



Biodegradabilità dei disperdenti selezionati per fuoriuscite di petrolio Comunemente usato in Nigeria

Principe C. Nnadozie*, Lucky O. Odokuma

Dipartimento di Microbiologia, Facoltà di Scienze, Università di Port Harcourt, Port Harcourt, Nigeria, PMB 5323 Choba

* Autore corrispondente: princemakat@yahoo.co.uk

Astratto Lo studio indaga sulla biodegradazione di due disperdenti di fuoriuscite di petrolio: "Eco-Remover" che è stato ottenuto dalla Nigerian National Petroleum Corporation (NNPC), Port Harcourt e un "Rigwash" non approvato prodotto localmente, ottenuto da un deposito di prodotti chimici industriali a Trans-Amadi, Port Harcourt. Le configurazioni sono state monitorate a intervalli di due settimane per un periodo di 42 giorni a temperatura ambiente (circa 30°C) su un sistema di agitazione statica. I parametri chimico-fisici dei campioni sono stati analizzati utilizzando metodi chimici standard quali la spettrofotometria di assorbimento atomico, la gascromatografia (GC-FID) e la tecnica titrimetrica. Il risultato del tasso di biodegradazione primaria ha rivelato che la miscela di Eco-Remover, acqua di mare e petrolio greggio (L2) è stata la più degradata al 77,1%, seguita dalla combinazione di Eco-Remover e acqua di mare (L1) al 4,39%. K1 (una miscela di acqua di mare e Rigwash) e K2 (una miscela di petrolio greggio, acqua di mare e Rigwash) si sono degradati rispettivamente all'1,22% e all'1,19%. Il risultato ha anche indicato che K1 ha avuto un effetto negativo sul petrolio greggio. L'indice del profilo analitico degli isolati batterici ha rivelato un totale di cinque generi trovati in crescita sui campioni. Tra loro, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Kocuria* erano dominanti e possiedono il potenziale per utilizzare disperdenti e/o petrolio greggio come uniche fonti di carbonio. Gli isolati fungini includono: *Aspergillo niger* (18,0%), *Cladosporium carioni* (8,20%), *Fusariosi ossitoca* (4,92%), *Mixomicetes* spp. (13,1%), *Fusarios* spp. (3,28%), *Penicillium* spp. (3,28%), *Phomas* spp. (8,20%), *Pleuroto polmonare* (8,20%), *Rizopos* spp. (3,28%), *Talaromyces flavus* (9,84%), *Trichoderma longibrachiatum* (6,56%), *T. polysporum* (4,92%) e *Verticillo* spp. (8,20%). L'analisi della varianza al limite di confidenza $P \leq 0,05$ ha mostrato che vi era una differenza significativa nella biodegradazione di ciascun disperdente o nella loro combinazione con il petrolio greggio. L'implicazione di questo studio stabilisce che Eco-Remover è più biodegradabile del "disperdente" Rigwash. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi sulla loro applicazione sul campo per confermare l'esito di queste osservazioni di laboratorio.

Parole chiave: inquinamento, greggio, disperdenti, microrganismi, biodegradazione

Cita questo articolo: Prince C. Nnadozie e Lucky O. Odokuma, "Biodegradabilità di selezionati disperdenti per fuoriuscite di petrolio comunemente usati in Nigeria". *Giornale internazionale di biorisanamento ambientale e biodegradazione*, vol. 5, n. 2 (2017): 49-59. doi: 10.12691/ijebb-5-2-3.

1. Introduzione

I sistemi acquatici, in particolare i corpi idrici marini e salmastri nella regione del delta del Niger in Nigeria, hanno sperimentato elenchi dell'intero spettro di composti industriali, principalmente disperdenti chimici per fuoriuscite di petrolio approvati o non approvati che sono sia refrattari che tossici per l'ambiente, nonché per umani. L'uso di disperdenti per fuoriuscite di petrolio in mare è consentito dal Nigerian Oil Spill Contingency Plan (NOSCP) come approvato dal Department of Petroleum Resources (DPR) *Linee guida e standard ambientali nell'industria petrolifera in Nigeria*, EGASPIN (2002). L'adozione dei disperdenti tra le diverse tecniche disponibili per combattere gli oil spill ha seguito una vasta letteratura sull'importanza del loro utilizzo [1]. I disperdenti per fuoriuscite di petrolio sono miscele di agenti tensioattivi (tensioattivi) in uno o più solventi organici, specificatamente formulate per migliorare la dispersione dell'olio nella colonna di acqua di mare riducendo l'interfacciale

tensione tra olio e acqua [2,3]. Questi agenti fanno affondare il petrolio più velocemente e più profondamente nell'acqua e possibilmente nelle falde acquifere [4]. Gli studi hanno esaminato gli impatti della miscela olio-disperdente sui rotiferi, che sono uno dei gruppi di organismi viventi che compongono la catena alimentare nei sedimenti acquatici.

Tuttavia, dopo la fuoriuscita accidentale di petrolio dal Torrey Canyon nel Regno Unito nel 1967, dove il disperdente di olio è stato utilizzato per la prima volta su larga scala come metodo di risposta per combattere le fuoriuscite, l'uso di disperdenti ha generato serie controversie [2,5,6,7]. Ciò è rimasto controverso a causa della tossicità delle miscele disperse e dei loro potenziali impatti negativi sull'ambiente. Di conseguenza, le vite acquatiche al di sotto delle acque superficiali erano potenzialmente esposte a olio e disperdenti con diverse modalità di azione e vie di esposizione. In Nigeria, le loro applicazioni non sono raccomandate a terra e/o in habitat di acqua dolce a causa del loro potenziale di tossicità e della sensibilità dell'habitat [8,9].

Hassanshahian e Capello [10] hanno sostenuto che l'applicazione di disperdenti per fuoriuscite di petrolio su un mare colpito da petrolio

hanno provocato l'aggiunta deliberata di un'altra sostanza tossica nell'ambiente marino che è già una potenziale minaccia per i sistemi biotico e abiotico. Contrariamente a questo punto di vista, gli studi hanno dimostrato che il suo utilizzo come contromisura dell'inquinamento è il metodo di pulizia più frequentemente utilizzato perché tali liquidi possono essere facilmente applicati a grandi fuoriuscite di petrolio e si presume generalmente che sia più conveniente rispetto a quello fisico. metodi di bonifica [11,12,13]. Uno studio ha confrontato la tossicità del petrolio greggio (un controllo, senza un disperdente per fuoriuscite di petrolio) con una miscela di petrolio greggio e disperdente e ha scoperto che una combinazione di petrolio greggio e disperdente è due volte più tossica del petrolio da solo [14]. Una ricerca condotta alla fine del 2012 da *Georgia Tech e Universidad Autonoma de Aguascalientes* ha rivelato la tossicità del petrolio fino a cinquantadue volte dopo Corexit, un disperdente è stato applicato durante la fuoriuscita di petrolio della BP nel Golfo del Messico [15,16]. Uno studio sul campo dell'impatto del Dioctyl sodium sulfosuccinate (DOSS), un disperdente chimico sul petrolio, ha implicato che il primo persistesse in quantità variabili nelle comunità coralline di acque profonde 6 mesi dopo la fuoriuscita di petrolio della Deepwater Horizon (DWH) del 2010 e sulle spiagge del Golfo del Messico 26 - 45 mesi dopo lo sversamento [17]. È stato riscontrato che il disperdente chimico Rigwash influisce negativamente sulla biodegradazione del petrolio greggio leggero Bonny [18]. Ciò, secondo il rapporto, potrebbe essere dovuto alla composizione chimica della sostanza detergente che ha inibito la crescita e lo sviluppo dei degradatori microbici.

Evidentemente, i disperdenti per fuoriuscite di petrolio di maggior qualità e molto utili utilizzati nell'industria petrolifera sono quelli che hanno la capacità o la capacità di solubilizzare/ disperdere l'olio, dopo di che essi stessi sono prontamente disponibili ai microrganismi per la degradazione. I microrganismi, in particolare i batteri, hanno il potenziale per degradare i disperdenti di fuoriuscite di petrolio e gli idrocarburi. Pertanto, per un organismo con l'informazione genetica per utilizzare i disperdenti come fonte di carbonio, l'enzima per la degradazione del disperdente chimico viene indotto quando la sostanza chimica raggiunge l'habitat microbico. I batteri hanno sviluppato sistemi regolatori che assicurano la sintesi di enzimi in modo da indurre l'attacco iniziale a questi composti [19].

Tuttavia, la necessità di studiare gli effetti dei disperdenti di fuoriuscite di petrolio utilizzati dalle industrie petrolifere nella lotta contro le fuoriuscite di petrolio nei sistemi acquatici, prima dell'applicazione sul campo, è considerata una panacea per risolvere la maggior parte dei problemi affrontati dalle industrie petrolifere. Pertanto, questo studio ha esaminato la biodegradabilità dei disperdenti per fuoriuscite di petrolio (Eco-Remover e "Rigwash" di produzione locale) comunemente utilizzati in Nigeria dalle industrie petrolifere. Gli obiettivi sono stati focalizzati su:

- Determinazione della biodegradabilità di alcuni disperdenti di oil spill utilizzati dalle Nigerian Petroleum Industries.
- Isolamento e identificazione di batteri e funghi a livello di genere/specie coinvolti nella biodegradazione dei disperdenti di oil spill.
- Indagine sugli effetti dei disperdenti di fuoriuscite di petrolio sul petrolio greggio.
- Determinazione Di IL percentuale primario biodegradazione E mineralizzazione (ultimo biodegradazione) di alcuni disperdenti per fuoriuscite di petrolio utilizzati nell'industria petrolifera nigeriana.

2. Materiali e metodi

Il petrolio greggio leggero Bonny e il disperdente per fuoriuscite di petrolio Eco-Remover sono stati ottenuti dalla Nigerian National Petroleum Corporation (NNPC), Port Harcourt, Rivers State of Nigeria. E i disperdenti per fuoriuscite di petrolio Rigwash non approvati dalla DPR sono stati acquistati da un negozio di prodotti chimici a Trans-Amadi, la metropoli di Port Harcourt. Le procedure standard sono state seguite durante la raccolta dei campioni. I contenitori di plastica utilizzati per le raccolte sono stati sigillati e conservati a temperatura ambiente nel laboratorio e utilizzati entro un periodo di 30 giorni. Il campione di acqua marina che è stato raccolto in modo asettico da Okrika High Sea attraverso Adedemebiri, Rivers State, era la fonte dell'inoculo. Il campione di acqua è stato raccolto con un contenitore di plastica da 10 litri mediante immersione nella colonna d'acqua a una profondità di 1 m e trasportato al laboratorio a 25 - 30°C entro 2 ore.

L'acqua di mare era R1 e la miscela di acqua di mare e petrolio greggio era R2. La combinazione di acqua di mare e disperdente per fuoriuscite di petrolio Rigwash era K1, e quella di acqua di mare, disperdente Rigwash e petrolio greggio era K2. L1 e L2 erano miscele di acqua di mare e disperdente per fuoriuscite di petrolio Eco-Remover; e acqua di mare, disperdente Eco-Remover più petrolio greggio rispettivamente.

Le metodologie adottate per la preparazione dei terreni, i risultati preliminari del range - per determinare la concentrazione non tossica dei disperdenti di oil spill per i microrganismi autoctoni del campione di acqua, il monitoraggio della biodegradazione, le analisi microbiologiche (compresi i test biochimici e l'indice del profilo analitico degli isolati), -le analisi chimiche e statistiche dei campioni/dati sono state descritte da Nnadozie e Odokuma [18]. I test di biodegradazione sono stati eseguiti per determinare le analisi fisico-chimiche dei campioni raccolti dalle beute di biodegradazione con scuotimento statico ai giorni 0, 14, 28 e 42 a circa 30°C di temperatura ambiente. Precisamente, per il campione R1, nel pallone di biodegradazione sono stati versati 100 ml di campione di acqua senza aggiunta di olio o disperdenti.

3. Risultati

3.1. Caratteristiche fisico-chimiche dei campioni

I risultati in **Figura 1-Figura 16** ha mostrato le analisi fisico-chimiche dei campioni (R1, R2, K1, K2, L1 e L2). Il pH per i campioni, per periodi da 0 a 42 giorni variava rispettivamente da 7,39 - 7,49, 9,02 - 9,80, 6,27 - 8,17, 6,42 - 6,56, 7,10 - 8,50 e 6,47 - 8,40 (**Figura 1**). L'acidità (**Figura 12**) e alcalinità (**Figura 13**) erano compresi tra 6,49 - 6,60 mg/l e 1,29 - 1,38 mg/l, 4,05 - 6,10 mg/l e 3,22 - 4,11 mg/l, 5,88 - 6,58 mg/l e 1,05 - 1,59 mg/l, 5,82 - 6,01 mg/l e 1,62 - 6,66 mg/l, 7,12 - 9,44 mg/l e 1,05 - 3,47 mg/l e 4,72 - 6,07 mg/l rispettivamente. I risultati per R1, R2, K1, K2, L1 e L2 per i solidi totali disciolti (TDS) (**Figura 4**) erano 12009 - 12015 mg/l, 14001 - 16096 mg/l, 11590 - 12030 mg/l, 8004 - 10350mg/l, 12910 - 14041mg/l e 3060 - 5012mg/l rispettivamente.

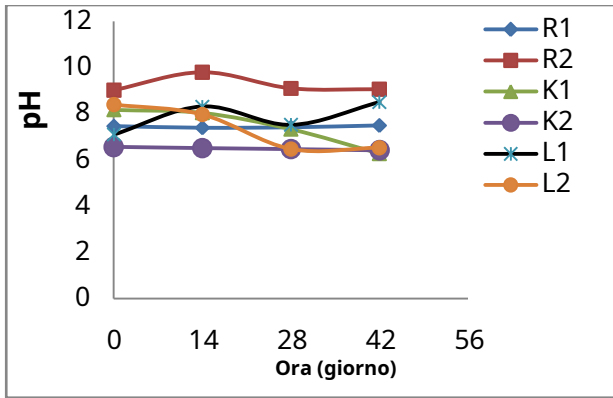


Figura 1. Variazione del pH dei campioni durante la degradazione

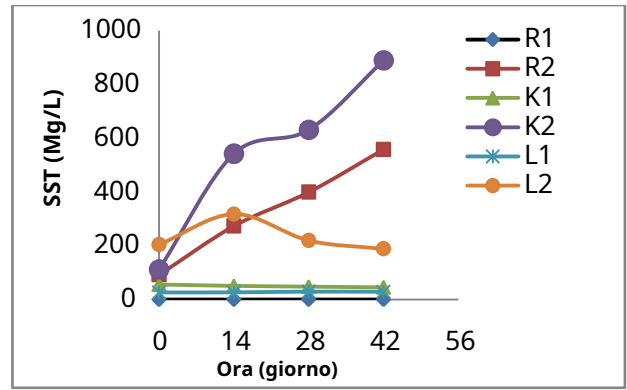


Figura 5. Variazione del livello di solidi sospesi totali dei campioni durante la degradazione

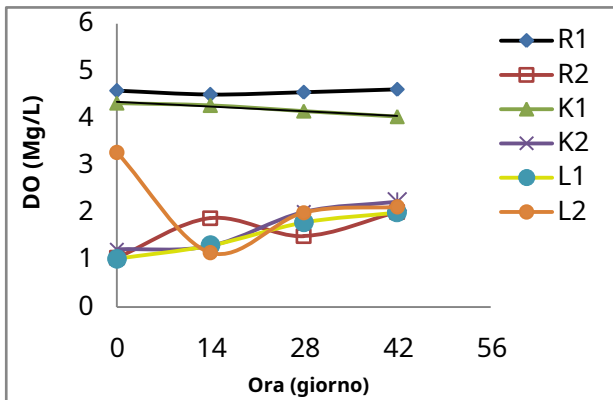


Figura 2. Variazione del livello di ossigeno disciolto dei campioni durante la degradazione

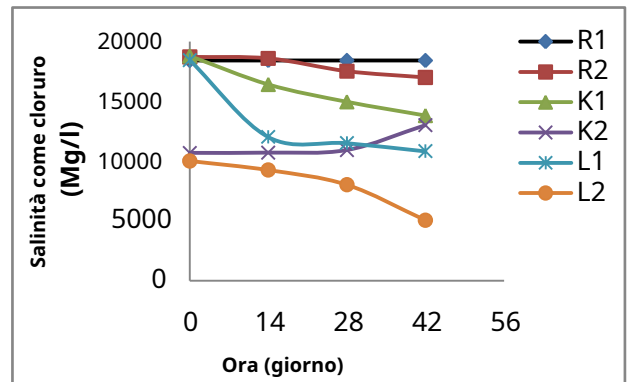


Figura 6. Variazione del livello di salinità dei campioni durante la degradazione

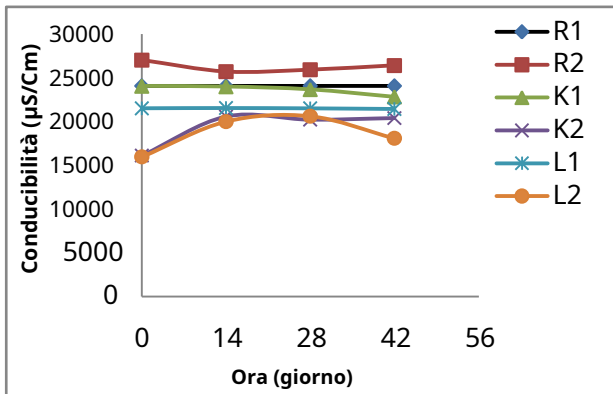


Figura 3. Variazione del livello di conducibilità dei campioni durante la degradazione

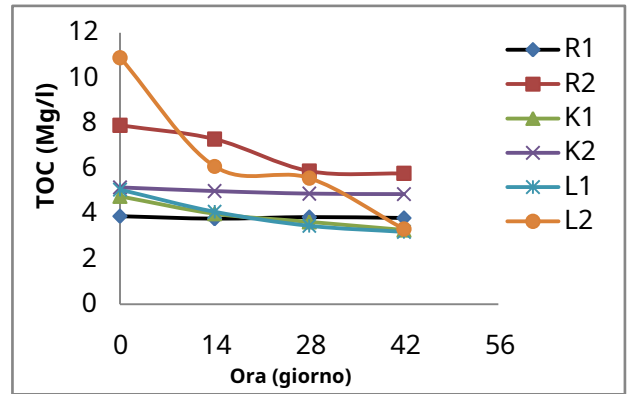


Figura 7. Variazione del livello di carbonio organico totale dei campioni durante la degradazione

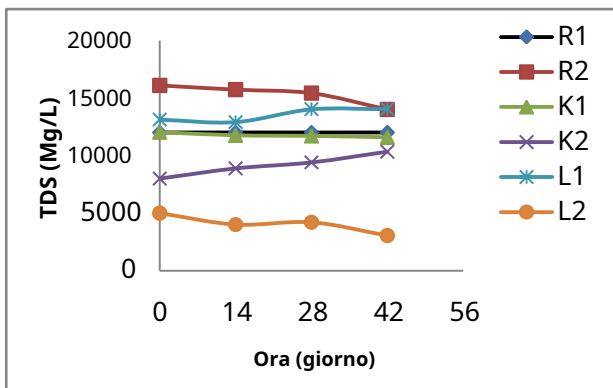


Figura 4. Variazione del livello di solidi disciolti totali dei campioni durante la degradazione

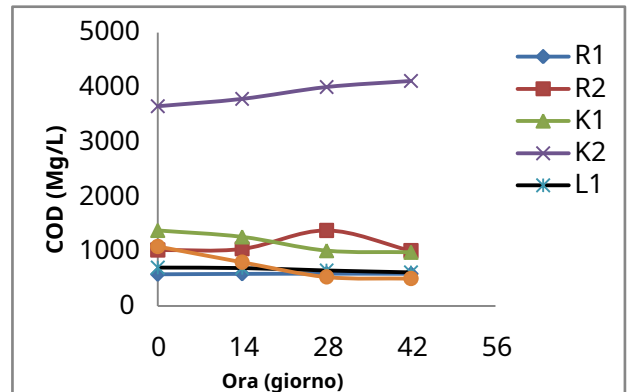


Figura 8. Variazione del livello di domanda chimica di ossigeno dei campioni durante la degradazione

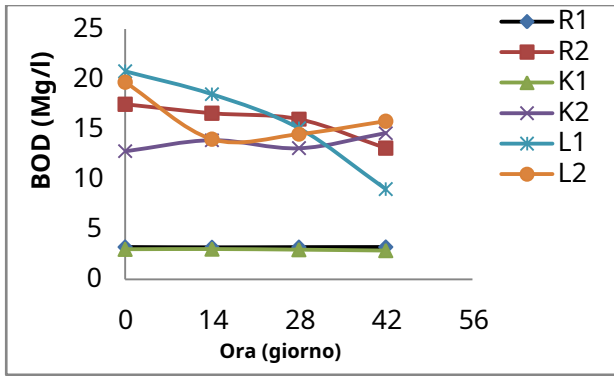


Figura 9. Variazione del livello di domanda biochimica di ossigeno dei campioni durante la degradazione

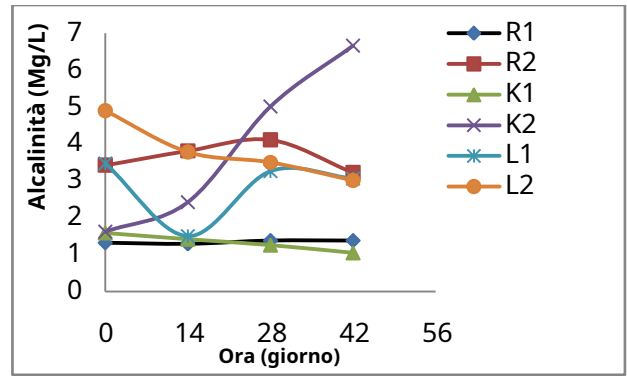


Figura 13. Variazione del livello di alcalinità dei campioni durante la degradazione

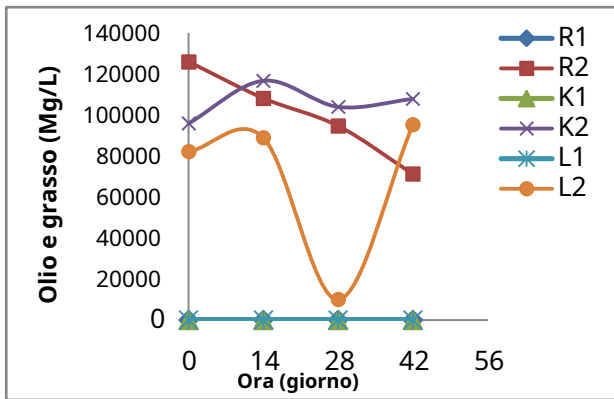


Figura 10. Variazione del livello di olio e grasso dei campioni durante la degradazione

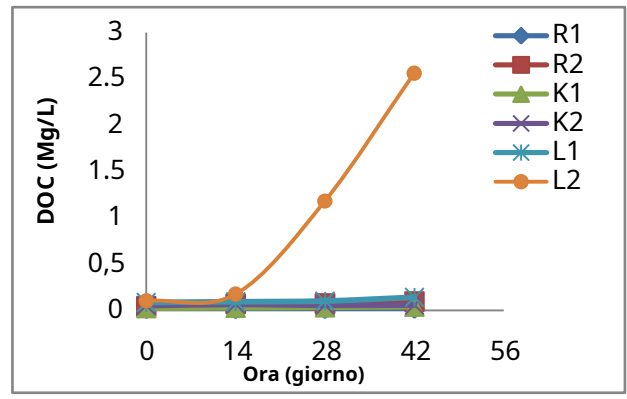


Figura 14. Variazione del livello di carbonio organico disciolto dei campioni durante la degradazione

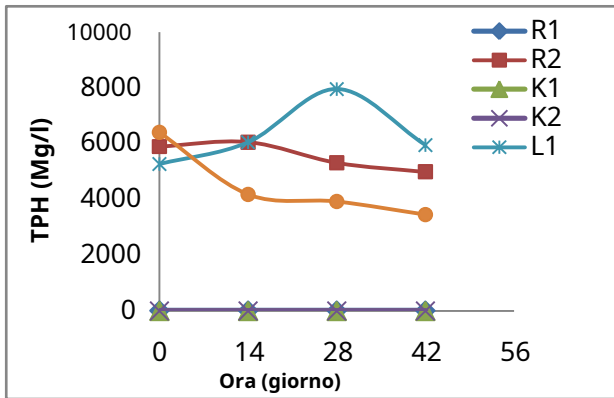


Figura 11. Variazione del livello totale di idrocarburi di petrolio dei campioni durante la degradazione

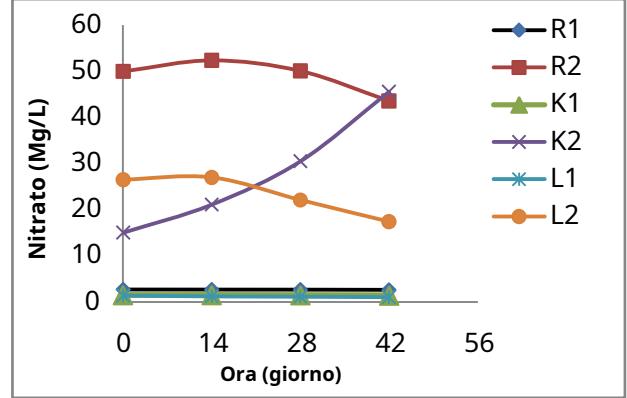


Figura 15. Variazione del livello di nitrati dei campioni durante la degradazione

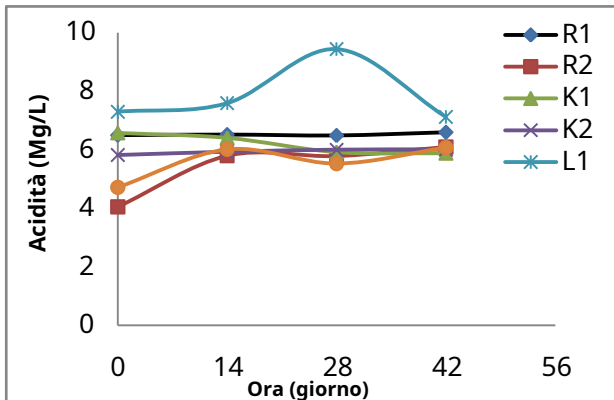


Figura 12. Variazione del livello di acidità dei campioni durante la degradazione

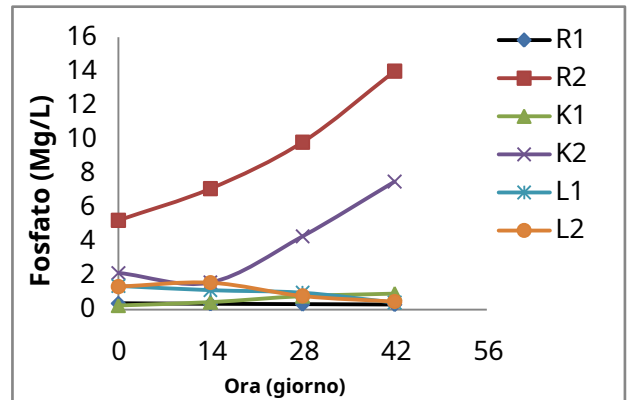


Figura 16. Variazione del livello di fosfato dei campioni durante la degradazione

Gli ioni nitrato e fosfato sono più alti in R2 con valori che vanno rispettivamente da 43,6 - 52,4 mg/l e 5,24 - 14,0 mg/l, e in L1 il nitrato era più basso con un intervallo di 1,00 - 1,38 mg/l; e a R1 (0,29 - 0,36 mg/l) e K1 (0,23 - 0,94 mg/l) gli ioni fosfato sono rispettivamente più bassi e più bassi (Figura 15-Figura 16). I contenuti di Potassio (K) e Sodio (Na) nel campione R1 sono all'interno del limite DPR di 200, mentre nel campione L1, Na era più alto con valori compresi tra 389 mg/l e 518 mg/l; e K era più alto a K2 (317 - 362 mg/l). Gli ioni Zinco (Zn), Cromo (Cr) e Selenio (Se) nei campioni non superano i limiti normativi rispettivamente di 1,0 mg/l, 0,5 mg/l e 0,01 mg/l. Rame (Cu) e Nichel (Ni) sono inferiori a 0,01 mg/l nei campioni studiati. Gli ioni di piombo (Pb) sono inferiori a 0,01 mg/l nei campioni R2, K1, K2, L1 e L2; mentre nel campione R1 era compreso tra 1,30 e 1,31 mg/l. Ferro (Fe), Cadmio (Cd) e Zolfo hanno registrato i valori più alti a L2, K2 e L2 con 0,72 - 2,03 mg/l, 0,63 - 1,03 mg/l e 0,15 - 0,55 mg/l; e il minimo a R1 (0,13 - 0,14 mg/l), L1 (0,01 - 0,03 mg/l) e (R1, K1 e L1 - con <0,01 mg/l) rispettivamente.

3.2. Proprietà microbiologiche dei campioni e dei trattamenti

3.2.1. Conta batterica totale eterotrofica (THB)

Il THB era più alto nella miscela di petrolio greggio-acqua di mare (R2) con $7,5 \times 10^2$ - $1,2 \times 10^6$ CFU/ml come mostrato in Figura 21. Il THB in K1 è diminuito con il tempo dal giorno 0 ($1,0 \times 10^4$ CFU/ml) al giorno 28 ($9,4 \times 10^2$ CFU/ml) e aumentato a $1,8 \times 10^3$ CFU/ml al giorno 42 rispetto a L1 dove il THB è aumentato progressivamente da $9,2 \times 10^1$ UFC/ml a $1,6 \times 10^4$ CFU/ml durante il periodo sperimentale di 42 giorni. A differenza del K2, L2 è aumentato nel tempo, con conteggi vitali totali che vanno da $5,3 \times 10^2$ CFU/ml (al giorno 0) a $5,4 \times 10^5$ CFU/ml (al giorno 42).

I risultati THB ottenuti indicano che L1 e L2 sono più degradabili dai batteri rispetto a K1 e K2. Il K1 può essere tossico per la crescita batterica e ha avuto un impatto negativo sull'olio, determinando così la recalcitranza della miscela composta.

3.2.2. Conta totale dei funghi eterotrofi (THF)

Il THF era più alto in K2 nei 28 giorni del periodo di biodegradazione con il conteggio vitale totale di $7,1 \times 10^5$ CFU/ml e diminuito al giorno 42 con $2,7 \times 10^4$ UFC/ml. Il THF conta (Figura 22) per R1, R2, K1, L1 e L2 ai 42 giorni di campionamento erano $9,6 \times 10^2$ UFC/ml, $2,0 \times 10^3$ UFC/ml, $1,5 \times 10^4$ UFC/ml, $3,3 \times 10^5$ UFC/ml e $6,9 \times 10^5$ CFU/ml rispettivamente.

3.2.3. Disperdenti, miscele olio-disperdenti e idrocarburi che utilizzano conte batteriche e fungine (DUB, DUF, HUB, HUF, DUB-HUB, DUF-HUF)

Figura 23-Figura 25 hanno mostrato i conteggi ottenuti rispettivamente da R2, K1, K2, L1 e L2. Il campione R2 ha avuto la più alta crescita di batteri che utilizzano idrocarburi (HUB) e funghi (HUF) al giorno 42 e sono $1,1 \times 10^4$ UFC/ml e $9,6 \times 10^3$ CFU/ml rispettivamente. K1 e L1 avevano il più alto disperdente che utilizzava batteri (DUB) e funghi

(DUF) crescita su 0 giorni e 42 giorni con conteggi DUB e DUF di $5,2 \times 10^2$ UFC/ml e $9,2 \times 10^1$ CFU/ml (giorno 0) e $2,4 \times 10^3$ UFC/ml e $8,9 \times 10^2$ CFU/ml (giorno 42) rispettivamente (Figura 24). I conteggi di idrocarburi disperdenti L2 e K2 che utilizzavano batteri (DUB-HUB) erano più alti con $2,5 \times 10^3$ UFC/ml e $1,7 \times 10^3$ CFU/ml rispettivamente al giorno 42 e 28 (Figura 25); mentre quella dei conteggi fungini (DUF-HUF) era $1,7 \times 10^6$ CFU/ml (al giorno 42) e $2,2 \times 10^5$ CFU/ml (al giorno 28) rispettivamente (Figura 25).

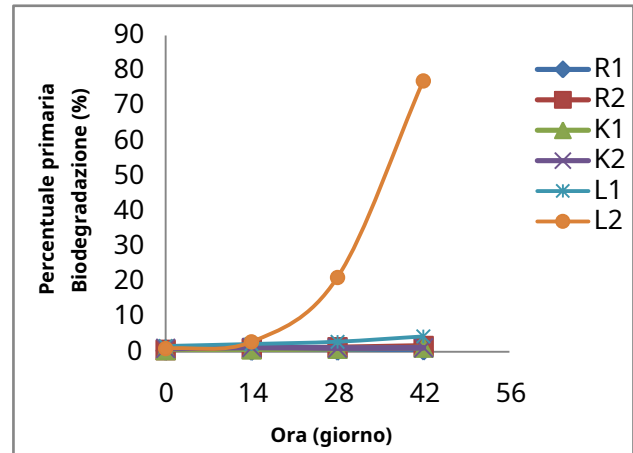


Figura 17. Tasso percentuale di biodegradazione primaria dei campioni

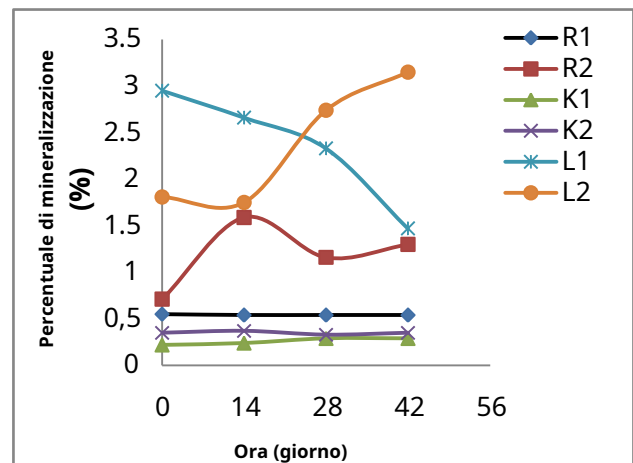


Figura 18. Percentuale di mineralizzazione dei campioni

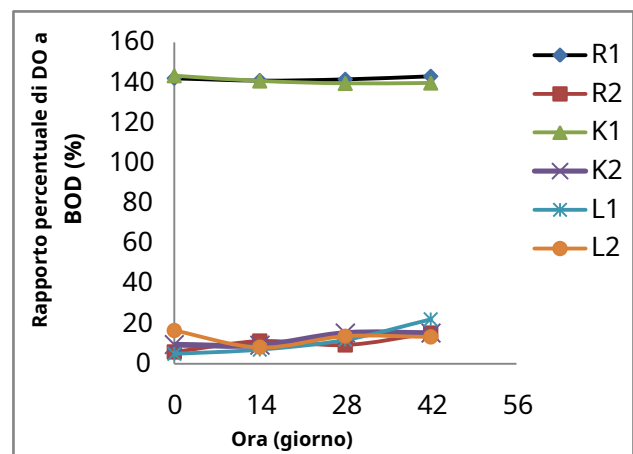


Figura 19. Rapporto percentuale tra DO e BOD dei campioni

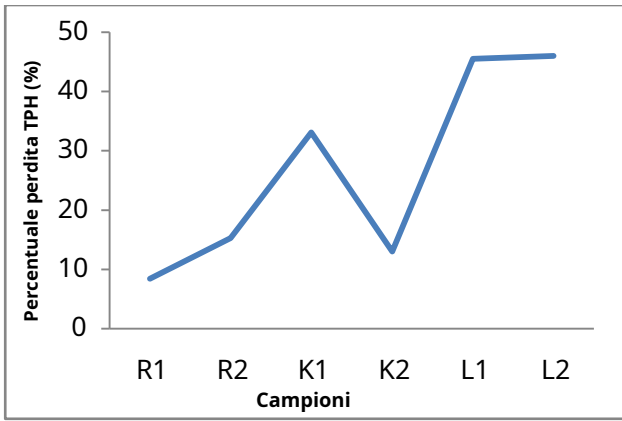


Figura 20. Percentuale totale di idrocarburi di petrolio persi di campioni

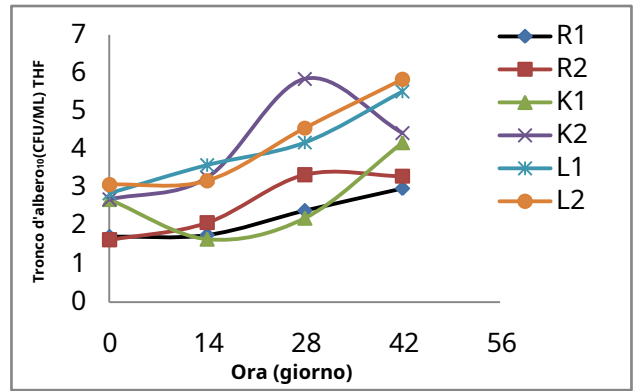


Figura 22. Conta fungina totale nei campioni

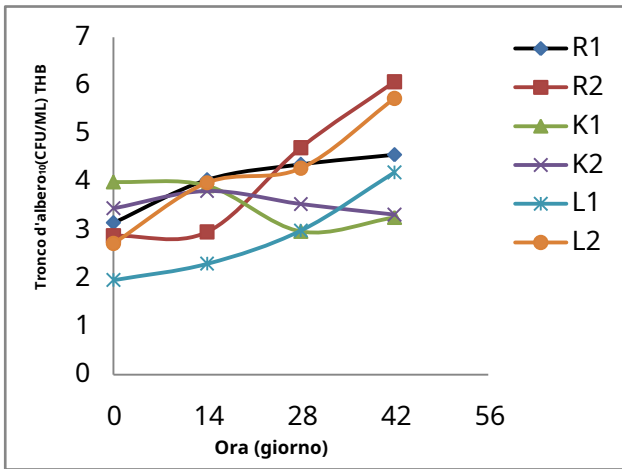


Figura 21. Conta batterica totale nei campioni

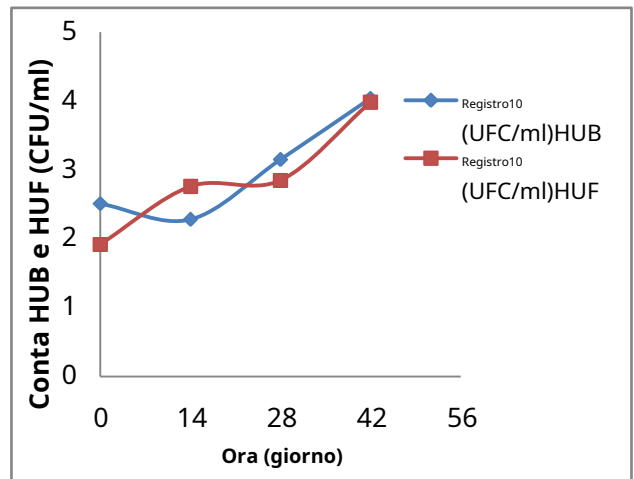


Figura 23. Idrocarburi che utilizzano la conta batterica e fungina per il campione R2

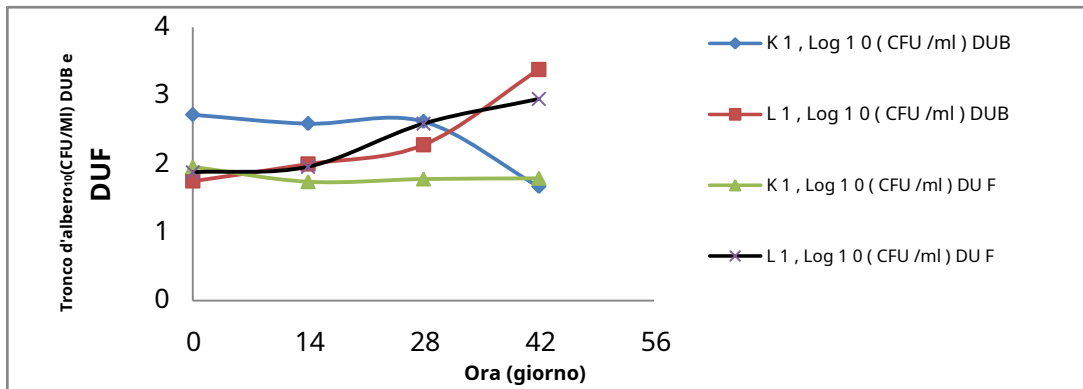


Figura 24. Disperdente che utilizza conte batteriche e fungine per campioni K1 e L1

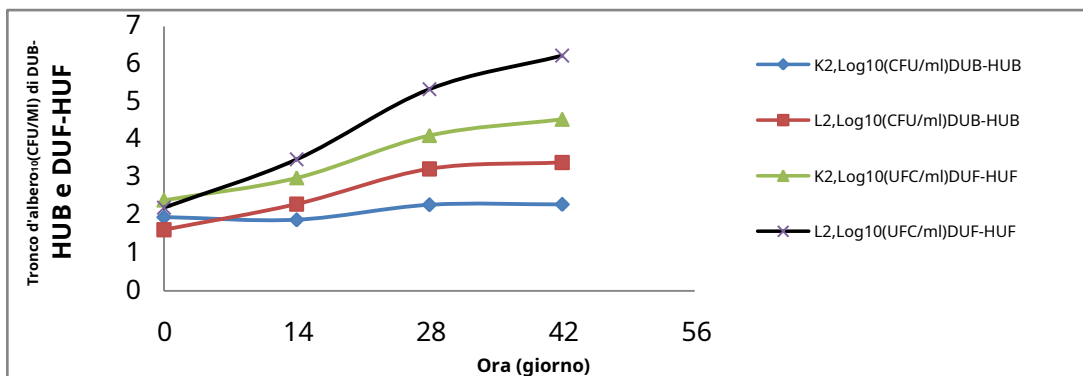


Figura 25. Disperdente-idrocarburo che utilizza conte batteriche e fungine per campioni K2 e L2

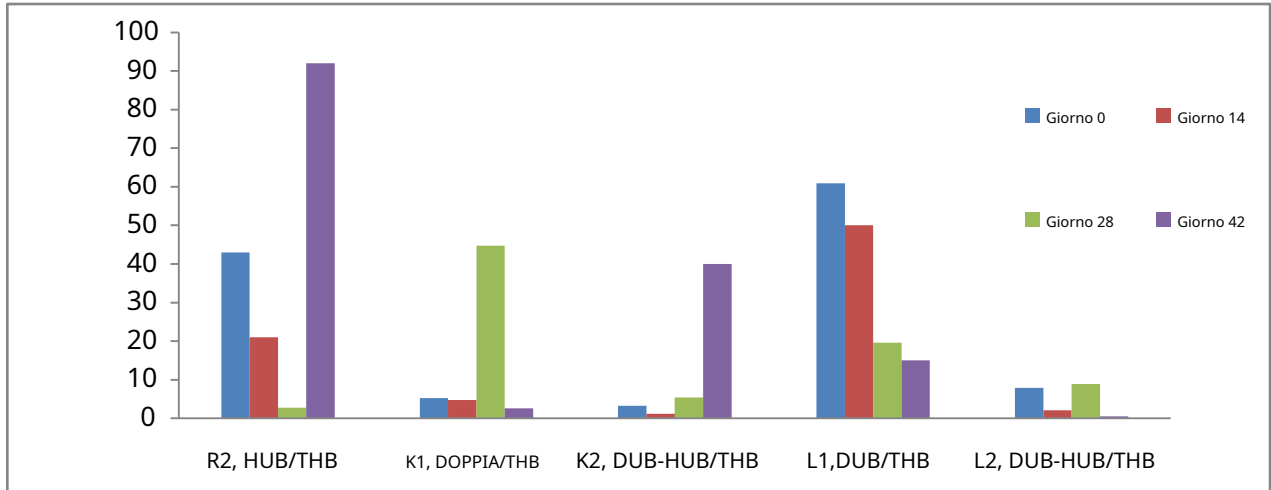


Figura 26. Rapporto percentuale di HUB, DUB e DUB-HUB rispetto ai conteggi THB

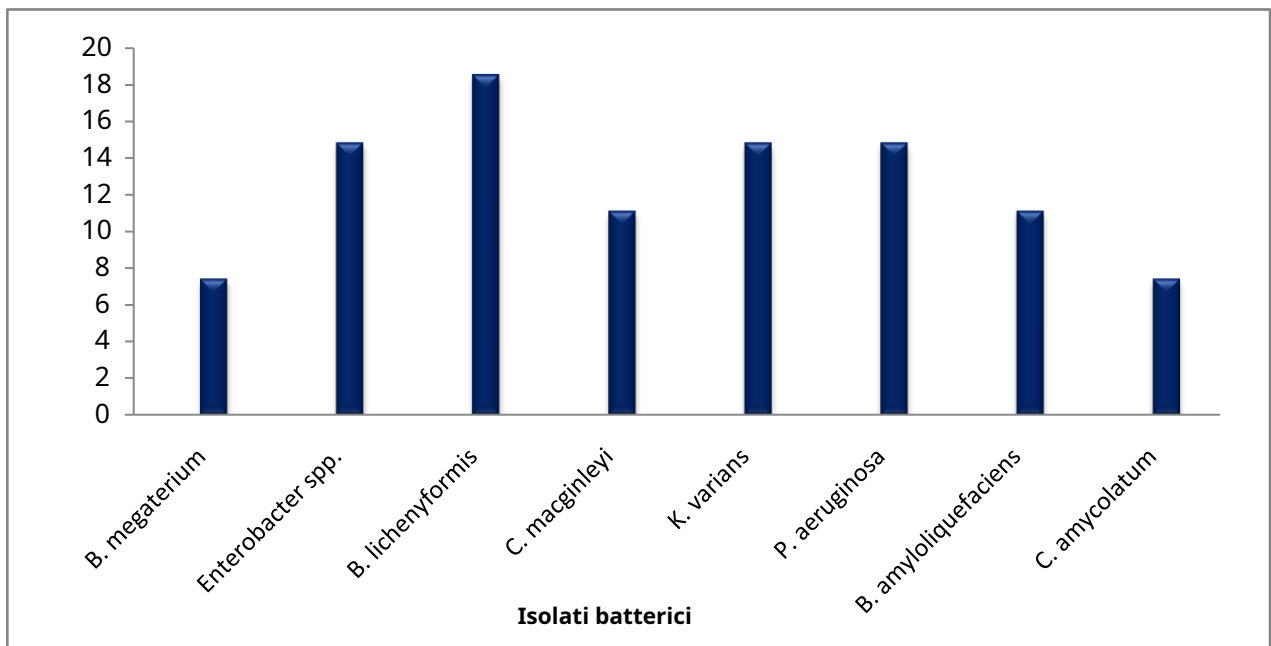


Figura 27. Percentuale di presenza di isolati batterici nei campioni

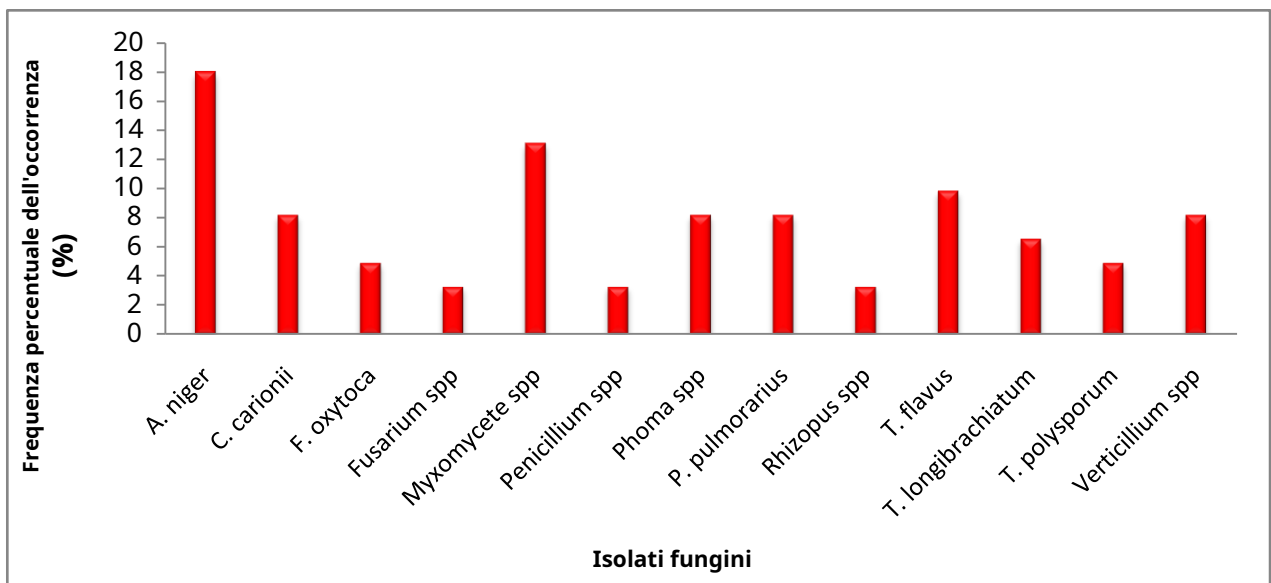


Figura 28. Percentuale di presenza di isolati fungini nei campioni

Tabella 1. Indice del profilo analitico (API), morfologia e reazione di Gram degli isolati batterici

CODICE ISOLATO	REAZIONE AL GRAMMO	MORFOLOGIA	SIMILITÀ PERCENTUALE(%)	IDENTITÀ DEL MICRORGANISMO
S1	+	Asta	99,5	<i>Bacillus megaterium</i>
S2	-	Asta	79,0	<i>Enterobacter</i> spp.
S3	+	Asta	79,5	<i>B. lichenyformis</i>
S4	+	Asta	79,5	<i>B. lichenyformis</i>
S5	+	Asta	97,5	<i>Corynebacterium macginleyi</i>
S6	+	Cocci	99,0	<i>Kocuria varians</i>
S7	-	Asta	97,8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
S8	+	Asta	60,5	<i>B. amyloliquefaciens</i>
S9	+	Asta	65,3	<i>C. amycolatum</i>
S10	-	Asta	66,4	<i>Enterobacter</i> spp.
S11	-	Asta	90,5	<i>P. aeruginosa</i>

3.2.4. Caratteristiche biochimiche e reazione di Gram degli isolati batterici

L'indice del profilo analitico (API) degli isolati batterici ha rivelato un totale di cinque (5) generi che crescono sui campioni analizzati (Tabella 1). *Bacillus megaterium*(S1) e *Enterobacter*spp. (S2) sono stati isolati dal campione R2. I batteri *B. lichenyformis*(S3), *Corynebacterium amycolatum*(S9) e *Pseudomonas aeruginosa*(S7) sono stati isolati dal campione L2. S4 (*B. lichenyformis*) è stato isolato da K1 e S5 (*Corynebacterium macginleyi*) è stato isolato sia da K1 che da L2. Gli altri procarioti

P. aeruginosa(S11) e *Enterobacter*spp. (S10) sono stati isolati dal campione L1. Varianti di *Kocuria*(S6) e *B. amyloliquefaciens*(S8) sono stati isolati rispettivamente solo dai campioni K2 e R1. La percentuale di somiglianza degli isolati batterici identificati tramite API variava tra il 60,5 e il 99,5%. La frequenza di occorrenza di *B. megaterium*, *Enterobacter*spp., *B. lichenyformis*, *C. macginleyi*, *K. varians*, *P. aeruginosa*, *B. amyloliquefaciens* e *C. amycolatum* erano 7,41%, 14,8%, 18,5%, 11,1%, 14,8%, 14,8%, 11,1% e 7,41% rispettivamente.

Il risultato dei test biochimici ha identificato i microrganismi. L'isolato, *P. aeruginosa* era catalasi positivo e ossidasi positivo, *K. variaera* lattosio negativo, trealosio e ureasi positivo. *Enterobacter*spp. era Ortho-Nitrophenyl- β D-Galattopiranosidasi (ONPG) positivo e ureasi negativo. *Corinebacteriospp.* era pirazina carbossamide (PYZ) positivo e ureasi negativo.

La reazione di Gram e le caratteristiche morfologiche degli isolati batterici lo hanno rivelato *Bacillo*spp., *Corinebacteriospp.* e *P. aeruginosa* apparso come verghe (Tabella 1). L'S6 era un cocco Gram-positivo. IL *Enterobacter*spp. appariva come un bastoncino mobile Gram-negativo.

3.2.5. Identificazione di isolati fungini

Le morfologie coloniali e microscopiche degli isolati fungini dai campioni studiati hanno mostrato un totale di undici (11) generi fungini. Gli isolati includono: *Aspergillo niger* (18,0%), *Cladosporium carionii* (8,20%), *Fusariosi ossitoca* (4,92%), *Fusariosp.* (3,28%), *Mixomicetespp.* (13,1%), *Penicillium*spp. (3,28%), *Phomaspp.* (8,20%), *Pleuroto polmonare* (8,20%), *Rizopospp.* (3,28%), *Talaromyces flavus* (9,84%), *Trichoderma longibrachiatum* (6,56%), *T. polysporum* (4,92%) e *Verticilliospp.* (8,20%). Un (1) isolato non identificato è stato trovato nel campione K2.

A. nigerera predominante in R2, K1, K2, L1 e L2; e seguito da *Mixomicetespp.* che si verifica in R1, K2 e L1. È stata mostrata la percentuale di presenza di isolati batterici e fungini Figura 27–Figura 28.

3.2.6. Percentuale HUB, DUB, DUB-HUB su THB di campioni

Figura 26 ha mostrato il rapporto percentuale tra HUB e THB per il campione R2 che variava dal 2,7 al 92%; mentre il rapporto DUB/THB per K1 era 2,6 – 44,7%, e per L1, 15 – 60,9%. Il rapporto percentuale tra DUB-HUB e THB per K2 era compreso tra 1,2 e 40% e per L2 tra 0,46 e 8,9% (Figura 26). Solo a L2 dopo 42 giorni il rapporto percentuale era inferiore a uno, il che indica che la miscela non era inquinata.

3.3. Biodegradazione dei campioni di prova

3.3.1. Percentuale di biodegradazione primaria dei campioni

La percentuale di biodegradazione primaria dopo 28 giorni di sperimentazione come mostrato in Figura 17 ha il minor tasso di biodegradazione a R1 con 0,36%, seguito da K1 (0,91%), K2 (1,12%), R2 (1,24%), L1 (2,89%) e L2 (21,2%). Il risultato della biodegradazione primaria, dopo 42 giorni, ha rivelato che L2 era il più degradato al 77,1%, seguito da L1 al 4,39%. K1, K2, R1 e R2 sono degradati rispettivamente all'1,22%, 1,19%, 0,42% e 1,64%.

3.3.2. Percentuale di mineralizzazione dei campioni

Figura 18 ha presentato il risultato della mineralizzazione dei campioni. Il rapporto tra BOD e COD di L2, K2, L1 e K1 era 2,74%, 1,16%, 2,33% e 0,29% dopo 28 giorni. Dopo 42 giorni, R1 era dello 0,54% e R2, K1, K2, L1 e L2 erano rispettivamente dell'1,30%, 0,29%, 0,35, 1,47% e 3,15%.

3.3.3. Rapporto percentuale tra ossigeno disciolto e domanda biochimica di ossigeno dei campioni

Il risultato su Figura 19 ha mostrato il rapporto percentuale tra DO e BOD dei campioni nell'intervallo da 0 a 42 giorni. Le configurazioni di biodegradazione L1 e R2 avevano i rapporti DO/BOD più bassi e più bassi rispettivamente del 4,90% e del 5,94% nel giorno 0. La percentuale più alta è stata osservata al K1 con il 143,3% il giorno 0 ed è leggermente diminuita al 139,9% il giorno 42.

3.3.4. Percentuale di perdite di TPH

Il risultato su [Figura 20](#) ha mostrato che la percentuale di perdita di TPH nel periodo di 42 giorni era più alta in L2, seguita da L1, K1, R2, K2 e R1 rispettivamente con 46,0%, 45,5%, 33,1%, 15,3%, 13,0% e 8,43%.

3.4. Analisi della variazione e relazioni dei dati

I risultati del test di analisi della varianza (ANOVA) al limite di confidenza del 95% ($P \leq 0,05$) per il periodo dell'esperimento hanno mostrato che c'era una differenza significativa nella biodegradazione di ciascun disperdente per fuoriuscita di petrolio o la loro combinazione con il petrolio greggio, come F-calcolato e i valori F-critici erano rispettivamente 20,126 e 2,901. Considerando che, utilizzando il rapporto percentuale tra BOD e COD, non vi era alcuna differenza significativa nella mineralizzazione di ciascun disperdente chimico o della loro miscela con petrolio greggio poiché il valore F calcolato (1,134) era inferiore al valore F critico (3,287).

4. Discussioni

Il risultato di questo studio indica che molti degli isolati batterici e fungini, quando sottoposti a screening per l'utilizzo di idrocarburi, hanno mostrato un potenziale di degradazione del petrolio greggio e dei disperdenti come unica fonte di carbonio ed energia. Recenti studi hanno mostrato la crescita di *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., [11, 18, 20], *Enterobacter* spp. [11] e *Corinebacteriosp.*, [18] nella combinazione di disperdenti per fuoriuscite di petrolio con petrolio greggio. Gli eucarioti, *Rizopospp.*, *Penicillium* spp., e *Aspergillus* spp. sono stati isolati da diverse miscele di disperdenti e campioni di acqua salmastra [20]. Un totale di sette generi fungini, anch'essi implicati in questo studio, hanno mostrato tendenze per l'utilizzo di idrocarburi e/o disperdenti

[18]. La capacità dei microrganismi di degradare i disperdenti delle fuoriuscite di petrolio e il petrolio greggio può essere dovuta al co-metabolismo, [21], o a causa della produzione di biosurfattanti [22, 23]. Il batterio a forma di bastoncino, *Pseudomonas aeruginosa* è stato collegato alla produzione di ramnolipidi [24], un biosurfattante utilizzato nella pulizia del petrolio. *Enterobacter cloacae* ha anche dimostrato di secernere esopolisaccaride (EPS) che aiuta nella riduzione della tensione interfacciale e inoltre protegge le cellule batteriche dall'esposizione diretta a sostanze tossiche [25, 26]. Un consorzio di microrganismi noto come biomassa può utilizzare il disperdente e il petrolio greggio come alimento [27]. Tutto questo e altro potrebbe aver contribuito al degrado dei campioni studiati.

I conteggi batterici e fungini degli idrocarburi utilizzati per il campione R2 erano in aumento dopo 42 giorni di sperimentazione. Ciò ha dimostrato che in condizioni di attenuazione naturale, le fuoriuscite di petrolio possono essere degradate dai microrganismi. Il calo dei conteggi di THB di K1 dal giorno 0 al giorno 42, THF di K1 dal giorno 0 al giorno 14, DUB di K1 dal giorno 0 al giorno 14 e dal giorno 28 al giorno 42, DUF di K1 dal giorno 0 al giorno 14 e DUB-HUB di K2 dal giorno 0 al giorno 14 hanno mostrato che la fuoriuscita di petrolio "disperdente", Rigwash è tossica per i microrganismi. Questo risultato è diverso dal rapporto [7] su quattro disperdenti chimici nessuno dei quali si è rivelato tossico.

La più alta crescita fungina osservata nel campione K2 può essere dovuta ai suoi valori di pH più bassi compresi tra 6,42 e 6,56. È noto che i funghi secernono enzimi extracellulari durante

biodegradazione e crescono meglio in condizioni ambientali a basso pH [21]. I risultati del pH per L1 e L2 hanno mostrato un certo livello di conformità con il limite DPR, mentre K1 e K2 non rientrano nel limite normativo consentito. Ciò indica che c'è stata una riduzione e/o un aumento del volume di idrocarburi a causa dell'applicazione di uno specifico disperdente e delle attività delle specie batteriche e fungine nei campioni. Secondo quanto riferito, i costituenti chimici di alcuni disperdenti di fuoriuscite di petrolio, come gli additivi e i solventi di base, hanno provocato l'incapacità delle cellule microbiche di degradare i disperdenti e/o le loro miscele con petrolio greggio [18, 28].

Il risultato della biodegradazione primaria dopo 42 giorni è simile al risultato dello studio di 21 giorni in cui L2 è stato degradato al 18,3%, K2, 1,01% e R2, 1,10% [18]. Sebbene il 77,1% del tasso di biodegradazione del campione L2 sia stato degradato dopo 42 giorni, solo esso era intrinsecamente biodegradabile sotto biodegradazione aerobica perché degrada più del 20% della miscela di idrocarburi dopo 28 giorni [29, 30]. La biodegradazione primaria è l'alterazione della struttura chimica di una sostanza, provocata dall'azione biologica, con conseguente perdita di una proprietà specifica di quella sostanza. Secondo l'OCSE [30], è il cambiamento strutturale (trasformazione) di una sostanza chimica organica da parte di microrganismi con conseguente perdita di una proprietà specifica. La perdita di TPH dopo 42 giorni di biodegradazione è stata rispettivamente dell'8,43%, 15,3%, 33,1%, 13,0%, 45,5% e 46,0% per R1, R2, K1, K2, L1 e L2. Considerando che dopo 21 giorni di studio, è stato riportato come 37,3% (L2), 4,52% (K2) e 4,07% (R2) [18]. Questi risultati hanno implicato gli effetti negativi di Rigwash sul greggio perché in condizioni di attenuazione naturale (R2) la perdita di TPH è aumentata del 15,3% in più rispetto a quando è stata applicata (K2 = 13,0%). Questo risultato ha supportato abbastanza l'osservazione dell'USEPA sul disperdente Corexit 9527, dove è stato riscontrato che aumenta la tossicità della fuoriuscita di petrolio dopo l'applicazione [31]. La miscela diventa fino a 52 volte più tossica del solo olio [16].

La percentuale di mineralizzazione (biodegradazione finale) dei campioni dopo 42 giorni variava dallo 0,29 al 3,15%. La percentuale di mineralizzazione dei campioni era il livello di degradazione aerobica ottenuto quando i disperdenti e/o l'olio grezzo (composti in esame) sono totalmente utilizzati dalle cellule microbiche con conseguente produzione di anidride carbonica, biomassa (nuovi costituenti cellulari microbici), sali minerali e acqua [18].

Il BOD è la quantità di ossigeno consumata dai microrganismi durante la metabolizzazione di un composto in esame [32]. La diminuzione del BOD con il tempo di L1 e R2 indicava che le concentrazioni di carbonio organico biodegradabile nel monitoraggio stavano diminuendo con il tempo ea causa di un progressivo aumento del DO. L'aumento del BOD di altre miscele o campioni potrebbe essersi verificato a causa dell'aumento dell'attività microbica [33] e declino in DO perché l'ossigeno disponibile nell'acqua viene ridotto dai microrganismi.

I valori di COD ottenuti indicano la quantità di ossigeno necessaria per ossidare chimicamente i composti organici presenti nei campioni. Infatti, il COD è la quantità di ossigeno consumata durante l'ossidazione di un composto in esame con dicromato caldo e acido [33]. Fornisce una misura della quantità di composto organico (materia ossidabile) presente nel materiale di prova che può essere ossidato da un forte agente ossidante chimico [11, 33].

La diminuzione dei livelli di nitrati, solfati e fosfati nel tempo indicava che questi composti venivano utilizzati dai microrganismi[35]. L'azoto e il fosforo limitano i nutrienti per i sistemi microbici. La loro presenza o assenza ha influenzato il tasso di biodegradazione.

La salinità è stato uno dei fattori che hanno influenzato il tasso di biodegradazione. La biodegradazione di L1, L2, R2 e K1 aumenta con la diminuzione della salinità mentre in R1 e K2 diminuisce leggermente con l'aumento della salinità. Gli studi hanno dimostrato che la biodegradazione dei disperdenti di fuoriuscite di petrolio o del petrolio greggio aumenta con la diminuzione della salinità[8,18,35].

5. conclusione

È stata valutata la biodegradabilità dei disperdenti per fuoriuscite di petrolio, Eco-Remover e Rigwash, comunemente utilizzati dalle industrie petrolifere in risposta all'inquinamento da fuoriuscite di petrolio. Dallo studio, Eco-Remover è più biodegradabile del "disperdente" Rigwash entro il periodo sperimentale di 42 giorni. Il comportamento dei composti durante lo studio può essere dovuto ai loro effetti sinergici. La miscela di petrolio greggio-Eco-Remover con il maggior numero di disperdenti di idrocarburi che utilizza conte batteriche e fungine ha mostrato la capacità di essere utilizzata dai microrganismi più della combinazione di petrolio greggio-Rigwash. Tuttavia, questo studio è limitato poiché il tasso percentuale di cellule microbiche presenti nei campioni dipende in parte dalla fonte dell'inoculo (acqua di mare). L'uso di diversi campioni di acqua può presentare specie indigene distinte di microrganismi idrocarbonoclastici che hanno il potenziale per utilizzare i substrati come l'unico carbonio disponibile ed energia. Il livello di biodegradazione raggiunto ha mostrato che c'era una differenza significativa nella biodegradazione di ciascun disperdente di fuoriuscite di petrolio o della loro combinazione con il petrolio greggio.

6. Raccomandazioni

Sequel del risultato di questo studio, (UN). Sono necessari ulteriori studi sull'applicazione di questi disperdenti sul campo per confermare l'esito di queste osservazioni di laboratorio.

(B). Il DPR dovrebbe garantire il funzionamento delle industrie petrolifere all'interno del territorio nigeriano rispettare rigorosamente le norme e i regolamenti che guidano l'uso di disperdenti per fuoriuscite di petrolio e l'adozione di strategie di risposta; le industrie petrolifere che hanno violato le sue leggi dovrebbero essere denunciate per fungere da deterrente per gli altri.

(c) L'isolato fungino non identificato dovrebbe essere sottoposto a ulteriori indagini, preferibilmente, approcci molecolari per classificare e identificare l'organismo e sapere se è nuovo.

(d) Altre raccomandazioni proposte da Nnadozie e Odokuma[18]dovrebbero essere presi sul serio e accordare la necessaria attenzione che meritano.

Riferimenti

- [1] American Petroleum Institute, API (2013) Prevenzione e risposta alle fuoriuscite di petrolio: disperdenti Scheda informativa 1 - Introduzione ai disperdenti, pp: 1-7.
- [2] IMO/UNEP (2011). Sistema informativo regionale; Parte D - Linee guida operative e documenti tecnici, Sezione 2, Linee guida per l'uso di disperdenti per combattere l'inquinamento da idrocarburi in mare nella regione mediterranea, REMPEC. [In linea]. Disponibile: <http://www.rempec.org/admin/store/wywigImg/file/Information%20resources/Guidelines/RIS%20D2%20%28Dispersants%29/EN/DispersantsGuidelinesPartI.pdf>. [Accesso: 09.11.2016].
- [3] Fingas, M., Fieldhouse, B. e Mullin, J. (1995) Emulsioni acqua-in-olio. Come si formano e come si rompono. In: *atti della conferenza internazionale sulla fuoriuscita di petrolio del 1995*, Long Beach, California, Stati Uniti. pp: 829-830.
- [4] Gayle, D. (2012). "In che modo i tentativi di ripulire la fuoriuscita della Deepwater Horizon potrebbero averla resa PEGGIORE: i prodotti chimici disperdenti 'hanno fatto penetrare più profondamente il petrolio nelle spiagge della Costa del Golfo'". Posta quotidiana (Londra). [In linea]. Disponibile: <http://www.dailymail.co.uk/sciencetech/article-2241093/Howattempts-clear-Deepwater-Horizon-spill-WORSE.html>. [Accesso: 12.10.2016].
- [5] Liang, S., Song, D., Zhang, Q., Wang, J. e Yan, L. (2013) Sviluppo di disperdenti per fuoriuscite di petrolio ad alta efficienza e bassa tossicità a base di derivati del sorbitolo, tensioattivi non ionici e glicolipidi biosurfattanti. *J. di dintorni*, 4: 16-22.
- [6] Lessard, RR e Demarco, G. (2000) Il significato dei disperdenti di fuoriuscite di petrolio. *Bollettino scientifico e tecnologico sulle fuoriuscite*, 6(1): 59-68.
- [7] Mulkins-Phillips, GJ e Stewart, JE (1974) Effetto di quattro disperdenti e biodegradazione e crescita di batteri sul petrolio greggio, *J. di Appl. Microbiol.* 28(4): 547-552.
- [8] Odokuma, LO (2012) The Genius in the Microbe: uno strumento indispensabile per la gestione del flusso ambientale mediato da xenobiotici. *Serie di conferenze inaugurali n. 87*, Università di Port Harcourt, Nigeria. [In linea]. Disponibile: https://www.academia.edu/29585970/the_genius_in_the_microbe_an_indispensable_tool_for_the_management_of_xenobiotic_mediated_environmental_flux_an_inaugural_lecture_inaugural_lecture_series_no_87. [Accesso: 12.10.2016].
- [9] Milinkovitch, T., Godefroy, J., Théron, M., e Thomas-Guyon, H. (2011). Tossicità dell'applicazione del disperdente: risposte dei biomarcatori nelle branchie di cefalo giovanile dorato (*Lisa aurata*). *Dintorni*. *Sondaggio*. 159(10): 2921-2928.
- [10] Hassanshahian, M. e Cappello, S. (2013). Biodegradazione del petrolio greggio negli ambienti marini, biodegradazione - ingegneria e tecnologia, Dr. Rolando Chamy (a cura di), *InTech*, pp. 101-135.
- [11] Zolfaghari-Baghbaderani, A., Emtyazjoo, M., Poursafa, P., Mehrabian, S., Bijani, S., Farkhani, D. e Mirmoghtadaee, P. (2012). Effetti di tre tipi di disperdenti di petrolio sulla biodegradazione del greggio disperso nell'acqua che circonda due province del Golfo Persico. *J. di dintorni. & Pub. Salute*, 2012: 8.
- [12] Ventikos, NP, Vergetis, EO, Psarafitis, HN e Triantafyllou, G. (2004) Una sintesi di alto livello di attrezzature e contromisure per la risposta alle fuoriuscite di petrolio. *J. di pericolo. Stuoia*, 107 (1-2): 51-58.
- [13] Riley, P. (1998) Composizione e metodi per la dispersione e la biodegradazione di oli e carburanti di petrolio fuoriusciti, *Petrotech*. [In linea]. Disponibile: <https://docs.google.com/viewer?url=patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US5753127.pdf>. [Accesso: 14.11.2016].
- [14] Otitoloju, AA (2010) Valutazione della degradazione del petrolio greggio in assenza di controllo e impostazioni di controllo del disperdente, basata su tecniche biologiche e fisiche. *Int. J. di dintorni. Ris.*, 4(2):353-360.
- [15] Main, D. (2014) Il disperdente rende il petrolio fuoriuscito 52 volte più tossico. MSNBC. [In linea]. Disponibile: http://www.nbcnews.com/id/50032789/ns/technology_and_scienc-science/t/dispersant-makes-oil-spills-times-more-tossico/#.WT7XQ2iGPiV [Accesso: 12.11.2016]
- [16] Roberto, RM, Snell, TW e Shearer, TL (2013) Tossicità sinergica del greggio macondo e del disperdente Corexit 9500A al *Brachionus plicatilis* complesso di specie (Rotifera). *J. di dintorni. Inquinare*. 173: 5-10.
- [17] White, HK, Lyons, SL, Harrison, SJ, Findley, DM, Liu, Y. e Kujawinski, EB (2014). Persistenza a lungo termine dei disperdenti in seguito alla fuoriuscita di petrolio dalla Deepwater Horizon. *Dintorni. Sci. Technol. Lett.*, 1(7): 295-299.
- [18] Nnadozie, PC e Odokuma, LO (2017). Impatto della fuoriuscita di idrocarburi "disperdenti" sulla biodegradazione del petrolio greggio in Nigeria. *Microbiolo. Ris. J.Int.* 18(4): 1-10.

- [19] Watanabe, K. (2001). Microrganismi rilevanti per il biorisanamento, *Corr. Opin. Biotecnologia*.12(3): 237.
- [20] Uzoigwe, CI e Okpokwasili, GC (2012). Biodegradazione dei disperdenti di fuoriuscite di petrolio nell'ecosistema acquatico naturale. *Int. J. di Phy. SC.*, 7(38): 5477-5484.
- [21] Chikere, CB e Azubuike, CC (2014). Caratterizzazione di idrocarburi utilizzando funghi da sedimenti e acqua inquinati da idrocarburi. *Negro. J.Biotech.*, 27: 49-54.
- [22] Singh, SN, Kumari, B. e Mishra, S. (2012). *Degradazione microbica degli alcani*. Divisione Scienze Ambientali, CSIR – Istituto Nazionale di Ricerca Botanica, Lucknow 226 001, India. pp: 439-469.
- [23] Bushnell, LD e Haas, HF (1941). L'utilizzo di alcuni idrocarburi da parte di microrganismi. *J. batteriolo.*41:653-673.
- [24] Rahman, KSM, Thahira-Rahmana, J., Lakshmanaperumalsamy, P. e Banato, IM (2002). Verso un'efficiente degradazione del petrolio greggio da parte di un consorzio batterico misto. *Biores Tecnol.*85 (3): 257-261.
- [25] Hua, X., Wu, Z., Zhang, H., Lu, D., Wang, M., Liu, Y. e Liu, Z. (2010) Degradazione dell'esadecano da parte del ceppo *Enterobacter cloacae* TU che nasconde un esopolisaccaride come bioemulsionante. *Chemosfera*80: 951-956.
- [26] Gutierrez, T, Leo, VV, Walker, GM e Green, DH (2009) Proprietà emulsionanti di un estratto di glicoproteina prodotto da un *Flexibacter* specie ceppo TG382. *Enzima Microb. Tecnol.* 45: 53-57.
- [27] Ladhari, N., Hayet, G., Harrabi, L. (2000). Studio della biodegradabilità del sale sodico dal prodotto di condensazione di acidi naftalen solfonici e formaldeide. *Unit Textile Res.* pp: 1-10.
- [28] Sogbanmu, TO e Otitoloju, AA (2012). Potenziale di potenziamento dell'efficacia e del biorisanamento di quattro disperdenti approvati per il controllo delle fuoriuscite di petrolio in Nigeria. *J.Bioremed. Biodegradabile*, 3(2): 1-5.
- [29] Bloch, HP (2009). Lubrificazione pratica per impianti industriali, capitolo 3: *Test sui lubrificanti*. 2a ed. pp: 24-25.
- [30] OCSE (2001). Linee guida OCSE per i test sui prodotti chimici. Bozza di documento, proposta per una nuova linea guida 302D, pp: 1-11.
- [31] USEPA (2010). Tossicità comparativa del petrolio greggio dolce della Louisiana (LSC) e LCS disperso chimicamente rispetto a due specie acquatiche di prova del Golfo del Messico. USEPA Ufficio di ricerca e sviluppo. [In linea]. Disponibile: <https://archive.epa.gov/emergency/bpspill/web/pdf/updatedphase2dispersant-toxtest.pdf>. [Accesso: 12.09.2016].
- [32] OCSE (1992). Linee guida per i test sui prodotti chimici. Adottato dal Consiglio, n. 301, pp: 1-62.
- [33] APHA (1998) Metodo standard per l'esame delle acque e delle acque reflue. Associazione americana per la salute pubblica. 19a ed. Washington DC [in linea]. Disponibile: https://www.mwa.co.th/download/file_upload/SMWW_1000-3000.pdf. [Accesso 12.11.2016].
- [34] La Dousse, A. e Tramiree, AS (1991) Risultati di 12 anni di ricerca nella bonifica dell'olio sversato. Inipol PAE 22. In: *Atti della conferenza internazionale sulla fuoriuscita di petrolio del 1991*. American Petroleum Institute, Washington DC pp: 577-581.
- [35] Okpokwasili, GC, e Odokuma, LO (1990). Effetto della salinità sulla biodegradazione del disperdente per fuoriuscite di petrolio. *Sciupare. Maneggio*.10: 141-146.