



Consiglio Nazionale delle Ricerche

Istituto per lo Studio degli Ecosistemi

Sede di Pisa

Progetto BIAGRO

RAPPORTO PRELIMINARE SULLA CARATTERIZZAZIONE MICROBICA DEI GESSI TIOXIDE RELATIVAMENTE ALLA INDIVIDUAZIONE DI CEPPI BATTERICI IN GRADO DI INTERAGIRE COL VANADIO, E RISULTANZE DEI TEST DI CESSIONE DEL VANADIO DAI GESSI TIOXIDE SOTTOPOSTI ALL' AZIONE DI ESTRAENTI DIVERSI

Test microbiologici

Nell'ambito del Progetto BIAGRO, sono state allestite prove preliminari, in collaborazione con i Laboratori di Biotecnologie Microbiche e Microbiologia Ambientale dell'Università degli Studi di Verona, tese ad individuare nei gessi prodotti da Tioxide la possibile presenza di cenosi batteriche in grado di interagire con il vanadio (V) in termini di variazione dello stato di ossidazione originario e, perciò, sulla mobilità (solubilità) dello stesso.

L'interesse per il vanadio si giustifica, in prima battuta, a fronte delle perplessità che la presenza di questo elemento nei gessi in oggetto muove in termini di potenziale impatto negativo, laddove non esistono – ad oggi - consistenti dati di letteratura relativi alla reale biodisponibilità di V nell'ambiente.

E' ovvio che la caratterizzazione microbiologica dei gessi Tioxide non potrà esaurirsi con lo studio dei microrganismi coinvolti nel solo ciclo biogeochimico del vanadio. Le interazioni microbiche con altri singoli elementi (es. manganese e zolfo), ma anche con le possibili frazioni del biogas in ambiente di discarica, dovranno essere chiarite nel corso dell'attuazione del Progetto BIAGRO, ai fini del riconoscimento di compatibilità dei gessi quale potenziale matrice di copertura (capping).

Per l'indagine sui batteri vanadio-resistenti e vanadio-trasformatori, sono state allestite colture di

arricchimento in beute da 250 ml contenenti acqua bidistillata, con o senza aggiunta di estratto di lievito (0.5 %), addizionata rispettivamente – in funzione di pressione selettiva - con NH_4VO_3 (ammonio metavanadato), NaVO_3 (sodio metavanadato) o V_2O_3 (ossido di vanadio trivalente) nella misura di 50 mM. NH_4VO_3 e NaVO_3 sono composti cristallini, in cui il V è presente nello stato massimo di ossidazione (5+). La scelta è ricaduta su questi composti del vanadio in quanto i meta vanadati rappresentano le specie chimiche più solubili dell'elemento in questione e assai diffuse – insieme agli ossidi di vanadio trivalente (comunque saggiato!) - in ambiente aerobico. Le beute di arricchimento sono state inoculate con una aliquota di gessi Tioxide. Dopo incubazione in coltura agitata a 27 °C per 15 giorni, al buio, al fine di ottenere in coltura axenica gli eventuali ceppi batterici presenti, si è proceduto agli strisci dei vari arricchimenti su piastre Petri contenenti mezzo Nutrient agarizzato (1/2 strength Agarized Nutrient Broth), addizionate con NH_4VO_3 alle concentrazioni di 5 o 10 mM, ovvero contenenti mezzo TYG (Agarized Triptone-YeastExtract-Glucose Broth) e addizionate con NH_4VO_3 alla concentrazione di 20 mM. Il risultato può essere così riassunto: 16 isolati provenienti dagli arricchimenti in presenza di V_2O_3 , 18 isolati dagli arricchimenti in presenza di NaVO_3 e 20 isolati dagli arricchimenti in presenza di NH_4VO_3 .

Tra questi isolati, alcuni hanno chiaramente evidenziato la capacità di trasformare l'ammonio metavanadato. In particolare, come si può vedere in Fig. 1 (piastra Petri di sinistra), almeno un ceppo batterico ha dimostrato di precipitare il vanadato (di colorazione gialla nel mezzo di coltura) in forma di un alone insolubile grigio/nero/verdastro. Sulla scorta delle informazioni di letteratura, le uniche forme del vanadio riconducibili a questo aspetto possono essere il vanadio metallico (valenza 0) ovvero il solfuro di vanadio (V_2S_3). Entrambe queste specie sono particolarmente insolubili. Determinazioni analitiche mirate sono state tuttavia programmate al fine di accertare in maniera incontrovertibile la natura del precipitato. D'altra parte (Fig. 1, piastra Petri di destra), il bioaccumulo extra- o intracellulare del metavanadato può essere ipotizzato in base alla completa decolorazione del mezzo di coltura, contestualmente all'assunzione di una colorazione giallognola da parte delle cellule batteriche. Anche questo meccanismo potrebbe giocare un ruolo fondamentale nella valutazione della mobilità del vanadio nell'ambito dei gessi Tioxide.

Quanto sopra detto rappresenta un'interpretazione, per quanto plausibile, del tutto preliminare e in attesa di conferma. Sono inoltre attualmente in corso le estrazioni del DNA genomico che consentiranno il sequenziamento delle regioni ipervariabili del gene codificante per il 16S rRNA di ciascuno degli isolati, in modo da risalire - mediante confronto delle sequenze in banca-dati – alla corretta collocazione tassonomica dei ceppi batterici ottenuti. Ciò permetterà di guadagnare informazioni preziose circa le caratteristiche biochimiche dei batteri in questione, necessarie per

una corretta interpretazione delle potenzialità dei medesimi e per l'efficace gestione di questi microrganismi nel contesto finale di applicazione della matrice d'origine.

Test chimici

Per quanto riguarda le prove di cessione del vanadio dai gessi Tioxide eseguite presso i Laboratori di Chimica del Suolo dell'ISE/CNR all'Area della Ricerca di Pisa, di seguito è riportato sinteticamente quanto finora effettuato in via preliminare.

I campioni di gesso rosso da sottoporre ad analisi (provenienti sia dal filtro rotativo, nella fase immediatamente successiva alla neutralizzazione con carbonato di calcio, sia dalla discarica interna dello stabilimento), sono stati previamente essiccati in stufa alla temperatura di 40°C per 5 giorni. I campioni essiccati sono stati quindi sottoposti ad estrazione sequenziale mediante l'utilizzo di estraenti di forza progressivamente crescente. Ogni passaggio prevede che la soluzione di estraente sia posta a contatto sotto agitazione con il campione oggetto di studio per un tempo opportuno. Nella presente analisi sono stati utilizzati, in successione, H₂O, CH₃COOH 0.11 M e NH₂OH·HCl 0.5 M, estraenti il cui uso è previsto dal metodo BCR, ossia dalla procedura di estrazione standardizzata dalla Comunità Europea (Žemberyová et al., 2006), in due rapporti gesso:estraente di 1:5 e 1:40 (peso/volume). Le miscele sono quindi centrifugate a 15.000 rpm per 15 minuti, e mentre il surnatante ottenuto è sottoposto ad analisi per la determinazione degli analiti tramite tecniche di spettroscopia ad assorbimento atomico e di spettrofotometria di emissione al plasma (ICP), il residuo è trattato con il successivo estraente. I metalli di cui è stata determinata la concentrazione nei surnatanti ottenuti in seguito a centrifugazione sono vanadio, ferro e manganese (Tabella 1). In tale procedura, la prima frazione, quella estratta con acqua dopo un tempo di agitazione di 18 h, rappresenta la quota di metallo solubile, quindi più pericolosa dal punto di vista del rilascio ambientale. Il passaggio successivo, quello in cui è utilizzato acido acetico per un tempo di 3 h in agitazione, permette il rilascio della quota di metallo scambiabile o eventualmente associata a carbonati. Infine, il passaggio conclusivo, che prevede il trattamento con idrossilammina idrocloruro dopo un tempo di agitazione di 3 h, individua la frazione di metallo legata ad ossidi/idrossidi di ferro e manganese.

Una procedura ulteriore di estrazione (Tabella 2) è stata condotta sui campioni di gesso, utilizzando singolarmente acqua distillata (tempo di agitazione 48 h) o acido acetico (tempi di agitazione di 5 e 12 h.). Le miscele sono state centrifugate per 15 minuti a 15.000 rpm, ed i surnatanti raccolti sottoposti ad analisi quantitativa di vanadio, ferro e manganese.

I risultati ottenuti sono riportati sinteticamente nelle tabelle seguenti.

Tabella 1. Risultati ottenuti dall'estrazione sequenziale H₂O-CH₃COOH 0.11M -NH₂*HCl 0.5M

Campione	Rapporto	H ₂ O 18h			CH ₃ COOH 3h		
		V (mg/Kg)	Fe (mg/Kg)	Mn (mg/Kg)	V (mg/Kg)	Fe (mg/Kg)	Mn (mg/Kg)
Filtro	1:40	n.r.	n.r.	39,11	n.r.	n.r.	1166
Filtro	1:40	n.r.	n.r.	33,97	n.r.	n.r.	1143
Filtro	1:5	n.r.	n.r.	10,67	n.r.	n.r.	279,3
Filtro	1:5	n.r.	n.r.	11,47	n.r.	n.r.	283,8
Discarica	1:40	n.r.	n.r.	9,09	n.r.	n.r.	350
Discarica	1:40	n.r.	n.r.	7,52	n.r.	n.r.	323
Discarica	1:5	n.r.	n.r.	0,75	n.r.	n.r.	15,8
Discarica	1:5	n.r.	n.r.	1,35	n.r.	n.r.	17,2

Campione	Rapporto	NH ₂ *HCl 3h	
		V (mg/Kg)	Fe (mg/Kg)
Filtro	1:40	173	3520
Filtro	1:40	166	
Filtro	1:5	160	
Filtro	1:5	163	
Discarica	1:40	252	1682
Discarica	1:40	264	
Discarica	1:5	191	
Discarica	1:5	181	

Tabella 2 Estrazione condotta sulla matrice con H₂O distillata o CH₃COOH 0.11M

Campione	Rapporto	H ₂ O 48h			CH ₃ COOH 5h			CH ₃ COOH 12h		
		V (mg/Kg)	Fe (mg/Kg)	Mn (mg/Kg)	V (mg/Kg)	Fe (mg/Kg)	Mn (mg/Kg)	V (mg/Kg)	Fe (mg/Kg)	Mn (mg/Kg)
Filtro	1.40	n.r.	n.r.	30,4	n.r.	n.r.	988	n.r.	n.r.	1100
Filtro	1.40	n.r.	n.r.	35,2	n.r.	n.r.	1015	n.r.	n.r.	1032
Discarica	1.40	n.r.	n.r.	8,07	n.r.	n.r.	279	n.r.	n.r.	350
Discarica	1.40	n.r.	n.r.	8,58	n.r.	n.r.	292	n.r.	n.r.	310

Dai risultati ottenuti è possibile affermare che il vanadio presente nella matrice in oggetto non si presenta in forma mobile. Un comportamento simile è osservabile anche per il ferro, lasciando

ipotizzare che i due elementi metallici siano tra loro associati. Si verifica invece un certo rilascio di manganese soprattutto quando si usano condizioni chimicamente più aggressive.

In questa fase della ricerca è opportuno precisare che non è stato seguito un protocollo di estrazione per verificare aspetti normativi del materiale oggetto di studio. La definizione “protocollo di estrazione” potrebbe lasciare adito a interpretazioni fuorvianti rispetto a quanto effettuato e a quello che si intende svolgere nel proseguimento della sperimentazione. Tra le attività previste nel progetto da parte di ISE è stata condotta una caratterizzazione preliminare del materiale “gessi rossi” oggetto dello studio con particolare riferimento al possibile rilascio di Vanadio o altri metalli. Naturalmente, essendo un progetto scientifico, sono stati presi in considerazione aspetti particolari legati allo sviluppo della ricerca (interazione con l’attività microbica, biodisponibilità per i vegetali) a supporto dei quali le normali analisi di leaching non sono sufficienti, pur fornendo dei dati di sicuro interesse. Per altro non è nelle finalità della ricerca la messa a punto di nuove metodologie analitiche né tantomeno la loro validazione.

Pertanto, oltre alle estrazioni in acqua e acido acetico, è stata usata una procedura di estrazione sequenziale che può sembrare particolarmente (irragionevolmente) aggressiva per una caratterizzazione ambientale della matrice ma che è, in realtà, funzionale allo sviluppo della ricerca in accordo con quanto stabilito con gli altri partner (è del tutto evidente che impiegando idrossilammina per solubilizzare gli ossidi di ferro e manganese, si ritroveranno in soluzione elevate quantità dei due metalli). Inoltre è molto probabile che l’approfondimento delle conoscenze su questa matrice porti a successive modifiche dei metodi impiegati, ad esempio per quanto concerne i rapporti e i tempi di estrazione, anche se per questi ultimi i dati di letteratura indicano che la massima estraibilità del vanadio si ottiene in tempi relativamente brevi generalmente non superiori alle 3 h (Poledniok et al., 2002).

Per la possibile destinazione finale e per lo studio delle interazioni con i vegetali il materiale è stato in prima approssimazione trattato come un suolo anche se ovviamente si tratta di matrice assolutamente diversa; questa precisazione è necessaria per spiegare la scelta di alcuni parametri (ad esempio il rapporto solido : liquido 1:5 provato in alcuni test) e soprattutto l’impiego di procedure di estrazione sequenziale che sono state derivate e modificate, da quanto messo a punto per il Vanadio per la matrice suolo (Mandiwana et al., 2004; Zemberyova et al 2007).

In definitiva, è stata applicata una procedura di estrazione sequenziale derivata dal metodo BCR (Žemberyová et al., 2006; Žemberyová et al., 2007) nella quale, stante l’assenza di sostanze umiche nella matrice, è stato eliminato il passaggio in H_2O_2 + $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, mentre all’estrazione con acido acetico, per valutare la potenziale pericolosità della matrice in esame per il rilascio di

vanadio, è stato premesso un passaggio con estrazione in acqua, con la quale si possono quantificare le forme immediatamente solubilizzabili dalla matrice in esame.

La metodologia semplificata divide in termini operazionali i metalli in tre frazioni:

- Solubili e quindi immediatamente rilasciabili in fase liquida e potenzialmente disponibili per essere assorbiti dai vegetali (estraibili in H_2O);
- Scambiabili: trattenuti sulle superfici della matrice con forze di legame sostanzialmente di natura elettrostatica, o legati ai carbonati (estrazione in CH_3COOH)
- Adsorbiti su ossidi/idrossidi (estrazione in $NH_2OH \cdot HCl$). L'impiego dell'idrossilammina che solubilizza gli ossidi di Fe e Mn rappresenta ovviamente una forzatura per la valutazione del potenziale rilascio di elementi metallici, ma è di particolare importanza per lo studio dei processi di adsorbimento da parte della matrice gessi rossi previsti nelle attività di sperimentazione di ISE, nell'ambito di questo progetto.

Sulla base di questi dati preliminari, che saranno integrati con altre misure per completare la caratterizzazione dei materiali saranno approntate anche le prove di adsorbimento per valutare la capacità di trattenimento dei metalli da parte dei gessi rossi.

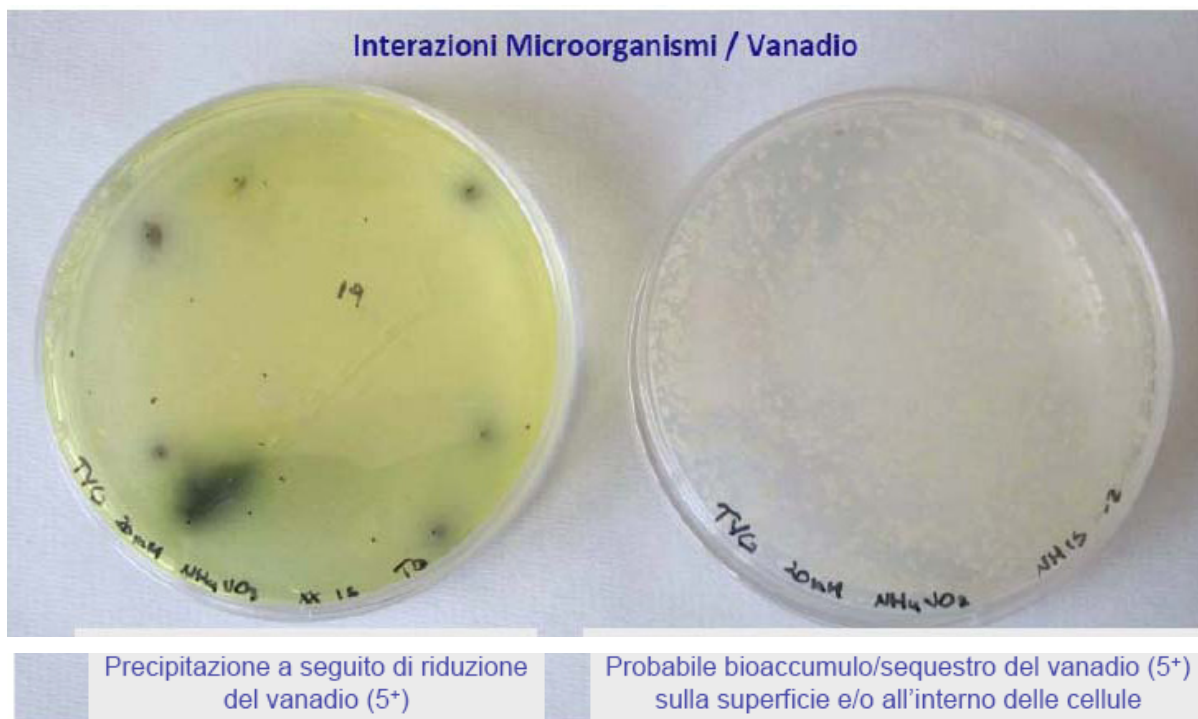


Fig. 1 – Ceppi batterici ottenuti da arricchimenti di gessi Tioxide e isolati su piastre Petri contenenti mezzo di coltura agarizzato addizionato con 20 mM NH_4VO_3

Riferimenti bibliografici

- J. Poledniok, F. Buhl, “*Speciation of vanadium in soil*” *Talanta* 59 (2003) 1-8.
- K.L. Mandiwana, N. Panichev, “*Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of vanadium (V) in soil after leaching with Na_2CO_3* ” *Analytica Chimica Acta* 517 (2004) 201–206.
- M. Žemberyová, J. Barteková, I. Hagarová, “*The utilization of modified BCR three-step sequential extraction procedure for the fractionation of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in soil reference materials of different origins*” *Talanta* 70 (2006) 973–978.
- M. Žemberyová, R. Jankovič, I. Hagarová, H.M. Kuss, “*Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of vanadium in extracts of soil and sewage sludge certified reference materials after fractionation by means of the Communities Bureau of Reference modified sequential extraction procedure*” *Spectrochimica Acta Part B* 62 (2007) 509–513.

Gianniantonio Petruzzelli