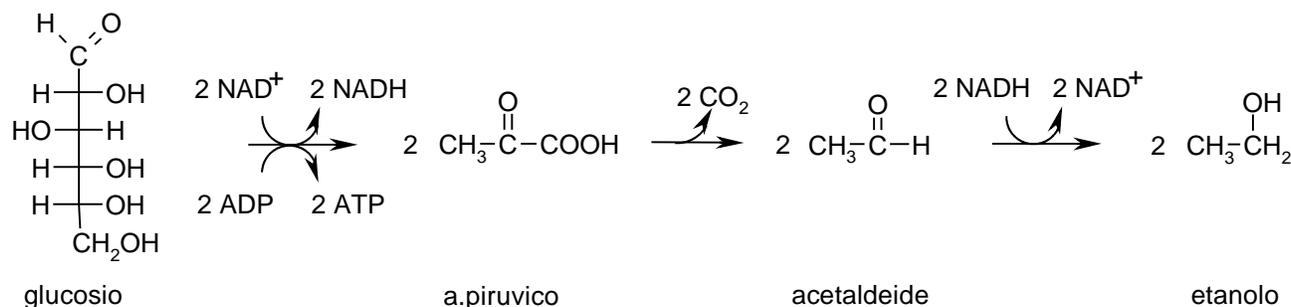
La percentuale di metano nel biogas è $13/18 = 0,72$.

Quindi **la composizione del biogas prevista è 72% CH₄ e 28% CO₂**, esattamente la stessa calcolata col metodo matematico.

2) glucosio

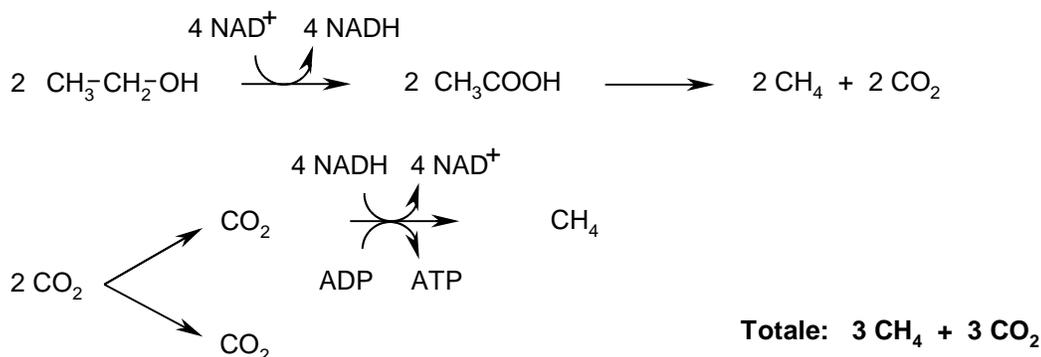
Il glucosio può essere degradato in molti modi, tutti equivalenti per quanto riguarda la produzione di biogas. Qui consideriamo il caso più semplice: il glucosio viene prima fermentato fino ad etanolo dai batteri idrolitici, l'etanolo viene poi degradato direttamente dai metanobatteri.

Batteri idrolitici, fermentazione alcolica:



Le molecole prodotte dai batteri idrolitici sono dunque: **2 CH₃CH₂OH + 2 CO₂**

Le reazioni operate dai metanobatteri sono:



Solo una delle molecole disponibili di CO_2 può essere ridotta a metano perché il potere riducente a disposizione è limitato ai 4 NADH ottenuti dall'ossidazione dell'etanolo. Nessun NADH residuo resta dalle reazioni precedenti dei batteri idrolitici.

La percentuale di metano nel biogas è $3/6 = 0,5$.

Quindi **la composizione del biogas prevista è 50% CH₄ e 50% CO₂**, esattamente la stessa calcolata col metodo matematico.