

Argomenti del corso: parte 1

☐ Introduzione alla bioremediation

☐ Il cometabolismo

☐ Il suolo e batteri

☒ **Bioremediation in situ**

☐ **Phytoremediation**

☐ **Bioremediation ex situ**



Bioremediation in situ

La bioremediation *in situ* si basa sull'attività biodegradante di microrganismi e si concentra sul miglioramento degli esistenti ma lenti processi di biodegradazione in natura.

Nella Bioremediation i microrganismi sono efficaci contro i contaminanti solo quando hanno accesso a una varietà di composti che fungono da fonte di energia e nutrienti per la crescita.

Solo in pochi casi le condizioni naturali sono tali da non richiedere l'intervento umano.

Queste tecniche sono generalmente le opzioni più desiderabili a causa del costo inferiore e del minore disturbo poiché forniscono il trattamento in atto evitando lo scavo e il trasporto di contaminanti. Il trattamento in situ è limitato dalla profondità del terreno che può essere efficacemente trattato in alcuni casi.



La complessità intrinseca dell'esecuzione del biorisanamento in situ significa che è necessario prestare particolare attenzione alla valutazione del successo di un progetto.

Nessuna prova può dimostrare in modo inequivocabile che i microrganismi hanno bonificato un sito. Pertanto, il Comitato per il biorisanamento in situ raccomanda una strategia di valutazione che costruisca un caso logico e coerente per il biorisanamento basato su linee convergenti di prove indipendenti.

La strategia dovrebbe includere tre tipi di informazioni:

- 1) perdita del contaminante,
- 2) i microrganismi hanno il potenziale di bonifica,
- 3) la bioremediation può essere effettivamente applicata.



Bioremediation *intrinseca*

**biorisanamento intrinseco,
bioremediation naturale,
bioremediation passiva,
bioattenuation**

Microrganismi autoctoni utilizzano l'apporto di nutrienti e **accettori di elettroni** in condizioni ambientali e **crescono** utilizzando, o eventualmente cometabolizzando, gli inquinanti e ne causano la distruzione.

Il biorisanamento intrinseco, se non è troppo lento e il **tasso naturale di biodegradazione** dei contaminanti è più veloce del tasso di migrazione, allora rimane un'opzione perfettamente ragionevole per l'eliminazione di sostanze tossiche.



Bioremediation *intrinseca*

Tasso naturale di biodegradazione:

- Tipo e concentrazione dell'inquinante
- Comunità microbica
- Condizioni idrogeochimiche.

Fasi di controllo della velocità di degradazione:

- **Afflusso di ossigeno**
- **Riduzione popolazione microbica**
- **pH**

Il vantaggio evidente è il basso costo!



Land Farming

Tecnica generalmente svolta ex situ, più raramente in situ.

Sfrutta l'azione biodegradativa della microflora autoctona o alloctona , in grado di degradare il tipo d'inquinante target.



Questa procedura è utilizzata di frequente dall'industria petrolifera per biodegradare:

- residui di idrocarburi o materiali oleosi o ricchi di idrocarburi che vengono inavvertitamente rilasciati nell'ambiente;
- fanghi di vario tipo;
- rifiuti delle industrie coinvolte nella trasformazione dei prodotti alimentari, produzione di carta e della concia delle pelli.



La domanda O_2 della microflora aumenta con l'aggiunta di C organico, e il tasso di diffusione di O_2 dall'aria sovrastante nel terreno è troppo lento per sostenere i batteri aerobici.

La necessità di fornire O_2 viene soddisfatta mescolando il terreno in qualche modo, a volte per semplice aratura, talvolta con miscelazione più approfondita.



Un altro fattore limitante è l'**umidità** poiché il terreno di superficie spesso si secca, quindi vengono utilizzati accorgimenti per fornire acqua e mantenere i livelli di umidità ottimali per gli organismi aerobici.



Un altro parametro è il **pH** del terreno: spesso il pH desiderato è tra 6.0 e 8.0, in particolare per la degradazione di idrocarburi.

Le trasformazioni possono procedere anche a pH più acidi.

Dal momento che la nitrificazione di concimi contenenti N aumenta l'acidità del suolo, il pH del terreno deve essere monitorato per prevenire condizioni indesiderabili per i microrganismi.

La bonifica con questi mezzi è limitata ai periodi dell'anno in cui la **temperatura** del suolo è in un range che permette la sufficientemente rapida crescita microbica.

Poca o nessuna biodegradazione si verifica durante i periodi freddi dell'anno nella zona temperata.



La notevole quantità di C presente in tali rifiuti ha il potenziale per supportare una grande biomassa, ma il terreno ha troppo basse quantità di **N e P** ed eventualmente altri **nutrienti inorganici** per supportare tali grandi biomasse, così N e P vengono aggiunti al terreno, spesso sotto forma di fertilizzanti commerciali.

Per gli idrocarburi, materiali oleosi privi di N e P, la quantità di N e P da aggiungere viene calcolato sulla quantità di C nel materiale da degradare.

Ad esempio, supponendo che il 30% del C venga assimilato nella biomassa delle cellule che effettuano la bioremediation e che la biomassa risultante ha un rapporto C:N:P di 50:5:1, la quantità di N e P da aggiungere sarebbe equivalente rispettivamente al 3% e allo 0,6% del C.



Tali calcoli spesso sopravvalutano notevolmente la necessità di N e P, perché:

- la biomassa si decompone essa stessa rendendo nuovamente disponibili N e P per la bioremediation;
- il suolo, i sedimenti o l'acqua conterranno N e P disponibili per uso microbico.

L'abuso di fertilizzanti dà come risultato una spesa ingiustificata che può anche provocare l'inquinamento da nitrati delle acque sotterranee e superficiali.

Quindi deve essere determinata la giusta quantità di fertilizzante da aggiungere.

L'aggiunta di sostanze nutritive nel il suolo per migliorare la biodegradazione è talvolta chiamata *biostimolazione*.

(https://www.youtube.com/watch?v=oU08_F_6zME)



Uno dei principali vantaggi del landfarming è il suo basso costo per attrezzature, messa in opera e operazioni.

Tuttavia, il processo è lento e richiede una ragionevolmente vasta area.

Gli inquinanti organici (e metalli tossici, se presenti) possono percolare dal sito nelle acque sotterranee, e le emissioni volatili possono rappresentare un pericolo in prossimità del sito.

La lisciviazione o volatilizzazione delle componenti tossiche, se presenti, deve essere controllata o impedita.



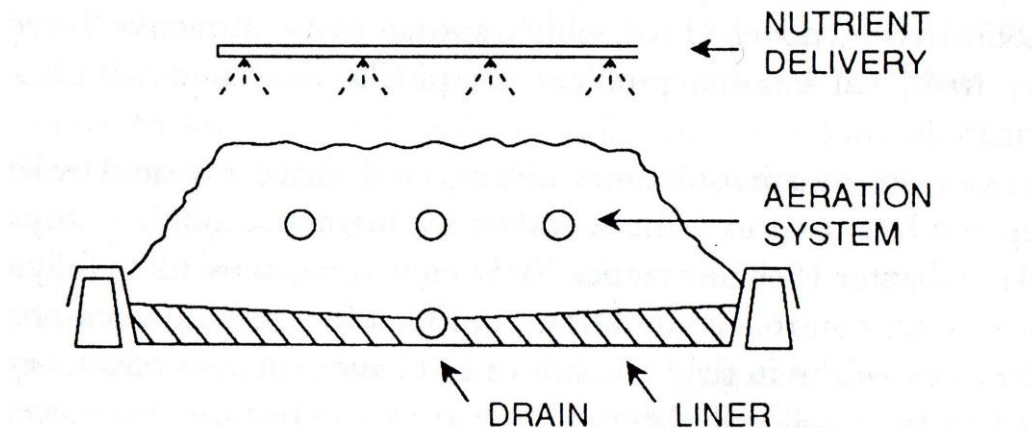
Prepared Beds

Si tratta di una tecnica che viene classificata come ex situ.

La presenza di elevate concentrazioni di sale nel suolo rallenta sensibilmente la bioremediation.

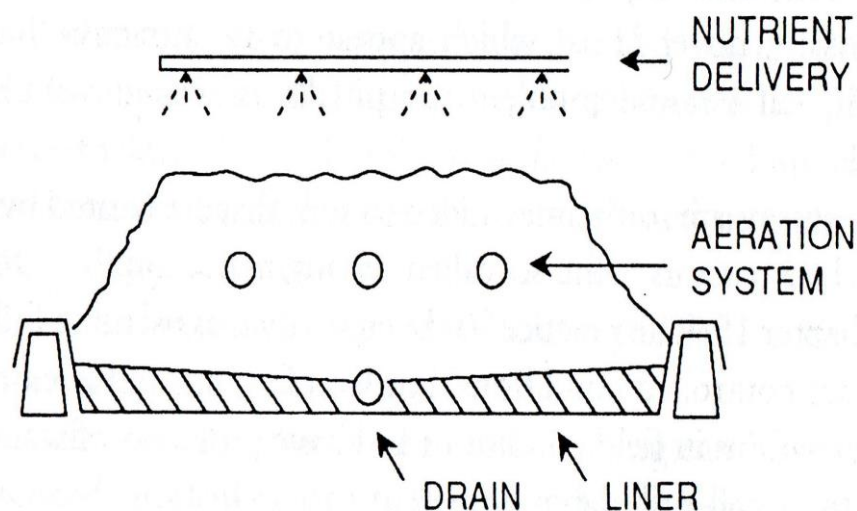
Questo comporta maggiori controlli tecnici che includono sistemi per fornire acqua di irrigazione e nutrienti, una fodera sul fondo del suolo, e mezzi per raccogliere percolato.

Il livello di sofisticazione, e di conseguenza il costo, varierà enormemente.



Questo sistema è utilizzato spesso quando i contaminanti sono idrocarburi policiclici aromatici, BTEX (benzene, toluene, etilbenzene e xilene), o entrambi. 

Acqua e nutrienti possono essere distribuiti attraverso un sistema spray di irrigazione dall'alto e l'intera operazione può essere fatta in una serra di plastica se è prevista l'emissione di prodotti volatili pericolosi.



Il liner (fodera) è argilla o un materiale sintetico. La fodera e il sistema di raccolta del percolato servono perchè il land farming convenzionale può provocare la contaminazione delle acque mediante percolazione di acqua.

In alcuni casi, tubi forati sono posizionati sopra la fodera per raccogliere il percolato, e sul liner e sopra i tubi è immessa sabbia per migliorare il drenaggio. Il percolato viene rimosso per trattamento successivo, che può essere in un bioreattore adiacente.



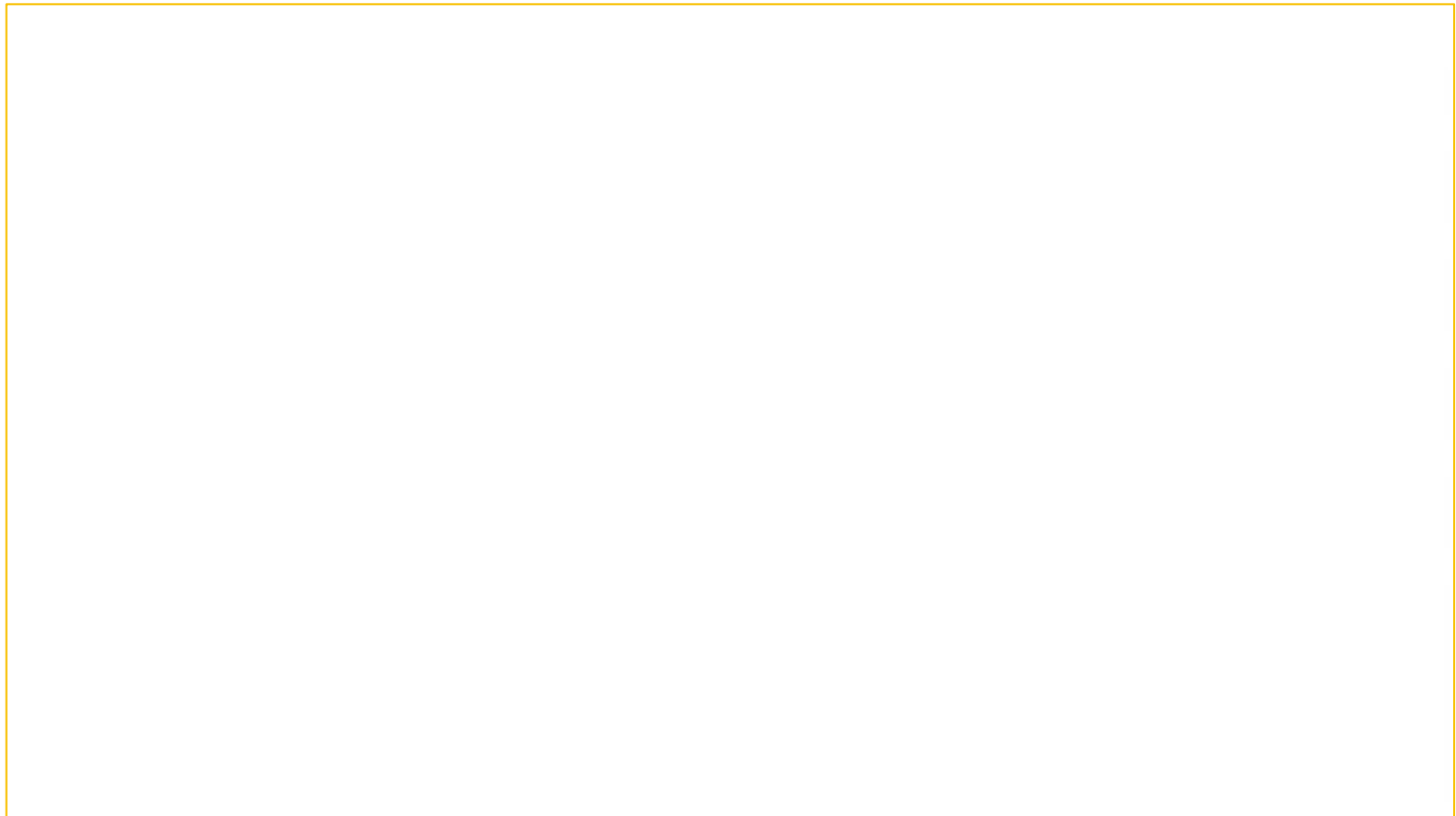
Ai terreni che sono trattati tramite *land farming* o *prepared beds* a volte vengono aggiunti microrganismi e questo viene chiamato

bioaugmentation (bioaccrescimento).



Ai terreni che sono trattati tramite *land farming* o *prepared beds* a volte vengono aggiunti microrganismi e questo viene chiamato

bioaugmentation (bioaccrescimento).



bioaugmentation (bioaccrescimento).

Questa pratica è utile in bioreattori completamente ingegnerizzati in condizioni controllate, ma il land farming ed il prepared beds sono soggetti a variazioni di condizioni di campo e hanno problemi di scala non considerate nei test di laboratorio.

Inoltre, il land farming o il prepared beds associati con la bioaugmentation mancano di una componente essenziale sperimentale e cioè un confronto dei trattamenti quali l'aerazione, l'irrigazione, la miscelazione, e l'uso di fertilizzanti che hanno importanza senza e con inoculazione.

Pertanto, è molto difficile valutare se l'aggiunta di microrganismi sia o non sia benefica.



Soil Piles

Un approccio più sofisticato è quello dei *soil piles* (*mucchi di terreno*), che sono a volte chiamati *biopiles*.

Il terreno contenente i contaminanti è scavato e collocato su una fodera impermeabile che trattiene il percolato.

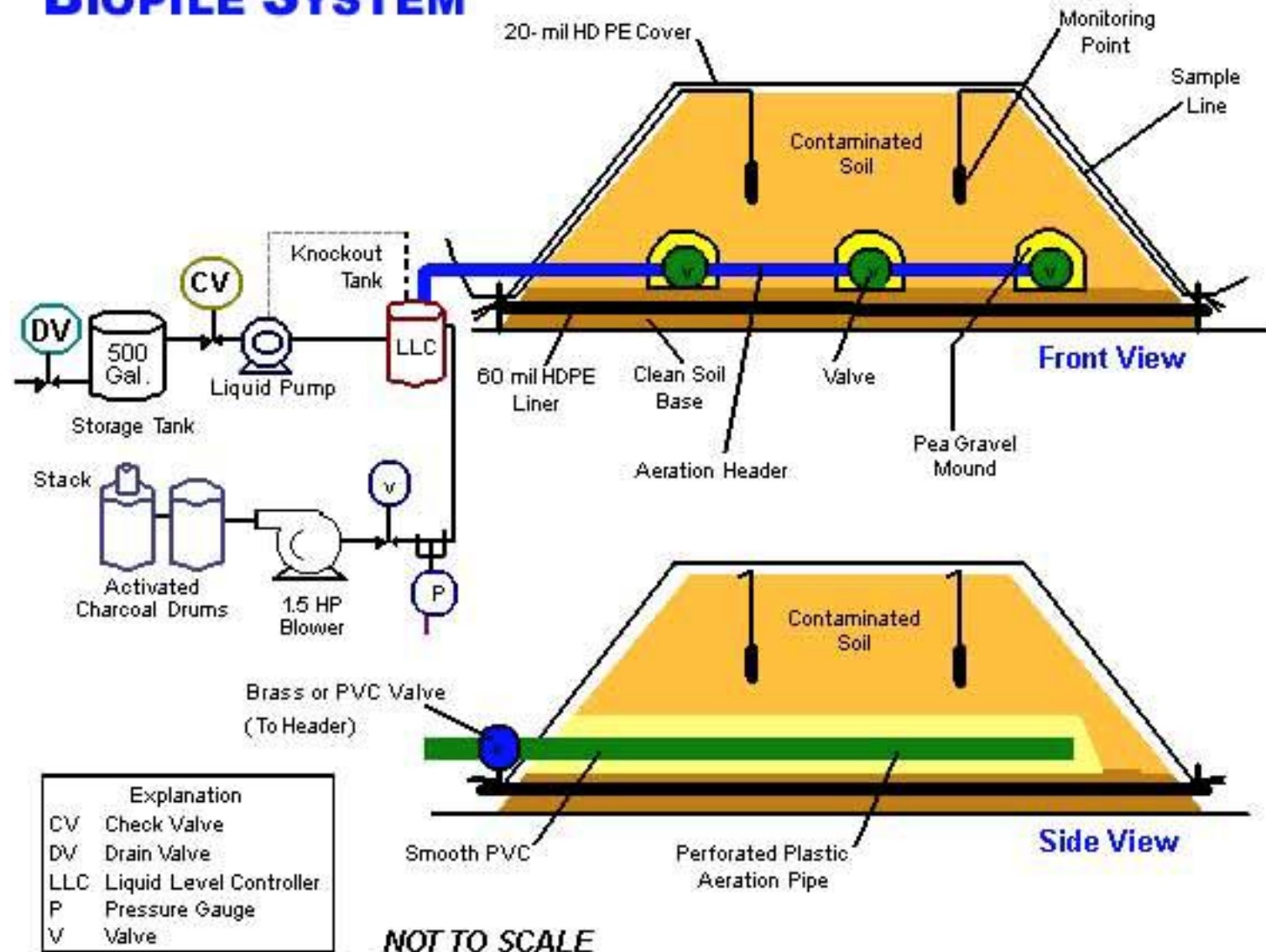
Un sistema di tubazioni viene inserito nel mucchio, e l'aria o l'O₂ viene introdotto o aspirato sotto vuoto per migliorare la decomposizione aerobica della sostanza inquinante.

Una soluzione, contenente nutrienti, viene aggiunta alla superficie del terreno per stimolare l'attività microbica.

Se i composti da trattare sono volatili o se si possono formare prodotti volatili che sono tossici, le emissioni gassose vengono raccolte, per esempio mediante l'uso di carbone attivo.



BIOPILE SYSTEM



Bioventing (bioventilazione)

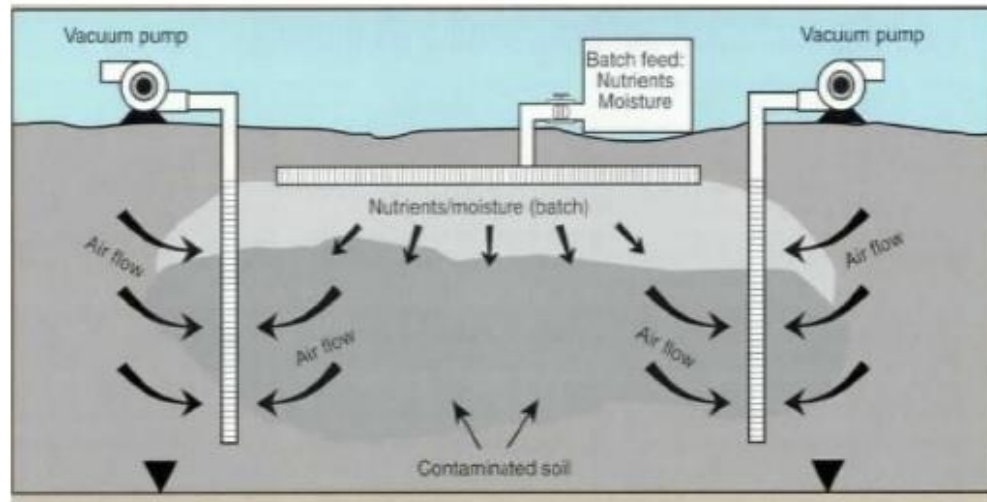
Una tecnologia che ha attirato notevole attenzione è il *bioventing*.

Ha trovato applicazione soprattutto per bonifica di idrocarburi.

Tuttavia, composti con elevata tensione di vapore possono volatilizzarsi troppo velocemente e quindi non essere degradati.

La procedura è interessante perché opera *in situ* e ha necessità di poca attrezzatura.





Questo approccio al trattamento in fase solida dei contaminanti si basa su metodi per introdurre aria nel terreno sopra falda (vadose o la porzione insatura del suolo), che fornisce così l' O_2 necessario come accettore di elettroni terminale per i batteri aerobi.

L'aria viene introdotta o mediante un metodo di estrazione a vuoto o forzando l'aria nel terreno sotto pressione positiva.

Adeguati pozzi di prelievo o di iniezione d'aria sono i modi con cui il vuoto o pressione positiva è applicata al suolo.



I terreni con bassa permeabilità generalmente non sono adatti, perché l'aria non può passare attraverso il suolo con sufficiente rapidità per fornire abbastanza O_2 per sostenere il metabolismo degli aerobi.

Inoltre, bisogna porre attenzione a che l'iniezione non porti alla diffusione di composti volatili in porzioni di terreno non ancora contaminati

Il bioventing può essere eseguito a basso costo, in particolare se vi è poca o nessuna necessità di trattare i gas liberati dal sito.

Ad esempio, il costo del trattamento di una grande fuoriuscita diesel è stato stimato a 10\$/m³ di terreno contaminato.

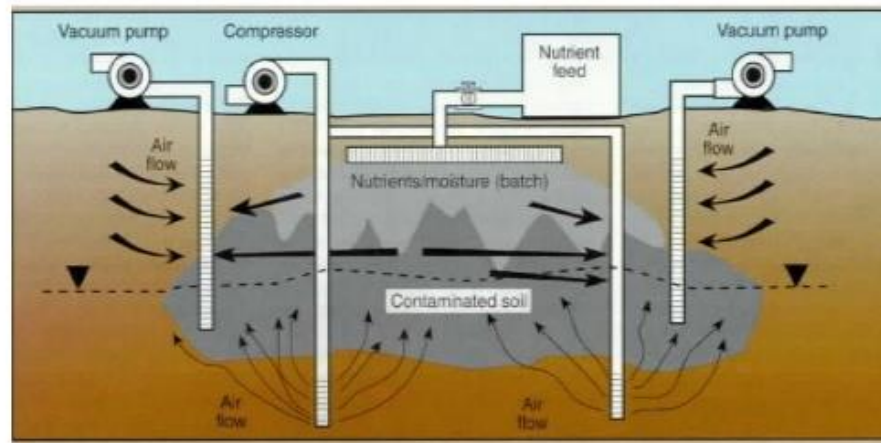
Si è valutato che la concentrazione di gasolio viene ridotta del 55-60% in un periodo di 2 anni. La perdita dei contaminanti è in parte il risultato di volatilizzazione, ma più del 90% è stato attribuito all'azione microbica.



Biosparging (biovaporizzazione)

Il **biosparging** è simile al bioventing, ma l'aria viene introdotta nella zona satura, cioè sotto la falda.

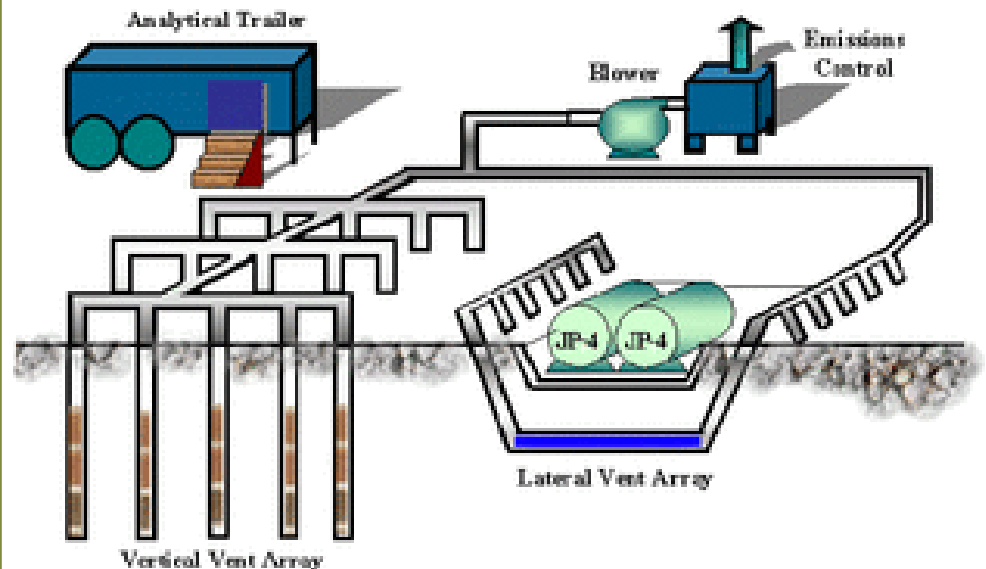
Lo scopo non è solo fornire O_2 , ma anche trasferire inquinanti volatili nella zona sovrastante non satura (vadose), che solitamente contiene una popolazione di microrganismi in grado di degradare tali composti.



Come per il bioventing, la portata di aria non dovrebbe essere così grande che i composti organici volatili passino attraverso la zona insatura senza decomposizione poiché saranno quindi immessi nell'atmosfera.

Modifiche dei metodi usuali di gorgogliamento di aria includono l'uso di O_3 in luogo di aria e di gorgogliamento con vapore per aumentare la temperatura nella zona vadose e nella parte superiore della falda: entrambi i metodi migliorano la biodegradazione

Il biosparging con estrazione di vapore è stato impiegato con successo nel ridurre la concentrazione di carburante in un sito con terreno e con acque sotterranee contaminate a una profondità di 12 m: le concentrazioni di olio combustibile nelle acque sotterranee e nel suolo vengono ridotti fino al 97 e 46% rispettivamente.



Compostaggio

Nel compostaggio il materiale inquinato viene miscelato insieme in una pila con una sostanza organica solida che è essa stessa ragionevolmente facilmente degradabile, come la paglia fresca, trucioli di legno, corteccia di legno.

- Aggiunta di N, P, e possibilmente altri nutrienti inorganici,
- L'umidità deve essere mantenuta costante,
- L'aerazione è fornita mediante miscelazione meccanica o qualche dispositivo di aerazione.



Se l'aerazione provoca il rilascio di sostanze tossiche volatili, esse devono essere intrappolate in modo che non vengano emesse nell'atmosfera.

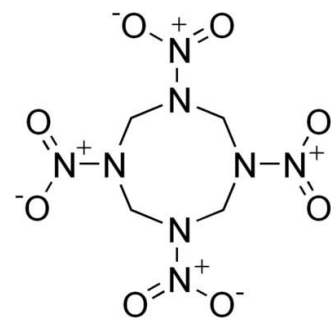
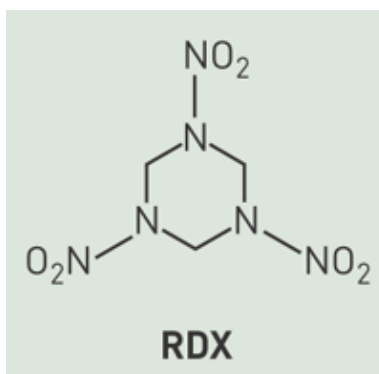
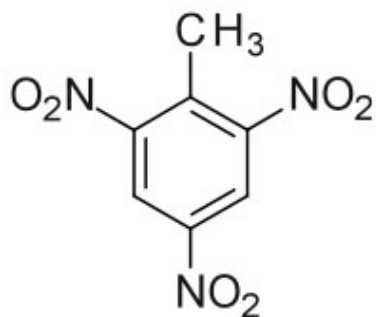
Un contenitore è desiderabile quando il compost contiene sostanze chimiche pericolose.



Il calore rilasciato durante la crescita microbica sul materiale organico solido non è adeguatamente dissipato e quindi la temperatura aumenta.

Le temperature più elevate (50- 60°C) sono spesso più favorevoli alla biodegradazione rispetto alle temperature più basse.

Il compostaggio è stato utilizzato come mezzo di trattamento del suolo contaminato con clorofenoli ed esplosivi come TNT (trinitrotoluene), RDX (ciclotrimetilen-trinitroammina), HMX (ciclotetrametilen-tetranitroammina).



Riepilogo – Tecniche di bioremediation

Bioremediation in situ: sfrutta il potenziale biodegradativo di un sito

- **Bioremediation intrinseca: Land Farming**
- **Prepared Bed**
- **Soil piles**
- **Bioventing e Biosparging**
- **Compostaggio**

Biostimulation

Bioaugmentation



Biorestoration (bioripristino) di acque sotterranee

L'introduzione di sostanze nutritive e O_2 nelle falde acquifere del sottosuolo, basandosi sulla microflora indigena per distruggere le molecole indesiderate è chiamata *biorestoration*.

Le perdite da serbatoi di stoccaggio sotterranei contenenti benzina portano alla comparsa di benzene, toluene, etilbenzene, xileni ecc.

Sebbene questi composti BTEX sono inizialmente nella fase benzina, particolare attenzione è dedicata a loro perché sono tossici e perché entrano nella fase acquosa mediante un rilascio prolungato.

Le quantità presenti nella fase acquosa sono dovute al rilascio prolungato e alla loro solubilità in acqua.

Inizialmente, la maggior quantità possibile di idrocarburi viene rimossa da mezzi fisici.

La biorestauration senza tale rimozione è inutile perché la grande massa continuerebbe ad alimentare le acque sotterranee.

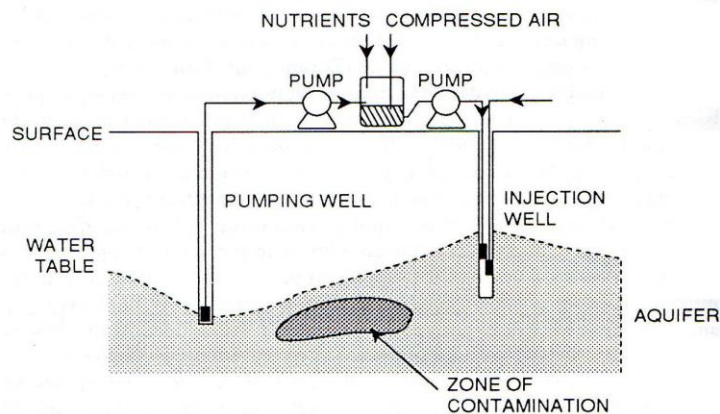
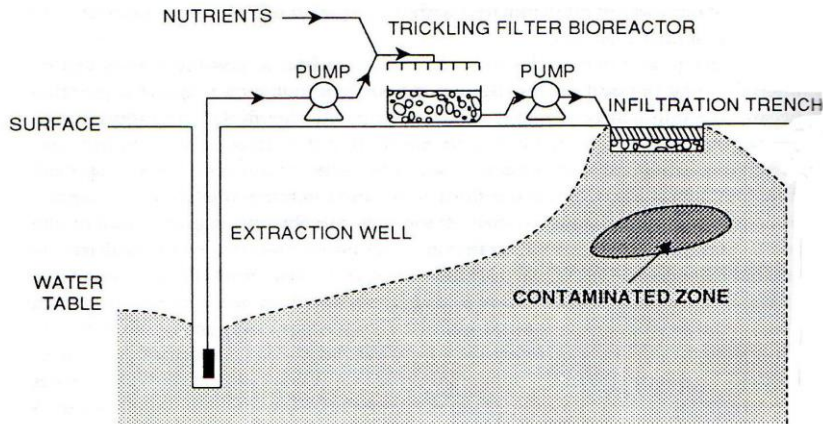
In seguito si determina la quantità ottimale di nutrienti da aggiungere.

Troppo poco = trasformazione lenta

Troppo = potrebbe intasamento della falda a causa del grande biomassa che si forma, provocando la cessazione della bonifica.

I tre nutrienti comunemente richiesti per un'attività ottimale sono N, P, e O₂.
Questi sono normalmente i fattori che limitano l'attività della microflora indigena

Una procedura comune è quella di aggiungere le sostanze nutritive in soluzione attraverso pozzi di iniezione nella zona satura o attraverso le gallerie di infiltrazione nella zona insatura o alla superficie del suolo.



In situ groundwater treatment using an infiltration trench (top) and an injection well (bottom). Note the use of an aboveground trickling-filter bioreactor.

L'acqua che viene recuperata dai pozzi viene di nuovo modificata con sostanze nutritive e ricircolata.

In alcuni sistemi, tutta l'acqua recuperata viene scaricata in un serbatoio alternativo e per l'iniezione viene utilizzata acqua potabile o acqua di falda non contaminata.

Le concentrazioni di agenti inquinanti e nutrienti sono spesso misurate regolarmente prelevando campioni nei punti di iniezione e di rimozione.

La rapida biodegradazione degli idrocarburi viene tipicamente eseguita da batteri aerobici, e la loro attività deve essere sostenuta.

Questo pone grossi problemi perché, anche nelle migliori condizioni, poco ossigeno è presente nelle acque sotterranee e le fonti naturali lo forniscono a tassi estremamente lenti.

Lo stesso problema della scarsa solubilità di ossigeno si applica all'acqua aggiunta durante la bonifica stessa.

Ad esempio, per la degradazione di una fuoriuscita 4000 litri di idrocarburi, è necessario 5000 kg di O_2 .

Un enorme volume di acqua miscelata con aria fino a 8 mg O_2 /litro dovrebbe essere pompato attraverso la falda acquifera per fornire la quantità necessaria O_2 .

Anche se l'acqua introdotta è saturata con ossigeno puro (40 mg O_2 /litro) al posto dell'aria, sarebbero necessari circa 110 milioni di litri di acqua.

Talvolta viene aggiunta H_2O_2 alla soluzione nutritiva come fonte di O_2 .



H_2O_2 è altamente solubile in acqua e libera lentamente ossigeno nella falda acquifera. Tuttavia, H_2O_2 è tossico per alcune specie a 100-200 mg/litro.

Il problema della tossicità può essere minimizzato o evitato se viene aggiunta inizialmente una bassa concentrazione di H_2O_2 (50 mg/ litro), e quindi aumentata gradualmente per dare fino a 1000 mg/litro.

La conduttività idraulica, è fondamentale per un esito positivo del processo.

Il successo della biorestoration dipende dalla idrogeologia del sito.

Nuovi metodi per la fornitura di O₂ sono stati studiati di recente. Alcuni si basano sulla decomposizione lenta di biossido di magnesio (MgO₂) e di biossido di calcio (CaO₂).

La reazione di MgO₂ è la seguente:



Alcuni batteri sono in grado di utilizzare, in aggiunta a O₂, nitrato come accettore di elettroni, e quindi crescono e degradano un numero di substrati in acque anossiche fornite di nitrato.

Il nitrato è attraente a causa della sua elevata solubilità in acqua e del basso costo, anche se si deve esercitare cautela perché i nitrati, se presenti nell'acqua potabile a livelli superiori a 10 mg/litro (come N), sono essi stessi inquinanti

Le bolle di N_2 , prodotto finale della completa riduzione del nitrato, possono spostare l'acqua nei pori all'interno della falda acquifera e quindi ridurre la conduttività idraulica.

Il nitrato è stato usato con successo come accettore di elettroni per il biorisanamento di BTEX in una falda acquifera O_2 -deficiente contaminata con combustibile.

Le acque sotterranee sono state integrate con KNO_3 e reintrodotte nel luogo contaminato attraverso una galleria d'infiltrazione.

La concentrazione di BTEX nel pozzo di estrazione è diminuito di quasi il 99% grazie alla stimolazione di batteri in grado di utilizzare il nitrato come accettore alternativo (denitrifiers) quando i livelli di O_2 erano bassi o scesi a zero.

Anche solfato e Fe^{3+} servono come accettori di elettroni per alcuni batteri, e in presenza di uno o l'altro degli ioni, certi substrati organici vengono metabolizzati.

Entrambi sono importanti nella biodegradazione di prodotti naturali e probabilmente anche nella distruzione di composti sintetici.

Tuttavia, l'uso potenziale di solfato per bioremediation è limitato perché il prodotto finale della sua riduzione, H_2S , è tossico per i microrganismi, gli esseri umani, gli animali superiori, e le piante.

L'uso del Fe^{3+} come accettore di elettroni in scala campo non è stata esplorata a causa dei problemi di diffusione di questo materiale insolubile attraverso una falda acquifera contaminata.

Macchie d'olio marine

L'interesse per la bonifica del petrolio versato in mare, in estuari e in acque dolci e l'uso di microrganismi per liberare dagli idrocarburi le coste adiacenti esiste da molti anni.

I primi studi hanno dimostrato che i batteri idrocarburo-ossidanti sono diffusi e che sono limitati dalla carenza di N e P quando il petrolio viene versato in acqua.

In questi processi formulazioni contenenti fertilizzanti lipofili erano particolarmente vantaggiose.

Fino al disastro ambientale della petroliera Exxon Valdez che si è arenata su una scogliera a Prince William Sound, Alaska, non era mai stato effettuato questo biorisanamento di petrolio in acque di superficie.

Il 24 marzo 1989 questa nave rilasciò 42 milioni di litri di petrolio contaminando sia l'acqua che le spiagge adiacenti.

Come risultato è iniziato il più grande programma di biorisanamento in campo mai intrapreso.



Le indagini di laboratorio effettuate poco dopo la fuoriuscita confermarono che N e P erano il fattore limitante e che quasi tutti gli alcani del petrolio versato in Alaska e una quantità apprezzabile di IPA venivano metabolizzati in 6 settimane con una soluzione di sali inorganici o con un concime lipofilo contenente N e P.

Il fertilizzante lipofilo prescelto era un liquido contenente urea in acido oleico, come sorgente di N, e tri(laurato-4)-fosfato come sorgente di P.

In 2 settimane, le differenze nelle quantità di petrolio erano visivamente evidenti tra le spiagge trattate con fertilizzanti e quelle non trattate, e le successive misurazioni quantitative hanno rivelato che il 60-70% del petrolio è stato degradato entro 16 mesi dalla fuoriuscita.

