

ISTISAN 1978/6

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

Laboratori degli Alimenti

Direttore: Prof. R. Negri

73/6

Possibilità di decontaminazione del
suolo contaminato da T.C.D.D.
mediante microorganismi.

Roma, 30 giugno 1977

RIASSUNTO

La degradazione microbica della T.C.D.D. proposta da più parti e con varie modalità come mezzo di decontaminazione, ha come base sperimentale descritta in letteratura, il lavoro di Matsumura e Benezet (*Environmental Health Perspectives*, 1973, pag. 253) nel quale si riportano risultati quantitativi ottenuti con alcuni ceppi (5 su 100 già preselezionati come attivi su pesticidi), e si dichiara di non aver potuto incrementare la loro velocità di degradazione della T.C.D.D.

In tale carenza di precedenti ricerche sul problema, le proposte sperimentate nell'I.S.S. hanno seguito due linee; la prima consistente in inoculi microbici attivi su sostanze clorurate (ma non sperimentati su T.C.D.D.), la seconda, consistente nel saggiare microrganismi isolati dal terreno contaminato di Seveso e microrganismi di collezione.

In questi ultimi anni, numerosi studi hanno dimostrato il ruolo svolto da diverse specie microbiche nella degradazione di composti organici, naturalmente o artificialmente presenti nell'ambiente, e già dalle prime osservazioni, eseguite durante la campagna di ricerca dei giacimenti petroliferi (1), si sono andati via via acquisendo numerosi dati sia sui substrati che sui meccanismi implicati nella loro degradazione (2,3,4,5,6).

Particolare rilievo hanno assunto queste coposcienze anche in relazione al problema derivante dal massiccio impiego in agricoltura di diserbanti e pesticidi, per il miglioramento della resa agricola, che hanno fatto sorgere, in relazione al passaggio di tali sostanze negli alimenti, il problema della loro degradazione.

In particolare sono stati studiati gli intermedi metabolici implicati nella degradazione di diversi composti organici, i meccanismi enzimatici di idrossilazione e di rottura dell'anello carbonioso e la natura degli enzimi che prendono parte a tali processi (7,8,9, 10,11,12,13).

Si ammette, generalmente, che il processo di idrossilazione sia la tappa essenziale per la rottura enzimatica dell'anello; gli enzimi che catalizzano tali reazioni sono stati indicati con il termine

ossidasi (14).

L'attività metabolica dei microrganismi nei confronti delle molecole organiche ha lasciato intravedere la possibilità di un loro impiego industriale.

E' ben noto, infatti, che miscele microbiche variamente composte o singole specie vengono utilizzate nelle industrie petrolifere, in agricoltura, nel trattamento di scarichi industriali e nella produzione di mangimi per uso zootecnico.

Particolare rilievo, infine, assume l'impiego dei microrganismi nel trattamento di ambienti contaminati da composti organici quali: fenoli, detergenti, grassi, cellulosa, cresoli, nafteni, oli, alcoli, paraffine, ecc.

Pertanto, alla luce di queste conoscenze ed in occasione del ben noto incidente di Seveso, conseguente alla fuoriuscita da un reattore di triclorofenolo e T.C.D.D. con vasta contaminazione dei luoghi adiacenti, accanto ad altri mezzi di bonifica, è stata avanzata l'ipotesi di impiegare anche fanghi microbici.

La mancanza di precisi dati bibliografici, ad eccezione del lavoro di Matsumura e Benetz (15) sulla degradazione della T.C.D.D. da parte di microrganismi, ha reso necessaria, prima di utilizzare

sul campo fanghi microbici, una sperimentazione in laboratorio al fine di verificarne la validità applicativa.

Scopo della presente nota é, pertanto, quello di riferire i risultati ottenuti nel corso di tali sperimentazioni, eseguite sulla base di protocolli presentati da alcune Ditte interessate al trattamento di bonifica mediante microrganismi.

Le esperienze relative alle miscele microbiche commerciali sono state condotte sia su terreno contaminato di Seveso che su substrati di minima addizionati di T.C.D.D.

Ulteriori ricerche vengono condotte su microrganismi isolati dal terreno contaminato di Seveso (zona A) e su microrganismi di collezione (Pseudomonas sp, E. coli, Corinebacteriae sp, Serratiae sp, Acromobacter sp), appartenenti a specie descritte in letteratura come valide nella degradazione di composti organici diversi.

Le ricerche sui microrganismi isolati dal suolo contaminato sono state dettate dal presupposto che il contatto con la T.C.D.D., analogamente a quanto ipotizzato per altri composti organici, può essere in grado di indurre nei microrganismi capacità degradanti o favorire l'affermarsi di popolazioni dotate di idoneo corredo enzimatico, presupposti questi suffragati anche da quanto

riportato in letteratura sul periodo di semivita della T.C.D.D.,
che risulta essere di circa un anno (16).

Le ricerche, invece, sugli stipiti di collezione rivestono caratte-
re di "verifica" di eventuale attività degradante su modelli di
dibenzoparadiossine, tenendo sempre presente le esperienze di
Matsumura (15) che, purtroppo, evidenziano la bassissima incidenza
di microrganismi atti a tale degradazione.

0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0

0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0

Nel quadro della decontaminazione da T.C.D.D. del terreno di
Seveso sono state effettuate quattro serie di sperimentazioni
impiegando due diverse miscele microbiche commerciali, denominate
W e P, fornite da Ditte specializzate e operanti nel settore della
decontaminazione ambientale.

Le sperimentazioni sulle due miscele microbiche sono state condotte
in parallelo

Le Ditte produttrici, in base ad esperienze pluriennali, avevano potuto rilevare la netta capacità demolitrice delle predette miscele nei confronti di composti organici di varia natura ed aromatici in particolare.

Gli esperimenti, in accordo con le Ditte produttrici, sono stati così articolati.

I Sperimentazione su terreno di Seveso

a) Preparazione del terreno contaminato

Sono stati omogenizzati n° 4 testimoni prelevati nella zona A di Seveso (102,103,104,105) del peso totale pari a g 1402.

Tale terreno é stato suddiviso in quattro aliquote da g 450 450-251-251 (contenuto teorico in T.C.D.D. circa 1,5 mcg/aliquota).

Le prime due aliquote sono state addizionate di acqua nella proporzione di 1:4 e sottoposte al trattamento rispettivamente con la miscela microbica W e P, mentre le restanti aliquote sono state addizionate esclusivamente di acqua nel rapporto di 1:5.

b) Riattivazione delle miscele microbiche

g 25 (W) e g (40) (P) sono stati addizionati rispettivamente con soluzione fisiologica in rapporto di 1:10 e con acqua minerale non gassata in rapporto di 1:6. Tali miscele sono state poste, quindi, a 32°C per 1 ora.

c) Arricchimento del terreno

Nel terreno di Seveso sono state effettuate le seguenti aggiunte:

W)	$K_2H_2PO_4$	0,3%
	K_2HPO_4	0,7%
	$Na_3C_6H_5O_7$	0,05%
	$MgSO_4$	0,01%
	$(NH_4)_2SO_4$	0,1%
	dodecano	1 ml
P)	$(NH_4)_2SO_4$	1,3 g
	$NaHCO_3$	3,2 g
	$NaCl$	0,6 g
	$MgSO_4$	0,2 g
	K_2HPO_4	1,5 g
	$CaCl_2$	0,2 g
	$Na_3C_6H_5O_7$	0,3 g

d) Conduzione dell'esperimento

I campioni di terreno arricchito sono stati addizionati delle miscele microbiche riattivate e posti sotto agitazione per sei ore, indi, addizionato di ulteriori composti organici (W= dode

ml 1 ; P= tryptose broth dehydrated Difco g 2) e di acqua fino al rapporto finale di 1:6. E' stata quindi ripristinata l'agitazione e l'ossigenazione per ulteriori 96 ore.

II Sperimentazione su terreno di Seveso

a) Preparazione del terreno contaminato

Un campione di terreno , del peso di Kg 6, prelevato dalla zona A di Seveso, é stato omogenizzato e suddiviso in 12 aliquote del peso ciascuna di g 500 (contenuto noto in T.C.D.D. circa 42,8 mcg/aliquota). I predetti campioni sono stati così contrassegnati:

- 1) Trattato W B1
- 2) Trattato W B2
- 3) Trattato W B3
- 4) Controllo W B4
- 5) Controllo W B5
- 6) Controllo W B8
- 7) Trattato P B7
- 8) Trattato P B10
- 9) Trattato P B11
- 10) Controllo p B6
- 11) Controllo P B9
- 12) Controllo P B12

I campioni di cui ai numeri 1-2-3-4-5-6 sono stati addizionati di:

KH_2PO_4	g 9
K_2HPO_4	g 21
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	g 1,5
MgSO_4	g 3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	g 3
dodecano	ml 1
H_2O distillata	ml 2000

Inoltre, i campioni di cui ai numeri 1-2-3 sono stati addizionati della miscela microbica W così precedentemente trattata:

g 25 di miscela addizionati di ml 250 di soluzione

fisiologica e mantenuti per 1 ora a 32°C

I campioni di cui ai numeri 7-8-9-10-11-12 sono stati addizionati di:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	g 1,3
NaHCO_3	g 3,2
KCl	g 0,6
MgSO_4	g 0,2
K_2HPO_4	g 1,5
CaCl_2	g 0,2
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	g 0,3
H_2O minerale non gassata	ml 2000

Inoltre i campioni di cui ai numeri 7-8-9 sono stati addizionati della miscela microbica così precedentemente trattata:

g 40 di miscela addizionati di ml 200 di acqua minerale non gassata mantenuti per 1 ora a 32°C

Tutti i campioni sono stati sottoposti ad agitazione ed areazione, a temperatura ambiente.

Dopo sei ore, i campioni di cui ai numeri 1-2-3-4-5-6 sono stati addizionati di ml 1 di dodecano e di acqua distillata (ml 750 i campioni n° 1-2-3; ml 1000 i campioni n° 4-5-6); i campioni di cui ai numeri 7-8-9-10-11-12 sono stati addizionati di g 2 di tryptose broth dehydrated Difco e di acqua minerale non gassata (ml 800 i campioni n° 7-8-9; ml 1000 i campioni 10-11-12).

L'agitazione e l'areazione é stata protratta per ulteriori 90 ore, per un totale, quindi, di 96 ore per tutti i campioni in esperimento.

Schema riassuntivo dei risultati ottenuti
nel corso delle Sperimentazioni I-II

sperimentazioni	prova	miscele microbiche	T.C.D.D valore medio mcg/aliquota terreno	T.C.D.D trovato mcg
I	1	W	1,3	0,13 non determinata teorico teorico
	2	P		
	3	-		
	4	-		
II	1	W	41,95	31,6
	2	W	58,60	40,8
	3	W	34,66	38,2
	4	P	50,30	44,8
	5	P	50,60	33,6
	6	P	33,20	36,2
	7A	-	36,90	33,6
	8A	-	25,60	21,1
	9A	-	51,80	33,6
	10B	-	53,45	43,5
	11B	-	34,68	31,8
	12B	-	38,25	42,8

Leggenda: A = Prove in bianco controllo W
B = Prove in bianco controllo P

Schema riassuntivo dei risultati ottenuti
nel corso delle Sperimentazioni III-IV

Sperimentazioni	prova	miscele microbiche	T.C.D.D. valore aggiunto	T.C.D. trovati mcg
III	1	W	8,19 mcg/350 ml substrato	7,7
	2C	-		9,1
	3	P		8,1
	4	W		7,5
	5	P		7,0
	6	P		4,7
IV	1	W	11,48 mcg/300 ml substrato	10,4
	2	W		10,9
	3	P		8,4
	4	P		8,9
	5	P		8,7
	6	P		7,5
	7	W		9,5
	8	W		7,6
	9	P		8,7
	10	P		10,0
	11C	-		8,4
	12C	-		9,3
	13	W		10,9
	14	W		10,7

Leggenda: C = Prove in bianco

III Sperimentazione su substrato di minima

a) Substrato di minima

KH_2PO_4	g 3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	g 0,5
NaHCO_3	g 1,06
NaCl	g 0,2
K_2HPO_4	g 7
cittrato di Na	g 0,5
MgSO_4	g 0,1
CaCl_2	g 0,1
H_2O q.b. a	ml 1000

Distribuire in matracci in ragione di ml 350/matracci ed al moment dell'uso aggiungere: Tween 80 ml 0,1; n-dodecano ml 0,2; glucosio g 1/matracci

b) Riattivazione delle miscele microbiche

Procedere come descritto nella I sperimentazione, utilizzando la miscela W in ragione di g 5/prova e la miscela P in ragione di g10/

c) Allestimento della prova

Il substrato di minima é stato addizionato di 8,19 mcg di T.C.D.D. /matracci e delle miscele microbiche riattivate , secondo il seguente schema:

- prova 1) miscela W
- prova 2) controllo
- prova 3) miscela P
- prova 4) miscela W
- prova 5) miscela P
- prova 6) miscela P (in substrato privo di glucosio)

Le prove di cui sopra sono state mantenute per 96 ore sotto agitazione a temperatura ambiente.

IV Sperimentazione su substrato di minima

a) Substrato di minima

vedere III sperimentazione

Distribuire in matracci in ragione di ml 300/matraccio ed al momento dell'uso aggiungere; Tween 80 ml 0,1; n-dodecano ml 0,2 / matraccio

b) Riattivazione delle miscele microbiche

Procedere come descritto nella III sperimentazione

c) Allestimento delle prove

Il substrato di minima, é stato addizionato di mcg 11,42 di T.C.D.D./
matraccio e delle miscele microbiche riattivate, secondo il seguente
schema:

prova 1-2: miscela W

prova 3-4: miscela P

prova 5-6: miscela P

prova 7-8: miscela W

prova 9-10: miscela P

prova 13-14: miscela W

prova 11-12: controllo

Le prove di cui sopra sono state mantenute a temperatura ambiente
per 96 ore

0000000000
00000000000000
00000000000000000000

Negli schemi riassuntivi sono riportati i risultati ottenuti nel corso delle sperimentazioni eseguite; il dosaggio del contenuto in T.C.D.D. in tutti i substrati impiegati é stato effettuato presso l' Istituto Superiore di Sanità secondo le modalità precisate nell'elaborato " Metodo per la determinazione della 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-diossina in materiali diversi; Istisan 1973/3 Roma 5 giugno 1977"

Le sperimentazioni sono state espletate impiegando inizialmente (sperimentazioni I e II) terreno contaminato di Seveso al fine di riprodurre , il più fedelmente possibile, le reali condizioni dell'eventuale impiego delle miscele microbiche in esame.

Nel corso di tali sperimentazioni sono, tuttavia, emerse difficoltà collegate, soprattutto, a problemi di ordine chimico-analitico; infatti, la presenza nel terreno di composti diversi, la difficoltà di omogenizzazione di un materiale così eterogeneo, la presenza di un elevato volume di acqua, ha reso difficoltosa la fase estrattiva e l'interpretazione dei risultati.

Si é tentato, pertanto, di proseguire le indagini (sperimentazioni III e IV) utilizzando un substrato artificiale in cui veicolare la T.C.D.D.

La scelta del substrato é stata dettata , oltreché da esigenze colturali, anche da presupposti tesi a limitare possibili interferenze nella fase analitica.

In particolare, la sperimentazione IV è stata condotta sempre su substrato artificiale, ma in assenza di glucosio, onde verificare il risultato ottenuto nel corso della terza sperimentazione (prova n°6) che si era dimostrato particolarmente interessante.

Tuttavia, anche l'adozione di un terreno artificiale di minima non è stata in grado di risolvere le difficoltà analitiche ed interpretative dei risultati già precedentemente incontrate.

Come si rileva dallo schema riassuntivo dei risultati esiste, infatti, una variabilità nei dati, a parità di condizioni operative, che potrebbe essere correlata ad una influenza del metabolismo microbico o alla variabilità di recupero della metodica analitica adottata.

Pertanto, sulla base di quanto emerso nel corso delle sperimentazioni eseguite, si è dell'avviso che una precisa valutazione di tale variabilità potrà essere ottenuta solo mediante l'impiego di composti particolari, quali diossina marcata.

A tal fine, sono in corso sperimentazioni su microrganismi isolati dal terreno di Seveso e su microrganismi di collezione onde verificare:

- a) presenza di attività enzimatica a carattere ossidasico
- b) capacità di dealogenare composti cloroorganici

Tale ipotesi di lavoro sono confortate da precisi dati bibliografici (17-18-19-20).

Pertanto tutti i microrganismi selezionati, aventi le caratteristiche sopramenzionate saranno saggiati nei confronti delle dibenzoparadiossine.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Bersteecher, E - Petroleum Microbiology; Elsevier Press, Inc N.Y.
1954
- 2) Gibson, D.T. - Science, 161, 3846, 1093, 1968
- 3) Horvath, R.S. - Bacterial. Review , 36(2), 146, 1972
- 4) McCormick, N.G. et al. - Appl. Environ. Microbiol. 31(6), 949, 1976
- 5) Marr, E.K. et al. - J. Bacteriol. 81, 425, 1961
- 6) Suzuki, T. - J. Environ. Sci. Health, B12(2)113, 1977
- 7) Munnecke, D.M. et al. - Appl. Microbiol., 304, 575, 1975
- 8) Tu, C.M. - Arch. Microbiol. 108, 259, 1976
- 9) Van Dijck, P.J. et al. - European J. Appl. Microbiol. 2, 277, 1976
- 10) Tu, C.M. et al. - Life Science 7, 311, 1968
- 11) Sharabin, N.E. - Appl. Microbiol. 18(3), 369, 1969
- 12) Munnecke, D.M. et al. - Appl. Microbiol. 28(2), 212, 1974
- 13) Francis, A.J. et al. - Appl. Microbiol. 29(4), 567, 1975
- 14) Hayishi, Q. - Proc. Int. Congr. Biochem. 6th, N.Y. 33, 31, 1964
- 15) Matsumura, F. et al. - Environmental Health Perspectives 253, 1973
- 16) Kearney, P.C. et al. - Advan. Chem. Ser. 120, 105, 1973
- 17) Bayilii, R.C. et al. - J. Bacteriol. 127(3), 1098, 1976
- 18) Crawford, R.L. - J. Bacteriol. 121(3), 531, 1975
- 19) Kauffman, D.D. et al. - Appl. Microbiol. 13(2), 443, 1965
- 20) Senior, E. et al. - Nature 263(7), 476, 1976

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici pubblicati nei rapporti ISTISAN è dei singoli autori.

La riproduzione parziale o totale dei "Rapporti ISTISAN" deve essere preventivamente autorizzata dai competenti Direttori di Laboratorio o Servizio.

A cura del Servizio Documentazione dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - Roma

MAGGIO 1978