

POLITECNICO DI TORINO

Facoltà di Ingegneria

Corso di laurea in Ingegneria per l'Ambiente e il Territorio



Tesi di laurea magistrale

**Analisi della biodegradazione del diesel in un suolo
contaminato mediante prove alla scala di laboratorio**

Relatori:

Prof.ssa Barbara Ruffino

Prof.ssa Francesca Bosco

Prof. Alberto Godio

Prof.ssa Fulvia Chiampo

Candidato:

Andrea Vergnano

Anno accademico 2017-2018

Abstract

I siti contaminati sono aree in cui, a causa di sversamenti accidentali o depositi abusivi, sono presenti nel suolo sostanze inquinanti tali da risultare pericolose per l'uomo e per l'ambiente. Le tecniche ingegneristiche per porvi rimedio sono molteplici, dalla messa in sicurezza alla bonifica tramite trattamenti fisici, chimici, termici. Alcune tecniche di bonifica sviluppate negli ultimi decenni, che prendono il nome di *bioremediation*, sfruttano la degradazione dei contaminanti ad opera di microrganismi, con lo scopo di un minor impatto sull'ecosistema e di un considerevole risparmio economico.

Il lavoro di questa tesi propone un approccio di *bioremediation* per la degradazione di contaminanti idrocarburi presenti nel suolo, in particolare i composti che costituiscono il diesel.

Obiettivo dello studio è stato il monitoraggio dell'evoluzione di microcosmi, realizzati in colonne cilindriche contenenti suolo contaminato artificialmente, con aggiunta di acqua e nutrienti. Sono stati realizzati in base alle considerazioni fatte su altri microcosmi studiati in una tesi precedente (Turetta, 2017) e monitorati in questa ricerca per consolidarne i risultati. Ciò è avvenuto ripetendo periodicamente una serie di analisi nell'arco di sei mesi di lavoro.

È stata monitorata l'evoluzione di prove respirometriche per valutare la CO₂ prodotta nel tempo, poiché questo dato è indice dell'attività di degradazione microbica.

Sono stati monitorati altri parametri, come pH e quantità di nutrienti residua.

Sono state eseguite delle analisi al gascromatografo, per ottenere una valutazione quantitativa del gasolio residuo nel terreno nel tempo.

I microrganismi si sono rivelati adatti alla degradazione del diesel e sono stati in grado di degradare una buona percentuale del contaminante. Le analisi respirometriche hanno misurato nei microcosmi contaminati una produzione di CO₂ di molto superiore rispetto ai controlli biotici (sono stati così chiamati i microcosmi non contaminati), indicando una progressiva mineralizzazione del diesel. Questo dato è stato confermato dalle analisi al gascromatografo, che hanno accertato che in 200 giorni il 70% del diesel è stato consumato dai batteri presenti nei microcosmi-colonne.

Da un'analisi più approfondita al gascromatografo si è evidenziato che i composti a basso peso molecolare sono stati degradati in percentuali superiori al 90%, mentre quelli ad alto peso molecolare sono stati ridotti solo del 35-40%. Evidentemente i batteri autoctoni, per quanto in grado di reagire positivamente ad una situazione di contaminazione da idrocarburi, non sono stati in grado di rimuovere efficacemente i composti più recalcitranti e meno biodegradabili.

Infine, confermati i risultati di degradazione del diesel ad opera dei microrganismi, è stata avviata la realizzazione di microcosmi a scala maggiore, per valutare i benefici della *bioremediation* in un sistema che simulasse più da vicino le condizioni in situ.

Sommario

1. Introduzione	5
I siti contaminati.....	5
Siti contaminati in Europa	6
Tecniche di bonifica.....	8
Excavation and disposal.....	11
Containment. Permeable active barriers (PRB).....	12
Physical – Chemical Treatments	12
Thermal Treatments	13
Biological Treatments	14
Degradazione microbica dei derivati del petrolio	16
Bioaugmentation	17
Biostimulation.....	18
Phytoremediation	19
Scopo del lavoro e struttura della tesi	21
2. Caratterizzazione del terreno	23
pH	23
Conducibilità elettrica	24
Alcalinità.....	24
Ammonio, Nitrati, Solfati, Cloruri.....	24
Tabella riassuntiva della caratterizzazione del terreno	25
3. Prove in laboratorio su microcosmi.....	26
Realizzazione di microcosmi per la crescita microbica	26
Barattoli	28
Colonne.....	30
Analisi respirometrica	31
Titolazione acido-base per la valutazione della CO ₂ prodotta	32
Risultati	32
Conta microbica su Agar – Malto	37
Risultati	41
Conta microbica su terreno contenente diesel	43
Glucosio – Analisi allo spettrofotometro	44
Umidità.....	44
Analisi al gascromatografo	45

Risultati	46
Analisi del pH.....	50
4. Prova di laboratorio a media scala	52
Approvvigionamento di ossigeno.....	53
5. Conclusioni.....	57
6. Bibliografia	58
7. Appendice	62
7.1. Composizione del terreno salino MSMB.....	62
7.2. Titolazione acido-base.....	62
7.3. Preparazione delle colture microbiche in capsula di Petri.....	64
7.4. Estrazione degli idrocarburi residui dal suolo	64
7.5. Analisi al gascromatografo – retta di taratura	65
7.6. Metodo di valutazione del glucosio	66
Kit D-Glucose	66
Spettrofotometro	67
7.7. Misurazione del pH.....	68
7.8. Misurazione dell'alcalinità.....	68
7.9. Misurazione dell'ammonio.....	69
7.10. Misurazione dei nitrati	70
7.11. Analisi dei solfati	70
7.12. Analisi dei cloruri.....	71
7.13. Caratteristiche dei microcosmi-barattoli	71
8. Ringraziamenti	73

1. Introduzione

Il lavoro di questa tesi si propone di studiare la degradazione, ad opera di microrganismi, di contaminanti idrocarburici presenti nel suolo, in particolare dei composti che costituiscono il diesel. Si può dunque parlare di biodegradazione di tali composti, i quali possono essere presenti nel suolo in aree interessate da sversamenti accidentali o a causa di depositi non controllati. I siti in esame sono chiamati siti contaminati, e poiché i contaminanti possono essere un pericolo per l'ambiente e la salute dell'uomo, occorre un intervento tecnico per limitare i danni. L'esperienza ingegneristica propone metodi di intervento che si suddividono in bonifica e in messa in sicurezza. Le operazioni di bonifica servono a risanare l'area, riportandola ad uno stato conforme ai limiti di legge, ed eliminare la sorgente di contaminazione. Le operazioni di messa in sicurezza si limitano invece a impedire che la contaminazione diventi un pericolo per la salute umana, dell'ecosistema o delle acque, generalmente isolando la zona contaminata dall'ambiente esterno. Alcuni di questi metodi sono usati da decenni, come nel caso del *pump and treat*, altri di attuazione più recente, quali ad esempio le barriere reattive permeabili (PRB).

Alcune tecniche di bonifica sviluppate negli ultimi decenni, che prendono il nome di *bioremediation*, sfruttano la degradazione dei contaminanti ad opera di microrganismi, con lo scopo di un minor impatto sull'ecosistema e di un considerevole risparmio economico (Yenn et al., 2014). La ricerca tuttavia, essendo ancora ad uno stadio di sviluppo, deve ancora superare alcune difficoltà per essere efficacemente adottata su larga scala.

Si introduce ora il problema dei siti contaminati, andando a descrivere lo stato dell'arte delle tecniche oggi più utilizzate, per poi approfondire gli aspetti della *bioremediation*.

I siti contaminati

I siti contaminati sono un problema attuale che interessa tutte le nazioni e tutte le aree del mondo. Tale problema è dovuto principalmente all'esposizione del suolo a sorgenti di contaminazione: accade specialmente nelle vicinanze di discariche, attività commerciali o industriali che fanno uso di

metalli pesanti, raffinerie e industrie del petrolio, territori militari e centrali nucleari. (Panagos et al., 2013).

Un primo aspetto importante di una contaminazione sono le caratteristiche del contaminante, poiché i suoi effetti sull'ambiente e sulla salute umana dipendono da alcuni suoi parametri quali la solubilità, il Kow che indica l'idrofobicità, la costante di Henry che determina la volatilità, l'LD50 che misura la tossicità, lo Slope Factor per la cancerogenicità. I contaminanti, a causa delle loro proprietà fisiche e chimiche, possono interagire diversamente con l'ambiente e venire in contatto con i soggetti esposti per diverse vie (ingestione, inalazione, ecc.). Una volta avvenuto il contatto, a causa delle loro proprietà tossiche o cancerogene, provocano problemi di salute di varia entità negli esseri viventi esposti. Alcuni contaminanti hanno la caratteristica di accumularsi nei tessuti biologici (*bioaccumulo*) e generare così effetti nocivi lungo la catena alimentare degli esseri viventi che ne sono venuti in contatto. Studi epidemiologici dimostrano che l'esposizione ai contaminanti di una popolazione residente nei pressi di un sito contaminato può causare svariati effetti nocivi su di essa, per esempio un incremento dei tassi di insorgenza di malattie come il cancro. (Pirastu et al., 2013). Un sito contaminato dunque è una fonte di possibili problemi gravi all'ambiente, all'ecosistema e all'uomo; il rischio che l'uomo risenta degli effetti nocivi dovuti alla contaminazione dipende dalla tossicità o cancerogenicità del contaminante, e dal modo in cui l'uomo viene a contatto con esso. Le caratteristiche idrogeologiche del sito stesso e le proprietà del contaminante come la tendenza ad adsorbire sui grani del suolo influenzano non solo il fattore di contatto, ma anche l'evoluzione nel tempo della contaminazione.

In questa tesi ci si occupa di siti contaminati terrestri, escludendo per esempio l'inquinamento marino dovuto a sversamenti accidentali nel trasporto di idrocarburi, descrivendo in prima istanza la situazione a livello europeo.

Siti contaminati in Europa

L'Unione Europea, nel suo organo preposto allo studio di queste tematiche, la European Environmental Agency (EEA), e in collaborazione con lo European Soil Data Center (ESDAC), ha organizzato una campagna di raccolta dati sui siti contaminati, a partire dai primi anni 2000. Gli studi più aggiornati a riguardo si possono reperire nel documento "Progress in management of contaminated sites", disponibile sul sito dell'EEA e risalente, nella sua ultima versione, al 2014.

Si vuole mostrare in *Figura 1* la statistica attuale sulla presenza di tali siti contaminati, sul grado di identificazione, e sulla percentuale di siti già bonificati.

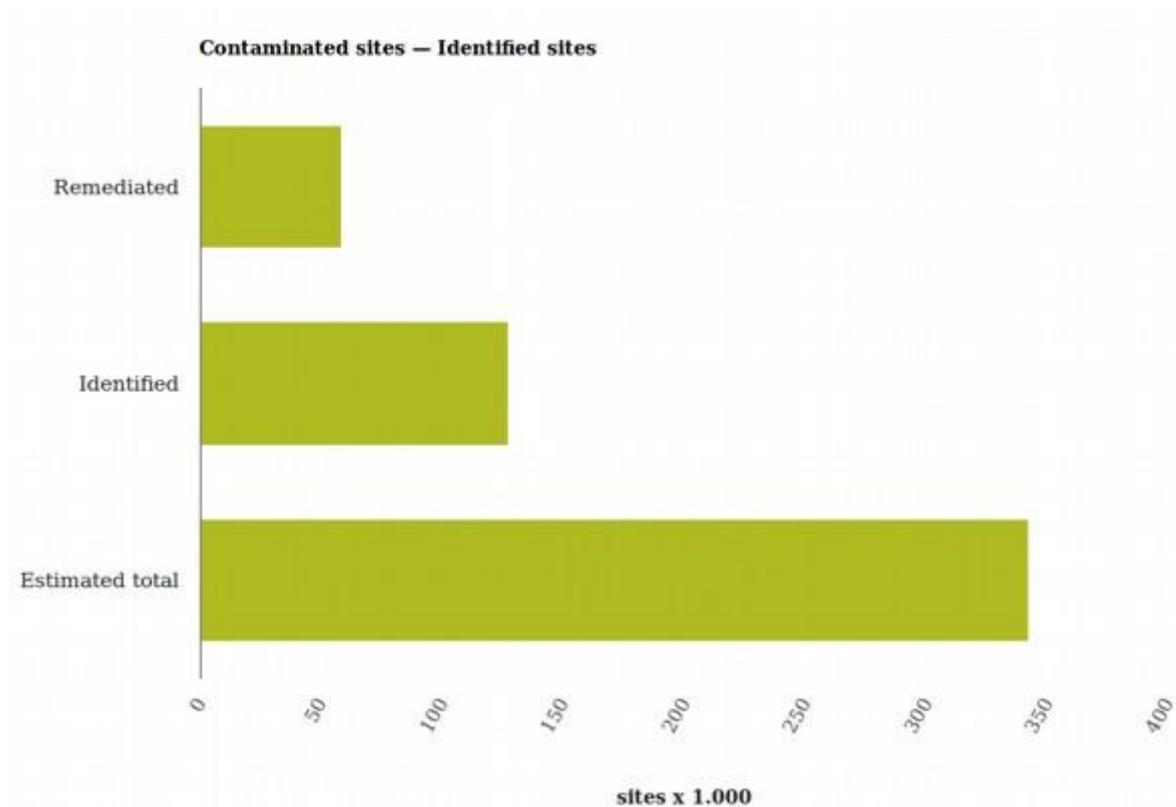


Figura 1. Siti contaminati in Europa: bonificati, identificati, stimati. Fonte: EEA

Si stima che in Europa ci siano circa 350 000 siti contaminati, di cui meno della metà sono stati identificati e solo il 45% di questi ultimi è già stato bonificato. Quindi, sul totale dei siti contaminati stimati, l’EEA assume che solo il 17% di essi sia stato già bonificato.

Si comprende facilmente che il primo problema da affrontare quando si parla di siti contaminati è certamente la loro identificazione. Le cause di una contaminazione possono infatti non essere recenti, e possono anche situarsi lontano dal luogo in cui essa è stata rilevata. Nel caso in cui il suolo abbia una scarsa permeabilità idraulica e il contaminante abbia la proprietà di essere persistente nell’ambiente, un sito può essere contaminato oggi per motivi risalenti a decine di anni fa, come depositi sotterranei di un’industria o di una vecchia miniera. Occorrerebbe dunque investire ingenti quantità di denaro e di tempo in ricerche di carattere geologico e storico, per identificare la maggior parte dei siti contaminati. Spesso, infatti, la sola osservazione degli effetti di una contaminazione sull’ambiente o sulla popolazione di un luogo non dà informazioni sufficienti a comprendere con

precisione l'ubicazione del sito o dei siti contaminati. Non è raro che una contaminazione si propaghi a chilometri di distanza dalla sorgente a causa della sua mobilitazione in falda.

Tecniche di bonifica

Le tecniche ingegneristiche per ridurre al di sotto dei limiti di legge la presenza dei contaminanti in un sito sono numerose, e si basano su principi molto differenti tra loro. Esse, tuttavia, oltre a godere di un diverso grado di affidabilità, conoscenza scientifica, impatto ambientale, costi, tempo, sono anche strettamente legate alla natura del sito, in particolare a certe proprietà del suolo, quali permeabilità idraulica e presenza di una falda, e alla natura della contaminazione. Esistono infatti contaminanti eliminabili con alcune tecniche, e altri per cui le stesse tecniche non avrebbero alcun effetto, ed esistono siti che, per le caratteristiche idrogeologiche, rendono nulli i benefici di alcune tecniche di bonifica. È dunque di fondamentale importanza avere conoscenze precise sul contaminante, sui suoi limiti di concentrazione consentiti e sulle caratteristiche del sito contaminato.

La normativa italiana che stabilisce i limiti di legge per i contaminanti nell'ambiente è il D.Lgs. 152/2006, nell'allegato V al titolo V. Si riportano in tabella 1.1 i limiti previsti per gli idrocarburi nel suolo.

Tabella 1.1. Limiti previsti dal D.Lgs. 152/2006 per gli idrocarburi nel suolo.

	Siti ad uso Verde pubblico, privato e residenziale (mg kg ⁻¹ espressi come ss)	Siti ad uso Commerciale E Industriale (mg kg ⁻¹ espressi come ss)
Idrocarburi Leggeri C inferiore o uguale a 12	10	250
Idrocarburi pesanti C superiore a 12	50	750

L'allegato II al titolo V del documento di legge identifica invece le attività per svolgere correttamente una caratterizzazione del sito, che vengono riportate di seguito:

- “1. Ricostruzione storica delle attività produttive svolte sul sito.
2. Elaborazione del Modello Concettuale Preliminare del sito e predisposizione di un piano di indagini ambientali finalizzato alla definizione dello stato ambientale del suolo, del sottosuolo e delle acque sotterranee.
3. Esecuzione del piano di indagini e delle eventuali indagini integrative necessarie alla luce dei primi risultati raccolti.
4. Elaborazione dei risultati delle indagini eseguite e dei dati storici raccolti e rappresentazione dello stato di contaminazione del suolo, del sottosuolo e delle acque sotterranee.
5. Elaborazione del Modello Concettuale Definitivo.
6. Identificazione dei livelli di concentrazione residua accettabili - sui quali impostare gli eventuali interventi di messa in sicurezza e/o di bonifica, che si rendessero successivamente necessari a seguito dell'analisi di rischio.”

In *Figura 2* si mostrano le principali fonti inquinanti riportate nei siti inquinati europei.

Contaminants affecting the solid matrix (soil, sludge, sediment) as reported in 2011 – Contaminants affecting soil and groundwater in Europe

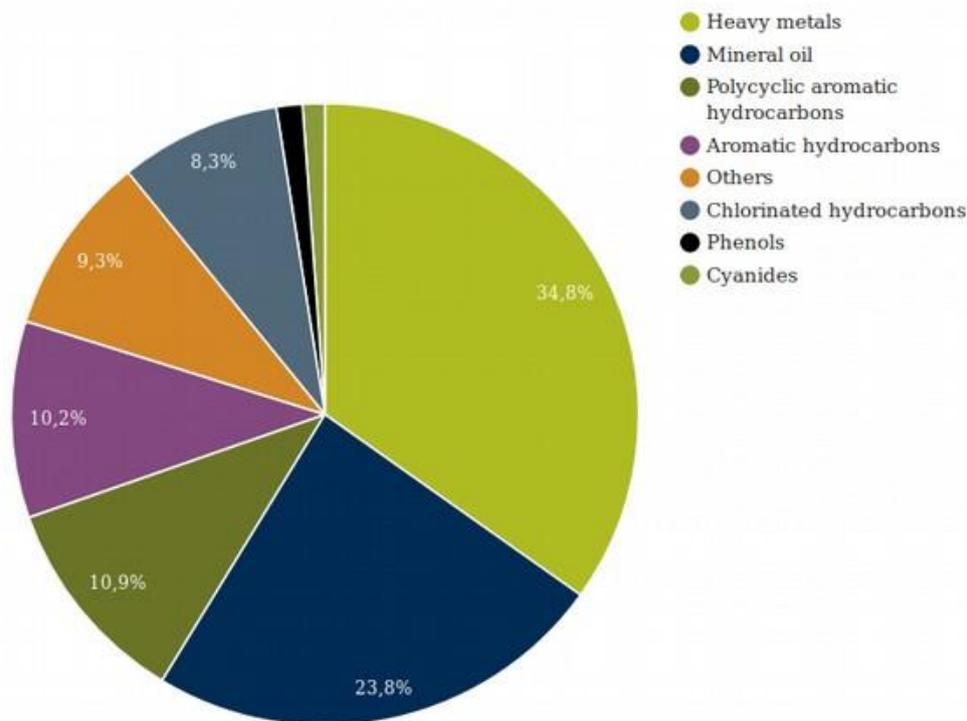


Figura 2 Contaminanti principali nei siti inquinati in Europa (2011)

Come si può osservare in *Figura 2*, la contaminazione da idrocarburi rappresenta più del 50% dei casi, seguita dai metalli pesanti (35%). Non è corretto tuttavia pensare agli idrocarburi come un'unica specie in campo di bonifica, poiché tali composti sono molteplici e possono possedere proprietà chimico-fisiche molto diverse tra loro.

Sulla base di ricerche bibliografiche sono stati approfonditi gli aspetti delle principali tecniche di bonifica, per poi concentrarsi su quanto è attinente alle tecniche di *bioremediation* degli idrocarburi, nostro oggetto di studio più specifico. Si vuole ricordare in particolare l'articolo di Lim et al. (2016), poiché è un lavoro che tratta delle diverse tecniche ingegneristiche di bonifica, e ha il pregio di contenere un'estesa bibliografia che è servita per ottenere informazioni specifiche.

Innanzitutto, è opportuno fare una distinzione tra tecniche in situ, ossia nelle quali il suolo del sito contaminato non viene mobilitato, e tecniche ex situ, nelle quali il suolo viene escavato e trattato in impianti on-site o off-site.

Excavation and disposal

Si vuole discorrere di una metodologia molto diffusa, che però può non essere considerata una vera e propria tecnica di bonifica, ossia l'escavazione e messa in discarica del suolo contaminato. Sempre dalle informazioni reperite presso il documento "Progress in management of contaminated sites" si possono infatti osservare in *Figura 3* le tecniche di bonifica ad oggi più utilizzate in Italia.

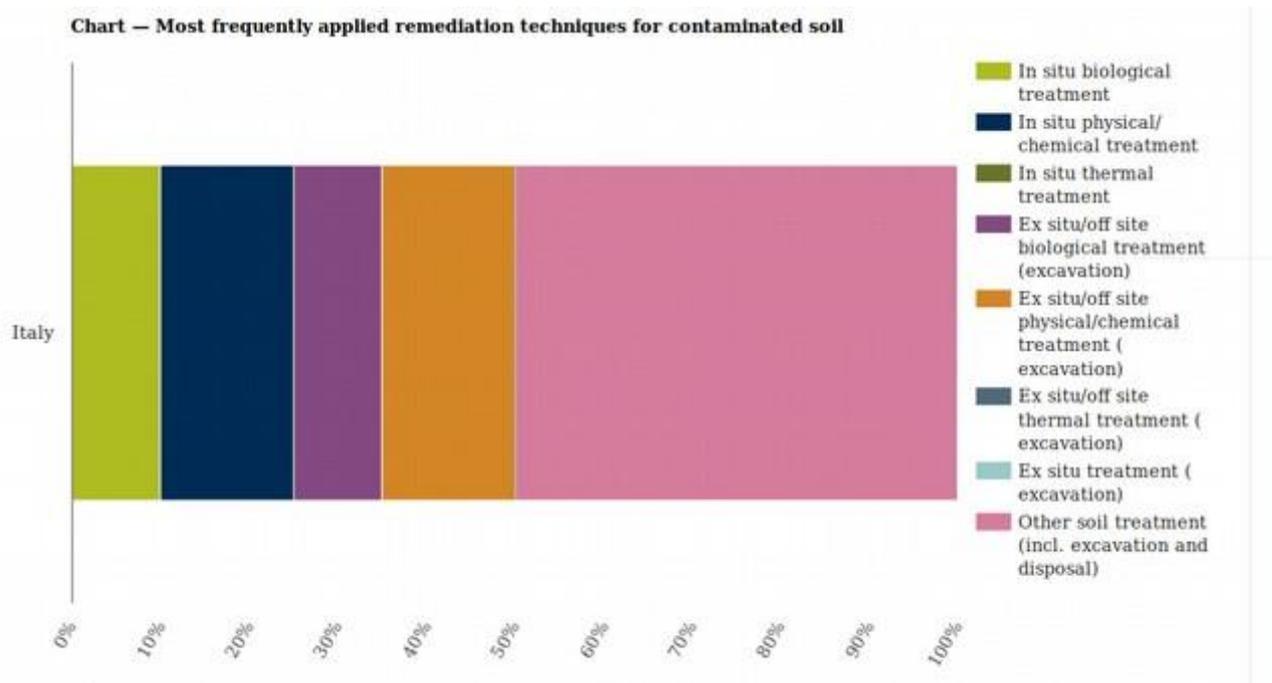


Figura 3 Tecniche di bonifica più frequentemente adottate in siti contaminati italiani

Osservando le percentuali riportate nel grafico si nota che il 50% dei siti contaminati è stato bonificato con procedure quali l'escavazione e smaltimento in discarica. Quest'ultima è ancora la tecnica più diffusa di bonifica in Italia, e consiste nel delineare l'area contaminata, procedere con uno scavo meccanico e trasportare il materiale in discarica. Non richiede conoscenze avanzate per essere messa in opera, ma occorre che l'area inquinata sia identificata in maniera corretta per evitare che rimanga in loco una parte della contaminazione. Si può dire che sia particolarmente adatta se, quando avviene uno sversamento accidentale, si riesce a rimuovere immediatamente la porzione di terreno contaminato prima che l'inquinante si sia diffuso in profondità. Negli altri casi, tuttavia, è un metodo antiquato, dal notevole impatto sullo stato del suolo e prevede alti costi di smaltimento.

Containment. Permeable active barriers (PRB)

Un altro storico metodo di messa in sicurezza di un sito contaminato è quello del contenimento. Si vuole cioè rendere sicura l'area confinando la zona inquinata in modo tale che la contaminazione non si possa propagare, per via aerea o attraverso la falda, nelle aree limitrofe. Vari metodi possono essere utilizzati, qui si elencano la costruzione di muri interrati in acciaio, in bentonite, oppure l'utilizzo della tecnica del *jet-grouting* (Rando, 2015), e la realizzazione di *capping* sulla superficie del sito. Parte integrante della messa in sicurezza è il monitoraggio della qualità dell'aria e dell'acqua in falda tramite pozzi.

Questa metodologia ha visto una grande evoluzione nello sviluppo di barriere non più destinate al solo contenimento degli inquinanti all'interno dell'area contaminata, ma barriere di materiale chimicamente attivo in grado di perseguire una degradazione, quando attraversate dall'acqua di falda. È il caso delle PRB, (*Permeable Reactive Barriers*), realizzate in materiali come il ferro zerovalente, e poste a valle idrogeologica della contaminazione. Sono un'ottima soluzione di bonifica nel momento in cui sia difficile ottenere dati precisi sulla posizione della sorgente, e si voglia lasciar esaurire la fonte contaminante utilizzando l'acqua di falda per portare gli inquinanti verso la barriera, dove verranno degradati.

Physical – Chemical Treatments

Reagenti chimici possono essere utilizzati per mobilitare o immobilizzare i contaminanti presenti nel suolo, a seconda del fine desiderato. Anche agenti fisici quali un flusso controllato di aria o acqua possono ottenere effetti positivi sul sito contaminato.

Una tecnica molto diffusa prende il nome di *pump and treat*, adatta a contaminazioni in falda, che consiste nel creare un ricircolo d'acqua nell'acquifero della zona contaminata. Viene prelevata a valle l'acqua contaminata, si procede trattandola con metodi fisici e chimici prima di immetterla a monte nel sistema. È una tecnica adatta a rimuovere la parte solubile della contaminazione, ma non è adatta alla rimozione degli inquinanti idrofobi come gli idrocarburi, poiché essi tendono all'adsorbimento sulla matrice suolo o ad essere presenti in fase "libera". È una tecnica non recente e perciò ben roduta, ma non è spesso efficace nella rimozione totale dei contaminanti, e richiede tempi lunghi, anche decenni.

Il discorso si può ampliare parlando di *soil flushing*, nel quale l'acqua di ricircolo, oltre ad essere trattata, viene additivata con sostanze atte a mobilitare il tipo di contaminante presente. Si utilizzano sostanze acide per mobilitare i metalli pesanti, tensioattivi per gli idrocarburi, alcoli per i solventi clorurati. Entrambi i metodi sono efficaci se la configurazione del sito e la permeabilità dell'acquifero sono sufficienti a permettere un passaggio dell'acqua rapido e allo stesso tempo capillare, escludendo quindi siti poco permeabili o interessati da carsismo (Di Molfetta, Sethi, 2012).

Qualora i composti siano particolarmente volatili, si può operare un *air sparging* per favorire lo stripping dei contaminanti, iniettando aria tramite numerosi pozzi, e recuperandola tramite pozzi di estrazione. È un metodo rapido, che vede la sua principale difficoltà nella distribuzione omogenea dell'aria insufflata nel volume da bonificare (Kabelitz et al., 2009)

Un altro metodo di trattamento chimico è l'*introduzione di reagenti* che non solo mobilizzano, come nel *soil flushing*, ma vadano a degradare, spesso grazie a reazioni di ossidazione, direttamente i composti contaminanti. Questi processi di ossidazione avanzata vengono realizzati principalmente con l'additivazione di ozono, reagente di Fenton o permanganato di potassio. Sono processi più rapidi ma anche più invasivi, a causa della possibile produzione di sottoprodotti dannosi, ma raggiungono efficienze di rimozione anche superiori al 95% (Sherwood e Cassidy, 2014).

Se la contaminazione è da LNAPL, idrocarburi con peso specifico inferiore a quello dell'acqua, prima di operare con le tecniche descritte è conveniente una rimozione fisica detta *free-phase extraction*, tramite separatori acqua-idrocarburi che lavorano solo sulla parte più superficiale del liquido in falda, eliminando grossolanamente una grande quantità di contaminante che galleggia sulla superficie della tavola piezometrica (Di Molfetta, Sethi, 2012).

Thermal Treatments

I trattamenti termici utilizzano alte temperature per modificare parametri importanti delle sostanze da rimuovere, andando ad aumentare volatilità, diffusione, mobilità, desorbimento, cinetiche di reazione. Possono essere operati essenzialmente in due modi, andando a scaldare il terreno tramite resistenze elettriche, abbinandovi pozzi di estrazione vapori e di monitoraggio, oppure tramite l'immissione di vapore ad alta temperatura, in modo tale da favorire l'evaporazione e la mobilitazione dei contaminanti con una temperatura di ebollizione inferiore a 100 °C. Quest'ultimo metodo prende di solito il nome di *soil vapor extraction*, e promette risultati migliori rispetto al

convenzionale air sparging: uno studio a scala pilota di Park et al. (2005) ha riportato efficienze di rimozione del 95%, su suolo contaminato da petrolio, in 30 giorni di operazioni.

Biological Treatments

L'utilizzo dei processi biologici per la bonifica dei siti inquinati è un approccio che si propone principalmente di raggiungere obiettivi di bonifica ad un minor costo, sia economico che di impatto ambientale. Inoltre, ha il vantaggio di non creare nuovi rifiuti o reflui da trattare o smaltire altrove (Shukla et al., 2010). È tuttavia un approccio studiato da pochi decenni, e la ricerca è ancora in piena fase di sviluppo.

I trattamenti biologici possono essere operati ex situ o in situ. I trattamenti ex situ tendono ad essere più costosi a causa dei costi di scavo e trasporto, ma hanno il vantaggio di poter controllare in maniera più efficace il sistema e la sua evoluzione. Viceversa, per i trattamenti in situ non si hanno costi addizionali di scavo, ma bisogna considerare l'installazione di impianti, e talvolta l'impossibilità a comprendere pienamente i fenomeni in atto, poiché essi avvengono sottoterra, può rendere la *bioremediation* inefficiente (Azubuike et al., 2016).

Il trattamento ex situ può essere operato in *biopile*, ossia cumuli controllati, provvisti di aerazione, irrigazione, aggiunta di nutrienti e sistemi di monitoraggio del percolato. Se si dispone di ampi spazi, è spesso più consigliabile il *landfarming*, nel quale viene sfruttato lo spazio in larghezza per poter operare una più sicura aerazione meccanica del suolo. I risultati non danno solitamente una degradazione completa, e si raggiungono percentuali di rimozione elevate solo nel lungo periodo. Paudyn et al. (2008) riporta l'80% di rimozione del diesel tramite *landfarming* in un periodo di 3 anni, utilizzando una motozappa per l'aerazione. Una corretta aerazione è di fondamentale importanza nella degradazione dei contaminanti.

Il *compostaggio* è un processo aerobico in cui composti organici sono stabilizzati dai microorganismi in alcune fasi (fase di crescita, fase attiva e maturazione). Si raggiungono anche alte temperature (55-65 °C). Il suolo deve essere pretrattato con la rimozione di grosse rocce e detriti e l'aggiunta di stralci vegetali e paglia per favorire una miglior porosità e quindi il passaggio di ossigeno. (Antizar-Ladislao et al., 2008). Altri substrati come scarti agricoli e letame sono utilizzati come sorgente supplementare di carbonio. I mucchi di suolo vengono disposti al riparo da agenti atmosferici e vengono monitorati parametri come umidità, pH e temperatura.

Qualora si abbia a che fare con piccoli volumi di suolo contaminato si può pensare all'installazione di un *bioreattore*, una tecnica certamente più rapida ed efficace delle altre analizzate, ma che richiede appunto un impianto apposito e costi di esecuzione più elevati. Le efficienze di rimozione sono molto elevate, anche del 97% per il petrolio (Chichere et al., 2016). Il suolo può essere bonificato come materiale con tenore di umidità basso (circa 15-20%) o come slurry, e subisce un continuo rimescolamento che massimizza le capacità degradative dei microorganismi (Mustafa et al., 2015).

Il trattamento può altresì essere svolto in situ.

Un trattamento comune in situ è la *natural attenuation*. Essa viene adottata nel momento in cui si stima che la naturale degradazione dei contaminanti presenti sarà abbastanza efficace da non permettere all'inquinante di diventare un rischio per la salute umana o per la qualità delle acque circostanti. I costi sono ridotti al minimo, ma occorre comunque installare pozzi di monitoraggio affinché, a causa di previsioni sbagliate, la contaminazione non raggiunga infine la falda. Spesso la *natural attenuation* viene presa come riferimento per esperimenti di bonifica con metodi biologici, come confronto rispetto alla tecnica oggetto di sperimentazione.

Qualora si decidesse di stimolare l'attività microbica in situ con l'insufflazione di aria, provvedendo a mantenere dunque ottimali condizioni aerobiche, la bonifica prende il nome di *bioventing*. Essa avviene a portate d'aria più basse rispetto all'*air sparging*, perché lo scopo non è lo stripping diretto dei contaminanti volatili, ma il fornire sufficiente ossigeno a favorire condizioni aerobiche ottimali allo sviluppo dei microorganismi (Lee et al., 2006). Se, in presenza di falda, l'aria viene iniettata nella zona satura per promuovere la risalita di composti organici volatili facilmente biodegradabili nella zona insatura, la tecnica viene più comunemente chiamata *biosparging*.

Un approccio utilizzato per completare la rimozione dei contaminanti, quando essi hanno già raggiunto basse concentrazioni in falda (ma non ancora sotto i limiti di legge) grazie a operazioni di bonifica precedenti, è quello dell'utilizzo di *Oxygen Release Compounds* (ORC) e di *Hydrogen Release Compounds* (HRC). Si tratta di reagenti a lento rilascio, che favoriscono condizioni di degradazione biologica rispettivamente aerobiche e anaerobiche, queste ultime talvolta desiderate per la degradazione di solventi clorurati. (Koenigsberg e Sandefur, 2008)

Degradazione microbica dei derivati del petrolio

La biodegradazione dei derivati del petrolio è un processo complesso che dipende dalla natura (idrocarburi saturi, aromatici, resine, a basso o ad alto peso molecolare, ecc.) e anche dalla concentrazione degli idrocarburi presenti. Una concentrazione troppo elevata di idrocarburi altrimenti biodegradabili può inibire l'attività microbica, divenendo letale per i microorganismi: Zhang et al. (2010) riporta valori limite del 4% in peso. Un altro dei problemi che diminuiscono la biodegradabilità degli inquinanti è la loro limitata biodisponibilità, dovuta al fatto che essi tendono ad essere adsorbiti sul suolo.

In ogni caso, si può osservare che possono subire una migliore biodegradazione, nell'ordine: gli alcani lineari, gli alcani ramificati, composti aromatici a basso peso molecolare, alcani ciclici. Altri composti, specialmente quelli più pesanti, possono non essere biodegradabili affatto (Ulrici et al., 2000).

La biodegradazione può essere aerobica o anaerobica, e a seconda del contaminante e del potenziale redox del sito può essere preferibile una all'altra. Tuttavia, per lo più si utilizzano processi aerobici, per la loro maggior velocità e sicurezza (non producono metano, che può generare esplosioni). La biodegradazione anaerobica ha cinetiche molto più lente di quella aerobica, e utilizza ferro, manganese, solfati e anidride carbonica come accettori di elettroni, anziché l'ossigeno. In entrambe le reazioni gli idrocarburi si comportano da donatori di elettroni (Sierra-Garcia e de Oliveira, 2013)

Per questi motivi, a prescindere dal tipo di realizzazione tecnica, che si tratti di *biopila* o *landfarming*, occorre investigare molti altri aspetti della biodegradazione, e sono stati svolti numerosi studi a tal proposito. Per questo si riportano le ricerche svolte in tal senso, per poter comprendere appieno i risultati ottenuti in questo studio e per poterlo inserire in un filone di ricerca più ampio.

Come riportato in Das e Chandran (2011), i tre principali approcci alla ricerca sono:

- **Bioaugmentation**, nella quale ceppi microbici noti per le loro capacità biodegradative di un determinato contaminante sono inoculate nel sistema.
- **Biostimulation**, nella quale viene stimolata la crescita di specie microbiche indigene.

- **Phytoremediation**, nella quale vengono sfruttate la capacità delle piante di estrarre i contaminanti e bioaccumularli, oppure la capacità di secernere sostanze, principalmente dalle radici, che favoriscono la biodegradazione batterica o fungina.

Bioaugmentation

La *bioaugmentation*, ossia l'inoculo di ceppi microbici dalla specifica azione degradativa, fornisce un grande vantaggio nel momento in cui vi sia assenza di microorganismi nel terreno contaminato, per esempio perché le specie batteriche indigene non sono riuscite ad adattarsi alla contaminazione (Xu e Zhou, 2017). A sostegno di ciò Jacques et al. (2008) riporta un esperimento a scala di laboratorio in cui nei sistemi senza *bioaugmentation* non si è osservata una degradazione efficiente degli idrocarburi policiclici aromatici oggetto di studio (20% di degradazione del fenantrene, 4% dell'antracene e 0% del pirene in 65 giorni). Il suolo infatti era stato prelevato da una zona agricola senza precedenti contaminazioni da quel tipo di contaminanti, quindi la popolazione microbica autoctona non era adattata a metabolizzarli.

Anche se la biomassa in loco è capace di crescere nel sito contaminato e nutrirsi del carbonio contenuto negli inquinanti, altri studi confermano che inoculare microorganismi già capaci di degradare il contaminante può rendere trascurabile la fase di adattamento, e quindi aumentare la velocità del trattamento (Mukherjee e Bordoloi, 2011; Mishra et al., 2001).

Probabilmente la miglior degradazione dei contaminanti si raggiunge isolando microorganismi o consorzi di microorganismi da siti che sono stati oggetto di lunghe contaminazioni storiche (Potin et al., 2004). D'altra parte, è stato riportato in alcuni articoli che la *bioaugmentation* non abbia contribuito all'effetto desiderato. Nella maggior parte dei casi, ciò fu correlato alla poca adattabilità dei microorganismi inoculati, probabilmente a causa di una errata selezione. (Bouchez et al., 2000; Wagner-Döbler, 2003).

Tale selezione non è semplice poiché non sono i singoli ceppi a degradare i composti contaminanti, ma i consorzi microbici. Infatti, ogni ceppo del consorzio è più adatto a degradare solo alcune delle sostanze contaminanti. Un singolo ceppo difficilmente ha la capacità di produrre tutti gli enzimi necessari a degradare contaminazioni date da inquinanti diversi. Molti dei contaminanti più comuni, come il petrolio, inoltre, sono essi stessi miscele di sostanze dalla diversa biodegradabilità (Zhao et al., 2009).

Biostimulation

I microorganismi presenti già in ambienti contaminati sono spesso ben adattati a sopravvivere in presenza degli inquinanti, e sono a proprio agio con la temperatura, la sua variazione nel corso del giorno e dell'anno, le condizioni climatiche, il pH, e gli altri parametri propri del sito. Questi microorganismi indigeni tendono ad utilizzare più facilmente i nutrienti e gli accettori di elettroni che sono disponibili nel luogo in cui si sono sviluppati. (Pandey e Fulekar, 2012)

Si è visto che, a causa della complessità degli idrocarburi derivati dal petrolio, un singolo ceppo microbico con i suoi enzimi non è capace di degradare completamente una contaminazione di tal genere. Solitamente la cooperazione di diversi microorganismi è necessaria per degradare tutti o quasi tutti i componenti della miscela di sostanze. Per questo, nel caso in cui nel sito contaminato sia già presente un consorzio microbico capace di proliferare in quelle condizioni, può essere preferibile stimolare la sua attività, piuttosto che introdurre ceppi non autoctoni.

Uno studio di Palanisamy et al. (2014) si è concentrato sulla degradazione del diesel tramite consorzi batterici proveniente da più siti contaminati. I test sono stati svolti su colture in liquido, quindi le condizioni individuate come ottimali potrebbero non essere valide su una matrice fatta da suolo. Uno dei risultati di questo studio è stato infatti che il successo della bonifica dipendeva grandemente dalla capacità di ottimizzare i vari parametri e le condizioni fisiche, chimiche e biologiche. In particolare, sono state fatte delle prove di degradazione in colture in liquido, in una soluzione salina (MSM, Mineral Salt Medium) utilizzata anche in questa ricerca, e con aggiunta di diesel come unica fonte di carbonio. Facendo variare pH, temperatura e concentrazione iniziale di diesel, si è riusciti ad identificare una specie, *A. baumannii*, in grado di degradare in queste condizioni più del 99% del diesel: pH 7, T = 35 °C, concentrazione iniziale di diesel 4% w/w, coltura in liquido MSM. Quest'altissima percentuale di degradazione è dovuta anche al fatto che gli esperimenti di ottimizzazione del sistema sono stati fatti in coltura liquida, non su suolo. Il suolo porta con sé altri problemi, quali la riduzione della biodisponibilità degli inquinanti.

La limitata biodisponibilità degli idrocarburi in un ambiente è data principalmente dalla bassa solubilità in acqua e alle interazioni con la matrice suolo, che limitano la velocità di degradazione (Harms e Bosma, 1997). Si ritiene che composti tensioattivi possano essere utilizzati per incrementare la biodisponibilità di queste fonti di carbonio altrimenti poco accessibili, anche se non tutti sono concordi sul fatto che vi siano sempre esiti positivi (Szulc et al., 2014).

Kauppi et al. (2011) ha investigato sull'aggiunta di nutrienti e sfalci di legno nel suolo contaminato da diesel. Gli sfalci avevano la funzione di migliorare la permeabilità all'aria del suolo, e si è dimostrato che sostituiscono efficacemente un'aerazione meccanica. Nella migliore condizione ottenuta dalle prove di laboratorio, con un rapporto suolo / sfalci di legno 1:1 e rapporto C:N:P pari a 100:10:1, l'81,5% del gasolio è stato consumato in 11 mesi, passando da 2700 a 500 mg / kg di suolo. I risultati della successiva prova di campo hanno mostrato che la biodegradazione del diesel viene accelerata in modo sensibile solo se sono aggiunti sia i nutrienti che gli sfalci di legno, ma che nessuno dei due, da solo, garantisce un sostanziale miglioramento alla bonifica. Ciò può essere spiegato dal fatto che sia un rapporto carbonio/azoto non ottimale, sia la scarsità di ossigeno, sono fattori limitanti alla velocità di degradazione. Lo stesso studio ha dimostrato inoltre che la mancanza di un controllo sull'umidità, cioè il permettere al sistema di autoregolarsi con le naturali precipitazioni e variazioni di temperatura, è deleteria per il successo della bonifica di un sito contaminato.

Gomez e Sartaj (2014) hanno studiato gli effetti combinati di *bioaugmentation* (tramite inoculo di un prodotto commerciale contenente ceppi tipici del Canada, luogo dove è avvenuto la ricerca) e *biostimulation* (mediante aggiunta di compost, 10% w/w) sulla degradazione di idrocarburi totali (TPH) in *biopile*, a scala di campo. In 94 giorni di studio è stata registrata una riduzione del 90,7% degli idrocarburi totali, contro il 48% delle *biopile* di controllo. Se dunque effettuate entrambe le tecniche in modo sinergico, i risultati sono potenzialmente migliori.

Phytoremediation

Questa tecnica si basa sull'uso delle interazioni fisiche, chimiche, biologiche e microbiologiche delle piante con i contaminanti presenti nel suolo, al fine di mitigarne gli effetti dannosi. A seconda del tipo di inquinante vi sono molti meccanismi che avvengono nella fitodepurazione, che prendono il nome di bioaccumulo, degradazione, stabilizzazione, fito-volatilizzazione. Pochi di questi processi avvengono direttamente nei tessuti vegetali: la maggior parte di essi sono il risultato di una complessa interazione tra essudati che vengono rilasciati dalle radici nella rizosfera e microorganismi. Per questo talvolta si parla di *rhizoremediation*. Le piante infatti non si sviluppano solo grazie alle proprietà chimico-fisiche del suolo, ma anche grazie ad una complessa comunità di microorganismi presenti nella rizosfera dal cui metabolismo dipende la salute stessa degli organismi vegetali. Le piante quindi creano nella rizosfera habitat unici in cui la popolazione microbica è

considerevolmente più alta che altrove (Lu et al., 2010). Si stima che circa il 40% dell'energia prodotta con la fotosintesi sia utilizzata dalle piante per produrre essudati che immettono nel terreno zuccheri, acidi organici e composti aromatici ricchi in carbonio e energia, i quali stimolano grandemente la crescita dei microorganismi (Khan et al., 2013). Le radici provvedono inoltre a immettere ossigeno nella rizosfera, e penetrando nel suolo danno anche un contributo positivo alla sua struttura. Tutti questi processi portano ad una miglior degradazione degli eventuali contaminanti, i cui sottoprodotti includono alcoli, acidi, anidride carbonica e acqua, molto meno tossici e persistenti dei composti di partenza. (Gerhardt et al., 2009). Oltre a stimolare l'attività microbica, le piante rilasciano enzimi dalle radici, come dealogenasi, nitroreduccasi, periossidasi e laccasi che svolgono un ruolo attivo e significativo nel catalizzare le reazioni di riduzione dei contaminanti organici (Alkorta e Garbisu, 2001) e nel creare legami tra essi e la sostanza organica presente nel suolo, immobilizzandoli con un processo chiamato *phytostabilization* (Merkl et al., 2005).

In parte gli idrocarburi possono essere assorbiti dalle radici (*phytoextraction*) e quindi passare nei tessuti vegetali. Secondo Haritash e Kaushik (2009) il destino degli idrocarburi che hanno subito *phytoextraction* è duplice. I composti a basso peso molecolare possono essere rilasciati in atmosfera tramite processi di traspirazione (*phytovolatilization*), mentre i composti non volatili possono rimanere nei tessuti radicali oppure essere immagazzinati nei vacuoli o nelle pareti cellulari (*phytoaccumulation*). A proposito di questo, la capacità di una pianta di bioaccumulare idrocarburi di diverso tipo è stata studiata da Atagana et al. (2011) e Boonsaner et al. (2011), i quali hanno riportato rispettivamente efficienze di rimozione dell'80% di BTEX in tre settimane tramite Canna indica, e dell'80% di petrolio in un suolo contaminato anche da metalli pesanti (*Chromolaena odorata* L.)

Uno studio di Agnello et al. (2016) ha dimostrato la sinergia tra *bioaugmentation* con batteri della specie *Pseudomonas aeruginosa* e *phytoremediation* con erba medica (*Medicago sativa*), in un suolo sabbioso a pH leggermente basico (8,1). Sono stati ottenuti questi risultati di degradazione degli idrocarburi totali, provenienti da una contaminazione di idrocarburi e metalli pesanti (Cu, Pb e Zn):

- 37% *natural attenuation*
- 47% *phytoremediation*
- 59% *bioaugmentation*
- 68% *bioaugmentation e phytoremediation*

È uno studio interessante poiché sia l'inoculo batterico sia l'erba medica hanno risposto a vari problemi della biodegradazione, dimostrando che le sinergie possono risolvere problemi complessi come la degradazione di miscele di composti. L'erba medica in primo luogo ha permesso di degradare in modo veloce ed efficace gli idrocarburi e bioaccumulare i metalli pesanti. Essa infatti è una specie che cresce rapidamente e sviluppa un esteso sistema radicale favorevole all'insediamento di microorganismi nella rizosfera (Kirk et al., 2005), tra cui batteri che mineralizzano l'azoto (Truchet et al., 1991). Essa è stata utilizzata in molti studi per la bonifica da svariati tipi di inquinanti: metalli pesanti quali Cd, Cr Ni, Cu Zn, derivati del petrolio, aromatici policiclici e idrocarburi clorurati (Agnello et al., 2016). D'altro canto, il ceppo di batteri utilizzato, *Pseudomonas Aeruginosa*, è stato scelto per la produzione di sideropori, molecole che servono come chelanti per i metalli pesanti e quindi li rendono biodisponibili (Visca et al., 2007). Inoltre, *P. Aeruginosa* produce biotensioattivi che possono incrementare la solubilità dei composti organici e quindi la loro mobilità e biodisponibilità. (Mulligan, 2005; Zhang et al., 2012).

In alcuni casi queste sinergie portano a risultati ottimi di degradazione, come nel caso della *Dracaena reflexa* studiata da Dadrasnia e Agamuthu (2013). Con una concentrazione di diesel del 2,5 % in peso e l'aggiunta di estratto di soia come *biostimulation* in un periodo di 270 giorni l'efficienza di degradazione, svolta dai microorganismi della rizosfera, è stata del 90 %.

Scopo del lavoro e struttura della tesi

Dato lo stato dell'arte attuale delle tecniche di bonifica, l'approfondimento sulla degradazione biologica dei contaminanti nel suolo è quindi interessante per alcuni aspetti:

- è una tecnica relativamente recente, che non può ancora sostenersi su decenni di esperienza. Essa abbisogna ancora di anni di florida ricerca per la messa a punto di standard tecnici adatti alle situazioni di bonifica più comuni;
- è un passo avanti nella sostenibilità ambientale, poiché non richiede aggiunta di composti chimici, utilizzo di alte temperature, rimozione del terreno, e non produce rifiuti da smaltire altrove;

- è meno dispendiosa economicamente, perciò con gli stessi investimenti si potrebbe intervenire su un maggior numero di siti inquinati, dei quali in Europa solo una piccola percentuale è già stata bonificata.

Il fine di questa ricerca è quindi studiare in scala di laboratorio la biodegradazione del diesel in un suolo contaminato artificialmente. In questo studio si vogliono validare i risultati delle analisi svolte su microcosmi da Turetta (2017), e in base ad essi si vuole avanzare nello studio con la creazione di nuovi microcosmi con geometria cilindrica, a piccola e successivamente media scala, nei quali i principali parametri operativi verranno monitorati.

Gli idrocarburi rappresentano più della metà degli inquinanti presenti nei siti contaminati europei, come mostrato nel grafico in *Figura 2*, e questo rende la ricerca applicabile a un settore potenzialmente vasto. Il diesel, composto per il 75% da idrocarburi saturi e per il 25% da aromatici, è una miscela rappresentativa di queste contaminazioni (ATSDR, 1995). Il suolo esaminato, non contaminato naturalmente, è stato prelevato nelle vicinanze di un sito di interesse nazionale, in Piemonte, nel territorio attorno a Trecate, in cui vi fu nel 1994 un incidente in un pozzo di petrolio, che comportò l'irrorazione di svariati ettari di terreno.

La presente ricerca consta di tre macro - capitoli. Il primo è dedicato alla caratterizzazione del terreno, effettuata in laboratorio, e mirata alla determinazione di parametri fisici e chimici del suolo. Sono state fatte analisi del pH, della conducibilità elettrica, dell'alcalinità, del contenuto di ammonio, nitrati, cloruri e solfati.

Nel secondo capitolo viene riportato l'insieme di esperimenti e relative misure volte a descrivere e valutare l'azione di degradazione dei microorganismi sul diesel contenuto nel suolo. Sono state svolte prove respirometriche per valutare la CO₂ prodotta nel tempo, poiché questo dato è indice dell'attività di degradazione microbica. Sono stati monitorati altri parametri, come pH e quantità di nutrienti residua. Infine, sono state eseguite delle analisi al gascromatografo, affinché fornissero una stima quantitativa del gasolio residuo nel terreno nel tempo.

Il terzo capitolo riguarda l'installazione di una prova di laboratorio a media scala, nella quale si vorrà determinare l'efficienza della degradazione nel tempo mediante la misura della permittività elettrica con l'utilizzo di una sonda geofisica.

2. Caratterizzazione del terreno

Il terreno è stato prelevato in un sito adiacente al sito contaminato di Trecate. Nel 1994 infatti, era in corso una trivellazione da parte di ENI nel territorio comunale, per un'indagine esplorativa, quando l'incontro di una cosiddetta "lente di vapore" fece saltare le aste di perforazione senza che i sistemi di sicurezza potessero fare alcunché. Durante le 36 ore successive fuoriuscirono 15000 m³ di petrolio greggio, che contaminarono in modo significativo un'area di circa 96 ettari. Questo generò un plume contaminante nell'acquifero, la cui tavola d'acqua fluttua stagionalmente tra 6 e 12 metri di profondità, in movimento verso il fiume Ticino (Cassiani et al., 2014)

Il suolo è stato prelevato a tre metri di profondità, affinché fosse il più possibile rappresentativo delle caratteristiche chimico-fisico e biologiche della zona di attività di degradazione, posta in profondità, e affinché avesse un minimo o nullo contenuto di suolo vegetale. Inoltre, ci si è assicurati in questo modo che non fosse stato soggetto né alla contaminazione dovuta all'incidente né a eventuali contaminazioni successive, dovute ad esempio all'utilizzo di fertilizzanti in agricoltura.

Esso è stato oggetto di una caratterizzazione, volta a conoscere gli specifici parametri fisici e chimici. È stato setacciato a 2 mm ed è stata inoltre rimossa la parte più fine (< 0,15 mm) per impedire al suolo di impaccarsi durante le fasi della sperimentazione. Di seguito vengono descritti i parametri oggetto di analisi, di cui viene riportata in appendice la metodica utilizzata.

pH

Il pH è stato misurato preparando due diversi estratti, il primo utilizzando acqua deionizzata, il secondo usando una soluzione salina 0,01 M di cloruro di calcio (CaCl₂) in acqua deionizzata, seguendo le indicazioni del DM del 13/09/1999, che tratta dei metodi ufficiali di analisi del suolo. La metodica completa è riportata in appendice al paragrafo 7.7.

Per quanto riguarda gli estratti ottenuti con acqua deionizzata, i valori riportati dal pH-metro non hanno raggiunto la stabilità, comportamento tipico di soluzioni a bassa concentrazione salina.

I valori di pH ottenuti con le due repliche di soluzione salina estraente di CaCl_2 sono stati di 7,28 e 7,36, indicando una condizione del suolo vicina alla neutralità.

Conducibilità elettrica

La preparazione della soluzione estraente è avvenuta in modo analogo a quanto operato nella misurazione del pH, utilizzando però acqua deionizzata con rapporto suolo - acqua 1:5.

Dopo aver preparato 3 repliche viene utilizzato un conduttimetro, che misura la corrente elettrica attraversante il mezzo, applicando una differenza di potenziale nota. Dopo aver compensato la misura, tramite valori tabulati, alla misura che si otterrebbe a 25 °C, è stato ottenuto il valore di $165 \pm 5 \mu\text{S}/\text{cm}$, che indica un terreno povero di sostanze suscettibili di ionizzazione quando messe in acqua.

Alcalinità

La quantità di carbonati e bicarbonati presenti è stata misurata avendo a disposizione uno strumento titolatore automatico con una soluzione di acido solforico 0,05 M. L'estrazione è avvenuta con rapporto suolo - acqua deionizzata 1:5. Si riporta in appendice la procedura completa, al paragrafo 7.8.

Le due repliche hanno dato risultati di $66.9 \pm 10.8 \text{ mg}/\text{kg}$ di bicarbonato.

Ammonio, Nitrati, Solfati, Cloruri

Le misurazioni di ammonio, nitrati, solfati e cloruri sono state svolte in modo simile.

Per l'ammonio e i nitrati, l'estrazione è avvenuta con rapporto suolo – soluzione salina di CaCl_2 1:10, analogamente alla misurazione del pH. Per i solfati e i cloruri essa è stata fatta con rapporto suolo - acqua deionizzata 1:5. La procedura di estrazione è stata fatta sempre secondo quanto suggerito dal DM del 13/09/1999.

Sono dunque state preparate delle soluzioni analizzabili tramite spettrofotometro UV – visibile, due delle quali, per l'ammonio e per i nitrati, tramite kit della NANOCOLOR. Le metodiche sono riportate in appendice al paragrafo 7.9.

I valori sperimentali sono di 2.18 ± 0.11 mg / kg di ammonio e di 68.0 ± 0.4 mg / kg di nitrati.

I solfati hanno una concentrazione di 211 ± 3 mg / kg, mentre i cloruri di 26.2 ± 0.3 mg / kg.

Tabella riassuntiva della caratterizzazione del terreno

Tabella 2.1. parametri del terreno oggetto di questa ricerca

pH	7.32 ± 0.04
EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$) @ 25°C	165 ± 5
Bicarbonato (mg/kg)	66.9 ± 10.8
Ammonia (mg/kg)	2.18 ± 0.11
Nitrate (mg/kg)	68.0 ± 0.4
Chloride (mg/kg)	26.2 ± 0.3
Sulfate (mg/kg)	211 ± 3

3. Prove in laboratorio su microcosmi

Realizzazione di microcosmi per la crescita microbica

La biodegradazione del diesel è stata studiata alla scala di laboratorio in sistemi chiusi, denominati microcosmi, in cui i microrganismi potessero svilupparsi e grazie ai quali fosse agevole svolgere le prove respirometriche, del pH, del glucosio residuo, le conte microbiche e le analisi al gascromatografo.

Questo studio riprende una tesi precedente (Turetta, 2017) in cui sono stati realizzati microcosmi contenuti in barattoli, come mostrato in *Figura 4*. Essa ha permesso di individuare, tra alcune condizioni testate, le più promettenti. Esse sono state trasferite in un sistema con una configurazione geometrica tale da meglio simulare le condizioni in situ: per questa tesi, quindi, sono stati realizzati microcosmi in colonne con geometria cilindrica, come si vede in *Figura 5*.

Le misure sui microcosmi-colonne sono state eseguite per un periodo di 200 giorni. Nello stesso periodo di 200 giorni sono stati monitorati anche i microcosmi-barattoli al fine di validare i risultati ottenuti da Turetta (2017). Per completezza di informazioni verranno riportati, nei grafici di questo capitolo relativi ai microcosmi-barattoli, anche i dati raccolti nei 170 giorni di monitoraggio precedenti a questa tesi.



Figura 4. Microcosmi-barattoli

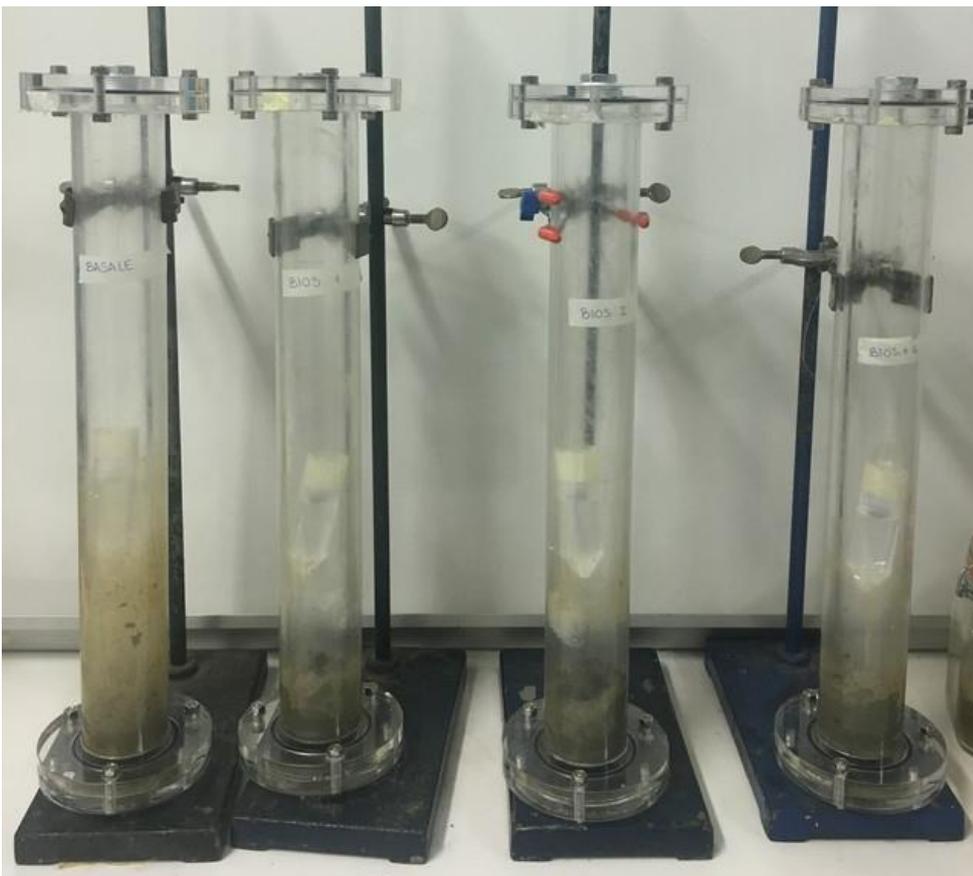


Figura 5. Microcosmi-colonne

Barattoli

La quantità di suolo presente in ciascun barattolo è di 200 g. Sono stati utilizzati dei contenitori di vetro di volume 1 L, provvisti di chiusura ermetica per evitare in particolare lo scambio di anidride carbonica tra il sistema e l'ambiente. Ciò ha permesso di svolgere in modo efficace prove respirometriche, e in secondo luogo è stata mantenuta il più possibile inalterata l'umidità.

Come si diceva, i microcosmi-barattoli sono stati realizzati da Turetta (2017) con varie configurazioni, affinché fosse possibile individuare quella ideale per la crescita microbica e per l'efficienza di rimozione del contaminante.

- In alcuni microcosmi è stato aggiunto del glucosio, per stimolare l'attività batterica, in quantità di 0,925 g / kg di suolo, ossia 0,185 g in ogni barattolo.
- È stata sperimentata la *bioaugmentation*. Si voleva verificare se l'inoculo di una biomassa selezionata e già acclimatata ad un ambiente contaminato da gasolio fosse efficace nell'aumentare la velocità di crescita batterica e di degradazione dell'idrocarburo. Sono state utilizzate due configurazioni di coltura in liquido: la prima, denominata M0, coltura con gasolio come unica fonte di carbonio, la seconda, M0,5, coltura con gasolio e 5 g/L di glucosio.
- In tutti i barattoli è stata operata una *biostimulation* aggiungendo un terreno salino denominato MSMB (Mineral Salt Medium) atto a favorire la crescita batterica, elaborato da Palanisamy et al. (2014). Ha pH 7,5, e in ciascun microcosmo ne sono stati aggiunti 37 ml. Per la sua composizione, si veda la tabella 7.1 in appendice.
- È stato sperimentato anche un altro tipo di terreno salino, denominato MSMF, atto a favorire la crescita fungina, ma sono stati evidenziati benefici inferiori, in termini di produzione di CO₂ e di degradazione del contaminante, rispetto all'aggiunta di terreno MSMB.
- Nei microcosmi è stato aggiunto dunque del diesel, in una quantità pari a 7,5g di diesel ogni 100g di suolo, ossia 15 g in ogni barattolo.
- Sono stati allestiti dei controlli biotici, non contaminati con gasolio, e un controllo abiotico, ossia un microcosmo con suolo sterilizzato, senza terreno salino MSMB e non contaminato.

La sperimentazione sui microcosmi-barattoli ha portato ad alcuni risultati:

- L'aggiunta di terreno salino MSMB è di fondamentale importanza per lo sviluppo dei batteri, i quali, rispetto ai funghi, si sono rivelati migliori degradatori del gasolio.
- Vi è la necessità di smuovere il suolo per favorire l'ossigenazione e quindi l'attività degradativa dei microrganismi aerobi.
- La *bioaugmentation*, così come è stata svolta, non ha portato benefici significativi misurabili in maggiore attività respiratoria o più veloce degradazione del contaminante.
- Anche l'aggiunta di glucosio si è rivelata inefficace, in questo senso.

In *Figura 6* si riporta l'andamento dei dati respirometrici in quattro microcosmi-barattoli il cui comportamento esplica significativamente tali considerazioni. Come si può osservare, i microcosmi con il glucosio (G) o caratterizzati da un diverso inoculo di biomassa (M0 e M0,5) non presentano sostanziali differenze nel grafico.

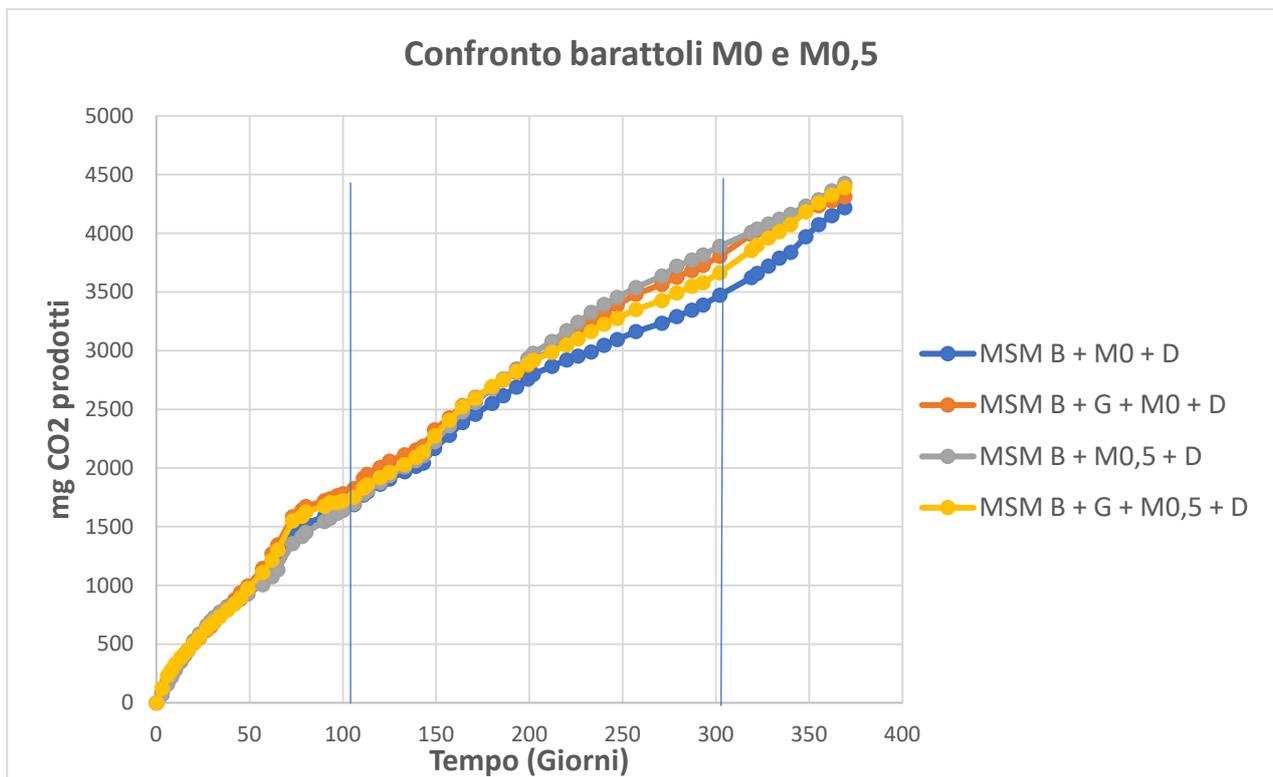


Figura 6. Andamento dei dati respirometrici nei barattoli contaminati M0 e M0,5

Per una descrizione più esaustiva sulle prove respirometriche svolte si rimanda al paragrafo successivo. Senza prendere in considerazione aspetti più complessi, è tuttavia evidente che sia

l'aggiunta di glucosio, sia l'inoculo M0,5 piuttosto che l'inoculo M0, non sono stati determinanti nel favorire la respirazione microbica nei microcosmi-barattoli.

In appendice, al paragrafo 7.13, vengono riportate in una tabella le caratteristiche dei microcosmi-barattoli che sono stati monitorati in questa tesi.

Colonne

Basandosi sull'esperienza ottenuta con lo studio dei microcosmi-barattoli è stata realizzata una nuova serie di microcosmi con una geometria differente, quella cilindrica, in colonne trasparenti alte circa 45 cm e dal diametro di 6 cm. La quantità di suolo posta in ciascuna colonna è stata di 200 g.

Sono state scelte le condizioni ottimali ricavate dall'osservazione dei barattoli, e quindi il terreno salino introdotto è stato MSMB, che si è dimostrato migliore rispetto a MSMF. Inoltre, non è stato aggiunto alcun inoculo di biomassa, poiché le prove respirometriche non hanno evidenziato maggiore attività microbica nei microcosmi con *bioaugmentation*, rispetto a quelli con la sola *biostimulation*. Si è preferito dunque seguire solamente la strategia della *biostimulation*, che a parità di risultati è più semplice e meno costosa. In una colonna, chiamata Bios + G, è stato aggiunto del glucosio in quantità molto maggiore rispetto a quanto operato nei barattoli (0,74 g contro 0,185 g, v. tabelle 3.1 e 3.2), per verificare in modo più sicuro se il glucosio non portasse benefici alla crescita batterica e alla degradazione del diesel.

Sono state allestite due colonne di controllo: un controllo biotico senza diesel, chiamato Basale, e un controllo abiotico contaminato con diesel, realizzato sterilizzando il suolo e il diesel in autoclave e operando sotto cappa sterile. Il controllo abiotico è servito per valutare la variazione della concentrazione del gasolio non dovuta alla biodegradazione.

Le colonne hanno le caratteristiche descritte in tabella 3.2. La sigla Bios sta a significare *biostimulation*, la stimolazione della crescita microbica operata tramite l'aggiunta di terreno salino MSMB.

Tabella 3.2 Caratteristiche dei microcosmi-colonne

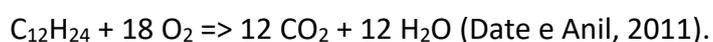
Colonna	Terreno salino	Glucosio	Diesel
Basale	MSMB		
Bios	MSMB		15 g
Bios + G	MSMB	0,74g	15 g
Controllo abiotico – suolo sterilizzato	MSMB		15 g

Una delle prime analisi svolte è stato un monitoraggio dell'attività respiratoria nei microcosmi. Le misure respirometriche e il loro andamento nel tempo ha permesso di avere una base di dati relativamente ampia, sulla quale poter fare ipotesi e ragionamenti poi verificabili tramite le altre prove descritte in questo capitolo, in particolare l'analisi al gascromatografo e le conte microbiche.

Analisi respirometrica

È stata svolta un'analisi respirometrica sui microcosmi (barattoli e colonne) al fine di determinare l'attività dei microorganismi misurando la CO₂ prodotta, indice della loro respirazione, con una frequenza di 1-2 volte alla settimana.

La reazione di respirazione che si vuole studiare produce CO₂ dalla degradazione del substrato carbonioso. Nel caso del microcosmo Bios, in cui la fonte di carbonio è solamente il diesel, si può scrivere una reazione media, essendo il gasolio una miscela di composti a diverso peso molecolare:



Ciò significa che stechiometricamente i microorganismi contenuti nel microcosmo Bios, degradando il diesel con una reazione di respirazione, abbisognano di 2,18 g di O₂ per produrre un grammo di CO₂.

Titolazione acido-base per la valutazione della CO₂ prodotta

Si è voluto dunque misurare l'anidride carbonica prodotta nei microcosmi, al fine di ottenere un risultato in termini di O₂ consumato nell'unità di tempo. Operativamente si è scelto di misurare la CO₂ prodotta tramite titolazione acido-base, ponendo all'interno dei microcosmi sigillati una soluzione basica (NaOH 1,5 M) che assorbisse la CO₂ prodotta, e svolgendo la titolazione con una soluzione acida (HCl 1,5 M). La metodica è descritta in appendice al paragrafo 7.2.

In questa ricerca sono stati seguiti gli andamenti nel tempo della respirazione di tutti i microcosmi citati precedentemente. Si descrive tuttavia solo il comportamento dei microcosmi-colonne, poiché gli unici interamente svolti in questo studio, e poiché la loro realizzazione rappresenta la prosecuzione di ciò che si è appreso tramite l'analisi dei microcosmi-barattoli nel corso della precedente tesi di Turetta (2017).

I risultati delle analisi sono dunque riportati in forma grafica e commentati nelle pagine seguenti.

Risultati

Si osservi il grafico in *Figura 7*, che mette in relazione la quantità cumulativa di CO₂ prodotta nei microcosmi-colonne, espressa in mg, con il tempo trascorso, in giorni.

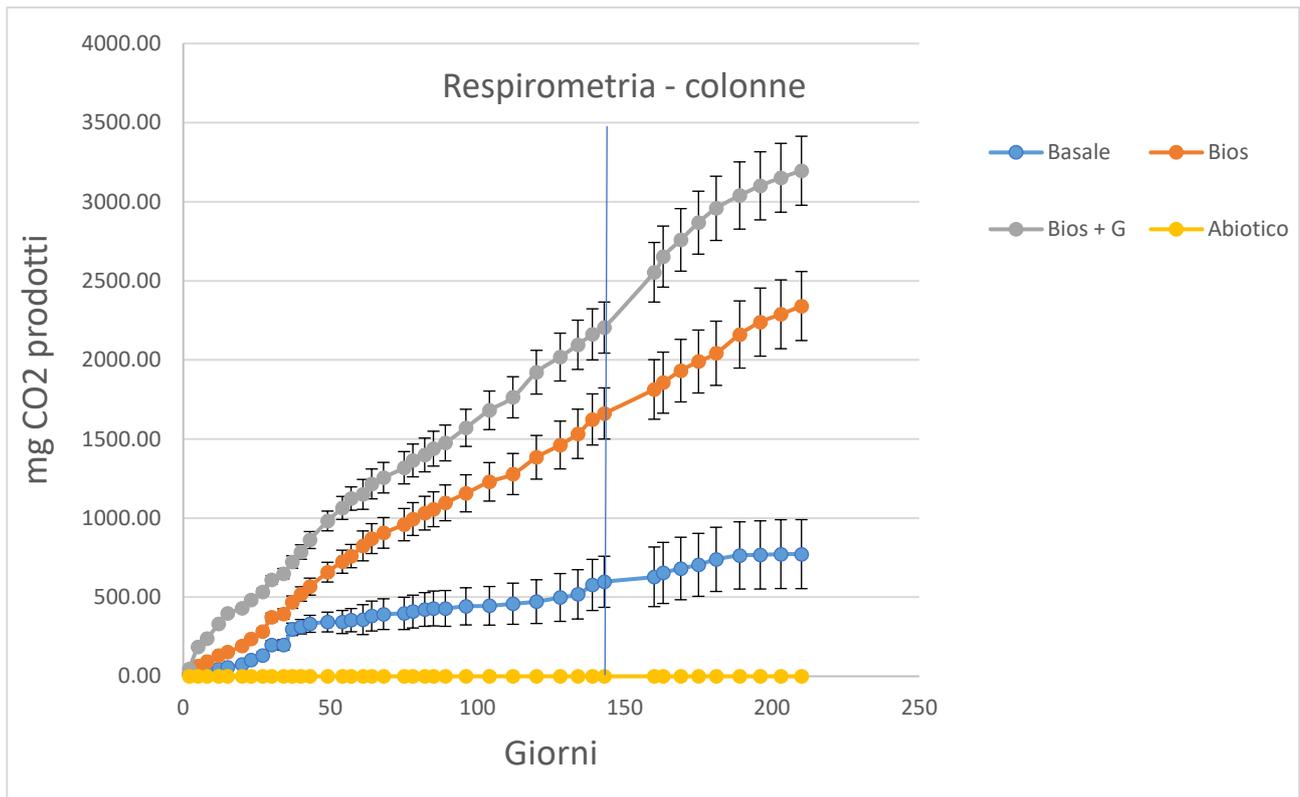


Figura 7. Andamento delle respirometrie nei quattro microcosmi-colonne

L'andamento dei valori cumulativi di CO₂ prodotta è descrivibile mediante le seguenti osservazioni:

- Andamento continuo positivo nelle colonne Bios e Bios + G: non si verificano periodi in cui la velocità di produzione di CO₂ sia nulla nei microcosmi contaminati da diesel. Dei due, il microcosmo in cui è avvenuta l'aggiunta di glucosio è quello in cui si è evidenziata la produzione di anidride carbonica maggiore. A 210 giorni da inizio esperimento, infatti, Bios registra una produzione cumulata di CO₂ di circa 2340 mg, mentre in Bios + G tale valore tocca i 3200 mg.
- I valori di CO₂ prodotta rimangono per lo più bassi nella colonna di controllo "Basale", realizzata senza l'aggiunta di contaminante o glucosio, ma solo terreno salino. A 210 giorni, il valore di CO₂ cumulata è pari a circa 770 mg. Essa presenta inoltre una discreta velocità di respirazione fino a 40 giorni, che poi rallenta fino a quasi fermarsi, presumibilmente con la fine delle scorte di carbonio nel suolo.

- Si notano altresì delle differenze nell'evoluzione del sistema Bios rispetto a quello Bios + G: sebbene Bios + G riporti una respirazione maggiore, in realtà le due curve procedono abbastanza parallele, tranne all'inizio e a 143 giorni, in cui il microcosmo con il glucosio segnala una produzione di anidride carbonica molto superiore. Questo fenomeno di maggior produzione di CO₂ per il microcosmo Bios + G avviene in corrispondenza dell'aggiunta di 37 ml di soluzione salina MSMB, la quale, per Bios + G, contiene anche 20 g/L di glucosio. Si può osservare quantitativamente questo fenomeno se si dividono le curve respirometriche in tratti, e ne vengono tracciate approssimazioni lineari (*Figura 8*).
- Il controllo abiotico ha mostrato una produzione di CO₂ nulla.

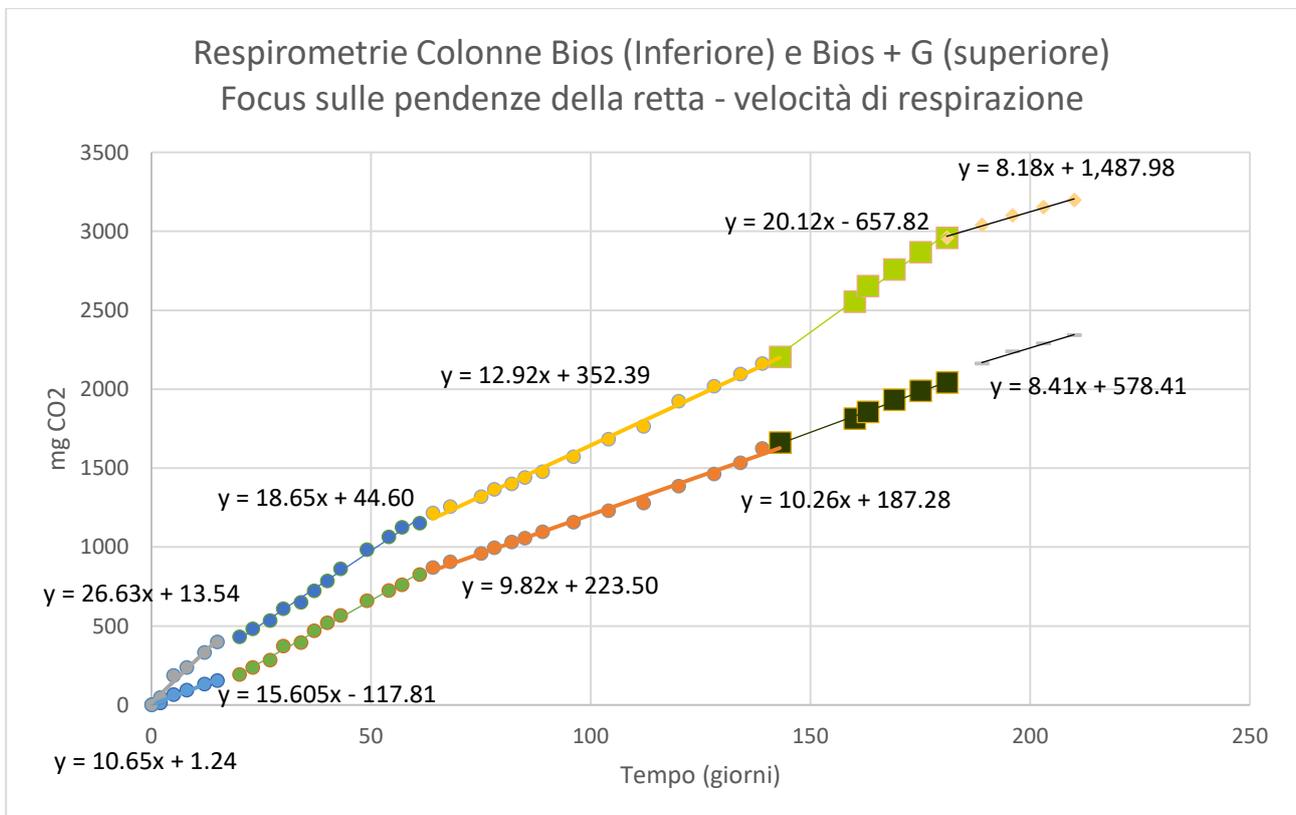


Figura 8. Approssimazioni lineari di parti delle curve respirometriche di Bios e Bios + G

- Ragionando sulle linee di tendenza, il coefficiente angolare della retta di approssimazione per Bios è di 10,5 da inizio esperimento a 15 giorni, contro un 26,5 per Bios + G. Tale coefficiente angolare rappresenta la quantità in milligrammi di CO₂ prodotta dal microcosmo in un giorno.
- Se si osservano i dati del periodo successivo, che va da 20 a circa 60 giorni, la differenza è molto minore: si ha un coefficiente angolare di 18,5 per Bios + G e 15,5 per Bios. Il microcosmo con il glucosio ha rallentato l'attività respiratoria, viceversa per il microcosmo Bios.
- Successivamente, fino a 143 giorni, la velocità di produzione della CO₂ diminuisce in entrambi i microcosmi: il coefficiente angolare diventa circa 13 per Bios + G e circa 10 per Bios. La respirazione rallenta ancora, ma il microcosmo Bios + G ha ancora una velocità di produzione di CO₂ leggermente maggiore della colonna Bios.
- Dai 143 giorni, momento dell'introduzione della soluzione salina (e del glucosio in Bios + G), a 180 giorni, si nota un significativo incremento nella respirazione da parte della colonna Bios + G, che raggiunge i 20 mg di CO₂ prodotti al giorno, mentre la colonna Bios rimane stabilmente su valori di circa 10 mg di CO₂ prodotti al giorno.
- Nell'ultimo periodo analizzato, ossia fino a 210 giorni, vi è nuovamente un decremento della respirazione, più evidente nel microcosmo Bios + G che nel microcosmo Bios.

Un altro grafico utile per osservare i medesimi concetti è quello proposto in *Figura 9*, che depura i risultati dell'analisi respirometrica dalla CO₂ prodotta dalla colonna di controllo "Basale". Si nota meglio, soprattutto nella colonna Bios, l'andamento pressoché lineare, mentre valgono le considerazioni fatte sull'evoluzione di Bios + G in funzione dell'aggiunta di terreno salino con glucosio, a inizio esperimento e a 143 giorni.

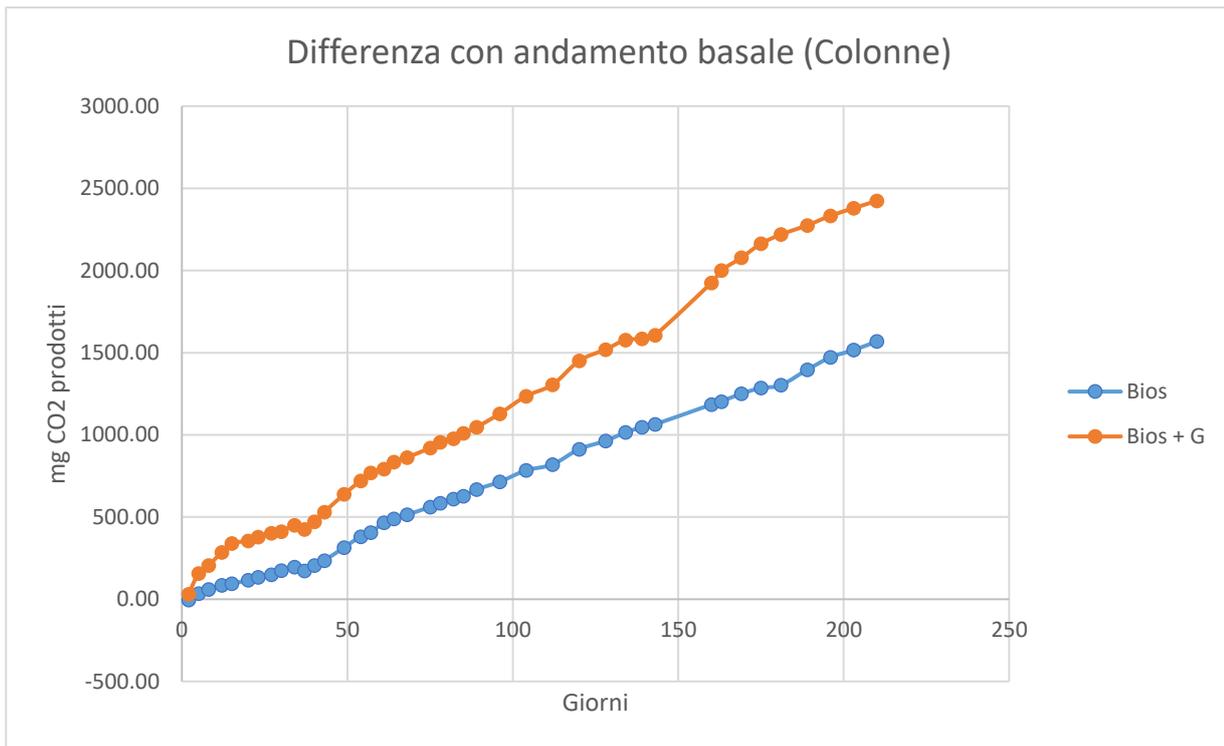


Figura 9. Bios – Basale e Bios + G – Basale

È stato realizzato infine un grafico semplificato (Figura 10), riassuntivo dei valori di CO₂ prodotti durante l'esperimento. A 190 giorni la colonna Bios + G ha prodotto circa 900 mg di CO₂ in più rispetto a Bios.

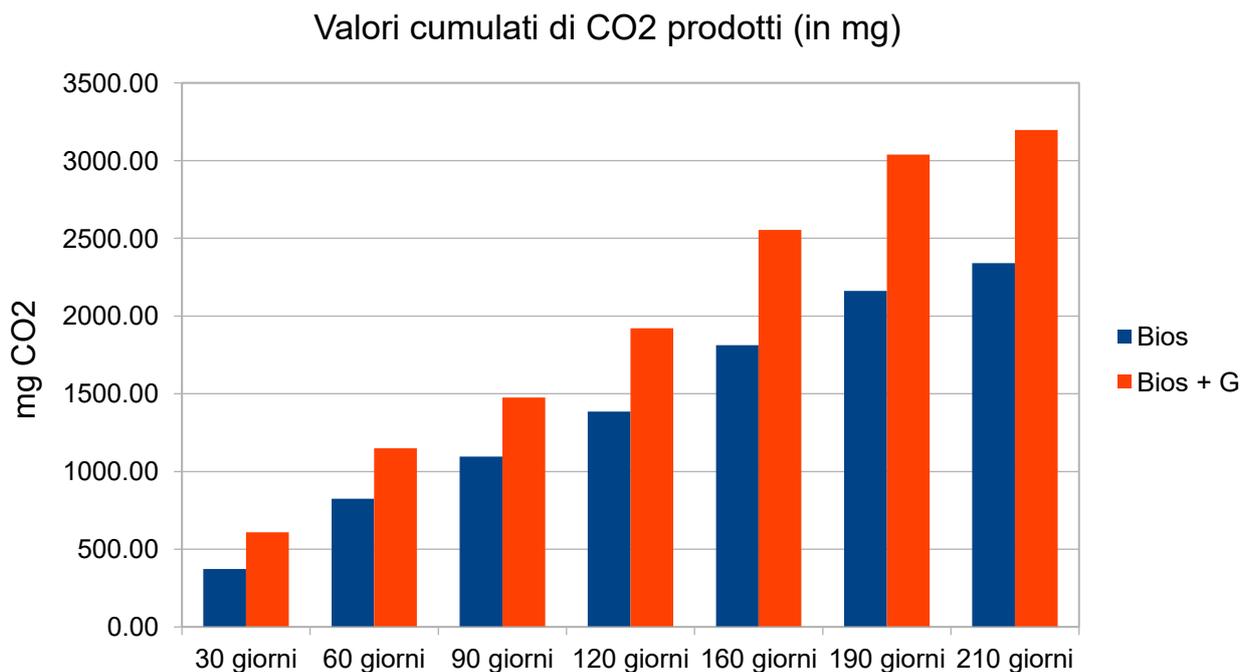


Figura 10. Grafico riassuntivo dei valori cumulati di CO₂ prodotti dai microcosmi Bios e Bios + G

Conta microbica su Agar – Malto

È stata studiata l'evoluzione dei microcosmi-colonne valutando periodicamente la presenza di colonie, la loro abbondanza e le loro caratteristiche, realizzando delle colture in capsule di Petri. Il suolo, prelevato dai microcosmi, è stato posto in capsule di Petri contenenti un terreno nutritivo (Agar-Malto). I nutrienti hanno avuto lo scopo di stimolare la crescita microbica, mentre l'Agar è un gelificante. In questo modo è stato possibile visualizzare, dopo alcuni giorni, le colonie microbiche come puntini all'interno della capsula. Il numero di colonie contate in questo modo è detto Colony-Forming Units (CFU) e serve a stimare l'abbondanza di cellule microbiche dalla loro capacità di formare un certo numero di colonie. È inoltre possibile distinguere colonie di diverso tipo, ad esempio quelle batteriche da quelle fungine. La metodica viene descritta più nel dettaglio in appendice, al paragrafo 7.3.

Le analisi qui riportate si riferiscono ai microcosmi-colonne (Basale, Bios, Bios + G). Esse sono state effettuate a 34, 68, 110 e 175 giorni dall'avvio delle prove nelle colonne. Si osservino *Figura 12*, *Figura 13* e *Figura 14*, che riportano come esempio le piastre di Petri realizzate con suolo estratto a 110 giorni dall'inizio dell'esperimento.

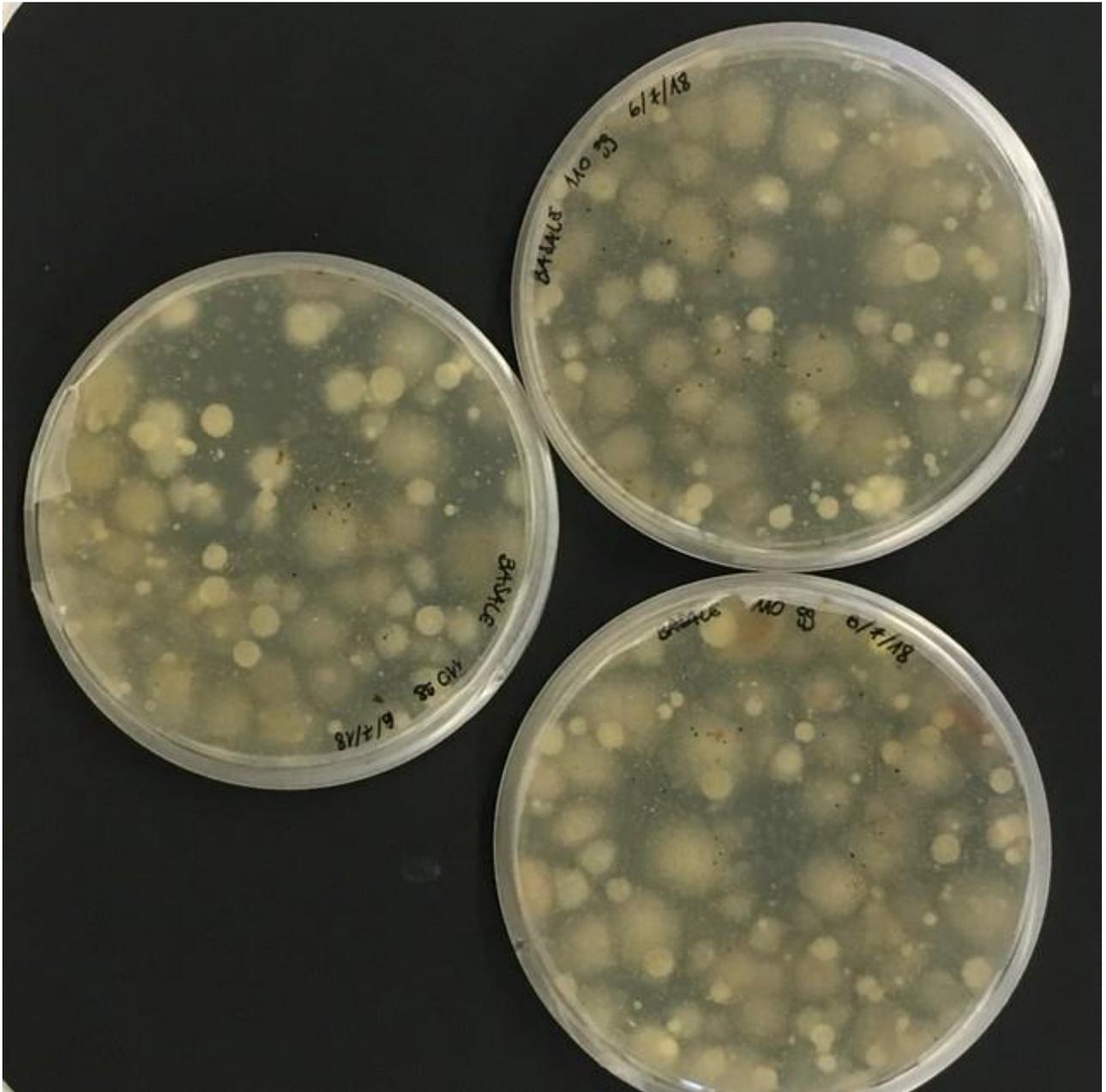


Figura 11. Conta CFU su terreno AM. Suolo di provenienza: colonna Basale, 110 giorni.

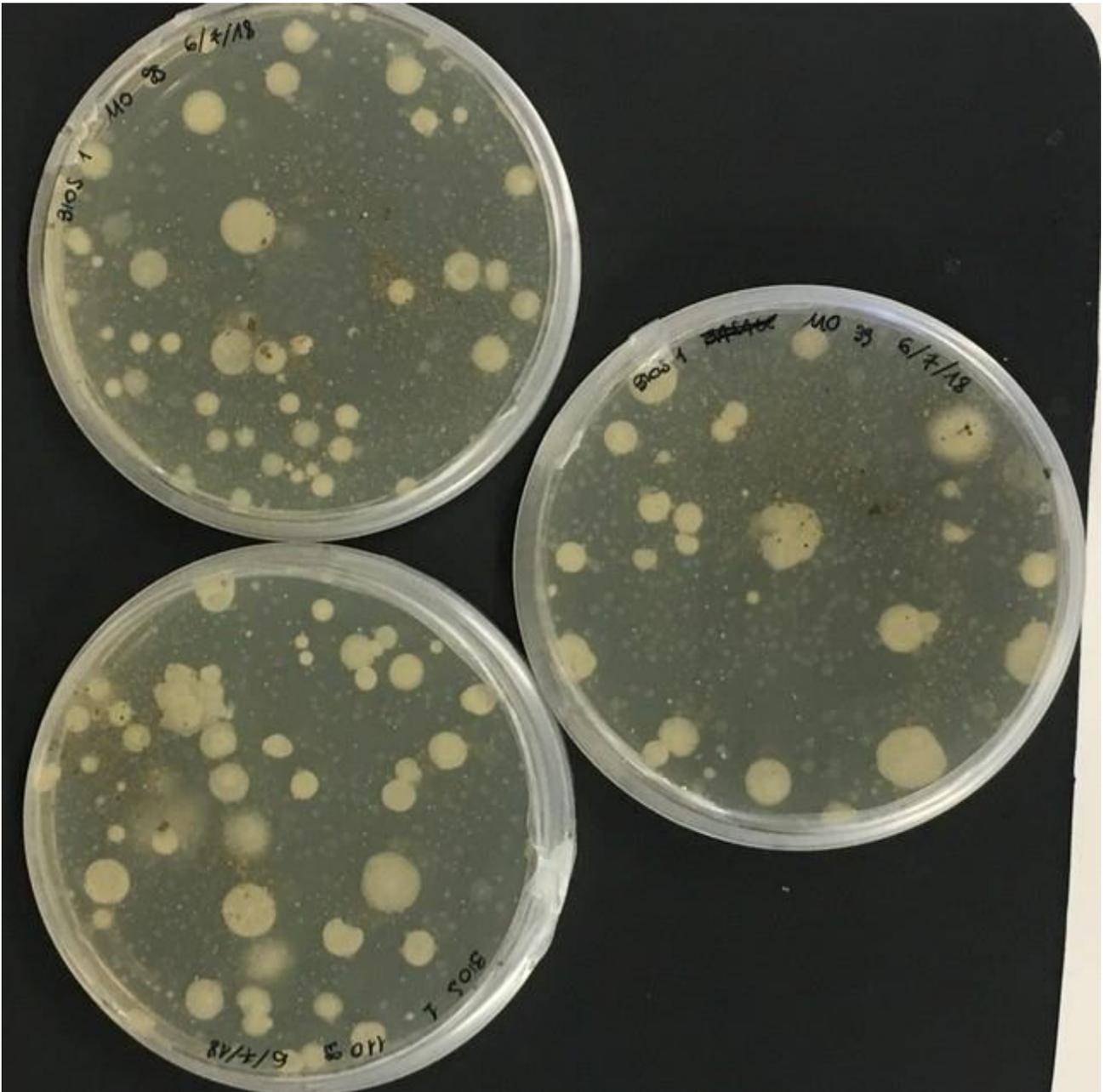


Figura 12. Conta CFU su terreno AM. Suolo di provenienza: colonna Bios, 110 giorni.



Figura 13. Conta CFU su terreno AM. Suolo di provenienza: colonna Bios + G, 110 giorni.

Come si osserva nella fotografia in *Figura 12*, la coltura con provenienza dalla colonna Basale, ossia quel microcosmo in cui è stato aggiunto solo il terreno salino MSMB, e né il glucosio né il diesel, presenta alcune colonie batteriche e molte colonie fungine. Confrontando invece le piastre Bios e Bios + G, non si notano grandi differenze in termini di qualità e quantità delle colonie, e, in entrambe, non sono presenti colonie fungine. Ciò può essere interpretato deducendo che la presenza di diesel nel suolo ha favorito lo sviluppo batterico a discapito di quello fungino. Questo ragionamento conferma i risultati trovati da Turetta (2017), secondo cui i batteri presenti nel suolo oggetto di studio abbiano una maggior adattabilità a degradare il gasolio rispetto ai funghi, e quindi per

ottenere la migliore efficienza di degradazione convenga stimolare la crescita batterica tramite un terreno salino apposito (MSMB), e non quella fungina.

Risultati

Si riportano in tabella 3.3 i risultati numerici della conta microbica totale, svoltasi su suolo prelevato dai microcosmi-colonne a 34, 68, 110 e 175 giorni dalla loro installazione. I dati sono stati normalizzati a numero di CFU (Colony-forming unit) per grammo di suolo.

Tabella 3.3. Dati sulla concentrazione di microorganismi nei microcosmi-colonne, espressi in Colony-forming unit (CFU) per grammo di suolo.

Denominazione microcosmo	Concentrazione di colonie [CFU/g di suolo]			
	34 giorni	68 giorni	110 giorni	175 giorni
Basale	$2,64 * 10^3$	$2,91 * 10^4$	$1,38 * 10^4$	$2,21 * 10^4$
Bios	$7,24 * 10^3$	$3,03 * 10^4$	$1,17 * 10^4$	$1,83 * 10^4$
Bios + G	$1,37 * 10^4$	$3,27 * 10^4$	$9,10 * 10^3$	$2,04 * 10^4$

Per maggiore chiarezza nel comprendere i dati riportati, si osservi il grafico in *Figura 14*.

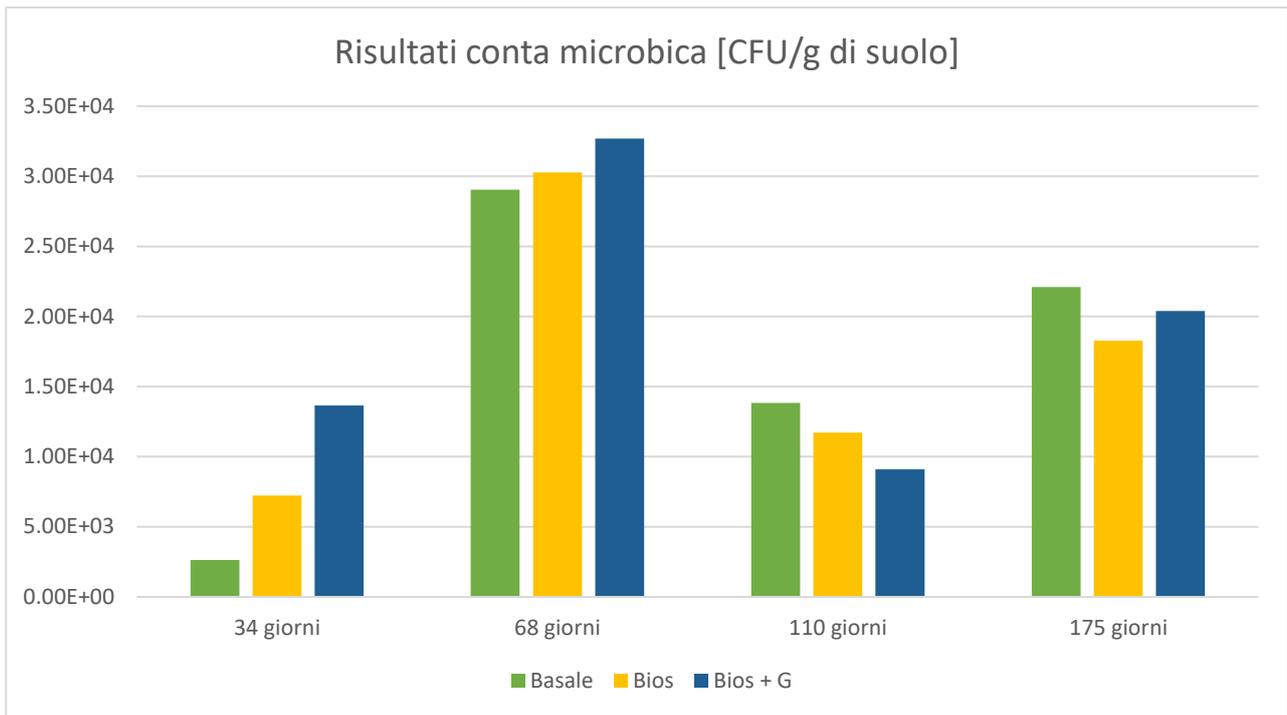


Figura 14. Andamento, nell'arco di 175 giorni, del numero di CFU nei microcosmi-colonne

Si possono trarre alcune considerazioni interessanti:

- Nei primi due mesi si registra un'elevata attività microbica. La crescita è più rapida per Bios e soprattutto Bios + G, i quali dopo un mese riportano rispettivamente valori di $7,24 \cdot 10^3$ CFU/g e $1,37 \cdot 10^4$ CFU/g. Tutti i microcosmi, a 68 giorni, hanno una concentrazione in CFU/g di circa $3 \cdot 10^4$.
- Fino a 110 giorni vi è una generale diminuzione nel tempo del numero di CFU/g. I microcosmi infatti riportano una concentrazione di circa $1 \cdot 10^4$ CFU/g.
- A 143 giorni nei microcosmi sono stati reimmessi i nutrienti iniziali, e questo ha conseguenze nel dato ottenuto a 175 giorni: il valore di CFU/g di tutti i microcosmi aumenta nuovamente, tornando a valori di circa $2 \cdot 10^4$ CFU/g.
- I risultati della conta batterica sono in linea con quelli forniti dalle prove respirometriche. Il calo del numero di CFU/g da 68 a 110 giorni è confermato dall'analisi respirometrica: proprio intorno ai 60 giorni la pendenza della curva [CO₂ prodotta / tempo] è diminuita significativamente in tutti i microcosmi-colonne, indicando un rallentamento dell'attività batterica (Figura 8). Ciò è dovuto probabilmente all'esaurimento progressivo di nutrienti contenuti nel terreno.

In un secondo momento, a 143 giorni da inizio esperimento, nei microcosmi sono stati reimmessi i nutrienti iniziali, sotto forma di terreno salino MSMB, e glucosio (quest'ultimo solamente nel Bios + G). A quest'operazione è susseguita una evidente ripresa dell'attività batterica, di nuovo confermata dalle prove respirometriche (*Figura 8*).

- Come già accennato, per ogni prelievo sono state osservate colonie fungine solo per il controllo biotico (Basale), con l'unica eccezione del campione prelevato a 175 giorni, in cui è stata osservata in media una percentuale di circa il 10% di colonie fungine rispetto alle colonie totali in tutti i microcosmi: probabilmente il ripristino dei sali e dei nutrienti ha stimolato lo sviluppo di spore fungine.

Conta microbica su terreno contenente diesel

Contemporaneamente alla conta microbica effettuata sul suolo prelevato a 175 giorni, è stata svolta una conta microbica specifica dei microorganismi degradatori del diesel. In questo caso si è utilizzato un terreno di crescita diverso, contenente diesel come unica fonte di carbonio, in modo tale che solo il diesel potesse essere nutrimento per i microorganismi. Sono stati posti in ciascuna capsula di Petri 50 mg di suolo, 20 ml di terreno salino MSMB e 40 µl di diesel sterilizzato.

Il risultato, misurato sempre in CFU, osservato dopo 4 giorni, mostra quanti batteri presenti nel suolo si possano adattare a nutrirsi esclusivamente di diesel. Si osservi la tabella 3.4.

Tabella 3.4. Microorganismi degradatori del diesel e loro percentuale sul totale di colonie microbiche. Prelievo a 175 giorni.

Microcosmo	Microorganismi degradatori (CFU/g suolo)	% sul totale di colonie
Bios	6.43E+03	35.17
Bios + G	8.80E+03	43.14

Mettendo a confronto i valori di CFU/g della coltura qui descritta, che indicano quanti microorganismi siano in grado di sopravvivere nutrendosi solamente di diesel, ed i valori di CFU/g della coltura con terreno nutritivo Agar-Malto, che rappresentano il totale delle colonie microbiche, si nota che solo il 35% (per il microcosmo Bios) e il 45% (per Bios + G) delle colonie è effettivamente in grado di crescere in ambiente in cui l'unica fonte di carbonio è il gasolio.

Si nota inoltre, su tutte le piastre, la crescita di colonie bianche a morfologia filamentosa, probabilmente riconducibili ad attinomiceti.

Glucosio – Analisi allo spettrofotometro

La quantità iniziale di glucosio immessa in ciascun microcosmo (200 g di suolo) è stata di 0,74 g, ossia 37 mg / g di suolo. La misura è stata effettuata a 68 e 175 giorni. È stato utilizzato un metodo basato su un kit enzimatico e la misura allo spettrofotometro.

I risultati ottenuti hanno evidenziato l'assenza di glucosio nel suolo Bios + G dopo 68 giorni. Ciò verifica l'ipotesi che il glucosio fosse stato completamente consumato nell'arco dei primi 68 giorni. I risultati relativi al glucosio nel microcosmo a 175 giorni sono stati nuovamente negativi, confermando la totale scomparsa del glucosio, che era stato ripristinato a 143 giorni. Per validare l'efficacia del metodo è stata fatta una prova su un campione di terreno al quale è stato aggiunto del glucosio in concentrazione pari a quella iniziale nel microcosmo Bios + G, ossia 3,7 g / kg di suolo, ottenendo un risultato corretto.

Umidità

La valutazione dell'umidità viene fatta pesando il campione, ponendolo in stufa a 105 °C fino al raggiungimento di un peso costante, per poi valutarne la differenza.

In tabella 3.7 vengono mostrati i valori di umidità, che è scesa lentamente fino ad essere ripristinata a 143 giorni, con la reintroduzione della soluzione salina.

Tabella 3.7. Percentuale di umidità nei microcosmi, misurata nel microcosmo basale

<i>Tempo (giorni)</i>	<i>% umidità</i>
<i>T5</i>	16
<i>T15</i>	14
<i>T34</i>	13

T68	12
T110	11
T135	10
T175	15

Analisi al gascromatografo

Il gascromatografo è uno strumento in cui una miscela fluida viene scomposta nelle sue componenti, sfruttando il fatto che abbiano alcune proprietà chimiche differenti. La miscela viene fatta passare in una colonna capillare (*Figura 16*) fatto di un materiale affine ai composti che si vogliono determinare, in modo tale che i composti che si desiderano determinare vengano adsorbiti sulla superficie interna della colonna. Un processo di riscaldamento controllato permette il desorbimento dei composti presenti nella miscela, un desorbimento che avviene in modo differenziale poiché ogni sostanza è più o meno affine rispetto alle altre. Per le analisi effettuate in questo lavoro è stato utilizzato un GC-FID in cui al termine della colonna, una fiamma brucia i composti in uscita, i quali liberano una certa quantità di ioni, misurati in mV tramite un detector. Un software riporta tali dati su un grafico [tempo di ritenzione / mV], detto cromatogramma. L'analisi del cromatogramma permette di avere informazioni sulle quantità relative dei componenti della miscela. Ciascuno dei picchi sul grafico rappresenta infatti una sostanza, presente nella miscela, che è stata desorbita in quel tempo di ritenzione. La quantità di tale sostanza è direttamente proporzionale all'area sottesa al picco, calcolabile con un'operazione di integrazione. In ultima istanza, per poter correlare l'area del grafico [t, mV] con la concentrazione di idrocarburo estratto con il solvente, occorre costruire una retta di taratura. Questo è stato fatto secondo la metodica descritta in appendice (paragrafo 7.4), ove è stata riportata anche la metodica di estrazione della miscela di idrocarburi dal suolo tramite solventi.



Figura 15. Interno di un gascromatografo del Politecnico di Torino. Si nota la colonna arrotolata in numerose spire.

Il gascromatografo è stato usato in questa ricerca per ottenere dati sull'effettiva biodegradazione del diesel, valutando quantitativamente la presenza di contaminante nei campioni nel tempo. Si riportano in appendice al paragrafo 7.5 alcuni dettagli sul gascromatografo e sulla procedura utilizzata.

Risultati

Dopo aver costruito la retta di taratura si possono ricavare i valori di concentrazione di diesel nei campioni provenienti dai microcosmi dall'analisi del cromatogramma. Nel nostro caso, si ha un grande picco iniziale che segnala la presenza del solvente, il quale viene desorbito per primo, a causa della sua alta volatilità, a cui seguono i picchi relativi ai diversi composti della miscela di diesel, come si può vedere in *Figura 16*.

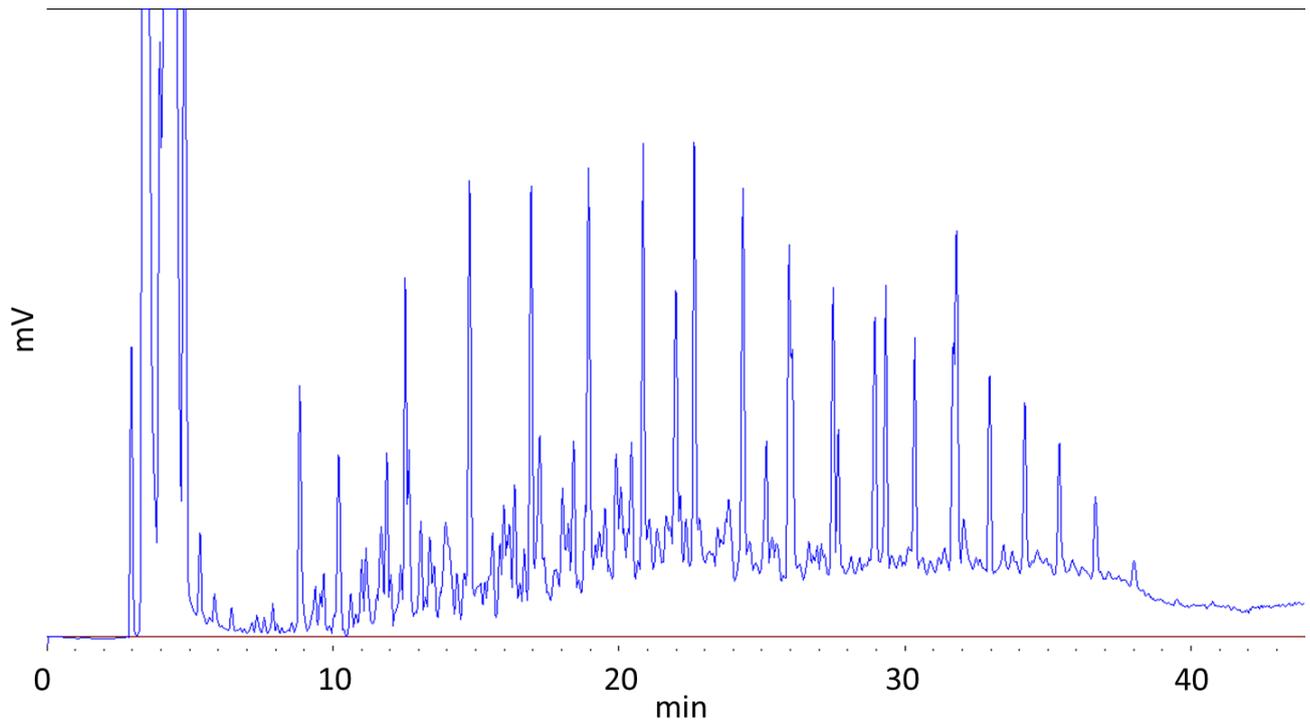


Figura 16 Esempio di un cromatogramma dato dall'estrazione del diesel con solventi

Analizzando i dati su foglio di calcolo, è stato realizzato il grafico in *Figura 17*, che mostra l'evoluzione della quantità di gasolio residua nei microcosmi-colonne ai tempi 0, 15, 68, 110, 135, 175, 203 giorni. L'integrazione è stata fatta svolgendo la sommatoria delle aree sottese a ciascun picco, considerando solamente i tempi di ritenzione da circa 6 minuti a circa 37 minuti, propri della fuoriuscita della miscela di idrocarburi.

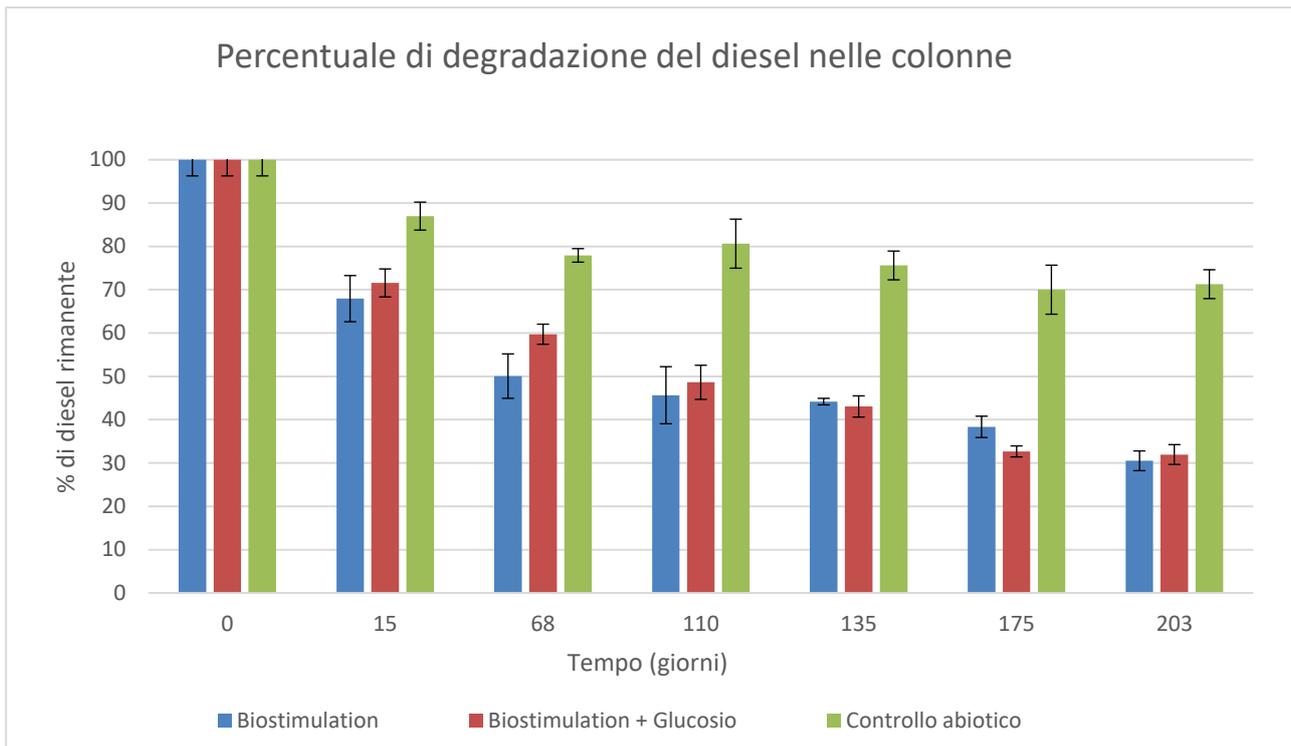


Figura 17. Percentuale di degradazione del diesel nelle colonne

Il grafico è stato realizzato in termini percentuali. Il 100% di gasolio, ossia la quantità presente al tempo 0, è pari a 75900 mg / kg di suolo. I valori scendono nel tempo, dimostrando l'efficacia della biodegradazione: i microcosmi biotici (Bios e Bios + G) presentano un tasso di scomparsa del gasolio molto più rapido rispetto al microcosmo abiotico di controllo.

Paragonando invece, secondo il proposito di valutare l'efficacia dell'aggiunta di glucosio, il microcosmo Bios e il microcosmo Bios + G, è evidente che la rapidità di degradazione sia praticamente identica. I due microcosmi degradano il primo 30% di diesel in sole due settimane, raggiungono la metà del diesel iniziale intorno ai 68 giorni, e nel punto finale, a 203 giorni, mostrano una percentuale di gasolio degradato del 70%. L'aggiunta di glucosio, anche in maggiori quantità rispetto a quanto operato da Turetta nei microcosmi-barattoli, sembra dunque una scelta inefficace ai fini di migliorare l'attività degradativa dei microorganismi.

È stato costruito un grafico simile riguardante la situazione nei microcosmi-barattoli contaminati (Figura 18).

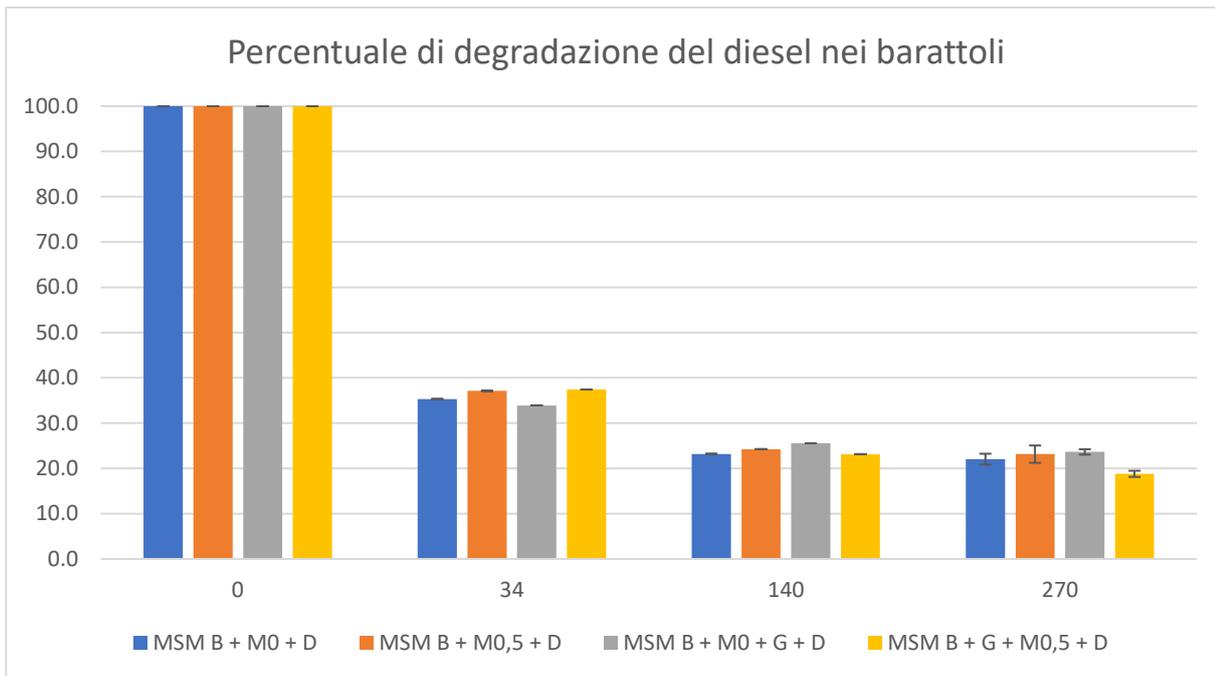


Figura 18. Percentuale di degradazione del diesel nei microcosmi-barattoli

Si osserva una rapida degradazione del diesel, ma dai 140 giorni in avanti la percentuale di gasolio residuo non varia più molto, rimanendo intorno al 20-25%. Similmente a quanto detto per l'analisi respirometrica (v. commenti alla *Figura 6*) non vi sono differenze notevoli tra la degradazione nei barattoli con glucosio o senza, e con diverso tipo di inoculo.

Confrontando i valori a 140 giorni con quelli dei microcosmi-colonne a 135 giorni si osserva che nei barattoli la degradazione è del 75% circa, mentre nelle colonne solo del 56-57%. Probabilmente la maggior biodegradazione nei barattoli è dovuta a un migliore ricambio d'aria e d'ossigeno per il minor spessore dello strato di suolo.

È stato fatto un tentativo di analisi più dettagliata dei composti residui suddividendoli in base al loro tempo di ritenzione. È stato diviso il cromatogramma di output, dai 6 ai 37 minuti, in tre intervalli di tempo uguali di circa 10 minuti ciascuno, a cui corrispondono composti a bassa ritenzione, media ritenzione e alta ritenzione. I composti ad alta ritenzione sono quelli che fanno più fatica a desorbirsi dalle pareti della colonna del gascromatografo, e quindi presumibilmente i più complessi, con un più alto peso molecolare (*Figura 19*).

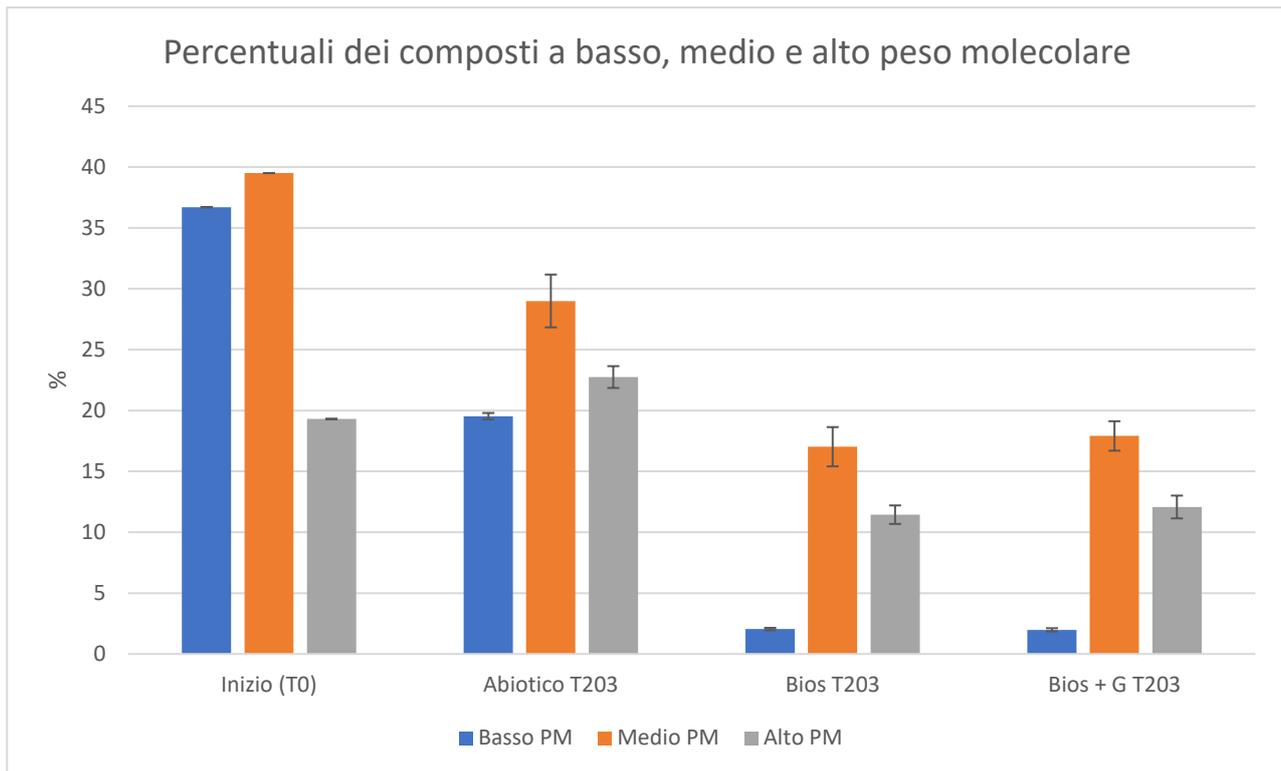


Figura 19 Evoluzione dei composti a diverso peso molecolare dalle analisi gascromatografiche.

Si nota una rapida degradazione dei composti a basso peso molecolare, più lenta invece negli idrocarburi più pesanti. Osservando i risultati relativi al microcosmo abiotico, si evince che una parte dei composti a basso peso molecolare non è stata veramente degradata dai batteri, non presenti in tale microcosmo, bensì ha subito stripping, probabilmente aiutato a causa delle operazioni di rimescolamento periodiche.

Analisi del pH

La misura del pH del suolo contenuto nelle colonne è stata fatta all'inizio dell'esperimento, a 68 e a 175 giorni, seguendo il metodo suggerito da Conyers e Davey (1988), analogamente a quanto descritto nel paragrafo 7.7.

I risultati dell'analisi del pH delle colonne sono schematizzati in tabella 3.5:

Tabella 3.5. Analisi del pH sui microcosmi-colonne

Microcosmo/pH	Iniziale	68 giorni	175 giorni
Basale	7,32	6,5	6,9
Bios 1		6,8	6,7
Bios 2		7,1	7,1
Bios + G		7,1	6,9
Controllo abiotico		7,1	7,0

Le misure del pH rivelano che l'attività batterica avviene in condizioni di neutralità, con una leggera tendenza a basificare il suolo rispetto alle condizioni iniziali. Il numero di cifre significative è diverso perché le analisi sono state svolte con due pHmetri diversi.

4. Prova di laboratorio a media scala

L'ultima parte di questo lavoro si focalizza sulla riproduzione in scala maggiore dei microcosmi realizzati precedentemente. Ovviamente, dato il gran numero di microcosmi analizzati verrà riprodotto quello con le caratteristiche di biodegradazione migliori, ossia un suolo con aggiunta di terreno salino adatto alla crescita batterica, senza aggiunta di glucosio e senza *bioaugmentation*, in modo simile a quello della colonna "Bios".

Uno degli obiettivi di questo esperimento a media scala è studiare se i dati di permittività elettrica, raccolti in continuo da una sonda geofisica collegata ad un datalogger possano essere un indice adeguato a capire lo stato di degradazione del diesel in un suolo inquinato.

Tali sistemi a media scala sono rappresentati da due colonne di plastica trasparente, identiche, alte 50 cm e dal diametro di 15 cm. In ciascuna di esse vengono messi 30 cm di suolo, che avendo una densità apparente di circa $1,62 \text{ kg/dm}^3$, corrispondono a circa 8,5 kg. Il suolo è stato preventivamente setacciato ad umido per eliminare la frazione ghiaiosa di grandezza $> 2 \text{ mm}$ e la sabbia fine $< 0,15 \text{ mm}$.

Di seguito si riporta in *Figura 20* lo schema di progetto della colonna.

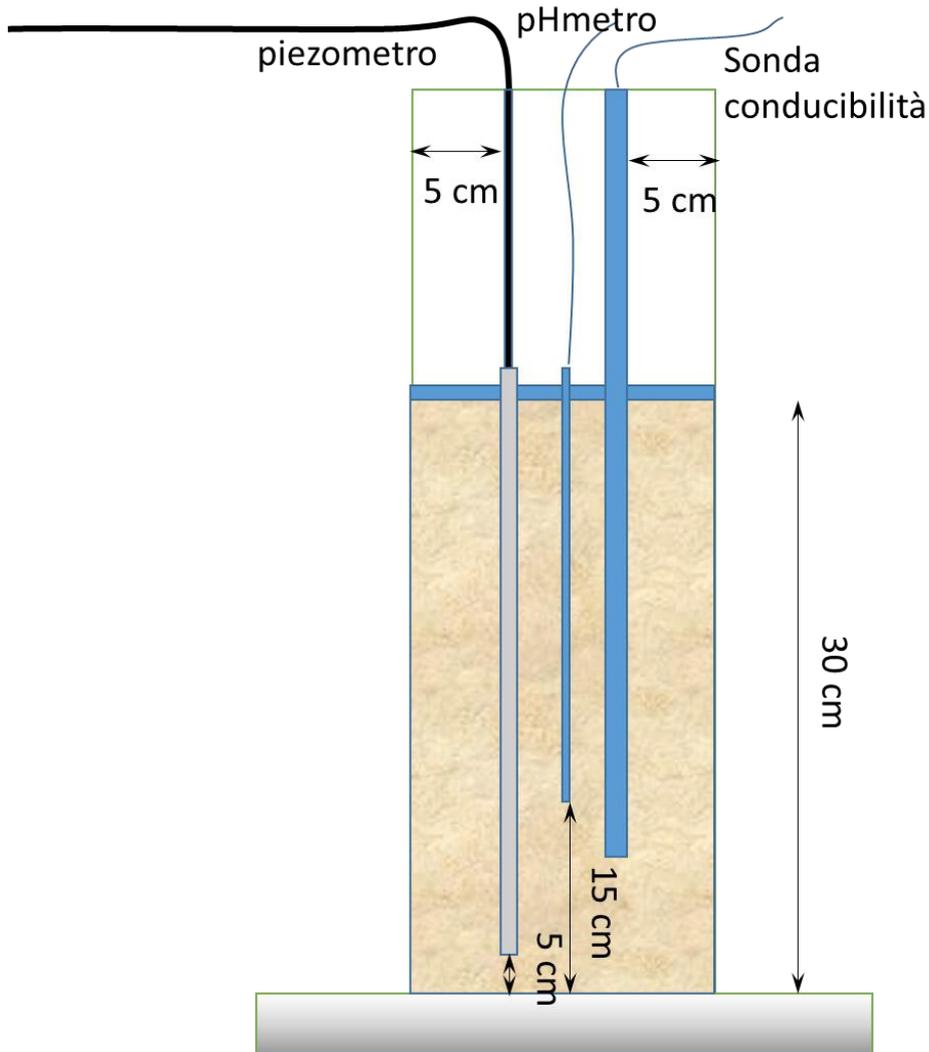


Figura 20. Disegno di progetto della colonna

Approvvigionamento di ossigeno

Un problema che può nascere in un sistema a media scala, rispetto alle colonne di minori dimensioni dei microcosmi, è quello della mancanza di ossigeno necessario per la respirazione microbica. Date le grandi dimensioni e dato la grande porzione di colonna occupata dal suolo non si può provvedere al periodico rimescolamento manuale, come fatto per i microcosmi. Si è pensato dunque di fornire ossigeno tramite insufflazione di aria, come potrebbe avvenire in un sistema di bonifica che utilizza la tecnica del *biosparging*.

È stato inizialmente posto un piezometro al centro della colonna, forato ogni 3 cm, collegato ad un piccolo compressore che pompasse nel terreno saturo l'aria proveniente dall'esterno. Il problema

principale sorto in questa configurazione è stato che l'aria, uscendo dai pori del piezometro, non aveva forza sufficiente per ossigenare tutto il suolo saturo, bensì il flusso rimaneva localizzato nelle immediate vicinanze del piezometro, creando in poco tempo un canale preferenziale di risalita delle bolle.

Anche nel caso in cui una continua insufflazione di aria avesse permesso di mantenere le condizioni di saturazione dell'ossigeno in acqua nella zona attorno al piezometro, ciò non sarebbe stato sufficiente a garantire una buona ossigenazione in tutto il sistema. È stato infatti creato un modello numerico, seguendo la legge di diffusione molecolare di Fick $\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$, e la sua soluzione $C(x, t) = C_s - (C_s - C_0) \operatorname{erf}\left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}}\right)$ (Dove C_s è la concentrazione di saturazione dell'ossigeno in acqua, C_0 la concentrazione iniziale, D la diffusività dell'ossigeno in acqua) tenendo conto della porosità del sistema, che permettesse di confrontare la perdita di ossigeno data dalla respirazione microbica e il guadagno dato dall'insufflazione dell'aria. Si osservi la *Figura 22*.

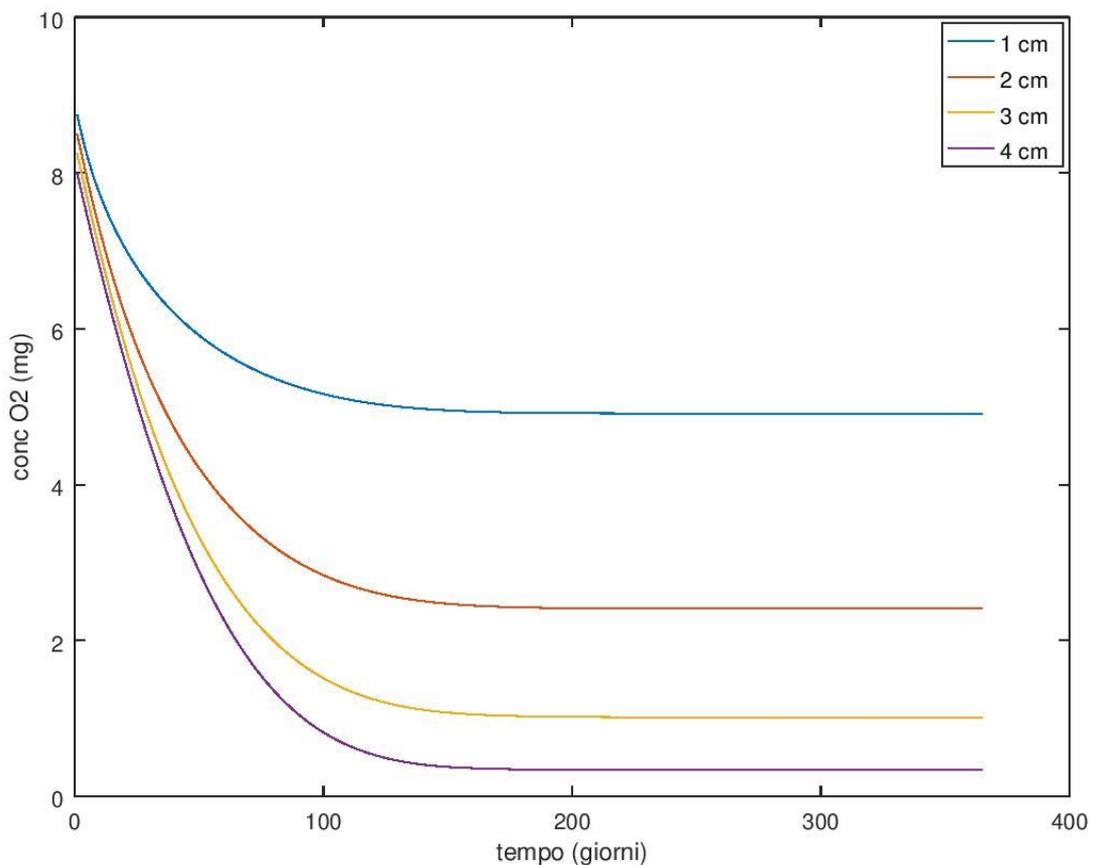


Figura 21 Modello di diffusione dell'ossigeno in una configurazione con piezometro centrale

Nel modello i dati presi in considerazione sono stati:

- Saturazione dell'ossigeno costante vicino al piezometro e pari a 9 mg / l
- Diffusività dell'ossigeno in acqua pari a $10^{-9} \text{ m}^2 / \text{s}$ (Sethi, 2012)
- Consumo di ossigeno pari a 0,15 mg / (giorno * cm^3), dato da una prima stima basata su una media delle produzioni di CO_2 del microcosmo Bios calcolata con le prove respirometriche.
- Porosità del 43 % (Turetta).

La pendenza iniziale delle curve rappresenta il consumo di ossigeno, stimato in base alle osservazioni fatte nel microcosmo BIOS. Come si vede, a distanza ravvicinata dal piezometro la diffusione molecolare permette di recuperare ossigeno, e mantenerlo ad un livello asintotico. È chiaro quanto la diffusione molecolare abbia efficacia solo nelle immediate vicinanze dell'insufflazione di aria. Se ne deduce che occorre un sistema di ossigenazione più complesso, che vada ad interessare capillarmente il suolo contenuto nella colonna, o che addirittura smuova meccanicamente i grani di suolo.

È stato perciò forato un tubo in HDPE in modo tale da creare una superficie orizzontale forata uniformemente, come si può vedere nella foto in *Figura 23*.

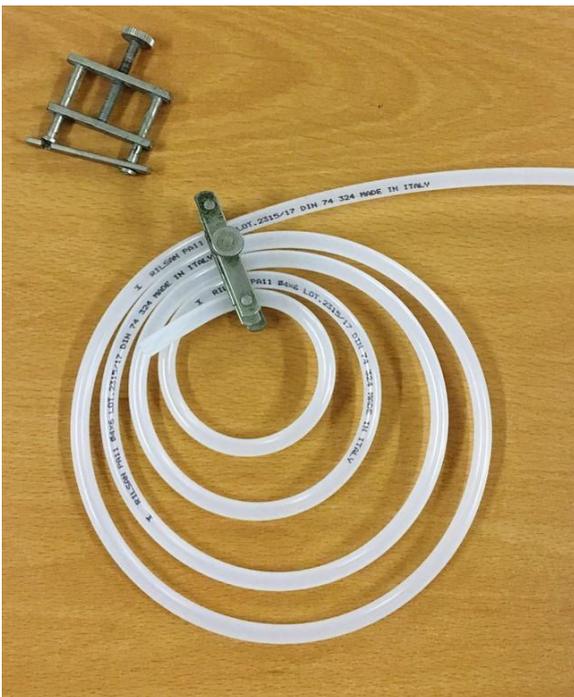


Figura 22. Sistema di insufflazione dell'aria tramite tubo forato

Al di sopra di esso è stato posto uno strato di selle, per migliorare la dispersione dell'aria nei primi strati del suolo (Figura 24)

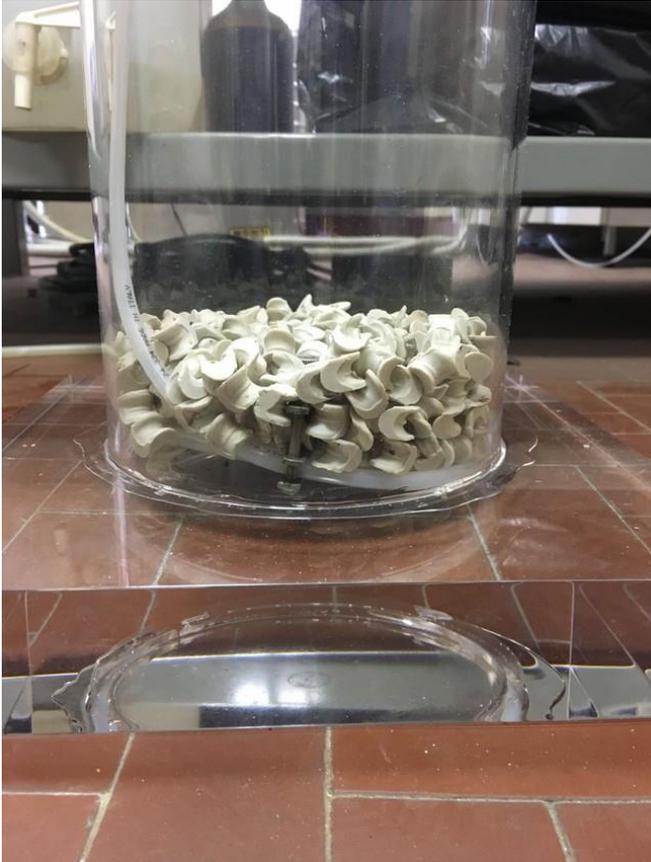


Figura 23. Le selle poste sopra il tubicino diffusore aiutano la dispersione dell'aria

Il sistema, così testato, ha permesso di rilevare un buon numero di bolle d'aria distribuite in modo abbastanza uniforme nel suolo.

5. Conclusioni

Questa tesi è parte di un progetto finalizzato a valutare l'efficacia di metodi geofisici per il monitoraggio della biodegradazione del diesel. In particolare, questa tesi ha avuto per oggetto la sperimentazione della biodegradazione del diesel a scala di laboratorio, realizzando e monitorando microcosmi diversi tra loro per poter individuare la soluzione ottimale da trasportare a scala più ampia.

Il suolo, per quanto non contaminato, è stato prelevato da un sito di interesse nazionale che nel 1994 ha subito una importante contaminazione da petrolio. Questo spiega il fatto che i microorganismi si siano rivelati essere già in parte adattati alla degradazione del diesel e, senza la necessità di operazioni di *bioaugmentation*, siano stati in grado di degradare una buona percentuale del contaminante (in 140 giorni il 75% nei microcosmi-barattoli, e in 200 giorni il 70% nei microcosmi-colonne). Si è resa tuttavia necessaria una *biostimulation*, tramite l'aggiunta di terreno salino MSMB, per il fatto che il suolo, prelevato a tre metri di profondità, è povero di nutrienti quali l'azoto. Non ha mostrato invece benefici l'aggiunta di glucosio come nutriente: quest'operazione favorisce immediatamente l'attività batterica rilevabile dalla produzione di CO₂, ma il glucosio viene consumato rapidamente e non genera un miglioramento nella degradazione del diesel, come dimostrano le prove al gascromatografo.

Dall'analisi più approfondita al gascromatografo si è evidenziato che i composti a basso peso molecolare sono stati degradati in percentuali superiori al 90% nei microcosmi-colonne, mentre quelli ad alto peso molecolare solo del 35-40%, sempre in 200 giorni. Evidentemente i batteri autoctoni, per quanto acclimatati ad una situazione di contaminazione da idrocarburi, non sono stati in grado di rimuovere efficacemente i composti più recalcitranti e meno biodegradabili. Uno sviluppo futuro può essere quello dello studio di una *bioaugmentation* specifica per la degradazione dei composti ad alto peso molecolare, se possibile a partire sempre dalla fauna microbica autoctona. Un altro studio interessante potrebbe essere mirato ad aumentare la biodisponibilità del diesel nel suolo tramite l'utilizzo di biotensioattivi.

Nel portare infine la ricerca verso scala più ampia, fino alla scala di campo, sono necessarie altre e diverse sperimentazioni, per risolvere problemi quali l'approvvigionamento di ossigeno e il controllo dei parametri fondamentali quali umidità, temperatura e pH.

6. Bibliografia

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 1995. *Toxicological profile for fuel oils*. Atlanta, GA: [U.S. Department of Health and Human Services](#), Public Health Service
- Agnello A.C., Bagard M., van Hullebusch E.D., Esposito G., Huguenot D., 2016. *Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation*. Science of the Total Environment 563–564, 693–703.
- Alkorta I., Garbisu C., 2001. *Phytoremediation of organic contaminants in soils*. Bioresource Technology, 79(3), 273–276.
- Antizar-Ladislao B., Spanova K., Beck A.J., Russell N.J., 2008. *Microbial community structure changes during bioremediation of PAHs in an aged coal-tar contaminated soil by in-vessel composting*. International Biodeterioration & Biodegradation, 61: 357-364.
- Atagana H. I., 2011. *Bioremediation of co-contamination of crude oil and heavy metals in soil by phytoremediation using Chromolaena odorata (L) King & HE Robinson*. Water, Air, & Soil Pollution, 215(1– 4), 261– 271.
- Azubuikwe C. C., Chikere C. B., Okpokwasili G. C., 2016. *Bioremediation techniques- classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects*. World J Microbiol. Biotechnol. 32:180.
- Boonsaner M., Borriukwisitsak S., Boonsaner A., 2011. *Phytoremediation of BTEX contaminated soil by Canna generalis*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 74(6), 1700– 1707.
- Bouchez T., Patureau D., Dabert P., Juretschko S., Doré J., Delgenès P., Moletta R., Wagner M., 2000. *Ecological study of a bioaugmentation failure*. Environ. Microbiol. 2, 179-190.
- Cassiani G., Binley A., Kemna A., Wehrer M., Orozco A.F., Deiana R., Boaga J., Rossi M., Dietrich P., Werban U., Zschornack L., Godio A., Gandomi A.J., Deidda G.P., 2014. *Non-invasive characterization of the Trecate (Italy) crude-oil contaminated site: links between contamination and geophysical signals*. Environ. Sci. Pollut. Res. doi: [10.1007/s11356-014-2494-7](https://doi.org/10.1007/s11356-014-2494-7)
- Chikere C.B., Okoye A.U., Okpokwasili G.C., 2016. *Microbial community profiling of active oleophilic bacteria involved in bioreactorbased crude-oil polluted sediment treatment*. J. Appl. Environ. Microbiol. 4, 1–20.
- Conyers, M. K. E Davey, B.G. 1988. *Observations on some routine methods for soil pH determination*. Soil Sci. 145 : 29 – 36.
- Dadrasnia A, Agamuthu P, 2013. *Diesel fuel degradation from contaminated soil by Dracaena reflexa using organic waste supplementation*. J. Jpn. Petrol. Inst. 56:236–243.
- Das N., Chandran P., 2011. *Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview*. Biotechnology Research International Volume 2011, Article ID 941810.
- Date, Anil W. (7 March 2011). *Analytic Combustion: With Thermodynamics, Chemical Kinetics and Mass Transfer*. Cambridge University Press. ISBN 1-107-00286-9.

Di Molfetta, Sethi, *Ingegneria degli acquiferi*. Springer, 2012.

European Environment Agency, *Progress in management of contaminated sites*. Disponibile all'indirizzo: <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/progress-in-management-of-contaminated-sites-3/assessment> . Consultato il 20/10/2018.

Gerhardt, K. E., Huang, X. D., Glick, B. R., & Greenberg, B. M., 2009. *Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges*. *Plant Science*, 176(1), 20–30.

Gomez F., Sartaj M., 2014. *Optimization of field scale biopiles for bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil at low temperature conditions by response surface methodology (RSM)*. *Int Biodeterior Biodegradation* 89:103– 109.

Haritash A.K., Kaushik C.P., 2009. *Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review*. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1), 1– 15.

Harms H., Bosma T.N.P., 1997. *Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18, 97-105.

Jacques R.J.S., Okeke B.C., Bento F.M., Teixeira A.S., Peralba M.C.R., Camargo F.A.O., 2008. *Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil*, *Bioresource Technology* 99, 2637–2643.

Khan S., Afzal M., Iqbal S., Khan Q.M., 2013. *Plant–bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils*. *Chemosphere*, 90(4), 1317– 1332.

Kabelitz N., Machackova J., Imfeld G., Brennerova M., Pieper D.H., Heipieper H.J., Junca H., 2009. *Enhancement of the microbial community biomass and diversity during air sparging bioremediation of a soil highly contaminated with kerosene and BTEX*. *Appl Microbiol Biotechnol* 82, 565–577.

Kauppi S., Sinkkonen A., Romantschuk M., 2011. *Enhancing bioremediation of diesel- fuel- contaminated soil in a boreal climate: Comparison of biostimulation and bioaugmentation*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, 359- 368.

Kirk J.L., Klironomos J.N., Lee H., Trevors J.T., 2005. *The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil*. *Environ. Pollut.* 133, 455–465.

Koenigsberg S.S., Sandefur C.A., 2008. *The Use of Oxygen Release Compound for the Accelerated Bioremediation of Aerobically Degradable Contaminants: The Advent of Time-Release Electron Acceptors*. *Remediation*, 10: 3-29. doi:[10.1002/rem.3440100103](https://doi.org/10.1002/rem.3440100103)

Lee T.H., Byun I.G., Kim Y.O., Hwang I.S., Park T.J., 2006. *Monitoring biodegradation of diesel fuel in bioventing processes using in situ respiration rate*. *Water Science and Technology*, 53(4-5):263-72.

Lim M.W., Lau E.V., Poh P.E., 2016. *A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil. Present works and future directions*. *Marine Pollution Bulletin* 109, 14-45.

Lu M., Zhang Z., Sun S., Wei X., Wang Q., & Su Y., 2010. *The use of goosegrass (Eleusine indica) to remediate soil contaminated with petroleum*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 209(1– 4), 181– 189.

Merkel N., Schultze-Kraft R., Infante C., 2005a. *Phytoremediation in the tropics— influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids*. *Environmental Pollution*, 138(1), 86– 91.

Ministero delle politiche agricole e forestali, *Decreto Ministeriale del 13/09/1999, Approvazione dei "Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo"*, disponibile all'indirizzo: <http://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/1999/10/21/099A8497/sg>

Mishra S., Jyot J., Kuhad R.C., Lal B., 2001. *Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil*. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1675-1681.

Mukherjee A.K., Bordoloi N.K., 2011. *Bioremediation and reclamation of soil contaminated with petroleum oil hydrocarbons by exogenously seeded bacterial consortium: a pilot-scale study*. Environ. Sci. Pollut. Res. 18, 471-478.

Mulligan C.N., 2005. *Environmental applications for biosurfactants*. Environ. Pollut. 133, 183–198

Mustafa Y.A., Abdul-Hameed H.M., Razak Z.A., 2015. *Biodegradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid contaminated soil in a roller slurry bioreactor*. Clean-Soil Air Water 43, 1115–1266.

Palanisamy N., Ramya J., Kumar S., Vasanthi N. S., Chandran P., Khan S., 2014. *Diesel biodegradation capacities of indigenous bacterial species isolated from diesel contaminated soil*. Journal of Environmental Health Science & Engineering, 12:142.

Panagos P., Van Liedekerke M., Yigini Y., Montanarella L., 2013. *Contaminated sites in Europe: review of the current situation based on data collected through a European network*. Journal of Environmental and Public Health. Article ID 158764.

Pandey B., Fulekar M.H., 2012. *Bioremediation technology: A new horizon for environmental clean-Up*. Biology and Medicine, 4 (1): 51-59.

Park G., Shin H.-S., Ko S.-O., 2005. *A laboratory and pilot study of thermally enhanced soil vapor extraction method for the removal of semi-volatile organic contaminants*. J. Environ. Sci. Health 40, 881–897.

Paudyn K., Rutter A., Rowe R.K., Poland J.S., 2008. *Remediation of hydrocarbon contaminated soils in the Canadian Arctic by landfarming*. Cold Reg Sci Technol 53, 102–114.

Pirastu R., Pasetto R., Zona A., et al., 2013. *The Health Profile of Populations Living in Contaminated Sites: Sentieri Approach*, Journal of Environmental and Public Health, vol. 2013, Article ID 939267.

Potin O., Rafin C., Veignie E., 2004. *Bioremediation of an aged polycyclicaromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2004, 54(1): 45– 52.

Rando, Isabel & Andromalos, Ken & Spillane, Vincent, 2015. *Vertical barrier containment system using jet-grouting and pre-grouting technologies at a groundwater contaminated site*. 10.13140/RG.2.1.4810.3768.

Sherwood M.K., Cassidy D.P., 2014. *Modified Fenton oxidation of diesel fuel in arctic soils rich in organic matter and iron*. Chemosphere 113, 56–61.

Sierra-Garcia I.N., de Oliveira V.M., 2013. *Microbial Hydrocarbon Degradation: Efforts to Understand Biodegradation in Petroleum Reservoirs*. <http://dx.doi.org/10.5772/55920>.

Shukla K.P., Singh N.K., Sharma S., 2010. *Bioremediation: Developments, Current Practices and Perspectives*. Genetic Engineering and Biotechnology Journal, Volume 2010: GEBJ-3

Szulc A., Ambrozewicz D., Sydow M., Lawniczac L., Piotrowska-Cyplik A., Marecik R., Chrzanowski L., 2014. *The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies*. Journal of Environmental Management 132, 121-128.

Truchet G., Roche P., Lerouge P., Vasse J., Camut S., de Billy F., Promé J.-C., Dénarié J., 1991. *Sulphated lipo-oligosaccharide signals of Rhizobium meliloti elicit root nodule organogenesis in alfalfa*. Nature 351, 670– 673.

Turetta A., 2017. *Utilizzo di metodi biologici a scala di laboratorio per la bonifica di terreni inquinati da idrocarburi*. Tesi di laurea magistrale, Politecnico di Torino.

Ulrici W., 2000. *Contaminant soil areas, different countries and contaminant monitoring of contaminants*. Environmental Process II. Soil Decontamination Biotechnology, H. J. Rehm and G. Reed, Eds., vol. 11, pp. 5–42.

Visca P., Imperi F., Lamont I.L., 2007. *Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance*. Trends Microbiol. 15, 22–30.

Wagner-Döbler I., 2003. *Microbial inoculants: snake oil or panacea?* In: Head I.M., Singleton I., Milner M.G., *Bioremediation: a Critical Review*. Horizon Scientific Press, Wymondham, Norfolk, pp. 259-289.

Xu Y., Zhou N., 2017. *Microbial remediation of aromatics-contaminated soil*. Front. Environ. Sci. Eng. 2017, 11(2): 1.

Yan G., Cai B., Chen C., Yue Y., Wang Q., Deng H., Liu S., Guo S., 2015. *Bioremediation of Crude Oil Contaminated Soil*. Petroleum Science and Technology, 33:717–723.

Yenn R., Borah M., Deka Boruah H. P., Sarma Roy A., Baruah R., Saikia N., Sahu O. P., Tamuli A. K., 2014. *Phytoremediation of abandoned crude oil contaminated drill sites of Assam with the aid of a hydrocarbon-degrading bacterial formulation*. International Journal of Phytoremediation 16, 909–925.

Zhang Z., Zhou Q., Peng S., Cai Z., 2010. *Remediation of petroleum contaminated soils by joint action of Pharbitis nil L. and its microbial community*. Science of the Total Environment 408, 5600–5605

Zhang X., Xu D., Zhu C., Lundaa T., Scherr K.E., 2012. *Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading Pseudomonas aeruginosa strains*. Chem. Eng. J. 209, 138–146.

Zhao S., Ramette A., Niu G.L., Liu H., Zhou N.Y., 2009. *Effects of nitrobenzene contamination and of bioaugmentation on nitrification and ammonia-oxidizing bacteria in soil*. FEMS Microbiology Ecology 70(2): 315–323.

7. Appendice

In questa appendice al lavoro della tesi vengono descritte nel dettaglio le metodologie utilizzate per svolgere gli esperimenti e le analisi più importanti, in modo tale che esse siano riproducibili nella maniera più fedele, ai fini di un possibile confronto con i risultati ottenuti.

7.1. Composizione del terreno salino MSMB

Tabella 7.1. Composizione del terreno salino MSMB

Composto	Concentrazione (g/L)
NH_4NO_3	3
KH_2PO_4	0,5
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,008
$\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,002
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,002
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,002
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0002
NaCl	1 mM

7.2. Titolazione acido-base

La titolazione acido-base è stata svolta manualmente, utilizzando una soluzione basica (NaOH 1,5 M) e una acida (HCl 1,5 M), secondo il metodo modificato di Alef (1995). La metodica è descritta di seguito.

- In ogni microcosmo viene posto un piccolo contenitore in plastica di circa 50 ml di capacità. In esso vengono versati 25 ml di una soluzione di NaOH 1,5 M. La CO₂ prodotta dall'attività microbica viene assorbita dalla soluzione.
- I microcosmi vengono sigillati ermeticamente, per impedire alla CO₂ prodotta dall'attività microbica di uscire dal sistema.
- Ogni 3-4 giorni si apre il microcosmo, si estrae il contenitore della soluzione e si può procedere con la titolazione. Per svolgere la titolazione occorre aggiungere alla soda estratta dal microcosmo poche gocce di fenolftaleina (disciolta in etanolo), una sostanza di colore rosa che a pH neutro diventa trasparente, e alcune di cloruro di bario 1 N, che serve per avere una migliore percezione del cambio di colore della fenolftaleina.
- Tramite una buretta si immette una quantità di soluzione di acido cloridrico tale da far avvenire il viraggio della soluzione da rosa a bianco-trasparente. Il sistema deve essere in agitazione per permettere una veloce diffusione dell'acido.
- Misurando la quantità di HCl consumati si calcola quanta CO₂ (mg) è stata prodotta dai microorganismi tramite la formula: $CO_2 = f * (V_0 - V)$, dove:
V₀ è il volume di soluzione di soda utilizzata (25 ml);
V è il volume di HCl necessario per portare la soluzione a pH 7, espresso in ml;
f è un fattore di conversione, uguale a 22 * M, dove M è molarità della soluzione titolante.
- Dopo la sperimentazione, occorre rimescolare con un cucchiaino il contenuto del microcosmo per assicurare una buona ossigenazione del sistema.

Vengono riportati inoltre alcuni dettagli sulla preparazione corretta della soluzione di soda:

- La soluzione di soda, poiché deve assorbire CO₂ di produzione microbica, deve essere preparata e maneggiata in modo tale che non venga in contatto con l'anidride carbonica prima del previsto.

- L'acqua utilizzata per preparare la soluzione, per quanto sia acqua distillata, contiene in sé della CO₂ disciolta, perciò è una buona procedura far bollire l'acqua per circa un'ora affinché l'anidride carbonica evapori.

7.3. Preparazione delle colture microbiche in capsula di Petri

Le conte microbiche sono state effettuate su Agar-Malto, un terreno ricco, con la seguente composizione:

- 20g/l di glucosio, (nutriente principale);
- 20g/l di estratto di malto (fonte di azoto);
- 2 g/l di peptone;
- 20 g/l di agar (gelificante).

Le piastre sono state preparate inserendo 50 mg di suolo in una capsula di Petri, a cui vengono aggiunti 100 microlitri di acqua sterile. All'interno delle piastre si miscelano il suolo e l'acqua con un'ansa sterile e 20 ml di terreno Agar-Malto sterilizzato viene versato al di sopra del suolo. La conta delle colonie è stata effettuata dopo 3 giorni.

7.4. Estrazione degli idrocarburi residui dal suolo

Per l'estrazione degli idrocarburi si parte da campioni di suolo di 2 g. L'estrazione avviene in soluzione di acetone-esano (1:1 v/v) con un rapporto di 1g suolo : 15 ml di solvente.

La miscela di suolo e solventi viene posta in vessel con chiusura ermetica e posti in forno a microonde. È stato utilizzato un forno microonde programmabile Milestone.

L'estrazione con solvente è stata svolta seguendo il metodo EPA 3546, che prevede il riscaldamento del campione in tre fasi:

- 15' riscaldamento
- 10' isoterma a 110°C
- 20' raffreddamento

Dopo la fase di estrazione il solvente deve essere depurato delle particelle di suolo in sospensione per cui viene utilizzato un filtro a trottola in teflon con porosità di 0,45 μm .

Per ciascun campione di suolo sono state fatte due repliche di estrazione, in modo tale da poter mediare i risultati ottenuti al gascromatografo.

7.5. Analisi al gascromatografo – retta di taratura

Si riportano alcune informazioni sul gascromatografo e sull'analisi effettuata:

- Temperatura iniettore: 220 °C
- Temperatura detector: 280 °C
- Programma di riscaldamento: 50°C per 1 min, rampa a 8°C/min fino a 320°C e 320°C per 10 minuti.
- Tipo di colonna: DB-5, lunghezza 30 m; \varnothing 0,53; spessore film interno 1,5 μm .
- Carrier gas: elio

La retta di taratura è una curva che correla l'area sottesa dai picchi del cromatogramma e la concentrazione di sostanza nel solvente. Come regola generale, in questa ricerca la retta di taratura è stata ricalcolata ad ogni serie di campioni; inoltre per ciascuna serie di campioni sono state fatte 3 repliche, sia dei campioni che della retta di taratura, e infine mediati i risultati.

Per la retta di taratura vengono preparate 5 soluzioni a concentrazione (mg diesel / kg solvente) nota. Il primo campione contiene solo solvente, e gli altri contengono 4 diverse diluizioni di diesel commerciale uguale a quello inserito nei microcosmi. Il solvente è, come descritto prima, una miscela di esano e acetone a pari volume. Si fanno le analisi al gascromatografo come descritto sopra e si individua la parte di grafico che interessa la fuoriuscita del diesel, tralasciando invece il picco legato all'iniziale fuoriuscita di solvente e eliminando la coda finale.

Aiutandosi con un foglio di calcolo si ottiene facilmente la somma delle aree della parte di grafico selezionata: questa è proporzionale alla concentrazione di diesel nella soluzione. Ripetendo questo

calcolo per i 5 campioni, si può costruire un grafico che metta in relazione la concentrazione (nota) di ciascun campione e il valore misurato (l'area sottesa), come mostrato in *Figura 24*.

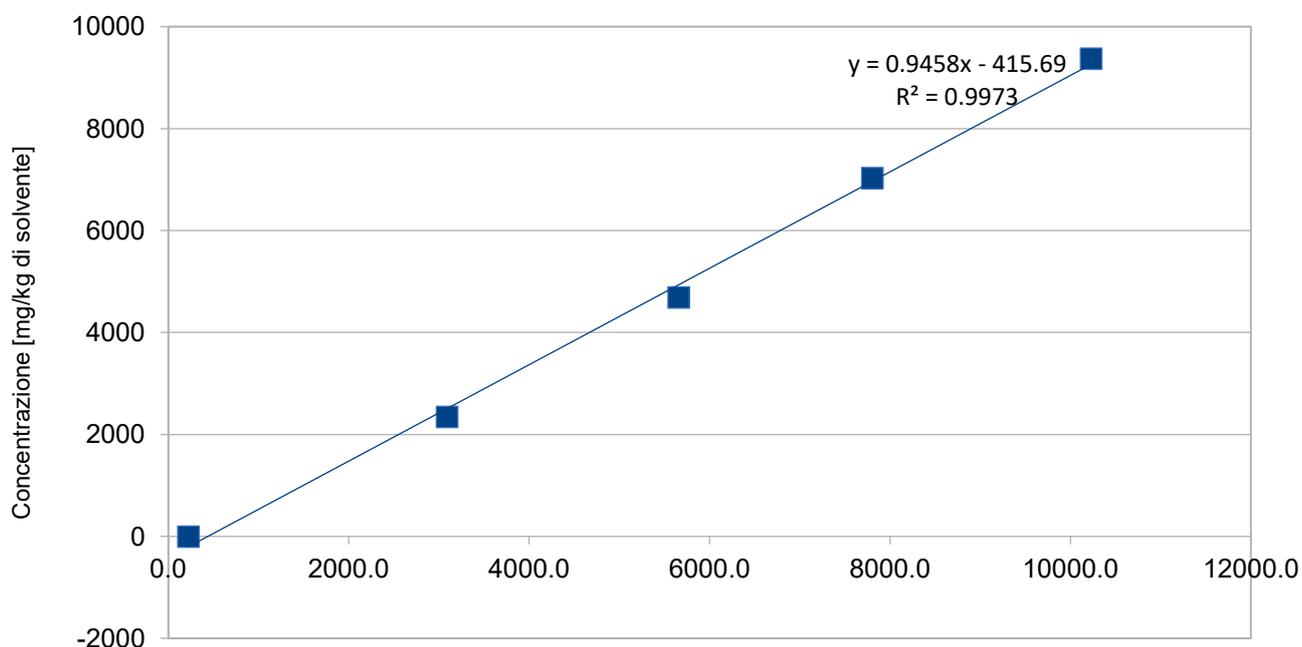


Figura 24. Esempio di retta di taratura di un gascromatografo.

L'equazione lineare, in questo caso abbastanza precisa, come si può notare dal fattore di correlazione R^2 , si può utilizzare per ricavare il valore di concentrazione diesel / solvente dei campioni ottenuti con le estrazioni dal suolo dei microcosmi.

7.6. Metodo di valutazione del glucosio

Kit D-Glucose

Il kit D-Glucose (prodotto da Boehringer Mannheim / R-biopharm) si basa sull'aggiunta di enzimi, finalizzata a generare reazioni stechiometricamente note con il glucosio. Esse portano infatti alla formazione di composti che fanno aumentare, in modo apprezzabile tramite lo spettrofotometro, l'assorbanza della soluzione ad una specifica lunghezza d'onda.

Le reazioni chimiche catalizzate dagli enzimi sono le seguenti:

- In presenza dell'enzima esochinasi (HK) e dell'adenosina-5-trifosfato (ATP), il D-glucosio viene fosforilato a D-glucosio-6-fosfato (G-6-P) e l'ATP diventa adenosina-5-difosfato (ADP).
- In presenza dell'enzima D-glucosio-6-fosfato-deidrogenasi, il G-6-P viene ossidato dal nicotinamide adenina dinucleotide fosfato (NADP) in D-gluconato-6-fosfato. Avviene contemporaneamente anche la riduzione del NADP in NADPH.

La quantità di NADPH formato è stechiometricamente proporzionale alla quantità di glucosio, e può essere osservata allo spettrofotometro a causa della sua assorbanza a 334, 340 e 365 nm.

Come conferma della validità del metodo, il test è stato effettuato anche su un campione di suolo con concentrazione di glucosio pari a quella iniziale dei microcosmi con esito positivo.

Spettrofotometro

Lo spettrofotometro è uno strumento che misura l'assorbanza, a diverse lunghezze d'onda, di una soluzione, che viene posta in un piccolo contenitore trasparente, detto cuvetta. La cuvetta viene attraversata da un fascio luminoso diffratto in una lunghezza d'onda desiderata, e dietro di essa un sensore rileva l'energia luminosa incidente. Poiché la cuvetta e la soluzione in essa contenuta assorbono una parte della luce, lo spettrofotometro può apprezzare una differenza tra energia luminosa emessa ed energia luminosa rilevata. Tale differenza è misurata come assorbanza, e inviata a un sistema di elaborazione del segnale

A causa dell'intrinseca assorbanza della cuvetta, la quale genera un errore sistematico nella lettura dello strumento, occorre misurare anche un "bianco", ossia il valore di assorbanza di una cuvetta vuota o riempita con acqua distillata. Il valore reale di assorbanza della soluzione è il valore misurato meno il valore di assorbanza del "bianco".

Il dato di assorbanza si può ricondurre ad un valore di concentrazione grazie alla validità della legge di Lambert e Beer, secondo cui l'assorbanza $A = \epsilon bC$, dove ϵ è l'assorbività molare, parametro proprio di ciascuna specie chimica, b è il cammino ottico, e C la concentrazione. Grazie alla legge lineare di Lambert e Beer si può tracciare una retta di taratura mediante l'osservazione dell'assorbanza di almeno tre soluzioni di riferimento a concentrazione nota, e ad essa riferire le successive osservazioni dei campioni.

7.7. Misurazione del pH

È stata preparata la soluzione salina estraente, miscelando 100 ml di acqua e 0,219 g di CaCl_2 esaidrato, alla quale è stato successivamente aggiunto il suolo, seguendo il procedimento di estrazione descritto:

- Si preparano quattro provette di egual dimensioni, le prime due contenenti ciascuna 10 g di terreno e 25 ml di soluzione salina, le altre 10 g di terreno e 25 ml di acqua deionizzata. (rapporto soluzione-suolo 1:2,5)
- Si chiudono le provette e si agitano per due ore: è stato utilizzato un Rotator Drive STR4 Stuart Scientifica prodotto da LAISS.
- Si lasciano sedimentare per alcuni minuti.

Completata la procedura di estrazione si può misurare il pH con un misuratore elettrodoico (pHmetro), dopo aver controllato la calibrazione dello strumento.

Sull'utilizzo della soluzione estraente di CaCl_2 , viene citato il testo del DM del 13/09/99.

“La misura del valore di pH in soluzione di CaCl_2 è, con molta probabilità, il metodo più usato per definire il grado di reazione del suolo. Infatti, come riportato da Peech (1965), da Conyers e Davey (1988), in presenza di calcio cloruro, il valore di pH:

- non risulta influenzato, entro certi limiti, dal rapporto suolo: soluzione;
- è praticamente indipendente da limitata concentrazione di sali solubili;
- corrisponde con buona approssimazione al grado di reazione accertato in pieno campo per i suoli coltivati;
- non risente degli errori dovuti al potenziale di giunzione liquida, tenuto conto che la sospensione resta flocculata;
- è praticamente coincidente per i campioni umidi e secchi all'aria;
- non varia anche dopo prolungata conservazione del campione secco all'aria.”

7.8. Misurazione dell'alcalinità

L'estrazione è avvenuta con rapporto suolo - acqua deionizzata 1:5, secondo la procedura descritta nel paragrafo 7.7 dell'appendice.

Lo strumento titolatore automatico utilizzato ha un elettrodo che misura in continuo il pH, mentre un dosatore immette gradualmente nella provetta una soluzione di acido solforico 0,05 M. Il sistema è impostato in modo tale da leggere la quantità di titolante necessaria affinché la soluzione raggiunga, se ciò è possibile, pH 8,3 ("primo punto titolante"), pH al quale sono presenti in egual quantità carbonati e bicarbonati. La soluzione viene quindi portata a pH 4,5 ("secondo punto titolante"), in cui sono presenti in egual quantità bicarbonati e acido carbonico.

Nota la quantità di titolante utilizzata e la sua molarità, e noto il volume di soluzione, lo strumento ricava direttamente l'alcalinità, dopo aver compensato automaticamente la misura a 25 °C

7.9. Misurazione dell'ammonio

La misurazione dell'ammonio è stata svolta seguendo il kit dell'ammonio della NANOCOLOR, secondo le fasi descritte di seguito:

- Estrazione come descritta nel paragrafo 7.7, con soluzione di CaCl_2 e rapporto suolo-soluzione 1:10.
- Si prendono 20 ml di estratto e si mettono in un matraccio da 25 ml, quindi si aggiunge 1 ml di reagente R1, una soluzione 2-5 % di idrossido di sodio, e si porta a volume con acqua distillata.
- Si aggiunge una pastiglia di reagente R2, contenente sodio nitroprussiato 5-33 % e acido dicloroisocianurico 10-20%. Si agita il matraccio. Se la soluzione vira verso il verde, ciò segnala la presenza di ammonio.
- Si procede costruendo la retta di taratura, preparando quattro soluzioni 0,1, 0,5, 1 e 2 mg/l tramite una soluzione standard dell'ammonio (1000 mg/l).
- Si possono misurare allo spettrofotometro i campioni, facendo 2 repliche. Se è necessario, si può procedere con una diluizione. La lunghezza d'onda a cui svolgere le misurazioni è 690 nm.

7.10. Misurazione dei nitrati

La misurazione dei nitrati è stata svolta seguendo il kit "Nitrati Z" della NANOCOLOR, secondo la metodica descritta di seguito:

- Estrazione come descritta nel paragrafo 7.7, con soluzione di CaCl_2 e rapporto suolo-soluzione 1:10.
- Si prendono 20 ml di estratto e si mettono in un matraccio da 25 ml, quindi si aggiunge 1 ml di reagente R1, una soluzione 20-50 % di acido acetico, e si porta a volume con acqua distillata.
- Si aggiunge un misurino di reagente R2, contenente acido sulfanilico 80-100 %. Si agita il matraccio.
- Si procede costruendo la retta di taratura, preparando quattro soluzioni 0,5, 1, 2 e 5 mg/l utilizzando una soluzione standard dei nitrati (1000 mg/l).
- Si possono misurare allo spettrofotometro i campioni, facendo 2 repliche. Se è necessario, si può procedere con una diluizione. La lunghezza d'onda a cui svolgere le misurazioni è 520 nm.

7.11. Analisi dei solfati

- L'estrazione viene svolta come nel paragrafo 7.7, con acqua deionizzata e rapporto suolo- H_2O 1:5.
- Si mettono in un becher 10 ml di estratto e si aggiungono 500 μl di un reattivo per solfati, contenente alcool, glicerina, HCl e NaCl.
- Si aggiungono 2 cucchiaini di cloruro di bario. Il bario reagisce con i solfati producendo solfato di bario, un sale insolubile che precipita e viene tenuto in sospensione dalla glicerina.
- Si agita per un minuto, si aspettano 10 minuti prima di fare l'analisi allo spettrofotometro.
- La retta di taratura viene fatta con quattro soluzioni 1, 5, 10 e 50 mg/l utilizzando una soluzione standard dei solfati (1000 mg/l).
- Si possono misurare allo spettrofotometro i campioni, facendo 3 repliche. Se è necessario, si può procedere con una diluizione. La lunghezza d'onda a cui svolgere le misurazioni è 420 nm.

7.12. Analisi dei cloruri

- L'estrazione viene svolta come nel paragrafo 7.7, con acqua deionizzata e rapporto suolo-H₂O 1:5.
- Si mettono in un becher 10 ml di estratto e si aggiungono 2 ml di un reattivo, contenente ferro.
- Si aggiunge 1 ml di tiocianato di mercurio (Hg(CNS)₂). I cloruri del campione si legano al mercurio con la reazione $2\text{Cl}^- + \text{Hg}(\text{SCN})_2 \rightarrow \text{HgCl}_2 + \text{SCN}^-$
- Il tiocianato quindi si può legare al ferro secondo la reazione $\text{SCN}^- + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{FeSCN}^{2+}$ virando verso un colore rosso.
- La retta di taratura viene fatta con quattro soluzioni 0,1, 0,5, 1 e 5 mg/l utilizzando una soluzione standard dei cloruri (1000 mg/l).
- Si misurano allo spettrofotometro i campioni, facendo 3 repliche. Si può fare una diluizione, se necessario. La lunghezza d'onda a cui svolgere le misurazioni è 463 nm.

7.13. Caratteristiche dei microcosmi-barattoli

Tabella 7.13 Caratteristiche principali dei microcosmi-barattoli

Denominazione del microcosmo	Terreno salino per la crescita batterica	Glucosio	Diesel	Inoculo di biomassa
MSMB + M0,5 (Controllo biotico)	X			X
MSMB+ G + M0 (Controllo biotico)	X	X		X
MSMB + G + M0,5	X	X		X

(Controllo biotico)				
MSMB + M0 + D	X		15 g	X
MSMB + M0,5 + D	X		15 g	X
MSMB + G + M0 + D	X		15 g	X
MSMB + G + M0,5 + D	X		15 g	X
Controllo abiotico				

8. Ringraziamenti

Desidero innanzitutto ringraziare la professoressa Ruffino per il tempo dedicato alla mia tesi, e per gli importanti consigli e incoraggiamenti. Ringrazio il professor Godio, la professoressa Bosco e la professoressa Chiampo per avermi guidato nelle scelte durante lo svolgimento del lavoro.

Ringrazio di cuore la dottoressa Chiara Mollea e il dottor Diego Franco che mi hanno seguito da vicino, e in particolare la dottoressa Annalisa Casale, che ha lavorato con me tutto questo tempo ed è stata molto disponibile durante la stesura finale.

Ringrazio la mia famiglia e i miei amici. Non c'è bisogno che faccia nomi tanto lo sapete che è grazie a voi tutti che la mia vita è vita.