

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

Utilizzo di metodi biologici a scala di laboratorio per la bonifica di terreni
inquinati da idrocarburi.



Relatore

Prof.ssa Fulvia Chiampo

Candidata

Amanda Turetta

Correlatore

Prof.ssa Francesca Bosco

Indice

1. Introduzione	1
2. Scopo del lavoro e struttura della tesi	7
3. Materiali e Metodi	9
3.1 Prove geofisiche	9
3.1.1 Caratterizzazione granulometrica del suolo.....	9
3.1.2 Determinazione del contenuto d'acqua	9
3.1.3 Determinazione della densità reale	10
3.1.4 Valutazione della porosità	10
3.2 Prove di biodegradazione	12
3.2.1 Analisi microbiologica del suolo	12
3.2.2 Allestimento di microcosmi in suolo	13
3.2.2.1 Prove di crescita in microcosmo con aggiunta di soluzione nutritiva	14
3.2.2.2 Prove di crescita con terreni salini differenti	14
3.2.2.3 Microcosmi con linee contaminate da gasolio	16
3.2.3 Colture in fase liquida	17
3.2.4 Colture in liquido con terreno adatto a microrganismi batterici	18
3.2.5 Colture in liquido per la bioaugmentation	18
3.2.6 Prove di bioaugmentation	19
3.2.6.1 Analisi microbiologica sul suolo dei microcosmi per la bioaugmentation	19
3.2.7 Determinazioni analitiche	20
3.2.7.1 Valutazione respirometrica	20
3.2.7.2 Determinazione dell'umidità dei microcosmi.....	20
3.2.7.3 Valutazione del pH.....	20
3.2.7.4 Valutazione del peso secco della biomassa	21
3.2.7.5 Misura dell'assorbanza per le colture in terreno liquido.....	21
3.2.7.6 Determinazione della concentrazione di gasolio residuo.....	21
4. Risultati e discussione	23
4.1 Prove geofisiche	23
4.1.1 Distribuzione granulometrica del suolo.....	23
4.1.2 Determinazione del contenuto d'acqua	24
4.1.3 Determinazione della densità reale	24
4.1.4 Valutazione della porosità	25
4.2 Prove di biodegradazione	26
4.2.1 Determinazioni sul suolo con dimensione inferiore a 2 mm: umidità e pH.....	26
4.2.2 Analisi microbiologica del suolo	26
4.2.3 Prove di crescita in microcosmo con aggiunta di soluzione nutritiva.....	27
4.2.3.1 Analisi respirometriche	27
4.2.3.2 Determinazione dell'umidità finale dei microcosmi.....	29

4.2.4 Prove di crescita con terreni salini differenti	29
4.2.4.1 Analisi della respirometria su linee con terreni salini differenti	29
4.2.4.2 Misura del pH del suolo nei microcosmi dopo l'aggiunta del medium	30
4.2.4.3 Valutazione dell'umidità finale dei microcosmi	30
4.2.5 Microcosmi con linee contaminate da gasolio	31
4.2.5.1 Analisi respirometrica sulle linee contaminate da gasolio	31
4.2.5.2 pH del suolo delle linee contaminate	34
4.2.6 Colture in fase liquida	35
4.2.7 Colture in liquido con terreno adatto a microrganismi batterici	37
4.2.8 Colture in liquido per la bioaugmentation	40
4.2.9 Prove di bioaugmentation	41
4.2.9.1 Analisi respirometrica	42
4.2.9.2 Analisi microbiologica sul suolo dei microcosmi per la bioaugmentation	45
4.2.9.3 Valutazione dell'umidità e del pH delle linee.....	47
4.2.9.4 Concentrazione residua di gasolio.....	48
5. Conclusioni.....	51
6. Bibliografia.....	53
Appendice	55
Ringraziamenti.....	61

1. Introduzione

Il rapporto “Progress in the Management of Contaminated Sites in Europe”, pubblicato nel 2014 dal JRC European Soil Data Centre, fornisce una stima dell’estensione delle aree contaminate presenti sul territorio europeo. I dati, raccolti attraverso gli enti di 27 stati del continente europeo, indicano la presenza di circa 1.170.000 siti potenzialmente contaminati, di cui 340.000 già classificati come certamente contaminati.

La percentuale di siti su cui si è già provveduto ad intervenire attraverso operazioni di bonifica è pari al 15% del totale. Gli interventi di decontaminazione comportano ogni anno un costo medio di 10 € pro capite e i costi per le indagini sui siti variano tra i 5.000 e i 50.000 €, mentre i progetti di risanamento hanno un costo che normalmente ricade tra i 50.000 e i 500.000 €.

Il rapporto indica come nel 38% dei casi la contaminazione sia dovuta alle attività di trattamento dei rifiuti, nel 34% alle attività industriali e commerciali (come impianti di estrazione e produzione di combustibili, impianti per la produzione di energia e attività minerarie), nell’11% dei casi allo stoccaggio di combustibili e sostanze chimiche, nei casi rimanenti alle perdite che si verificano nel corso delle operazioni di trasporto e ad una serie di cause secondarie (tra le quali le attività militari).

I contaminanti riscontrati nei siti sono prevalentemente idrocarburi di varia natura e metalli pesanti, come è possibile visualizzare nel grafico sottostante (Figura 1):

Contaminanti del suolo



Figura 1. Contaminanti del suolo (Adattata da “Progress in the Management of Contaminated Sites in Europe” 2014)

La tecnica di bonifica attualmente più diffusa comporta lo scavo del suolo contaminato e la sua messa a discarica (pratica diffusa in percentuali che variano tra il 5% e il 90% dei casi a seconda della nazione di indagine, con una media del 30%); tuttavia, visto l’aumento delle restrizioni e dei controlli sulle aree adibite a discarica, si stanno sempre più diffondendo tecniche di bonifica alternative. Queste tecniche comprendono principalmente trattamenti di tipo biologico, chimico (e.g. ossidazione Fenton ed estrazione con solventi) e termico (ad esempio incenerimento, riscaldamento con microonde e desorbimento termico) (Lim et al., 2016).

Nelle ultime due decadi ci sono stati sviluppi riguardanti principalmente le tecniche di decontaminazione di tipo biologico che comportano l’impiego dei microrganismi indigeni del suolo, o altri appositamente selezionati, per la trasformazione e degradazione delle sostanze contaminanti fino al raggiungimento delle concentrazioni consentite dalle normative europee. Le tecniche di biorisanamento si suddividono nelle pratiche *ex-situ* ed *in-situ* che vengono di seguito elencate.

Tecniche *ex-situ*:

- Biopile: formazione di cumuli di suolo addizionati di nutrienti ad aerazione e umidità controllata per l'incremento dell'attività microbica. I cumuli possono essere coperti da materiali traspiranti ma impermeabili (e.g. GoreTex).
- Windrow: movimentazione periodica di cumuli di suolo contaminati eventualmente arricchiti di nutrienti e acqua.
- Bioreattore: trattamento del materiale contaminato in un bioreattore sotto forma di materiale asciutto o come slurry in cui vengono create le condizioni operative ottimali; può prevedere l'aggiunta di microrganismi selezionati (bioaugmentation).
- Land farming: dissodamento del terreno attraverso aratura per favorire la degradazione aerobica dei contaminanti da parte dei microrganismi indigeni del suolo.

Tecniche *in-situ*:

- Bioventing: stimolazione dell'attività microbica attraverso introduzione di flussi di aria per favorire l'ossigenazione, con eventuale aggiunta di nutrienti e umidità.
- Biosparging: analogo al bioventing, prevede l'uso di flussi d'aria per far risalire i composti organici volatili in una zona del terreno non satura per incrementarne la degradazione da parte dei microrganismi.
- Phytoremediation: utilizzo di piante per degradare o ridurre la concentrazione di inquinanti attraverso estrazione, accumulo, filtrazione e stabilizzazione delle sostanze indesiderate.

In tabella vengono riportati i vantaggi e gli svantaggi delle tecniche sopra elencate e un esempio dei contaminanti che possono essere trattati:

Tabella 1. Tecniche di bioremediation

Tecniche ex-situ			
Tecnica	Vantaggi	Svantaggi	Applicazione
<i>Biopile</i>	Basso costo di realizzazione. Buon controllo dei parametri all'interno del cumulo. Possibilità di modificare la tessitura del terreno.	Necessità sistema raccolta del percolato e suo successivo trattamento. Alto costo di mantenimento.	Trattamento idrocarburi in aree fredde.
<i>Windrow</i>	Velocità degradazione maggiore rispetto alla tecnica di biopile.	Non adatto in presenza di contaminanti organici volatili (VOCs).	Trattamento aree contaminate con idrocarburi.
<i>Bioreattore</i>	Eccellente controllo dei parametri di processo. Velocità di bonifica elevata.	Necessaria accurata progettazione del reattore e identificazione dei parametri ottimali. Adatto per volumi di suolo ridotti.	Trattamento suoli contaminati con VOCs.

Tecniche in-situ			
Tecnica	Vantaggi	Svantaggi	Applicazione
<i>Land farming</i>	Basso costo di progettazione e operativo. Utilizzabile in ogni area climatica. Adatto per trattare grandi volumi di materiale. Basso consumo di energia.	Necessità di ampi spazi operativi. Non adatto per suoli contaminati da VOCs.	Bonifica suoli contaminati da idrocarburi inclusi gli aromatici policiclici.
<i>Bioventing</i>	Alte velocità di degradazione dei contaminanti.	Necessità di individuare la portata d'aria adeguata e il sistema di distribuzione adatto. Poco adatto per suoli a bassa permeabilità.	Risanamento siti contaminati con prodotti petroliferi.
<i>Biosparging</i>	Alte velocità di degradazione dei contaminanti.	Efficacia dipendente dalla permeabilità del suolo.	Bonifica terreni contaminati con BTEX.
<i>Phytoremediation</i>	Basso costo di installazione e mantenimento. Conservazione della struttura naturale del suolo. Prevenzione dell'erosione. Possibilità di operare su vasta scala.	Identificazione di piante adatte alle condizioni del suolo e in grado di sopravvivere in presenza del contaminante.	Trattamento suoli contaminati da metalli pesanti e radionuclidi.

Le tecniche descritte in precedenza sono metodologie attualmente in fase di sviluppo e di cui esistono sia sperimentazioni a livello di laboratorio sia sotto forma di prove in campo; di seguito si riassumono le caratteristiche e i parametri di processo testati, e i relativi risultati, descritti in letteratura.

Si riportano esclusivamente informazioni riguardanti le prove di degradazione su idrocarburi, con particolare attenzione al gasolio che, come indicato nel capitolo successivo, è il contaminante scelto per le prove descritte all'interno della tesi.

Inoltre è stata posta l'attenzione sulle tecniche che più probabilmente potrebbero costituire una futura evoluzione delle prove riportate nella presente tesi.

Tecniche *ex-situ*:

- **Biopile:** in letteratura vengono indicati diversi ammendanti addizionati con l'obiettivo di aumentare la porosità del terreno e favorire l'ossigenazione del suolo, in particolare si possono citare i chips di legno (1 kg di chips :1 kg di suolo, Kauppi et al., 2011).
I vari team di ricerca hanno sperimentato diverse strategie di bonifica che comprendono la biostimulation, ovvero l'aggiunta di sostanze nutritive nel suolo, e la bioaugmentation, cioè l'inserimento all'interno del suolo di un consorzio microbico appositamente selezionato, confrontandole con la naturale degradazione operata dai microrganismi autoctoni.
Per quanto riguarda la biostimulation le sostanze addizionate sono principalmente azoto (95-1340 mg-N/ kg di suolo, generalmente sotto forma di urea o nitrato di ammonio) e fosforo (in rapporto alla quantità di N inserita, generalmente prossimo a 0,1, sotto forma di NaH_2PO_4 e/o K_2HPO_4). Le biopile sono spesso arieggiate con portate variabili dipendenti dalla tipologia di suolo e in genere umidificate attraverso passaggio della corrente d'aria in acqua.
Per quanto riguarda la bioaugmentation, i microrganismi degradanti il contaminante vengono generalmente selezionati in colture liquide in cui l'unica fonte di carbonio è il contaminante stesso.
I risultati ottenuti mostrano che la biostimulation è in genere efficace nell'incrementare la degradazione degli idrocarburi. Kauppi et al., 2011 riportano una diminuzione da 2700 mg di gasolio/kg di suolo a 500 mg di gasolio/kg di suolo dopo 11 mesi di trattamento (riduzione dell'81,5%). Per quanto riguarda la bioaugmentation invece le sperimentazioni appaiono più contrastanti: Kauppi et al., non evidenziano un effetto positivo sulla degradazione, mentre Gomez et al., 2014, che associano biostimulation e bioaugmentation, riportano una diminuzione dopo 94 giorni del 90,7% dei TPH (Total Petroleum Hydrocarbon) presenti nel suolo rispetto al 48% misurato su biopile non inocolata e non addizionata con nutrienti.
- **Windrow:** Coulon et al., 2010 riportano che in presenza di suoli dalla tessitura fine la tecnica windrow risulta essere più efficace rispetto alla tecnica della biopile per bonificare un terreno contenente idrocarburi; un cumulo da 3 tonnellate è stato arricchito con nutrienti (N e P in rapporto 20:2) e inoculato con 5×10^7 CFU/g di suolo. La degradazione verificatasi nel cumulo, rivoltato due volte a settimana, è stata confrontata con quella rilevata in una biopile di massa analoga e addizionata dei medesimi nutrienti ma ossigenata inviando aria ogni 48 ore; il risultato è che all'interno della biopile la degradazione è stata del 80%, mentre con la tecnica windrow è stato raggiunto un valore del 97%.
- **Land farming:** in letteratura si riporta che se il contaminante si trova ad una profondità inferiore ad 1 m rispetto al piano campagna, allora non è necessario effettuare uno scavo per portare in superficie il terreno, diversamente se il contaminante si trova oltre 1,7 m di profondità lo scavo è necessario (Nikolopoulou et al., 2013). La bonifica richiede irrigazione del terreno in maniera da mantenere un'umidità circa costante (1 o 2 volte a settimana a seconda delle precipitazioni e della stagione; Silva-Castro et al., 2015 riportano una biodegradazione degli idrocarburi compreso tra il 36 e il 65% a seconda del tipo di trattamento e concentrazione iniziale del contaminante), talvolta è possibile prevedere una biostimulation.

Tecniche *in-situ*:

- **Bioventing:** la tecnica prevede l'individuazione del corretto flusso d'aria e del periodo di iniezione ottimale che variano significativamente a seconda della porosità del terreno; da letteratura si evidenzia che in ogni caso un aumento del flusso d'aria non incrementa necessariamente la degradazione degli idrocarburi contaminanti: Thomé et al., 2014 evidenziano come nei suoli argillosi contaminati da gasolio una diminuzione del flusso

associata con un intervallo di aerazione più lungo risulti più efficace ed economico rispetto ad un flusso elevato (il valore ottimale indicato è di 2 l/min per un'area di circa 80 cm² per 1h ogni due giorni che permette una diminuzione di concentrazione del contaminante dell'85% rispetto al valore iniziale). Flussi elevati inoltre provocano la volatilizzazione degli inquinanti in aria con conseguente dispersione dei contaminanti.

A livello di laboratorio è in fase di studio l'utilizzo di tensioattivi per favorire il trasporto in fase acquosa dei composti idrocarburici rendendoli così più disponibili per i microrganismi; tra gli altri sono stati sperimentati SDS, TWEEN 80 e Triton X-100.

Le quantità utilizzate riportate in letteratura sono in genere dello 0,02% w/v per SDS, comprese tra lo 0,02 e lo 0,1% v/v in fase liquida per il TWEEN 80, 5 g/l per il Triton X-100 (utilizzato da Seo et al., 2009). I tensioattivi di origine sintetica possono risultare però tossici per i microrganismi, e quindi per l'ambiente, se addizionati in dosi non corrette; pertanto sono in fase di studio i tensioattivi di origine biologica, cioè prodotti dai microrganismi. Tra i biotensioattivi di particolare interesse sono le ciclodestrine (Simpanen et al., 2016) e i ramnolipidi che sono biodegradabili, sicuri per l'ambiente, stabili e a bassa tossicità (Szulc et al., 2013).

Alcuni studi mostrano che l'aggiunta di biotensioattivi incrementa l'efficienza di degradazione del gasolio, mentre altri studi evidenziano una mancanza di effetto o talvolta una diminuzione della velocità di degradazione: ciò può essere dovuto al fatto che parte dei composti idrofobici rimangono intrappolati all'interno delle micelle di tensioattivo risultando così non disponibili per i microrganismi, sebbene trasportati in fase acquosa (Szulc et al., 2013).

2. Scopo del lavoro e struttura della tesi

Gli idrocarburi costituiscono più della metà delle sostanze che, secondo il rapporto del JRC European Soil Data Centre, contaminano il suolo, per questa ragione sono stati scelti come contaminanti di studio all'interno di questa tesi; in particolare si è posto l'interesse sugli idrocarburi che costituiscono il gasolio da autotrazione.

All'interno della presente tesi viene proposta una strategia a livello di laboratorio per la bonifica di terreni contaminati da gasolio attraverso metodologie di tipo biologico. La scelta di questa particolare tipologia di prove è da imputarsi alla loro sostenibilità dal punto di vista ambientale, in quanto permettono di minimizzare l'inserimento di sostanze chimiche nel suolo sfruttando i microrganismi presenti naturalmente nel terreno.

Nella parte iniziale del lavoro (*3.1 Prove geofisiche*) sono state valutate le caratteristiche geofisiche del suolo utilizzato: distribuzione granulometrica, densità reale e apparente, contenuto naturale di umidità e porosità della matrice, con il fine di comprendere le particolari proprietà che potrebbero influenzare la degradazione del gasolio da parte dei microrganismi autoctoni o eventualmente inoculati; ad esempio una bassa porosità potrebbe rendere più complessa l'operazione di ossigenazione causando la formazione di punti in cui la degradazione avverrebbe in condizioni di anaerobiosi con conseguente produzione di CH₄ (gas infiammabile e con elevato effetto serra).

Nella seconda parte della tesi (*3.2 Prove biologiche*) vengono invece presentate prove di tipo chimico-biologico eseguite con il fine di quantificare la popolazione microbica indigena nel suolo (*3.2.1 Analisi microbiologica del suolo*) e valutare la capacità dei microrganismi di utilizzare nutrienti presenti naturalmente nel terreno e i quelli, di diverse tipologie, addizionati appositamente per favorirne la crescita.

Sono state sperimentate due diverse tipologie di medium liquidi salini con l'intenzione di valutare quale permettesse di ottenere i risultati migliori dal punto di vista della crescita microbica (valutata con analisi respirometrica); i medium scelti tendevano rispettivamente a favorire i microrganismi di tipo fungino e i microrganismi di tipo batterico. I terreni sono stati inseriti all'interno di microcosmi in suolo inizialmente non contaminati e successivamente sono state allestite linee contaminate e i rispettivi controlli in cui il gasolio non era presente. Queste prove, oltre a permettere di valutare il tipo di terreno salino più efficace, sono state utilizzate per comprendere se il contaminante scelto avesse un effetto inibente sui microrganismi (*3.2.2. Allestimento microcosmi in suolo*).

Parallelamente sono state realizzate una serie di colture in liquido con lo scopo di fornire un'ulteriore indicazione circa il terreno salino più indicato e per valutare la capacità degradativa nei confronti del gasolio; ciò è stato stabilito recuperando e quantificando la biomassa cresciuta all'interno delle colture contaminate (*3.2.3 Colture in fase liquida*).

Stabilito quale fosse il terreno più adatto ad essere utilizzato, si è provveduto a realizzare prove di coltura in liquido per avere un'indicazione circa la necessità o meno di aggiungere una fonte di carbonio facilmente utilizzabile da parte dei microrganismi e, se necessario, in quale concentrazione. Tali prove sono state condotte mantenendo le colture sia in condizioni statiche sia in condizione di agitazione per evidenziare se ci fossero differenze quantitative e qualitative in termini di biomassa prodotta (*3.2.4 Colture in liquido con terreno adatto a microrganismi batterici*).

Infine sono stati allestiti nuovi microcosmi in suolo per confrontare l'effetto della biostimulation rispetto alla bioaugmentation (*3.2.6 Allestimento linee con bioaugmentation*), ovvero l'aggiunta nel suolo di microrganismi coltivati in liquido già acclimatati ad un ambiente

contaminato da gasolio; sono stati impiegati due diversi tipi di inoculi di microrganismi cresciuti in terreni a concentrazione differente di glucosio (3.2.5 *Colture in liquido per la bioaugmentation*) per valutare se ci fosse una differenza significativa di comportamento respirometrico quando utilizzati nel suolo.

Nel capitolo 4. *Risultati e discussione* sono riportati e commentati i risultati ottenuti dalle prove sperimentali descritte precedentemente.

Infine nel capitolo 5. *Conclusioni* vengono riassunti i risultati ottenuti indicando anche possibili valutazioni e sviluppi futuri.

3. Materiali e Metodi

3.1 Prove geofisiche

3.1.1 Caratterizzazione granulometrica del suolo

Il suolo impiegato nelle prove descritte all'interno della tesi è stato asportato da un sito non contaminato da idrocarburi nei pressi di Trecate da una profondità di circa 3 m. Su tale terreno è stata eseguita una prima caratterizzazione di tipo granulometrico.

Per l'operazione sono stati utilizzati setacci con apertura di maglia di 5, 2, 1,180, 0,600, 0,300, 0,150 e 0,063 mm impilati l'uno sull'altro nell'ordine riportato.

Il trattenuto di ogni setaccio e il passante dell'ultimo vaglio è stato pesato per ottenere la distribuzione granulometrica del suolo in esame.

3.1.2 Determinazione del contenuto d'acqua

Per la valutazione del contenuto d'acqua è stato utilizzato il metodo WCR (Water Content Refractometry). Un sensore (CS613 Campbell Scientific, Inc.) è stato inserito in un cumulo di materiale dall'altezza adeguata a ricoprire interamente la porzione sensibile del dispositivo (circa 30 cm). Il sensore è stato collegato ad un datalogger (CR850 Campbell Scientific, Inc) che registrava i tempi in cui il segnale elettromagnetico emesso impiegava per attraversare il sensore. Il sistema è stato connesso ad un computer in maniera da poter visualizzare in tempo reale i dati in ingresso.

I dati sono stati raccolti per un tempo superiore all'ora (escluso il tempo necessario all'assestamento del sistema).

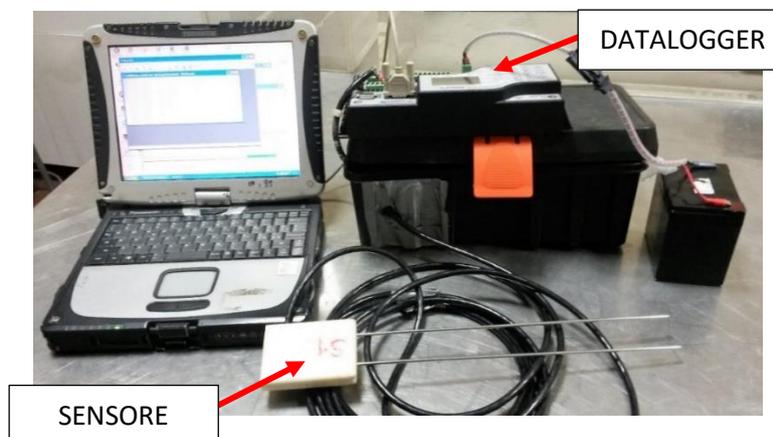


Figura 2. Sensore e datalogger impiegati nella prova WCR

I tempi di andata e ritorno del segnale elettromagnetico all'interno delle aste del sensore utilizzato nella prova di WCR sono stati corretti in maniera da tenere conto della differenza di temperatura tra l'ambiente in cui si è svolta la prova (registrabile dal datalogger) e la temperatura normale (20°C) attraverso la relazione:

$$t_{corr} = t_{raw} + (20 - |T|) * (0,526 - 0,052 * t_{raw} + 0,00136 * t_{raw})$$

Dove t_{corr} è il dato corretto; t_{raw} è il dato registrato dal datalogger e T è la temperatura (°C) registrata durante la prova.

Dal valore così corretto è stato possibile ricavare il valore di permittività elettrica attraverso l'equazione:

$$\varepsilon = [(t_{corr} * \frac{10^{-6}}{S_f} - 2 * t_d) * c/4L]^2$$

ε è la permittività elettrica, S_f è una costante dello strumento e pari a 1024, t_d è una correzione per il tempo e vale $5,48 * 10^{-9}$ s, L è la lunghezza delle aste del sensore (0,266 m) e c è la velocità della luce nel vuoto.

Le relazioni sopra riportate sono fornite dal produttore del sensore all'interno del manuale.

Infine dal valore di permittività è possibile ricavare il contenuto d'acqua volumetrico ϑ presente nel suolo in esame utilizzando l'equazione empirica di Topp (Topp et al., 1980):

$$\vartheta = 4,3 * 10^{-6} * \varepsilon^3 - 5,5 * 10^{-4} * \varepsilon^2 + 2,92 * 10^{-2} * \varepsilon - 5,3 * 10^{-2}$$

3.1.3 Determinazione della densità reale

Per la determinazione della densità reale del materiale, definita come il rapporto tra la massa secca del campione e il volume del liquido spostato dal campione, si è utilizzato il metodo della picnometria secondo la norma EN 1936:2006 (E).

Sono state selezionate 5 delle frazioni ottenute dalla setacciatura descritta al paragrafo 3.1.1, in particolare la frazione passante 0,063 mm e il trattenuto dei setacci da 0,063, 0,150, 0,300 e 0,600 mm. Da ciascuna frazione sono stati prelevati 5 g di materiale e, nel caso delle frazioni trattenute dai setacci da 0,300 e 0,600 mm, si è ritenuto opportuno frantumare con un pestello il materiale per favorire la fuoriuscita di aria dal grano.

Sono stati riempiti completamente con acqua 5 picnometri, che sono stati messi sottovuoto attraverso un'apposita pompa per eliminare l'aria in essa disciolta, al termine dell'operazione ognuno è stato pesato.

I 5 g di materiale di ciascuna frazione sono stati inseriti all'interno dei picnometri suddetti, ma riempiti non completamente, ed ogni ampolla è stata posta nuovamente sottovuoto.

Ogni picnometro è stato poi rabboccato con acqua ed è stato inserito un tappo forato per eliminare parte dell'acqua. Ogni picnometro è stato ripesato per la valutazione della massa, e quindi del volume, del liquido spostato.

La densità reale è stata calcolata valutando il volume di acqua spostata attraverso i valori di pesata e dividendo tale valore per la massa di campione inserito nel picnometro.

3.1.4 Valutazione della porosità

Per valutare la porosità del suolo è stata realizzata una prova di infiltrazione utilizzando una colonna in Plexiglass di 15 cm di diametro provvista sul fondo di un basamento dotato di valvola a farfalla per permettere l'allagamento della colonna dal basso. Sul fondo della colonna è stato posto uno strato di materiale drenante costituito dalla frazione di suolo trattenuta dal vaglio 2 mm per un'altezza di circa 5 cm, lo strato è stato ricoperto da un filtro di carta per evitare l'intasamento del condotto di ingresso dell'acqua da parte del materiale sabbioso presente nel suolo.

Al di sopra del filtro è stata disposta una colonna di sabbia di altezza pari a 36 cm (l'altezza è stata stabilita in modo che il sensore già impiegato nella prova di determinazione del contenuto d'acqua fosse totalmente ricoperto).

La valvola a farfalla posta sul fondo della colonna è stata connessa mediante una tubazione di gomma ad un serbatoio contenente acqua posto in posizione sopraelevata rispetto alla colonna in maniera da assicurare un battente adeguato per tutto il corso della prova.

È stato preso nota del tempo di inizio della prova e si è aperto il rubinetto del serbatoio dell'acqua finché non si è osservato un affioramento di acqua sulla superficie della colonna di sabbia. Si è preso nota del volume di liquido fuoriuscito dal serbatoio che corrisponde al volume vuoto in colonna e quindi alla porosità del materiale.

Di seguito si riportano le caratteristiche della colonna impiegata per la prova di infiltrazione e i dati necessari alla valutazione della porosità del suolo (frazione < 2mm).

Tabella 2. Caratteristiche della colonna utilizzata nella prova di infiltrazione

Diametro della colonna (cm)	15
Altezza della sabbia (cm)	36
Altezza sabbia + dreno (cm)	41
Battente iniziale (m)	2,03

Massa aggiunta in colonna (kg)	10,34
Volume materiale in colonna (dm³)	6,36
Densità apparente (kg/m³)	1620
Volume reale materiale (L)	3,82
Volume acqua aggiunto (L)	2,75

La porosità del terreno è stata calcolata dividendo il volume di acqua aggiunto per il volume del materiale inserito in colonna.



Figura 3. Prova di infiltrazione

3.2 Prove di biodegradazione

3.2.1 Analisi microbiologica del suolo

Metodo delle capsule di suolo

L'analisi è stata condotta su campioni di suolo con dimensioni inferiori a 2 mm e utilizzando un terreno Agar Malto a pH 4 (più indicato per la crescita di microrganismi fungini) e a pH 5 (più indicato per la crescita di microrganismi di tipo batterico).

Di seguito si riporta la composizione dei suddetti terreni:

Tabella 3. Composizione terreno Agar-Malto

Terreno Agar Malto (pH 4)	Terreno Agar Malto (pH 5)
20 g/L estratto di malto	20 g/L estratto di malto
2 g/L peptone	2 g/L peptone
20 g/L glucosio	20 g/L glucosio
20 g/L agar	20 g/L agar

I terreni sono stati portati al valore di pH desiderato mediante aggiunta di una soluzione di HCl 1M.

Per ogni tipo di terreno sono state realizzate 3 piastre Petri su cui sono stati depositati 50 mg di suolo ognuna e 3 piastre contenenti 100 mg di suolo ciascuna. Su ogni deposito di suolo sono state aggiunte alcune gocce di acqua sterile e si è agitato per alcuni secondi con un'ansa in plastica, anch'essa sterile, per favorire la sospensione dei microrganismi. Successivamente sono stati versati su ogni piastra 20 mL di terreno Agar Malto, imprimendo un leggero movimento rotatorio per distribuire il suolo nella piastra.

Le piastre sono state conservate in condizioni di assenza di luce per mantenere le condizioni naturali in cui i microrganismi si trovavano nel terreno di origine e a temperatura ambiente, finché non si è osservata su di esse la crescita di colonie di microrganismi. In seguito è stata effettuata la conta di tali colonie andando a distinguere le colonie di tipo batterico da quelle fungine.

Metodo a diluizioni successive

È stata preparata una sospensione inserendo 50 g del suolo in esame in 100 mL di acqua distillata all'interno di una beuta contenente sfere di vetro in quantità tale da favorire la movimentazione del liquido e facilitare la sospensione dei microrganismi adesi alla superficie dei grani di suolo. La beuta è stata tenuta in agitazione per circa 1 h alla velocità di 125 rpm dopo essere stata chiusa con un tappo di cotone.

Al termine della fase di agitazione sono state realizzate tre diluizioni della sospensione con rapporto 1:100, 1:1000 e 1:10000. 0,5 mL di ogni campione sono stati distribuiti per mezzo di un'ansa sterile sulla superficie di una capsula Petri con terreno Agar Malto a pH 4 e a pH 5 (20 mL).

Per ogni diluizione sono state realizzate 3 repliche per il terreno a pH 4 e 3 repliche per il terreno a pH 5.

Ogni capsula è stata chiusa con parafilm ed è stata mantenuta a temperatura ambiente in assenza di luce per alcuni giorni prima di valutare la crescita delle colonie di microrganismi.

I materiali utilizzati, così come l'acqua distillata, erano sterili.

La concentrazione di colonie (UFC: Unità Formanti Colonie) è stata calcolata come:

$$\text{Concentrazione (UFC/g suolo)} = \frac{\text{media UFC}}{\text{g suolo per capsula}}$$

3.2.2 Allestimento di microcosmi in suolo

Per valutare la capacità di produzione di CO₂ da parte dei microrganismi presenti nel suolo, sono stati allestiti dei microcosmi all'interno di barattoli in vetro (di volume pari ad 1 L) provvisti di un sistema di chiusura a tenuta in maniera che lo scambio di CO₂ tra l'interno del microcosmo e l'ambiente esterno fosse il più possibile limitato.

All'interno di ogni barattolo sono stati inseriti 200 g di suolo con granulometria inferiore a 2 mm e al centro di ogni microcosmo è stato inserito un contenitore in plastica, poggiante su un supporto anch'esso di materiale plastico, al cui interno vi erano 25 mL di una soluzione di NaOH 1,5 N in grado di assorbire la CO₂ presente all'interno del microcosmo.

Per la preparazione della soluzione caustica è stata impiegata acqua distillata decarbonata attraverso ebollizione dell'acqua per un tempo minimo di 45 minuti.

I microcosmi sono stati mantenuti a temperatura ambiente e in condizioni di alternanza luce-buio naturali.



Figura 4. Microcosmo

3.2.2.1 Prove di crescita in microcosmo con aggiunta di soluzione nutritiva

Si è voluta valutare la capacità di respirazione dei microrganismi del suolo senza che ad esso fosse aggiunta una fonte di carbonio. Per l'analisi sono stati allestiti 2 microcosmi del tipo descritto nel paragrafo precedente. Nel primo sono stati aggiunti 35 mL di acqua distillata e nel secondo 40 mL; il suolo è stato mescolato per distribuire l'acqua in modo uniforme.

Il quantitativo di acqua aggiunto è stato scelto in maniera che il suolo non risultasse né troppo secco né eccessivamente fangoso.

Al giorno 9 e al giorno 22 è stata aggiunta una soluzione nutritiva in ciascun sistema.

La composizione della soluzione nutritiva introdotta è quella riportata di seguito (terreno Czapek):

Tabella 4. Composizione soluzione nutritiva (terreno Czapek)

Composto	Concentrazione (g/L)
C ₆ H ₁₂ O ₆	30
NaNO ₃	3
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄	0,2
KCl	0,2
FeSO ₄	0,01

L'aggiunta era costituita da 5 mL (un volume ridotto in maniera da non causare un'umidificazione eccessiva del suolo) della soluzione descritta in Tabella 4 con una concentrazione quadruplicata rispetto ai valori indicati.

I sistemi sono stati monitorati complessivamente per 31 giorni.

3.2.2.2 Prove di crescita con terreni salini differenti

È stata valutata la capacità di sviluppo dei batteri e dei funghi naturalmente presenti nel suolo mediante la quantificazione della produzione di CO₂. Sono state quindi allestite 4 linee biotiche ed una linea abiotica, di seguito descritte.

❖ Linee biotiche:

In due microcosmi, indicati con F ed F + G sono stati versati 37 mL di un medium salino adatto a microrganismi di tipo fungino (MSM F), già utilizzato da Maddela et al. (2015), a pH 5,5, la cui composizione è la seguente:

Tabella 5. Composizione MSM F

Composto	Concentrazione (g/L)
Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O	3
KH ₂ PO ₄	3
NaCl	0,5
NH ₄ Cl	1
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,5
CaCl ₂ • H ₂ O	0,002
FeCl ₃ • 2H ₂ O	0,002

Nel microcosmo indicato con F + G il medium includeva glucosio come fonte di carbonio (20 g/L di glucosio).

Nei microcosmi qui identificati con B e B + G invece sono stati aggiunti 37 mL di un medium a pH 7,5 adatto a microrganismi batterici (MSM B), impiegato da Palanisamy et al. (2014), di composizione:

Tabella 6. Composizione MSM B

Composto	Concentrazione (g/L)
NH ₄ NO ₃	3
KH ₂ PO ₄	0,5
K ₂ HPO ₄ • 3H ₂ O	0,5
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,008
CuSO ₄ • 4H ₂ O	0,002
MnSO ₄ • H ₂ O	0,002
FeSO ₄ • 7H ₂ O	0,002
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,002
NaCl	1 mM

Nel microcosmo indicato con B + G il medium includeva glucosio come fonte di carbonio (20 g/L di glucosio).

❖ Linea abiotica: il suolo sterile è stato inserito in un contenitore analogo ai precedenti ma sterilizzato e su di esso sono stati versati 37 mL di acqua sterile. Sia il contenitore per la soluzione di NaOH 1,5 N, sia il sostegno sottostante sono stati sterilizzati.

Il suolo di ogni microcosmo è stato mescolato per distribuire uniformemente il medium. Le linee sono state monitorate per 8 giorni.



Figura 5. Linee biotiche con terreni salini differenziati

3.2.2.3 Microcosmi con linee contaminate da gasolio

Sono state allestite 8 linee biotiche a partire dal suolo presente all'interno dei microcosmi biotici descritti nel paragrafo 3.2.2.2; ciò con lo scopo di valutare un'eventuale capacità degradativa di batteri e funghi nei confronti del gasolio da autotrazione o, al contrario, evidenziare un effetto inibente sui microrganismi.

La composizione delle linee è presentata nella tabella sottostante; il medium per batteri e funghi a cui si fa riferimento nella tabella ha la composizione del terreno riportato al paragrafo 3.2.2.2 (Tabella 5 e Tabella 6); ogni microcosmo contiene metà del suolo acclimatato dei microcosmi descritti al paragrafo precedente e 100 g di suolo con dimensione inferiore ai 2 mm.

Tabella 7. Linee contaminate da gasolio e controlli

Linea	Glucosio	Gasolio	Microcosmo di provenienza del suolo
MSM B + 2% G	20 g/L	-	B
MSM B + 2% G + D	20 g/L	SI	B
MSM B + 3% G	30 g/L	-	B + G
MSM B + 3% G + D	30 g/L	SI	B + G
MSM F + 2% G	20 g/L	-	F
MSM F + 2% G + D	20 g/L	SI	F
MSM F + 3% G	30 g/L	-	F + G
MSM F + 3% G + D	30 g/L	SI	F + G

La quantità di medium è di 37 mL per ogni microcosmo.

Nei microcosmi contaminati la concentrazione utilizzata è di 0,09 ml di gasolio/g suolo.

Per la preparazione, il suolo di ognuno dei microcosmi biotici del punto 3.2.2.2 è stato pesato e suddiviso in due parti all'incirca uguali e riposto in contenitori di vetro del tipo già descritto in precedenza. Nei microcosmi senza gasolio sono stati aggiunti 100 g di suolo (conservato fino a quel momento in frigorifero) e dispersi 37 mL del medium specificato in tabella 7 e il sistema è stato miscelato per omogeneizzare il più possibile.

Nel caso dei microcosmi da contaminare con idrocarburi si è operato in maniera differente: si è proceduto alla contaminazione di 100 g di suolo non acclimatato su piastre in vetro versando il gasolio con una pipetta Pasteur e miscelando per distribuirlo in maniera omogenea; si è mantenuto il suolo contaminato con il gasolio per mezz'ora sotto cappa chimica prima di unire il suolo contaminato a quello acclimatato.

Il gasolio impiegato è un gasolio commerciale da autotrazione; secondo quanto riporta l'azienda che serve il distributore di approvvigionamento, il gasolio contiene una quantità di biodiesel nei limiti imposti dall'Unione Europea (< 7% in volume).

È stato successivamente aggiunto il medium corrispondente e il sistema è stato miscelato.



Figura 6. Inquinamento del suolo con gasolio su piastra.

È stata mantenuta la linea abiotica descritta in 3.2.2.2.

Dopo 42 giorni in ogni microcosmo sono stati aggiunti 2 mL di H₂O distillata per ripristinare le condizioni di umidità iniziali.

3.2.3 Colture in fase liquida

Parallelamente all'allestimento dei microcosmi in suolo, sono state realizzate colture in medium liquido all'interno di beute Erlenmeyer (500 mL) provviste di frangiflutti; all'interno di ogni coltura è stato inserito 1 g di suolo proveniente dai microcosmi del paragrafo 3.2.2.2.

Le colture sono state suddivise in 6 linee dalla composizione riassunta in tabella:

Tabella 8. Colture in fase liquida

Linea	Glucosio	Microcosmo di provenienza del suolo
MSM B + gasolio	-	B
MSM B + 2% G + gasolio	20 g/L	B
MSM B + 3% G + gasolio	30 g/L	B
MSM F + gasolio	-	B
MSM F + 2% G + gasolio	20 g/L	F
MSM F + 3% G + gasolio	20 g/L	F

Con MSM B e MSM F si fa riferimento ai medium salini descritti nel paragrafo 3.2.2.2 (Tabelle 5 e 6); in ogni beuta sono stati versati 100 ml di medium.

Il quantitativo di gasolio inserito in ogni coltura è pari all' 1% v/v.

Per ogni linea sono state realizzate 2 repliche.



Figura 7. Colture in beuta sul sistema di agitazione.

Le beute sono state chiuse con tappi di cotone e parafilm e tenute in agitazione a 125 rpm per 3 giorni.

Al 4° giorno l'agitazione è stata sospesa e il parafilm sostituito con pellicola polimerica per ridurre l'evaporazione del liquido. Le colture sono state mantenute in condizioni statiche a temperatura ambiente e nelle condizioni di naturale alternanza luce-buio per 38 giorni.

3.2.4 Colture in liquido con terreno adatto a microrganismi batterici

Sono state allestite 6 nuove linee in medium liquido per valutare se il contaminante scelto (gasolio) esercitasse un'azione inibente sulla crescita dei microrganismi.

Le linee sono riassunte in tabella; in ogni beuta è stato inoltre aggiunto 1 g di suolo proveniente dal microcosmo MSM B + 2% G descritto in precedenza.

Tabella 9. Colture in liquido con MSM B

Linea	Glucosio	Gasolio
MSM B	-	-
MSM B + gasolio	-	SI
MSM B + 0,5% G	5 g/L	-
MSM B + 0,5% G + gasolio	5 g/L	SI
MSM B + 2% G	20 g/L	-
MSM B + 2% G + gasolio	20 g/L	SI

Con MSM B si fa riferimento al medium salino descritto in tabella 6; in ogni beuta sono stati inseriti 100 mL del medium indicato.

La concentrazione di gasolio impiegata è dell'1% v/v.

La concentrazione di glucosio utilizzata è stata scelta in modo da avere un'indicazione circa il quantitativo di glucosio necessario per ottenere una produzione di biomassa sufficiente per svolgere in seguito prove di bioaugmentation.

Le colture sono state inserite in beute Erlenmeyer (500 mL) dotate di frangiflutti chiuse con tappi di cotone e poste in agitazione per circa mezz'ora in maniera da favorire la dispersione dei microrganismi presenti nel suolo all'interno del liquido e poi mantenute in condizioni statiche.

Sono state allestite anche 6 linee analoghe con volume raddoppiato (200 mL di MSM B) che sono state poste in agitazione continua. Per ogni linea sono state realizzate due repliche.

Le linee sono state mantenute per due settimane.

3.2.5 Colture in liquido per la bioaugmentation

Con lo scopo di produrre una biomassa già acclimatata ad un ambiente contaminato da gasolio da poter inserire all'interno di microcosmi in suolo (descritti al paragrafo successivo), sono state allestite due tipologie di colture in liquido: MSM B + gasolio e MSM B + 0,5% G + gasolio. Ogni coltura consisteva in un volume di 200 mL di medium di cui il 10% costituito da un inoculo proveniente dalle colture agitate con la medesima denominazione descritte precedentemente (paragrafo 3.2.4), mentre il restante da MSM B.

Tali colture sono state realizzate all'interno di beute Erlenmeyer provviste di frangiflutti (500 mL); per ogni coltura sono state realizzate 6 repliche.

3.2.6 Prove di bioaugmentation

Si è deciso di valutare se l'inoculo di una biomassa già acclimatata ad un ambiente contaminato da gasolio potesse portare ad una crescita più rapida rispetto ad una linea non inoculata e ad una più rapida degradazione degli idrocarburi contaminanti; per questa ragione sono state allestite le linee riassunte in tabella:

Tabella 10. Microcosmi di bioaugmentation e relativi controlli

Linea	Glucosio	Gasolio	Inoculo	Coltura di provenienza dell'inoculo
MSM B *	-	-	-	-
MSM B + D	-	SI	-	-
MSM B + G *	SI	-	-	-
MSM B + G + D	SI	SI	-	-
MSM B + M 0 *	-	-	SI	MSM B + gasolio
MSM B + M 0 + D	-	SI	SI	MSM B + gasolio
MSM B + M 0,5 *	-	-	SI	MSM B + 0,5% G + gasolio
MSM B + M 0,5 + D	-	SI	SI	MSM B + 0,5% G + gasolio
MSM B + G + M 0 *	SI	-	SI	MSM B + gasolio
MSM B + G + M 0 + D	SI	SI	SI	MSM B + gasolio
MSM B + G + M 0,5 *	SI	-	SI	MSM B + 0,5% G + gasolio
MSM B + G + M 0,5 + D	SI	SI	SI	MSM B + 0,5% G + gasolio

Le linee contrassegnate con * identificano le linee di controllo.

Per la contaminazione con gasolio si è agito come descritto in precedenza, mentre per quanto riguarda l'inoculo si è provveduto a recuperare la biomassa presente all'interno delle colture descritte al paragrafo precedente attraverso centrifugazione a 4100 rpm per 10 minuti. Prima di centrifugare, il medium delle colture analoghe è stato unito e posto in agitazione per uniformare la tipologia e il quantitativo di biomassa che sarebbe stata inserita, per poi suddividerlo sulla base del numero di microcosmi.

Il quantitativo inserito in ciascun microcosmo è pari a 300 mg di biomassa/kg di suolo.

La biomassa recuperata è stata successivamente sospesa in 37 mL di MSM B (privo o con aggiunta di glucosio a seconda della tipologia di linea) prima di essere riversata sul suolo.

3.2.6.1 Analisi microbiologica sul suolo dei microcosmi per la bioaugmentation

Si è deciso di valutare la concentrazione dei microrganismi degradanti il gasolio presenti all'interno del suolo di ogni linea contaminata descritta al paragrafo precedente e confrontarla con la concentrazione totale (microrganismi degradanti il gasolio e microrganismi non degradanti).

Per la prova sono state realizzate due tipologie di piastre: piastre Agar-Malto a pH 5, di composizione riportata in Tabella 3, per la valutazione della concentrazione totale di microrganismi e piastre con terreno salino MSM B e gasolio per quantificare la concentrazione di microrganismi degradanti il gasolio.

Per la preparazione delle piastre Agar-Malto si è operato come descritto al paragrafo 3.2.1 depositando in ogni piastra 50 mg di suolo; il campione di suolo è stato ottenuto smuovendo il terreno presente in ciascun microcosmo e prelevando da ognuno 2 g di terra, da questi sono stati prelevati i 50 mg necessari dopo aver nuovamente rimescolato.

Le piastre appena descritte sono state realizzate anche per i microcosmi non contaminati.

Per le piastre con il medium MSM B (composizione in Tabella 6 con aggiunta di 20 g/L di agar) si è operato ponendo il suolo su un lato della piastra e sospendendolo con alcune gocce di acqua sterile, 40 µL di gasolio sono stati invece sparsi sul lato opposto della piastra distribuendolo per mezzo di un'ansa sterile (piastre S). Successivamente 22 mL di medium agarizzato sono stati distribuiti sulla piastra.

Sono state inoltre realizzate piastre analoghe ma in cui il gasolio era stato versato all'interno del medium agarizzato anziché sulla piastra (piastre denominate I).

3.2.7 Determinazioni analitiche

3.2.7.1 Valutazione respirometrica

Periodicamente è stata effettuata la determinazione della CO₂ prodotta nei microcosmi descritti al paragrafo 3.2.2.1, 3.2.2.2, 3.2.2.3 e 3.2.6 titolando la soluzione di NaOH presente al loro interno. La titolazione è stata condotta impiegando una soluzione di HCl 1,5 N e utilizzando come agente di precipitazione BaCl₂ e come indicatore la fenolftaleina.

Dopo ogni determinazione, il suolo dei microcosmi, ad eccezione di quelli indicati al paragrafo 3.2.2.1, è stato smosso per ridurre il compattamento e favorire l'ossigenazione e la soluzione di NaOH è stata sostituita e reinserita all'interno dei microcosmi.

Per ricavare i mg di CO₂, noto il volume di soluzione di HCl necessario per la titolazione, è stata utilizzata la seguente formula:

$$\text{mg CO}_2 = (V_0 - V) * f$$

Dove:

V₀ = volume soluzione di HCl per titolare campione privo di CO₂ (pari a 25 ml);

V = volume soluzione di HCl per titolare la soluzione di NaOH inserita nel microcosmo;

f = fattore di conversione = 22*M, dove M è la molarità della soluzione titolante.

3.2.7.2 Determinazione dell'umidità dei microcosmi

Per la determinazione dell'umidità del suolo impiegato per le prove e per la valutazione del contenuto d'acqua presente nei microcosmi, sono stati prelevati e pesati uno o più campioni da ogni microcosmo. Per la prova i campioni sono stati mantenuti in stufa a 105°C fino al raggiungimento di un peso costante.

3.2.7.3 Valutazione del pH

Per la valutazione del pH del suolo nei microcosmi sono stati prelevati campioni di suolo e miscelati con acqua distillata all'interno di una beuta (rapporto 1 g suolo: 2,5 mL di acqua); il sistema è stato mantenuto in agitazione per mezz'ora per mezzo di un'ancoretta magnetica, dopodiché si è lasciato sedimentare il suolo sospeso prima di effettuare la misurazione del pH. Per quanto riguarda la misura del pH delle colture in medium liquido, essa è stata effettuata sul permeato recuperato con la filtrazione.

3.2.7.4 Valutazione del peso secco della biomassa

La biomassa cresciuta all'interno delle colture in medium liquido è stata recuperata prelevando, qualora presente, il micelio presente all'interfaccia gas/liquido.

Il liquido di ogni coltura è stato invece versato all'interno di provette Falcon che sono state centrifugate per 15 minuti a 4100 rpm. Il liquido è stato successivamente filtrato per recuperare la biomassa utilizzando filtri in microfibra di vetro da 1,2 µm.

I filtri impiegati e i miceli prelevati all'interfaccia gas/liquido sono stati inseriti in stufa a 105°C fino al raggiungimento di un peso costante e poi pesati per valutare il quantitativo di biomassa presente.

3.2.7.5 Misura dell'assorbanza per le colture in terreno liquido

Per la valutazione dell'OD del terreno delle colture è stato misurato il valore di assorbanza a 65 nm (lunghezza d'onda caratteristica per sospensioni batteriche) su un campione di terreno di circa 3 ml tramite spettrofotometro.

3.2.7.6 Determinazione della concentrazione di gasolio residuo

Il suolo dei microcosmi inquinati da gasolio è stato sottoposto ad analisi gascromatografica, da un laboratorio certificato, secondo la norma UNI EN ISO 16703:2011 (Qualità del suolo - Determinazione del contenuto di idrocarburi da C10 a C40 mediante gascromatografia) per valutare la concentrazione di gasolio residua a metà del periodo di osservazione e al termine della sperimentazione.

4. Risultati e discussione

4.1 Prove geofisiche

4.1.1 Distribuzione granulometrica del suolo

La setacciatura descritta nel paragrafo 3.1.1 ha permesso di definire le percentuali in massa delle 8 frazioni che sono state considerate e i risultati sono riportati di seguito:

Tabella 11. Distribuzione granulometrica del suolo

Taglia (mm)	Peso (g)	% in massa	% cumulativa
5	95,2	6,1 %	94,0 %
2	249,5	16,0 %	78,0 %
1,180	188,3	12,1 %	65,9 %
0,600	228,3	14,6 %	51,3 %
0,300	213,7	13,7 %	37,6 %
0,150	197,4	12,6 %	25,0 %
0,063	303,9	19,4 %	5,5 %
< 0,063	85,7	5,5 %	
	Totale (g)		
	1562,0		



Figura 8. Frazioni ottenute mediante setacciatura

Si riporta anche il grafico semilogaritmico che mostra la distribuzione cumulativa:

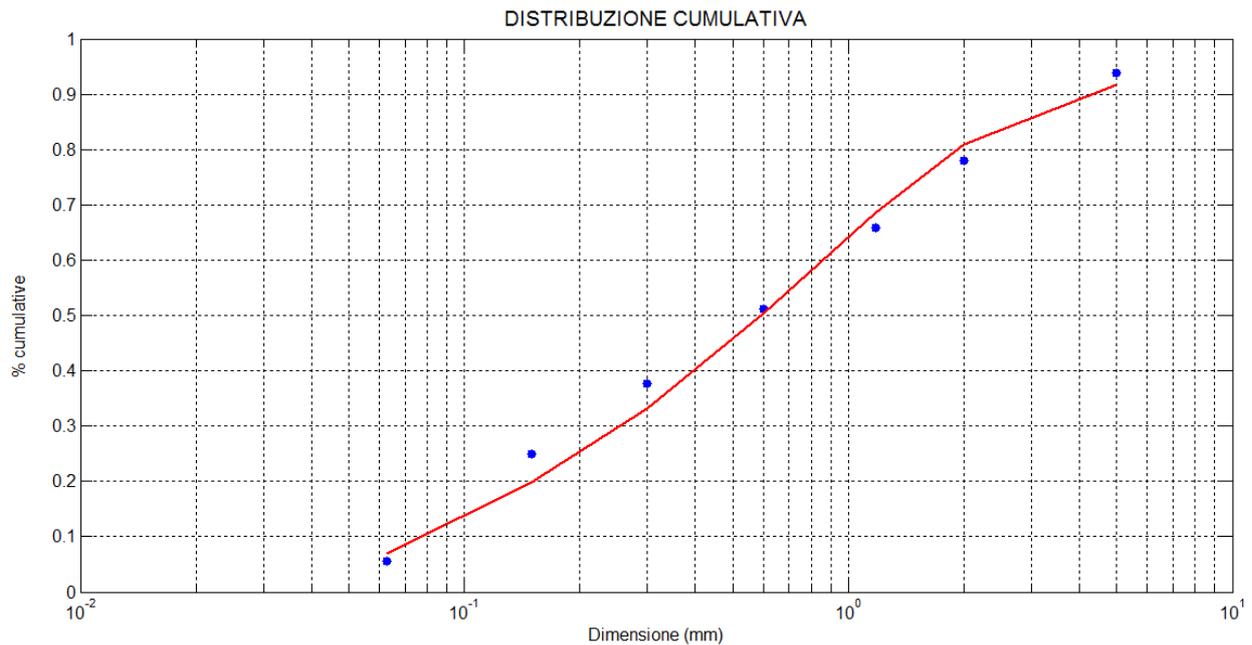


Figura 9. Distribuzione granulometrica cumulativa del suolo

In rosso è rappresentata la distribuzione normale cumulativa valutata da Matlab utilizzando la media μ e la deviazione standard σ calcolate con i dati riportati in tabella (y è definita dai valori delle percentuali cumulative presenti in tabella 11).

$p = \text{normcdf}(y, \mu, \sigma)$.

4.1.2 Determinazione del contenuto d'acqua

Utilizzando i dati registrati nel corso della prova di valutazione dell'umidità mediante il metodo WCR è stato possibile stimare un contenuto d'acqua volumetrico pari all' 1,27 %.

Il valore è piuttosto basso, ma è ragionevole vista la permanenza del suolo in un ambiente a bassa umidità e ad una temperatura prossima ai 20°C per diverso tempo.

4.1.3 Determinazione della densità reale

Si riportano le densità reali delle frazioni di suolo in analisi valutate con il metodo della piconometria e il valore mediato secondo le percentuali in massa:

Tabella 12. Densità reale del suolo

Taglia (mm)	% in massa	densità reale (kg/m ³)
< 0,063	8,79	2750
0,063	30,14	2630
0,150	19,74	2760
0,300	18,61	2720
0,600	22,73	2730
densità reale mediata (kg/m³)		2710

I valori di densità reale per il suolo variano tra 1200 e 3000 kg/m³ a seconda della tessitura, della natura delle particelle solide che lo costituiscono e del contenuto di sostanza organica presente. Un valore di circa 2700 kg/m³ indica normalmente un suolo con presenza di carbonato di calcio.

4.1.4 Valutazione della porosità

Attraverso la prova di valutazione del contenuto d'acqua era stato possibile effettuare una prima stima dell'intervallo di porosità ϕ del suolo attraverso la relazione CRIM (Complex Refractive Index Method) che lega porosità, contenuto idrico e permittività elettrica della matrice solida:

$$\epsilon_b^\alpha = \epsilon_m^\alpha * (1 - \phi) + \epsilon_w^\alpha * S_w * \phi + (1 - S_w) * \phi * \epsilon_a^\alpha$$

ϵ_b è la permittività elettrica relativa del bulk, ϵ_m quella del solido (varia tra 3 e 8), ϵ_w è permittività relativa dell'acqua (= 80), ϵ_a è la permittività relativa dell'aria (= 1), α è un esponente pari a 0,5 ed $S_w * \phi$ è il contenuto idrico. Trascurando il contenuto idrico in quanto molto basso è stata ricavata la relazione semplificata:

$$\epsilon_b^\alpha = \epsilon_m^\alpha * (1 - \phi) + \phi * \epsilon_a^\alpha$$

Che ha permesso di valutare ϕ facendo variare ϵ_m tra 3 e 8 (valori tipici da letteratura); la porosità risulta compresa nell'intervallo 0,27 e 0,70.

Il valore di porosità valutato attraverso la prova di infiltrazione e calcolato come descritto al paragrafo 3.1.3 risulta pari al 43% v/v.

Il valore reale tuttavia è inferiore a quello riportato in quanto il volume di acqua aggiunto comprende anche quello necessario per la saturazione del dreno che ha porosità superiore al resto del materiale; il valore finale comunque risulta compatibile con un terreno di tipo sabbioso (porosità tipica inferiore al 50%) e compreso nell'intervallo valutato con la prova WCR.

I risultati delle prove fin qui discusse (distribuzione granulometrica, valore di densità reale e valore di porosità) indicano inequivocabilmente che il suolo con cui si opera è di tipo sabbioso.

4.2 Prove di biodegradazione

4.2.1 Determinazioni sul suolo con dimensione inferiore a 2 mm: umidità e pH

Valutazione dell'umidità del suolo: il suolo con cui sono stati allestiti i microcosmi descritti nella sezione Materiali e metodi risultava avere un'umidità media pari allo 0,39 % in massa.

Valutazione del pH del suolo: il pH del suolo risulta pari a 6,8. Il valore mostra una leggera acidità del suolo, va però evidenziato che l'acqua distillata impiegata per la valutazione presenta valori di pH anomali per ragioni non note al laboratorio, tali valori possono aver influenzato il risultato mostrato in tabella.

4.2.2 Analisi microbiologica del suolo

Metodo delle capsule di suolo

La conta delle colonie è stata effettuata 4 giorni dopo la preparazione delle piastre descritte nel paragrafo 3.2.1 e i risultati sono riportati nella tabella seguente:

Tabella 13. Conta su terreno Agar Malto a pH 5

mg suolo	n° colonie	Di cui fungine	Concentrazione (UFC/g suolo)	media UFC
100	21	3 colonie	300	30
100	47	4 colonie		
100	22	3 colonie		
50	28	5 colonie	453	22,7
50	18	4 colonie		
50	22	non distinguibili*		

*Non è stato possibile distinguere la tipologia in quanto una delle colonie fungine si sovrapponeva alle altre colonie limitandone l'identificazione.

Tabella 14. Conta su terreno Agar Malto a pH 4

mg suolo	n° colonie	Di cui fungine	Concentrazione (UFC/g suolo)	media UFC
100	6	6 colonie	57	5,7
100	5	5 colonie		
100	6	6 colonie		
50	1	1 colonie	40	2
50	3	3 colonie		
50	2	2 colonie		

Le tabelle riportano il valore medio di UFC (Unità Formanti Colonia) per ogni tipologia di piastra.

I valori di UFC/g suolo individuati con il metodo delle capsule di suolo sono piuttosto bassi a causa della scarsa concentrazione di microrganismi aerobi presenti nel suolo utilizzato, a sua volta dovuta al basso contenuto organico del terreno che, come già affermato in precedenza, proviene da una profondità di circa 3 m sotto il livello campagna.



Figura 10. Piastre su cui sono visibili le colonie di microrganismi ottenute con il metodo delle capsule di suolo.

Metodo a diluizioni successive

Il metodo non ha portato alla crescita di colonie di microrganismi visibili, pur avendo atteso un tempo superiore alle due settimane. Ciò può essere dovuto alla ridotta concentrazione di microrganismi presenti nel suolo in esame, già osservata con il metodo precedente, ancora diminuita drasticamente dall'aver utilizzato delle diluizioni.

4.2.3 Prove di crescita in microcosmo con aggiunta di soluzione nutritiva

Nei sottoparagrafi successivi si riportano i risultati delle prove condotte sui microcosmi descritti al paragrafo 3.2.2.1 in cui è stata aggiunta una certa quantità di acqua distillata per valutare la capacità respirometrica del suolo in presenza dei soli nutrienti naturalmente presenti e il comportamento a seguito dell'aggiunta di composti nutritivi.

4.2.3.1 Analisi respirometriche

Di seguito si riportano i quantitativi di CO₂ prodotta dai microcosmi.

Si noti che il grafico è cumulativo: ogni punto rappresenta la quantità di anidride carbonica prodotta fino al giorno riportato in ascissa.

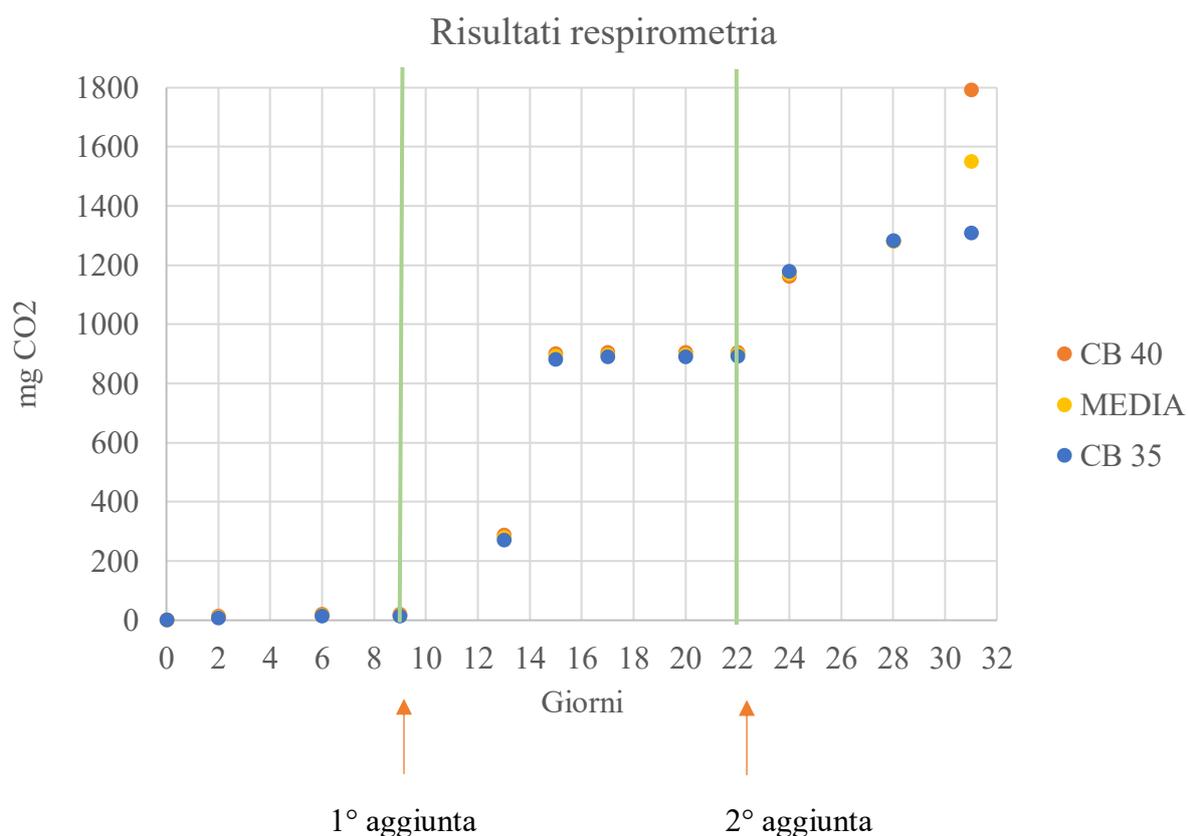


Figura 11. Valori cumulativi di CO₂ per microcosmi

CB 35: microcosmo 200 g suolo + 35 mL acqua

CB 40 microcosmo 200 g suolo + 40 mL acqua

Vengono riportati sul grafico anche i valori mediati, secondo media aritmetica, dei valori dei singoli microcosmi.

Le linee verticali in verde indicano i giorni in cui sono state effettuate le aggiunte di soluzione nutritiva del tipo Czapek.

Si osserva che in presenza di sola acqua i quantitativi di CO₂ prodotta sono piuttosto bassi, ciò è probabilmente da imputare al basso contenuto organico utilizzabile dai microrganismi che è presente nel suolo in quanto, come già specificato, proveniente da 3 m sotto il piano campagna.

A seguito della prima aggiunta di terreno nutritivo si osserva un aumento della respirazione in tutti i microcosmi, con quantità analoghe di CO₂ prodotta (valore medio pari a 277 mg).

I valori valutati il giorno 15 non sono ritenuti significativi, in quanto nel corso della prova si è osservato un viraggio anomalo della soluzione di soda.

A seguito della seconda aggiunta la respirazione torna a crescere dopo una fase di rallentamento significativo e i valori di CO₂ si mantengono analoghi tra i tre microcosmi ad eccezione dell'ultimo giorno in cui è stata effettuata la titolazione (20 mg prodotti tra il giorno 27 e il giorno 31 per CB 35 e 511 mg prodotti per CB 40 nello stesso intervallo di tempo).

4.2.3.2 Determinazione dell'umidità finale dei microcosmi

In tabella si riportano i valori di umidità iniziale e finale dei microcosmi. Si assume, per il calcolo dell'umidità iniziale, che l'umidità sia completamente dovuta all'aggiunta di acqua in quanto l'umidità naturale del suolo è trascurabile ($< 0,39\%$ w/w secondo quanto già indicato al paragrafo 4.2.1).

Tabella 15. Umidità iniziale e finale nei microcosmi

Microcosmo	Umidità iniziale (w/w)	Umidità finale (w/w)
CB 35	14,9 %	12,9 %
CB 40	17,0 %	15,4 %

Al termine dei 31 giorni durante i quali i microcosmi sono stati monitorati non si è evidenziata una riduzione significativa del contenuto d'acqua.

4.2.4 Prove di crescita con terreni salini differenti

Si riportano i risultati delle determinazioni condotte sui microcosmi descritti al punto 3.2.2.2, in cui sono stati sperimentati due medium salini adatti rispettivamente a microrganismi batterici e a microrganismi fungini in presenza o meno di una fonte aggiunta di carbonio.

Il quantitativo di medium aggiunto (37 mL) è stato scelto sulla base dei risultati dei due precedenti paragrafi; non essendoci differenze significative di respirazione tra CB 35 e CB 40 è stato scelto un valore intermedio.

4.2.4.1 Analisi della respirometria su linee con terreni salini differenti

Si riportano i risultati dell'analisi respirometrica sui 5 microcosmi. Il grafico è cumulativo.

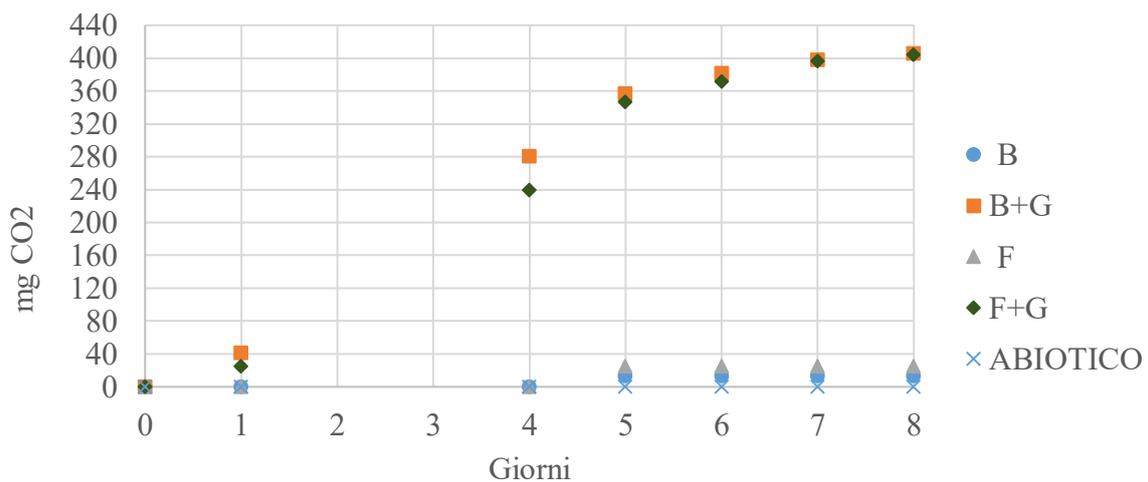


Figura 12. Valori cumulativi di CO₂ per microcosmi con linee differenziate

Si osserva che nei microcosmi in cui al medium salino non è stato aggiunto glucosio i quantitativi di CO₂ prodotta sono piuttosto bassi, in quanto viene a mancare la fonte principale e facilmente utilizzabile di carbonio.

Per i microcosmi che contenevano glucosio invece la respirazione è stata significativa e i valori finali di CO₂ prodotta sono analoghi (404 e 406 mg rispettivamente per F + G e B + G), sebbene inizialmente il microcosmo B + G mostrasse valori più alti di F + G (rispettivamente 281 mg di CO₂ e 239 mg totali al 4° giorno); ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che i batteri hanno una velocità di crescita maggiore rispetto ai microrganismi fungini e pertanto presentano un vantaggio iniziale che viene però poi compensato dalla maggior produzione di biomassa dei funghi in fase di crescita in grado di utilizzare il glucosio.

4.2.4.2 Misura del pH del suolo nei microcosmi dopo l'aggiunta del medium

Si riporta il pH del suolo contenuto nei microcosmi il giorno successivo all'aggiunta del MSM valutato con le modalità descritte nella sezione Materiali e metodi; il campione di suolo preso in esame è pari a 10 g per ogni microcosmo.

Tabella 16. pH del suolo dei microcosmi con terreno MSM B e MSM F

Linea	pH
B	7,4
B+G	6,3
F	7,1
F+G	6,2

Il pH del suolo contenuto nei microcosmi dopo l'aggiunta del medium liquido non si discosta molto dal valore originale presentato al paragrafo 4.2.1 in virtù del potere tampone del terreno e per la crescita ancora ridotta della biomassa al suo interno.

4.2.4.3 Valutazione dell'umidità finale dei microcosmi

I valori di umidità fanno riferimento all'8° giorno dalla data di allestimento dei microcosmi.

Tabella 17. Umidità finale microcosmi con terreno MSM B e MSM F

Linea	Umidità media (w/w)
B	14,8 %
B+G	41,9 %
F	40,9 %
F+G	37,4 %

I valori di umidità delle linee B + G, F ed F + G non sono ritenuti credibili considerato il quantitativo di soluzione acquosa aggiunta all'inizio della prova e la quasi assenza di umidità del terreno; un'umidità del 40% in massa implicherebbe aver aggiunto nel suolo più di 80 mL di acqua (contro i 37 mL di soluzione acquosa effettivamente aggiunti) ciò non è compatibile neanche con una possibile umidificazione causata dalla soda presente nel microcosmo e dal vapore d'acqua presente nell'aria e quello prodotto dalla respirazione dei microrganismi. Il valore di 80 mL inoltre porterebbe a saturazione il suolo utilizzato visto il basso valore di porosità ricavato attraverso la prova di infiltrazione.

È possibile che i campioni prelevati non fossero rappresentativi del microcosmo (grumi in cui la quantità d'acqua era superiore alla media).

Il valore di umidità finale del microcosmo B invece è coerente con la quantità di liquido utilizzata in fase di allestimento ed è analogo al valore ottenuto per i microcosmi preparati in precedenza (Tabella 15).

4.2.5 Microcosmi con linee contaminate da gasolio

Nel caso dei microcosmi descritti al paragrafo 3.2.2.3, in cui linee differenziate per funghi e batteri sono state contaminate con gasolio per valutare la capacità di crescita delle biomasse in presenza di contaminante, sono state condotte analisi respirometriche, valutazione del pH del suolo e una stima dell'umidità finale.

4.2.5.1 Analisi respirometrica sulle linee contaminate da gasolio

Di seguito si riporta il grafico dei quantitativi di CO₂ prodotti complessivamente all'interno dei microcosmi contaminati da gasolio e le rispettive linee di controllo; si noti che la curva corrispondente a MSM B + 3% G si interrompe al giorno 4 per un problema legato alla contaminazione del suolo del microcosmo da parte della soluzione di soda.

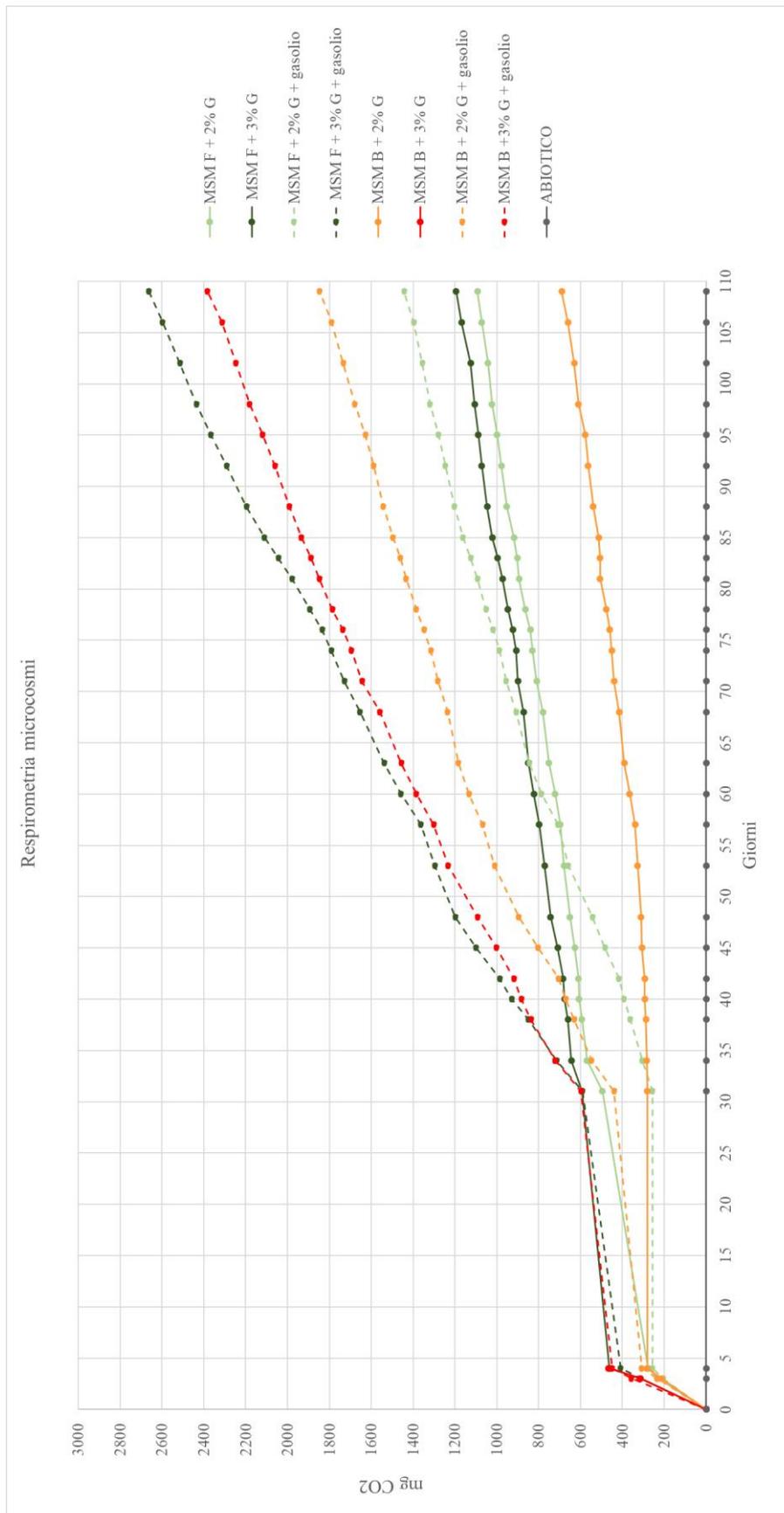


Figura 13. Valori cumulativi di CO₂ per microcosmi con linee contaminate da gasolio e rispettivi controlli.

Osservando le curve respirometriche si nota che ogni linea contaminata con gasolio (linee tratteggiate) ha prodotto una maggior quantità di CO₂ rispetto alla corrispondente linea priva di gasolio.

Il terreno più adatto a microrganismi batterici in presenza di gasolio mostra una maggiore quantità di CO₂ prodotta rispetto alle linee corrispondenti ma con terreno adatto ai funghi solo nel caso di MSM B + 2% G + gasolio (1790 mg di CO₂ contro i 1398 mg prodotti da MSM F + 2% G + gasolio); il valore relativo a MSM B + 3% G + gasolio è invece prossimo alla linea corrispondente ma inferiore (rispettivamente 2313 mg e 2597 mg).

Osservando i dati respirometrici (a partire dal 31° giorno) si è pensato che potessero essere approssimati con una retta, la cui pendenza rappresenta una velocità media di produzione della CO₂. Nel grafico sono riportati i dati suddivisi sulla base della concentrazione di glucosio.

I valori temporali sono scalati considerando il 31° giorno come il giorno 0; si è imposto il valore dell'intercetta facendola coincidere con il valore caratteristico del giorno 31.

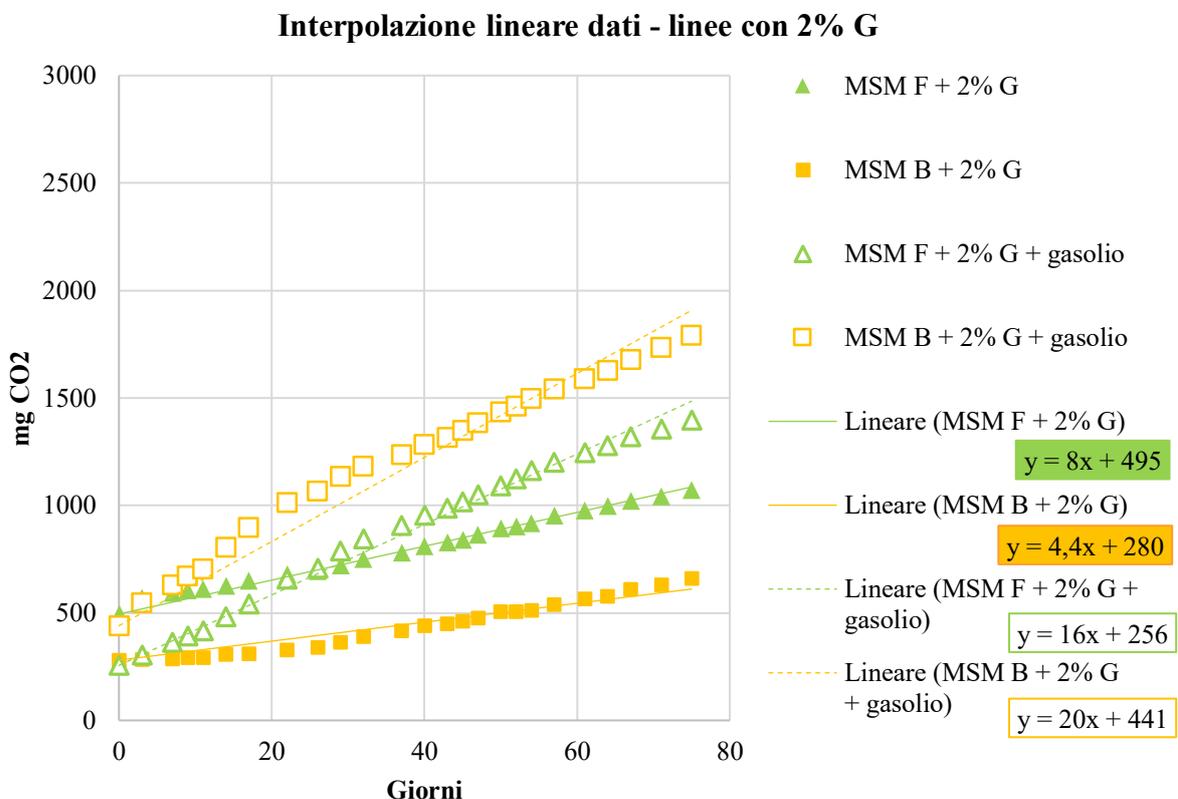


Figura 14. Interpolazione lineare dei dati su linee con il 2% di glucosio.

In presenza di gasolio la pendenza della retta interpolatrice è maggiore rispetto a quella delle rette che interpolano i dati respirometrici delle linee non contaminate; tale pendenza è confrontabile tra le linee MSM B e MSM F: 20 e 16 rispettivamente.

Tra le pendenze delle linee non contaminate invece c'è una maggiore differenza percentuale: 4,4 per MSM B + 2% G e 8 per MSM F + 2% G.

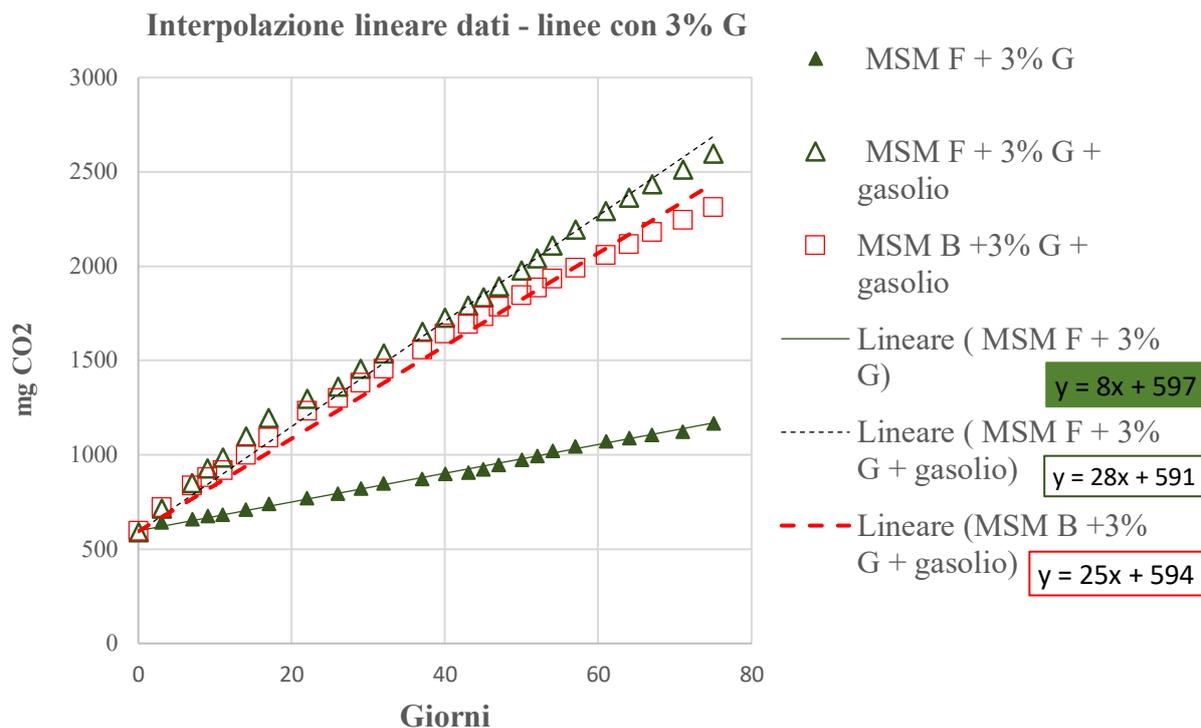


Figura 15. Interpolazione lineare dei dati su linee con il 3% di glucosio.

Anche con la concentrazione di glucosio più alta si osserva il comportamento descritto in precedenza, con valori di pendenza leggermente superiori per quanto riguarda i microcosmi contaminati; il valore di MSM F + 3% G (8) invece è analogo a quello di MSM F + 2% G.

4.2.5.2 pH del suolo delle linee contaminate

In tabella sono riportati i valori di pH del suolo dei microcosmi contaminati da gasolio e le rispettive linee di controllo valutati come descritto al punto 3.2.7.3.

Tabella 18. pH del suolo dei microcosmi contaminati con gasolio e dei rispettivi controlli

Microcosmo	pH (a metà del periodo di osservazione)	pH (finale)
MSM F + 2% G	7,8	8,2
MSM F + 3% G	8	8,3
MSM B + 2% G	7,5	7,6
MSM F + 2% G + gasolio	7,1	7,9
MSM F + 3% G + gasolio	7,0	7,6
MSM B + 2% G + gasolio	7,3	8,1
MSM B + 3% G + gasolio	7,2	7,9

Non si osservano differenze rilevanti tra i microcosmi, sebbene MSM B avesse un valore di pH significativamente più alto di MSM F, ciò è da imputare al potere tampone del suolo.

Per tutti i microcosmi si rileva al termine del periodo di osservazione un leggero aumento del pH rispetto a quello misurato in precedenza; le differenze comunque si mantengono minime.

4.2.6 Colture in fase liquida

L'allestimento di tali linee aveva come obiettivi quelli di fornire un'indicazione su quale tipologia di microrganismi (batteri o funghi) sia la più adatta a crescere in un ambiente contaminato con gasolio e l'influenza della concentrazione iniziale di glucosio sulla quantità di biomassa prodotta. Le concentrazioni di glucosio utilizzate sono uguali a quelle impiegate nei microcosmi in suolo del paragrafo precedente in maniera da poter confrontare i risultati delle due tipologie di prove e comprendere quale terreno salino sia più adatto per le prove di biodegradazione.

Le linee prive di glucosio invece sono state realizzate per valutare la capacità di crescita in assenza di una fonte di carbonio di facile utilizzo.

Di seguito si riporta l'aspetto dei terreni il giorno in cui la biomassa è stata prelevata:

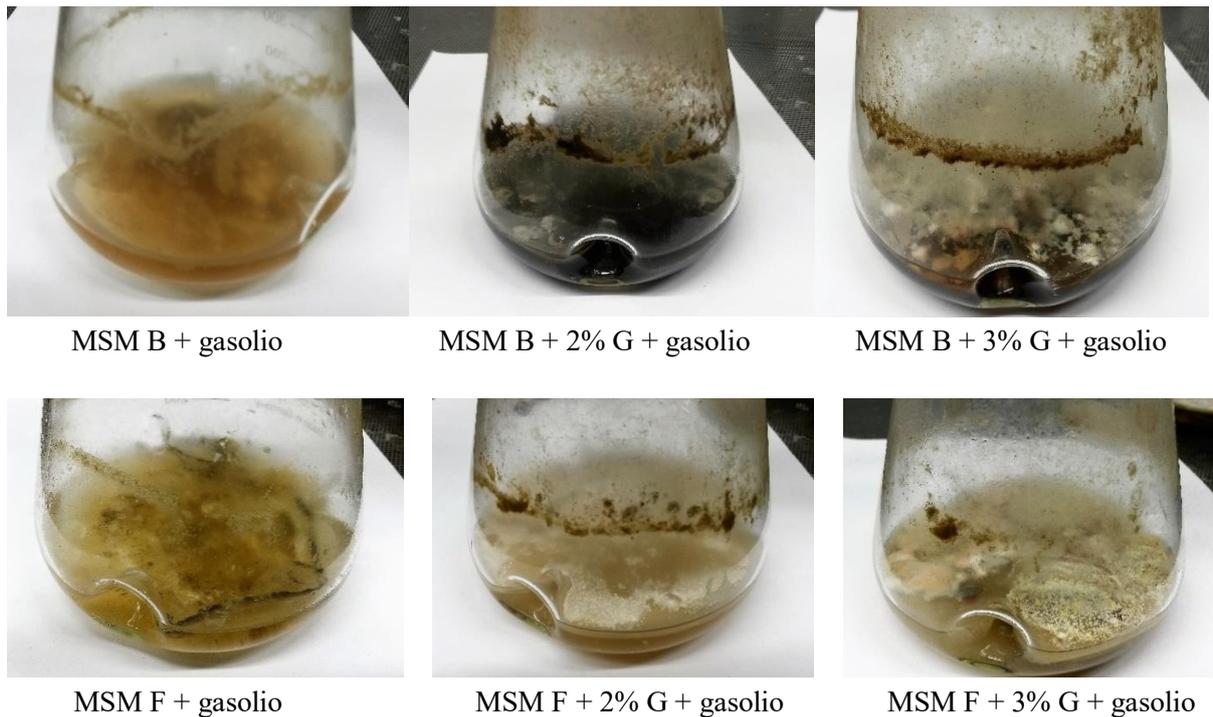


Figura 16. Aspetto dei terreni al 38° giorno



Figura 17. Esempio di micelio presente all'interfaccia gas/liquido

In tabella si riportano le concentrazioni di biomassa recuperata da ogni coltura, dopo 38 giorni dall'allestimento, e il valore del pH valutato sul permeato della filtrazione.

Tabella 19. Concentrazioni di biomassa in coltura liquida e pH

Terreno	g biomassa/L (media)	pH (medio)
MSM F + 2% G + gasolio	2,832 ± 0,263	3,0 ± 0,1
MSM F + 3% G + gasolio	2,804 ± 0,179	3,0 ± 0,1
MSM B + 2% G + gasolio	3,527 ± 1,903	6,0 ± 2,2
MSM B + 3% G + gasolio	4,954 ± 1,771	3,5 ± 0,9
MSM F + gasolio	1,327 ± 0,098	4,5 ± 0,1
MSM B + gasolio	1,510 ± 0,951	6,8 ± 0,4

Come si può osservare la massima produzione di biomassa è stata ottenuta per il terreno MSM B + 3% G + gasolio (4,954 g biomassa/L), mentre quella inferiore per MSM B + gasolio (0,837 g biomassa/L). Il valore riscontrato per quest'ultimo può non essere significativo in quanto una delle repliche mostrava un quantitativo di biomassa molto inferiore all'altra, ciò può essere dipeso da una procedura di recupero non corretta.

Se si confrontano le concentrazioni di biomassa si vede che nel caso del MSM F il quantitativo di glucosio non sembra influenzare la crescita dei microrganismi in quanto i valori ottenuti sono praticamente gli stessi tra MSM F + 2% G e MSM F + 3% G (rispettivamente 2,832 e 2,804 g biomassa/L). Nel caso in cui il glucosio non era presente invece si è ottenuto, come atteso, un valore inferiore (1,327 g biomassa/L per MSM F) in virtù della minore quantità di carbonio a disposizione e della presenza di una fonte più complessa da degradare.

I valori nel caso di MSM B invece si discostano a seconda della concentrazione di glucosio inizialmente presente.

Per quanto riguarda le colture in cui il glucosio non è stato aggiunto non si osservano differenze significative tra MSM F e MSM B (rispettivamente 1,327 e 1,510 g biomassa/L).

Osservando i valori di pH si possono elaborare le medesime considerazione già riportate per il quantitativo di biomassa: i valori sono analoghi per le colture di tipo MSM F (4,5, 3,0 e 3,0 rispettivamente per MSM F, MSM F + 2% G e MSM F + 3% G) e si discostano maggiormente tra i terreni MSM B (6,8, 6,0 e 3,5 rispettivamente per MSM B, MSM B+ 2% G e MSM B + 3% G).

Per MSM F il pH è diminuito rispetto al valore iniziale di 5,5 in tutte le colture, probabilmente a causa della presenza dell'ammonio come fonte di azoto: esso viene infatti scambiato con un protone e di conseguenza la concentrazione di H⁺ è aumentata abbassando il valore di pH. Per i terreni del tipo MSM B invece le variazioni sono più difficili da analizzare in quanto la presenza di ammonio e nitrato ha effetti contrastanti sul pH.

Complessivamente sembra che il terreno MSM B produca risultati migliori in termini di quantità di biomassa prodotta. Questi dati, uniti ai risultati delle respirometrie condotte sui microcosmi in suolo, hanno portato alla scelta di questo tipo di terreno per la realizzazione delle prove successive.

I risultati ottenuti dalle colture e dalle prove di tipo respirometrico concordano con le informazioni presenti in letteratura; secondo le fonti infatti i microrganismi batterici sarebbero i più adatti a svilupparsi in un ambiente contaminato da gasolio (Maddela et al., 2016).

4.2.7 Colture in liquido con terreno adatto a microrganismi batterici

Le colture allestite con lo scopo di valutare un'eventuale effetto inibente del gasolio sui microrganismi presentavano dopo una settimana l'aspetto di seguito riportato:

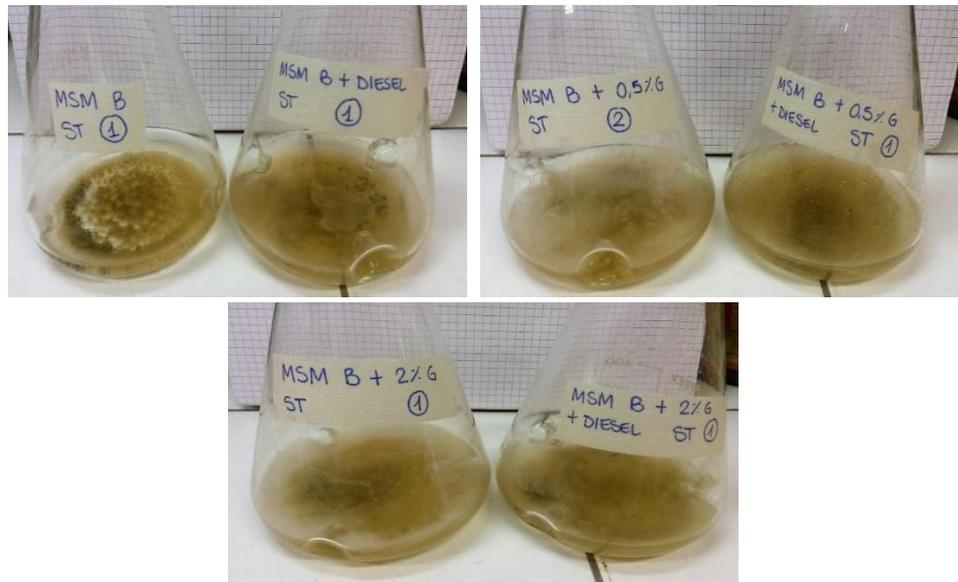


Figura 18. Confronto tra ogni linea statica e il proprio controllo

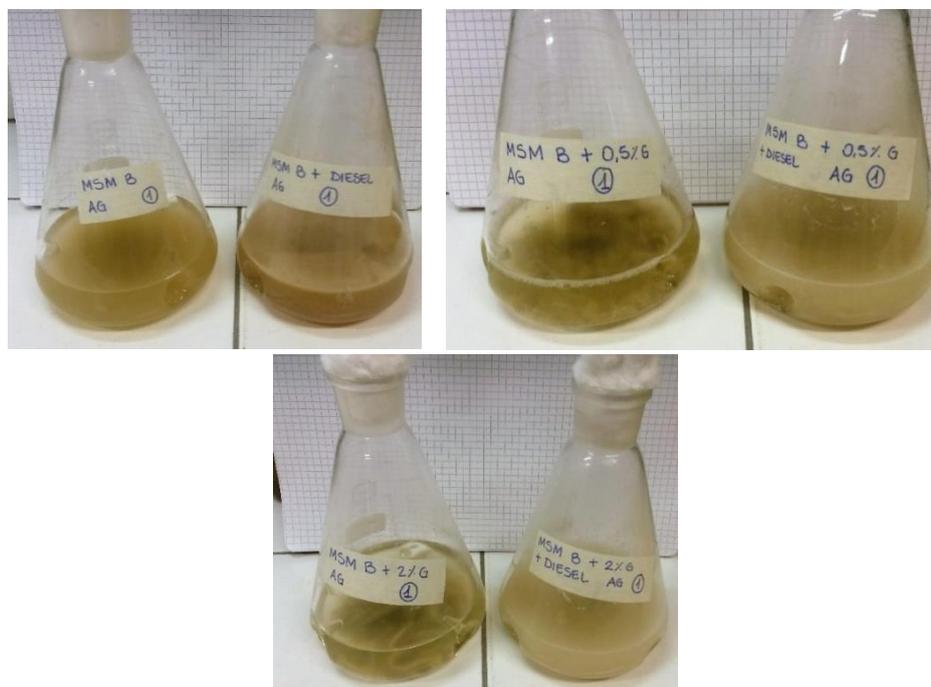


Figura 19. Confronto tra ogni linea agitata contaminata e il proprio controllo

Dopo la prima settimana nelle colture statiche non si osserva differenza nella tipologia di biomassa cresciuta in presenza o assenza di gasolio, mentre nelle colture agitate prive di gasolio, come si può vedere chiaramente in figura 19, sembra essere cresciuta una maggiore quantità di funghi rispetto alle colture con gasolio.

Nelle colture prive di glucosio invece non si nota la presenza di funghi né in quelle contenenti gasolio né in quelle senza.

Sia per le colture statiche sia per le colture agitate non si osserva una differenza rilevante nel quantitativo di biomassa cresciuta tra il terreno contenente lo 0,5 % di glucosio e quello con il 2%.

Per la descrizione più dettagliata dell'aspetto delle colture si rimanda all'Appendice.

Al termine delle 2 settimane si è provveduto al recupero della biomassa formata all'interno delle colture agitate.

In tabella vengono riportati i quantitativi di biomassa prodotta per litro di soluzione e il valore del pH del terreno.

Tabella 20. Concentrazioni di biomassa in coltura liquida agitata e pH

Terreno	g biomassa /L (media)	pH (media)
MSM B	1,581 ± 0,445	6,8 ± 0,1
MSM B + 0,5% G	3,574 ± 0,107	7,8 ± 0,5
MSM B + 2% G	5,650 ± 0,170	6,0 ± 2,0
MSM B + gasolio	3,103 ± 0,119	6.2 ± 0,1
MSM B + 0,5% G + gasolio	3,804 ± 0,368	6.3 ± 0,1
MSM B + 2% G + gasolio	6,440 ± 1,550	3,4 ± 0,1

I quantitativi di biomassa ottenuti per litro di soluzione mostrano che, a parità di concentrazione di glucosio, nelle colture in cui era presente anche il gasolio la crescita dei microrganismi è stata superiore (3,103 g biomassa/L per MSM B + gasolio rispetto a 1,581 ottenuti per MSM B, 3,804 e 3,574 rispettivamente per MSM B + 0,5% G + gasolio e MSM B + 0,5% G, 6,440 e 5,650 per MSM B + 2% G + gasolio e MSM B + 2% G); ciò è un'ulteriore prova a favore della capacità dei microrganismi indigeni del suolo di degradare il contaminante. Se si confrontano i risultati ponendo l'attenzione sul quantitativo di glucosio inizialmente presente si vede che la biomassa recuperata è maggiore in presenza di un quantitativo di glucosio più alto.

Per quanto riguarda il pH è più difficile confrontare i valori in quanto nel terreno sono presenti colture miste che seguono vie metaboliche differenti, anche in virtù della presenza o meno di gasolio, e quindi impiegano i nutrienti in maniera differente con produzione di metaboliti non noti.

Ad un mese di distanza dal giorno di allestimento la biomassa cresciuta all'interno delle colture statiche è stata recuperata mediante filtrazione; la tempistica è stata scelta in maniera tale che i giorni trascorsi dall'allestimento al recupero fossero analoghi a quelli delle colture liquide realizzate con MSM F e MSM B descritte al paragrafo 3.2.3.

Di seguito si riportano le immagini dei terreni così come apparivano il giorno del recupero della biomassa:

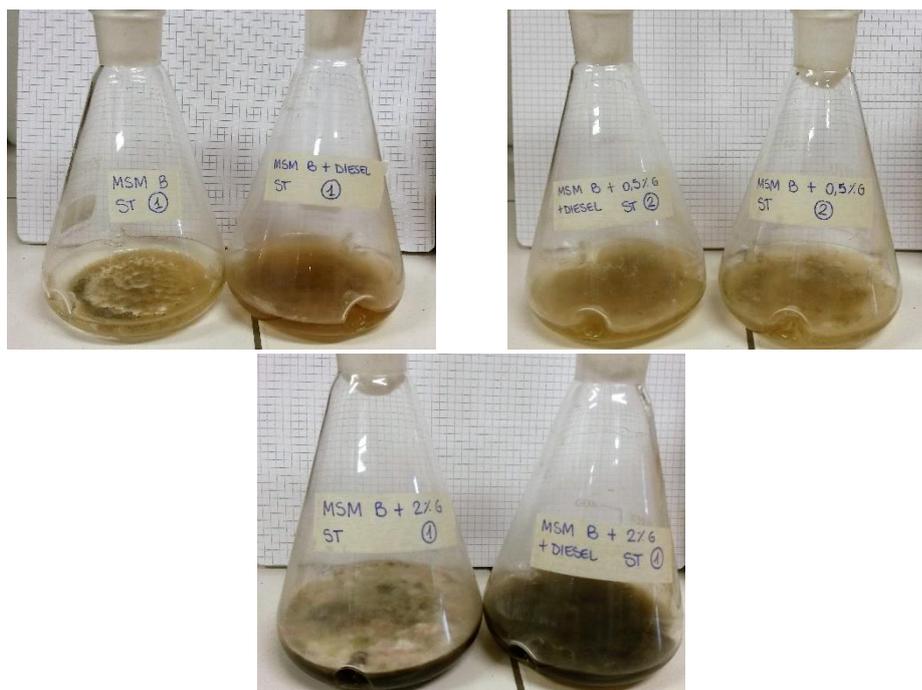


Figura 20. Confronto tra ogni linea statica contaminata e il proprio controllo

Le concentrazioni di biomassa recuperata e il valore del pH dei terreni sono presentati in tabella:

Tabella 21. Concentrazioni di biomassa in coltura liquida statica e pH

Terreno	g biomassa /L (media)	pH (media)
MSM B	$2,015 \pm 0,273$	$5,4 \pm 0,2$
MSM B + 0,5% G	$2,888 \pm 0,303$	$9,0 \pm 0,1$
MSM B + 2% G	$5,858 \pm 0,173$	$4,6 \pm 0,1$
MSM B + gasolio	$1,709 \pm 0,119$	$6,8 \pm 0,1$
MSM B + 0,5% G + gasolio	$3,994 \pm 0,655$	$8,5 \pm 0,1$
MSM B + 2% G + gasolio	$5,371 \pm 1,033$	$5,2 \pm 2,3$

I quantitativi ottenuti mostrano una crescita analoga, a parità di glucosio inizialmente presente, tra le colture contaminate e quelle in cui il gasolio non era presente, ciò era già stato osservato all'interno delle colture agitate; tuttavia mentre per le colture agitate la biomassa cresciuta in presenza di gasolio era sempre superiore a quella recuperata nei terreni di controllo, nel caso delle colture statiche ciò è vero solo per il terreno MSM B + 0,5% G + gasolio (3,994 g biomassa/L contro i 2,888 ottenuti per MSM B + 0,5% G). Il diverso comportamento può essere dovuto all'aver mantenuto i terreni in condizioni di assenza di agitazione: nelle colture agitate la superficie di interfaccia tra la soluzione acquosa e il gasolio era maggiore rispetto a quella creata all'interno delle colture statiche e questo può aver ridotto la disponibilità del contaminante per i microrganismi; infatti se si confrontano i quantitativi cresciuti all'interno delle colture statiche con quelle agitate si può vedere come la quantità di biomassa nei terreni

contaminati siano generalmente inferiori nella colture mantenute in condizioni statiche. L'agitazione inoltre può aver favorito l'ossigenazione del terreno.

Per quanto riguarda i valori di pH non è possibile evidenziare un andamento; tuttavia se si confrontano i valori delle colture statiche con quelle agitate si osserva che in linea di massima i valori variano in maniera uguale: per i terreni del tipo MSM B + 0,5% G il valore di pH misurato è sempre il maggiore rispetto alle altre colture non contaminate (circa 9 per le colture statiche e 6,3 per le agitate) e lo stesso si verifica per MSM B + 0,5% G + gasolio rispetto alle linee contaminate (8,5 per le statiche e 7,8 per le agitate); il valore di pH più basso invece è sempre riscontrato nei terreni MSM B + 2% G, (4,6 per le statiche e 6 per le agitate), per le colture non contaminate, e tra le colture contaminate MSM B + 2% G + gasolio (5,2 per le statiche e 3,4 per le agitate). La differenza in termini di valori numerici può dipendere dal diverso periodo di tempo di mantenimento.

Infine confrontando le quantità di biomassa e i pH di MSM B + gasolio e di MSM B + 2% G + gasolio con i valori ottenuti per le medesime colture del paragrafo 3.2.3 (risultati presentati al paragrafo 4.2.6) si vede come per quest'ultime i quantitativi di biomassa cresciuta fossero più bassi (0,84 g/L per MSM B + gasolio contro 1,70 g/L delle nuove colture e 3,5 g/L per MSM B + 2% G + gasolio contro gli attuali 5,37 g/L). Per quanto riguarda i valori di pH invece i valori sono pressoché identici per MSM B + gasolio e un po' più distanti per MSM B + 2% G + gasolio (5,2 per le colture descritte in questo paragrafo e 6,0 per le colture del punto 3.2.3).

4.2.8 Colture in liquido per la bioaugmentation

Nel grafico si indicano i valori di assorbanza per le colture di bioaugmentation descritte al paragrafo 3.2.5; tali colture hanno come scopo quello di produrre una quantità di biomassa già adattata alla presenza del contaminante in maniera da poter inoculare dei microcosmi in suolo con tali microrganismi più selezionati verso la degradazione del gasolio.

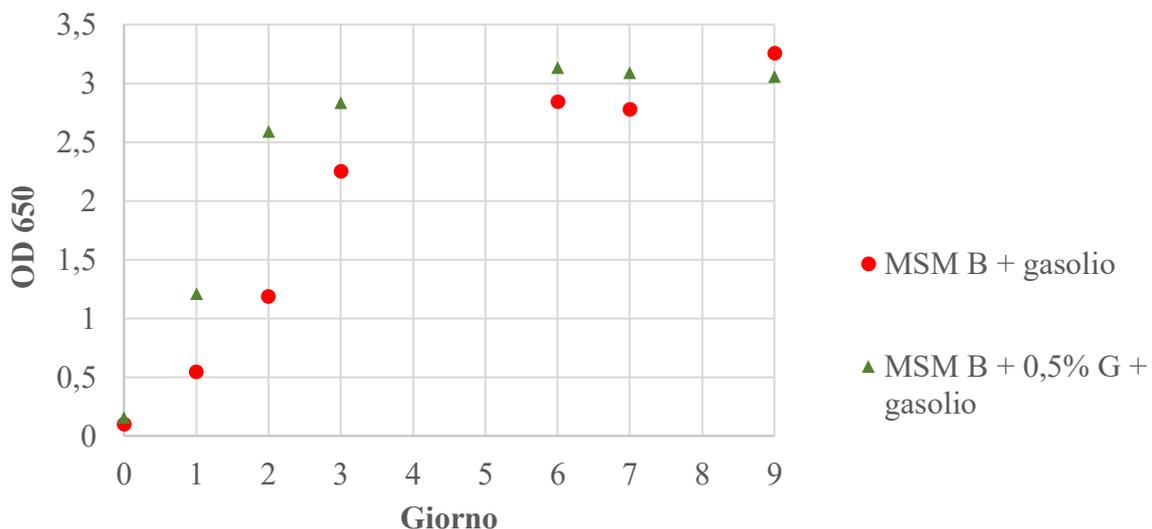


Figura 21. Valori di assorbanza per le colture liquide di bioaugmentation.

I valori di OD₆₅₀ mostrano come tra il 1° e il 2° giorno i microrganismi all'interno della coltura MSM B + 0,5% G + gasolio si trovassero nella fase di crescita esponenziale; tale fase è stata invece più lenta per la coltura MSM B + gasolio, probabilmente a causa del maggior tempo necessario a degradare il contaminante rispetto al glucosio. Successivamente alla fase

esponenziale i valori misurati si mantengono all'incirca costanti raggiungendo una fase stazionaria (giorni 6-9).

Una parte del terreno è stato filtrato su filtri da 0,7 μm che sono stati successivamente messi in stufa per la valutazione della concentrazione di biomassa prodotta all'interno delle colture. I risultati sono riassunti in tabella:

Tabella 22. Concentrazioni di biomassa in coltura liquida per la bioaugmentation

Terreno	g biomassa/L terreno
MSM B + gasolio	0,47
MSM B + 0,5% G + gasolio	0,92

Le concentrazioni ottenute sono inferiori rispetto a quelli ottenuti dalle colture in liquido descritte al punto precedente (tabella 21) pur avendo utilizzato le medesime concentrazioni di glucosio e gasolio.

4.2.9 Prove di bioaugmentation

Nei microcosmi per bioaugmentation si intende verificare se l'inoculo di una biomassa selezionata e già acclimatata ad un ambiente contaminato da gasolio è efficace nell'aumentare la velocità di crescita e di degradazione degli idrocarburi in esso contenuto; inoltre l'effetto è confrontato con quello della biostimulation e delle relative linee di controllo.

Sono state svolte analisi di tipo respirometrico per valutare la crescita microbica.

Il quantitativo di glucosio presente nel terreno utilizzato in alcuni dei microcosmi è pari allo 0,5%. La quantità è stata scelta sulla base del confronto tra i quantitativi di biomassa prodotti nelle colture liquide descritte al punto 3.2.5; si è deciso di utilizzare la concentrazione minore di glucosio non avendo riscontrato una differenza in termini di biomassa recuperata tra le colture contenenti il 2% di glucosio e quelle con lo 0,5% tale da giustificare l'uso di un quantitativo maggiore di glucosio; inoltre l'utilizzo di un minor quantitativo consentirebbe di ridurre i costi qualora le prove venissero realizzate su scala maggiore.

4.2.9.1 Analisi respirometrica

Nell'istogramma si riportano i valori cumulativi di mg CO₂ prodotti dai microcosmi su cui è stata eseguita la bioaugmentation e dalle linee di controllo.

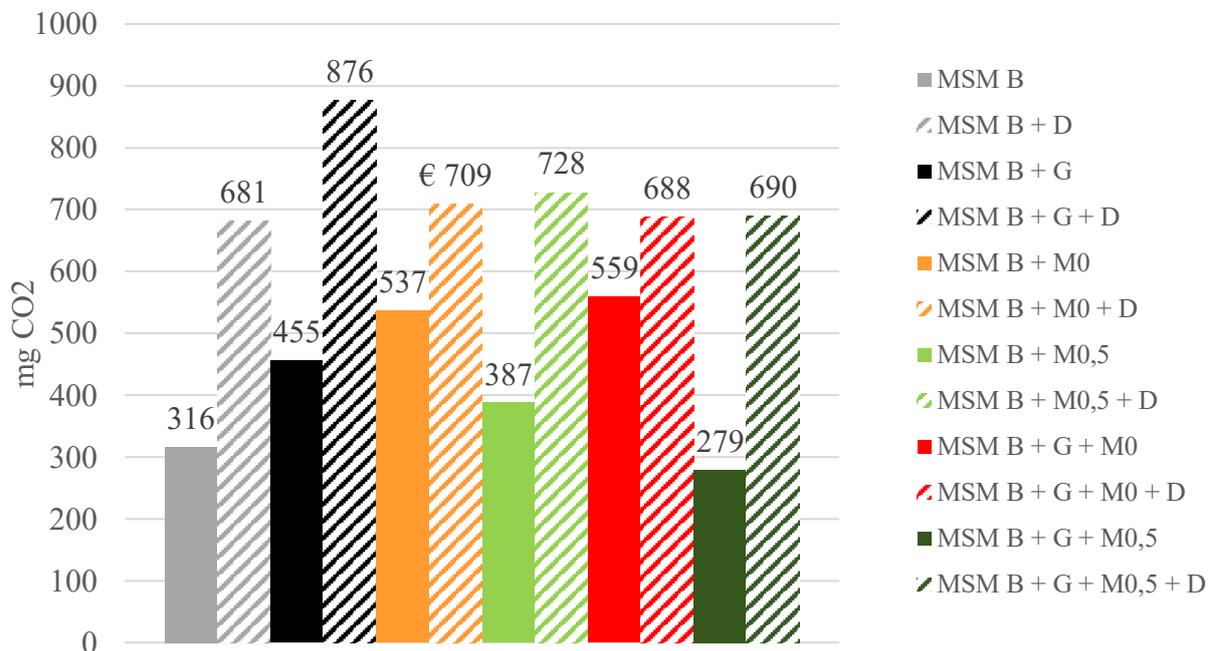


Figura 22. Valori cumulativi finali di CO₂ per i microcosmi con bioaugmentation e relative linee di controllo

Le linee contaminate da gasolio hanno prodotto una maggior quantità di CO₂ rispetto alle corrispondenti linee di controllo; nel caso delle linee con M0 (microrganismi provenienti da coltura liquida con gasolio senza glucosio) la differenza non è elevata quanto invece lo è per M0,5 (microrganismi provenienti da coltura liquida con gasolio e 0,5% di glucosio) e per la linea con terreno esclusivamente salino. La quantità di CO₂ prodotta in presenza di gasolio risulta essere circa doppia rispetto alle linee non contaminate nel caso di M0,5 e del terreno salino.

Non si osservano differenze significative in termini respirometrici tra linee contaminate da gasolio e in assenza di glucosio (681 mg di CO₂ per MSM B + D, 709 mg per MSM B + M0 + D, 728 mg per MSM B + M0,5 + D); per le linee contaminate e con lo 0,5% di glucosio (MSM B + G + D, MSM B + G + M0 + D, MSM B + G + M0,5 + D) si nota invece una differenza più significativa tra le linee di bioaugmentation e quella di biostimulation (876 mg di CO₂ prodotti da MSM B + G + D e 688 e 690 mg rispettivamente per MSM B + G + M0 + D e MSM B + G + M0,5 + D).

Per quanto riguarda le linee non contaminate la maggior produzione di CO₂ si ha per le linee arricchite da M0 sia nei microcosmi con glucosio sia in quelli senza (rispettivamente 559 e 537 mg di CO₂ prodotti).

Si è scelto di interpolare i dati respirometrici con una retta così come mostrato al paragrafo 4.2.10.1 (Figura 14 e Figura 15). La pendenza della retta rappresenta una velocità media di produzione di CO₂. Nel grafico sono riportati i dati suddivisi in base alla tipologia di inoculo.

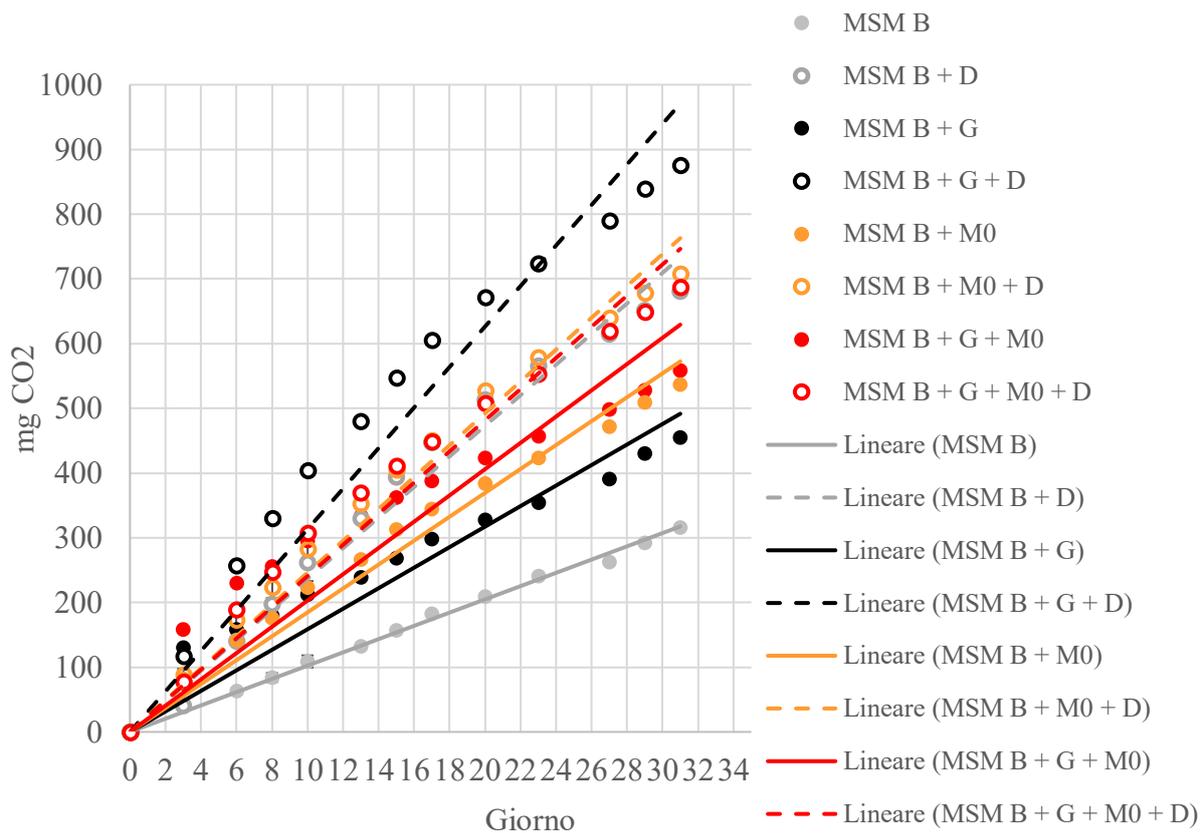


Figura 23. Velocità di produzione della CO₂ nei microcosmi con M0 e linee di controllo.

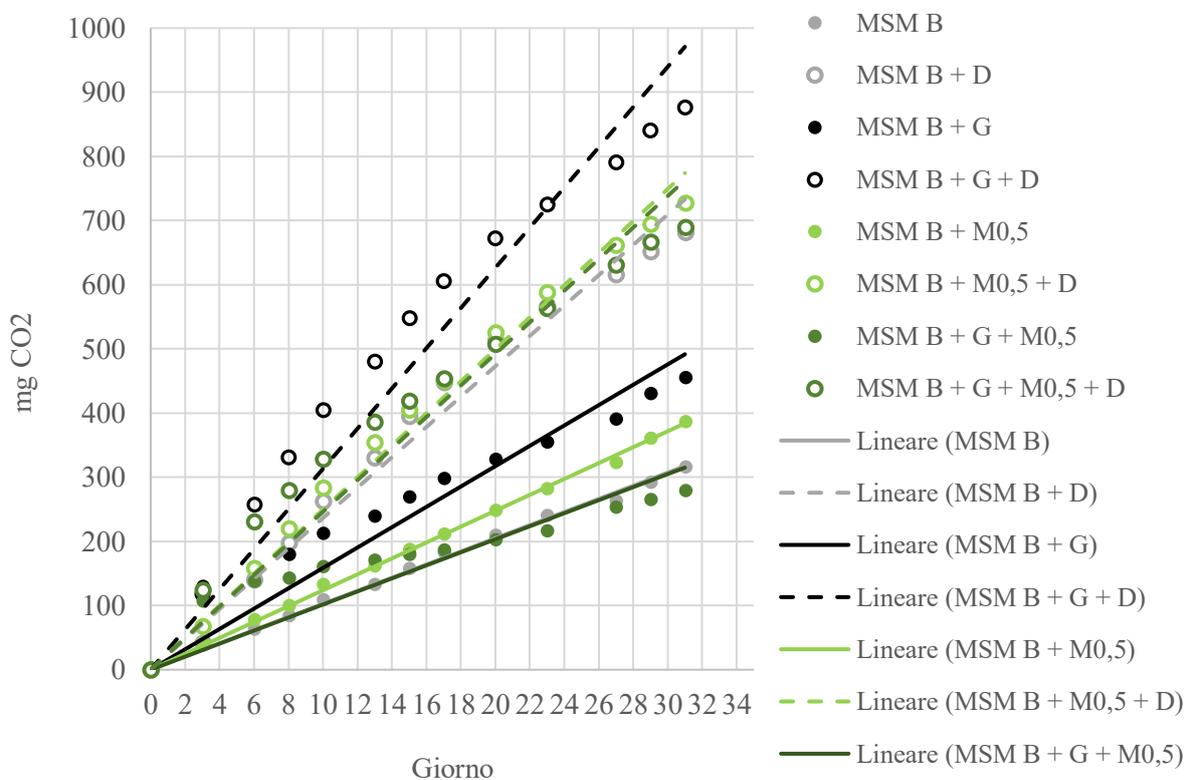


Figura 24. Velocità di produzione della CO₂ nei microcosmi con M0,5 e linee di controllo.

Tabella 23. Pendenza rette interpolanti

Retta interpolante	Pendenza
Lineare (MSM B)	10
Lineare (MSM B + D)	24
Lineare (MSM B+ G)	16
Lineare (MSM B + G + D)	31
Lineare (MSM B + M0)	18
Lineare (MSM B + M0 + D)	25
Lineare (MSM B + M0,5)	12
Lineare (MSM B + M0,5 + D)	25
Lineare (MSM B + G + M0)	20
Lineare (MSM B + G + M0 + D)	24
Lineare (MSM B + G + M0,5)	10
Lineare (MSM B + G + M0,5 + D)	25

La pendenza delle rette interpolanti i dati respirometrici delle linee contaminate è sempre maggiore di quella delle corrispondenti linee non contaminate e tale pendenza è pressoché la stessa (e pari a 24-25) per tutte le linee, ad eccezione di Lineare (MSM B + G + D) a cui corrisponde una pendenza di 31.

Non si osserva pertanto una differenza di comportamento tra le linee di biostimulation e quelle di bioaugmentation e neanche tra i due tipi di inoculo.

Un valore anomalo di pendenza è quello della prova MSM B + G + M0,5 che è uguale, e pari a 10, a quello della prova corrispondente con il solo terreno salino (MSM B), nonostante l'aggiunta di glucosio nel terreno e dell'aggiunta di biomassa.

4.2.9.2 Analisi microbiologica sul suolo dei microcosmi per la bioaugmentation

Di seguito si riportano i risultati delle conte realizzate sulle piastre (descritte al paragrafo 3.2.6.1) finalizzate alla valutazione della concentrazione dei microrganismi degradanti il gasolio e dei microrganismi complessivi presenti nei microcosmi in suolo per la bioaugmentation.

Tabella 24. Conta su piastre Agar-Malto.

Microcosmo	Replica	n° colonie	di cui fungine	media UFC	Concentrazione (UCF/g)
MSM B	1	316	1	287	$5,7 \cdot 10^3$
	2	258	0		
MSM B + D	1	74	1	53	$1,1 \cdot 10^3$
	2	32	0		
MSM B + G	1	n.c.*	//	//	//
	2	n.c.			
MSM B + G + D	1	666	0	725	$1,5 \cdot 10^4$
	2	784	0		
MSM B + M0	1	63	4	87	$1,7 \cdot 10^3$
	2	110	2		
MSM B + M0 + D	1	57	1	44	$8,8 \cdot 10^2$
	2	31	3		
MSM B + M0,5	1	30	23	23	$1,8 \cdot 10^1$
	2	15	13		
MSM B + M0,5 + D	1	35	0	38,5	$7,7 \cdot 10^2$
	2	42	0		
MSM B + G + M0	1	65	25	62	$3,8 \cdot 10^1$
	2	58	51		
MSM B + G + M0 + D	1	28	2	26,5	$5,3 \cdot 10^2$
	2	25	12		
MSM B + G + M0,5	1	n.c.	//	//	//
	2	n.c.			
MSM B + G + M0,5 + D	1	20	8	19,5	$3,9 \cdot 10^2$
	2	19	3		

* n.c = non contabili

Il valore di concentrazione maggiore è stato ottenuto per il microcosmo MSM B + G + D ($1,5 \cdot 10^4$) che è la linea che presenta anche il più alto quantitativo di CO₂ prodotta. Per quanto riguarda le altre linee contaminate, le concentrazioni di UCF sono di un ordine di grandezza analogo (circa 10^3) ad eccezione di MSM B + G + M0,5 + D che presenta un valore inferiore (10^2); ciò è in linea con i risultati respirometrici in quanto la velocità di produzione di CO₂ è analoga tra i microcosmi, così come il valore cumulativo finale.

Se si confrontano i valori di UFC/g delle linee contaminate con i valori delle rispettive linee di controllo, si ha che solo in alcuni casi il valore delle linee contaminate è maggiore di quello delle linee corrispondenti; nonostante i risultati delle respirometrie mostrino quantità di CO₂ prodotta più elevate nel primo caso; ciò potrebbe essere dovuto alla non omogeneità dei campioni di suolo.

Tabella 25. Conta su piastre con MSM B e gasolio.

Microcosmo	Replica	Tipologia	n° colonie	di cui fungine	media UFC	Concentrazione (UCF/g)
MSM B + D	1	S	15	0	33	6,7*10 ²
	2	S	10	0		
	3	I	75	0		
MSM B + G + D	1	S	29	0	44	8,7*10 ³
	2	S	76	0		
	3	I	26	0		
MSM B + M0 + D	1	S	18	0	48	9,7*10 ²
	2	S	119	0		
	3	I	8	0		
MSM B + M0,5 + D	1	S	98	0	54	1,1*10 ³
	2	S	39	0		
	3	I	24	0		
MSM B + G + M0 + D	1	S	618	0	727	1,5*10 ⁴
	2	S	836	0		
	3	I	n.c.	0		
MSM B + G + M0,5 + D	1	S	2	0	2	3,3*10 ¹
	2	S	1	0		
	3	I	2	0		

S indica che il medium e il gasolio sono stati inseriti separatamente, I invece che sono stati inseriti insieme.

Le concentrazioni ottenute in presenza del gasolio come unica fonte di carbonio sono dello stesso ordine di grandezza per tutti i microcosmi (circa 10²-10³), ad eccezione di MSM B + G + M0 + D (che presenta una concentrazione significativamente maggiore, dell'ordine di 10⁴) e MSM B + G + M0,5 + D (che presenta una concentrazione inferiore e pari a 10¹).

Confrontando i valori in Tabella 25 con quelli ottenuti per le piastre Agar-Malto, Tabella 24, si vede come siano abbastanza simili, ad eccezione di MSM B + G + D e MSM B + G + M0 + D. MSM B + G + D tra tutte le linee è quella che presenta i migliori risultati dal punto di vista respirometrico e infatti la concentrazione di microrganismi complessivi (piastre Agar-malto) è pari a 1,5* 10⁴ che è il valore più alto tra tutti i microcosmi. Il valore di concentrazione ottenuto con le piastre MSM B e gasolio invece è in linea con le altre, questo potrebbe indicare che nonostante il migliore risultato respirometrico la capacità di degradazione del gasolio sia analoga.

Infine se si pone l'attenzione sulla tipologia di colonie, si osserva che in presenza del solo gasolio come fonte di carbonio non siano presenti colonie di tipo fungino (come già osservato all'interno delle colture liquide descritte al punto 4.2.8); esse sono state osservate solo sul terreno Agar-Malto.

4.2.9.3 Valutazione dell'umidità e del pH delle linee

Sulle linee sono state svolte determinazioni del pH e del grado di umidità del suolo dopo 2 settimane dall'allestimento e al termine del periodo di monitoraggio.

Tabella 26. Umidità e pH del suolo dei microcosmi.

Microcosmo	Umidità dopo 2 settimane (%w/w)	Umidità finale (%w/w)	pH (a metà del periodo di osservazione)	pH (finale)
MSM B	12,3	11,1	7,8	8,0
MSM B + D	17,2	15,5	8,0	7,5
MSM B + G	13,2	11,8	7,9	7,6
MSM B + G + D	16,4	16,2	7,6	7,8
MSM B + M0	12,8	11,7	7,2	7,5
MSM B + M0 + D	18,2	16,3	7,5	7,6
MSM B + M0,5	13,9	12,9	7,8	8,0
MSM B + M0,5 + D	18,0	16,9	7,5	7,7
MSM B + G + M0	13,8	12,4	7,5	7,2
MSM B + G + M0 + D	19,4	19,8	7,5	7,5
MSM B + G + M0,5	17,0	13,4	7,3	8,1
MSM B + G + M0,5 + D	17,4	16,9	7,4	7,7

I microcosmi contaminati presentano, come logico attendersi, valori di umidità mediamente più elevati rispetto ai relativi controlli sia a metà del periodo di osservazione sia al suo termine. Tali valori sono inoltre analoghi a quelli dei microcosmi allestiti in precedenza (Tabelle 16, 18 e 19). Per tutte le linee si osserva una diminuzione del grado di umidità, dovuta all'evaporazione dell'acqua favorita dalla movimentazione del suolo nei microcosmi, ad eccezione di MSM B + G + M0 + D (la cui umidità passa da 19,4 % w/w a 19,8% w/w) probabilmente a causa della non perfetta omogeneità del campione prelevato.

Per quanto riguarda i valori di pH si ha che non ci sono differenze rilevanti tra i microcosmi (a metà del periodo di osservazione il pH varia tra 7,2 e 8,0 e nella fase finale tra 7,2 e 8,1). I valori ottenuti sono analoghi a quelli già presentati in tabella 19.

4.2.9.4 Concentrazione residua di gasolio

La concentrazione di gasolio residuo a metà del periodo di osservazione e al termine della sperimentazione è stata valutata tramite analisi gascromatografica, da un laboratorio certificato, secondo la norma UNI EN ISO 16703:2011 (Qualità del suolo - Determinazione del contenuto di idrocarburi da C10 a C40 mediante gascromatografia).

Le concentrazioni ottenute sono riassunte nelle tabelle sottostanti:

Tabella 27. Riduzione percentuale del contaminante (percentuali in massa) e conta UFC (giorno 15)

Giorno	MSM B + D	MSM B + G + D	MSM B + M0 + D	MSM B + M0,5 + D	MSM B + G + M0 + D	MSM B + G + M0,5 + D
15	41 %	34 %	19 %	32 %	33 %	36 %
34	40 %	35 %	33 %	39 %	33 %	33 %
<i>Conta UFC su Agar-Malto</i>						
Giorno	MSM B + D	MSM B + G + D	MSM B + M0 + D	MSM B + M0,5 + D	MSM B + G + M0 + D	MSM B + G + M0,5 + D
15	1,1 *10 ³	1,5*10 ⁴	8,8 *10 ²	7,7 *10 ²	5,3 *10 ²	3,9 *10 ²
<i>Conta UFC su MSM B agarizzato e gasolio</i>						
Giorno	MSM B + D	MSM B + G + D	MSM B + M0 + D	MSM B + M0,5 + D	MSM B + G + M0 + D	MSM B + G + M0,5 + D
15	6,7 *10 ²	8,7 *10 ³	9,7 *10 ²	1,1 *10 ³	1,5*10 ⁴	3,3 *10 ¹

La riduzione percentuale finale di gasolio è compresa tra il 33 e il 40 %. Per le linee in cui è stata effettuata la “bioaugmentation” (MSM B + M0 + D, MSM B + G + M0 + D, MSM B + M0,5 + D e MSM B + M0,5 + D) sono stati ottenuti risultati del tutto analoghi a quelli dei microcosmi con microrganismi esclusivamente biostimolati (MSM B + D e MSM B + G).

Il risultato ottenuto è in linea con i risultati respirometrici riportati al paragrafo 4.2.9.1; le linee contaminate avevano infatti prodotto un quantitativo di CO₂ analogo (compreso tra 681 e 728 mg di CO₂), ad eccezione della linea MSM B + G + D che ne aveva prodotta una quantità significativamente superiore alle altre (876 mg).

Come era stato ipotizzato al paragrafo 4.2.9.2 relativo alla conta delle colonie cresciute su terreno Agar-Malto e su terreno salino agarizzato, la maggior produzione di CO₂ ottenuta per la linea MSM B + G + D può essere dovuta alla maggior concentrazione totale di microrganismi rispetto alle altre linee (conta UFC Agar-Malto); il valore di UFC individuato con le piastre con MSM B agarizzato e gasolio invece era dello stesso ordine di grandezza delle altre linee (10²-10³) e infatti la capacità degradativa nei confronti dell'inquinante è risultata analoga.

La massima riduzione del contenuto di gasolio è stato ottenuto per le linee MSM B +D e MSM B + M0,5 + D (rispettivamente 40 e 39 % di riduzione).

L'aggiunta di glucosio al terreno salino sul suolo non ha incrementato in modo significativo né la respirazione né la degradazione del gasolio:

- la linea MSM B + G + D ha avuto una riduzione della quantità di inquinante del 35 % contro il 40 % di MSM B + D;
- per MSM B + G + M0 + D e MSM B + M0 + D sono stati ottenuti risultati identici;
- infine MSM B + G + M0,5 + D e MSM B + M0,5 + D sono divise da 6 punti percentuali).

Anche i valori di riduzione di gasolio ottenuti per il giorno 15 sono abbastanza simili per tutte le linee (circa il 34 %), ad eccezione di MSM B + D e MSM B + M0 + D, per le quali sono stati ottenuti valori del 41 % e 19 %, rispettivamente. Per la linea MSM B + D e MSM B + G + M0,5

+ D il valore di degradazione finale è inferiore a quello ottenuto dopo 2 settimane; ciò è causato dall'aver dovuto utilizzare repliche diverse del medesimo microcosmo per ottenere i due valori. La percentuale di degradazione si è mantenuta pressoché la stessa tra la metà e il termine del periodo di incubazione. Si potrebbe ipotizzare che il gasolio venga assorbito dai microrganismi in un primo momento e che venga metabolizzato in un tempo più lungo. A conferma di questa ipotesi, dalle analisi respirometriche (paragrafo 4.2.9.1) non si osserva una variazione significativa della velocità di produzione della CO₂ nella seconda parte della prova. Un andamento analogo è stato già individuato da precedenti studi, tra cui quello realizzato da Ledezma-Villanueva et al. (2016), i quali hanno operato su un terreno sabbioso addizionato con soluzione salina e in presenza di un consorzio microbico. Nel loro studio hanno riportato una diminuzione importante della concentrazione di gasolio nei primi 5-10 giorni dall'allestimento della prova e un successivo rallentamento della degradazione.

5. Conclusioni

Nel presente lavoro di tesi è stata indagata la possibilità di elaborare una strategia, su scala di laboratorio, per la bonifica di un terreno inquinato da gasolio per mezzo di un procedimento biologico. In particolare si è valutato se i microrganismi naturalmente presenti nel suolo fossero in grado di degradare il contaminante scelto e, se sì, in quali condizioni.

Il suolo utilizzato per le prove proviene da qualche metro (circa 3) sotto il piano campagna ed è pertanto più povero di nutrienti e microrganismi rispetto al terreno presente in superficie. In presenza di perdite e fuoriuscite di gasolio il materiale liquido percola facilmente nel terreno fino a raggiungere profondità più o meno elevate a seconda delle quantità rilasciate e della tipologia di terreno; l'utilizzo di un suolo povero per le sperimentazioni è pertanto giustificato in quanto più simile a quello su cui si potrebbe dover operare per un reale progetto di bonifica.

Dalle prove condotte in microcosmo (descritte al paragrafo 3.2.2) si è osservato che per ottenere una respirazione significativa da parte dei microrganismi, indice della presenza di una biomassa attiva, è fondamentale la stimolazione attraverso l'introduzione di una soluzione salina.

Le prove di biodegradazione condotte utilizzando terreni salini differenti (paragrafo 4.2.5) e le colture in mezzo liquido (4.2.6) hanno mostrato che, in presenza di gasolio, il terreno salino che permette di ottenere risultati respirometrici migliori e una maggior crescita di biomassa è MSM B, un medium adatto per microrganismi batterici già impiegato da Palanisamy et al., (2014) per sperimentazioni in fase liquida con concentrazioni di contaminante comprese tra l'1 e il 5% v/v. Il medium impiegato da Palanisamy et al., (2014) è risultato adatto anche per test realizzati su terreno solido e con concentrazioni di gasolio superiori (0,09 ml di gasolio/g suolo).

L'aggiunta del medium non varia in maniera significativa il pH del suolo e quindi non ne altera le caratteristiche (paragrafo 4.2.4.2).

Attraverso le prove in microcosmo (4.2.5) e le colture in medium liquido (4.2.7) è stata anche evidenziata l'assenza di un effetto inibente del gasolio sui microrganismi.

Le prove in microcosmo hanno evidenziato la necessità di smuovere il suolo per favorire l'ossigenazione e quindi l'attività degradativa dei microrganismi aerobi. Qualora si desiderasse realizzare uno scale-up del processo sarebbe fondamentale individuare il metodo migliore per minimizzare la formazione di punti non sufficientemente aerati (e di conseguenza tutte le caratteristiche del sistema di aerazione: flusso di aria, eventuale sistema di trattamento dell'aria e sistema di distribuzione).

Viene talvolta indicato un effetto positivo sulla capacità e velocità di degradazione del gasolio nel caso in cui venga aggiunta una biomassa selezionata a quella già presente.

Le prove di biodegradazione presentate al paragrafo 3.2.6 hanno avuto pertanto come scopo quello di stabilire se l'aggiunta di una biomassa già acclimatata ad un ambiente inquinato da gasolio e cresciuta in fase liquida (3.2.5) comportasse migliori risultati in termini di respirazione cellulare e degradazione del gasolio.

In termini respirometrici, l'aggiunta non ha portato ad alcun effetto positivo; i quantitativi complessivi di CO₂ prodotti nel periodo di osservazione risultano pressoché identici per i microcosmi inquinati in cui è stata effettuata la "bioaugmentation" e per quelli in cui, a parità di concentrazione di contaminante, è stato inserito il solo terreno salino già menzionato.

In termini di concentrazione di gasolio rimanente al termine del periodo di osservazione, le analisi preliminari effettuate mostrano che c'è stata una diminuzione significativa di tale valore.

Nelle linee per la “bioaugmentation” la percentuale di rimozione è analoga a quella ottenuta per le linee di “biostimulation” (33-40 % w/w).

L’assenza di un effetto significativo da parte della “bioaugmentation” può essere considerato un risultato positivo qualora si desiderasse svolgere prove su una scala maggiore, in quanto non sarebbe necessario coltivare un inoculo microbico adattato al contaminante, con evidente risparmio di tempo e denaro. Su una scala maggiore inoltre non sarebbe banale distribuire la biomassa in maniera omogenea nel suolo.

6. Bibliografía

- Azubuiké C. C., Chikere C. B., Okpokwasili G. C., *Bioremediation techniques-classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects*. World J Microbiol Biotechnol (2016), 32:180.
- Chemlal R., Tassist A., Drouiche M., Lounici H., Drouiche N., Mameri N., *Microbiological aspects study of bioremediation of diesel-contaminated soils by biopile technique*. International Biodeterioration & Biodegradation 75 (2012), 201-206.
- Coulon F., Al Awadi M., Cowie W., Mardlin D., Pollard S., Cunningham C., Risdon G., Arthur P., Semple K.T., Paton G.I. *When is a soil remediated? Comparison of biopiled and windrowed soils contaminated with bunker-fuel in a full-scale trial*. Environmental Pollution 158 (2010), 3032–3040.
- Gomez F., Sartaj M., *Optimization of field scale biopiles for bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil at low temperature conditions by response surface methodology (RSM)*. Int Biodeterior Biodegradation (2014), 89:103–109.
- Horel A., Schiewer S., *Investigation of the physical and chemical parameters affecting biodegradation of diesel and synthetic diesel fuel contaminating Alaskan soils*. Cold Regions Science and Technology 58 (2009), 113–119.
- Kauppi S., Sinkkonen A., Romantschuk M., *Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: Comparison of biostimulation and bioaugmentation*. International Biodeterioration & Biodegradation 65 (2011), 359-368.
- Ledezma-Villanueva A., Adame-Rodríguez J. M., O'Connor-Sánchez I. A., Villareal-Chiu J. F., Aréchiga-Carvajal E. T. *Biodegradation kinetic rates of diesel-contaminated sandy soil samples by two different microbial consortia*. Annals of Microbiology 66 (2016), 197-206.
- Lim M.W., Lau E.V., Poh P.E., *A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil—Present works and future directions*. Marine Pollution Bulletin 109 (2016), 14-45.
- Lahel A., Fanta A. B., Sergienko N., Shakya M., López M. E., Behera S. K., Rene E. R., Park H. S., *Effect of process parameters on the bioremediation of diesel contaminated soil by mixed microbial consortia*. International Biodeterioration & Biodegradation 113 (2016), 375-385.
- Maddela N.R., Scalvenzi L., Pérez M., Monrriero C., Gooty J. M., *Efficiency of Indigenous Filamentous Fungi for Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Medium and Soil: Laboratory Study from Ecuador*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 95 (2015), 385-394.
- Maddela N.R., Burgos R., Kadiyala V., Carrion A. R., Bangeppagari M., *Removal of petroleum hydrocarbons from crude oil in solid and slurry phase by mixed soil microorganisms isolated from Ecuadorian oil fields*. International Biodeterioration & Biodegradation 108 (2016), 85-90.

- Margesin, R., Zimmerhauer, A., Schinner, R. *Monitoring of bioremediation by soil biological activities*. Chemosphere 40 (2000),339–346.
- McAlexander B.L., Krembs F. J., Cardeñosa Mendoza M., *Treatability Testing for Weathered Hydrocarbons in Soils: Bioremediation, Soil Washing, Chemical Oxidation, and Thermal Desorption*. Soil and Sediment Contamination 24 (2015), 882-897.
- Nikolopoulou M., Pasadakis N., Norf H., Kalogerakis N., *Enhanced ex situ bioremediation of crude oil contaminated beach sand by supplementation with nutrients and rhamnolipids*. Marine Pollution Bulletin 77 (2013), 37–44.
- Palanisamy N., Ramya J., Kumar S., Vasanthi N. S., Chandran P., Khan S., *Diesel biodegradation capacities of indigenous bacterial species isolated from diesel contaminated soil*. Journal of Environmental Health Science & Engineering (2014), 12:142.
- Sanscartier D., Zeeb B., Koch I., Reimer K., *Bioremediation of diesel-contaminated soil by heated and humidified biopile system in cold climates*. Cold Regions Science and Technology 55 (2009), 167-173.
- Selberg A., Juuram K., Budashova J., Tenno T., *Biodegradation and Leaching of Surfactants During Surfactant-Amended Bioremediation of Oil-Polluted Soil*. Applied Bioremediation – Active and Passive Approaches, InTech (2013).
- Seo Y., Lee W-H., Sorial G., Bishop P. L., *The application of a mulch biofilm barrier for surfactant enhanced polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation*. Environmental Pollution 157 (2009), 95-101.
- Silva-Castro G. A., Uad I., Rodríguez-Calvo A., González-López J., Calvo C., *Response of autochthonous microbiota of diesel polluted soils to land-farming treatments*. Environmental Research 137 (2015), 49-58.
- Simpanen S., Mäkelä R., Mikola J., Silvennoinen H., Romantschuk M., *Bioremediation of creosote contaminated soil in both laboratory and field scale: Investigating the ability of methyl- β -cyclodextrin to enhance biostimulation*. International Biodeterioration & Biodegradation 106 (2016), 117-126.
- Szulc A., Ambrożewicz D., Sydow M., Ławniczak Ł., Piotrowska-Cyplik a., Marecik R., Chrzanowski Ł., *The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies*. Journal of Environmental Management 132 (2014), 121-128.
- Thomé A., Reginatto C., Cecchin I., Colla L. M., *Bioventing in a Residual Clayey Soil Contaminated with a Blend of Biodiesel and Diesel Oil*. J. Environ. Eng (2014), 140 (11).
- Topp G. C., Davis J.L., Annan A. P., *Electromagnetic determination of soil water content: Measurements in coaxial transmission lines*. Water Resources Res. 16 (3) (1980), 574-582.
- van Liedekerke M., Prokop G., Rabl-Berger S., Kibblewhite M., Louwagie G., *Progress in the management of contaminated sites in Europe*. JRC Reference Reports (2014).

Appendice

Di seguito si riportano i valori puntuali delle analisi respirometriche descritte nel capitolo 4.2 Prove di biodegradazione:

Tabella I. Valori cumulativi di CO₂ prodotti dai microcosmi descritti al paragrafo 4.2.3.1.

Giorno	CB 35	CB 40	CB 35 (1)	Media
	<i>mg CO₂</i>	<i>mg CO₂</i>	<i>mg CO₂</i>	<i>mg CO₂</i>
0	0	0	0	0
2	8,25	13,2	6,6	9,35
6	18,15	19,8	9,9	15,95
9	18,15	19,8	9,9	15,95
13	273,9	287,1	268,95	276,65
15	818,4	900,9	945,45	888,25
17	831,6	904,2	948,75	894,85
20	831,6	904,2	948,75	894,85
22	831,6	904,2	952,05	895,95
24	1095,6	1161,6	1262,25	1173,15
28	1211,1	1280,4	1353	1281,5
31	1230,9	1791,9	1386	1469,6

Tabella II. Valori cumulativi di CO₂ prodotti dai microcosmi descritti al paragrafo 4.2.4.1

Giorno	CB F	CB F+G	CB B	CB B+G	ABIOTICO
	<i>mg CO₂</i>				
0	0	0	0	0	0
1	0	24,75	0	41,25	0
4	0	239,25	0	280,5	0
5	24,75	346,5	13,2	356,4	0
6	24,75	371,25	13,2	381,15	0
7	24,75	396	13,2	397,65	0
8	24,75	404,25	13,2	405,9	0

Tabella III. Valori cumulativi di CO₂ prodotti dai microcosmi descritti al paragrafo 4.2.5.1

Giorno	MSM F + 2% G	MSM F + 3% G	MSM B + 2% G	MSM B + 3% G	MSM F + 2% G + gasolio	MSM F + 3% G + gasolio	MSM B + 2% G + gasolio	MSM B +3% G + gasolio	Abiotico
	<i>mg CO₂</i>	<i>mg CO₂</i>	<i>mg CO₂</i>	<i>mg CO₂</i>	<i>mg CO₂</i>	<i>mg CO₂</i>	<i>mg CO₂</i>	<i>mg CO₂</i>	<i>mg CO₂</i>
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
3	227,7	316,8	214,5	313,5	206,3	313,5	234,3	356,4	0
4	277,2	462,0	280,5	465,3	255,8	409,2	308,6	448,8	0
31	495,0	594,0	280,5		255,8	590,7	440,6	597,3	0
34	569,3	643,5	283,8		305,3	714,5	547,8	721,1	0
38	594,0	660,0	287,1		363,0	849,8	630,3	836,6	0
40	607,2	676,5	293,7		392,7	929,0	671,6	882,8	0
42	610,5	683,1	293,7		417,5	986,7	704,6	919,1	0
45	627,0	709,5	306,9		483,5	1098,9	803,6	1001,6	0
48	650,1	742,5	310,2		542,9	1197,9	896,0	1092,3	0
53	679,8	772,2	326,7		658,4	1296,9	1011,5	1232,6	0
57	696,3	797,0	339,9		707,9	1362,9	1067,6	1301,9	0
60	721,1	823,4	364,7		787,1	1458,6	1133,6	1384,4	0
63	750,8	849,8	391,1		844,8	1537,8	1183,1	1457,0	0
68	780,5	872,9	415,8		907,5	1653,3	1235,9	1559,3	0
71	810,2	899,3	440,6		955,4	1729,2	1282,1	1645,1	0
74	830,0	907,5	450,5		988,4	1791,9	1315,1	1694,6	0
76	839,9	924,0	460,4		1018,1	1834,8	1348,1	1735,8	0
78	864,6	947,1	476,9		1051,1	1892,6	1384,4	1785,3	0
81	894,3	973,5	506,6		1092,3	1978,4	1433,9	1848,0	0
83	902,6	996,6	506,6		1125,3	2044,4	1460,3	1887,6	0
85	919,1	1021,4	513,2		1161,6	2110,4	1496,6	1933,8	0
88	952,1	1046,1	539,6		1202,9	2196,2	1542,8	1991,6	0
92	978,5	1072,5	564,3		1245,8	2291,9	1589,0	2060,9	0
95	998,3	1089,0	577,5		1278,8	2366,1	1628,6	2118,6	0
98	1023,0	1105,5	610,5		1320,0	2435,4	1678,1	2181,3	0
102	1042,8	1125,3	630,3		1356,3	2514,6	1734,2	2247,3	0
106	1072,5	1168,2	660,0		1397,6	2597,1	1790,3	2313,3	0

Tabella IV. Valori cumulativi di CO₂ prodotti dai microcosmi descritti al paragrafo 4.2.10.1

Giorno	MSM B	MSM B + D	MSM B + G	MSM B + G + D	MSM B + M0	MSM B + M0 + D
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	40,4	41,3	130,4	117,2	82,5	89,1
6	63,5	140,3	158,4	257,4	141,9	173,8
8	84,2	198,0	179,9	330,8	176,0	224,4
10	108,9	262,4	212,9	404,3	223,3	282,7
13	132,8	330,0	239,3	480,2	267,3	353,1
15	157,6	394,4	269,0	547,8	313,5	405,9
17	183,2	447,2	298,7	605,6	344,3	451,3
20	209,6	513,2	328,4	671,6	383,9	528,0
23	240,9	566,0	354,8	724,4	424,1	579,2
27	263,2	615,5	391,1	790,4	472,5	640,2
29	292,1	651,8	430,7	839,9	509,3	679,0
31	316,0	681,5	455,4	876,2	536,8	708,7

Giorno	MSM B + M0,5	MSM B + M0,5 + D	MSM B + G + M0	MSM B + G + M0 + D	MSM B + G + M0,5	MSM B + G + M0,5 + D
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	41,8	67,1	158,4	78,1	107,3	124,3
6	78,1	158,4	229,9	189,2	138,1	230,5
8	100,7	220,0	256,3	248,1	143,0	278,9
10	132,6	283,8	295,9	308,0	160,6	328,4
13	162,3	353,7	334,4	369,6	171,1	385,6
15	187,6	404,3	363,0	411,4	179,9	419,1
17	211,2	450,5	388,3	448,5	186,5	453,8
20	248,1	525,5	423,5	507,9	203,0	507,4
23	282,2	587,4	457,6	553,3	216,7	562,7
27	323,4	661,7	498,3	619,3	253,6	630,3
29	361,4	694,7	528,0	649,0	265,7	666,6
31	387,2	727,7	558,8	687,8	278,9	689,7

Tabella V. Aspetto delle colture liquide presentate al paragrafo 4.2.6 il giorno del recupero della biomassa.

Terreno	Descrizione
MSM F + gasolio.	Il terreno mostrava un colore giallino e il quantitativo di biomassa, di colore beige, era basso.
MSM F + 2% G + gasolio	Si rilevava la presenza di biomassa fungina di colore bianco con qualche puntino più scuro presente all'interfaccia gas/liquido, la replica (1) presentava alcune chiazze rosa.
MSM F + 3% G + gasolio	La biomassa aveva un aspetto simile a quella di MSM F + 2% G + gasolio ma appariva più eterogenea a causa della maggior presenza di chiazze di colore giallino e rosa.
MSM B + gasolio	Il terreno appariva ocre e la biomassa era scarsa e di colore beige.
MSM B + 2% G + gasolio.	Il terreno presentava un colore nero e la biomassa fungina era eterogenea e di colore bianco con chiazze verdi e rosate.
MSM B + 3% G + gasolio.	Analogo a MSM B + 2% G + gasolio ma la replica (2) mostrava una biomassa più omogenea e di colore bianco.

Tabella VI. Aspetto delle colture liquide presentate al paragrafo 4.2.7.

Dopo una settimana le colture allestite come indicato al punto 3.2.4, presentavano l'aspetto di seguito descritto:

Tabella VI (a). Colture statiche

Terreno	Descrizione
MSM B	Il terreno appariva quasi trasparente e sul fondo era presente una quantità di biomassa molto piccola.
MSM B + gasolio.	Il terreno si presentava meno trasparente rispetto al proprio controllo e con un sottile film di biomassa all'interfaccia gas/liquido.
MSM B + 0,5% G.	Il terreno era di colore ocre opaco e all'interfaccia era presente un film di biomassa biancastra di un certo spessore e di aspetto gelatinoso.

MSM B + 0,5% G + gasolio.	Il terreno era di colore oca opaco e all'interfaccia gas/liquido era presente un film di biomassa gelatinosa di spessore inferiore a MSM B + 0,5% G.
MSM B + 2% G.	Colorazione giallina opaca del terreno e presenza di biomassa bianca in superficie e in parte sospesa.
MSM B + 2% G + gasolio	Terreno di colore giallino opaco con biomassa in sospensione.

Tabella VI (b). Colture agitate

Terreno	Descrizione
MSM B	Il terreno appariva giallino e torbido con biomassa in sospensione ma senza pellets chiaramente visibili.
MSM B + gasolio.	Terreno di colore marroncino-aranciato e presenza di biomassa biancastra all'interfaccia e in sospensione.
MSM B + 0,5% G.	La colorazione del terreno era giallina quasi trasparente con pellets di biomassa tonde e filamentose e pellets più grandi di forma più irregolare e allungata.
MSM B + 0,5% G + gasolio.	Terreno di colore giallo chiaro con presenza di poche pellets di forma non regolare e molta biomassa sospesa.
MSM B + 2% G.	Terreno di colore giallino quasi trasparente, presenza di biomassa sotto forma di pellets irregolare scure al centro e con filamenti bianchi intorno.
MSM B + 2% G + gasolio	Terreno giallo chiaro con biomassa biancastra in sospensione e qualche pellets scura.

Di seguito si riporta la descrizione dei terreni statici così come apparivano il giorno del recupero della biomassa.

Tabella VI (c). Colture statiche

Terreno	Descrizione
MSM B	Il terreno appariva trasparente e praticamente privo di biomassa.
MSM B + gasolio.	Terreno di colore ocra e presenza di un film di biomassa biancastra all'interfaccia.
MSM B + 0,5% G.	Terreno di colore giallo-trasparente con film di biomassa in superficie di colore chiaro con alcune chiazze più scure.
MSM B + 0,5% G + gasolio.	Terreno di colore giallo più scuro del precedente con strato di biomassa in superficie di colore chiaro con alcune chiazze nera.
MSM B + 2% G.	La colorazione del terreno era nera con uno strato di biomassa di colore bianca, giallina co chiazze rosate e verdastre.
MSM B + 2% G + gasolio	Terreno di colore nero con strato di biomassa all'interfaccia di colore biancastro.

Tabella VII (a). Concentrazioni residue di gasolio nei microcosmi per la biostimulation.

Giorno	MSM B + D (mg/kg suolo)	MSM B + G + D (mg/kg suolo)
0	74925	74925
15	44581 ± 8373	49429 ± 9283
34	45317 ± 8511	48449 ± 9099

Tabella VII (b). Concentrazioni residue di gasolio nei microcosmi per la bioaugmentation.

Giorno	MSM B + M0 + D (mg/kg suolo)	MSM B + M0,5 + D (mg/kg suolo)	MSM B + G + M0 + D (mg/kg suolo)	MSM B + G + M0,5 + D (mg/kg suolo)
0	74925	74925	74925	74925
15	60797 ± 11418	50771 ± 9535	50266 ± 9440	47632 ± 8946
34	46136 ± 8665	45388 ± 8524	50025 ± 9395	50161 ± 9420

La concentrazione iniziale è stata valutata teoricamente considerando l'aggiunta di 18 ml di gasolio in ogni microcosmo (0,09 ml di gasolio/g di suolo) e assumendo una densità media di 832 kg/m³ (il gasolio da autotrazione deve avere una densità compresa tra 820 e 845 kg/m³).

Ringraziamenti

Un sentito ringraziamento va ai miei relatori, la professoressa Chiampo e la professoressa Bosco, per avermi resa partecipe di questo progetto e per l'attenzione con cui mi hanno seguito in questi mesi. Vorrei anche ringraziare il professor Godio, per avermi seguito per la parte di caratterizzazione geofisica, la dottoressa Mollea, per il tempo dedicatomi in laboratorio, e la dottoressa Casale che ha condiviso con me lo svolgimento delle prove e che mi ha aiutata ad impostare questa tesi ed è stata fonte di preziosi suggerimenti.

Un doveroso ringraziamento va ai miei genitori che mi hanno sempre lasciata libera di seguire i miei interessi e di intraprendere il mio personale percorso (universitario e non) senza pressioni e che tutti i giorni convivono con le mie stranezze.

Un grazie anche ad Alessio che mi spinge a dare sempre del mio meglio e che ormai da anni mi sostiene con la pazienza di un santo.

Un grazie agli amici che ti rendono più sereno ogni giorno e con cui non smetteresti mai di parlare e ridere (Cherie, com'è che ci conosciamo da 18 anni, ma ogni volta che ci vediamo non abbiamo mai abbastanza tempo per dirci tutto?!?). Un sincero ringraziamento anche ai compagni di corso con cui ho condiviso mille ansie, notti insonni, appunti e (talvolta) sollievo.

Infine vorrei fare una dedica particolare prendendo in prestito le parole di una famosa scrittrice:

“Così erano le sue conversazioni con Clara. Sicché, per Alba, la persona più importante della casa e la presenza più forte della sua vita era sua nonna. Era lei il motore che avviava e faceva funzionare quell'universo magico che era la parte sul retro della grande casa dell'angolo, dove i primi sette anni della sua vita trascorsero in completa libertà. ... Alba passava la giornata dietro a sua nonna, infilandosi tra le sue sottane, insistendo perché raccontasse storie o muovendo vasi con la forza del pensiero. In lei trovava un rifugio sicuro quando era presa da incubi o quando gli allenamenti di suo zio Nicolás diventavano insopportabili. Clara le insegnò a badare agli uccelli e a parlare a ognuno di loro nel suo linguaggio, a conoscere i segni premonitori della natura e a confezionare sciarpe a punto incrociato per i poveri. Alba sapeva che sua nonna era l'anima della grande casa dell'angolo.”

I. Allende - “La casa degli spiriti”