

STRATEGIE DI CO-COMPOSTAGGIO PER IL BIORISANAMENTO DEI SUOLI CONTAMINATI DA IDROCARBURI: INATTIVAZIONE DEI SEMI INFESTANTI E PROLUNGAMENTO DELLA FASE TERMOFILO

Davide Rossi ^{1}, Andrea Franzetti ¹, Giancarlo Renella ², Luigi Righini ³*

¹ Università degli Studi di MILANO Bicocca – DISAT

² Università degli Studi di PADOVA - AFNAE

³ Ordine Interprovinciale dei Chimici e dei Fisici di Parma e Piacenza

** Corresponding Author: d.rossi39@campus.unimib.it*

Sommario. Una delle principali criticità per il riutilizzo dei suoli sottoposti a biorisanamento è la presenza di semi di piante infestanti, derivanti dal materiale di partenza o accumulatisi durante il trattamento. L'elevata densità di semi, associata all'aumento della fertilità dei terreni bonificati, può favorire una rapida colonizzazione vegetale con conseguenti problematiche fitosanitarie. Questo studio ha valutato l'impiego di ammendanti organici termogenici in processi di co-compostaggio di suoli contaminati da idrocarburi mediante biopile dinamiche, con l'obiettivo di prolungare la fase termofila per inattivare i semi infestanti e accelerare la biodegradazione degli inquinanti. Il progetto, sviluppato nell'arco di due anni, si è articolato in una fase preliminare su scala di mesocosmo ($\approx 1 \text{ m}^3$), finalizzata all'individuazione delle condizioni operative più efficaci, e in una fase successiva su scala pilota (fino 100 t). L'inibizione della germinazione è stata valutata tramite prove di falsa semina in condizioni controllate, mentre parallelamente sono state monitorate la concentrazione di idrocarburi e le dinamiche delle comunità batteriche. I risultati indicano che l'aumento della scala e l'aggiunta di materiale verde favoriscono una maggiore attività termogenica (52°C), associata a una riduzione della germinazione. Lo studio mira a definire strategie operative efficaci e sostenibili per il recupero dei suoli contaminati.

INTRODUZIONE ED OBIETTIVO DEL PROGETTO

Il progetto ha approfondito possibili soluzioni tecnologiche per affrontare la persistenza di semi invasivi nei sedimenti sottoposti a processi di biorisanamento. I trattamenti sperimentali sono stati concepiti per valutare: l'effetto di ammendanti organici (azione termica), del rivoltamento meccanico e delle dimensioni delle biopile

“strategie di co-compostaggio per il biorisanamento di suoli contaminati da idrocarburi”

(effetto massa) sulla riduzione della vitalità dei semi presenti pretrattamento. Nel corso dei primi due anni di lavoro sono stati elaborati e condotti diversi esperimenti finalizzati a valutare l'efficacia di strategie di co-compostaggio per il trattamento di suoli contaminati da idrocarburi. Il progetto si articola in due fasi principali. La prima, sviluppata nel corso del primo anno, è stata condotta a scala di mesocosmo (circa 1 m³ di suolo). La seconda fase ha previsto una serie di prove su scala pilota, con biopile dinamiche di dimensioni progressivamente maggiori, ed ha coinvolto sia il primo che il secondo anno di attività. L'obiettivo complessivo dello studio è stato quello di individuare le condizioni operative ottimali in grado di garantire un equilibrio tra costi economici e ambientali, resa del processo ed effettiva capacità di degradazione dei contaminanti, nonché di inibizione della germinazione dei semi.

MATERIALI E METODI

Allestimento dei mesocosmi

Sono stati allestiti quattro mesocosmi riempiendo altrettanti contenitori in polipropilene espanso (volume 61 L, dimensioni 60 × 40 cm) con suolo contaminato da idrocarburi. L'ossigenazione è stata garantita mediante insufflazione d'aria. La temperatura è stata monitorata in continuo tramite sonda, mentre l'umidità è stata controllata periodicamente al fine di mantenerla a valori ottimali. Le conduzioni testate sono state le seguenti:

- Mesocosmo A: terreno contaminato + materiale verde non compostato (20% v/v)
- Mesocosmo B: terreno contaminato + lecitina di soia (5% p/p)
- Mesocosmo C: terreno contaminato + + materiale verde non compostato (15% v/v) + biochar (5% v/v)
- Mesocosmo di controllo: terreno contaminato

Allestimento delle prove pilota

In parallelo alle prove condotte su scala di mesocosmo, è stata realizzata una prima biopila dinamica su scala pilota (circa 60 t), utilizzando lo stesso suolo iniziale, precedentemente vagliato a 10 mm, al fine di valutare le caratteristiche di inerzia termica di un sistema di dimensioni industriali. Il terreno è stato ammendato con il 20% in volume di materiale verde non compostato, replicando una delle condizioni sperimentali testate su scala ridotta. Su questa biopila sono state effettuate misure della concentrazione di ossigeno (O₂) nel gas interstiziale del suolo, utilizzate per definire una frequenza di rivoltamento in grado di massimizzare lo sviluppo termico mantenendo al contempo condizioni favorevoli alla biodegradazione aerobica. La sperimentazione su scala pilota è proseguita con l'allestimento di ulteriori biopile di dimensioni inferiori, finalizzate a valutare l'influenza della massa del materiale sull'efficacia del trattamento. Il suolo di partenza, diverso dal precedente, ma con una simile contaminazione da idrocarburi alifatici, è stato vagliato a circa 10 mm e

“strategie di co-compostaggio per il biorisanamento di suoli contaminati da idrocarburi”

utilizzato per la realizzazione di due biopile dinamiche di circa 10 t ciascuna (15/25 A e B). Al fine di migliorare la leggibilità dei risultati relativi all'inibizione della germinazione, il terreno è stato addizionato con semi di prato e di pisello prima della formazione dei cumuli; nella biopila 15/25 A è stato inoltre incorporato il 20% v/v di scarti verdi triturati (6 mm). In parallelo, sono stati predisposti piccoli cumuli di terreno commerciale e diverse condizioni di controllo, comprendenti suolo tal quale, suolo con semi, suolo con materiale verde e suolo contaminato non trattato. Le biopile sono state sottoposte a rivoltamenti periodici e monitorate in termini di andamento termico, ossigenazione, concentrazione di idrocarburi e inibizione della germinazione. È stata infine condotta una seconda sperimentazione su scala maggiore, mediante l'allestimento di due biopile dinamiche di circa 100 t ciascuna. Anche in questo caso è stato utilizzato un suolo differente rispetto alla prova precedente, ma caratterizzato da tipologie di contaminazione analoghe; anche in questa fase sono stati introdotti semi di prato per il monitoraggio della germinazione. Le due biopile differivano per la composizione, poiché nella biopila 23/25 A è stato aggiunto il 20% v/v di materiale verde triturato (6 mm). Le modalità di allestimento e gestione sono state mantenute costanti al fine di consentire il confronto dell'influenza dei parametri operativi sulle prestazioni termiche, sullo sviluppo della comunità microbica e sull'efficienza di degradazione dei contaminanti.

Verifica di germinazione post-trattamento

Per verificare la presenza di semi vitali e la germinazione dei semi introdotti artificialmente, sono stati sviluppati due protocolli. Il terreno proveniente dai mesocosmi e una quota rappresentativa del materiale della biopila dinamica di 60 t sono stati collocati in sei contenitori in plastica trasparente da 55 L ciascuno. I contenitori sono stati forati sul fondo per consentire il drenaggio dell'acqua in eccesso e coperti con una rete a maglia fine al fine di prevenire contaminazioni esterne da semi infestanti. Una volta posizionato, il terreno è stato manualmente rimescolato per ridurre la presenza di zolle e favorire condizioni omogenee di germinazione, quindi irrigato regolarmente. I contenitori sono stati collocati in ambiente esterno, esposto alla radiazione solare diretta. L'emergenza delle specie infestanti è stata monitorata per un periodo di 3–4 settimane, intervallo ritenuto sufficiente per l'osservazione della germinazione di eventuali semi vitali.

Per le altre prove pilota, invece, al tempo zero sono state prelevate tre aliquote di suolo da ciascuna biopila (A e B) e collocate in vasi di 1L, mantenuti in camera di crescita presso l'Università di Milano-Bicocca, con illuminazione ed irrigazione controllate e regolari. Il campionamento è stato ripetuto ogni 10–12 giorni, immediatamente dopo il rivoltamento meccanico delle biopile. Ogni vaso è stato monitorato per un mese, registrando il numero di plantule emerse e, quando possibile, le specie germinate.

Analisi microbiologiche

Le analisi microbiologiche hanno riguardato le regioni ipervariabili V5–V6 del gene 16S rRNA (Wang e Qian, 2009), amplificate e sequenziate mediante piattaforma

“strategie di co-compostaggio per il biorisanamento di suoli contaminati da idrocarburi”

Illumina MiSeq, con successiva elaborazione bioinformatica tramite DADA2. I campioni di suolo, prelevati solo per le biopile 23/25 A e B sono stati raccolti all’inizio dell’esperimento (T0), durante (T2, T3) e al termine (T4). L’estrazione del DNA è stata effettuata utilizzando il FastDNA™ Spin Kit (MP Biomedicals). La presenza di DNA batterico è stata preliminarmente verificata tramite PCR con i primer F27/R519, confermata dalla visualizzazione di una banda di circa 500 bp su gel di agarosio. La PCR di sequenziamento ha interessato la regione V5–V6 utilizzando i primer F783/R1027, secondo il protocollo Illumina a 27 cicli (94 °C denaturazione, 47 °C annealing, 72 °C estensione). I frammenti amplificati sono stati purificati con il kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) e sequenziati mediante piattaforma ILLUMINA MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, USA).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sviluppo termico

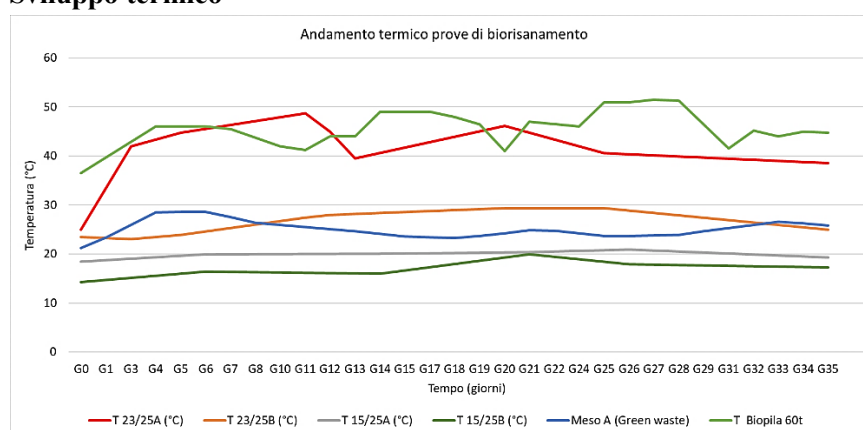


Figura 1. Grafico relativi all’andamento termico delle prove di biorisanamento durante i primi trentacinque giorni di trattamento.

L’andamento termico registrato nei primi 35 giorni di trattamento evidenzia differenze marcate tra le diverse prove, direttamente riconducibili alla scala operativa e alla composizione delle biopile. La biopila da 60 tonnellate ha raggiunto rapidamente condizioni termofile stabili, mantenendo temperature superiori a 45 °C per un periodo prolungato, a conferma dell’effetto massa, dal ruolo dell’ammendante verde e dell’elevata inerzia termica tipica dei sistemi di grande scala. Le biopile 23/25 hanno mostrato comportamenti differenziati: la biopila 23/25 A, arricchita con materiale verde, ha evidenziato un rapido incremento della temperatura e un picco termico marcato entro le prime due settimane, mentre la biopila 23/25 B, priva di substrati facilmente biodegradabili, ha mostrato un aumento più graduale e temperature complessivamente inferiori, rimanendo prevalentemente in regime mesofilo. Il mesocosmo A e le biopile

15/25 A e B, caratterizzati da masse ridotte e da un elevato rapporto superficie/volume, non hanno raggiunto soglie termofile, mostrando andamenti fortemente influenzati dalle condizioni ambientali e dalla dispersione del calore. Nel complesso, questi risultati indicano che solo la combinazione di adeguata scala operativa e disponibilità di sostanza organica labile consente lo sviluppo di un metabolismo microbico sufficientemente intenso da sostenere l'autorigenerazione termica del sistema, con ricadute dirette sulla selezione delle comunità microbiche e sull'efficacia del trattamento, inclusa l'inibizione della germinazione dei semi.

Analisi delle comunità microbiche

Le analisi delle comunità batteriche dei campioni provenienti dalle biopile 23/25 A e B hanno evidenziato una marcata dinamica temporale durante il trattamento, con un lieve effetto selettivo associato al picco termico (T2) (Moreno *et al.*, 2021). In questa fase il picco termico agisce come filtro ecologico, si osserva una riduzione, seppur limitata, dei taxa mesofili e un incremento relativo di gruppi noti per la resistenza allo stress e la degradazione della sostanza organica complessa. In questa fase risultano, infatti, relativamente più abbondanti Actinobacteria filamentosi e sporigeni (come *Streptomyces*, *Micromonospora* e membri delle *Thermomonosporaceae*), taxa ampiamente documentati per la loro capacità di persistere e rimanere metabolicamente attivi in condizioni termofile o sub-termofile, oltre che per il loro ruolo chiave nella degradazione di composti organici complessi e recalcitranti, (Peng *et al.*, 2013).

Nel complesso, la biopila arricchita con materiale verde ha mostrato una comunità microbica più strutturata e funzionalmente orientata, coerente con un più marcato sviluppo termico i risultati suggeriscono una stretta interazione tra parametri operativi, dinamiche microbiche e inibizione della germinazione (Meng *et al.*, 2019) (Larney e Blackshaw, 2003).

Germinazione delle piante dopo il trattamento

Nel corso delle prove di falsa semina, nelle prime 3–4 settimane di osservazione non è stata rilevata alcuna emergenza vegetale in nessuna delle condizioni sperimentali considerate, incluso il controllo. A partire dal mese successivo, è stata invece osservata una crescita abbondante di piante in tutti i contenitori; tuttavia, le specie emerse risultavano ampiamente diffuse anche nelle aree immediatamente adiacenti alla zona di posizionamento delle cassette. Sulla base di tale evidenza, si è ipotizzato che la crescita osservata fosse riconducibile a una contaminazione successiva da semi provenienti dall'ambiente circostante, piuttosto che alla presenza di semi vitali originariamente contenuti nei terreni trattati. L'assenza di germinazione nella fase iniziale potrebbe inoltre essere stata influenzata da condizioni meteorologiche non previste, potenzialmente sfavorevoli all'emergenza delle plantule. Alla luce di queste considerazioni, nelle successive sperimentazioni le prove di falsa semina sono state condotte in ambiente controllato, mediante l'utilizzo di una camera di crescita, al fine di ridurre le variabili ambientali e migliorare l'affidabilità dei risultati.

“strategie di co-compostaggio per il biorisanamento di suoli contaminati da idrocarburi”

Nelle biopile 15/25 è stata osservata un'elevata germinazione iniziale, costituita principalmente da Graminacee introdotte intenzionalmente nel substrato prima del compostaggio, insieme a specie erbacee spontanee quali *Chenopodium*, *Urtica* ed *Euphorbia*. L'analisi dell'abbondanza totale ha evidenziato una marcata diminuzione nel tempo, attribuibile principalmente ai rivoltamenti meccanici delle biopile. Tali operazioni avrebbero verosimilmente alterato la banca semi e ridotto progressivamente l'idoneità del substrato all'insediamento delle plantule. Questa dinamica supporta l'ipotesi di un ruolo determinante dei fattori meccanici nel controllo della germinazione residua durante il trattamento. Nelle biopile 23/25 la germinazione è risultata complessivamente inferiore e meno diversificata rispetto al trattamento 15/25, essendo dominata quasi esclusivamente dalle Graminacee introdotte, con sporadica comparsa di altre specie dicotiledoni (ad es. *Nasturtium*). È emersa una chiara differenza tra le repliche: nella biopila 23/25 A la germinazione ha mostrato una riduzione più marcata, in accordo con il profilo termico più accentuato registrato nella fase iniziale del trattamento. Al contrario, nella biopila 23/25 B, caratterizzata da una minore variabilità termica, la germinazione si è mantenuta più stabile, seppur limitata. Nel complesso, questi risultati indicano che, nelle biopile di maggiore scala, le dinamiche termiche possono svolgere un ruolo decisivo nel modulare la persistenza della capacità germinativa sia delle specie introdotte sia di quelle spontanee.

BIBLIOGRAFIA

- Larney, F.J. e Blackshaw, R.E. (2003) «*Weed Seed Viability in Composted Beef Cattle Feedlot Manure*», *Journal of Environmental Quality*, 32(3), pp. 1105–1113. Disponibile su: <https://doi.org/10.2134/jeq2003.1105>.
- Meng, Q. et al. (2019) «*Microbial Community Succession and Response to Environmental Variables During Cow Manure and Corn Straw Composting*», *Frontiers in Microbiology*, 10. Disponibile su: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00529>.
- Moreno, J. et al. (2021) «*Revisiting the succession of microbial populations throughout composting: A matter of thermotolerance*», *Science of The Total Environment*, 773, p. 145587. Disponibile su: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145587>.
- Peng, J. et al. (2013) «*Bacterial communities predominant in the degradation of 13C4-4,5,9,10-pyrene during composting*», *Bioresource Technology*, 143, pp. 608–614. Disponibile su: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.039>.
- Wang, Y. e Qian, P.-Y. (2009) «*Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies*», *PLOS ONE*, 4(10), p. e7401. Disponibile su: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>.