Degradazione di idrocarburi in suoli contaminati

Un terreno contaminato da idrocarburi prelevato da un'area di rifornimento di autocisterne è stato utilizzato per confrontare i processi degradativi operati da microrganismi autoctoni con quelli alloctoni di origine marina no-OGM selezionati per la degradazione degli idrocarburi. Si è verificata l'effettiva utilità dell'aggiunta di ceppi batterici in siti inquinati e la consistenza del rapporto costi/benefici

Paolo Broglio,
Ecologia Applicata, Milano
Roberto Blundo,
Ecobios Italia, Roma

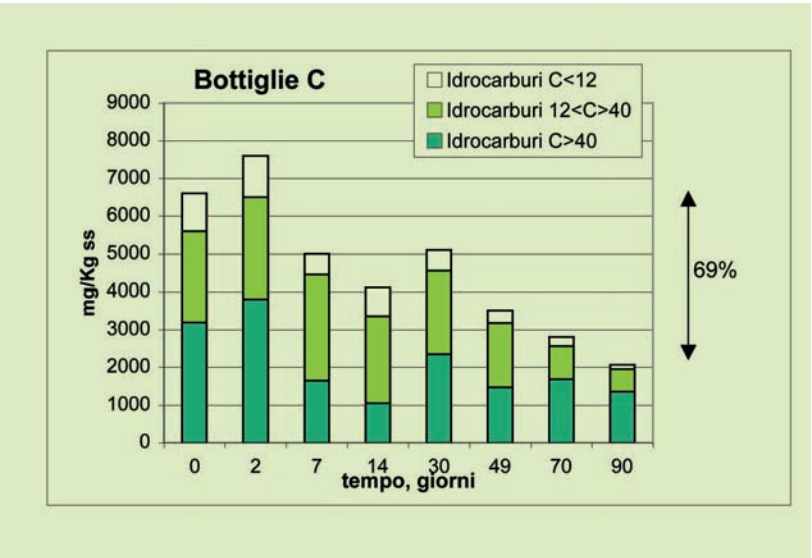
Fra le diverse tecniche di risanamento dei suoli contaminati da idrocarburi, si è osservato che affidarsi a batteri autoctoni, ancorché messi nelle condizioni ottimali per quanto concerne nutrienti e ossigeno, può richiedere tempi di recupero molto lunghi. La *bioaugmentation* (bonifica del terreno contaminato con l'ausilio di nutrienti e microrganismi alloctoni - OGM free) rappresenta una valida alternativa nell'ambito dei sistemi biologici ed ecocompatibili del trattamento del suolo inquinato (Zucchi et al., 2003). In questi anni, la ricerca ha messo in evidenza le diverse attitudini dei microrganismi nell'operare la biodegradazione degli idrocarburi (Bartha, 1986; Bossert et al., 1995; Davini et al., 2002; Riser, 1998), esistono infatti ceppi batterici selezionati per aggredire matrici complesse come il petrolio greggio e i suoi derivati di distillazione.

Sono presenti già in natura microrganismi estremamente specializzati che operano precisi passaggi metabolici nei diversi stadi della degradazione degli idrocarburi (ZoBell et al., 1944; ZoBell, 1946; Sander et al., 1991). In ambiente naturale, la catena metabolica è lenta a formarsi e, in genere, si osserva un accumulo di sostanze senza evoluzioni successive. La tecnica della bioaugmentation sfrutta la capacità umana di assemblare in laboratorio una serie di famiglie di microrganismi, non in competizione, che formano *blend* (consorzi) di microrganismi capaci di utilizzare ogni passaggio metabolico fino a sostanze semplici o addirittura fino a CO_2 e acqua.

Il blend batterico di riferimento per la bioaugmentation deriva da ricerche e applicazioni trentennali che hanno trovato clamorose applicazioni in tutto il mondo (in Alaska con il versamento relativo alla Exxon Valdez, nel golfo del Texas con il versamento Mega Borg, in Kuwait dopo la guerra con l'Irak, nel Mare del Nord), ma viste sempre con una certa diffidenza in Italia.

Nel nostro Paese esiste un'applicazione su terreno contaminato da PCB e su micelio di tetracicline (Blundo et al., 1992) documentate.

In pratica, il blend batterico si è confermato capace di aprite l'anello aromatico (Pinelli et al., 1997), sia quello relativo agli idrocarburi che quello delle tetracicline, in due punti a mezzo delle ossidasi prodotte partecipando attivamente alla demolizione/trasformazione del substrato. Il consorzio di microrganismi utilizzato



1 - Idrocarburi totali nel terreno C (senza inoculo), evoluzione nel tempo delle tre frazioni nel test in bottiglia chiusa

deriva da ceppi batterici marini di diversa natura prelevati a suo tempo da zone contaminate e allevati in laboratorio, di generazione in generazione, fino ad arrivare a cloni resistenti a una diversa pressione osmotica e quindi in grado di operare anche in acque dolci o terreni.

Materiali e metodi

Preparazione dei terreni

Per la preparazione dei terreni si sono prelevati circa 20 kg di terreno contaminato che è stato suddiviso in quattro aliquote omogenee trattate nel modo seguente:

- *Terreno C:* terreno inquinato che non subisce alcun inoculo batterico, ma che è stato corretto per il contenuto di nutrienti (secondo il rapporto ottimale C:N:P: pari a 100:10:5) al fine di favorire il metabolismo dei batteri autoctoni;
- *Terreno X:* terreno inquinato addizionato con batteri prodotti da Ecobios Italia.

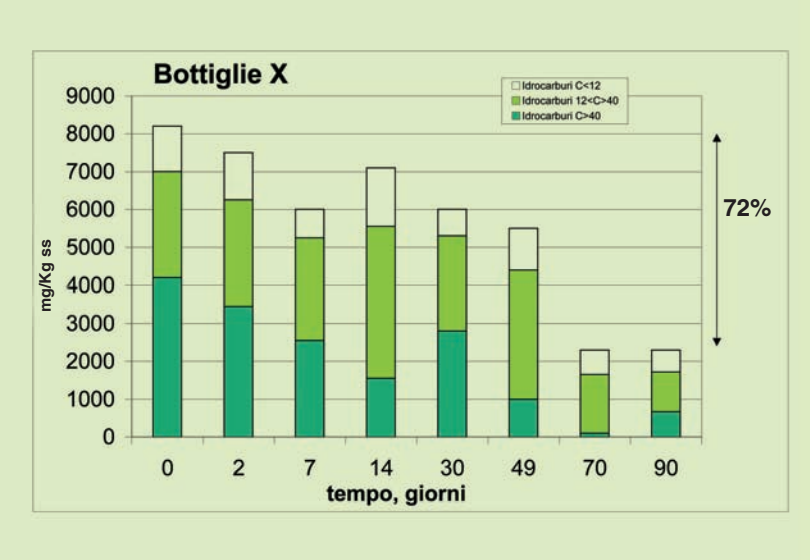
Per la preparazione dei terreni con inoculo batterico si sono seguite scrupolosamente le buone pratiche di laboratorio al fine di operare nei quantitativi e nelle condizioni ottimali per la crescita e il metabolismo batterico.

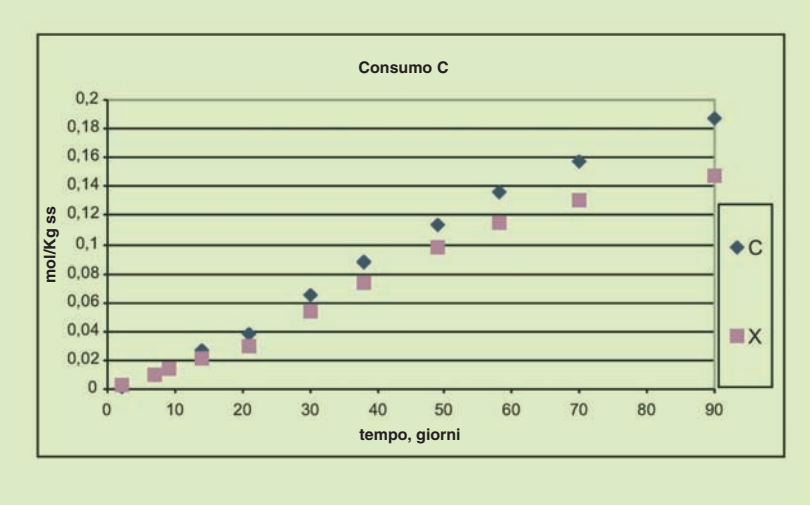
Il test è stato condotto secondo due modalità parallele: in bottiglia chiusa per consentire un controllo anche del comparto gassoso; in contenitori aperti con aggiunta di acqua e forte aerazione per ottimizzare gli scambi gassosi.

Allestimento test in bottiglia chiusa

Si sono utilizzate bottiglie in vetro Duran da 500 mL con tappo a vite dotato di setto in silicone predisposto per il prelievo e analisi dei gas. Sono state allestite 5 serie di 13 bottiglie ciascuna nel modo seguente: le serie C e X sono state preparate introducendo in ognuna il relativo terreno (circa 100 g su base secca in ciascuna delle 13 bottiglie); la Serie S è stata ottenuta a partire dal terreno C passando, poi, per la sterilizzazione con raggi gamma. Le bottiglie sono state chiuse in modo da impedire scambi gassosi con l'esterno.

Per una buona conduzione della sperimentazione ogni volta che veniva consumata la metà dell'ossigeno presente all'interno dei reattori (quando cioè la concentrazione dell'ossigeno scendeva al di sotto dei 100.000 ppm) si è operato il completo ricambio della stessa atmosfera ventilando aria all'interno del reattore, previa caratterizzazione completa.





2 - Idrocarburi totali nel terreno X (con inoculo), evoluzione nel tempo delle tre frazioni nel test in bottiglia chiusa

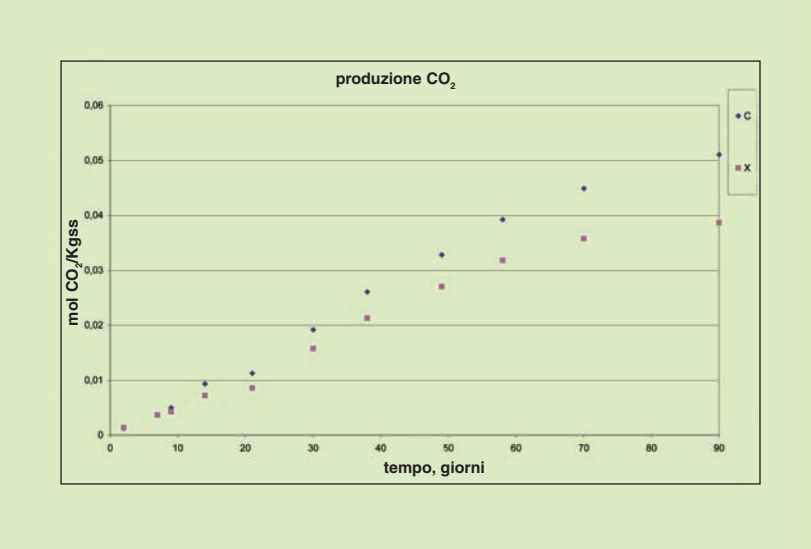
3 - Consumo specifico di ossigeno nel test in bottiglia chiusa

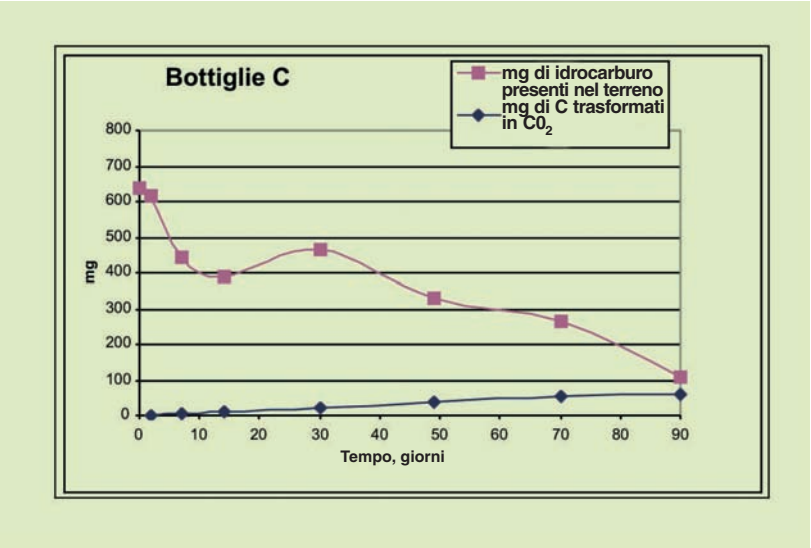
Allestimento test slurry

Si sono disposti 4 contenitori in vetro aperti (becker) della capacità di 2 L e contrassegnati con le sigle C e X. In ciascun becker si sono introdotti circa 900 g del relativo terreno con l'ag-

Tabella 1 - Caratterizzazione del terreno contaminato

	unità di misura	
pH		6
Umidità	%	9,3
Azoto Totale	mg/kg (su s.s.)	245
Fosforo Totale	mg/kg (come P, su s.s.)	107
Metilterbutiletere	mg/kg(su s.s.)	<0,05
Composti Aromatici Totali	mg/kg (su s.s.)	<0,1
Idrocarburi Totali (IR)	mg/kg (su s.s.)	6.900
Idrocarburi <C12	mg/kg (su s.s.)	1.620
Idrocarburi >C12	mg/kg (su s.s.)	2.900





4 - Produzione specifica di anidride carbonica nel test in bottiglia chiusa

5 - Evoluzione nel tempo del carbonio nella bottiglia C (senza inoculo), concentrazione di idrocarburi totali nel terreno e C trasformato in CO_2

giunta di 100 mL di acqua di fonte. L'insufflazione di aria è stata garantita da un piccolo compressore da acquario collegato alle relative porose.

Strumentazione

Per le determinazioni riguardanti il comparto gassoso si sono utilizzate le seguenti strumentazioni:

- Gascromatografo Hewlett-Packard 6890 Serier con le seguenti colonne: colonna a setacci in Argon per la determinazione di Ossigeno e Azoto; poraplot in Elio per la determinazione di Anidride Carbonica e acqua;
- Spettrometro di massa Agilent 5973 N per la ricerca dei VOC;
- Manometro a U a mercurio per la misura della pressione all'interno dei reattori;
- Termocoppia per il rilevamento della temperatura;

Per le analisi degli idrocarburi nel terreno si sono applicate le seguenti metodiche:

- Idrocarburi totali: Metodo ISO-TR 11046/94 con analisi mediante spettrofotometria IR;
- Idrocarburi C>12: Metodo ISO-TR 11046/94 con analisi in Gascromatografia;
- Idrocarburi C<12: Metodo EPA 8015-c/00 con analisi in Gascromatografia con detector a fiamma (FID).

Risultati e discussione

L'analisi del terreno prelevato dal sito contaminato è riassunta nella tabella 1, come si può osservare, i valori riportati evidenziano una contaminazione da idrocarburi totali intorno ai 7 g per kg di sostanza secca. Prevalgono gli idrocarburi pesanti mentre non sono stati riscontrati né i composti aromatici, né la frazione volatile.

Test in bottiglia chiusa

Nella fase solida dei campioni sottoposti a sterilizzazione, sia per gli idrocarburi totali che per le frazioni C<12 che C>12, non si hanno sostanziali variazioni nel tempo. Gli idrocarburi totali vengono determinati con sistema IR capace di rilevare le molecole di idrocarburo fino a un valore massimo intorno ai 60 atomi di carbonio; in gascromatografia vengono invece determinati gli idrocarburi con un numero di atomi di carbonio non superiori ai 40; in particolare vengono differenziati quelli con C<12 (detti *leggeri*) e quelli con C>12 (detti *pesanti*).

Per meglio comprendere le trasformazioni degli idrocarburi per ciascuna serie di prova si è calcolata, per differenza, la frazione di idrocarburi *pesantissimi*, quelli cioè con oltre 40 atomi di C. Le tre frazioni così distinte in base al numero di atomi di carbonio vengono mostrate negli istogrammi bottiglie X e C.

Come si può osservare, nei terreni addizionati con batteri specifici l'attività degradativa si spinge fino a intaccare in modo cospicuo le frazioni più pesanti.

Se si fa riferimento agli idrocarburi totali (figure 1 e 2) si può osservare che le concentrazioni nei 4 terreni presentano nel tempo profili piuttosto simili: durante i primi 50 giorni sono evidenti delle fluttuazioni che indicano un modesto abbattimento. Tra il 50° e il 70° giorno di incubazione la contaminazione da idrocarburo si riduce drasticamente.

Più precisamente, al termine dei 90 giorni di sperimentazione l'abbattimento degli idrocarburi totali risulta essere: nel terreno non inocu-

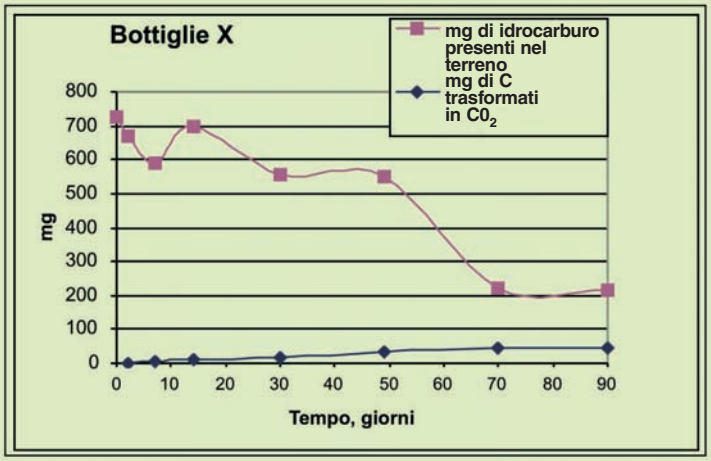
lato (C) del 69%; nel terreno denominato X del 72%. Nei medesimi grafici, se si prende in considerazione l'andamento degli idrocarburi C<12 e C>12, si può notare che i profili relativi a ogni gruppo di inquinante ripercorrono l'andamento riscontrato per gli idrocarburi totali. In particolare, si osserva che solo al compimento dei novanta giorni di sperimentazione si evidenziano gli abbattimenti più significati che mostrano per ciascuna famiglia valori prossimi ai limiti di legge.

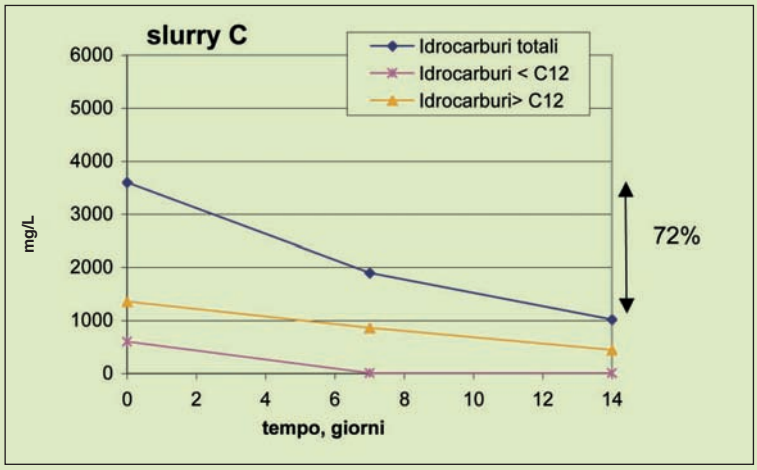
Nella fase gassosa del terreno sterile la composizione non si è modificata in misura sensibile durante tutta la sperimentazione confermando, quindi, assenza di attività metabolica.

Le bottiglie della serie S sono le uniche a non aver avuto necessità di aerazione e pertanto non sono mai

6 - Evoluzione nel tempo del carbonio nella bottiglia X (con inoculo), concentrazione di idrocarburi totali nel terreno e C trasformato in CO2

7 - Idrocarburi totali nel terreno C (senza inoculo), evoluzione nel tempo delle tre frazioni nel test slurry





Fotometri Luxmetri
Fotometri per misure illuminotecniche anche in postazioni dove sono presenti videoterminali.

I corsi
Corsi dedicati al miglior utilizzo degli apparecchi LSI affrontando le problematiche relative ai metodi di misura e presentazione dei risultati. Il programma ed il calendario sono disponibili sul sito LSI.

Centralina microclimatica
Centralina di misura di tutti i parametri che nel loro assieme definiscono la qualità ambientale dal punto di vista del comfort e stress termico (ambienti moderati, caldi e freddi), dell'illuminamento e della qualità dell'aria (gas).

LSI SpA - 20090 Settala (MI)
Tel. 02/954141 - Fax 02/95770594
E-mail info@lsi-lastem.it - www.lsi-lastem.it

ABSTRACT

Paolo Broglio, *Ecologia Applicata, Milano*
Roberto Blundo, *Ecobios Italia, Roma*

Autochthonous and allochthonous microrganism activity in hydrocarbons biodegradation of contaminated soils

In this work we have analysed a hydrocarbons contaminated soil of a filling petrol station in the Northern Italy characterised by a 20 years lasting pollution. Comparative analysis between autochthonous microrganisms and allochthonous microrganisms appropriately selected to degrade hydrocarbons are been made. It is possible demonstrate the advantage coming from the addition of microrganisms directly into contaminated sites.

BIBLIOGRAFIA

Bartha R. 1986. Biotechnology of petroleum pollutants degradation. Microb. Ecol., 12, 155-172.
Blundo R., Broglio P., Brozzo R. 1992. Comunicazione preliminare circa la possibilità di demolizione enzimatica a carico di molecole a base di anelli aromatici come PCBs, idrocarburi e antibiotici (tetracicline e rifamicine). V Convegno Internazionale Ordine Nazionale dei Biologi. Riva del Garda, 22-25 ottobre 1992.
Bossert I.D. , Comperau G.C. 1995. Clean up of petroleum hydrocarbon contamination in soil. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. Wiley-Liss Ed. New York, 77-107.
Davini E., Molinari M., Gioielli B., Sasso R., Audino F., Robertiello A. 2002. La naturale attenuatione assistita per la bonifica di suoli contaminati da prodotto petroliferi. Siti Contaminati,1, 8-12.
Pinelli D., Fava F., Nocentini M., Pasquali G.1997, Bioremediation of a polycyclic aromatic hydrocarbon-cantaminated soil using different aerobic batch bioreactor system. Journal of Soil Contamination, 6, 243- 256.
Riser R. E.1998. Remediation of petroleum contaminated soil, Lewis, Boca Ratin FL, 28-34.
Sander P.,Wittich R.M., Fortnagel P., Wilkes H., Francke W. 1991. Degradation of 1,2,4 tricloro and 1,2,4,5 tetraclorobenzene by Pseudomonas strains. Appl.Environm.Microbiol., 57, 1430-1440.
ZoBell C.E., Beckwith I.D. 1944. The deterioration of rubber products by microrganisms. J. Am.Water Works Assoc., 36, 439-453.
ZoBell E. 1946. Action of microrganism on idrocarbons. Bact.Rev.,10, 1-49.
Zucchi M., Angiolini L., Borin S., Brusetti L., Dietrich N., Gigliotti C., Barbieri P., Sorlini C., Daffonchio D. 2003. Response of bacterial community during bioremediation of an oil-polluted soil. J. App. Microb., 94, 248-257.

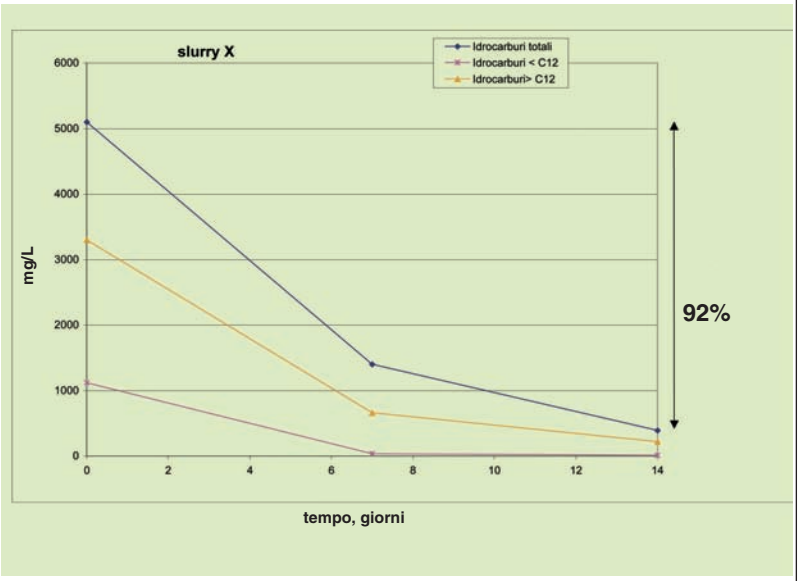
state aperte. Sia per quanto riguarda il consumo dell'ossigeno (figura 3) che per quanto riguarda la produzione di anidride carbonica (figura 4), il campione X non si differenzia in modo significativo dal controllo (C): si può anzi evidenziare una respirazione leggermente più veloce nel campione non inoculato. In sintesi per le suddette tre famiglie in 90 giorni il consumo di ossigeno non supera le 0,19 mol/kg s.s. e la produzione di anidride carbonica si attesta intorno alle 0,05 mol/kg s.s.
Nelle figure 5 e 6 si mostrano gli andamenti nel tempo della quantità di idrocarburi presenti nel terreno e del carbonio allontanato sotto forma di CO_2. Il rapporto tra gli idrocarburi persi dal terreno e il Carbonio eliminato come CO_2 varia da terreno a terreno: mediamente si perdono dai 8,5 ai 11 mg di idrocarburo.

Test Slurry
La consistenza del terreno, resa fangosa dall'aggiunta di acqua ha consentito di ottenere un maggiore coefficiente di scambio gas-liquido così che l'ossigeno disciolto è maggiormente disponibile alla biomassa in tutto il volume di terreno. Nelle figure 7 e 8 vengono mostrati gli andamenti della concentrazione di idrocarburi nel tempo.
Come si può osservare già dopo 14 giorni di sperimentazione la contaminazione è scesa per tutti i terreni analizzati al di sotto dei limiti pre-

Sistema GC/MSD per la rivelazione di tracce in matrici complesse

Il nuovo GC/MSD Agilent 5975C è il primo strumento che dispone dell'esclusiva Trace Ion Detection, una caratteristica che riduce sensibilmente il rumore della linea di base, migliorando il profilo del picco e la precisione dello spettro. Utilizzata con il Software di deconvoluzione Agilent (DRS), permette la rivelazione anche dei composti co-eluenti, eliminando la maggior parte dei problemi delle analisi più complesse. La piattaforma dispone di funzioni per aumentare la produttività e la flessibilità, oltre a maggiori capacità MS. La nuova sorgente lavora con temperature operative fino a 350 °C.
Questa nuova caratteristica, insieme all'esclusivo quadrupolo riscaldato e al ciclo automatico di bakeout, offre prestazioni analitiche superiori e operazioni di manutenzione minime, anche con i campioni più sporchi.
Oltre ai vantaggi cromatografici offerti dall'esclusiva Capillary-Flow Technology del nuovo GC 7890A, l'accessorio QuickSwap del sistema GC/MSD 5975C permette di sostituire la colonna senza dover ventilare il rivelatore di massa.
La nuova piattaforma è integrata con il software della ChemStation Agilent GC/MSD per l'acquisizione dei dati, l'elaborazione e la presentazione dei risultati. È inoltre compatibile con il sistema Agilent Enterprise Content Management per una raccolta centralizzata dei dati multi-strumento.

Sistema GC/MSD Agilent 5975C



8 - Idrocarburi totali nel terreno X (con inoculo), evoluzione nel tempo delle tre frazioni nel test slurry

visti dalla vigente normativa (D.M. 471/1999). Si osserva inoltre che gli abbattimenti degli idrocarburi totali sono per il campione non inoculato C dell'ordine del 72%, per il campione X 92%.

Conclusioni

Il presente lavoro ha messo in luce che: se i batteri autoctoni vengono messi in condizioni ottimali per nutrienti e per disponibilità di ossigeno, si favorisce la loro attitudine a degradare gli idrocarburi.

Nel caso in oggetto, l'attività è ancor più efficace poiché, trattandosi di un inquinamento molto vecchio, si sfrutta la capacità metabolica di microrganismi che nel tempo si sono naturalmente selezionati e, come dimostrato nelle prove in slurry, si raggiungono i limiti di legge in tempi brevi.

Le prove con aggiunta di *blend* batterici selezionati hanno fornito interessanti e inedite informazioni. Risulta infatti evidente come nell'ambito delle tecniche di biorisanamento di un suolo inquinato da idrocarburi, la *Bioaugmentation*, rappresenta una tecnica efficace sia in termini di rese che di capacità di demolizione della catena idrocarburica.

Come già osservato negli grafici 1 e 2 si ha una resa di abbattimento degli idrocarburi totali per i campioni non inoculati C del 69%, mentre per la serie inoculata X del 72%.

La presente sperimentazione ha infatti dimostrato che l'aggiunta di *blend* batterici selezionati a un terreno contaminato garantisce non solo un migliore abbattimento degli idrocarburi, ma anche una maggiore efficienza qualitativa nel rompere le catene idrocarburiche a molti atomi di carbonio come già evidenziato nelle figure.

swan
ANALYTICAL INSTRUMENTS

Monitor AMI Codes

Sistema di monitoraggio completo per la misura ed il controllo del dosaggio di cloro e altri disinfettanti su acqua potabile, piscine, acqua di raffreddamento, acque reflue, acqua di mare

- *Analisi DPD colorimetrica conforme a standard ISO, ASTM*
- *Misura di pH integrata*
- *Controllo flusso campione e addizione reagenti*
- *Uscite 4-20 mA programmabili, contatti di allarme*
- *Data logger per registrare fino a 1.500 dati*
- *Relays o uscite in corrente programmabili come regolazione PID*
- *Modulo di lavaggio opzionale per pulizia automatica della cella a deflusso e del fotometro*
- *Webserver opzionale per accesso allo strumento da remoto via internet*
- *Interfaccia fieldbus opzionale*

SWAN definisce lo Standard

SWAN Analitica srl
I - 16166 GENOVA Tel. +39 010 329 1396 Fax + 39 010 372 6008
swan@swananalitica.it www.swananalitica.it