



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Ingegneria Civile, Ambientale, dei Materiali
Dipartimento di Ingegneria
S.S.D. ICAR/03

TECNICHE DI BIOREMEDIATION DI SUOLI CONTAMINATI DA IDROCARBURI

DOTTORE
ING. PIETRO GRECO LUCCHINA

COORDINATORE
PROF.SSA ANTONINA PIRROTTA

TUTOR
PROF. GASPARE VIVIANI

CO TUTOR
ING. DANIELE DI TRAPANI
PROF.SSA PAOLA QUATRINI

CICLO XXXIV
2022

Ringraziamenti

Alla fine di questo percorso di Dottorato un sentito ringraziamento va a tutto il gruppo di Ingegneria Sanitaria Ambientale del Dipartimento di Ingegneria dell'Università degli Studi di Palermo per avermi accolto e fatto sentire parte di una grande famiglia. In particolare, ringrazio il Prof. Viviani e l'Ing. Di Trapani, per avermi guidato e seguito durante questi anni, e la Signora D'Addelfio, per i suoi consigli e la sua disponibilità.

Un ringraziamento va al gruppo del Laboratorio di Microbiologia molecolare del Dipartimento STEBICEF e in particolare alla Prof.ssa Quatrini e alla Dott.ssa Catania per il loro prezioso contributo professionale e umano.

Un doveroso ringraziamento va a Eni e ad Eni Rewind per avermi dato l'opportunità di svolgere questo Dottorato. In particolare, tengo a ringraziare i Dott. Giovanna Carpani, Alfonso Modica, Lucia Poppa, Luca Serbolisca e Federico Villani per la disponibilità e per il prezioso contributo dati nel corso dell'intero svolgimento del lavoro di Tesi.

Indice

Introduzione.....	1
Capitolo 1 – La contaminazione dei suoli da idrocarburi	3
1.1 Introduzione.....	3
1.2 Quadro nazionale e regionale.....	7
1.3 Il quadro normativo nazionale sui siti contaminati.....	11
1.4 Gli idrocarburi	12
1.4.1 I prodotti petroliferi.....	13
1.4.2 Gli idrocarburi aromatici.....	14
1.4.3 Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA)	15
1.4.4 Destino, trasporto e meccanismi di degradazione	16
1.4.5 Effetti dell'inquinamento da idrocarburi.....	19
1.5 Tecniche di bonifica di suoli contaminati da idrocarburi	21
1.5.1 Trattamenti fisico-chimici.....	22
1.5.2 Trattamenti biologici	23
1.5.3 Trattamenti termici	24
1.6 Bioremediation di suoli contaminati da idrocarburi	25
1.6.1 Meccanismi di degradazione degli idrocarburi	25
1.6.2 Biodegradazione aerobica degli idrocarburi.....	27
1.6.3 La famiglia AlkB delle alcano-idrossilasi	29
1.6.4 I batteri idrocarburo degradanti nei suoli	30
1.7 Tecniche di bioremediation di suoli contaminati da idrocarburi	32
1.7.1 Landfarming.....	33
1.7.2 Compostaggio.....	35
1.7.3 Bioventing.....	37
1.7.4 Bioreattori	38
1.7.5 Phytoremediation.....	39
1.7.6 La rizoremediation	41
1.7.6.1 Interazione pianta-microorganismi.....	42
1.7.6.2 I batteri PGPR (plant growth promoting rhizobacteria).....	44
1.7.6.3 Simbiosi tra piante e microrganismi del suolo	45
1.7.7 La tecnologia <i>e-ibs-abr</i> [®]	48

1.8 Applicabilità di tecniche di bioremediation ad un suolo contaminato da idrocarburi	49
--	----

Capitolo 2 – Studio del potenziale intrinseco di biorisanamento del suolo

contaminato..... 53

2.1 Introduzione	53
2.2 Materiali e metodi.....	53
2.2.1 Terreni di coltura	53
2.2.1.1 Bushnell Haas Broth	53
2.2.2 Soluzioni e Tamponi.....	54
2.2.2.1 TE.....	54
2.2.2.2 TAE (50X)	54
2.2.2.3 Soluzione di Cristal-Violetto	54
2.2.2.4 Reattivo di Lugol.....	54
2.2.2.5 Soluzione di Safranina	54
2.2.3 Caratteristiche del suolo utilizzato	55
2.2.4 Colture di arricchimento e isolamento di batteri idrocarburo-ossidanti	56
2.2.5 Caratterizzazione fenotipica di batteri idrocarburo-ossidanti.....	57
2.2.6 Colorazione di Gram	57
2.2.7 PCR del gene 16S rDNA.....	57
2.2.8 Sequenziamento degli ampliconi 16S rDNA ed analisi delle sequenze ..	58
2.2.9 Estrazione di DNA metagenomico dal suolo.....	59
2.2.10 Analisi metagenomica dell'rDNA 16S.....	60
2.2.11 Amplificazione del gene <i>alkB</i>	60
2.3 Analisi dei risultati	61
2.3.1 Isolamento di batteri HC degradanti dal suolo contaminato	61
2.3.2 Identificazione tassonomica degli isolati	63
2.3.3 Analisi filogenetica degli isolati.....	64
2.3.4 Analisi della composizione della comunità microbica	66
2.3.5 Valutazione del potenziale catabolico del suolo	69

Capitolo 3 – Applicabilità di tecniche di bioremediation a un suolo reale

contaminato da idrocarburi: test in microcosmo e in colonna 71

3.1 Introduzione	71
3.2 Materiali e metodi.....	72
3.2.1 Test in microcosmo.....	72
3.2.1.1 Installazione sperimentale	72
3.2.1.2 Protocollo analitico	75
3.2.1.3 Concentrazione idrocarburi C10-C40	76
3.2.1.4 Test di fitotossicità	79
3.2.1.5 pH.....	81

3.2.1.6	Composizione della comunità microbica	82
3.2.1.7	Verifica della presenza dei batteri hc degradanti inoculati nel suolo alla fine della bioaugmentation	83
3.2.2	Test in colonna	83
3.2.2.1	Installazione sperimentale	83
3.2.2.2	Protocollo analitico	85
3.3	Analisi dei risultati	87
3.3.1	Test in microcosmo	87
3.3.1.1	Concentrazione idrocarburi C10-C40	87
3.3.1.2	Indice di germinazione e pH	89
3.3.1.3	Evoluzione della comunità microbica	91
3.3.1.4	Verifica della presenza dei batteri hc degradanti inoculati nel suolo alla fine della bioaugmentation	95
3.3.2	Test in colonna	95
3.3.2.1	Concentrazione idrocarburi C10-C40	95
3.3.2.2	Incidenza dei percorsi di rimozione (volatilizzazione vs biodegradazione)	97
3.3.2.3	Indice di germinazione	98

Capitolo 4 – Valutazione dell’effetto sinergico tra piante, simbionti microbici e batteri idrocarburo-degradanti: test di rhizoremediation in

vaso	99	
4.1	Introduzione	99
4.2	Materiali e metodi	99
4.2.1	Terreni di coltura	99
4.2.1.1	Yeast-extract mannitol (YM)	99
4.2.2	Installazione sperimentale	100
4.2.3	Protocollo analitico	103
4.3	Analisi dei risultati	104
4.3.1	Parametri di crescita delle piante	104
4.3.2	Concentrazione di idrocarburi C10-C40	108
4.3.3	Indice di germinazione	110
4.3.4	Verifica delle condizioni di rizosfera potenziata	111

Capitolo 5 – Considerazioni sull’applicabilità della tecnologia e-ibs-abr®

.....	115	
5.1	Introduzione	115
5.2	Analisi dei Risultati	116
5.3	Considerazioni finali	119

Conclusioni **121**

Bibliografia..... 123

Introduzione

La contaminazione del suolo derivante da attività industriali e petrolchimiche rappresenta oggi uno dei principali problemi a livello globale. Con particolare riferimento alla matrice solida, la principale forma di contaminazione in Europa è rappresentata dalla presenza di idrocarburi. Molti composti idrocarburici presentano la peculiarità di essere biodegradabili, pertanto suscettibili di essere degradati a molecole strutturalmente più semplici mediante tecniche di bioremediation.

Gli idrocarburi sono diffusamente presenti nelle acque, nei suoli e nell'aria, specie nelle aree del pianeta a più alta industrializzazione o densità abitativa. Tale diffusione ha reso pressoché ubiquitaria la presenza di microrganismi capaci di utilizzare, per la loro crescita, gli idrocarburi come fonte di energia o di carbonio. Per questo motivo, negli ultimi decenni i trattamenti biologici stanno progressivamente sostituendo i convenzionali trattamenti di bonifica, basati su processi termici o chimici, rispetto ai quali presentano una serie di vantaggi, quali il ricorso a processi naturali, la relativa economicità per il contenuto consumo di materia e/o di energia, etc.

Tuttavia, per valutare l'applicabilità di un trattamento biologico di un suolo contaminato è necessario studiare e comprendere tutti i fattori che potrebbero influire sull'efficacia del processo, che dipendono dalle caratteristiche della matrice contaminata, dalla tipologia e dalla concentrazione del contaminante e dal potenziale di biodegradazione delle popolazioni microbiche autoctone (Bento et al., 2005; Jiang et al., 2016). Inoltre, data la diversità degli effetti di additivi come nutrienti e inoculi, è necessario valutare in che modo i vari fattori possono influenzare il processo di biorisanamento mediante l'esecuzione preventiva di test di laboratorio (c.d. test di biotratatabilità), che devono essere eseguiti prima della progettazione di interventi a scala reale in situ o ex situ (Sabaté et al., 2004; Mariano et al., 2007).

In questo contesto si inserisce l'attività di ricerca di cui si riferisce nella presente tesi di dottorato, frutto di una convenzione tra l'Università degli Studi di Palermo e la Eni Corporate University S.p.A. L'obiettivo della ricerca è stato quello di valutare l'applicabilità di tecniche di bioremediation per la bonifica di suoli contaminati da idrocarburi; in particolare, si è fatto riferimento al sistema *e-ibs-abr*®, registrato come marchio da Eni, per una sua applicazione per il risanamento dei terreni ricadenti all'interno di una delle "isole" del SIN di Gela, risultati contaminati da idrocarburi verosimilmente a causa delle attività di estrazione e trasporto del greggio.

Il sistema *e-ibs-abr* (Eni Integrated Bioremediation System with Autochthonous Bacteria and Rhizomicrobiota), consiste nell'impiego combinato e integrato di diverse tecnologie di tipo biologico, al fine di ottenere un'attività enzimatica forte e diversificata in grado di attaccare le differenti molecole di idrocarburi.

Le attività di ricerca conotte nell'ambito della tesi di dottorato sono state suddivise nelle seguenti fasi:

1. studio del potenziale di biorisanamento intrinseco del suolo iniziale, mediante isolamento dei batteri HC ossidanti dai campioni di suolo mediante colture di arricchimento su HC e identificazione degli isolati, analisi mediante estrazione del DNA metagenomico dal suolo e sequenziamento Illumina MISEq della regione V3-V4 del gene 16S rRNA e amplificazione del gene *alkB*, che codifica per la monossigenasi di membrana responsabile della prima reazione di degradazione aerobica degli idrocarburi;
2. valutazione dell'applicabilità di tecniche di bioremediation e studio del potenziale di biorisanamento del suolo, mediante test di biotrattabilità in microcosmo e test in colonna, nei quali sono state simulate diverse condizioni operative di cui si è monitorata l'evoluzione del processo degradativo;
3. valutazione dell'applicabilità di tecniche di rizoremediation, mediante prove in vaso con specie di piante con rizosfera "potenziata".

Capitolo 1 – La contaminazione dei suoli da idrocarburi

1.1 Introduzione

La contaminazione del suolo rappresenta oggi uno dei principali problemi a livello globale con rilevanti effetti sulla salute umana (Panagos et al., 2013).

L’Agenzia Europea per l’Ambiente (European Environment Agency, EEA), nel 2014 ha pubblicato il “Progress in management of Contaminated Sites in Europe” (Van Liedekerke et al., 2014), in cui viene descritto lo stato delle conoscenze in merito alla situazione dei siti contaminati all’interno della comunità europea e i relativi progressi riscontrati. I dati europei, riferiti a 39 Paesi, costituiti dai 33 Paesi membri dello Spazio economico europeo (SEE) e da 6 Paesi cooperanti nei Balcani occidentali, mostrano come in media esistano circa 5,7 siti contaminati ogni 10.000 abitanti (Figura 1.1), numero che sale a 42 se si considerano anche i siti potenzialmente contaminati

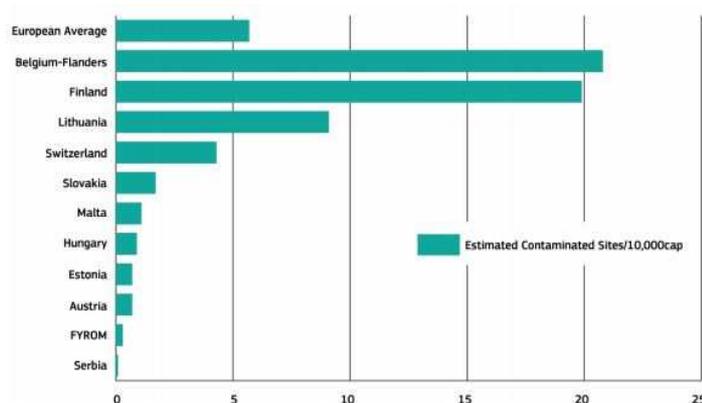


Figura 1. 1. Numero di siti per 10.000 ab stimati in Europa (Van Liedekerke et al., 2014)

Le statistiche aggiornate al 2014 hanno stimato che in Europa ci sono circa 2,5 milioni di siti potenzialmente contaminati, dei quali circa 340.000 sono contaminati

e devono essere bonificati: di questi solo il 15% è stato bonificato o è in corso di bonifica (Figura 1.2 e 1.3).

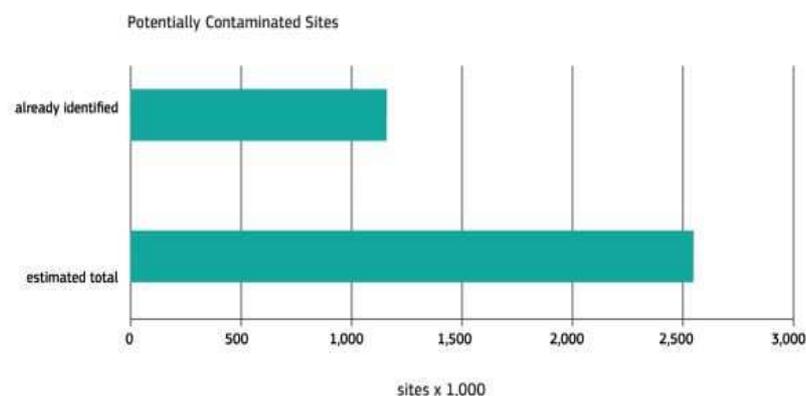


Figura 1. 2. Numero di siti potenzialmente contaminati stimati in Europa (Van Liedekerke et al., 2014)

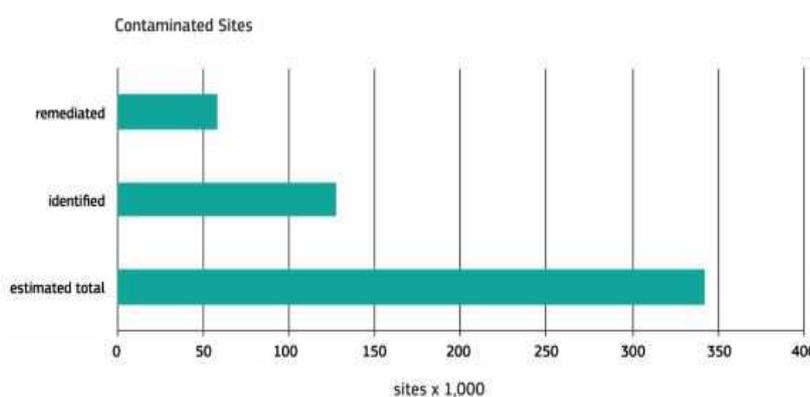


Figura 1. 3. Numero di siti contaminati stimati in Europa (Van Liedekerke et al., 2014)

La contaminazione del suolo è il risultato delle attività svolte in vari settori produttivi; in particolare i settori presi in considerazione nello studio sono stati:

- trattamento e smaltimento dei rifiuti;
- attività industriali e commerciali;
- attività di stoccaggio;
- perdite durante il trasporto;

- attività militari;
- attività nucleari;
- altro.

Il maggior contributo in Europa è dato dalle attività di trattamento e smaltimento dei rifiuti e dalle attività industriali e commerciali, a cui sono riconducibili rispettivamente il 37% e il 33% dei siti contaminati, seguiti dallo stoccaggio (11%) e dalle perdite durante il trasporto (8%). Le restanti attività (militari, nucleare e altro) hanno invece un contributo totale pari a circa l'11% (Figura 1.4).

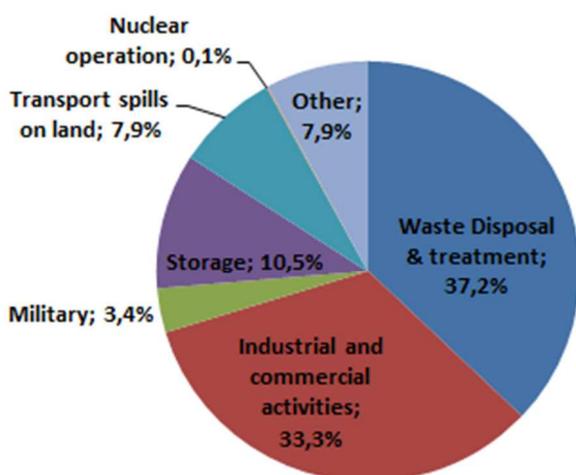


Figura 1. 4. Settori e attività responsabili della contaminazione in Europa

Considerando la matrice solida, la principale forma di contaminazione in Europa è rappresentata dagli idrocarburi (Mineral oil), e più in particolare da Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PHA), Chlorinated Hydrocarbons (CHC), Aromatic Hydrocarbons (BTEX), presenti nel 53% dei siti contaminati, seguita dai metalli pesanti, presenti invece nel 35% dei siti interessati (Panagos et al., 2013; Van Liedekerke et al., 2014, Puglisi et al., 2017) (Figura 1.5).

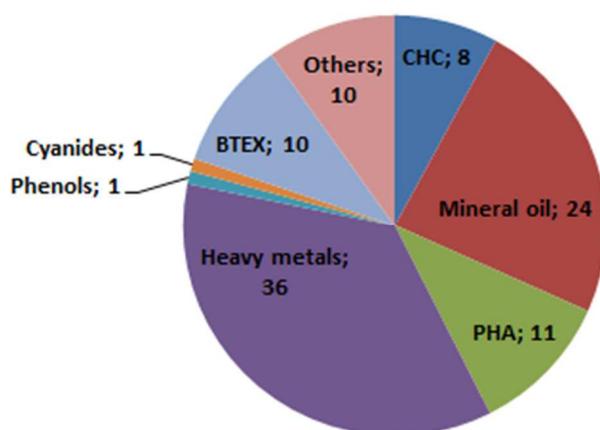


Figura 1. 5. Distribuzione dei contaminanti nel suolo in Europa

La situazione italiana è molto simile a quella europea (Perez et al., 2018), anche se in Italia il maggior contributo in termini di contaminazione dei suoli è riconducibile alle attività industriali e commerciali (52 %) (Figura 1.6).

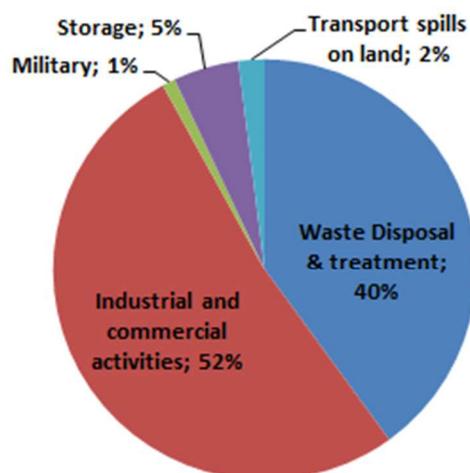


Figura 1. 6. Settori e attività responsabili della contaminazione in Italia

Anche dal punto di vista della distribuzione dei diversi contaminanti la situazione italiana riflette i dati europei (Figura 1.7).

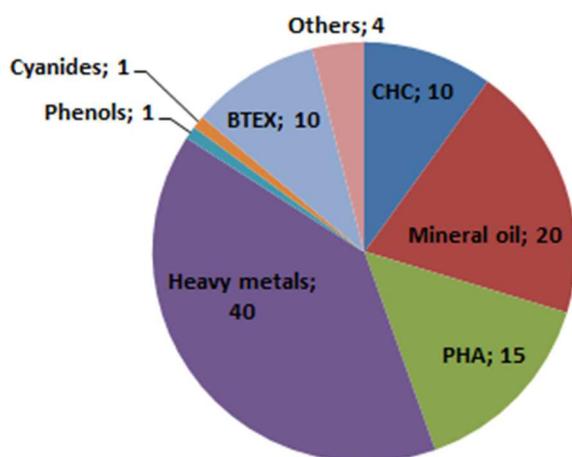


Figura 1. 7. Distribuzione dei contaminanti nel suolo in Italia

Anche in questo caso, considerando la matrice solida, la classe degli idrocarburi rappresenta la principale forma di contaminazione (presente nel 55 % dei siti contaminati), seguita dai metalli pesanti (40 %).

1.2 Quadro nazionale e regionale

In Italia, secondo l'ultimo annuario dei dati ambientali ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale), il numero totale di siti oggetto di procedimento amministrativo di bonifica ammonta a 31.645 di cui 16.516 con procedimento amministrativo concluso e 15.129 in corso (ISPRA, 2020) (Figura 1.8). Questi dati provengono dalle anagrafiche regionali e si riferiscono ai Siti Contaminati d'interesse regionale (Tabella 1.1).

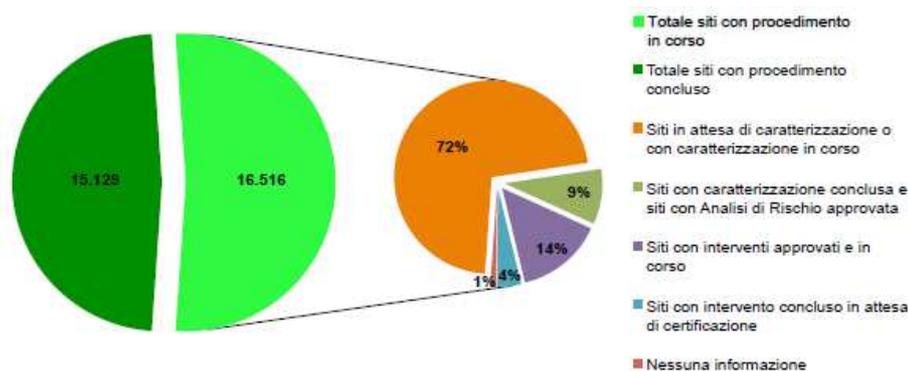


Figura 1. 8. Numero di siti oggetto di procedimento di bonifica in Italia e progresso nella gestione dei siti con procedimento di bonifica in corso (ISPRA, 2020)

Tabella 1. 1. Anagrafica dei siti contaminati di interesse regionale in Italia

Regioni e Province Autonome	Proc. Amm. in corso	Proc. Amm. concluso	Totale
Piemonte	838	922	1760
Valle D'Aosta	33	146	179
Lombardia	3030	6290	9320
Bolzano	22	328	350
Trento	135	317	452
Veneto	648	622	1270
Friuli-Venezia Giulia	226	970	1196
Liguria	320	366	686
Emilia-Romagna	515	476	991
Toscana	2027	2185	4212
Umbria	77	69	146
Marche	558	500	1058
Lazio	1013	155	1168
Abruzzo	832	343	1175
Molise	31	56	87
Campania	2825	393	4218
Puglia	391	169	560
Basilicata	216	58	174
Calabria	85	57	142
Sardegna	1062	234	1296
Sicilia	632	473	1105
TOTALE	16516	15129	31645

In Sicilia sono presenti 1.105 siti oggetto di procedimento amministrativo di bonifica, di cui solo il 43% concluso (Figura 1.9).

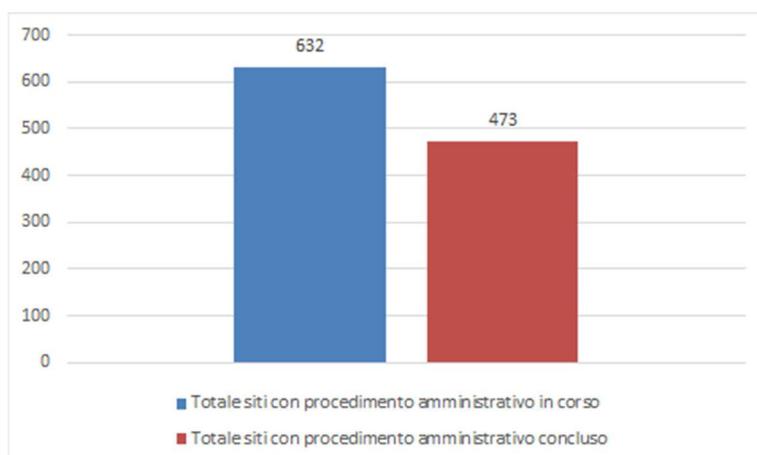


Figura 1. 9. Numero di siti oggetto di procedimento di bonifica in Sicilia

Da questa analisi sono esclusi i siti di Interesse Nazionale (SIN), che, come è noto, sono aree interessate da particolari livelli di inquinamento e/o interesse ambientale, tali da assumere interesse sovraregionale e, per tale ragione, per cui la competenza nella loro bonifica è stata attribuita al Ministero della Transizione Ecologica (MITE). A seguito di differenti successivi atti normativi di varia natura, sono stati identificati 58 SIN; tuttavia, il D.M. 11 gennaio 2013 ha trasferito le competenze di 18 SIN alle Regioni, per cui ad oggi il loro numero complessivo è pari a 39 (Figura 1.10). Di questi, 4 ricadono in Sicilia (Figura 1.11):

1. SIN n. 3 di Gela (CL), individuato con L. 426/98;
2. SIN n.4 di Priolo (SR), individuato con L. 426/98;
3. SIN n.53 di Milazzo (ME), individuato con L. 266/05;
4. SIN n.35 di Biancavilla (CT), individuato con D.M. 468/01.

I primi tre sono costituiti da aree industriali, come raffinerie, stabilimenti petrolchimici, centrali di produzione di energia elettrica e cementerie, in buona parte in esercizio, mentre il quarto è relativo a un caso di inquinamento di un'area urbana (Comune di Biancavilla) per contaminazione da materiali asbestiformi.

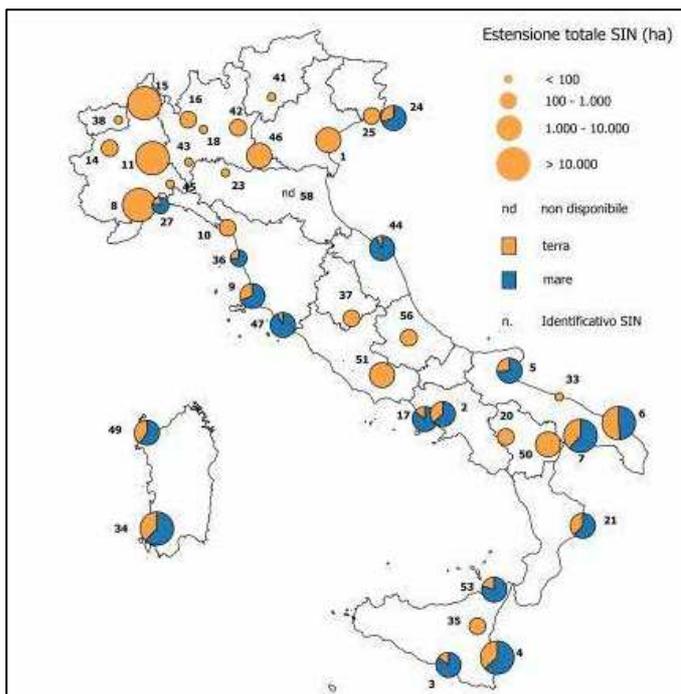


Figura 1. 10. Localizzazione ed estensione dei SIN in Italia (ISPRA, 2020)



Figura 1. 11. Localizzazione dei SIN in Sicilia (ARPA Sicilia)

1.3 Il quadro normativo nazionale sui siti contaminati

L'intero quadro normativo italiano sui siti contaminati si è sviluppato nell'ultimo trentennio, durante il quale esso ha subito una rapida evoluzione.

Le prime norme nazionali in materia sono state la Legge 349 del 8/7/1986 *"Istituzione del Ministero dell'ambiente e norme in materia di danno ambientale"* e la Legge n. 441 del 28 ottobre 1987; solo con l'emanazione del D.lgs. 22/97 (c.d. *"Decreto Ronchi"*) sono stati identificati alcuni punti chiave sul tema dei siti contaminati. In particolare, tale Decreto all'art.17 anticipava l'emanazione di apposite norme mirate all'identificazione dei limiti di accettabilità di contaminazione dei suoli e dei criteri generali da adottare per la messa in atto degli interventi di risanamento dei siti dove è stata accertata la contaminazione. Ai sensi del citato art.17 è stato quindi emanato il D.M. 471/99, *"Regolamento recante criteri, procedure e modalità per la messa in sicurezza, la bonifica e il ripristino dei siti inquinati, ai sensi dell'articolo 17 del decreto legislativo 5 febbraio 1997, n. 22, e successive modifiche e integrazioni"*, che costituisce il regolamento di attuazione delle procedure citate nel Decreto Ronchi e stabilisce criteri, procedure e modalità per la messa in sicurezza, la bonifica e il ripristino ambientale dei siti inquinati.

Le procedure definite dal D.M 471/99 sono state sostituite col D.lgs. 152/2006, c.d. *"Codice dell'ambiente"*, che ha introdotto importanti modifiche sia sulle modalità di caratterizzazione dei siti contaminati, sia su quelle di identificazione degli stessi, nonché delle procedure di bonifica e/l messa in sicurezza.

In particolare, le attività previste dal D.lgs. 152/06 in presenza di un sito "potenzialmente" contaminato possono essere così sintetizzate:

- 1) a seguito di un evento potenzialmente contaminante, il responsabile deve avviare una campagna di indagini per verificare se sono state superate le concentrazioni soglia di contaminazione (CSC), riportate nell'All.5, parte IV, titolo V, del D.lgs. 152/06;
- 2) nel caso di non superamento delle CSC, si deve solo procedere al ripristino ambientale della zona contaminata;
- 3) nel caso invece di superamento delle CSC, il sito è definito "potenzialmente contaminato" e deve essere redatto il Piano di caratterizzazione, avente i seguenti contenuti, riportati nell'All. 2, parte IV, titolo V, del D.lgs.152/2006:
 - a) ricostruzione storica delle attività produttive svolte nel sito;
 - b) elaborazione del Modello Concettuale Preliminare;
 - c) esecuzione del Piano di indagini;
 - d) elaborazione dei risultati;

- e) elaborazione del Modello Concettuale Definitivo;
 - f) identificazione dei livelli di concentrazione residua accettabili (CSR: concentrazioni soglia di rischio), a seguito dell'applicazione di una Analisi di Rischio inversa, il cui superamento richiede l'esecuzione di interventi di bonifica e/o messa in sicurezza;
- 4) nel caso in cui i valori delle CSR non siano superati, il sito non è contaminato e non occorre procedere a bonifica, ma, al più, all'esecuzione di un piano di monitoraggio;
 - 5) invece, nel caso in cui i valori delle CSR siano superati, il sito è definito contaminato e occorre procedere al progetto e all'esecuzione di interventi di bonifica e/o di messa in sicurezza (operativa o permanente);
 - 6) nel caso di siti con attività in esercizio si procede alla messa in sicurezza "operativa", che non interrompe l'attività pur consentendo il contenimento della diffusione degli inquinanti;
 - 7) nel caso di siti dismessi si procede alla bonifica (con eliminazione delle fonti di inquinamento) o alla messa in sicurezza "permanente" (con isolamento definitivo degli inquinanti).

1.4 Gli idrocarburi

Gli idrocarburi sono composti organici binari contenenti idrogeno e carbonio e possono essere suddivisi in funzione del tipo di legami che si instaurano tra gli atomi di carbonio presenti nella loro struttura. Si distinguono "idrocarburi saturi", che presentano soltanto legami carbonio-carbonio semplici, e "idrocarburi insaturi", caratterizzati da legami carbonio-carbonio doppi e tripli. Inoltre, gli idrocarburi vengono genericamente suddivisi in due classi: aromatici e alifatici. I primi sono rappresentati da tutti i composti insaturi contenenti uno o più anelli benzenici, i secondi includono idrocarburi saturi (alcani) ed insaturi (alcheni e alchini) a catena aperta e gli analoghi composti ciclici (cicloalcheni e cicloalcani) (Figura 1.12).

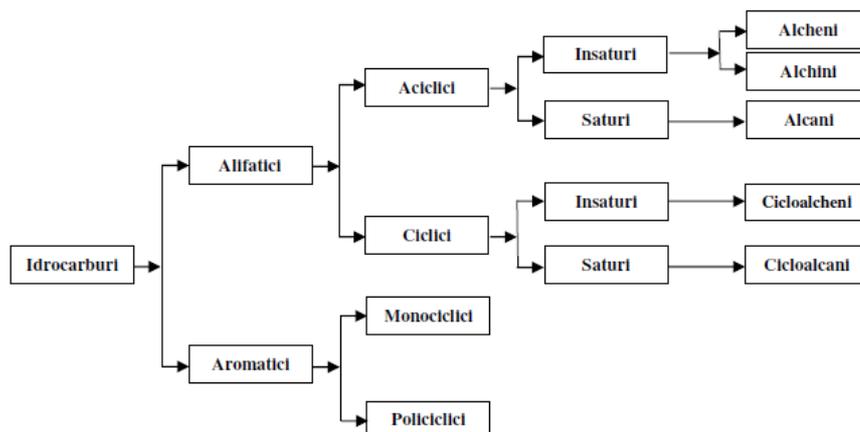


Figura 1. 12. Classificazione dei composti idrocarburi

1.4.1 I prodotti petroliferi

I prodotti petroliferi sono miscele complesse di idrocarburi caratterizzati da scarsa solubilità, da una densità in genere inferiore a quella dell'acqua e relativa volatilità. Il petrolio greggio rappresenta una miscela complessa costituita principalmente da idrocarburi e da una miscela di composti organici, contenenti ossigeno, azoto, zolfo, e di alcuni componenti inorganici (Costa et al., 2012, Chandra et al., 2013). In particolare, il greggio può essere suddiviso in quattro frazioni: alifatici, aromatici, resine e asfalteni (Varjiani, 2017). Rispetto alle frazioni alifatiche e aromatiche, le resine e gli asfalteni contengono anche composti polari non idrocarburi ed hanno strutture di atomi di carbonio che assumono geometrie molto complesse con aggiunta di atomi di azoto, zolfo e ossigeno.

Gli idrocarburi petroliferi sono compresi tra il C6 ed il C40 (Potter and Simmons, 1998) e possono essere suddivisi in intervalli specifici di numero o frazione di carbonio equivalente in funzione del rischio che comportano per la salute umana e per l'ambiente (CCME, 2010). La frazione 1 rappresenta la frazione volatile nella maggior parte delle miscele di idrocarburi e si riferisce all'intervallo di numero di atomi di carbonio equivalente da C6 a C10. La frazione 2 rappresentante la frazione semi-volatile e si riferisce all'intervallo di numero di atomi di carbonio equivalente da C10 a C16. La frazione 3 è invece considerata come frazione non volatile e comprende l'intervallo di numero di carbonio equivalente da C16 a C34. La frazione 4 rappresenta infine la frazione con la più bassa volatilità e solubilità e si riferisce ai composti con numero di carbonio equivalente $C > 34$.

Nonostante l'eterogeneità delle miscele ottenute, si può fare distinzione tra le varie frazioni ricavate dai processi di distillazione del petrolio greggio in funzione del numero di atomi di carbonio che caratterizzano la maggioranza dei composti costituenti le frazioni stesse:

- a) gas (da C1 a C4), costituiti principalmente da metano ed etano (gas combustibili), propano e butano (GPL);
- b) benzine (da C5 a C10), distinte in leggere e pesanti, costituite da alifatici e aromatici e utilizzate anche come solventi;
- c) cherosene (da C10 a C16), usato come carburante nei motori industriali e per riscaldamento;
- d) gasolio (da C14 a C25), utilizzato come carburante per motori e riscaldamento;
- e) residuo o olio pesante (oltre C25), da cui è possibile ricavare oli combustibili o lubrificanti e bitumi.

La benzina rappresenta una delle forme di contaminazione più diffuse. È costituita da una miscela di idrocarburi relativamente volatili, che comprende alifatici, aromatici e additivi. La composizione della benzina riscontrabile nelle forme di contaminazione ambientale può essere fortemente variabile, per effetto delle modificazioni nel tempo indotte dai fenomeni di trasformazione che interessano in modo diverso le varie componenti della benzina stessa e che portano alla riduzione delle frazioni più volatili o biodegradabili, nonché di quella adsorbibile nel caso di inquinamento delle acque di falda. Il diesel è composto principalmente da idrocarburi lineari e rispetto alle benzine contiene una percentuale maggiore di idrocarburi a catena lunga, più pesanti e meno volatili (APAT, 2006). Gli oli lubrificanti sono formati da idrocarburi a catena con più di 20 atomi di carbonio, hanno tipicamente alto peso molecolare, densità minore dell'acqua e sono poco mobili nel suolo. Gli oli esausti contengono composti aromatici e IPA (idrocarburi policiclici aromatici) che derivano dai processi di combustione.

1.4.2 Gli idrocarburi aromatici

Gli idrocarburi aromatici sono composti caratterizzati dalla presenza di un anello aromatico ovvero un anello di sei atomi di carbonio con tre legami doppi delocalizzati (APAT, 2006). Possono essere sia di origine naturale (presenti in tracce a seguito di processi di degradazione della sostanza organica), che antropica. In particolare, la loro immissione nell'ambiente è dovuta a molteplici attività industriali e, più in generale, a tutte le attività che richiedono l'impiego di solventi organici.

Gli idrocarburi aromatici si differenziano in base al tipo di gruppo sostituito presente sull'anello e sono maggiormente rappresentati da: benzene, toluene, etilbenzene e xilene (BTEX) (Figura 1.13).

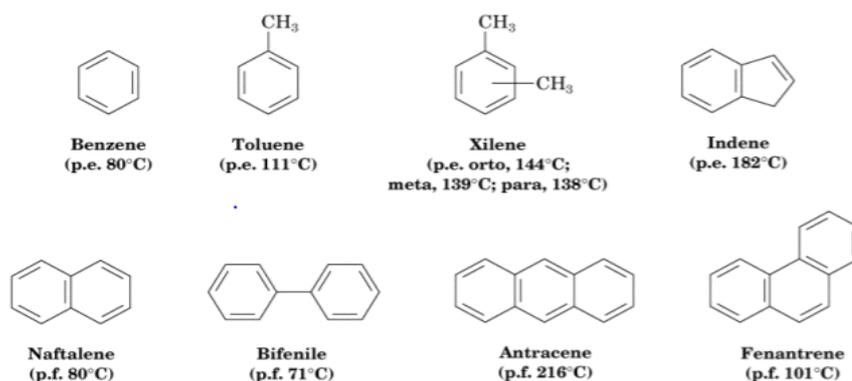


Figura 1. 13. Composti idrocarburi aromatici (APAT, 2006)

Nelle normali condizioni ambientali (pressione di 1 atm e temperatura di 20°C), gli idrocarburi aromatici si trovano allo stato liquido e sono caratterizzati da una volatilità piuttosto elevata. In particolare, il benzene e il toluene tendono a passare dalle matrici contaminate all'atmosfera, dove reagiscono e si degradano in pochi giorni. Nell'acqua e nei suoli, invece, la degradazione di queste specie è solitamente più lenta.

1.4.3 Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

Gli IPA rappresentano una delle categorie di composti organici più pericolose per la loro diffusione e tossicità. Sono composti derivanti dal benzene costituiti unicamente da atomi di carbonio e idrogeno in cui gli atomi di carbonio costituiscono più anelli condensati (APAT, 2006). Si ritrovano come impurità nei combustibili fossili ed hanno origine dalla loro incompleta combustione (Ahn et al., 1999; Brenner et al, 2002; Johnsen et al., 2005). La loro immissione in ambiente è quindi associata ai processi di combustione industriali ed urbani, al traffico navale ed allo sversamento di petrolio.

Gli IPA sono caratterizzati da una elevata affinità con la sostanza organica e una solubilità in acqua relativamente bassa. Queste caratteristiche spiegano la loro tendenza a rimanere adsorbiti al suolo e sottosuolo e a formare legami con le particelle in sospensione nelle acque o a depositarsi nei sedimenti ricchi di carbonio

organico. Inoltre, vista la tendenza ad accumularsi nel particolato aeriforme, gli IPA possono raggiungere anche ambienti molto lontani dall'attività industriale responsabile della loro produzione.

Pur mostrando una bassa tossicità acuta, alcuni IPA si sono rivelati degli agenti cancerogeni. La United States Environment Protection Agency (USEPA) ha inserito tra gli inquinanti prioritari 17 IPA (Tabella 1.2).

Tabella 1. 2. IPA considerati “inquinanti prioritari” (USEPA)

Composto	Peso molecolare [g mol ⁻¹]	Formula bruta	Tensione di vapore [Pa]	Solubilità in acqua [mg l ⁻¹]	Log Kow (Log K _{oc})
Naftalene	128,19	C ₁₀ H ₈	10 a 25°C	31,7	3,37 (3,11)
Acenaftilene	152,20	C ₁₂ H ₈	0,12 a 25°C	16,1	4,00 (3,83)
Acenaftene	154,21	C ₁₂ H ₁₀	1,3 10 ³ a 131,2°C	9,93	3,92 (5,38)
Fluorene	166,22	C ₁₃ H ₁₀	0,04 a 20 °C	1,98	4,18 (5,47)
Antracene	178,23	C ₁₄ H ₁₀	3,6 10 ⁻⁴ a 25°C	0,0434	4,54 (5,76)
Fenantrene	178,23	C ₁₄ H ₁₀	1,3 10 ³ a 118,2°C	1,29	4,57 (6,12)
Fluorantene	202,26	C ₁₆ H ₁₀	1,23 10 ⁻³ a 25°C	0,206	5,22 (6,38)
Pirene	202,26	C ₁₆ H ₁₀	1,19 10 ⁻² a 25°C	0,135	5,18 (6,51)
Crisene	228,29	C ₁₈ H ₁₂	8,3 10 ⁻⁷ a 25°C	0,0016	1,649 (6,27)
Benzo(a)antracene	228,29	C ₁₈ H ₁₂	6,67 10 ⁻⁷ a 20°C	0,0094	5,91 (6,30)
Benzo(a)pirene	252,31	C ₂₀ H ₁₂	7,32 10 ⁻⁷ a 25°C	0,00162	6,04 (6,26)
Benzo(b)fluorantene	252,31	C ₂₀ H ₁₂	6,7 10 ⁻⁵ a 20°C	0,0015	5,80 (5,74)
Benzo(k)fluorantene	252,31	C ₂₀ H ₁₂	1,29 10 ⁻⁷ a 25°C	0,0008	6,00 (5,99)
Benzo(e)pirene	252,31	C ₂₀ H ₁₂	7,6 10 ⁻⁷ a 25°C	0,004	6,21 (7,20)
Benzo(g,h,i)perilene	268,35	C ₂₁ H ₁₆	9,8 10 ⁻¹⁰ a 20°C	0,00026	6,50 (6,20)
Indeno(1,2,3-c,d)pirene	276,33	C ₂₂ H ₁₂	9,8 10 ⁻¹⁰ a 20°C	0,00022	
Dibenzo(a,h)antracene	278,35	C ₂₂ H ₁₄	9,8 10 ⁻¹⁰ a 20°C	0,0049	6,75 (6,52)

Gli studi finora condotti su cavie animali hanno evidenziato la cancerogenicità degli IPA a maggior peso molecolare, come benzo(a)pirene, benzo(a)antracene, benzo(b)fluorantene, benzo(k)fluorantene e crisene. Altri IPA, come antracene e fluorantene, sono risultati mutageni, mentre quelli a basso peso molecolare possono probabilmente indurre effetti tossici somatici per esposizioni acute o croniche (Mackay et al., 1992).

1.4.4 Destino, trasporto e meccanismi di degradazione

In presenza di un sito contaminato è fondamentale conoscere e analizzare in maniera approfondita i fenomeni che influenzano il destino ambientale degli inquinanti nel suolo e nel sottosuolo, nonché i processi chimici e chimico-fisici, che si instaurano a seguito della contaminazione.

Un generico contaminante può essere presente nel suolo/sottosuolo in quattro forme diverse: adsorbito alla fase solida, disciolto in soluzione, presente come fase libera separata (se questa è immiscibile o poco miscibile con l'acqua) o in forma volatile all'interno degli spazi interstiziali costituenti il suolo (in terreni insaturi).

La conoscenza delle modalità di distribuzione dei contaminanti tra le fasi di uno specifico sistema è alla base della possibilità di impostare con successo le attività di bonifica.

Una volta rilasciati nell'ambiente, gli idrocarburi petroliferi per gravità tendono a permeare verticalmente verso il basso fino a raggiungere le acque sotterranee formando una fase liquida immiscibile con l'acqua, chiamata NAPL (Non Aqueous Phase Liquid), che tende a diffondersi orizzontalmente. In funzione della densità, tale fase può essere distinta in LNAPL (Light Non Aqueous Phase Liquids) o in DNAPL (Dense NAPL). Nel primo caso essa ha densità inferiore all'acqua e tende quindi a galleggiare sulla superficie della falda (figura 1.14), mentre nel secondo caso essa ha densità maggiore all'acqua, tendendo così a raggiungere gli strati più profondi dell'acquifero (figura 1.15).

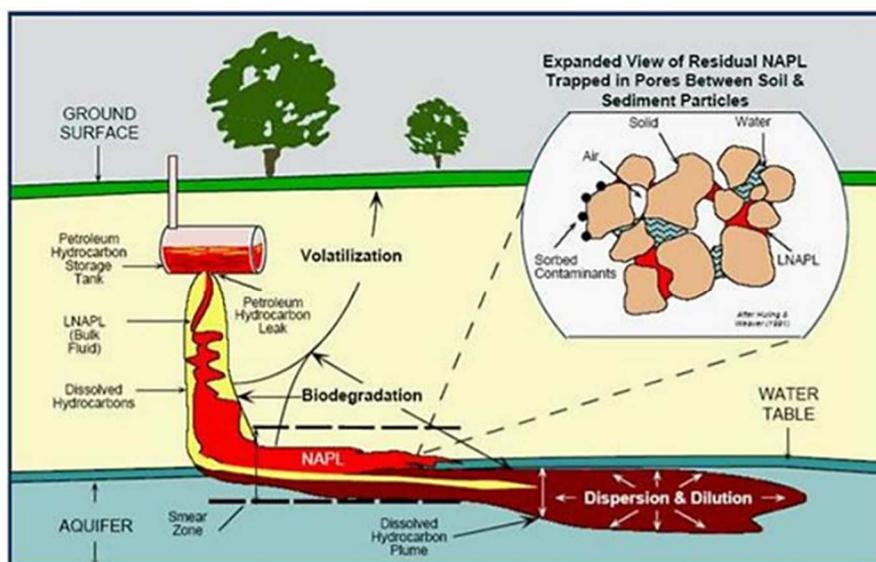


Figura 1. 14. Meccanismi di trasporto di una LNAPL (Capozzoli et al., 2017)

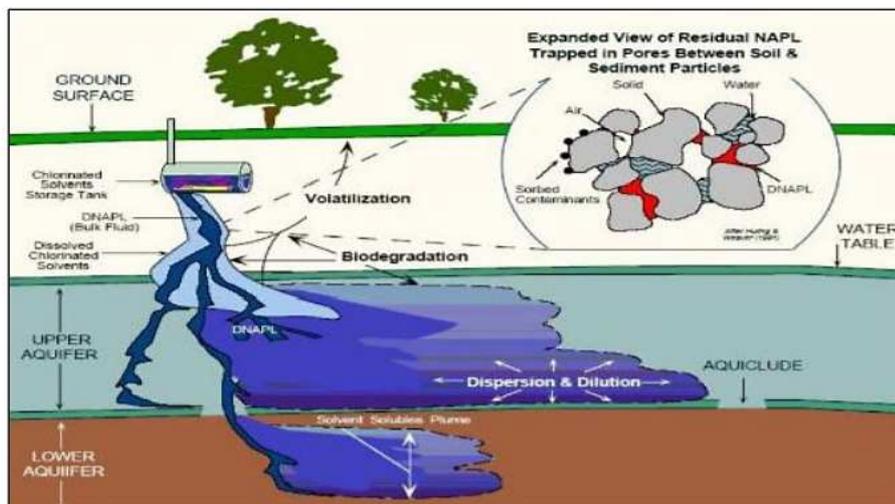


Figura 1. 15. Meccanismi di trasporto di una DNAPL (Capozzoli et al., 2017)

Quando la contaminazione interessa la zona superficiale del suolo, i meccanismi principali che si instaurano sono: trasporto eolico, degradazioni di tipo ossidativo/fotochimico, lisciviazione e trasporto ad opera di acque meteoriche o superficiali, con possibilità di penetrazione nel sottosuolo (Zerlia, 2001). Nel corso del loro movimento nel sottosuolo, gli idrocarburi tendono a “spiazzare” l’aria e l’acqua interstiziali, con l’instaurarsi di fenomeni di trasporto, di trasformazione e di interazione che sono funzione tanto delle caratteristiche del terreno che delle proprietà chimico-fisiche dei singoli inquinanti. I principali meccanismi che regolano l’interazione tra il terreno e i contaminanti idrocarburi sono schematicamente riassunti in Figura 1.16.

- Evaporazione e condensazione
- Diffusione
- Avvezione
- Dispersione
- Solubilità in acqua
- Scambio cationico
- Adsorbimento e desorbimento
- Biodegradazione
- Reazioni abiotiche

Figura 1. 16. Principali meccanismi di trasporto e di trasformazione degli idrocarburi petroliferi nel sistema suolo/sottosuolo (Zerlia, 2000)

Seguendo il percorso di un prodotto petrolifero dalla superficie verso il sottosuolo è possibile individuare una serie di fenomeni concomitanti che modificano la composizione della fase idrocarburica mediante un processo di evoluzione continua (Barakat et al., 2001; Mishra e Kumar, 2015; Esbaugh et al., 2016). Le componenti più leggere possono volatilizzare e diffondersi negli interstizi, la componente più solubile può interagire con l'acqua interstiziale, dissolversi e diffondersi o essere adsorbita dal suolo o ancora può essere attaccata dai microrganismi ed essere degradata. Una parte può rimanere sottoforma di NAPL e raggiungere la falda. Nel caso di LNAPL, il contaminante tende a galleggiare sulla superficie della falda e a diffondersi, con velocità e direzione regolate principalmente dalle caratteristiche della falda stessa. Inoltre, la perdita delle componenti leggere per solubilizzazione e/o volatilizzazione può comportare l'aumento della densità del NAPL e il conseguente affondamento dello stesso fino alla base permeabile della falda. Altro fenomeno complesso è legato all'adsorbimento che influenza la velocità di migrazione degli idrocarburi e l'estensione della contaminazione.

1.4.5 Effetti dell'inquinamento da idrocarburi

Lo sversamento di idrocarburi negli ecosistemi è una delle maggiori preoccupazioni ambientali (Santos and Maranhó, 2018). La presenza di inquinanti idrocarburici nei suoli e nelle acque comporta impatti ambientali significativi e rischi sostanziali sia per l'uomo che per altre forme di vita (Hentati et al., 2013; Sammarco et al., 2016). I contaminanti idrocarburici caratterizzano la stragrande maggioranza dei sottoprodotti classificati come inquinanti ambientali prioritari, a causa della loro natura persistente e recalcitrante (Ossai et al., 2020); essi sono per lo più durevoli e stabili e permangono a lungo nell'ambiente (Keramitsoglou et al., 2003; Dindar et al., 2013; Gennadiev et al., 2015).

In seguito a uno sversamento di prodotti idrocarburici, il contaminante riempie i pori del suolo e viene rapidamente adsorbito dalle sue particelle, alterandone le composizioni chimiche, fisiche e biologiche (Mena et al., 2016). Esso inoltre penetra nel terreno fino a raggiungere la falda acquifera, modificandone gli stati ecologici e geochimici.

Gli impatti negativi sui diversi ecosistemi includono la compromissione e l'alterazione delle condizioni biotiche e abiotiche con gravi conseguenze sulla biodiversità (Gargouri et al., 2015; Nardeli et al., 2016). L'alterazione della composizione chimica del suolo la scarsa disponibilità di nutrienti in seguito alla contaminazione da idrocarburi può inoltre provocare cambiamenti nella composizione microbica del suolo e l'inibizione dell'attività batterica (Andreolli et al., 2015; Abbasian et al., 2016).

Gli effetti negativi sulle piante si verificano sia nelle fasi di crescita che di sviluppo. La presenza di inquinanti idrocarburi può indurre uno stress ossidativo che ne riduce la crescita, porta a deformazioni fogliari e necrosi nei tessuti e può compromettere la difesa contro i patogeni (Adam e Duncan, 2002; Mendez-Natera et al., 2004; Zhu, 2010; Shan et al., 2014; Rusin et al., 2015).

Anche gli animali subiscono conseguenze negative dovute all'inquinamento da idrocarburi, che può portare allo sviluppo di cancro e altre malattie, insufficienza della capacità riproduttiva e bioaccumulo nella catena alimentare a livelli che disturbano i processi biochimici e fisiologici.

La somma di questi squilibri ambientali può coinvolgere direttamente e/o indirettamente la salute umana. I contaminanti idrocarburi hanno infatti elevati tossicità e potenziale cancerogeno, mutageno e teratogeno (Chen et al., 2015). Depressione del sistema nervoso, narcosi e irritazione delle mucose degli occhi sono alcuni dei sintomi causati sull'uomo dalla contaminazione da idrocarburi (Ameen et al., 2016; Bastida et al., 2016; Santos and Maranhão, 2018).

Considerato l'elevato numero di composti presenti negli idrocarburi, solo una parte di essi è stata finora ben caratterizzata dal punto di vista dell'effetto tossicologico (ATSDR, 2011). Nei confronti degli esseri umani, gli idrocarburi petroliferi, a seconda della natura chimica, della composizione, della modalità di esposizione, del livello di esposizione e del tempo di esposizione, risultano generalmente tossici e letali. I possibili effetti tossicologici sulla salute umana conseguenti a una esposizione a idrocarburi a breve o a lungo termine sono riportati in Figura 1.17 e in Figura 1.18. Essi possono causare varie tipologie di problemi di salute agli esseri umani e agli animali, tra cui emotossicità (distruzione dei globuli rossi), cancerogenicità (capacità o tendenza a indurre il cancro), genotossicità (capacità di indurre danni al DNA non trasmissibili), mutagenicità (capacità di incitare mutazioni genetiche trasmissibili), teratogenicità (induzione della malformazione dell'embrione o feto), citotossicità (capacità di essere tossico per le cellule), neurotossicità (danno al cervello e al sistema nervoso), immunotossicità (capacità di reprimere il sistema immunitario), nefrotossicità (danno al rene), epatotossicità (capacità di provocare danni al fegato), cardiotossicità (capacità di causare danni ai muscoli cardiaci) e capacità di indurre disturbi oculari (WHO, 1986; Cajaraville et al., 1991; Omoti et al., 2008; Sriram et al., 2011; Zheng et al., 2014; Ogunneye et al., 2014; Azeez et al., 2015; Lawal, 2017).

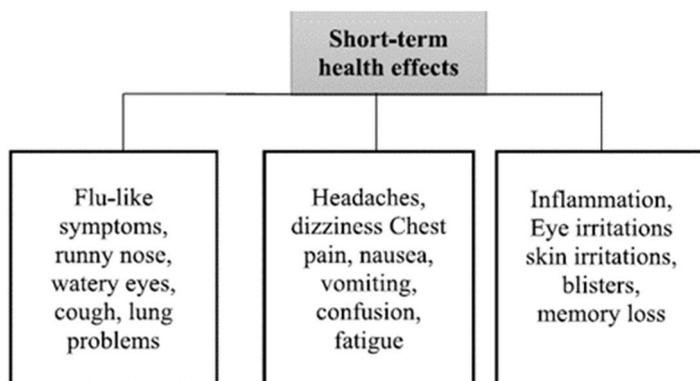


Figura 1. 17. Effetti tossicologici a breve termine sulla salute legati all'esposizione ad idrocarburi (Ossai et al., 2020)

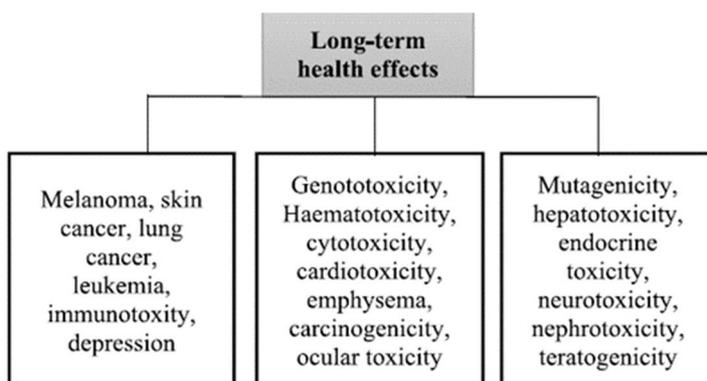


Figura 1. 18. Effetti tossicologici a lungo termine sulla salute legati all'esposizione ad idrocarburi (Ossai et al., 2020)

1.5 Tecniche di bonifica di suoli contaminati da idrocarburi

L'approccio di bonifica scelto per un sito contaminato è fortemente sito specifico e dipende tanto dalle caratteristiche del contaminante e dalle condizioni fisiche, chimiche e biologiche dell'ambiente interessato, quanto da fattori esterni come requisiti normativi, costi e vincoli di tempo (Ossai et al., 2020).

Una prima classificazione degli interventi di bonifica può essere fatta in funzione del luogo in cui essi avvengono, essendo così classificabili in trattamenti in-situ ed ex-situ. I trattamenti ex-situ presentano il vantaggio di essere facilmente gestibili e ottimizzabili, ma richiedono l'escavazione e la movimentazione del terreno

contaminato, con aumento dei costi e dei rischi legati alla movimentazione stessa. I trattamenti in-situ non prevedendo scavo e movimentazione e consentono di intervenire simultaneamente su più matrici ambientali; essi sono però più difficili da controllare, sia come parametri di processo, sia come definizione dei limiti di intervento. I trattamenti ex-situ possono essere ulteriormente distinti in “on-site” e “off-site, a seconda che il trattamento avvenga in impianti (anche mobili) realizzati all’interno o in prossimità della stessa area oggetto dell’intervento, o in impianti lontani da tale area.

I trattamenti di bonifica per la matrice solida possono inoltre essere classificati in funzione del tipo di processo che sta alla base dell’intervento; in questo caso è possibile fare distinzione tra trattamenti fisico-chimici, trattamenti biologici e trattamenti termici (Lim et al., 2016).

1.5.1 Trattamenti fisico-chimici

Comprendono diversi trattamenti applicabili sia in situ che ex situ (Tabella 1.3). L’obiettivo dei trattamenti fisico-chimici è quello di favorire il passaggio di fase dei contaminati, in modo da renderli più facilmente estraibili o trattabili (trattamenti fisici), o la trasformazione dei contaminanti in sostanze meno pericolose mediante l’impiego di reagenti chimici (trattamenti chimici) (Dadrassia et al., 2013; Naseri et al., 2014; Azubuike et al., 2016).

Tabella 1.3. Trattamenti fisico-chimici in situ ed ex situ

In situ	Ex situ
soil vapor extraction (SVE)	soil washing
soil flushing	solidificazione/stabilizzazione
ossidazione chimica	
solidificazione/stabilizzazione	

L’SVE è una tecnologia di trattamento in situ di contaminanti organici basata sulla ventilazione della zona non satura (o “vadosa”) del sottosuolo mediante pozzi verticali finestrati, al fine di creare un gradiente di pressione e volatilizzare i contaminanti adsorbiti, raccogliere e trasportare il vapore del suolo contaminato nei pozzi di estrazione e infine trattare i contaminanti fuori terra. (Dadrassia et al., 2013; Ma et al., 2016; Simpanen, 2016). Studi a scala pilota di SVE hanno ottenuto rendimenti di bonifica dell’89% per i composti organici semi-volatili (Zhang et al., 2015).

Il soil washing e il soil flushing sono interventi di estrazione dei contaminanti dal suolo mediante lavaggio dello stesso con un fluido. Tale fluido è generalmente costituito da acqua arricchita da additivi chimici (tensioattivi, soluzioni di acidi o

basi, agenti complessanti) per agevolare la separazione dei contaminanti (Seo et al., 2015; Godheja et al., 2016; Fabbricino et al., 2018). Nel primo caso l'intervento avviene ex situ, con escavazione e pretrattamento del terreno prima della fase di lavaggio. Nel secondo caso il trattamento avviene in situ con immissione a monte dell'area contaminata di un fluido di lavaggio, che viene recuperato a valle. In entrambi i casi l'obiettivo è quello di trasferire i contaminanti dalla matrice solida a quella liquida, con formazione di una torbida che deve essere poi sottoposta a trattamento. Studi di letteratura (Kang et al., 2012) riportano rendimenti di rimozione del 97% per i TPH.

L'ossidazione chimica è una tecnologia di bonifica in-situ di acque sotterranee, suolo e sottosuolo, che consiste nell'utilizzo di sostanze chimiche ossidanti come perossido di idrogeno, permanganato di potassio o ozono, in presenza o meno di catalizzatori. Tale iniezione avviene in corrispondenza dell'area contaminata al fine di indurre la trasformazione delle sostanze inquinanti in composti meno tossici, con l'obiettivo di ottenere come prodotti finali acqua e anidride carbonica (ITRC, 2000). Uno studio condotto da Chen et al. (2015) sull'applicazione dell'ossidazione chimica a terreni contaminati da idrocarburi ha ottenuto efficienze di rimozione comprese tra il 48 e il 93% in 120 giorni di trattamento.

La solidificazione/stabilizzazione può essere considerata una tecnologia di messa in sicurezza in-situ o un intervento di bonifica ex-situ di suoli contaminati. Essa interviene sulla fonte di inquinamento, immobilizzando i contaminanti secondo diversi meccanismi di natura fisica o chimica, spesso concomitanti. Tali obiettivi vengono raggiunti con l'impiego di agenti leganti che portano alla formazione di una struttura cristallina, vetrosa o polimerica che ingloba le particelle di suolo contaminato.

1.5.2 Trattamenti biologici

I trattamenti biologici, che comprendono diversi trattamenti applicabili in situ o ex situ (Tabella 1.4), si basano sull'attività metabolica o cometabolica di microrganismi (autoctoni o alloctoni), creando le condizioni ottimali per accelerare i naturali processi di biodegradazione dei contaminanti organici.

Tabella 1. 4. Trattamenti di bioremediation in situ ed ex situ

In situ	Ex situ
landfarming	landfarming
bioventing	compostaggio
bioflushing	bioreattori
phytoremediation	phytoremediation

Negli ultimi anni le tecniche di “bioremediation”, che saranno meglio discusse appresso, hanno acquisito un ruolo centrale nella bonifica dei suoli contaminati da idrocarburi di origine petrolifera, grazie ai vantaggi che esse presentano rispetto alle tecniche convenzionali: costi più contenuti, minori consumi energetici, possibilità di intervenire su tutte le fasi dell'inquinante e restituzione di un terreno bonificato biologicamente attivo (Frankenberger, 1992; Ulrici, 2000; Couto et al., 2010).

1.5.3 Trattamenti termici

I trattamenti termici (Tabella 1.5) consentono di risanare i terreni contaminati da sostanze organiche e, in talune tipologie di processo, anche di rimuovere (quando vaporizzabili e poi ossidabili a basse temperature) o immobilizzare efficacemente le sostanze inorganiche.

Tabella 1. 5. Trattamenti termici in situ ed ex situ

In situ	Ex situ
Desorbimento termico per estrazione di vapore o a radiofrequenze	Desorbimento termico a tamburo rotante, a pale o a coclee
Vetrificazione	Inceneritore a tamburo rotante, a letto fluido o al plasma

I trattamenti termici si distinguono in due grandi categorie: trattamenti di desorbimento termico e trattamenti di termodistruzione. Nel primo caso il trattamento si limita a una semplice evaporazione/pirolisi dei composti volatili, con temperature in genere variabili tra 90 e 650°C, mentre nel secondo caso le temperature variano da 600°C a oltre 2.000°C per i sistemi che comportano la fusione e la successiva vetrificazione del terreno. Le caratteristiche del terreno decontaminato a fine trattamento dipendono dalla temperatura di processo: temperature al di sotto di 460°C non pregiudicano il riutilizzo agronomico del terreno, per temperature comprese tra 500 e 900°C il suo utilizzo può essere esclusivamente quello di materiale da riporto o riempimento, mentre il terreno trattato al di sopra di 900°C arriva al punto di fusione e, una volta raffreddato, diviene un prodotto vetrificato.

Il desorbimento termico può avvenire sia in situ, per estrazione con vapore o a radio frequenze, che ex situ, ad esempio in unità a tamburo rotante, ed è idoneo per il trattamento di matrici solide contaminate da sostanze volatili e semi-volatili come idrocarburi policiclici aromatici (IPA), idrocarburi petroliferi, policlorobifenili (PCB) (Liu et al., 2019; Zhao et al., 2019).

I trattamenti di termodistruzione sono invece applicati nel caso di elevate concentrazioni di composti organici di elevata pericolosità e stabilità termica o per l'immobilizzazione di composti inorganici. Anche questi ultimi possono essere adoperati in situ, tramite vetrificazione del terreno contaminato, o ex situ, tramite incenerimento in inceneritori a tamburo rotante, a letto fluido o al plasma.

I trattamenti termici hanno elevati rendimenti di rimozione dei contaminanti ma sono molto costosi (Ossai et al., 2020).

1.6 Bioremediation di suoli contaminati da idrocarburi

Gli idrocarburi sono diffusamente presenti nelle acque, nei suoli e nell'aria, specie nelle aree del pianeta a più alta industrializzazione o densità abitativa. Tale diffusione ha reso pressoché ubiquitaria la presenza di microrganismi capaci di utilizzare, per la loro crescita, gli idrocarburi come fonte di energia o di carbonio (McGenity et al., 2012).

La biodegradazione consiste comunemente nel trasformare gli idrocarburi in biomassa, anidride carbonica e acqua (Duarte da Cunha e Leite, 2000). Questa trasformazione avviene a livello membrana cellulare o all'interno delle cellule dei microrganismi mediante una successione di reazioni biochimiche di ossidazione, ciascuna delle quali necessita di un catalizzatore costituito da una proteina specifica (enzima). Si attiva così una catena metabolica, in cui ciascun enzima catalizza la trasformazione di una sostanza in un prodotto che viene ulteriormente ossidato con la reazione catalizzata dall'enzima successivo, sino alla trasformazione in substrati di crescita, anidride carbonica e acqua.

1.6.1 Meccanismi di degradazione degli idrocarburi

Il biorisanamento è un processo che sfrutta l'attività dei microrganismi e i loro prodotti per rimuovere i contaminanti dal suolo (Leung, 2004). In particolare, le tecniche di biorisanamento utilizzano i microrganismi per ridurre, eliminare o contenere i contaminanti presenti nel suolo, sedimenti, acqua e aria.

Il biorisanamento prevede la produzione di energia in una reazione redox all'interno delle cellule microbiche. Queste reazioni includono la respirazione e altre funzioni biologiche necessarie per il mantenimento e la riproduzione cellulare. In genere sono necessari una fonte di energia (donatore di elettroni), un accettore di elettroni e la disponibilità di sostanze nutritive.

La presenza di microrganismi con capacità cataboliche appropriate è il requisito più importante per il biorisanamento dei suoli contaminati da idrocarburi (Venosa et al, 2002). È stato dimostrato che le comunità batteriche quando sono esposte agli

idrocarburi sono soggette ad un arricchimento selettivo che favoriscono la componente microbica dotata dei determinanti genici utili alla loro utilizzazione. Le comunità batteriche che si sono adattate agli idrocarburi sono in grado di rispondere alla contaminazione nel giro di poche ore, mostrando tassi di biodegradazione nettamente più elevati rispetto alle comunità batteriche mai interessate da contaminazione da idrocarburi (Leahy e Colwell, 1990).

Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi sulla biodegradazione degli idrocarburi, che ne hanno descritto i meccanismi principali e le vie metaboliche (Farhadian et al., 2008; Rojo, 2009; Sajna et al., 2015; Varjani et al., 2015; Varjani e Srivastava, 2015; Meckenstock et al., 2016; Wilkes et al., 2016; Varjani and Upasani, 2016; Lo Piccolo et al., 2011). Gli idrocarburi possono essere metabolizzati selettivamente da singoli ceppi di microrganismi o da un consorzio di ceppi microbici, sia appartenenti allo stesso genere che a generi diversi (Boopathy, 2000; Varjani et al., 2015; Varjani e Upasani, 2016; De Pasquale et al., 2012). Il petrolio, essendo costituito da una miscela che comprende sia idrocarburi semplici che complessi, viene degradato da diversi microrganismi, ciascuno in grado di scomporre un gruppo specifico di molecole (Zanaroli et al., 2010; Varjani e Upasani, 2013; Varjani et al., 2014). Bisogna però considerare che mentre i composti più semplici possono essere degradati da un'ampia varietà di batteri, solo in pochissime specie si riscontra la capacità di degradare composti complessi come IPA, resine e asfalteni.

La degradazione degli idrocarburi petroliferi può essere mediata da specifici sistemi enzimatici (Widdel e Rabus, 2001; Das e Chandran, 2011). I microrganismi possono catabolizzare gli inquinanti idrocarburi per ottenere energia e trasformarli in molecole assimilabili nella biomassa cellulare (Leahy e Colwell, 1990). La Figura 1.19 riporta i principali meccanismi coinvolti nella degradazione degli idrocarburi.

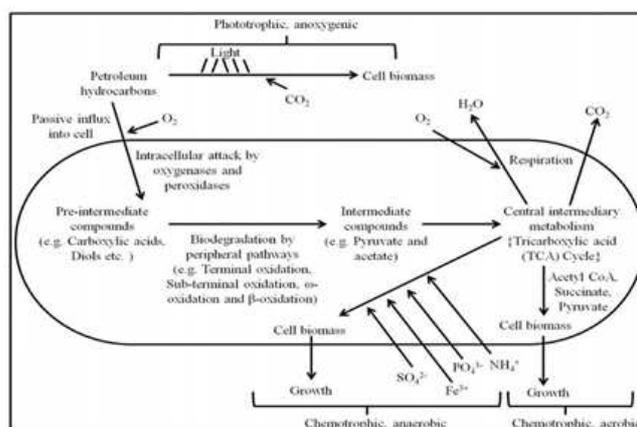


Figura 1. 19. Meccanismi di degradazione degli idrocarburi (Varjani, 2017)

Il catabolismo degli idrocarburi è stato a lungo considerato un processo strettamente aerobico, ma negli ultimi anni numerosi autori hanno evidenziato la presenza di microrganismi in grado di degradare gli idrocarburi in condizioni anaerobiche (Widdel e Rabus, 2001; Abbasian et al., 2015; Meckenstock et al., 2016).

1.6.2 Biodegradazione aerobica degli idrocarburi

La componente del petrolio degradata più rapidamente in condizioni aerobiche è costituita dagli alcani (Riser-Roberts, 1998). In particolare; gli alcani a basso e medio peso molecolare ($C < 28$) vengono degradati più facilmente dai microrganismi; tuttavia, diversi ceppi batterici sono in grado di degradare idrocarburi alifatici fino a C_{36} e oltre (Lo Piccolo et al., 2011).

In Figura 1.20 sono riportati i principali meccanismi per la degradazione degli idrocarburi da parte dei microrganismi, che può seguire diversi pathway come l'ossidazione terminale, subterminale, β e ω ossidazione (Ji et al., 2013).

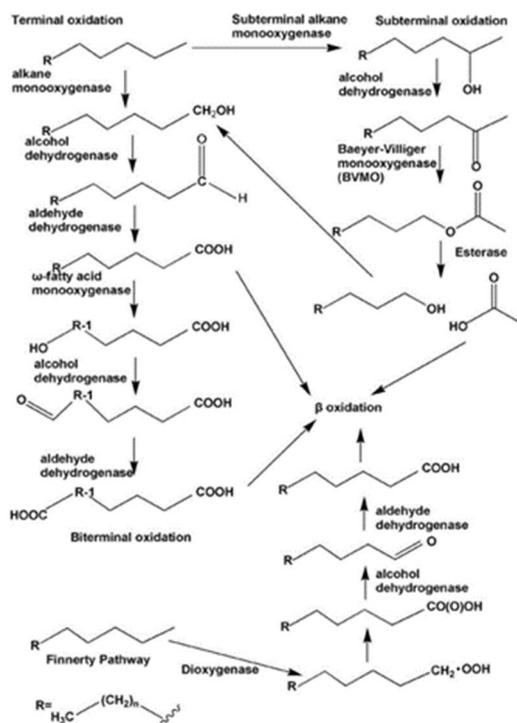


Figura 1. 20. Pathway di degradazione degli idrocarburi alifatici in condizioni aerobiche (Ji et al., 2013)

Nella degradazione aerobica degli alcani, il composto idrocarburico, caratterizzato da un'elevata stabilità chimica, viene reso reattivo utilizzando l'ossigeno molecolare. La prima fase consiste nella formazione di un alcool primario per ossidazione di un metile terminale, che avviene ad opera degli enzimi idrossilasi. Tali enzimi catalizzano l'incorporazione nella molecola organica di un solo atomo di ossigeno in posizione terminale o sub terminale sotto forma di gruppo ossidrilico OH. L'alcool primario viene quindi ossidato ad aldeide e successivamente ad acido grasso ad opera di due deidrogenasi specifiche. Infine, l'acido grasso viene coniugato al CoA (coenzima A) e quindi processato tramite beta-ossidazione per generare acetyl-CoA. I prodotti finali della mineralizzazione degli idrocarburi sono ATP, CO₂ e H₂O (Rojo, 2009).

I composti aromatici (es. benzene, toluene, etilbenzene, xilene, naftalene), a differenza degli alifatici, sono caratterizzati da una maggiore stabilità termodinamica che li rende generalmente più recalcitranti alla biodegradazione. Esistono tuttavia vari batteri in grado di degradarli. In questo caso, l'efficienza di biodegradazione dipende dalla solubilità del composto, dal numero di anelli benzenici, dal tipo e dal numero di sostituenti e dalle proprietà degli atomi eterociclici (Xue et al., 2015). Analogamente agli alifatici, la versatilità catabolica dei batteri nei confronti dei composti aromatici si basa sull'esistenza di geni catabolici che codificano per monoossigenasi e idrossilano direttamente l'anello aromatico o il sostituente alchilico legato all'anello. Successivamente, l'attività enzimatica di specifiche deidrogenasi porta alla formazione di catecoli e protocatecuati. I primi sono intermedi metabolici che derivano dal catabolismo di composti aromatici non alchilati, come il fenantrene o il benzene, o da aromatici aventi un gruppo funzionale come il fenolo o il toluene; i protocatecuati sono invece intermedi metabolici che derivano dal catabolismo di composti aromatici polialchilati o dal catabolismo del benzoato e dei suoi derivati (Figura 1.21). Dopo la formazione degli intermedi catecolici, avviene una rottura dell'anello aromatico tramite una apertura in orto o in meta catalizzate rispettivamente dalle intradiolo- diossigenasi (tipo I) o extradiolo- diossigenasi (tipo II). Una serie di reazioni porta quindi alla formazione di intermedi metabolici, come acetyl-CoA, succinato, formiato, acetaldeide, piruvato, che possono entrare nel metabolismo centrale per la produzione di energia e biomassa. I metaboliti finali sono CO₂ e H₂O.

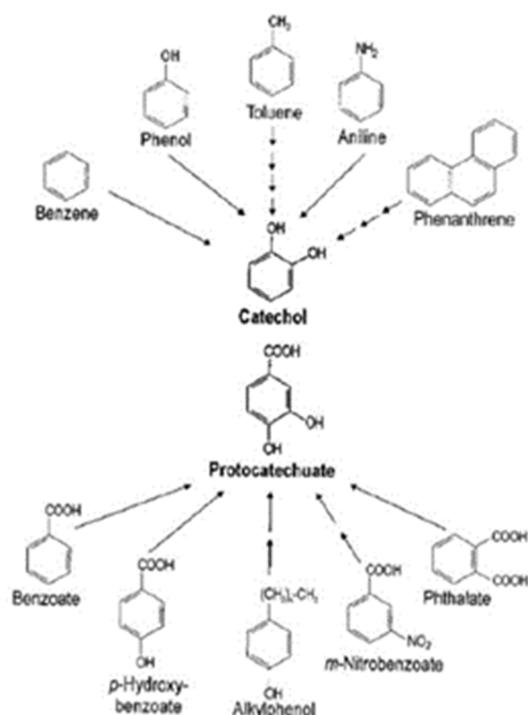


Figura 1. 21. Vie cataboliche che portano alla formazione di catecoli e protocatecuati (Xue et al., 2015)

1.6.3 La famiglia AlkB delle alcano-idrossilasi

Il gene *alkB* codifica la monossigenasi responsabile della prima reazione di degradazione aerobica degli idrocarburi ed è presente in numerose specie batteriche degradatrici di n-alcani. La via di degradazione degli alcani meglio caratterizzata è quella codificata dal plasmide OCT di *P. putida* GPO1, chiamato *alkBFGHJKL* che codifica per gli enzimi necessari per convertire gli alcani in acetyl-CoA (Figura 1.22). Il sistema alcano idrossilasi di *P. putida* GPO1, che è codificato dal cluster *alk*, è composto da tre polipeptidi: un alcano idrossilasi (*AlkB*), una rubredossina (*AlkG*) e una rubredossina reduttasi (*AlkT*).

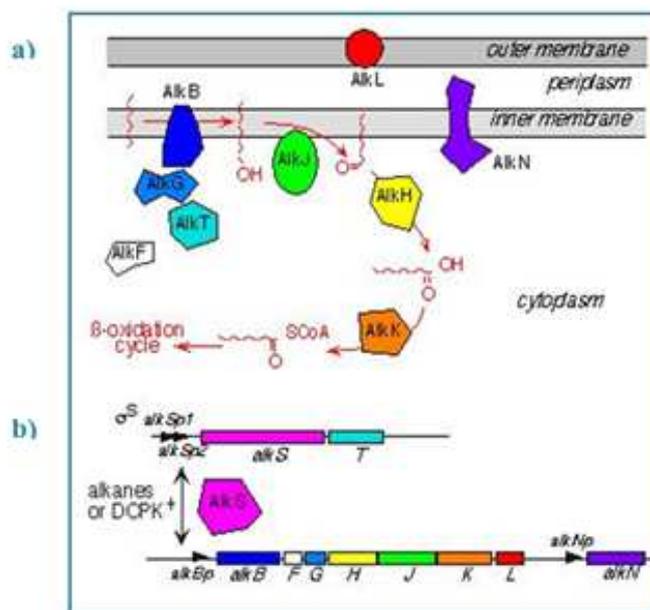


Figura 1. 22. Degradazione di n-alcani in *P. putida* Gp01. a) Pathway metabolico della degradazione degli alcani, ruolo e localizzazione delle proteine Alk. b) organizzazione e regolazione dell'operone *alkBFGHJKL* (van Beilen et al., 2001)

Ad oggi sono noti più di 60 omologhi *AlkB*; sono stati trovati in microrganismi sia Gram-positivi che Gram-negativi e mostrano un'elevata diversità di sequenza (Marín et al., 2001; Smits et al., 2002, 2003; van Beilen et al., 2002; Kuhn et al., 2009). Un sistema *AlkB* in grado di degradare n-alcani lunghi fino a 36C è stato caratterizzato per la prima volta in un ceppo di *Gordonia* isolato sulle coste siciliane (Lo Piccolo et al., 2011).

1.6.4 I batteri idrocarburo degradanti nei suoli

Negli ultimi anni numerose ricerche hanno approfondito il tema della microbiologia della biodegradazione degli idrocarburi e hanno permesso di identificare un numero sempre crescente di microrganismi, provenienti da ecosistemi sia terrestri che acquatici, in grado di degradare gli idrocarburi (Boonchan et al., 2000; Hendrickx et al., 2006; Varjani e Upasani, 2013; Wilkes et al., 2016). L'efficienza di biodegradazione varia dal 6% all'82% per i funghi, dallo 0,13% al 70% per i batteri del suolo (Quatrini et al., 2008) e dallo 0,003% al 100% per i batteri marini (Das e Chandran, 2011).

I batteri rappresentano i degradatori primari e gli agenti più attivi nella biodegradazione. Essi sono infatti in grado di degradare un'ampia gamma di substrati idrocarburi attraverso percorsi aerobici e anaerobici. La maggiore velocità di degradazione della maggior parte degli inquinanti organici avviene in condizioni aerobiche, grazie al vantaggio metabolico di avere la disponibilità di O₂ come accettore di elettroni (Riser-Roberts, 1998). Sono noti microrganismi che degradano composti alifatici, monoaromatici o poliaromatici ed anche resine. La Tabella 1.6 riporta un elenco di diversi generi di batteri degradatori di idrocarburi con i rispettivi substrati degradati. Le vie cataboliche che portano alla degradazione dei diversi composti idrocarburi coinvolgono ognuna enzimi diversi specializzati nella degradazione di substrati specifici.

Tabella 1. 6. Microrganismi degradatori di idrocarburi e substrati corrispondenti (Varjani, 2017)

Idrocarburi del petrolio	Microrganismo	Riferimento bibliografico	
Alifatici	<i>Acinetobacter</i> sp.	Mittal and Singh (2009) and Foght (2008)	
	<i>Alcanivorax</i> sp.	Harayama et al. (2004) and Brooijmans et al. (2009)	
	<i>Azoarcus</i> sp.	Widdel and Rabus (2001)	
	<i>Bacillus</i> sp.	Ghazali et al. (2004) and Das and Mukherjee (2007)	
	<i>Brevibacterium</i>	Leahy and Colwell (1990)	
	<i>Desulfosarcina</i> sp.	Jaekel et al. (2013)	
	<i>Desulfococcus</i> sp.	Jaekel et al. (2013)	
	<i>Gordonia</i> sp.	Quatrini et al. (2008)	
	<i>Marinobacter</i> sp.	Yakimov et al. (2007)	
	<i>Micrococcus</i> sp.	Roy et al. (2002) and Ghazali et al. (2004)	
	<i>Ochrobactrum</i> sp.	Varjani et al. (2015)	
	<i>Oleispira</i> sp.	Harayama et al. (2004) and Brooijmans et al. (2009)	
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Mittal and Singh (2009), Rocha et al. (2011), Sajna et al. (2015), Varjani et al. (2015) and Varjani and Upasani (2016c)	
		<i>Rhodococcus</i> sp.	Abbasian et al. (2015)
		<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Varjani et al. (2015)
Monoaromatici	<i>Thalassolituus</i> sp.	Brooijmans et al. (2009)	
	<i>Acinetobacter</i> sp.	Batista et al. (2006)	
	<i>Bacillus</i> sp.	Janbandhu and Fulekar (2011)	
	<i>Halomonas</i> sp.	Widdel and Rabus (2001)	
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Mittal and Singh (2009) and Meckenstock et al. (2016)	
Poliaromatici	<i>Rhodococcus</i> sp.	Leahy and Colwell (1990) and Salleh et al. (2003)	
	<i>Sphingobacterium</i> sp.	Janbandhu and Fulekar (2011)	
	<i>Achromobacter</i> sp.	Janbandhu and Fulekar (2011)	
	<i>Bacillus</i> sp.	Mittal and Singh (2009)	
	<i>Cycloclasticus</i> sp.	Harayama et al. (2004)	
Resine	<i>Pseudomonas</i> sp.	Widdel and Rabus (2001) and Meckenstock et al. (2016)	
	<i>Vibrio</i> sp.	Widdel and Rabus (2001)	
	Member of family Vibrionaceae,	Leahy and Colwell (1990)	
	Enterobacteriaceae <i>Moraxella</i> sp.	Chandra et al. (2013)	

Il maggior numero di microrganismi appartiene al phylum dei Proteobacteria, (classi Alpha-, Beta-, Gamma-Proteobacteria) e all'ordine degli Actinomycetales (Gram-positivi ad alto contenuto in G + C) (van Beilen et al., 2003; Quatrini et al., 2008).

1.7 Tecniche di bioremediation di suoli contaminati da idrocarburi

Le tecnologie di bioremediation sono essenzialmente di tre tipi: biostimulation, bioaugmentation e phytoremediation.

Le tecniche di biostimulation mirano a regolare e favorire la crescita delle popolazioni microbiche già presenti nella matrice contaminata (batteri autoctoni) a spese delle sostanze da degradare (Seklemova et al., 2001). L'attività batterica viene stimolata tramite l'ottimizzazione dei parametri ambientali limitanti, quali aerazione, aggiunta di nutrienti, controllo del pH e della temperatura (Elektorowicz, 1994; Piehler et al., 1999; Rhykerd et al., 1999; Margesin, et al., 2000; Adams et al., 2015). Numerosi studi di letteratura hanno evidenziato come la biostimulation possa essere considerata una tecnica di bonifica efficace per la rimozione degli idrocarburi petroliferi. Uno dei vantaggi della biostimulation è che il biorisanamento avviene ad opera dei microrganismi autoctoni, già presenti e ben distribuiti all'interno del suolo. Uno dei punti chiave è la modalità di immissione degli additivi, che deve consentire la loro pronta disponibilità per i microrganismi e che dipende fortemente dalla geologia del sottosuolo. Infatti, la presenza di suoli poco permeabili come argilla e limi può ostacolare la diffusione degli additivi in maniera uniforme in tutta l'area interessata. Inoltre, la presenza di fratture nel suolo può costituire delle vie preferenziali per gli additivi. Infine, l'aggiunta di nutrienti potrebbe promuovere anche lo sviluppo di microrganismi eterotrofi non degradatori innati di idrocarburi, creando così una competizione con i batteri idrocarburo-degradatori (Adams et al., 2014).

Le tecniche di bioaugmentation prevedono la preparazione, in adatti sistemi fermentativi, di inoculi costituiti da microrganismi con specifiche capacità degradative. Questi microrganismi possono essere batteri selezionati dalla matrice da bonificare (inoculo autoctono) o altri batteri con specifiche caratteristiche degradative (inoculi alloctoni) (Richard and Vogel, 1999; Barathi and Vasudevam, 2001). La logica di questo approccio, che si è sviluppato a partire dagli anni '70 dello scorso secolo, è che in alcuni casi le popolazioni autoctone potrebbero essere presenti in quantità ridotta o non essere in grado di degradare l'ampia gamma di idrocarburi presenti in miscele complesse come, ad esempio, il petrolio o ancora potrebbero trovarsi in una condizione di stress a seguito della recente contaminazione (Leahy e Colwell, 1990). In questi casi, l'inoculo batterico potrebbe ridurre il periodo di lag prima dell'inizio della biodegradazione (Adams et al., 2015). Nella scelta dei microrganismi da inoculare è necessario valutare tutti i fattori che possono influenzare la loro crescita. Infatti, affinché questo approccio abbia successo in campo, i microrganismi inoculati devono essere in grado di degradare la maggior parte dei componenti del petrolio, di adattarsi velocemente alle nuove condizioni ambientali e di competere efficacemente con le popolazioni batteriche indigene

(Atlas, 1977; Goldstein et al., 1985). L'inoculo può essere costituito da un singolo ceppo batterico o da consorzi batterici. Infatti, le diverse specie microbiche hanno differenti capacità e preferenze per la degradazione degli idrocarburi. Alcuni microrganismi degradano gli alcani lineari, ramificati o ciclici, altri preferiscono gli aromatici mono o polinucleari e altri degradano congiuntamente sia gli alcani che gli aromatici.

Infine, le tecniche di phytoremediation sfruttano le piante per il trattamento dei suoli contaminati da idrocarburi.

Come già anticipato nel paragrafo precedente, i trattamenti biologici per la matrice solida insatura sono diversi:

- landfarming (LF);
- compostaggio;
- bioventing (BV);
- bioreattori;
- phytoremediation.

1.7.1 Landfarming

Il landfarming (Figura 1.23) è un processo di biorisanamento che ha lo scopo di incentivare i processi metabolici aerobici attuati dalla microflora batterica, garantendo un'opportuna esposizione del terreno all'ossigeno atmosferico e cercando di ottimizzare le condizioni operative in termini di apporto di nutrienti, temperatura e umidità (Philp e Atlas, 2005; Paudyn et al., 2008; Volpe et al., 2012; Silva-Castro et al., 2015). Negli ultimi anni sono stati promossi diversi studi finalizzati ad aumentare l'efficacia del landfarming mediante l'inoculo di colonie batteriche specializzate (bioaugmentation) o l'aggiunta di fertilizzanti e tensioattivi al fine di ottenere una degradazione più efficiente (Jeong et al., 2015).

Il landfarming è un trattamento che viene solitamente applicato ex situ on site, ma non mancano applicazioni in situ nel caso di contaminazione del suolo superficiale (Sims et al, 1999; Spada et al., 2017).

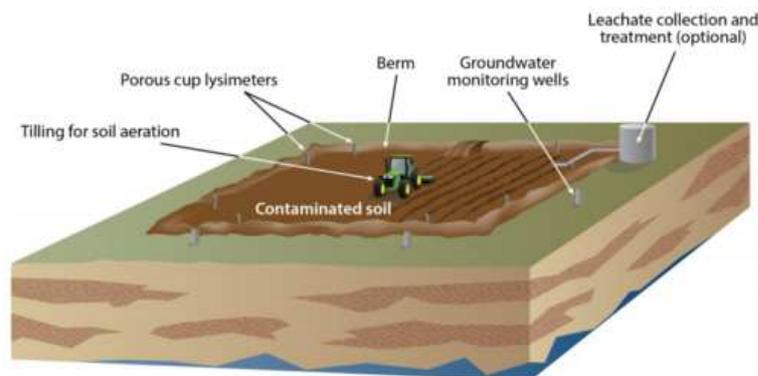


Figura 1. 23. Schema di un intervento di landfarming (Nikolopoulou et al., 2016)

Nel caso di applicazione ex situ, dopo un pretrattamento mirato al miglioramento delle sue caratteristiche (omogeneizzazione, aggiunta di nutrienti, inoculi batterici, etc), un sottile strato di terreno (20-60 cm) viene steso all'interno di un bacino al di sopra di un letto drenante di sabbia e ghiaia (60-120 cm) che ha lo scopo di permettere la penetrazione naturale dell'aria. Il fondo del bacino deve essere impermeabilizzato per evitare la percolazione dei contaminanti nel sottosuolo; il percolato prodotto viene raccolto e ricircolato per garantire il giusto grado di umidità. Nel caso di applicazione in situ, il suolo superficiale viene periodicamente rivoltato al fine di favorirne l'ossigenazione e stimolare l'attività microbica aerobica. Inoltre, durante il trattamento può essere prevista l'immissione di acqua additivata con nutrienti.

Il LF trova la maggiore applicazione nel risanamento di terreni contaminati da idrocarburi petroliferi a basso peso molecolare, facilmente o moderatamente biodegradabili (anche se quelli troppo leggeri tendono a volatilizzare piuttosto che essere biodegradati) (Wang et al., 2016). Con riferimento alle caratteristiche granulometriche del suolo contaminato, il landfarming risulta idoneo soprattutto per suoli omogenei dotati di buona permeabilità, prevalentemente sabbiosi o anche sabbioso-argillosi, con basso contenuto di sostanze tendenti all'adsorbimento.

I vantaggi del LF sono la sua economicità e la durata contenuta (dipendente dal tipo di contaminazione, dalle concentrazioni in gioco e dalle condizioni ambientali, ma comunque dell'ordine dei 6-18 mesi); per contro, il LF presenta gli svantaggi di una forte dipendenza dell'efficienza del trattamento dalle condizioni ambientali e di richiedere ampie superfici (Cookson, 1995).

Uno studio condotto da Brown et al. (2017) sull'applicazione del LF con aggiunta di nutrienti per la bonifica di un suolo contaminato da idrocarburi petroliferi ha mostrato un tasso di rimozione pari al 53% in sole 6 settimane di trattamento. In uno studio simile, Guarino et al. (2017) hanno confrontato tre diverse configurazioni di trattamento per un suolo contaminato da idrocarburi petroliferi: natural attenuation,

landfarming e landfarming accoppiato a bioaugmentation. I risultati ottenuti hanno evidenziato che il LF ha permesso di raggiungere efficienze di rimozione superiori rispetto all'attenuazione naturale (rispettivamente 70% e 57%) e che l'accoppiamento della bioaugmentation al LF ha incrementato l'efficienza fino all'86%.

In generale, il LF ha avuto successo soprattutto in regioni caratterizzate da climi temperati (McCarthy et al., 2004), ma la letteratura è ricca di esperienze per la sua applicazione anche in regioni caratterizzate da climi più rigidi (Paudyn et al., 2008; Jeong et al., 2015; Camenzuli and Freidman, 2015).

1.7.2 Compostaggio

Il principio di un processo di compostaggio è analogo a quello del LF e consiste nel garantire le condizioni operative opportune per l'attività di biodegradazione da parte dei microrganismi aerobici (Cai et al., 2017; Ren et al., 2018; Saum et al., 2018). In questo caso, il pretrattamento del terreno deve prevedere, oltre a quanto previsto per il LF, anche la miscelazione con agenti strutturanti (segatura, trucioli di legno, paglia, ecc.) al fine di incrementare la porosità e agevolare l'uniforme distribuzione degli additivi e il trasferimento dell'ossigeno. Il processo di compostaggio è applicabile a terreni omogenei e porosi, con un limitato contenuto di argilla; esso richiede tempi di trattamento dell'ordine dei mesi, ma comunque mediamente inferiori rispetto al landfarming. Tale tecnica è generalmente presente in due varianti impiantistiche: a cumuli rivoltati (Figura 1.24) e a cumuli statici (biopile) (Figura 1.25).

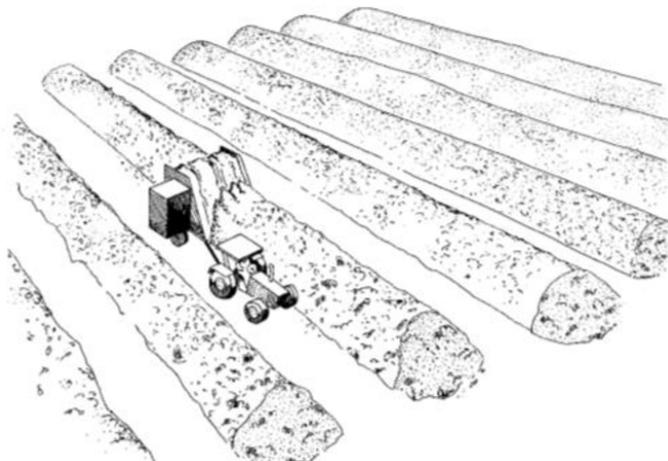


Figura 1. 24. Compostaggio in cumuli rivoltati (Tamas and Kovacs, 2008)

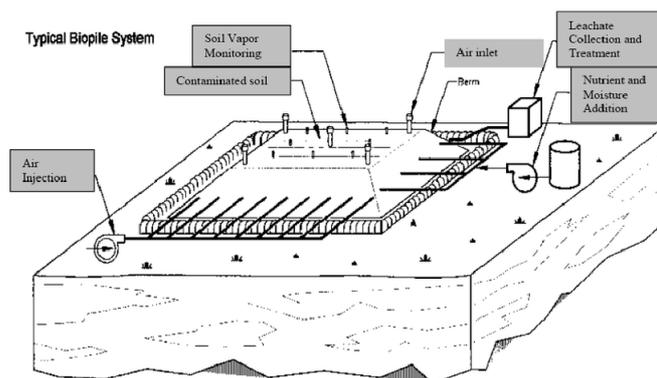


Figura 1. 25. Compostaggio in biopila (Tamas and Kovacs, 2008)

Nel primo caso, il terreno è disposto in cumuli (aventi altezza massima pari a 2 m) disposti su una superficie impermeabile, in cui l'aerazione è ottenuta mediante periodici rivoltamenti del terreno contaminato effettuati adoperando normali pale o idonee macchine scavallatrici. Sebbene questa tecnica sia molto interessante dal punto di vista economico e permetta di raggiungere buone efficienze di rimozione per contaminanti idrocarburi (Al-Daher e Al-Awadhi, 1998), essa presenta lo svantaggio di richiedere ampi spazi e del rischio di rilascio di VOC durante le lavorazioni periodiche (Azubuike et al., 2016). Per quest'ultimo motivo, i cumuli devono essere realizzati all'interno di strutture chiuse dotate di trattamento dell'aria. Nel secondo caso, la biopila viene realizzata su un fondo impermeabile dotato di sistema di raccolta del percolato, alternando strati di suolo (30 cm) con agenti strutturanti e nutrienti, fino a raggiungere un'altezza che può arrivare a 3-5 m. L'aerazione, forzata o naturale, è garantita introducendo dei tubi forati nel cumulo ad uno o più livelli. In particolare, il secondo livello di aerazione è necessario quando l'altezza della biopila supera 3 m, per cui la soluzione più usuale è quella di realizzare biopile entro tale altezza. Per accelerare il processo si prevede l'adozione di coperture dotate di tubi di estrazione dei vapori e di un sistema di regolazione per il dosaggio di acqua e nutrienti.

Le biopile risultano essere efficienti nei confronti della maggior parte dei prodotti petroliferi, IPA, BTEX e pesticidi. Numerosi studi riportano tassi di degradazione di idrocarburi superiori al 70% utilizzando questa configurazione di trattamento (Gomez e Sartaj, 2014; Whelan et al., 2015; Dias et al., 2015). Risultati sperimentali hanno dimostrato che questo processo permette di ottenere ottimi rendimenti di risanamento (90-95%) per suoli contaminati da IPA (Lehr et al., 2004). Inoltre, le biopile consentono un ottimo controllo della temperatura di processo e per questo motivo hanno avuto molto successo anche in territori caratterizzati da climi piuttosto rigidi (Aislable et al., 2006; Chemlal et al., 2012).

1.7.3 Bioventing

Il bioventing è un intervento di estrazione-trattamento in-situ per la rimozione dei contaminanti biodegradabili nella zona insatura (Camenzuli and Freidman, 2015; Iturbe and López, 2015; Trulli et al., 2016). Il principio generale del trattamento è quello di incentivare i processi metabolici aerobici attuati dalla microflora batterica autoctona, mediante l'immissione di ossigeno nel sottosuolo. Ciò avviene attraverso la realizzazione di opportuni pozzi di immissione ai quali può essere accoppiato un sistema di irrigazione di acqua additivata con nutrienti (Figura 1.26).

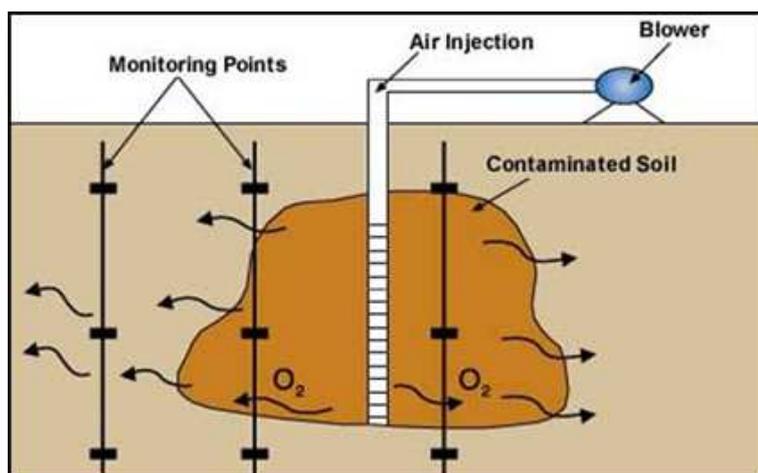


Figura 1. 26. Schema di un intervento di Bioventing

Il bioventing ha il vantaggio di essere economicamente vantaggioso rispetto ai trattamenti alternativi della zona insatura e di eliminare i rischi legati alla movimentazione del contaminante in fase di escavazione. Tuttavia, questa tecnica richiede terreni dotati di buona permeabilità al gas e può causare lo strappaggio dei contaminanti maggiormente volatili. Quest'ultimo effetto indesiderato può essere contenuto riducendo le portate di immissione, in modo di evitare che la volatilizzazione prevalga sull'effetto biologico.

Numerosi studi di campo e di laboratorio hanno evidenziato che il BV è una tecnica molto efficiente soprattutto nella rimozione di idrocarburi con $C > 12$ (oli minerali leggeri e pesanti, gasolio) (Österreicher-Cunha et al., 2004; García Frutos et al., 2010; Amin et al., 2014; Hohener e Ponsin, 2014). In particolare, Thomé et al. (2014) applicando un trattamento di BV su un suolo contaminato da idrocarburi hanno ottenuto efficienze di rimozione pari all'85% dopo un periodo di 60 giorni.

1.7.4 Bioreattori

I Bioreattori sono trattamenti ex situ che prevedono l'escavazione del terreno contaminato e il loro trattamento all'interno di reattori chiusi (Figura 1.27). In funzione del contenuto d'acqua in peso è possibile fare distinzione tra reattori in fase semisolida o bioslurry (contenuto d'acqua in peso 40-90%) e reattori in fase solida (contenuto d'acqua 10-20% in peso).

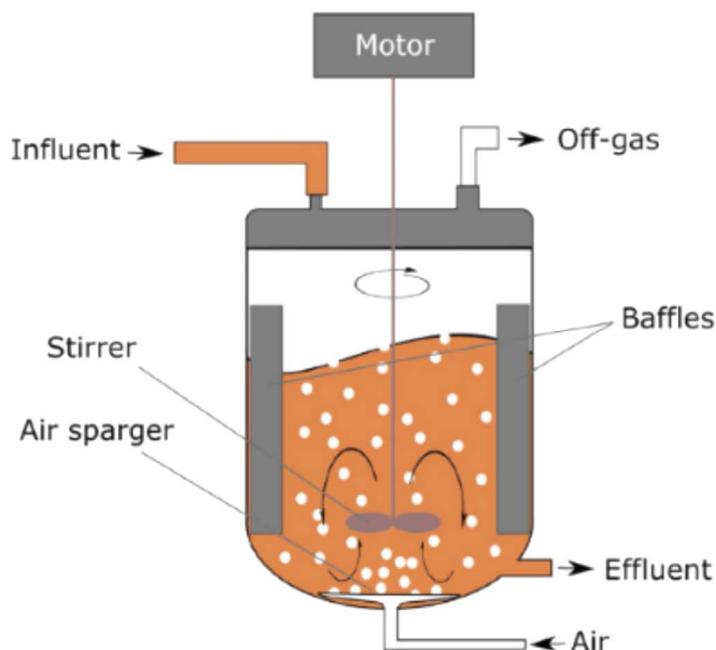


Figura 1. 27. Schema di un reattore bioslurry (Pino-Herera et al., 2017)

I bioreattori trovano applicazione a scala reale nella degradazione di composti recalcitranti difficilmente eliminabili con gli altri processi biologici (Mohan et al., 2007). Il principale vantaggio di questi trattamenti è, infatti, quello di poter controllare e regolare i parametri operativi come pH, temperatura e ossigeno in modo da ottimizzare il processo (Gan et al., 2009). I reattori offrono inoltre la possibilità di favorire il processo di biorisanamento mediante dosaggio di nutrienti (Beolchini et al., 2010) o inoculo di biomassa specializzata (Li et al., 2008; Kuppusamy et al., 2016). Una delle limitazioni nell'adozione di tale tecnologia consiste nell'escavazione e successivo pretrattamento del suolo contaminato.

I bioreattori sono stati ampiamente utilizzati per il trattamento di suoli contaminati da idrocarburi e IPA, con rendimenti di rimozione in genere non inferiori al 60% e a

volte anche superiori al 90% (Johnsen et al., 2005; Firmino et al., 2015; Chikere et al., 2016). Tuhuloula et al. (2014) hanno condotto uno studio sul biorisanamento di un terreno contaminato da idrocarburi petroliferi attraverso l'utilizzo di un reattore a sospensione bioslurry e l'uso congiunto di consorzi microbici di *Bacillus cereus* e *Pseudomonas putida*, ottenendo una efficienza di rimozione del naftalene compresa tra il 79,35 e il 99,73%, dopo 49 giorni di trattamento.

1.7.5 Phytoremediation

La phytoremediation è una tecnologia di bonifica che fa uso della vegetazione per il trattamento di suoli contaminati, sfruttando i processi naturali delle piante (Merkl et al., 2005; Peng et al., 2009; Ossai et al., 2014; Brzeszcz et al., 2016; Seckin, 2016). Tale tecnologia è adoperabile sia in interventi ex-situ che in interventi in-situ, specialmente in quei siti nei quali la contaminazione interessa il suolo superficiale. I processi riconducibili all'intervento di phytoremediation sono molteplici (Figura 1.28) e hanno l'obiettivo di convertire i contaminanti in sostanze meno tossiche e meno persistenti (Kösesakal et al., 2015; Gouda et al., 2016; Cristaldi et al., 2017; Hussain et al., 2018;).

In particolare, nel caso di inquinanti organici la phytoremediation può avvenire mediante quattro processi anche concomitanti (Germida et al., 2002; Lim et al., 2016):

- phytostabilization;
- phytodegradation;
- phytovolatilization;
- phytostimulation.

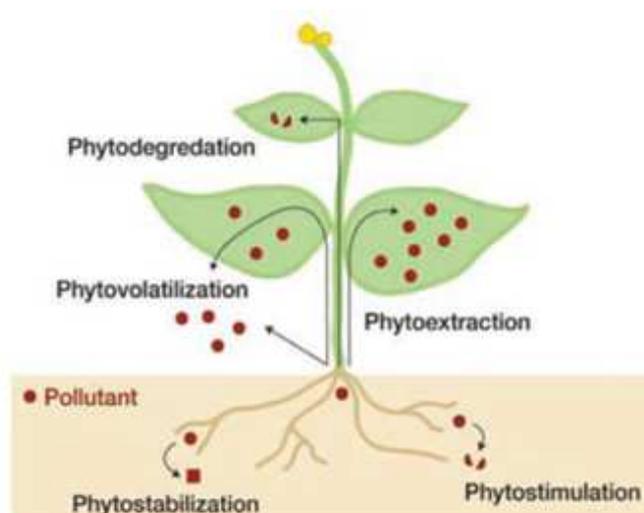


Figura 1. 28. Meccanismi di azione sui contaminanti nei trattamenti di fitorimediazione (Maffucci et al., 2013)

La phytostabilization consiste nella immobilizzazione dei contaminanti nel suolo, evitandone la diffusione mediante il controllo di processi erosivi, di evaporazione e di percolazione. Inoltre, la presenza della vegetazione riduce anche la dispersione per via eolica delle sostanze inquinanti (Pilon-Smits, 2005; Singh, 2012; Lim et al., 2016, Razzaq, 2017). Essa richiede estesi apparati radicali, poiché l'assorbimento e l'accumulo degli idrocarburi si verifica all'interno della zona radicolare, della membrana radicale e delle cellule radicali (Germida et al., 2002).

La phytodegradation può avvenire tramite l'assorbimento del contaminante e il successivo accumulo di metaboliti non tossici nei tessuti vegetali o per rilascio nella rizosfera di enzimi che degradano i composti organici. In alcuni casi, gli inquinanti vengono degradati fino a molecole semplici che vengono utilizzate dalle piante per la loro crescita e la generazione di nuovi tessuti.

La phytovolatilization consiste nell'assorbimento del contaminante da parte della pianta, che ne immette poi in atmosfera i prodotti di trasformazione/degradazione mediante traspirazione. L'assorbimento avviene nelle radici del vegetale e i composti vengono degradati e veicolati verso le foglie, da dove volatilizzano.

La phytostimulation o rhizoremediation, che verrà meglio discussa nel paragrafo successivo, consiste nel rilascio da parte della pianta di fattori che incentivano l'attività dei batteri presenti nel suolo contaminato e responsabili della degradazione del contaminante.

1.7.6 La rizoremediation

Un aspetto fondamentale della tecnologia di phytoremediation è lo sfruttamento della popolazione microbica associata all'apparato radicale delle piante (rizosfera) (Brzeszcz et al., 2016; Seckin, 2016) (Figura 1.29).

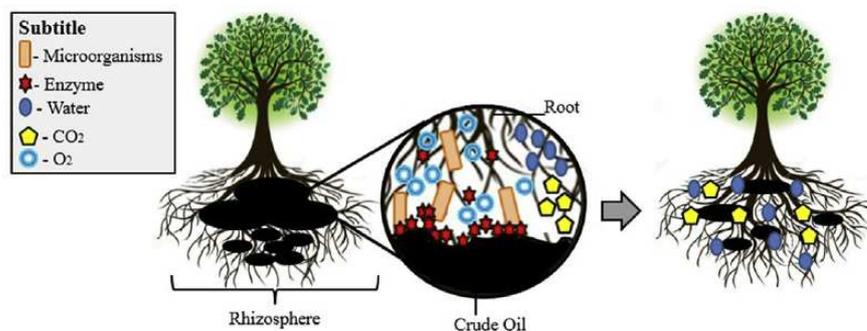


Figura 1. 29. Processo di rizodegradazione in suoli contaminati da idrocarburi (Santos and Maranhão, 2018)

La rizoremediation rappresenta una buona tecnica per la bonifica dei suoli contaminati, in cui le piante agiscono indirettamente creando condizioni favorevoli per la crescita delle popolazioni batteriche nella regione della rizosfera (Alaribe and Agamuthu, 2015; Hanks et al., 2015).

È dimostrato che nella zona di terreno strettamente associata alla radice, la rizosfera, si ha un numero di microrganismi metabolicamente attivi superiore al terreno non vegetato. Le piante rilasciano nel suolo come essudato dalle radici un elevato numero di nutrienti. Ciò favorisce la proliferazione di gruppi specifici di microrganismi in grado di colonizzare in modo aggressivo la superficie radicolare e di influenzare la crescita delle piante (Kloepper et al., 1989). La concentrazione di batteri nelle immediate vicinanze delle radici può essere infatti anche cento volte maggior rispetto a quella del suolo tal quale.

Alcuni dei microrganismi della rizosfera possono agire direttamente sugli inquinanti organici degradandoli (Kuiper et al., 2004). In presenza di inquinanti idrocarburi, infatti, si ha una diminuzione della quantità di nutrienti nella rizosfera e i microrganismi iniziano a degradare il contaminante. Come risultato del metabolismo batterico, vengono rilasciati dalla cellula microbica composti organici meno tossici, acqua e anidride carbonica che diventano disponibili sia per la pianta che per gli altri microrganismi che iniziano a svilupparsi durante il biorisanamento (Wolicka et al., 2009) (Figura 1.30).

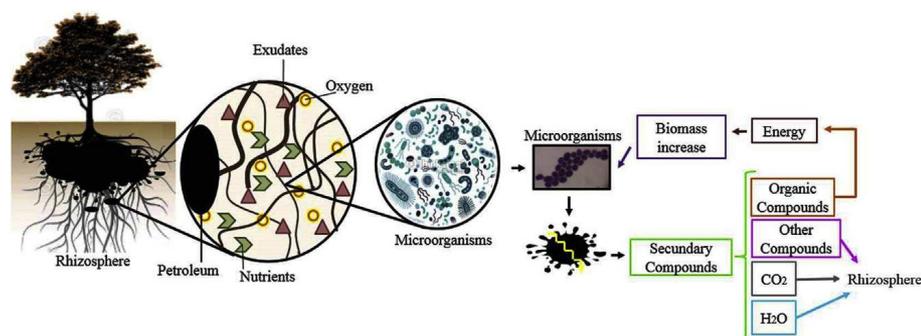


Figura 1. 30. Meccanismi di rizodegradazione in suoli contaminati da idrocarburi (Santos and Maranhó, 2018)

Inoltre, alcuni batteri del suolo possono influenzare positivamente le piante migliorandone la crescita e la salute (Glick, 1995), favorendo lo sviluppo delle radici (Gamalero et al., 2002, 2004) o aumentando la tolleranza delle piante agli stress ambientali (Glick, 2004).

1.7.6.1 Interazione pianta-microorganismi

La rizosfera costituisce un ecosistema complesso ed è definito come la stretta zona di suolo ricca di nutrienti che circonda le radici della pianta (1-5 mm) (Lim et al., 2016; Razavi et al., 2016). La rizosfera rappresenta un microambiente altamente dinamico dove l'interdipendenza tra microorganismi e piante si traduce in un'associazione simbiotica che crea un microbioma interattivo influenzato dalle radici delle piante e dalle loro attività che produce metaboliti primari e secondari (Newman et al., 2016). Questa varietà di metaboliti primari (acidi organici, carboidrati e amminoacidi) e secondari (alcaloidi, terpeni e composti fenolici) influisce con la microflora della rizosfera (Venturi e Keel, 2016). Per questo motivo, le comunità microbiche della rizosfera sono generalmente più attive e più abbondanti delle comunità microbiche nel suolo lontano dalle radici (Smalla et al., 2001).

La Figura 1.31 riporta le principali interazioni pianta-microorganismi che si verificano durante il processo di rizoremediation:

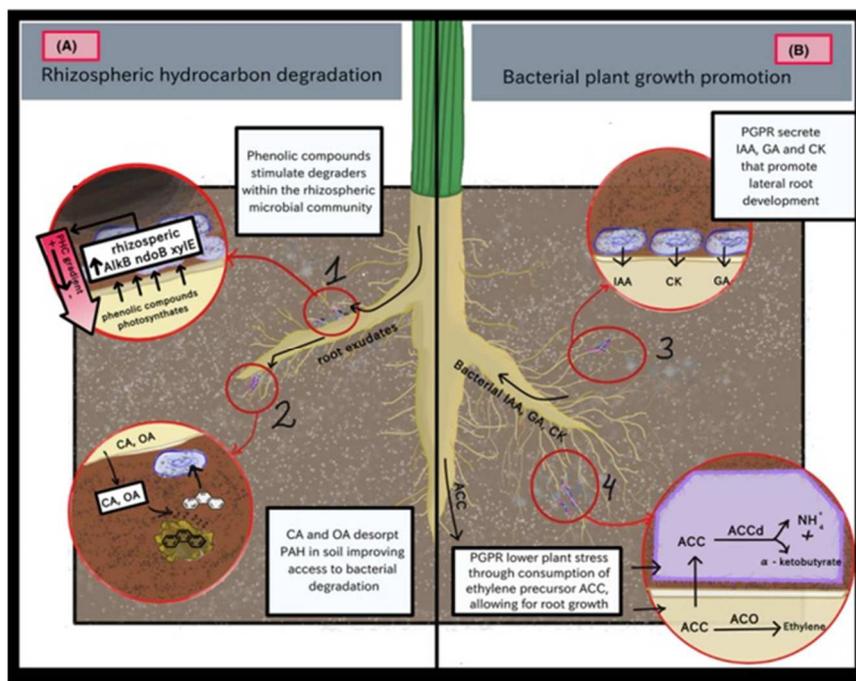


Figura 1. 31. Principali interazioni pianta-microrganismi che si verificano durante la rhizoremediation (Correa-García et al., 2018)

Da un lato (A), le radici delle piante tramite i propri essudati stimolano i batteri idrocarburo degradanti (1) e aiutano a desorbire i contaminanti adsorbiti alle particelle del suolo aumentandone la biodisponibilità (2). D'altro canto (B), i microorganismi della rizosfera promuovono la crescita delle piante attraverso, tra i vari meccanismi, la produzione di ormoni vegetali (3) e la degradazione dell'acido 1-aminociclopropano-1-carbossilico ACC (4).

Questi meccanismi rendono la rizosfera densamente abitata da diversi organismi, tra cui batteri, funghi, protozoi, che forniscono alla pianta le vitamine, gli aminoacidi e le citochinine necessarie per la sua crescita (Lim et al., 2016). La densità microbica e l'attività enzimatica sono elevate in prossimità delle radici e diminuiscono con l'aumentare della distanza, formando gradienti millimetrici distinti (Marschner et al., 2012). Inoltre, i metaboliti secondari delle piante che fanno parte degli essudati sono spesso strutturalmente molto simili ai contaminanti organici (Singer et al., 2003); ciò si traduce in una maggiore presenza e attività dei microbi in grado di degradare i contaminanti organici nella rizosfera, anche in assenza di contaminanti (Yergeau et al., 2014). Precedenti studi dimostrano che i microrganismi che si sviluppano in questi ambienti possono avere una buona tolleranza al contaminante in un incidente ambientale. Negli anni sono stati pubblicati numerosi studi sull'uso combinato di piante e batteri degradanti per la bonifica dei suoli contaminati da prodotti petroliferi

(Escalante-Espinosa et al., 2005; Alarcón et al., 2008; Lin et al., 2008) o idrocarburi aromatici (Daane et al., 2001; Barac et al., 2004; Glick, 2010).

1.7.6.2 I batteri PGPR (plant growth promoting rhizobacteria)

Uno dei fattori determinanti per la buona riuscita di un intervento di rizoremediation è lo sviluppo dell'apparato radicale delle piante. Come già anticipato, i batteri, oltre a degradare direttamente il contaminante, possono favorire la crescita delle piante aiutandole a tollerare lo stress dovuto alla contaminazione. Esistono diversi modi in cui i PGPR possono facilitare direttamente la crescita delle piante (Glick, 1995; Glick et al., 2007):

- fissare l'azoto atmosferico e renderlo disponibile per le piante;
- sintetizzare i siderofori, che sequestrano il ferro dal suolo e lo forniscono alle cellule vegetali;
- sintetizzare fitormoni che possono migliorare le fasi di crescita delle piante;
- solubilizzare minerali come il fosforo, rendendoli più prontamente disponibili per la crescita delle piante;
- sintetizzare l'enzima 1-amminociclopropan-1-carbossilato (ACC) deaminasi, che riduce i livelli di etilene nelle piante.

Molti batteri PGPR possiedono le capacità di attuare più di uno di questi meccanismi e possono quindi utilizzare meccanismi diversi in vari momenti durante il ciclo di vita della pianta.

I batteri PGPR possono avere effetto scarso o nullo sulla crescita delle piante quando esse sono coltivate in condizioni ottimali e prive di stress, ma possono giocare un ruolo fondamentale nel caso dei suoli contaminati. Numerosi autori hanno inoculato batteri PGPR nella rizosfera per favorire la crescita delle piante in condizioni di contaminazione da idrocarburi. In particolare, Liu et al. (2014) hanno dimostrato che inoculando ceppi di PGPR nella rizosfera è possibile ottenere sia un miglioramento della crescita delle piante che dell'efficienza di rimozione degli idrocarburi petroliferi. Allo stesso modo, inoculando un ceppo di *Acinetobacter* PGPR, Xun et al. (2015) hanno riscontrato un incremento dell'altezza dello stelo delle piante rispetto ai controlli oltre che un maggiore tasso di degradazione.

1.7.6.3 Simbiosi tra piante e microrganismi del suolo

La simbiosi tra piante e microrganismi della rizosfera permette il miglioramento degli aspetti nutrizionali di entrambi i partner. Le forme di simbiosi di maggiore interesse per la bonifica dei suoli contaminati da idrocarburi sono:

- la simbiosi tra apparato radicale e batteri (fissazione simbiotica dell'azoto);
- la simbiosi tra apparato radicale e funghi (formazione di micorrize).

L'azoto è presente nell'aria atmosferica con una concentrazione del 78%, ma per essere assorbito dalle piante deve trovarsi nel terreno sotto forma di ione ammonio o di nitrato. I batteri hanno un ruolo fondamentale nella trasformazione dell'azoto nelle forme assimilabili dalla pianta. Essi possono fissare l'azoto atmosferico in ammoniaca e successivamente in nitrato o degradare in ammoniaca le proteine e i composti organici derivanti da materiale in decomposizione (Figura 1.32).

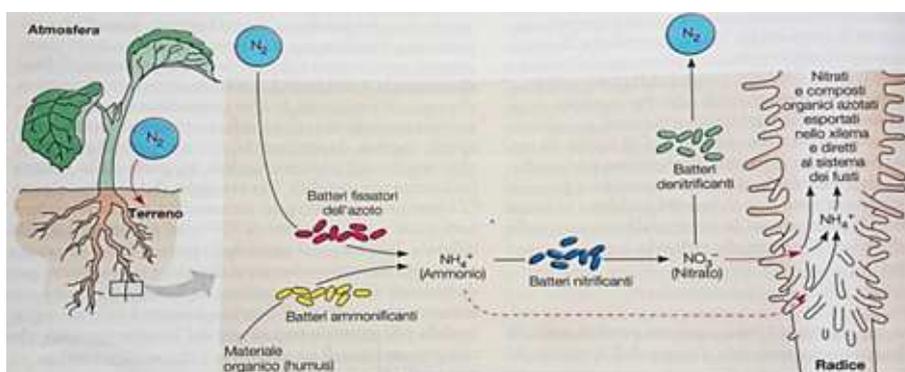


Figura 1. 32. La fissazione simbiotica dell'azoto ed il ciclo dell'azoto (Campbell and Reece, 2002)

Molte piante sono in grado di instaurare relazioni simbiotiche con batteri azotofissatori, che forniscono quindi una fonte endogena di azoto pronto per essere assimilato in composti organici, principalmente amminoacidi, che vengono poi trasportati in tutte le strutture della pianta. Per svolgere la fissazione dell'azoto, questi batteri hanno necessità di associarsi intimamente con la pianta, all'interno di noduli che si sviluppano a livello radicale. Al contempo, la pianta fornisce ai batteri carboidrati e altri composti organici. Tra le relazioni simbiotiche di questo tipo, quella tra piante leguminose-batteri rizobi (appartenenti ai generi *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*) è la più conosciuta (Figura 1.33)



Figura 1. 33. Sviluppo dei noduli a livello radicale (Pancaldi et al., 2019)

Il riconoscimento tra una specie di leguminosa e la specie compatibile di rhizobium avviene grazie all’attivazione di specifiche vie metaboliche che producono molecole-segnale per la comunicazione tra i due organismi (Figura 1.34).

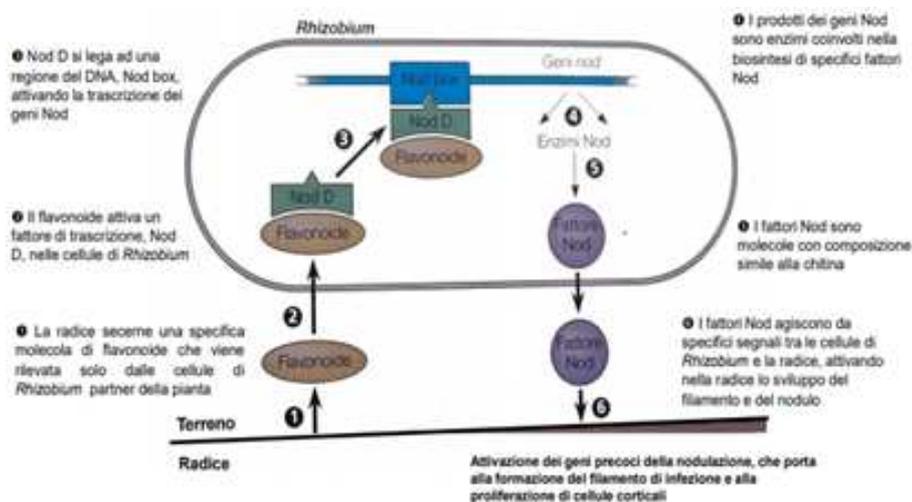


Figura 1. 34. Riconoscimento tra una specie di leguminosa e la relativa specie compatibile di Rhizobium (Campbell and Reece, 2002)

Le radici secernono una specifica molecola di flavonoide che viene rilevato dai rhizobium partner della pianta, dove attivano un fattore di trascrizione chiamato Nod D. Il Nod D si lega ad una regione del DNA (Nod box) attivando la trascrizione dei geni Nod, enzimi coinvolti nella biosintesi di specifici fattori Nod. I fattori Nod agiscono da specifici segnali tra rhizobium e radice e attivano lo sviluppo del nodulo, dove avviene la fissazione dell’azoto in forma ammoniacale e la produzione di

amminoacidi. Tale operazione richiede una grande quantità di energia, per questo motivo la pianta trasporta saccarosio dalle foglie ai noduli radicali (Figura 1.35). Oltre alle leguminose coltivate per alimentazione umana ed animale, anche le leguminose spontanee erbacee e legnose si avvantaggiano della simbiosi con i rizobi (e contribuiscono ad arricchire il suolo in azoto).

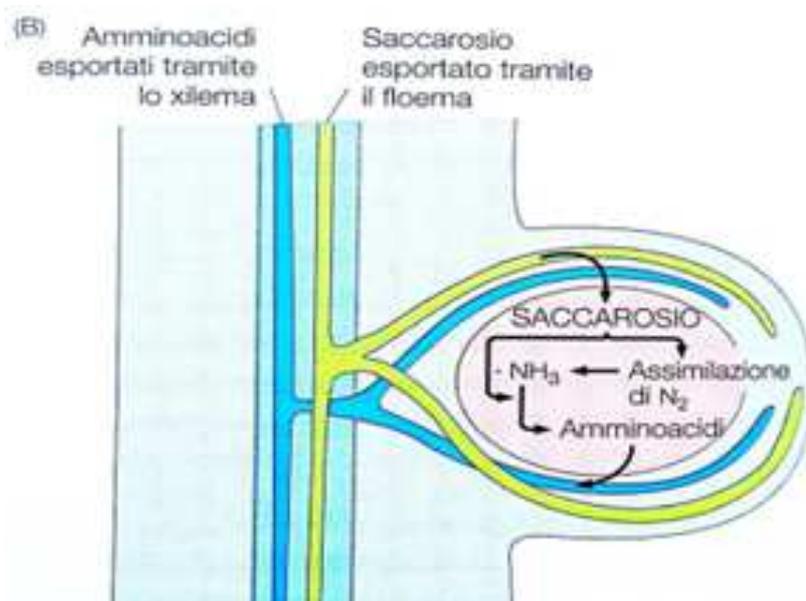


Figura 1. 35. Fissazione dell'azoto in forma ammoniacale e produzione di amminoacidi nel nodulo (Smith et al., 2008)

Le micorrize sono invece delle associazioni simbiotiche tra funghi presenti nel terreno e le radici delle piante. La pianta cede al fungo materie organiche (zuccheri, proteine, vitamine), ricevendo in cambio un incremento degli elementi nutritivi assorbiti.

I fosfati rappresentano uno dei macronutrienti che limitano maggiormente la crescita delle piante. In molti terreni, infatti, l'apporto di fosfato è limitato e l'assorbimento da parte della pianta crea una zona di impoverimento intorno alle radici delle piante. La rete ifale dovuta alle micorrize permette di accedere a un'area più ampia di suolo per l'assorbimento di fosfato e di altri nutrienti (Figura 1.36).

L'effetto della micorrizzazione si traduce essenzialmente in un consistente aumento della superficie e del volume radicale in percentuali molto superiori rispetto ad un apparato radicale non micorrizzato.

Studi di letteratura hanno dimostrato che i funghi micorrizici possono incrementare l'efficienza di interventi di rizoremediation migliorando la crescita e la nutrizione delle piante e fornendo protezione contro gli agenti patogeni (Tang et al., 2009; Xun

et al., 2015) anche su suoli fortemente antropizzati e degradati (Quatrini et al., 2003; Cardinale et al., 2010).

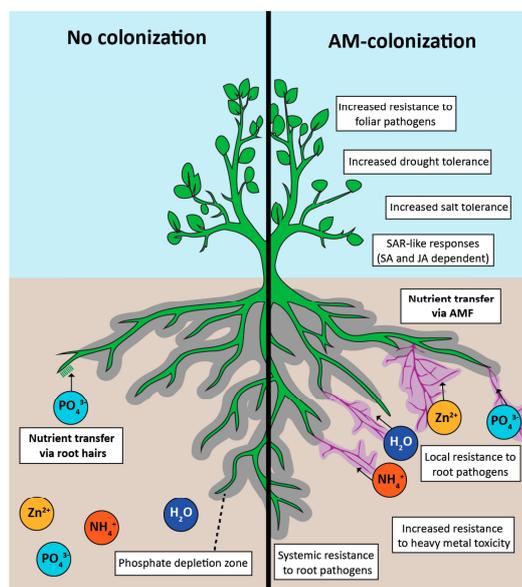


Figura 1. 36. Effetti positivi dei funghi micorrizici (Jacott et al., 2017)

1.7.7 La tecnologia *e-ibs-abr*®

ENI e Syndial S.p.A. (oggi Eni Rewind) hanno sviluppato in laboratorio e poi applicato in campo la tecnica di bonifica nota con il marchio registrato e-IBS-ABR (Integrated Bioremediation System with Autochthonous Bacteria and Rhizomicrobiota) (Figura 1.37).

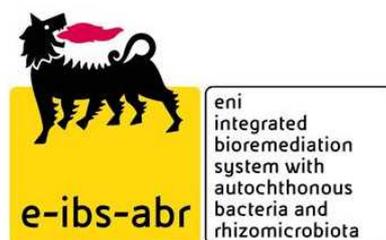


Figura 1. 37. Eni Integrated Bioremediation System with Autochthonous Bacteria and Rhizomicrobiota

Il processo e-IBS-ABR è stato messo a punto per la bonifica interamente biologica di siti contaminati da idrocarburi. Esso consiste nell'impiego combinato e integrato di diverse tecnologie di tipo biologico, che possono essere applicate in serie o in parallelo: landfarming, phytoremediation, bioventing, biostimulation, bioaugmentation, etc. Lo scopo di questo sistema è quello di ottenere un'attività enzimatica forte e diversificata in grado di attaccare le differenti molecole di idrocarburi.

Il sistema e-IBS-ABR può essere applicato in caso di contaminazione del suolo superficiale da idrocarburi, in presenza di una popolazione autoctona idrocarburo degradante e in assenza di condizioni inibitrici dell'attività batterica.

Al fine di valutarne l'applicabilità è necessario condurre una serie di analisi e test in laboratorio per valutare la risposta a diversi trattamenti e per selezionare la configurazione di trattamento più appropriata. Durante questa fase devono essere eseguiti test di biotrattabilità, chimico-fisici, microbiologici e di phytoremediation per progettare e validare il sistema di bonifica più adatto alle caratteristiche sito-specifiche del suolo da bonificare.

Sulla base dei risultati ottenuti in laboratorio è quindi necessario programmare una fase sperimentale in campo che permetta di valutare gli effetti del trattamento a scala reale. Tale fase, oltre a consentire una valutazione definitiva del trattamento, fornisce tutti gli elementi necessari per la messa a punto dell'intervento di bonifica full scale.

1.8 Applicabilità di tecniche di bioremediation ad un suolo contaminato da idrocarburi

Negli ultimi anni le tecniche di bioremediation hanno acquisito un ruolo centrale nella bonifica dei suoli contaminati da idrocarburi di origine petrolifera, grazie ai vantaggi che esse presentano rispetto alle tecniche convenzionali (Shekoohiyan et al., 2016; García-Sánchez et al., 2018) e alla possibilità di accelerare i processi di biodegradazione naturali attraverso l'ottimizzazione dei parametri limitanti (Vidali, 2001; Coulon et al., 2012). Tuttavia, per valutare se sia appropriato un trattamento biologico del suolo contaminato, è necessario studiare e comprendere tutti i fattori che potrebbero influire sull'efficacia del processo (Jiang et al., 2016).

In assenza di interventi antropici esterni, i processi biodegradativi possono richiedere tempi talmente lunghi da non avere pratiche ricadute ai fini del risanamento e del recupero dei comparti ambientali inquinati. Da qui la necessità di un approccio ingegneristico che permetta il controllo di tutti i fattori critici che influenzano la velocità di biodegradazione dei contaminanti, al fine di garantire prestazioni ed efficienze di rimozione dell'inquinante compatibili con gli standard normativi e cinetiche di processo assai più veloci.

La biodegradazione degli idrocarburi nel suolo può essere limitata da molti fattori (Figura 1.38), che possono essere raggruppati in tre categorie (Boopathy et al., 2000; Bundy et al., 2002; Atagana 2008, Al Sulaimani 2010; Al-Hawash et al, 2018):

- fattori chimico-fisici: temperatura, salinità, potenziale redox, pH, la presenza di particolari sostanze organiche capaci di assorbire i contaminanti riducendone la biodisponibilità;
- fattori nutrizionali: disponibilità di acqua, azoto, fosforo e micronutrienti (ferro, zinco, rame etc.) e presenza di accettori di elettroni (ossigeno, nitrati, solfati etc.);
- fattori tossicologici: fattori attribuibili ai contaminanti, come la composizione chimica, la concentrazione e la biodisponibilità.

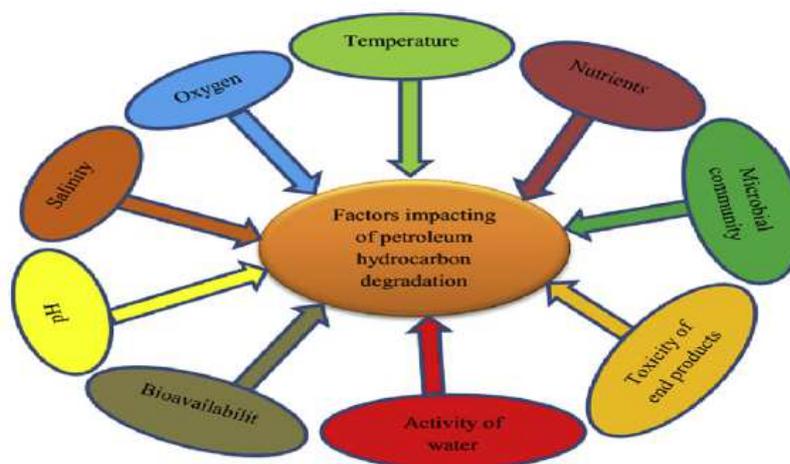


Figura 1. 38. Fattori che influenzano la biodegradazione degli idrocarburi (Al-Hawash et al., 2018)

Tutti i processi biologici sono strettamente dipendenti dalla temperatura. Questa ha una notevole influenza sia sull'attività metabolica che su alcuni dei fenomeni fisici in gioco, come il trasferimento di ossigeno e i fenomeni di adsorbimento e desorbimento. Venosa e Zhu (2003) hanno osservato che la temperatura dell'ambiente in cui si è verificato lo sversamento di prodotti petroliferi influenza sia le proprietà degli idrocarburi che l'attività dei microrganismi presenti nel suolo. Sebbene la biodegradazione degli idrocarburi possa verificarsi in un ampio intervallo di temperature, si osserva generalmente che i tassi di degradazione diminuiscono al diminuire della temperatura (Atlas e Bartha, 1972). I tassi di degradazione più elevati si verificano generalmente nell'intervallo tra 30 e 40 °C nel suolo, tra 20 e 30 °C in

alcuni ambienti di acqua dolce e tra 15 e 20°C negli ambienti marini (Bossert e Bartha, 1984; Cooney, 1984).

Il pH influenza l'attività dei microrganismi, in quanto la velocità di crescita di ciascuna specie batterica è favorita entro intervalli limitati del valore di pH del terreno. Verstraete et al. (1976) correggendo il pH di un suolo contaminato da benzina da 4,5 a 7,4 hanno ottenuto un raddoppio del tasso di rimozione. Inoltre, esso è tornato a diminuire in modo significativo quando il valore del pH è stato incrementato fino a 8,5. Il valore di pH ottimale per l'attività dei microrganismi è compreso tra 6 e 8 (Fan et al., 2014; Adams et al., 2015).

La presenza di acqua all'interno dei pori del terreno è condizione necessaria per l'attività metabolica dei microrganismi. Valori ottimali di umidità sono compresi tra il 50 e l'80% della capacità idrica di campo (massima quantità di acqua che un suolo può trattenere, una volta che sia stata eliminata l'acqua gravitazionale); tali valori da un lato garantiscono una adeguata dissoluzione del contaminante, mentre dall'altra permettono una sufficiente circolazione dell'aria che fornisce l'ossigeno necessario per la biodegradazione.

I nutrienti possono costituire fattori limitanti e influenzare i processi di biodegradazione. L'azoto e il fosforo sono i due nutrienti essenziali alla crescita dei microrganismi, mentre altri elementi, come calcio, sodio, potassio, rame, ferro, magnesio, manganese, zolfo e zinco, sono richiesti in quantità minima e in genere sono presenti in natura in concentrazioni più che sufficienti. Diversi studi hanno dimostrato che l'aggiunta di nutrienti durante il trattamento di suoli contaminati da idrocarburi ha determinato un incremento del tasso di degradazione (Rayner et al., 2007). Tuttavia, è stato dimostrato che anche alti livelli di nutrienti nel suolo possono inibire l'attività di biodegradazione (Carmichael e Pfaender, 1997; Chaillan et al., 2006). In particolare, molti autori hanno indicato che il rapporto C:N:P ottimale per promuovere la crescita microbica è pari a 100:10:1 (Beskoski et al., 2011; Zhao et al., 2011; Dias et al., 2012).

La biodegradazione dei composti organici richiede inoltre la presenza di un accettore di elettroni, tra cui il più comune è l'ossigeno molecolare. La rimozione dei contaminati per via aerobica assicura infatti la massima efficienza dei processi biodegradativi (Abbassian et al., 2015). Tuttavia, i microrganismi che si trovano in profondità nel suolo, o in altre zone in condizioni anaerobiche, utilizzano altri composti come accettori di elettroni, tra cui: solfati, nitrati, ferro, manganese o anidride carbonica (Heider et al., 1998; Weelink et al., 2009; Meckenstock et al., 2016; Wilkes et al., 2016). Malgrado questi accettori di elettroni siano spesso presenti nei siti contaminati, la degradazione anaerobica non ha ricevuto molta attenzione, a causa delle scarse efficienze di rimozione ottenibili (Fuchs et al., 2011). L'efficienza della biodegradazione dipende anche dalle caratteristiche del contaminante, come la sua complessità, la concentrazione e la biodisponibilità. Generalmente l'efficienza di degradazione degli idrocarburi decresce con l'aumentare del numero di atomi di carbonio: gli alcani a catena corta sono degradati

più facilmente, seguiti da alcani ramificati, aromatici, ciclici aromatici, asfalteni e composti pesanti (Xue et al., 2015). È stato inoltre osservato che elevate concentrazioni di idrocarburi possono avere un effetto tossico sui batteri, inibendo l'attività microbica (Admon et al., 2001). Viceversa, concentrazioni di idrocarburi estremamente basse possono limitare la biodegradazione poiché la disponibilità di carbonio in questi casi può costituire un fattore limitante la crescita batterica (Leahy e Colwell, 1990). Il termine biodisponibilità indica la tendenza di un contaminante organico ad essere assimilato dai batteri e rappresenta un fattore chiave per una efficiente biodegradazione degli inquinanti. La diminuzione della biodisponibilità nel corso del tempo può essere determinata da diversi fattori, come le reazioni di ossidazione chimica che incorporano i contaminanti nella sostanza organica naturale, la lenta diffusione nei pori molto piccoli o l'adsorbimento nella sostanza organica. È stato dimostrato che trattamenti che prevedono una rigorosa miscelazione del suolo o la disgregazione delle particelle più grandi, aumentano la biodisponibilità del contaminante, influenzando positivamente sui tassi di biodegradazione (Manning et al., 1995).

Per ottenere condizioni di biodegradazione ottimali, è quindi importante conoscere le caratteristiche del sito contaminato e soprattutto i fattori chiave come le caratteristiche e la concentrazione dei contaminanti e il potenziale di biodegradazione delle popolazioni microbiche (Bento et al., 2005). Inoltre, data la diversità degli effetti di additivi come fertilizzanti e inoculi, è necessario valutare i vari fattori che possono influenzare il processo di biorisanamento. Tutte queste informazioni possono essere ottenute mediante test di laboratorio noti come test di biotrattabilità, che devono essere eseguiti prima della progettazione di interventi a scala reale in situ o ex situ (Sabatè et al., 2004; Mariano et al., 2007). Infatti, non esiste una regola generale per scegliere il miglior trattamento per i siti contaminati. Ogni caso va analizzato singolarmente, valutandone le particolarità strettamente sitespecifiche (Duarte da Cunha e Leite, 2000).

Capitolo 2 – Studio del potenziale intrinseco di biorisanamento del suolo contaminato

2.1 Introduzione

La prima parte della sperimentazione è stata dedicata allo studio del potenziale di biorisanamento intrinseco del suolo iniziale. A tale scopo è stata identificata la comunità microbica del suolo contaminato tramite tecniche coltura dipendenti e indipendenti. In particolare, sono stati isolati e identificati i batteri idrocarburo degradanti dal suolo contaminato, mediante isolamento su idrocarburi come unica fonte di carbonio, amplificazione e sequenziamento dell'rDNA 16S. Inoltre, la composizione dell'intera comunità microbica è stata analizzata mediante estrazione del DNA metagenomico dal suolo e sequenziamento Illumina MISEq della regione V3-V4 del gene 16S rRNA. Infine, per valutare il potenziale di biodegradazione degli alcani, il DNA estratto dal suolo è stato usato come stampo per la reazione di amplificazione del gene *alkB*, che codifica per la monossigenasi di membrana responsabile della prima reazione di degradazione aerobica degli idrocarburi.

2.2 Materiali e metodi

2.2.1 Terreni di coltura

2.2.1.1 Bushnell Haas Broth

È un terreno minerale indicato per l'isolamento di batteri HC degradanti in quanto contiene tutti i nutrienti necessari per la crescita dei batteri tranne la fonte di carbonio, come fonte di carbonio vengono utilizzati idrocarburi (Tabella 2.1).

Tabella 2. 1. Composizione Terreno Bushnell Haas

Magnesium sulphate	0,20	g
Calcium chloride	0,20	g
Monopotassium phosphate	1	g
Dipotassium phosphate	1	g
Ammonium nitrate	1	g
Ferric chloride	0,50	g

Preparato in polvere

Preparazione:

Sospendere 3,27 gr in 1 litro di H₂O distillata.

Sterilizzare in autoclave a 121° a 1 atm per 20 minuti.

Per ottenere il terreno solido aggiungere Bacto Agar (15 g/l)

2.2.2 Soluzioni e Tamponi

2.2.2.1 TE

Tabella 2. 2. Composizione Tampone TE

Tris HCL (pH 8.0)	10	mM
EDTA (pH 8.0)	1	mM

2.2.2.2 TAE (50X)

Tabella 2. 3. Composizione Tampone TAE (50X)

Tris base	242	g
Acido Acetico glaciale	57	ml
EDTA 0,5 M (pH 8.0)	100	ml

2.2.2.3 Soluzione di Cristal-Violetto

1 g di cristal-violetto in 20 ml di etanolo al 96 %

80 ml di soluzione acquosa di ossalato di ammonio all'1%

2.2.2.4 Reattivo di Lugol

20 g KI in 100 ml di acqua distillata

10 g di Iodio cristallino

Diluizione 1:4 in acqua distillata

2.2.2.5 Soluzione di Safranina

10 g in 100 ml di alcool etilico assoluto

10 ml in 90 ml di acqua distillata

2.2.3 Caratteristiche del suolo utilizzato

I campioni di suolo sono stati prelevati da un sito oggetto, nell'autunno del 2018, di uno sversamento accidentale di gasolio che ha causato la contaminazione del suolo superficiale. La composizione granulometrica e le caratteristiche fisico-chimiche dei campioni di suolo utilizzati per i test di laboratorio sono riportate nelle Tabelle 2.4 e 2.5.

Tabella 2. 4. Composizione granulometrica del suolo in esame

Argilla	3,1 %
Limo fine	13,5 %
Limo grosso	31,6 %
Sabbia fine	46,9 %
Sabbia grossa	4,9 %

Tabella 2. 5. Caratteristiche fisico chimiche del suolo in esame

Umidità [%]	9,5
pH [-]	8,2
CIC [%]	26
TOC [mg/L]	2,6
C 10-40 [mg/kg]	8852
Arsenico [mg/kg]	17,9
Bario [mg/kg]	67,8
Cromo [mg/kg]	35,7
Nichel [mg/kg]	46,9
Piombo [mg/kg]	11,1
Rame [mg/kg]	27,0
Vanadio [mg/kg]	32,5
Zinco [mg/kg]	81,5
Manganese [mg/kg]	1030
Ferro [mg/kg]	68300
Alluminio [mg/kg]	33500
Titanio [mg/kg]	663
Boro [mg/kg]	65

2.2.4 Colture di arricchimento e isolamento di batteri idrocarburo-ossidanti

In collaborazione con il Laboratorio di Microbiologia Ambientale ed Ecologia Microbica del Dipartimento STEBICEF dell'Università degli Studi di Palermo, è stato valutato il potenziale di biodegradazione della comunità microbica autoctona del suolo. A tale scopo sono stati isolati dal suolo contaminato ceppi batterici capaci di crescere su n-alcani come unica fonte di carbonio mediante l'allestimento di colture di arricchimento. Le colture sono state preparate trasferendo 1gr di suolo in una beuta contenente 100 ml di terreno BH (Bushnell Haas) e 1 ml di diesel. La beuta è stata quindi posta in agitazione a 180 rpm per 10 giorni alla temperatura di 30°C. 1 ml del batch 1 è stato trasferito in una seconda beuta contenente 100 ml di terreno BH e 1 ml di diesel e incubato nelle stesse condizioni del batch 1 per altri 10 giorni. 1 ml del batch 2 è stato trasferito in una terza beuta contenente 100 ml di terreno BH, 0.25 ml di diesel, 0.25 ml di C₂₀, 0.25 ml di C₂₄ e 0.25 ml di C₂₈. Anche il terzo batch è stato incubato nelle stesse condizioni dei batch precedenti per dieci giorni. Dal batch 3 si è passati quindi all'isolamento dei batteri idrocarburo-ossidanti (Figura 2.1), trasferendo 100 µl del batch 3 delle colture di arricchimento su terreno minerale BH. La fonte di carbonio era costituita da diesel (100 µL) aggiunto su foglio di carta bibula, precedentemente sterilizzato, che è stato posto sul coperchio di ogni piastra, chiusa poi con parafilm.

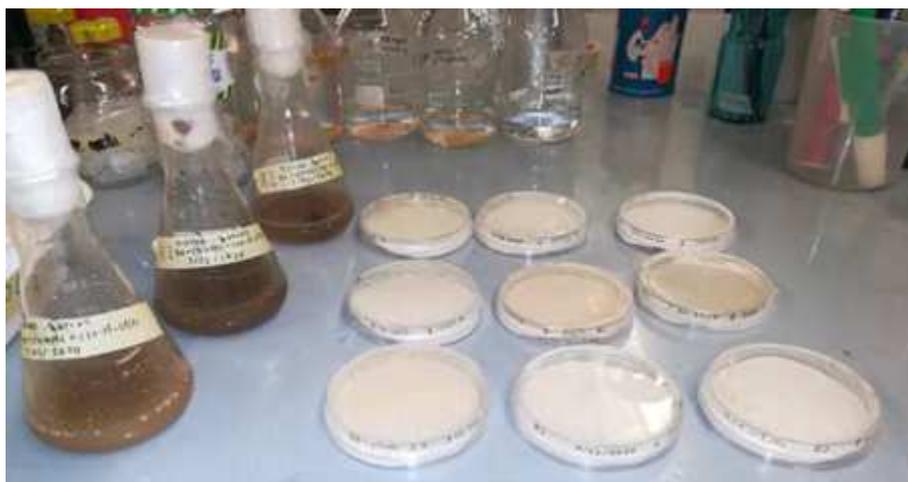


Figura 2. 1. Colture di arricchimento e colture su terreno solido dei batteri degradatori di idrocarburi isolati dal suolo cocontaminato

Le piastre sono state incubate a 30°C ed osservate giornalmente fino a crescita. Un secondo batch di piastre è stato preparato come precedentemente descritto,

selezionando e trasferendo dal primo batch di piastre quattro colonie per fenotipo fino ad ottenere colture pure.

2.2.5 Caratterizzazione fenotipica di batteri idrocarburo-ossidanti

I ceppi batterici isolati a partire dal suolo contaminato sono stati caratterizzati fenotipicamente mediante osservazione allo stereomicroscopio, osservando e descrivendo aspetto, spessore, margini, dimensione colore delle colonie di ogni isolato cresciuto su piastra. Gli isolati che hanno mostrato le stesse caratteristiche fenotipiche sono stati raggruppati in un'unica unità tassonomica operativa (OTU).

2.2.6 Colorazione di Gram

Gli isolati batterici sono stati classificati in Gram positivi o negativi attraverso la tecnica della colorazione di Gram. L'allestimento dei vetrini è stato effettuato trasferendo i vari isolati in gocce di acqua sterile poste sui vetrini precedentemente sgrassati. Una volta preparati tutti i vetrini è stata effettuata la colorazione. Inizialmente gli isolati sono stati trattati con soluzione di cristalvioletto. Dopo un minuto, previa rimozione del colorante in eccesso con acqua, è stato aggiunto il reattivo di Lugol (soluzione acquosa di iodio e ioduro di potassio), che consente la fissazione del colorante alla parete batterica mediante formazione di un complesso insolubile. Dopo il tempo di trattamento, pari ad un minuto, il lugol è stato rimosso con acqua ed è stato aggiunto alcol etilico (90%) per la decolorazione. Dopo 30 secondi, previa rimozione del decolorante con acqua, è stata aggiunta la soluzione di safranina, rimossa dopo un ulteriore minuto di tempo. Effettuata la colorazione i vetrini sono stati osservati al microscopio ottico con obiettivo 100x con immersione in olio.

2.2.7 PCR del gene 16S rDNA

Al fine di identificare i batteri isolati dal suolo contaminato, essi sono stati sottoposti ad amplificazione del gene ribosomale 16S rDNA. In particolare, è stata prelevata una singola colonia batterica dalle piastre di BH con l'uso di uno stuzzicadenti sterile, la colonia è stata stemperata in 20 μ L di tampone TE in un tubo da 1,5 ml. il campione è stato quindi sottoposto a shock termico, mediante incubazione in acqua bollente (100°C) per 5 minuti e trasferimento in ghiaccio per altri 5 minuti, per consentire la lisi delle cellule batteriche e la liberazione del DNA. Il lisato ottenuto

è stato centrifugato per 5 minuti a 14.000 rpm per rimuovere i residui cellulari. Infine, 1 μ L di lisato cellulare è stato usato come stampo nella reazione di amplificazione. Per la reazione di amplificazione è stata utilizzata la coppia di primers 27F e 1492R (Tabella 2.6).

Tabella 2. 6. Sequenza dei primer utilizzati per l'amplificazione del gene 16S rRNA

Primer	Sequenza Nucleotidica	Riferimento Bibliografico
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Vergin et al., 1998
1492R	GGYTACCTTGTTACGACTT	Lane et al., 1991

L'amplificazione dell'rDNA 16S è stata effettuata in 30 μ l, utilizzando le concentrazioni e le condizioni indicate nelle Tabelle 2.7 e 2.8 (Catania et al., 2015). 5 μ l dei prodotti di PCR sono stati analizzati tramite corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1%, al fine di visualizzare il prodotto atteso.

Tabella 2. 7. Miscela di reazione per l'amplificazione dell'rRNA 16S

Reagente	Concentrazione finale
Buffer Standard One Taq	1x
DNTPs	200 μ M
Primer 27Forward	0,2 μ M
Primer 1492 Reverse	0,2 μ M
One Taq Hot Start Biolabs	0,05U/ μ l
H ₂ O GIBCO	

Tabella 2. 8. Programma di amplificazione dell'rDNA 16S

Fasi	Tempo	Temperatura	n. di cicli
Denaturazione iniziale	30 sec	94°	1
Denaturazione	30 sec	94°	30
Annealing	1 min	50°	30
Allungamento	1,5 min	68°	30
Allungamento finale	5 min	68°	1
Mantenimento	infinito	4°	1

2.2.8 Sequenziamento degli ampliconi 16S rDNA ed analisi delle sequenze

Per il sequenziamento, gli ampliconi del gene 16S rDNA sono stati inviati alla società "MACROGEN EUROPE" (Amsterdam, Paesi Bassi). L'rDNA 16S è stato preparato

seguendo le indicazioni dettate dalla società, inviando 30µl di DNA ad una concentrazione di 20 ng/µl

Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state confrontate con quelle presenti nel database GenBank dell'NCBI utilizzando il programma BLASTN, database nucleotide collection (nr/nt) e 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea); e in RDP Naive Bayesian rDNA Classifier ver.2.4, utilizzando un "Confidence threshold" dell'80%.

2.2.9 Estrazione di DNA metagenomico dal suolo

Il DNA metagenomico è stato estratto dal suolo contaminato utilizzando il kit "Fast DNA Spin Kit for Soil" (MPbio) (Catania et al., 2018). In particolare, 0.5 g di suolo sono stati trasferiti in "Lysing Matrix E. tube" contenenti biglie di silice di diverse dimensioni per favorire la lisi cellulare tramite azione meccanica. Al campione sono stati aggiunti 978 µl di Sodium Phosphate Buffer e 122 µl di MT Buffer, il campione è stato omogenizzato utilizzando "FastPrep-24 Instrument" (MPbio) per 40 s alla velocità di 6.0 m/s. Il campione è stato centrifugato a 14000 g per 5 minuti per eliminare i detriti cellulari, il surnatante è stato trasferito in un nuovo tubo da 2 ml, 250 µl di buffer PPS (Protein Precipitation Solution) sono stati aggiunti e il campione è stato centrifugato a 14000 g per 5 minuti. Il surnatante è stato nuovamente trasferito in un nuovo tubo da 15 ml, a cui è stato aggiunto 1ml di "Resuspend Binding Matrix". Il campione è stato miscelato per inversione per 2 minuti ed in seguito lasciato sedimentare a temperatura ambiente per 3 minuti. Il campione è stato trasferito nei tubi "SPIN Filter Tube" e centrifugato a 14000 g per 1 minuto. Il DNA è stato purificato aggiungendo 500 µl di buffer SEWS-M, e centrifugando a 14000 g per 1 minuto. Lo SPIN™ Filter contenente il DNA estratto è stato asciugato per cinque minuti a temperatura ambiente. Il DNA è stato eluito in 30µl di acqua DNase/Rnase-Free (GIBCO) centrifugando a 14,000 g per 1 minuto.

La qualità e la quantità di DNA sono stati valutati tramite spettrofotometro (NanoDrop™ 2000 / 2000c thermofisher). Lo spettrofotometro è uno strumento che restituisce la concentrazione, in questo caso del DNA del campione, misurando il valore di assorbanza. In particolare, 1 µl di campione di DNA estratto è stato inserito nell'apposito supporto dello strumento che registra il picco di assorbimento. Il software restituisce quindi il valore di concentrazione (ng/µl) e il grado di purezza del campione espresso come rapporto di assorbanza 260/280, che è un indicatore di contaminazione da proteine, e rapporto di assorbanza 260/230, che è un indicatore di contaminazione causata da composti organici.

I campioni di DNA sono stati conservati a -20°C per le successive analisi.

2.2.10 Analisi metagenomica dell'rDNA 16S

Il DNA metagenomico estratto dal suolo contaminato è stato sottoposto a sequenziamento di nuova generazione (NGS-Illumina-MiSeq) presso la BMR Genomics srl, Padova, Italia.

Sono state analizzate le sequenze delle regioni ipervariabili del gene rDNA 16S (V3-V4, per batteri ed archea), aventi una lunghezza tra i 100 ed i 350 nucleotidi. Il sequenziamento è stato eseguito sulla piattaforma MiseqSequencing System-Illumina.

La tecnologia Illumina si basa sul seguente procedimento: molecole di DNA con adattatori appropriati legati su ciascuna estremità vengono utilizzati come substrati per reazioni di sintesi di amplificazione ripetute su un supporto solido (vetrino) che contiene sequenze oligonucleotidiche complementari a un adattatore legato. Gli oligonucleotidi sul vetrino sono distanziati in modo tale che il DNA, che viene poi sottoposto a ripetuti cicli di amplificazione, crei dei "cluster" clonali costituiti da circa 1000 copie di ciascun frammento oligonucleotidico. Ogni vetrino può supportare milioni di reazioni a grappolo parallele.

2.2.11 Amplificazione del gene *alkB*

Il DNA estratto dal suolo è stato usato come stampo per la reazione di amplificazione del gene *alkB*, utilizzando la coppia di primers degenerati DEG1RE e TS2S.

I primer degenerati TS2S e DEG1RE sono disegnati su sequenze note interne del gene *alkB* di *P. oleovorans* e del gene *alkM* di *Acinetobacter* (Tabella 2.9).

Tabella 2. 9. Sequenze dei Primers utilizzati per la reazione di amplificazione del gene *alkB* con relativo riferimento bibliografico. Le degenerazioni sono indicate con i seguenti simboli: y = t + c; r = a + g; i = inosina.

Primer	Sequenza Nucleotidica	Riferimento Bibliografico
DEG1RE	gtr agi ctr gtr cgc tta agg tg	Smits et al., 1999
TS2S	aay aga gct cay gar ytrggt cay aag	Smits et al., 1999

Due reazioni di PCR sono state effettuate per amplificare il gene *alkb*; nella prima reazione 10 ng di DNA metagenomico sono stati utilizzati come DNA stampo in un volume finale di 30 µl; nella seconda reazione, 1 µl di prodotto di PCR ottenuto dalla prima reazione di amplificazione, è stato utilizzato come DNA stampo, nelle stesse condizioni di amplificazione (Quatrini et al., 2008).

Le concentrazioni dei reagenti di PCR e le condizioni di reazione sono riportate in Tabella 2.10 e 2.11.

Tabella 2. 10. Miscela di reazione per l'amplificazione del gene *alkB*

Reagente	Concentrazione finale
Buffer Standard One Taq	1x
DNTPs	200 μ M
Primer DEG1RE	0,2 μ M
Primer TS2S	0,2 μ M
One Taq Hot Start Biolabs	0,05U/ μ l
H ₂ O GIBCO	

Tabella 2. 11. Programma di amplificazione del gene *alkB*

Fasi	Tempo	Temperatura	n. di cicli
Denaturazione iniziale	30 sec	94°	1
Denaturazione	30 sec	94°	25
Annealing	1 min	40°	25
Allungamento	1,5 min	68°	25
Allungamento finale	5 min	68°	1
Mantenimento	infinito	4°	1

2.3 Analisi dei risultati

2.3.1 Isolamento di batteri HC degradanti dal suolo contaminato

Come già anticipato, al fine di isolare i batteri idrocarburo-degradanti dai campioni di suolo contaminato, aliquote delle colture di arricchimento sono state trasferite su piastra di terreno colturale BH con diesel come unica fonte di carbonio e di energia. Per ottenere colture pure di ogni ceppo batterico idrocarburo-ossidante sono stati eseguiti due passaggi successivi di trasferimento degli isolati su terreno solido fresco BH nelle stesse condizioni. Dopo un periodo di incubazione di 5 giorni a 30°C il numero totale di isolati ottenuti al primo trasferimento, è stato di 26.

per ogni piastra del primo batch, sono state selezionate colonie che mostravano fenotipi diversi (colore, forma, dimensione, bordi ed aspetto delle colonie) e almeno 4 colonie per fenotipo sono state trasferite per ottenere colture pure. 18 potenziali batteri degradatori di idrocarburi, capaci di crescere su diesel come unica fonte di carbonio, sono stati ottenuti dal secondo trasferimento su terreno solido.

La colorazione di Gram effettuata su tutti gli isolati ottenuti ha mostrato la presenza di un elevatissimo numero di batteri gram-negativi, cocchi o bastoncelli.

Gli isolati sono stati raggruppati per fenotipo, individuando 8 fenotipi diversi le cui caratteristiche sono riportate in Tabella 2.12.

Tabella 2. 12. Caratteristiche fenotipiche dei batteri isolati dal suolo contaminato su diesel come unica fonte di carbonio

Fenotipo	Dimensione (mm)	Colore	Forma	Gram	Forma cellulare	N° isolati	codice identif.
A	1	Arancio	Circolare	Negativo	Bastoncello	1	1
B	<1	Bianco	Circolare	Negativo	Bastoncello	1	3
C	1	Giallo chiaro	Circolare	Negativo	Cocco	4	5, 7, 16, 19
D	<1	Bianco	Circolare	Negativo	Cocco	6	9, 11, 14, 17, 22, 23,
E	1	Bianco	Circolare	Negativo	Bastoncello	3	10, 13, 18
F	<1	Bianco	Circolare	Positivo	Cocco	1	21
G	>1	Bianco	Circolare	Positivo	Cocco	1	25
H	1	Arancio	Circolare	Negativo	Cocco	1	15

Un esempio dei fenotipi dei batteri isolati dal suolo contaminato è mostrato in Figura 2.2.



Figura 2. 2. Alcuni degli isolati batterici isolati dal suolo contaminato su terreno di coltura BH in presenza di diesel come unica fonte di carbonio

2.3.2 Identificazione tassonomica degli isolati

Per l'identificazione tassonomica dei batteri idrocarburo-ossidanti isolati dal suolo è stato amplificato il gene che codifica per l'rRNA ribosomiale 16S, mediante la tecnica di colony-PCR. Gli ampliconi sono stati sottoposti ad analisi elettroforetica su gel agarosio 1% per verificarne l'avvenuta amplificazione. L'analisi elettroforetica dei prodotti di PCR ha mostrato per tutti i campioni la presenza di bande delle dimensioni attese di 1500 bp (Figura 2.3).

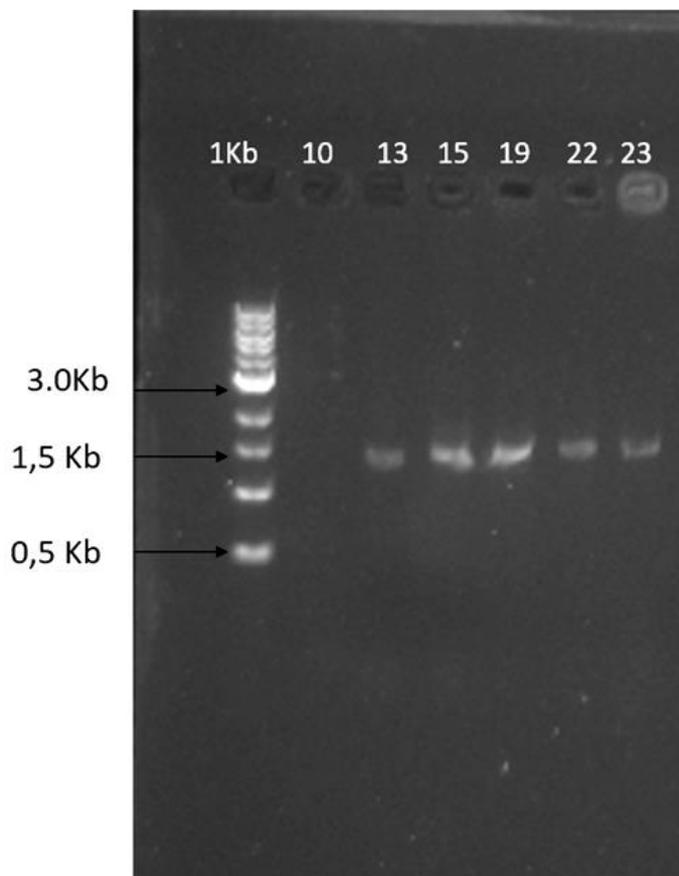


Figura 2. 3. Analisi elettroforetica del prodotto di amplificazione dell'rDNA 16S di alcuni ceppi batterici isolati su diesel dal suolo contaminato. 1kb: 1kb DNA ladder Biolabs 0,25 µg/lane

2.3.3 Analisi filogenetica degli isolati

Tutti gli ampliconi 16S degli isolati sono stati inviati, alla società “MACROGEN EUROPE”, per la reazione di sequenziamento.

I risultati del sequenziamento vengono visualizzati come sequenze nucleotidiche in formato FastA e come elettroferogrammi. Le sequenze sono state analizzate per l’identificazione tassonomica con il software “Nucleotide BlastNCBI”, Blast nr database (Megablast) e Blast rRNA_typestrains/ 16S_ribosomal_RNA database (Megablast) ed anche con il software “RDPClassifier (Tabella 2.13).

Tabella 2. 13. Identificazione tassonomica degli isolati mediante allineamento delle sequenze ottenute con quelle presenti nel database dell’NCBI tramite BLAST e nel Ribosomal database project

Fenotipo	Analisi filogenetica (RDPII database)				Blast nr database (Megablast)			Blast rRNA_typestrains/ 16S_ribosomal_RNA (Megablast)		
	Sequenza (bp)	Phylum	Classe	Famiglia	Sequenza con maggiore similarità	Similarità %	Accession number	Sequenza con maggiore similarità	Similarità %	Accession number
A	1150	Proteobacteria	Gamma proteobacteria	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i> sp. SO29	99	HQ651967	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637	99	NR_112030
B	988	Actinobacteria	Actinobacteria	Nocardiaceae	<i>Nocardia</i> sp. B2BY	98	MN162635	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i> DSM 44484	98	NR_041857
C	1477	Actinobacteria	Actinobacteria	Nocardiaceae	<i>Actinobacteria</i> sp. HCT-41-2	98	MW425585	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i> DSM 44484	98	NR_041857
	1353	Proteobacteria	Beta proteobacteria	Comamonadaceae	<i>Delftia</i> sp. MWU13-3324	98	MT101746	<i>Delftia suruhensis</i> NBRC 16741	98	NR_113870
D	1278	Proteobacteria	Gamma proteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> sp. RSP3	99	KR051489	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NBRC 12689	99	NR_113599
E	1216	Proteobacteria	Beta proteobacteria	Comamonadaceae	<i>Hydrogenophaga palleronii</i> sp. T50-28	91	MN330545	<i>Hydrogenophaga galaconesensis</i> HWB-10 165	91	NR_149183
F	1345	Actinobacteria	Actinobacteria	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i> sp. BY22	99	KC439480	<i>Rhodococcus degradans</i> CCM 4446	99	NR_145886
G	1253	Proteobacteria	Gamma proteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> sp. SAUF016	99	KX879787	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NBRC 12689	99	NR_113599
H	1195	Actinobacteria	Actinobacteria	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i> sp. DZ002	98	GU196259	<i>Rhodococcus ruber</i> DSM 43338	98	NR_118602

L’analisi filogenetica dei batteri isolati su diesel dal suolo contaminato ha mostrato la presenza di batteri affiliati a phylum, classi e generi noti in letteratura come batteri idrocarburo-ossidanti (Figura 2.4). In particolare, è stata osservata la predominanza di batteri appartenenti al phylum dei Proteobatteri (61%), seguito dal phylum degli Actinobacteria (39%).

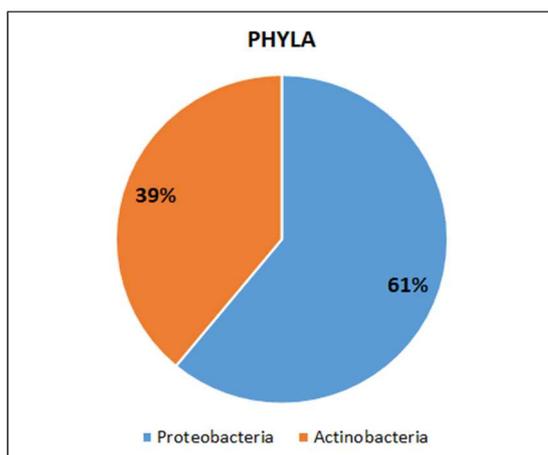


Figura 2. 4. Identificazione tassonomica a livello di phylum dei batteri del suolo contaminato isolati su diesel come unica fonte di carbonio

Tra i Proteobatteri la classe predominante è stata rappresentata dai Gammaproteobatteri (45%), con un'elevata abbondanza percentuale dei generi *Pseudomonas* (39%) e *Hydrogenophaga* (17%) (Figura 2.5).

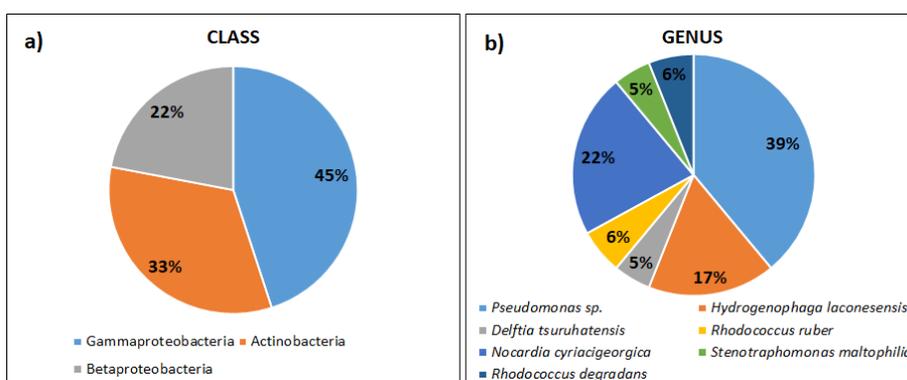


Figura 2. 5. Identificazione tassonomica a livello di classe (a) e genere (b) dei batteri del suolo contaminato isolati su diesel come unica fonte di carbonio

Il genere *Pseudomonas* è caratterizzato da una elevata versatilità catabolica, batteri di questo genere possono infatti metabolizzare più di 100 diversi composti organici (Glick et al., 1994; Hong et al., 2005; Saikia et al., 2012). Sono noti per utilizzare una serie di idrocarburi alifatici e aromatici come unica fonte di carbonio e di energia (Das e Chandran, 2011; Kadali et al., 2012; Puškárová et al., 2013). Il genere *Hydrogenophaga* è un genere di batteri Gram- negativi noto per la rimozione di inquinanti ambientali come il 4 aminobenzoato (Contzen et al., 2000). Ad oggi in

letteratura non vi è alcuno studio riguardante la capacità del suddetto genere di utilizzare nel proprio metabolismo idrocarburi ed alcani. Il genere *Stenotrophomonas sp.* è un genere di batteri gram-negativi che comprende almeno 8 specie descritte che si trovano in tutto l'ambiente, in particolare in stretta associazione con le piante (Ryan et al., 2009), e che da un punto di vista metabolico trovano un grande impiego in termini di biorisanamento ambientale. Ad esempio, *S. maltophilia* può degradare p- nitrophenolo e 4-clorofenolo, idrocarburi policiclici aromatici, benzene, toluene, etilbenzene. Il genere *Delftia* è un genere di batteri Gram-negativi, noto per la capacità metaboliche uniche di abbattere o trasformare una varietà di inquinanti come IPA, cadmio e sostanze recalcitranti (Johnston et al., 2013). Anche il phylum degli Actinobacteria è ben rappresentato (33%). Tra i vari generi sono stati identificati *Nocardia* (22%) e *Rhodococcus* (6%). Il genere *Nocardia*, che comprende batteri actinomiceti aerobici, Gram-positivi, ampiamente distribuiti negli habitat acquatici e terrestri (Yamamura et al., 2005; Gendy et al., 2008) e nel suolo con un'ampia diversità di funzioni biologiche. Diverse specie di *Nocardia* sono state isolate da terreni contaminati da petrolio e hanno mostrato potenti capacità di degradazione del petrolio o dei prodotti in gomma. Sono stati isolati ceppi di *Nocardia* in grado di crescere su alcani con catene di lunghezza fino a 36 atomi di carbonio, (*Nocardia sp. SoB*) (Quatrini et al., 2008; Lo Piccolo et al., 2011). Il genere *Rhodococcus* comprende batteri aerobi obbligati, Gram-positivi parzialmente acido-resistente, catalasi-positivo. I batteri appartenenti a questo genere vivono in rocce, acque sotterranee, suolo, sedimenti marini e presentano un'ampia versatilità metabolica con capacità di biodegradazione e trasformazione di vari composti inquinanti, come idrocarburi, pesticidi e xenobiotici (Warhurst e Fewson, 1994; Larkin et al., 2005; Quatrini et al., 2008; Martínková et al., 2009).

2.3.4 Analisi della composizione della comunità microbica

Il DNA metagenomico estratto dal suolo è stato sottoposto a sequenziamento di nuova generazione NGS-Illumina Miseq al fine di caratterizzare la composizione della comunità microbica autoctona.

Il sequenziamento NGS (Next Generation Sequencing-Illumina-MiSeq) ha permesso di stimare l'abbondanza relativa dei taxa presenti nel campione a livello di phylum, classe e genere. Le analisi NGS mostrano una comunità microbica piuttosto ricca e diversificata composta da 14 phyla, 36 classi e 57 ordini batterici. È stata riscontrata una predominanza dei phyla Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, TM7 e Bacteroidetes (Figura 2.6). La presenza di questi microorganismi è stata già osservata in altri siti contaminati da idrocarburi (Zhang et al., 2012; Wang et al., 2019). In accordo con altri studi, i Proteobatteri risultano essere il phylum predominante con una maggior presenza di taxa appartenenti alla classe degli Alphaproteobacteria; tuttavia, sono stati riscontrati anche batteri

appartenenti alle restanti classi, tra cui i Betaproteobacteria e i Gammaproteobacteria (Sengupta et al., 2015). La presenza predominante del phylum dei Proteobatteri può essere associata alla loro capacità di degradare idrocarburi alifatici e aromatici (Abed et al., 2015), anche gli Acidobatteri e Actinobatteri risultano tra i phyla più abbondanti, suggerendo un ruolo nei processi di biorisanamento di suoli contaminati da idrocarburi come già noto in letteratura (Sun et al., 2015).

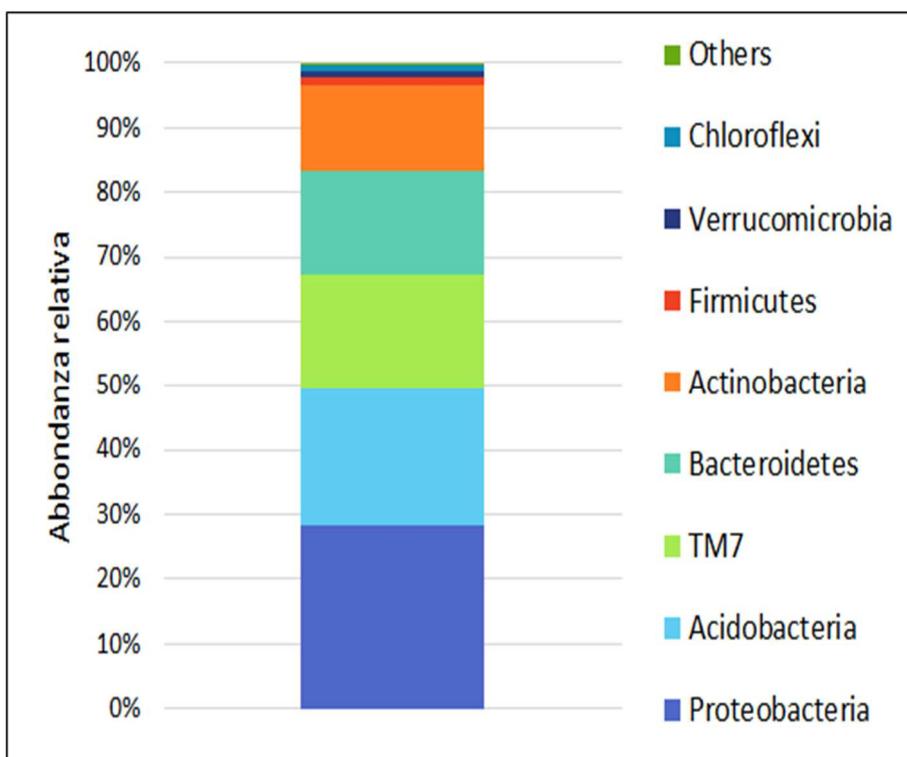


Figura 2. 6. Abbondanza relativa dei phyla identificati nel campione di suolo contaminato tramite sequenziamento NGS

Tra i Proteobatteri la classe degli Alphaproteobacteria risulta tra le più abbondanti, ed è principalmente costituita da batteri affiliati al genere *Parvibaculum*, genere di batteri aerobi coinvolti in meccanismi di degradazione di diversi alcani (Rosario-Passapera et al., 2012) (Figura 2.7).

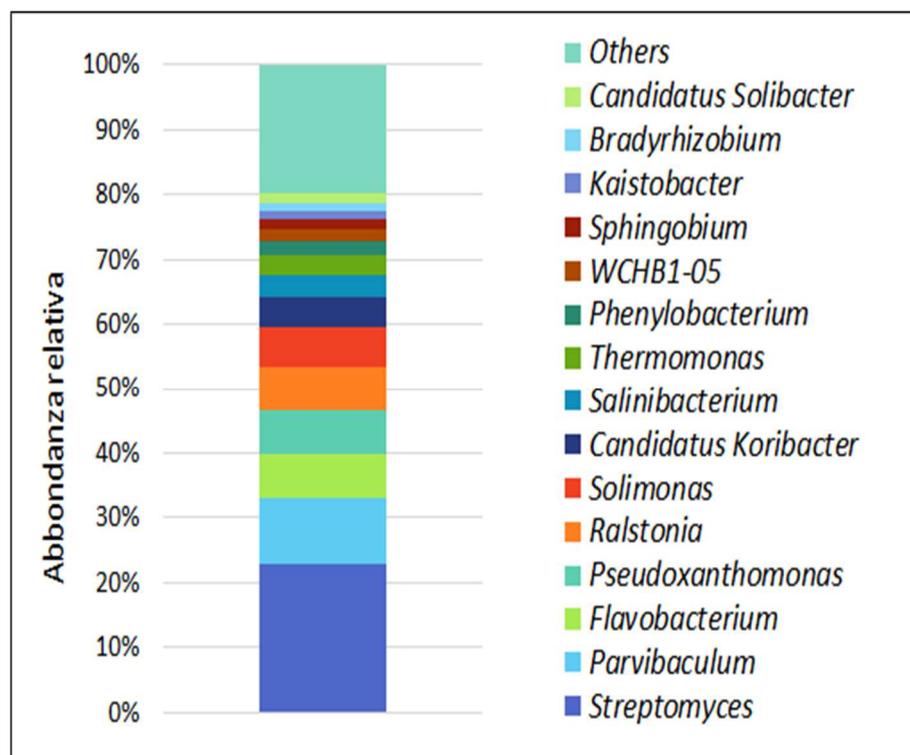


Figura 2. 7. Abbondanza relativa dei generi identificati nel suolo iniziale tramite sequenziamento NGS

Un genere appartenente alla classe degli Alphaproteobacteria identificato nel suolo contaminato è il genere *Sphingobium*, i cui membri sono in grado di degradare idrocarburi policiclici aromatici (Kertesz et al., 2019). All'intero della classe dei Gammaproteobacteria troviamo con una maggiore abbondanza batteri affiliati al genere *Pseudoxanthomonas*, genere noto per degradare idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e per produrre e rilasciare nell'ambiente biotensioattivi, favorendo l'aumento della biodisponibilità di molecole complesse come i composti aromatici (Nayak et al., 2009). Nel suolo contaminato sono presenti anche batteri appartenenti al genere *Solimonas* e *Bradyrhizobium*. La classe dei Betaproteobacteria è invece esclusivamente rappresentata da batteri appartenenti al genere *Ralstonia*. Batteri appartenenti a questo genere sono capaci di utilizzare idrocarburi aromatici come fonte di carbonio ed energia in maniera esclusiva (Ryan et al., 2007). Il genere *Streptomyces*, appartenente al phylum Actinobacteria, è quello con l'abbondanza relativa più elevata. A questo genere appartengono una vasta gamma di batteri aerobi Gram-positivi caratterizzati da una elevata versatilità catabolica, capaci di utilizzare un ampio range di IPA e idrocarburi alifatici (Balachandran et al., 2012). Il genere

Flavobacterium, con un'elevata abbondanza relativa, appartiene al phylum dei Bacteroidetes, batteri aerobi isolati e identificati spesso in siti contaminati da idrocarburi (Chaudhary et al., 2018), probabilmente non tanto per la capacità di degradare efficientemente idrocarburi ma piuttosto per la capacità di produrre e rilasciare nell'ambiente circostante biotensioattivi per il recupero di molecole recalcitranti (Rahman et al., 2003). Il genere *Koribacter*, appartenente al phylum degli Acidobatteri è un tipico batterio isolato dal suolo (Ward et al., 2009).

2.3.5 Valutazione del potenziale catabolico del suolo

La valutazione del potenziale di biorisanamento delle comunità idrocarburo-ossidanti presenti nel suolo contaminato è stata condotta ricercando il gene *alkB*, che codifica per l'enzima alcano monossigenasi, che interviene nello step chiave della degradazione degli alcani convertendo l'alcano nell'alcool corrispondente.

Il gene *alkB* è stato amplificato a partire dal DNA totale estratto dal suolo. Il prodotto atteso è un frammento di 500 bp (Figura 2.8).

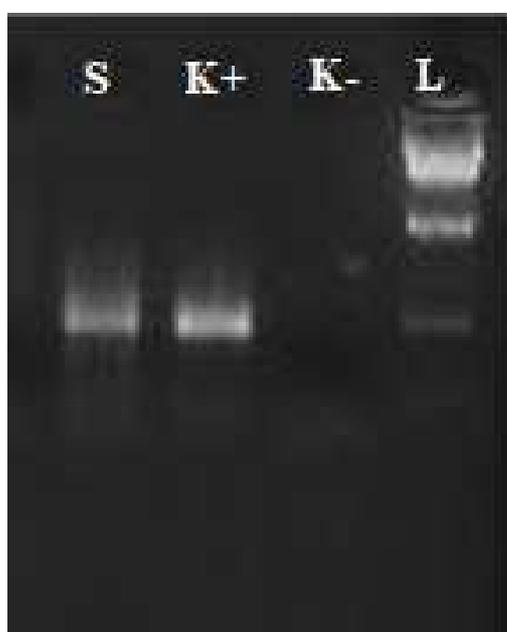


Figura 2. 8. Analisi elettroforetica del prodotto di PCR del gene *alkB* ottenuto amplificando il DNA metagenomico estratto dal suolo contaminato (S: Suolo contaminato; K+: Controllo positivo: *Gordonia* SoCg, K-: Controllo negativo; L: DNA Ladder 100 bp biolabs)

L'analisi elettroforetica del prodotto di amplificazione ha mostrato una banda visibile all'altezza di 550 bp. Il controllo positivo (k+) corrisponde alla coltura pura di *Gordonia* sp. SoCg, il cui gene *alkB* è stato precedentemente amplificato con la stessa coppia di primers e sequenziato (Quatrini et al., 2008, Lo Piccolo et al., 2011). La suddetta banda ottenuta nel campione di suolo (S) dimostra quindi la presenza di batteri idrocarburo ossidanti capaci di utilizzare alcani lineari per la presenza di geni associati al pathway di degradazione *alkB*. Questo risultato conferma i dati ottenuti dall'analisi NGS che avevano già evidenziato la presenza di batteri idrocarburo-ossidanti degradatori di n-alcani nel suolo contaminato.

Capitolo 3 – Applicabilità di tecniche di bioremediation a un suolo reale contaminato da idrocarburi: test in microcosmo e in colonna

3.1 Introduzione

I test di biotrattabilità sono indispensabili per la scelta della soluzione ottimale di intervento e per la definizione delle variabili operative. A tale scopo sono stati condotti dei test in microcosmo che hanno permesso di analizzare le dinamiche del processo a scala di laboratorio e di valutare gli effetti di differenti configurazioni di trattamento. Per simulare diverse condizioni operative ed ottenere un quadro esaustivo dei fenomeni in gioco, sono state studiate diverse configurazioni utilizzando più microcosmi e diversificando le caratteristiche di ognuno di essi. In questo modo è stato possibile determinare il rendimento di rimozione della biomassa autoctona presente nella matrice contaminata e l'influenza sulle cinetiche di biodegradazione della biostimulation, con aggiunta di ossigeno e/o nutrienti. La sperimentazione è stata condotta in ambiente a temperatura controllata ed è stata accompagnata dal monitoraggio dei principali parametri chimici, fisici e microbiologici.

Oltre ai test in microcosmo, è stato progettato e allestito un impianto pilota costituito da tre unità cilindriche in Plexiglas con l'obiettivo di realizzare uno scale-up dell'attività sperimentale. Analogamente a quanto fatto per i test in microcosmo, la sperimentazione è stata accompagnata dal monitoraggio dei principali parametri chimici, fisici e microbiologici.

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Test in microcosmo

3.2.1.1 Installazione sperimentale

La prima parte della sperimentazione è stata dedicata alla progettazione e realizzazione di test di biotrattabilità in microcosmo. Per simulare diverse condizioni operative ed ottenere un quadro esaustivo dei fenomeni in gioco, sono state studiate diverse configurazioni utilizzando più microcosmi e diversificando le caratteristiche di ognuno di essi.

A tal fine, sono stati realizzati due tipi di microcosmo, entrambi in fase solida:

- a) il primo tipo di microcosmo (tipo A) è stato realizzato disponendo circa 1,5 kg di suolo contaminato all'interno di contenitori di alluminio di dimensioni 21 x 8 cm. In questo caso i microcosmi sono stati differenziati per testare diverse configurazioni di un intervento di landfarming;
- b) il secondo tipo di microcosmo (tipo B) è stato realizzato disponendo circa 2,5 kg di suolo contaminato all'interno di contenitori in materiale plastico di dimensioni 30 x 7 cm dove era stato realizzato uno strato drenante in ghiaietto di circa 3 centimetri, nel quale è stata inserita una rete di distribuzione dell'aria (Figura 3.1). Tale rete era costituita da tubi forati (D = 6 mm) collegati ad una soffiante. In questo caso i microcosmi sono stati differenziati per testare diverse configurazioni di un intervento di bioventing.

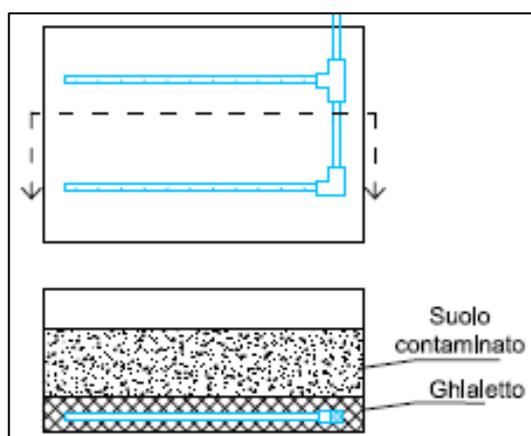


Figura 3. 1. Schema microcosmi di tipo B

In tutti i microcosmi l'umidità iniziale è stata corretta al 60-80% della capacità idrica di campo. L'umidità è stata quindi monitorata e corretta con aggiunta di acqua distillata quando necessario.

Il primo e il quarto microcosmo hanno avuto la funzione di valutare l'influenza dell'aerazione sull'efficienza di rimozione della biomassa autoctona presente nel suolo contaminato, mediante rivoltamenti periodici del suolo (tipo A) e di aerazione forzata del sottosuolo (tipo B).

Il secondo e il quinto microcosmo, nei quali è stata prevista l'aggiunta di disinfettante al fine di inibire i processi biologici, hanno avuto la funzione di ottenere indicazioni su eventuali processi di natura non biologica che possano aver comportato una variazione delle caratteristiche chimico-fisiche del campione.

Il terzo e il sesto microcosmo hanno avuto la funzione di valutare l'influenza dell'aggiunta di nutrienti (biostimulation) sull'efficienza di rimozione e sullo sviluppo della biomassa autoctona. I nutrienti sono stati immessi mediante soluzioni di Cloruro di Ammonio (NH_4Cl) e Idrogeno-Fosfato di Potassio (K_2HPO_4) dosati per ottenere un rapporto C:N:P pari a 100:10:1.

Al fine di valutare gli effetti di un intervento di inoculo di batteri alloctoni (bioaugmentation), in termini di sinergia o competizione con la popolazione batterica autoctona, in corrispondenza del centovesimo giorno di sperimentazione nei microcosmi A1, A3, B1 e B3 è stato inoculato un mix di batteri idrocarburo degradanti (Tabella 3.1).

Tabella 3. 1. Mix di batteri idrocarburo degradanti utilizzati per la bioaugmentation

Nome del Ceppo	Crescita su n-alcani
<i>Nocardia sp. SoB</i>	C8 – C36
<i>Rhodococcus sp. SoD</i>	C12 – C28
<i>Rhodococcus sp. SoF</i>	C12 – C28
<i>Gordonia sp. SoCg</i>	C12 – C36
<i>Gordonia sp. SoCp</i>	C12 – C36

L'inoculo era costituito da un mix di cinque ceppi batterici Gram-positivi precedentemente isolati nel laboratorio di Microbiologia Ambientale ed Ecologia Microbica del dipartimento STEBICEF (Università degli Studi di Palermo) da un sito siciliano contaminato da Idrocarburi e specializzati nella degradazione di una vasta gamma di idrocarburi compresi nel range da C8 a C36 (Quatrini et al., 2008, De Pasquale et al., 2012).

Per ognuno dei cinque ceppi batterici è stato preparato un pre-inoculo, trasferendo una singola colonia in 3 ml di terreno BH contenente esadecano (1%) come unica fonte di carbonio. I pre-inoculi sono stati incubati a 30°C per 48 ore in agitazione a 160 rpm. La crescita è stata valutata in termini di torbidità prendendo come riferimento un controllo contenente solo il terreno e l'esadecano. Dopo il periodo di

incubazione, l'1% di preinoculo è stato trasferito in beute contenenti 300 ml di terreno BH e diesel come unica fonte di carbonio (1%). Le colture liquide (Figura 3.2) sono state incubate nelle condizioni già descritte.



Figura 3. 2. Colture batteriche degli isolati *Gordonia* SoCg, SoCp, *Nocardia* SoB e *Rhodococcus* SoD, SoF inoculate in microcosmo dopo 120 giorni di sperimentazione

Al termine del periodo di incubazione 200 ml di ogni coltura batterica (corrispondente a 10^9 CFU/ml) sono stati trasferiti in un'unica beuta al fine di creare una miscela da inoculare in microcosmo, in totale 1 litro di miscela è stata inoculata in ogni microcosmo.

Pertanto, sono state messe a punto sei diverse configurazioni, di cui 3 di tipo A e 3 di tipo B (Tabella 3.2).

Tabella 3. 2. Configurazioni dei test in microcosmo

Tipo	n.	Controllo abiotico	Aerazione	Biostimulation	Bioaugmentation
A	1		rivoltamenti periodici		al 120° giorno
	2	X	rivoltamenti periodici		
	3		rivoltamenti periodici	X	al 120° giorno
B	1		aerazione forzata		al 120° giorno
	2	X	aerazione forzata		
	3		aerazione forzata	X	al 120° giorno

L'intera sperimentazione è stata condotta all'interno di un frigotermostato da laboratorio al fine di mantenere costante la temperatura dell'ambiente ad un valore di $20 \pm 0,5$ °C (Figura 3.3).



Figura 3. 3. Installazione sperimentale test in microcosmo

3.2.1.2 Protocollo analitico

La durata dei test di biotrattabilità in microcosmo è stata pari a 180 giorni, durante i quali sono stati prelevati a cadenza mensile dei campioni per le analisi fisico-chimiche e biologiche:

- 1) concentrazione idrocarburi C10-C40;
- 2) test di fitotossicità;
- 3) pH;
- 4) composizione della comunità microbica.

3.2.1.3 Concentrazione idrocarburi C10-C40

Al fine di monitorare l'evoluzione del processo degradativo e valutare le performance di rimozione, è stata periodicamente determinata la concentrazione degli idrocarburi C10-C40. L'analisi dei campioni è stata eseguita in accordo con la ISO 16703:2004 che prevede una fase di estrazione della fase organica con n-eptano e acetone, una fase di lavaggio e separazione della fase organica, una fase di purificazione con Florisil e solfato di sodio anidro e la misura mediante gascromatografo con rivelatore FID.

Il campione di suolo è stato preliminarmente essiccato all'aria per 24 ore e ne è stata determinata l'umidità in accordo con il Metodo Ufficiale n. II.1, Suppl. Ord. G.U. n.248 del 21/10/99 al punto II.1.4.1.

Un'aliquota di 10 grammi di campione essiccato è stata introdotta all'interno di una bottiglia in vetro pyrex, nella quale sono stati aggiunti: Acetone ($\text{CH}_3)_2\text{CO}$, con rapporto campione/acetone pari a 2, e una soluzione di riferimento RTW, con rapporto soluzione/campione pari a 1. La soluzione di riferimento RTW era stata preparata dosando 30 mg di n-tetracontano e 21 mg di n-decano in un litro di n-eptano.

Al fine di agevolare l'estrazione della fase organica, la bottiglia in pyrex è stata sottoposta a bagno ad ultrasuoni per 30 minuti (Figura 3.4). Successivamente, il contenuto è stato trasferito in un falcon da 50 ml e sottoposto a centrifugazione per 10 minuti a 4.000 giri al minuto per favorire la separazione solido-liquido (Figura 3.5).



Figura 3. 4. Estrazione della fase organica in bagno a ultrasuoni



Figura 3. 5. Separazione solido-liquido mediante centrifugazione

Il surnatante ottenuto è stato versato all'interno di un imbuto separatore graduato da 500 ml nel quale sono stati aggiunti 100 ml di H₂O distillata. L'imbuto è stato quindi miscelato manualmente per 5 minuti e successivamente è stato lasciato a sedimentare per 1 ora al fine di permettere la separazione tra la fase organica e la miscela acqua-acetone (Figura 3.6).



Figura 3. 6. Separazione della fase organica in imbuto separatore

Dopo tale intervallo di tempo l'acetone è stato allontanato mediante il rubinetto posto nella parte inferiore dell'imbutto separatore ed è stato effettuato un secondo lavaggio della fase organica, aggiungendo altri 100 ml di acqua distillata, agitando manualmente per 5' minuti e lasciando sedimentare per 24 ore. Dopo la seconda fase di lavaggio, si è ottenuta una netta separazione della fase organica che, dopo l'allontanamento di acqua e acetone, è stata raccolta all'interno di un cilindro graduato (Figura 3.7).

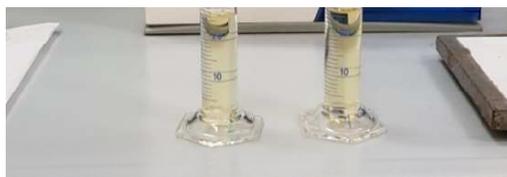


Figura 3. 7. Misura del volume della fase organica estratta

A questo punto la fase organica ottenuta è stata purificata mediante filtrazione in cartucce contenenti 2 g di Florisil e 2 g di solfato di sodio (Figura 3.9).



Figura 3. 8. Purificazione della fase organica

La fase organica purificata è stata infine sottoposta ad analisi mediante GC/FID (Figura 3.9).



Figura 3. 9. Gascromatografo con rilevatore FID

3.2.1.4 Test di fitotossicità

I test di fitotossicità consentono di verificare, prima, durante e dopo l'esecuzione di un trattamento di suoli contaminati, l'effettiva riduzione che tale trattamento ha comportato sulla tossicità dei suoli, non sempre garantita dalla sola riduzione delle concentrazioni dei contaminanti rimossi (Coulon et al., 2005; García Frutos et al., 2010). Questi test prevedono di far sviluppare piante in presenza di una matrice contaminata, misurando la risposta in termini di numero di semi germogliati e lunghezza dell'apparato radicale. La valutazione dell'indice di germinazione è stata effettuata utilizzando la specie *Lepidium sativum* (Crescione comune), in accordo con la procedura messa a punto da APAT (2004).

In particolare, per ogni campione sono state previste 4 diverse configurazioni: tal quale, diluito con sabbia silicea (20 mesh) al 25%, diluito con sabbia silicea (20 mesh) al 50%, una configurazione di controllo costituita da sabbia (20 mesh). Per ogni configurazione 10 g di campione sono stati posti all'interno di una capsula Petri dove sono stati aggiunti 5 ml di acqua distillata. In ogni capsula è stato inserito un filtro carta Whatman, sul quale sono stati disposti in modo casuale dieci semi di *Lepidium sativum* (Figura 3.10).

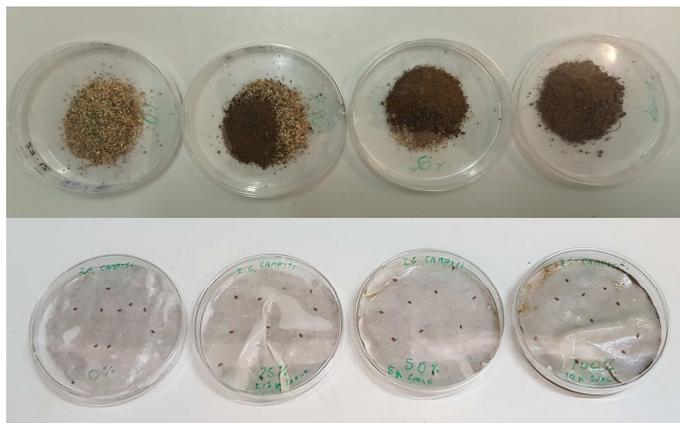


Figura 3. 10. Configurazioni per determinazione IG

Le quattro configurazioni sono state disposte in pila, racchiuse in un sacchetto di polietilene e riposte in stufa per 72 ore ad una temperatura di 27°C. Alla fine del periodo di incubazione sono stati conteggiati il numero di semi germinati per ogni configurazione ed è stata misurata la lunghezza delle radici (Figura 3.11).



Figura 3. 11. Misura lunghezza delle radici con calibro digitale

A questo punto è stato possibile calcolare l'indice di germinazione come rapporto del prodotto tra il numero di semi germinati (N) e la somma delle lunghezze delle

radici (L) di ogni singola diluizione (D) a quello relativo alla configurazione di controllo (T):

$$IG_D = \frac{\sum L_D \times N_D}{\sum L_T \times N_T}$$

L'indice di germinazione del campione è stato calcolato come media degli indici ottenuti per le tre diluizioni.

3.2.1.5 pH

Il pH influenza l'attività dei microrganismi e in particolare la loro velocità di crescita. Valori ottimali di pH sono compresi tra 7 e 8, ma l'attività batterica è comunque sufficientemente intensa anche per valori compresi tra 5 e 9. La misura del pH è stata effettuata su sospensione suolo-acqua in accordo con il D.M. 13/09/1999. In particolare, 10 g di suolo sono stati inseriti in un becher con 25 ml di acqua distillata. La sospensione è stata quindi posta in agitazione per 2 h e successivamente lasciata sedimentare per qualche minuto (Figura 3.12). La misura del pH è stata effettuata sul surnatante mediante un multimetro WTW Multi 3420 munito di sonda WTW pH-electrode (Figura 3.13).



Figura 3. 12. Fase di agitazione della sospensione suolo-acqua



Figura 3. 13. Multimetro WTW Multi 3420

3.2.1.6 Composizione della comunità microbica

Al fine di monitorare eventuali cambiamenti in termini di composizione e abbondanza nel tempo della popolazione batterica e gli effetti della presenza degli inquinanti sulle cinetiche di biodegradazione, è stata analizzata la composizione della comunità microbica mediante estrazione del DNA metagenomico e sequenziamento MISeq Illumina della regione V3-V4 del gene 16S rRNA. In particolare, la composizione della comunità microbica è stata analizzata dopo 120 giorni (biostimulation) e confrontata con quella del suolo iniziale (tempo 0). Le procedure di estrazione del DNA dal suolo, sequenziamento e analisi delle sequenze, e i materiali utilizzati sono analoghi a quelli esposti nel Capitolo 2 per il suolo iniziale.

Inoltre, alla fine della sperimentazione è stato valutato il potenziale di degradazione del suolo trattato mediante isolamento dei batteri HC degradanti, amplificazione dell'rDNA 16S e sequenziamento, così come descritto al Capitolo 2 per il suolo iniziale.

Anche queste attività sono state svolte in collaborazione con il laboratorio di Microbiologia Ambientale ed Ecologia Microbica del Dipartimento STEBICEF dell'Università di Palermo.

3.2.1.7 Verifica della presenza dei batteri hc degradanti inoculati nel suolo alla fine della bioaugmentation

Per valutare la sopravvivenza dei batteri idrocarburo ossidanti inoculati sono stati isolati dal suolo finale delle configurazioni A3 e B3 i ceppi batterici capaci di crescere su n-alcani come unica fonte di carbonio. Gli isolati ottenuti sono stati caratterizzati tassonomicamente mediante amplificazione e sequenziamento del gene 16S rRNA, analogamente a quanto fatto per il suolo iniziale (Capitolo 2).

3.2.2 Test in colonna

3.2.2.1 Installazione sperimentale

Dopo i test in microcosmo è stata prevista una fase di test in colonna. L'apparato sperimentale realizzato (Figura 3.14) è formato da 3 colonne di forma cilindrica in plexiglass, aventi diametro pari a 10 cm e altezza pari a 1 m, fissate su un supporto a parete.



Figura 3. 14. Installazione sperimentale test in colonna

Il materiale di riempimento delle colonne è stato composto da tre strati così distinti dal basso verso l'alto: un primo strato dello spessore di 40 cm costituito da ghiaietto, un secondo strato di 50 cm costituito dal terreno contaminato (peso 4 kg) e un ultimo strato di 10 cm di ghiaietto.

L'impianto è stato dotato di un sistema di aerazione, costituito da un'unica soffiante collegata all'estremità inferiore di ogni colonna tramite una rete di distribuzione munita di flussimetri per la regolazione e il monitoraggio della portata d'aria, e di un sistema di alimentazione d'acqua, costituito da una pompa peristaltica collegata mediante una rete di distribuzione ad elementi forati posti nell'estremità superiore delle colonne (Figura 3.15).

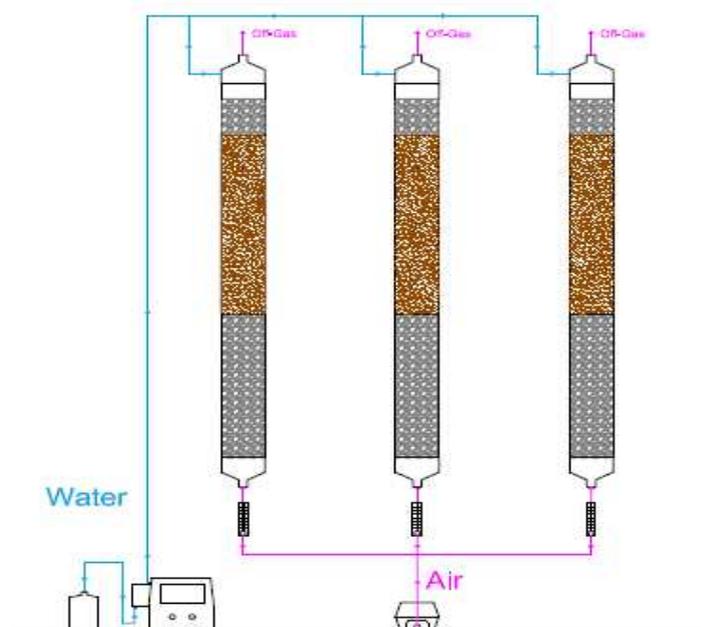


Figura 3. 15. Sistema di aerazione e di irrigazione

In ciascuna unità sono state realizzate due porte di campionamento del diametro di 17 mm, dotate di tappo di chiusura. Tali porte sono state posizionate a 10 cm dai margini superiore e inferiore degli strati di terreno.

Nella parte sommitale di ogni colonna è stato previsto un elemento di chiusura idoneo per l'accumulo e il campionamento dei gas.

In ciascuna delle tre colonne sono stati inseriti circa 4 kg di suolo contaminato ed ognuna di esse è stata caratterizzata da differenti condizioni di alimentazione e funzionamento, sintetizzate in Tabella 3.3.

Tabella 3. 3. Configurazioni dei test in colonna

Colonna	Aerazione	Disinfettante	Biostimulation
C 1	X		
C 2	X	X	
C 3	X		X

In particolare, la prima colonna è stata finalizzata alla valutazione dell'influenza dell'aerazione sull'efficienza di rimozione della biomassa autoctona presente nel suolo contaminato.

La seconda colonna, nella quale è stata prevista l'aggiunta di disinfettante al fine di inibire i processi biologici, ha consentito di ottenere indicazioni su eventuali processi di natura non biologica che possano aver comportato variazioni delle caratteristiche chimico-fisiche del campione trattato.

Infine, con la terza colonna è stato valutato l'effetto dell'aggiunta di nutrienti (biostimulation) sull'efficienza di rimozione e sullo sviluppo della biomassa autoctona. Come nutrienti sono state utilizzate soluzioni di Cloruro di Ammonio (NH_4Cl) e Idrogeno-Fosfato di Potassio (K_2HPO_4) dosati per ottenere un rapporto C:N:P pari a 100:10:1.

L'aerazione è stata mantenuta attiva per tutta la durata della sperimentazione con una portata di 0,6 l/min. L'impianto di alimentazione dell'acqua è stato invece attivato solo all'occorrenza, in modo da garantire valori dell'umidità del terreno all'interno del range 60-80% della capacità idrica di campo, con irrorazione dall'alto di acqua nella prima colonna, acqua e disinfettante nella seconda, acqua e nutrienti nella terza.

3.2.2.2 Protocollo analitico

La durata dell'attività sperimentale è stata di 150 giorni, durante i quali sono stati periodicamente prelevati dei campioni di terreno da ogni colonna, con frequenza media di 30 giorni, utilizzati per la determinazione della concentrazione degli idrocarburi e per l'esecuzione dei test di fitotossicità, utilizzando gli stessi protocolli analitici descritti precedentemente per i test di biotrattabilità su microcosmo.

Inoltre, allo scopo di eseguire un bilancio di massa, per ciascuna delle tre colonne è stata misurata, con frequenza media settimanale, la portata ponderale di idrocarburi presente negli off gas, come prodotto della portata di gas in uscita per la relativa concentrazione di idrocarburi. È stato così possibile calcolare la massa di

contaminante persa per volatilizzazione come integrale nel tempo della portata ponderale per ogni intervallo tra due campagne di misura successive. Per determinare la portata di gas è stato utilizzato un anemometro a filo caldo (Figura 3.16), mentre la concentrazione di idrocarburi è stata determinata mediante GASTEC ® MK III (Figura 3.17).



Figura 3. 16. Anemometro a filo caldo



Figura 3. 17. GASTEC ® MK III, rilevatore a ionizzazione di fiamma (FID) portatile

3.3 Analisi dei risultati

3.3.1 Test in microcosmo

3.3.1.1 Concentrazione idrocarburi C10-C40

Gli andamenti nel tempo della concentrazione di Idrocarburi C10-C40 relativi ai microcosmi di tipologia A e B sono riportati in Figura 3.18 e in Figura 3.19, mentre in Figura 3.20 viene riportato l'andamento delle efficienze di rimozione per ognuno dei sei microcosmi.

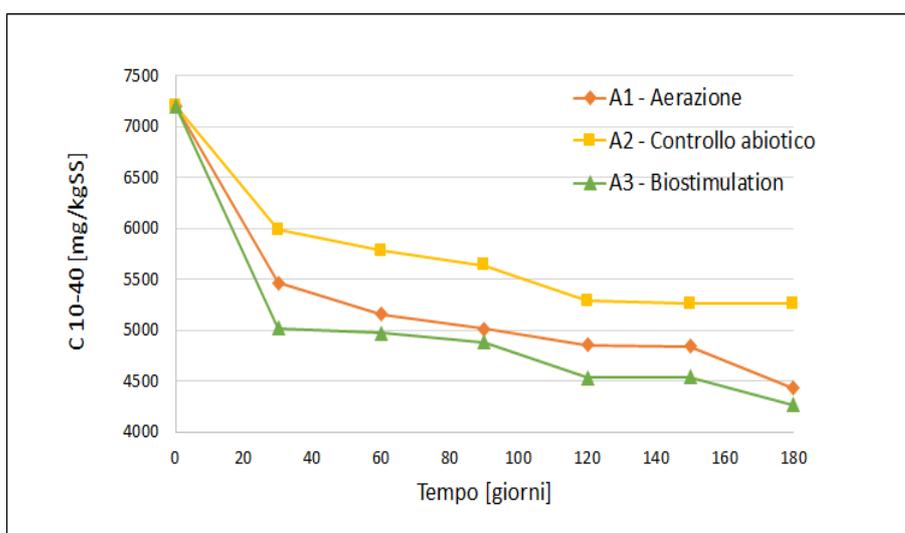


Figura 3. 18. Andamento della concentrazione di Idrocarburi C10-C40 nei microcosmi di tipo A

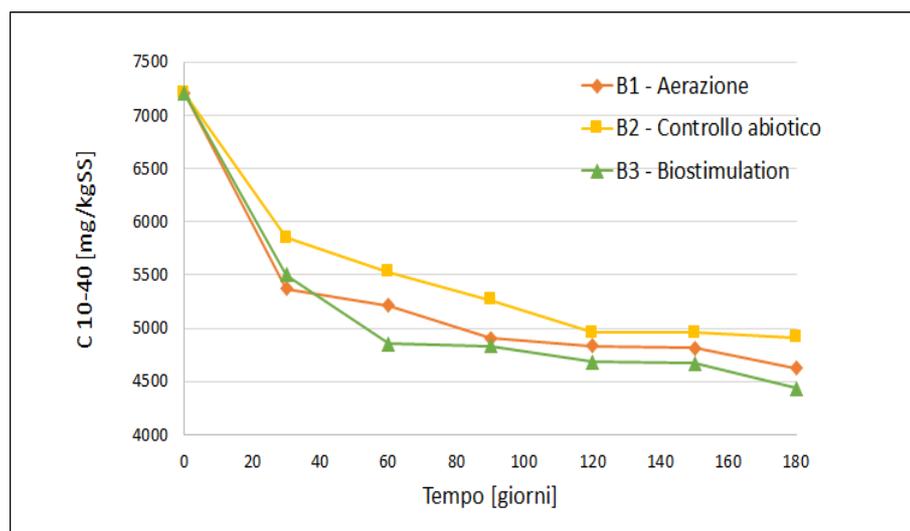


Figura 3. 19. Andamento della concentrazione di Idrocarburi C10-C40 nei microcosmi di tipo B

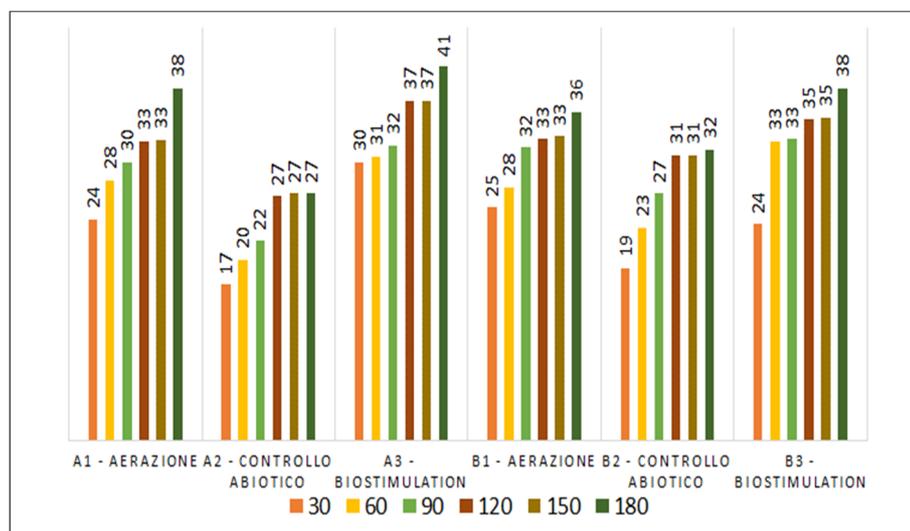


Figura 3. 20. Andamento dei rendimenti di rimozione nei test in microcosmo

Tutti i microcosmi hanno mostrato una progressiva riduzione della concentrazione del contenuto di idrocarburi; inoltre, nella colonna relativa al controllo abiotico la riduzione è stata inferiore a quella rilevata nelle rimanenti due configurazioni. Tale risultato porta a pensare che i maggiori rendimenti raggiunti in tali due configurazioni siano dovuti ad un processo biologico in atto.

La configurazione di biostimulation ha raggiunto efficienze migliori rispetto a quella con semplice aerazione, sia nei microcosmi di tipo A che nei microcosmi di tipo B, anche se nei primi tale andamento è risultato più marcato rispetto a quello dei secondi. Questa differenza potrebbe essere dovuta ad un migliore contatto tra popolazione batterica, ossigeno e nutrienti dovuto alle operazioni di miscelazione previste solo nei microcosmi di tipo A (Manning et al., 1995). Ciò sembrerebbe confermato dal fatto che nel microcosmo A3 sono stati ottenuti rendimenti leggermente superiori rispetto al B3 dopo i 120 giorni di biostimulation. L'inoculo del mix di batteri HC degradanti, dopo una prima fase stazionaria verosimilmente dovuta all'acclimatazione della popolazione batterica, ha fatto registrare una ripresa dell'attività degradativa. Probabilmente, prolungando la sperimentazione sarebbe stato possibile apprezzare meglio tale risultato.

3.3.1.2 Indice di germinazione e pH

La Figura 3.21 mostra l'indice di germinazione del suolo iniziale e dei campioni prelevati dai microcosmi A1 (a), A3 (b), B1 (c) e B3 (d) tra la biostimulation e la bioaugmentation (120 giorni) e al termine del periodo di sperimentazione (180 giorni).

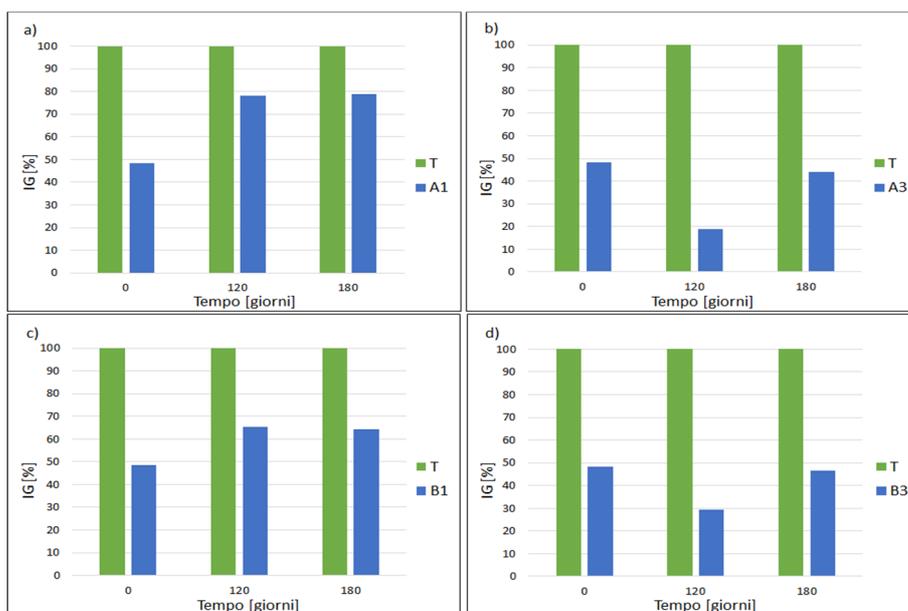


Figura 3. 21. Andamento degli indici di germinazione nelle configurazioni A1 (a), A3 (b), B1 (c) e B3 (d)

L'esame della figura evidenzia che le configurazioni di semplice aerazione e di biostimulation hanno avuto effetti diversi sulla fitotossicità del suolo. Nelle configurazioni di aerazione (A1 e B1) la riduzione della concentrazione di idrocarburi ha causato l'incremento dell'indice di germinazione del suolo rispetto al suolo non trattato già dopo i primi 120 giorni. Nelle configurazioni di biostimulation (A3 e B3) invece l'indice di germinazione è diminuito sensibilmente durante la prima fase del trattamento, evidenziando così un aumento della fitotossicità del suolo nonostante i maggiori rendimenti di rimozione degli Idrocarburi; solo alla fine dei 180 giorni di trattamento è stato rilevato un miglioramento del valore dell'IG, verosimilmente per effetto dell'ulteriore riduzione della concentrazione di idrocarburi, che ha raggiunto valori confrontabili con quelli del suolo non trattato. L'iniziale peggioramento della fitotossicità registrato nei microcosmi A3 e B3 potrebbe essere legato al differente andamento del pH nelle configurazioni di biostimulation rispetto a quelle di semplice aerazione (Figura 3.22).

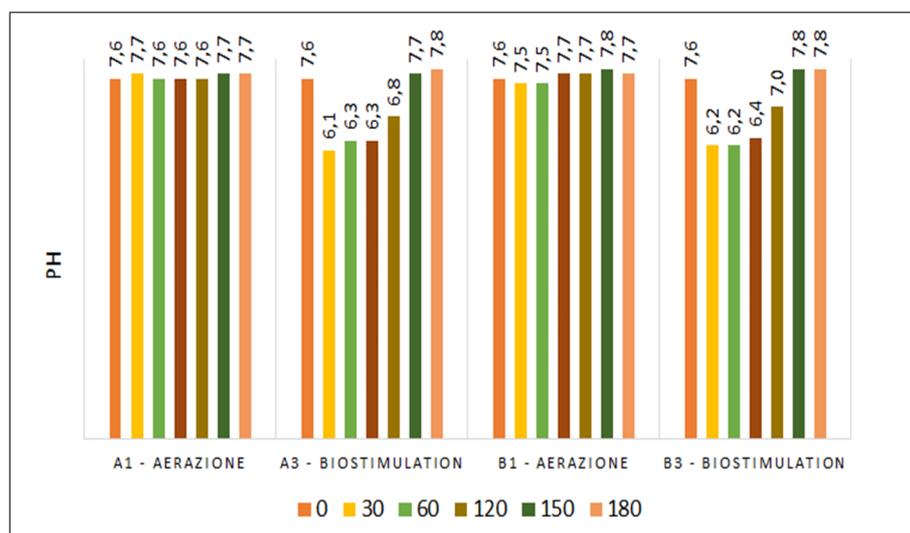


Figura 3. 22. Andamento del pH nei microcosmi A1, A3, B1e B3

Nelle configurazioni di semplice aerazione il valore del pH è rimasto pressoché costante durante tutta la durata della sperimentazione. Nelle configurazioni A3 e B3 esso ha invece registrato una leggera diminuzione subito dopo l'aggiunta dei nutrienti, tornando a valori simili a quelli del suolo iniziale alla fine della sperimentazione.

Studi di letteratura hanno mostrato che il pH rappresenta uno dei fattori principali nella determinazione delle solubilità dei metalli e che in particolare essa è molto bassa in condizioni alcaline (pH=8) e aumenta al diminuire del pH (Chuan et al., 1995; Martinez and Motto, 1999). La riduzione del pH, seppure lieve, potrebbe aver

favorito la mobilitazione dei metalli presenti nel suolo e la loro solubilizzazione in acqua durante la conduzione dei test di fitotossicità. Numerosi studi hanno infatti evidenziato la correlazione tra la concentrazione dei metalli e la riduzione della germinazione di diverse specie di piante (Li et al., 2005; Sethy et al., 2013; Bae et al., 2016; Baruah et al., 2019) In ogni caso tutti i valori assunti dal pH durante la sperimentazione sono compresi tra 6 – 8, range ottimale per i processi biologici.

3.3.1.3 Evoluzione della comunità microbica

Sia per i microcosmi di tipo A che di tipo B il rendimento di rimozione maggiore è stato ottenuto nella configurazione di biostimulation. Per questo motivo si è deciso di analizzare la composizione delle comunità batteriche tramite sequenziamento NGS-IlluminaMiseq del DNA metagenomico estratto dal suolo dei due microcosmi dopo 120 giorni di biostimulation.

Dopo 120 giorni di biostimulation, le analisi metagenomiche hanno evidenziato differenze significative tra le comunità microbiche dei due diversi tipi di trattamento, sia in termini di composizione che di abbondanza relativa dei taxa (Figura 3.23).

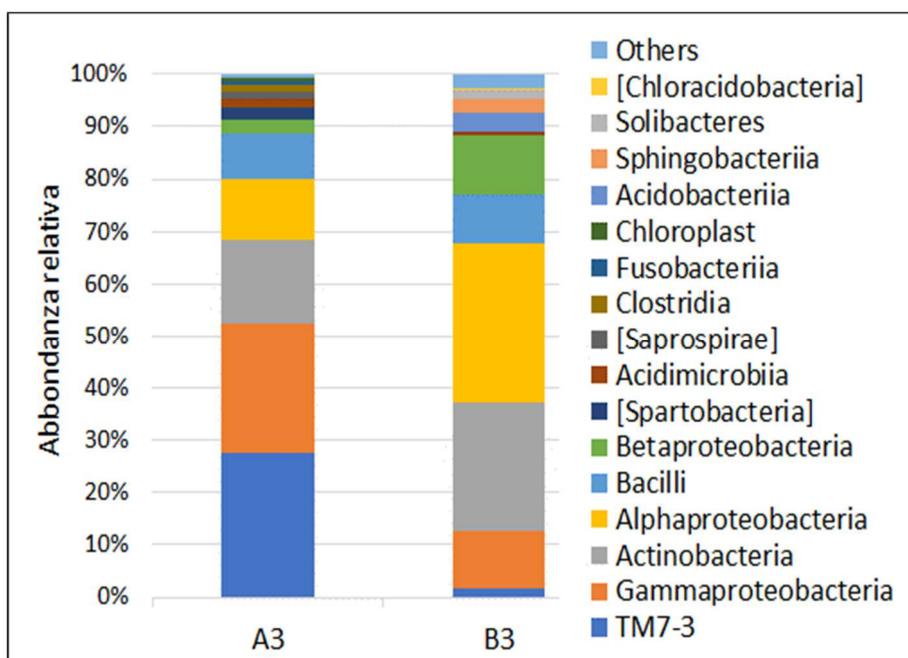


Figura 3. 23. Abbondanza relativa delle varie classi batteriche rilevate nei suoli delle configurazioni A3 e B3 dopo 120 giorni di biostimulation

Nel microcosmo A3 si osserva una predominanza delle classi di Gammaproteobacteria e TM7. Nel microcosmo B3 (aerazione forzata), invece, è stata rilevata una maggiore abbondanza relativa di Actinobacteria, Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria, che risultano le classi predominanti.

A livello di Genere (Figura 3.24), nella composizione microbiologica del microcosmo A3 si osserva una maggiore diversità di batteri affiliati a generi noti per degradare idrocarburi, tra questi troviamo: *Enhydrobacter*, *Propiniobacterium* *Staphylococcus*, *Acinetobacter* e *Pseudoxanthomonas*.

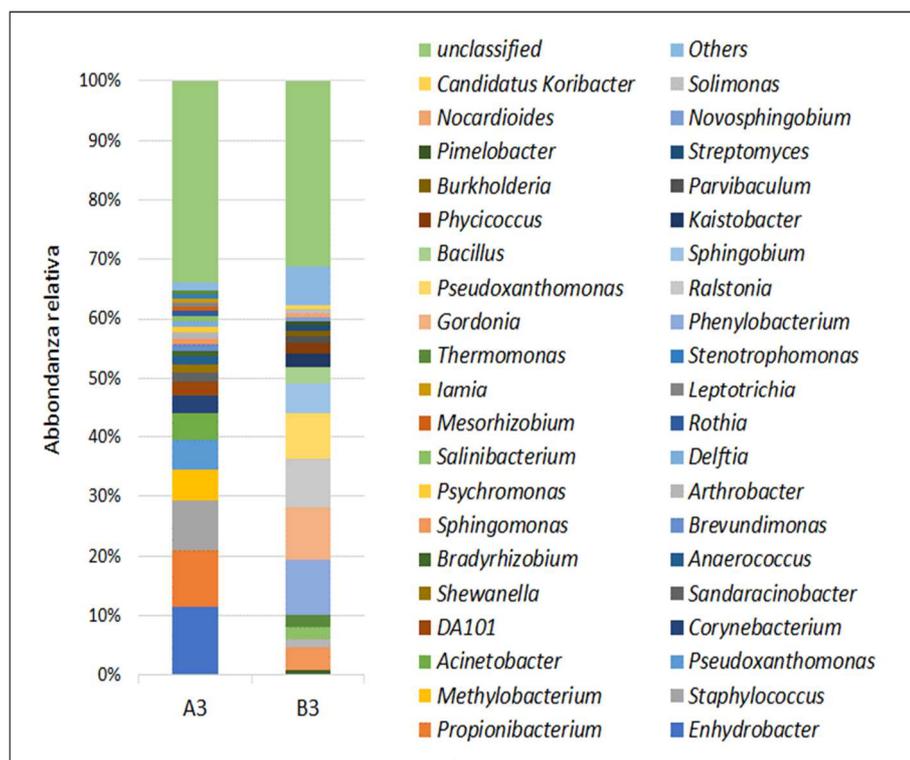


Figura 3. 24. Abbondanza relativa dei differenti generi rilevati nei suoli delle configurazioni A3 e B3 dopo 120 giorni di biostimulation

Questi generi sono stati identificati in suoli contaminati da idrocarburi, e altri autori hanno evidenziato un incremento in termini di abbondanza relativa in seguito a trattamenti di biostimolazione (Al-Kindi et al., 2016). Inoltre, si riscontra anche una elevata abbondanza relativa di microrganismi del genere *Methylobacterium*, noto per crescere in ambienti in cui vi è una forte attività da parte dell'enzima metano

monossigenasi; suggerendo che questo microrganismo sfrutti il metano come fonte di energia (Patel et al., 1982).

Nel microcosmo B3 si osserva una elevata abbondanza relativa di *Pseudoxanthomonas* e *Ralstonia*, noti per le loro capacità di degradare gli idrocarburi e produrre biotensioattivi, che favoriscono la biodisponibilità dei contaminanti. Altro genere con una elevatissima abbondanza è il *Phenylobacterium*, noto per essere un degradatore di composti policiclici aromatici, come l'antrachinone, e di altri composti complessi (Rodgers-Vieira et al., 2015; Singleton et al., 2016). Anche il genere *Gordonia* è risultato particolarmente abbondante. Questo genere è noto per degradare n-alcani a catena media e lunga ed è stato identificato più volte in suoli contaminati da idrocarburi (Franzetti et al., 2008; Quatrini et al., 2008). Infine, sebbene con una minore abbondanza relativa, risultano presenti batteri appartenenti ai generi di *Kaistobacter*, *Sphingobium*, *Sphingomonas* e *Bacillus*.

La Figura 3.25 riporta invece il confronto tra la composizione delle comunità batteriche nei microcosmi A3 e B3 dopo 120 giorni di biostimulation e quella del suolo non trattato a livello di classe.

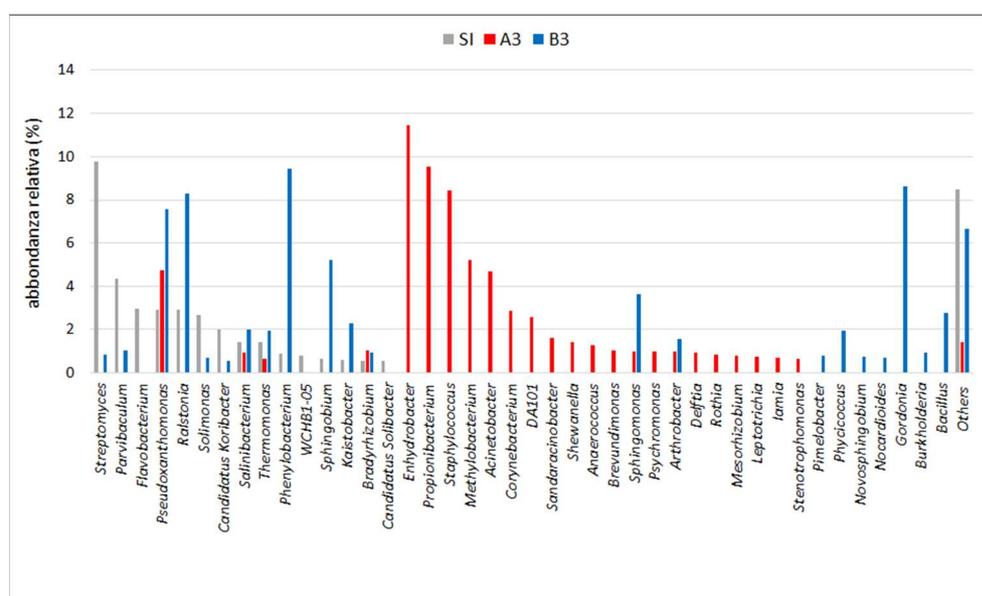


Figura 3. 25. Abbondanza relativa delle varie classi nel suolo non trattato e nelle configurazioni A3 e B3 dopo 120 giorni di biostimulation

In entrambi i casi, la biostimulation ha provocato uno shift nella composizione batterica del suolo. Le classi di Acidobacteria, TM7-1 e Sphingobacteria mostravano una discreta abbondanza relativa nel suolo iniziale, mentre la loro percentuale si è

drasticamente ridotta dopo la biostimulation. Al contrario l'abbondanza relativa di Actinobacteria e Alphaproteobacteria, considerati microorganismi con elevata efficienza di degradazione degli idrocarburi, è nettamente aumentata, in particolare nel microcosmo B3. I Gammaproteobacteria, invece, mostrano una notevole predominanza nel microcosmo A3, mentre in B3 si osserva una percentuale di abbondanza relativa molto simile al suolo senza interventi di biostimolazione. L'abbondanza dei Betaproteobacteria aumenta nel microcosmo B3 e diminuisce nel microcosmo A3, mentre l'abbondanza di TM7-3 aumenta notevolmente in A3 ma diminuisce in B3. Infine, la classe dei Bacilli aumenta notevolmente in entrambe le configurazioni.

La figura 3.26, che riporta l'abbondanza relativa dei generi, fornisce ulteriore conferma dello shift della composizione della popolazione microbica dopo il trattamento.

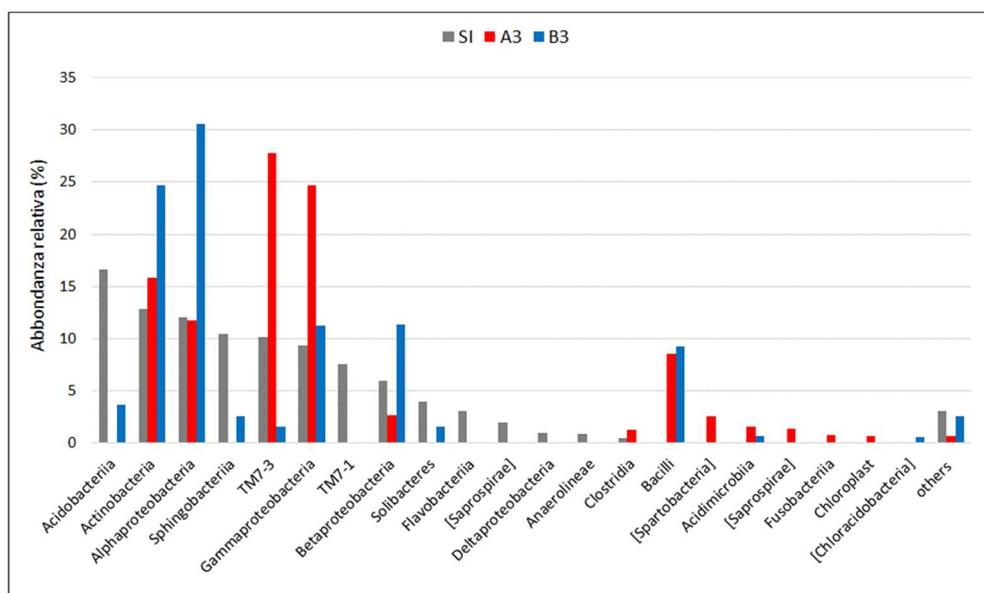


Figura 3. 26. Abbondanza relativa dei vari generi nel suolo non trattato e nelle due configurazioni A3 e B3 dopo 120 giorni di biostimulation

Osservando il grafico possiamo notare la scomparsa di alcuni generi come *Streptomyces*, *Parvibaculum*, *Flavobacterium*, *Candidatus Koribacter* e *Solimonas*, che erano presenti nel suolo iniziale ma che scendono sotto la soglia di rilevamento in seguito alla biostimulation. Inoltre, è possibile notare come molti generi presenti nel suolo non trattato si ritrovino solamente nel microcosmo B3 e, in alcuni casi, addirittura con un netto incremento di abbondanza relativa, come nel caso di *Ralstonia*.

3.3.1.4 Verifica della presenza dei batteri hc degradanti inoculati nel suolo alla fine della bioaugmentation

Per valutare la sopravvivenza dei batteri idrocarburo ossidanti inoculati sono stati isolati e caratterizzati tassonomicamente mediante amplificazione e sequenziamento del gene 16S rRNA i ceppi batterici capaci di crescere su n-alcane come unica fonte di carbonio dal suolo finale delle configurazioni A3 e B3.

Le analisi filogenetiche hanno confermato la presenza di batteri idrocarburo-ossidanti appartenenti a due dei tre generi inoculati: *Gordonia amicalis* e *Nocardia cyriacigeorgica*, suggerendo che questi batteri idrocarburo-ossidanti siano sopravvissuti e siano cresciuti durante il trattamento (Tabella 3.4)

Tabella 3. 4 Identificazione tassonomica dei ceppi batterici isolati dai microcosmi A3 e B3 alla fine del trattamento

Isolato	Sequenza (bp)	Sequenza con maggiore similarità	Similarità	Accession Number
1	1175	<i>Gordonia amicalis</i>	99%	NR_028735.1
2	1138	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	99%	NR_117334.1
3	1210	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	99%	NR_113748.1
4	1411	<i>Mycolicibacterium vanbaalenii</i>	99%	NR_074572.1

Oltre alla presenza di specie inoculate, le analisi filogenetiche mostrano anche la presenza di *Paenibacillus glucanolyticus* e *Mycolicibacterium vanbaalenii*, noti per la capacità di degradare idrocarburi policiclici aromatici (Ghafari et al., 2019; Yang et al., 2021).

3.3.2 Test in colonna

3.3.2.1 Concentrazione idrocarburi C10-C40

Gli andamenti nel tempo della concentrazione di Idrocarburi C10-C40 relativi alle tre configurazioni dei test in colonna sono riportati in Figura 3.27, mentre in Figura 3.28 viene riportato l'andamento delle efficienze di rimozione.

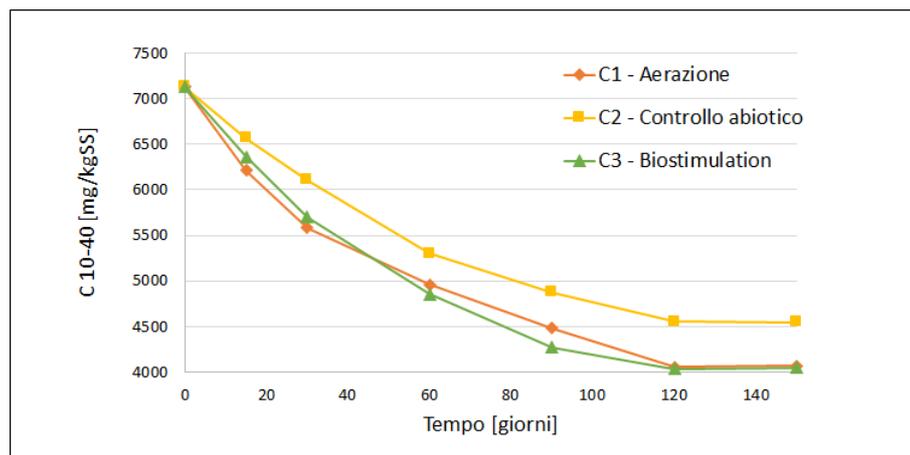


Figura 3. 27. Andamento della concentrazione di Idrocarburi C10-C40 nei test in colonna

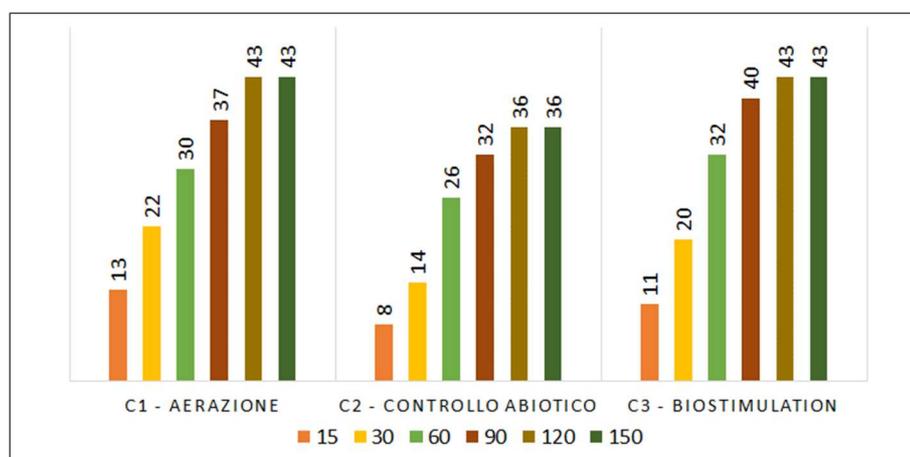


Figura 3. 28. Andamento delle efficienze di rimozione nei test in colonna

Analogamente a quanto osservato per i microcosmi, la concentrazione di idrocarburi si è ridotta in tutte e tre le configurazioni e, anche in questo caso, la riduzione minore è stata osservata nel controllo abiotico. Questi risultati sembrano confermare la presenza di un processo biologico in atto che ha comportato rendimenti di rimozione superiori nelle altre due configurazioni. In questo caso però, l’aggiunta di nutrienti non ha comportato un sensibile miglioramento del rendimento di rimozione nella configurazione C3. Ciò potrebbe essere dovuto alla modalità di dosaggio della soluzione di acqua e nutrienti. Infatti, la soluzione immessa dall’alto subito dopo il

riempimento della colonna potrebbe aver dato luogo ad una distribuzione non uniforme dei nutrienti.

3.3.2.2 Incidenza dei percorsi di rimozione (volatilizzazione vs biodegradazione)

Durante la sperimentazione in colonna sono stati inoltre periodicamente monitorati i gas in uscita mediante la misura della portata e della concentrazione di idrocarburi. Dall'analisi della componente aeriforme e dall'elaborazione congiunta delle misure di TPH in fase solida, è stato possibile eseguire un bilancio di massa relativo a ciascuna delle tre configurazioni (Figura 3.29).

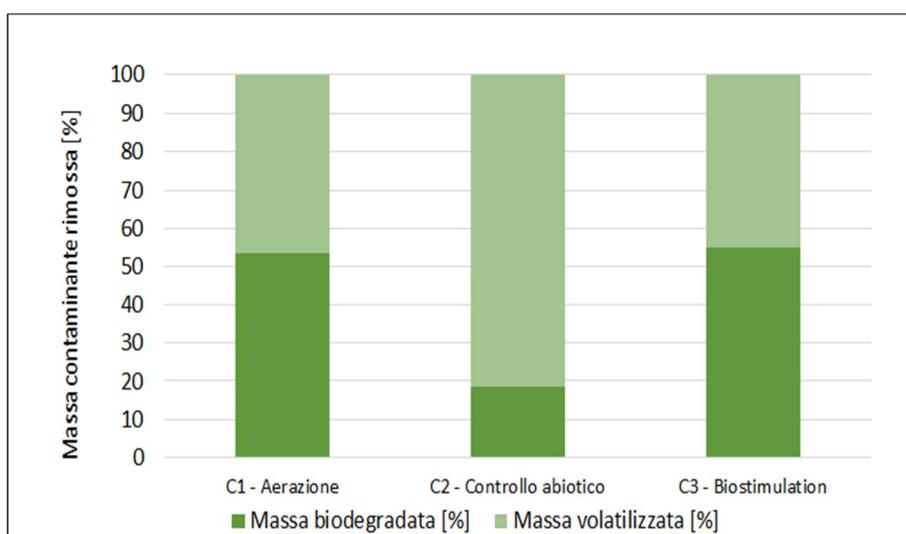


Figura 3. 29. Incidenza della biodegradazione e della volatilizzazione

Dall'analisi dei risultati è possibile notare come l'incidenza della volatilizzazione sia risultata maggiore nel controllo abiotico rispetto alle altre due configurazioni. Ciò sembrerebbe confermare la presenza di un processo biologico in atto che abbia significativamente contribuito a migliorare l'efficienza di rimozione nelle configurazioni di aerazione e biostimulation.

Inoltre, dai risultati ottenuti è possibile osservare una inaspettata incidenza della biodegradazione nel controllo abiotico, anche se inferiore rispetto alle altre due configurazioni. Questo effetto potrebbe essere legato alla modalità di dosaggio di acqua e ipoclorito all'interno della colonna. Infatti, la soluzione immessa dall'alto subito dopo il riempimento della colonna potrebbe non essere riuscita a raggiungere

per percolazione tutti i punti del terreno, determinando una sterilizzazione solo parziale.

3.3.2.3 Indice di germinazione

La Figura 3.30 mostra l'indice di germinazione valutato nel suolo iniziale e nei campioni prelevati dai microcosmi C1 (a) e C3 (b) al termine del periodo di sperimentazione (150 giorni).

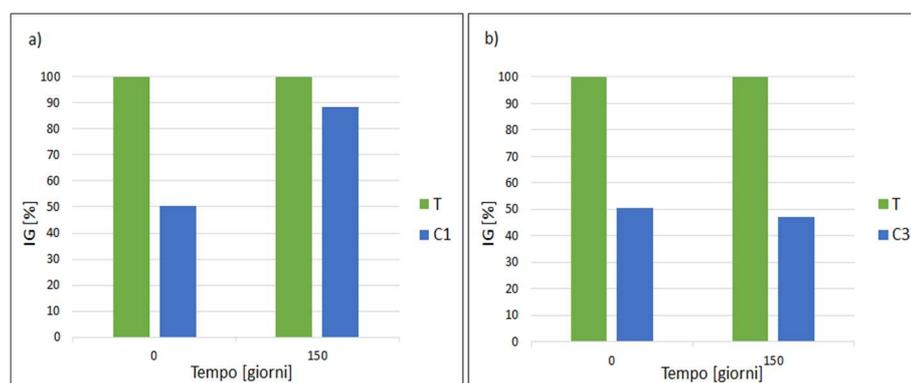


Figura 3. 30. Andamento degli indici di germinazione nelle configurazioni C1 (a), C3 (b)

L'esame della figura evidenzia che anche in questo caso, analogamente a quanto osservato nei microcosmi, la configurazione con sola aerazione e quella con biostimulation hanno avuto effetti diversi sulla fitotossicità del suolo. Nella configurazione C1 la riduzione della concentrazione di idrocarburi ha causato l'incremento dell'indice di germinazione del suolo rispetto al suolo non trattato, mentre nella configurazione C3 l'IG si è mantenuto su valori confrontabili con quelli del suolo non trattato. Ciò sembrerebbe confermare che l'aggiunta della soluzione di nutrienti abbia causato un iniziale incremento della fitotossicità del suolo, che è comunque tornata a valori simili a quelli del suolo non trattato dopo il consumo degli stessi da parte della popolazione idrocarburo degradante.

Capitolo 4 – Valutazione dell'effetto sinergico tra piante, simbionti microbici e batteri idrocarburo-degradanti: test di rizoremediation in vaso

4.1 Introduzione

L'obiettivo della terza fase della sperimentazione è stato quello di valutare l'eventuale effetto sinergico tra comunità batteriche idrocarburo degradanti, autoctone e inoculate, e le piante nella bioremediation di un suolo contaminato da idrocarburi C10-C40. A tale scopo sono state allestite delle colture in vaso dove sono stati effettuati test di rizoremediation utilizzando piante con rizosfera "potenziata". La specie indagata è il *Cytisus scoparius*, comunemente chiamato Ginestra dei Carbonai, una pianta arbustiva appartenente alla specie delle leguminose, molto diffusa in diverse zone di Italia e che si adatta a molti tipi di terreno.

4.2 Materiali e metodi

4.2.1 Terreni di coltura

4.2.1.1 Yeast-extract mannitol (YM)

È un terreno indicato per la coltivazione di batteri *Rhizobium* (Tabella 2.1).

Tabella 2. 14. Composizione suolo Yeast-extract mannitol

Yeast extract	1	g/l
Mannitol	10	g/l
Dipotassium phosphate	0,50	g/l
Magnesium sulphate	0,20	g/l
Sodium chloride	0,10	g/l

Preparazione:

Sospendere in 1 litro di H₂O distillata.
Sterilizzare in autoclave a 121° a 1 atm per 20 minuti.
Per ottenere il terreno solido aggiungere Bacto Agar (15 g/l)

4.2.2 Installazione sperimentale

Le colture in vaso (Figura 4.1) sono state allestite in un'area esterna del laboratorio di Ingegneria Sanitaria Ambientale "Prof. Luigi Gagliardi" del Dipartimento di Ingegneria dell'Università degli Studi di Palermo.

Sono state allestite tre configurazioni:

- 1) di controllo (K);
- 2) solo pianta (SP);
- 3) configurazione completa (CC).



Figura 4. 1. Allestimento delle colture in vaso

La prima configurazione era costituita solamente dal suolo contaminato. Essa ha avuto l'obiettivo di valutare la capacità di degradazione della comunità autoctona presente nel suolo contaminato.

Nella seconda configurazione sono stati invece seminati quattro semi di *Cytisus*. Tale configurazione ha avuto l'obbiettivo di valutare la crescita e l'adattamento della pianta al suolo contaminato, oltre che l'eventuale sinergia tra la pianta e i batteri idrocarburo degradanti autoctoni.

La terza configurazione, definita completa, ha previsto invece la piantumazione di *Cytisus* e la costituzione di una "rizosfera potenziata". A tale scopo sono stati

aggiunti dei funghi micorrizici commerciali sotto forma di granuli (Figura 4.2), che favoriscono lo sviluppo dell'apparato radicale, incrementando la capacità di assorbimento di acqua e nutrienti.



Figura 4. 2. Inoculo dei funghi micorrizici

Inoltre, sono stati inoculati dei rizobi simbiotici di leguminose arbustive mediterranee (Quatrini et al., 2002; Cardinale et al., 2008) provenienti dalla ceppoteca del laboratorio di Microbiologia Ambientale ed Ecologia Microbica del Dipartimento STEBICEF dell'Università di Palermo. Questi batteri simbiotici sono responsabili della fissazione biologica dell'azoto molecolare e, quindi, capaci di trasformare l'azoto atmosferico in una forma facilmente assimilabile per le piante. L'inoculo era costituito da due rizobi isolati da specie di leguminose siciliane (Tabella 4.2).

Tabella 4. 1. Batteri rizobi utilizzati per l'inoculo

Nome del Ceppo	Rif. bibliografico
<i>Bradyrhizobium SjCL4</i>	Cardinale et al., 2008
<i>Bradyrhizobium SjCL30</i>	Cardinale et al., 2008

Per ognuno dei due ceppi batterici è stato preparato un pre-inoculo, trasferendo una singola colonia in 3 ml di terreno YMB. I pre-inoculi sono stati incubati a 30°C per 48 ore in agitazione a 160 rpm. La crescita è stata valutata in termini di torbidità prendendo come riferimento un controllo contenente solo il terreno. Dopo il periodo di incubazione, l'1% di preinoculo è stato trasferito in beute contenenti 50 ml di terreno YMB. Le colture liquide (Figura 4.3) sono state incubate nelle condizioni già descritte.



Figura 4. 3. Colture batteriche degli isolati *Bradyrhizobium SjCL4* e *SjCL30* inoculate in vaso

Al termine del periodo di incubazione le due colture sono state trasferite in un'unica beuta al fine di creare una miscela da inoculare in vaso. In particolare, è stato inoculato 1 ml di miscela per ogni seme.

Infine, è stato inoculato lo stesso mix di batteri idrocarburo degradanti già descritto nel Capitolo 3 (Figura 4.4). In particolare, sono stati eseguiti due inoculi, sia per i batteri idrocarburo ossidanti che per i rizobi. Il primo inoculo è stato eseguito subito dopo la germinazione delle piante, mentre il secondo dopo circa 7 mesi (giugno-luglio 2021) in concomitanza con l'incremento delle temperature esterne.



Figura 4. 4. Inoculo dei batteri *rhizobium* e idrocarburo degradanti

In totale sono stati allestiti 15 vasi, 7 per la configurazione completa, 5 per la configurazione solo pianta e 3 per la configurazione di controllo.

4.2.3 Protocollo analitico

La durata della sperimentazione è stata di 10 mesi, da novembre 2020 a settembre 2021, durante i quali sono stati periodicamente misurati alcuni parametri di crescita delle piante, al fine di valutarne la crescita e lo sviluppo su suolo contaminato in condizioni “normali” (configurazione SP) e di “rizosfera potenziata” (configurazione CC).

Al fine di valutare le efficienze di rimozione delle tre configurazioni sono state monitorate le concentrazioni di idrocarburi C10-C40. Alla fine della sperimentazione sono stati inoltre effettuati dei test di fitotossicità, per valutare se a una riduzione della concentrazione di idrocarburi si fosse associato un miglioramento della qualità del suolo. Le procedure utilizzate sono le stesse descritte al Capitolo 3.

Infine, sono state verificate le condizioni di rizosfera potenziata analizzando le radici delle piante appartenenti alla configurazione completa a fine sperimentazione. In particolare, l'effetto dei batteri rhizobium è stato valutato mediante verifica della formazione dei noduli radicali, mentre l'effetto la micorrizzazione è stata valutata mediante colorazione dei campioni delle radici in tripiano blu secondo la procedura standard di Philips e Hayman (1970).

Le principali fasi operative per l'individuazione delle simbiosi endomicorriziche sono:

- 1) Pulizia approfondita dei campioni radicali in sottili pezzetti lunghi 2-3 cm e spessi non più di 0.5-1 mm. Dopo la pulitura le radici vengono conservate in acqua di rubinetto e in frigo a 4°C circa. Le radici devono essere poste in provette con la possibilità di essere chiuse;
- 2) Decolorazione delle radici: i tempi consigliati sono 15'. La soluzione deve essere al 10% di KOH a 90°C, a ebollizione sotto cappa chimica, su piastra riscaldante. Infine, bisogna sciacquare ripetutamente 5 volte utilizzando un comune colino da cucina;
- 3) Per permettere che il colorante venga fissato alle strutture micorriziche è necessaria l'acidificazione, per 10' in soluzione al 2% in HCL a temperatura ambiente. Dopo il trattamento in acido, si deve eliminare solo la soluzione acida senza risciacquare in acqua;
- 4) Per evidenziare l'infezione fungina si esegue la colorazione dei campioni delle radici in tripiano blu al 0.05% con glicerolo per 10' a 90°C. Si elimina quindi il colorante risciacquando ripetutamente in acqua. Infine, le

radici colorate vengono immerse in acido lattico e conservate in scatole Petri in frigorifero a 4°C;

5) In ultimo viene eseguita la valutazione della micorrizzazione attraverso l'osservazione degli arbuscoli al microscopio.

4.3 Analisi dei risultati

4.3.1 Parametri di crescita delle piante

Uno dei punti cruciali delle tecniche di phytoremediation è l'adattamento della pianta alle condizioni di contaminazione. Come già anticipato, la costituzione della rizosfera potenziata può essere utile per ridurre lo stress della pianta e favorirne la crescita e lo sviluppo. Come è possibile osservare in Figura 4.5, già dopo poche settimane dalla germinazione la configurazione completa ha mostrato uno stato di salute delle piante migliore rispetto alla configurazione con le sole piante e tale differenza si è mantenuta durante tutte le fasi della sperimentazione (Figura 4.6).



Figura 4. 5. Confronto tra la configurazione SP (sx) e CC (dx) dopo circa due mesi dalla germinazione



Figura 4. 6. Confronto tra la configurazione SP (sx) e CC (dx) dopo circa sette mesi dalla germinazione

Dal mese di gennaio 2021 (due mesi dopo la semina) e fino alla fine della sperimentazione sono stati misurati con frequenza mensile, per ogni vaso e per ogni configurazione, alcuni parametri di crescita della pianta. In particolare, sono stati misurati la lunghezza del fusto principale, il numero di foglie e il numero di ramificazioni; per ogni mese è stato quindi calcolato il valore medio delle misure eseguite sui vasi relativi a ciascuna delle configurazioni esaminate (SP e CC) (Figura 4.7, 4.8 e 4.9).

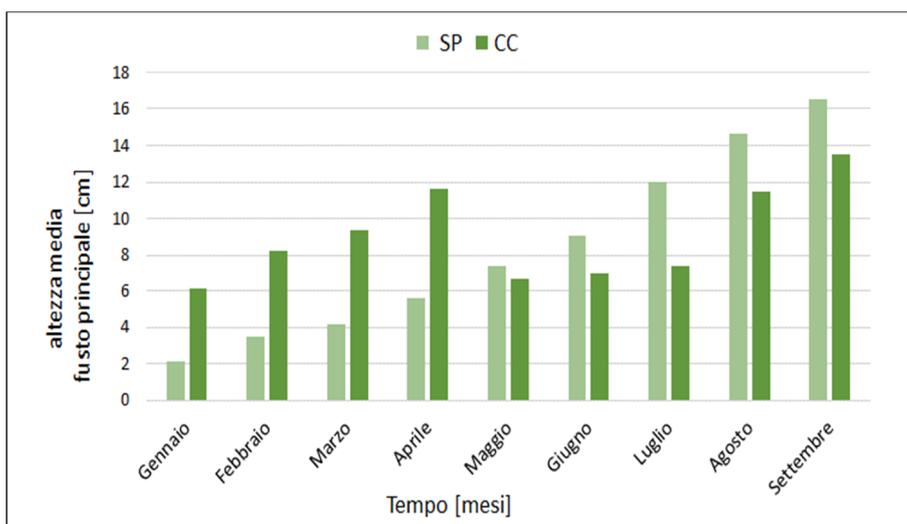


Figura 4. 7. Andamento medio mensile delle altezze del fusto principale

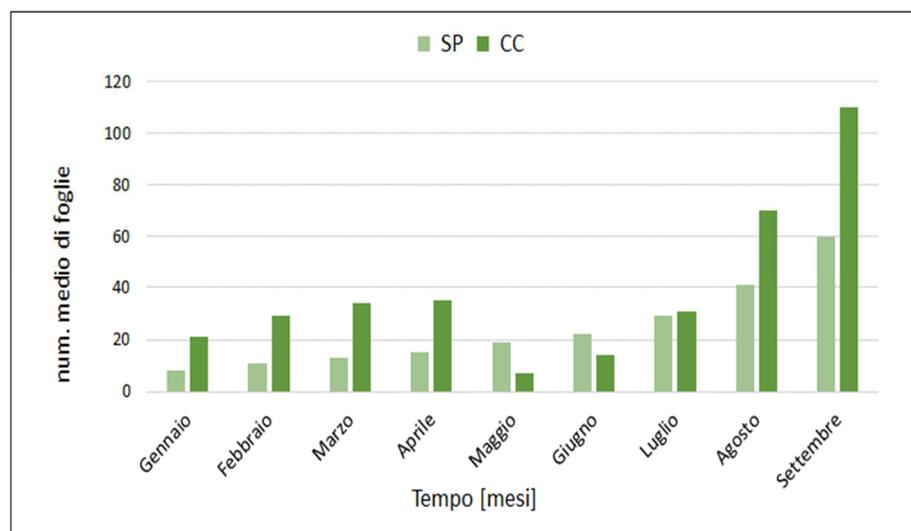


Figura 4. 8. Andamento medio mensile del numero medio di foglie

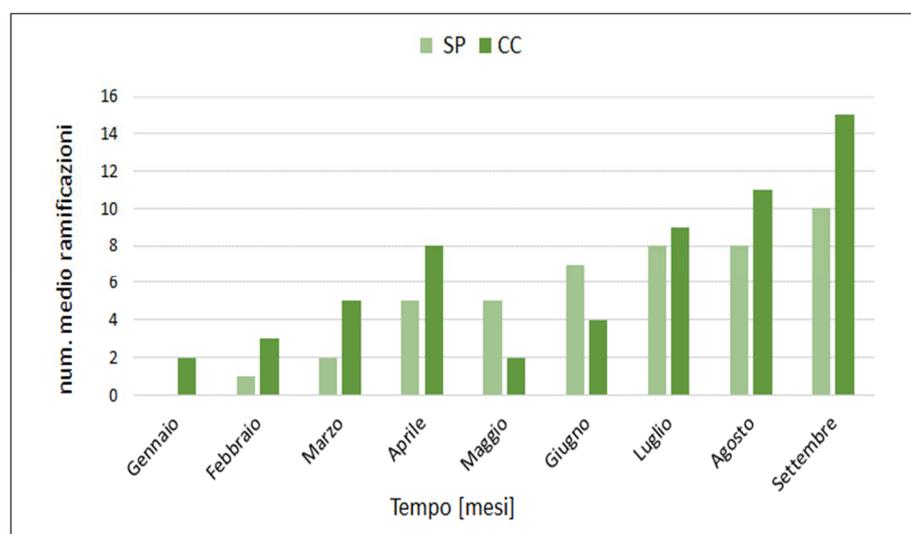


Figura 4. 9. Andamento medio mensile del numero medio di ramificazioni

L'analisi dei risultati conferma che in generale la configurazione completa ha mostrato uno stato di salute delle piante migliore rispetto alla configurazione con le sole piante. Analizzando nel dettaglio l'andamento delle altezze del fusto principale, si osserva nei primi quattro mesi di monitoraggio una crescita sia nella configurazione SP che nella configurazione CC, anche se nella seconda essa risulta maggiore.

L'esame delle figure citate evidenzia che, nel periodo compreso tra aprile e maggio 2021 si è verificato un brusco arresto della crescita dell'altezza del fusto principale nella configurazione SP e addirittura uno shift negativo nella configurazione CC. Ciò è stato provocato da un aumento significativo e repentino delle temperature dell'aria esterna a partire dal mese di marzo che ha portato a una condizione di stress delle piante (Figura 4.10).

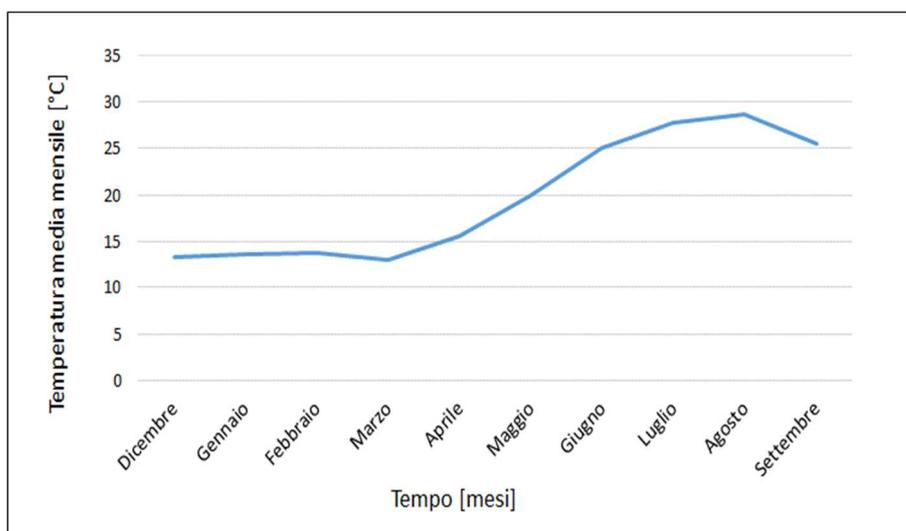


Figura 4. 10. Andamento della temperatura media mensile esterna durante la sperimentazione

La configurazione CC ha risentito maggiormente di questo fenomeno, verosimilmente a causa del maggiore sviluppo delle piante rispetto alla configurazione SP e quindi della maggiore esposizione alla temperatura esterna (Figura 4.11). Tale circostanza ha richiesto nel mese di maggio una parziale potatura delle piante della configurazione CC, accompagnata dall'incremento della frequenza di irrigazione. In seguito a ciò, si è osservata una ripresa della crescita delle piante nella configurazione CC fino alla fine della sperimentazione, quando l'altezza media del fusto principale, seppur inferiore a quello della configurazione SP, ha raggiunto un valore pari quasi al doppio rispetto a quello registrato prima del fenomeno descritto (aprile).

Anche gli andamenti degli altri dati biometrici evidenziano un arresto della crescita delle piante nella configurazione SP e uno shift negativo nella configurazione CC. Anche in questo caso, dal mese di giugno si è osservata una ripresa della crescita delle piante. Tuttavia, a differenza dell'altezza media del fusto principale, sia il numero medio di foglie che delle ramificazioni hanno raggiunto a fine

sperimentazione un valore maggiore nella configurazione CC rispetto alla configurazione SP.

Questi risultati sembrano confermare l'effetto positivo della rizosfera potenziata sulla crescita della pianta, anche in presenza di condizioni ambientali che comportano situazioni di stress.

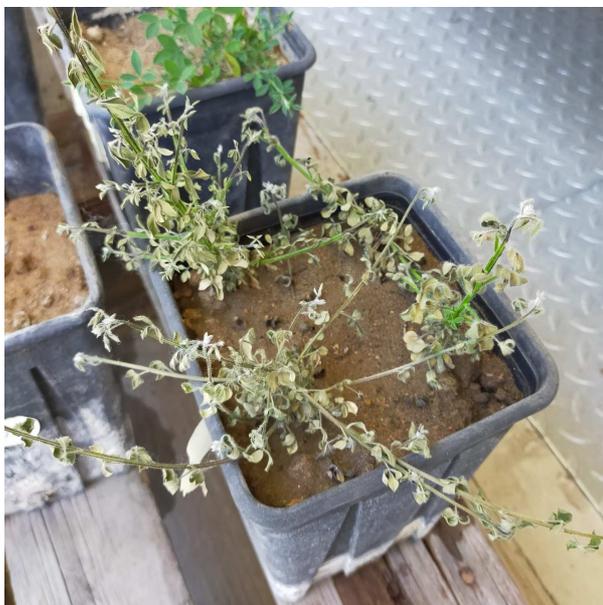


Figura 4. 11. Condizione di stress nella configurazione CC dovuta al repentino aumento delle temperature

4.3.2 Concentrazione di idrocarburi C10-C40

L'andamento della concentrazione degli idrocarburi nelle tre configurazioni è riportato in Figura 4.12, mentre in Figura 4.13 sono riportati i relativi rendimenti di rimozione. Per la configurazione completa, al fine di apprezzare al meglio l'effetto della rizosfera sul rendimento di biodegradazione, le analisi sono state svolte sia su un campione rappresentativo dei vasi (CC1) che su un campione del suolo adeso alle radici (CC2). I valori riportati nel grafico sono stati calcolati come media delle concentrazioni ottenute dall'analisi dei campioni dei diversi vasi appartenenti alla stessa configurazione.

La concentrazione di Idrocarburi C10-C40 delle tre configurazioni all'inizio della sperimentazione era di circa 5400 mg/kg_{SS}. A partire da tale valore si è osservata una riduzione del tempo della concentrazione in tutti i campioni analizzati. In particolare, la configurazione K relativa al controllo è quella che ha avuto a fine sperimentazione

il valore di concentrazione più alto di concentrazione. I due campioni relativi alla configurazione completa hanno invece raggiunto concentrazioni più basse, con una sensibile differenza tra il suolo rappresentativo dell'intero vaso e il suolo prelevato in prossimità delle radici. La configurazione SP, che ha previsto la sola piantumazione delle piante, ha invece raggiunto una concentrazione finale inferiore rispetto al controllo, ma superiore rispetto alla configurazione completa.

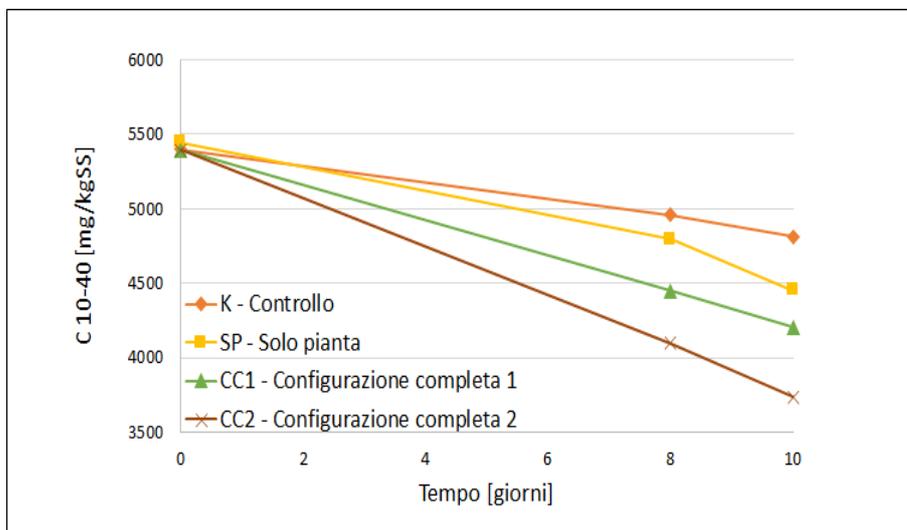


Figura 4. 12. Andamento nel tempo dalla concentrazione di idrocarburi nelle diverse configurazioni

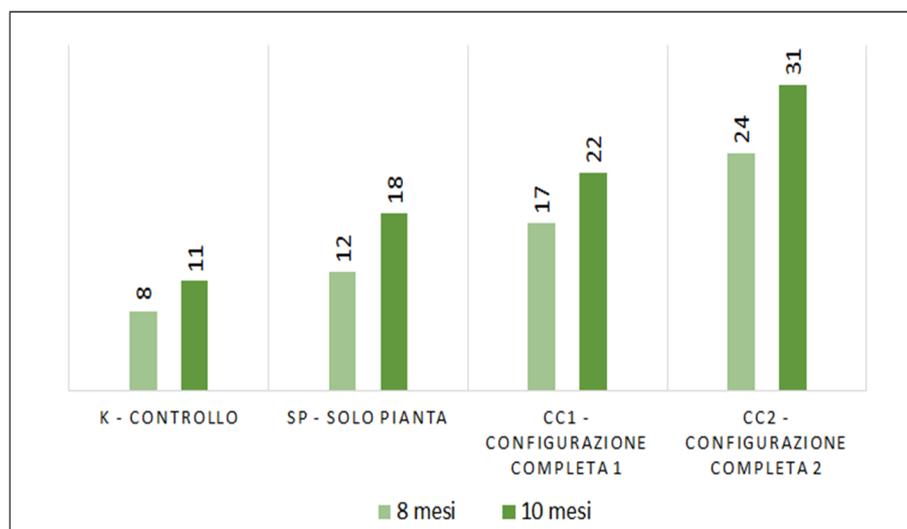


Figura 4.13. Andamento dei rendimenti di rimozione degli idrocarburi nelle diverse configurazioni a 8 e a 10 mesi di sperimentazione

L'esame della Figura 4.13 consente di notare come già nella configurazione SP sia stato raggiunto un rendimento di rimozione superiore rispetto a quello della configurazione di controllo. Ciò porta a pensare che la pianta abbia favorito l'attività degradativa della popolazione autoctona idrocarburo ossidante, confermando un effetto benefico dovuto alla sinergia tra piante e batteri nella rizosfera. Nella configurazione completa, la costituzione della rizosfera potenziata e l'inoculo del mix di batteri idrocarburo ossidanti hanno permesso di raggiungere un rendimento di rimozione pari al doppio rispetto alla configurazione di controllo. L'effetto benefico della rizosfera potenziata viene messo in evidenza dal maggior rendimento di rimozione ottenuto in prossimità delle radici, pari a quasi tre volte quello della configurazione di controllo. Tuttavia, il massimo rendimento di rimozione ottenuto si attesta attorno al 30%, al di sotto delle aspettative di progetto. Tale risultato potrebbe però essere attribuito al rialzo termico dell'aria ambiente verificatosi nel mese di maggio e già discusso nel paragrafo precedente. Infatti, la condizione di stress così determinatasi, oltre a danneggiare le piante, potrebbe aver inibito o arrestato l'attività batterica delle popolazioni HC degradanti.

4.3.3 Indice di germinazione

La Figura 4.14 mostra il confronto tra l'indice di germinazione del suolo iniziale e dei campioni prelevati dalle tre configurazioni K (a), SP (b), e CC (c) al termine del periodo di sperimentazione (10 mesi).

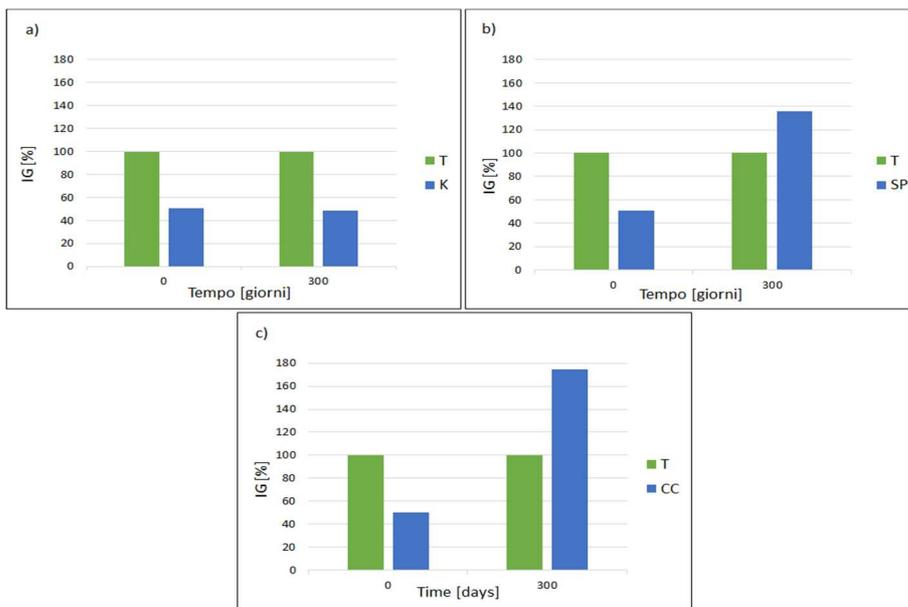


Figura 4. 14. Andamento degli indici di germinazione nelle configurazioni K (a), SP (b) e CC (c)

I risultati ottenuti mostrano che, mentre nella configurazione di controllo si è ottenuto a fine trattamento un indice di germinazione confrontabile con quello del suolo iniziale, le configurazioni SP e CC hanno mostrato una netta riduzione della fitotossicità. Per queste due configurazioni, infatti, si passa da una situazione di inibizione della germinazione, con un IG inferiore a quello del testimone, ad una situazione di stimolazione della germinazione, con un IG superiore rispetto al testimone. Ciò evidenzia che la rizoremediation, oltre a permettere un incremento della degradazione degli idrocarburi rispetto alla configurazione di controllo, ha determinato una riduzione della fitotossicità e quindi un miglioramento della qualità della matrice a fine trattamento.

4.3.4 Verifica delle condizioni di rizosfera potenziata

L'effetto degli inoculi di *Bradyrhizobium* è stato valutato mediante verifica della formazione dei noduli radicali in fase di dismissione dei vasi della configurazione completa per il prelievo dei campioni di suolo (Figura 4.15). I noduli radicali erano presenti nelle radici delle piante inoculate.



Figura 4. 15. Formazione dei noduli radicali per la fissazione dell'azoto nella configurazione completa

Per valutare invece l'effetto dei funghi micorrizici è stata valutato lo stato micorrizico delle radici mediante osservazione al microscopio dopo colorazione con tripiano blu (Figura 4.16).

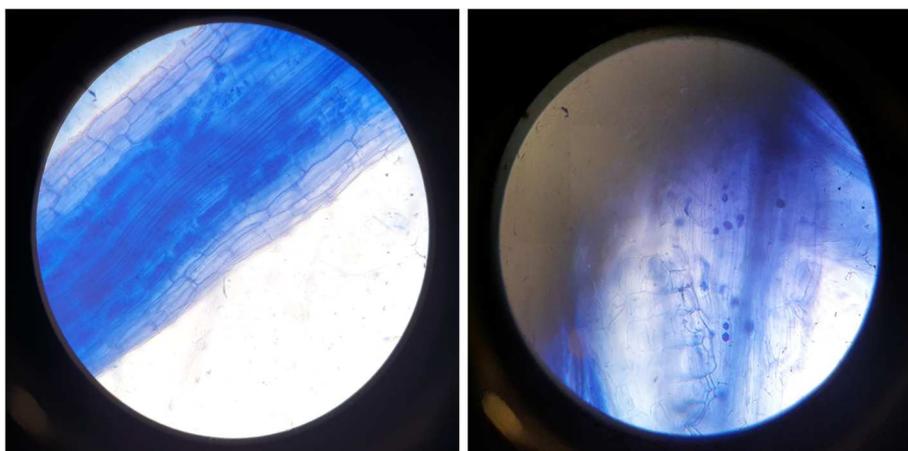


Figura 4. 16. Osservazioni al microscopio di ife e arbuscoli nei campioni radicali precedentemente colorati con tripiano blu

Le osservazioni al microscopio dei campioni radicali prelevati dalla configurazione completa a fine sperimentazione evidenziano la presenza di ife e arbuscoli, confermando quindi la micorrizzazione delle radici.

Capitolo 5 – Considerazioni sull'applicabilità della tecnologia *e-ibs-abr*®

5.1 Introduzione

L'obiettivo della ricerca è stato quello di valutare l'applicabilità di tecniche di bioremediation per la bonifica di un suolo contaminato da idrocarburi e in particolare del sistema *e-ibs-abr*®, registrato come marchio da Eni, ad una delle Isole del SIN di Gela dove è stata riscontrata una diffusa contaminazione del suolo superficiale da idrocarburi C10-C40, verosimilmente riconducibile alle attività di estrazione e trasporto del greggio.

Il sistema *e-ibs-abr*® (Eni Integrated Bioremediation System with Autochthonous Bacteria and Rhizomicrobiota), consiste nell'impiego combinato e integrato di diverse tecnologie di tipo biologico, al fine di ottenere un'attività enzimatica forte e diversificata in grado di attaccare le differenti molecole di idrocarburi. Al fine di valutarne l'applicabilità è necessario condurre una serie di analisi e test in laboratorio per valutare la risposta a diversi trattamenti e per selezionare la configurazione di trattamento più appropriata alle caratteristiche sito-specifiche del suolo da bonificare.

L'attività di ricerca svolta nel corso della tesi, a tale scopo, è stata finalizzata a valutare l'applicabilità dei singoli trattamenti previsti nel sistema *e-ibs-abr*, per il risanamento di suoli contaminati, facendo uso di modelli fisici a scala di laboratorio. In particolare, come diffusamente descritto nei precedenti capitoli, la ricerca è stata articolata in tre fasi.

La prima fase ha avuto l'obiettivo di studiare il potenziale di biorisanamento intrinseco del suolo iniziale. A tale scopo sono stati isolati dal suolo contaminato i batteri idrocarburo degradanti, che sono stati successivamente identificati mediante amplificazione e sequenziamento dell'rDNA 16S. Inoltre, al fine di monitorare l'evoluzione nel tempo della popolazione batterica autoctona e di quella inoculata e gli effetti della presenza degli inquinanti sulle cinetiche di biodegradazione, è stata analizzata la composizione della comunità microbica mediante estrazione del DNA metagenomico e sequenziamento MISEq Illumina della regione V3-V4 del gene 16S rRNA. Infine, il DNA estratto dal suolo è stato usato come stampo per la reazione di amplificazione del gene *alkB*, che codifica la monossigenasi responsabile della prima reazione di degradazione aerobica degli idrocarburi.

Nella seconda fase della sperimentazione è stata valutata l'applicabilità e l'efficienza di biodegradazione di diverse tecniche di bioremediation, testando diverse configurazioni di intervento. A tale scopo sono state realizzate due campagne sperimentali, una con test di biotrattabilità in microcosmo e una con test di biotrattabilità in colonna. Per l'esecuzione dei test in microcosmo sono stati realizzati due diverse tipologie di microcosmi entrambi in fase solida: la prima tipologia per simulare interventi di landfarming e la seconda per simulare interventi di bioventing. Per entrambi i microcosmi sono state allestite diverse configurazioni al fine di testare l'effetto sulle cinetiche di degradazione della biostimulation, con aggiunta di azoto e fosforo, e della bioaugmentation, con l'inoculo di un mix di batteri idrocarburo ossidanti. Durante la sperimentazione sono stati periodicamente prelevati campioni di terreno da ogni microcosmo al fine di valutare la concentrazione idrocarburi C 10-40, il pH, la fitotossicità del suolo e la composizione della comunità microbica. Per i test in colonna è stato invece realizzato un apparato sperimentale costituito da tre colonne di forma cilindrica in plexiglass dotate di un sistema di aerazione, di un sistema di irrigazione e di un sistema di campionamento degli off-gas. Anche in questo caso sono state testate diverse configurazioni di trattamento e sono stati periodicamente prelevati dei campioni al fine di valutare la concentrazione idrocarburi C 10-40 e la fitotossicità del suolo. Inoltre, sono state eseguite delle misure periodiche degli off-gas in uscita per valutare i diversi contributi della volatilizzazione e della biodegradazione sulla rimozione degli idrocarburi.

La terza fase della sperimentazione ha avuto l'obiettivo di valutare l'applicabilità di tecniche di rhizoremediation, studiando l'effetto sinergico tra piante e batteri idrocarburo ossidanti indigeni e inoculati. A tale scopo sono state realizzate delle prove in vaso utilizzando specie di piante in condizioni normali e in condizioni di rizosfera potenziata, con inoculo di funghi micorrizici e batteri rizobi. Sono stati periodicamente prelevati campioni di terreno per valutare la concentrazione di idrocarburi C 10-40, la fitotossicità del suolo e la sopravvivenza dei microorganismi inoculati a fine sperimentazione.

5.2 Analisi dei Risultati

I risultati ottenuti dalla prima fase della sperimentazione mostrano che il suolo analizzato presenta un potenziale intrinseco di biorisanamento, dato dalla presenza di batteri idrocarburo-ossidanti altamente efficienti. Dal suolo contaminato iniziale sono stati isolati 18 potenziali batteri degradatori di idrocarburi, capaci di crescere su diesel come unica fonte di carbonio, che sono stati poi raggruppati in 8 fenotipi diversi. Dall'amplificazione e dal sequenziamento dell'rDNA 16S è emersa la presenza di batteri citati in letteratura come batteri idrocarburo-ossidanti. Tra questi sono stati identificati batteri appartenenti al genere *Pseudomonas*, noto per utilizzare

una serie di idrocarburi alifatici e aromatici come unica fonte di carbonio e di energia, il genere *Nocardia*, numerose volte isolato da terreni contaminati da idrocarburi e che ha dimostrato potenti capacità di degradazione, e il genere *Rhodococcus*, caratterizzato da un'ampia versatilità metabolica con capacità di biodegradazione e trasformazione di vari composti inquinanti, come idrocarburi, pesticidi e xenobiotici. Inoltre, il sequenziamento NGS del DNA metagenomico estratto dal suolo ha mostrato una comunità microbica piuttosto ricca e diversificata composta da 14 phyla, 36 classi e 57 ordini batterici. È stata riscontrata una predominanza dei phyla Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, TM7 e Bacteroidetes. La presenza predominante del phylum dei Proteobatteri può essere associata alla loro capacità di degradare idrocarburi alifatici e aromatici. Infine, anche l'amplificazione del gene *alkB* ha confermato i dati ottenuti dall'identificazione degli isolati e dall'analisi NGS che avevano già evidenziato la presenza di batteri idrocarburo-ossidanti degradatori di n-alcani nel suolo contaminato.

La seconda fase della sperimentazione ha confermato l'applicabilità di tecniche di bioremediation al suolo in esame. Tutti i microcosmi hanno infatti mostrato una progressiva riduzione della concentrazione di idrocarburi e in entrambe le configurazioni, semplice aerazione e biostimulation, la riduzione è stata minore nel controllo abiotico. La configurazione di biostimulation ha raggiunto efficienze migliori rispetto alla semplice aerazione sia nei microcosmi di tipo A (landfarming) che nei microcosmi di tipo B (bioventing). Tuttavia, questa differenza è risultata più marcata nei microcosmi di tipo A, probabilmente grazie alle operazioni di miscelazione che hanno favorito un migliore contatto tra popolazione batterica, ossigeno e nutrienti. Ciò sembra confermato dal fatto che A3 ha ottenuto rendimenti leggermente superiori rispetto a B3 dopo i 120 giorni di biostimulation. L'inoculo del mix di batteri idrocarburo degradanti, dopo una prima fase stazionaria verosimilmente dovuta all'acclimatazione della popolazione batterica, ha fatto registrare una ripresa dell'attività degradativa. I test di germinazione hanno evidenziato una netta riduzione della fitotossicità del suolo nei trattamenti con sola aerazione, mentre nelle configurazioni di biostimulation è stato osservato un iniziale aumento della fitotossicità probabilmente legato alla soluzione di nutrienti immessa, che ha determinato una temporanea riduzione del pH. Il valore dell'IG è poi migliorato alla fine della sperimentazione, raggiungendo valori confrontabili con quelli del suolo non trattato. Sia per i microcosmi di tipo A che di tipo B il rendimento di rimozione maggiore è stato ottenuto nella configurazione di biostimulation, con valori di circa il 30-35% dopo 120 giorni di biostimulation e circa il 40% dopo la bioaugmentation. I trattamenti simulati nei microcosmi hanno determinato inoltre uno shift nella struttura e composizione delle comunità microbiche rispetto al suolo non trattato. Dopo 120 giorni di biostimulation, le analisi metagenomiche hanno evidenziato un aumento dell'abbondanza di batteri del Phylum dei Actinobacteria e Proteobacteria; questi ultimi diventano la componente

predominante nei microcosmi di tipo B. A livello di genere si è osservata una maggiore diversità di batteri idrocarburo ossidanti, noti per degradare soprattutto IPA, rispetto al suolo non trattato. In termini di composizione e abbondanza le comunità microbiche dei due tipi di microcosmi appaiono distinte tra loro. Nei microcosmi sottoposti a landfarming si osserva la predominanza del genere *Enhydrobacter*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Methylobacterium*, mentre nei microcosmi sottoposti a ventilazione forzata si osserva la predominanza di *Phenyllobacterium*, *Gordonia*, *Ralstonia*, *Pseudoxanthomonas*, *Sphingobium*. In ogni caso, i risultati ottenuti evidenziano che i trattamenti di bioremediation testati hanno avuto un effetto sulla biodiversità delle comunità batteriche idrocarburo-ossidanti, che hanno cambiato composizione e struttura favorendo i membri della comunità con metabolismo più attivo nelle condizioni testate, portando alla formazione di un microbiota altamente specializzato nella degradazione degli idrocarburi e adatto a crescere, prosperare e degradare in quelle condizioni ambientali. I risultati dei test in colonna sono in linea con quelli ottenuti dai test in microcosmo, sia in termini di efficienze di rimozione che di fitotossicità della matrice trattata. In questo caso è stato inoltre possibile eseguire il monitoraggio degli off-gas in uscita. I risultati ottenuti hanno evidenziato come l'incidenza della volatilizzazione sia risultata nettamente maggiore nel controllo abiotico rispetto alle altre configurazioni. Ciò conferma la presenza di un processo biologico in atto che ha significativamente contribuito a migliorare l'efficienza di rimozione nelle configurazioni di aerazione e biostimulation.

I risultati ottenuti nell'ultima fase della sperimentazione hanno evidenziato che la configurazione che ha previsto la sola piantumazione del *Cytisus* ha raggiunto un rendimento di rimozione superiore rispetto alla configurazione di controllo. Ciò porta a pensare che la pianta abbia favorito l'attività degradativa della popolazione autoctona idrocarburo ossidante, confermando un effetto benefico dovuto alla sinergia tra piante e batteri nella rizosfera. Nella configurazione completa, la costituzione della rizosfera potenziata e l'inoculo del mix di batteri idrocarburo ossidanti hanno permesso di raggiungere un rendimento di rimozione pari al doppio rispetto alla configurazione di controllo. L'effetto benefico della rizosfera potenziata è stato messo in evidenza dal maggior rendimento di rimozione ottenuto nei campioni prelevati in prossimità delle radici (pari a circa il 30%). Anche i risultati dei test di fitotossicità sono risultati ottimali. Le due configurazioni di rhizoremediation sono infatti passate da una situazione di inibizione della germinazione, con un IG inferiore a quello del testimone, ad una situazione di stimolazione della germinazione, con un IG superiore rispetto al testimone. Ciò conferma che la rhizoremediation, oltre a permettere un incremento della degradazione degli idrocarburi rispetto alla configurazione di controllo, ha determinato una riduzione della fitotossicità e quindi un miglioramento della qualità della matrice a fine trattamento.

5.3 Considerazioni finali

I risultati ottenuti durante la sperimentazione hanno confermato l'applicabilità di tecniche di bioremediation per la bonifica del suolo in esame e di conseguenza la potenziale applicabilità all'interno della tecnologia *e-ibs-abr®*.

In particolare, la caratterizzazione microbiologica del suolo ha evidenziato che il suolo analizzato presenta un potenziale intrinseco di biorisanamento, dato dalla presenza di batteri idrocarburo-ossidanti altamente efficienti. La presenza del gene *alkB* ha confermato il catabolismo degli alcani alifatici nel suolo. Inoltre, dai risultati dei test in microcosmo è emerso che la popolazione microbica è in grado di adattarsi alle diverse condizioni di trattamento con uno shift nella sua struttura e composizione che favorisce i membri della comunità con metabolismo più attivo nelle condizioni testate, e portando alla formazione di un microbiota altamente specializzato nella degradazione di HC e adatto a crescere, prosperare e degradare in quelle condizioni ambientali.

I test di biotrattabilità hanno evidenziato che la biostimulation con aggiunta di nutrienti permette di raggiungere rendimenti di rimozione maggiori rispetto alla semplice aerazione, incrementando l'attività metabolica dei batteri HC degradanti. Analogo discorso vale per la bioaugmentation che dopo una prima fase stazionaria, verosimilmente dovuta all'acclimatazione della popolazione batterica, ha fatto registrare una ripresa dell'attività degradativa. Per ridurre il problema del periodo di acclimatazione, nella successiva fase di test in campo potrebbe essere opportuno testare la bioaugmentation inoculando i batteri idrocarburo ossidanti isolati dallo stesso suolo contaminato.

Dai test in microcosmo è emersa inoltre la convenienza per il suolo in esame di applicare un trattamento di landfarming rispetto ad uno di bioventing, soprattutto grazie al miglior contatto tra popolazioni batteriche, contaminante e nutrienti dovuta alla miscelazione.

I test in colonna hanno evidenziato che il trattamento di bioventing può permettere di raggiungere rendimenti superiori nella prima fase del trattamento, ma che in questo la volatilizzazione presenta un significativo contributo nella rimozione totale degli idrocarburi.

A queste considerazioni va aggiunto il fatto che il trattamento di landfarming è più facilmente applicabile rispetto al bioventing e risulta più conveniente anche dal punto di vista economico, in quanto il bioventing richiede maggiori consumi energetici dovuti all'aerazione.

Sia i test in microcosmo che quelli in colonna hanno però evidenziato che l'aggiunta di nutrienti può provocare un iniziale incremento della fitotossicità del suolo, anche se tutti i campioni analizzati hanno restituito valori dell'indice di germinazione a fine sperimentazione paragonabili con quelli del suolo non trattato.

La qualità della matrice trattata può essere migliorata accoppiando all'intervento di landfarming, un trattamento di rhizoremediation. Le prove in vaso hanno infatti evidenziato che la rhizoremediation comporta un netto miglioramento della qualità del suolo trattato rispetto al controllo. Tale tendenza è maggiore nel caso di costituzione della rizosfera potenziata, tramite inoculo di batteri PGPB e funghi micorrizici, che ha influito positivamente anche sulla crescita e sullo stato di salute delle piante. L'interazione tra piante e batteri ha permesso inoltre di raggiungere rendimenti di rimozioni di idrocarburi maggiori rispetto al controllo.

Possibili sviluppi delle attività di ricerca qui condotte, al fine di ottenere un'ancora più completa valutazione dell'applicabilità del sistema e-ibs-abr, possono essere mirate all'esecuzione di test di campo, da cui potranno essere ricavati anche criteri di dimensionamento degli interventi.

La prima fase del test in campo potrà prevedere la realizzazione di un intervento di landfarming con inoculo di nutrienti, al fine di stimolare la biomassa autoctona e accelerare i processi biologici di degradazione già presenti in situ.

Tale fase avrà la durata di 90 giorni, stante che i test di laboratorio hanno evidenziato una riduzione delle cinetiche di biodegradazione dopo un periodo di circa 60 giorni. Dopo tale intervallo di tempo, la seconda fase prevederà la piantumazione del *Cytisus* e l'inoculo di batteri idrocarburo degradanti, batteri azoto fissatori e funghi micorrizici. In questo modo, coerentemente con quanto osservato in laboratorio, l'interazione tra piante e batteri permetterà di incrementare significativamente il rendimento di rimozione e di migliorare la qualità della matrice trattata.

Durante la sperimentazione verranno periodicamente prelevati dei campioni per le analisi fisico-chimiche e biologiche. In questo modo sarà possibile monitorare l'andamento del processo per valutare eventuali differenze rispetto a quanto osservato in laboratorio e mettere in atto le eventuali azioni correttive.

Conclusioni

L'obiettivo della ricerca è stato quello di valutare l'applicabilità del sistema e-ibs-abr ad una delle Isole del SIN di Gela dove è stata riscontrata una diffusa contaminazione del suolo superficiale da idrocarburi C10-C40.

Il sistema e-ibs-abr (Eni Integrated Bioremediation System with Autochthonous Bacteria and Rhizomicrobiota), consiste nell'impiego combinato e integrato di diverse tecnologie di tipo biologico. Al fine di valutarne l'applicabilità è necessario condurre una serie di analisi preliminari, con l'obiettivo di verificare il potenziale di biodegradazione intrinseco del suolo in esame, e dei test in laboratorio, per valutare la risposta a diversi trattamenti e per selezionare la configurazione di trattamento più appropriata alle caratteristiche sito-specifiche del suolo da bonificare. Successivamente i trattamenti analizzati in laboratorio devono essere testati in campo, al fine di valutare definitivamente il trattamento testato in laboratorio e fornire gli elementi necessari per la messa a punto dell'intervento di bonifica full scale. Quest'ultima fase inoltre è utile al fine di valutare la fattibilità economica dell'intervento, i costi infatti possono variare sensibilmente in funzione della filiera di trattamenti impiegati.

L'attività sperimentale esposta in questa tesi ha riguardato i test preliminari e i test di laboratorio ed è stata articolata in tre fasi.

La prima fase ha avuto l'obiettivo di caratterizzare il suolo in esame dal punto di vista biologico al fine di studiarne il potenziale di biorisanamento intrinseco. Dall'amplificazione e dal sequenziamento dell'rDNA 16S dei batteri isolati dal suolo contaminato iniziale è emersa la presenza di batteri citati in letteratura come batteri idrocarburo-ossidanti. Tra questi sono stati identificati batteri appartenenti al genere *Pseudomonas*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. Inoltre, i risultati del sequenziamento MISEq Illumina della regione V3-V4 del gene 16S rRNA hanno mostrato una comunità microbica piuttosto ricca e diversificata composta da 14 phyla, 36 classi e 57 ordini batterici. È stata riscontrata una predominanza dei phyla Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, TM7 e Bacteroidetes. Infine, anche l'amplificazione del gene *alkB*, che codifica la monossigenasi responsabile della prima reazione di degradazione aerobica degli idrocarburi, ha confermato i dati ottenuti dall'identificazione degli isolati e dall'analisi NGS.

Nella seconda fase della sperimentazione è stata valutata l'applicabilità e l'efficienza di biodegradazione di diverse tecniche di bioremediation, testando diverse configurazioni di intervento tramite test in microcosmo e test in colonna. I risultati

ottenuti hanno confermato l'applicabilità di tecniche di bioremediation al suolo in esame. La configurazione di biostimulation ha raggiunto efficienze migliori rispetto alla semplice aerazione sia nei microcosmi di tipo A (landfarming) che nei microcosmi di tipo B (bioventing). Tuttavia, questa differenza è risultata più marcata nei microcosmi di tipo A, probabilmente grazie alle operazioni di miscelazione che hanno favorito un migliore contatto tra popolazione batterica, ossigeno e nutrienti. L'inoculo del mix di batteri idrocarburo degradanti, dopo una prima fase stazionaria verosimilmente dovuta all'acclimatazione della popolazione batterica, ha fatto registrare una ripresa dell'attività degradativa. Sia per i microcosmi di tipo A che di tipo B il rendimento di rimozione maggiore è stato ottenuto nella configurazione di biostimulation, con valori di circa il 30-35% dopo 120 giorni di biostimulation e circa il 40% dopo la bioaugmentation. In entrambi i casi non sono stati riscontrati significativi peggioramenti della fitotossicità del suolo dopo il trattamento. I risultati dei test in colonna sono in linea con quelli ottenuti dai test in microcosmo, sia in termini di efficienze di rimozione che di fitotossicità della matrice trattata. In questo caso è stato inoltre possibile eseguire il monitoraggio degli off-gas in uscita, che ha evidenziato una maggiore incidenza della volatilizzazione nel controllo abiotico rispetto alle configurazioni di bioremediation.

La terza fase della sperimentazione ha avuto l'obiettivo di valutare l'applicabilità di tecniche di rhizoremediation, studiando l'effetto sinergico tra piante e batteri idrocarburo ossidanti indigeni e inoculati. A tale scopo sono state realizzate delle prove in vaso utilizzando specie di piante in condizioni normali e in condizioni di rizosfera potenziata, con inoculo di funghi micorrizici e batteri rizobi. I risultati ottenuti hanno mostrato che l'interazione tra piante e batteri ha favorito l'attività degradativa della popolazione autoctona idrocarburo ossidante e che la costituzione della rizosfera potenziata ha permesso di raggiungere rendimenti di rimozione nettamente superiori rispetto alla configurazione di controllo. La rhizoremediation ha inoltre determinato una riduzione della fitotossicità e quindi un miglioramento della qualità della matrice a fine trattamento.

Nel complesso, i risultati ottenuti durante la sperimentazione hanno confermato l'applicabilità di tecniche di bioremediation per la bonifica del suolo in esame e quindi la potenziale applicabilità della tecnologia *e-ibsabr*®.

In particolare, i risultati ottenuti suggeriscono di procedere alla fase di test in campo realizzando un iniziale trattamento di landfarming con immissione di nutrienti, seguito da una successiva piantumazione di *Cytisus* (o altre leguminose arbustive idonee con inoculo di batteri idrocarburo ossidanti, di rizobi specifici e di funghi micorrizici per la costituzione della rizosfera potenziata).

Bibliografia

- Abbasian F., Lockington R., Mallavarapu M.; Naidu R. (2015). A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria. *Appl Biochem Biotechnol*, 76(3):670-99.
- Abbasian F., Lockington R., Megharaj M., Naidu R. (2016). The biodiversity changes in the microbial population of soils contaminated with crude oil. *Curr. Microbiol.* 72, 663 e 670.
- Abed R.M.M., Al-Kindi S., Al-Kharusi S. (2015). Diversity of bacterial communities along a petroleum contamination gradient in desert soils. *Microbial ecology* 69.1: 95-105.
- Adam, G., Duncan, H.J., 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environ. Pollut.* 120, 363–370.
- Adams G., Tawari-Fufeyin, P., Okoro S., Ehinomen I. (2015). Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation*, 3, 28-39.
- Admon S., Green M., Avnimelech Y. (2001). Biodegradation kinetics of hydrocarbon in soil during land treatment of oily sludge. *Bioremediation J.* 5 (3), 193-209.
- Ahn Y., Sanseverino J., Saylor G.S. (1999). Analyses of polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria isolated from contaminated soils, *Biodegradation*101999 pp 149-157.
- Aislabie J., Saul D.J., Foght J.M. (2006) Bioremediation of hydrocarboncontaminated polar soils. *Extremophiles* 10:171–179.
- Alarcón A., Davies Jr F.T., Autenrieth R.L., Zuberer D.A. (2008). Arbuscular mycorrhiza and petroleum-degrading microorganisms enhance phytoremediation of petroleum contaminated soil. *Internat J Phytorem* 2008; 10:251–63.
- Alaribe F.O., Agamuthu P. (2015). Assessment of phytoremediation potentials of *Lantana camara* in Pb impacted soil with organic waste additives. *Ecol. Eng.* 83, 513e520.
- Al-Daher R., Al-Awadhi N. (1998). Bioremediation of damaged desert environment using the windrow soil profile system in Kuwait. *Environ. Int.* 24 (1/2), 175–180.
- Al-Hawash A.B., Dragh M.A., Li S., Alhujaily A., Abbood H.A., Zhang X., Ma F. (2018). Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, Volume 44, Issue 2, Pages 71-76, ISSN 1687-4285.
- Al-Kindi S. and Raeid M.M.A. (2016). Comparing oil degradation efficiency and bacterial communities in contaminated soils subjected to biostimulation using different organic wastes. *Water, Air, & Soil Pollution* 227.1: 36.
- Al-Sulaimani Y., Al-Wahaibi S. N., Al-Bahry et al. (2010). “Experimental investigation of biosurfactants produced by *Bacillus* species and their potential for MEOR in Omani oil field,” In: *Proceedings of the SPE EOR Conference at Oil and Gas West Asia 2010 (OGWA '10)*, pp. 378-386, Muscat, Oman, April 2010.

- Ameen F., Moslem M., Hadi S., Al-Sabri A.E. (2016). Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia. *Saudi J. Biol. Sci.* 23, 211e218.
- Amin M.M., Hatamipour M.S., Momenbeik F., Khiadani M., Mohammadi-Moghadam F. (2014). Soil remediation via bioventing, vapor extraction and transition regime between vapor extraction and bioventing. *International Journal of Environmental Health Engineering*, 3 (1).
- Andreolli M., Lampis S., Brignoli P., Vallini G. (2015). Bioaugmentation and biostimulation as strategies for the bioremediation of a burned woodland soil contaminated by toxic hydrocarbons: a comparative study. *J. Environ. Manage* 153, 121e131.
- APAT. (2004). Utilizzo di indicatori biologici ed ecotossicologici. RTI CTN_TES 1/2004.
- APAT. (2006). Manuale per le indagini ambientali nei siti contaminati. Manuale e linee guida 43/2006.
- Atagana H. I. (2008). Compost bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil inoculated with organic manure. *African Journal of Biotechnology*, 7(10), 1516-1525.
- Atlas R. M. (1984). *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Company, New York.
- Atlas RM, Bartha R (1972). Biodegradation of petroleum in seawater at low temperatures. *Can J Microbiol* 18:1851–1855.
- ATSDR (2011). Total Petroleum Hydrocarbons. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA, USA.
- Azeez O.M., Anigbogu C.N., Akhigbe R.E., Saka W.A. (2015). Cardiotoxicity induced by inhalation of petroleum products. *J. Afr. Assoc. Physiol. Sci.* 3 (1), 14–17.
- Azubuikwe C.C., Chikere C.B., Okpokwasili G.C. (2016). Bioremediation techniques - classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32 (11), 180.
- Bae J., Benoit D.L., Watson A.K. (2016). Effect of heavy metals on seed germination and seedling growth of common ragweed and roadside ground cover legumes. *Environ Pollut.* 2016 Jun; 213:112-118.
- Balachandran C., Duraipandiyanab V., Balakrishnaa K., Ignacimuthu S. (2012). Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. *Bioresource Technology* 112: 83-90.
- Barac T., Taghavi S., Borremans B., Provoost A., Oeyen L., Colpaert J.V. (2004). Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nat Biotechnol* 2004; 22:583–8.
- Barakat A. O, Qian Y., Kim M., Kennicutt M. C. (2001), Chemical characterization of naturally weathered oil residues in arid terrestrial environment in Al-Alamein, Egypt. *Environment International*, Volume 27, Issue 4, Pages 291-310.
- Barathi S., Vasudevan N. (2001). Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas* fluorescence isolated from a petroleum contaminated soil. *Environ Int.* 26, 413-416.
- Baruah N., Mondal S.C., Farooq M. (2019). Influence of Heavy Metals on Seed Germination and Seedling Growth of Wheat, Pea, and Tomato. *Water Air Soil Pollut* 230, 273.
- Bastida F., Jehmlich N., Lima K., Morris B.E.L., Richnow H.H., Hernandez T. (2016). The ecological and physiological responses of the microbial community from a semiarid soil

- to hydrocarbon contamination and its bioremediation using compost amendment. *J. Proteomics* 135, 162e169.
- Bento F., Camargo F., Okeke B., Frankenberger W. (2005). Comparative Bioremediation of Soils Contaminated with Diesel Oil by Natural Attenuation, Biostimulation and Bioaugmentation. *Bioresource technology*, 96, 1049-55.
- Beolchini F., Rocchetti L., Regoli F., Dell'Anno A. (2010). Bioremediation of marine sediments contaminated by hydrocarbons: experimental analysis and kinetic modeling. *J. Hazard. Mater.* 182 (2010) 403–407.
- Bešković V., Gojčić-Cvijović G., Milić J., Ilić M., Miletić S., Šoljčić Knudsen T., Vrvic M. (2011). Ex situ Bioremediation of a Soil Contaminated by Mazut (Heavy Residual Fuel Oil) – a Field Experiment. *Chemosphere*. 83. 34-40.
- Boonchan S., Britz M.L., Stanley G.A. (2000). Degradation and mineralization of highmolecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal bacterial cocultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (3), 1007–1019.
- Boopathy R., Factors limiting bioremediation technologies. Department of Biological Sciences, Nicholls State University, Thibodaux, LA 70310, USA.
- Bossert I, Bartha R (1984). The fate of petroleum in soil ecosystems. In: Atlas RM (ed) *Petroleum microbiology*. Macmillan Publishing Co, New York, pp 434–476.
- Brenner R.C.; Magar V.S.; Ickes J.A.; Abbott J.E.; Stout S.A.; Crecelius E.A.; Bingler L.S. (2002). Characterization and FATE of PAH-Contaminated Sediments at the Wyckoff/Eagle Harbor Superfund Site. *Environmental Science and Technology*. 36, 2605-2613.
- Brzeszcz J., Steliga T., Kapusta P., Turkiewicz A., Kaszycki P. (2016). R-strategist versus K-strategist for the application in bioremediation of hydrocarbon contaminated soils. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 106, 41-52.
- Bundy J.G., Paton G.I., Campbell C.D. (2002). Microbial communities in different soil types do not converge after diesel contamination. *J. Appl. Microbiol.* 92, 276-288.
- Cai D., Yang X., Wang S., Chao Y., Morel J.L., Qiu R. (2017). Effects of dissolved organic matter derived from forest leaf litter on biodegradation of phenanthrene in aqueous phase. *J. Hazard Mater.* 324, 516–525.
- Cajaraville M.P., Marigomez J.A., Angulo E. (1991). Automated measurement of lysosomal structure alterations in oocytes of mussels exposed to petroleum hydrocarbons. *Arch. Environ. Contamination Toxicol.* 21, 395–400.
- Camenzuli D., Freidman B.L. (2015). On-site and in situ remediation technologies applicable to petroleum hydrocarbon contaminated sites in the Antarctic and Arctic. *Polar Res.* 34, 24492.
- Campbell N.A. and Reece J.B. (2002). *Biology V.1*. Benjamin Cummings, ISBN:9780805366242.
- Capozzoli L., Giampaolo V., Rizzo E. (2017). Cherts for monitoring hydrocarbon contamination. *GNGTS 36° Convegno Nazionale*, Trieste 2017.
- Cardinale M., Lanza A., Bonni M., Marsala S., Puglia A., Quatrini P. (2008). Diversity of rhizobia nodulating wild shrubs of Sicily and some neighbouring islands. *Archives of microbiology*. 190. 461-70. 10.1007/s00203-008-0394-2.
- Cardinale M., Brusetti L., Lanza A., Orlando S., Daffonchio D., Puglia A.M., Quatrini P. (2010). Rehabilitation of mediterranean anthropogenic soils using symbiotic wild

- legume shrubs: Plant establishment and impact on the soil bacterial community structure. *Appl Soil Ecol* 2010;46(1):1-8.
- Carmichael L.M., Pfaender F.K. (1997). The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils. *Biodegradation* 8(1):1–13.
- Catania V., Santisi S., Signa G., Vizzini S., Mazzola A., Cappello S., ... & Quatrini P. (2015). Intrinsic bioremediation potential of a chronically polluted marine coastal area. *Marine pollution bulletin*, 99(1-2), 138-149.
- Catania V., Cappello S., Di Giorgi V., Santisi S., Di Maria R., Mazzola A., ... & Quatrini P. (2018). Microbial communities of polluted sub-surface marine sediments. *Marine pollution bulletin*, 131, 396-406.
- CCME (2010) Canadian Soil Quality Guidelines for Carcinogenic and Other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) (Environmental and Human Health Effects). Scientific Criteria Document revised, Canadian Council of Ministers of the Environment, Gatineau, 216 p.
- Chaillan F., Chaîneau C.H., Point V., Saliot A., Oudot J. (2006). Factors inhibiting bioremediation of soil contaminated with weathered oils and drill cuttings. *Environ Pollut* 144:255–265.
- Chandra S., Sharma R., Singh K., Sharma A. (2013), Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon, *Ann. Microbiol.* 63, 417–431.
- Chaudhary D.K. and Kim J. (2018). *Flavobacterium naphthae* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 68.1: 305-309.
- Chemlal R., Tassist A., Drouiche M., Lounici H., Drouiche N., Mameri N. (2012). Microbiological aspects study of bioremediation of diesel-contaminated soils by biopile technique. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 75.
- Chen K.F., Chang Y.C., Chiou W.T. (2015). Remediation of diesel-contaminated soil using in situ chemical oxidation (ISCO) and the effects of common oxidants on the indigenous microbial community: a comparative study. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91, 1877–1888.
- Chikere C.B., Chikere B.O., Okpokwasili G.C. (2012). Bioreactor-based bioremediation of hydrocarbon-polluted Niger Delta marine sediment, Nigeria, *3 Biotech* 2 (2012) 53–66.
- Chuan M.C., Shu G.Y., Liu J.C. (1996). Solubility of heavy metals in a contaminated soil: Effects of redox potential and pH. *Water Air Soil Pollut* 90, 543–556.
- Contzen M., Moore E.R., Blümel S., Stolz A., Kämpfer P. (2000). *Hydrogenophaga intermedia* sp. nov., a 4-aminobenzenesulfonate degrading organism. *Syst Appl Microbiol.* 2000 Dec;23(4):487-93.
- Cookson J.T. (1995). *Bioremediation Engineering: Design and Application*. McGraw-Hill, New York, USA.
- Cooney J.J. (1984). The fate of petroleum pollutants in freshwater ecosystems. In: Atlas RM (ed) *Petroleum microbiology*. Macmillan, New York, pp 399–434.
- Correa-García S., Pande P., Séguin A., St-Arnaud M., Yergeau E. (2018). Rhizoremediation of petroleum hydrocarbons: a model system for plant microbiome manipulation *Microb. Biotechnol.*, 11 (2018), pp. 819-832.

- Costa A.S., Romao L.P., Araujo B.R., Lucas S.C., Maciel S.T., Wisniewski Jr. A., Alexandre M.R. (2012), Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass, *Bioresour. Technol.* 105, 31–39.
- Coulon F., Pelletier E., Gourhant L., Delille D. (2005). Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub- Antarctic soil. *Chemosphere* 58, 1439-1448.
- Couto M. N., Monteiro E., Vasconcelos M. (2010). Mesocosm trials of bioremediation of contaminated soil of a petroleum refinery: Comparison of natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Environmental science and pollution research international*, 17, 1339-46.
- Cristaldi A., Conti G.O., Jho E.H., Zuccarello P., Grasso A., Copat C., Ferrante M. (2017). Phytoremediation of contaminated soils by heavy metals and PAHs. A brief review. *Environ. Technol. Innov.* 8, 309–326.
- Daane L.L., Harjono I., Zylstra G.J., Haggblom M.M. (2001). Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2683–2691.
- Dadrasnia A., Shahsavari N., Emenike C.U. (2013). Remediation of contaminated sites. In: *Hydrocarbon*. In: *Hydrocarbon*, vol. 4, INTECH, pp. 66–82.
- Das N., Chandran P. (2011). Microbiol degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol Res Int.* 2011:1–13.
- De Pasquale C., Palazzolo E., Piccolo L.L., Quatrini P. (2012). Degradation of long-chain n-alkanes in soil microcosms by two actinobacteria. *J Environ Sci Health Part A Toxic Hazard Subst Environ Eng* 2012;47(3):374-81.
- Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152. Norme in materia ambientale. (GU Serie Generale n.88 del 14-04-2006 - Suppl. Ordinario n. 96).
- Dias R.L., Ruberto L.A.M., Vazquez S.C., Hernandez E., Lo Balbo A., Del Panno M.T., Mac Cormack W.P. (2012). Bioremediation of an aged diesel oil-contaminated Antarctic soil: evaluation of the “onsite” biostimulation strategy using different nutrient sources. *Int Biodeterior Biodegradation* 75:96–103.
- Dias R.L., Ruberto L., Calabró A., Balbo A.L., Del Panno M.T., Mac Cormack W.P. (2015). Hydrocarbon removal and bacterial community structure in on-site bio stimulated biopile systems designed for bioremediation of diesel-contaminated Antarctic soil. *Polar Biol.* 38, 677–687.
- Dindar E., Şağban F.O.T., Başkaya H.S. (2013). Bioremediation of petroleum contaminated soil. *J. Biol. Environ. Sci.* 7 (19), 39.
- Duarte Da Cunha C., Leite S. G. F. (2000). Gasoline biodegradation in different soil microcosms. *Braz. J. Microb.* 31, 45-49, 2000.
- Elektorowicz M (1994) Bioremediation of petroleum-contaminated clayey soil with pretreatment. *Environ Technol* 15: 373-380.
- Esbaugh A. J., Mager E. M., Stieglitz J. D., Hoenig R., Brown T. L., French B. L., Linbo T. L., Lay C., Forth H., Scholz N. L., Incardona J. P., Morris J. M., Benetti D. D., Grosell M. (2016). The effects of weathering and chemical dispersion on Deepwater Horizon crude oil toxicity to mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) early life stages. *Science of The Total Environment*, Volume 543, Part A, Pages 644-651.

- Escalante-Espinosa E., Gallegos-Martinez M. E., Favela-Torres E., Gutierrez-Rojas M. (2005). Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. Inoculated with a microbial consortium in a model system. *Chemosphere* 59, 405–413.
- Fabbicino M., Ferraro A., Luongo V., Pontoni L., Race M. (2018). Soil washing optimization, recycling of the solution, and ecotoxicity assessment for the remediation of Pb-contaminated sites using EDDS. *Sustainability* 10, 636.
- Fan M. Y., Xie R.J. and Qin G. (2013). Bioremediation of petroleum-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with yeast. *Environmental Technology*. Volume 35, Issue 4, 2014.
- Farhadian M., Vachelard C., Duchez D., Larroche C. (2008). In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review. *Bioresour. Technol.* 9, 5296–5308.
- Firmino P. I., Farias R., Barros A., Buarque P., Rodríguez, E., Lopes A., Dos Santos A. (2015). Understanding the anaerobic BTEX removal in continuous-flow bioreactors for ex situ bioremediation purposes. *Chemical Engineering Journal*. 281. 272-280. 10.1016/j.cej.2015.06.106.
- Frankenberger Jr. W.T. (1992). The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons. In: Calabrese, E.J., Kostecki, P.T. (Eds.), *Hydrocarbon contaminated soils and groundwater*. Lewis, Boca Raton, FL, pp. 237-293.
- Franzetti A., Bestetti G., Caredda P., La Colla P., tamburini E. (2008). Surface-active compounds and their role in the access to hydrocarbons in *Gordonia* strains. *FEMS microbiology ecology* 63.2: 238-248.
- Fuchs G., Boll M., Heider J. (2011). Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 803-816.
- Gamalero E., Martinotti M.G., Trotta A., Lemanceau P., Berta G. (2002). Morphogenetic modifications induced by *Pseudomonas fluorescens* A6RI and *Glomus mosseae* BEG12 in the root system of tomato differ according to plant growth conditions. *New Phytol.* 155:293–300.
- Gamalero E., Trotta A., Massa N., Copetta A., Martinotti M.G., Berta G. (2004). Impact of two fluorescent pseudomonads and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture, and P acquisition. *Mycorrhiza* 2004; 14:185–92.
- Gan S., Lau E.V., Ng H.K. (2009). Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J. Hazard. Mater.* 172 (2009) 532–549.
- García Frutos F.J., Escolano O., García S., Babín M., Fernández M.D. (2010). Bioventing remediation and ecotoxicity evaluation of phenanthrene-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, Volume 183, Issues 1–3.
- García-Sánchez M., Kosnar Z., Mercl F., Aranda E., Tlustos P. (2018). A comparative study to evaluate natural attenuation, mycoaugmentation, phytoremediation, and microbial-assisted phytoremediation strategies for the bioremediation of an aged PAH-polluted soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147, 165e174.
- Gargouri B., Mhiri N., Karray F., Fathi A., Sayadi S. (2015). Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading yeast strains from petroleum contaminated industrial wastewater. *Biomed. Res. Int.*, 929424
- Gennadiev A., Yu N., Pikovskii I., Tsibart A.S., Smirnova M.A. (2015). Hydrocarbons in soils: Origin, composition, and behavior (review). *Eur. Soil Sci.* 48, 1076–1089.
- Germida J., Frick C., Farrell R. (2002). Phytoremediation of oil-contaminated soils. *Dev. Soil Sci.* 28, 169–186.

- Ghafari S., Baboli Z., Neisi A., Mirzaee S.A., Darvishi Cheshmeh Soltani R., Saeedi R., Jorfi S. (2019). Surfactant-enhanced Bioremediation of n-Hexadecane-contaminated Soil Using Halo-tolerant Bacteria *Paenibacillus gluconolyticus* sp. Strain T7-AHV Isolated from Marine Environment. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 33, 1, pp. 111–123.
- Glick B.R., Pasternak J.J., Patten C.L. (1991). *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*. Washington: ASM.
- Glick B.R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol*, 41:109–17.
- Glick B.R. (2004). Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Adv Appl Microbiol*, 56:291–312.
- Glick B.R., Cheng Z., Czarny J., Duan J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase containing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol* 119:329–39.
- Glick B.R. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 28, 367–374.
- Godheja J., Shekhar S.K., Siddiqui S.A., Modi D.R. (2016). Xenobiotic compounds present in soil and water: A review on remediation strategies. *J. Environ. Anal. Toxicol.* 6, 392.
- Goldstein R.M., Mallory L.M., Alexander M. (1985). Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 977-983.
- Gomez F., Sartaj M. (2014). Optimization of field scale biopiles for bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil at low temperature conditions by response surface methodology (RSM). *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 89, 103–109.
- Gouda A.H., El-Gendy A.S., Abd El-Razek T.M., El-Kassas H.I. (2016). Evaluation of phytoremediation and bioremediation for sandy soil contaminated with petroleum hydrocarbons. *Int. J. Environ. Sci. Dev.* 7, 7.
- Guarino C., Spada V., Sciarrillo R. (2017). Assessment of three approaches of bioremediation (natural attenuation, landfarming and bioaugmentation-assisted landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. *Chemosphere* 170, 10–16.
- Hanks N.A., Caruso J.A., Zhang, P. (2015). Assessing *Pistia stratiotes* for phytoremediation of silver nanoparticles and Ag (I) contaminated waters. *J. Environ. Manage* 164, 41e45.
- Heider J., Spormann A.M., Beller H.R., Widdel F. (1998). Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 459-473.
- Hendrickx B., Junca H., Vosahlova J., Lindner A., Rüegg I., Bucheli-Witschel M., Brennerova M. (2006). Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. *Journal of Microbiological Methods*, 64(2), 250-265.
- Hentati O., Lachhab R., Ayadi M., Ksibi M. (2013). Toxicity assessment for petroleum-contaminated soil using terrestrial invertebrates and plant bioassays. *Environ. Monit. Assess.* 185, 2989–2998.
- Höhener P. & Ponsin V. (2014). In situ vadose zone bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. 27. 10.1016/j.copbio.2013.08.018.

- Hong J.H., Kim J., Choi O.K., Cho K.S., Ryu H.W. (2005). Characterization of a diesel-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* IU5, isolated from oil-contaminated soil in Korea. *World J Microbiol Biotechnol.*;21:381–384.
- Hussain I., Puschenreiter M., Gerhard S., Schöftner P., Yousaf S., Wang A., Syed J.H., Reichenauer T.G. (2018). Rhizoremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Improvement opportunities and field applications. *Environ. Exp. Botany* 147, 202–219.
- Ispra (2020), *Annuario dei dati ambientali 95/2020*, ISBN: 978-88-448-1040-5
- ITRC (2000). *Situ oxidation. Technical and Regulatory Guidance*, Interstate Technology and Regulatory Cooperation Work Group.
- Iturbe R., López J. (2015). Bioremediation for a soil contaminated with hydrocarbons. *J. Pet. Environ. Biotechnol.* 6, 208.
- Jacott C.N., Murray J.D., Ridout C.J. (2017). Trade-Offs in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis: Disease Resistance, Growth Responses and Perspectives for Crop Breeding. *Agronomy* 7, 75.
- Jeong S.W., Jeong J., Kim J. (2015). Simple surface foam application enhances bioremediation of oil-contaminated soil in cold conditions. *Journal of Hazardous Materials*, Volume 286, Pages 164-170, ISSN 0304-3894.
- Ji Y., Mao G., Wang Y., Bartlam M. (2013). Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. *Frontiers in microbiology*, 4:58.
- Jiang Y., Brassington K., Prpich G., Paton G., Semple K., Pollard S., Coulon F. (2016). Insights into the biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soils by bioaugmentation and nutrient stimulation, *Chemosphere*, 161, 300-307
- Johnsen A.R., Karlson U. (2005). PAH degradation capacity of soil microbial communities—does it depend on exposure? *Microb Ecol* Volume 50, pp 488–494.
- Kadali K.K., Simons K.L., Skuza P.P., Moore R.B., Ball A.S. (2012). A complementary approach to identifying and assessing the remediation potential of hydrocarbonoclastic bacteria. *J Microbiol Meth.* 2012; 88:348–355.
- Kang W.H., Cheong J.G., Kim K., Chae H., Chang C.H. (2012). Restoration of petroleum contaminated soils by field scale soil washing system. In: *International Conference on Environmental Science and Technology*. p. 30.
- Keramitsoglou I., Certalis C., Kassomenos P. (2003). Decision support system for managing oil spill events. *Environ. Manag.* 32 (2), 290.
- Kertesz M.A., Kawasaki A., Stolz A. (2019). Aerobic hydrocarbon-degrading alphaproteobacteria: Sphingomonadales. *Taxonomy, genomics and ecophysiology of hydrocarbon-degrading microbes*: 105-124.
- Kloepper J.W., Lifshitz R., Zablutowicz R.M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7:39–43.
- Kösesakal T., Ünal M., Kulen O., Memon A., Yüksel B. (2015). Phytoremediation of petroleum hydrocarbons by using a freshwater fern species *Azolla filiculoides*. *Int. J. Phytoremediation* 18 (5), 467–476.
- Kuhn E., Bellicanta G.S., Pellizari V.H. (2009). New alk genes detected in Antarctic marine sediments. *Environmental microbiology* 11.3: 669-673.
- Kuiper I., Lagendijk E.L., Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J.J. (2004). Rhizoremediation: a beneficial plant microbe interaction. *Mol Plant Microbe Interact*; 17:6-15.

- Kuppusamy S., Thavamani P., Megharaj M., Naidu R. (2016). Bioaugmentation with novel microbial formula vs. natural attenuation of a long-term mixed contaminated soil—treatability studies in solid and slurry phase microcosms. *Water Air Soil Pollut.* 227.
- Lane D.J. (1991). 16S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley, New York, pp. 115–175.
- Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen C.R. (2005). Biodegradation and *Rhodococcus*—masters of catabolic versatility. *Current Opinion in Biotechnology*, Volume 16, Issue 3, Pages 282–290, ISSN 0958-1669.
- Lawal A.T. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. *Cogent Environ. Sci.* 3, 1339841.
- Leahy J.G.; Colwell R.R. (1990). Microbial Degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbial Reviews*, 53(3), 305-315.
- Lehr J.H. (2004). *Wiley's Remediation Technologies Handbook: Major Contaminant Chemicals and Chemical Groups*. John Wiley & Sons Ltd.
- Leung M. (2004). Bioremediation: techniques for cleaning up a mess, *Journal of Biotechnology*, vol. 2, pp. 18-22.
- Li X., Li P., Lin X., Zhang C., Li Q., Gong Z. (2008). Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases. *J. Hazard. Mater.* 150 (2008) 21–26.
- Li W., Khan M., Yamaguchi S. (2005). Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul* 46, 45–50.
- Lim M.W., Lau E.V., Poh P.E. (2016). A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil – present works and future directions. *Mar. Pollut. Bull.* 109, 14–45.
- Lin X., Li F., Zhang L., Zhou Q. (2008). Evaluation of plant-microorganism synergy for the remediation of diesel fuel contaminated soil. *Bull Environ Contam Toxicol*; 81:19–24.
- Liu W., Hou J., Wang Q., Ding L., Luo Y. (2014). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria and their effects on phytoremediation of oil-contaminated saline-alkaline soil. *Chemosphere* 117: 303-308.
- Liu J., Zhang H., Yao Z., Li X., Tang J. (2019). Thermal desorption of PCBs contaminated soil with calcium hydroxide in a rotary kiln. *Chemosphere* 220, 1041–1046.
- Lo Piccolo L., De Pasquale C., Fodale R., Puglia A. M., Quatrini P. (2011). Involvement of an alkane hydroxylase system of *Gordonia* sp. strain SoCg in degradation of solid n-alkanes. *Applied and environmental microbiology*, 77(4), 1204-1213.
- Ma J., Yang Y., Dai X., Li C., Wang Q., Chen C., Yan G., Guo S. (2016). Bioremediation enhances the pollutant removal efficiency of soil vapour extraction (SVC) in treating petroleum drilling waste. *Water Air Soil Pollut.* 227, 465.
- Mackay D., Shiu W.Y., Ma K.C. (1992) *Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals: Polynuclear aromatic hydrocarbons, polychlorinated dioxins and dibenzofurans*. Lewis Publishers, Chelsea, Michigan, USA.
- Maffucci M., Cappucci S., Levizzari R. (2008). Metodologie di messa in sicurezza e bonifica dei siti contaminati. 10.13140/RG.2.1.5147.0965.
- Manning J., Boopathy R., Kulpa C.F. (1995). A laboratory study in support of the pilot demonstration of a biological soil slurry reactor. Report no. SFIM-AEC-TS-CR-94038. US Army Environmental Center, Aberdeen Proving Ground, MD.

- Margesin R., Schinner F. (2001). Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3127-3133.
- Mariano A., Kataoka A., Angelis D., Bonotto D. (2007), Laboratory Study on the Bioremediation of Diesel Oil Contaminated Soil from a Petrol Station, *Brazilian Journal of Microbiology - BRAZ J MICROBIOL*, 38, 10.
- Marín M. M., Smits T.H.M., van Beilen J.B., Rojo F. (2001). The alkane hydroxylase gene of *Burkholderia cepacia* RR10 is under catabolite repression control. *Journal of bacteriology* 183.14: 4202-4209.
- Marschner P., Marhan S., Kadeler E. (2012). Microscale distribution and function of soil microorganisms at the rhizosphere-detritus interface. *Soil Biol. Biochem.* 49, 174e183.
- Martínez C.E., Motto H.L. (2000). Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. *Environmental Pollution*, Volume 107, Issue 1, Pages 153-158, ISSN 0269-7491.
- Martínková L., Uhnáková B., Pátek M., Nešvera J., Křen V. (2009). Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International*, Volume 35, Issue 1, Pages 162-177, ISSN 0160-4120.
- Meckenstock R.U., Boll M., Mouttaki H, Koelschbach J.S., Cunha Tarouco P., Weyrauch P., Dong X., Himmelberg A.M. (2016). Anaerobic Degradation of Benzene and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2016;26(1-3):92-118. doi: 10.1159/000441358. Epub 2016 Mar 10. PMID: 26960214.
- 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*, Volume 40, Issues 1–2, Pages 31-39, ISSN 0165-232X.
- McGenity J., Folwell B.D., McKew B.A., Sanni G.O. (2012). Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquat. Biosyst.*, 8, p. 10.
- Mena E., Villasenor J., Rodrigo M.A., Canizares P. (2016). Electrokinetic remediation of soil polluted with insoluble organics using biological permeable reactive barriers: effect of periodic polarity reversal and voltage gradient. *Chem. Eng. J.* 299, 30e36.
- Mendez-Natera J.R., Roque C., Zapata K., Otahola-Gómez V. (2004). Effect of concentration and time of soil contamination by oil on germination of maize seeds (*Zea mays* L.) Cv. Himeca 95. *Rev. UDO Agríc.* 4, 66–71.
- Merkl N., Schultze-Kraft R., Infante C. (2005). Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water Air Soil Pollut.* 165, 195–209.
- Mishra A. K., Kumar G. S. (2015), *Weathering of Oil Spill: Modeling and Analysis*. *Aquatic Procedia*, Volume 4, Pages 435-442.
- Mohan S.V., Sirisha K., Rao R.S., Sarma P.N. (2007). Bioslurry phase remediation of chlorpyrifos contaminated soil: process evaluation and optimization by Taguchi design of experimental (DOE) methodology. *Ecotoxicol Environ Saf* 68:252–262.
- Nardeli S.M., Saad C.F., Rossetto P.B., Caetano V.S., Ribeiro-Alves M., Paes J.E.S., Danielowski R., Maia L.C., Oliveira A.C., Peixoto R.S., Reinert F., Alves-Ferreira M. (2016). Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* to oil contamination. *Environ. Exp. Bot.* 127, 63e72.
- Naseri M., Barabadi A., Barabady J. (2014). Bioremediation treatment of hydrocarbon contaminated Arctic soils: influencing parameters. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1–16.

- Nayak A.S., Vijaykumar M.H., Karegoudar T.B. (2009). Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04 and its application in bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volume 63, Issue 1, Pages 73-79, ISSN 0964-8305.
- Newman M.M., Lorenz N., Hoilett N., Lee N.R., Dick R.P., Liles M.R., Ramsier C., Kloepper J.W. (2016). Changes in rhizosphere bacterial gene expression following glyphosate treatment. *Sci. Total Environ.* 553, 32e41.
- Nikolopoulou M., Kalogerakis N. (2016). Ex Situ Bioremediation Treatment (Landfarming). In: McGenity T., Timmis K., Nogales B. (eds) *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*. Springer Protocols Handbooks. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ogunneye A.L., Omoboyowa D.A., Sonibare A.L., Adebuseyi A.J., Faniran T.P. (2014). Hepatotoxicity and nephrotoxic effects of petroleum fumes on petrol attendants in Ibadan, Nigeria. *Niger. J. Basic Appl. Sci.* 22 (3&8), 57–62.
- Omoti A.E., Waziri-Erameh J.M., Enock M.E. (2008). Ocular disorders in a petroleum industry in Nigeria. *Eye* 22, 925–929.
- Ossai I.C., Fauziah S.H., Ghufran R. (2014). The utilization of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) as an aquatic macrophyte treatment system (AMATS) in phytoremediation for palm oil mill effluent (POME). *Int. J. Sci.: Basic Appl. Res.* 13 (2), 31–47.
- Ossai I. C., Ahmed A., Hassan A., Hamid F.S. (2020). Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology & Innovation*, Volume 17, 100526, ISSN 2352-1864.
- Österreicher-Cunha P., Vargas E.A., Guimarães J.R.D., Campos T.M.P., Nunes C.M.F., Costa A., Antunes F.S., Silva M.I.P., Mano D.M. (2004). Evaluation of bioventing on a gasoline–ethanol contaminated undisturbed soil. *Journal of Hazardous Materials* 110 (2004) 63–76.
- Panagos P., Van Liedekerke M., Yigini Y., Montanarella L. (2013), Contaminated Sites in Europe: Review of the Current Situation Based on Data Collected through a European Network, *Journal of environmental and public health*, 2013. 158764. 10.1155/2013/158764.
- Pancaldi S., Baldisserotto C., Ferroni L. (2019). *Fondamenti di botanica generale. Teoria e pratica in laboratorio*. McGraw-Hill Education, ISBN: 8838695369
- Patel R.N., Hou C.T., Laskin A.I., Felix A. (1982). Microbial oxidation of hydrocarbons: properties of a soluble methane monooxygenase from a facultative methane-utilizing organism, *Methylobacterium* sp. strain CRL-26. *Applied and Environmental Microbiology* 44.5: 1130-1137.
- Paudyn K, Rutter A, Rowe RK, Poland JS (2008). Remediation of hydrocarbon contaminated soils in the Canadian Arctic by landfarming. *Cold Reg Sci Technol* 53:102–114.
- Peng S., Zhou Q., Cai Z., Zhang Z. (2009). Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis Jalapa* L. in a greenhouse plot experiment. *J. Hazard. Mater.* 168, 1490–1496.
- Pérez A. P. and Eugenio N. R. (2018), Status of local soil contamination in Europe: Revision of the indicator “Progress in the management Contaminated Sites in Europe, EUR 29124 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2018, ISBN 978-92-79-80072-6, doi:10.2760/093804, JRC107508.
- Philp J.C., Atlas R.M. (2005). Bioremediation of contaminated soils and aquifers. In: Atlas, R.M., Philp, J.C. (Eds.), *Bioremediation: Applied Microbial Solutions for Real-world*

- Environmental Cleanup. American Society for Microbiology (ASM) Press, Washington, pp. 139–236.
- Phillips J.M., Hayman D.S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Brit. Mycol. Soc.*, Vol. 55: pp. 158–161.
- Piehler M.F., Swistak J.G., Pinckney J.L. and Paerl H.W. (1999). Stimulation of Diesel Fuel Biodegradation by Indigenous Nitrogen Fixing Bacterial Consortia. *Microb Ecol*38: 69-78.
- Pilon-Smits E. (2005). Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 15–39.
- Pino-Herrera D. O., Pechaud Y., Huguenot D., Esposito G., Eric D. van Hullebusch E. D., Mehmet A., Oturan M. A. (2017). Removal mechanisms in aerobic slurry bioreactors for remediation of soils and sediments polluted with hydrophobic organic compounds: An overview. *J Hazard. Mater.* 339, 427–449.
- Potter T.L., Simmons K.E. (1998), Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group, vol. 2, p. 102 Amherst Scientific Publishers.
- Puglisi E., Spina F., Spini G., Varese G. C. (2017), Il biorisanamento di suoli contaminati da idrocarburi. *ECOSCIENZA* Numero 4, Anno 2017.
- Quatrini P., Scaglione G., Cardinale M., Caradonna F., Puglia A.M. (2002). Bradyrhizobium sp. nodulating the mediterranean shrub spanish broom (*Spartium junceum* L.). *J Appl Microbiol* 2002; 92(1):13-21.
- Quatrini P., Scaglione G., Incannella G., Badalucco L., Puglia A.M., La Mantia T. (2003). Microbial inoculants on woody legumes to recover a municipal landfill site. *Water Air Soil Pollut Focus* 2003;3(3):189-99.
- Quatrini P., Scaglione G., Pasquale C., Riela S., Puglia A. (2008). Isolation of Gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline. *Journal of applied microbiology*, 104, 251-9.
- Rahman K.S.M., Rahman T.J., Lakshmanaperumalsamy P., Marchant R., Banat M. (2003). The potential of bacterial isolates for emulsification with a range of hydrocarbons. *Acta biotechnologica* 23.4: 335-345.
- Rayner J.L., Snape I., Walworth J.L., Harvey P.M., Ferguson S.H. (2007). Petroleum–hydrocarbon contamination and remediation by microbioventing at sub-Antarctic Macquarie Island. *Cold Reg Sci Technol* 48:139–153.
- Razavi B.S., Zarebanadkouki M., Blagodatskaya E., Kuzyakov Y. (2016). Rhizosphere shape of lentil and maize: spatial distribution of enzyme activities. *Soil Biol. Biochem.* 96, 229e237.
- Razzaq R. (2017). Phytoremediation: an environmental friendly technique – a review. *J. Environ. Anal. Chem.* 4 (2), 195.
- Ren X., Zeng G., Tang L., Wang J., Wang J., Deng Y., Liu Y., Peng B. (2018). The potential impact on the biodegradation of organic pollutants from composting technology for soil remediation. *Waste Manage.* 72, 138–149.
- Rhykerd R.L., Crews B., McInnes K.J., Weaver R.W. (1999). Impact of bulking agents, forced aeration and tillage on remediation of oil-contaminated soil. *Bioresour Technol* 67: 279-285.
- Richard J.Y., Vogel T.M. (1999). Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *Int. Biodet. Biod.* 44, 93-100.

- Riser-Roberts E. (1998). Remediation of Petroleum Contaminated Soils: Biological, Physical, and Chemical Processes. ISBN {Formatting Citation}, Record Number 19981909549, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Rodgers-Vieira E.A., Zhang Z., Adrion A.C., Gold A., Aitken M.D. (2015). Identification of anthraquinone-degrading bacteria in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and environmental microbiology* 81.11: 3775-3781.
- Rojo F. (2009). Degradation of alkanes by bacteria. *Environ Microbiol* 10:2477–9056.
- Rosario-Passapera R., Keddis R., Wong R., Lutz R.A., Starovoytov V., Vetriani C. (2012). *Parvibaculum hydrocarboniclasticum* sp. nov., a mesophilic, alkane-oxidizing alphaproteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent on the East Pacific Rise. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 62. Pt_12: 2921-2926.
- Rusin M., Gospodarek J., Nadgórska-Socha A. (2015). The effect of petroleum-derived substances on the growth and chemical composition of *Vicia faba* L. *Pol. J. Environ. Stud.* 24 (5), 2157–2166.
- Ryan M.P., Pembroke J.T., Adley C.C. (2007). *Ralstonia pickettii* in environmental biotechnology: potential and applications. *Journal of applied microbiology* 103.4: 754-764.
- Ryan R., Monchy S., Cardinale M. et al. (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat Rev Microbiol* 7, 514–525.
- Sabaté J., Viñas M., Solanas A.M. (2004), Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54, 19-25.
- Saikia R.R., Deka S., Deka M., Banat IM. (2012). Isolation of biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* RS29 from oil-contaminated soil and evaluation of different nitrogen sources in biosurfactant production. *Ann Microbiol.* 2012; 62:753–763.
- Sajna K.V., Sukumaran R.K., Gottumukkala L.D., Pandey A. (2015). Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 or its culture broth. *Bioresour. Technol.* 191, 133–139.
- Sammarco P.W., Kolian S.R., Warby R.A.F., Bouldin J.L., Subra W.A., Porter S.A. (2016). Concentrations in human blood of petroleum hydrocarbons associated with the BP/Deepwater Horizon oil spill, Gulf of Mexico. *Arch. Toxicol.* 90, 829–837.
- Santos J. & Maranhão L., (2018). Rhizospheric microorganisms as a solution for the recovery of soils contaminated by petroleum: A review. *Journal of environmental management.* 210. 104-113.
- Saum L., Jiménez M.B., Crowley D. (2018). Influence of biochar and compost on phytoremediation of oil-contaminated soil. *Int. J. Phytoremed.* 20 (1), 54–60.
- Seckin, C. (2016). Extended Exergy Accounting analysis of IGCC process e Determination of environmental remediation cost of refinery and coke processing waste. *J. Clean. Prod.* 119, 178-186.
- Seklemova E., Pavlova A., Kovacheva K. (2001). Biostimulation based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. *Biodegradation*, 12, 311-316.
- Sengupta A. and Dick W.A. (2015). Bacterial community diversity in soil under two tillage practices as determined by pyrosequencing. *Microbial ecology* 70.3: 853-859.

- Seo S.J., Kim J.H., Shin J.W., Park J.Y. (2015). Treatment of artificial and real co-contaminated soil by an enhanced electrokinetic-fenton process with a soil flushing method. *Water Air Soil Pollut.* 226 (86).
- Sethy S. K., Ghosh, S. (2013). Effect of heavy metals on germination of seeds. *Journal of natural science, biology, and medicine*, 4(2), 272–275.
- Shan B.Q., Zhang Y.T., Cao Q.L. (2014). Growth responses of six leguminous plants adaptable in Northern Shaanxi to petroleum-contaminated soil. *Environ. Sci.* 35, 1125–1130.
- Shekoohiyani S., Moussavi G., Naddafi K. (2016). The peroxidase-mediated biodegradation of petroleum hydrocarbons in a H₂O₂-induced SBR using in-situ production of peroxidase: biodegradation experiments and bacterial identification. *J. Hazard Mater.* 313, 170e178.
- Silva-Castro G.A., Uad I., Rodríguez-Calvo A., González-López J., Calvo C. (2015). Response of autochthonous microbiota of diesel polluted soils to land-farming treatments. *Environ. Res.* 137, 49–58.
- Simpanen S. (2016). Evaluation of in-Situ Remediation Methods in Soils Contaminated with Organic Pollutants. Dissertation in Environmental Ecology, University of Helsinki, Lahti, Finland.
- Sims R.C. and Sims J.L. (1999). Landfarming of petroleum contaminated soils, in D.C. Adriano, J.-M. Bollag, W.T. Frankenberger, Jr., and Sims, R.C. (Eds.), *Bioremediation of Contaminated Soils*, Monograph 37, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI, Chapter 27, pp. 767–782.
- Singer A.C., Crowley D.E., Thompson I.P. (2003). Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Biotechnology Trends* 21: 123–130.
- Singh B., Bhattacharya A., Channashettar V.A., Jeyaseelan C.P., Gupta S., Sarma P.M., Mandal A.K., Lal B. (2012). Biodegradation of oil spill by petroleum refineries using consortia of novel bacterial strains. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 89, 257–262.
- Singleton D.R., Adrion A.C., Aitken M.D. (2016). Surfactant-induced bacterial community changes correlated with increased polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in contaminated soil. *Applied microbiology and biotechnology* 100.23: 10165-10177.
- Smalla K., Wieland G., Buchner A., Zock A., Parzy J., Kaiser S. et al. (2001). Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4742–4751.
- Smith S.E., Read D.J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. New York, London: Academic. 787 pp. 3rd ed.
- Smits T.H.M., Röthlisberger M., Witholt B., van Bailsen J.B. (1999). Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains. *Environmental Microbiology* 1.4: 307-317.
- Smits T.H.M., Balada S.B., Witholt B., van Bailsen J.B. (2002). Functional analysis of alkane hydroxylases from gram-negative and gram-positive bacteria. *Journal of bacteriology* 184.6: 1733-1742.
- Smits T.H., Witholt B., van Beilen J.B. (2003). Functional characterization of genes involved in alkane oxidation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 84, 193–200.

- Spada V., Iavazzo P., Sciarrillo R.; Guarino C. (2017). Successful Integrated Bioremediation System of Hydrocarbon-Contaminated Soil at a Former Oil Refinery Using Autochthonous Bacteria and Rhizo-Microbiota. 10.1007/978-3-319-52381-1_3.
- Sriram K., Lin G.X., Jefferson A.M., Goldsmith W.T., Jackson M., McKinney W. (2011). Neurotoxicity following acute inhalation exposure to the oil dispersant COREXIT EC9500A. *J. Toxicol. Environ. Health A* 74, 1405–1418.
- Sun W., Li J., Jiang L., Sun Z., Fu M., Peng X. (2015). Profiling microbial community structures across six large oilfields in China and the potential role of dominant microorganisms in bioremediation. *Applied microbiology and biotechnology* 99.20: 8751-8764.
- Tamás J., Kovács E. (2008) Environmental technology. Debreceni Egyetem a TÁMOP 4.1.2 pályázat keretein belül.
- Tang M., Chen H., Huang J.C., Tian Z.Q. (2009). Effects of AM fungi on growth and physiology of *Zea mays* seedlings under diesel stress. *Soil Biol Biochem* 41: 936–940
- Thomé A., Reginatto C., Cecchin I., Colla L.M. (2014). Bioventing in a residual clayey soil contaminated with a blend of biodiesel and diesel oil. *J. Environ. Eng.* 140(11):06014005.
- Trulli E., Morosini C., Rada E.C., Torretta V. (2016). Remediation in situ of hydrocarbons by combined treatment in a contaminated alluvial soil due to an accidental spill of LNAPL. *Sustainability* 8, 1086.
- Tuhuloula A., Altway A., Juliastuti S.R., Suprpto S. (2014). Biodegradation of soils contaminated with naphthalene in petroleum hydrocarbons using bioslurry reactors. *IOP Conf Ser. Earth Environ. Sci.* 175, 012014.
- Ulrici W. (2000). Contaminated soil areas, different countries and contaminants monitoring of contaminants. In: Rehm, H.J., Reed, G. (Eds.), *Environmental Processes II. Soil Decontamination, Biotechnology*, Vol. 11b, 2nd Edition. Wiley-VCH, Weinheim, FRG, pp. 5-42.
- Van Beilen J.B., Panke S., Lucchini S., Franchini A.G., Röthlisberger M., Witholt B. (2001). Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes. *Microbiology (Reading)*, Jun;147(Pt 6):1621-1630.
- Van Beilen J.B., Smits T.H.N., Whyte L.G., Schorcht S., Röthlisberger M., Plaggemeier T., Engesser K.H., Witholt B. (2002). Alkane hydroxylase homologues in Gram-positive strains. *Environmental microbiology* 4.11: 676-682.
- Van Beilen J. B.; Li Z.; Duetz W. A.; Smits T. H.M.; Witholt B. (2003). Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment. In: *Oil & Gas Science and Technology - Rev. IFP* 58 (4), S. 427–440.
- Van Liedekerke M., Prokop G., Rabl-Berger S., Kibblewhite M., Lowagie G. (2014), *Progress in the Management of Contaminated Sites in Europe*, EUR 26376 2014.
- Varjani S.J., Upasani V.N. (2013). Comparative studies on bacterial consortia for hydrocarbon degradation. *Int. J. Innovative Res. Sci. Eng. Technol.* 2 (10), 5377– 5383.
- Varjani S.J., Thaker M.B., Upasani V.N. (2014). Optimization of growth conditions of native hydrocarbon utilizing bacterial consortium “HUBC” obtained from petroleum pollutant contaminated sites. *Indian J. Appl. Res.* 4 (10), 474–476.
- Varjani S.J., Rana D.P., Jain A.K., Bateja S., Upasani V.N. (2015). Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains

- isolated from on shore sites of Gujarat, India. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 103, 116–124.
- Varjani S.J., Srivastava V.K. (2015). Green technology and sustainable development of environment. *Renewable Res. J.* 3 (1), 244– 249.
- Varjani S.J., Upasani V.N. (2016). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresour. Technol.* 222, 195–201.
- Varjani S.J. (2017), Microbial degradation of petroleum hydrocarbons, *Bioresource Technology*, Volume 223, Pages 277-286.
- Venosa A.D., Lee K., Suidan M.T., Garcia-Blanco S., Cobanli S., Moteleb M., Haines J.R., Tremblay G., Hazelwood M. (2002). Bioremediation and biorecovery of a crude oilcontaminated freshwater wetland on the St. Lawrence River. *Bioremediation Journal*, 6 (3).
- Venosa A.D., Zhu X. (2003). Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. *Spill Sci Technol Bull* 8:163 178.
- Venturi V., Keel C. (2016). Signaling in the rhizosphere. *Trends Plant Sci.* 21, 187e198.
- Vergin K.L., Urbach E., Stein J.L., DeLong E.F., Lanoil B.D., Giovannoni S.J. (1998). Screening of a fosmid library of marine environmental genomic DNA fragments reveals four clones related to members of the order Planctomycetales. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3075–3078.
- Vidali M. (2001). Bioremediation: an overview. *Pure Appl. Chem.* 73, 1163-1172.
- Volpe A, D'Arpa S, Del Moro G, Rossetti S, Tandoi V, Uricchio VF (2012) Fingerprinting hydrocarbons in a contaminated soil from an Italian natural reserve and assessment of the performance of a low-impact bioremediation approach. *Water Air Soil Pollut* 223:1773–1782. doi:10.1007/s11270-011-0982-7.
- Wang S.Y., Kuo Y.C., Hong A., Chang Y.M., Kao C.M. (2016). Bioremediation of diesel and lubricant oil contaminated soil using enhanced landfarming system. *Chemosphere* 164, 558–567.
- Wang, M., Deng B., Fu X., Xu Z. (2019). Characterizations of microbial diversity and machine oil degrading microbes in machine oil contaminated soil. *Environmental Pollution* 255: 113190.
- Ward N.L. et al. (2009). Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Applied and environmental microbiology* 75.7: 2046-2056.
- Warhurst A.M., Fewson C.A. (1994). Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus*. *Critical Reviews in Biotechnology* 14(1):29-73.
- Weelink S.A., Van Doesburg W., Saia F.T., Rijkstra W.I., Röling W.F., Smidt H., Stams A.J. (2009) A strictly anaerobic betaproteobacterium *Georgfuchsia toluolica* gen. nov., sp. nov. degrades aromatic compounds with Fe (III), Mn (IV) or nitrate as an electron acceptor. *FEMS Microbiol Ecol* 70:575–585.
- Whelan M.J., Coulon F., Hince G., Rayner J., McWatters R., Spedding T., Snape I. (2015). Fate and transport of petroleum hydrocarbons in engineered biopiles in polar regions. *Chemosphere* 131, 232–240.
- Widdel F., Rabus R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 259– 276.

- Wilkes H., Buckel W., Golding B.T., Rabus R. (2016). Metabolism of Hydrocarbons in n-Alkane-Utilizing Anaerobic Bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2016;26(1-3):138-51. doi: 10.1159/000442160. Epub 2016 Mar 10. PMID: 26959725.
- Wolicka D., Suszek A., Borkowski A., Bielecka A. (2009). Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. *Bioresour. Technol.* 100, 3221e3227.
- World Health Organization [WHO] (1986). In *Immunotoxicology: Development of Predictive Testing for Determining the Immunotoxic Potential of Chemicals*. United Nations Environment Programme International Labor Office, Report of a Technical Review Meeting, WHO Press, London, U.K.
- Xue J., Yu Y., Bai Y., Wang L., Wu Y. (2015). Marine Oil-Degrading Microorganisms and Biodegradation Process of Petroleum Hydrocarbon in Marine Environments: A Review. *Curr Microbiol.* 2015 Aug;71(2):220-8. doi: 10.1007/s00284-015-0825-7. Epub 2015 Apr 28. PMID: 25917503.
- Xun F., Xie B., Liu S., Guo C. (2015). Effect of inoculating plant growth-promoting bacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on oats in oil-contaminated saline-alkaline soil to enhance phytoremediation. *Environ Sci Pollut Res* 22: 598-608.
- Yang J., Gu Y, Chen Z., Song Y., Sun F., Liu J., Waigi M.G. (2021). Colonization and performance of a pyrene-degrading bacterium *Mycolicibacterium* sp. Pyr9 on root surfaces of white clover. *Chemosphere*, Volume 263, ISSN 0045-6535.
- Yergeau E., Sanschagrin S., Maynard C., St-Arnaud M., Greer C.W. (2014). Microbial expression profiles in the willow rhizosphere are dependent on soil contamination. *ISME G* 8: 344-358.
- Zanaroli G., Toro S.D., Todaro D., Varese G.C., Bertolotto A., Fava, F. (2010). Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non-acclimated, complex source of microorganisms. *Microb. Cell Fact.* 9 (10), 1–13.
- Zerlia T. (2000). Il destino ambientale degli idrocarburi petroliferi nel sottosuolo: meccanismi di trasporto e di trasformazione. *Chimica e Industria* 82, 971.
- Zerlia T. (2001), Environmental impact of petroleum products in the soil Part II: Petroleum products composition and key properties. *Rivista dei Combustibili*, 55(3), 123-130.
- Zhang C., Mörtelmaier C., Margesin R. (2012). Characterization of the bacterial archaeal diversity in hydrocarbon-contaminated soil. *Science of the Total Environment* 421: 184-196.
- Zhang C., Chen X., Tan Y., Feng Y., Zhong Z. (2015). Soil vapor extraction removal of semi volatile organic compounds in soil: A pilot-scale study. In: *International Conference on Sustainable Energy and Environmental Engineering*. pp. 180–182.
- Zhao D., Liu C., Liu L., Zhang Y., Liu Q., Wu W.-M. (2011). Selection of functional consortium for crude oil-contaminated soil remediation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65, 1244-1248.
- Zhao C., Dong Y., Feng Y., Li Y., Dong Y. (2019). Thermal desorption for remediation of contaminated soil: A review. *Chemosphere* 221, 841–855.
- Zheng M., Ahuja M., Bhattacharya D., Clement T.P., Hayworth J.S., Dhanasekaran M. (2014). Evaluation of differential cytotoxic effects of the oil spill dispersant Corexit 9500. *Life Sci.* 95, 108–117.
- Zhu W. (2010). *Petroleum Polluted Soil and Sludge Bio-Treatment Technology*. China petrochemical press, Beijing, pp. 26–29.

