

Università degli Studi di Pisa
Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali



Tesi di laurea in Scienze e Tecnologie per l'Ambiente ed il
Territorio

Utilizzo del compost nel processo di biorecupero di suoli
contaminati da idrocarburi: valutazione dei parametri chimici
e biologici

Relatore

Prof. Alessandro Saviozzi

Candidato

Marco Cozzolino

ANNO ACCADEMICO 2005-2006

Alla Mia Famiglia

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 Premessa	1
1.2 L'inquinamento da idrocarburi	4
1.2.1 Diffusione degli idrocarburi nel suolo	7
1.3 La contaminazione dei suoli:	11
1.3.1 Normative comunitarie	11
1.3.2 Normative italiane.....	13
1.4 Tecniche di risanamento dei suoli inquinati	17
1.4.1 Trattamenti chimici e fisici	20
1.4.2 Trattamenti biologici - Bioremediation.....	24
1.4.3 Il tessuto enzimatico del suolo	32
1.5 Utilizzo del compost nel processo di biorecupero	34
1.6 Scopo della tesi	36
2. MATERIALI E METODI.....	37
2.1 Schema di lavoro.....	37
2.2 Materiali.....	42
2.2.1 Suolo	42
2.2.1.2 Suolo sterilizzato.....	42
2.2.2 Compost	43
2.2.3 Idrocarburi.....	44
2.3 Metodi analitici	45
2.3.1 Analisi del suolo.....	45
2.3.1.1 Tessitura	45
2.3.1.2 Calcare	47
2.3.1.3 Capacità idrica massima.....	47
2.3.2 Analisi chimiche	49
2.3.2.1 Idrocarburi totali (TPH)	49
2.3.2.2 pH.....	51

2.3.2.3 Carbonio Organico Totale.....	52
2.3.3 Analisi biochimiche	54
2.3.3.1 Lipasi.....	54
2.3.3.2 Deidrogenasi	55
2.3.4 Analisi biologiche	58
2.3.4.1 Attività respiratoria	58
2.3.4.2 ATP	59
2.4 Analisi statistica	62
3.RISULTATI E DISCUSSIONE.....	63
3.1 Evoluzione dei parametri chimici	63
3.1.1 Idrocarburi totali (TPH)	63
3.1.2 pH.....	69
3.1.3 Carbonio organico.....	72
3.2 Evoluzione dei parametri biochimici	74
3.2.1 Lipasi.....	74
3.2.2 Deidrogenasi	77
3.3 Evoluzione dei parametri biologici	80
3.3.1 Attività respiratoria del terreno	80
3.3.2 ATP.....	84
4. CONCLUSIONI.....	86
5. BIBLIOGRAFIA	87
6.RINGRAZIAMENTI	94

1. INTRODUZIONE

1.1 Premessa

Uno dei maggiori problemi dei Paesi industrializzati riguarda il rilascio di sostanze chimiche pericolose e tossiche che vengono a contatto con le varie matrici ambientali, quali acqua, aria e suolo, alterandone il loro naturale equilibrio. Tra le varie sostanze, i prodotti petroliferi e i loro derivati risultano largamente utilizzati soprattutto come carburanti per veicoli e come combustibili per riscaldamento. In Italia solo nel 2002, sono state prodotte e importate 170885 kt di olio combustibile e ben 6671 kt di gasolio (APAT, 2002).

Ogni volta che tali sostanze vengono stoccate trasportate o trasferite, accidentalmente possono contaminare, oltre all'atmosfera e all'idrosfera, anche il suolo sia negli strati superficiali che in quelli profondi, fino ad interessare eventuali falde idriche. Da qui nasce l'esigenza in primo luogo di preservare il suolo in tutte le sue parti da rilasci puntuali e localizzati e da eventi cronici, il cui rilascio avviene attraverso varie fonti sparse sul territorio, quali perdite incontrollate da serbatoi, cisterne, oleodotti e autobotti; in secondo luogo è necessario sviluppare metodologie necessarie a decontaminare l'ambiente. Qualsiasi metodologia utilizzata per il recupero dei siti interessati da una tale emergenza deve rispondere ad alcuni requisiti quali costi operativi relativamente contenuti rispetto ai benefici conseguibili, semplicità

operative, applicabilità ad aree più vaste possibili ed infine alta efficienza nella rimozione degli inquinanti.

Un'area interessata da un evento inquinante può essere trattata, dopo le debite valutazioni preliminari (pianificazione delle indagini, previsione dell'evoluzione dell'inquinamento e ottimizzazione delle risorse economiche) con 2 strategie principali di intervento:

- messa in sicurezza permanente del sito, attraverso interventi atti a isolare in maniera definitiva le fonti inquinanti, qualora non si proceda alla rimozione degli inquinanti pur applicando le migliori tecnologie disponibili;

- bonifica del sito vera e propria, costituita dagli interventi atti a ridurre le concentrazioni degli inquinanti nelle varie matrici ambientali interessate (suolo, falde e aria), riportandole fino alle concentrazioni del fondo naturale o a livelli idonei all'uso più sensibile del territorio.

I principali interventi attraverso cui un suolo può essere decontaminato sono fisici, chimici e biologici.

I processi fisici prevedono tecnologie che hanno come scopo quello di separare, isolare o concentrare le sostanze inquinanti; tra i più comuni vi sono il deposito in discarica e la termodistruzione (con temperature di esercizio fino a 1500-2000°C). Quest'ultima ha costi molto elevati ed è fonte di inquinamento atmosferico, risultando perciò poco compatibile dal punto di vista ambientale nonostante comporti un'efficace distruzione dei composti inquinanti.

I processi chimici invece prevedono l'introduzione di sostanze ossidanti nel suolo contaminato, che rendono meno tossici gli inquinanti o li immobilizzano.

Infine i processi biologici sfruttano le capacità degradative dei microrganismi, in particolare funghi e batteri, nei confronti dei composti organici, trasformandoli in composti meno tossici. In quest'ottica si

colloca il biorisanamento (bioremediation), definito come l'utilizzo di organismi viventi per rimuovere gli inquinanti ambientali dal suolo, dall'acqua e dall'aria; i composti organici sono così metabolizzati in condizioni aerobiche o anaerobiche attraverso processi biochimici espletati dai microrganismi, che portano alla formazione di composti quali anidride carbonica e acqua (Sarkar *et al.*, 2005).

1.2 L'inquinamento da idrocarburi

I prodotti petroliferi vengono prodotti per distillazione frazionata del petrolio grezzo a differenti temperature e pressioni e sono costituite da miscele complesse di centinaia o migliaia di molecole organiche, soprattutto idrocarburi. In tali composti gli atomi di C sono legati tra loro a formare catene aperte o chiuse ad anello, mentre i restanti elettroni di valenza, non impegnati nei legami C-C, sono utilizzati per i legami con gli atomi di H.

Tra i prodotti petroliferi rientrano, oltre alle benzine, anche il cherosene e i combustibili per aviogetti, i gasoli, gli oli combustibili, gli oli lubrificanti, i bitumi e i loro derivati. Ciascuno di essi possiede un numero caratteristico di atomi di carbonio, ha un intervallo tipico di temperatura di distillazione, presenta percentuali variabili di composti aromatici, quali ad esempio monociclici della benzina come i BTEX (benzene, toluene, etilbenzene e xilene) e idrocarburi policiclici aromatici più complessi (IPA), costituiti da fenantrene, benzo(a)pirene e naftalene. In Tabella 1.1 sono sintetizzate le caratteristiche dei prodotti petroliferi principali.

Il gasolio, in particolare, viene utilizzato come combustibile nei motori Diesel ed è una miscela complessa di idrocarburi, ottenuta per distillazione e raffinazione frazionata del petrolio grezzo, avente un numero di atomi di C compresa tra 10 e 22 ($C_{10}-C_{22}$), con intervallo di distillazione di 150-400 °C; il suo aspetto è di liquido limpido con odore caratteristico, ha densità di 820-855 Kg/m³ (a 15°C), punto di ebollizione compreso tra 160 e 370 °C, mentre la temperatura di infiammabilità è di 55 °C e viene classificato secondo la CE come composto nocivo (Xn).

	n° atomi di C per molecola	Temperatura di distillazione (°C)	Idrocarburi alifatici	BTEX	Aromatici complessi (IPA)
Benzina	4-12	30-210	X	X	
Cherosene (combustibili e carburanti aviogetti)	11-13	150-250	X	X	X
Gasolio (combustibili e carburanti Diesel)	12-20	160-400			X
Oli combustibili pesanti	18-25	315-540	X		X
Oli lubrificanti	20-40	425-540	X		X

Tabella 1.1 – Principali prodotti petroliferi (adattata da EniTecnologie e AgipPetroli, 2001).

L'inquinamento da idrocarburi interessa varie matrici ambientali (aria, acqua e suolo) e per ciascuna di essa segue vari percorsi in cui giocano un ruolo chiave le caratteristiche chimiche e chimico-fisiche di ciascuno composto.

Gli idrocarburi incombusti sono responsabili dell'inquinamento atmosferico e la loro presenza nell'aria è dovuta anche a perdite accidentali che si verificano durante le fasi di trasporto, distribuzione e trattamento. Tra i composti di maggiore interesse vi sono il benzene, i cui gravi effetti sulla salute umana interessano vari apparati (cardiovascolare, nervoso, digerente e cutaneo), gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), in particolare il benzo(a)pirene, che sono cancerogeni e che derivano, oltre

che dalla combustione dei motori in cattivo stato, dalle raffinerie e dagli impianti petrolchimici.

L'inquinamento da idrocarburi della matrice acqua, principalmente dell'ambiente marino, è legato a contaminazioni accidentali o sistematiche: le prime, che coinvolgono anche grandi quantità di petrolio, sono da ricollegare a incidenti in navigazione (collisioni, incagliamenti, incendi, esplosioni, naufragi) con ingenti danni nei confronti degli ecosistemi marini e litorali; quelle sistematiche sono invece da ricondurre alle operazioni di lavaggio delle cisterne effettuate dalle petroliere in mare aperto, dilavamento degli oli minerali dispersi nell'ambiente, perdite di raffinerie o di impianti di trivellazione in mare aperto. A questo proposito si ricordino gli incidenti verificatisi negli ultimi decenni: nel marzo 1967 la Torrey Canyon si arenò a largo della Cornovaglia, la Exxon Valdez che nel 1989 contaminò la baia di Prince William, in Alaska, la Haven che naufragò a largo delle coste genovesi, la petroliera Erika che nel 1999 si spezzò in due al largo della costa atlantica francese, il naufragio della Jessica a largo delle Galapagos nel 2001 e infine quello della Prestige vicino alle coste spagnole della Galizia (La Repubblica, 2002).

1.2.1 Diffusione degli idrocarburi nel suolo

I meccanismi principali attraverso cui gli idrocarburi possono contaminare gli strati superficiali del suolo sono svariati: il trasporto eolico e la lisciviazione con possibilità di penetrazione nel sottosuolo.

A partire dal piano campagna e procedendo in profondità si individuano diverse zone che per le loro caratteristiche granulometriche e strutturali determinano differenti meccanismi di contaminazione. Fra queste vi sono (Raffaelli e Raimondi, 1998):

- il suolo vegetale, contenente aria e poca acqua dovuta alle occasionali infiltrazioni;
- la zona insatura o areata, in cui i pori tra i granuli del suolo sono maggiormente occupati dall'aria e in parte dall'acqua che percola verso il basso;
- la zona satura o acquifero, in cui i pori tra i granuli del suolo sono totalmente occupati dall'acqua;
- la frangia capillare, che si trova al di sopra del livello freatico e in cui i pori tra i granuli del suolo sono parzialmente occupati dall'acqua;
- zona impermeabile, costituita da rocce o suolo impermeabile, che ostacola il flusso verso il basso dell'acqua.

Seguendo il percorso di un prodotto petrolifero liquido dalla superficie verso il sottosuolo, si notano vari processi legati essenzialmente alle caratteristiche di ciascun composto della miscela di idrocarburi; difatti i componenti più leggeri LNAPLs (Light Non Aqueous Phase Liquids), a differenza dei DNAPLs (Dense Non Aqueous Phase Liquids), possono evaporare e diffondersi negli interstizi, mentre le frazioni più solubili in acqua possono interagire con l'acqua, e dopo solubilizzazione, diffondersi sia nella falda che nel suolo. Un'altra frazione può rimanere intrappolata

negli interstizi non essendo miscibile con l'acqua e infine un'ultima frazione può essere biodegradata da parte dei microrganismi.

Vari parametri giocano un ruolo chiave nel comportamento di questi inquinanti nel suolo (Zerlia, 2001a):

- la solubilità in acqua, S_w che varia sensibilmente tra tutti i composti organici ma che in generale diminuisce al crescere del numero di sostituenti saturi legati agli anelli aromatici e dei doppi legami e si attesta su valori compresi tra 0,001 e 100 g/l; quelli con valori più alti si allontanano più facilmente dalla fonte inquinante passando nella fase acquosa.

- Il coefficiente di ripartizione K_{OC} , cioè il coefficiente di adsorbimento di un composto da parte della sostanza organica, che esprime la tendenza di un composto ad essere adsorbito dalla frazione colloidale del suolo; questo parametro viene comunemente espresso come: $K_{OC} = K_d * 100 / (OC\%)$, dove K_d è il coefficiente di distribuzione ed è inversamente proporzionale alla mobilità del composto e vale $K_d = C_s / C_w$, dove C_s è la concentrazione del composto nel suolo e C_w è la concentrazione del composto nella soluzione circolante all'equilibrio; $OC\%$ rappresenta invece la percentuale di carbonio organico presente nel suolo. Bassi valori di K_{OC} , inferiori a 150, determinano la scarsa tendenza del composto a rimanere nel suolo, favorendo il processo di lisciviazione, mentre valori più elevati, intorno a 5000, determinano una trascurabile mobilità, provocandone l'adsorbimento sulla frazione organica.

- Il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua K_{OW} , cioè il rapporto tra la concentrazione molare di un soluto nei due liquidi immiscibili ottanolo e acqua descritto da:

$$K_{OW} = C_{\text{soluto in ottanolo (moli/l)}} / C_{\text{soluto in acqua (moli/l)}}$$

Solitamente valori elevati di K_{OW} corrispondono a sostanze più solubili in ottanolo che in acqua, perciò più idrofobe; valori di $\log K_{OW} > 5$ indicano sostanze tanto idrofobe (liofile) da accumularsi completamente nella parte lipidica del sistema biologico e/o nel materiale organico presente, mentre questo non avviene per bassi valori questo non avviene.

- La costante di Henry H_i , si esprime attraverso il rapporto fra la fase gassosa (la pressione parziale) e acquosa (la concentrazione molare) di un composto all'equilibrio; descrive perciò la ripartizione di un composto organico fra la fase gassosa e la soluzione acquosa e viene perciò comunemente espressa come: $H_i = P_i / C_i$, dove P_i = pressione parziale del componente -iesimo sopra la soluzione liquida (atm), H_i è la costante di Henry per il componente -iesimo ($\text{atm} \cdot \text{m}^3 / \text{mol}$) e C_i è la concentrazione del componente -iesimo nella soluzione liquida (mol / m^3).

Per valutare e prevedere il comportamento dei composti idrocarburici costituenti i prodotti petroliferi è necessario valutare le caratteristiche chimico-fisiche di ciascun composto, che sono riportate in Tabella 1.2.

Non potendo seguire il comportamento di ogni singolo componente di una miscela di idrocarburi, un fenomeno di contaminazione da prodotti petroliferi di vario genere viene valutato con un dato complessivo, definito TPH (Total Petroleum Hydrocarbons), che spesso viene incontrato in letteratura concentrandosi su un set di contaminanti indicatori (chemical of concern) scelti come rappresentativi delle proprietà chimico-fisiche delle varie classi di composti (Nocentini *et al.*, 2000; Namkoong *et al.*, 2002; Rivera-Espinoza e Dendooven, 2004; Boopathy, 2004; Bento *et al.*, 2005; Sarkar *et al.*, 2005).

Composto	Solubilità in acqua a 25 °C (mg/l)	Coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua (log K_{ow})	Coefficiente di adsorbimento nella sostanza organica (log K_{oc})	Costante di Henry H (m³-atm/mol)
Benzene	1750	2,13	1,58	5,5E-03
Toluene	535	2,73	2,48	6,6E-03
Etilbenzene	152	3,13	3,04	8,7E-03
Xileni	146-198	3,26	2,38-2,79	o-xilene: 5,1E-03
MTBE	48.000	1,06-1,30	1,08	1,0E-03
Etanolo	1.000.000	-0,032	0,34	
Pirene	0,132	4,88	4,58	
Benzo(a)pirene	0,0012	5,98	5,59	1,0E-04
Antracene	0,045	4,45	4,15	
Fenantrene	1,0	4,46	4,15	
Naftalene	31,0	3,28	3,11	1,15E-03

Tabella 1.2 – Caratteristiche chimico-fisiche dei principali composti indicatore nell'inquinamento da petrolio (Adattata da Zerlia, 2001b).

1.3 La contaminazione dei suoli:

1.3.1 Normative comunitarie

In accordo con le ultime stime potrebbero essere più di 2 milioni i siti in tutta l'Unione Europea potenzialmente contaminati da sorgenti puntuali, di cui circa 100.000 necessitano di risanamento; i siti che presentano le maggiori concentrazioni di inquinanti si trovano intorno a zone industriali dell'Europa Nord-Occidentale, in particolare Gran Bretagna, Francia, Belgio, Olanda, Germania e Italia (European Environment Agency, 2005).

Da stime effettuate a livello comunitario, soltanto sul territorio nazionale italiano i siti potenzialmente contaminati ammonterebbero a 12.000 (APAT, 2004).

Le scarse attenzioni rivolte nel passato verso la gestione delle attività antropiche ha fatto sì che fosse sempre più pressante l'esigenza di adottare, sia a livello comunitario che nazionale, norme che garantissero la bonifica e il risanamento delle varie matrici ambientali coinvolte in aree inquinate (suolo, sottosuolo, acque superficiali e profonde), talvolta compromesse anche in modo irreversibile.

A livello comunitario, il problema della contaminazione dei suoli ha assunto una notevole importanza grazie a episodi sempre più frequenti e vasti. È scaturita perciò, da parte degli Stati Membri, dalla Commissione delle Comunità Europee (CE) e dall'Agenzia Europea per l'Ambiente (EEA), l'esigenza di trovare soluzioni riguardanti il problema dell'inquinamento e del risanamento del territorio; così nel 1994 nasce un progetto finanziato dalla CEE per la stima dei rischi determinati dai siti contaminati denominata "Azione Concertata sull'Analisi di Rischio dei Siti Contaminati" (CARACAS), indirizzato su sette tematiche:

tossicologia umana, analisi di rischio ecologico, destino e trasporto dei contaminanti, indagini ed analisi dei siti, modelli, valori guida e metodologie di analisi e rischio.

Le direttive che hanno fatto da precursori dei regolamenti attualmente vigenti nel nostro Paese sono state da un lato quelle relative ai rifiuti (Direttive 91/56/CEE), ai rifiuti pericolosi (Direttive 91/689/CEE) e agli imballaggi e ai rifiuti da imballaggio (Direttive 94/62/CEE), mentre dall'altro è entrata in vigore la direttiva sulla prevenzione e riduzione integrate sull'inquinamento (Direttiva 96/61/CEE¹), più nota col termine IPPC. Attraverso quest'ultima direttiva sono stati definiti gli obblighi di un impianto industriale riguardo a scarichi in acqua, nell'aria e nei suoli, la produzione di rifiuti, lo spreco di energia e di acqua; inoltre gli Stati Membri risultano responsabili del controllo delle conformità degli impianti, in modo particolare sull'istituzione di una procedura di domanda, rilascio e aggiornamento delle autorizzazioni di esercizio e l'istituzione dei requisiti minimi da includere in qualsiasi autorizzazione.

¹ Direttiva 96/61/CEE del 24.09.96, *sulla prevenzione e la riduzione integrate dell'inquinamento*, in G.U.C.E. L257 del 10.10.1996

1.3.2 Normative italiane

I provvedimenti legislativi che hanno maggiormente contribuito ad aumentare la sensibilità verso le problematiche di bonifica e ripristino ambientale di siti contaminati sono stati in primo luogo il Decreto Legislativo n° 22 del 1997², in particolare con l'art. 17 e successive modifiche, che ha introdotto a livello nazionale il tema dei siti inquinati e della loro bonifica, successivamente disciplinati dal Decreto Ministeriale n° 471 del 25 ottobre 1999³, recante indicazioni sia tecniche che procedurali.

Con l'art. 17 del decreto "Ronchi" viene per la prima volta definito il concetto di bonifica, inteso come inserimento di limiti di accettabilità, normato da specifiche norme tecniche e sono fissati gli obblighi dei soggetti titolare dei siti inquinati, le competenze in materia di approvazione e controllo degli interventi di bonifica in un sito, i sistemi di garanzia di natura reale e patrimoniale di cui possono beneficiare le Amministrazioni Pubbliche per attuare gli interventi. Grazie a questo decreto legislativo viene individuato chiaramente l'oggetto a cui devono essere applicate le operazioni di risanamento e il soggetto responsabile di tali operazioni. Inoltre, qualora i responsabili non provvedano al ripristino ambientale ovvero non siano individuabili, l'autorità pubblica competente (Comune o Regione) si deve far carico degli interventi di bonifica.

Con l'entrata in vigore del D.M. n° 471 del 25 ottobre 1999 si è passati all'attuazione tecnica del decreto "Ronchi", definendo in maniera

² Decreto Legislativo 5.02.97, n. 22, *Attuazione delle direttive 91/156/CEE sui rifiuti, 91/689/CEE sui rifiuti pericolosi e 94/62/CE sugli imballaggi e sui rifiuti di imballaggio*, pubblicato in G.U. n. 38 del 15 febbraio 1997.

³ Decreto Ministeriale 25.10.99 n. 471, *Regolamento recante criteri, procedure e modalità per la messa in sicurezza, la bonifica e il ripristino ambientale dei siti inquinati, ai sensi dell'art. 17 del decreto legislativo 5.2.1997 n. 22, e successive modificazioni ed integrazioni*, pubblicato in G.U. n.293 del 15.12.1999.

puntuale, oltre agli aspetti amministrativi e procedurali, anche quelli tecnici delle attività di bonifica.

Per evitare errate interpretazioni, nel Decreto Ministeriale vengono definiti termini tecnici quali: sito, sito inquinato, sito potenzialmente inquinato, inquinamento diffuso, campione di fondo naturale e in maniera inequivocabile vengono individuate varie tipologie di interventi:

- **messa in sicurezza d'emergenza**: ogni intervento necessario ed urgente, in attesa degli interventi di bonifica e ripristino ambientale o interventi di messa in sicurezza permanente per rimuovere le fonti inquinanti e contenere la loro diffusione;

- **bonifica**: insieme degli interventi atti a ridurre la concentrazione delle sostanze inquinanti nel suolo, nel sottosuolo, nelle acque superficiali o sotterranee ad un livello uguale o inferiore ai valori di concentrazione limite accettabili;

- **bonifica con misure di sicurezza**: insieme degli interventi atti a ridurre la concentrazione delle sostanze inquinanti nel suolo, sottosuolo e nelle acque, a concentrazioni superiori rispetto a quelle stabilite per la specifica destinazione d'uso, qualora i valori limite non possano essere raggiunti neppure con l'applicazione delle migliori tecnologie a costi sopportabili; i valori di concentrazione residua devono garantire la salute umana e la protezione dell'ambiente e sono determinati attraverso una metodologia di analisi di rischio riconosciuta a livello internazionale;

- **ripristino ambientale**: gli interventi di riqualificazione ambientale e paesaggistica, che rappresentano il completamento degli interventi di bonifica nei casi in cui sia richiesto, che consentano di recuperare il sito alla effettiva e definitiva fruibilità per la destinazione

d'uso conforme agli strumenti urbanistici in vigore, assicurando la salvaguardia della qualità delle matrici ambientali;

- **messa in sicurezza permanente**: l'insieme degli interventi atti ad isolare in modo definitivo le fonti inquinanti, qualora queste ultime siano rappresentate da rifiuti stoccati e non sia possibile procedere alla rimozione degli stessi pur applicando le migliori tecnologie a costi sopportabili.

Viene poi presa in considerazione la problematica relativa ai costi sopportabili in relazione ai livelli di concentrazione raggiungibili dopo un intervento di bonifica mentre nel caso di **impianti di esercizio** si intendono quelli che non determinano un arresto prolungato delle attività produttive.

Gli allegati che completano il decreto sono 5 e riguardano:

- i valori dei limiti di accettabilità riferiti al suolo, sottosuolo e dalle acque sotterranee (All. 1);
- le procedure di riferimento per il prelievo e l'analisi dei campioni di suolo, delle acque superficiali e sotterranee (All. 2);
- i criteri generali per gli interventi di messa in sicurezza d'emergenza, di bonifica e di ripristino ambientale, per le misure di sicurezza e messa in sicurezza permanente e per gli interventi in cui si faccia ricorso all'utilizzo di batteri (All. 3);
- i criteri generali per la redazione dei progetti di bonifica (All. 4);
- i modelli attraverso i quali la pubblica amministrazione certifica l'avvenuta bonifica o la messa in sicurezza permanente (All. 5).

Recentemente poi, con l'art.18 della Legge n° 179 del 2002⁴, che introduce norme specifiche per la valorizzazione dei siti inquinati, la politica del recupero dei siti che in passato hanno ospitato insediamenti produttivi attualmente dismessi o sotto utilizzati definiti col termine “brownfields”, ha avuto un ulteriore sviluppo; ne sono esempio le aree di Sesto San Giovanni a Milano, Porto Marghera a Venezia, l'area di Campi a Genova, Bagnoli a Napoli (APAT, 2006).

⁴ Legge 31 luglio 2002, n.179, *Disposizioni in materia ambientale*, pubblicato in G.U. n. 189 del 13-8-2002

1.4 Tecniche di risanamento dei suoli inquinati

La necessità di bonificare i siti contaminati da sostanze chimiche tossiche e pericolose, ha permesso lo sviluppo di tecnologie che favorissero la totale eliminazione o la parziale rimozione degli inquinanti dalla matrice ambientale interessata. Come già accennato, le tipologie di interventi di bonifica sono tre se raggruppati in base alle tecniche che sono impiegate: fisici, chimici e biologici.

Qualora invece prevedano o meno la rimozione del suolo interessato da fenomeno di contaminazione, possono essere suddivisi in interventi *in situ* (se prevedono il trattamento del suolo o del sottosuolo direttamente sul posto senza la necessità di escavazione) o *ex situ* (se il suolo interessato viene rimosso o movimentato, ed è definito *on site* qualora il trattamento avvenga nell'area in cui si effettua lo scavo, oppure *off site* se il materiale è avviato negli impianti di trattamento autorizzati o in discarica). Le principali tecnologie di bonifica possono poi essere ulteriormente suddivise in tre gruppi in base al tipo di azione esercitata sui contaminanti:

- I. separazione e concentrazione: il composto inquinante viene prima separato dalla matrice (suolo o acqua), successivamente concentrato e infine destinato ad un trattamento finale;
- II. trasformazione: il contaminante, attraverso opportune reazioni chimiche o biologiche, viene convertito in un composto meno pericoloso o innocuo rispetto a quello originario;
- III. immobilizzazione/inertizzazione: l'inquinante viene reso innocuo tramite la formazione di prodotti molto poco solubili, oppure viene inglobato in una matrice che ne impedisce il movimento e la diffusione.

La scelta della tecnologia più opportuna è determinata da numerosi fattori, sia di tipo tecnico sia di tipo economico e legale, e ciascuno di essi assume un ruolo più o meno predominante rispetto agli altri anche se a volte è utile utilizzare congiuntamente varie tecniche a causa della contemporanea presenza di composti di natura differente (idrocarburi, metalli pesanti, pesticidi, ...); qui di seguito vengono sommariamente esposti (EniTecnologie e AgipPetroli, 2001).

1- Fattori legati alla natura dell'inquinante:

- la resistenza all'attacco microbiologico, che ne determina la biodegradabilità;
- le caratteristiche chimico-fisiche che caratterizzano la mobilità e la persistenza dei composti nei suoli; seguendo questi criteri si possono individuare classi omogenee di inquinanti come, per esempio, volatili, semivolatili o non volatili;
- la forma in cui l'inquinante è presente, se adsorbita sul suolo, disciolta nelle acque o come prodotto libero negli spazi interstiziali tra le particelle di suolo;
- la tossicità degli inquinanti, che determina le misure di prevenzione e sicurezza durante le operazioni di bonifica.

2- Fattori legati al sito:

- il comparto interessato al fenomeno di inquinamento (suolo saturo, suolo insaturo, falda);
- la facilità di accesso al sito, l'estensione della zona contaminata, la disponibilità di infrastrutture e la prossimità di insediamenti;

- il tipo di suolo (permeabilità, omogeneità), le caratteristiche desiderate del suolo a fine trattamento, il volume di materiale da trattare, lo spazio disponibile per il trattamento.

3- Fattori legati alla tecnologia:

- i limiti di efficacia del metodo di trattamento, il livello di sviluppo e di confidenza delle tecnologie applicabili;
- la presenza di effetti indesiderati collaterali al trattamento, quali rumore, cattivi odori, produzione di polveri e vibrazioni, mobilitazione di sostanze inquinanti;
- il rischio di incidenti associato al metodo di trattamento in relazione al sito.

4- Fattori di tipo economico:

- il valore del sito prima e dopo il trattamento, il costo del trattamento, il tempo disponibile per la bonifica, i costi di trasporto e dei macchinari, il costo del monitoraggio e delle analisi, l'affidabilità dei sub-appaltatori,...;
- il costo associato alla eventuale mancata produzione.

Tutte le considerazioni tecnico-economiche devono poi soddisfare i vincoli di tipo legislativo: criteri di bonifica, obblighi contrattuali, tipo di sviluppo e di uso finale del sito.

1.4.1 Trattamenti chimici e fisici

Vi sono molte metodologie utilizzate che si basano su principi di tipo chimico, soprattutto reazioni *redox*, e di tipo fisico; di seguito viene fornita un breve descrizione delle principali tecniche di bonifica spiegando il principio che sta alla loro base.

Soil vapor extraction: denominata anche soil vapor stripping, o in situ vacuum extraction, prevede l'applicazione di aria compressa attraverso i pozzi di iniezione, che permette di trascinare i contaminanti sotto forma di vapore e gas verso i pozzi di estrazione ai quali è stato applicato il vuoto; difatti nella zona insatura viene applicata una differenza di pressione rispetto a quella atmosferica che provoca oltre ad un flusso di gas nel sottosuolo, una perturbazione dei gas interstiziali progressivamente sostituiti da aria. I gas estratti dai pozzi possono essere ulteriormente trattati mediante assorbimento su carbone attivo, incenerimento, ossidazione catalitica, o semplicemente per condensazione. Si adatta ad una vasta gamma di composti organici volatili, specialmente quelli con tensione di vapore superiore a 0,5 mmHg (a 20°C) e con costante di Henry superiore a $0,001 \text{ m}^3 \cdot \text{atm} / \text{mol}$.

Soil washing: è una tecnica che si basa sulla separazione del contaminante dalla matrice attraverso un processo di lavaggio in soluzione acquosa. Le tappe del processo sono: escavazione del suolo, rimozione dei detriti, aggiunta di acqua ed agenti per l'estrazione, filtrazione e lavaggio. Ci sono due modi di rimozione dei contaminanti: per dissoluzione o sospensione degli stessi nella soluzione acquosa o per concentrazione degli stessi attraverso separazione per gravità.

L'acqua contaminata proveniente dal processo è trattata con le tecnologie adattabili alle sostanze pericolose presenti; è applicabile con successo alle seguenti classi di inquinanti: composti organici semi-volatili, combustibili, metalli pesanti, oltre che a composti organici volatili e ai pesticidi.

Estrazione con solvente: si basa sull'estrazione chimica e si differenzia dalla tecnica di Soil Washing, che usa acqua o una soluzione acquosa arricchita con additivi; prima dell'estrazione sono previsti degli stadi di separazione fisica per suddividere il suolo in frazioni granulometriche, in quanto la frazione più fine contiene la maggior parte del contaminante. L'estrazione con solvente è comunemente usata in combinazione con altre tecnologie, come Solidificazione/Stabilizzazione, Incenerimento, o Soil Washing in funzione delle condizioni sito-specifiche. Al termine dell'estrazione, tracce di solvente possono impregnare la matrice trattata, quindi si deve tener conto della tossicità del solvente usato. Una volta che il suolo trattato rispetta i valori standard richiesti potrebbe essere riposto in sito; è efficace per il trattamento di suoli, sedimenti e fanghi contaminati da PCB, composti organici volatili, solventi alogenati e derivati del petrolio.

Incenerimento: è una tecnica di tipo termico di bonifica che consente la decontaminazione di suoli inquinati da sostanze organiche, in particolare a composti alogenati volatili, alogenati semivolatili, non-alogenati volatili, non-alogenati semivolatili, PCB, pesticidi, diossine e furani, cianuri organici, organici corrosivi. Gli inquinanti sottoposti a temperature superiori di 500 °C, in presenza di ossigeno, vengono sottoposti a volatilizzazione, combustione e distruzione.

Air sparging: con questa tecnica aria viene iniettata attraverso dei pozzi situati fin sotto al livello di falda, provocando la volatilizzazione per risalita degli inquinanti, che possono essere così captati da un sistema di estrazione dei vapori al di fuori della zona contaminata; fra i composti a cui tale tecnologia può essere applicata vi sono gli idrocarburi, i composti organici volatili, i composti organici alogenati e non alogenati.

Dual phase extraction: permette la simultanea eliminazione di inquinanti, sia in fase vapore che acquosa, presenti nella zona satura e in quella insatura; prevede l'abbassamento della falda attraverso una pompa sommersa, che provoca un aumento dello spessore della zona insatura dove vengono così vaporizzate le sostanze inquinanti tra cui idrocarburi, composti volatili alogenati e non alogenati.

Solidificazione/stabilizzazione: questa tecnica impiega cementi idraulici, gesso, silicati, calce o altri materiali che legano i contaminanti in una matrice solida così da poter riutilizzare il materiale inertizzato come materiale edilizio o di riempimento della pavimentazione stradale oppure essere destinato al deposito in discarica. La stabilizzazione prevede invece il contatto con sostanze chimiche che riducano la mobilità degli inquinanti; tali tecniche sono adatte per tutti gli inquinanti inorganici.

Desorbimento termico: prevede la separazione dei contaminanti organici dalla matrice interessata attraverso il riscaldamento della stessa che avviene tra 200 °C e 600°C con vari modi; gli inquinanti, resi volatili, sono trasportati ad una apposita sezione di trattamento tramite il vuoto o un gas di trasporto. Tra gli inquinanti a cui tale metodologia viene applicata vi sono: composti organici volatili non alogenati, semi-volatili

combustibili, composti policiclici aromatici, PCB, pesticidi erbicidi e combustibili.

1.4.2 Trattamenti biologici - Bioremediation

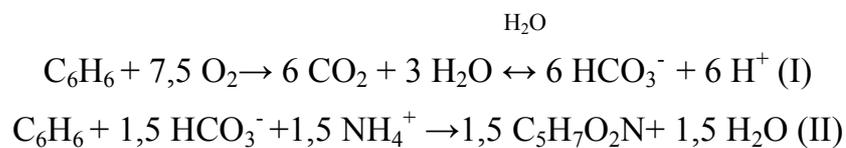
L'utilizzo di tecniche di bonifica che prevedono l'utilizzo di organismi viventi per rimuovere i contaminanti, in special modo idrocarburi, dalle varie matrici ambientali è stato studiato fino alla fine degli anni '40 ma non ha avuto un consistente sviluppo fino all'incidente della petroliera Exxon Valdez nel 1989. Da quel momento in poi questa tecnica di recupero dei suoli contaminati ha visto un largo sviluppo poiché maggiori vantaggi rispetto alle altre:

- non vengono introdotte o prodotte altre sostanze tossiche o nocive;
- bassi costi e semplicità d'esercizio;
- maggior velocità di decontaminazione rispetto alla naturale attenuazione degli inquinanti.

I principali artefici della degradazione delle sostanze contaminanti sono batteri, attinomiceti, lieviti, muffe, alghe e protozoi, che formano una complessa comunità di microrganismi che di per sé sono già presenti nel suolo, inteso come ecosistema; essi utilizzano i contaminanti come fonte di nutrienti (carbonio, azoto, fosforo e zolfo) e di energia, degradando gli inquinanti organici in molecole meno complesse, rendendole così innocue. In quest'ottica la *bioremediation* può essere definita come l'uso di microrganismi o processi microbiologici per degradare i contaminanti ambientali, attraverso numerose applicazioni anche su vasta scala (Boopathy, 2000).

Fra i vari parametri chimico-fisici che influenzano il processo aerobico o anaerobico di degradazione degli inquinanti, ve ne sono alcuni che hanno un impatto diretto: sorgenti di energia (atomi-molecole donatori di elettroni), atomi-molecole accettori di elettroni, nutrienti, pH, temperatura, umidità ed eventuali metaboliti o substrati inibitori.

Se posti nelle condizioni ideali, pur con cinetiche di degradazione diverse, tutti gli idrocarburi presenti nel petrolio, fra cui tutti i prodotti petroliferi, sono degradabili. Il meccanismo di biodegradazione degli inquinanti idrocarburi, come il benzene, può essere rappresentato dalle seguenti reazioni, dove per l'ossidazione è necessaria la presenza di un accettore finale di elettroni, cioè l'ossigeno.



Da notare che nella reazione (I), l'ossidazione di una parte del benzene, che funge da donatore di elettroni, con l'ossigeno, che invece accetta elettroni, fornisce l'energia necessaria per la formazione di nuovo materiale cellulare (indicato nella seconda reazione da $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$) a spese della rimanente parte di benzene e di ottimali quantità di nutrienti (indicati sempre nella seconda reazione da NH_4^+).

Grazie alla diffusione pressoché ubiquitaria degli idrocarburi, questa ed altre reazioni di degradazione ha permesso la diffusione in moltissimi ambienti diversi e soprattutto nelle aree ad alta densità abitativa, di microrganismi specializzati nell'utilizzo di questi composti come fonte di energia o carbonio per la loro crescita. Fra i principali microrganismi coinvolti nella biodegradazione, che si sono meglio adattate allo sfruttamento degli idrocarburi, troviamo i generi *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Gliocladium sp.*, *Mucor sp.*, *Scopulariopsis sp.* e *Trichoderma sp.* (Van Gestel *et al.*, 2003). Le tecniche che sfruttano tali microrganismi, spesso già presenti nel suolo contaminato (comunità autoctone), sono molte e di vario genere, ma comunque sono accomunate dal fatto che hanno

l'obiettivo di stimolare le proprietà degradative dei microrganismi coinvolti.

Il **Land farming** è una tecnologia che opera *on site* e prevede la disposizione di strati di suolo contaminato su una superficie impermeabile e l'adozione di procedure idonee a creare e mantenere le condizioni ottimali per lo sviluppo dei microrganismi. Infatti devono essere assicurati: il corretto bilanciamento dei nutrienti (carbonio, azoto e fosforo), il trasferimento di ossigeno alle popolazioni microbiche attraverso il rimescolamento del materiale o aggiunta di materiali (scaglie di legno, materiali silicei espansi detti "bulking agents") adatti a facilitare il passaggio dell'aria e dei gas prodotti dalla decontaminazione, e infine un tenore di umidità e pH ideali per i processi naturali (Hejazi *et al.*, 2003; McCarthy, 2004). Questa metodologia viene applicata nel caso di contaminanti degradabili, soprattutto prodotti petroliferi, e la sua efficacia dipende da vari fattori legati a:

- a) caratteristiche del suolo: possono essere decontaminati suoli che permettano la distribuzione dei nutrienti, dell'ossigeno e dell'acqua in modo uniforme e completo, per cui suoli con strutture particolari (come le argille, che tendono ad aggrumarsi), sono di difficile utilizzo;
- b) volatilità degli inquinanti, che nel caso siano particolarmente pericolosi per gli operatori e le popolazioni esposte devono essere trattati con particolari cautele;
- c) circostanze climatiche, come neve, pioggia e vento che influiscono direttamente sul processo di decontaminazione in quanto viene realizzata a cielo aperto; difatti le precipitazioni meteoriche possono provocare l'erosione del suolo oltre che aumentare, in modo deleterio per i microrganismi, il tenore di acqua.

Il **Compostaggio** è una metodologia di decontaminazione emergente che opera *ex-situ*; prevede l'escavazione del suolo e il suo mescolamento con materiali correttivi organici quali trucioli, fieno e concime, che forniscono una porosità sufficiente ed un equilibrio tra carbonio ed azoto adatto per promuovere l'attività termofila e microbica che si sviluppa in condizioni aerobiche. L'efficienza massima di degradazione è realizzata in pile statiche o areate controllando l'ossigenazione, il tenore d'acqua e la temperatura attraverso l'utilizzo di tubazioni forate immerse nel cumulo; al di sopra delle biopile vengono posti dei teli impermeabili che convogliano opportunamente i gas prodotti in modo da sottoporli a trattamenti specifici.

La tecnica può essere applicata a suoli contaminati con residui organici biodegradabili tra cui gli esplosivi (TNT, RDX e HMX), gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e a tutti i prodotti petroliferi.

Le limitazioni all'utilizzo di questa tecnica sono il notevole spazio richiesto, il rilascio incontrollato di VOCs durante lo scavo dei suoli contaminati, l'aumento volumetrico del materiale a causa dell'aggiunta del materiale organico, il fatto che i metalli pesanti non possono trattati poiché tossici ai microrganismi, la necessità di realizzare un impianto pilota per verificare la reale degradabilità degli inquinanti ed infine la necessità di movimentazioni periodiche dei cumuli per una completa miscelazione del materiale (www.frtr.gov; Jørgensen *et al.*, 2000; Namkoong *et al.*, 2002; Van Gestel *et al.*, 2003).

I **Bioreattori** sono reattori biologici nei quali viene posto il materiale da decontaminare, in particolar modo le acque inquinate, estratte dal sottosuolo; sono basati sulla crescita di microrganismi, solitamente non presenti nel suolo, collocati su supporti o sospesi nel liquido stesso; i

microrganismi degradano i composti organici e azotati presenti producendo biossido di carbonio, acqua e nuove cellule che formano i fanghi.

Dei bioreattori fanno parte gli impianti di bioslurry, nei quali viene introdotto il materiale contaminato, che però sono molto costosi per cui vengono utilizzati soltanto qualora siano presenti contaminanti particolarmente difficili da rimuovere e oltre a ciò, possono essere decontaminati solo ristretti volumi di materiale.

Questo tipo di impianti sono impiegati per il trattamento di composti organici semi-volatili, i composti azotati, gli idrocarburi ed ogni contaminante biologicamente degradabile.

Alcuni fattori possono limitare l'applicabilità e l'efficacia del processo, tra cui:

- l'aggiunta di nutrienti necessari per sostenere la carica microbica;
- le elevate concentrazioni dell'agente inquinante che possono risultare tossiche per i microrganismi;
- l'inquinamento atmosferico provocato dalla volatilizzazione degli inquinanti attivati dai processi di degradazione;
- le temperature ambientali basse che fanno diminuire significativamente i tassi di biodegradazione, con tempi maggiori di epurazione o maggiori costi per il riscaldamento;
- i microrganismi non specifici che possono colonizzare preferenzialmente i bioreattori, provocando una ridotta efficacia del processo, i residui richiedono il trattamento o l'eliminazione.

Il **Bioventing** utilizza i microrganismi autoctoni per biodegradare i contaminanti organici adsorbiti nel suolo, per cui è una tecnologia *in situ*; all'area interessata viene applicato un flusso di ossigeno tramite iniezione

diretta di aria e vengono aggiunti nutrienti. È molto simile al soil vapor extraction (SVE), spesso utilizzata congiuntamente, ma evita la volatilizzazione dei contaminanti, poiché i flussi di aria applicati sono più bassi.

I composti interessati da questo tipo di biodegradazione sono soprattutto gli idrocarburi di origine petrolifera (olio grezzo, benzina, gasolio ed olio combustibile) oltre che solventi non clorurati ed alcuni pesticidi.

I limiti dell'applicabilità di questa tecnica sono:

- il pH del suolo, che deve avere valori tra 6 e 8 per assicurare una buona attività batterica;
- l'umidità che deve assumere valori né troppo alti né troppo bassi;
- l'elevata concentrazione degli inquinanti che può essere tossica per i microrganismi;
- la tessitura del suolo che può interferire con l'adeguata aerazione;
- la prossimità di falde nella zona da trattare, la bassa permeabilità del suolo;
- le temperature ambientali che in alcuni casi possono disturbare la biodegradazione.

La **Biofiltrazione** è una tecnologia a basso costo ed altamente efficace per il controllo dell'inquinamento atmosferico, in cui gli agenti inquinanti organici in fase di vapore vengono convogliati attraverso una base di mezzi porosi e vengono assorbiti e poi degradati dai microrganismi. La sua applicabilità dipende, come gli altri processi di trattamento biologici, dalla biodegradabilità degli agenti inquinanti ed è usata soprattutto per trattare i composti organici volatili non alogenati e gli idrocarburi, mentre per i composti organici volatili alogenati il processo risulta meno efficace.

Alcuni fattori possono limitarne l'applicabilità e l'efficacia quali la velocità del flusso di corrente d'aria che è regolata dalle dimensioni del biofiltro, le temperature insufficienti che possono ritardare o arrestare la rimozione dei contaminanti a meno che il biofiltro sia clima-controllato, i residui che risultano recalcitranti alla biodegradazione e non sono convertiti in prodotti inoffensivi (www.frtr.gov; Chen *et al.*, 2006).

La **Bioaugmentation** è una tecnica di bonifica *in situ*, che prevede l'inoculo nella matrice da decontaminare di microrganismi che possono essere selezionati sia dai materiali stessi da bonificare, sia da materiali provenienti da siti diversi (inoculi alloctoni) e messi in coltura per la loro proliferazione; questi, una volta introdotti consumeranno selettivamente i composti inquinanti in presenza di ossigeno e di altri elementi nutrienti, convertendoli in anidride carbonica, in acqua ed in biomassa microbica; le basse temperature ritardano il processo, per cui possono essere utilizzati sistemi che aumentano la temperatura del suolo e conseguentemente il tasso di degradazione. Per avere un'efficace decontaminazione della matrice contaminata possono occorrere anche parecchi anni. (www.frtr.gov; Bento *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005).

La **Biostimolazione** prevede, a differenza della precedente tecnologia, l'introduzione di nutrienti al suolo contaminato sottoforma di fertilizzanti organici o inorganici, che fanno aumentare la popolazione dei microrganismi indigeni, in grado di utilizzare gli inquinanti come risorsa per il loro sviluppo; la biodegradazione può risentire in maniera significativa di alcuni parametri che devono essere mantenuti sotto stretto controllo: principalmente l'aerazione, il pH e la temperatura. Con questa metodologia di recupero vengono trattati principalmente suoli contaminanti da prodotti petroliferi e tutti i loro derivati (Molina-

Barahona *et al.*, 2004; Bento *et al.*, 2005, Sarkar *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005).

L'Attenuazione naturale (definita anche “intrinsic bioremediation”) consiste nella capacità autodegradatrice del suolo e costituisce un approccio differente dagli altri in quanto prevede l’attento monitoraggio dei fenomeni che portano alla rimozione o alla diminuzione degli inquinanti in maniera spontanea ma sempre regolati da processi di tipo biologico. Per valutare l’effettiva degradazione dei contaminanti, vengono ripetute nel tempo le operazioni di monitoraggio della natura e della distribuzione degli inquinanti, l’analisi dei fattori critici che influenzano la naturale degradazione degli inquinanti (temperatura, pH, concentrazione dei nitrati, dei nitriti, dei fosfati, dell’ammoniaca, dei solfati....) e la verifica della presenza di una popolazione microbica capace di degradare gli inquinanti presenti. Questa metodologia è applicabile a tutti gli inquinanti biodegradabili, ma ha un grosso limite relativo alla lentezza del processo che non può essere applicato in presenza di sostanze pericolose per la salute umana, per la flora e la fauna localmente presente (Bento *et al.*, 2005; Sarkar *et al.*, 2005).

1.4.3 Il tessuto enzimatico del suolo

I suoli funzionano come filtri viventi e condizionano fortemente la biosfera e le attività umane in quanto, oltre a catturare le precipitazioni e produrre cibo, permettono la degradazione delle sostanze organiche, la riconversione dei nutrienti, la sintesi di sostanze umiche del suolo, l'aggregazione e la disgregazione delle sostanze xenobiotiche, la fissazione dell'azoto e molti altri processi. Per questo motivo è importante preservare il suolo da fenomeni che ne alterino le caratteristiche e possano comprometterne anche definitivamente, la qualità quali l'erosione, la salinizzazione, la perdita di sostanza organica e la contaminazione ad opera di sostanze chimiche inquinanti. La "qualità" di un suolo è definita come la "provata capacità di un suolo di accettare, conservare e riciclare l'acqua, i nutrienti e l'energia" (Masciandaro e Ceccanti, 1999) e dipende dalla sua naturale composizione ma anche dall'uso e dalla gestione che ne fa l'uomo, soprattutto nell'influire sulle sue funzioni.

Gli enzimi sono dei catalizzatori biologici che abbassano l'energia di attivazione richiesta per lo svolgimento delle reazioni biochimiche e sono sintetizzati dai microrganismi presenti nel suolo e dalle piante, ma si trovano anche in cellule morte e residui di esse e associati a sostanze organiche e minerali.

Gli enzimi hanno differenti ubicazioni in un suolo essendo associati con varie componenti sia biotiche che abiotiche. Spesso sono associati sia a cellule proliferanti che non proliferanti (spore, cisti, ...) o con cellule morte o frammenti di cellule; di fondamentale importanza risulta perciò la distinzione fra enzimi extracellulari, definiti anche enzimi "stabilizzati", che devono essere in qualche modo protetti nei confronti delle avversità e sono indipendenti dagli organismi che lo hanno prodotto, ed enzimi delle cellule proliferanti, strettamente collegati alle attività degli

organismi viventi e localizzati all'interno delle cellule; a questa categoria appartengono tutti gli enzimi delle reazioni che forniscono energia alla cellula.

Gli enzimi extracellulari, che rappresentano la maggior parte, esistono contemporaneamente nei complessi enzima-substrato o sono assorbiti da minerali di argilla o possono essere associati a colloidali umici e sono considerati di grande importanza per la fertilità di un suolo anche quando le condizioni sono proibitive per la vita microbica.

I fattori che giocano un ruolo determinante nelle attività enzimatiche di un suolo sono l'umidità, il grado di salinità, il pH, la temperatura e la presenza di particolari sostanze prodotte dalle piante e dai microrganismi.

Per i motivi esposti le attività enzimatiche danno importanti informazioni sulla funzionalità, la produttività e la degradazione di un suolo e di un suo eventuale recupero, visto che sono catalizzatori di importanti processi metabolici come la decomposizione della sostanza organica, la degradazione delle sostanze inquinanti, la nitrificazione e l'ossidazione. Risultano perciò utili indicatori della qualità di un suolo in quanto:

- ♦ sono fortemente collegati a importanti parametri della qualità come la sostanza organica, le proprietà fisiche e l'attività microbica;
- ♦ possono variare velocemente rispetto ad altre proprietà dando una prima indicazione della variazione della qualità del suolo;
- ♦ possono costituire un indice biologico che va ad integrare altri parametri nella comprensione degli effetti provocati da differenti gestioni agronomiche di un suolo;
- ♦ sono facilmente misurabili e quantificabili rispetto ad altre proprietà del suolo (fisiche e biologiche).

1.5 Utilizzo del compost nel processo di biorecupero

L'apporto di sostanza organica ai suoli avviene principalmente attraverso l'utilizzo di ammendanti di varia natura; viene così garantita la reintegrazione della componente unica così come la lavorabilità, la porosità, l'aerazione e il drenaggio del suolo. Oltre a ciò vengono forniti sostanze nutrienti sottoforma di carbonio, azoto e fosforo che sono gradualmente resi disponibili per le colture attraverso la lenta degradazione della sostanza organica.

Fra gli ammendanti impiegati, il compost risulta avere larga diffusione soprattutto per impieghi quali:

- recupero di aree degradate non contaminate;
- il recupero di aree degradate e contaminate;
- la progettazione e la gestione del verde urbano pubblico e privato.

In base agli scarti utilizzati nel processo di compostaggio, il compost viene immesso sul mercato, dopo attenti controlli effettuati dalle autorità locali, come:

1. Ammendante Compostato Verde (ACV), se il processo di stabilizzazione biologica ha interessato solo scarti vegetali;
2. Ammendante Compostato Misto (ACM), se oltre a scarti vegetali vengono utilizzati nel processo di compostaggio altre biomasse di origine alimentare, zootecnica o fanghi di depurazione.

Ciascuno di essi determina differenti caratteristiche chimico-fisiche che condizionano il suo impiego in vari ambiti (agricoltura in pieno campo, florovivaismo, giardinaggio, opere di recupero paesaggistico,....).

Il compost, poiché prodotto biologicamente, in condizioni aerobiche, da scarti, residui e rifiuti organici putrescibili, presenta una

biomassa attiva, dotata di elevata attività metabolica di tipo degradativo nei confronti di molti composti organici tossici come gli idrocarburi, gli idrocarburi policiclici aromatici, i solventi clorurati e i pesticidi. La “bioremediation” di suoli contaminati può essere effettuata apportando compost in quantità e qualità differenti, preferibilmente se ad elevato grado di maturazione; la degradazione di contaminanti organici, risulta così accelerata contribuendo al ripristino della qualità originale di molti terreni in tempi relativamente brevi (Vasudevan e Rajaram, 2001; Franco *et al.*, 2004).

L’apporto di questi materiali stabili, ad elevato contenuto di sostanza organica, determina un effetto positivo sulle condizioni generali del suolo e in particolare sul rapido sviluppo delle popolazioni microbiche autoctone che, vivendo a carico della sostanza organica, trovano nel compost un substrato idoneo alla crescita e allo sviluppo, contribuendo così alla degradazione delle sostanze tossiche.

1.6 Scopo della tesi

Il presente lavoro di tesi tratta del problema del biorisanamento di aree contaminate da idrocarburi. La sperimentazione è stata condotta attraverso l'introduzione di ammendante compostato verde, applicato in diverse dosi (1%, 2% e 4%). In un suolo contaminato con gasolio per motori Diesel, alle concentrazioni di 10000 ppm, sono stati monitorati nel tempo le variazioni degli idrocarburi totali e i parametri chimici, biologici e biochimici per:

- ✓ Valutare l'efficace applicazione di tecniche biologiche eco-sostenibili che favoriscano la decontaminazione di un suolo inquinato da idrocarburi.

- ✓ Ricercare idonei parametri marcatori (chimici, biochimici e biologici) dei processi coinvolti nel risanamento del suolo.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Schema di lavoro

Nel presente studio sperimentale un suolo non contaminato, tendenzialmente sabbioso e povero di sostanza organica, è stato artificialmente inquinato con una miscela di idrocarburi e successivamente sottoposto ad un trattamento di biostimolazione di tipo *off site* per facilitarne e aumentarne la velocità di recupero.

Questa metodologia di bioremediation prevede l'introduzione di nutrienti al suolo contaminato sottoforma di fertilizzanti organici o inorganici, provocando un aumento della popolazione microbica autoctona, che utilizza gli idrocarburi e la sostanza organica presente nel suolo come fonti primarie per la crescita (Molina-Barahona *et al.*, 2004; Bento *et al.*, 2005; Sarkar *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005).

Sono state così ricreate in laboratorio le condizioni ideali per il biorecupero del suolo contaminato; il suolo è stato campionato, essiccato a temperatura ambiente, setacciato a 2 mm e trasferito in contenitori dalle dimensioni di 30 cm x 15 cm x 8 cm. In ogni contenitore sono stati trasferiti 250 g di suolo mantenendo costante la temperatura a 25°C per tutta la fase di decontaminazione. Ciascun microcosmo è stato umidificato uniformemente con acqua deionizzata, distribuita a piccole dosi, in maniera da mantenere un'umidità nel suolo pari al 50% della sua capacità idrica massima.

Successivamente il suolo è stato contaminato con gli idrocarburi e omogeneamente miscelato per favorire una distribuzione uniforme.

Nei trattamenti che prevedevano aggiunta di compost (1% C, 2% C e 4%C), il materiale è stato miscelato col suolo, in quantità pari all'1%, al 2% e al 4% di peso secco, ovvero nella dose di 2,5, 5 e 10 g di compost su un peso di 250 g di suolo.

In definitiva sono stati ottenuti sei diversi tipi di trattamento del suolo, sintetizzati nella Tabella 2.1.

Sigla	Tipo di trattamento
T	Terreno
TI	Terreno + Idrocarburi
TIS	Terreno Sterilizzato + Idrocarburi
C 1%	Terreno + Idrocarburi + Compost all'1%
C 2%	Terreno + Idrocarburi + Compost al 2%
C 4%	Terreno + Idrocarburi + Compost al 4%

Tabella 2.1 – Trattamenti applicati al suolo ed utilizzati nella sperimentazione.

Il suolo non inquinato (T), il suolo inquinato (TI) ed il suolo inquinato e sterilizzato con una soluzione di sodio azide al 6,5 % (TIS) hanno avuto funzione di controllo; quest'ultimo trattamento (TIS) è servito per valutare e quantificare la volatilizzazione delle frazioni più leggere degli idrocarburi per la durata di 14 giorni, visto che in letteratura vengono forniti dati molto discordanti tra loro (Huesemann, 2004). Il dato ottenuto è stato estrapolato anche per tutti gli altri trattamenti dello studio.

Come fonte contaminante di natura idrocarburica è stato utilizzato gasolio commerciale (combustibile per motori Diesel), acquistato presso una stazione di servizio Agip. In ciascun contenitore, al suolo sono stati

aggiunti 2,5 g di gasolio in modo da ottenere una concentrazione uniforme di inquinante pari a 10 000 ppm.

I microcosmi così ottenuti sono stati incubati, per 107 giorni ad una temperatura costante di 25°C e mantenendo un'umidità costante pari al 50% della capacità idrica massima (Figura 2.1). Giornalmente il suolo è stato umidificato con acqua deionizzata e miscelato per garantire una quantità di ossigeno e acqua ideali per favorire la degradazione dei contaminanti; se il suolo risulta troppo secco o troppo umido, la crescita e il metabolismo batterico possono risultare fortemente ridotti o addirittura inibiti. L'ossigeno svolge anch'esso un ruolo importante poiché le condizioni aerobiche sono essenziali per l'efficace degradazione degli idrocarburi; l'ossidazione enzimatica dei composti idrocarburici, in cui è coinvolta l'ossigenasi, richiede infatti ossigeno molecolare che deve essere fornito per tutta la durata del trattamento di biorecupero (Huesemann, 2004).



Figura 2.1 – Incubazione dei trattamenti biologici.

L'incubazione dei microcosmi ha avuto una durata 107 giorni, durante i quali, ad intervalli di tempo di 1 (t_0), 7 (t_1), 14(t_2), 30 (t_3), 60 (t_4) e 107 (t_5) giorni, sono stati prelevati da ciascun contenitore campioni omogenei di suolo. Su tali campioni sono state eseguite analisi chimiche e chimico-fisiche (idrocarburi totali (TPH), pH, carbonio organico totale), biochimiche (lipasi e deidrogenasi) e biologiche (attività respiratoria del suolo e misura dell' ATP). L'attività respiratoria del suolo è stata valutata su una durata complessiva di 24 giorni, attraverso la misura della quantità di CO₂ sviluppata giornalmente.

Per il trattamento TIS (terreno sterilizzato + idrocarburi) sono stati indagati soltanto gli andamenti degli idrocarburi totali (TPH) al tempo t_1 e t_2 .

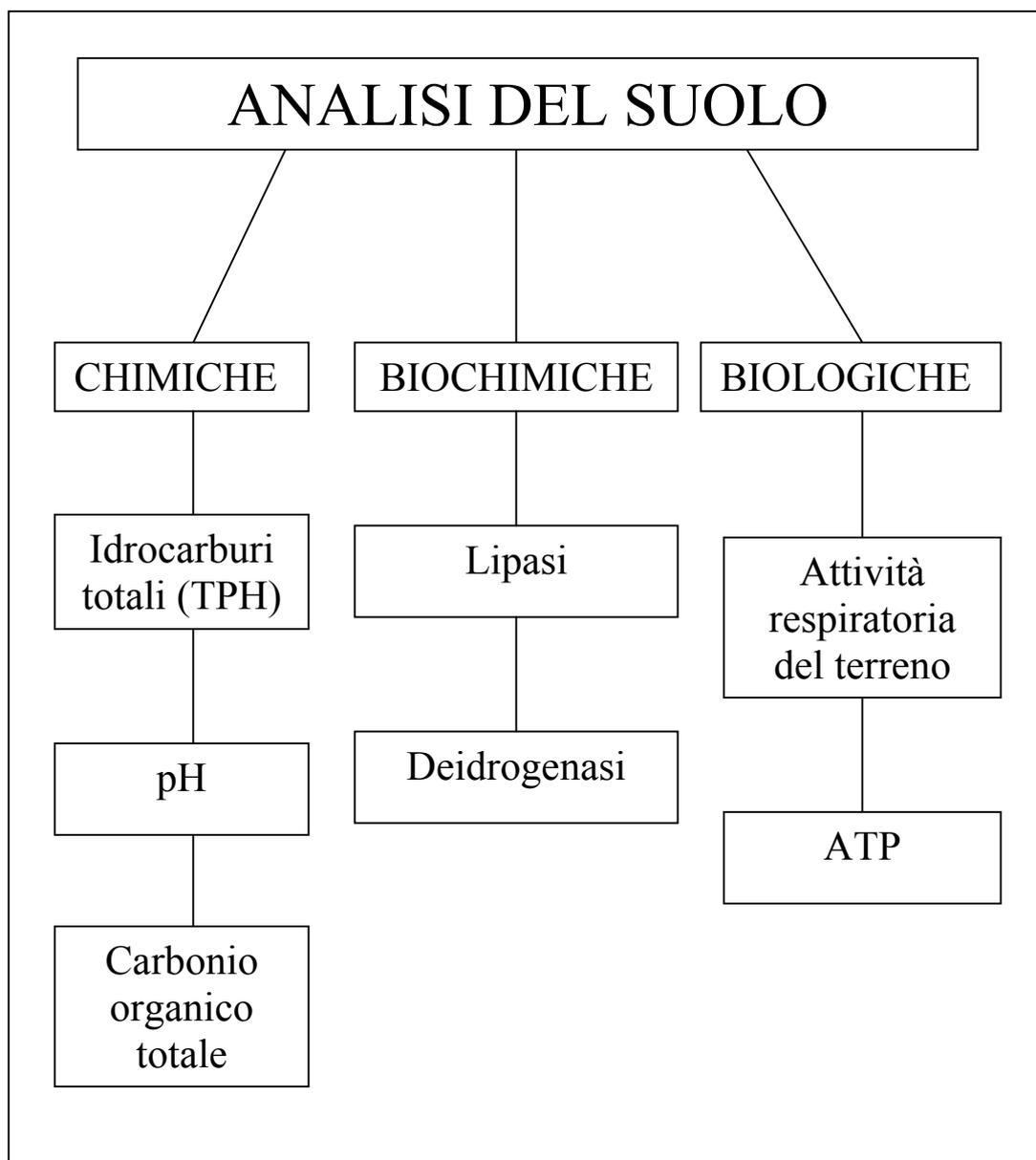


Figura 2.2 – Schema delle determinazioni analitiche.

2.2 Materiali

2.2.1 Suolo

Il suolo utilizzato per lo studio, prelevato da un appezzamento agricolo nei pressi di Terricciola (Pisa), presenta le seguenti caratteristiche (Tabella 2.2).

Sabbia (%)	71,7
Limo (%)	10,6
Argilla (%)	17,7
pH	8,3
Capacità idrica massima (%)	39
Carbonio totale (%)	1,97
Carbonio organico (%)	1,19
Calcare (%)	6,55
Azoto totale (‰)	1,19
C/N	10
C.S.C. (cmol/kg)	5

Tabella 2.2 – Caratteristiche principali del suolo utilizzato nella sperimentazione.

2.2.1.2 Suolo sterilizzato

Al fine di valutare e quantificare l'effettiva volatilizzazione della frazione più leggera degli idrocarburi, non dovuta a fenomeni degradativi assegnabili ai microrganismi presenti, è stata effettuata la sterilizzazione di 50 g di suolo; per annullare la carica microbica presente sono stati aggiunti 10 ml di una soluzione di sodio azide al 6,5 % al suolo su cui sono state analizzate le concentrazioni degli idrocarburi totali (TPH).

2.2.2 Compost

Per favorire lo sviluppo e la crescita dei microrganismi presenti nel suolo, e quindi favorire una più veloce ed efficace degradazione degli idrocarburi, è stato aggiunto un ammendante organico in tre diverse percentuali rispetto al peso secco del suolo.

L'ammendante compostato verde utilizzato in questo studio è stato prodotto dal consorzio CERMEC di Massa-Carrara; il materiale originario per la produzione di tale compost è costituito dagli sfalci, dalle potature e dalla frazione organica dei rifiuti domestici. Le caratteristiche principali del materiale sono riportate in Tabella 2.3.

pH	8,4
Carbonio totale (%)	39,2
Carbonio organico (%)	37,6
Carbonio inorganico(%)	1,7
Azoto totale (‰)	11,6
C/N	15,1
Indice di germinazione (I.G.)	91

Tabella 2.3 – Caratteristiche del compost.

2.2.3 Idrocarburi

Il gasolio combustibile presenta caratteristiche particolari rispetto ad altri tipi di miscele: possiede un suo odore caratteristico, è formato da composti con 10-22 molecole di carbonio (C_{10} - C_{22}) e viene distillato dal petrolio a temperature comprese tra 150 °C e 400 °C. I composti più leggeri tendono ad evaporare, mentre gli altri composti tendono a disperdersi in acqua o ad essere adsorbiti nel suolo e nei sedimenti.

Dal punto di vista tossicologico, questa miscela di idrocarburi può causare irritazione alla pelle, agli occhi e alle vie respiratorie in caso di esposizione ripetuta.

2.3 Metodi analitici

2.3.1 Analisi del suolo

2.3.1.1 Tessitura

L'analisi della tessitura è stata effettuata per mezzo del levigatore di Esenwein (Figura 2.2) secondo la metodica ufficiale: una soluzione di esametafosfato e carbonato di sodio viene addizionata a 10 g di suolo, preventivamente essiccato all'aria e setacciato a 2 mm, allo scopo di deflocculare i colloidali; dopo 2 ore di agitazione la sospensione viene posta nel levigatore e portata a volume con acqua deionizzata. A questo punto viene effettuata l'agitazione manuale della sospensione all'interno del levigatore e una volta conclusa l'agitazione si attendono 12 minuti per eseguire il primo prelievo, costituito da limo + argilla (I). La sospensione, nuovamente agitata per renderla omogenea, viene lasciata sedimentare per ulteriori 20 ore, dopodiché viene effettuato un secondo prelievo corrispondente all'argilla (II). Ogni frazione raccolta (10 ml della sospensione), viene posta in una capsula tarata e successivamente essiccata in stufa prima di essere pesata; ciascuna frazione solida prelevata permette di calcolare la percentuale di ciascuna classe dimensionale, una volta rapportata al volume del liquido disperdente, secondo il seguente calcolo:

$$Limo (\%) = (I-II) * \frac{Vl}{Vp} * \frac{100}{P}$$

$$\text{Argilla (\%)} = (\text{II}) * \frac{V_l}{V_p} * \frac{100}{P}$$

$$\text{Sabbia (\%)} = 100 - (\text{I} + \text{II})$$

V_l = volume del levigatore;

V_p = volume prelevato;

P = peso del campione.

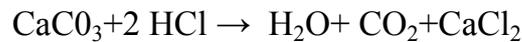
(AA.VV. 1994. “Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo”.
Ministero delle Risorse Agricole: Osservatorio Nazionale Pedologico.
ISMEA, Roma).



Figura 2.2 – Levigatore di Esenwein per l’analisi della tessitura.

2.3.1.2 Calcare

Il contenuto in calcare nel suolo è stato determinato per via gas-volumetrica con il calcimetro di Scheibler secondo la metodica ufficiale. Per questo tipo di analisi viene utilizzato 1 g di suolo posto in una beuta, all'interno della quale viene posizionato HCl (1:2), che reagisce col calcare presente nel suolo sviluppando così CO₂, secondo la reazione:



In base alle condizioni di pressione atmosferica e temperatura viene calcolata la quantità di calcare totale presente nel suolo.

(AA.VV. 1994. "Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo". Ministero delle Risorse Agricole: Osservatorio Nazionale Pedologico. ISMEA, Roma)

2.3.1.3 Capacità idrica massima

La capacità idrica massima di un suolo corrisponde alla quantità di acqua che un determinato suolo riesce a trattenere contro la forza di gravità; a questo scopo sono stati preparati campioni in modo da rispecchiare i trattamenti presenti nello studio: 1 %, 2% e 4 % di compost rispetto al peso secco del suolo, con un peso totale del suolo pari a 100 g. I campioni così preparati sono stati posti in altrettante colonne, sul cui fondo è stato posto un filtro veloce (Whatman n° 41); sono stati poi aggiunti alle colonne 100 ml di H₂O deionizzata, che è stata lasciata lisciviare lungo la colonna; parte di essa è fluita all'interno di cilindri graduati posti al di sotto delle colonne, mentre la parte rimanente di acqua

è stata trattenuta dal suolo. Quest'ultima viene calcolata per differenza tra quella immessa nelle colonne e quella passata nei cilindri graduati. La capacità idrica massima viene espressa in % rispetto al peso del suolo.

2.3.2 Analisi chimiche

2.3.2.1 Idrocarburi totali (TPH)

I campioni di suolo (ciascuno del peso di 1,5 g) preventivamente essiccati all'aria, sono stati miscelati con Na_2SO_4 per allontanare l'acqua eventualmente residua nei campioni e posti in provette di vetro. A ciascun campione sono stati poi aggiunti 15 ml di 1,1,2-triclorotrifluoroetano (rapporto di estrazione 1:10) e la provette chiuse sono state poste in agitazione meccanica per due ore. Il contenuto di ciascuna provetta è stato fatto passare attraverso speciali colonne di "Florisil" (MgO_3Si), preventivamente attivate con 10 ml di estraente (Figura 2.3) e raccolto in cuvetta per la lettura allo spettrometro nell'infrarosso (Figure 2.4 e 2.5), in un intervallo di lunghezza d'onda compreso tra 3200 e 2800 cm^{-1} .

(Platen, 1995)



Figura 2.3 – Attivazione delle colonne di "Florisil" e raccolta del campione per l'analisi degli idrocarburi.

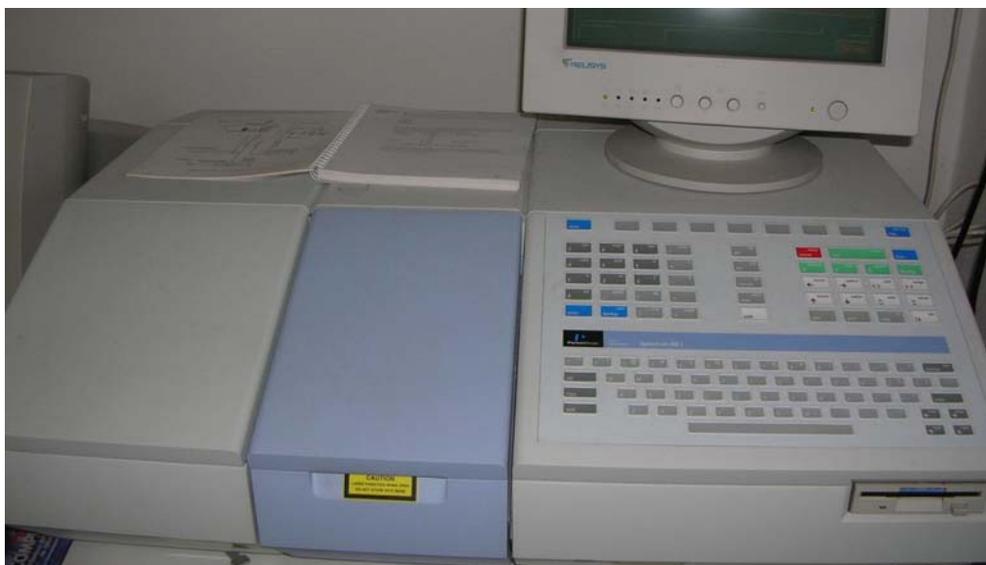


Figura 2.4 – Spettrometro all'infrarosso utilizzato per l'analisi degli idrocarburi.



Figura 2.5 – Particolare dello spettrometro all'infrarosso e cuvetta utilizzata per l'analisi degli idrocarburi.

2.3.2.2 pH

Il pH è stato determinato per via potenziometrica utilizzando un pH-metro con elettrodo a vetro CRISON-Micro pH 2001 (Figura 2.6). La determinazione è stata eseguita su una sospensione suolo-acqua in rapporto di 1: 2,5, dopo agitazione effettuata per 30 minuti.

(AA.VV. 1994. “Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo”. Ministero delle Risorse Agricole: Osservatorio Nazionale Podologico. ISMEA, Roma).



Figura 2.6 – Determinazione del pH per via potenziometrica.

2.3.2.3 Carbonio Organico Totale

Questo parametro è stato determinato per mezzo di uno strumento automatico, ELTRA 900 CS (Figura 2.7). L'apparecchiatura impiegata è costituita da un forno ad induzione in cui viene raggiunta la temperatura di 1450 °C e all'interno del quale il campione viene posto in una navicella di silice e bruciato in atmosfera di O₂. L'ossigeno, immesso nell'apparecchio con flusso costante di 100 l/h, funge anche da gas di trasporto facendo sì che la CO₂ prodotta dalla combustione attraversi un analizzatore ad infrarossi capace di misurarne la concentrazione; viene inoltre utilizzata una bilancia di precisione per determinare il peso esatto del campione di suolo immesso nello strumento analizzatore.

Lo strumento, in base al peso del campione introdotto e alla concentrazione di CO₂ rilevata, fornisce direttamente la percentuale di C ossidabile totale presente nel saggio. A questo valore deve essere poi sottratto il valore del C del calcare presente nel campione, ricavando il valore del carbonio organico totale.



Figura 2.7 – Analizzatore ad infrarossi ELTRA CS per la determinazione del carbonio organico totale e particolare del forno per la combustione.

2.3.3 Analisi biochimiche

2.3.3.1 Lipasi

La determinazione dell'attività lipasica si basa sulla determinazione per via colorimetrica del rilascio del para-nitrofenolo (PNF), dopo l'incubazione dei campioni con para-nitrofenilbutirrato (pNPB, substrato di reazione).

Per effettuare questa analisi sono stati pesati 100 mg di suolo preventivamente essiccato all'aria e posti in tubi da centrifuga ai quali sono stati aggiunti 5 ml di tampone ($\text{NaHPO}_4/\text{NaOH}$ 0,1M) in modo da mantenere un pH di 7,25. Successivamente la provetta è stata portata ad una temperatura di 30°C, sono stati aggiunti 50 μl di substrato di reazione ed il tutto è stato agitato e mantenuto a 30°C per altri 10 minuti; a questo punto le provette sono state poste in bagno di ghiaccio ad una temperatura di 4°C per arrestare la reazione. La sospensione è stata centrifugata per 5 minuti a 2000 rpm ad una temperatura di 4°C; infine il surnatante è stato prelevato e posto in cuvetta (Figura 2.8) per la lettura spettrofotometrica (lunghezza d'onda 400 nm) dei campioni.

Il controllo viene preparato con la stessa metodica utilizzata per i campioni, ma senza l'aggiunta di suolo.

I risultati vengono espressi in $\mu\text{g PNP/g} \cdot 10'$.

(Margesin *et al.*, 2002)

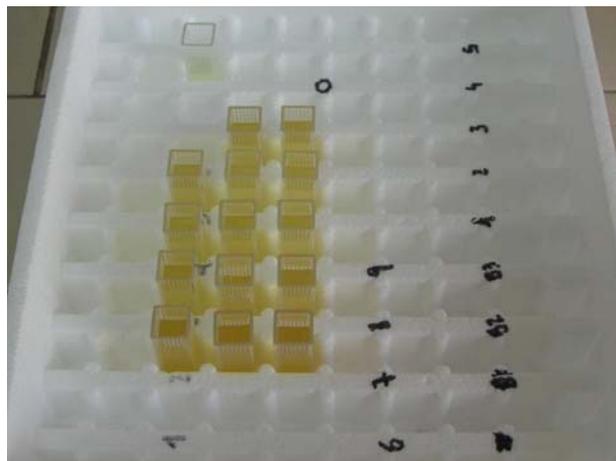


Figura 2.8 – Surnatante posto in cuvette per l'analisi dell'attività lipasica; le differenze di colore corrispondono a diverse concentrazioni di p-nitrofenolo rilasciato dopo l'incubazione dai campioni.

2.3.3.2 Deidrogenasi

Il metodo utilizzato prevede la determinazione dell'attività deidrogenasica di un suolo in seguito al dosaggio colorimetrico del 2,3,5 trifenilformazano (TPF) prodotto dalla riduzione, da parte dei microrganismi presenti, del cloruro di 2,3,5 trifeniltetrazolio (TTC). Il TPF prodotto è di colore rosso (Figure 2.9 e 2.10) e la sua concentrazione viene determinata mediante spettrofotometro regolato alla lunghezza d'onda di 488 nm.

Il campione di suolo preventivamente essiccato è stato pesato (300 mg) e posto in provetta munita di tappo a vite nella quale sono stati aggiunti 0,3 ml di soluzione tampone di tris-maleato 0,1 M a pH 7,0 e 0,075 ml di soluzione TTC al 3%. La provetta è stata chiusa ed agitata per alcuni secondi in modo da mescolare il contenuto in modo omogeneo; dopo queste operazioni le provette sono state poste in stufa alla temperatura di 37°C per 24 ore. In seguito, ai campioni sono stati aggiunti

6 ml di metanolo e si è proceduto all'estrazione agitando le provette per 10 minuti circa con agitatore meccanico a 120 colpi al minuto. La soluzione ottenuta è stata filtrata con filtri Whatman n° 42 ed il filtrato è stato letto allo spettrofotometro contro il bianco, costituito da metanolo.

I risultati vengono calcolati in base alla quantità di liquido e suolo utilizzato. L'attività deidrogenasica viene espressa in $\mu\text{g TTF/g}\cdot\text{h}$ (Casida *et al.*, 1964).



Figura 2.9 – Soluzione prodotta dopo l'aggiunta di metanolo ai campioni utilizzati per la determinazione dell'attività deidrogenasica; le differenze di colore corrispondono alle diverse concentrazioni di 2,3,5 trifenilformazano (TPF).

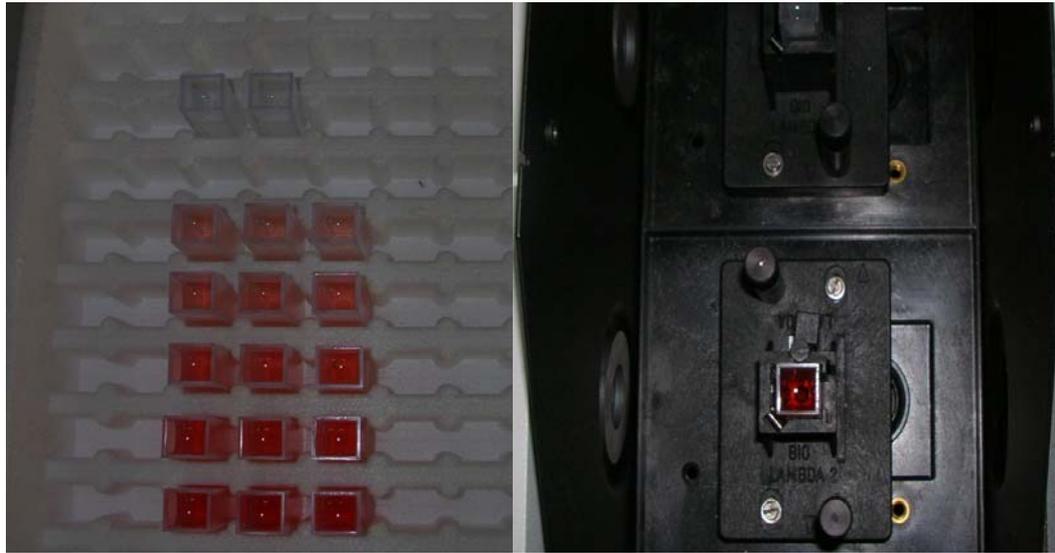


Figura 2.10 – Soluzione posta in cuvette per l'analisi dell'attività deidrogenica e particolare dello spettrofotometro utilizzato per questa analisi; le differenze di colore corrispondono a diverse concentrazioni di 2,3,5 trifenilformazano (TPF) rilasciato dopo l'incubazione dai campioni.

2.3.4 Analisi biologiche

2.3.4.1 Attività respiratoria

L'analisi ha lo scopo di misurare la velocità ed il grado di mineralizzazione della sostanza organica del suolo mediante la valutazione quantitativa della CO₂ sviluppata (Levi Minzi *et al.*, 1990). In contenitori di vetro con tappo ermetico a vite sono stati posti 50 g di suolo seccato all'aria al quale è stata aggiunta H₂O fino al 50% della capacità idrica massima. Il peso totale è stato annotato su ciascun contenitore per controllare la perdita di umidità. Sono stati allestiti cinque contenitori corrispondenti ai trattamenti utilizzati nel presente lavoro, mantenendo le esatte proporzioni e concentrazioni presenti nei trattamenti biologici studiati; sono state così ricreate le medesime condizioni utilizzate dello studio. L'evoluzione dello sviluppo di CO₂ è stato seguito per 24 giorni.

Ciascun contenitore così preparato, contenente un becher con 10 ml di soluzione 0,5 N di NaOH, è stato chiuso e posto in termostato a 25°C. Dopo 24 ore il contenitore veniva arieggiato, umidificato con H₂O se necessaria, dotato di un nuovo becher contenente 10 ml di soluzione 0,5 N di NaOH, chiuso nuovamente e riposto nel termostato. Sul contenuto dei becher è stata eseguita una titolazione con HCl 0,5 N per determinare la quantità di NaOH che non aveva reagito con la CO₂, dopo aver aggiunto BaCl₂ 1,5 M, secondo la seguente reazione:



Da questa reazione, conoscendo il rapporto stechiometrico tra gli eq. di NaOH che hanno reagito e la CO₂, si risale alla quantità di CO₂ sviluppata da 25 g di suolo; combinando le espressioni e moltiplicando per il peso atomico degli atomi di C si ottengono i grammi di C-CO₂ respirati:

$$(10 - x) * 12 = \text{mg C-CO}_2 / 100 \text{ g suolo}$$

(Levi-Minzi *et al.*, 1990)

2.3.4.2 ATP

L'ATP (adenosina trifosfato) è stata determinata tramite saggio della bioluminescenza, secondo il metodo di Ciardi e Nannipieri (1990). In un becher sono stati pesati 2 g di suolo e ad esso sono stati aggiunti 20 ml di soluzione estraente (PA), costituita da urea 2 M, DMSO (dimetilsolfossido) al 20 %, H₃P0₄ 0,67 M, EDTA 20 mM e 100 mg di adenosina. Quest'ultima è servita per saturare i siti di legame per l'ATP, mentre l'acido fosforico ha saturato i siti di legame per il fosfato. EDTA, urea e DMSO sono serviti invece, rispettivamente, per chelare gli ioni metallici a denaturare le proteine e per prevenire i legami idrogeno dell'ATP estratto, ed infine per rimuovere le cellule dalla superficie del terreno e provocarne la lisi. A questo punto i campioni sono stati sonicati per 2,5 minuti in bagno di ghiaccio tramite sonicatore ULTRASONIC PROCESSOR (Figura 2.11) dopodiché sono stati posti per 30 minuti in agitatore meccanico, ad una temperatura di 4°C. I campioni sono stati poi filtrati con filtri Whatman n° 42, raccogliendo il filtrato in provette di vetro. Successivamente sono stati prelevati 100 µl di filtrato e sono stati tamponati con 800 µl di tampone tris-amminometano-EDTA sale bisodico a pH 10,2-10,8, formato da una soluzione di tris-ammino-metano 0,2 M in

100 μ l + EDTA sale bisodico 4 mM e 15 mM di magnesio acetato e NaOH. Si è proceduto alla determinazione della quantità di ATP estratto misurando quantitativamente il livello di luce emessa dalla reazione che avviene tra ATP e luciferina catalizzata dall'enzima luciferasi, secondo la reazione:



La luciferina è una molecola eterociclica che viene attivata tramite adenilazione in presenza di ioni Mg^{2+} e si ossida quindi ad ossiluciferina; una forma ionica eccitata dell'ossiluciferina è l'emittente di luce. La luce emessa è stata misurata al luminometro LUMINOSKAN TL PLUS (Figura 2.12) per tre successivi periodi d'integrazione di 10 secondi; la lettura è stata fatta in seguito alla stabilizzazione dell'aliquota di soluzione enzimatica aggiunta; la misura della quantità di ATP contenuta in soluzione è la media di tre distinte letture della medesima soluzione. Infine sono stati aggiunti quantità di ATP standard (10 μ l che contengono 10 ng di ATP) mescolando lentamente e procedendo all'ultima lettura. Sottraendo dal valore ottenuto dall'ultima lettura (campione + tampone + Monitor Reagent + ATP standard) quello ottenuto dopo l'aggiunta del Monitor Reagent, otteniamo l'emissione di luce dovuta all'ATP standard (a).

Alla misura ottenuta dall'aggiunta del Monitor Reagent si sottrae il valore dovuto del campione più il tampone: si ottiene così l'emissione di luce dovuta all'ATP presente nel campione (b).

Considerando che abbiamo aggiunto una quantità nota di ATP (10 ng) l'ATP presente nel campione sarà pari a :

$$\text{ATP}_{\text{campione}} = a * b / 10 \text{ ng di ATP per g di suolo}$$

(Ciardi e Nannipieri, 1990)



Figura 2.11 – Ultrasonic processor utilizzato per sonicare i campioni in bagno di ghiaccio per la determinazione dell'ATP.



Figura 2.12 – Luminometro utilizzato per la determinazione dell'ATP.

2.4 Analisi statistica

I risultati ottenuti dalle analisi sono la media di tre ripetizioni. I risultati riportati per il test respirometrico e per gli idrocarburi rappresentano invece la media di due repliche; il coefficiente di variazione (C.V.), cioè la deviazione standard espressa in % del valore medio, era inferiore al 5%. Tali risultati, espressi in riferimento al suolo secco, sono stati sottoposti ad analisi statistica della varianza (ANOVA) con un livello di significatività del 5% ($P=0,05$) (Zar, 1984).

3.RISULTATI E DISCUSSIONE

Il suolo utilizzato nella sperimentazione (Tabella 2.2) è caratterizzato, oltre che da un pH leggermente alcalino (8,3), anche da una dotazione iniziale di azoto totale pari a 1,19 ‰, più che sufficiente per la normale attività della microflora presente. Il rapporto C/N (10) risultava essere ottimale visto il contenuto di carbonio organico (1,19%). La tessitura del suolo, franco-sabbioso (sabbia 71,7 %, limo 10,6 % e argilla 17,7 %), ha permesso il mantenimento di una buona aerazione.

3.1 Evoluzione dei parametri chimici

3.1.1 Idrocarburi totali (TPH)

Il gasolio viene utilizzato come combustibile nei motori Diesel e appartiene alla vasta gamma di prodotti petroliferi insieme alle benzine, al cherosene e ai combustibili per aviogetti, agli oli combustibili, agli oli lubrificanti, ai bitumi e ai loro derivati.

L'Allegato 1 del D.M. 471/'99, che stabilisce i valori di concentrazione limite accettabili nel suolo e nel sottosuolo riferiti alla specifica destinazione d'uso dei siti da bonificare (ad uso verde pubblico, privato e residenziale oppure ad uso commerciale o industriale), prende in considerazione gli aromatici (Benzene, Etilbenzene, Stirene, Toluene e Cilene), gli IPA (Benzo(a)antracene, Benzo(a)pirene,

Benzo(b)fluorantene, Dibenzo(a)pirene, ...) e gli idrocarburi suddivisi in idrocarburi leggeri C<12 ed idrocarburi pesanti C>12 (Tabella 3.1).

	Suoli ad uso Verde Pubblico, Privato e Residenziale (mg /kg espressi come s.s.)	Suoli ad uso Commerciale o Industriale (mg /kg espressi come s.s.)
Idrocarburi		
Idrocarburi leggeri < C12	10	250
Idrocarburi pesanti >C12	50	750
Aromatici		
Benzene	0,1	2
Etilbenzene	0,5	50
Stirene	0,5	50
Toluene	0,5	50
Cilene	0,5	50
Aromatici policiclici		
Benzo(a)antracene	0,5	10
Benzo(a)pirene	0,1	10
Benzo(b)fluorantene	0,5	10
Dibenzo(a)pirene	0,1	10

Tabella 3.1 – Valori di concentrazione limite accettabili nel suolo e nel sottosuolo riferiti alla specifica destinazione d’uso dei siti da bonificare per alcuni composti idrocarburi.

Dal punto di vista della biodegradazione gli idrocarburi possono presentare una resistenza più o meno marcata alla degradazione microbica in base alla loro struttura chimica, il grado e natura di sostituzioni con composti simili e peso molecolare. Alcuni di questi posseggono un’intrinseca ed elevata resistenza alla degradazione microbica e sono definiti recalcitranti a causa della complessa struttura molecolare; ci sono alcuni composti come gli n-alcani che sono molto più facilmente

degradabili rispetto ai composti monociclici aromatici, i policiclici aromatici e gli asfalteni (Heusemann, 2004).

In Figura 3.1 è mostrato l'andamento della concentrazione degli idrocarburi totali (TPH) del trattamento sterilizzato in due settimane di incubazione; il valore misurato ha permesso di quantificare e valutare la perdita degli idrocarburi nel terreno dovuta al fenomeno di evaporazione, che si assestava intorno al 40%. Il dato si colloca all'interno dei valori presenti in letteratura, compresi tra il 15% e il 60% (Heusemann, 2004). L'ampia variazione dei dati è sostanzialmente dovuta alle differenti condizioni sperimentali all'interno della prove. L'assenza di variazione tra il t_1 (7giorni) e il t_2 (14 giorni) sta ad indicare che l'evaporazione, pur consistente, non si prolunga oltre la prima settimana di incubazione.

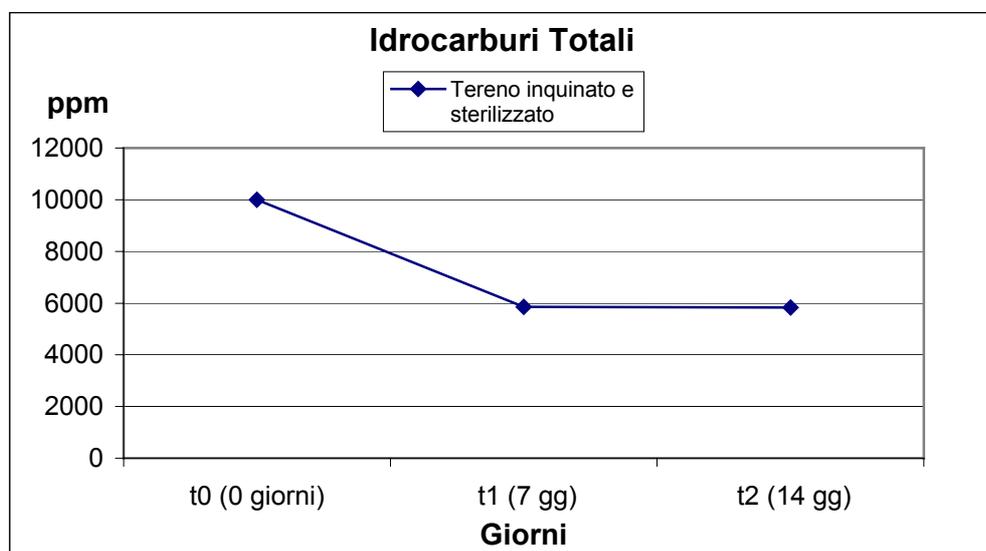


Figura 3.1 – Valori di concentrazione degli idrocarburi totali a 0, 7 e 14 giorni dall'inizio dell'incubazione.

In Tabella 3.2 e in Figura 3.2 sono mostrati gli andamenti della concentrazione degli idrocarburi totali durante tutto il periodo di incubazione.

Durante la prima fase della sperimentazione si registra la maggior perdita nel contenuto di idrocarburi in tutti i trattamenti legata, come dimostrato (Figura 3.1), ai fenomeni di evaporazione dei composti più leggeri degli idrocarburi.

Nel tempo, l'abbattimento complessivo risulta piuttosto consistente per tutti i diversi trattamenti biologici con soltanto lievi differenze di efficacia tra un trattamento e l'altro. Al tempo t_6 (107 gg) i valori di concentrazione del TPH risultavano compresi tra 1100 ppm e 1400 ppm. Il trattamento al termine dell'incubazione col contenuto più basso in idrocarburi è stato riscontrato nel trattamento 4% C (89%) (Figura 3.2), ma l'abbattimento del TPH è stato del tutto confrontabile con quello riscontrato nel controllo non trattato (88%). La mancanza di un effetto positivo sulla decontaminazione degli idrocarburi dei trattamenti col compost, diversamente da quanto atteso, potrebbe essere legato alla presenza nel compost verde utilizzato nella sperimentazione di sostanze tossiche, quali polifenoli che possono aver parzialmente inibito la microflora deputata alla degradazione degli idrocarburi.

Idrocarburi Totali (ppm)					
	t₂ (7 gg)	t₃ (14 gg)	t₄ (30 gg)	t₅ (60 gg)	t₆ (107 gg)
Terreno inquinato	3227	2578	1947	1388	1207
1% Compost	3661	3262	2385	1591	1435
2% Compost	4127	3454	2761	1941	1464
4% Compost	3364	2867	2021	1292	1143

Tabella 3.2 – Valori di concentrazione degli idrocarburi totali a 7, 14, 30, 60 e 107 giorni dall'inizio dell'incubazione.

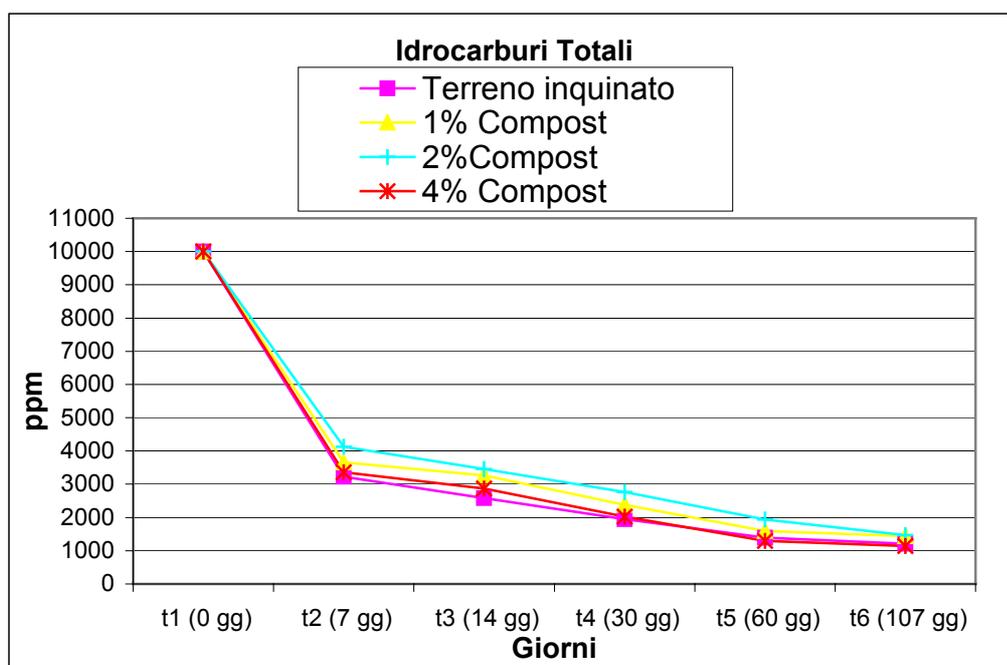


Figura 3.2 – Valori di concentrazione degli idrocarburi totali a 0, 7, 14, 30, 60 e 107 giorni dall'inizio dell'incubazione.

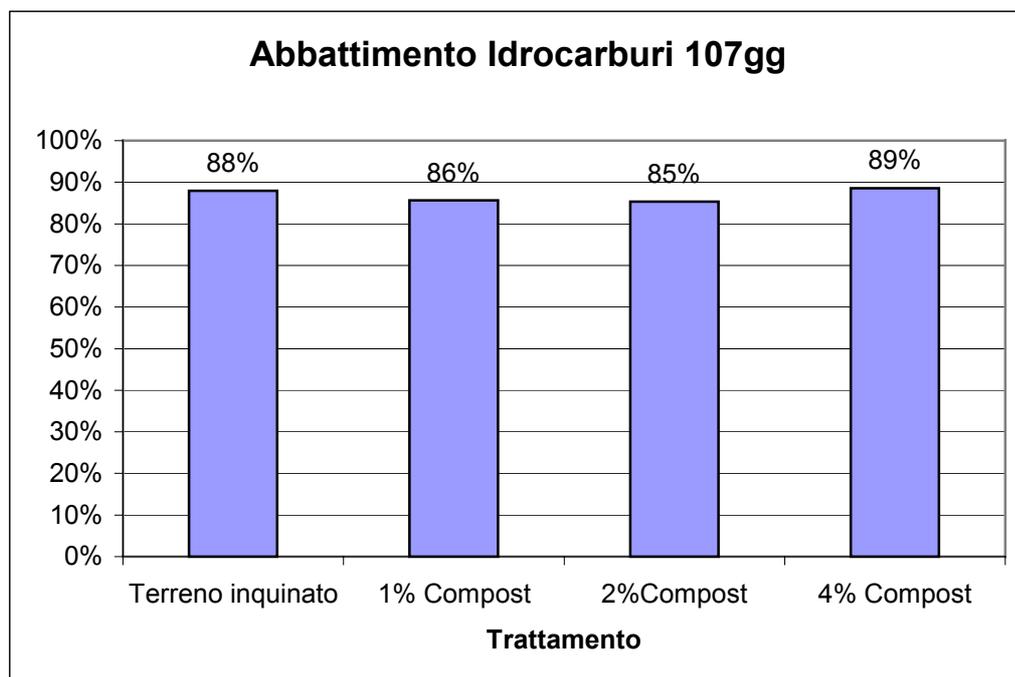


Figura 3.2a – Abbattimento percentuale degli idrocarburi totali.

È comunque interessante notare come i valori indicati dall'Allegato 1 del D.M. 471/'99 (Tabella 3.1) relativi alle due differenti destinazioni d'uso indicate (Verde Pubblico, Privato e Residenziale e Commerciale o Industriale) non siano ancora raggiunti nonostante il notevole abbattimento degli idrocarburi totali (Figura 3.2a).

3.1.2 pH

Il pH fornisce la misura della concentrazione di ioni idrogeno H^+ nella soluzione circolante, cioè la fase liquida presente negli spazi tra le particelle solide del suolo (Alef e Nannipieri, 1995). Il valore del pH di un suolo dipende fortemente dalla natura e dalle caratteristiche chimiche delle superfici solide presenti, chiamate "superfici di scambio" e in particolare dalle cariche positive e negative, dalla loro saturazione e quindi dal numero e dal tipo di basi di scambio presenti (Sequi, 1989).

In base ai valori che assume può influenzare, oltre che l'attività microbica del suolo, anche l'assimilabilità degli elementi nutritivi, la mobilità degli ioni tossici e l'adattabilità delle colture.

Analizzando la Figura 3.3 e la Tabella 3.3, relative all'andamento del pH in tutto il periodo di incubazione di tutti i trattamenti, è possibile notare che le variazioni risultano minime e comprese tra 0,3 e 0,4 unità; tutti i trattamenti mostrano un pH sub-alcalino con valori compresi sempre tra 8 e 8,5.

Nonostante le piccole oscillazioni dei valori di pH nel tempo, si può notare che tra il primo (1 gg) e l'ultimo campionamento (107 gg), il pH aumenta, seppur di poco, in quasi tutti i trattamenti; questo avviene soprattutto negli ultimi due tempi di analisi. I valori passano infatti da 8,2-8,4 al tempo t_1 (1 g) fino a valori tra 8,3-8,5 al tempo t_6 (107 gg); questo può far supporre che l'incubazione abbia favorito la solubilizzazione di specie chimiche alcaline, in seguito alla mineralizzazione della sostanza organica, responsabili dell'aumento di pH, che non sono state rimosse dal suolo poiché l'incubazione è avvenuta in contenitori.

L'apporto di sostanza organica da compost al suolo contaminato non determina nessuna sostanziale variazione dei valori del pH e quindi alcuna influenza sulla attività della flora microbica responsabile della degradazione degli idrocarburi; questo perché sia il suolo che il compost utilizzati nella sperimentazione posseggono già di per sé valori molto simili di pH, 8,3 e 8,4, rispettivamente.

pH						
(p<0,05)	t ₁ (1 gg)	t ₂ (7 gg)	t ₃ (14 gg)	t ₄ (30 gg)	t ₅ (60 gg)	t ₆ (107 gg)
Terreno	8,4 def	8,2 hi	8,2 hi	8,2 hi	8,3 fg	8,5 a
Terreno inq.	8,3 ef	8,2 hi	8,3 fg	8,2 hi	8,4 cde	8,5 abc
1% Compost	8,2 gh	8,2 hij	8,2 gh	8,2 hi	8,5 ab	8,5 bcd
2%Compost	8,2 hi	8,2 hi	8,2 hi	8,1 j	8,4 bcd	8,3 ef
4% Compost	8,3 fg	8,1 ij	8,2 hi	8,0 k	8,3 ef	8,3 fg

Tabella 3.3 – Valori di pH a 1, 7, 14, 30, 60 e 107 giorni dall'inizio dell'incubazione.

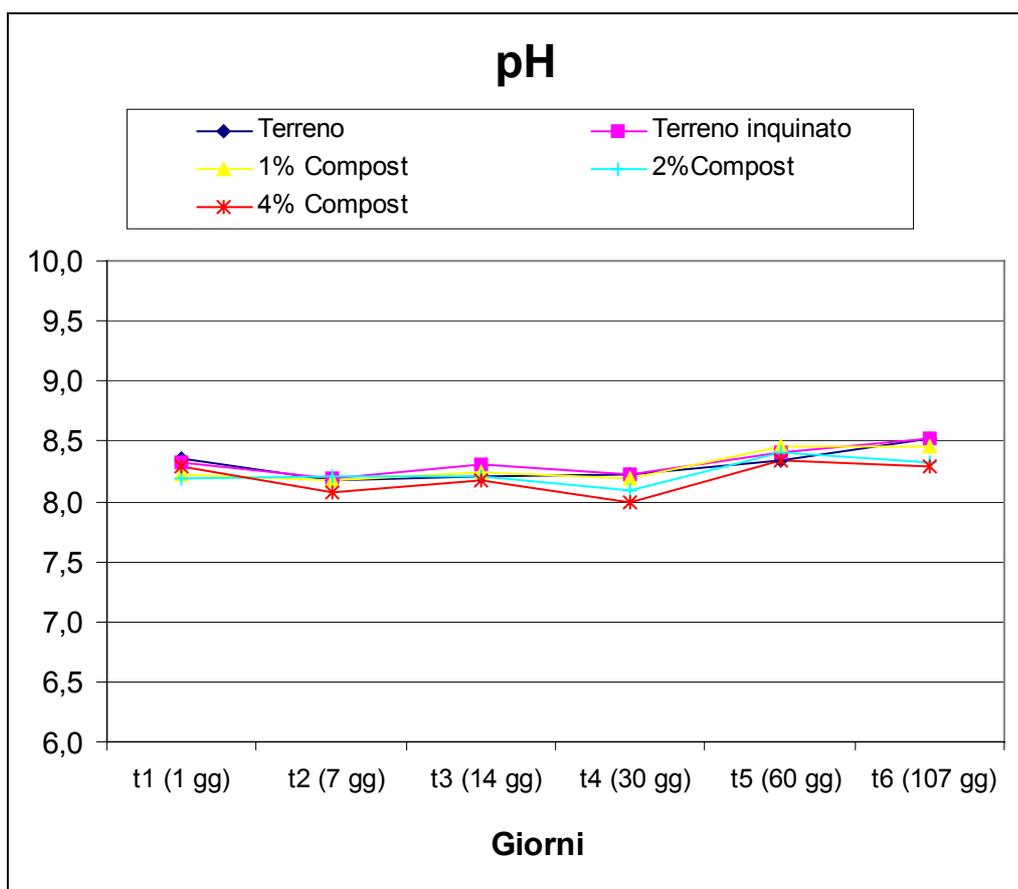


Figura 3.3 – Valori di pH a 1, 7, 14, 30, 60 e 107 giorni dall'inizio dell'incubazione.

3.1.3 Carbonio organico

In Figura 3.4 e in Tabella 3.4 sono rappresentati i valori del Carbonio Organico (CO) in tutti i trattamenti e la loro evoluzione durante la sperimentazione; ad una prima analisi, si nota come i vari trattamenti risultano globalmente ben distinti fra loro denotando differenti % di CO durante i 107 giorni di incubazione.

Nella parte inferiore del grafico si nota che il suolo non trattato (T), ha il minor contenuto di carbonio organico; il suolo inquinato con la miscela di idrocarburi (TI), invece, possiede una maggiore quantità, seppur minima di carbonio dovuta appunto all'apporto di C dal gasolio aggiunto, come atteso. I trattamenti che hanno avuto differenti apporti di compost (1% C, 2% C e 4% C), oltre che della miscela di idrocarburi, risultano possedere una quantità significativamente maggiore di carbonio organico, valori che si mantengono difatti nel tempo.

Seguendo l'andamento temporale dei differenti trattamenti è possibile notare che in tutti i trattamenti, sia dove è stato aggiunto il compost che nei controlli, il contenuto di carbonio organico rimane pressoché costante, con variazioni comprese tra 0,15-0,25 %.

Carbonio Organico (%)						
(p<0,05)	t₁ (1 gg)	t₂ (7 gg)	t₃ (14 gg)	t₄ (30 gg)	t₅ (60 gg)	t₆ (107 gg)
Terreno	1,08 n	1,11 mn	1,20 l	1,18 lm	1,17 lm	1,06 n
Terreno inq.	1,76 h	1,55 j	1,50 jk	1,46 k	1,51 jk	1,67 i
1% Compost	1,97 g	1,92 g	1,92 g	1,93 g	1,99 g	1,95 g
2% Compost	2,34 d	2,21 f	2,23 f	2,26 ef	2,36 d	2,32 de
4% Compost	2,63 a	2,47 c	2,56 ab	2,55 b	2,59 ab	2,62 ab

Tabella 3.4 – Valori del Carbonio Organico (CO) a 1, 7, 14, 30, 60 e 107 giorni dall'inizio dell'incubazione.

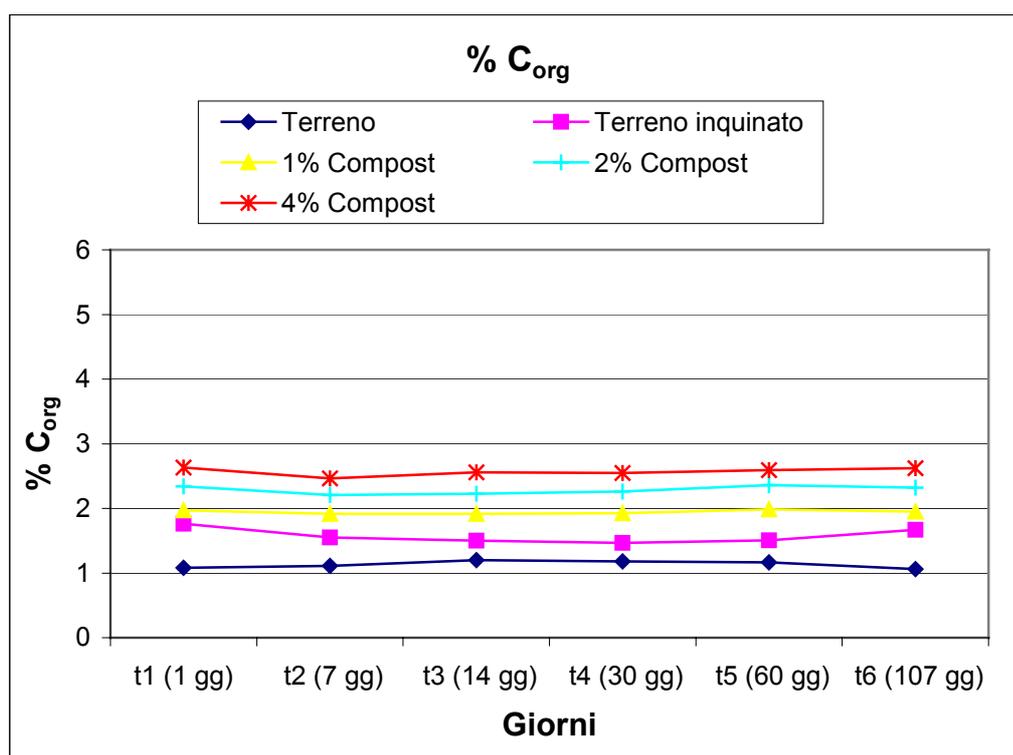


Figura 3.4 – Valori del Carbonio Organico (CO) a 1, 7, 14, 30, 60 e 107 giorni dall'inizio dell'incubazione.

3.2 Evoluzione dei parametri biochimici

3.2.1 Lipasi

Una significativa quantità di lipidi viene in contatto col suolo (tramite diverse vie) sottoforma di trigliceridi, costituenti la principale forma di accumulo di grassi all'interno dei tessuti di piante ed animali. Il processo di degradazione dei lipidi è catalizzato dalla lipasi e porta alla liberazione di glicerolo ed acidi grassi. Questo enzima viene prodotto da una larga varietà di microrganismi, animali e piante.

Recentemente è stata dimostrata da alcuni autori (Margesin *et al.*, 1999 e 2000) la stretta correlazione esistente tra l'inquinamento organico del suolo ed una sviluppata attività lipasica, che a differenza di altri parametri, sia biochimici che biologici, come ad esempio la deidrogenasi, che invece aumenta nel tempo, diminuiscono durante la decontaminazione; questo parametro biochimico viene perciò ritenuto un valido strumento nel monitoraggio della biodegradazione dei suoli caratterizzati dalla presenza di contaminanti organici, quali ad esempio gli idrocarburi.

Durante tutta la fase di decontaminazione del suolo, nei vari trattamenti sono stati riscontrati comportamenti piuttosto simili seppur con lievi differenze. Come si vede in Tabella 3.5 e in Figura 3.5 dopo una lieve diminuzione dell'attività lipasica fino alla seconda settimana della sperimentazione, si assiste ad un leggero aumento di questo parametro biochimico in tutti i trattamenti. I valori più bassi dell'attività lipasica,

particolarmente evidenti nel suolo non trattato (T), potrebbero essere legati all'inibizione esercitata dagli idrocarburi; infatti i valori fra suolo inquinato e non contaminato, (TI) e (T) risultano statisticamente differenti. Nella tesi ammendate, si registrano quasi sempre valori più elevati dell'attività lipasica rispetto al campione inquinato; la presenza della sostanza organica del compost potrebbe aver "tamponato" l'azione inibente dei TPH. Successivamente, la graduale scomparsa degli idrocarburi ha permesso una leggera ripresa dell'attività lipasica, fino a raggiungere valori sostanzialmente simili al giorno 107 in tutte le tesi.

Lipasi ($\mu\text{g PNP/g}\cdot 10^3$)					
(p<0,05)	t₁ (7 gg)	t₂ (14 gg)	t₃ (30 gg)	t₄ (60 gg)	t₅ (107 gg)
Terreno	1080,4 cdefg	964,7 fgh	1203,8 bcdef	1354,7 abcd	1256,2 bcdef
Terreno inq.	899,2 gh	752,4 h	898,9 gh	1025,7 efgh	1419,6 ab
1% Compost	1290,2 bcde	1102,5 cdefg	1123,1 cdefg	1179,8 bcdefg	1497,0 a
2% Compost	1082,1 cdefg	1065,7 defg	1145,7 bcdefg	1173,2 bcdefg	1280,9 bcde
4% Compost	1236,6 bcdef	1087,1 cdefg	1272,4 bcde	1335,0 abcd	1365,7 abc

Tabella 3.5 – Valori dell'attività lipasica a 7, 14, 30, 60 e 107 giorni dall'inizio dell'incubazione.

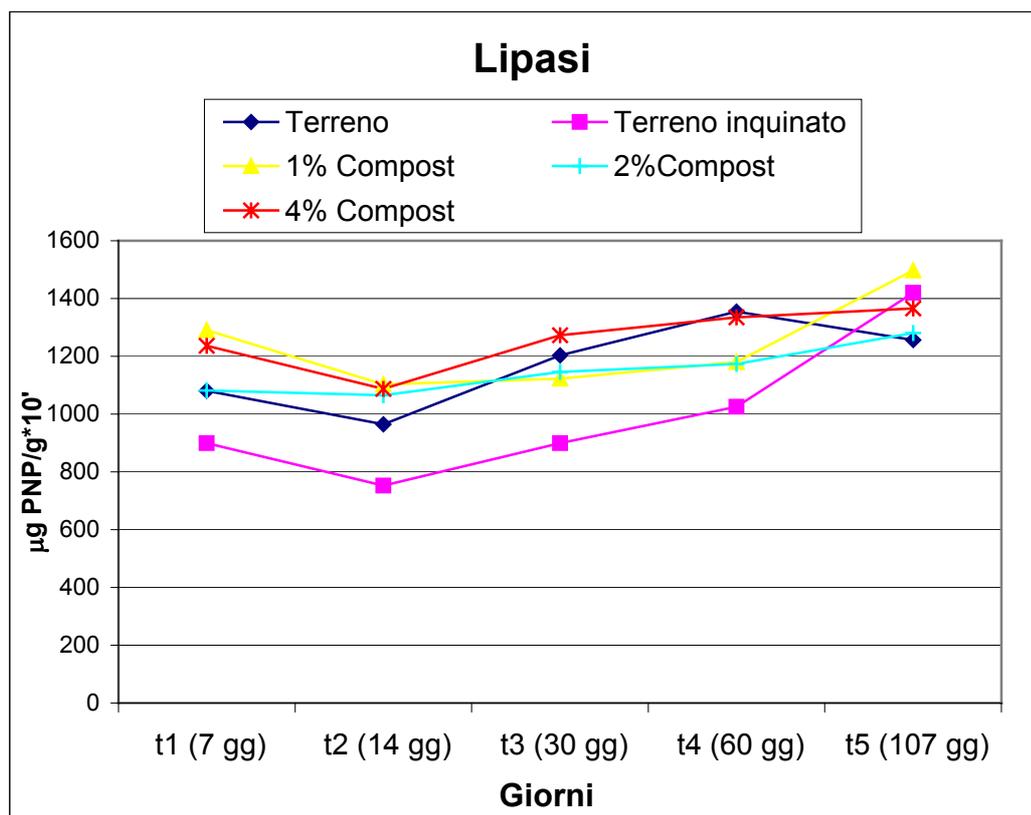


Figura 3.5 – Valori dell'attività lipasica a 7, 14, 30, 60 e 107 giorni dall'inizio dell'incubazione.

3.2.2 Deidrogenasi

L'ossidazione biologica dei composti organici è generalmente dovuta al processo di deidrogenazione; l'attività deidrogenasica propria, ad opera dei microrganismi, può essere confusa con quella fenolossidasica extracellulare e con l'azione dei composti inorganici che catalizzano la stessa reazione. Gli enzimi che catalizzano tale processo possono essere di vario tipo pur essendo altamente specifici. Tali enzimi, rapidamente degradati, sono presenti in tutte le specie microbiche e trasferiscono idrogeno ed elettroni dal substrato ad un accettore durante la prima fase di ossidazione della sostanza organica. La misura di questi enzimi permette di monitorare l'attività microbica di un suolo, come indice dell'attività ossidativa totale. L'attività deidrogenasica è correlata negativamente con la presenza di alcuni composti tossici, come i fenoli, mentre è correlata positivamente con l'evoluzione di CO₂.

Osservando la Tabella 3.6 e la Figura 3.6, relative all'andamento temporale della deidrogenasi, si nota che all'inizio della sperimentazione (t₁), i valori più alti sono rappresentati dai trattamenti in cui era stato aggiunto compost, in proporzione alla dose applicata. A partire dalla seconda settimana tutti i valori della deidrogenasi diminuiscono. Il trend discendente è stato osservato anche per il trattamento con la massima aggiunta di compost; il trattamento col 2 e particolarmente col 4% di compost mantengono tuttavia un'attività deidrogenasica più alta e significativamente differente da tutti gli altri per tutto il periodo.

Tali risultati riscontrati durante la fase di recupero del suolo inquinato sono in accordo con quanto riportato in letteratura (Namkoong *et al.*, 2002; Margesin *et al.*, 2000).

L'andamento di questo parametro biochimico, espressione dell'attività microbica, rivela quindi un'intensa attività durante la fase iniziale della decontaminazione, aumentando poi gradualmente a diminuire e parallelamente alla diminuzione del contenuto di idrocarburi totali.

Deidrogenasi (g TTF/g*h)					
(p<0,05)	t₁ (7 gg)	t₂ (14 gg)	t₃ (30 gg)	t₄ (60 gg)	t₅ (107 gg)
Terreno	2,56 g	3,08 fg	2,89 fg	2,15 gh	1,05 h
Terreno inq.	4,73 de	4,83 de	2,67 g	1,78 gh	1,86 gh
1% Compost	9,75 c	8,87 c	5,09 de	2,14 gh	2,89 fg
2% Compost	12,04 ab	11,32 b	5,72 d	1,94 gh	4,10 ef
4% Compost	11,33 b	12,89 a	8,55 c	4,18 ef	6,08 d

Tabella 3.6 – Valori dell'attività deidrogenasica a 7, 14, 30, 60 e 107 giorni dall'inizio dell'incubazione.

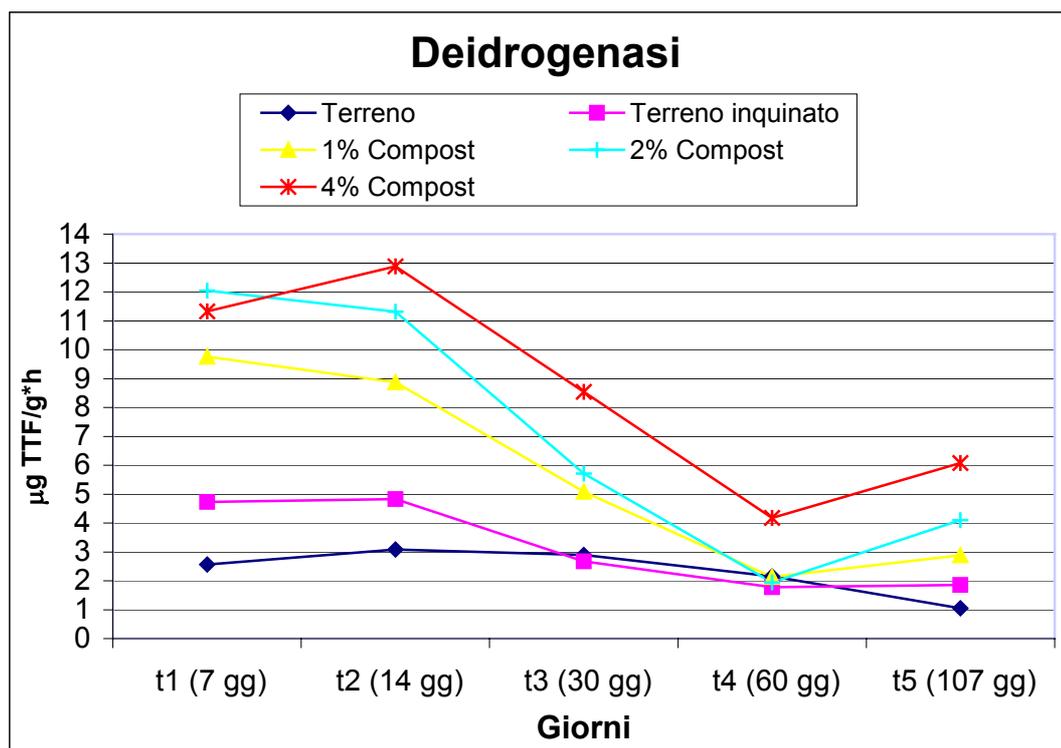


Figura 3.6 – Valori dell'attività deidrogenasica a 7, 14, 30, 60 e 107 giorni dall'inizio dell'incubazione.

3.3 Evoluzione dei parametri biologici

3.3.1 Attività respiratoria del terreno

Tutti gli organismi metabolicamente attivi presenti in un suolo consumano O₂ per svolgere i loro processi metabolici producendo CO₂ (Anderson, 1982). La somma CO₂ della sviluppata dal suolo definisce la sua attività respiratoria e rappresenta un importante indice dell'attività microbica del suolo poiché la viene prodotta grazie alla degradazione dei composti organici presenti (Namkoong *et al.*, 2002).

L'attività respiratoria di un suolo rappresenta inoltre un indice per valutare la mineralizzazione del carbonio (Anderson, 1982).

Dalle prove di respirazione si ottiene la quantità di CO₂ svolta dal terreno nell'intervallo di tempo intercorrente tra ogni misurazione e la precedente; questi dati sono detti incrementali perché misurano l'incremento di carbonio mineralizzato nell'intervallo di tempo considerato (sviluppo giornaliero di CO₂). Sommando per ogni tempo *t* tutti valori incrementali a partire dal giorno 1, si hanno i valori cumulativi (sviluppo cumulativo di CO₂).

Lo sviluppo giornaliero di anidride carbonica rappresentato in Figura 3.7a, mostra come tutti i trattamenti, ad eccezione del terreno non trattato (T), dopo una breve inibizione iniziale presentino una ripresa generale dell'attività respiratoria dovuta forse ad un'inibizione della crescita microbica provocata dall'aggiunta di idrocarburi. Il trattamento T invece possiede il proprio massimo di respirazione al 1° giorno di incubazione per poi continuare a diminuire costantemente. La ripresa dell'attività respiratoria, riscontrata nelle tesi ammendate, potrebbe essere

riconducibile alla presenza di materia organica presente nei tre trattamenti col compost (1% C, 2% C e 4% C), dato che durante i giorni 2-5 i valori maggiori riguardano il trattamento col 4% di compost; valori inferiori si riscontrano in quello col 2% e valori ancor più bassi in quelli con l'1%, comunque maggiori rispetto al trattamento in cui era presente solo la fonte di inquinamento.

Durante il periodo successivo, fino al 24° giorno, si assiste ad una diminuzione della respirazione, in cui il valore più basso risultava sempre quello col solo terreno, mentre quello più alto era rappresentato dal 4% C; gli altri trattamenti infine avevano valori simili ma inferiori, seppur di poco, a quelli col maggior contenuto di compost.

Lo sviluppo cumulativo di CO₂, mostrato in Figura 3.7b, conferma le osservazioni fatte nello sviluppo giornaliero; i trattamenti per i primi due giorni di sperimentazione rimanevano su valori simili, mentre col proseguimento dell'incubazione le differenze si rendevano sempre più evidenti.

È stato infine studiato l'andamento della mineralizzazione della CO₂, applicando il modello di cinetica del primo ordine di Stanford e Smith (1972). L'equazione del primo ordine è la seguente:

$$C_t = C_0 * [1 - \exp(-kt)]$$

dove C_t rappresenta la quantità di carbonio mineralizzato al tempo t espressa in mg C-CO₂/100g, C₀ rappresenta la quantità di carbonio potenzialmente mineralizzabile espressa in mg C-CO₂/100g, k è la costante cinetica di decomposizione del carbonio (velocità di mineralizzazione del carbonio organico nel suolo) e t è il tempo espresso in giorni. I parametri dell'equazione, riportati in Tabella 3.7, mostrano che tale funzione rappresenta in maniera ottimale l'andamento di tutti i

trattamenti, come si può notare dai valori molto elevati di R^2 , compresi tra 0,98 e 0,99.

La costante k , che rappresenta la velocità di mineralizzazione, nel trattamento T, senza idrocarburi, aveva il valore maggiore, pari a 0,10, pur in presenza di un livello molto inferiore di carbonio potenzialmente mineralizzabile; TI aveva un valore pari ad un terzo di quello del suolo non trattato ($k=0,03$), mentre nei trattamenti in presenza di compost e idrocarburi il valore di k risultava uguale in tutti e tre i trattamenti, pari a 0,06, cioè un valore doppio rispetto al trattamento inquinato in cui è assente il compost (TI); questo dimostra, similmente a quanto osservato per la lipasi, come la presenza degli idrocarburi eserciti un'influenza negativa sulla velocità di mineralizzazione del carbonio, che però è attenuata dalla presenza dell'ammendante.

	C_t (mg C-CO ₂ /100g)	C_0 (mg C-CO ₂ /100g) ($p < 0,05$)	k	R^2
Terreno	53,5	55,3	0,10	0,982
Terreno inq.	112,2	196,4	0,03	0,999
1% Compost	118,2	157,6	0,06	0,999
2% Compost	128,0	161,6	0,06	0,998
4% Compost	154,1	197,7	0,06	0,998

Tabella 3.7 – Parametri utilizzati nei modelli matematici per la descrizione della cinetica di mineralizzazione del carbonio nel suolo.

	g C-CO ₂ /100g	CO (%)	(C-CO ₂ *100)/CO
Terreno	0,05	1,08	4,95
Terreno inq.	0,11	1,76	6,37
1% Compost	0,12	1,97	6,01
2% Compost	0,13	2,34	5,47
4% Compost	0,15	2,63	5,85

Tabella 3.8 – Tasso di mineralizzazione, espresso come percentuale di C-CO₂ rispetto al Carbonio Organico (CO), nel suolo.

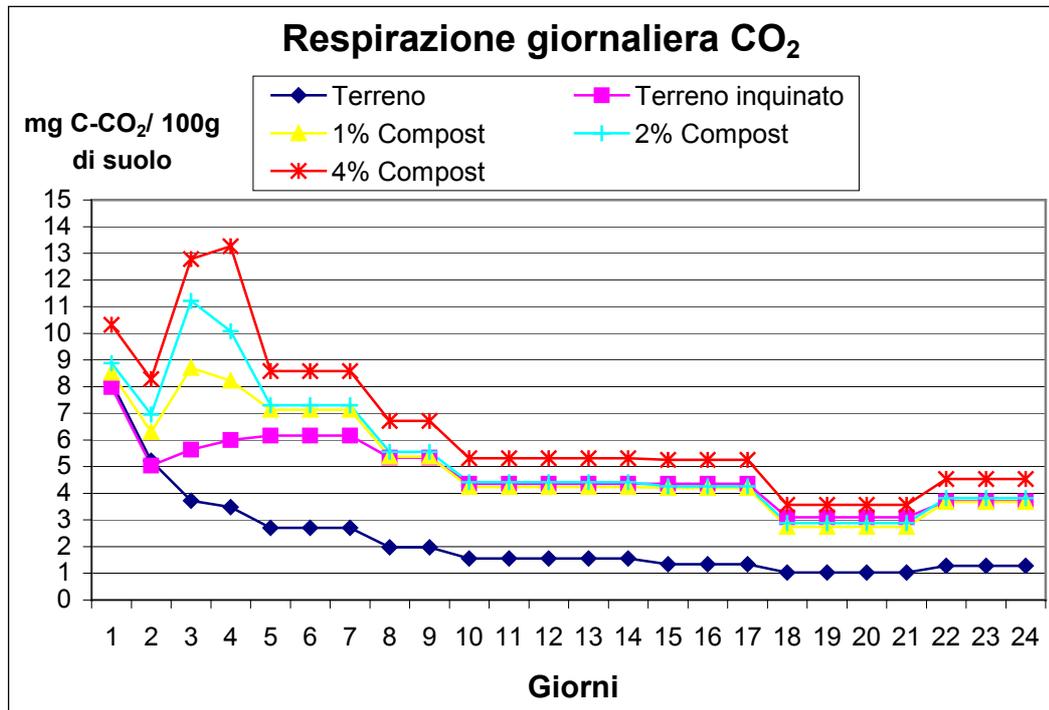


Figura 3.7a – Sviluppo giornaliero di CO₂ dei trattamenti biologici durante la fase di incubazione durata 24 giorni.

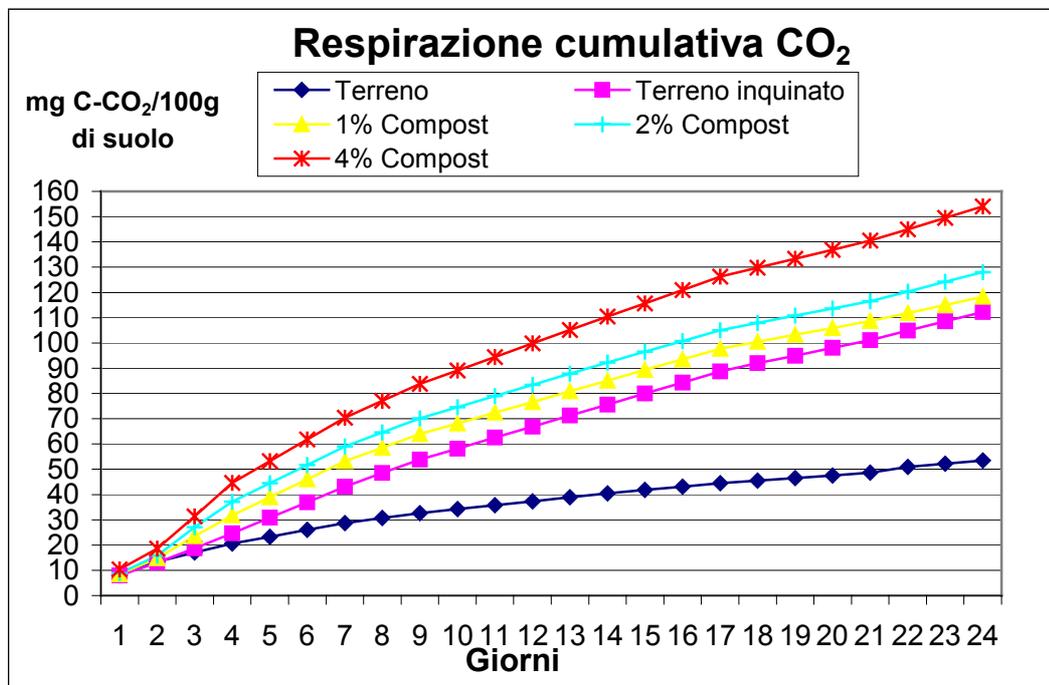


Figura 3.7b – Sviluppo cumulativo di CO₂ dei trattamenti biologici durante la fase di incubazione durata 24 giorni.

3.3.2 ATP

L'ATP (adenosina trifosfato) è presente in tutti gli organismi viventi, dove funziona sia come coenzima che come substrato. L'utilizzo di ATP nel suolo come biomassa microbica è basato sull'assunzione che l'ATP sia presente in maniera relativamente costante nelle cellule microbiche e che non sia associato né alle cellule morte né adsorbito dai componenti del suolo.

L'estrazione e la misurazione dell'ATP nel suolo viene effettuata tramite il saggio della bioluminescenza, basato sulla quantità di luce emessa in presenza del sistema luciferina-luciferasi.

I valori della concentrazione di ATP rappresentano un importante indice di attività microbica e di funzione del suolo. I valori presenti in Tabella 3.9 e in Figura 3.8 ne mostrano l'andamento durante tutto il periodo di incubazione. È innanzitutto possibile notare come durante tutta la sperimentazione i valori più alti si siano registrati nei trattamenti col compost, proporzionalmente alla percentuale presente, sintomo della capacità dell'ammendante nello stimolare l'attività della biomassa. Dopo un iniziale e leggero aumento fino al 14° giorno di incubazione, si assiste ad una diminuzione dell'ATP in tutti i trattamenti fino al tempo t_4 (60gg), dove si trova un picco verso il basso, in cui tutti i campioni raggiungono valori statisticamente uguali. Questo comportamento potrebbe essere spiegato dalla minor disponibilità di nutrienti per i microrganismi presenti nel suolo. Successivamente si assiste ad una ripresa dell'attività della biomassa microbica in tutti i trattamenti, più imponente nei trattamenti con presenza di compost. Alla fine dell'incubazione anche i trattamenti T e TI aumentavano, ma si mantenevano sempre significativamente inferiori di quelli osservati nelle tesi ammendate con compost.

ATP (ng ATP/ g suolo)					
(p<0,05)	t₁ (7 gg)	t₂ (14 gg)	t₃ (30 gg)	t₄ (60 gg)	t₅ (107 gg)
Tereno	196,71 efgh	279,93 cde	195,83 efgh	75,65 j	212,84 efg
Terreno inq.	227,26 efg	254,12 def	171,18 fghi	83,30 ij	207,10 efg
1% Compost	280,14 cde	418,05 ab	272,10 de	90,91 ij	380,36 b
2%Compost	338,24 bcd	481,53 a	344,77 bcd	113,16 hij	374,01 b
4% Compost	379,94 b	427,49 ab	367,04 bc	155,72 ghij	398,42 ab

Tabella 3.9 – Valori della biomassa microbica a 7, 14, 30, 60 e 107 giorni dall'inizio dell'incubazione.

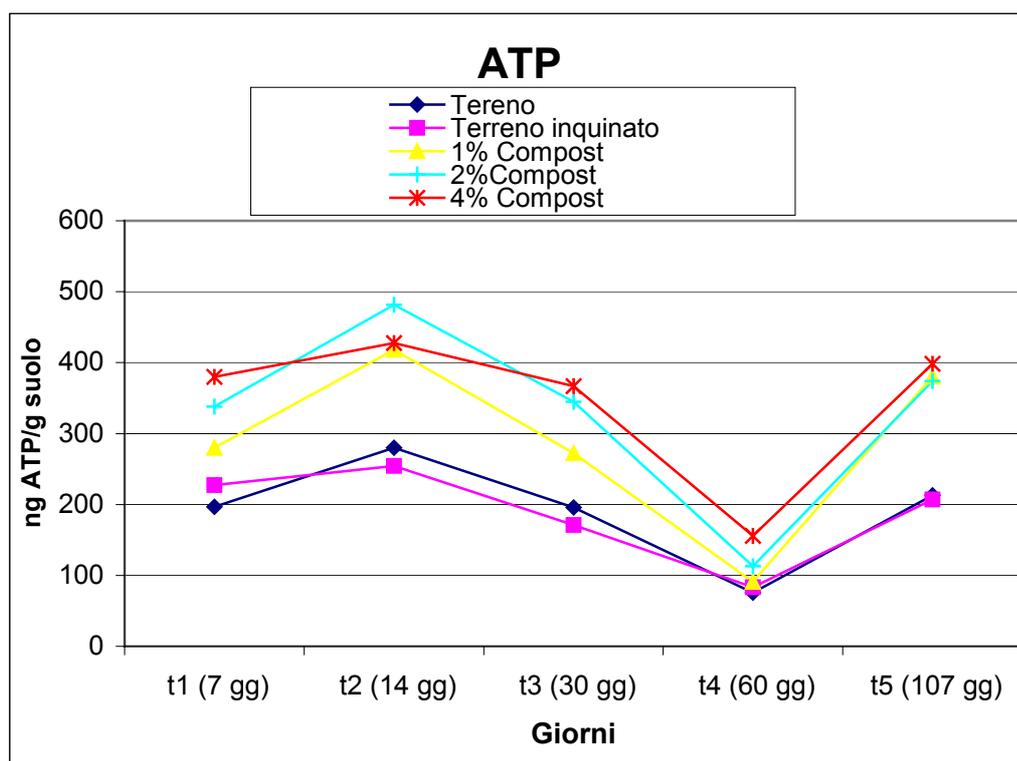


Figura 3.8 – Valori della biomassa a 7, 14, 30, 60 e 107 giorni dall'inizio dell'incubazione.

4. CONCLUSIONI

Le prove effettuate in laboratorio per valutare l'efficacia dell'applicazione di tecniche di biorisanamento e individuare idonei parametri indicatori nella decontaminazione di un suolo inquinato da idrocarburi, hanno permesso di verificare che:

- ✓ L'applicazione dell'ammendante compostato verde ha stimolato il metabolismo del suolo poiché gli indici di attività microbica (attività respiratoria, ATP) e le attività enzimatiche hanno mostrato valori superiori rispetto al suolo non trattato (T) e inquinato (TI).
- ✓ Il compost verde utilizzato nella sperimentazione tuttavia non ha fatto registrare nessun evidente effetto positivo nella decontaminazione del suolo, nemmeno in relazione alle quantità di materiale aggiunto, diversamente da quanto atteso.
- ✓ I parametri studiati che meglio hanno rispecchiato il processo di biorecupero del suolo sono state la deidrogenasi, la lipasi e l'attività respiratoria del terreno.

5. BIBLIOGRAFIA

Anderson J.P.E. (1982). *Soil respiration*. Methods of soil analysis, chemical and microbiological properties, part 2, 2nd edn. Agronomy. American society of Agronomy, Madison, Wisconsin.

Alef K., Nannipieri P. (1995). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London.

APAT (2002). *Relazione annuale al Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio sulle caratteristiche di alcuni combustibili liquidi prodotti, importati ed utilizzati*.

APAT (2004). *Metodologie, tecniche e procedure per il supporto degli interventi di valorizzazione dei siti inquinati*.

APAT (2006). Sito internet: <http://www.apat.gov.it>.

AA.VV. (1994). *Metodi ufficiali di analisi chimica dei suolo*. Ministero delle Risorse Agricole, Alimentari e Forestali: Osservatorio Nazionale Pedologico e per la Qualità del Suolo. ISMEA, Roma.

Bento F.M., Camargo F.A.O., Okeke B.C., Frankenberger W.T. (2005). *Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation*. *Bioresource Technology* 96: 1049-1055.

Boopathy R. (2000). *Factors limiting bioremediation technologies*. *Bioresource Technology* 74: 63-67.

Boopathy R. (2004). *Anaerobic biodegradation of no.diesel fuel in soil: a soil column study*. *Bioresource Technology* 94: 143-151.

Casida L.E., Klein D.A., Santoro T. (1964). *Soil dehydrogenase activity*. *Soil Science* 98: 371-376.

Chen J., Wu C., Wang J., Ma J. (2006). *Performance evaluation of biofilters packed with carbon foam and lava for nitric oxide removal*. *Journal of Hazardous Material* (article in press).

Ciardi C., Nannipieri P. (1990). *A comparison of methods for measuring ATP in soil*. Soil Biology and Biochemistry 22: 725-727.

Decreto Legislativo 5.02.97, n. 22, *Attuazione delle direttive 91/156/CEE sui rifiuti, 91/689/CEE sui rifiuti pericolosi e 94/62/CE sugli imballaggi e sui rifiuti di imballaggio*, pubblicato in G.U. n. 38 del 15 febbraio 1997.

Direttiva 96/61/CEE del 24.09.96, *sulla prevenzione e la riduzione integrate dell'inquinamento*, in G.U.C.E. L257 del 10.10.1996.

EniTecnologie e AgipPetroli (2001). *La bonifica biologica dei siti inquinati da idrocarburi*. Ulrico H., Milano.

European Environmet Agency (2005). *The European environment – State and outlook 2005*. Copenhagen.

Franco I., Contin M., Bragato G., De Nobili M. (2004). *Microbiological resilience of soil contaminated with crude oil*. Geoderma 121: 17-30.

Hejazi R.F., Husain T., Khan F.I. (2003). *Landfarming operation of oily sludge in arid region – human health risk assessment*. Journal of Hazardous Material B 99: 287-302.

Huesemann M.H, (2004). *Biodegradation and bioremediation of petroleum pollutants in soil*. In: Ajay Singh – Owen P. Ward (Eds.), *Applied Bioremediation and Phytoremediation*. Soil Biology – Series Editor, pagg. 13-34.

Jørgensen K. S., Puustinen J., Suortti A.-M. (2000). *Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles*. *Environmental Pollution* 107: 245-254.

La Repubblica, 19 Novembre 2002.

Legge 31 luglio 2002, n.179, *Disposizioni in materia ambientale*, pubblicato in G.U. n. 189 del 13-8-2002.

Levi Minzi R., Riffaldi R., Saviozzi A. (1990). *Carbon mineralization in soil amended with different organic material*. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 31: 325-335.

Margesin R., Feller G., Hämmerle M., Stenger U., Schinner F. (2002). *A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil*. *Biotechnology Letters* 24: 27-33.

Masciandaro G., Ceccanti B. (1999). *Assessing soil quality in different agro-ecosystems through biochemical and chemico-structural properties of humic substances*. Soil & Tillage Research 51: 129-137.

McCarthy K., Walker L., Vigoren L., Bartel J. (2004). *Remediation of spilled petroleum hydrocarbons by in situ landfarming at an arctic site*. Cold Regions Science and Technology 40: 31-39.

Molina-Barahona L., Rodríguez-Vázquez R., Hernández-Velasco M., Vega-Jarquín C., Zapata-Pérez O., Mendoza-Cantù A., Albores A. (2004). *Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and suppletion with crop residues*. Applied Soil Ecology 27: 165-175.

Namkoong W., Hwang E.-Y., Park J.-S., Choi J.-Y. (2002). *Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting*. Environmental Pollution 119: 23-31.

Nocentini M., Pinelli D., Fava F. (2000). *Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures: the residual concentration problem*. Chemosphere 41: 1115-1123.

Platen H. (1995). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. ISBN: 0-12-513840.

Raffaelli L., Raimondi P. (1998). *Accertamento, strategie e tecniche di bonifica*, in Giornate di aggiornamento sul tema “Idrocarburi: problematiche di accertamento e gestione nelle acque e nei suoli”, 18-19 Maggio 1998.

Rivera-Espinoza Y., Dendooven L. (2004). *Dynamics of carbon, nitrogen hydrocarbons in diesel-contaminated soil amended with biosolids and maize*. Chemosphere 54: 379-386.

Sarkar D., Ferguson M., Datta R., Birnbaum S. (2005). *Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids additivo, carbon supplementation and monitored natural attenuation*. Environmental Pollution 136: 187-195.

Sequi P. and Nannipieri P. (1989). *Il suolo come sistema biologico*. In “Chimica del Suolo” pp. 224-240. Patron Editore, Bologna.

Stanford G., Smith S.J. (1972). *Nitrogen mineralization potentials of soil*. Soil Science Society American Proceedings 36: 465-472.

Van Gestel K., Mergaert J., Swings J., Coosemans J., Ryckeboer J. (2003). *Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste*. Environmental Pollution 125: 361-368.

Vasudevan N., Rajaram P. (2001). *Bioremediation of oil sludge-contaminated soil*. Environment International 26: 409-411.

www.frtr.gov

Yu K.S.H., Wong H.A.Y., Yau K.W.Y., Wong Y.S., Tam N.F.Y. (2005). *Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments*. Marine Pollution Bulletin 51: 1071-1077.

Zar J.K. (1984). *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Englewood Cliffs.

Zerlia T. (2001a). *Impatto ambientale dei prodotti petroliferi nel suolo: Parte I - Meccanismi di diffusione dell'inquinamento da idrocarburi*. La rivista dei combustibili 55 (1): 33-40.

Zerlia T. (2001b). *Impatto ambientale dei prodotti petroliferi nel suolo: Parte II – Composizione dei prodotti petroliferi e proprietà chiave*. La rivista dei combustibili 55 (3): 123-130.

6.RINGRAZIAMENTI

Porgo i miei più sentiti ringraziamenti in primo luogo al Prof. Saviozzi e al Dott. Cardelli che con questo lavoro di tesi mi hanno permesso di sviluppare un argomento per me interessante; inoltre li ringrazio per la pazienza e la disponibilità avuta nei miei confronti durante la fase sperimentale del lavoro e per tutti i preziosi ed utili consigli che mi hanno fornito per la stesura della tesi.

Oltre a loro ringrazio tutte le persone e tutti i colleghi del Dipartimento di Chimica e Biotecnologie Agrarie dell'Università di Pisa che hanno allietato e reso più piacevole la mia permanenza presso il dipartimento, in particolare Federica, Silvia e Raffaella.

Ringrazio enormemente tutta la mia famiglia che mi ha dato l'opportunità di intraprendere e portare a termine questo percorso di studi ricco di insidie; soprattutto li ringrazio per il sostegno che mi hanno dato, non solo economico, specialmente nei momenti più delicati della mia carriera universitaria.

Ringrazio in particolar modo Veronica che mi è sempre stata accanto e che mi ha permesso, attraverso il suo affetto e la sua ancor più grande pazienza, di coronare questo sogno.

Ringrazio poi tutti i miei "compagni" di avventura che ho conosciuto e sempre più apprezzato, con cui ho condiviso momenti indimenticabili; in particolare ringrazio (in rigoroso ordine alfabetico): Agnese, Alessio, Guido, Leonardo, Leonardo, Lorenzo, Marco, Marina, Matteo, Riccardo,

Roberta, Rossella, Stefano, Valentina e tutti coloro che ho incontrato durante il mio percorso di studi.

Un ringraziamento particolare va poi a tutti i miei amici di piazzetta e tutti i calcettotofili del lunedì che mi sono sempre stati vicino e per la loro costante presenza nell' allietare i miei momenti di svago.