

Metodologie molecolari per il monitoraggio ed il controllo di biofilm in sistemi industriali di raffreddamento

F, Di Pippo¹, L, Di Gregorio¹, G. Cuomo¹, V, Tandoi¹, S, Rossetti¹

¹CNR-IRSA, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Ricerca Sulle Acque, Area della Ricerca di Roma 1, Monterotondo, Roma, Italia.

Sintesi

Il biofilm microbico è la principale componente del micro-biofouling in sistemi industriali di raffreddamento, presenti presso industrie di diverso tipo (petrolchimico, farmaceutico, chimico, etc.), e rappresenta un serio problema dal punto di vista gestionale. Nei sistemi di scambio termico, la formazione di biofilm può determinare un abbassamento delle rese di trasferimento di calore fino al 30% e risulta essere all'incirca quattro volte più isolante dei depositi di carbonato di calcio. Nelle torri di raffreddamento, che contengono un sistema di ricircolazione aperto, i microrganismi possono diffondersi dall'aria all'acqua e sono in grado di moltiplicarsi velocemente, quando sono presenti un substrato ed alcune condizioni per il loro sviluppo, quali certi valori di pH, temperatura, concentrazione di ossigeno disciolto e di nutrienti (il cui contenuto aumenta a causa dell'evaporazione dell'acqua). I biofilm svolgono un'azione di protezione dei componenti microbici da fenomeni di predazione, nonché dall'azione di disinfettanti tossici e questo rende la disinfezione dell'acqua molto più problematica. Le conseguenze della formazione del biofilm all'interno delle torri di raffreddamento possono causare anche il deterioramento delle pareti delle stesse e dei sistemi di scambio termico: il biofilm infatti impedisce che l'azione degli agenti di protezione contro la corrosione raggiunga le superfici interne delle torri e degli scambiatori di calore. Inoltre, i prodotti del metabolismo microbico tendono ad accelerare le reazioni di corrosione dei materiali con cui l'acqua del circuito entra in contatto. Studi sistematici sui biofilms eterotrofi e fototrofi che colonizzano i sistemi di raffreddamento degli impianti industriali, sono al momento alquanto limitati, nonostante gli effetti dannosi legati al biofouling siano notevoli, e comportino rilevanti costi aggiuntivi legati alla conduzione di tali sistemi (monitoraggio, aggiunta di biocidi, manutenzione, etc.). Al momento la strategia seguita nel campo industriale si limita a periodici dosaggi di tossici ed al monitoraggio delle cariche microbiche, effettuato peraltro in maniera grossolana. È pertanto essenziale adottare sistemi di monitoraggio e controllo del biofilm in formazione mediante metodiche che siano rapide e di semplice esecuzione.

Keywords: biofilm, torri di raffreddamento, biofouling, c-di-GMP

Sistemi di controllo del biofilm

In linea generale, ad oggi, per la favorire la rimozione del biofilm negli impianti industriali di raffreddamento vengono utilizzati biocidi. Con il termine biocida si intendono dei preparati contenenti uno o più principi attivi, capaci di bloccare l'attività microbiologica, rallentando o evitando quindi la formazione, la crescita e la proliferazione. Essi interferiscono con la respirazione, cambiano la permeabilità della parete cellulare con il risultato di rompere le cellule. I prodotti impiegati generalmente in industria sono suddivisi in due classi: biocidi non ossidanti e biocidi ossidanti. I biocidi non ossidanti (bromopropandioli, sali di ammonio quaternario, triazine, isotiazolinoni e ditiocarbammati, etc.) sono sostanze organiche ad azione biocida e/o biostatica. I biocidi ossidanti (alogenoderivati, biossido di cloro, perossidi, etc.) invece, hanno un'azione molto rapida anche contro batteri molto resistenti, e ciò consente di ampliare lo spettro d'azione. L'aspetto negativo è che questi additivi sono poco efficaci nei confronti di un biofilm maturo (a causa della presenza di sostanze esopolimeriche) e possono innescare fenomeni di corrosione verso le parti in ferro. È sempre più oggetto di studio il possibile utilizzo di sostanze eco-compatibili (a bassa tossicità) per la rimozione del biofilm in sistemi industriali quali i biodisperdenti, sostanze non inquinanti in grado di

disperdere le particelle di matrice esopolimerica che protegge i batteri dal contatto con i biocidi. I biodispersenti sono, in genere, molecole con terminali idrofobi che si legano alla materia organica costituente il biofilm. I terminali idrofilici della stessa molecola permettono all'acqua di asportare la molecola di dispersente che porta a sua volta con sé una piccola parte di matrice, instaurando un equilibrio di formazione/rimozione del biofilm. Si testa l'azione di sostanze surfattanti "green" su biofilm di diversa derivazione e composizione e con differenti caratteristiche della matrice, a seconda delle condizioni imposte e dell'acqua di *make up*, al fine di poter individuare la presenza della sostanza a più alto rendimento e a più ampio spettro d'azione. Non esiste, ad oggi, un metodo "standardizzato" per valutare la rimozione del biofilm operata da una determinata sostanza. Si procede mediante prove batch, simulando il più possibile le condizioni in cui lavorano le torri di raffreddamento. La percentuale di rimozione del biofilm viene stimata in fasi diverse della crescita e con diverse concentrazioni del biodispersente utilizzato, ponendo la superficie sulla quale è avvenuta la crescita del biofilm in presenza della sostanza (de Tora et al., 2014). Vengono, inoltre, condotte prove sperimentali di pre-condizionamento del substrato con sostanze surfattanti "green" al fine di valutare la diversa adesione delle cellule, le eventuali variazioni nella composizione della matrice extracellulare e per garantire prevenzione nella formazione del biofilm.

Monitoraggio del biofilm: meccanismi biomolecolari alla base del processo

Negli ultimi anni lo studio dello sviluppo dei biofilm è stato approfondito dal punto di vista genetico, con la caratterizzazione di alcuni geni coinvolti in questo processo di differenziamento. Inoltre, si è definita l'ultrastruttura dei biofilm con l'utilizzo della microscopia confocale laser a scansione. La formazione di biofilm richiede coordinazione, interazioni e comunicazione tra le diverse specie microbiche che lo costituiscono (Davey and O'Toole, 2000). Questa particolarità dimostra come cellule batteriche, capaci di vita autonoma, sono in grado di organizzarsi in comunità. La matrice organica, secreta dai microrganismi e in cui essi sono immersi, è costituita da esopolisaccaridi, proteine e DNA extracellulare (97% acqua, 2-5% cellule batteriche, 1-2% polisaccaridi neutri o polianionici, 1-2% proteine (compresi gli enzimi), meno dell'1-2 % DNA ed RNA e ioni (legati o liberi)). Malgrado la presenza della matrice extracellulare sia universale, essa è molto varia sia nella composizione sia nei tempi di sintesi (Di Pippo et al., 2013; Di Pippo et al., 2015). È noto che le interazioni geniche che si instaurano durante la formazione del biofilm sono diverse a seconda del ceppo batterico e non esistono metodiche in grado di analizzare il pattern di espressione genica su biofilm polimicrobici. La maggior parte degli studi, infatti, sono incentrati su biofilms monospecifici e soprattutto su microrganismi patogeni in ambito nosocomiale, mentre la letteratura riguardante biofilms di sistemi industriali è ridotta e focalizzata sulle comunità planctoniche patogene (*P.aeruginosa* e *L.pneumophila*) (Li et al., 2015). Il solo elemento unificante emerso nel processo di formazione del biofilm, nella maggior parte delle specie batteriche e anche in alcune specie fototrofe è rappresentato dall'incremento della sintesi di una molecola segnale intracellulare molto conservata, la guanosina monofosfato ciclica dimerica (c-di-GMP) (Boyde O'Toole, 2012). Questa molecola solubile, a seconda della sua concentrazione intracellulare, esercita un controllo sull'adesione, la motilità, quindi espressione di EPS e appendici cellulari, la virulenza e la morfogenesi delle cellule in diverse specie batteriche, esercitando un controllo sia a livello trascrizionale, traduzionale e post-traduzionale. È stato dimostrato che il passaggio da stadio planctonico a sessile è determinato da un incremento della concentrazione intracellulare di c-di-GMP, ma a monte di questo incremento vi è un complesso network di segnali, legato all'espressione di particolari geni e *small RNA units*. A sua volta, c-di-GMP funge da effettore su una serie di proteine, attivandole, e determinando l'attivazione di sistemi enzimatici complessi che polimerizzano i diversi monomeri dando origine agli esopolisaccaridi che vengono secreti, la

produzione di molecole per l'adesione, produzione di *fimbriae*, cellulosa, processing dell'RNA, espressione di geni per la virulenza (Boyde O'Toole, 2012). Sono ad oggi noti molti studi che coinvolgono indirettamente la c-di GMP e che si basano sull'analisi dei geni responsabili dell'espressione di enzimi coinvolti nella sintesi di c-di GMP. Tuttavia, tutti questi studi sono stati condotti su biofilm monospecifici, essendo l'enzima responsabile della sintesi di c-di GMP, la Diguanylate Ciclasi, codificato da geni differenti a seconda della specie batterica coinvolta. La metodica prevede l'analisi della molecola ubiquitaria direttamente implicata nel processo di formazione del biofilm, c-di-GMP, seguendo l'andamento della sua concentrazione nelle diverse fasi di crescita di biofilms polimicrobici, al fine di utilizzarla come "sistema di allarme" *in situ*.

Metodi e possibili applicazioni

Viene valutato l'andamento della concentrazione di c-di-GMP nelle fasi di formazione e maturazione del biofilm in un sistema in scala laboratorio realizzato *ad hoc* che mima fedelmente una torre di raffreddamento (Fig.1) (Liu et al., 2011).

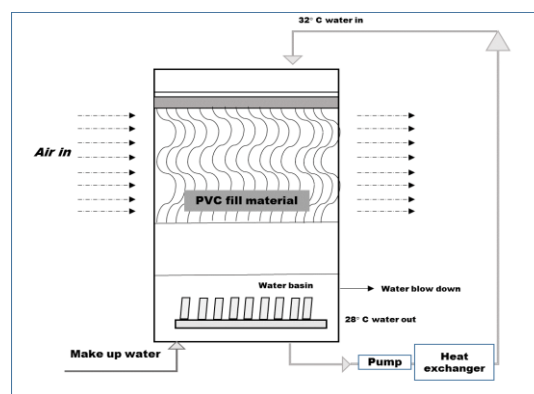


Figura 1: Schema del sistema di raffreddamento in scala laboratorio

Il principio di realizzazione del reattore si basa essenzialmente sull'utilizzo degli stessi materiali presenti nei sistemi industriali, che rappresentano il substrato su cui aderisce la popolazione microbica del biofilm. Un sistema in continuo permette il passaggio dell'acqua di *make-up* (con l'aggiunta periodica che bilancia quella evaporata), mantenendo le medesime condizioni di temperatura, irradianza e pH presenti su larga scala. Elementi importanti del sistema sono la presenza di una pompa per il ricircolo dell'acqua e uno scambiatore di calore, la possibilità di inserire all'interno superfici (in genere di PVC) sulle quali attecchirà il biofilm che siano facilmente rimovibili per consentire il campionamento e le analisi nelle diverse fasi di crescita. L'analisi della concentrazione del secondo messaggero intracellulare, c-di-GMP, nel sistema in scala laboratorio (Fig.1), prevede l'utilizzo del sistema accoppiato HPLC-UV (limite di *detection* della metodica è 5 nM e la concentrazione intracellulare di c-di-GMP varia, in genere, da 0 a 10 uM) (Roy et al., 2013). In particolare, viene valutata la variazione della concentrazione della molecola tra comunità planctonica e comunità adesa e nelle diverse fasi di adesione e formazione del biofilm. I risultati ottenuti dalle analisi della molecola c-di-GMP e delle variazioni della sua concentrazione nel corso del tempo sono utili alla comprensione dei meccanismi molecolari alla base del processo di formazione e sviluppo di biofilms polimicrobici. Partendo dalle conoscenze biomolecolari acquisite, l'obiettivo è quello di progettare un biosensore basato sul trasferimento di energia per risonanza di fluorescenza (FRET) ingegnerizzato in un sistema batterico per condurre un monitoraggio *in situ* su larga scala che sia semplice, economico e soprattutto per consentire una immediata valutazione dello stato del biofilm in tempo reale: un sistema ad "early warning" biologico dipendente

dalla concentrazione di molecole “segnale” prodotte dai batteri in prossimità del passaggio da vita planctonica a vita sessile (Fig.2).

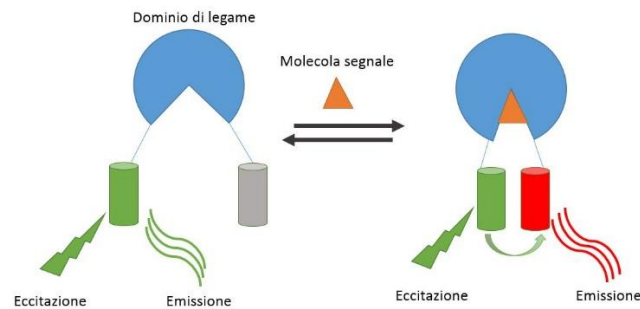


Figura 2: Principio di funzionamento del biosensore basato su sistema FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer): il legame tra dominio e molecola segnale determina un cambiamento conformazionale che causa il trasferimento di energia per risonanza di fluorescenza, quindi una diversa emissione (dal verde al rosso), che sarà misurabile e direttamente proporzionale alla concentrazione della molecola.

Bibliografia

- Boyd and O'Toole, "Second Messenger Regulation of Biofilm Formation: breakthroughs in understanding c-di-GMP effector systems" *The Annual Review of Cell and Developmental Biology* (2012), 28: 439-62
- Davey Mary Ellen and George A. O'Toole, "Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics" *Microbiology And Molecular Biology Reviews* (2000), 847-67
- de Tora F., M. Buccolini, S. Rossetti, V. Tandoi: "A new Model System for monitoring the biofilm growth and its application in industrial processes", *Chemical Engineering Transactions*, (2014), 55-60
- Di Pippo F., Ellwood N. T. W., Gismondi A., Bruno L., Rossi F., Magni P., De Philippis R. "Characterization of exopolysaccharides produced by seven biofilm-forming cyanobacterial strains for biotechnological applications", *Journal of Applied Phycology*, (2013), 25:1697–1708
- Di Pippo F, Di Gregorio L, Tandoi V, Rossetti S. "Impact of biofilm growth phase, diversity and EPS quality on the removal efficiencies of biodispersants used for reducing biofilm adhesion in cooling towers". *FEMS 2015. 6th Congress of European Microbiologists. Maastricht. (2015) (Accepted, Poster).*
- Li Lijie et al., "Prevalence and Molecular Characteristics of Waterborne Pathogen *Legionella* in Industrial Cooling Tower Environments", *International Journal of Environmental Research and Public Health* (2015), 12605-12617
- Liu Y et al., "Disinfection of bacterial biofilms in pilot-scale cooling tower systems", *Biofouling* (2011), (4):393-402
- Roy A. B. et al., "Extraction and Quantification of Cyclic Di-GMP from *P. aeruginosa*" *Bio Protocol*. (2013), 1-7