

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**APPROCCI MOLECOLARI PER LO STUDIO DI
MICROORGANISMI ISOLATI DA IMPIANTI DI
BIOGAS**

Tutor: Prof. Lorenzo Favaro

**Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse Naturali e
Ambiente (DAFNAE)**

Co-tutor: Dott.ssa Sara Agostini

DAFNAE

Laureando: Marco Botteri

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

ABSTRACT	1
1: STATO DELL'ARTE.....	3
2: APPROCCIO SPERIMENTALE.....	7
2.1 ESTRAZIONE E QUANTIFICAZIONE DEL DNA.....	7
2.2 TECNICA ARDRA.....	9
2.3 PURIFICAZIONE DNA E SEQUENZIAMENTO.....	9
3: RISULTATI E DISCUSSIONE.....	11
3.1 PRODOTTI DELLA PCR.....	11
3.2 PRODOTTI DELLA DIGESTIONE ENZIMATICA.....	11
3.3 RISULTATI DEL SEQUENZIAMENTO SANGER.....	12
3.4 CONCLUSIONE.....	13
BIBLIOGRAFIA	14

Abstract:

Il biogas è una fonte di energia rinnovabile che rappresenta una valida alternativa ai combustibili fossili e perciò consiste anche in una delle possibili soluzioni per far fronte al problema del riscaldamento globale. La produzione di biogas a livello industriale avviene tramite un processo di digestione anaerobica che si verifica ad opera di microrganismi quali batteri e archaea, i quali, utilizzando come substrato materiale organico proveniente dai rifiuti urbani o scarti delle lavorazioni agro-industriali, proliferano liberando come prodotti di scarto del metabolismo gas come anidride carbonica e metano.

In questo lavoro viene descritta la procedura di screening, operata attraverso la tecnica ARDRA, per la caratterizzazione di alcuni isolati anaerobici selezionati da inoculi di impianti di biogas in modo tale da poterli poi identificare e caratterizzare in futuro per le loro capacità idrolitiche e fermentative a partire da differenti matrici organiche.

1: Stato dell'arte

Il riscaldamento globale è il fenomeno consistente nell'innalzamento della temperatura media a livello mondiale che ha avuto inizio verso la fine del XIX secolo e continua ai giorni nostri. Esso è causato dall'aumento dell'effetto serra dovuto a sua volta dalla maggiore concentrazione atmosferica di gas serra come CO₂, CH₄, N₂O e altri, derivanti principalmente dalle attività di estrazione e combustione dei combustibili fossili, dagli allevamenti intensivi e dal processo di deforestazione. Tale fenomeno caratterizzato dall'aumento delle temperature porta come conseguenze anche tutti gli eventi ad esso associati come lo scioglimento dei ghiacciai, l'innalzamento del livello dei mari, siccità, desertificazione, maggiore frequenza e intensità di fenomeni atmosferici estremi come tornado, uragani, tifoni, ondate di calore e di freddo.

La produzione di biogas è una tecnologia molto utile per far fronte al problema del riscaldamento globale poiché rappresenta una via per l'ottenimento di gas, in particolare metano, alternativa, rinnovabile e a basso impatto ambientale contrariamente a com'è il processo di produzione per via estrattiva.

La combustione di metano ottenuto per via rinnovabile (biogas) infatti non comporta un aumento netto della concentrazione della CO₂ atmosferica poiché la CO₂ liberata durante la combustione è la stessa che molto tempo prima è stata assorbita, quindi di fatto tolta dall'atmosfera, dalle piante per sintetizzare glucosio grazie alla fotosintesi clorofilliana. Il glucosio così prodotto poi è stato utilizzato, attraverso varie vie metaboliche, per sintetizzare tutte le macromolecole biologiche (carboidrati, proteine, grassi e acidi nucleici) che a loro volta sono proprio i substrati di partenza utilizzati negli impianti di biogas.

La produzione di biogas avviene attraverso un processo chiamato digestione anaerobica che consiste in una serie di reazioni enzimatiche successive attuate da batteri e archaea in condizioni di anaerobiosi. Possono essere identificate quattro fasi differenti: idrolisi, acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi (Fig.1).

Nell'idrolisi, composti ad alto peso molecolare come polisaccaridi, proteine e lipidi vengono idrolizzati nelle loro unità fondamentali, quindi rispettivamente mono e disaccaridi, amminoacidi, acidi grassi e glicerolo grazie all'azione di enzimi idrolitici, prodotti e secreti nell'ambiente extracellulare.

Nella fase di acidogenesi macromolecole rilasciate come intermedi delle reazioni precedenti vengono degradate da batteri anaerobi obbligati o facoltativi

generando acidi grassi a catena corta come l'acido acetico, propionico e butirrico e alcoli e gas quali CO₂ e H₂.

Durante l'acetogenesi, quei composti che non possono essere direttamente utilizzati dai batteri metanogenici per produrre metano, come alcoli e acidi grassi volatili con la catena carboniosa contenente più di un atomo di C vengono ossidati ad acido acetico, H₂ e CO₂.

La metanogenesi è l'ultima fase del processo di fermentazione anaerobica, viene messa in atto da archaea metanogeni anaerobi obbligati e consiste nella produzione di metano (Adekunle et al. 2015) a partire dai substrati prodotti nelle fasi precedenti secondo le seguenti reazioni (Yue Li et al. 2019):

- $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$
- $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{H}_2\text{O}$
- $4 \text{CH}_3\text{OH} \rightarrow \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$
- $4 \text{HCOO}^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{HCO}_3^-$
- $4 \text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$

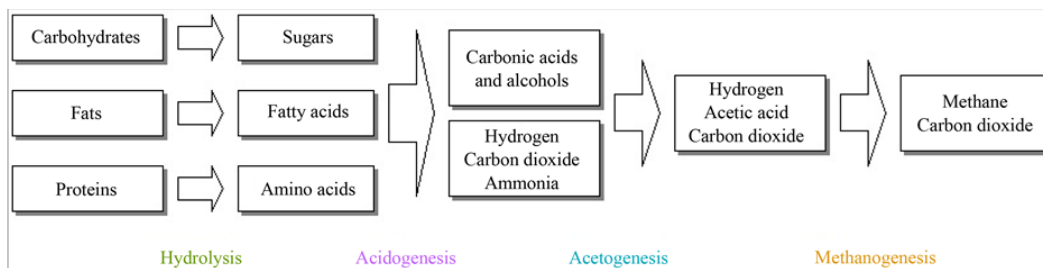


Fig. 1: Le fasi della fermentazione anaerobica (Adekunle et al. 2015).

A livello industriale, gli impianti di biogas solitamente lavorano utilizzando il sistema Continuous Stirred Tank Reactors (CSTR) che è costituito da un reattore a flusso continuo dotato di un sistema di agitazione che permette il mescolamento del materiale per rendere il più possibile omogenee le concentrazioni dei vari elementi presenti nella miscela.

La digestione anaerobica è un processo molto delicato che ha bisogno di precise condizioni ambientali per avvenire al meglio e anche una piccola deviazione di queste dai valori ottimali può comportare una notevole diminuzione della resa in biogas. I parametri più importanti da tenere sotto controllo sono la temperatura, che deve essere fra i 30°C e i 40°C per i mesofili e fra i 50°C e i 60°C per i termofili; il pH che deve assumere valori intorno alla neutralità tra 6.7 e 7.5; l'assenza di

ossigeno; il tipo di substrato e il rapporto C/N il cui valore ottimale si aggira tra 16 e 25; il tempo di residenza nel fermentatore (HRT) ed infine la velocità di agitazione, che non deve essere eccessivamente elevata per non danneggiare fisicamente le cellule, ma neanche troppo bassa al fine di evitare gradienti di concentrazione di nutrienti e gas presenti nel brodo colturale (Kougias et al. 2018).

Per quanto riguarda il substrato di partenza, esso è costituito da biomasse di origine animale o vegetale, provenienti da scarti agroindustriali, dal settore zootecnico, dalle acque reflue degli impianti di depurazione, dalla frazione organica dei rifiuti solidi urbani (FORSU) e da colture appositamente dedicate. La maggior parte degli impianti di biogas non lavorano utilizzando substrati specifici a causa della presenza di inibitori come fenoli e ammoniaca, della bassa resa metanogenica e la caratteristica stagionalità di molti di essi, ma adottano bensì una strategia chiamata co-digestione, la quale prevede l'utilizzo di un substrato di partenza composto da una miscela di residui organici provenienti da varie fonti e con caratteristiche anche molto diverse tra loro; questa strategia porta con sé notevoli vantaggi poiché permette un miglior bilanciamento dei nutrienti e in particolare il rapporto C/N, diluisce gli inibitori, stabilizza il pH, ha un effetto sinergico perché porta ad uno stato più avanzato la degradazione, il che comporta una maggiore produzione di biogas e quindi maggiori guadagni economici all'azienda (Kougias et al. 2018).

Al termine del processo di fermentazione anaerobica, il biogas ottenuto può essere o utilizzato direttamente per la produzione di energia elettrica e calore, oppure purificato a metano, il quale poi può fungere da carburante per veicoli o essere immesso nella rete nazionale e utilizzato per le utenze domestiche.

In questa tesi viene descritta la parte molecolare della procedura di screening di alcuni ceppi anaerobici isolati da un campione di digestato proveniente da un impianto di biogas. L'obiettivo finale è quello di identificare questi ceppi per valutarne le capacità metaboliche nell'ambito della digestione anaerobica e per contribuire alla creazione di un database per catalogare i microorganismi presenti nei biodigestori.

Per l'identificazione ci si è concentrati sul gene codificante l'RNA ribosomiale 16S: dagli studi di metagenomica, infatti, esso risulta costituito da una sequenza di circa 1600 pb composta da un'alternanza di regioni ipervariabili e regioni costanti e per questo motivo è molto informativo dal punto di vista tassonomico, infatti è

sufficiente sequenziarne un tratto abbastanza ampio (in questo caso di circa 1300 pb) per ottenere una rapida identificazione dell'organismo da cui proviene.

Partendo da isolati anaerobici ottenuti in un lavoro precedente dello stesso gruppo di ricerca, i primi passi della procedura di screening sono stati l'estrazione e la quantificazione del DNA da questi isolati. Successivamente, per selezionare quali campioni sequenziare è stata applicata la tecnica ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), una metodica composta da vari step, semplice ma efficace per l'identificazione delle diverse specie in una comunità microbica. Dato che dalla purificazione si è ottenuta solo una piccola quantità di DNA mentre per avere dei risultati visualizzabili negli step successivi è necessario avere miliardi di copie dello stesso gene, il primo step consiste in una reazione di PCR per amplificare una porzione del rDNA 16S. A questo punto, poiché amplificati provenienti da campioni di ceppi diversi avranno anche una sequenza nucleotidica diversa, specialmente nel rDNA 16S, il secondo step consiste nella digestione degli amplificati utilizzando un enzima di restrizione, in questo caso Hpa II, il quale, riconoscendo una sequenza palindromica invertita CCGG e tagliando dopo il primo nucleotide, produce per ogni campione una serie di segmenti di varie lunghezze, a seconda di dove l'enzima riconosce i siti di taglio. Lo step finale di questa procedura consiste nell'analisi dei profili elettroforetici ottenuti mediante l'elettroforesi su gel dei prodotti della restrizione: i profili così ottenuti saranno tanto più diversi tra loro quanto più evolutivamente distanti sono i ceppi di partenza corrispondenti.

A questo punto i campioni corrispondenti ai profili di restrizione più diversi gli uni dagli altri sono stati selezionati per la fase finale cioè il sequenziamento tramite metodo Sanger, che permette di sequenziare frammenti di dimensioni nell'ordine della Kilobase nel giro di poche ore.

2: Approccio sperimentale

L'approccio sperimentale ha previsto come primo passo l'estrazione del DNA da vari ceppi isolati e la sua quantificazione. In seguito per ogni campione è stata applicata la tecnica ARDRA per ottenere il profilo di restrizione di una porzione di circa 1300 pb del gene codificante l'rRNA 16S amplificata tramite PCR ed infine alcuni prodotti di amplificazione sono stati sequenziati per identificare il microorganismo isolato in partenza (N.B. Il processo di isolamento è stato effettuato da altri ricercatori dello stesso gruppo di ricerca e pertanto non verrà descritto in questo lavoro).

2.1 Estrazione e quantificazione del DNA

L'estrazione del DNA genomico di ciascun isolato è stata eseguita con il kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ seguendo il seguente protocollo:

- Aggiungere 50-100 mg (peso secco) di cellule batteriche/fungine risospese in acqua o buffer isotonic fino ad un volume di 200 µl a un tubo di lisi ZR BashingBead™ . Aggiungere 750 µl di soluzione di lisi al tubo;
- fissare il tubo sul bead beater e procedere impostando la velocità massima per 5 minuti;
- centrifugare il tubo di lisi ZR BashingBead™ in una microcentrifuga a 10,000 x g per 1 minuto;
- trasferire 400 µl di supernatante in un Zymo-Spin™ IV Spin Filter posta in un tubo raccogliatore e centrifugare a 7,000 rpm per 1 minuto;
- aggiungere 1,200 µl di Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer nel filtrato presente nel tubo raccogliatore dello step precedente;
- trasferire 800 µl della soluzione ottenuta nello step precedente in una colonna Zymo-Spin™ IIC posta in un tubo raccogliatore e centrifugare a 10,000 x g per 1 minuto;
- eliminare l'eluato dal tubo raccogliatore e ripetere lo step precedente;
- aggiungere 200 µl di DNA Pre-Wash Buffer alla colonna Zymo-Spin™ IIC posta in un nuovo tubo raccogliatore e centrifugare a 10,000 x g per 1 min;
- aggiungere 500 µl di Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer alla colonna Zymo-Spin™ IIC e centrifugare a 10,000 x g per 1 minuto;

- trasferire la colonna Zymo-Spin™ IIC in un tubo pulito da 1.5 ml per microcentrifuga e aggiungere 100 μ l di DNA Elution Buffer direttamente sulla matrice della colonna. Centrifugare a 10,000 x *g* per 30 secondi per eluire il DNA.

Dopo aver estratto il DNA si è proceduto con la sua quantificazione rilevando l'assorbimento a $\lambda=260$ nm utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop. (Fig. 2)

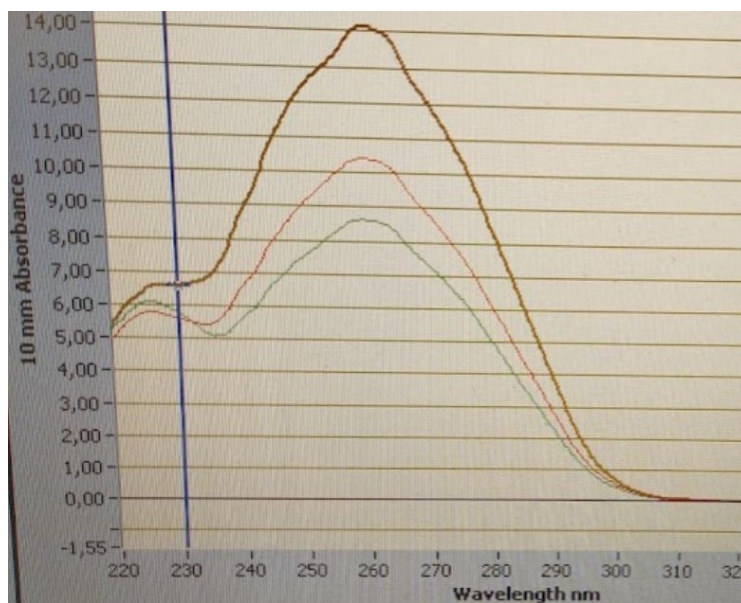


Fig. 2: Esempio delle curve di assorbimento del DNA.

2.2 Tecnica ARDRA

Per amplificare il DNA è stata allestita una reazione di PCR per otto campioni utilizzando i primers 63F e 1389F e impostando il termociclatore con i seguenti parametri (Tabella 1):

STEP	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (min:sec)
1	95.0	01:00
2 (35x)	95.0	00:40
	54.0	00:30
	72.0	00:30
3	72.0	05:00
4	4.0	∞

Tabella 1: Ciclo di PCR eseguito per amplificare il gene 16S dell'rRNA.

Una volta terminata la PCR è stata allestita un'elettroforesi su gel d'agarosio 0.8X per osservare i risultati dell'amplificazione. (Fig. 3)

Per la reazione di digestione si sono prelevate delle aliquote di DNA amplificato e le si sono messe ad incubare con l'enzima Hpa II a 37°C per un'ora, al termine della quale si è proceduto all'inattivazione dell'enzima incubando i campioni a 64°C per 20 min. A questo punto è stata allestita un'elettroforesi su gel d'agarosio 1.2X per vedere i risultati della reazione di restrizione. (Fig. 4)

2.3 Purificazione DNA e sequenziamento

Partendo dai prodotti di amplificazione della PCR si è proceduto con la purificazione del DNA utilizzando una metodica (descritta sotto) che prevede l'utilizzo di beads magnetiche AMPure XP per rimuovere i primers che altrimenti darebbero problemi durante la reazione di sequenziamento.

Per la procedura di purificazione è stato eseguito il seguente protocollo :

- Aggiungere uguali volumi di DNA estratto e soluzione con biglie (10 µl) e lasciare in termoblocco a 37°C per 5 min;
- magnetizzare e rimuovere il surnatante;
- fare 2 lavaggi con 200 µl di etanolo 80% (ovvero inserire etanolo e rimuoverlo per due volte) lasciando le eppendorf attaccate al magnete;
- eluire in H₂O Sigma (20 µl) e lasciare 5 min in termoblocco a 37°C;
- magnetizzare e recuperare il campione di DNA.

Dopo la risospensione del DNA in H₂O ciascun campione è stato quantificato al Qubit ed aliquotato per il sequenziamento in tubini da 0.2 mL.

Come suggerito dal sito della ditta di sequenziamento BMR Genomics, la quantità di DNA richiesta per il sequenziamento Sanger è pari a 2 ng ogni 100 pb per frammenti di 800-1500 pb; per cui avendo amplificato un tratto di circa 1300 pb sono stati inviati 26 ng di DNA per campione più un nuovo campione di uno dei due primers.

A questo punto i campioni nei tubini sono stati lasciati ad essiccare a 49°C prima di procedere con l'invio del campione all'azienda per il sequenziamento.

3: Risultati e discussione

3.1 Prodotti della PCR

Nel gel della Fig.3 è visualizzabile il risultato della PCR e si può notare, come atteso, che in tutti i campioni, compreso il controllo positivo, sia avvenuta un'amplificazione di un segmento di circa 1300 pb (corrispondente al rDNA 16S), visualizzabile nel gel come una banda chiara di dimensione compresa tra 1.2 e 1.5 Kb, mentre nel controllo negativo è evidente l'assenza di bande conseguenza del fatto che non sia avvenuta alcuna amplificazione.

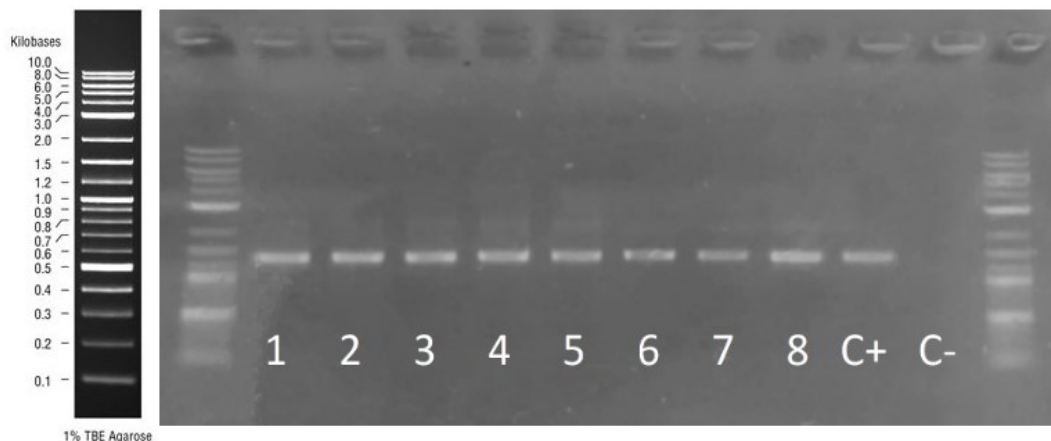


Fig. 3: Visualizzazione dei prodotti di PCR (DNA ladder 1Kb Euroclone).

3.2 Prodotti della digestione enzimatica

Dopo la reazione di digestione enzimatica si sono ottenuti otto profili di restrizione (Fig. 4) differenti e di questi otto, i sei più diversi sono stati selezionati per lo step successivo del sequenziamento.



Fig. 4: Profili di restrizione dopo reazione di digestione. I campioni con il numero corrispondente cerchiato sono quelli che sono stati scelti per il sequenziamento. (DNA ladder 1Kb Euroclone)

3.3 Risultati del sequenziamento Sanger

I risultati possono essere visualizzati tramite il software Chromas o direttamente nel sito della BMR Genomics. La tabella 2 mostra il risultato della ricerca utilizzando il tool BLAST delle sei sequenze in formato FASTA ottenute dopo il sequenziamento, tenendo in considerazione solo l'output con maggiore identità cioè quello in cui la sequenza cercata si allinea maggiormente con quelle trovate da BLAST.

Specie	Identità di sequenza	Famiglia
<i>Asaccharospora irregularis</i>	99.02%	Alicyclobacillaceae
<i>Enterococcus faecium</i>	98.64%	Oscillospiraceae
<i>Schnuerera ultunensis</i>	97.00%	Tissierellaceae
<i>Pseudomonas boreopolis</i>	96.51%	Xanthomonadaceae
<i>Caldibacillus hisashii</i>	99.26%	Bacillaceae
<i>Brevibacillus agri</i>	99.56%	Paenibacillaceae

Tabella 2: Risultato della ricerca con BLAST delle sequenze ottenute tenendo conto dell'output con maggiore identità.

Per quanto riguarda l'affidabilità dei dati si può fare riferimento agli intervalli di confidenza statistici descritti nell'articolo di Yarza P. et al. (2014), nel quale vengono calcolati i valori soglia di identità di sequenza del rDNA 16S al di sopra dei quali si può parlare di identità di specie (98.7%), di genere (94.5%), di famiglia (86.5%), di ordine (82.0%), di classe (78.5%) e di phylum (75.0%). Secondo questo criterio, si può affermare di essere ragionevolmente sicuri che la specie trovata da BLAST sia effettivamente quella da cui è stato estratto il DNA solo nel caso di *Asaccharospora irregularis*, *Caldibacillus hisashii* e *Brevibacillus agri* poiché tutti e tre hanno una percentuale di identità superiore al 98.7%; nel caso di *Enterococcus faecium*, *Schnuerera ultunensis* e *Pseudomonas boreopolis* invece si può confermare solo l'identità di genere visto che i valori di identità di sequenza sono maggiori del 94.5% ma inferiori al 98.7%.

In ogni caso si può osservare che i sei campioni selezionati per il sequenziamento sono corrispondenti a microorganismi di sei specie diverse, ognuna appartenente a una famiglia diversa ma tutte facenti parte del regno dei batteri, in particolare dei mesofili, per cui questi isolati, nell'ambito della digestione anaerobica, svolgono le prime fasi di tale processo e non la metanogenesi che invece è svolta esclusivamente dagli archaea.

3.4 Conclusione

L'identificazione e il conseguente studio delle specie microbiche presenti in un fermentatore anaerobico per la produzione di biogas e biometano costituiscono uno step fondamentale per il miglioramento della performance dell'impianto. Infatti la conoscenza delle specie microbiche e delle rispettive funzioni metaboliche permettono di ottimizzare la reazione di fermentazione anaerobica, sia attraverso una modulazione dell'abbondanza di tali specie, sia intervenendo con l'ingegneria genetica, con l'obiettivo di massimizzare il processo di digestione e metanogenesi e ottenere così rese maggiori di biogas e biometano.

Bibliografia

- Adekunle, K. and Okolie, J. (2015) A Review of Biochemical Process of Anaerobic Digestion. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, **6**, 205-212. doi: [10.4236/abb.2015.63020](https://doi.org/10.4236/abb.2015.63020).
- Kougias, P.G., Angelidaki, I. Biogas and its opportunities—A review. *Front. Environ. Sci. Eng.* 12, 14 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11783-018-1037-8>.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E. *et al.* Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol* 12, 635–645 (2014). <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>.
- Yue Li, Yinguang Chen, Jiang Wu, Enhancement of methane production in anaerobic digestion process: A review, *Applied Energy*, Volume 240, 2019, Pages 120-137, ISSN 0306-2619, <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2019.01.243>.