



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA
DI VITERBO**

Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE AMBIENTALI

XIX Ciclo

BIO/19

**“Uso di agenti mobilizzanti nel micorisanamento di suoli
sottoposti a contaminazione recente e storicamente contaminati
da idrocarburi policiclici aromatici”**

Dottoranda

Dott.ssa Vanessa Leonardi

Il Tutore

Prof. Maurizio Petruccioli

Il Coordinatore del corso

Prof. Enrico Mincione

Il Co-Tutore

Prof. Čeněk Novotný

*Denique caelesti sumus omnes semine oriundi;
omnibus ille idem pater est, unde alma liquentis
umoris guttas mater cum terra recepit, feta parit
nitidas fruges arbustaque laeta et genus
humanum, parit omnia saecula ferarum, pabula
cum praebet, quibus omnes corpora pascunt et
dulcem ducunt vitam prolemque propagant; qua
propter merito maternum nomen adepta est.*

Lucrezio, *De rerum natura*, II, 995

INDICE

1	INTRODUZIONE	1
1.1	Premessa	1
1.2	Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)	2
1.2.1	Generalità	2
1.2.2	Proprietà chimico-fisiche degli IPA	2
1.2.3	Fonti principali degli IPA	4
1.2.4	Tossicità	5
1.2.5	IPA nel suolo	27
1.3	Bonifica biologica di siti contaminati	29
1.3.1	Generalità	29
1.3.2	Il micorisanamento	29
1.3.3	Funghi white-rot	30
1.3.4	Enzimi ligninolitici prodotti dai funghi “white-rot”	32
1.4	Il problema della biodisponibilità	36
1.4.1	Generalità	36
1.4.2	Agenti mobilizzanti	41
1.4.3	Gli agenti mobilizzanti e la biodisponibilità degli inquinanti	42
1.4.4	Surfactanti	44
1.4.5	Surfactanti non-ionici	48
1.4.6	Biosurfactanti	49
1.4.7	Lipidi	51
1.4.8	Ciclodestrine	52
2	SCOPO DEL LAVORO	54

3	MATERIALI E METODI	56
3.1	Suoli	56
3.1.1	Suolo modello	56
3.1.2	Contaminazione del suolo modello	58
3.1.3	Aging	60
3.1.4	Suoli storicamente contaminati	60
3.2	Carica microbica del suolo	61
3.3	Microrganismi utilizzati	62
3.4	Prove di biorisanamento	62
3.4.1	Capacità di colonizzazione del suolo	62
3.4.2	Preparazione del preinoculo	63
3.4.3	Biotrattamento	64
3.4.4	Pretrattamento del suolo con agenti mobilizzanti	64
3.4.5	Prove di tossicità degli agenti mobilizzanti	65
3.5	Metodi analitici	65
3.5.1	Determinazione delle attività enzimatiche	65
3.5.2	Determinazione delle proteine totali	67
3.5.3	Determinazione dell'ergosterolo	67
3.5.4	Analisi dei contaminanti	68
3.5.5	Determinazione della frazione biodisponibile	69
3.6	Prove ecotossicologiche	69
3.6.1	Test di mortalità	69
3.6.2	Prova di inibizione dell'allungamento dell'apparato radicale	69
3.7	Analisi statistiche	70
4	RISULTATI E DISCUSSIONE	71
4.1	Prove preliminari e impostazione sperimentale	72
4.2	Crescita fungina e rilascio di polisaccaridasi sul suolo contaminato ad hoc	80

4.3	Prove di biorisanamento su suoli contaminati ad hoc	90
4.4	Produzione di enzimi ligninolitici su suolo contaminato ad hoc	104
4.5	Analisi di ecotossicità del suolo contaminato ad hoc e biottrattato	111
4.6	Effetto degli agenti mobilizzanti sulla crescita microbica del suolo contaminato ad hoc	116
4.7	Degradazione di idrocarburi policiclici aromatici in suoli storicamente contaminati	118
5	CONCLUSIONI	123
6	BIBLIOGRAFIA	126
	APPENDICE	149

1 INTRODUZIONE

1.1 Premessa

Nei paesi industrializzati il problema della bonifica dei siti contaminati da idrocarburi sta assumendo sempre maggiore rilevanza e, in particolare, la contaminazione di suoli da idrocarburi policiclici aromatici (IPA) rappresenta uno degli scenari più ricorrenti (Pannu *et al.*, 2004).

Molte sono le tecniche di bonifica attualmente in uso che permettono di affrontare situazioni anche molto complesse. Tra queste ultime, il trattamento di suoli contaminati da IPA, rappresenta una delle sfide più difficili.

Gli IPA sono considerati degli inquinanti prioritari in virtù della loro ubiquità e delle loro proprietà tossiche, mutagene e cancerogene. L'efficacia di trattamenti di biorisanamento di suoli contaminati è fortemente condizionata dalla recalcitranza di questi composti all'attacco biologico e dal loro basso grado di biodisponibilità (Tiehm *et al.*, 1994).

Essendo composti altamente idrofobici, gli IPA tendono a ripartirsi nella fase organica del suolo e in questo stato possono persistere per tempi lunghissimi.

A questa ridotta biodisponibilità sono da imputare i risultati spesso negativi che si ottengono quando si utilizzano tecniche di biorisanamento con batteri su suoli contaminati da IPA.

Particolarmente promettente nella bonifica di tali suoli risulta essere l'impiego di funghi "white-rot" (micorisanamento). A differenza dei batteri, i funghi non hanno la necessità di trasportare la molecola da degradare all'interno della cellula, ma grazie alla produzione di complessi enzimatici esocellulari e alla caratteristica crescita ifale possono accedere in modo più efficace al contaminante adsorbito.

Nonostante ciò, quando si è in presenza di suoli storicamente contaminati, la biodisponibilità degli IPA ad alto peso molecolare si riduce a livelli tali che anche le tecniche di micorisanamento risultano inefficaci. Per ovviare a questo problema negli ultimi anni è stato preso in considerazione l'utilizzo di agenti mobilizzanti, ossia di sostanze che grazie alle loro particolari caratteristiche chimiche sono in grado di favorire il

trasporto degli inquinanti idrofobici dalla fase organica a quella acquosa, così da aumentare la loro biodisponibilità e quindi la biotrattabilità dei suoli contaminati.

1.2 Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

1.2.1 Generalità

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) costituiscono un'ampia classe di composti organici, (<http://envirocancer.cornell.edu/FactSheet/general/fs41.pah.cfm>) costituiti dalla fusione di due o più anelli benzenici, che si formano durante la combustione incompleta e la pirolisi di materiali organici.

L'interesse scientifico per questa classe di composti è legato soprattutto alla riconosciuta azione cancerogena che alcuni di questi composti hanno dimostrato. Per questo motivo la United States Environment Protection Agency (EPA) e la World Health Organization (WHO) hanno identificato, all'interno di questa classe, 16 composti definiti "inquinanti prioritari": naftalene, acenaftilene, acenaftene, fluorene, fenantrene, antracene, fluorantene, pirene, crisene, benzo[a]antracene, benzo[b]fluorantene, benzo[k]fluorantene, benzo[a]pirene, dibenzo[a,h]antracene, benzo[ghi]perilene, indeno[1,2,3-cd]pirene (Harvey, 1997; Neff, 1979).

1.2.2 Proprietà chimico-fisiche degli IPA

Le proprietà chimico-fisiche sono di estrema importanza poiché danno informazioni circa la distribuzione e la reattività di una sostanza nell'ambiente.

Gli IPA sono composti idrofobici solidi a temperatura ambiente e con punti di ebollizione e di fusione elevati. La loro persistenza nell'ambiente è dovuta principalmente alla scarsa solubilità in acqua (Cerniglia, 1992). In generale, la solubilità e la volatilità decrescono con l'aumentare del numero di anelli benzenici fusi, mentre la idrofobicità si comporta in modo opposto (Wilson e Jones, 1993).

La solubilità diminuisce ulteriormente se in soluzione sono presenti soluti ionici, questo effetto si misura mediante una costante, K_s , definita come segue:

$$K_s = \log[C_w^\circ / C_{w, \text{sal}}^\circ] / [\text{SALI}]_{\text{TOT}}$$

C_w° = concentrazione della sostanza in acqua pura

$C_{w, \text{sal}}^\circ$ = concentrazione in acqua contenente i soluti ionici

$[\text{SALI}]_{\text{TOT}}$ = concentrazione degli ioni totale

Tanto maggiore è il valore della costante, tanto più idrofobo sarà il comportamento della sostanza in soluzione.

Estremamente importante da definire è il concetto di ripartizione acqua/materiale solido. Le sostanze idrofobiche tendono a raggiungere un equilibrio tra la fase solida e quella acquosa, e le proporzioni di tale ripartizione dipendono da innumerevoli fattori tra cui la temperatura, la concentrazione del contaminanti, la quantità dei soluti, la quantità di sostanza organica e le caratteristiche del contaminante. Il coefficiente di ripartizione tra acqua e materiale solido si esprime come :

$$K_p = C_s / C_w$$

In cui C_s è la concentrazione della sostanza nella fase solida

C_w è la concentrazione della sostanza nella fase acquosa.

Poiché la tendenza di una sostanza idrofobica a ripartirsi tra acqua e solidi dipende in maniera preponderante dalla quantità totale di carbonio organico (TOC), si introduce un nuovo coefficiente che tiene conto di ciò: il coefficiente di ripartizione tra acqua e sostanza organica (K_{om}) con cui si può ridefinire il K_p come segue:

$$K_p = K_{om} * \text{TOC}$$

Poiché K_{om} è di difficile determinazione sperimentale, si sostituisce con il $K_{o/w}$, vale a dire il coefficiente di ripartizione tra acqua e n-ottanolo, un solvente organico con comportamento abbastanza simile a quello della sostanza organica. Esso è definito come:

$$K_{o/w} = C_o^\circ / C_w^\circ$$

In cui C_o° è la solubilità del composto in n-ottanolo

C°_w è la solubilità in acqua.

Dato che $K_{o/w}$ è in genere molto elevato, si utilizza spesso il $\log K_{o/w}$.

A questo punto K_{om} si può calcolare mediante l'espressione:

$$K_{om} = A \log K_{o/w} + B$$

A e B costanti

Il coefficiente di ripartizione acqua materiale solido sarà quindi

$$K_p = (A \log K_{o/w} + B) * TOC$$

1.2.3 Fonti principali degli IPA

Gli IPA, sono una famiglia di microinquinanti organici divenuti ormai ubiquitari nell'ambiente.

Le fonti da cui derivano gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) possono essere di due tipi: naturali ed antropiche.

Per quanto riguarda le fonti naturali gli IPA si possono formare in tre modi (Neff, 1985): pirolisi ad alta temperatura di materiali organici (incendi di foreste e pratiche di incenerimento agricolo), diagenesi a bassa temperatura di materiali organici sedimentari che portano alla formazione di combustibili fossili e biosintesi diretta da parte di microrganismi e piante

Tra le fonti antropiche la combustione incompleta ad alta temperatura di materiale organico è una delle principali sorgenti antropogeniche di IPA nell'ambiente. La produzione di IPA durante la pirolisi (la parziale rottura di molecole organiche complesse in radicali liberi a basso peso molecolare) e la piro-sintesi (combinazione di radicali liberi contenenti uno o più atomi di carbonio) è funzione della temperatura. Le sorgenti ambientali di IPA da processi pirolitici sono diverse (Neff, 1979): cibi affumicati, fumo di sigarette, raffinerie di petrolio, produzione di asfalto, produzione di carbon coke, inceneritori di rifiuti, combustione di combustibili fossili, centrali termoelettriche che hanno come prodotti di scarto sostanze solide, liquide e gassose in cui possono essere presenti IPA.

Comunque, qualunque attività industriale o domestica, in cui materiali organici vengono portati ad alte temperature, risulterà nella produzione di alcuni IPA.

1.2.4 Tossicità

Gli IPA sono composti lipofili e si accumulano nei tessuti degli organismi esposti; la loro eliminazione dipende dalla capacità dell'organismo stesso di trasformarli in metaboliti idrosolubili, eliminabili attraverso l'escrezione.

Molti IPA sono cancerogeni e sono quindi di particolare interesse come contaminanti ambientali (Sims e Overcash, 1983). Numerosi studi hanno indicato che i composti a uno due e tre anelli sono estremamente tossici (Sims e Overcash, 1983), mentre gli IPA a più alto peso molecolare sono considerati genotossici (Lijinsky, 1991; Mersch-Sundermann *et al.*, 1992; Nylund *et al.*, 1992; Phillips, 1983).

Gli IPA possono manifestare il loro effetto tossico principalmente attraverso due tipi di interazione con le strutture cellulari: in primo luogo possono formare dei legami reversibili con siti lipofili che possono impedire i normali processi della cellula (tossicità acuta); secondariamente possono portare alla formazione di metaboliti idrofili, reattivi ed elettrofili, che si legano alle strutture cellulari, provocando danni a lungo termine (tossicità cronica).

Per tossicità acuta si intende l'effetto a breve termine che l'esposizione ad un certo inquinante produce sull'organismo in esame.

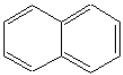
Uno dei meccanismi più importanti che rende gli IPA tossici per gli organismi è la fotoinduzione, che si verifica quando una molecola assorbe radiazioni solari nella regione degli UV. Le molecole eccitate, reagendo con l'ossigeno, possono produrre ossigeno singoletto o altre specie ossidanti, pericolose per i tessuti biologici. Il meccanismo viene definito di Energy-transfer. Le molecole di IPA fotoattivate potrebbero interagire con i substrati organici generando radicali liberi altamente reattivi. Questi stress producono la conseguente tossicità sull'organismo.

Per tossicità cronica si intende l'insorgenza di effetti negativi su organismi esposti a dosi basse per un periodo di tempo sufficientemente lungo. Quando si parla di effetti negativi ci si riferisce alla capacità di indurre un fenomeno tumorale (cancerogenicità), di indurre una mutazione (mutagenicità) o di provocare effetti sul feto (teratogenicità).

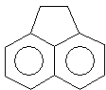
Molti IPA sono in grado di produrre gli effetti sopra indicati. Tra i più noti troviamo il B[a]pirene, uno degli IPA più cancerogeni che, come tale, è il composto più studiato (Holstein *et al.*, 1979; de Serres e Ashby, 1981). Il B[a]pirene viene spesso utilizzato come riferimento per l'indicazione della “potenza oncogena relativa” delle altre molecole appartenenti a questa classe.

In Tabella 1.1 vengono riportate le schede tossicologiche relative ai 7 IPA utilizzati nelle prove di biorisanamento.

Tabella 1.1 Schede tossicologiche degli IPA (<http://bdt.regione.puglia.it/pqueryset.php>) utilizzati nel presente lavoro di tesi

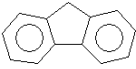
Naftalene  	
Nome chimico	Naftaline
Formula di struttura:	
Formula bruta:	C ₁₀ H ₈
Sinonimi:	Naphthalin; Naphthene; Naphthaline; Camphor tar; White tar; Moth balls; Moth Flakes; Tar camphor; Mighty 150; Mighty RD1; NCI-C52904; UN 1334.
Numero CAS:	91-20-3
Aspetto fisico:	Solido cristallino bianco o liquido con odore caratteristico.
Peso molecolare:	128,17
Punto di fusione:	80 °C; oltre questa temperatura sublima in maniera apprezzabile.
Punto di ebollizione:	218 °C a 760 mmHg
Solubilità:	In acqua: < 1 mg/ml a 22 °C; 30 ppm .
Proprietà chimiche:	Il naftalene è un composto incompatibile con gli agenti ossidanti. Reagisce violentemente con il pentossido di diazoto, con CrO ₃ e con cloruro di alluminio + cloruro benzoile. Allo stato fuso, attacca alcune plastiche, gomme e altri rivestimenti. Il naftalene è sensibile al calore, si infiamma a 88 °C ed è combustibile. Volatilizza apprezzabilmente a temperatura ambiente.
Genotossicità:	In prove citogenetiche con cellule ovariche di cavia, il naftalene ha indotto scambi fra cromatidi fratelli con e senza attivazione.
Cancerogenicità:	A seguito delle prove di cancerogenicità eseguite nel 1990 e nel 1991, il naftalene è stato definito come probabile cancerogeno per l'uomo.
Tossicità acuta:	Il naftalene è tossico per l'uomo per ingestione e per inalazione; è anche pericoloso assorbito attraverso la pelle.
Degradazione:	Il naftalene è moderatamente solubile in acqua. Circa il 96% del naftalene si disperde nell'aria, il 3% nell'acqua e circa lo 0,5% nei suoli terrestri e nei sedimenti acquatici. Nell'atmosfera il naftalene si fotodegrada rapidamente. Nell'acqua si degrada per volatilizzazione, fotolisi, assorbimento e biodegradazione. Nel suolo viene assorbito moderatamente e subisce biodegradazione. La principale sorgente di naftalene nell'aria è rappresentata dalle aree a traffico sostenuto o dove vi siano esalazioni di carburante o in prossimità di raffinerie di petrolio.

Acenaftalene 	
Nome chimico	Acenaftalene
Formula di struttura:	
Sinonimi:	1,2-Deidroacenaftilene; ciclopenta[de]naftilene; acenaftalene
Formula bruta:	C ₁₂ H ₈
Numero CAS:	208-96-8
Peso molecolare:	152,21
Punto di fusione:	93,5-94,5 °C
Punto di ebollizione:	265-275 °C
Solubilità:	In acqua: insolubile.
Proprietà chimiche:	L'acenaftalene é molto stabile in normali condizioni di laboratorio.
Genotossicità:	I risultati di prove sulla genotossicità dell'acenaftalene su <i>Salmonella typhimurium</i> sono stati contraddittori (dati EPA).
Cancerogenicità:	Non vi sono dati sufficienti per considerare cancerogeno l'acenaftalene per gli animali e per l'uomo (dati EPA).
Tossicità acuta:	La più probabile esposizione umana all'acenaftalene è quella professionale, per contatto cutaneo o per inalazione nei luoghi in cui il composto viene prodotto o usato. Sono documentati i casi di esposizione per inalazione nei luoghi di lavoro. Esposizioni non professionali sarebbero frequenti in ambiente urbano e attraverso assunzione di acqua potabile contaminata.
Degradazione:	L'acenaftalene è un componente del petrolio greggio, dei catrami di carbon fossile è liberato nell'ambiente durante gli incendi naturali. Le principali fonti di emissione di acenaftalene nell'ambiente sono le raffinerie di petrolio e le centrali di distillazione dei catrami di carbone. Per l'uso molto diffuso di materiali contenenti acenaftalene, questo composto viene comunemente liberato da rifiuti solidi urbani e inceneritori. L'emivita segnalata in suoli aerobici va da 12 a 121 giorni. Si ritiene che l'acenaftalene non si idrolizzi né si bioconcentri nell'ambiente. Nei sistemi acquatici l'acenaftalene può migrare dalla colonna d'acqua alla materia organica contenuta nei sedimenti e nei solidi sospesi. Nell'atmosfera la reazione con radicali ossidrilici prodotti fotochimicamente e con ozono si ritiene sia un processo di degradazione molto importante, con emivita rispettivamente di 5 e 1 ora.

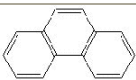
Acenaftene  	
Nome chimico:	1,2-Diidroacenaftilene; 1,8-etilenenaftalene; 1,2-diidroacenaftene; peri-etilenenaftalene; etilene naftalene; 1,8-diidroacenaftilene; naftileneetilene.
Formula di struttura:	
Formula bruta:	C ₁₂ H ₁₀
Numero CAS:	83-32-9
Peso molecolare:	154,21
Punto di fusione:	96,2 °C
Punto di ebollizione:	279 °C
Solubilità:	In acqua: 2,9 x 10 ⁻² mmol/l.
Tossicità acuta:	In un esperimento, ratti parzialmente epatotomizzati sono stati nutriti per 7 giorni con 15 mg/kg di acenaftene. La tossicità è stata verificata sulla base del peso corporeo, del peso assoluto del fegato e della rigenerazione epatica. Al termine dello studio si è verificato un aumento della rigenerazione epatica (dati EPA).
Tossicità cronica:	In un esperimento di 90 giorni, 4 gruppi di topi (20 animali/sex/gruppi) sono stati nutriti per intubazione con 0 - 175 - 350 o 700 mg/kg/giorno di Acenaftene. La valutazione tossicologica di questo studio ha compreso: modificazioni del peso corporeo, assunzione del cibo, mortalità, valutazioni clinico-patologiche, peso degli organi e valutazioni isto-patologiche degli organi bersaglio. I risultati di questo studio hanno indicato che non esistono effetti, correlati al trattamento, riguardanti la sopravvivenza, segni clinici, modificazioni del peso corporeo, l'assunzione del cibo e alterazioni oftalmiche. Alle dosi medio-alte sono stati notati cambiamenti del peso del fegato e alterazioni microscopiche, probabilmente correlati alle dosi. Inoltre, maschi trattati con alte dosi e femmine trattate con dosi medio-alte hanno mostrato un significativo incremento dei livelli di colesterolo (dati EPA).

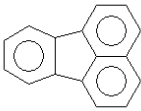
Fluorene



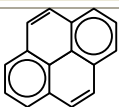
Formula di struttura:	
Formula bruta:	C ₁₃ H ₁₀
Sinonimi:	HSDB 2165; NSC 6787.
Numero CAS:	86-73-7
Aspetto fisico:	Foglioline o scaglie bianche splendenti o piccole lamine bianche cristalline, fluorescenti se impure.
Peso molecolare:	166,21
Punto di fusione:	116 – 117 °C.
Punto di ebollizione:	295 °C.
Solubilità:	In acqua: 1,2 x 10 ⁻² mmol/l; insolubile (1,7 mg/kg) . In altri solventi: solubile in acetone, disolfuro e tetracloruro di carbonio, toluene, piridina, etere, benzene e, a caldo, in etanolo al 95%.
Proprietà chimiche:	Il fluorene sublima facilmente nel vuoto, ma è molto stabile in normali condizioni di laboratorio.
Genotossicità:	Saggi sulla mutagenicità del fluorene, effettuati su cinque ceppi di <i>Salmonella typhimurium</i> (1000 µg/piastra) hanno dato esito negativo, così come su <i>Escherichia coli</i> (con concentrazioni di fluorene fino a 2 mg/ml) o su colture primarie di epatociti di ratto (dati EPA).
Cancerogenicità:	Le prove della cancerogenicità del fluorene sugli animali non sono sufficienti e questo composto non può essere classificato come cancerogeno umano.
Tossicità acuta:	L'esposizione umana al fluorene avviene primariamente attraverso il fumo di tabacco, l'inalazione di aria inquinata e per ingestione di cibo e acqua contaminati.
Degradazione:	Il fluorene si rinviene nei combustibili fossili e viene liberato nell'ambiente in grandi quantità poiché è un prodotto ubiquitario di combustione incompleta. Nell'atmosfera è liberato dalla combustione di oli, benzina, carbone, legno e rifiuti. Nell'aria esso si mantiene inizialmente allo stato di vapore, poi si degrada rapidamente. L'emivita stimata è di 29 ore. In fase di particolato viene eliminato con deposizioni secche e umide e risulta presente nella pioggia, nella neve e nella nebbia, ma parte di esso risulta stabile alla foto-ossidazione e può essere pertanto trasportata anche lontano. La biodegradazione può essere lenta in acqua e suoli in condizioni di scarsa presenza di ossigeno. Il suo forte adsorbimento da parte dei sedimenti è importante per il suo trasporto. L'emivita nel suolo varia tra 2 e 64 giorni.

  Antracene	
Nome chimico:	p-naftalene
Formula di struttura:	
Formula bruta:	C ₁₄ H ₁₀
Sinonimi:	Anthracin; Green oil; Tetra Olive N2G; Anthracene oil; Anthracen; HSDB 702; NSC 7958.
Numero CAS:	120-12-7
Impiego:	L'antracene è un composto naturale presente nei catrami di carbon fossile che si forma per combustione incompleta di composti organici. È utilizzato nella produzione di insetticidi, di conservanti per il legno e di coloranti.
Aspetto fisico:	Solido granulare cristallino da incolore a giallo chiaro con fluorescenza bluastra.
Peso molecolare:	178,23
Punto di fusione:	216,4 °C
Punto di ebollizione:	340 °C
Solubilità:	In acqua: 3,7 x 10 ⁻⁴ mmol/l; < 1 mg/l.
Proprietà chimiche:	L'antracene è un combustibile solido.
Genotossicità:	L'antracene può determinare mutazioni nelle cellule viventi.
Cancerogenicità:	Ad alte dosi, l'antracene è considerato cancerogeno per gli animali.
Tossicità acuta:	L'antracene ha una tossicità acuta molto elevata per gli organismi acquatici e gli uccelli.
Tossicità cronica:	L'esposizione ad antracene può causare fenomeni allergici agli occhi e alla pelle notevolmente aggravati dall'esposizione alla luce solare. Una ripetuta esposizione cutanea può causare irregolari cambiamenti di colore da giallo a bruno, perdita del pigmento della pelle, assottigliamento o ispessimento cutaneo, verruche, tumori cutanei e brufoli. Una ripetuta inalazione di fumi derivanti dal riscaldamento dell'antracene può causare bronchite cronica con tosse e catarro. Una ripetuta esposizione dello scroto maschile ad antracene può causare riduzione dello spessore cutaneo e un aumento del pigmento. Gli effetti cronici dell'antracene sugli organismi acquatici sono notevoli.
Degradazione:	L'antracene è moderatamente persistente in acqua, con emivita variabile tra 20 e 200 giorni. Circa il 77,5% del composto finisce nell'aria, circa il 9,5% nel suolo, circa il 9% nei sedimenti acquatici e la parte restante nell'acqua. Si ritiene che l'antracene sia capace di bioaccumularsi nei pesci.

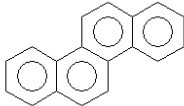
Fenantrene 	
Nome chimico:	Fenantrene
Formula di struttura:	
Formula bruta:	C ₁₄ H ₁₀
Numero CAS:	85-01-8
Aspetto fisico:	Polvere cristallina bianca
Peso molecolare:	178,24
Punto di fusione:	100 °C
Punto di ebollizione:	339 °C a 760 mm Hg
Solubilità:	In acqua: <1 mg/ml a 26 °C. In altri solventi: molto solubile in toluene, tetracloruro di carbonio; solubile in DMSO, etanolo, acetone.
Cancerogenicità:	In uno studio comparativo di induzione di tumori mammari, singole dosi orali di 200 mg di Fenantrene in olio di sesamo somministrate con alimentazione forzata a ratti femmine non hanno indotto tumori 60 giorni dopo il trattamento. Non sono stati esaminati altri tessuti oltre la ghiandola mammaria. Non è stata dimostrata l'attività cancerogenica completa in 2 esperimenti di pittura sulla pelle di topi. Non è stato riscontrato alcun tumore in topi trattati con una soluzione di Fenantrene in benzene (dose e frequenza di trattamento non specificati) per un periodo di 9 mesi. Anche l'applicazione dermica di Fenantrene al 5% , per un periodo di tempo da 3 settimane a 1 anno, non ha provocato in topi l'induzione di tumori della pelle (dati EPA).
Tossicità acuta:	Non sono disponibili informazioni sulla tossicità acuta di Fenantrene nell'uomo. E' riportata una DL50 orale per topi di 750 mg/kg. Singole dosi di 100 mg/kg/giorno di Fenantrene somministrate con alimentazione forzata per 4 giorni hanno determinato la soppressione dell'attività carbossilesterasica nella mucosa intestinale di ratti, ma non hanno prodotto altri segnali di tossicità gastrointestinale. Fenantrene non ha effetti sull'attività carbossilesterasica epatica o extraepatica. La DL50 orale per i topi è 700 mg/kg.
Tossicità cronica:	Non sono disponibili informazioni sulla tossicità orale cronica di Fenantrene nell'uomo o in animali.
Valori limite:	PEL (OSHA): 0,2mg/m ³

Fluorantene 	
Nome chimico:	Fluoranthene; 1,2-Benzacenaftene; benzo[j,k]fluorene; 1,2-(1,8-naftalenediil)benzene; 1,2-(1,8-naftalene)benzene.
Formula di struttura:	
Formula bruta:	C ₁₆ H ₁₀
Sinonimi:	FA; Idryl; Rcra waste number U120.
Numero CAS:	206-44-0
Aspetto fisico:	Solido costituito da aghi giallo scuri o da scaglie.
Peso molecolare:	202,26
Punto di fusione:	110 °C
Punto di ebollizione:	250 °C a 60 mmHg
Solubilità:	In acqua: < 1 mg/ml a 18 °C. In altri solventi (mg/ml a 20 °C): dimetilsolfossido quasi 100; etanolo (95%) 5-10; acetone quasi 100; solubile in cloroformio, bisolfuro di carbonio, etere, benzene.
Proprietà chimiche:	Il Fluorantene può essere sensibile alle lunghe esposizioni alla luce. Le soluzioni del composto possono rimanere stabili in normali condizioni di laboratorio per 24 ore. Se riscaldato fino alla temperatura di decomposizione, dà origine a fumi acri .
Genotossicità:	Non si hanno prove certe sulla mutagenicità del Fluorantene: i risultati di saggi del composto su diversi ceppi di <i>Salmonella typhimurium</i> hanno dato esito talvolta positivo, in altri casi negativo. Anche gli esperimenti effettuati su cellule di mammiferi si sono rivelati in conclusivi (dati EPA).
Cancerogenicità:	Il Fluorantene è stato saggiato su topi in prove di pigmentazione cutanea con dosi variabili all'incirca da 1,5 mg/animale/settimana per 52 settimane a 100 mg/animale/settimana per 82 settimane al fine di verificarne la cancerogenicità. I risultati di questi studi hanno però dato esito negativo, così come in seguito ad altre applicazioni cutanee effettuate in ulteriori esperimenti. In un esperimento effettuato in vivo su topi, sono stati iniettati per via intraperitoneale 0, 163 o 815 mg/kg di Fluorantene in dimetilsolfossido 1, 8 e 15 giorni dopo la nascita. Dopo 24 settimane negli animali sono stati riscontrati sia visivamente che istologicamente tumori ai polmoni, mentre tutte le masse di tessuto e gli organi con accrescimento anomalo sono stati oggetto di esame istologico. È stato osservato un aumento statisticamente significativo dell'incidenza degli adenomi ed adenocarcinomi combinati ai polmoni. Il Fluorantene ha prodotto anche tumori cutanei in saggi con Benzo[a]pirene nei topi (dati EPA).

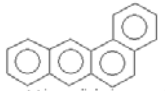
Tossicità acuta:	L'esposizione umana può derivare dall'aria inquinata o dall'ingestione di cibo contaminato da prodotti di combustione che hanno generato idrocarburi policiclici aromatici. La contaminazione da acqua potabile è meno frequente poiché i trattamenti come la filtrazione o la clorurazione lo eliminano. È invece il rivestimento delle condutture con Fluorantene a essere una più comune via di contaminazione dell'acqua potabile. La DL50 orale per i ratti è di 2000 mg/kg, mentre la DL50 dermica per i conigli è di 3180 mg/kg .
Tossicità cronica:	In uno studio, topi di entrambi i sessi (20/sex/gruppo) sono stati nutriti per intubazione gastrica con 0, 125, 250 o 500 mg/kg/giorno di Fluorantene per 13 settimane. Durante l'esperimento, a intervalli regolari, sono stati registrati i valori dei seguenti parametri: peso corporeo, consumo di cibo, dati ematologici. Alla fine delle 13 settimane, tutti i topi trattati hanno mostrato nefropatia, aumento della salivazione e dei livelli degli enzimi epatici in proporzione alla dose somministrata. I topi esposti alla dose di 500 mg/kg/giorno hanno mostrato un aumento del consumo di cibo e del peso corporeo. Quelli trattati con 250 e 500 mg/kg/giorno hanno mostrato valori di transaminasi sierica GP statisticamente più alti e un maggiore peso del fegato sia relativo che assoluto, sono state riscontrate microscopiche lesioni epatiche associate al composto. Sulla base degli aumentati livelli di transaminasi, delle patologie renali ed epatiche e delle anomalie cliniche ed ematologiche, il LOAEL considerato è stato di 250 mg/kg/giorno, mentre il NOAEL di 125 mg/kg/giorno (dati EPA).
Degradazione:	Il rilascio di Fluorantene nell'aria e nell'acqua è alquanto frequente, trattandosi di un prodotto comune della combustione di sostanza organica; esso è anche presente nei carboni fossili ed è liberato soprattutto nelle aree ad elevata concentrazione urbana. Sia nell'aria che nell'acqua si trova associato al particolato. Nell'acqua è rapidamente adsorbito dai sedimenti e si bioconcentra negli organismi. La sua concentrazione nei pesci rappresenta un'eccellente parametro indicatore di inquinamento in una determinata area. Se non viene adsorbito, si degrada per fotolisi con emivita da pochi giorni a una settimana. Nei sedimenti si mantiene invece stabile per decenni e oltre. Poiché nel suolo viene facilmente adsorbito, resta associato ai centimetri di suolo più superficiali. Essendo però stato rinvenuto anche nelle falde, ci dimostra che può anche lisciviare. In presenza di microrganismi adattati, si biodegrada in pochi anni. Nell'atmosfera si fotodegrada allo stato libero con emivita di 4-5 giorni. L'aerosol o il particolato che lo contengono è relativamente stabile per essere trasportato dalle correnti a lunga distanza prima di essere soggetto a deposizione per gravità o con la pioggia.

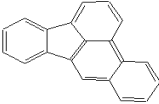
 Pirene	
Nome chimico:	Pirene; Benzo[def]fenantrene; beta-pirene.
Formula di struttura:	
Formula bruta:	C ₁₆ H ₁₀
Sinonimi:	Pyren (D); HSDB 4023; NSC 17534.
Numero CAS:	129-00-0
Aspetto fisico:	Cristalli prismatici monoclini, incolori se puri, giallo chiaro se impuri (con tetracene).
Peso molecolare:	202,26
Punto di fusione:	156 °C
Punto di ebollizione:	393 °C a 760 mmHg. 393 °C a 760 mmHg
Solubilità:	In acqua: < 1 mg/ml a 22 °C. In altri solventi (mg/ml a 22 °C): dimetilsolfossido 5-10; etanolo (95%) < 1; acetone 50-100. È solubile in toluene, bisolfuro di carbonio, etere di petrolio, etere e benzene. Completamente solubile nei solventi organici.
Proprietà chimiche:	Il Pirene reagisce con ossidi di azoto a formare nitroderivati, nonché con acido nitrico al 70%. In normali condizioni di laboratorio è stabile, così come sono stabili soluzioni in acqua, dimetilsolfossido, etanolo (95%) e acetone se tenute per 24 ore in normali condizioni di laboratorio. Sebbene non si conosca il suo punto di infiammabilità, si ritiene che il Pirene sia combustibile. Allo stato solido o in soluzione presenta una leggera fluorescenza bluastra. Non subisce fotoossidazione in solventi organici se sotto luce fluorescente. Riscaldato fino a decomposizione, emette fumi con odore pungente .
Tossicinetica metabolismo:	L'assorbimento del Pirene può avvenire per via cutanea.
Genotossicità:	In esperimenti sul DNA di <i>Escherichia coli</i> e <i>Bacillus subtilis</i> il Pirene si è rivelato incapace di produrre mutazioni. Altre prove su geni di cellule batteriche hanno dato esito sia positivo che negativo, mentre su cellule di lievito ha prodotto solo un aumento dell'incidenza di conversione dei geni in fase mitotica. Il Pirene non ha indotto aumenti di mutazioni recessive letali legate al sesso in <i>Drosophila</i> . Risultati discordanti sono stati pure ottenuti da esperimenti condotti su cellule in vitro di mammiferi e esito negativo hanno dato iniezioni intraperitoneali del composto nel midollo osseo di topi (dati EPA).
Cancerogenicità:	I dati sperimentali sulla cancerogenicità del Pirene non sono conclusivi, non è classificabile come cancerogeno umano.
Tossicità acuta:	L'esposizione umana a Pirene può derivare sia da inalazione di aria contaminata, sia da consumo di cibo e acqua inquinata.

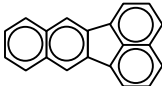
	Un'esposizione particolarmente elevata si ha con il fumo di sigaretta e con l'ingestione di cibi affumicati. Nei ratti l'inalazione di Pirene ha causato danni epatici, polmonari e gastrici, mentre l'assorbimento cutaneo per 10 giorni ha prodotto iperemia, perdita di peso e anomalie ematopoietiche. Applicazioni cutanee per 30 giorni hanno inoltre prodotto dermatiti.
Tossicità cronica:	In uno studio di 13 settimane maschi e femmine di topo sono stati trattati per intubazione gastrica con 0, 75, 125 o 250 mg/kg/giorno di Pirene mescolato ad olio di mais. I parametri tossicologici considerati sono stati i seguenti: anomalie del peso corporeo, consumo di cibo, mortalità, segni patologici clinici di organi e tessuti e chimica del sangue e del siero. In alcuni animali di tutti i gruppi, compreso il gruppo di controllo, sono stati osservati casi di nefropatia, caratterizzata dalla presenza di focolai multipli di rigenerazione tubulo-renale, spesso accompagnata da infiltrazioni di linfociti interstiziali e/o da focolai di fibrosi interstiziale. Il peso relativo e assoluto dei reni si è rivelato ridotto negli animali trattati con la dose più alta. In base a questi risultati il NOAEL è stato di 75 mg/kg/giorno e il LOAEL di 125 mg/kg/giorno (dati EPA).
Degradazione:	Il rilascio di Pirene nell'ambiente è molto diffuso poiché questo composto è un prodotto comune di combustione incompleta. È largamente associato a particolato, particelle di suolo e sedimenti. Sebbene le maggiori concentrazioni si abbiano nei pressi delle fonti di emissione, la sua presenza in luoghi anche molto distanti da esse indica che il Pirene è piuttosto stabile nell'atmosfera e che è capace di essere trasportato a lunga distanza. Nell'aria può subire fotolisi diretta, sebbene l'adsorbimento al particolato possa apparentemente ritardare questo processo la sua emivita in fase di vapore dipende dalla sua reazione con gli altri inquinanti atmosferici: è di 0,67 giorni se reagisce con ozono e di 14 giorni se reagisce con biossido di azoto; se reagisce con radicali ossidrilici prodotti fotochimicamente, la sua emivita stimata è di 1,12 giorni. Liberato nell'acqua viene adsorbito molto fortemente dai sedimenti e dal particolato, si bioconcentra da leggermente a moderatamente negli organismi acquatici, ma non subisce idrolisi. Nei pressi della superficie delle acque può subire una significativa biodegradazione e una diretta fotolisi. Importante può essere anche l'evaporazione, in seguito alla quale l'emivita può variare da 4,8 a 39,2 giorni per un fiume o può essere di 1176 giorni per uno stagno. L'adsorbimento ai sedimenti limita l'evaporazione. Se liberato nel suolo si ritiene venga fortemente adsorbito dalle particelle di terreno e per questo non dovrebbe lisciviare in misura apprezzabile nella falda, sebbene il suo rinvenimento in essa dimostra che può comunque raggiungerla. Si ritiene che non evaporino né venga idrolizzato dal terreno ove può comunque biodegradarsi in buona parte.

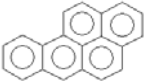
Crisene  	
Nome chimico:	1,2-Benzofenantrene; benzo[a]fenantrene; 1,2,5,6-dibenzonaftalene; 1,2-benzfenantrene.
Formula di struttura:	
Formula bruta:	C ₁₈ H ₁₂
Numero CAS:	218-01-9
Impiego:	Il Crisene è utilizzato in diverse sintesi chimiche di ricerca.
Aspetto fisico:	Scaglie ortorombiche bipiramidali, da incolore a blu fluorescenti.
Peso molecolare:	228,28
Punto di fusione:	254 – 256 °C
Punto di ebollizione:	448 °C
Solubilità:	In acqua: 0,0018 mg/kg, insolubile.
Proprietà chimiche:	Il Crisene è molto stabile in condizioni normali di laboratorio.
Genotossicità:	Il Crisene produce anomalie cromosomiche nelle cellule germinali di cavie e di topi dopo esposizione per intubazione, nonché esito positivo in prove batteriche di mutazione genetica e alterazioni in cellule di mammiferi esposte in coltura (dati EPA).
Cancerogenicità:	Non vi sono dati sufficienti di prove effettuate su animali per dimostrare gli effetti cancerogeni del Crisene sull'uomo. Nei topi esso produce un aumento dell'incidenza di carcinomi e linfomi maligni a seguito di iniezioni intraperitoneali e carcinomi dermici per esposizione cutanea. Anche se la cancerogenicità del Crisene sull'uomo non è stata confermata, esso rientra fra quei prodotti definiti cancerogeni come catrame di carbone, fuliggine, emissioni di cokeria e fumo di sigaretta (dati EPA).
Degradazione:	Il Crisene è un composto facilmente rinvenibile associato al particolato, al suolo e ai sedimenti poiché si tratta di un prodotto che si forma a seguito di una combustione incompleta. Nel suolo sembra che venga adsorbito molto fortemente e non liscivi nelle acque sotterranee. Non si idrolizza o evapora in maniera apprezzabile dal suolo e può essere soggetto a biodegradazione. Nelle acque superficiali esso è soggetto a fotolisi con un'emivita media di 4,4 ore. Nell'aria il Crisene subisce fotolisi diretta, anche se

	l'adsorbimento sul particolato può ritardare questo processo. L'emivita stimata del Crisene nell'aria è di 1,25 ore.
--	--

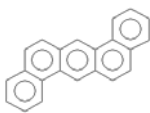
Benz[a]antracene 	
Nome chimico:	1,2-Benzantracene; 2,3-benzfenantracene; 2,3-benzofenantrene; 1,2-benz[a]antracene; 1,2-benzantrene.
Formula di struttura:	
Formula bruta:	C ₁₈ H ₁₂
Numero CAS:	56-55-3
Aspetto fisico:	Sottili lamine o scaglie incolori che danno fluorescenza verde-giallastra.
Peso molecolare:	228,29
Punto di fusione:	157 – 159 °C
Punto di ebollizione:	435 °C (sublimazione).
Solubilità:	In acqua: < 1 mg/ml a 20 °C.
Proprietà chimiche:	Il benz(a)antracene è stabile in normali condizioni di laboratorio. È un probabile combustibile; se riscaldato fino a decomposizione emette fumi acri e irritanti.
Tossicinetica metabolismo:	Le attuali teorie sull'attivazione metabolica degli idrocarburi policiclici aromatici sono in accordo con il potenziale cancerogeno del benz(a)antracene. Infatti, viene metabolizzato dalla ossidasi a funzione mista per dare epossidi che, per la loro particolare struttura, risultano mutageni per i batteri e cancerogeni per i topi (dati EPA).
Genotossicità:	Il benz(a)antracene si è dimostrato genotossico in un varietà di prove su cellule procariotiche ed eucariotiche. Nei procarioti il composto è risultato positivo nelle prove di danneggiamento del DNA, di reversione e mutazione. In cellule di mammifero è risultato positivo nelle prove di danneggiamento, di mutazione, di effetti sui cromosomi e di trasformazioni cellulari (dati EPA).
Cancerogenicità:	Sulla base di poche prove su animali, il benz(a)antracene ha prodotto tumori in topi esposti per intubazione gastrica, iniezioni intraperitoneali, sottocutanee e intramuscolari, applicazioni topiche. Anche se non vi sono dati specifici riguardanti la sua azione sull'uomo, è stato incluso fra i composti cancerogeni per l'uomo (dati EPA).

Benzo[b]fluorantene  	
Nome chimico:	3,4-benz(e)acefenantrilene; 2,3-benzofluorantrene; 2,3-benzofluorantene; 2,3-benzfluorantene; 3,4-benzofluorantene; 3,4-benzofluorantrene; benzo(e)fluorantene.
Formula di struttura:	
Formula bruta:	C ₂₀ H ₁₂
Numero CAS:	205-99-2
Impiego:	Il benzo(b)fluorantene viene utilizzato nella ricerca chimica.
Aspetto fisico:	Cristalli aghiformi incolori o polvere cotonosa gialla.
Peso molecolare:	252,32
Punto di fusione:	163 – 165 °C
Solubilità:	In acqua: < 1 mg/ml a 19 °C
Proprietà chimiche:	Il benzo(b)fluorantene pur reagire con forti ossidanti, nonché con diversi elettrofili, perossidi, ossidi di azoto e di zolfo; è stabile in condizioni normali di laboratorio. Se riscaldato fino a decomposizione emette fumi acri e irritanti.
Genotossicità:	In prove di reversione mutagenica in <i>Salmonella</i> si sono ottenuti risultati prevalentemente positivi (dati EPA).
Cancerogenicità:	Sulla base di prove di laboratorio su animali, il benzo(b)fluorantene ha prodotto tumori in topi a seguito di impiantazioni polmonari, iniezioni intraperitoneali o sottocutanee e trattamenti dermici (dati EPA).
Degradazione:	Il benzo(b)fluorantene deriva prevalentemente dall'incompleta combustione di numerosi carburanti. Liberato in acqua, l'adsorbimento ai sedimenti sospesi sembra che rimuova gran parte del composto dalla soluzione. La parte in soluzione sembra essere interessata da fotolisi e fotossidazione, mentre la parte adsorbita sembra resistere a questi processi. Nei pesci il composto può bioconcentrarsi. Nel suolo, a causa del forte adsorbimento precoce, la volatilizzazione, la fotolisi e la lisciviazione verso le acque sotterranee non è significativa. Nell'aria il benzo(b)fluorantene viene probabilmente adsorbito al particolato e poi si deposita sotto forma di precipitazione secca o umida. In fase di vapore reagisce con i radicali ossidrilici generati fotochimicamente, con un'emivita stimata di un giorno.

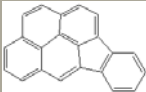
Benzo[k]fluorantene  	
Nome chimico:	8,9-benzofluorantene; 11,12-benzofluorantene; 11,12-benzo(k)fluorantene; 2,3,1',8'-binaftilene; benzo(k)fenantrene..
Formula di struttura:	
Formula bruta:	C ₂₀ H ₁₂
Sinonimi:	B(K)F
Numero CAS:	207-08-9
Aspetto fisico:	Cristalli aghiformi giallo chiaro.
Peso molecolare:	252,32
Punto di fusione:	217 °C
Punto di ebollizione:	480 °C a 760 mm Hg
Solubilità:	In acqua: < 1 mg/ml a 20 °C
Proprietà chimiche:	Il benzo(k)fluorantene pur reagire con forti ossidanti, nonché con diversi elettrofili, perossidi, ossidi di azoto e di zolfo. È stabile in condizioni normali di laboratorio; le sue soluzioni in acqua, dimetilsolfossido, etanolo al 95% o acetone possono mantenersi stabili per 24 ore in condizioni normali di laboratorio. Se riscaldato fino a decomposizione emette fumi acri e irritanti.
Genotossicità:	Il benzo(k)fluorantene è risultato mutageno in prove sui batteri (dati EPA).
Cancerogenicità:	Sulla base di prove di laboratorio su animali, il benzo(k)fluorantene ha prodotto tumori in topi a seguito di impiantazioni polmonari, iniezioni intraperitoneali o sottocutanee e trattamenti dermici. Risultati dubbi sono stati ottenuti in prove su adenomi polmonari in topi. Tale composto è considerato un probabile cancerogeno umano (dati EPA).
Degradazione:	Il benzo(k)fluorantene è un prodotto della incompleta combustione. Sia nell'aria che nell'acqua esso si ritrova associato al particolato. Sul suolo viene adsorbito fortemente tanto da mantenersi negli strati superficiali senza lisciviare nelle acque sotterranee. La biodegradazione, quando si verifica, è molto lenta (emivita di circa 2 anni). Sembra che si bioconcentri negli organismi acquatici.

Benzo[a]pirene	
Nome chimico:	Benzo[a]pirene 6,7-Benzopirene; B[a]P; BP; 3,4-benzopirene; benzo[d,e,f]crisene; 3,4-benzpirene; benzpirene; 3,4-benzilpirene; 3,4-benz[a]pirene; 3,4-BP; 3,4-benzo(alfa)pirene.
Formula di struttura:	
Formula bruta:	C ₂₀ H ₁₂
Numero CAS:	50-32-8
Aspetto fisico:	Polvere cristallina giallastra con debole odore aromatico.
Peso molecolare:	252,32
Punto di fusione:	176,5 – 177,5 °C
Punto di ebollizione:	475 °C a 760 mmHg
Densità:	1,351 g/ml
Solubilità:	In acqua: < 1 mg/ml a 17 °C. In altri solventi (mg/ml a 17 °C): dimetilsolfossido 10-50; etanolo (95%) < 1; acetone 10-50. Solubile in toluene, xilene, benzene, etere.
Proprietà chimiche:	Il benzo(a)pirene è incompatibile con i forti ossidanti; esso viene interessato rapidamente da nitrurazione e alogenazione. L'ozono, l'acido cromatico e gli agenti cloruranti ossidano questo composto. Il benzo(a)pirene può reagire con gli ossidanti organici ed inorganici inclusi vari elettrofili, perossidi, ossidi di azoto e ossidi di zolfo. L'idrogenazione ha luogo con l'ossido di platino. Non è infiammabile. Subisce foto-ossidazione per irradiazione con luce solare o con fluorescenza in solventi organici. Le soluzioni di benzo(a)pirene in benzene si ossidano per influenza della luce e dell'aria. Le soluzioni in acqua, dimetilsolfossido, etanolo al 95% o acetone possono rimanere stabili per 24 ore in condizioni normali. Se riscaldato fino a decomposizione emette fumi tossici e densi di monossido e biossido di carbonio.
Genotossicità:	Il benzo(a)pirene si è dimostrato genotossico in diverse prove su cellule procariotiche ed eucariotiche. Nei procarioti il composto è risultato positivo nelle prove di danneggiamento del DNA nonché di reversione e mutazione. In cellule di mammifero è risultato positivo nelle prove di danneggiamento, di mutazione, di effetti sui cromosomi e di trasformazioni cellulari (dati EPA).
Cancerogenicità:	Il benzo(a)pirene è un probabile agente cancerogeno per l'uomo. Vi sono alcune prove che esso possa causare tumori alla pelle, ai polmoni e alla vescica sia nell'uomo che negli animali.
Effetti sulla riproduzione:	Il benzo(a)pirene ha causato in animali da laboratorio l'insorgenza di tumori nei nuovi nati di madri esposte durante la gravidanza nonché disturbi di sviluppo fetale.
Tossicità acuta:	La DL50 subcutanea per i ratti è di 50 mg/kg.

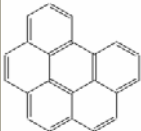
Tossicità cronica:	I dati disponibili si basano su studi di alimentazione, intubazione gastrica, inalazione, instillazione intratracheale, trattamenti dermici e subcutanei effettuati su roditori ed alcuni primati. Somministrazioni ripetute di benzo(a)pirene sono state associate con l'incremento dell'incidenza sia di tumori generali che relativi alla zona trattata. Il composto viene utilizzato frequentemente come controllo positivo nei saggi sulla cancerogenicità (dati EPA).
Valori limite:	PEL-TWA (OSHA): 0,2 mg/m ³ per un turno lavorativo di 8 ore. TLV-TWA (ACGIH): 0,2 mg/m ³
Degradazione:	Il benzo(a)pirene è un composto facilmente rinvenibile associato al particolato, al suolo e ai sedimenti poiché si tratta di un prodotto che si forma a seguito di una combustione incompleta. Nell'aria subisce fotolisi diretta, anche se l'adsorbimento sul particolato può ritardare questo processo. Esso inoltre può essere allontanato per reazione con O ₃ (emivita di 37 min.) e NO ₂ (emivita di 7 giorni) e l'emivita stimata della reazione che produce fotochimicamente radicali liberi nell'aria è di 21,49 ore. Se rilasciato in acqua esso viene adsorbito molto velocemente dai sedimenti e al particolato, si bioconcentra negli organismi acquatici che non lo metabolizzano, e non si idrolizza. Nel suolo sembra che venga adsorbito molto fortemente dai sedimenti e non liscivi in maniera significativa nelle acque sotterranee. Non si idrolizza o evapora in maniera apprezzabile dal suolo e può essere soggetto a biodegradazione. Nelle acque superficiali esso è soggetto a fotolisi con un'emivita media di 4,4 ore.

Dibenz[a,h]antracene  	
Nome chimico:	Dibenz[a,a]anthracene Benz[a,h]antracene; 1,2:5,6-Dibenzantracene; 1,2:5,6-benzantracene; 1,2:5,6-dibenz[a]antracene; 1,2:5,6-dibenzoantracene.
Formula di struttura:	
Formula bruta:	C ₂₂ H ₁₄
Numero CAS:	53-70-3
Aspetto fisico:	Solido cristallino bianco o giallo pallido, con tendenza a sublimare.
Peso molecolare:	278,35
Punto di fusione:	266-267 °C
Punto di ebollizione:	524 °C
Tensione di vapore:	10 ⁻¹⁰ mm Hg a 20 °C; 3,7 + 1,8 x 10 ⁻¹⁰ Pa a 25 °C.
Solubilità:	In acqua: < 1 mg/l a 19 °C; 1,8 x 10 ⁻⁶ mmol/l. In altri solventi (mg/ml): a 19 °C dimetilsolfossido e acetone 1-10,

	etanolo al 95% <1; a 18 °C metanolo e toluene <1. Solubile inoltre in benzene, etere, acido acetico, etere di petrolio, xilene, oli, solventi organici, in tributirina (8 mg/ml) e leggermente solubile in alcool.
Proprietà chimiche:	Il dibenz(a,h)antracene è probabilmente un composto combustibile, sebbene non sia disponibile il suo punto di infiammabilità. È incompatibile con forti ossidanti e viene ossidato dall'acido cromico e dal tetraossido di osmio. È stabile in normali condizioni di laboratorio.
Genotossicità:	Effetti mutageni e danni al DNA dovuti al dibenz(a,h)antracene sono stati osservati su batteri e su colture cellulari di mammiferi (dati EPA).
Cancerogenicità:	In vari esperimenti sugli animali il dibenz(a,h)antracene si è rivelato cancerogeno per la maggior parte delle vie. È probabile che lo sia anche per l'uomo. In topi esposti al composto per via orale e cutanea, nonché per via sottocutanea o intramuscolare, sono stati osservati carcinomi. L'iniezione di dibenz(a,h)antracene ha prodotto tumori intorno al punto di iniezione in vari animali da laboratorio (dati EPA).
Tossicità acuta:	Il dibenz(a,h)antracene è velenoso per via intravenosa, ma è dannoso anche se deglutito o inalato. Ha un effetto irritante. Particolarmente se riscaldato fino a decomposizione, emette fumi aspri, tossici e irritanti, contenenti monossido e biossido di carbonio. L'esposizione umana a questo composto deriva da inalazione di aria o da ingestione di acqua e cibo contaminati.
Degradazione:	Il dibenz(a,h)antracene viene comunemente liberato nell'ambiente poiché la sua origine è quella di un ubiquitario prodotto di combustione incompleta. Si associa in grande misura al particolato, al suolo e ai sedimenti. La sua presenza in luoghi anche molto distanti dalle fonti di prima emissione dimostra che è piuttosto stabile nell'atmosfera. Nel suolo viene adsorbito fortemente e non liscivia nell'acqua di falda. Nel terreno è soggetto a biodegradazione, con emivita rilevata di 18-21 giorni. Liberato nell'acqua si ritiene venga fortemente adsorbito dai sedimenti e dal particolato e si bioaccumuli negli organismi acquatici non dotati di ossidasi microsomiale, l'enzima capace di metabolizzare alcuni IPA. In acqua non viene idrolizzato, né evapora. Nell'atmosfera si associa al particolato e può subire un trasporto la cui entità dipende dalle dimensioni delle particelle e dalle condizioni climatiche che determinano i tassi di deposizione secca o umida. Nell'aria può subire fotolisi. La sua emivita nell'atmosfera è stata stimata nell'ordine di 1 giorno, sulla base dei tempi di reazione con i radicali ossidrilici prodotti fotochimicamente.

Indeno[1,2,3-cd]pirene  	
Nome chimico:	Indeno[1,2,3-cd]pirene; o-Fenilenepirene; 2,3-o-fenilenepirene; 1,10-(1,2-fenilene)pirene.
Formula di struttura:	
Formula bruta:	C ₂₂ H ₁₂
Numero CAS:	193-39-5
Aspetto fisico:	Solido cristallino aghiforme o a scaglie di colore giallo che in soluzione mostra una fluorescenza giallo-verdastra.
Peso molecolare:	276,34
Punto di fusione:	160 – 163 °C
Punto di ebollizione:	536 °C
Proprietà chimiche:	L'indeno[1,2,3-cd]pirene è molto stabile in normali condizioni di laboratorio.
Genotossicità:	L'indeno[1,2,3-cd]pirene ha dato esito positivo in prove mutagene su cellule batteriche (dati EPA).
Cancerogenicità:	L'indeno[1,2,3-cd]pirene ha prodotto tumori in topi trattati per impiantazione polmonare, iniezione sottocutanea ed esposizione dermica. Sebbene non vi siano dati che associno questo composto all'insorgenza di tumori nell'uomo, l'indeno[1,2,3-cd]pirene fa parte di composti che si sono rivelati associati a tumori umani, quali catrame di carbon fossile, nerofumo, emissioni da cokerie e il fumo di sigaretta (dati EPA).
Tossicità acuta:	La principale via di esposizione umana è l'ingestione di cibo contaminato, ma altre fonti di intossicazione possono essere l'acqua e l'aria contaminate.
Degradazione:	L'indeno[1,2,3-cd]pirene è un composto che si forma nella maggior parte delle combustioni o dei processi ad elevata temperatura che coinvolgono sostanze contenenti carbonio ed idrogeno. Le fonti note di questo composto sono la combustione di carbone, legno e benzina, l'incenerimento di rifiuti urbani, le cokerie e il fumo di sigaretta. E' stato anche trovato nella benzina, nell'olio per motori e nelle acque di scorrimento stradali. La quantità di indeno[1,2,3-cd]pirene che viene liberata nel suolo è da questo fortemente assorbita e pertanto si ritiene che non liscivi. Non vi sono informazioni su eventuali processi di volatilizzazione, idrolisi e biodegradazione che esso potrebbe subire nel terreno. Liberato nell'acqua viene assorbito fortemente dal particolato sospeso, dai microrganismi e dai sedimenti. Il suo potenziale di bioconcentrazione nella maggior parte degli organismi

	acquatici è elevato. Non vi sono informazioni riguardo la volatilizzazione, la fotolisi, l'idrolisi e la biodegradazione di questo composto nell'acqua. La quasi totalità dell'indeno[1,2,3-cd]pirene liberato nell'atmosfera viene assorbita dal particolato. L'indeno[1,2,3-cd]pirene è stato rinvenuto nella pioggia, nell'acqua potabile e di falda, nei corpi d'acqua superficiali, nelle acque reflue industriali, nei sedimenti marini e di acqua dolce, nei sedimenti in sospensione, nei prodotti di scarico degli autoveicoli, nell'atmosfera, nei cibi (cereali, oli da cucina, malto di orzo), nel latte in polvere, negli omogeneizzati per bambini, nei prodotti ittici, nelle fogne.
--	--

Benzo[ghi]perilene	
Formula di struttura:	
Formula bruta:	C ₂₂ H ₁₂
Numero CAS:	191-24-2
Aspetto fisico:	Solido di colore giallo si presenta in forma piastre verdi pallide.
Peso molecolare:	276,33
Punto di fusione:	277-279 °C
Punto di ebollizione:	545 °C
Solubilità	0,3 µg/L a 25 °C
Proprietà chimiche:	Stabile. Combustibile. Incompatibile con gli agenti ossidanti forti.
Cancerogenicità:	Possibile cancerogeno.
Tossicità acuta:	L'esposizione umana più probabile deriva da esposizione professionale, che può avvenire con il contatto cutaneo o l'inalazione. Le esposizioni non professionali derivano soprattutto si dalla contaminazione atmosferica urbana, dal consumo di alimenti arrostiti e dalla contaminazione dell'acqua potabile.
Degradazione:	Il benzo(ghi)terilene è un componente del petrolio greggio ed un prodotto di combustione che può essere prodotto e liberato nell'ambiente dagli incendi. Le emissioni provenienti dal raffinamento del petrolio, dalla distillazione del catrame e dalla combustione di legno, carbone, petrolio e benzina sono fonti di diffusione importanti. Il benzo(ghi)perilene biodegrada lentamente nell'ambiente. I periodi di biodegradazione nel suolo variano tra 600 a 650 giorni, non si pensa che idrolizzi nell'ambiente ed è altamente immobile in terreno. Il benzo(ghi)perilene, inoltre tende a bioconcentrare nei sistemi acquatici e può subire la fotodecomposizione diretta nell'atmosfera.

1.2.5 IPA nel suolo

Il rilascio degli IPA nell'ambiente è diffuso su vasta scala poiché questi composti sono prodotti onnipresenti della combustione incompleta di sostanze organiche.

Gli IPA sono stati individuati in una grande varietà di comparti ambientali, tra cui aria (Freeman e Cattel, 1990), suolo (Jones *et al.*, 1989), sedimenti (Youngblood e Blumer, 1975), acqua (Cerniglia e Heitkamp, 1989), olii, catrame (Nishioka *et al.*, 1986) e cibo (Lijinsky, 1991; Dipple and Bigger, 1991).

Particolarmente importante dal punto di vista ambientale è la presenza di tali inquinanti nel suolo e nei sedimenti. Infatti, poiché gli IPA sono caratterizzati da una scarsa solubilità in acqua e per la loro natura idrofobica, tendono ad accumularsi nei sedimenti a tessitura molto fine e nella sostanza organica del terreno (Meador *et al.*, 1995). I sedimenti, quindi, possono essere considerati un contenitore per l'accumulo di IPA. La loro concentrazione nei sedimenti può variare di diversi ordini di grandezza (da pochi µg/kg fino a g/kg) a seconda della vicinanza dei corsi d'acqua alle attività industriali.

Gli inquinanti rilasciati nel suolo vanno incontro a una serie di fenomeni di ripartizione tra le varie fasi presenti nel suolo stesso (gas interstiziale, particelle solide, acqua), generando di conseguenza fenomeni di migrazione e trasformazione degli inquinanti che determinano sia l'estensione spaziale e temporale della contaminazione, sia la possibilità che essi vengano in contatto con l'uomo o gli altri organismi dell'ambiente.

L'entità ed i fenomeni di trasporto e trasformazione sono in genere complessi e dipendono sia dalle proprietà chimico-fisiche delle sostanze coinvolte nell'inquinamento, sia dalle caratteristiche geologiche, idro-geologiche ed ecologiche del sito. Questi fenomeni sono particolarmente complicati nel caso di inquinanti costituiti da miscele complesse e poco idrosolubili, come i prodotti petroliferi, che costituiscono un sistema a molte fasi e molte componenti.

In generale, le sostanze inquinanti possono diffondersi dal luogo del rilascio muovendosi: a) lungo la superficie trasportati dall'acqua piovana, disciolte (o meno se sono idrofobiche) o trascinate insieme ai detriti perché adsorbite su di essi; b) verso l'atmosfera, per volatilizzazione diretta o portate dal vento con la polvere; c) verso il sottosuolo, con dinamiche complesse legate alla mobilità dell'inquinante, che è funzione della ripartizione dello stesso nelle tre fasi: solida, liquida o gassosa.

Nel suolo, quindi, le sostanze tossiche possono essere dilavate dall'acqua piovana o, se in forma fluida e permeabile con l'acqua, percolare direttamente verso il basso, spesso fino alla falda acquifera, trascinate o disciolte in essa; possono essere adsorbite sulle particelle di suolo o assorbite dalla flora e quindi trasportate ai più alti livelli della catena alimentare, fino all'uomo.

La via sotterranea è di gran lunga la più complessa, per la varietà dei fenomeni che possono avvenire nel sottosuolo sia durante il cammino verso la falda sia nel successivo trasporto nella zona satura. La via di migrazione nel sottosuolo è anche la più importante, in genere, per l'estensione spaziale che può assumere l'inquinamento quando sia trasportato da una falda mobile e per la persistenza temporale che si può verificare in molte sostanze percolate nel sottosuolo (Grillo, 2001).

Nella migrazione degli inquinanti intervengono, in generale, due tipi di fenomeni: quelli macroscopici regolati dalle leggi della dinamica dei fluidi, quali scorrimento, percolazione, adesione al terreno, capillarità, e quelli microscopici, quali fenomeni fisici di diffusione e ripartizione delle specie fra le varie fasi, regolata dagli equilibri termodinamici, quali solvatazione/precipitazione ed evaporazione/condensazione; chimico-fisici quali adsorbimento; chimici e biochimici quali le reazioni di idrolisi, ossidazione, ecc.

I principali meccanismi che regolano la migrazione sono la diffusione e l'advezione.

La diffusione è il trasferimento di molecole da una zona a più alta ad una a più bassa concentrazione, dovuto al loro movimento termico casuale. È un fenomeno importante su distanze brevi, ed è responsabile, su scala microscopica, del raggiungimento degli equilibri locali di partizione delle specie fra le varie fasi.

L'advezione, invece, è il movimento che avviene in risposta a forze macroscopiche come il potenziale idrico. Mentre la diffusione produce un movimento indipendente dei singoli componenti di una miscela, nell'advezione è l'intero fluido che si muove. L'advezione nel sottosuolo dipende dalle proprietà del fluido (in particolare viscosità, densità, tensione superficiale) e da quelle del suolo (morfologia, composizione, porosità, contenuto d'acqua, temperatura ecc.). Il movimento per advezione che avviene nella falda è responsabile della propagazione dell'inquinamento a grandi distanze.

1.3 Bonifica biologica di siti contaminati

1.3.1 Generalità

Il risanamento biologico di siti inquinati sta acquisendo un crescente interesse in quanto l'impiego di microrganismi si è rivelato vantaggioso sia da un punto di vista tecnico che economico (Šašek, 2003).

Si tratta di processi che coinvolgono la microflora indigena o microrganismi esogeni capaci di degradare e metabolizzare i composti inquinanti il suolo.

Il ruolo di maggiori responsabili della degradazione della sostanza organica spetta ai batteri in virtù della loro capacità di attacco unitamente ad una velocità di crescita superiore a quella degli altri microrganismi, i quali in ogni caso concorrono a formare con i primi un vero e proprio “consorzio” responsabile del processo di bonifica.

Questo consorzio esplica la sua attività attraverso una sequenza di fenomeni che porta ad una continua trasformazione delle molecole e della microflora presente, per cui ogni fase è diversa dalla precedente e dalla successiva.

Il principio cardine su cui si basa il processo di biorisanamento, è l'accelerazione dei processi degradativi che normalmente avverrebbero in natura. Tale accelerazione si ottiene facilmente migliorando le condizioni per lo sviluppo e la crescita dei microrganismi, quindi aumentando l'ossigenazione del suolo e la concentrazione delle sostanze limitanti la crescita.

Il biorisanamento può essere quindi definito come un insieme di tecnologie che, sfruttando la capacità dei microrganismi di degradare i contaminanti, sono capaci di accelerare i fenomeni naturali di detossificazione dell'ambiente.

1.3.2 Il micorisanamento

Il “micorisanamento”, trattamento biologico basato sull'uso di funghi (soprattutto “white rot”), è considerato di grande interesse nella bonifica di suoli contaminati da inquinanti organici.

I funghi “white-rot”, si sono dimostrati particolarmente abili nel metabolizzare e mineralizzare molti contaminanti organici, quali oli ed affini, prodotti petroliferi, clorofenoli e IPA (Alexander, 1994; Juhasz e Naidu, 2000).

I funghi filamentosi hanno inoltre delle peculiarità che li distinguono dai batteri dal punto di vista della possibile applicabilità al biorisanamento di suoli inquinati e alla rimozione dei contaminanti. Essi, infatti, hanno un’ottima capacità di penetrazione delle ife nella matrice contaminata e producono enzimi esocellulari quali laccasi, Mn-perossidasi e lignina-perossidasi in grado di raggiungere ed attaccare i composti inquinanti, anche a basse biodisponibilità. Le ossidasi che producono, inoltre, hanno bassa specificità del substrato e quindi sono capaci di ossidare (anche attraverso mediatori) un’ampia gamma di composti aromatici. Un altro aspetto che rende interessante l’impiego dei funghi filamentosi nel biorisanamento è il fatto che essi partecipano anche ai processi di umificazione del suolo. Un loro intervento nel biorisanamento può, quindi, dare avvio all’umificazione così da restituire a pieno il suolo risanato per un eventuale uso agricolo.

1.3.3 Funghi white-rot

I funghi white-rot, appartenenti generalmente al gruppo dei Basidiomiceti, colonizzano in natura il legno e preferenzialmente decompongono lignina in materiali ligneocellulosici causandone il marciume bianco, la cosiddetta carie bianca del legno. Il nome white rot deriva appunto dall’aspetto del legno attaccato da questi funghi, nel quale l’eliminazione della lignina porta ad uno scolorimento del substrato. Questi microrganismi invadono il lume delle cellule vegetali e rilasciano ossidasi esocellulari in grado di degradare la lignina. Studi di microscopia elettronica hanno dimostrato che la lignina viene degradata ad una certa distanza dalle ife fungine e viene rimossa progressivamente dal lume delle cellule verso la lamella mediana (Blanchette, 1984; Blanchette e Reid, 1986; Blanchette *et al.*, 1987).

Interessante è il fatto che l’ossidazione della lignina non produce un guadagno netto di energia, perciò la lignina non è un substrato nel metabolismo primario; piuttosto essa è degradata durante il metabolismo secondario allo scopo di aver accesso ai polisaccaridi del legno bloccati in complessi lignina-carboidrati, fornendo così una fonte di energia alla quale altri organismi non hanno accesso (Jeffries, 1990).

L'elevata resistenza alla degradazione microbica esibita dai materiali ligninocellulosici è dovuta alla presenza della lignina, una macromolecola della parete cellulare vegetale, che conferisce ai tessuti legnosi una notevole stabilità strutturale. La lignina è un etero-polimero complesso costituito da subunità a scheletro fenilpropanoidico interconnesse attraverso una grande varietà di legami eteri e carbonio-carbonio. L'estrema eterogeneità strutturale, ma soprattutto le dimensioni macromolecolari della lignina, rende questa molecola resistente alla degradazione da parte di sistemi enzimatici intracellulari. Di conseguenza, i funghi white-rot hanno sviluppato nel corso dell'evoluzione un sistema degradativo aspecifico localizzato nell'ambiente extra-cellulare basato sulla produzione e l'escrezione di un gruppo di enzimi, che sono normalmente sintetizzati in risposta ad una riduzione o ad una limitazione delle fonti azotate e/o carboniose (Tuor *et al.*, 1995) ed agiscono generando radicali liberi.

Oltre alla decomposizione della lignina, il potenziale degradativo dei funghi white rot nei confronti di vari inquinanti, sia in suolo sterile che non, è stato ben documentato (Davis *et al.*, 1993; Šašek *et al.*, 1993).

L'aspecificità degli enzimi prodotti permette a tali organismi di degradare un'ampia varietà di substrati organici fra cui numerosi composti xenobiotici. Ad esempio, composti recalcitranti come i pesticidi clorurati (Kennedy *et al.*, 1990), gli idrocarburi policiclici aromatici (Bumpus, 1989), i bifenili policlorurati e gli esplosivi a base nitro-aromatica (Fernando *et al.*, 1990) sono mineralizzati con alto grado di efficienza dai funghi white-rot. Questa estrema aspecificità degradativa rende quindi interessante l'uso potenziale di questi agenti biologici in procedure di biorisanamento. La degradazione di molecole recalcitranti da parte di questi organismi dipende dalla produzione e dall'escrezione di un gruppo di enzimi che includono ossidasi a rame (laccasi e tirosinasi), ossidasi generanti perossido di idrogeno (glucosio-ossidasi, gliossal-ossidasi e aril-alcool ossidasi) e perossidasi (ligninasi e perossidasi manganese dipendenti).

In particolare, i funghi white-rot, in base al tipo di substrato colonizzato e al tipo di enzimi ossidativi rilasciati, vengono classificati in cinque gruppi principali:

- 1) al primo gruppo appartengono quei microrganismi, tra cui *Coriolus versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Phlaeobium radiatum* (Ander *et al.*, 1980; Eriksson *et al.*, 1983), che producono la lignina perossidasi, la manganese perossidasi e la laccasi;

- 2) il secondo gruppo comprende quei microrganismi che producono sia la manganese perossidasi che la laccasi, ma non la lignina perossidasi, pur essendo dei forti

degradatori di lignina. Appartengono a questo gruppo *Dichomitus squalens*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* (Leatham *et al.*, 1985; Galliano *et al.*, 1991; Giovannozzi Sermanni *et al.*, 1994);

3) nel terzo gruppo si inseriscono quei funghi che rilasciano la lignina perossidasi in genere associata con uno degli altri due enzimi già citati, ma prevalentemente con la laccasi;

4) il quarto gruppo include quei funghi che rilasciano solo la lignina perossidasi;

5) il quinto gruppo è costituito da quelle specie fungine non ancora completamente caratterizzate, tra cui *Fomes lignotus* e *Trametes cingolata* (Tuor, 1995).

Il processo di degradazione della lignina non è operato da un singolo enzima, ma è il risultato dell'azione concertata di più enzimi, prodotti spesso da più microrganismi.

1.3.4 Enzimi ligninolitici prodotti dai funghi “white-rot”

Il corredo di funghi ligninolitici prodotti dai funghi “white-rot” consiste principalmente di perossidasi (Mn-perossidasi e lignina-perossidasi), fenolossidasi (laccasi) ed un insieme di enzimi di supporto (ossidasi che producono H₂O₂) quali, ad esempio, glucosio ossidasi e arilalcolossidasi (Fakoussa e Hofrichter, 1999).

La **lignina perossidasi** (LiP; EC 1.11.1.14, Diarilpropano, ossigeno, perossido di idrogeno ossidoreduttasi) è l'enzima ligninolitico più studiato. Fu scoperto per la prima volta nel fungo *Phanerochaete chrysosporium* (Glenn *et al.*, 1983); in seguito fu anche trovato in molti altri basidiomiceti come *Phlaeobium radiata* (Hatakka *et al.*, 1987), *Trametes* (*Coriolus*) *versicolor* (Dodson *et al.*, 1987), *Bjerkandera adusta* (Kimura *et al.*, 1991), *Nematoloma frowardii* (Hofrichter e Fritsche, 1997) e anche nell'ascomicete *Chrysonilia sitophila* (Duran *et al.*, 1987).

La LiP è una glicoproteina che contiene come gruppo prostetico un gruppo eme (ferroporfirinico IX) e richiede il perossido di idrogeno per esprimere la sua attività catalitica (Gold *et al.*, 1984; Tien e Kirk, 1984). La LiP è espressa in forme enzimatiche multiple, isoenzimi, con peso molecolare compreso tra 38 e 47 kDa e punti isoelettrici tra 3.2 e 4.7 (Hatakka, 1994).

Il ciclo catalitico della LiP consiste nell'ossidazione monoelettronica dell'enzima nativo da parte del perossido di idrogeno, con formazione di un intermedio catalitico

denominato Composto I. Questo viene, a sua volta, ridotto in Composto II, attraverso un elettrone fornito da un composto aromatico (alcol veratrilico), che conseguentemente dà origine ad un catione radicalico aromatico.

La LiP ha una bassa specificità di substrato per i composti aromatici e ossida sia strutture fenoliche che non-fenoliche, preferendo quelle metossi-sostituite, grazie al suo alto potenziale redox ($> +1.25V$) (Kersten *et al.*, 1990). I composti fenolici sono ossidati a fenossiradicali che vengono trasformati in chinoni (Odier *et al.*, 1988), i quali, a loro volta, possono anche polimerizzare (Higuchi, 1989; Odier *et al.*, 1988); i composti aromatici non fenolici sono invece ossidati a cationi radicali acrilici (Shoemaker *et al.*, 1985). La LiP è un enzima estremamente sensibile, che può essere inattivato dal suo stesso co-substrato, il perossido di idrogeno, e da sostanze fenoliche (Chung e Aust, 1995). Per questo motivo un suo utilizzo applicativo sembra essere poco praticabile.

La **manganese perossidasi** (MnP, EC 1.11.1.13., Mn(II): perossido di idrogeno ossidoreduttasi), scoperta anch'essa in *P. chrysosporium* (Kuwara *et al.*, 1984), ha un ciclo catalitico simile alla LiP. Tuttavia, al contrario della LiP, la MnP agisce preferenzialmente su substrati fenolici, utilizzando la coppia redox Mn(II)/Mn(III), come intermediario.

Diversi studi evidenziano la capacità della MnP di ossidare, sia pure con efficienza inferiore rispetto alla LiP, anche substrati non fenolici caratterizzati da un alto potenziale redox (Buswell *et al.*, 1995; D'Annibale *et al.*, 1996).

La capacità catalitica della MnP è incrementata dalla presenza di appropriati mediatori, quali tioli (Forrester *et al.*, 1988; Kapich *et al.*, 1999), acidi organici (malico, ossalico, tartarico ecc.), che agiscono da agenti chelanti del Mn(III) (Warishii *et al.*, 1992) e facilitano l'ossidazione di vari composti aromatici (Martinez *et al.*, 1996; Hofrichter *et al.*, 1998) e acidi organici (Perez e Jeffries, 1992; Hofrichter *et al.*, 1998).

Anche la MnP è un enzima extracellulare glicosilato, che contiene un gruppo eme (Glenn e Gold, 1985; Paszczyński *et al.*, 1985), ed è presente in diverse forme isoenzimiche, con pesi molecolari compresi tra 38 e 50 kDa e punti isoelettrici tra 2.9 e 7 (Fakoussa e Hofrichter, 1999). Oltre che in *P. chrysosporium* la MnP è stata anche trovata in altri funghi "white-rot" degradatori della lettiera come, ad esempio, *T. versicolor* (Johansson e Nyman, 1987), *P. radiata* (Nikku-Pavola *et al.*, 1990), *Panus Tigrinus* (Maltseva *et al.*, 1991), *Lentinula edodes* (Forrester *et al.*, 1988), *Ceriporiopsis subvermispora* (Ruttiman *et al.*, 1992), *Pleurotus ostreatus* (Becker e Sinitsyn, 1993), *Agaricus bisporus* (Bonnen *et al.*, 1994), *N. frowardii* (Schneega *et al.*, 1997), *Stropharia*

rugosoannulata (Scheibner e Hofrichter, 1998), *Clytocibula dusenii* (Ziegenhagen e Hofrichter, 2000).

Il ciclo catalitico della MnP include la forma nativa dell'enzima Fe(III), il Composto I e il Composto II (Warishii *et al.*, 1992). Il Mn(II) è richiesto come donatore di un elettrone e riduce entrambi i Composti I e II, mentre si ossida a Mn(III) (Fakoussa e Hofrichter, 1999).

Nel ciclo catalitico di quest'enzima è stata riscontrata anche la presenza di un intermedio cataliticamente inattivo (Composto III), che si genera in presenza di un eccesso di perossido di idrogeno ed è una forma irreversibile. Questo spiega la sua notevole instabilità e le sue limitazioni a un suo eventuale utilizzo applicativo (Neto e Kling, 1993; Khazaal *et al.*, 1993). Tuttavia, la capacità della MnP di intervenire nel processo di umificazione nel suolo (Hofrichter *et al.*, 1998) suggerisce il suo utilizzo in applicazioni ambientali.

La **laccasi** (EC 1.10.3.2., p-benzenediolo: O₂ ossidoreduttasi) è una fenolossidasi con una bassa specificità di substrato, ma non è in grado di ossidare substrati con un potenziale redox maggiore di 0.8-0.9 V, quali unità non fenoliche metossi-sostituite (Brown, 1967; Salas *et al.*, 1995; D'Annibale *et al.*, 1996).

La laccasi è una proteina che contiene rame e per questo è conosciuta anche come “ossidasi a rame blu” (Reinhammar e Malstrom, 1981). Questo enzima è prodotto da quasi tutti i funghi ligninolitici quali, *Trametes versicolor* (Fahaereus e Reinhammar, 1967), *P. radiata* (Kantelinen *et al.*, 1989), *Pycnoporus cinnabarinus* (Eggert *et al.*, 1995), *N.frowardii* (Hofrichter e Fritsche, 1997) e anche da molti altri funghi, come *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* (Thurston, 1994), e piante superiori, quali *Nicotiana tabacum*, *Acer pseudoplatanus* (O'Malley *et al.*, 1993).

L'esistenza di questo enzima fu dimostrata per la prima volta nel lattice di una pianta giapponese *Rhus vernicifera* (Yoshida, 1883). Recentemente, è stata osservata anche in alcuni batteri, tra cui il più studiato è *Azospirillum lipoferum* (Faure *et al.*, 1996; Alexander *et al.*, 1996), molto diffuso nel suolo. Alcune fenolossidasi con caratteristiche laccasiche sono state purificate dalle larve e dalla cuticola degli adulti di alcuni insetti, tra cui *Drosophila melanogaster* (Miessner *et al.*, 1991).

La laccasi è una proteina glicosilata, espresse in diverse forme isoenzimatiche, con pesi molecolari (59-110 kDa) e potenziali redox (0.4-0.8V) molto variabili (Xu, 1997).

Il centro catalitico della laccasi contiene, generalmente, quattro ioni rame Cu(II) (Reinhammar e Malstrom, 1981), che trasferiscono gli elettroni dal substrato all'ossigeno. La forma enzimatica attiva è generalmente un monomero, anche se sono stati osservati omodimeri e omotetrameri (Gianfreda *et al.*, 1999), che contiene quattro atomi di rame per monomero, legati a tre siti redox (tipo I, tipo II e tipo III, quest'ultimo contenente una coppia di atomi di rame saldamente legati) (Farver e Pecht, 1984).

La catalisi enzimatica della laccasi comporta l'ossidazione dei composti fenolici, tramite la sottrazione di un elettrone e la formazione di un fenossiradicale o di un radicale cationico, che può seguire vari destini:

- promuovere reazioni di depolimerizzazione (Brown, 1967; Bollag, 1992; Higuchi, 1989);
- subire reazioni non enzimatiche, come idratazioni o ripolimerizzazioni (Higuchi, 1989), dovute ad un accoppiamento ossidativo con formazione di oligomeri e polimeri (Brown, 1967; Bollag, 1992). Si pensa che questa funzione sia utile, a livello fisiologico, per allontanare composti altamente reattivi e tossici per il micelio fungino, che si formano durante il processo ligninolitico (Haars *et al.*, 1981);
- catalizzare anche reazioni di demetilazione delle unità fenoliche terminali, una funzione molto importante per un'eventuale utilizzo della laccasi in processi di delignificazione biologica della pasta di cellulosa, durante la lavorazione della carta (Reid e Paice, 1994).

Il ciclo catalitico della laccasi si pensa coinvolga tre passaggi consecutivi:

- 1) riduzione del rame di tipo I da parte di un substrato riduttore;
- 2) trasferimento degli elettroni interni dal tipo I al tipo II e al tipo III, che costituiscono un "aggregato trinucleare" (Zaitseva *et al.*, 1996);
- 3) riduzione dell'ossigeno molecolare ad acqua (Thurston, 1994).

La dipendenza della laccasi dall'ossigeno piuttosto che dal perossido di idrogeno, la sua intrinseca stabilità, nonché la capacità di utilizzare un maggior numero di substrati attraverso mediatori redox, la rende estremamente interessante dal punto di vista applicativo. Inoltre, la capacità di queste fenolossidasi di intervenire nella sintesi delle sostanze umiche del suolo (Stevenson, 1984), aumenta le sue potenziali applicazioni ambientali.

1.4 Il problema della biodisponibilità

1.4.1 Generalità

Studi sulla biodegradazione di diversi composti nel suolo hanno dimostrato che il loro basso rilascio dalla matrice del suolo alla fase acquosa è spesso il passaggio che limita il processo (Beck e Jones, 1995; Erickson *et al.*, 1993; Luthi *et al.*, 1994; Weissenfels *et al.*, 1992; Würdemann *et al.*, 1995).

Questo fenomeno si esplica come limitata biodisponibilità, termine usato con differenti significati da parte dei tossicologi. Comunque la definizione più usata è la seguente: “Un inquinante ha una biodisponibilità limitata quando il suo tasso di assorbimento da parte di un organismo è limitato da barriere fisico-chimiche tra l’inquinante e l’organismo” (Volkering *et al.*, 1998). Per capire meglio il processo che regola la biodisponibilità è necessario conoscere le interazioni tra matrice suolo, inquinante e microrganismi. Queste interazioni sono dipendenti da:

- il tipo e lo stato chimico/fisico dell’inquinante;
- il tipo e lo stato chimico/fisico del suolo;
- il tipo e lo stato del microrganismo;
- i fattori esterni come la temperatura e la presenza di nutriente e ossigeno.

Per quanto riguarda lo stato chimico/fisico dell’inquinante: il contaminante arriva nel suolo, infatti esso può essere disciolto nell’acqua che occupa i pori del suolo, assorbito o adsorbito nella particella di suolo oppure essere presente come una fase separata dal suolo, cioè essere presente in fase solida o liquida.

La biodisponibilità dipende dal tasso di diffusione, ovvero il trasporto dell’inquinante alla fase acquosa che è la chiave che regola il processo della biodisponibilità del contaminante.

Tra le possibili soluzioni tecnologiche al problema della limitata biodisponibilità degli inquinanti, una molto promettente per la mobilitazione degli stessi, è l’uso di tensioattivi chiamati surfactanti (Morris e Pritchard, 1993), espressione derivante dalla terminologia inglese “Surface Active Agents”.

La prima ricerca circa l’applicazione di surfactanti nel suolo è stata eseguita nell’industria petrolifera, usando l’azione dispersiva e superficie/attiva di tali tensioattivi; l’obiettivo era quello di aumentare il recupero di petrolio dai pozzi petroliferi tramite

lavaggio con soluzioni di tali agenti mobilizzanti. Quindi i primi studi sull'uso di questi additivi per decontaminare suoli inquinati sono stati eseguiti dall' American Petroleum Institute (1979).

Per un recupero *in situ*, altre soluzioni sono considerate, in genere, eccessivamente costose, come l'aumento della temperatura del suolo, oppure sono ancora in fase di sviluppo, come l'applicazione di tecniche acustiche e l'uso di solventi organici, ossidanti chimici, o enzimi fungini. Al contrario, per un recupero *ex situ*, l'aumento della temperatura, la riduzione meccanica degli aggregati di suolo ed il miglioramento dell'insieme delle condizioni, si prevedono come opzioni realistiche da attuare (Volkerling *et al.*, 1998).

Riguardo i contaminanti si osserva che alcune sostanze sembrano essere non-biodegradabili, ad esempio vari polimeri sintetici, sotto qualunque condizione. Molti composti, potenzialmente attaccabili dai microrganismi, non vengono in realtà distrutti. E' quindi necessario distinguere tra una molecola biodegradabile e una che, sotto particolari condizioni, non viene biodegradata. Il primo termine indica una potenzialità mentre il secondo descrive ciò che realmente accade quando si verificano una serie di condizioni.

Ci sono varie giustificazioni che si possono addurre per spiegare la non biodegradazione di una molecola: 1) La concentrazione delle sostanze tossiche può essere tanto alta che la proliferazione microbica e il metabolismo sono inibiti. 2) Uno o più nutrienti essenziali per la crescita sono ad un livello troppo basso. 3) Il substrato stesso può essere a concentrazioni troppo basse per permettere una replicazione apprezzabile degli organismi che posseggono i giusti enzimi catabolici. 4) Il substrato può trovarsi in una forma non prontamente disponibile per il microrganismo.

In particolar modo, l'ultimo punto riguarda la cosiddetta "biodisponibilità", cioè la misura in cui la sostanza che deve essere degradata si rende disponibile al microrganismo stesso. La scarsa biodisponibilità è estremamente importante poiché risulta spesso essere la causa principale della persistenza di composti che sono considerati biodegradabili. Essa può inoltre essere uno dei limiti maggiori ai tentativi di biorisanamento di siti contaminati.

La scarsa disponibilità di una molecola organica può derivare dal fatto che essa risulta ad(s)sorbita sulle particelle solide del suolo, oppure presente nei liquidi in fase non-acquosa (NAPL), o perché intrappolata nella matrice fisica del suolo e dei sedimenti.

Adsorbimento e Assorbimento

Le superfici solide in molti ambienti possono influenzare in modo drammatico l'attività dei microrganismi indigeni. Queste superfici possono alterare la disponibilità degli inquinanti organici, cambiare i livelli di vari nutrienti sia organici che inorganici, modificare il pH e i livelli di O₂, rendere gli inibitori meno tossici, deprimere l'attività di enzimi extracellulari. Le superfici attive possono essere costituite da minerali argillosi, dalla frazione organica (o sostanze umiche) del suolo o dei sedimenti, da ossidi o idrossidi amorfi di Fe e Al. Le superfici solide agiscono mediante adsorbimento, con cui si indica la ritenzione dei soluti originariamente presenti in soluzione da parte delle superfici di un materiale solido. Per assorbimento si intende, invece, la ritenzione del soluto all'interno della massa del solido piuttosto che sulle sue superfici.

Una grande varietà di composti organici vengono adsorbiti o assorbiti dai costituenti dei suoli e dei sedimenti. Alcune di queste molecole vengono adsorbite principalmente dai minerali argillosi, mentre altre si legano maggiormente o interamente alla sostanza organica. Non solo le sostanze organiche, ma anche alcuni nutrienti inorganici essenziali per la crescita dei microrganismi possono subire processi di adsorbimento.

Una serie di fattori influenzano l'adsorbimento e l'assorbimento dei composti organici. Questi fattori includono il tipo e la concentrazione dei soluti, il tipo e la quantità dei minerali argillosi, la quantità della sostanza organica nel suolo o nei sedimenti, il pH, la temperatura, e la natura del composto in questione.

L'adsorbimento può implicare forze di van der Waals, legami idrogeno, scambio ionico, o chemioadsorbimento. Le molecole di grandi dimensioni possono essere ritenute dalle superfici dei minerali argillosi per mezzo di legami idrogeno, ma per i composti organici a basso peso molecolare, critici come inquinanti, è particolarmente importante lo scambio ionico, in cui uno ione di un certo tipo in soluzione viene scambiato con uno ione di un altro tipo che si trova adsorbito. I minerali argillosi e i materiali organici colloidali hanno una carica netta negativa, e quindi tendono ad attrarre principalmente cationi. Una particella di argilla può avere ioni H, Ca, K o Mg sulla sua superficie, ma una molecola carica positivamente può sostituirsi ad uno di questi cationi adsorbiti, così da risultare adsorbita sul minerale. Poiché le sostanze umiche posseggono cariche negative, anche esse possono scambiare composti carichi positivamente. Le molecole organiche anioniche,

invece, vengono tendenzialmente repulse a causa delle cariche negative sulle superfici discusse in precedenza (Morrill *et al.*, 1982).

La frazione organica dei suoli e dei sedimenti è responsabile dell'adsorbimento di molti composti, particolarmente di quelli idrofobici. Molti idrocarburi policiclici aromatici e altri inquinanti non polari vengono adsorbiti prevalentemente dalla sostanza organica piuttosto che dai minerali argillosi. La proporzione di questa ritenzione è direttamente correlata con il coefficiente di partizione ottanolo-acqua, che viene espresso come il valore $K_{o/w}$ (una misura della idrofobicità di una sostanza), e dalla percentuale di carbonio organico nel suolo o nei sedimenti; maggiore è la quantità di sostanza organica presente nella fase solida, e maggiore sarà il numero di molecole idrofobiche adsorbite.

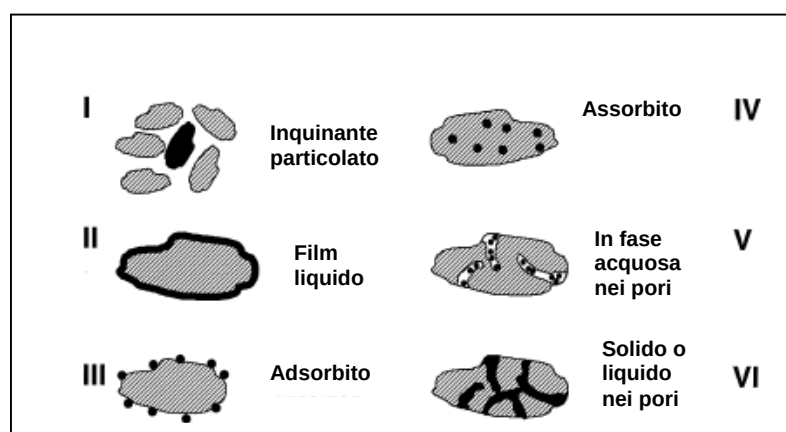


Figura 1.1 Diverse forme fisiche di inquinanti organici nel suolo: I: particelle solide; II: film liquido; III: adsorbimento esterno alle particelle di suolo; IV: adsorbimento all'interno delle particelle di suolo; V: in macropori del suolo; VI: in micropori del suolo (Volkering *et al.*, 1998).

Liquidi in fase non-acquosa e composti con bassa solubilità in acqua.

Nei siti contaminati, molti inquinanti non si trovano in fase acquosa o adsorbiti ai solidi, ma piuttosto in liquidi immiscibili con l'acqua. Come tali, la disponibilità dei contaminanti per la biodegradazione o il biorisanamento può essere drasticamente ridotta. I microrganismi del terreno possono, infatti, agire solo su sostanze che si trovano in fase acquosa. Questi liquidi in fase non-acquosa (NAPL) che contengono gli inquinanti ambientali si ritrovano in acquiferi, sottosuoli, sedimenti, suoli, nella parte superficiale della colonna d'acqua in corpi idrici marini e dolci. I NAPL generalmente contengono una serie di molecole organiche piuttosto che una sola sostanza, come avviene nel caso di uno

sversamento accidentale. Essi sono composti da molecole che hanno una bassa solubilità in acqua e un'alta solubilità nei solventi organici.

Vari sono i fattori che influenzano la biodegradazione dei singoli costituenti dei NAPL. Questi includono: (a) l'abilità intrinseca della microflora presente nel sito di trasformare i costituenti, (b) il tasso di ripartizione del costituente dal liquido non-acquoso verso la fase acquosa, (c) la viscosità del NAPL, (d) la tossicità del liquido non-acquoso, (e) l'area dell'interfaccia tra il NAPL e la fase acquosa, (f) la presenza di altri costituenti che sono degradati più velocemente dello specifico composto in esame, e (g) una concentrazione di equilibrio nella fase acquosa troppo bassa per permettere ai microrganismi di crescere.

Aging

Oltre ai processi discussi in precedenza, una molecola può presentare una ridotta biodisponibilità in funzione dal tempo. Questo processo va sotto il nome di "aging" (invecchiamento) ed è stato proposto per spiegare la differenza nelle velocità di biodegradazione tra un suolo di recente contaminazione ed un suolo storicamente contaminato (Bogan e Sullivan, 2003).

La biodisponibilità si riduce nel tempo poiché una molecola, pur rimanendo inalterata dal punto di vista chimico, può migrare nel suolo così da ritrovarsi in una o più delle seguenti categorie:

- Composti non adsorbiti che si trovano in micropori ad una certa distanza (nell'ordine dei micrometri) dalle cellule che posseggono i sistemi enzimatici adatti.
- Composti che si trovano nei nanopori. Questi ultimi hanno dimensioni di gran lunga inferiori ai micropori e le molecole che si trovano in essi sono del tutto inaccessibili a qualunque organismo.
- Sostanze chimiche che formano complessi con i materiali umici o altre sostanze per formare specie molecolari che, sebbene contengano la molecola di partenza inalterata, sono di fatto specie chimiche nuove.

I meccanismi di cui sopra rendono conto del più generale processo che va sotto il nome di "aging", mediante il quale molte sostanze inquinanti diminuiscono la loro biodisponibilità con il passare del tempo.

Un suolo che ha subito un processo di invecchiamento risulterà estremamente difficile da trattare, anche utilizzando tecniche di micorisanamento. In tali casi, uno degli

approcci che sta riscotendo particolare successo è quello di utilizzare sostanze che siano in grado di trasportare l'inquinante dalla fase organica a quella acquosa.

1.4.2 Agenti mobilizzanti

La biodisponibilità degli inquinanti, e quindi la biotrattabilità di un suolo contaminato, può essere aumentata significativamente trattando il suolo contaminato con agenti in grado di mobilizzare i contaminanti adsorbiti nella fase organica del suolo.

L'additivo deve possedere determinate caratteristiche:

- ottime capacità “mobilizzanti” verso gli inquinanti adsorbiti,
- lenta biodegradabilità nel suolo ammendato,
- assente o ridotta tossicità nel suolo,
- disponibilità su scala industriale a bassi costi (Volkering *et al.* 1998, Rouse *et al.* 1994).

In particolare negli ultimi anni sono stati saggiati:

- Tensioattivi sintetici ad esempio Triton X, Igepal (Viney e Bewley, 1990), Tween (Aronstein *et al.*, 1991; 1992) e Brij (Volkering *et al.*, 1995). Questi agenti hanno generalmente mostrato un ottimo effetto “solubilizzante” verso i contaminanti organici, soprattutto quando impiegati a concentrazioni superiori alla loro concentrazione critica di micella (CMC), ma spesso sono anche risultati recalcitranti, tossici e in grado di produrre metaboliti tossici nella matrice ammendata, nonché di inibire la crescita dei microrganismi, impedendo di conseguenza la rimozione finale dei contaminanti (Rouse *et al.*, 1994).
- Tensioattivi di origine microbica (Dohse & Lion, 1994; Rouse *et al.*, 1994). Risultati interessanti sono stati ottenuti impiegando ammendati di origine microbica, i quali, comunque, non sono ancora disponibili su scala industriale a basso costo; questo preclude attualmente il loro impiego nella bioremediation industriale di suoli contaminati (Rosemberg e Ron, 1999)
- Agenti biogeni. Recentemente il gruppo del Prof. Fava (Fava *et al.*, 2002) ha studiato l'effetto di alcuni agenti “solubilizzanti” commerciali biogeni, sostanze umiche, ciclodestrine, saponine, lecitine di soia nella bioremediation aerobica di suoli storicamente contaminati da PCB. Tutti gli additivi biogeni si sono rilevati

“mobilizzanti” molto promettenti, sia per il loro effetto stimolante sul risanamento, sia per la loro atossicità, biodegradabilità e basso costo.

L’uso di agenti mobilizzanti è stato ampiamente sperimentato nel caso di biorisanamento condotto da consorzi batterici e/o microflora indigena, soprattutto in sistemi “slurry”. In tal modo, la biodisponibilità degli inquinanti, e quindi la biotrattabilità di un suolo contaminato, è, in genere, significativamente aumentata.

1.4.3 Gli agenti mobilizzanti e la biodisponibilità degli inquinanti

La biodisponibilità di inquinanti organici idrofobici può essere aumentata dagli agenti mobilizzanti per mezzo di tre meccanismi principali:

- Emulsione di inquinanti liquidi in fase non-acquosa: gli agenti mobilizzanti possono diminuire la tensione superficiale tra fase acquosa e non acquosa. Ciò può portare alla formazione di micro-emulsioni o, con input di energia, alla formazione di macro-emulsioni; provocando un aumento di superficie di contatto, migliora così la diffusione dell’inquinante alla fase acquosa e mobilizza inquinanti liquidi assorbiti (Volkering *et al.*, 1998).
- Aumento della solubilità apparente dell’inquinante: questa pseudo-solubilizzazione è causata dalla presenza di micelle. I composti organici idrofobici si dissolvono maggiormente nel *core* della micella, mentre le molecole idrofile, come i composti mono-aromatici, possono essere presenti sia nel *core* che nel guscio delle micelle. Il trasporto “micellare” degli idrocarburi alla fase acquosa può essere molto rapido a causa delle piccole dimensioni delle micelle (Almgren *et al.*, 1979).
- Trasporto facilitato dell’inquinante: ciò deriva da diversi processi, come l’interazione delle molecole di inquinante con le singole molecole di agente mobilizzante, l’interazione dell’additivo con gli idrocarburi assorbiti, la mobilizzazione di inquinanti intrappolati nel suolo, che diminuiscono la tensione superficiale dell’acqua presente nei pori delle particelle di suolo (Deitsch e Smith, 1995; Yeom *et al.*, 1996).

Questi tre meccanismi possono provocare l’aumento di diffusione ed il loro relativo contributo dipende fortemente dallo stato fisico dell’inquinante.

Oltre che ad aumentare il tasso di diffusione, aumentando la solubilità in acqua, gli agenti mobilizzanti possono produrre un decremento delle dimensioni delle particelle precipitate dei composti organici idrofobici (Kotterman *et al.*, 1997).

L'uso di agenti mobilizzanti nella bioremediation comporta complesse relazioni tra additivo, suolo, inquinante e microrganismo. Uno schema semplificato di queste interazioni è mostrato in figura 1.2 anche se in realtà le interazioni sono più complesse a causa dell'eterogeneità del suolo.

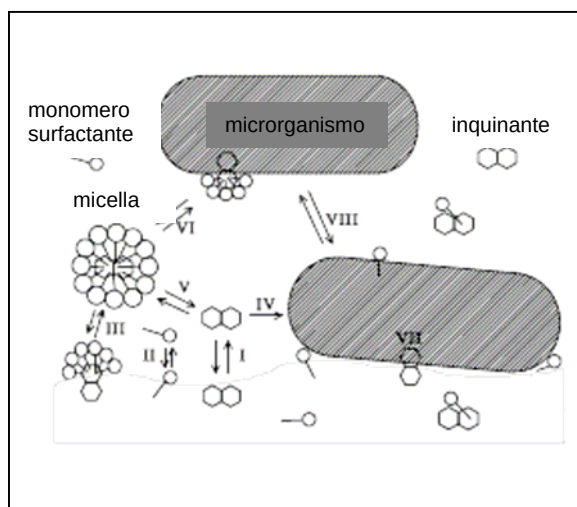


Figura 1.2 Schematica descrizione delle interazioni tra microrganismi, suolo, inquinanti e agenti mobilizzanti. I: porzione di inquinante; II: porzione di molecola di additivo all'interno del suolo; III: pseudo-solubilizzazione dell'inquinante; IV: assorbimento dell'inquinante, nella fase acquosa, dai microrganismi; V: partizione dell'inquinante tra la fase acquosa e le micelle; VI: porzione di micelle sui microrganismi; VII: assorbimento diretto dell'inquinante dalla fase solida ad opera dei microrganismi; VIII: porzione di microrganismi nel suolo (Volkering *et al.*, 1998).

Per quanto riguarda la presenza di liquidi in fase non acquosa (NAPL), gli agenti mobilizzanti, oltre a ridurre la tensione superficiale, si concentrano all'interfaccia liquido/liquido riducendo la tensione interfacciale (tensione tra un liquido polare ed uno non polare). Questo può causare la dispersione di goccioline di NAPL con la formazione di una emulsione.

In particolare tre meccanismi per l'assorbimento microbiologico di idrocarburi liquidi sono stati proposti (Bury e Miller, 1993):

- assorbimento di idrocarburi disciolti in fase acquosa;
- assorbimento diretto di idrocarburi dall'interfaccia liquido/liquido;
- assorbimento di idrocarburi "pseudo-solubilizzati".

Il primo meccanismo si realizza con composti ad alta solubilità in acqua (Goswami *et al.*, 1983); il secondo è stato descritto per substrati scarsamente solubili (Efroymson e Alexander, 1994; Prokop *et al.*, 1971; Wodzinski e Larocca, 1977); l'ultimo riguarda una pseudo solubilizzazione degli NAPLs ad opera di escrezioni microbiche (Goswami *et al.*, 1983; Reddy *et al.*, 1982). Comunque l'assorbimento è causato da uno dei tre meccanismi o da una loro combinazione anche in considerazione delle condizioni ambientali, dal tipo di organismo e di idrocarburo.

In un sistema con due fasi liquide l'aggiunta di agenti mobilizzanti può avere come conseguenze un miglioramento della dispersione e della pseudo-solubilizzazione degli NAPLs (Breuil e Kushner, 1980) e la presenza dell'agente mobilizzante all'interfaccia liquido/liquido può inibire l'attacco microbico a questa interfaccia, riducendo così il tasso di degradazione (Aiba *et al.*, 1969).

1.4.4 Surfactanti

Tra gli agenti mobilizzanti i più studiati sono i surfactanti, "surface-active agents", molecole organiche costituite da una parte idrofoba ed una idrofila. La parte idrofila rende il surfactante solubile in acqua mentre quella idrofoba determina la sua concentrazione all'interfaccia di fase. La presenza di molecole di surfactante all'interfaccia di fase causa la riduzione della tensione superficiale della soluzione. Un importante parametro che descrive le proprietà fisiche dei surfactanti è il bilancio idrofilico/lipofilo (HLB), che è determinato dalla relazione tra la parte idrofila e quella idrofoba della molecola di surfactante (Hyers, 1991); il valore HLB aumenta con la sua idrofobicità.

Quindi i surfactanti aiutano a disperdere gli oli, aumentano la superficie utile per la crescita batterica, aiutano a separare i batteri dalle goccioline di olio dopo l'utilizzo e, quindi, favoriscono l'esaurimento dell'idrocarburo.

Un'altra caratteristica dei surfactanti è la formazione di micelle, piccoli aggregati di molecole di surfactanti. A basse concentrazioni nella fase acquosa sono presenti singole molecole di surfactanti. Al di sopra di una determinata concentrazione, detta "critical micelle concentration" (CMC), le molecole di surfactanti si aggregano insieme, formando aggregati di 20-200 molecole. La CMC dipende dalla temperatura ed è differente per ogni surfactante; alla temperatura del suolo, l'intervallo della CMC è 0,1-10 mM. Il tipo e le

dimensioni degli aggregati dipendono dalla struttura del surfactante e dal pH della soluzione (Cantor e Schimmel, 1980).

Più semplicemente le micelle possono essere schematicamente rappresentate da una piccola goccia (2-4 μm) costituita da un cuore idrofobo e un guscio idrofilo (Miller e Bartha, 1989). La presenza di micelle aumenta la solubilità apparente dei composti organici idrofobici (HOC), questo fenomeno è detto solubilizzazione (Volkerling *et al.* 1998).

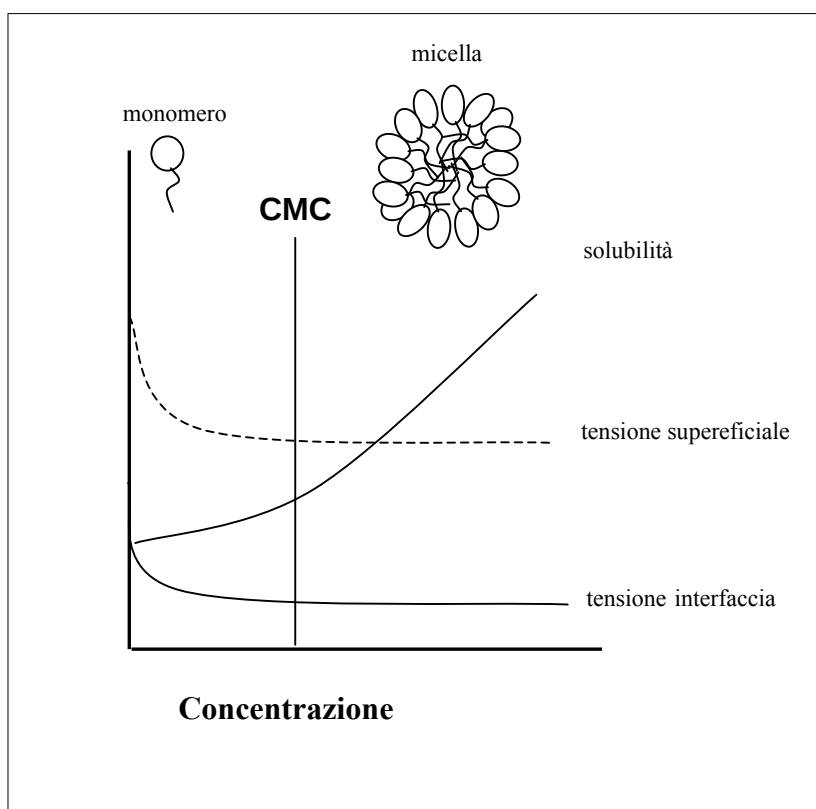


Figura 1.3 Diagramma schematico della variazione della tensione superficiale, interfacciale e della solubilità del contaminante con la concentrazione del surfactante. (Mulligan *et al.*, 2001).

La concentrazione di molecole di surfactanti sulla superficie solida porta ad una riduzione della tensione superficiale, che può aumentare il contatto tra fase acquosa e solida.

I surfactanti più efficienti sono quelli che hanno una bassa CMC in quanto è necessario meno surfactante per diminuire la tensione superficiale.

Ad alte concentrazioni i surfactanti inducono la formazione di singoli (emimicelle) o doppi strati (admicelle) di molecole di surfactanti intorno alle superfici (figura 1.4). La concentrazione alla quale avviene il secondo fenomeno è chiamata “critical admicelle concentration” e di solito è più bassa della CMC (West e Harwell, 1992; Nayyar *et al.*, 1994).

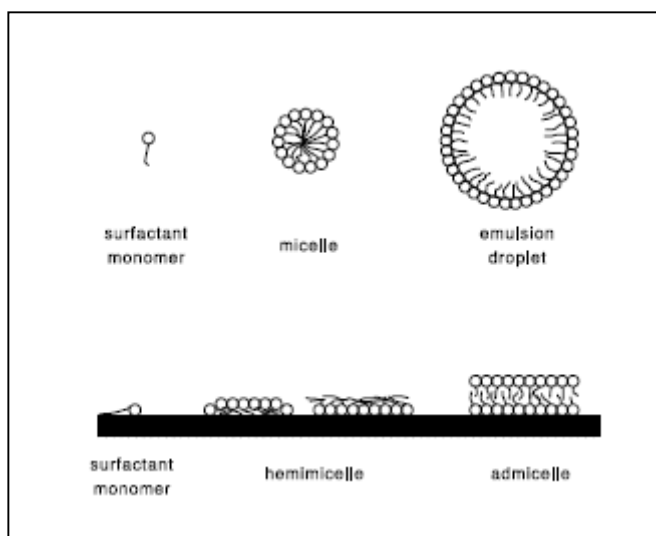


Figura 1.4 Rappresentazione schematica di differenti forme di surfactanti nel suolo (adattato da West e Harwell, 1992).

A seconda della natura del gruppo idrofilo, possiamo distinguere quattro tipi di surfactanti: anionici, cationici, zwitterionici e non ionici. I surfactanti possono essere prodotti chimicamente (surfactanti sintetici) o biologicamente (biosurfactanti). I gruppi idrofobi più comuni dei surfactanti sintetici sono paraffine, olefine, alchilbenzeni, alchilfenoli e alcoli; i gruppi idrofili sono generalmente gruppi solfato, solforato o carbossilato (surfactanti anionici), ammonio quaternario (surfactanti cationici), poliossietilene o polipeptide (surfactanti non-ionici). La maggiore classe di biosurfactanti include glicolipidi, fosfolipidi, acidi grassi, lipopeptidi/lipoproteine e surfactanti biopolimerici.

I surfattanti prodotti su larga scala hanno numerose applicazioni; ad esempio, sono utilizzati nell'industria alimentare, farmaceutica e cosmetica. come additivi, emulsificanti, schiumanti e disperdenti, Il mercato attuale di surfattanti è di circa nove miliardi di dollari per anno e la loro richiesta è prevista in aumento ad un tasso del 35% nei prossimi anni (Dati CNR <http://www.ist.me.cnr.it/sabie/progetto.htm>)

Quasi tutti i surfattanti attualmente commercializzati sono derivati chimici del petrolio. Tuttavia, la risposta all'aggiunta di surfattanti in scala di laboratorio e, ancora di più, ambientale è difficilmente prevedibile. Un crescente interesse è orientato alla ricerca di surfattanti di origine microbica (biosurfattanti) di agenti biogeni che si diversificano strutturalmente e risultano essere molto meno pericolosi nei confronti degli ecosistemi naturali. Gli agenti mobilizzanti hanno applicazioni potenziali nella protezione ambientale, nel recupero di ambienti contaminati da idrocarburi (figura 1.5), nella sanitizzazione degli ambienti di lavoro e nelle industrie di trattamento degli alimenti.

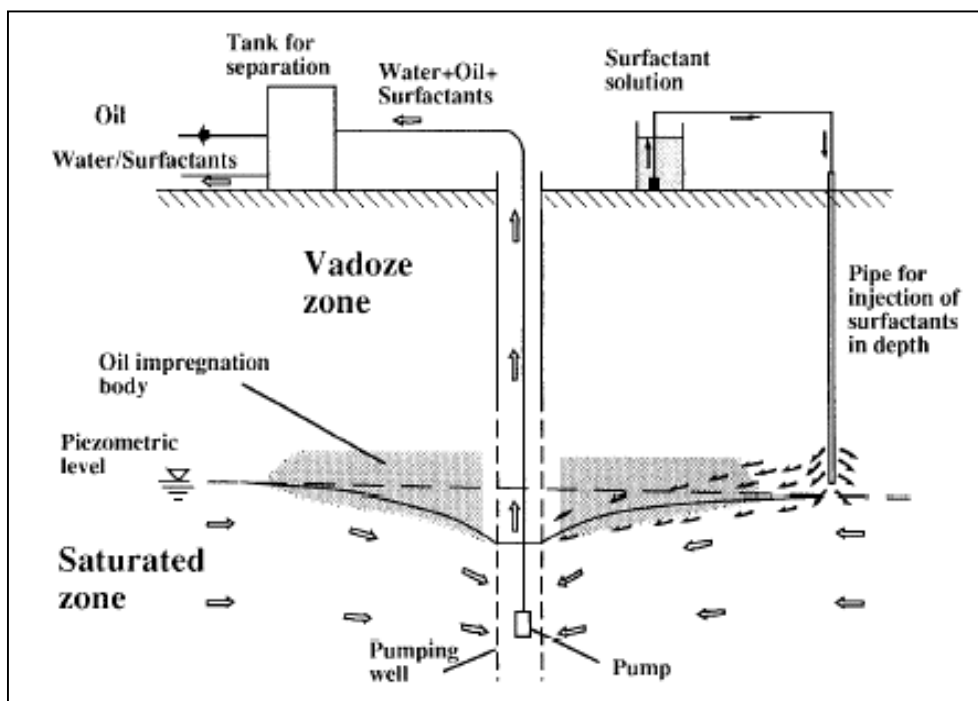


Figura 1.5 Schema sperimentale per l'iniezione di surfattanti in profondità per il recupero ambientale di un suolo contaminato da idrocarburi (Bettahar, 1999).

1.4.5 Surfactanti non-ionici

La serie di surfactanti Tween (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80) è costituita da surfactanti non-ionici, caratterizzati dall'avere come gruppo idrofilo poliossietilene o polipeptide, hanno un valore di HLB simile ma hanno differenti porzioni idrofobiche e trovano numerose applicazioni in vari campi.

Le caratteristiche fondamentali sono riportate nella tabella 1.2, mentre le relative strutture chimiche sono riportate in figura 1.6.

Tabella 1.2 Caratteristiche principali dei Tween (Kim *et al.*, 2005)

Nome commerciale	Tween 20^a	Tween 40^a	Tween 60^a	Tween 80^a
Nome chimico	Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate	Polyoxyethylene (20) sorbitan monopalmitate	Polyoxyethylene (20) sorbitan monostealeate	Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate
Peso molecolare	1227,5	1283,6	1311,7	1309,7
Densità	1,11	1,10	1,07	1,06
CMC^b	0,05	0,04	0,02	0,04
HLB^c	16,7	15,6	14,9	15,0
Tipo	Non-ionico	Non-ionico	Non-ionico	Non-ionico
Fase	Liquido	Liquido	Gel	Liquido

a Dati da MSDS (Material Safety Data Sheets).

b CMC: concentrazione critica micellare (mM).

c HLB: bilancio idrofilico/lipofilo.

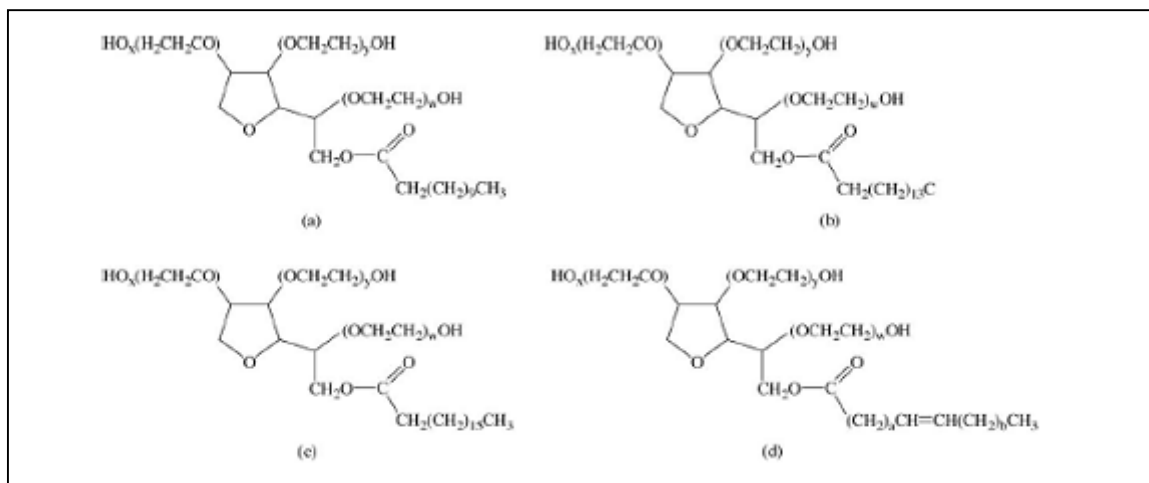


Figura 1.6 Struttura chimica dei surfactanti Tween: (a) polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate, (b) polyoxyethylene (20) sorbitan monopalmitate, (c) polyoxyethylene (20) sorbitan monostealeate and (d) polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (Kim *et al.*, 2005).

Per essere efficienti, questi surfactanti devono essere assorbiti in una adeguata quantità ed orientazione.

Tween 20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate) ha 12 atomi di carbonio nella porzione idrofobica chiamata “laurate”.

Tween 40 (polyoxyethylene sorbitan monopalmitate) ha 16 atomi di carbonio nella porzione idrofobica chiamata “palmitate”.

Tween 60 (polyoxyethylene sorbitan monostealeate) e Tween 80 (polyoxyethylene sorbitan monooleate) hanno 18 atomi di carbonio nella porzione idrofobica chiamata rispettivamente “stearate” ed “oleate” e variano per la loro saturazione organica.

In modo particolare il Tween 80 è ampiamente utilizzato come additivo nell’industria alimentare e farmaceutica come agente emulsionante, disperdente o stabilizzante (Budavavi *et al.*, 1996); produce emulsioni di tessitura fine, buona stabilità e resistenza ai cambiamenti di pH (Spalton, 1964).

1.4.6 Biosurfactanti

I biosurfactanti sono surfactanti prodotti extracellularmente o sono parte di membrana cellulare di batteri, lieviti e funghi. Vengono prodotti da vari tipi di substrato come zuccheri, oli, alcani e wastes (Lin, 1996).

Includono classi di strutture molecolari abbastanza differenti dai surfactanti sintetici, con varie strutture chimiche come semplici acidi grassi (saponi) o complessi glicolipidi, lipopeptidi, lipopolisaccaridi e fosfolipidi. La maggior parte di questi composti sono anionici o neutri, solo pochi sono cationici come quelli contenenti gruppi amminici (Mulligan *et al.*, 2001). La parte idrofobica costituita da una lunga catena di acidi grassi, mentre la porzione idrofilica può essere un carboidrato, un amminoacido, un peptide ciclico, un fosfato, un acido carbossilico o un alcool. Un'ampia varietà di microrganismi può produrre questi composti.

Tra i vantaggi dei biosurfactanti rispetto ai surfactanti sintetici troviamo l'alta specificità, la bassa tossicità, l'alta biodegradabilità e la migliore compatibilità ambientale (Mulligan *et al.*, 2001) oltre, ovviamente, l'abilità ad essere sintetizzati da una fonte rinnovabile.

I biosurfactanti sono stati saggiati per aumentare il recupero di petrolio e per il trasporto di petrolio grezzo (Hayes *et al.*, 1986) ed è stata dimostrata la loro effettiva capacità di ridurre la tensione interfacciale di petrolio ed acqua, la viscosità dell'olio, la rimozione dell'acqua dall'emulsione prima del processo, ed il rilascio di bitume da sabbie ricche di catrame.

Le proprietà fisico-chimiche caratteristiche di questi composti sono la bassa tensione interfacciale, la bassa CMC e la stabilità termica.

I biosurfactanti vengono divisi in due grandi gruppi: quelli a basso peso molecolare e quelli ad alto peso molecolare. Questi ultimi sono meno efficienti nel ridurre la tensione interfacciale, ma sono efficienti nel rivestire la goccioline di petrolio prevenendone la fusione. Inoltre i biosurfactanti ad alto peso molecolare presentano una persistenza prolungata dovuta alla loro bassa solubilità, che aumenta il loro assorbimento sulle superfici e limita la loro disponibilità alla degradazione microbica. Sono eteropolisaccaridi i cui componenti attivi sono lipidi e proteine ed esplicano la loro azione come biodispersanti, prevenendo la fusione di goccioline di olio in acqua.

Invece i biosurfactanti a basso peso molecolare, dotati di bassa concentrazione critica micellare (CMC), aumentando la solubilità apparente degli idrocarburi tramite la

loro incorporazione nelle cavità idrofobiche delle micelle, diminuiscono la tensione interfacciale tra olio ed acqua.

Concludendo i biosurfactanti possono aumentare la crescita microbica su substrati legati con il loro desorbimento dalla superficie o tramite l'aumento della loro solubilità apparente in acqua. Inoltre si è constatato che l'aggiunta di questi particolari agenti mobilizzanti è vantaggiosa quando la crescita microbica è bassa (ad esempio a bassa temperatura o in presenza di alte concentrazioni di inquinanti) o quando gli inquinanti sono costituiti da componenti difficili da degradare, come gli IPA.

1.4.7 Lipidi

Studi *in vitro* hanno dimostrato che la perossidazione lipidica, catalizzata da enzimi fungini, è molto importante per l'ossidazione degli IPA; l'uso di oli vegetali per solubilizzare gli IPA è stata dimostrata a livelli simili dei surfactanti sintetici (Grimberg *et al.*, 1995, Kleven, 1950; Pannu *et al.*, 2004); inoltre, l'utilizzo di olio vegetale è stato sperimentato per velocizzare la crescita di alcuni funghi (Dijkstra *et al.*, 1972; Wardle e Schisler, 1969).

L'olio vegetale può essere separato in due frazioni, la insaponificabile e i gliceridi; ciò si realizza attraverso la saponificazione, nella quale i gliceridi diventano sapone o sali di acidi grassi e glicerolo. La frazione insaponificabile, che contiene steroli, è estratta con dietiletere.

Ad esempio l'olio di soia contiene un grande numero di saponine che sono state dimostrate inibire la crescita di alcuni funghi (Olsen, 1971; Pedersen *et al.*, 1966; Zentmyer e Thompson, 1967), ma è anche noto che gli steroli, sia vegetali che animali, precipitano le saponine invertendo l'azione inibitrice di queste ultime (Gestetner *et al.*, 1971).

Una fonte di olio a basso costo è rappresentata dalle acque di vegetazione, prodotto di scarto dell'industria olearia; il quantitativo di olio nelle acque di vegetazione può variare fino all'1%. La loro composizione chimica, infatti, presenta un'elevata variabilità dipendente dalle condizioni climatiche, geografiche e pedologiche del terreno dove si trova l'oliveto, dalla varietà delle olive, dall'impiego e dal tipo di fertilizzanti, dal grado di maturazione e conservazione delle drupe, dall'età della pianta e dal sistema di estrazione

dell'olio. Mediamente le AV contengono l'83% di acqua, il 15% di sostanza secca ed il 2% di Sali minerali (Amat di San Filippo *et al.*, 1986).

Fra i componenti organici contenuti nelle AV prevalgono quantitativamente i carboidrati; sono presenti sia zuccheri semplici, come glucosio, fruttosio e xilosio sia polisaccaridi, come la cellulosa e le pectine derivate dalla polpa di olive e costituenti i solidi totali in sospensione. Grazie anche alla presenza di questi composti carboniosi, fonte di energia e di carbonio per i funghi, le AV possono essere potenzialmente utilizzate come additivi nella mycoremediation. Si è, inoltre, rilevata la presenza di acidi organici (acetico, tartarico, glicemico, lattico e malico), i quali rendono il pH delle AV leggermente acido (pH=4,9-6,5) (Montedoro *et al.*, 1986).

1.4.8 Ciclodestrine

Le ciclodestrine sono oligosaccaridi ciclici, costituiti da unità di glucosio, con una superficie esterna idrofilica ed una cavità centrale lipofilica, e sono prodotte dalla degradazione enzimatica dell'amido da parte dei batteri. Hanno una cavità a bassa polarità dentro la quale componenti organiche con una appropriata dimensione e guscio possono formare inclusioni di complessi (Szejtli, 1982). Questa proprietà conferisce alle ciclodestrine la capacità di aumentare la solubilità apparente di inquinanti idrofobici organici (Wang e Brusseau, 1993; Gao *et al.*, 1998), per questo motivo vengono utilizzate per aumentare il contatto tra inquinante idrofobico e la microflora degradativi in fase acquosa (Wang *et al.*, 1998; Bardi *et al.*, 2000; Fava *et al.*, 2002).

Più precisamente le ciclodestrine sono oligosaccaridi ciclici costituite da sei (α -ciclodestrine), sette (β -ciclodestrine), otto (γ -ciclodestrine) o più unità di glucopirano legate con legami α -(1,4).

Mentre l'altezza della cavità delle ciclodestrine è la stessa per tutti i tipi, il numero di unità di glucosio determina il diametro interno della cavità ed il suo volume. Basandosi sulle dimensioni, le α -ciclodestrine tipicamente possono complessare molecole a basso peso molecolare o composti con catene alifatiche, le β -ciclodestrine possono formare complessi con composti aromatici ed eterociclici e le γ -ciclodestrine possono ospitare molte molecole come macrocicliche e steroidi.

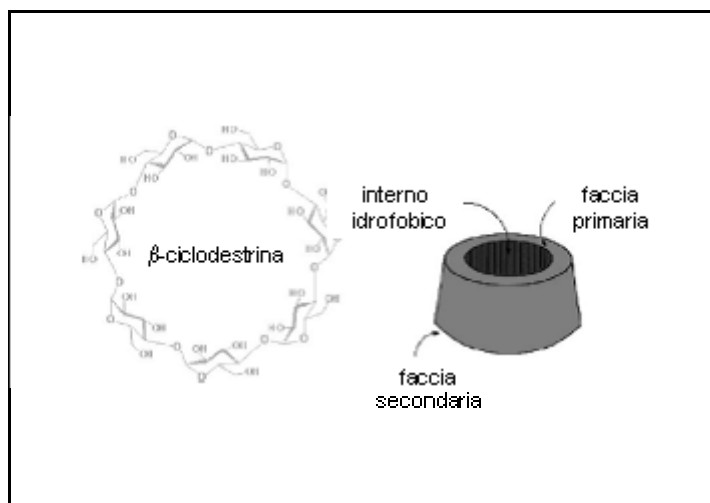


Figura 1.6 Struttura chimica di una β -ciclodestrina (Martin del Valle, 2004).

Il grande interesse scientifico per le ciclodestrine dipende dalla loro abilità a formare inclusioni di complessi con diversi composti il cui risultato è una molecola idrofilica nella parte esterna, che può dissolvere in acqua, ed una cavità apolare, con una matrice idrofobica, descritta come un microambiente eterogeneo. Come risultato di questa cavità, le ciclodestrine possono formare inclusioni di complessi con un'ampia varietà di molecole ospiti idrofobiche.

Le β -ciclodestrine sono le più accessibili, le meno costose e generalmente le più usate. Le β -ciclodestrine non hanno mostrato tossicità nei confronti dei microrganismi, hanno buona biodegradabilità e rispetto ai surfactanti sono meno inclini a formare emulsioni.

Una miscela di α -CD metilate, denominata RAMEB, prodotta industrialmente ha mostrato eccellenti proprietà “mobilizzanti” nei confronti di un'ampia gamma di molecole (Fava *et al.*, 2002, 2003). L'effetto delle RAMEB è attribuito in particolare al loro impatto sulle proprietà delle superfici ed alla porosità del suolo (Jozefaciuk *et al.*, 2003).

2 SCOPO DEL LAVORO

Il problema della bonifica dei siti contaminati da idrocarburi sta assumendo sempre maggiore rilevanza nei paesi industrializzati. Molte sono le tecniche di bonifica che permettono di affrontare situazioni anche molto complesse, la contaminazione di suoli da idrocarburi policiclici aromatici (IPA) rappresenta uno degli scenari più ricorrenti (Pannu *et al.*, 2004). Gli IPA sono considerati degli inquinanti prioritari in virtù della loro ubiquità e delle loro proprietà tossiche, mutagene e cancerogene.

Nel biorisanamento di un suolo contaminato da idrocarburi policiclici aromatici il problema della ridotta biodisponibilità è di fondamentale importanza. Molti tentativi di biorisanamento hanno avuto scarso successo proprio a causa delle difficoltà che i microrganismi hanno nel raggiungere il contaminante adsorbito in fase organica (Marquez-Rocha *et al.*, 2000).

L'uso di funghi nel trattamento di suoli contaminati (micorisanamento) da idrocarburi policiclici aromatici (IPA) è considerato di grande potenziale interesse. I funghi white-rot, in particolare, producono ossidasi esocellulari in grado di raggiungere composti inquinanti a bassa biodisponibilità e caratterizzati da bassa specificità di substrato e, quindi, da ampio spettro degradativo. Per questo motivo i funghi filamentosi si sono dimostrati più efficienti dei batteri nella degradazione di contaminanti scarsamente solubili in fase acquosa come gli IPA (Kotterman *et al.*, 1998). Tuttavia, l'efficacia dei trattamenti di micorisanamento di suoli contaminati da IPA è fortemente condizionata dalla recalcitranza di questi composti all'attacco biologico e dal loro basso grado di biodisponibilità, dovuta alla loro alta idrofobicità e conseguente adsorbimento nella fase organica del suolo (Tiehm *et al.*, 1994).

Negli ultimi anni sono stati tentati diversi approcci per favorire il desorbimento dei contaminati nel suolo; tra i più promettenti risulta essere l'impiego di agenti mobilizzanti, ampiamente sperimentato nel caso di biorisanamento condotto da consorzi batterici e/o microflora indigena, soprattutto in sistemi "slurry". In tal modo, la biodisponibilità degli inquinanti, e quindi la biotrattabilità di un suolo contaminato, è in genere significativamente aumentata. Tuttavia, l'impiego di agenti "mobilizzanti" nel micorisanamento è stato fino ad oggi poco investigato.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare comparativamente l'effetto di diversi agenti mobilizzanti sulle prestazioni degradative di quattro ceppi fungini, *Irpex lacteus* (FR.:FR.) FR., 617/93, *Pleurotus ostreatus* (JACQ.:FR.) KUMM., 300, *Allescheriella sp.* (DABAC 2B) e *Phlebia sp.* (DABAC 9), su un suolo contaminato “ad hoc”, per simulare una contaminazione recente, con una miscela di IPA costituita da antracene, fenantrene, fluorantene, pirene, crisene, benzo[a]pirene e benzo[k]fluorantene. Sono stati selezionati 5 differenti agenti mobilizzanti: olio di soia, Tween 20, Tween 80, β -ciclodestrine commerciali metilate a random (RAMEB) e acque di vegetazione di frantoi oleari. I risultati ottenuti su suolo contaminato “ad hoc” sono stati successivamente comparati con quelli ottenuti sullo stesso suolo sottoposto ad “aging” e su due suoli storicamente contaminati. I due suoli, uno proveniente da un antico gasometro della compagnia Ceca ČPP Transgas di Praga, l'altro da uno stabilimento per il trattamento del legno in Sobeslav, nella Repubblica Ceca, differivano sia per la concentrazione totale di idrocarburi policiclici aromatici (2320 e 612 mg IPA/kg) sia per la relativa quantità di frazione non biodisponibile (4,0 e 32%, rispettivamente).

3 MATERIALI E METODI

3.1 Suoli

Nel presente lavoro di tesi sono stati utilizzati: un suolo modello contaminato in laboratorio con concentrazioni note di idrocarburi policiclici aromatici, per simulare un inquinamento recente, lo stesso suolo sottoposto ad aging e due suoli storicamente contaminati.

3.1.1 Suolo modello

Il suolo di riferimento, utilizzato per la contaminazione in laboratorio, è stato prelevato da uno strato superficiale (0-30 cm) di un terreno ad uso agricolo biologico (Pian di Ciliano, Soriano del Cimino, Viterbo). Il campione, dopo setacciatura di 2 mm, è stato essiccato all'aria e conservato a 2 °C, in modo da consentirne la stabilizzazione e da ridurre al minimo lo stress da campionamento (Nannipieri *et al.*, 1990).

Si procedeva, quindi, alla determinazione di pH, umidità, capacità di ritenzione idrica, punto di appassimento, tessitura, contenuto di carbonio organico.

Il pH reale e l'acidità potenziale del suolo sono stati misurati utilizzando un elettrodo a membrana di vetro, dopo aver agitato il terreno umido con acqua o con KCl 1N, rispettivamente (rapporto 1:2,5 p/v).

L'umidità relativa è stata valutata ponendo una quantità nota di campione in stufa a 105 °C per 24 h; dalla differenza fra la misura gravimetrica del campione prima e dopo essiccazione, è stata determinata l'umidità percentuale del campione rispetto al peso secco: $(\text{peso umido} - \text{peso secco}) \cdot 100 / \text{peso umido}$.

La capacità di ritenzione idrica ed il punto di appassimento sono stati calcolati mediante Piastra di Richards, operando nel seguente modo: il terreno è stato saturato con acqua distillata per 24 ore; una parte di questo campione è stata utilizzata per determinare la capacità idrica di campo, con piastra per basse pressioni posta ad una pressione di 0,3 bar, valore medio per terreni franchi; un'altra parte è stata posta in piastra per alte pressioni

a 15 bar per determinare il punto di appassimento. I risultati sono contenuti nella tabella 3.1.

La determinazione analitica della tessitura è stata effettuata secondo le metodiche ufficiali della società internazionale di scienze del suolo (ISSS), utilizzando il levigatore di Andreasen (metodo per setacciatura ad umido o metodo “alla pipetta”). Il terreno, secondo il triangolo tessiturale della società internazionale di scienze del suolo (ISSS), era classificato come sabbioso-limoso; il contenuto in sabbia, limo, argilla è riportato nella tabella 3.1.

Il C organico è stato determinato per ossidazione con bicromato (metodo Springer-Klee). Il C organico è stato ossidato ad anidride carbonica con soluzione di potassio bicromato in presenza di acido solforico, in condizioni standardizzate. La quantità di potassio bicromato che non ha reagito è stata determinata per titolazione con una soluzione di solfato ferroso ammonico. Il punto finale della titolazione è stato determinato con l'aggiunta di un opportuno indicatore di ossidoriduzione.

Reagenti:

- soluzione di bicromato di potassio 0,25 N;
- H_2SO_4 concentrato;
- soluzione 0,2 N di sale di Mohr (solfato ferroso ammonico, $FeSO_4 \cdot (NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$) contenente 25 ml di acido solforico concentrato per litro. (La soluzione non è stabile e deve essere preparata di frequente. In ogni caso il titolo della soluzione deve essere controllato per ogni serie di analisi);
- indicatore: o-fenantrolina-ferroso-solfato.

Procedimento: 500 mg del campione secco all'aria e macinato sono stati trasferiti in provette dotate di refrigerante a ricadere miscelati, nell'ordine, con 20 ml della soluzione di bicromato, 20 ml di acido solforico concentrato. Parallelamente è stata effettuata una prova in bianco. Le provette sono state fatte bollire per 2 ore a 160 °C, in un incubatore ad alta temperatura modello ECO 6 con programma automatico (Velp Scientifica s.r.l. Milano). Al termine dell'incubazione, sono stati aggiunti 45 ml di acqua distillata e 3-4 gocce di indicatore. E' stato retrolitolato l'eccesso di bicromato con la soluzione di solfato ferroso ammonico (viraggio dal verde all'arancio).

Per il calcolo viene utilizzata l'espressione:

$$TOC (g/kg) = [(V_b - V_a)/1000] \cdot (M_{Fe(II)}/6) \cdot 12 \cdot (1000/m)$$

dove:

TOC = contenuto di carbonio organico totale, espresso in g/kg

3/2 = rapporto molare della reazione di ossidoriduzione (2 moli di potassio bicromato reagiscono con 3 moli di C)

Vb = volume della soluzione di ferro (II) solfato utilizzato nella titolazione della prova in bianco, espresso in millilitri

Va = volume della soluzione di ferro (II) solfato utilizzato nella titolazione della soluzione del campione, espresso in millilitri

MFe(II) = molarità effettiva della soluzione di ferro (II) solfato

12 = peso atomico del carbonio, espresso in g·mole⁻¹

6 = numero di elettroni

m = massa del campione, espressa in grammi

da cui: $TOC (\%) = [(Vb-Va)/m] \cdot NFe(II) \cdot 0,3$

Tabella 3.1 Caratteristiche chimico fisiche del suolo di riferimento

Umidità relativa (%)	4,47
PH	reale 6,4
	Potenziale 5,1
	Sabbia (%) 64,63
Tessitura	limo (%) 22,9
	Argilla (%) 12,47
Capacità di Ritenzione Idrica (%)	25,48
Punto di appassimento (%)	12,52
Carbonio Organico (g/kg)	15

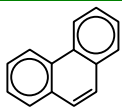
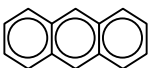
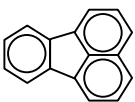
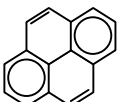
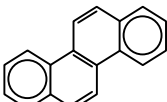
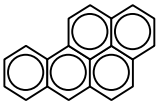
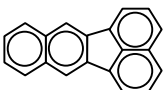
3.1.2 Contaminazione del suolo modello

Un volume di 260 µl di una soluzione in Acetone (BDH analitic grade) contenente 400 µg di ognuno dei 7 idrocarburi policiclici aromatici selezionati per la contaminazione del suolo modello (fenantrene, antracene, fluorantene, pirene, crisene, benzo[α]pirene, benzo(k)fluorantene, tabella 3.2) è stato sparso su 2 g di sabbia di silice sterile ed asciutta

(J.T. Baker sea sand), contenuti in una vial. La soluzione è stata aggiunta in 7 step ad intervalli di 30 min e lasciata essiccare all'aria 24 ore per favorire l'assorbimento dei contaminanti e l'evaporazione dell'acetone. La sabbia è stata quindi mescolata con 6 grammi del suolo di riferimento, ottenendo una contaminazione di idrocarburi policiclici totale di 350 mg/kg.

Gli standard utilizzati, antracene (99%, W/W) fenantrene (98%), fluorantene (99%), pirene (98%), crisene (98%), benzo[α]pirene (96%), benzo[k]fluorantene (99%), sono stati forniti da Fluka (USA).

Tabella 3.2 Proprietà chimico fisiche degli idrocarburi policiclici aromatici utilizzati per la contaminazione del suolo di riferimento.

IPA	Formula bruta	Struttura Chimica	Peso molecolare	Solubilità in acqua (mg/l)	Potenziale di ionizzazione (eV)
Fenantrene	C ₁₄ H ₁₀		178,2	1,29	7,91
Antracene	C ₁₄ H ₁₀		178,2	0,07	7,43
Fluorantene	C ₁₆ H ₁₀		202,3	0,26	7,95
Pirene	C ₁₆ H ₁₀		202,3	0,14	7,43
Crisene	C ₁₈ H ₁₂		228,3	0,002	7,59
Benzo[α]pirene	C ₂₀ H ₁₂		252,3	0,0038	7,12
Benzo[k]fluorantene	C ₂₀ H ₁₂		252,3	0,0008	7,48

3.1.3 Aging

Il suolo dopo la contaminazione è stato sottoposto ad aging conservando la matrice a 2 °C per un anno, in modo da consentirne la stabilizzazione e ridurre al minimo lo stress da campionamento (Nannipieri *et al.*, 1990).

3.1.4 Suoli storicamente contaminati

I due suoli storicamente contaminati provenivano da siti nella Repubblica Ceca. Il suolo S1, proveniente da un antico gasometro della compagnia Ceca ČPP Transgas di Praga e fornito da DEKONTA a.s., aveva una concentrazione totale di IPA pari a 2526 mg/kg e una frazione biodisponibile del 4%. Il suolo S2, proveniva da uno stabilimento per il trattamento del legno in Sobeslav, e differiva dal suolo S1 sia per la concentrazione totale di idrocarburi policiclici aromatici, 612 mg/kg, sia per la relativa quantità di frazione non biodisponibile, 32%.

I terreni, dopo setacciatura di 2 mm, sono stati essiccati all'aria e conservati a 2 °C, in modo da consentirne la stabilizzazione e di ridurre al minimo lo stress da campionamento (Nannipieri *et al.*, 1990).

Le analisi dei contaminanti, svolte dal laboratorio di Micologia Sperimentale dell'Istituto di Microbiologia dell'Accademia delle Scienze della Repubblica Ceca, Praga, rilevavano una forte contaminazione da composti aromatici (Tabella 3.3).

Tabella 3.3 Idrocarburi policiclici organici presenti nel suolo proveniente dal sito della compagnia Ceca ČPP Transgas di Praga

Inquinante	SUOLO S1		SUOLO S2	
	Concentrazione (mg/kg)	Deviazione standard	Concentrazione (mg/kg)	Deviazione standard
Fenantrene	958	33,0	75,5	5,9
Antracene	34	1,4	40,5	5,8
Fluorantene	789	3,6	193,7	14,7
Pirene	404	6,3	150,9	12,1
Benzo[a]antracene	20	2,3	52,4	4,0
Crisene	24	3,3	42,6	4,3
Benzo[b]fluorantene	18	1	19,3	3,1
Benzo[k]fluorantene	16	2,9	10,5	0,4
Benzo[a]pirene	26	0,5	14,3	1,9
Dibenzo[a]antracene	2	0,1	1,2	0,0
Benzo[ghi]terilene	12	0,4	4,9	0,9
Indeno-pirene	17	1,7	6,6	1,1

3.2 Carica microbica del suolo

La carica microbica del suolo contaminato è stata determinata utilizzando i seguenti terreni agarizzati:

Terreno 1 per la conta di lieviti e funghi filamentosi costituito da (g/l):

- Rose Bengal Agar (Biolife) 16,0;
- Cloramfenicolo 0,1 (in soluzione alcolica);
- Streptomicina solfato 0,55 (in soluzione acquosa).

Terreno 2 per la conta di batteri costituito da (g/l)

- Plate Count Agar 17,5;
- Cicloheximide 0,5 (in soluzione acquosa).

Dopo aver sterilizzato in autoclave il terreno agarizzato a 121 °C per 15 min, e dopo averlo termostatato in bagno maria a 50 °C, sono stati aggiunti gli antibiotici precedentemente sterilizzati per filtrazione.

La sospensione del suolo in esame è stata preparata miscelando 1,0 g (peso secco) di suolo con 99 ml di acqua sterile ed agitando la sospensione per 30 min mediante agitatore magnetico. Successivamente sono state eseguite diluizioni scalari, diluendo 1 ml della sospensione precedente in 9 ml di acqua sterile; sono stati poi utilizzati 0,1 ml di ogni diluizione per inoculare, tramite spatolamento superficiale, le piastre. Dopo aver incubato le piastre a 28 °C per 2-5 giorni è stata effettuata la conta vitale dei lieviti e funghi filamentosi (terreno 1) e dei batteri (terreno 2).

3.3 Microrganismi utilizzati

Sono stati utilizzati quattro ceppi fungini: *Irpex lacteus* (FR.:FR.) FR., 617/93, *Pleurotus ostreatus* (JACQ.:FR.) KUMM., 300, provenienti dalla collezione di Basidiomiceti dell'Istituto di Microbiologia dell'Accademia delle Scienze della Repubblica Ceca, *Allescheriella* sp. (DABAC 2B) e *Phlebia* sp. (DABAC 9), precedentemente isolati da un suolo storicamente contaminato del sito ACNA (Cengio, SV). Durante lo studio i ceppi sono stati mantenuti su Potato Destrose Agar (PDA) a 4 °C e ripassati ogni mese.

3.4 Prove di biorisanamento

3.4.1 Capacità di colonizzazione del suolo

La capacità di colonizzazione della matrice da parte dei due ceppi è stata valutata utilizzando dei test tube contenenti tre differenti tipi di substrato di crescita, costituito da materiale lignocellulosico sterile: stocchi di mais macinati in modo fine, stocchi di mais macinati in modo grossolano e tutoli di mais (5g per ognuno), portati al 75% di umidità finale, inoculati con 5 ml di precoltura liquida e il suolo di riferimento (20g) a 3 diverse umidità (10%, 15%, 20%), poiché i funghi white rot colonizzano bene il suolo a queste percentuali di umidità (Boyle 1995). Sono stati testati due differenti modelli di trattamento

(ponendo il suolo sullo strato superiore o inferiore rispetto al substrato colonizzato, Figura 3.1) per determinare le condizioni di colonizzazione e di crescita ottimali. I tubi sono stati incubati a 28 °C per 21 giorni e la crescita delle ife è stata monitorata e documentata attraverso fotografie.

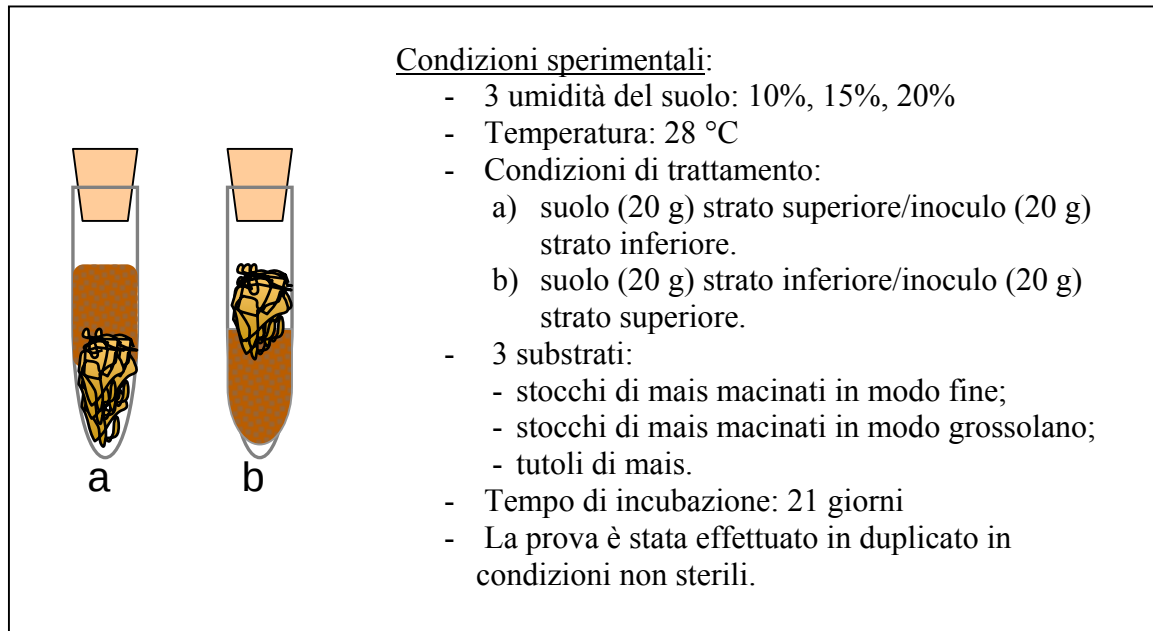


Figura 3.1 Schema sperimentale per le prove di colonizzazione del suolo

3.4.2 Preparazione del preinoculo

Le sospensioni in acqua deionizzata sterile sono state ottenute a partire da colture su PDA incubate per 10 giorni a 28 °C.

La biomassa miceliare necessaria a fornire l'inoculo per le prove è stata prodotta in coltura agitata a partire da ogni sospensione, utilizzando il seguente terreno di pre-coltura: glucosio 5% (p/v), estratto di lievito, 0,5% (p/v). Ove necessario, il micelio è stato omogeneizzato con Ultra Turrax Mixer (Ika-Merk). La precoltura è stata condotta in beute Erlenmeyer da 500 ml (contenenti 100 ml di terreno), incubate a 28 °C in shaker orbitale (B. Braun, Biotech. International) sotto agitazione costante di 180 rpm, per 96 h.

3.4.3 Biotrattamento

Dopo omogeneizzazione con Ultraturax le precolture sono state lavate con acqua sterile e la sospensione miceliare (5 ml con una concentrazione di biomassa di circa 10 g/l) è stata utilizzata come inoculo per gli stocchi di mais sterili (5 g) contenuti in beute Erlenmeyer da 250 ml. In base all'umidità residua degli stocchi e al volume di inoculo, è stata calcolata l'umidità totale ed è stata aggiunta acqua così da avere un'umidità ad inizio prova del 75% (p/p). I ceppi sono stati incubati a 28 °C per 15 giorni. Quindi sono stati aggiunti 20 g (peso secco) di suolo (precedentemente trattato con agenti mobilizzanti) (Figura 3.2). La durata del trattamento è stata di 6 settimane.

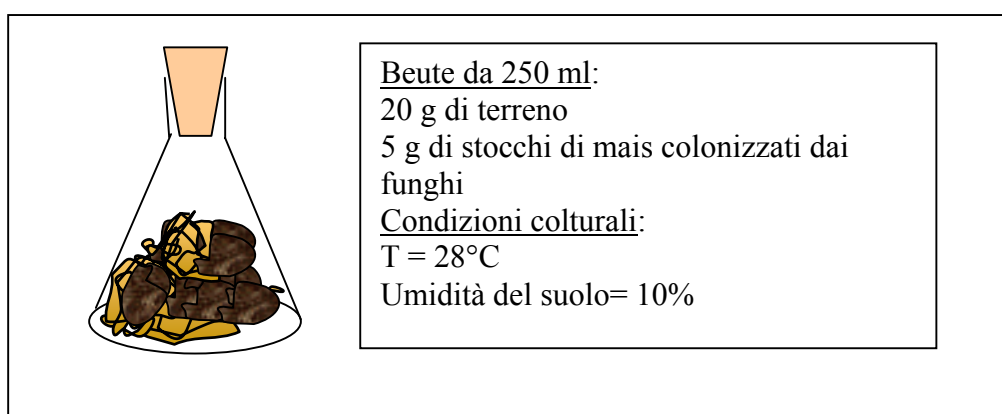


Figura 3.2 Schema comune delle diverse prove di biotratamento del suolo contaminato

3.4.4 Pretrattamento del suolo con agenti mobilizzanti

Prima del biotratamento il suolo contaminato è stato trattato con 5 differenti agenti mobilizzanti: olio di soia, Tween 20, Tween 80, una miscela commerciale a basso costo di ciclodestrine metilate (RAMEB, Randomly Methylated β -Cyclodextrins), acque di vegetazione provenienti da frantoi oleari (pH 5,46 e contenenti (g/l): zuccheri, 28,17; fenoli, 7,44; COD, 87,3). Nel caso dell'olio di soia, del Tween 20 e del Tween 80, il suolo è stato pretrattato con un'emulsione (5%) di acqua:agente mobilizzante (1:1). Le acque di vegetazione sono state aggiunte al 25% per raggiungere una concentrazione finale di olio di circa il 2,5%. Le ciclodestrine, disciolte in acqua deionizzata, sono state addizionate al suolo alla concentrazione del 1% (Fava *et al.*, 2002). Il suolo ammendato è stato mantenuto 6 giorni a 4 °C e l'umidità corretta al 10%.

3.4.5 Prove di tossicità degli agenti mobilizzanti

La tossicità degli agenti mobilizzanti nei confronti dei funghi è stata valutata utilizzando piastre di PDA (potato dextrose agar) contenenti gli agenti mobilizzanti, olio di soia, Tween 20, Tween 80, acque di vegetazione, ciclodestrine a 3 concentrazioni (Garon *et al.*, 2002). 0,1 ml delle precolture liquide (con una concentrazione di biomassa di circa 10 g/l) sono stati posti al centro delle piastre di PDA. Le piastre sono state incubate a 28 °C per 7 giorni. L'inibizione della crescita è stata determinata in base al confronto con le piastre senza agenti mobilizzanti.

3.5 Metodi analitici

3.5.1 Determinazione delle attività enzimatiche

Il contenuto proteico e le attività enzimatiche (laccasi, Mn-perossidasi, lignino-perossidasi, arilalcol-ossidasi, tirosinasi) dei suoli trattati sono stati determinati mediante saggi spettrofotometrici (D'Annibale *et al.*, 1998) su estratti acquosi ottenuti come descritto da Criquet *et al.* (1999).

Il tampone di estrazione era costituito da: 100 ml di tampone acetato 0,1 M; 3 g di polivinilpolipirrolidone; 0,1 ml di TWEEN 80; 1,47 g di CaCl₂. I campioni sono stati estratti in beute da 100 ml aggiungendo ad ogni beuta 3 g di suolo e 30 ml di tampone di estrazione (rapporto 1:10 p/v). Le beute sono state chiuse con del parafilm, coperte con carta di alluminio e tenute in agitazione orbitale in ghiaccio per un'ora a 150 rpm. Il campione è stato in seguito centrifugato in falcon sterili a 8000 rpm per 20 min alla temperatura di 4 °C. Dopo aver filtrato il surnatante su carta Whatman N.41, è stato misurato il volume finale del filtrato con un cilindro e quindi è stata eseguita una ultrafiltrazione in cella AMICON provvista di membrana in polisulfone (DIAFLO PM 10, cut-off 10 KDa). Sono stati quindi recuperati 1000 µl del retentato e sono stati trasferiti in eppendorf.

I saggi enzimatici sono stati effettuati sui surnatanti ottenuti dalla centrifugazione dei campioni (14000 rpm, 5 min).

L'attività laccasica è stata determinata spettrofotometricamente utilizzando come substrato il 2,6 dimetossifenolo (DMOP, $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{OH}$) (Slomczynski *et al.*, 1995). La miscela di reazione (1 ml) conteneva 950 μl di DMOP 5 mM, sciolto in tampone Walpole 0,1 M, a pH 4 e 50 μl di enzima. L'ossidazione del DMOP a 3,5,3',5'-tetrametossidifenochinone (cerulignone) è stata seguita a 35 °C, in cinetica, attraverso l'incremento di assorbanza a 477 nm ($\epsilon_{477} = 14600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

L'attività perossidasi, manganese dipendente, è stata determinata secondo il metodo di Waarishi *et al.* (1992). Alla miscela di reazione (1 ml), contenente 0,5 mM di MnSO_4 (16,9 mg in 10 ml), tampone malonato (50 mM) tamponato con soda, a pH 4,5 e 6 μl di enzima, è stato aggiunto perossido d'idrogeno (75 μM). La formazione del complesso chelato Mn(III)-malonato a 35 °C, è stata seguita cineticamente a 270 nm ($\epsilon_{270} = 11590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

L'attività lignino-perossidasi è stata dosata spettrofotometricamente misurando l'ossidazione del veratril alcol a veratrilaldeide (3,4-dimetossibenzaldeide). La miscela di reazione (1 ml) conteneva 2 μM di veratril alcol (3,4-dimetossibenzilalcol) in tampone tartrato 50 mM pH 3,0 e volumi appropriati di campione. La reazione è stata avviata mediante aggiunta di perossido di idrogeno (0,4 mM).

L'attività enzimatica dell'arilalcol-ossidasi è stata seguita misurando nel tempo l'incremento di assorbanza a 310 nm ($\epsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) dovuta alla formazione nel tempo della veratrilaldeide a 30 °C. La miscela di reazione (1 ml) conteneva 2 mM di veratril alcol in tampone fosfato 80 mM pH 6 e volumi appropriati di campione.

L'attività monofenolasica è stata accertata misurando la formazione del complesso tra il benzochinone che si forma e il MBTH a 492 nm ($\epsilon_{492} = 31300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La miscela di reazione (1,1 ml) conteneva 0,06 mM di 4-idrossianisolo e 0,2 mM di 3-metil-2-benzotiazolinone-idrazone, in tampone buffer acetato 50 mM pH 5,0 e volumi appropriati di campione.

La determinazione degli zuccheri riducenti è stata effettuata in accordo con Robit *et al.* (1968) (modificando il Metodo Nelson). L'attività di polisaccaridasi è stata determinata, come descritto da Hope and Burns, utilizzando CMC 1% (carbossimetil cellulosa) a pH 5 come substrato per la determinazione dell' endo-1,4- β -glucanasi; AVICEL ® 0,5% a pH 5 per la determinazione delle β -esoglucanasi; e xilano 0,25% a pH 5 per la determinazione delle endo-1,4-beta-xilanasi.

In tutti i saggi enzimatici, l'attività enzimatica è stata misurata in Unità Internazionali (UI), e definita come la quantità di enzima che catalizza la formazione di 1 μ M di prodotto nell'unità di tempo nelle condizioni di dosaggio impiegate.

3.5.2 Determinazione delle proteine totali

Per la determinazione delle proteine totali è stato utilizzato il metodo proposto da Bradford (1976).

Reagenti usati:

-Reattivo Coomassie Brilliant Blue G (Biorad, USA).

Procedimento: a 30 μ l di campione opportunamente diluito sono stati aggiunti 1,5 ml di reagente (il reattivo di Coomassie veniva diluito 1:5); dopo avere agitato si è lasciato incubare per 5 minuti e si è letto l'assorbimento a 595 nm contro il bianco (30 μ l di acqua e 1,5 ml di reagente).

Costruzione della retta di taratura: è stata preparata una soluzione madre sciogliendo 0,01 g di albumina da siero bovino (BSA) in 10 ml di acqua deionizzata e si è eseguita una serie di diluizioni scalari operando nel range 0,2-0,9 mg/ml.

3.5.3 Determinazione dell'ergosterolo

La determinazione dell'ergosterolo è stata effettuata secondo il metodo di Davis e Lamar (1992). Un campione di 2,5 g di suolo è stato estratto con 10 ml di una miscela esano/metanolo 1:4 per 16 ore sotto agitazione orbitale (150 rpm). L'estratto è stato quindi filtrato sotto vuoto ed il filtro lavato con 10 ml di MeOH ed esano. Sono stati aggiunti 2,25 g di KOH ed è stata effettuata una saponificazione a 70 °C per 1 ora. Dopo il raffreddamento sono stati aggiunti 4 ml di acqua deionizzata e si è agitato vigorosamente per far chiarificare la fase organica. Prelevata la fase organica, la fase acquosa è stata nuovamente estratta con 5 ml di esano. Le fasi organiche sono state portate quindi a secco in Rotavapor a 35 °C ed il residuo è stato risospeso in metanolo a 60 °C (1 ml). La determinazione dell'ergosterolo è stata effettuata come riportato da Novotny *et al.* mediante analisi RP-HPLC a 282 nm in isocratica (MeOH:H₂O) 90:10, Ultra Gradient

HPLC grado di purezza minima 99,8% (BDH). E' stata utilizzata una colonna Lichrospher 100 RP-8 (5µm) in Lichrocart 125-4 (Merck).

3.5.4 Analisi dei contaminanti

I vari campioni di suolo sono stati sottoposti ad estrazione mediante Soxhlet dotato di refrigeranti a bolle. Aliquote di 4 g di ciascun campione sono state estratte, per 12 h, con 200 ml di estraente (esano:acetone, 3:1 v/v), assicurando la minima temperatura di ebollizione; l'estratto è stato quindi portato a secco allontanando il solvente per distillazione a pressione ridotta (evaporazione rotante Buchi).

Per le analisi HPLC è stata utilizzata una pompa Waters 1525 ed un rilevatore di assorbanza Waters 2487. Gli estratti secchi dei vari campioni sono stati analizzati con una colonna Envirosep-PP (Phenomenex), dimensioni 125 x 3,2 mm, flusso costante 0,5 ml/min, con eluzione a gradiente (riportata in tabella 3.4): A: acqua MilliQ grade , B: acetonitrile, Ultra Gradient HPLC grado di purezza minima 99,8% (BDH) .

Tabella 3.4 Analisi HPLC IPA (EPA 610)

Colonna	EnviroSep –PP		
Dimensioni	125 · 3.2 mm		
Flusso	0,5 ml min		
Fase mobile	A: Acqua (%)	B: Acetonitrile (%)	Tempo (min)
	50	50	0.00
	48	52	2.00
	48	52	8.00
	30	70	20.00
	30	70	27.00
	0	100	36.00
	0	100	40.00
Rilevazione	UV 254 nm		

3.5.5 Determinazione della frazione biodisponibile

La frazione biodisponibile nei suoli non pretrattati con additivi è stata stimata attraverso l'estrazione fluida supercritica sequenziale (Cajthaml and Sasek, 2005) utilizzando un estrattore Prep Master (Suprex, USA) dotato di un restrittore VaryFlow che operava a 40 °C e un flusso di biossido di carbonio.

Un grammo di campione è stato estratto a 50 °C alla pressione di 300 bar. Ogni estrazione è stata condotta in triplicato ed i composti estratti sono stati raccolti dopo 5, 10, 20, 40, 60, 80, 120, 160 and 200 minuti. Il valore della frazione F è stato calcolato con Prism versione 4.0 (GraphPad, USA).

3.6 Prove ecotossicologiche

3.6.1 Test di mortalità

La tossicità del suolo trattato con i due ceppi fungini e del controllo di incubazione è stata valutata con il test di mortalità del collembolo (ISO 11268-1,-2) *Folsomia Candida* (Willem), eseguito nel seguente modo: 20 g di suolo sono stati posti in un contenitore di vetro da 50 ml, umidificati con l'aggiunta di 5 ml di acqua distillata e inoculati con collemboli di 10 giorni. I contenitori sono stati chiusi con parafilm con dei fori e posti al buio, a temperatura ambiente, per 14 giorni.

L'effetto tossico è stato determinato calcolando la percentuale di mortalità dei collemboli sia nel controllo di incubazione che nel suolo biottrattato con le due specie fungine (D'Annibale *et al.*, 2005).

3.6.2 Prova di inibizione dell'allungamento dell'apparato radicale

Questa prova valuta la fitotossicità del suolo attraverso la verifica dell'effetto di prodotti fitotossici sulla germinazione dei semi (ISO 11269-1,-2). Il saggio prende in considerazione la germinazione e l'accrescimento radicale dei semi di *Lepidium sativum* L. (crescione inglese), pianta particolarmente sensibile alla presenza di fattori fitotossici, dopo

un periodo di incubazione di 24 h in germinatoio a 25 °C al buio. Il test di germinazione è stato effettuato per ogni campione su 6 repliche, con 35 semi di *Lepidium sativum* posti in piastre Petri (60 × 10 mm) contenenti 5 g di suolo, coperto da dischi di carta Whatman No. 1, e 8 ml di acqua distillata. Dopo l'incubazione sono stati contati i semi germinati ed è stata misurata la lunghezza del loro apparato radicale. Si è determinato l'indice di germinazione I_g come germinabilità per la lunghezza radicale dei semi germinati rispetto al controllo (Barbero *et al.*, 2001) secondo l'equazione:

$$I_g = (G_s L_s) / (G_c L_c)$$

dove G_s e L_s sono rispettivamente la germinabilità e la lunghezza radicale del campione; G_c e L_c sono i corrispettivi valori per il controllo con acqua distillata (metodo UNI 10780, 1998).

3.7 Analisi statistiche

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante lo studio della varianza (ANOVA). La comparazione multipla delle coppie di dati è stata eseguita, quando necessario, con il test di Tukey. Entrambe le procedure sono state effettuate utilizzando il software specifico Sigma Stat (Jandel Corp., San Rafael, CA, USA).

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

Questo studio si inquadra nell'ambito della problematica del risanamento di suoli contaminati da IPA mediante il micorisanamento, detto anche "bioaugmentation" fungina o "mycoremediation". Questo approccio si sostanzia nell'apporto di inoculi costituiti da microrganismi reperiti da collezioni colturali o isolati dalla matrice contaminata stessa o da matrici omologhe (Atagana, 2004; Garon *et al.*, 2004). In questo quadro, la ricerca si è decisamente orientata negli ultimi due decenni su alcune specie fungine, afferenti in particolare al raggruppamento ecologico dei funghi basidiomiceti agenti di carie bianca (white-rot) (Field *et al.*, 1993; Pointing, 2001). L'impiego di questi funghi è stato proposto come valida alternativa all'uso di batteri in quanto si è rivelato efficace nel trattamento di suoli contaminati da un'ampia gamma di sostanze di origine antropogenica (Pointing, 2001; Šašek, 2003). Grazie alla produzione di enzimi ligninolitici a bassa specificità di substrato, i funghi white-rot sono in grado di degradare e metabolizzare composti recalcitranti scarsamente biodisponibili e/o molecole caratterizzate da una notevole eterogeneità e complessità strutturale. L'ampia competenza catalitica di questi enzimi riflette l'eterogeneità strutturale della lignina alla cui degradazione essi sono preposti (Field *et al.*, 1993; Tuor *et al.*, 1995). Altra caratteristica peculiare di questi funghi è la crescita ifale che permette una buona colonizzazione della matrice suolo ed un efficiente sistema di penetrazione nei pori del suolo stesso.

Numerosi lavori riguardanti l'utilizzo di funghi "white-rot" nella biodegradazione di IPA sono attualmente disponibili nella letteratura scientifica (Bogan *et al.*, 1999; Boyle *et al.*, 1998; Resnick e Gibson, 1996; Garon *et al.*, 2002). Tuttavia, la maggior parte di essi è stata realizzata in fase "slurry", cioè in condizioni sperimentali difficilmente applicabili direttamente "in situ". Al contrario, si registra tuttora una scarsità di dati disponibili relativamente all'utilizzo di queste specie direttamente su suoli contaminati e in condizioni di umidità vicine o leggermente superiori alla capacità di campo. Alcuni studi hanno, inoltre, messo in evidenza i limiti connessi all'uso di specie alloctone e hanno portato all'elaborazione di schemi di risanamento basati su specie autoctone (Van der Gast *et al.*, 2003; Atagana, 2004; Potin *et al.*, 2004; Garon *et al.*, 2004; D'Annibale *et al.*, 2006). La pressione selettiva a cui queste specie sono sottoposte ha, infatti, indotto a pensare che queste possano avere acquisito la capacità di degradare i contaminanti presenti nella

matrice da cui essi sono stati isolati (Garon *et al.*, 2004). Tuttavia, spesso questa pressione selettiva può semplicemente tradursi nello sviluppo di meccanismi di tolleranza e, quindi, non implica necessariamente l'acquisizione della capacità degradativa sulle molecole target presenti nel sito stesso.

Come emerge dalla letteratura sull'argomento, uno dei problemi fondamentali è quello costituito dalla riduzione della biodisponibilità delle sostanze da degradare, dovuta ad un incremento delle interazioni che con il tempo vengono ad instaurarsi con i colloidi del suolo ("aging") (Allard *et al.*, 2000). La bassa biodisponibilità che caratterizza gli IPA su suolo è uno dei maggiori ostacoli che si frappongono ad una loro efficace degradazione biologica (Manilal e Alexander, 1991; Weissenfiels *et al.*, 1992; Volkerling *et al.*, 1992). Di conseguenza, è della massima importanza adottare delle soluzioni finalizzate ad un incremento della loro biodisponibilità.

Uno degli approcci più comunemente usati a questo scopo comporta l'impiego di diversi agenti mobilizzanti (Garon *et al.*, 2000; Thibault *et al.*, 1996; Morris e Pritchard, 1993).

Lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di valutare l'efficacia di alcuni agenti mobilizzanti nel favorire il biorisanamento operato da quattro differenti ceppi fungini su un suolo contaminato "ad hoc" in laboratorio, su un suolo contaminato ad hoc in laboratorio e sottoposto ad aging e su due suoli proveniente da siti storicamente contaminati al fine di verificare se l'effetto "aging" potesse dar luogo a significative differenze nelle prestazioni degradative dei funghi.

4.1 Prove preliminari e impostazione sperimentale

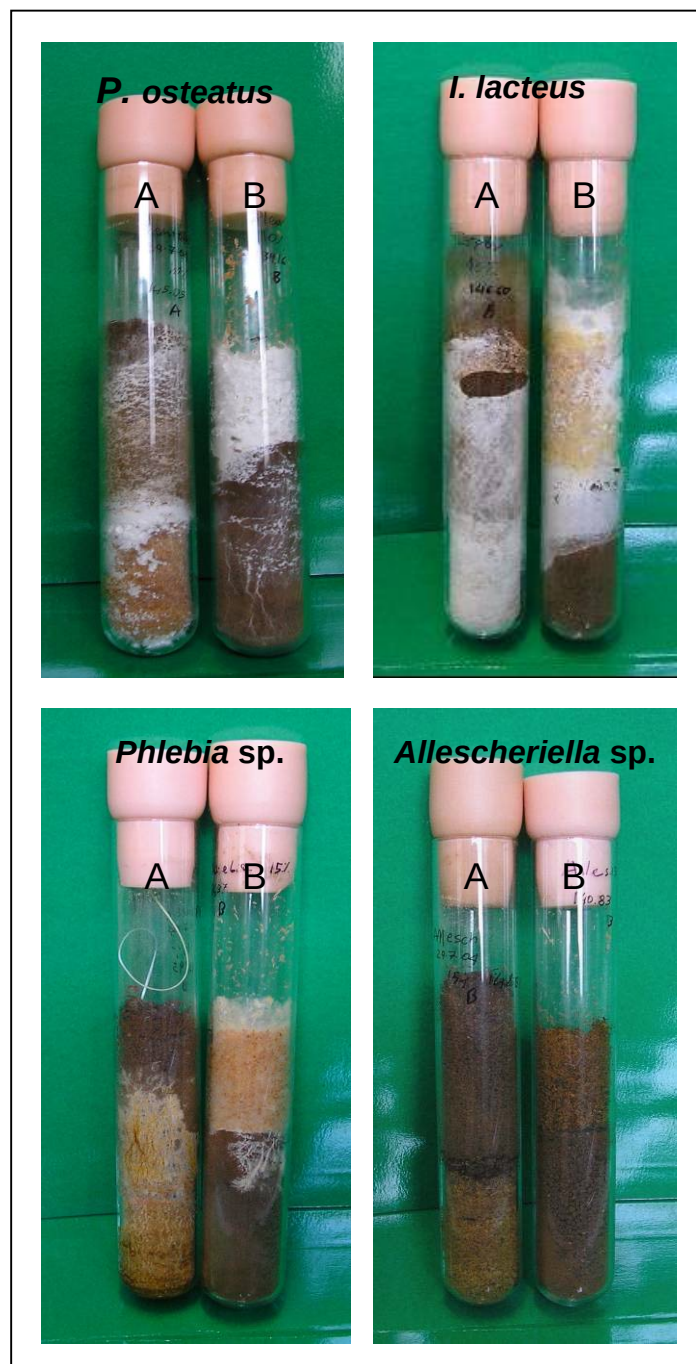
I quattro ceppi fungini utilizzati in questo studio sono stati, *Irpex lacteus* (FR.:FR.) FR. 617/93, *Pleurotus ostreatus* (JACQ.:FR.) KUMM., 3004, *Allescheriella sp.* (DABAC 2B) e *Phlebia sp.* (DABAC 9). La scelta dei primi due ceppi è fondata sulla base di una serie di criteri tecnici tra i quali la loro capacità di colonizzare rapidamente il suolo in presenza di additivi e di competere validamente con la microflora autoctona, un'attiva produzione di enzimi ligninolitici nonché una provata attitudine degradativa nei confronti degli IPA (Eggen e Sveum, 1999; Šašek *et al.*, 1998). Gli altri due ceppi fungini utilizzati in questo studio sono stati precedentemente isolati da una matrice storicamente

contaminata e caratterizzata dalla presenza di IPA, quali antracene e fenantrene, e di alcuni derivati chetonici (9,10-antracene dione; 7-H-benz[DE]-antracen-7-one (D'Annibale *et al.*, 2006). I due ceppi sono stati successivamente, selezionati sulla base di una serie di criteri, quali la capacità di degradare il colorante polimerico a base antrachinonica Poly R-478 e la capacità di produrre enzimi extracellulari coinvolti nella degradazione di molecole aromatiche (D'Annibale *et al.*, 2006). In particolare, la scelta del primo criterio è motivata dall'elevata correlazione dimostrata tra la capacità di decolorare il Poly R-478 e quella di degradare gli IPA da parte di numerose specie fungine (Field *et al.*, 1993; Novotny *et al.*, 2003). Il primo isolato, *Phlebia* sp. DABAC 9, è un basidiomicete appartenente al raggruppamento dei white-rot, mentre il secondo isolato, *Allescheriella* DABAC 1, costituisce l'anamorfo del genere *Botryobasidium* (Arora and Sandhu, 1985; Ananda and Sridhar, 2002).

Prima di effettuare le prove di biorisanamento sui suoli contaminati, si è proceduto alla valutazione della crescita ifale dei quattro ceppi fungini su suolo non contaminato in assenza di agenti mobilizzanti e in condizioni simili a quelle successivamente impiegate nelle prove di risanamento. Sono stati sottoposti ad indagine tre diversi tipi di materiale lignocellulosico (stocchi di mais macinati in modo fine, stocchi di mais macinati in modo grossolano, tutoli di mais), colonizzati dal fungo per 3 settimane e posti in contatto con il suolo a tre diverse umidità (10%, 15%, 20%). La velocità di estensione ifale, sulla fase suolo, è stata seguita nel tempo.

Tale indagine preliminare ha confermato la notevole velocità di colonizzazione di *P. ostreatus* e *I. lacteus* ed è emerso che stocchi di mais macinati in modo grossolano costituiscono un ottimo substrato di crescita. L'aggiunta del materiale lignocellulosico ha il duplice scopo di fornire una fonte di carbonio utilizzabile preferenzialmente dai funghi "white-rot", così da favorirne la crescita, e di indurre la sintesi di ossidasi generalmente coinvolte nell'attacco della lignina (Morgan *et al.*, 1993; Childress *et al.*, 2004; Lang *et al.*, 1993). L'estensione ifale maggiore è osservata su suolo con umidità del 10%. In Figura 4.1 è mostrata l'estensione ifale su suolo dei ceppi selezionati dopo 21 giorni di incubazione a 28 °C.

Figura 4.1 Colonizzazione del suolo modello da parte dei quattro ceppi fungini in due diverse condizioni sperimentali: A) suolo (strato superiore)/materiale lignocellulosico colonizzato (strato inferiore) B) materiale lignocellulosico colonizzato (strato superiore)/suolo (strato inferiore).



Per quanto riguarda la scelta degli agenti mobilizzanti, sono stati selezionati due surfactanti sintetici della serie dei Tween (Tween 20 e Tween 80), olio di soia, acque di vegetazione provenienti da frantoi oleari e una miscela commerciale a basso costo di β -ciclodestrine metilate (RAMEB). Queste ultime sono molto interessanti poiché rispondono a molti dei requisiti richiesti a tali tipi di agenti: elevate capacità mobilizzanti, lenta biodegradabilità nel suolo, tossicità bassa o nulla nei confronti degli organismi e disponibilità su larga scala a costi contenuti (Fava *et al.*, 2002).

In una fase preliminare del lavoro si è ritenuto anche utile valutare mediante test su piastra l'effetto di ogni singolo agente mobilizzante a vari livelli di concentrazione sulla crescita miceliare. In tabella 4.1 è mostrata la crescita radiale di *Pleurotus ostreatus*, *Irpex lacteus*, *Phlebia* sp. ed *Allescheriella* sp. in presenza dei vari agenti mobilizzanti. Come si può osservare dalla tabella 4.1, nessuno degli agenti mobilizzanti aveva un impatto negativo sulla crescita di *I. lacteus*, con l'unica eccezione rappresentata dal Tween 20 aggiunto al terreno agarizzato.

Al contrario, *P. ostreatus* si mostrava alquanto sensibile alla presenza di alcuni degli additivi. In particolare, il Tween 20 sembrava inibire totalmente la crescita ifale anche alla concentrazione più bassa sottoposta ad indagine (1%, p/p). L'inibizione della crescita in presenza di Tween 80 risultava solo parziale ma, comunque, statisticamente significativa a tutte le concentrazioni del surfactante.

Le RAMEB riducevano la crescita di *P. ostreatus* in una misura variabile tra il 24 e il 31% con scarsa relazione con la concentrazione finale. L'olio di soia, invece, non aveva alcun effetto inibente sulla crescita di *P. ostreatus* e le acque di vegetazione risultavano tossiche solo se aggiunte al 50%.

Per quanto riguarda i due ceppi fungini isolati dalla matrice storicamente contaminata a cui si è fatto riferimento in precedenza, *Phlebia* sp. ed *Allescheriella* sp. nessuno degli additivi aveva un impatto negativo sulla crescita dei due ceppi fungini, tranne che per le acque di vegetazione, che, alla concentrazione del 50%, risultavano essere tossiche per entrambe le specie. Il Tween 80, invece, determinava un incremento della crescita di *Allescheriella* sp., a tutte le concentrazioni sottoposte ad indagine.

La foto (Figura 4.2) mostra la crescita radiale dei quattro funghi in presenza degli agenti mobilizzanti usati per le prove di biorisanamento (ad eccezione delle ciclodestrine).

Tabella 4.1. Effetto degli agenti mobilizzanti sulla crescita radiale di *Pleurotus ostreatus*, *Irpex lacteus*, *Phlebia sp.* e *Allescheriella sp.* ottenuta su piastre agarizzate di patata destrosio (PDA) contenenti olio di soia, Tween 20, Tween 80, acque di vegetazione (AV) e ciclodestrine metilate (RAMEB). Tutti gli agenti mobilizzanti sono stati aggiunti in modo da raggiungere diversi livelli di concentrazione.

Agente mobilizzante /concentrazione (% p/p)	<i>P.ostreatus</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>Alleschiells sp.</i>	<i>Phlebia sp.</i>
Nessuno	7,7 ± 0,3 ^c	7,6 ± 0,3 ^{bd}	4,4 ± 0,14 ^d	9,0* ± 0,0 ^a
Tween 20/5.0	a.c. ^a	2,0 ± 0,5 ^c	3,65 ± 0,07 ^a	9,0* ± 0,0 ^a
Tween 20/2.5	a.c. ^a	7,7 ± 0,4 ^b	4,2 ± 0,28 ^{acd}	9,0* ± 0,0 ^a
Tween 20/1.0	a.c. ^a	6,8 ± 0,4 ^d	4,2 ± 0,28 ^{acd}	9,0* ± 0,0 ^a
Tween 80/5.0	5,0 ± 0,3 ^b	9,0* ± 0,0 ^a	5,45 ± 0,21 ^{bc}	9,0* ± 0,0 ^a
Tween 80/2.5	5,2 ± 0,3 ^b	9,0* ± 0,0 ^a	5,8 ± 0,14 ^b	9,0* ± 0,0 ^a
Tween 80/1.0	4,9 ± 0,4 ^b	9,0* ± 0,0 ^a	5,5 ± 0,0 ^b	9,0* ± 0,0 ^a
Olio soia/5.0	7,6 ± 0,2 ^c	9,0* ± 0,0 ^a	4,8 ± 0,28 ^{cd}	9,0* ± 0,0 ^a
Olio soia/2.5	7,2 ± 0,3 ^c	9,0* ± 0,0 ^a	4,55 ± 0,21 ^{de}	9,0* ± 0,0 ^a
Olio soia/1.0	7,5 ± 0,3 ^c	9,0* ± 0,0 ^a	4,1 ± 0,07 ^{ae}	9,0* ± 0,0 ^a
AV / 50	3,4 ± 0,2 ^d	9,0* ± 0,0 ^a	1,7 ± 0,14 ^f	2,55 ± 0,07 ^b
AV / 25	6,8 ± 0,3 ^{cf}	9,0* ± 0,0 ^a	4,75 ± 0,07 ^d	9,0* ± 0,0 ^a
AV / 5	9,0* ± 0,0 ^e	9,0* ± 0,0 ^a	4,85 ± 0,07 ^{cd}	9,0* ± 0,0 ^a
RAMEB / 2.5	5,9 ± 0,6 ^{bf}	9,0* ± 0,0 ^a	4,5 ± 0,0 ^{de}	9,0* ± 0,0 ^a
RAMEB / 1.0	5,7 ± 0,3 ^{bf}	9,0* ± 0,0 ^a	4,35 ± 0,15 ^{de}	9,0* ± 0,0 ^a
RAMEB / 0.1	5,4 ± 0,50 ^b	9,0* ± 0,0 ^a	4,3 ± 0,0 ^{ad}	9,0* ± 0,0 ^a

Legenda: ^{a)} a.c., assenza di crescita; *L'intero diametro della piastra (9 cm) era coperto dalla colonia fungina,.

I dati sono la media ± deviazione standard di 2 determinazioni.

La significatività delle differenze tra le medie è stata determinata mediante il test di Tukey ($P \leq 0.05$). La presenza della stessa lettera al di sopra dei valori, nell'ambito dello stesso ceppo, indica assenza di significatività tra i trattamenti.

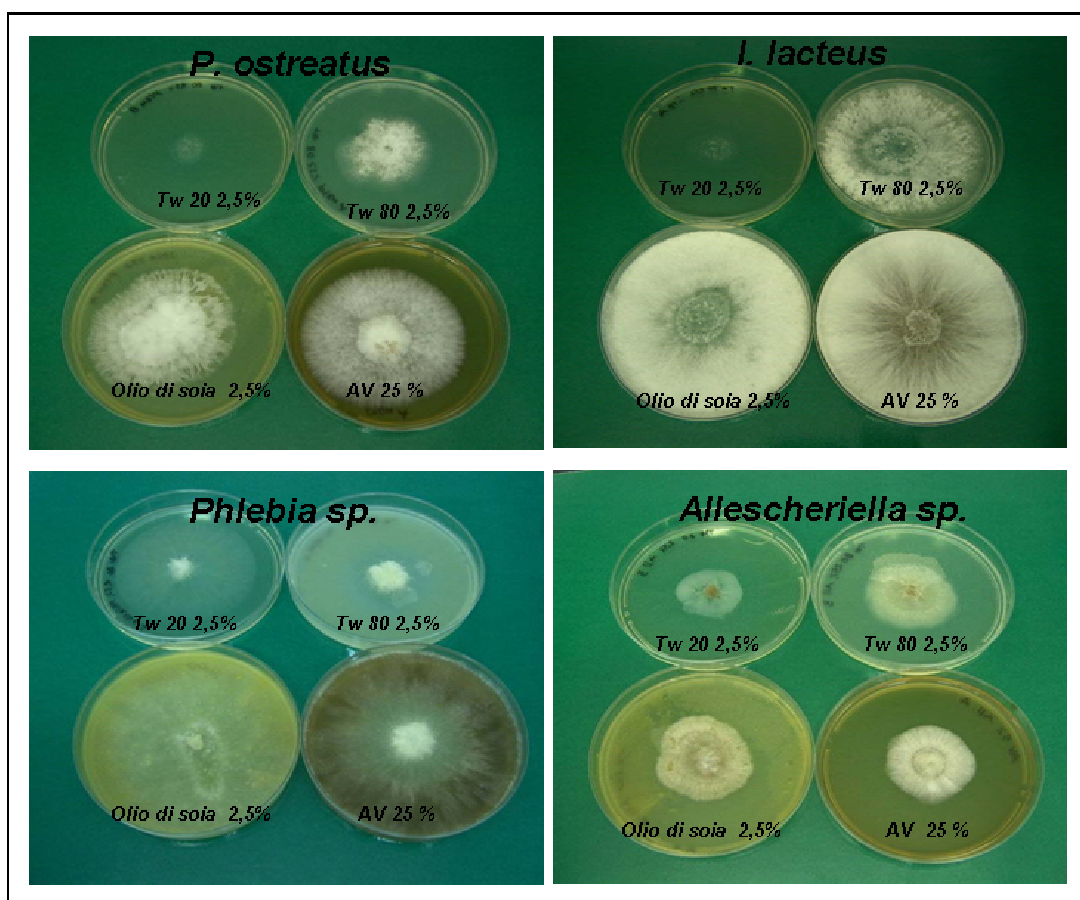


Figura 4.2 Crescita radiale dei funghi in presenza di agenti mobilizzanti alle concentrazioni riportate in figura dopo 7 giorni di incubazione.

Per quanto concerne la procedura di contaminazione “ad hoc” del suolo, gli IPA sono stati sciolti in acetone e la soluzione gradualmente aggiunta a della sabbia di quarzo.

A seguito dell’evaporazione del solvente, la sabbia di quarzo è stata miscelata con il suolo in un rapporto 1:3 (p/p). La validità di questa procedura finalizzata a garantire un’uniforme miscelazione dei contaminanti con il suolo è stata dimostrata dal gruppo di ricerca dell’Istituto di Microbiologia dell’Accademia delle Scienze della Repubblica Ceca diretto dal Prof. Šašek (Novotny *et al.*, 1999).

La miscela dei 7 IPA è stata scelta sulla base della loro importanza come inquinanti prioritari individuati dall’Environmental Protection Agency (US-EPA, Haevy, 1997; Neff, 1979), e sulla base della loro presenza nei suoli storicamente contaminati utilizzati nel presente lavoro di tesi.

L’impostazione sperimentale prevedeva l’allestimento di due tipi di controllo per ciascuna tesi (tempo zero e controllo di incubazione) e, ovviamente, il suolo contaminato trattato con il ceppo in studio.

L’uso dell’estrattore Soxhlet impiegando una miscela di esano:acetone (3:1 v/v) ha fornito delle rese di recupero superiori al 95% che sono risultate migliori rispetto a quanto riportato da Novotny (1999). La separazione e successiva quantificazione degli IPA è stata realizzata mediante cromatografia su fase inversa ad alte prestazioni impiegando una colonna Envirosep-PP (Phenomenex, USA) specificamente messa a punto per tale finalità. In figura 4.3 è mostrata la separazione cromatografica degli IPA impiegati in questo studio riferita al suolo contaminato al tempo zero e al suolo pretrattato con olio di soia e biottrattato con *Phlebia* sp.

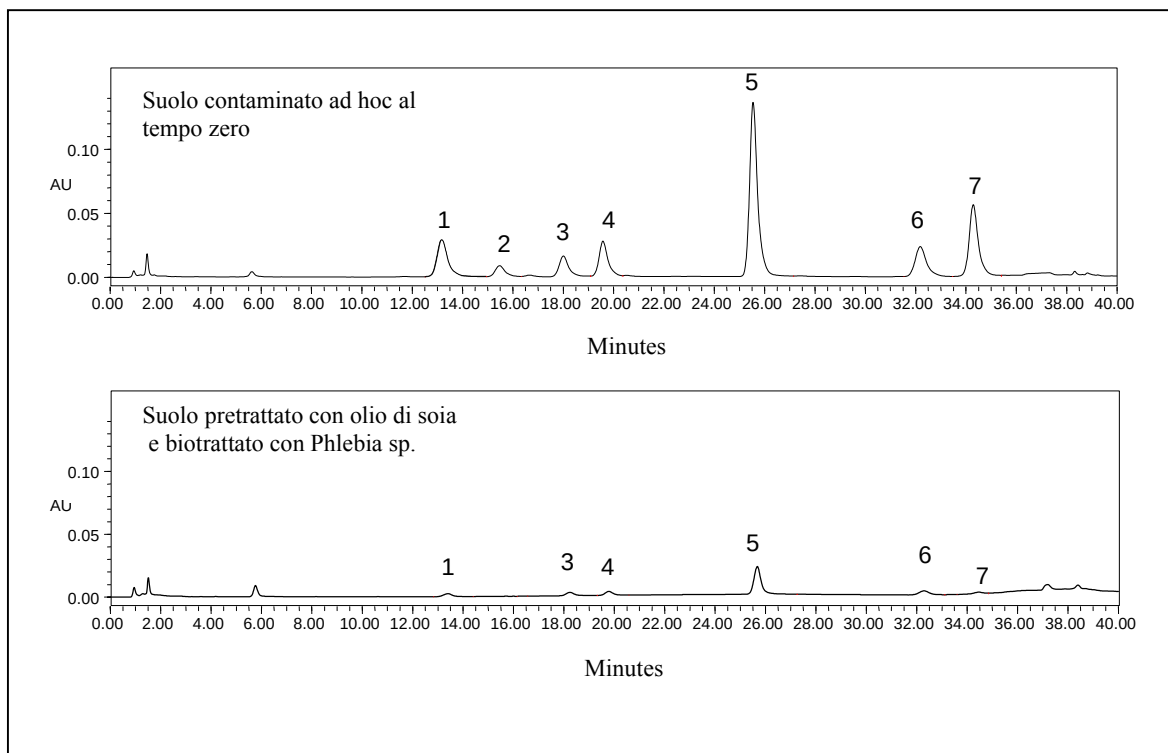


Figura 4.3 Separazione mediante cromatografia su fase inversa ad alte prestazioni della miscela di IPA estratta da suolo contaminato non pretrattato al tempo zero (suolo contaminato non inoculato) ed estratta da suolo pretrattato con olio di soia e inoculato con *Phlebia* sp.

Gli IPA venivano eluiti nel seguente ordine: 1) fenantrene; 2) antracene; 3) fluorantene; 4) pirene; 5) crisene; 6) benzo[k]fluorantene; 7) benzo[a]pirene.

4.2 Crescita fungina e rilascio di polisaccaridasi sul suolo contaminato ad hoc

I ceppi mostravano, in generale, capacità di crescita sul suolo contaminato. La colonizzazione completa del suolo sovrastante richiedeva un tempo di incubazione di circa 6 settimane. I ceppi incubati a 28°C, esibivano una velocità di crescita variabile, inoltre gli agenti mobilizzanti sembravano in alcuni casi stimolare la colonizzazione della matrice contaminata (Figura 4.4).

Si è reso necessario valutare la crescita fungina nella matrice contaminata, in presenza ed in assenza degli additivi. Il grado di colonizzazione fungina è, infatti, un indice diretto della resistenza del ceppo ai contaminanti tossici e, indirettamente, della sua potenziale capacità di attaccare la matrice contaminata (Garon *et al.*, 2000).

Per quel che concerne le metodologie volte a determinare la crescita fungina su matrici solide è importante sottolineare l'impossibilità nel caso dei funghi di applicare le classiche metodiche di conta su piastra.

Sono state effettuate delle prove nei test tube, in condizioni analoghe a quelle utilizzate nelle prove in beuta, ponendo il materiale lignocellulosico, ovvero gli stocchi di mais macinati in modo grossolano, colonizzato dal fungo a contatto con la matrice contaminata in presenza ed in assenza degli agenti mobilizzanti e l'estensione ifale nel suolo è stata seguita nel tempo (Tabella 4.2).

Al fine di quantificare, sebbene per via indiretta, la biomassa fungina e di determinare un eventuale effetto degli agenti mobilizzanti sulla crescita, al termine dell'incubazione venivano determinati i livelli di ergosterolo, un componente specifico della membrana fungina (Novotny *et al.*, 1999, Davis e Lamar, 1992).

Il suolo contaminato non inoculato e incubato a 28°C per 6 settimane ad un'umidità costante del 10% mostrava un significativo aumento dei livelli di ergosterolo, rispetto al suolo prima dell'incubazione, nel quale i quantitativi di ergosterolo erano nulli. I valori di ergosterolo nei controlli di incubazione oscillano tra i 2,4 e 3,4 µg/g di suolo, ad eccezione del suolo pretrattato con RAMEB nel quale i livelli di ergosterolo erano nulli.

Questi dati sono in linea con quanto sarà successivamente discusso riguardo l'effetto degli agenti mobilizzanti sulla crescita della microflora indigena.

P. ostreatus e *I. lacteus* dopo 6 settimane di incubazione hanno mostrato nel suolo contaminato livelli di ergosterolo superiori rispetto a quelli ottenuti con *Phlebia* sp. ed *Allescheriella* sp.

I quantitativi di ergosterolo estratti dal micelio di *I. lacteus* erano significativamente superiori a quelli degli altri ceppi.

La Figura 4.5 mostra che la presenza dell'olio di soia e del Tween 80 determinava un aumento della crescita di *I. lacteus* mentre in presenza degli altri agenti mobilizzanti non si riscontravano differenze significative rispetto al suolo incubato con il micelio in assenza di additivi. L'olio di soia e le acque di vegetazione determinavano un aumento dei livelli di ergosterolo anche nella matrice biottrattata con *P. ostreatus* e *Allescheriella* sp., quest'ultimo ceppo mostrava una crescita nulla in assenza di agenti additivi ed in presenza di RAMEB. Gli agenti mobilizzanti non hanno avuto effetti positivi sul suolo biottrattato con *Phlebia* sp.

Al termine dell'incubazione sono state anche dosate alcune attività enzimatiche coinvolte nella degradazione delle macromolecole di parete del materiale lignocellulosico presente, al fine di verificare l'impatto dovuto alla presenza degli additivi sulle capacità d'utilizzo di questo materiale.

L'idrolisi della cellulosa da parte dei funghi prevede l'azione successiva di tre enzimi: le endoglucanasi che scindono in modo casuale i legami interni β -1,4 liberando molecole di glucosio e cello-oligosaccaridi, le esoglucanasi che attaccano la porzione terminale non riducente della cellulosa liberando cellobiosio e, infine, le β -glucosidasi che liberano due monomeri di glucosio per ogni molecola di cellobiosio prodotta. Nel presente lavoro sono state sottoposte ad indagine le endo-1,4-beta-glucanasi, le β -esoglucanasi (o cellobioidrolasi) e le endo-1,4-beta-xilanasi.

Infatti, è noto che nel micorisanamento la colonizzazione fungina è stimolata dalla presenza di materiale lignocellulosico. E' noto inoltre che nei funghi la degradazione di idrocarburi aromatici è un processo cometabolico, in virtù dell'incapacità da parte dei funghi stessi di utilizzare i contaminanti quali unica fonte di carbonio (Tucker *et al.*, 1995; Lang *et al.*, 1993).

Le tabelle 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6 mostrano che la presenza degli additivi genera risposte differenti in funzione sia delle specie fungine sia dal tipo degli additivi.

Tutti i funghi hanno prodotto polisaccaridasi in assenza di additivi. *Phlebia* sp. presentava i livelli di attività maggiori rispetto agli altri ceppi, inoltre gli agenti

mobilizzanti determinavano produzioni enzimatiche migliori e, in alcuni casi, analoghe a quelle rilevate in assenza di pretrattamento (Tabella 4.5).

Solo le acque di vegetazione e le ciclodestrine avevano effetti significativamente positivi sulla produzione dei tre enzimi da parte di *P. ostreatus* (Tabella 4.3), mentre i livelli di attività prodotti da *I. lacteus* sembrano generalmente ridotti rispetto alle condizioni rilevate in assenza di additivi, con l'unica eccezione delle ciclodestrine che davano risposte analoghe (Tabella 4.4).

Allescheriella sp. presentava in assenza di agenti mobilizzanti un'attività molto bassa, ma tutti gli additivi avevano effetti significativamente positivi sulla produzione dei tre enzimi con l'unica eccezione delle xilanasi in presenza di acque di vegetazione e RAMEB, le cui attività erano nulle (Tabella 4.6).



Figura 4.4 Colonizzazione del suolo contaminato biottrattato con *P. ostreatus* non pretrattato (suolo TQ) e pretrattato con acque di vegetazione (suolo + AV) dopo 6 settimane di incubazione.

Tabella 4.2 Estensione ifale nel suolo contaminato ad hoc, e contenuto di ergosterolo ($\mu\text{g/g}$ di ergosterolo per grammo di suolo) dopo 6 settimane di incubazione nel suolo contaminato ad hoc in laboratorio non pretrattato (suolo TQ) e nel suolo pretrattato con differenti agenti mobilizzanti: olio di soia (OS), Tween 20 (Tw20), Tween 80 (Tw80), Acque di Vegetazione (AV), RAMEB.

	<i>P. ostreatus</i>		<i>I. lacteus</i>		<i>Phlebia</i> sp.		<i>Allescheriella</i> sp.	
	Ergosterolo ($\mu\text{g/g}$)	Lunghezza ife (cm)	Ergosterolo ($\mu\text{g/g}$)	Lunghezza ife (cm)	Ergosterolo ($\mu\text{g/g}$)	Lunghezza ife (cm)	Ergosterolo ($\mu\text{g/g}$)	Lunghezza ife (cm)
Micelio*	916,4 $\pm$ 54,5 ^x		2701,5 $\pm$ 307,7 ^y		1314,7 $\pm$ 165,2 ^x		1559,1 $\pm$ 127,4 ^x	
Agente mobilizzante								
Nessuno	9,4 $\pm$ 2,2 ^{ac}	4,6 $\pm$ 0,2 ^a	6,9 $\pm$ 2,4 ^{ac}	1,3 $\pm$ 0,0 ^a	3,0 $\pm$ 0,1 ^{ab}	2,5 $\pm$ 0,7 ^{ad}	0,0 $\pm$ 0,0 ^a	n.m.
Olio di soia.	23,3 $\pm$ 4,2 ^b	5,0 $\pm$ 0,0 ^b	13,4 $\pm$ 1,6 ^b	5,0 $\pm$ 0,0 ^b	5,2 $\pm$ 1,8 ^a	5,0 $\pm$ 0,0 ^b	3,5 $\pm$ 0,8 ^b	n.m.
Tween 20	3,5 $\pm$ 0,5 ^a	5,0 $\pm$ 0,0 ^b	8,4 $\pm$ 0,6 ^a	3,1 $\pm$ 0,1 ^c	4,2 $\pm$ 0,1 ^a	1,7 $\pm$ 0,3 ^{ac}	0,1 $\pm$ 1,3 ^a	n.m.
Tween 80	8,7 $\pm$ 1,7 ^a	5,0 $\pm$ 0,0 ^b	12,5 $\pm$ 0,1 ^b	3,2 $\pm$ 0,3 ^c	3,2 $\pm$ 1,8 ^{ab}	1,3 $\pm$ 0,1 ^c	1,3 $\pm$ 1,1 ^{ab}	n.m.
AV	15,0 $\pm$ 0,9 ^c	5,0 $\pm$ 0,0 ^b	7,9 $\pm$ 0,0 ^{ac}	4,6 $\pm$ 0,5 ^b	2,3 $\pm$ 0,3 ^{ab}	3,4 $\pm$ 0,1 ^d	6,1 $\pm$ 1,1 ^c	n.m.
RAMEB	7,3 $\pm$ 2,2 ^a	4,4 $\pm$ 0,0 ^c	4,5 $\pm$ 1,3 ^c	1,6 $\pm$ 0,2 ^a	0,8 $\pm$ 0,5 ^b	2,9 $\pm$ 0,2 ^{ad}	0,0 $\pm$ 0,0 ^a	n.m.

Leggenda: * In tabella sono riportati i quantitativi di ergosterolo estratti da 1 g di peso secco di micelio, precedentemente liofilizzato. n.m., non misurabile, il colore del micelio simile a quello del suolo non permetteva una misurazione manuale.

I dati sono la media $\pm$ deviazione standard di 3 determinazioni.

La significatività delle differenze tra le medie è stata determinata mediante il test di Tukey ($P \leq 0.05$). La presenza della stessa lettera, al di sopra dei valori all'interno della colonna, indica assenza di significatività tra i trattamenti.

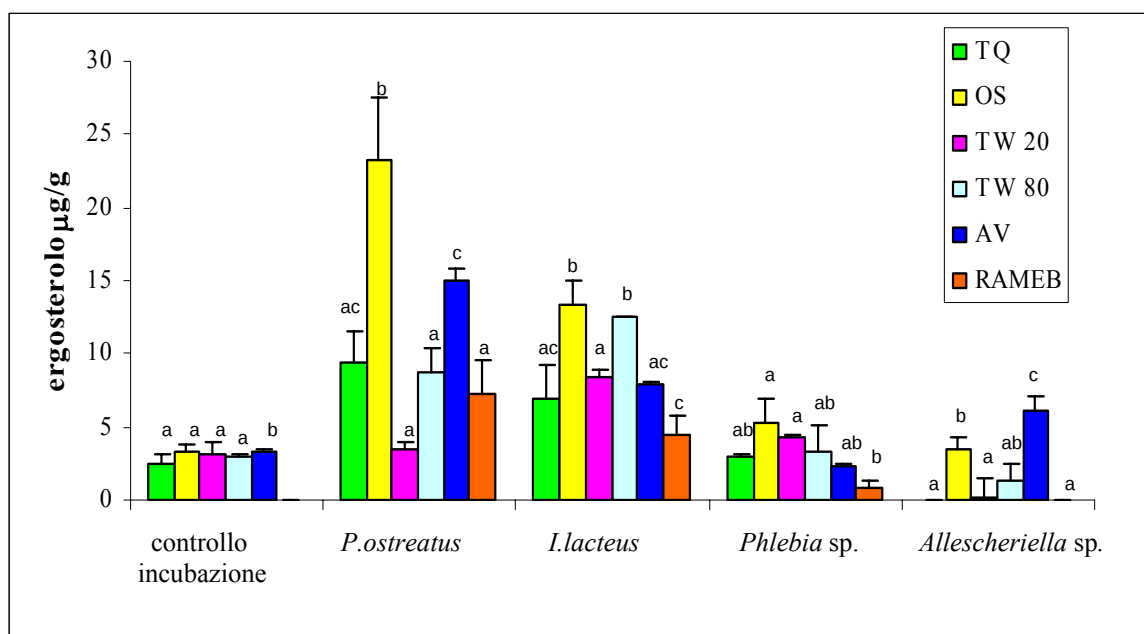


Figura 4.5 Contenuto di ergosterolo rilevato nel controllo di incubazione non inoculato e nel suolo contaminato ad hoc incubato con *P. ostreatus*, *I. lacteus*, *Phlebia sp.*, *Allescheriella sp.* per 6 settimane in assenza (TQ) ed in presenza dei seguenti agenti mobilizzanti: olio di soia (OS), Tween 20 (TW20), Tween 80 (TW80), acque di vegetazione (AV) e RAMEB.

I dati sono la media $\pm$ deviazione standard di 3 determinazioni.

La significatività delle differenze tra le medie è stata determinata mediante il test di Tukey ($P \leq 0.05$). La presenza della stessa lettera al di sopra della barra nell'ambito dello stesso ceppo e dei controlli di incubazione indica assenza di significatività tra i trattamenti.

Tabella 4.3 Attività di polisaccaridasi rilevate al termine del biotrattamento (6 settimane a 28° C) con *Pleurotus ostreatus* in assenza e in presenza degli agenti mobilizzanti.

Agente Mobilizzante	Attività enzimatiche		
	Endoglucanasi (UI/g)	Esoglucanasi (UI/g)	Xilanasi (UI/g)
Nessuno	0,014± 0,00 ^a	0,408± 0,09 ^a	0,126 ± 0,01 ^a
Olio soia	0,024± 0,00 ^a	0,419± 0,06 ^a	0,134 ± 0,02 ^a
Tween 20	0,068 ± 0,05 ^a	0,378± 0,07 ^a	0,169± 0,00 ^a
Tween 80	0,046 ± 0,00 ^a	0,366± 0,04 ^a	0,104± 0,02 ^a
AV	0,348 ± 0,00 ^b	1,078± 0,10 ^b	0,487± 0,05 ^b
RAMEB	0,376 ± 0,00 ^b	1,280± 0,18 ^b	0,473± 0,03 ^b

I dati sono la media ± deviazione standard di 3 determinazioni.

La significatività delle differenze tra le medie è stata determinata mediante il test di Tukey ($P \leq 0.05$). La presenza della stessa lettera al di sopra dei valori all'interno della stessa colonna indica assenza di significatività tra i trattamenti.

Tabella 4.4 Attività di polisaccaridasi rilevate al termine del biotratamento (6 settimane a 28° C) con *Irpex lacteus* in assenza e in presenza degli agenti mobilizzanti.

Agente mobilizzante	Attività enzimatiche		
	Endoglucanasi (UI/g)	Esoglucanasi (UI/g)	Xilanasi (UI/g)
Nessuno	0,624± 0,02 ^a	0,337± 0,01 ^{ab}	0,379 ± 0,01 ^{ac}
Olio soia	0,282 ± 0,06 ^b	0,301± 0,01 ^{ab}	0,289 ± 0,05 ^{ab}
Tween 20	0,547 ± 0,09 ^a	0,261± 0,05 ^{ab}	0,302± 0,08 ^{ab}
Tween 80	0,364 ± 0,05 ^b	0,229± 0,07 ^a	0,248± 0,00 ^b
AV	0,309 ± 0,01 ^b	0,288± 0,01 ^{ab}	0,381± 0,05 ^{ac}
RAMEB	0,529 ± 0,07 ^a	0,354± 0,05 ^b	0,494± 0,02 ^c

I dati sono la media ± deviazione standard di 3 determinazioni.

La significatività delle differenze tra le medie è stata determinata mediante il test di Tukey ($P \leq 0.05$). La presenza della stessa lettera al di sopra dei valori all'interno della stessa colonna indica assenza di significatività tra i trattamenti.

Tabella 4.5 Attività di polisaccaridasi rilevate al termine del biotrattamento (6 settimane a 28° C) con *Phlebia* sp. in assenza e in presenza degli agenti mobilizzanti.

Agente mobilizzante	Attività enzimatiche		
	Endoglucanasi (UI/g)	Esoglucanasi (UI/g)	Xilanasi (UI/g)
Nessuno	0,334± 0,00 ^a	0,700± 0,03 ^{ac}	0,483 ± 0,02 ^a
Olio soia	0,481± 0,02 ^b	1,302± 0,20 ^b	0,552 ± 0,03 ^b
Tween 20	0,764 ± 0,00 ^c	0,786± 0,02 ^{ac}	0,833 ± 0,01 ^c
Tween 80	0,446 ± 0,06 ^b	0,763± 0,07 ^{ac}	0,434 ± 0,01 ^a
AV	0,798 ± 0,02 ^c	0,933± 0,03 ^a	0,551± 0,03 ^b
RAMEB	0,516 ± 0,02 ^b	0,621± 0,07 ^c	0,448± 0,02 ^a

I dati sono la media ± deviazione standard di 3 determinazioni.

La significatività delle differenze tra le medie è stata determinata mediante il test di Tukey ($P \leq 0.05$). La presenza dalla stessa lettera al di sopra dei valori all'interno della stessa colonna indica assenza di significatività tra i trattamenti.

Tabella 4.6 Attività di polisaccaridasi rilevate al termine del biottrattamento (6 settimane a 28° C) con *Allescheriella* sp. in assenza e in presenza degli agenti mobilizzanti.

Attività enzimatiche			
Agente mobilizzante	Endoglucanasi (UI/g)	Esoglucanasi (UI/g)	Xilanasi (UI/g)
Nessuno	0,030± 0,00 ^a	0,272± 0,06 ^a	0,107 ± 0,00 ^a
Olio soia	0,103± 0,02 ^b	0,612± 0,03 ^b	0,014 ± 0,00 ^b
Tween 20	0,187 ± 0,03 ^c	0,861± 0,05 ^b	0,210 ± 0,01 ^c
Tween 80	n.r. ^a	0,851± 0,02 ^b	0,144 ± 0,02 ^d
AV	0,139 ± 0,02 ^d	1,070± 0,20 ^{bc}	n.r. ^b
RAMEB	0,210 ± 0,02 ^c	1,283± 0,05 ^c	n.r. ^b

Legenda: n.r., non rilevata

I dati sono la media ± deviazione standard di 3 determinazioni.

La significatività delle differenze tra le medie è stata determinata mediante il test di Tukey ($P \leq 0.05$). La presenza dalla stessa lettera al di sopra dei valori all'interno della stessa colonna indica assenza di significatività tra i trattamenti.

4.3 Prove di biorisanamento su suoli contaminati ad hoc

In una prima fase sono state saggiate le capacità degradative dei quattro ceppi su una matrice di recente contaminazione, effettuando prove di biorisanamento su un suolo contaminato ad hoc in laboratorio.

La Tabella 4.7 mostra le concentrazioni residue di ciascun componente presente nella miscela di IPA impiegata nella contaminazione ad hoc del suolo in seguito a incubazione con *P. ostreatus* e le percentuali di rimozione rispetto al controllo di incubazione. Tali percentuali sono state calcolate rapportando la concentrazione residua nel suolo inoculato a quella rilevata nel controllo di incubazione omologo non inoculato ed indicano l'entità del contributo alla degradazione da attribuire al fungo. Infatti, in tutti controlli di incubazione venivano rilevate riduzioni nella concentrazione di alcuni IPA che possono essere verosimilmente ascritte sia all'azione della microflora autoctona sia a fenomeni abiotici (Tabella 4.11).

Per quanto riguarda il secondo aspetto, uno studio recente aveva riscontrato riduzioni nelle concentrazioni di IPA nei controlli di incubazione condotti in condizioni di sterilità suggerendo che esse fossero la conseguenza della volatilizzazione e/o di fenomeni di adsorbimento di alcuni contaminanti alle particelle di suolo (Novotny *et al.*, 1999).

Le prestazioni degradative di *P. ostreatus* (Tabella 4.7) in assenza di additivi apparivano essere migliori di quelle di *I. lacteus* e comparabili a quelle di *Phlebia* sp. e *Allescheriella* sp. L'antracene ed il fenantrene risultavano i componenti più suscettibili alla degradazione anche in assenza di agenti mobilizzanti. L'aggiunta degli additivi sortiva un impatto estremamente positivo sui livelli di deplezione degli IPA, con l'unica eccezione rappresentata dai suoli pretrattati con le RAMEB. I risultati migliori venivano ottenuti nei suoli pretrattati con olio di soia e in misura comparabile con Tween 20, in particolare sui composti a più elevato peso molecolare che in assenza di agenti mobilizzanti erano degradati in percentuali sempre minori al 50% rispetto alla contaminazione iniziale. Inoltre, in presenza di olio di soia e Tween 20, si osservava una quasi totale deplezione del fenantrene e una rimozione completa dell'antracene.

Nelle prove condotte con *I. lacteus* (Tabella 4.8), in assenza di agenti mobilizzanti, veniva osservata una rimozione preferenziale dell'antracene. La rimozione del fenantrene, e del benzo[a]pirene, invece, risultavano nulle rispetto al controllo di incubazione e trascurabili quelle del benzo[k]fluorantene del pirene e del crisene.

Tutti gli agenti mobilizzanti sortivano un significativo impatto positivo come risulta evidente dall'esame dei dati in tabella 4.8. Tra questi, i migliori risultavano essere l'olio di soia e il Tween 80, ma, anche sul suolo pretrattato con acque di vegetazione, i livelli di deplezione degli IPA risultavano significativamente migliorati rispetto al suolo non trattati. Nei suoli pretrattati con uno di questi tre agenti mobilizzanti, l'antracene, il fenantrene e il crisene venivano rimossi in misura superiori rispetto agli altri IPA. Inoltre, le percentuali di rimozione di fenantrene, crisene e benzo[a]pirene rispetto al controllo di incubazione risultavano nettamente superiore a quelle ottenute in assenza di agenti mobilizzanti. L'aggiunta delle ciclodestrine e del Tween 20, pur determinando dei miglioramenti rispetto al suolo non pretrattato, sortiva un effetto decisamente inferiore a quello osservato con gli altri agenti.

In assenza di agenti mobilizzanti, nelle prove condotte con *Phlebia* sp. veniva osservata una rimozione preferenziale dell'antracene, del fenantrene e del fluorantene. Risultava trascurabile rispetto al controllo di incubazione omologo invece, la rimozione del crisene (4,7%) e variabili dal 18 al 28% quelle relative a pirene, benzo[k]fluorantene e benzo[a]pirene (Tabella 4.9).

Gli agenti mobilizzanti sortivano un effetto variabile come risulta evidente dall'esame della tabella 4.9. Tra questi, l'olio di soia determinava un incremento significativo nella deplezione dei composti a più elevato peso molecolare, quali pirene, crisene, benzo[k]fluorantene e benzo[a]pirene. Le acque di vegetazione determinavano incrementi nei livelli di deplezione del crisene. Denominatore comune dell'uso di questi tre agenti mobilizzanti era, quindi, una migliorata degradazione del pirene e del crisene. Nei terreni pretrattati con le RAMEB si osservava un significativo effetto stimolante sulla degradazione del pirene, il quale veniva rimosso di circa il 65%, rispetto al controllo di incubazione omologo. L'aggiunta di Tween 80, non determinava miglioramenti rispetto al suolo non pretrattato.

In assenza di additivi antracene, fenantrene e fluorantene risultavano i contaminanti più suscettibili alla degradazione da parte di *Allescheriella* sp. Gli agenti più efficaci nel determinare un incremento nei livelli di deplezione degli IPA erano i due Tween e, in misura minore, le RAMEB e l'olio di soia. Tuttavia, nonostante i Tween avessero fornito ottimi risultati nella rimozione degli IPA più semplici, essi risultavano totalmente inefficaci nel caso dei contaminanti a più elevato grado di condensazione, quali benzo[k]fluorantene e benzo[a]pirene. L'aggiunta di olio di soia, come illustrato in tabella 4.10, determinava un

peggioramento nelle prestazioni degradative di *Allescheriella* sp. nei confronti di fenantrene e fluorantene rispetto al suolo in assenza di tali additivi, mentre si riscontravano significativi miglioramenti nella degradazione di crisene, benzo[k]-fluorantene e benzo[a]-pirene.

Tale effetto stimolante nella rimozione dei contaminanti a più elevato peso molecolare ascrivibile alla presenza dell'olio di soia era stato anche riscontrato nelle prove condotte con *I. lacteus*, *P. ostreatus* e *Phlebia* sp.

La figura 4.6 mostra le concentrazioni residue complessive degli IPA nel suolo contaminato ad hoc al termine dell'incubazione con *P. ostreatus*, *I. lacteus*, *Phlebia* sp. e *Allescheriella* sp. e quella dei controlli di incubazione omologhi. Questa modalità di rappresentazione, pur non tenendo conto della diversità strutturale che caratterizza i componenti IPA presenti nella miscela, fornisce un'indicazione comparativa sull'efficienza di degradazione dei ceppi nonché sulla loro risposta in termini complessivi all'impiego degli agenti mobilizzanti.

Nelle prove condotte con *I. lacteus* tutti gli agenti mobilizzanti sortivano un significativo impatto positivo, tra questi, i migliori risultavano essere l'olio di soia e, in misura comparabile, il Tween 80. Anche nel suolo pretrattato con acque di vegetazione, la deplezione degli IPA risultava significativamente migliorata rispetto al suolo non pretrattato.

In assenza di agenti mobilizzanti le prestazioni degradative di *P. ostreatus* risultavano migliori di quelle di *I. lacteus* in assenza di agenti mobilizzanti. Tuttavia, anche in questo caso, l'uso di questi agenti sortiva un impatto positivo sui livelli di deplezione degli IPA, con l'unica eccezione rappresentata dai suoli pretrattati con le RAMEB. I risultati migliori venivano ottenuti nei suoli pretrattati con olio di soia e Tween 20.

Come si può osservare dalla Figura 4.6, nel caso di *Phlebia* sp., l'unico additivo in grado di aumentare le performance degradative complessive sembra essere l'olio di soia.

L'effetto stimolante esercitato dai due Tween era invece più rilevante con *Allescheriella* sp., mentre gli altri additivi, ad eccezione delle acque di vegetazione che avevano un effetto negativo, non sembravano incidere in misura rilevante sulle prestazioni complessive di questo fungo.

Va tenuto però presente che si tratta di un suolo contaminato "ad hoc" in cui i fenomeni di riduzione della biodisponibilità dovuti all'aging o a interazioni dei contaminanti con la fase organica del suolo sono ovviamente ridotti rispetto a quelli

riscontrati su matrici storicamente contaminate. Tuttavia, a prescindere dal fattore biodisponibilità degli IPA, la capacità degli agenti mobilizzanti impiegati in questa prova nonché l'azione stimolante di alcuni di essi sul rilascio di enzimi extra-cellulari poteva indurre a prevedere un effetto positivo conseguente all'uso di tali agenti.

A tal fine sono state effettuate delle prove addizionali sul suolo contaminato ad hoc in laboratorio e sottoposto ad "aging", selezionando i ceppi che avevano mostrato le migliori performance degradative ed effetti positivi nella deplezione dei contaminanti in presenza degli agenti mobilizzanti.

Il suolo dopo la contaminazione è stato conservato a 4°C per un anno, quindi sono state effettuate delle prove di biotrattamento in condizioni analoghe a quelle descritte in precedenza al fine di verificare gli effetti dell'aging sulle prestazioni degradative di *P. ostreatus* e *I. lacteus*.

Tabella 4.7 Concentrazione residua dei singoli componenti della miscela di IPA presenti sul suolo incubato con *Pleurotus ostreatus*, per 6 settimane a 28°C in assenza ed in presenza di agenti mobilizzanti. I componenti IPA aggiunti al suolo erano i seguenti: fenantrene (PHEN), antracene (ANTR), fluorantene (FLT), pirene (PYR), crisene (CHRY), benzo[k]fluorantene (BKFLT), e benzo[a]pirene (BaPYR). Ciascun IPA è stato inizialmente aggiunto nella misura di 50 mg/kg di suolo.

Agente mobilizzante	Concentrazioni residue (mg/kg)						
	PHEN	ANTR	FLT	PYR	CHRY	BKFLT	BaPYR
Nessuno	14,9±0,4 ^a [38,5]	11,0±0,2 ^a [61,6]	26,9±0,2 ^a [36,8]	23,5±0,3 ^a [39,3]	31,1±1,0 ^a [24,9]	27,3±0,2 ^a [23,4]	25,7±0,8 ^a [13,9]
Olio soia	3,8±0,3 ^{bc} [92,6]	0,0±0,0 ^b [100,0]	4,5±1,7 ^b [90,5]	5,1±0,1 ^b [80,2]	3,8±3,8 ^b [90,7]	5,6±0,9 ^b [72,4]	3,5±0,7 ^b [83,1]
Tween 20	2,3±0,4 ^b [95,2]	0,0±0,0 ^b [100,0]	6,5±1,1 ^b [87,9]	10,3±0,5 ^c [78,5]	7,0±0,5 ^b [84,9]	10,1±0,7 ^c [69,9]	6,1±0,0 ^b [80,2]
Tween 80	12,9±2,3 ^a [74,2]	0,0±0,0 ^b [100,0]	23,0±1,5 ^{ac} [56,1]	17,4±0,3 ^d [61,2]	23,0±3,9 ^d [39,9]	19,0±1,3 ^d [34,3]	6,5±1,6 ^b [68,4]
AV	8,1±0,3 ^c [76,9]	12,5±0,5 ^{ac} [53,1]	20,8±1,2 ^c [57,8]	15,7±0,6 ^e [64,7]	26,6±3,1 ^{ad} [43,8]	22,1±1,8 ^e [30,2]	13,7±1,0 ^c [42,0]
RAMEB	24,9±3,3 ^d [53,8]	13,8±1,3 ^c [58,7]	24,4±3,4 ^{ac} [51,4]	20,0±0,9 ^f [54,1]	26,4±0,9 ^{ad} [29,5]	23,3±0,9 ^e [14,2]	20,9±2,4 ^d [19,2]

In parentesi quadra sono riportate le percentuali di rimozione, calcolate rispetto alla concentrazione residua degli IPA nel controllo di incubazione relativo, ottenuto preparando e successivamente incubando, nelle medesime condizioni il suolo non inoculato.

I dati sono media ± d.s. di tre repliche.

L'effetto degli agenti mobilizzanti è stato analizzato statisticamente all'interno dello stesso contaminante: valori sovrastati da lettere uguali indicano assenza di significatività come determinato mediante il test di Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabella 4.8 Concentrazione residua dei singoli componenti della miscela di IPA presenti sul suolo incubato con *Irpex lacteus* per 6 settimane a 28°C in assenza ed in presenza di agenti mobilizzanti. I componenti IPA aggiunti al suolo erano i seguenti: fenantrene (PHEN), antracene (ANTR), fluorantene (FLT), pirene (PYR), crisene (CHRY), benzo[k]fluorantene (BKFLT), e benzo[a]pirene (BaPYR). Ciascun IPA è stato inizialmente aggiunto nella misura di 50 mg/kg di suolo.

Agente mobilizzante	Concentrazioni residue (mg/kg)						
	PHEN	ANTR	FLT	PYR	CHRY	BKFLT	BaPYR
Nessuno	26,5±0,0 ^a [0,0]	15,3±1,0 ^a [46,9]	33,1±1,4 ^a [22,3]	30,3±1,3 ^a [21,8]	34,5±4,0 ^a [16,7]	29,1±1,8 ^a [18,3]	32,5±1,6 ^a [0,0]
Olio soia	7,2±0,9 ^b [86,0]	0,0±0,0 ^b [100,0]	10,4±1,4 ^b [78,0]	11,4±1,4 ^b [56,3]	7,9±0,0 ^b [80,3]	12,5±0,0 ^b [38,9]	8,3±2,0 ^b [60,2]
Tween 20	24,5±2,9 ^a [48,4]	7,5±0,3 ^c [75,9]	27,6±3,5 ^{ac} [48,4]	26,9±3,5 ^{ac} [43,8]	27,6±6,9 ^c [40,5]	23,4±2,5 ^c [30,3]	21,9±3,5 ^c [28,4]
Tween 80	8,0±0,5 ^b [84,0]	0,0±0,0 ^b [100,0]	12,1±0,7 ^b [76,8]	14,6±0,3 ^b [67,5]	7,3±1,0 ^b [80,9]	13,9±0,6 ^b [51,8]	9,4±0,2 ^b [54,5]
AV	11,1±0,7 ^b [68,4]	10,8±1,6 ^c [59,3]	15,1±2,5 ^b [69,5]	16,8±2,9 ^{bc} [62,8]	12,0±9,8 ^b [74,7]	16,5±2,4 ^{bc} [47,8]	12,4±3,2 ^{bd} [47,7]
RAMEB	22,8±3,0 ^a [57,7]	14,9±2,3 ^a [55,6]	21,8±5,1 ^c [56,4]	21,3±1,7 ^c [51,2]	19,8±8,5 ^d [47,0]	20,8±2,1 ^c [23,5]	17,3±1,5 ^{cd} [33,3]

In parentesi quadra sono riportate le percentuali di rimozione, calcolate rispetto alla concentrazione residua degli IPA nel controllo di incubazione relativo, ottenuto preparando e successivamente incubando, nelle medesime condizioni il suolo non inoculato.

I dati sono media ± d.s. di tre repliche.

L'effetto degli agenti mobilizzanti è stato analizzato statisticamente all'interno dello stesso contaminante: valori sovrastati da lettere uguali indicano assenza di significatività come determinato mediante il test di Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabella 4.9 Concentrazione residua dei singoli componenti della miscela di IPA presenti sul suolo incubato con *Phlebia sp.* per 6 settimane a 28°C in assenza ed in presenza di agenti mobilizzanti. I componenti IPA aggiunti al suolo erano i seguenti: fenantrene (PHEN), antracene (ANTR), fluorantene (FLT), pirene (PYR), crisene (CHRY), benzo[k]fluorantene (BKFLT), e benzo[a]pirene (BaPYR). Ciascun IPA è stato inizialmente aggiunto nella misura di 50 mg/kg di suolo.

Agente mobilizzante	Concentrazioni residue (mg/kg)						
	PHEN	ANTR	FLT	PYR	CHRY	BKFLT	BaPYR
Nessuno	4,5±0,5 ^a [74,9]	12,0±1,0 ^a [53,8]	15,4±1,5 ^a [56,9]	25,9±0,4 ^a [28,5]	43,5±2,6 ^a [4,7]	34,3±2,4 ^a [18,1]	30,3±1,5 ^a [19,9]
Olio soia	4,4±0,6 ^a [88,2]	10,1±0,0 ^a [0,4]	24,3±0,6 ^b [39,1]	19,6±1,1 ^b [19,4]	25,9±2,0 ^b [41,6]	21,6±0,4 ^b [10,6]	7,9±0,3 ^b [70,2]
Tween 20	2,1±0,1 ^b [93,9]	10,7±0,0 ^a [62,0]	23,6±5,7 ^b [47,7]	24,1±3,2 ^a [46,1]	38,7±1,3 ^{ac} [24,3]	30,5±0,4 ^a [22,6]	26,4±1,8 ^{ac} [31,9]
Tween 80	3,1±0,1 ^{ab} [91,5]	10,6±0,9 ^a [20,1]	24,5±3,9 ^b [44,3]	24,1±0,3 ^a [42,6]	41,6±0,4 ^a [1,4]	30,6±1,3 ^a [9,9]	24,2±2,0 ^c [7,8]
AV	4,2±0,6 ^a [83,6]	10,6±0,4 ^a [55,8]	18,4±3,5 ^{ac} [55,7]	20,0±1,8 ^b [51,9]	33,0±2,3 ^c [36,7]	31,0±0,6 ^a [16,7]	27,1±0,8 ^{ac} [9,8]
RAMEB	9,9±0,8 ^c [74,9]	13,7±1,3 ^b [54,8]	20,4±2,9 ^{bc} [51,7]	14,1±1,4 ^c [65,3]	39,8±4,3 ^a [3,5]	31,7±2,9 ^a [0,5]	26,9±3,2 ^{ac} [18,2]

In parentesi quadra sono riportate le percentuali di rimozione, calcolate rispetto alla concentrazione residua degli IPA nel controllo di incubazione relativo, ottenuto preparando e successivamente incubando, nelle medesime condizioni il suolo non inoculato.

I dati sono media ± d.s. di tre repliche.

L'effetto degli agenti mobilizzanti è stato analizzato statisticamente all'interno dello stesso contaminante: valori sovrastati da lettere uguali indicano assenza di significatività come determinato mediante il test di Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabella 4.10 Concentrazione residua dei singoli componenti della miscela di IPA presenti sul suolo incubato con *Allescheriella sp* per 6 settimane a 28°C in assenza ed in presenza di agenti mobilizzanti. I componenti IPA aggiunti al suolo erano i seguenti: fenantrene (PHEN), antracene (ANTR), fluorantene (FLT), pirene (PYR), crisene (CHRY), benzo[k]fluorantene (BKFLT), e benzo[a]pirene (BaPYR). Ciascun IPA è stato inizialmente aggiunto nella misura di 50 mg/kg di suolo.

Agente mobilizzante	Concentrazioni residue (mg/kg)						
	PHEN	ANTR	FLT	PYR	CHRY	BKFLT	BaPYR
Nessuno	6,2±1,9 ^{ac} [65,1]	11,3±0,9 ^a [56,3]	17,0±3,2 ^a [52,7]	20,2±0,2 ^a [44,3]	47,1±5,9 ^a [0,0]	34,7±0,7 ^{ac} [17,1]	33,7±2,4 ^{ac} [11,2]
Olio soia	28,4±1,9 ^b [24,1]	8,3±0,2 ^b [17,9]	29,7±1,1 ^b [25,6]	19,8±1,0 ^a [18,5]	31,6±2,1 ^b [28,8]	22,3±0,6 ^b [7,3]	9,0±0,3 ^b [66,5]
Tween 20	3,9±0,3 ^a [88,8]	9,0±1,5 ^b [68,1]	9,7±2,1 ^c [78,4]	13,5±1,4 ^b [69,9]	33,8±4,8 ^b [34,0]	32,7±2,9 ^a [17,1]	30,9±1,8 ^a [20,3]
Tween 80	5,4±1,5 ^{ac} [85,4]	9,6±0,8 ^{ab} [27,6]	12,0±0,8 ^{cd} [72,7]	15,1±1,3 ^b [64,1]	36,7±0,4 ^{bc} [13,0]	33,6±1,8 ^a [1,0]	30,5±0,4 ^a [1,0]
AV	27,8±1,2 ^b [0,0]	22,6±0,3 ^c [6,2]	31,8±0,7 ^b [23,6]	32,6±0,9 ^c [21,8]	39,7±1,8 ^{ab} [23,9]	33,3±0,6 ^a [10,5]	32,8±1,0 ^{ac} [0,0]
RAMEB	8,9±0,9 ^c [77,3]	11,7±0,2 ^a [61,1]	15,5±0,2 ^{ad} [63,2]	14,5±0,5 ^b [64,5]	45,2±1,2 ^c [0,0]	38,2±0,4 ^c [19,7]	35,4±2,1 ^c [0,0]

In parentesi quadra sono riportate le percentuali di rimozione, calcolate rispetto alla concentrazione residua degli IPA nel controllo di incubazione relativo, ottenuto preparando e successivamente incubando, nelle medesime condizioni il suolo non inoculato.

I dati sono media ± d.s. di tre repliche.

L'effetto degli agenti mobilizzanti è stato analizzato statisticamente all'interno dello stesso contaminante: valori sovrastati da lettere uguali indicano assenza di significatività come determinato mediante il test di Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabella 4.11 Concentrazioni residue dei singoli componenti della miscela di IPA presenti nel controllo di incubazione (suolo incubato non inoculato), per 6 settimane a 28°C in assenza ed in presenza di agenti mobilizzanti. I componenti IPA aggiunti al suolo erano i seguenti: fenantrene (PHEN), antracene (ANTR), fluorantene (FLT), pirene (PYR), crisene (CHRY), benzo[k]fluorantene (BKFLT), e benzo[a]pirene (BaPYR). Ciascun IPA è stato inizialmente aggiunto nella misura di 50 mg/kg di suolo.

Agente Mobilizzante	Concentrazioni residue (mg/kg)						
	PHEN	ANTR	FLT	PYR	CHRY	BKFLT	BaPYR
Nessuno	17,8± 0,7 ^a	26,0±2,3 ^{ac}	35,9±2,3 ^a	36,2±2,0 ^a	45,6±2,6 ^{ab}	41,9±2,3 ^a	37,9±1,1 ^a
Olio soia	37,4±3,5 ^{bd}	10,1±1,5 ^b	39,9±1,9 ^{ab}	24,3±2,1 ^b	44,3±3,3 ^{ab}	24,1±2,0 ^b	26,6±0,7 ^b
Tween 20	34,8±0,8 ^b	28,2±1,2 ^{ac}	45,1±2,0 ^b	44,7±0,6 ^c	50,0±3,0 ^a	39,4±2,5 ^{ac}	38,8±1,6 ^a
Tween 80	36,9±0,9 ^{bd}	13,3±1,0 ^b	44,0±3,1 ^b	41,9±2,6 ^c	42,2±2,1 ^b	33,6±2,2 ^{cd}	26,2±0,4 ^b
AV	25,9±0,7 ^c	24,1±1,8 ^a	41,6±0,6 ^b	41,6±0,8 ^c	50,0±1,1 ^a	37,2±2,5 ^{acd}	30,0±2,7 ^{bc}
RAMEB	35,5±0,5 ^d	30,2±1,4 ^c	42,2±1,0 ^b	40,7±1,8 ^{ac}	41,2±3,1 ^b	31,9±2,4 ^d	32,8±2,2 ^c

I dati sono media ± d.s. di tre repliche.

L'effetto degli agenti mobilizzanti è stato analizzato statisticamente all'interno dello stesso contaminante: valori sovrastati da lettere uguali indicano assenza di significatività come determinato mediante il test di Tukey ($P \leq 0,05$).

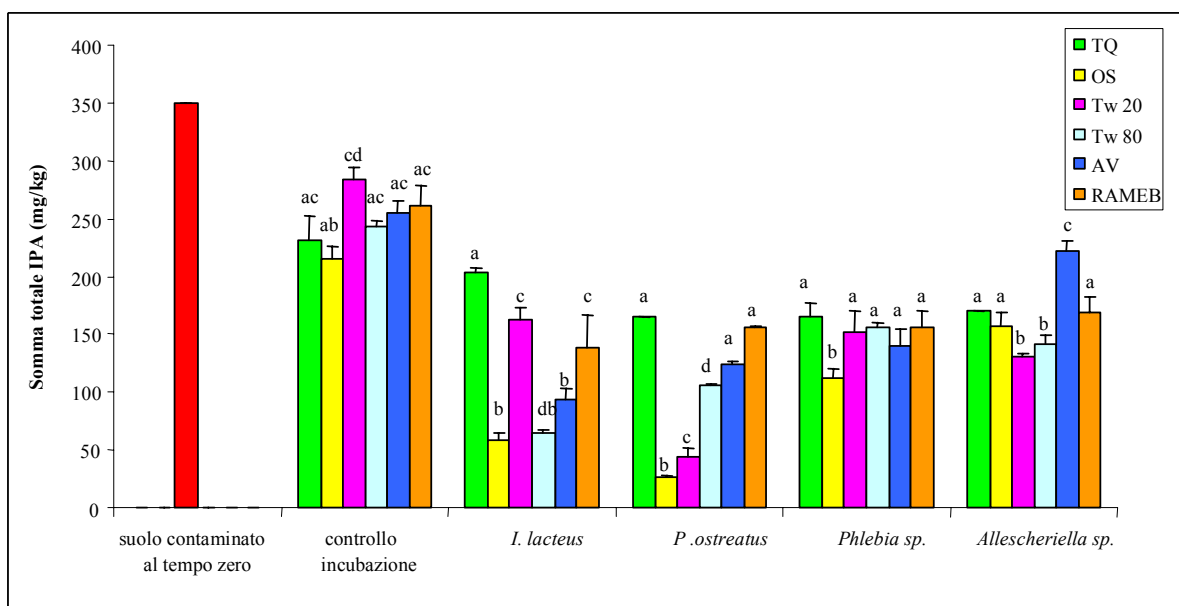


Figura 4.6 Concentrazione complessiva residua degli IPA su suoli colonizzati da *I. lacteus*, *P. ostreatus*, *Phlebia sp.* e *Allescheriella sp.* in assenza (TQ) e in presenza dei seguenti agenti mobilizzanti: olio di soia (OS), Tween 20 (T20), Tween 80 (T80), acque di vegetazione (AV) e ciclodestrine metilate (RAMEB).

I dati sono media $\pm$ d.s. di tre repliche.

L'effetto degli agenti mobilizzanti è stato analizzato statisticamente all'interno dei cinque gruppi di istogramma: barre sovrastate da lettere uguali indicano assenza di significatività come determinato mediante il test di Tukey ($P \leq 0,05$).

In tabella 4.12 sono riportate le concentrazioni residue e le percentuali di rimozione di ciascun singolo contaminante, calcolate come precedentemente riportato, per il suolo contaminato sottoposto ad aging e biottrattato con *P. ostreatus*. In questo caso, e sulla base dei risultati deludenti ottenuti con le RAMEB, si è ritenuto opportuno semplificare il piano sperimentale omettendole.

Anche in questo suolo si osservava, in assenza di agenti mobilizzanti, una degradazione preferenziale dell'antracene e del fenantrene rispetto agli altri componenti, come precedentemente riportato per il suolo contaminato di recente contaminazione.

L'impatto positivo degli additivi precedentemente osservato veniva confermato anche sulla matrice sottoposta ad aging. L'olio di soia sembrava sortire un risultato migliore su tutti i contaminanti, determinando anche la rimozione totale del benzo[a]pirene e un'elevata rimozione degli altri composti a più elevato peso molecolare che risultavano meno degradati sia in assenza di pretrattamenti sia in presenza degli altri additivi. Tali contaminanti, fluorantene, crisene e benzo[k]fluorantene, subivano abbattimenti percentuali rispetto ai controlli di incubazione omologhi variabili dal 55 al 93%.

Le deplezioni osservate nei terreni pretrattati con i due Tween risultavano inferiori a quelle ottenute nella matrice di recente contaminazione, soprattutto per quanto riguarda l'effetto del Tween 20 che ha dato risultati nettamente meno importanti in confronto alle prove precedenti, riduzione percentuale complessiva degli IPA del 43,7% rispetto all'84,8% sulla matrice di recente contaminazione.

Anche su suolo sottoposto ad aging, i risultati ottenuti con *P. ostreatus* in assenza di agenti mobilizzanti risultavano migliori di quelli con *I. lacteus*. (Tabella 4.13). L'olio di soia, anche in questo, caso forniva risultati superiori a quelli ottenuti con i Tween e le acque di vegetazione.

Andando a valutare la concentrazione complessiva residua degli IPA su suoli contaminati ad hoc e sottoposti ad aging e colonizzati al termine dell'incubazione (Figura 4.7) con *I. lacteus* o *P. ostreatus*, si confermava la superiorità di quest'ultimo in assenza di agenti mobilizzanti, come per altro già osservato per il suolo di recente contaminazione. Si confermava, inoltre, l'effetto positivo dell'olio di soia sui livelli di decontaminazione di entrambi i ceppi fungini.

Tabella 4.12 Concentrazioni residue dei singoli componenti della miscela di IPA presenti sul suolo sottoposto ad aging incubato con *Pleurotus ostreatus* per 6 settimane a 28 °C in assenza ed in presenza di agenti mobilizzanti. I componenti IPA aggiunti al suolo erano i seguenti: fenantrene (PHEN), antracene (ANTR), fluorantene (FLT), pirene (PYR), benzo[k]fluorantene (BKFLT) e benzo[a]pirene (BaPYR). Ciascun IPA è stato inizialmente aggiunto nella misura di 50 mg/kg di suolo.

Agente mobilizzante	Concentrazioni residue (mg/kg)						
	PHEN	ANTR	FLT	PYR	CHRY	BKFLT	BaPYR
Nessuno	16,3±2,1 ^a [52,5]	18,0±0,5 ^a [34,7]	29,6±1,1 ^a [21,3]	23,8±0,1 ^a [42,0]	31,5±7,7 ^a [6,6]	24,4±1,3 ^{ac} [19,5]	28,8±1,7 ^a [14,2]
Olio soia	2,8±0,4 ^b [85,7]	6,3±0,7 ^b [31,9]	7,3±0,5 ^b [71,2]	4,2±0,2 ^b [78,9]	11,9±0,3 ^b [55,7]	1,3±0,3 ^b [93,6]	0,0±0,0 ^b [100,0]
Tween 20	8,2±0,3 ^c [79,0]	6,7±0,6 ^b [25,7]	24,5±0,4 ^c [50,5]	16,1±0,5 ^c [67,5]	27,1±1,2 ^a [5,7]	23,3±3,9 ^a [28,6]	0,3±0,4 ^b [99,2]
Tween 80	5,9±0,5 ^c [74,6]	6,6±0,4 ^b [58,7]	21,8±2,0 ^c [32,9]	15,0±0,9 ^c [59,4]	31,8±0,6 ^a [19,3]	29,6±0,5 ^c [6,0]	3,5±0,0 ^b [87,7]
AV	5,8±0,1 ^c [78,0]	6,9±0,1 ^b [55,5]	16,4±1,5 ^d [46,6]	10,8±1,0 ^d [58,0]	28,4±1,0 ^a [0,0]	29,5±1,3 ^c [0,0]	10,1±3,0 ^c [61,5]

In parentesi quadra sono riportate le percentuali di rimozione, calcolate rispetto alla concentrazione residua degli IPA nel controllo di incubazione relativo, ottenuto preparando e successivamente incubando, nelle medesime condizioni il suolo non inoculato.

I dati sono media ± d.s. di tre repliche.

L'effetto degli agenti mobilizzanti è stato analizzato statisticamente all'interno dello stesso contaminante: valori sovrastati da lettere uguali indicano assenza di significatività come determinato mediante il test di Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabella 4.13 Concentrazioni residue dei singoli componenti della miscela di IPA presenti sul suolo sottoposto ad aging incubato con *Irpex lacteus* per 6 settimane a 28° C in assenza ed in presenza di agenti mobilizzanti. I componenti IPA aggiunti al suolo erano i seguenti: fenantrene (PHEN), antracene (ANTR), fluorantene (FLT), pirene (PYR), benzo[k]fluorantene (BKFLT) e benzo[a]pirene (BaPYR). Ciascun IPA è stato inizialmente aggiunto nella misura di 50 mg/kg di suolo.

Agente mobilizzante	Concentrazioni residue (mg/kg)						
	PHEN	ANTR	FLT	PYR	CHRY	BKFLT	BaPYR
Nessuno	28,5±1,8 ^a [16,1]	19,8±0,4 ^a [28,1]	29,8±5,1 ^a [20,9]	38,8±3,6 ^a [15,6]	29,3±3,7 ^a [26,4]	26,7±3,3 ^a [20,0]	32,6±2,5 ^a [2,8]
Olio soia	5,8±0,3 ^b [69,8]	5,7±0,5 ^b [37,9]	10,6±1,0 ^b [58,5]	6,5±0,2 ^b [67,6]	4,8±0,2 ^b [82,1]	1,3±0,1 ^b [93,5]	3,7±0,2 ^b [83,7]
Tween 20	20,4±1,4 ^a [47,7]	5,9±0,7 ^b [34,6]	26,9±2,6 ^{ac} [45,8]	20,9±0,5 ^c [58,0]	17,8±2,0 ^c [8,0]	16,4±2,3 ^c [49,7]	4,6±0,4 ^b [86,6]
Tween 80	15,1±2,6 ^c [35,4]	5,2±0,0 ^b [67,3]	23,0±0,1 ^{ac} [29,1]	19,0±0,4 ^{cd} [48,3]	22,4±1,1 ^c [43,1]	18,5±0,5 ^{ac} [41,3]	1,6±0,1 ^b [94,4]
AV	14,8±1,3 ^c [44,3]	6,4±1,0 ^b [58,5]	20,0±0,7 ^c [34,8]	16,1±0,1 ^d [37,4]	21,6±2,1 ^c [23,7]	19,1±1,3 ^{ac} [31,5]	10,6±1,7 ^c [59,8]

In parentesi quadra sono riportate le percentuali di rimozione, calcolate rispetto alla concentrazione residua degli IPA nel controllo di incubazione relativo, ottenuto preparando e successivamente incubando, nelle medesime condizioni il suolo non inoculato.

I dati sono media ± d.s. di tre repliche.

L'effetto degli agenti mobilizzanti è stato analizzato statisticamente all'interno dello stesso contaminante: valori sovrastati da lettere uguali indicano assenza di significatività come determinato mediante il test di Tukey ($P \leq 0,05$).

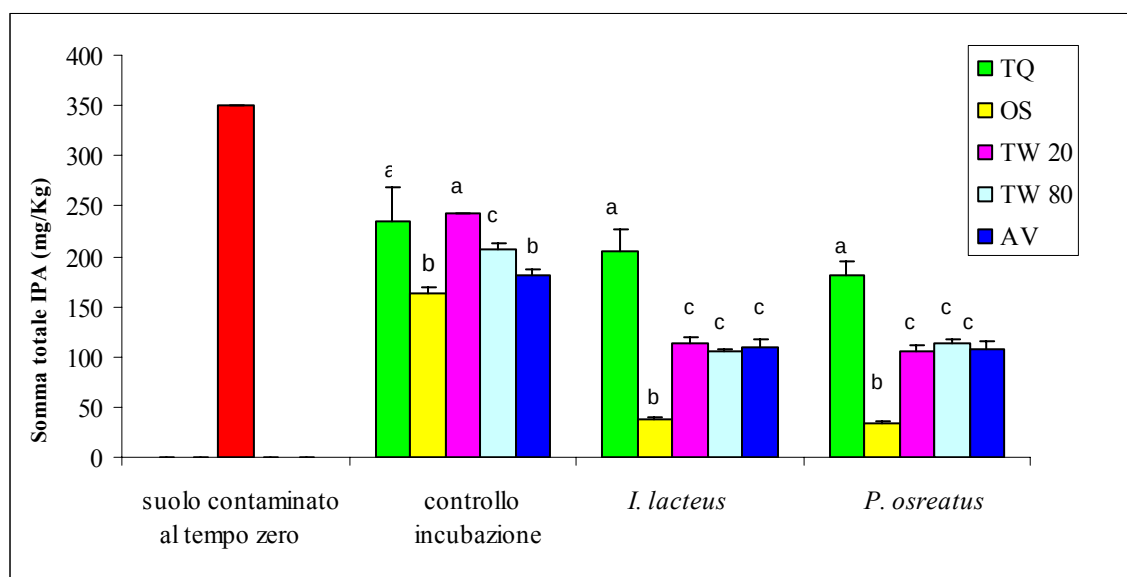


Figura 4.7 Concentrazione complessiva residua degli IPA su suoli contaminati ad hoc, sottoposti ad aging e colonizzati da *I. lacteus* e *P. ostreatus*, in assenza (TQ) e in presenza dei seguenti agenti mobilizzanti: olio di soia (OS), Tween 20 (T20), Tween 80 (T80), acque di vegetazione (AV) e ciclodestrine metilate (RAMEB).

I dati sono media $\pm$ d.s. di tre repliche. L'effetto degli agenti mobilizzanti è stato analizzato statisticamente all'interno dei tre gruppi di istogramma: barre sovrastate da lettere uguali non sono risultate differenti per $P < 0,05$ secondo il Tukey Test.

4.4 Produzione di enzimi ligninolitici su suolo contaminato ad hoc

Nel corso delle prove sono state dosate le attività di alcuni enzimi extracellulari ligninolitici potenzialmente coinvolti nella degradazione degli IPA nel suolo modello contaminato ad hoc in laboratorio.

Lo spettro delle attività enzimatiche prodotte dai ceppi *Pleurotus ostratus* e *Irpex lacteus* impiegati in questo studio è ampiamente descritto in letteratura (Shah e Nerud, 2002; Hammel, 1995; Novotny *et al.*, 2000). Il primo è noto per essere un buon produttore di laccasi, manganese perossidasi e aril-alcool ossidasi (AAO). La AAO viene prodotta nel corso del metabolismo secondario e assolve alla duplice funzione di fornire perossido di idrogeno per il funzionamento delle perossidasi nonché di evitare la ripolimerizzazione di specie radicaliche. *I. lacteus*, oltre agli enzimi sopra menzionati, produce anche lignina perossidasi.

I due ceppi isolati nel suolo contaminato, *Phlebia* sp. e *Allescheriella* sp., sono stati precedentemente testati in cultura agitata su diversi terreni di coltura al fine di caratterizzare i ceppi per quanto riguarda il loro spettro enzimatico (D'Annibale *et al.*, 2006). La laccasi è stato l'unico enzima ligninolitico prodotto in cultura agitata da entrambi i ceppi, mentre nei suoli storicamente contaminati dai quali sono stati isolati e successivamente sottoposti a micorisanamento sono stati rilevati enzimi lignina perossidasi e manganese perossidasi.

In Tabella 4.14 sono riportate le produzioni di enzimi ligninolitici riscontrate su suolo in assenza ed in presenza di agenti mobilizzanti al termine del periodo di incubazione con *I. lacteus*. In generale, indipendentemente dalle condizioni, non è stata riscontrata né attività lignina perossidasi né aril-alcool ossidasi. Inoltre, i livelli più elevati di produzione enzimatica sono stati rilevati in assenza di additivi, in particolare per quanto concerne l'attività manganese perossidasi (217 mUI/g suolo) e quella laccasica (26,8 mIU/g suolo).

Le attività ligninolitiche su suolo colonizzato da *P. ostreatus* risultavano in generale superiori a quelle rilevate con *I. lacteus*. Anche in questo caso, le attività più alte si ottenevano in assenza di additivi, fatta esclusione per i suoli contenenti Tween 80 che esibivano livelli di attività enzimatiche comparabili al controllo (Tabella 4.15).

Tabella 4.14 Attività enzimatiche ligninolitiche e proteine solubili rilevate al termine del biotattamento (6 settimane a 28°C) con *Irpex lacteus* in assenza e in presenza degli agenti mobilizzanti.

Agente mobilizzante	Attività enzimatiche (mUI/g suolo)					Proteine solubili (µg/g suolo)	
	Laccasi		Mn-perossidasi	Ligninasi	Aril-alcool Ossidasi	Tirosinasi	
	DMP	ABTS					
Nessuno	26,8 ± 2,2 ^a	2,2 ± 0,3 ^a	217,0 ± 35,1 ^a	n.r. ^a	n.r. ^a	n.r. ^a	0,86 ± 0,0 ^a
Olio soia	8,2 ± 4,1 ^b	5,0 ± 1,0 ^b	n.r. ^b	n.r. ^a	n.r. ^a	n.r. ^a	0,65 ± 0,0 ^a
Tween 20	6,0 ± 1,2 ^b	1,5 ± 0,2 ^a	n.r. ^b	n.r. ^a	n.r. ^a	n.r. ^a	0,82 ± 0,1 ^a
Tween 80	12,1 ± 2,3 ^b	2,2 ± 0,4 ^a	50,5 ± 10,8 ^c	n.r. ^a	n.r. ^a	1,0 ± 0,2 ^a	0,70 ± 0,1 ^a
AV	18,1 ± 1,2 ^a	1,0 ± 0,3 ^a	n.r. ^b	n.r. ^a	n.r. ^a	5,35 ± 1,2 ^b	0,85 ± 0,0 ^a
RAMEB	15,1 ± 3,3 ^b	2,6 ± 0,1 ^a	n.r. ^b	n.r. ^a	n.r. ^a	4,4 ± 0,9 ^b	0,94 ± 0,2 ^a

Legenda: n.r., non rilevata, DMF, 2,6 dimetossifenolo; ABTS, 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato).

I dati sono media ± d.s. di tre repliche.

L'effetto degli agenti mobilizzanti è stato analizzato statisticamente all'interno della colonna: valori sovrastati da lettere uguali indicano assenza di significatività come determinato mediante il test di Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabella 4.15 Attività enzimatiche ligninolitiche e proteine solubili rilevate al termine del biottrattamento (6 settimane a 28°C) con *Pleurotus ostreatus* in assenza (controllo) e presenza degli agenti mobilizzanti.

Agente Mobilizzante	Attività enzimatiche (mUI/g suolo)					Proteine solubili (µg/g suolo)	
	Laccasi		Mn-perossidasi	Ligninasi	Aril-alcool Ossidasi	Tirosinas	
	DMP	ABTS					
Nessuno	25,3 ± 6,0 ^a	6,7 ± 0,2 ^{ab}	498,8 ± 30,7 ^a	n.r. ^a	n.r. ^a	n.r. ^a	0,64 ± 0,0 ^a
Olio soia	7,7 ± 1,6 ^b	3,6 ± 0,7 ^a	n.r. ^b	n.r. ^a	n.r. ^a	n.r. ^a	0,56 ± 0,1 ^a
Tween 20	15,2 ± 6,5 ^{ba}	12,3 ± 3,2 ^{bc}	n.r. ^b	n.r. ^a	n.r. ^a	n.r. ^a	0,64 ± 0,0 ^a
Tween 80	26,1 ± 3,4 ^a	15,7 ± 3,1 ^c	513,7 ± 92,7 ^a	n.r. ^a	n.r. ^a	1,4 ± 0,3 ^b	0,74 ± 0,0 ^a
AV	10,2 ± 0,0 ^b	11,9 ± 3,4 ^{bc}	n.r. ^b	n.r. ^a	n.r. ^a	n.r. ^a	0,80 ± 0,1 ^a
RAMEB	9,6 ± 2,5 ^b	7,5 ± 3,8 ^{ab}	n.r. ^b	n.r. ^a	n.r. ^a	2,6 ± 0,2 ^c	0,78 ± 0,1 ^a

Legenda: n.r., non rilevata, DMF, 2,6 dimetossifenolo; ABTS, 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato).

I dati sono media ± d.s. di tre repliche.

L'effetto degli agenti mobilizzanti è stato analizzato statisticamente all'interno della colonna: valori sovrastati da lettere uguali indicano assenza di significatività come determinato mediante il test di Tukey ($P \leq 0,05$).

In Tabella 4.16 sono riportati i valori di tali attività riscontrate su suolo in assenza ed in presenza di agenti mobilizzanti al termine del periodo di incubazione con *Phlebia* sp.

Tra queste, la più rilevante da un punto di vista quantitativo era quella MnP-asica, che risultava peraltro stimolata rispetto al controllo nei suoli contenenti Tween 20 (549,8 mUI/g suolo) e AV (494,0 mUI/g suolo).

La presenza di agenti mobilizzanti, invece, non determinava aumenti significativi nei livelli di attività laccasica di *Phlebia* sp. rispetto a quelli rilevati in assenza dei additivi stessi. Anche l'attività ligninasica veniva stimolata significativamente dalla presenza del Tween 80, delle AV e delle RAMEB. Le attività aril-alcool ossidasica e tirosinasica, che non venivano rilevate nei suoli in assenza di pretrattamento, risultavano essere elicitate dalla presenza di Tween, AV e ciclodestrine metilate.

Nelle prove condotte con *Allescheriella* sp. si riscontravano, in assenza degli agenti mobilizzanti, dei livelli di attività laccasica e ligninasica (Tabella 4.17) nettamente inferiori a quelli registrati con *Phlebia* sp. nelle stesse condizioni. Inoltre, in assenza di pretrattamento non venivano rilevate attività MnP-asica, ligninasica, tirosinasica e aril-alcool ossidasica. Tra gli agenti sottoposti ad indagine, il più efficiente nello stimolare la produzione di enzimi ligninolitici era il Tween 20: in particolare, l'attività laccasica, presenta anche nel controllo, veniva incrementata di un fattore pari a circa 11, inoltre, si riscontravano significativi livelli di attività MnP-asica, ligninasica e tirosinasica (69,8, 59,5 e 42,6 mUI/g suolo, rispettivamente). Per quanto riguarda il Tween 20, vale la pena di ricordare che esso esercita un effetto stimolante sul rilascio di diversi enzimi extracellulari (Katic *et al.*, 1998; Urek e Pazarlioglu, 2005) e questo è in linea con quanto precedentemente riportato per *Allescheriella* sp., sia per quanto riguarda le prestazioni degradative, sia per quanto concerne la stimolazione della produzione di attività ligninolitiche.

Le Tabelle 4.16 e 4.17 mostrano chiaramente che i livelli di attività enzimatica più elevati per quanto concerne gli enzimi ligninolitici erano quelli relativi alla manganese perossidasi. Si può notare inoltre, che l'attività MnP-asica più alta si otteneva nei suoli non pretrattati o pretrattati con i Tween.

Per quanto riguarda il Tween 80, è noto che esso esercita un effetto stimolante sul rilascio di diversi enzimi extracellulari (Katic *et al.*, 1998; Urek e Pazarlioglu, 2005). E' stato riportato, inoltre, che il Tween 80, in virtù del suo contenuto in catene aciliche mono-insature suscettibili all'azione della manganese perossidasi, è in grado di stimolare la degradazione del fenantrene e del fluorene da parte del fungo *Phanerochaete chrysosporium* (Moen e

Hammel, 1994; Bogan *et al.*, 1996). Infatti, il Mn^{3+} generato enzimaticamente è in grado di attaccare acidi grassi insaturi o lipidi contenenti catene aciliche insature formando radicali idroperossido, i quali sono in grado, a loro volta, di ossidare alcuni IPA (Dix *et al.*, 1985).

In ogni caso, non va trascurato il fatto che un utilizzo del Tween 80 al fine di generare perossi-radicali avrebbe presupposto l'aggiunta concomitante di Mn^{2+} e, possibilmente, di composti in grado di stabilizzare il Mn^{3+} da esso derivato, quali acidi organici (Hofrichter, 2002).

In questo studio, la laccasi è stata rilevata in tutte le condizioni sottoposte ad indagine con livelli di attività oscillanti tra 0,5 e 27 mUI/g di suolo. Il coinvolgimento di questo enzima nell'ossidazione degli IPA è noto dalla letteratura scientifica. In particolare, è stato mostrato come la laccasi sia in grado di ossidare un'ampia gamma di IPA ad eccezione del naftalene, del fenantrene e del fluorene persino in assenza di mediatori redox (Majcherczyk *et al.*, 1998) dando luogo alla formazione dei dioni derivati (Majcherczyk *et al.*, 1998).

L'efficienza di ossidazione degli IPA da parte della laccasi viene ad essere notevolmente aumentata in presenza di alcuni mediatori sintetici, quali N-idrossibenzotriazolo (HBT) (Bohmer *et al.*, 1998), o naturali come nel caso dell'acido 4-idrossibenzoico (Johannes e Majcherczyk, 2000). E' stato inoltre mostrato come l'efficienza di ossidazione degli IPA da parte del sistema laccasi/HBT non sia strettamente correlato al potenziale di ionizzazione (IP) né tantomeno al potenziale di semi-onda degli IPA stessi (Majcherczyk *et al.*, 1998). Tale correlazione con l'IP era stata, invece, segnalata nell'ossidazione degli IPA da parte della lignina perossidasi (LiP) di *P. chrysosporium* (Bogan e Lamar, 1995). Inoltre, era stato suggerito che gli IPA con IP > 7.55 eV non fossero suscettibili all'azione ossidativa della LiP e della MnP (Bogan e Lamar, 1995).

Nel nostro studio, non è stata trovata alcuna correlazione tra i livelli di deplezione degli IPA e il loro IP. Non è stata inoltre riscontrata alcuna significativa correlazione rapportando i livelli di attività dei singoli enzimi o quelli cumulativi all'entità della deplezione degli IPA. Questo può essere giustificato tenendo presente che la metabolizzazione degli IPA da parte dei funghi white-rot è un processo sinergico che coinvolge altri tipi di enzimi a localizzazione intra-cellulare, quali citocromo P-450 mono-ossigenasi e epossido idrolasi (Bezalel *et al.*, 1997; Cameron *et al.*, 2000).

Tabella 4.16 Attività enzimatiche ligninolitiche e proteine solubili rilevate al termine del biottrattamento (6 settimane a 28°C) con *Phlebia sp.* in assenza e in presenza degli agenti mobilizzanti.

Agente mobilizzante	Attività enzimatiche (mUI/g suolo)					Proteine solubili (µg/g suolo)	
	Laccasi		Mn-perossidasi	Ligninasi	Aril-alcool Ossidasi	Tirosinasi	
	DMF	ABTS					
Nessuno	6,35 ± 0,7 ^a	8,37 ± 4,5 ^a	234,52 ± 19,3 ^a	29,82 ± 3,5 ^a	n.r. ^a	n.r. ^a	0,17 ± 0,0 ^a
Olio soia	6,79 ± 1,3 ^a	8,22 ± 3,4 ^a	253,32 ± 30,0 ^a	73,41 ± 14,1 ^{ab}	n.r. ^a	n.r. ^a	0,18 ± 0,0 ^a
Tween 20	8,91 ± 0,1 ^a	13,62 ± 0,4 ^a	549,85 ± 5,3 ^b	n.r.	n.r. ^a	1,45 ± 0,5 ^a	0,25 ± 0,0 ^a
Tween 80	8,20 ± 2,4 ^a	9,69 ± 0,1 ^a	112,61 ± 9,0 ^c	116,45 ± 8,9 ^{cb}	42,15 ± 13,7 ^a	0,66 ± 0,0 ^a	0,33 ± 0,1 ^a
AV	9,29 ± 5,0 ^a	9,31 ± 1,2 ^a	494,04 ± 0,7 ^b	88,17 ± 22,4 ^{cb}	n.r. ^a	1,48 ± 0,7 ^a	1,49 ± 1,2 ^b
RAMEB	13,99 ± 5,1 ^a	10,20 ± 2,6 ^a	235,32 ± 45,3 ^a	80,52 ± 5,2 ^{cb}	11,72 ± 1,9 ^b	1,45 ± 0,8 ^a	0,35 ± 0,1 ^a

Legenda: n.r., non rilevata, DMF, 2,6 dimetossifenolo; ABTS, 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato).

I dati sono media ± d.s. di tre repliche.

L'effetto degli agenti mobilizzanti è stato analizzato statisticamente all'interno della colonna: valori sovrastati da lettere uguali indicano assenza di significatività come determinato mediante il test di Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabella 4.17 Attività enzimatiche ligninolitiche e proteine solubili rilevate al termine del biottrattamento (6 settimane a 28°C) con *Allescheriella sp.* in assenza e in presenza degli agenti mobilizzanti.

Agente mobilizzante	Attività enzimatiche (mUI/g suolo)					Proteine solubili (µg/g suolo)	
	Laccasi		Mn-perossidasi	Ligninasi	Aril-ailcool ossidasi	Tirosinasi	
	DMF	ABTS					
Nessuno	0,48 ±0,3 ^a	1,49± 0,3 ^a	n.r. ^a	n.r. ^a	n.r. ^a	n.r. ^a	0,16±0,0 ^a
Olio soia	6,15±0,3 ^a	0,77±0,3 ^a	n.r. ^a	n.r. ^a	n.r. ^a	n.r. ^a	0,21±0,1 ^a
Tween 20	6,35±3,4 ^a	1,69±0,05 ^a	69,83±29,0 ^a	59,52±3,7 ^a	42,62±17,7 ^a	n.r. ^a	0,25±0,1 ^a
Tween 80	1,38 ±0,2 ^a	1,76±0,3 ^a	n.r. ^a	21,41±6,7 ^b	n.r. ^a	n.r. ^a	0,28±0,0 ^a
AV	20,91±6,6 ^b	24,65±4,3 ^b	n.r. ^a	n.r. ^a	n.r. ^a	n.r. ^a	0,79±0,3 ^a
RAMEB	n.r. ^a	3,25±0,3 ^a	202,47±51,5 ^b	n.r. ^a	n.r. ^a	2,60±0,2 ^a	0,65±0,1 ^a

Legenda: n.r., non rilevata, DMF, 2,6 dimetossifenolo; ABTS, 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato).

I dati sono media ± d.s. di tre repliche.

L'effetto degli agenti mobilizzanti è stato analizzato statisticamente all'interno della colonna: valori sovrastati da lettere uguali indicano assenza di significatività come determinato mediante il test di Tukey ($P \leq 0,05$).

4.5 Analisi di ecotossicità del suolo contaminato ad hoc e biotrattato

Al fine di verificare se i trattamenti condotti con funghi avessero dato luogo ad una effettiva detossificazione del suolo, sono state condotte delle prove di fitotossicità basate sulla germinazione e sulla lunghezza della radichetta utilizzando il crescione inglese (*Lepidium sativum* L.) e dei test di mortalità condotti sul Collembolo *Folsomia candida*.

Denominatore comune delle prove di fitotossicità è l'inibizione della germinazione e dell'allungamento radicale in presenza di additivi. Non sono state riscontrate differenze significative tra le prove condotte con i funghi e i relativi controlli di incubazione, indipendentemente dalla presenza o assenza degli agenti mobilizzanti (dati non mostrati).

L'unica eccezione è rappresentata da un incremento di germinabilità nei suoli incubati con *P. ostreatus* in presenza di olio di soia (Tabella 4.18). Tuttavia, tale incremento di germinabilità è dovuto ad una significativa inibizione della germinabilità dovuta all'aggiunta dell'olio che risultava totale nel tempo zero e si attenuava nei controlli di incubazione.

Questa evidenza suggerisce l'opportunità di abbassare la concentrazione di questo agente solubilizzante a patto che tale variazione non comporti una riduzione della deplezione degli IPA. A questo proposito va specificato che gli altri agenti mobilizzanti nelle concentrazioni impiegate non esercitavano un significativo effetto inibente sulla germinazione dei semi. Al contrario, andando a considerare, invece, la lunghezza della radichetta si osservava che anche le acque di vegetazione, oltre all'olio di soia, esercitavano un effetto inibitorio. Inoltre, nei suoli non pretrattati e in quelli pretrattati con Tween 80 e ciclodestrine metilate e successivamente incubati con *P. ostreatus* si osservava un significativo effetto inibitorio sul processo di allungamento radicale (Tabella 4.18).

Tabella 4.18 Germinabilità percentuale e lunghezza media della radichetta di *Lepidium sativum* L. dopo 48 h di incubazione a 25 °C in presenza dei suoli trattati con *P. ostreatus* in presenza ed in assenza di agenti mobilizzanti dei controlli di incubazione (CI) omologhi.

Agente mobilizzante	Germinabilità (%)	Lunghezza radichetta (mm)
Nessuno/ CI	51,4 ± 5,6 ^{acd}	11,2 ± 0,4 ^a
Nessuno / <i>P. ostreatus</i>	48,5 ± 4,8 ^{acd}	8,9 ± 0,3 ^b
Olio soia / CI	10,0 ± 1,8 ^b	1,5 ± 0,2 ^c
Olio soia / <i>P. ostreatus</i>	42,1 ± 1,8 ^a	6,0 ± 1,0 ^{de}
Tween 20 / CI	53,5 ± 4,1 ^{cd}	9,9 ± 0,7 ^{ab}
Tween 20 / <i>P. ostreatus</i>	54,2 ± 3,9 ^{cd}	8,5 ± 0,6 ^b
Tween 80 / CI	47,8 ± 2,4 ^{acd}	12,0 ± 1,0 ^a
Tween 80 / <i>P. ostreatus</i>	49,3 ± 4,4 ^{acd}	7,2 ± 0,4 ^d
AV / CI	48,6 ± 4,2 ^{acd}	5,7 ± 0,2 ^e
AV / <i>P. ostreatus</i>	45,0 ± 6,1 ^{ac}	7,2 ± 0,7 ^d
RAMEB / CI	55,7 ± 4,3 ^d	14,8 ± 0,4 ^f
RAMEB / <i>P. ostreatus</i>	50,0 ± 2,7 ^{acd}	5,2 ± 0,3 ^e

Legenda: I dati sono media ± d.s. di tre repliche.

L'effetto degli agenti mobilizzanti è stato analizzato statisticamente all'interno della colonna: valori sovrastati da lettere uguali indicano assenza di significatività come determinato mediante il test di Tukey ($P \leq 0,05$).

Il test di mortalità condotto sul Collembolo *Folsomia candida* indicava che gli IPA presenti sul suolo esercitavano un significativo effetto tossico, evidenziato da una mortalità percentuale intorno al 50% (Figura 4.8). Tale effetto tossico risultava significativamente aumentato in presenza degli agenti mobilizzanti, presumibilmente a causa di un'aumentata mobilizzazione degli IPA indotta dagli agenti stessi.

E' interessante notare, inoltre, come in assenza di questi additivi la mortalità nei suoli biottrattati con i funghi non differisse ne' dal suolo contaminato ne' dal relativo controllo di incubazione, ad eccezione del suolo incubato con *Allescheriella* sp.; in questo caso le percentuali di mortalità erano analoghe a quelle del suolo non contaminato (Tabella 4.19).

Nei suoli trattati con *P. ostreatus* e *I. lacteus* non si osservavano differenze significative nelle percentuali di mortalità rispetto ai controlli di incubazione omologhi sia in assenza sia in presenza di additivi (dati non mostrati).

Andando a valutare l'impatto della presenza degli agenti mobilizzanti sulla detossificazione in colture di *Phlebia* sp, si osservava una riduzione significativa della mortalità solo nelle prove condotte con Tween 80 e RAMEB rispetto al terreno colonizzato in assenza di additivi (33 e 10 vs. 77% di mortalità, rispettivamente) (Fig. 4.8).

Nelle prove condotte con *Allescheriella* sp., si osservava, invece, in assenza degli agenti mobilizzanti una fortissima riduzione di mortalità. L'aggiunta di questi non forniva risultati significativamente diversi rispetto a questa condizione di controllo.

In sostanza, questi risultati mostrano che *Allescheriella* sp. è molto più efficiente degli altri funghi nel detossificare il suolo in questione e che in queste condizioni la riduzione di tossicità non viene aumentata dall'azione degli agenti mobilizzanti.

Tabella 4.19 Numero di sopravvissuti del Collembolo *Folsomia candida* nel suolo contaminato al tempo zero, nel controllo di incubazione (CI) e nel suolo biottrattato con *I. lacteus*, *P. ostreatus*, *Phlebia* sp. ed *Allescheriella* sp.

Agente mobilizzante	Numero Sopravvissuti
Suolo contaminato al tempo zero	$3,7 \pm 1,5^a$
Nessuno / CI	$6,0 \pm 2,6^{ab}$
Nessuno/ <i>I. lacteus</i>	$5,0 \pm 2,0^a$
Nessuno/ <i>P. ostreatus</i>	$6,0 \pm 0,0^{ab}$
Nessuno/ <i>Phlebia</i> sp.	$5,5 \pm 0,7^{ab}$
Nessuno/ <i>Allescheriella</i> sp.	$9,33 \pm 1,1^b$

I suoli sono stati inizialmente incubati con 10 collemboli.

I dati sono media $\pm$ d.s. di tre repliche.

L'effetto degli agenti mobilizzanti è stato analizzato statisticamente all'interno della colonna: valori sovrastati da lettere uguali indicano assenza di significatività come determinato mediante il test di Tukey ($P \leq 0,05$).

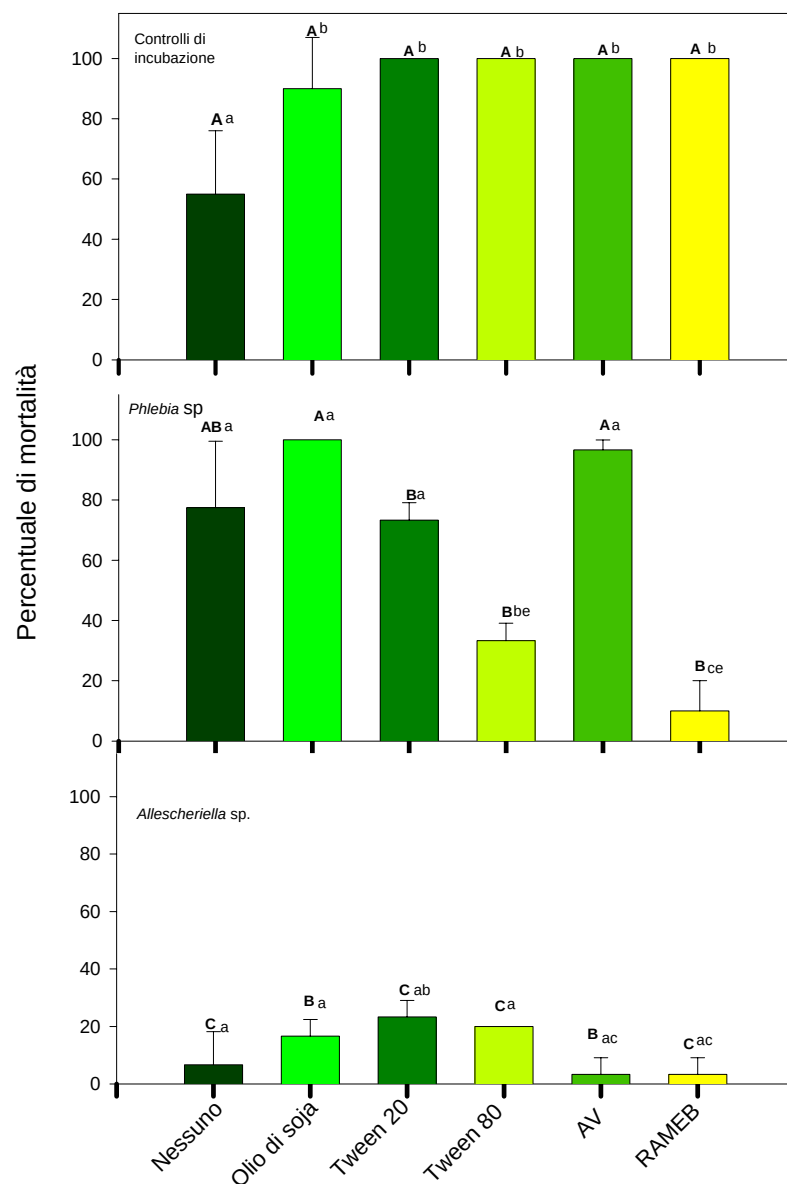


Figura 4.8 Percentuale di mortalità del Collembolo *Folsomia candida* nel controllo di incubazione e nel suolo biottrattato con *Phlebia* sp. ed *Allescheriella* sp. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard dei dati. Sulla base del test di Tukey ($P < 0.05$) a lettere minuscole uguali non corrispondono differenze significative nell'ambito dello stesso ceppo, a lettere maiuscole uguali non corrispondono differenze significative nell'ambito di trattamenti omologhi.

4.6 Effetto degli agenti mobilizzanti sulla crescita microbica del suolo contaminato ad hoc

Le conte batteriche effettuate sui controlli di incubazione indicavano un netto decremento della carica microbica in presenza di tutti gli agenti mobilizzanti, ad eccezione del Tween 20. Al contrario, la carica batterica nel controllo condotto in assenza agenti mobilizzanti non variava significativamente nel corso dell'incubazione (Figura 4.9).

Nel suolo oggetto di indagine, conte vitali fungine effettuate con terreni agarizzati selettivi, mostravano che la microflora fungina veniva, invece, stimolata dalla presenza delle AV e dei due Tween. Questi risultati preliminari indicavano come l'aggiunta di agenti mobilizzanti determinasse modifiche a livello di carica microbica, sia fungina che batterica, perciò è verosimile immaginare che questi agenti mobilizzanti possano avere un impatto anche nella composizione qualitativa della microflora autoctona. Tali modifiche qualitative potrebbero portare, ad esempio, ad una selezione di specie in grado di abbattere e/o degradare i contaminanti presenti nella matrice in questione. I dati illustrati in figura 4.6, messi in relazione alle “performance” degradative, mostravano tuttavia come anche nelle situazioni in cui si evidenziava una netta diminuzione nella microflora batterica (caso di olio di soia e AV), le prestazioni degradative del sistema non differivano significativamente da situazione in cui tali decrementi non sono stati osservati.

Sono, pertanto, previste ulteriori sperimentazioni con tecniche molecolari, quali DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) e T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), finalizzate ad ottenere questo tipo di informazioni. Infatti, è ragionevole pensare che nelle condizioni di non sterilità che caratterizzano gli interventi di micorisanamento possano instaurarsi delle interazioni tra la microflora autoctona e l'inoculante esogeno che determinano le prestazioni degradative finali del sistema. L'acquisizione, quindi, di questo tipo di informazioni consentirebbe di avere un quadro più chiaro della situazione e di modulare in maniera più fine le condizioni di micorisanamento.

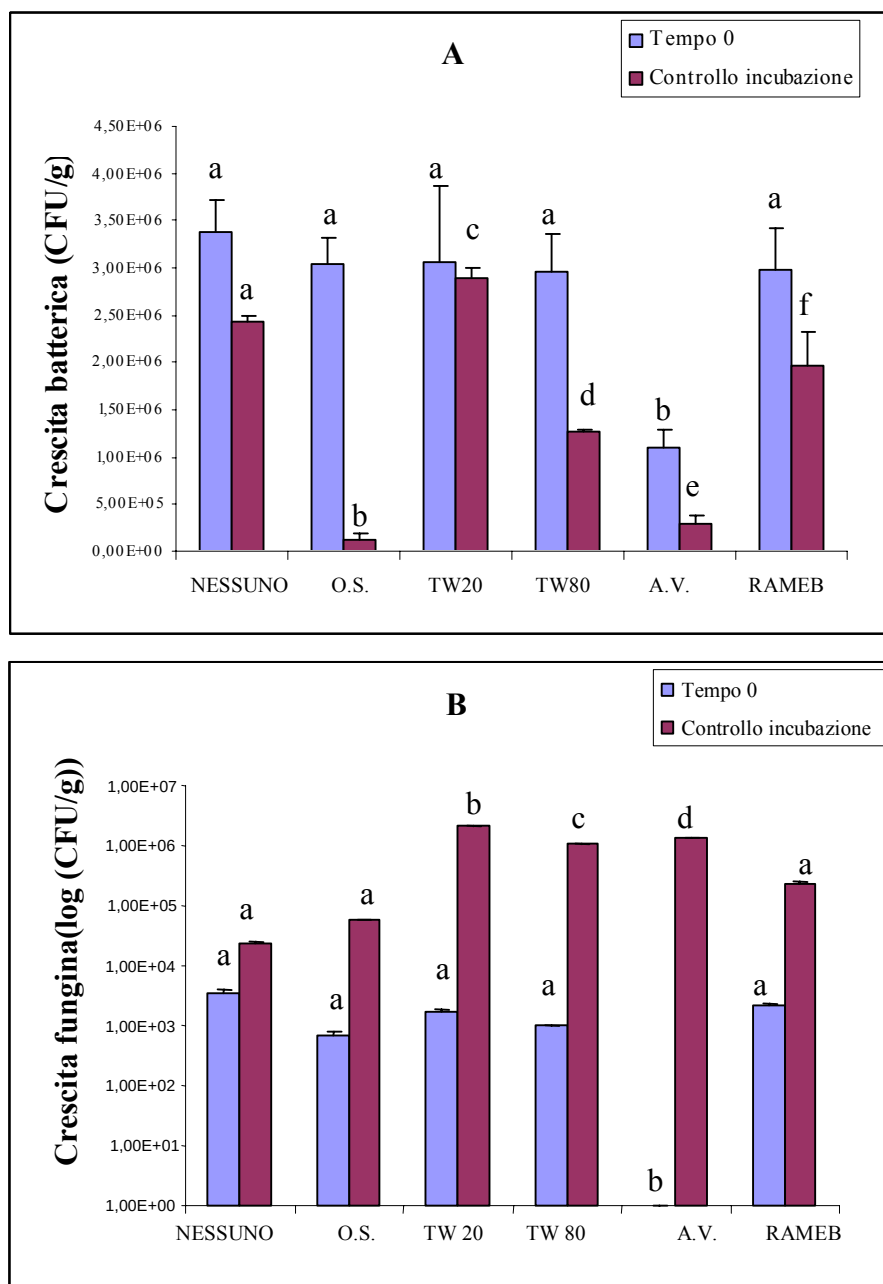


Figura 4.9 Effetto degli agenti mobilizzanti sulla crescita batterica (A) e fungina (B) al tempo iniziale e nel controllo di incubazione. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard dei dati. Sulla base del test di Tukey ($P \leq 0.05$) a lettere uguali non corrispondono differenze significative.

4.7 Degradazione di idrocarburi policiclici aromatici in suoli storicamente contaminati

Al fine di verificare se le indicazioni fornite dai risultati ottenuti sui suoli modelli contaminati in laboratorio fossero estendibili anche a matrici reali, sono state condotte delle prove di biorisanamento su due suoli storicamente contaminati da idrocarburi policiclici aromatici. I due suoli provenienti dalla Repubblica Ceca, uno, S1, da un antico gasometro della compagnia ČPP Transgas di Praga, l'altro, S2, da uno stabilimento per il trattamento del legno in Sobeslav, erano significativamente differenti sia per la concentrazione totale di idrocarburi policiclici aromatici (2320 e 612 mg IPA/kg) sia per la relativa quantità di frazione non biodisponibile (4,0 e 32%, rispettivamente). In più, nel suolo S1 fenantrene, fluorantene e pirene erano di gran lunga gli agenti inquinanti più abbondanti, rispettivamente 41,3, 34 e 17,4% della concentrazione totale degli IPA.

Anche in questo suolo si osservava, in assenza di additivi, una degradazione preferenziale dell'antracene e del fenantrene rispetto agli altri componenti, come precedentemente riportato per i suoli contaminati "ad hoc".

Le analisi di HPLC rilevavano che *P. ostreatus*, in assenza di agenti mobilizzanti, degradava fortemente i contaminanti a 3 e 4 anelli in entrambe le matrici contaminate (con abbattimenti medi di circa 73 e 58% per S1 e S2, rispettivamente), (Tabella 4.20 e 4.21), mentre nel suolo S2, in assenza di additivi, i composti ad elevato peso molecolare, che presentavano generalmente una frazione non biodisponibile, superiore all'80%, venivano degradati in modo trascurabile da *P. ostreatus*. Tra gli additivi impiegati nel presente studio l'olio di soia e, in misura minore, il Tween 80 determinavano, in entrambi i suoli, un aumento della degradazione degli IPA ad elevato peso molecolare da parte di *P. ostreatus*.

In assenza di additivi *I. lacteus* era più efficiente di *P. ostreatus* nella degradazione degli IPA a 3 e 4 anelli nel suolo S1, mentre nel suolo S2 tali contaminanti erano degradati in modo analogo da entrambi i funghi.

Come emerge dalla tabella 4.20, ad eccezione dei composti a più elevato peso molecolare l'aggiunta degli agenti mobilizzanti ha ridotto le prestazioni degradative di *I. lacteus* in entrambi i suoli.

Tuttavia, l'olio di soia e le acque di vegetazione hanno stimolato la deplezione dei contaminanti meno biodisponibili quali benzo[a]pirene, dibenzoantracene, benzo[ghi]perilene e indenopirene nel suolo S1, anche se questi erano inquinanti secondari.

Risultati simili sono stati osservati con l'olio di soia e il Tween 80 nel suolo S2 in cui la degradazione di benzo[a]pirene, benzo[ghi]perilene ed indenopirene, era significativamente superiore a quella osservata in assenza di additivi.

I coefficienti di correlazione tra la frazione biodisponibile e la porzione degradata sono riportati nelle tabelle 4.20 e 4.21. In assenza di agenti mobilizzanti ed indipendentemente dalla combinazione suolo/ceppo fungino, i valori di questi coefficienti oscillano tra 0,60 e 0,83. In presenza di additivi, i valori di R^2 erano generalmente superiore a 0,45 per la maggior parte delle combinazioni fungo/suolo/additivo ad eccezione del suolo S1 pretrattato con OMW, dove questi valori ammontavano a 0,17 nel biottrattamento con *I. lacteus* e 0,19 nel caso di *P. ostreatus*.

Concludendo in assenza di additivi la performance degradativa di entrambi i funghi era elevata nel suolo S1, con la minore frazione non biodisponibile, mentre nel suolo S2 caratterizzato da un'elevata frazione non biodisponibile, l'aggiunta di olio di soia aumentava significativamente la performance degradativa di entrambi i funghi. L'effetto degli additivi era evidente soprattutto nella degradazione dei composti meno biodisponibili, quali benzo[a]pirene, di benzo[a,h]antracene, benzo[ghi]perilene e indeno[1,2,3-cd]pirene.

Questo risultato conferma che la biodisponibilità degli idrocarburi policiclici aromatici è il parametro più importante per valutare l'efficienza dei funghi nella degradazione dei contaminanti (Poiting, 2001; Bhatt *et al.*, 2002). Gli elevati valori dei coefficienti di correlazione tra la frazione biodisponibile, stimata attraverso l'estrazione fluida supercritica sequenziale, e i livelli di degradazione in assenza di additivi suggerisce l'estrazione fluida supercritica sequenziale come un valido strumento per valutare a priori l'utilità del biottrattamento fungino di un suolo contaminato.

L'impiego di agenti mobilizzanti nel micorisanamento del suolo S1 con frazione biodisponibile trascurabile (4%) mostrava un effetto limitato ed a volte negativo sulla deplezione degli IPA, indipendentemente dall'additivo o dal fungo, l'unica eccezione era rappresentata dall'aumento di deplezione dei composti meno biodisponibili ad opera di entrambi i funghi, in presenza di olio di soia. Questo suggeriva che il supposto aumento della pseudo-solubilizzazione degli IPA ad opera degli agenti mobilizzanti, in particolare dei surfactanti, aveva un effetto trascurabile sulle capacità degradative dei due funghi.

Al contrario, nel suolo S2, caratterizzato da un'elevata frazione non biodisponibile, il pretrattamento con olio di soia aumentava le prestazioni degradative di entrambi i funghi.

Questo era evidente soprattutto per gli idrocarburi molto condensati e con alto potenziale di ionizzazione, quali crisene e pirene (7,76 e 7,56 eV, rispettivamente).

Nello stesso suolo anche il Tween 80 esercitava un effetto positivo sulla performance degradativa di *P. ostreatus*. Questo risultato confermava quanto riportato in studi precedenti (Bogan e Lamar, 1995) riguardo il positivo effetto stimolante del Tween 80 e dell'olio di soia sulla degradazione fungina di IPA ad elevato peso molecolare.

Tabella 4.20 Concentrazione (C) iniziale di IPA, espressa come concentrazione degli idrocarburi policiclici aromatici* (mg/kg di suolo), nel suolo S1 con relativa frazione non biodisponibile (FNB) e concentrazioni residue dopo biotattamento con *I. lacteus*, e *P. ostreatus* nel suolo in assenza e in presenza degli agenti mobilizzanti: olio di soia, Tween 20, Tween 80, Acque di Vegetazione (AV).

	Coeff corr.*	TOT	PHE	ANT	FLT	PYR	CHR	BaA	BbF	BkF	BaP	DBA	BghiP	IPY
C iniziale		2320,0	958,0	34,0	789,0	404,0	24,0	20,0	18,0	16,0	26,0	2,0	12,0	17,0
FNB		94,3	8,5	1,0	21,6	15,3	4,1	3,7	8,4	5,4	10,9	1,2	5,5	8,7
<i>P. ostreatus</i>														
Nessuno	0,60	596,5 [70,7]	84,6 [89,6]	0,0 [100,0]	299,0 [55,7]	137,9 [63,8]	14,3 [53,3]	6,7 [74,1]	14,5 [16,7]	8,1 [27,3]	8,1 [61,9]	1,8 [0]	9,3 [25,0]	12,0 [14,3]
olio di soia	0,54	518,5 [74,82]	185,0 [78,6]	0,0 [0,0]	234,2 [68,08]	52,3 [85,9]	15,5 [25,0]	1,3 [90,0]	10,8 [31,2]	4,6 [50,0]	2,8 [70,0]	0,8 [50]	4,9 [54,5]	6,3 [57,1]
Tween 20	0,66	591,4 [54,5]	31,8 [80,2]	0,8 [0]	314,1 [52,06]	162,4 [55,7]	16,2 [27,3]	8,7 [25,0]	15,9 [0,0]	9,8 [0,0]	9,7 [58,3]	2,2 [0]	7,5 [46,1]	12,3 [29,4]
Tween 80	0,67	599,0 [64,4]	49,5 [89,7]	0,3 [100]	313,4 [53,42]	162,5 [58,9]	17,9 [30,8]	5,7 [64,7]	13,6 [17,6]	7,8 [33,3]	8,3 [65,2]	1,9 [0]	7,4 [41,7]	10,7 [26,7]
AV	0,19	650,1 [66,56]	200,2 [76,0]	1,6 [0]	273,4 [57,14]	118,8 [67,4]	16,6 [22,7]	9,4 [30,8]	11,1 [31,25]	6,8 [30,0]	1,4 [95,2]	0,4 [100]	1,6 [84,6]	8,8 [30,8]
<i>I. lacteus</i>														
Nessuno	0,83	279,2 [86,3]	20,6 [97,5]	0,0 [100]	71,9 [89,3]	90,5 [76,2]	10,8 [64,0]	8,6 [68,1]	18,2 [0,0]	9,1 [17,3]	19,9 [5,2]	2,0 [0,0]	12,8 [0,0]	14,8 [0,0]
olio di soia	0,55	1037,5 [49,5]	394,6 [54,2]	0,0 [0,0]	400,3 [45,4]	168,7 [54,2]	18,9 [5,0]	4,0 [60,0]	13,6 [12,5]	8,1 [20,0]	7,4 [30,0]	1,3 [50,0]	8,8 [18,18]	11,8 [14,3]
Tween 20	0,81	335,6 [74,1]	30,6 [80,9]	0,7 [0,0]	64,9 [90,1]	145,4 [60,4]	9,8 [54,5]	6,6 [41,7]	19,4 [0]	10,6 [0,0]	17,7 [25,0]	2,0 [0,0]	11,8 [7,7]	16,0 [5,9]
Tween 80	0,82	566,2 [66,3]	33,8 [92,8]	0,6 [93,75]	168,9 [74,8]	269,7 [31,5]	14,4 [46,1]	7,4 [58,8]	17,6 [0]	10,2 [16,67]	16,7 [26,1]	2,0 [0,0]	11,5 [8,3]	13,3 [13,3]
AV	0,17	1462,0 [24,9]	582,9 [29,9]	9,7 [0,0]	529,3 [16,95]	271,7 [25,5]	11,3 [50,0]	6,4 [53,8]	11,5 [31,25]	9,3 [10,0]	11,2 [47,6]	1,4 [50,0]	7,7 [38,5]	9,4 [30,8]

* Correlazione tra i valori della frazione biodisponibile stimata nel suolo e la frazione biodegradata.

**La frazione non biodisponibile è stata calcolata attraverso l' estrazione fluida supercritica sequenziale (SFE).

***I dati sono media di due esperimenti indipendenti (deviazioni standard < 10%).

In parentesi quadra sono riportate le percentuali di rimozione, calcolate rispetto la concentrazione residua degli IPA nel controllo di incubazione relativo.

Tabella 4.21 Concentrazione (C) iniziale di IPA, espressa come concentrazione degli idrocarburi policiclici aromatici* (mg/kg di suolo) nel suolo S2, con relativa frazione non biodisponibile (FNB) e concentrazioni residue dopo biotratamento con *I. lacteus*, e *P. ostreatus* nel suolo in assenza e in presenza degli agenti mobilizzanti: olio di soia (OS), Tween 20 (Tw20), Tween 80 (Tw80), Acque di Vegetazione (AV).

	Coeff corr.*	TOT	PHE	ANT	FLT	PYR	CHR	BaA	BbF	BkF	BaP	DBA	BghiP	IPY
C iniziale		612,4	75,5	40,5	193,7	150,9	52,4	42,6	19,3	10,5	14,3	1,2	4,9	6,6
FNB		193,7	12,8	13,0	56,2	34,7	15,2	13,2	15,4	8,9	12,4	0,8	4,8	6,3
<i>P. ostreatus</i>														
Nessuno	0,77	302,2 [37,2]	13,3 [0]	7,6 [16,4]	108,6 [30,8]	68,1 [55,4]	37,9 [27,7]	23,7 [44,3]	14,1 [27,0]	8,2 [21,7]	10,2 [28,8]	1,0 [15,6]	3,8 [22,6]	5,7 [10,0]
olio di soia	0,65	209,0 [55,4]	21,6 [63,2]	7,0 [72,0]	88,6 [51,3]	31,6 [71,2]	25,9 [37,3]	6,9 [55,7]	10,5 [27,1]	5,2 [34,4]	4,8 [0]	0,7 [27,4]	2,6 [33,3]	3,6 [25,6]
Tween 20	0,75	334,6 [39,5]	14,6 [70,5]	11,7 [49,3]	133,6 [32,5]	81,5 [44,7]	27,8 [39,7]	22,0 [40,6]	16,1 [2,9]	5,9 [34,8]	3,9 [69,3]	0,8 [19,7]	2,5 [38,0]	3,8 [24,3]
Tween 80	0,69	201,7 [52,8]	12,3 [46,0]	4,5 [75,1]	88,7 [36,0]	41,3 [67,2]	18,0 [58,2]	8,4 [74,1]	11,6 [20,8]	5,9 [34,8]	3,9 [69,3]	0,8 [19,7]	2,5 [38,0]	3,8 [24,3]
AV	0,81	303,4 [44,5]	22,4 [60,6]	13,0 [71,7]	106,4 [40,6]	66,8 [49,8]	33,5 [29,9]	21,3 [41,0]	14,0 [13,4]	7,3 [18,6]	8,6 [32,6]	1,0 [8,8]	4,0 [8,5]	5,1 [14,0]
<i>I. lacteus</i>														
Nessuno	0,78	344,3 [28,3]	13,4 [0]	11,3 [0]	106,4 [32,2]	90,1 [41,0]	41,4 [20,9]	30,3 [28,9]	17,1 [11,4]	8,6 [17,8]	12,7 [10,8]	1,1 [1,8]	4,9 [0]	7,0 [0]
olio di soia	0,77	300,7 [35,8]	16,9 [71,4]	14,9 [40,5]	116,8 [35,8]	72,2 [34,2]	26,1 [36,8]	17,9 [0]	12,2 [15,8]	7,0 [10,8]	7,4 [0]	0,9 [8,9]	3,4 [12,6]	5,0 [0]
Tween 20	0,66	391,1 [39,5]	14,6 [70,5]	9,5 [49,3]	124,1 [32,5]	115,4 [44,7]	44,8 [39,7]	32,2 [40,6]	17,6 [2,9]	10,6 [16,5]	9,6 [43,6]	1,2 [3,6]	4,6 [8,1]	6,9 [8,2]
Tween 80	0,45	349,6 [18,4]	13,7 [40,0]	6,4 [64,6]	142,5 [0]	95,5 [24,2]	34,6 [19,6]	21,7 [33,5]	13,1 [10,1]	10,6 [16,5]	9,6 [43,6]	1,2 [3,6]	4,6 [8,1]	6,9 [8,2]
AV	0,59	439,4 [44,5]	33,2 [60,6]	11,5 [71,1]	160,5 [40,6]	108,7 [49,8]	44,3 [29,9]	32,9 [41,0]	16,6 [13,4]	8,9 [18,6]	10,6 [32,6]	1,2 [8,8]	4,5 [8,5]	6,5 [14,0]

* Correlazione tra i valori della frazione biodisponibile stimata nel suolo e la frazione biodegradata.

**La frazione non biodisponibile è stata calcolata attraverso l' estrazione fluida supercritica sequenziale (SFE).

***I dati sono media di due esperimenti indipendenti (deviazioni standard < 10%).

In parentesi quadra sono riportate le percentuali di rimozione, calcolate rispetto la concentrazione residua degli IPA nel controllo di incubazione relativo.

5 CONCLUSIONI

Il problema della bonifica dei suoli contaminati ha assunto, negli ultimi anni, un'importanza notevole, sia per l'accresciuta sensibilità nei confronti delle tematiche ambientali, sia per gli indubbi rischi alla salute umana che possono derivare dall'esposizione a certe sostanze.

Tra i contaminati maggiormente refrattari alle più svariate tecniche di risanamento (sia biologiche che chimico-fisiche) vanno annoverati gli idrocarburi policiclici aromatici. Questi composti derivanti dalla combustione incompleta di materiali organici, presentano caratteristiche tali che, una volta entrati a contatto con il terreno, vanno incontro ad una serie di processi che li rendono sempre più recalcitranti alla degradazione.

Il micorisanamento, ovvero l'utilizzo di specie fungine afferenti soprattutto al gruppo dei white-rot, risulta particolarmente efficiente nel recupero di suoli contaminati grazie alla produzione di enzimi esocellulari aspecifici ed alla loro peculiare crescita.

Uno dei problemi che maggiormente impedisce l'uso estensivo di tecniche di biorisanamento è quello della riduzione della biodisponibilità degli inquinanti nel tempo.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare comparativamente l'effetto di diversi agenti mobilizzanti sulle prestazioni degradative di quattro ceppi fungini *Irpex lacteus* (FR.:FR.) FR., 617/93, *Pleurotus ostreatus* (JACQ.:FR.) KUMM., 300, *Allescheriella* sp. (DABAC 2B) e *Phlebia* sp. (DABAC 9) su differenti tipi di suoli contaminati.

In una prima fase sono state effettuate prove di micorisanamento su un suolo contaminato "ad hoc" in laboratorio, per simulare una contaminazione recente, con una miscela di IPA costituita da antracene, fenantrene, fluorantene, pirene, crisene, benzo[a]pirene e benzo[k]fluorantene. Tra gli agenti mobilizzanti oggetto di studio sono stati selezionati 2 surfactanti non ionici polietossilati (Tween 20 e Tween 80), β -ciclodestrine commerciali metilate a random (RAMEB), acque di vegetazione di frantoi oleari e olio di soia.

- I ceppi mostravano, in generale, capacità di crescita sul suolo contaminato, inoltre i livelli di ergosterolo dimostravano che gli agenti mobilizzanti in alcuni casi stimolavano la colonizzazione della matrice contaminata.

- Le prestazioni degradative di *P. ostreatus* in assenza di ammendanti apparivano migliori di quelle di *I. lacteus* e comparabili a quelle di *Phlebia* sp. e *Allescheriella* sp.
- Gli agenti mobilizzanti sortivano effetti variabili sulle performance dei funghi nella deplezione dei vari composti.
- Per tutti i ceppi veniva riscontrato un effetto stimolante nella rimozione dei contaminanti a più elevato peso molecolare ascrivibile alla presenza di olio di soia.
- Non si riscontrava alcuna correlazione tra i livelli di attività dei singoli enzimi o quelli cumulativi e l'entità della deplezione degli IPA.
- Alcuni agenti mobilizzanti mostravano un effetto negativo sulla crescita della microflora batterica, nel controllo di incubazione, mentre nei confronti della crescita fungina si otteneva un effetto opposto. Ciò indicherebbe che questi additivi potrebbero avere un impatto nella composizione della microflora autoctona, portando, ad esempio, ad una selezione di specie in grado di abbattere e/o degradare i contaminanti presenti nella matrice contaminata.
- *P. ostreatus* e *I. lacteus* avevano mostrato le migliori performance degradative ed effetti positivi nella deplezione dei contaminanti in presenza degli agenti mobilizzanti. Per questo motivo questi due ceppi sono stati selezionati per prove aggiuntive.

I risultati ottenuti nel biotratamento con *P. ostreatus* e *I. lacteus* su suolo contaminato “ad hoc” sono stati successivamente comparati con quelli ottenuti sullo stesso suolo sottoposto ad aging.

- L'impatto positivo degli additivi precedentemente osservato veniva confermato anche sulla matrice sottoposta ad aging.
- Si confermava, inoltre, l'effetto positivo dell'olio di soia sui livelli di decontaminazione di entrambi i ceppi fungini.
- Anche su suolo sottoposto ad aging, i risultati ottenuti con *P. ostreatus* in assenza di agenti mobilizzanti risultavano migliori di quelli con *I. lacteus*.

L'impiego di questi agenti è stato studiato anche su due suoli storicamente contaminati, uno proveniente da un antico gasometro della compagnia Ceca ČPP Transgas di Praga, l'altro da uno stabilimento per il trattamento del legno in Sobeslav, nella Repubblica Ceca, e differenti sia per la concentrazione totale di idrocarburi policiclici

aromatici (2320 e 612 mg IPA/kg) sia per la relativa quantità di frazione non biodisponibile (4,0 e 32%, rispettivamente).

- In assenza di additivi la performance degradativa di entrambi i funghi era elevata nel suolo S1, con la minore frazione non biodisponibile, mentre nel suolo S2, caratterizzato da un'elevata frazione non biodisponibile, l'aggiunta di olio di soia aumentava significativamente la performance degradativa di entrambi i funghi.
- L'effetto degli additivi era evidente soprattutto nella degradazione dei composti meno biodisponibili, quali benzo[a]pirene, dibenzo[a,h]antracene, benzo[ghi]perilene e indeno[1,2,3-cd]pirene, confermando che la biodisponibilità degli idrocarburi policiclici aromatici è il parametro più importante per valutare l'efficienza dei funghi nella degradazione dei contaminanti (Poiting, 2001; Bhatt *et al.*, 2002).
- Gli elevati valori dei coefficienti di correlazione tra la frazione biodisponibile, stimata attraverso l'estrazione fluida supercritica sequenziale, e i livelli di degradazione in assenza di additivi suggerisce l'estrazione fluida supercritica sequenziale come un valido strumento per valutare a priori l'utilità del biotattamento fungino di un suolo contaminato.

In conclusione, considerando i risultati ottenuti su differenti tipi di suoli contaminati, è possibile affermare che l'utilizzo di agenti mobilizzanti nel favorire il biorisanamento fungino di suoli contaminati da IPA fornisce, spesso, risultati positivi, ma risulta assai difficile prevedere quale ceppo fungino e quale agente mobilizzante siano più efficienti per un particolare suolo contaminato senza un'indagine preventiva. Tuttavia l'estrazione fluida supercritica sequenziale può essere uno strumento valido per valutare le potenzialità del micorisanamento su quel suolo e gli agenti mobilizzanti possono essere il mezzo per migliorare tali potenzialità.

6 BIBLIOGRAFIA

- Aiba S., Moritz V., Someya J., Haung K.L.,** (1969). Cultivation of yeast cells by using n-alkanes as the sole carbon source I. batch culture. *Journal of Fermentation Technology*, 47, 203-210.
- Alexander G., Jacond C., Faure D., Bally R.,** (1996). Population dynamics of motile and non motile *Azospirillum lipoferum* strain during rice root colonization and motyle variation in the rizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 19, 271-278.
- Alexander M.,** (1994). *Biodegradation and Bioremediation*, Academic Press, Inc, San Diego, 248-250.
- Allard A.S., Remberger M., Neilson A.H.,** (2000). The negative impact of aging on the loss of PAH components in a creosote-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 46, 43-49.
- Almgren M., Grieser F., Thomas J.K.** (1979). Dynamic and static aspects of solubilization of neutral arenes in ionic micellar solutions. *Journal of the American Chemical Society*, 101, 279-291.
- Amat di San Filippo P., Rinaldi A., Sanjust di Teulada E., Satt G., Viola, A.** (1984). Vegetable material in water in the olive oil industry: raw material or polluting waste. *Rivista di Merceologia*, 25, 183-199.
- Ananda K., Sridhar K.R.,** (2002). Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west coast of India, *Canadian Journal of Microbiology*, 48, 871-878.
- Ander P., Eriksson K.E.,** (1980). Selective degradation of wood components by white-rot fungi. *Plant Physiology*, 41, 239-248.
- Aronstein B.N., Calvillo Y.M., Alexander M.,** (1991). Effect of surfactants at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. *Environmental Science Technology*, 25, 1728-1731.

- Arora D.S., Sandhu D. K.,** (1985). Survey of some Indian soils for laccase producing fungi and their lignin degrading ability, *Proceedings of Indian Academy of Sciences-Plant*, 94, 567-564.
- Atagana H.J.,** (2004). Biodegradation of phenol, *o*-cresol, *m*-cresol and *p*-cresol by indigenous soil fungi in soil contaminated with cresolate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 851-858.
- Barbero P., Beltrami M., Baudo R., Rossi D.,** (2001). Assessment of Lake Orta sediments phytotoxicity after the liming treatment. *Journal of Limnology*, 60(2), 269-276.
- Bardi L., Mattei A., Steffan S., Marzona M.,** (2000). Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with β -cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 709-713.
- Barr D.P., Aust S.D.,** (1994). Mechanism of white-rot fungi to degrade pollutants. *Environmental Science and Technology*, 28, 79-87.
- Baumard P., Budzinski H., Garrigues P.,** (1998). Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the western Mediterranean Sea. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 765-766.
- Beck A.J., Jones K.C.,** (1995). Limitations to the *in situ* remediation of soils contaminated with organic chemicals in relation to the potential to achieve clean-up criteria. In: Van den Brink, WJ, Bosman R & Arendt F (Eds) *Contaminated Soil '95*, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 327-336..
- Becker H.G., Sinitsyn A.P.,** (1993). Mn-Peroxidase from *Pleurotus ostreatus*, the action on the lignin. *Biotechnology Letters*, 15, 289-294.
- Bettahar M., Ducreux J., Shafer G., Van Dorpe F.,** (1999). Surfactant enhanced in situ remediation of LNAPL contaminated aquifer: large scale studies on a controlled experimental site. *Transport in Porous Media*, 37, 255-276.
- Bezalel L., Hadar Y., Cerniglia C.E.,** (1997). Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2495-2501.

- Bhatt M., Cajthalm T., Sasek V.,** (2002). Mycoremediation of PAH-contaminated soil. *Folia Microbiologica*, 47, 255-258.
- Blanchette R.A.,** (1984). Manganese accumulation in wood decayed by white rot fungi. *Phytopathology*, 74, 153-160.
- Blanchette R.A.,** (1984). Screening wood decayed by white-rot fungi for preferential lignin degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 48, 647-653.
- Blanchette R.A., Otjen L., Carlson M.,** (1987). Lignin distribution in cell walls of birch wood decayed by white rot basidiomycetes. *Phytopathology*, 77, 684-690.
- Blanchette R.A., Reid I.D.,** (1986). Ultrastructural aspects of wood deignification by *Phlaebla (Merulius) tremellosus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 239-245.
- Bogan B.W., Lamar R.T.,** (1995). One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2631-2635.
- Bogan B.W., Lamar R.T., Burgos W. D., Tien M.,** (1999). Extent of humification of anthracene, fluoranthene, and benzo[α]pyrene by *Pleurotus ostreatus* during growth in PAH-contaminated soils *Letters in Applied Microbiology*, 28 (4), 250-254.
- Bogan B.W., Lamar R.T., Hammel K.E.,** (1996). Fluorene oxidation in vivo by *Phanerochaete chrysosporium* and in vitro during manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1788-1792.
- Bogan B.W., Sullivan W.R.,** (2003). Physicochemical soil parameters affecting sequestration and mycobacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Chemosphere*, 52(10), 1717-1726.
- Bohmer S., Messner K., Srebotnik E.,** (1998). Oxidation of phenanthrene by a fungal laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole and unsaturated lipids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 244(1), 233-238.
- Bollag J.M.,** (1992). Decontaminating soil with enzymes. *Environmental Science Technoogy*, 26, 1876-1881.

- Bonnen A.M., Anton L.H., Orth A.B.,** (1994). Lignin-degrading enzymes of commercial button mushroom, *Agaricus Bisporus*. Applied and Environmental Microbiology, 60, 960-965.
- Boyle C.D.,** (1995). Development of a practical method for inducing white-rot fungi to grow into and degrade organopollutants in soil, Canadian Journal of Microbiology, 41, 345-353.
- Boyle C.D., Wiesner C., Richardson A.,** (1998). Factors affecting the degradation of polyaromatic hydrocarbons in soil by white-rot fungi. Soil Biology and Biochemistry, 30, 873-882.
- Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Analytical Biochemistry, 72, 248-254.
- Breuil C., Kushner D.J.,** (1980). Effects of lipids, fatty acids, and other detergents on bacterial utilization of hexadecane. Canadian Journal of Microbiology, 26, 223-231.
- Brown R.R.,** (1967). Biochemical aspect of oxidative coupling of phenols. Oxidative Coupling of Phenols, New York, Marcel Dekker, 167-201.
- Budavavi S., O'Neil M.J., Smith A., Heckelman P.E., Kinneary J.F.,** (1996). Merck Index, 1996. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals (twelfth edition).
- Bumpus J.A.,** (1989). Biodegradation of polycyclic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, 54, 1143-1150.
- Bury S.J., Miller C.A.,** (1993). Effect of micellar solubilization on biodegradation rates of hydrocarbons. Environmental Science Technology, 27, 104-110.
- Buswell J.A., Cai Y., Chang S.T.,** (1995). Effects of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula Edodes*. Fems Microbiology Letters, 128, 81-88.
- Cajthaml T., Šašek V.,** (2005). Application of supercritical fluid extraction (SFE) to predict bioremediation efficacy of long-term composting of PAH-contaminated soil. Environmental Science and Technology, 39, 8448-8452.

- Cameron M.D., Timofeevski S., Aust S.D.,** (2000). Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(6), 751-8.
- Cantor C.R., Schimmel P.R.,** (1980). *Biophysical Chemistry*, 111, W. H. Freeman, San Francisco, P. W. Atkins, 1346.
- Cerniglia C.E., Heitkamp M.A.,** (1989). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment . In: Varanasi, U (Ed.), *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. CRC Press, Boca Raton, 42-64.
- Cerniglia C.E.,** (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3, 351-368.
- Childress A.M., Bennett J.W., Connick W.J., Daigle D.J.,** (2004). Formulation of filamentous fungi for bioremediation. *Journal Biotechnology Techniques*, 12 (3), 211-214.
- Chung N., Aust D.,** (1995). Inactivation of lignin peroxidase by hydrogen peroxidase during the oxidation of phenols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 316, 851-855.
- Commins, B.T.** (1969). Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons during pyrolysis and combustion of hydrocarbons. *Atmospheric Environment*, 3, 565-572.
- Criquet S., Tagger S., Vogt G., Iacazio G., Lepetit J.,** (1999). Laccase activity of forest bitter. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 1239-1244.
- D'Annibale A., Celletti D., Felici M., Di Mattia E., Giovannozzi Sermanni G.,** (1996). Substrate specificità and properties of laccase from *Lentinus edodes*. *Acta. Biotechnologica*, 16, 257-270.
- D'Annibale A., Crestini C., Vinciguerra V., Giovannozzi Sermanni G.,** (1998). The degradation of recalcitrant effluents by white-rot fungus. *Journal of Biotechnology*, 61, 209-218.
- D'Annibale A., Ricci M., Leonardi V., Quarantino D., Mincione E., Petruccioli M.,** (2005). Degradation of aromatic hydrocarbons by white-rot fungi in a historically contaminated soil, 90, 723-731.

- D'Annibale A., Rosetto F., Leonardi V., Federici F., Petruccioli. M., (2006).** Autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 28-36.
- Davies M.V., Glaser J.A., Evans J.W., Lamar R.T., (1993).** Field evaluation of the lignin degrading fungus *Phanerochaete sordida* to treat creosote contaminated soil. *Environmental Science Technology*, 27, 2572-2576.
- De Serres F.J., Ashby J., (1981).** Evaluation of short term tests for carcinogens. Report of the international collaborative program. Progress in mutation research, 1. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- Deutsch J.J., Smith J.A., (1995).** Effect of Triton X-100 on the rate of trichloroethene desorption from soil to water. *Environmental Science Technology*, 29, 1069-1080.
- Dijkstra F.I.J., Scheffers W.A., Wilken T.O., (1972).** Submerged growth of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Antonie van Leeuwenhoek Ned. Tijdschr. Hyg*, 38, 329-340.
- Dipple A.C., Bigger C.A.H., (1991).** Mechanism of action of food associated PAHs. *Mutation Research*, 259(3-4), 263-276.
- Dix T.A., Fontana R., Panthani A., Marnett L.J., (1985).** Hematin-catalyzed epoxidation of 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene by polyunsaturated fatty acid hydroperoxides. *Journal of Biological Chemistry*, 260, 5358-5365.
- Dodson P.J., Evans C.S., Harvey P.J., Palmer J.M., (1987).** Production and properties of an extracellular peroxidase from *Coriolus versicolor* which catalyses C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ cleavage in a lignin model compound. *FEMS Microbiology Letters*, 42, 17-22
- Dohse DM, Lion LW (1994).** Effect of *microbial* polymers on the sorption and transport of phenanthrene in a low-carbon sand. *Environmental Science Technology*, 28, 541-548.
- Dombroski E.C., Gaudet I.D., Florence L.Z., Qureshi A.A., (1996).** A comparison of techniques used to extract solid samples prior to acute toxicity analysis using the Microtox test. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 11, 121-128.

- Duran N., Ferrer I., Rodriguez J.,** (1987). Ligninases from *Chrysonilia sitophyla* (TFB-27441). Applied Biochemistry and Biotechnology, 16, 157-167.
- Efroymsen R.A., Alexander M.,** (1994). Role of partitioning in biodegradation of phenanthrene dissolved in nonaqueous-phase liquids. Environmental Science Technology, 28, 1172-1179.
- Eggen T., Sveum P.,** (1999). Decontamination of aged creosote polluted soil: the influence of temperature, white-rot fungus *P. ostreatus*, and pre-treatment. International Biodeterioration and Biodegradation, 43, 125-133.
- Eggert C., Temp U., Dean J.F.D., Eriksson K.L.,** (1995). Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid. FEBS Letters, 376, 202-206.
- Erickson D.C., Loehr R.C., Neuhauser E.F.,** (1993). PAH loss during bioremediation of manufactured gas plant site soils. Water Research, 27, 911-919.
- Eriksson K.E., Johnsrud S.C., Vallander L.,** (1983). Degradation of lignin and lignin model compounds by various mutants of the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. Archives of Microbiology, 135, 161-168.
- Fahaereus G., Reinhammar B.,** (1967). Large-scale production and purification of laccase from cultures of *Polyporus versicolor* and some properties of laccase. Acta Chemica Scandinavica, 21, 2367-2378.
- Fakoussa R.M., Hofrichter M.,** (1999). Biotechnology and microbiology of coal degradation. Applied Microbiology and Biotechnology, 52, 25-40.
- Farver O., Pecht I.,** (1984). The reactivity of copper sites in the blue copper proteins. In: R. Lontie (Ed), Copper Proteins and Copper Enzymes, 1, 183-214. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Faure D., Bouillant M.L., Jacond C., Bally L.,** (1996). Phenolic derivatives related to lignin metabolism as substrates for *Azospirillum* laccase activity. Phytochemistry, 42, 357-359.
- Fava F., Bertin L., Fedi S., Zannoni D.,** (2002). Methyl- β -cyclodextrin enhanced solubilization and aerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls in two aged-contaminated soils. Biotechnology and Bioengineering, 81(4), 1-10.

- Fava F., Di Gioia D., Marchetti L., Fenyvesi E., Szejtli J.,** (2002). Randomly methylated β -cyclodextrins (RAMEB) enhance the aerobic biodegradation of polychlorinated biphenyl in aged-contaminated soils. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 44 , 417-421.
- Fava F., Zanaroli G., Young L.Y.** (2003) Microbial reductive dechlorination of pre-existing PCBs and spiked 2,3,4,5,6-pentachlorobiphenyl in anaerobic slurries of a contaminated sediment of Venice Lagoon (Italy) *FEMS Microbiology Ecology*, 44 (3), 309-318.
- Fernando T., Bumpus J.A., Aust S.D.,** (1990). Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1666-1671.
- Field J.A., De Jong E., Costa G.F., De Bont J.A.M.,** (1993). Screening of ligninolytic fungi applicable to biodegradation of xenobiotics. *Trends in Biotechnology*, 11, 44-49.
- Forrester I.T., Grabsky M., Burgess R.R., Leatham G.F.,** (1988). Manganese, Mn-dependent peroxidases and the degradation of lignin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 157, 992-999.
- Freeman D.J., Cottel F.C.R.,** (1990). Woodburning as a source of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology*, 24, 1581-1585.
- Galliano H., Gas G., Series J.L., Boundet A.M.,** (1991). Lignin degradation by *Rigidosporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn-peroxidase and laccase enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 13, 473-482.
- Gao S., Wang L., Huang Q., Han S.,** (1998). Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons by β -cyclodextrin and carboxymethyl- β -cyclodextrin. *Chemosphere*, 37, 1299-1305.
- Garon D., Krivobok S., Seigle-Murandi F.,** (2000). Fungal degradation of fluorene. *Chemosphere*, 40, 91-97.
- Garon D., Krnobk S., Wouesidjewe D., Seigle-Murandi F.,** (2002). Influence of surfactants on solubilization and fungal degradation of fluorene. *Chemosphere*, 47, 303-309.

- Garon D., Sage L., Siegle-Murandi F.,** (2004). Effects of fungal bioaugmentation and cyclodextrin amendment on fluorine degradation in soil slurry. *Biodegradation*, 15, 1-8.
- Gestetner B., Assa Y., Birk Y., Bondi I.,** (1971). Lucerne saponin. IV. Relationship between their chemical constitution and haemolytic and antifungal activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 22, 168-172.
- Gianfreda L., Xu F., Bollag J.M.,** (1999). Laccase: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*, 3, 1-25.
- Giovannozzi Sermanni G., D'Annibale A., Di Lena G., Vitale N.S., Di Mattia E., Minelli V.,** (1994). The production of exoenzymes of *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus* and their use for upgrading corn straw. *Biosource Technology*, 48, 173-178.
- Glenn J.K., Gold M.H.** (1985). Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 242, 329-341.
- Glenn J.K., Morgan M.A., Mayfield M.B., Kuwahara M., Gold M.H.,** (1983). An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 114, 1077-1083.
- Gold M.H., Kuwahara M., Chiu A.A., Glenn J.K.,** (1984). Purification and characterization of an extracellular H₂O₂-requiring enzyme diarylpropane oxygenase from the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 234, 353-362.
- Goswami P.C., Singh H.D., Bhagat S.D. & Baruah J.N.,** (1983). Mode of uptake of insoluble solid substrates by microorganisms. I. Sterol uptake by an *Arthrobacter* species. *Biotechnology and Bioengineering*, 25, 2929-2943.
- Grillo G., Robertiello A., Di Leo C., Molinari M., Nardella A.,** (2001). La bonifica biologica dei siti inquinati da idrocarburi. Ulrico Hoepli (Ed), Milano.

- Grimberg S.J., Nagel J., Aitken M.D.,** (1995). Kinetics of phenanthrene dissolution into water in the presence of nonionic surfactants. *Environmental Science and Technology*, 29, 1480-1487.
- Guha S., Jaffè P.R.,** (1996). Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the micellar phase of non-ionic surfactants. *Environmental Science and Technology*, 30, 605-611.
- Haars A., Chet I., Hüttermann A.,** (1981). Effects of phenolic compounds and tannin on growth and activity of *Fomes annosus*. *Environmental Journal of Forest Pathology*, 11, 67-76.
- Hammel K.E.,** (1995). Organopollutant degradation by ligninolytic fungi. In: Young L., Cerniglia C., (Eds), *Microbial Transformation and Degradation of Toxic Chemicals*. Wiley, NY, 331-336.
- Hammel KE, Mozuch MD, Jensen Jr. KA. Kersten PJ** (1994) H₂O₂ recycling during oxidation of the arylglycerol β -aryl ether lignin structure by lignin peroxidase and glyoxal oxidase. *Biochemistry*, 33, 13349-13354.
- Harvey R. G.,** (1997). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Wiley-VCH, New York - Chichester - Weinheim - Brisbane - Singapore - Toronto.
- Hatakka A.,** (1994). Lignin modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, 13, 125-135.
- Hatakka A., Kantelin A., Tervilia-Wilo A., Viikari L.,** (1987). Production of ligninases by *Phlebia radiata* in agitated cultures. In: Odier E. (Ed.), *Lignin Enzymic and Microbial Degradation*, International Symposium, INRA Paris, 185-189.
- Hayes M.E., Nestau E., Hrebenar K.R.,** (1986). Microbial surfactants. *Chemtech*, 16, 239-245.
- Higuchi T.,** (1989). Mechanism of lignin degradation by lignin peroxidase and laccase of white-rot fungi. In: Lewis, N.G., and Paice M.G., (Eds), *Biogenesis and Biodegradation of Plant Cell Polymers*. ACS Symposium Series, 399, 482-502.
- Hofrichter M.,** (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 454-466.

- Hofrichter M., Fritsche W.,** (1997). Depolymerization of low rank coal by extracellular fungal enzyme synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 4, 419-571.
- Hofrichter M., Scheibner K., Schneegab I., Fritsche W.,** (1998). Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 399-404.
- Holstein M., McCann J., Angelosanto F. A., Nicols W. W.,** (1979). Short-term. tests for carcinogens and mutagens. *Mutation Research*, 65, 133,-226.
- Holt M.S., Mitchel G.C., Watkinson R.J.,** (1992). The environmental chemistry, fate and effects of nonionic surfactants. In: Hutzinger O (Ed) *The handbook of environmental chemistry*. volume 3, Part F, 91-98 and 119-139.
- Hope C.F.A., Burns, R.G.,** (1987). Activity, origins and location of cellulases in a silt loam soil. *Biology Fertility of Soils*, 5, 164-170.
- ISO 11268-1, -2,** (1994). Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*).
- ISO 11269-1, -2,** (1993). Determination of the effects of pollutants on soil flora.
- Jeffries T.W.,** (1990). Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. *Biodegradation*, 1, 163-176.
- Johannes C., Majcherczyk A.** (2000). Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 524-528.
- Johansson T., Nyman P.O.,** (1987). A manganese(II)-dependent extracellular peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Acta Chemica Scandinavica B*, 41, 762-765.
- Jones K.C., Stratford J.A., Tridge P., Waterhouse K.S., Johnston A.E.,** (1989). Polynuclear aromatic hydrocarbons in an agricultural soil: long-term changes in profile distribution. *Environmental Pollution*, 56, 337-351.
- Jozefaciuk G., Muranyi A., Fenyvesi E.,** (2003). Effect of randomly methylated beta-cyclodextrin on physical properties of soils. *Environmental Science and Technology*, 1; 37(13), 3012-3017.

- Juhasz A.L., Naidu R.** (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[*a*]pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 45, 57-88.
- Kantelinen A., Hatakka A., Viikari L.**, (1989). Production of lignin peroxidase and laccase by *Phlebia radiata*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31, 234-239.
- Kapich A., Hofrichter M., Vares T. Hattaka A.**, (1999). Coupling of manganese peroxidase mediated lipid peroxidation with destruction of non phenolic lignin compounds and ¹⁴C-labelled lignins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 259, 212-219.
- Katic M., Frantar J., Grgic I., Podgornik H., Perdih A.**, (1998). Polyoxyethylene stimulates lignin peroxidase production in *Phanerochaete chrysosporium*. *Folia Microbiologica* (Prague), 43, 631-634.
- Kennedy D.W., Aust S.D., Bumpus J.A.**, (1990). Comparative biodegradation of alkyl halide insecticides by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium* (BKM-F-1767). *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 2347-2353.
- Kernesten P.J., Kalyanaraman B., Hammel K.E., Reinhammar B., Kirk T.K.**, (1990). Comparison of lignin peroxidase and laccase in the oxidation of methoxy benzene. *Biochemical Journal*, 268, 475-480.
- Kersten P.J., Kalyanaraman B., Hammel K.E., Reinhammar B., Kirk, T.K.**, (1990). Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. *Biochemical Journal*, 268, 475-480.
- Khazaal K.A., Owen E., Dodson A.P., Palmer J.M., Harvey P.J.**, (1993). Treatment of barley straw with ligninase: Effect on activity and fate of the enzyme shortly after being added to straw. *Animal Feed Science and Technology*, 41, 15-21
- Kim E.S., Lee D.H., Yum B.W., Chang H.W.**, (2005). The effect of ionic strength and hardness of water on the non-ionic surfactant-enhanced remediation of perchloroethylene contamination. *Journal of Hazardous Materials*, B 119, 195-203.
- Kimura Y., Asada Y., Kuwahara M.**, (1991). Molecular analysis of *Bjerkandera adusta* lignin peroxidase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35, 510-514.

- Klevens H.B.**, (1950). Solubilization of polycyclic Aromatic hidrocarbons. Journal of Physical and Colloid Chemistry, 54, 283-298.
- Kotterman M.J.J., Rietberg H.J., Hage A., Field J.A.**,. (1997). Polycyclic aromatic hydrocarbon oxidation by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 in the presence of non-ionic surfactants. Biotechnology and Bioengineering, 57, 220-227.
- Kuwara M., Glenn J.K., Morgan M.A., Gold M.H.**, (1984). Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Letters, 169, 247-250.
- Laha S., Luthy R.G.**, (1992). Effects of nonionic surfactants on the mineralization of phenanthrene in soil-water systems. Biotechnology and Bioengineering, 40, 1367-1380.
- Lang S., Wagner F.**, (1993). Biological activities of biosurfactants. In: Kosaric N (ed.) Biosurfactants. Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
- Lantz S., Lin J.E., Mueller J.G., Pritchard P.H.**, (1995). Effects of surfactants on fluoranthene mineralization by *Sphingomonas paucimobilis* Strain EPA 505. In: Hinchee RE, Brockman FJ & Vogel CM (Eds), Microbial processes for bioremediation, 7-14. Battelle Press Columbus, USA.
- Leatham G.F., Crawford R.L.,T. Kent Kirk T.K.**, (1983). Degradation of Phenolic Compounds and Ring Cleavage of Catechol by *Phanerochaete Chrysosporium*. Applied and Environmetnal Microbiology, 46, 191-197.
- Lee M.D., Gregory III G.E., White D.G., Fountain J.F., Shoemaker S.H.**, (1995). Surfactant-enhanced anaerobic bioremediation of a carbon tetrachloride DNAPL In: Hinchee RE, Leeson A & Semprini L (Eds) Bioremediation of chlorinated solvents, 147-152. Battelle Press, Columbus, USA.
- Lijinsky W.**, (1991). The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food. Mutation Research, 259, 251-262.
- Lin S.C.**, (1996). Biosurfactant: recent advances. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 63, 109-120.

- Luthy R.G., Dzombak D.A., Peters C.A., Roy S.B., Ramaswami A., Nakles D.V., Nott B.R.** (1994). Remediating tar-contaminated soils at manufactured gas plant sites. *Environmental Science Technology*, 28, A266-A276.
- Majcherczyk A., Johannes C., Huttermann A.** (1998). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 335-341.
- Maltseva O.V., Niku-Paavola M.L., Leontievsky A.A., Myasoedova N.M., Golovleva L.A.**, (1991). Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Panus tigrinus*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 13, 291-302.
- Manilal P., Lee S.A., Lewis S.T., Sheppar A.N., Watkinson R.J.**, (1993). Growth and biodegradation by white-rot fungi inoculated into soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 25, 277-287.
- Manilal V.B., Alexander M.**, (1991). Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil. *Applied Microbial Biotechnology*, 35, 401-405.
- Marquez-Rocha F.J., Hernandez-Rodriguez V.Z., Vazquez- Duhalt R.**, (2000). Biodegradation of soil-adsorbed polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnology Letters*, 22, 469-472.
- Martin Del Valle E.M.**, (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39, 1033-1046.
- Martinez M.J., Boeckle B., Camareno S., Guillen F.J., Martinez A.T.**, (1996). in: T.W. Jeffries, L. Viikari (Eds), *Enzymes for Pulp and Paper Processing*, American Chemical Society, Washington, 183-196.
- Meador J.P., Stein J.E., Reichert W.L., Varanasi U.**, (1995). Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 143, 79-165.
- Mersch-Sundermann, V., Mochayedi, S., Kevekordes, S.**, (1992). Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Escherichia coli* PQ37. *Mutation Research*, 278, 1-9.
- Miessner M., Crescenzi O., Napoletano A., Porta G., Andersen S.O., Peter M.G.**, (1991). Biphenyltetrols and dibenzofuranones from oxidative coupling of resorcinol

- with 4-alkylpyrocatechols: new clues to the mechanism of insect cuticle sclerotization. *Helvetica Chimica Acta*, 74, 1205-1212.
- Mihelcic J.R., Lueking D.R., Mitzell R.J., Stapleton J.M.** (1993). Bioavailability of sorbed- and separate-phase chemicals. *Biodegradation*, 4, 141-153.
- Miller R.M., Bartha R.**, (1989). Evidence from liposome encapsulation from transport-limited microbial metabolism of solid alkanes. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 269-274.
- Moen M.A., Hammel K.E.**, (1994). Lipid peroxidation by the manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* is the basis for phenanthrene oxidation by the intact fungus. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1956-1961.
- Montedoro G.F., Petruccioli G., Parlati M.V.**, (1986). Atti Tavola Rotonda "Lo smaltimento delle acque reflue dei frantoi oleari", accademia Nazionale dell'Olio, Spoleto, 10 novembre 1986, 76-86.
- Morgan P., Lee S.A., Lewis S.T., Sheppard A.N., Watkinson R.J.**, (1993). Growth and biodegradation by white-rot fungi inoculated into soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 25, 279-287.
- Morril L.G., Mahilum B., Mohiuddin S.H.**, (1982). Organic Compounds in Soils: Sorption, Degradation and Persistence. Ann Arbor Science Publ. MI USA.
- Morris P.J., Pritchard P.H.**, (1993). Concepts in improving polychlorinated biphenyl bioavailability to bioremediation strategies. In: Hinchey RE, Eason A, Semprini L & Ong SK (Eds) *Bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbon compounds*, 359-367. Lewis Publishers, Raton, USA.
- Mulligan C.N.**, (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133, 183-198.
- Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F.**, (2001). Surfactant enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*, 60, 371-380.
- Nannipieri P., Badalucco P., Landi L., Pietramellara G.**, (1997). Measurements in assessing the risk of chemicals to soil ecosystems. In: Zeliko, J.T. (Ed.), *Ecotoxicology: Responses, Biomarkers and Risk Assessment*, an OECD workshop. SOS Publications, Fair Haven, 507.

- Nannipieri P., Grego S., Ceccanti B.,** (1990). Ecological significance of the biological activity in soil. *Soil Biochemistry*, 6, 293-355.
- Nayyar S.P., Sabatini D.A., Harwell J.A.,** (1994). Surfactant adsorption and modified adsorption of nonpolar, polar, and ionizable organic contaminants. *Environmental Science Technology*, 28, 1874-1881.
- Neff J.M.** (1979). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment: Sources, Fates and Biological Effects*. Applied Science Publishers Ltd., Essex, England, 262.
- Neff J.M.,** (1985). Polycyclic aromatic hydrocarbons In : G.M. Rand and S.R. Petrocelli (eds.) *Fundamentals of aquatic toxicology*. Hemisphere Publ. Corp., New York. 416-454.
- Neto J.S.A., Kling S.H.** (1993). Stability of crude ligninases: Effect of different hydrogen peroxide concentrations in the presence of aromatic alcohols. *Biotechnology Techniques*, 7, 81-84.
- Nikku-Pavola M.L., Karhunen E., Kantelinen A., Viikari L., Lundell T., Hatakka A.,** (1990). The effect of culture on the production of lignin-modifying enzymes by the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Journal of Biotechnology*, 13, 211-221.
- Nishioka M., Chang H.C., Lee V.,** (1986). Structural characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbon isomers in coal tars and combustion products. *Environmental Science and Technology*, 20, 1023-1027.
- Novotny C., Erbanova P., Cajthaml T., Rothschild N., Dosoretz C., Sasek V.,** (2000). *Irpex lacteus*, a white-rot fungus applicable to water and soil bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 850-853.
- Novotny C., Erbanova P., Sasek V., Kubatova A., Cajthaml T., Lang E., Krahel J., Zadrazil F.,** (1999). Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. *Biodegradation*, 10, 159-168.
- Novotný C., Rawal B., Bhatt M., Patel M., Šašek V., Molitoris H.P.,** (2003). Screening of fungal strains for remediation of water and soil contaminated with synthetic dyes, 143-148. In V. Šašek, J.A. Glaser, and Ph. Baveye (ed.), *The Utilization of*

- Bioremediation to Reduce Soil Contamination: Problems and Solution. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, Holland.
- Nylund K., Asplund L., Jansson B., Jonsson P., Litze'n K., Sellström U,** (1992). Analysis of some polyhalogenated organic pollutants in sediment and sewage sludge. *Chemosphere*, 24, 1721-1730.
- O'Malley D.M., Whetten R., Bao W., Chem C., Sederoff R.R.,** (1993). The role of laccase in lignification. *Plant Journal*, 4, 451-757.
- Odier E., Mozuch M.D., Kalyanaraman B., Kirk T.K.,** (1988). Ligninase-mediated phenoxy radical formation and polymerization unaffected by cellobiose: quinone oxidoreductase. *Biochemistry*, 70, 847-852.
- Olsen R.A.,** (1971). Triterpeneglycosides as inhibitors of fungal growth and metabolism. Effect on growth, endogenous respiration and leakage of UV-absorbing material from various fungi. *Plant Physiology*, 23, 715-727.
- Pannu J.K., Singh A., Ward O.P.** (2004). Vegetable oil as a contaminated remediation amendment: application of peanut oil for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Process Biochemistry*, 39, 1211-1216
- Paszczyński A., Huynh V.B., Grawford R.,** (1985). Enzymatic activities of an extracellular manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters*, 29, 37-41.
- Pedersen M.W., Zimmer D.E., Anderson J.O., McGuire C.F.,** (1966). A comparison of saponins from *Du Puits*, *Laboratory Ranger* and *Uinta* alfalfas. *Proc. X Internat., Grassland Cong. P.*, 693-697.
- Perez J., Jefries T.W.,** (1992). Role of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 31, 495-502.
- Phillips D.H.,** (1983). Fifty years of benzo(a)pyrene. *Nature*, 303, 468-472.
- Pointing S.B.,** (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 20-33.

- Potin O., Rafin C., Veignie E.,** (2004). Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 54, 45-52.
- Prokop A., Erickson L.E., Paredes-Lopez O.,** (1971). Growth models of cultures with two liquid phases. V. Substrate dissolved in disperse phase - experimental observations. *Biotechnology and Bioengineering*, 13, 241-256.
- Reddy P.G., Singh D., Roy P.K., Baruah J.N.,** (1982). Predominant role of hydrocarbon solubilization in the microbial uptake of hydrocarbons. *Biotechnology and Bioengineering*, 24, 1241-1269.
- Reid I.D., Paice M.G.,** (1994). Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. *FEMS Microbiology Reviews*, 13, 369-376.
- Reinhammar B., Malstrom B.G.,** (1981). Blue copper containing oxidases. In: Spiro TG (Ed) *copper proteins (Metal ions in biology 3)* Wiley, New York, 109-149.
- Reisfeld A., Gutnick D., Rosenberg E.,** (1972). Microbial degradation of crude oil: factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure cultures. *Applied Microbiology*, 24, 363-368.
- Resnick S.M., Gibson D.T.,** (1996). Regio- and stereospecific oxidation of fluorene, dibenzofuran, dibenzothiophene by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain NCIB 9816-4. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4073-4080
- Robit J.F., Whelan W.J., Radley S.A.,** (1968). *Starch and Its Derivatives*. Chapman and Hall, London, 431-432.
- Roch F., Alexander M.,** (1995). Biodegradation of hydrophobic compounds in the presence of surfactants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14, 1151-1158.
- Ron E.Z.,** (2000). Microbial life on petroleum. In *Journey to Diverse Microbial Worlds*. Edited by Seckback J. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 303-305.
- Rosemberg E., Ron E.Z.,** (1999). High- and low-molecular mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 154-162.
- Rouse J.D., Sabatini D.A., Suflita J.M., Harwell J.H.** (1994). Influence of surfactant on microbial degradation of organic compounds, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 24, 325-370.

- Ruttiman C., Schweber E., Salas L., Cullen D., Vicussá R.,** (1992). Lygninolytic enzymes of the white-rot basidiomycete *Phlebia brevispora* and *Ceriporiopsis subvermispora*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 16, 64-76.
- Salas C., Lobos S., Larrain J., Salas L., Cullen D., Vacuna R.,** (1995). Properties of laccase isoenzymes produced by the basidiomycetes *Ceriporiopsis subvermispora*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 21, 323-333.
- Samanta S.K., Singh O.V., Rakesh K.J.,** (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation TRENDS in Biotechnology, 20 (6), 243-248.
- Šašek V.,** (2003). Why mycoremediations have not yet come into practice. In: The Utilization of Bioremediation to Reduce Soil Contamination: Problems and Solutions, 247-266.
- Šašek V., Cajthaml T., Bhatt M.,** (2003). Use of fungal technology in soil remediation: a case study. Water, Air and Soil Pollution, 3, 5-14.
- Šašek V., Volfovà O., Erbanova P., Vyas B.R.M., Matucha M.,** (1993). Degradation of PCBs by white rot fungi, methylotrophic and hydrocarbon utilizing yeasts and bacteria. Biotechnology Letters, 15, 521-526.
- Scheibner K., Hofrichter M.,** (1998). Conversion of aminonitrotoluenes by fungal manganese peroxidase. Journal of Basic Microbiology, 38, 63-71.
- Schneega I., Hofrichter M., Scheibner K., Fritsche W.,** (1997). Purification of the main manganese peroxidase isoenzyme MnP2 from the white-rot fungus *Nematoloma frowardii* b19. Applied Microbiology and Biotechnology, 48(5), 602-605.
- Shah V., Nerud F.,** (2002). Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. Canadian Journal of Microbiology, 48(14), 857-870.
- Shoemaker H.E., Harvey P.J., Bowen R.M., Palmer J.M.,** (1985). On the mechanism of enzymatic lignin breakdown. FEBS Letters, 187, 7-12.
- Sims R.C., and M.R. Overcash** (1983). Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. Residue Reviews, 88, 1-68.

- Slomczynski D., Nakas J., Tanenbaum W.,** (1995). Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea*. Applied and Environmental Microbiology, 61, 907-912.
- Spalton L.M.,** (1964). Pharmaceutical Emulsions and Emulsifying Agents. White, R. F., (Ed.). London, 19-20.
- Stevenson F.J.,** (1994) Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions, J. Wiley, New York–Chichester–Brisbane–Toronto, 405-428.
- Thibault S., Anderson M., Frankenberger W.T.,** (1996). Influence of surfactants on pyrene desorption and degradation in soils. Applied and Environmental Microbiology, 62(1), 283-287.
- Thurston C.F.,** (1994). The structure and function of fungal laccases. Microbiology, 140, 19-26.
- Tiehm A.,** (1994). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. Applied and Environmental. Microbiology, 60, 258-263.
- Tien M., Kirk T.K.,** (1984). Lignin degrading enzymes from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 81, 2280-2286
- Torstenssen L.,** (1997). Microbial assays in soils. In: Tarradellas, J., Bitton, G., Rossel, D. (Eds.), Soil Ecotoxicology. Lewis, 207-234.
- Tsomides H.J., Hughes J.B., Thomas J.M., Ward C.H.,** (1995). Effect of surfactant addition on phenanthrene biodegradation in sediments. Environmental Toxicology and Chemistry, 14, 953-959.
- Tucker B., Radtke C., Kwon S.I., Andersson A.J.,** (1995). Suppression of bioremediation by *Phanerochaete chrysosporium* by soil factors. Journal of Hazard Materials, 41, 251-265.
- Tuor U., Winterhalter K., Fiechter A.,** (1995). Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants in wood decay. Journal of Biotechnology, 41, 1-7.

- Urek R.O., Pazarlioglu N.K.,** (2005) Production and stimulation of manganese peroxidase by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. Process Biochemistry, 40(1), 83-87.
- Van der Gast C., Whiteley A.S., Starkey M., Knowles C.J., Tompson I.P.,** (2003). Bioaugmentation strategies for remediating mixed chemical effluents. Biotechnology Progress, 19, 1156-1161.
- Van der Werf M.J., Hartmans S., Van den Tweel W.J.J.,** (1995). Permeabilization and lysis of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* cells by Triton X-100 for efficient production of d-malate. Applied Microbiology and Biotechnology, 43, 590-594.
- Verstraete W., Devliegher W.,** (1996). Formation of non-bioavailable organic residues in soil: Perspectives for site remediation. Biodegradation, 7, 471-485.
- Viney I, Bewley RJ** (1990). Preliminary studies on the development of a microbial treatment for polychlorinated biphenyls. Archive Environmental Contamination Toxicology, 19, 789-796.
- Volkering F., Breure A.M., Rulkens W.H.** (1998). Microbiological aspects of surfactant use for biological soli remediation. Biodegradation, 8, 401-417.
- Volkering F., Breure A.M., Sterkengurg A., van Andel S.G.,** (1992). Microbial degradation of PAHs: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. Applied Microbiology and Biotechnology, 36, 548-552.
- Volkering F., Breure A.M., van Andel G., Rulkens W.H.** (1995). Influence of non-ionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Applied and Environmental Microbiology, 61, 1699-1705.
- Waarishi H., Valli K., Gold M.H.,** (1992). Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of Biological Chemistry, 267, 23683-23695.
- Wahle U., Kördel W.,** (1997). Developement of analytical methods for the assessment of ecotoxicological relevant soil contamination. Part A. Development and improvement of soil extraction methods for the determination of the bioavailable parts of contaminants. Chemosphere, 35, 223-237.

- Wang J.M., Marlowe E.M., Miller-Maier R., Brusseau M.L.,** (1998). Cyclodextrin-enhanced biodegradation of phenanthrene. *Environmental Science Technology*, 32, 1907-1915.
- Wang X., Brusseau M.L.,** (1993). Solubilization of some low-polarity organic compounds by hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Environmental Science Technology*, 27, 2821-2825.
- Wardle K.S., Schisler L.C.,** (1969). The effects of various lipids on growth of mycelium of *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 61, 305-314.
- Weissenfiels W.D., Klewer H.S., Langhoff J.,** (1992). Adsorption of PAHs by soil particles: influence of biodegradability and biotoxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 689-696.
- West C.C., Harwell J.H.,** (1992). Surfactants and subsurface remediation. *Environmental Science Technology*, 26, 2324-2330.
- Wilson S.C., Jones K.C.,** (1993). Bioremediation of soils contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental Pollution*, 88, 229-249.
- Wodzinski R.S., Larocca D.,** (1977). Bacterial growth kinetics on diphenylmethane and naphthalene-heptamethylnonane mixtures. *Applied and Environmental Microbiology*, 33, 660-665.
- Woo C.S., Dsilva A.P., Fassel V.A., Oestreich G.J.,**(1978). Polynuclear aromatic hydrocarbons in coal-identification by their X-ray excited optical luminescence. *Environmental Science Technology*, 12, 173-174
- Würdemann H., Lund N.C., Gudehus G.,** (1995). Assessment of a biological in situ remediation. In: Hinchey R.E., Miller R.N. & Johnson P.C. (Eds) *In situ aeration: air sparging, bioventing, and related remediation processes*. Battelle Press Columbus, USA, 237-247.
- Xu F.** (1997). Effect of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 924-928.
- Yeom I.T., Ghosh M.M., Cox C.D.,** (1996). Kinetic aspects of surfactant solubilization of soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science Technology*, 30, 1589-1595.

- Yeom I.T., Ghosh M.M., Cox C.D.,** (1996). Kinetic Aspects of Surfactant Solubilization of Soil-Bound Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environmental Science Technology*, 30(5), 1589-1595.
- Yoshida H.,** (1983). Chemistry of lacquer (Urushi). *Journal of the Chemical Society*, 43, 472-486.
- Youngblood W.W., Blumer M.,** (1975). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment: homologous series in soils and recent marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 39, 1303-1314.
- Zaitseva I., Zaitsev G., Card G., Moshkov K. Box B.B., Ralph A., Lindley P.,** (1996). The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1: Nature of the copper centres. *Journal of Biotechnology*, 41, 243-248.
- Zentmyer G.A., Thompson C.R.,** (1967). The effect of saponins from alfalfa on *Phytophthora cinnamomi* in relation to control of root rot of avocado. *Phytopathology* 57, 1278-1279.
- Zhang W., Bouwer E., Wilson L., Durant N.,** (1995). Biotransformation of aromatic hydrocarbons in subsurface biofilms. *Water Science and Technology*, 31, 1-14.
- Ziegenhagen D., Hofrichter M.,** (2000). A simple and rapid method to gain high amounts of manganese peroxidase with immobilized mycelium of the agaric white-rot fungus *Clitocybula dusenii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 553-557.

APPENDICE

L'attività di ricerca svolta nel periodo di dottorato ha portato alla stesura dei seguenti lavori:

Riviste Internazionali

D'Annibale A., Ricci M., Leonardi V., Quarantino D., Mincione E., Petruccioli M., (2005). Degradation of aromatic hydrocarbons by white-rot fungi in a historically contaminated soil. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(6), 723-731 (Wiley & Sons, UK).

D'Annibale A., Rosetto F., Leonardi V., Federici F., Petruccioli M., (2006). Role of Autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 28-36 (American Soc. Microbiology Press USA).

Baldi F., Leonardi V., D'Annibale A., Piccolo A., Zecchini F., Petruccioli M., (2006). Integrated approach of a previous metal removal from a historical contaminated soil followed by organic pollutant biodegradation. *European Journal of Soil Biology* (Elsevier Science, in press).

D'Annibale A., Leonardi V., Federici E., Baldi F., Zecchini F., Petruccioli M., (2007). Chemical leaching and biological treatment of solid waste containing sulphide ore ashes and aromatic hydrocarbons by microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* (Springer Verlag, in press).

Leonardi V., Šašek V., Petruccioli M., D'Annibale A., Cajthaml T. "Mycoremediation of industrial PAH-contaminated soil: estimation and modification of bioavailability of the pollutants". *International Biodeterioration & Biodegradation* (Elsevier Science, submitted).

Atti e comunicazioni a congresso

Leonardi V., Petruccioli M., Šašek V., (2004). The effects of surfactants on mycoremediation of aged PAH-contaminated soil. Seminar "Mycoremediation 2003", Praga, repubblica Ceca, Czech Mycology, 167-168 56 (1-2) 2004.

Leonardi V., Ricci M., Rosetto F., D'Annibale A., Giovannozzi Sermanni G., Mincione E., Federici F., Petruccioli M., (2004). Uso di funghi filamentosi autoctoni nel biorisanamento di suoli fortemente contaminati. Atti del VI convegno del consorzio Interuniversitario Nazionale della Chimica per l'Ambiente INCA, Palermo 2-4 ottobre 2004.

Leonardi V., D'Annibale A., Petruccioli M., (2004). Bioaugmentation Fungina nel risanamento di suoli storicamente contaminati. Poster 6° Convegno FISV, Federazione Italiana Scienze della Vita, Riva del Garda (TN), 30 settembre-3 ottobre 2004.

Leonardi V., D'Annibale A., Petruccioli M., (2004). Potenzialità applicative di funghi isolati da suoli contaminati: il caso di *Phlebia radiata*. Comunicazione orale BMMA "Bertinoro Meeting di Microbiologia Ambientale" Bertinoro, maggio 2004.

D'Annibale A., Leonardi V., Ricci M., Rosetto F., Mincione E., Federici F., Giovannozzi Sermanni G., Petruccioli M., (2004). Uso di funghi nel biorisanamento di suoli contaminati da sostanze aromatiche (mono- e policicliche). Soil Remediation series n. 4 Progetto SISIFO, Risultati secondo anno di attività 2002-2003, 171-181. Editor Pietro Canepa, Consorzio Interuniversitario "La Chimica per l'Ambiente", agosto 2004.

Leonardi V., Ricci M., Rosetto F., D'Annibale A., Giovannozzi Sermanni G., Mincione E., Federici F., Petruccioli M., (2004). "Soil washing" e successivo "bioaugmentation" con funghi filamentosi nel risanamento di suoli fortemente contaminati". Poster VII congresso INCA, Venezia, 2/4 settembre 2004.

Leonardi V., D'Annibale A., Petruccioli M., (2004). Screening of filamentous fungal strains for bioremediation of aged PAH-contaminated soil. Poster European Summer School "Innovative approaches to the bioremediation of contaminated sites". Università di Bologna, 7-11 settembre 2004.

D'Annibale A., Leonardi V., Mincione E., Federici F., Giovannozzi Sermanni G., Petruccioli M., (2004). "Bioaugmentation" con funghi filamentosi nel risanamento di suoli fortemente e storicamente contaminati. Norme, tecnologie e controlli ambientali: Acqua, Siti contaminati, Atmosfera, Politiche energetiche,

Certificazioni ambientali. 215-221. Atti dei seminari Ecomondo, Rimini, 3/6 novembre 2004.

Leonardi V., Šašek V., Petruccioli M., (2005). Effetto di agenti solubilizzanti nel micorisanamento di suoli storicamente contaminati da idrocarburi policiclici aromatici. Comunicazione orale BMMA 2005 “Bertinoro Meeting di Microbiologia Ambientale” Bertinoro, 13-14 maggio 2005.

Leonardi V., Cajthaml T., Petruccioli M., Šašek V., (2005). The effects of surfactants on mycoremediation of aged PAH-contaminated soil. Proceedings of the 3rd European Bioremediation Conference, 197, Chania, Crete, Greece 4-7 luglio 2005.

Baldi F., Leonardi V., D’Annibale A., Piccolo A., Zecchini F., Petruccioli M., (2005). Integrated approach of a previous metal removal from a historical contaminated soil followed by organic pollutant biodegradation. Proceedings of the 3rd European Bioremediation Conference, 189, Chania, Crete, Greece 4-7 luglio 2005.

D’Annibale A., Petruccioli M., Federici F., Leonardi V., Mincione E., Quarantino D., Stazi S.R., Giovannozzi Sermanni G. (2005). Micorisanamento “ex situ” di un suolo storicamente contaminato da idrocarburi aromatici. Convegno SICA Torino. 20-23 settembre 2005.

Leonardi V., D’Annibale A., Baldi F., Zecchini F., Petruccioli M., (2006). Trattamento chimico e biologico combinato per il risanamento di suoli/rifiuti fortemente inquinati da metalli e contaminanti organici. Comunicazione orale VIII Congresso INCA “Chimica Sostenibile e Tecnologie ambientali: stato dell’arte e prospettive”. Bologna, 23-24 marzo 2006 O14 pp. 51.

Leonardi V., Federici E., Giubilei M.A., Frisanti A., D’Annibale A., Petruccioli M., (2006). Soil mycoremediation by *Botryosphaeria rhodina* and possible interactions with indigenous microflora. 25° Congresso Nazionale della SIMGBM, Società Italiana di Microbiologia Generale & Biotecnologie Microbiche. Orvieto (TR), 8-10 giugno 2006.

Leonardi V., Federici E., Giubilei M.A., Frisanti A., D’Annibale A., Petruccioli M., (2006). Interaction between autochthonous microflora and exogenously-added *Botryosphaeria rhodina* during soil reclamation. Conference Living together: polymicrobial communities. Edinburgh, UK, 3-6 luglio 2006.

Leonardi V., Petruccioli M., Šašek V., Federici F., Novotny C., Stazi S.R., D'Annibale A., (2006). Uso di agenti solubilizzanti nel micorisanamento di un suolo contaminato “ad hoc” con idrocarburi policiclici aromatici. Convegno Sica, Sassari, 1-4 Ottobre 2006.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il Prof. Maurizio Petruccioli e il Prof. Federico Federici perché questi lunghi anni sono stati per me una grande scuola di vita.

Un sincero ringraziamento al Dott. Alessandro D'Annibale, per i consigli espressi con estrema competenza, per l'aiuto che mi ha sempre offerto, per l'amicizia e il supporto dimostrati dentro e fuori le mura universitarie.

Ringrazio il Prof. Čeněk Novotný, Co-Tutore, per avermi accolto nel laboratorio di Micologia Sperimentale dell'Istituto di Microbiologia presso l'Accademia di Scienze della Repubblica Ceca.

Un ringraziamento particolare al Prof. Vaclav Šásek, mio Mentore, per la disponibilità dimostrata e per la preziosa supervisione al lavoro.

Ringrazio il Prof. Enrico Mincione e la Dott.ssa Roberta Bernini per avermi dato la possibilità di usufruire del laboratorio di Chimica Organica.

Eternamente grata al Dott. Daniele Quaratino, mio costante punto di riferimento, con la certezza di aver trovato un Vero Amico.

Grazie alla Dott.ssa Silvia Crognale per aver condiviso insieme i momenti belli e anche quelli brutti della vita.

Un'espressione di gratitudine va alla Dott.ssa Fernanda Crisante, al Dott. Maurizio Barontini e al Dott. Gianfranco Provenzano per avermi sempre "pazientemente" sopportata.

Un pensiero a tutti coloro che nel tempo si sono succeduti nel laboratorio, in particolare alla Dott.ssa Viviana Bozzoli, alla Dott.ssa Anna Maria Gallo, al Dott. Raffaello Verardi e alla Dott.ssa Rosella Forliti per aver reso l'ambiente di lavoro sempre piacevole.

Un abbraccio a Silvia, Chiara ed Arianna per l'affetto e l'instancabile fiducia.

Certamente molto più che un ringraziamento per i miei genitori, perché hanno sempre rispettato le mie scelte, anche nei momenti difficili, e perché mi hanno fatto crescere con la consapevolezza del loro affetto e del loro sostegno.

Infine un pensiero ad Emanuele, che ha condiviso con me ogni emozione, perché spero che questi anni di lontananza e sacrificio possano essere una base importante per il nostro futuro.