

ANALISI GENETICHE, UN SUPPORTO AL BIORISANAMENTO

LE ANALISI GENETICHE A SUPPORTO DELLA PROGETTAZIONE E DEL MONITORAGGIO DELLA BONIFICA SONO UN IMPORTANTE ESEMPIO DI COME L'UTILIZZO DI TECNOLOGIE INNOVATIVE, OLTRE A QUELLE TRADIZIONALI, RIESCA A MIGLIORARE EFFICIENZA, EFFICACIA E SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE DELL'INTERVENTO DI RISANAMENTO.

Il monitoraggio e la gestione della bonifica ambientale costituiscono il nodo fondamentale per la corretta riuscita del risanamento "progettato" in termini di efficienza, efficacia e sostenibilità ambientale.

Il caso studio riguarda la bonifica tramite biorisanamento di un punto vendita carburanti attivo (di seguito Pv) per cui è in corso un procedimento ambientale avviato ai sensi del dm 31/15 nel 2015.

Inquadramento del sito e descrizione della bonifica

L'area occupata dal Pv è di circa 3.000 m² e si inserisce in un contesto territoriale industriale e agricolo a media densità abitativa.

La stratigrafia del sito è caratterizzata da depositi di origine alluvionale, costituiti in prevalenza da limi e sabbie in alternanza a livelli ghiaiosi e argillosi; la falda freatica si attesta a circa 9 m dal piano campagna. Le indagini ambientali, eseguite sul sito in seguito al riscontro della non tenuta di una tubazione di benzina, hanno evidenziato nel suolo insaturo la presenza di sostanze idrocarburiche nei pressi dell'area di erogazione, e nelle acque sotterranee presenza di eteri (Mtbe ed Etbe) su tutta la superficie del Pv, compresi i punti di valle idrogeologica.

Alla luce dei risultati ottenuti dalle indagini ambientali e dall'elaborazione dell'Adr, è stato predisposto il progetto di bonifica, che prevede il trattamento del sottosuolo con tecnologia di biorisanamento; l'intervento è stato dimensionato sulla base di un test in laboratorio, in microcosmo, in cui sono state testate diverse condizioni e che ha permesso di definire la miscela di nutrienti e ossigeno più adatta alle condizioni sito-specifiche.

La bonifica è stata avviata a ottobre 2019 mediante l'iniezione nel sottosuolo,

attraverso transetti di piezometri, di ossigeno e della miscela di nutrienti e cofattori di sviluppo microbico più idonea a sostenere l'attività biologica dei microrganismi autoctoni presenti nel sottosuolo.

Analisi genetiche

L'efficacia di un intervento di biorisanamento è determinata sia dalla sussistenza di fattori ambientali favorevoli alla degradazione e sia dalla

TAB. 1
TARGET MOLECOLARI

Elenco target molecolari.

Target qPcr	Funzione del target
Universal bacteria (cellule/ml)	misura la quantità totale dei batteri presenti nel campione
varP	rileva il gene asfA, presente nella specie batterica <i>Variovorax paradoxus</i> , nota per degradare Mtbe, Etbe e Tba
icmA/hcmA	identifica il gene (idrossi)isobutirril-CoA mutasi, espresso dalla specie <i>Aquinoala tertiarycarbonis</i> , coinvolto nella completa degradazione di Mtbe ed Etbe
ethB	rileva il gene responsabile dell'espressione del citocromo P450, enzima coinvolto nelle prime fasi della degradazione di Mtbe ed Etbe, appartenente al genere <i>Rhodococcus</i>

Bacteria (genus level)	Funzione	Aerobico/ anaerobico	Abundance (%) PZ02 (ref)	Abundance (%) PZ04
<i>Thermodesulfobivrio</i>	Sulphate reduction	anaerobico	4	5
<i>Desulfosporosinus</i>	Sulphate reduction	anaerobico	<1	2
<i>Methanoregula</i>	Methanogen (production of methane)	anaerobico	Not detected	8
<i>Candidatus Brocadia</i>	Nitrogen/ammonia metabolism - anammox	anaerobico	<1	4
<i>Candidatus Kuenenia</i>	Nitrogen/ammonia metabolism - anammox	anaerobico	<1	3
<i>Geobacter</i>	Chlorinated ethenes and toluene degradation, iron metabolism	anaerobico	2	2
<i>Candidatus Jettenia</i>	Nitrogen/ammonia metabolism - anammox	anaerobico	<1	1
<i>Methanobacterium</i>	Methanogen	anaerobico	<1	1
<i>Candidatus Nitrosotenuis</i>	Ammonia oxidation	aerobico	<1	3
<i>Nitrosarchaeum</i>	Ammonia oxidation	aerobico	6	1
<i>Sulfuricaulis</i>	Sulphur oxidation	aerobico	1	2
<i>Methylobacter</i>	Methanotroph (methane oxidation)	aerobico	1	2
<i>Sideroxydans</i>	Iron oxidation	microaerophilic	2	2
<i>Gallionella</i>	Iron oxidation	microaerophilic	5	4
<i>Candidatus nitrotoga</i>	Nitrogen metabolism	both	2	1
<i>Polynucleobacter</i>	Freshwater bacteria - uses acetate	both	3	<1

TAB. 2 ANALISI NGS
Identificazione dei batteri dominanti con funzione e abbondanza



presenza di microrganismi adatti alle specifiche condizioni. Si è ritenuto pertanto importante far affidamento sui nuovi strumenti in grado di monitorare per via quantitativa il potenziale di biodegradazione dei contaminanti presenti (eteri), consistenti nell'analisi genetica di target molecolari in grado di quantificare e qualificare la comunità batterica presente.

In particolare, sono state effettuate sulle acque prelevate da piezometri scelti in base alla distribuzione del *plume* di contaminazione:

- analisi con tecnologia qPcr (*quantitative polymerase-chain-reaction*) che permette di rilevare il materiale genetico, individuare e quantificare solo gli specifici ceppi microbici degradatori dei contaminanti d'interesse. Nella *tabella 1* è riportato l'elenco dei target molecolari ricercati
- attraverso la tecnologia qPcr è stato possibile monitorare, con la ripetizione delle medesime analisi, la crescita dei ceppi microbici degradatori e di conseguenza l'efficacia del trattamento biologico
- analisi di sequenziamento del metagenoma (Ngs, *Next generation sequencing*), che permette di individuare tutte le specie della comunità microbica in base al loro Dna, per avere una visione completa di tutto ciò che costituisce il microsistema.

Esiti

I risultati delle analisi qPcr eseguite al tempo zero hanno evidenziato la sussistenza nelle acque sotterranee di un potenziale di degradazione biologica. Successivamente le medesime analisi sono state ripetute con lo scopo di monitorare la crescita dei batteri rilevati. In una specifica area del sito gli esiti di tale monitoraggio hanno evidenziato una scarsa crescita dei batteri specifici; in tale area è stato quindi effettuato un approfondimento mediante analisi Ngs, con lo scopo di ottenere ulteriori

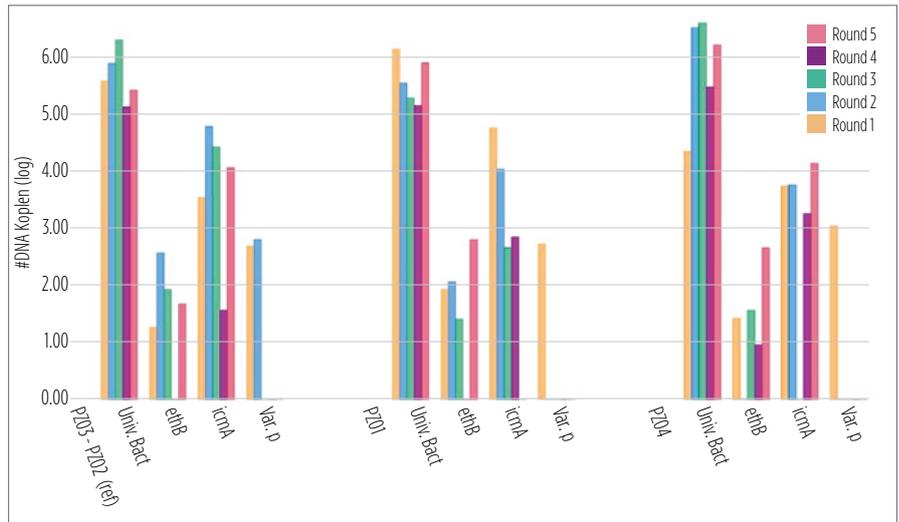


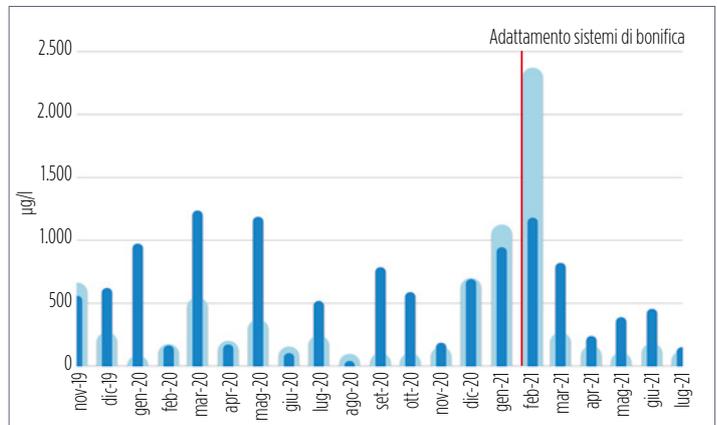
FIG. 1 ANALISI QPCR

Esito dei monitoraggi genetici successivi agli interventi post analisi genetiche.

FIG. 2 CONTAMINAZIONE NEL TEMPO

Andamento della contaminazione nel tempo.

- MTBE
- ETBE



informazioni riguardo l'efficacia della tecnologia di bonifica sull'intera popolazione batterica.

Da questa analisi è emersa (*tabella 2*), in tale area, la predominanza di specie anaerobiche e microaerofile (specie che vivono e crescono a basse quantità di ossigeno), segnale di una non sufficiente diffusione di ossigeno per lo sviluppo delle specifiche comunità aerobiche degradatrici dei contaminanti d'interesse. Tale informazione ha confermato la necessità di integrare il sistema di bonifica già presente per massimizzare l'efficienza di trattamento nella zona critica; è stato quindi installato un transetto di iniezione più vicino a tale area, in modo da incrementare in maniera adeguata la concentrazione di ossigeno disciolto. A valle di tale modifica si è riscontrato, con i monitoraggi genetici successivi, un forte aumento dei batteri totali e la crescita delle specie coinvolte nella degradazione aerobica degli eteri (*figura 1*).

Tali risultati sono stati confermati anche dalla rapida e sostanziale diminuzione della concentrazione degli eteri in tutti i piezometri di monitoraggio (*figura 2*).

Conclusioni

Lo studio ha messo in evidenza l'importanza di un nuovo strumento di caratterizzazione, le analisi genetiche, per la progettazione e per il monitoraggio dell'andamento di un intervento di *bioremediation*.

Nel caso in oggetto, infatti, le analisi effettuate hanno permesso di rilevare in un'area specifica che gli effetti dell'intervento di biorisanamento non erano ottimali, e quindi di individuare tempestivamente le azioni correttive necessarie ad aumentare l'efficienza di trattamento in tale zona; le analisi dei target specifici hanno inoltre permesso di verificare, in tempi brevi, l'efficacia delle azioni adottate.

Sara Fedeli¹, Elisa Rainaldi², Claudio Carusi³, Federica Brogioli⁴

1. Esperto Sviluppo&Compliance, Mares Srl
2. Responsabile Sviluppo&Compliance, Mares Srl
3. Manager Setore ambiente, Mares Srl
4. Specialista analisi molecolari, Orvion BV