

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"
SCUOLA POLITECNICA E DELLE SCIENZE DI BASE



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA CIVILE, EDILE ED AMBIENTALE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE
INGEGNERIA PER L'AMBIENTE E IL TERRITORIO

ABSTRACT

EFFECTS OF SURFACTANTS ON BIOREMEDIATION
PROCESSES APPLIED IN THE VADOSE ZONE OF SITES
CONTAMINATED BY PETROLEUM HYDROCARBONS

RELATORE

Prof. Ing. Massimiliano Fabbricino

CANDIDATO

Marco Fantozzi M67/201

CORRELATORI

Prof. Eric Van Hullebusch

Ing. YoanPechaud

Ing. Vincent Langlois

Ing. Douglas Pino Herrera

ANNO ACCADEMICO 2015/2016

ABSTRACT

EFFETTI DEI SURFATTANTI SUI PROCESSI DI BIORISANAMENTO APPLICATI ALLA ZONA VADOSA DI SITI CONTAMINATI DA IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI (IPA)

La ricerca oggetto della tesi si inserisce nel quadro di un progetto di più ampio respiro dal titolo “Projet MOUSTIC” (“Sustainable Methods and Technologies for Remediation” 2016 – 2018), finanziato da ANR - Agence Nationale de la Recherche - Francia), il cui scopo è superare i limiti correnti in termini di efficienza, costi, sostenibilità e fattibilità del biorisanamento *in-situ* della zona vadosa di siti contaminati da idrocarburi policiclici aromatici attraverso l’utilizzo di schiume surfattanti.

Gli idrocarburi policiclici aromatici (**IPA**) sono composti da anelli aromatici fusi tra loro e generati continuamente dalla combustione incompleta della materia organica. E’ noto che gli IPA con basso peso molecolare sono altamente tossici mentre quelli con alto peso molecolare sono genotossici. Inoltre, molti dei costituenti di tali composti risultano essere cancerogeni e/o mutageni.

Le proprietà fisico-chimiche degli IPA sono tali da non garantire il loro immediato utilizzo da parte dei microorganismi e favoriscono il loro accumulo nel terreno.

Il **biorisanamento** può garantire una soluzione a tale problema. Il principio di tale tecnica è quello di rimuovere gli inquinanti dall’ambiente naturale e/o convertirli in prodotti meno dannosi mediante l’azione di microorganismi endogeni, naturalmente presenti all’interno dell’ambiente contaminato.

Tra i vari fattori ambientali che influenzano la fattibilità del biorisanamento, quali la temperatura, il pH del suolo, la disponibilità di O₂ e nutrienti e la biodisponibilità dell’inquinante, quest’ultimo, definito come l’effetto dei fattori fisico-chimici sul tasso della biodegradazione, è ritenuto il più importante.

Gli IPA possono presentarsi nel terreno in diverse forme fisiche: i) particellare; ii) film liquido; adsorbito iii) sulla superficie del granello di terreno, iv) all’interno del granello stesso; v) in fase acquosa nei pori; vi) in fase liquida o solida, nei pori. Dunque, una frazione dei microorganismi responsabili della degradazione degli IPA può essere fisicamente separata dal substrato da degradare. Inoltre, è noto che i microorganismi sono in grado di degradare un substrato soltanto quando esso si presenta in fase acquosa. Per i composti in esame, il rilascio dalla matrice solida alla fase acquosa è molto lento. Pertanto, gli IPA sono caratterizzati da bassa biodisponibilità. Il rilascio degli IPA dalla superficie di minerali e dalla sostanza organica può essere facilitato tramite l’utilizzo di **surfattanti**.

Per indagare nel dettaglio alcuni di questi aspetti, meglio precisati nel prosieguo, sono stati quindi effettuati, presso il “Laboratoire Géomatériaux et Environnement” (LGE) dell’Université Paris-Est, Marne-la-Vallée, una serie di test a scala banco, i cui risultati costituiscono il nucleo principale della ricerca condotta.

Le attività di laboratorio effettuate, in particolare, sono state le seguenti:

- 1) Test di biocompatibilità tra surfattanti (Tween 80, SDS, CAPB, Lauryl Betaine) e microorganismi endogeni naturalmente presenti nei campioni di suolo contaminato, raccolti presso il sito denominato North of France (NoF) effettuati tramite test respirometrici con strumentazione OxiTOP[®], in fase liquida e sul suolo. Inoltre, con riferimento ai test sul suolo, è stato analizzato il comportamento di quest’ultimo in presenza di sola acqua. Sono state analizzate le frazioni granulometriche di sabbia fine (63-200 µm) (FS) e sabbia grossolana (200-2000 µm) (CS). Per entrambe le frazioni è stato calcolato l’iniziale contenuto d’acqua.
- 2) Analisi della biodegradazione del fenantrene (PHE) in un sistema batch completamente miscelato. Sono state sviluppate, a partire dal suolo contaminato, i) colture batteriche in grado di degradare il fenantrene; è stata analizzata la ii) biodegradazione del fenantrene, la sua solubilizzazione e volatilizzazione attraverso la misura della concentrazione effettuata con cromatografia liquida (HPLC); è stata studiata la iii) crescita microbica contando le Unità formanti colonie (CFU) su piastre Petri;
- 3) Test di biocompatibilità tra surfattanti (CAPB, Lauryl Betaine, SDS) e l’inoculo sviluppato in grado di degradare il fenantrene come sola fonte carboniosa, effettuati attraverso test respirometrici con strumentazione OxiTOP[®], in fase liquida;
- 4) Sviluppo di una tecnica analitica per la determinazione della concentrazione della biomassa basata sulla correlazione dei dati risultanti dalle analisi di densità ottica (OD) @ 400 nm, Unità formanti colonie (CFU), concentrazione del fenantrene (PHE) e massa cellulare secca. La misura dell’assorbanza, infatti, risulta essere molto rapida. Correlando il valore risultante da tale analisi a quelli delle analisi menzionate, le operazioni di misura della concentrazione del fenantrene e dei microorganismi risultano rapide e semplici.

I risultati ottenuti sono riassunti di seguito:

BIOCOMPATIBILITA' SURFATTANTI/MICROORGANISMI ENDOGENI

TEST RESPIROMETRICI (in fase liquida e sul suolo)

I test respirometrici in fase liquida hanno mostrato la biocompatibilità dei 4 surfattanti analizzati. La risposta respirometrica dei microorganismi, espressa in termini di BOD, ha raggiunto valori medi di: 228 mg/L e 18 mg/L per il Tween 80 in concentrazioni di 1.0 g/L e 0.1 g/L, dopo 5 giorni; 485 mg/L per SDS in 2.0 g/L dopo 4 giorni (dati riferiti al solo test 3); 900 mg/L e 550 mg/L per CAPB e Lauryl Betaine entrambi in 1.0 g/L, dopo 5 giorni.

Risultati analoghi sono stati ottenuti in riferimento ai test sul suolo. Il valore di BOD ha raggiunto un valore medio di: 430 mg/L per Tween 80 in entrambe le concentrazioni 1.0 g/L and 0.1 g/L; 362 mg/L per SDS in 2.0 g/L (dati riferiti al solo test 2); 362 mg/L per CAPB in 1.0 g/L; 475 mg/L per Lauryl Betaine in 1.0 g/L. La risposta respirometrica in presenza di sola acqua, in termini di BOD, per i diversi test, rispettivamente, è risultata essere pari a: 407 mg/L, 272 mg/L, 317 mg/L, 498 mg/L. Il periodo di osservazione per tutti i test è stato di 6 giorni. Comparando tali dati, il valore di BOD raggiunto in presenza di sola acqua nel test su Lauryl Betaine è superiore a quello raggiunto in presenza del surfattante. Pertanto, Lauryl Betaine può inibire leggermente l'attività microbica quando versato direttamente sul suolo. Tuttavia, tale comportamento può essere dovuto alle naturali oscillazioni dei processi biologici. Si raccomandano test di durata maggiore.

I test respirometrici sulle due diverse frazioni granulometriche di suolo hanno mostrato che i valori di BOD si innalzano al crescere del contenuto di acqua. Per la frazione di sabbia fine (FS) ciò accadeva fintantoché la risposta respirometrica risultava inibita. Il motivo di tale comportamento può risiedere nel contenuto d'acqua iniziale presente nel suolo. Infatti, analizzando quest'ultimo, le due frazioni granulometriche presentavano valori diversi, rispettivamente 0,9 % (FS) e 2,2 % (CS). Un limitato apporto d'acqua ai microorganismi può aver inibito la loro risposta respirometrica.

BIODEGRADAZIONE DEL FENANTRENE

Sono stati adottati 2 protocolli per 4 campioni:

- A coltura acclimatata al fenantrene solubilizzato in metanolo
- B coltura acclimatata al fenantrene in cristalli
- C controllo sulla solubilizzazione, fenantrene in cristalli (senza biomassa)
- D controllo sulla volatilizzazione, fenantrene solubilizzato in metanolo (senza biomassa)

Il campione A, dopo 5 settimane di osservazione, presentava un biofilm sulle pareti dell'erlenmeyer. Il campione B, invece, presentava microorganismi aggregati in fiocchi,

probabilmente cresciuti intorno ai cristalli di substrato da degradare. Potrebbero essersi quindi formate due diverse famiglie di microorganismi in relazione alle diverse condizioni iniziali del substrato.

Con riferimento alla biodegradazione del fenantrene, erano previsti andamenti decrescenti della concentrazione per i campioni A e B, a causa, appunto, della biodegradazione operata dai microorganismi. Concentrazioni iniziali diverse da zero erano previste per i campioni con fenantrene solubilizzato in metanolo. Viceversa, concentrazioni iniziali uguali a zero erano previste per i campioni contenenti fenantrene in cristalli. In quest'ultimo caso, è necessario che il substrato diffonda in acqua prima di essere degradato ad opera dei microorganismi. Per i campioni C e D, erano previsti, rispettivamente, andamenti teorici della solubilizzazione e volatilizzazione, crescente per il primo, decrescente per il secondo. La procedura di campionamento è risultata essere problematica ed alcuni valori non hanno fornito i risultati sperati. Pertanto, i valori assoluti di tale prova non sono da tenere in considerazione. Tuttavia, è possibile sottolineare la rapida degradazione del fenantrene ad opera dei microorganismi endogeni, i quali consumano il substrato in una settimana.

BIOCOMPATIBILITA' INOCULO/SURFATTANTI

I test respirometrici in fase liquida hanno mostrato la biocompatibilità dei 3 surfattanti analizzati. La risposta respirometrica dei microorganismi, espressa in termini di BOD, ha raggiunto valori medi di 200 mg/L per CAPB in concentrazione di 1.0 g/L; 150 mg/L per Lauryl Betaine in 1.0 g/L; 250 mg/L per SDS in 2.0 g/L. Il valore di BOD risultato dalla "prova in bianco" è risultato essere di 200 mg/L, simile a quello risultato in presenza dei singoli surfattanti, differentemente dalle precedenti prove di laboratorio. Il tempo di osservazione è stato di 5 giorni. Tale comportamento può essere dovuto ad una leggera inibizione dell'attività microbica da parte dei surfattanti o alle naturali oscillazioni dei processi biologici. Tuttavia, dato che il test non è stato condotto in condizioni sterili, altre colonie di microorganismi possono essere intervenute nella degradazione del substrato. Pertanto, il test è da considerare inattendibile e se ne raccomanda la ripetizione in condizioni sterili.

TECNICA ANALITICA PER LA DETERMINAZIONE DELLA BIOMASSA

Il test non ha fornito i risultati sperati in riferimento alla correlazione dei dati con la concentrazione del fenantrene a causa della difficoltà di campionamento già menzionata ed alla naturale oscillazione dei processi biologici. Tuttavia, è stato possibile osservare che alla rapida degradazione del fenantrene corrisponde un aumento della massa microbica e della torbidità del campione. In conclusione, prima di affermare che tale tecnica risulta non adeguata allo scopo preposto, si raccomandano ulteriori prove sperimentali.