

# **Lotta contro l'inquinamento con metodi biologici. Risultati preliminari sull'abbattimento di aldeidi, derivati clorurati (DDT, PCB) e idrocarburi polinucleari aromatici (IPA) con microorganismi EM<sup>®</sup>**

Carla Boga,<sup>a</sup> Erminia del Vecchio<sup>b</sup>, Luciano Forlani,<sup>a\*</sup> Mario Franceschetti<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Chimica Industriale "Toso Montanari" Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Viale Del Risorgimento, 4 40136 Bologna Italia

<sup>b</sup> Via Predosa 18/2, Zola Predosa (BO) Italia

<sup>c</sup> Via Reposati, 5 06024 Gubbio (PG) Italia

Indirizzo di posta elettronica: [luciano.forlani@unibo.it](mailto:luciano.forlani@unibo.it)

In generale, le aldeidi sono considerate pericolose per la salute degli esseri viventi, in quanto sono capaci di fissarsi, anche se in maniera reversibile, con i gruppi amminici delle proteine o con gruppi a carattere nucleofilo presenti nelle varie molecole organiche.

In particolare, il capostipite delle aldeidi, la formaldeide (HCHO) è un inquinante molto comune negli ambienti chiusi dove arriva con i mobili di casa molto spesso ottenuti da cascami di legno o, comunque truciolati, panforti, compattati con resine a base di formaldeide (fenoliche, melamminiche) [1,2] che lentamente, ma continuamente, rilasciano la formaldeide stessa nell'aria dove le fasce di cittadini più a rischio, bambini ed anziani, vivono la maggior parte della giornata.

La formaldeide è classificata dall'Istituto per la lotta contro i tumori, (IARC) [3] come "cancerogeno per gli umani", ed è inserita nella prima classe di pericolosità con composti ormai al bando, come benzene, amianto, benzopirene e altri. A differenza di questi, la formaldeide non ha ricevuto particolare attenzione da parte delle agenzie di notizie, e, nonostante che sia oltre che cancerogena e mutagena, è anche un aggressivo delle mucose e un agente pericoloso per le vie respiratorie, la sua presenza non suscita l'attenzione che richiederebbe la sua pericolosità.

Una classe di composti che destano molto interesse sia per le loro caratteristiche di pericolosità per gli umani che per la loro diffusione sul territorio, sono i derivati clorurati, un tempo molto utilizzati come pesticidi e ora regolamentati da leggi restrittive. L'esempio più noto e importante è dato dal DDT (acido diclorodifeniltricloroacetico) ora al bando nel territorio europeo, ma ancora utilizzato in altre regioni, data la sua efficacia nel combattere l'anofele e quindi nel contrastare la malaria.

Un'altra classe di inquinanti a forte carattere cancerogeno è costituita dagli idrocarburi polinucleari aromatici (IPA) che sono presenti nei catrami di carbon fossile, nei bitumi e quindi nei loro derivati troppo ampiamente utilizzati nell'asfaltatura delle strade, dei marciapiedi o nelle varie coperture di edifici. Tra gli

IPA sono ben noti la naftalina, un tempo usata come tarmicida domestico, e il più pericoloso, l'alfa benzopirene.

In questo studio preliminare ci siamo occupati di aldeidi e soprattutto della formaldeide, di composti organici clorurati e in via del tutto preliminare di IPA e della possibilità di essere abbattuti (totalmente o parzialmente) con metodi biologici e quindi di scarso impatto ambientale.

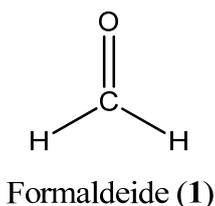
In letteratura [4-6] sono riportati alcuni esempi di abbattimento della formaldeide con metodi biologici. Noi abbiamo utilizzato una miscela di microorganismi EM-1<sup>®</sup> gentilmente forniti dalla Sig.ra Yurie Orimoto per conto della ditta "Punto EM srl" e ampiamente studiati dal Prof. T. Higa [7-8].

Il concetto di EM è stato introdotto dal Prof. T. Higa all'Università di Ryukus, Okinawa (Japan), che ha sviluppato una tecnologia basata su una multi-coltura di vari microorganismi presenti in natura, sia aerobici che anaerobici, includendo popolazioni di batteri dell'acido lattico e lieviti, oltre ad un piccolo numero di batteri fotosintetici ed actinomiceti. La prima applicazione di EM<sup>®</sup> è stata nel campo dell'agricoltura sostenibile e dell'ambiente, ma è anche stato provato che gli EM<sup>®</sup> possono avere un grande numero di applicazioni molto interessanti, oltre che in agricoltura, nel giardinaggio, nel trattamento dei rifiuti, nel bio-risanamento, ed in campo biomedicale [9-12]. Molto probabilmente, la capacità degli EM<sup>®</sup> nei campi citati, è legata ad un effetto sinergico derivato dalla possibilità di coesistenza di differenti microorganismi, ed è per questo che abbiamo intrapreso un'indagine esplorativa su sostanze completamente diverse dal punto di vista chimico, ma accumulate dalle caratteristiche conclamate di pericolosità per l'ambiente e per gli umani.

### **Abbattimento delle aldeidi: il caso della formaldeide**

Un valido motivo della scelta della formaldeide, oltre alla sua pericolosità già ricordata, è dovuto al fatto che questa sostanza è "onnipresente", dato che rientra in una serie notevole di processi chimici, tanto da essere utilizzata, sia come principio puro che come derivati, in un tonnellaggio molto elevato. Per esempio, la produzione globale (e quindi il consumo) della formaldeide nel 2008 si è aggirata attorno a 33 milioni di tonnellate [13].

In via preliminare, si è presa in considerazione la metodologia di letteratura per il rilevamento della formaldeide (**1**) scegliendo il metodo più adatto a rispondere alle nostre esigenze, sia in vitro che in vivo.



Un metodo riportato[14], semplice e molto sensibile è quello spettrofotometrico/colorimetrico di rilevazione con un reagente detto MTBH (3-metil-2-benzotiazolinone idrazone cloridrato monoidrato) che in presenza di **1** sviluppa una

colorazione azzurra. Purtroppo, questo metodo è risultato inattuabile perchè soggetto a numerose interferenze in quanto reagisce con tutti i composti carbonilici presenti nell'ambiente di reazione, compresi quelli degli zuccheri necessari per l'attivazione di EM-1<sup>®</sup>. Infatti, il reagente, mescolato con i soli EM-1<sup>®</sup> ha dato una colorazione talmente intensa da rendere impossibile qualsiasi determinazione qualitativa o quantitativa di eventuali altri composti carbonilici presenti come la formaldeide.

Un altro metodo promettente che abbiamo provato, usa l'indagine spettroscopica per Risonanza Magnetica Nucleare al carbonio (<sup>13</sup>C), in ambiente acquoso [15,16]. Questo metodo si è dimostrato efficace per quantità discrete di formaldeide, ma troppo lungo (e costoso) per le nostre esigenze.

Tuttavia, con questo metodo è stato possibile verificare che soluzioni acquose di formaldeide, nell'intorno di 0.02g/litro, restano praticamente inalterate per oltre un mese a circa 30°C.

Si è saggiata la possibilità di misurare la quantità di formaldeide con derivatizzazione della stessa per mezzo della 4-nitrofenilidrazina o della 2,4-dinitrofenilidrazina, abbinata alla gascromatografia con rivelatore a frammenti di massa, utilizzando come standard l'esametilbenzene (2).

L'uso della 2,4-dinitrofenilidrazina, (noto da molto tempo [17]) si è rivelato come il metodo più semplice e affidabile [18] e, con questo metodo, sono state eseguite prove di abbattimento della formaldeide, in soluzioni acquose alla concentrazione di 0.03 grammi/litro, mediante l'aggiunta di EM-1<sup>®</sup> a varie diluizioni. Gli EM-1<sup>®</sup> sono sempre stati utilizzati in forma attivata, preparata da sospensione di EM-1<sup>®</sup> fornita dalla ditta "Punto EM srl" secondo un protocollo fornito dalla Sig.ra Yurie Orimoto.

Per un confronto, si è esaminata la permanenza della formaldeide (1) in soluzione acquosa senza altre aggiunte: si è osservato che nelle condizioni utilizzate, la scomparsa della formaldeide è agevolata dalla presenza dei microrganismi EM-1<sup>®</sup>, anche se, nelle nostre condizioni sperimentali, si è visto, anche senza l'aggiunta di EM-1<sup>®</sup>, un calo non trascurabile, ma molto inferiore e più lento rispetto a quello registrato in presenza di EM-1<sup>®</sup>.

Il trattamento della formaldeide con una soluzione diluita 1:1 di EM-1<sup>®</sup> in acqua ha visto una netta diminuzione della quantità di formaldeide, infatti dopo solo due giorni, la soluzione di formaldeide in assenza di EM era ancora al 75% del valore iniziale, mentre in presenza di EM si era ridotta al 25 % del valore iniziale.

La quantità di formaldeide nella soluzione, in presenza di EM-1<sup>®</sup> è andata a zero in sette giorni, mentre la quantità di formaldeide in soluzioni acquose, in assenza di EM-1<sup>®</sup>, nello stesso tempo, è rimasta costante al 75% rispetto al valore iniziale.

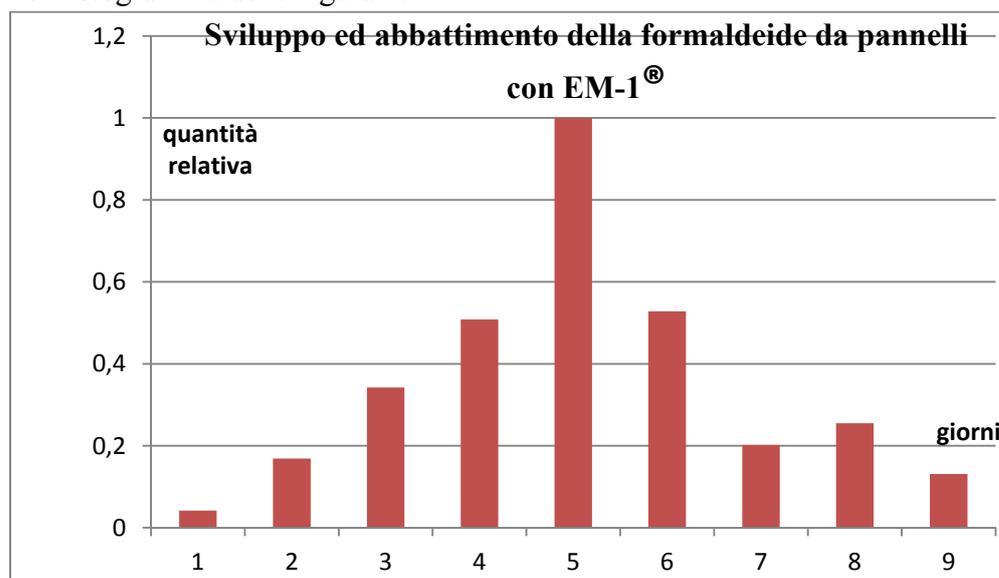
La modesta diminuzione della concentrazione di formaldeide può essere ascritta al fatto che abbiamo usato (volutamente) acqua dell'acquedotto, che contiene ossigeno e cloro o suoi derivati, per ragioni di potabilizzazione, che possono provocare la scomparsa della formaldeide stessa trasformandola in acido formico. Abbiamo potuto verificare, per via NMR, come già ricordato, che la formaldeide, (0.02g/L) in acqua pesante deionizzata e priva di ossidanti, è rimasta inalterata per oltre un mese. Altre prove *in vitro*, analoghe a quella descritta, hanno dato gli stessi risultati.

Successivamente, ci è sembrato interessante e propositivo per bonificare gli ambienti delle nostre abitazioni, passare dall'indagine *in vitro* cioè in condizioni controllate al massimo, ad un problema reale di presenza della formaldeide in prodotti del commercio quali i pannelli cosiddetti truciolati. Per questo scopo, ci siamo procurati pannelli del commercio (vedi figura 1) in un qualsiasi supermercato di *bricolage*, li abbiamo portati a dimensioni opportune in modo da avere campioni di circa 15g che abbiamo posto a macerare in acqua o in acqua contenente EM-1<sup>®</sup> a varie diluizioni.



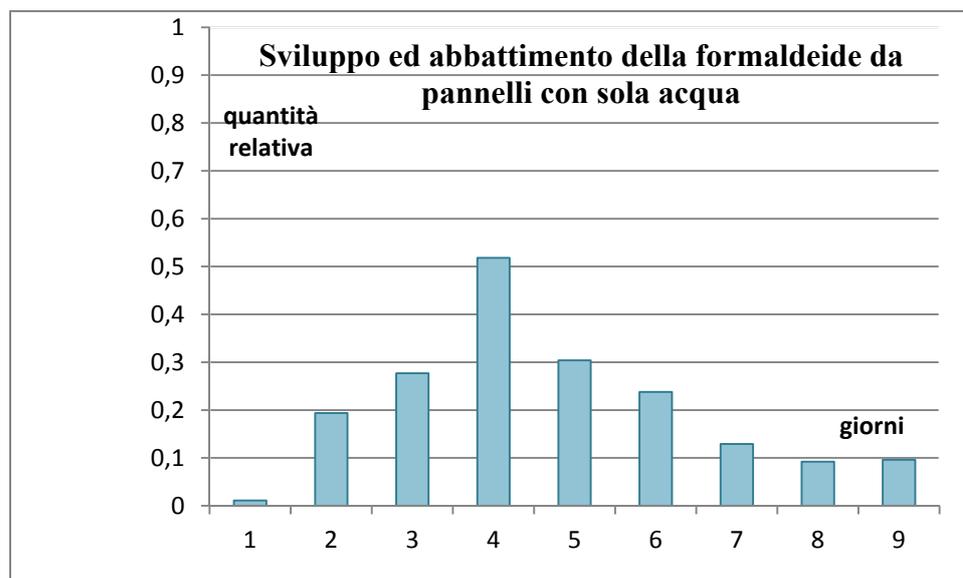
**Figura 1**

La soluzione che ne è risultata è stata analizzata, con le modalità descritte, prelevando aliquote prefissate, a tempi opportuni. Si è osservato un andamento prima crescente, poi decrescente nel tempo della quantità di formaldeide rivelata, come riportato nell'istogramma della figura 2.



**Figura 2**

La Figura 3 riporta lo stesso fenomeno osservato quando il pannello sia posto in sola acqua.



**Figura 3**

Si nota che anche la macerazione in sola acqua (senza EM-1<sup>®</sup>) dei campioni di pannelli provoca l'estrazione di formaldeide che lentamente e spontaneamente diminuisce.

Sia la fase di crescita che quella di decrescita sono avvenute molto più lentamente in assenza di EM-1<sup>®</sup> che in presenza di EM-1<sup>®</sup>. Le quantità di formaldeide in gioco sono circa la metà di quelle osservate in presenza di EM-1<sup>®</sup>.

I microrganismi utilizzati agevolano la fuoriuscita della formaldeide dal pannello, probabilmente anche depolimerizzando le resine responsabili della loro compattazione, e contemporaneamente ne agevolano l'abbattimento. Ovviamente i due processi non hanno la stessa velocità, l'estrazione è certamente più veloce dell'abbattimento, per cui si osserva un massimo di concentrazione della formaldeide che poi decresce regolarmente.

Da un nostro calcolo di minima, certamente approssimato, la quantità di formaldeide che è stata evidenziata con il metodo descritto, può raggiungere il valore di 1.7g per Kg di pannello.

Il nostro metodo non è direttamente confrontabile con il metodo ufficiale UNI EN 120 che stabilisce in 8mg/100g di pannello il limite di emissione. Possiamo tuttavia affermare che il pannello da noi esaminato possiede una potenzialità di emissione di aldeide formica libera notevolmente superiore a quella stabilita dalla normativa. Anche se in aria la formaldeide è liberata più lentamente che in acqua, e la sua emissione può proseguire per tempi molto lunghi, è riconosciuto che questo inquinante sia un serio pericolo anche per le vie respiratorie, aggravato dalla lunga permanenza tra le pareti domestiche soprattutto dei soggetti più a rischio.

## Abbattimento di altre aldeidi: benzaldeide e p-metilbenzaldeide.

Nel tentativo di generalizzare sia la metodica adottata che l'idea che gli EM possano effettivamente avere una affinità distruttiva verso il carbonile aldeidico, abbiamo esteso l'indagine ad altre aldeidi relativamente più facili da analizzare come la benzaldeide e la 4-metilbenzaldeide (o p-metilbenzaldeide).

Sono state eseguite prove in vitro sia con la benzaldeide (**3**) che con la 4-metilbenzaldeide (p-tolualdeide, **4**) pesandone varie quantità e sottoponendole all'azione dei microrganismi e analizzando le sospensioni ottenute a tempi opportuni. A causa della scarsa solubilità delle aldeidi scelte in acqua, abbiamo dovuto prima solubilizzarle nella minima quantità di etanolo (0.06mL di benzaldeide/4-metilbenzaldeide in 10mL di etanolo) e prelevandone opportune aliquote alle quali sono stati aggiunti volumi noti di EM-1<sup>®</sup>.

Ogni campione è stato estratto con diclorometano, portato a volume noto, e addizionato dello standard (esametilbenzene, **2**). L'analisi degli estratti è stata compiuta con gascromatografia con rivelatore a frammenti di massa.

Dall'analisi dei gascromatogrammi abbiamo potuto seguire sia la scomparsa della benzaldeide che la comparsa dei prodotti delle sue trasformazioni causate dagli EM-1<sup>®</sup>.

La Figura 4 riporta l'andamento della quantità di 4-metilbenzaldeide in vitro ed in presenza di EM-1<sup>®</sup>.

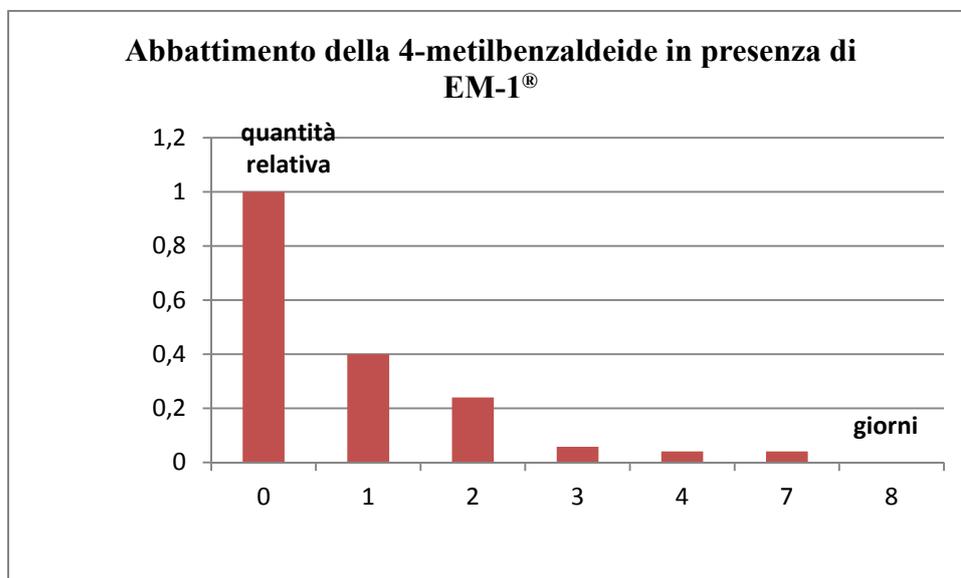
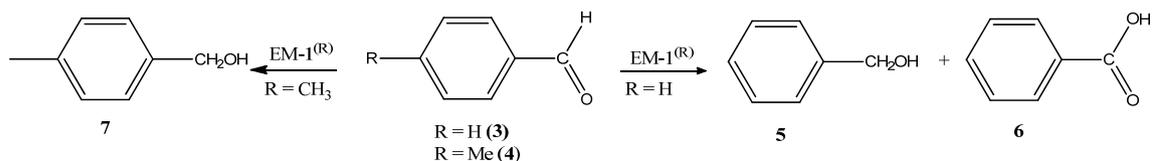


Figura 4.

Nello schema 1 si osserva come la benzaldeide (**3**) sia stata trasformata in un suo prodotto di riduzione (l'alcol benzilico) (**5**). Nelle miscele di reazione sono presenti anche quantità apprezzabili del comune prodotto di ossidazione, l'acido benzoico (**6**). Quest'ultimo si può formare, in piccole quantità anche in assenza di EM-1<sup>®</sup>, dato che è un prodotto dell'ossidazione della benzaldeide con l'ossigeno atmosferico, o con altri ossidanti.



**Schema 1**

Da sottolineare che la diminuzione della quantità di benzaldeide non arriva a zero, almeno nelle nostre condizioni di reazione, ma si ferma a concentrazioni ancora apprezzabili (circa il 20 % della concentrazione iniziale).

Nel caso della 4-metilbenzaldehyde (4) non abbiamo avuto evidenze della formazione del corrispondente acido benzoico, mentre l'unico prodotto evidenziato è l'alcool 4-metilbenzilico (7).

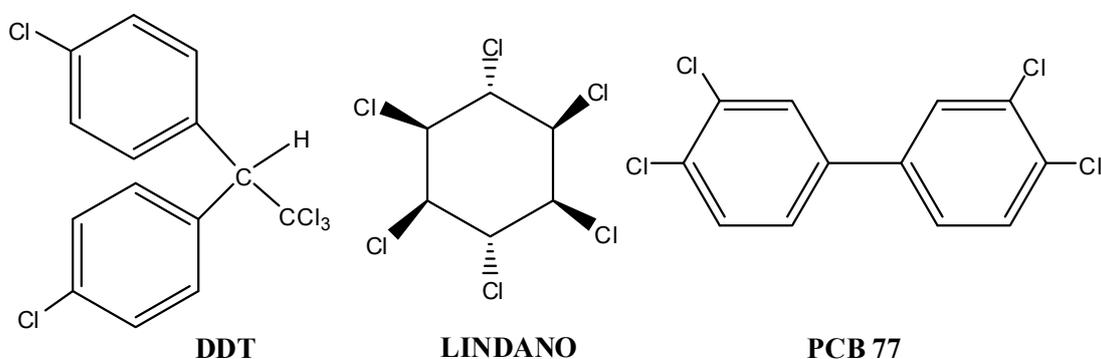
Si può affermare che gli EM-1<sup>®</sup> utilizzati esercitano una azione riducente sul gruppo carbonilico aldeidico.

Questa affermazione ha un interesse rilevante anche dal punto di vista prettamente chimico perché introduce una nuova potenzialità per l'ottenimento di derivati benzilici per via biochimica.

## Abbattimento di composti clorurati

Data l'importanza che in questi tempi hanno raggiunto i composti clorurati come inquinanti, abbiamo esteso l'indagine delle potenzialità degli EM-1<sup>®</sup> anche verso alcuni composti clorurati, molto noti per la loro pericolosità e/o per la grande diffusione che hanno avuto nel corso di varie tecnologie, e che sono un esempio del cattivo uso della chimica (sia doloso che per carenza di adeguata conoscenza chimica) soprattutto per i PCB anche nella fase di smaltimento.

Abbiamo preso in considerazione il **DDT**, [1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano] il **lindano** [ $\gamma$  esaclorocicloesano] e tra i **PCB** il 3,3',4,4'-tetraclorobifenile (**PCB 77**).

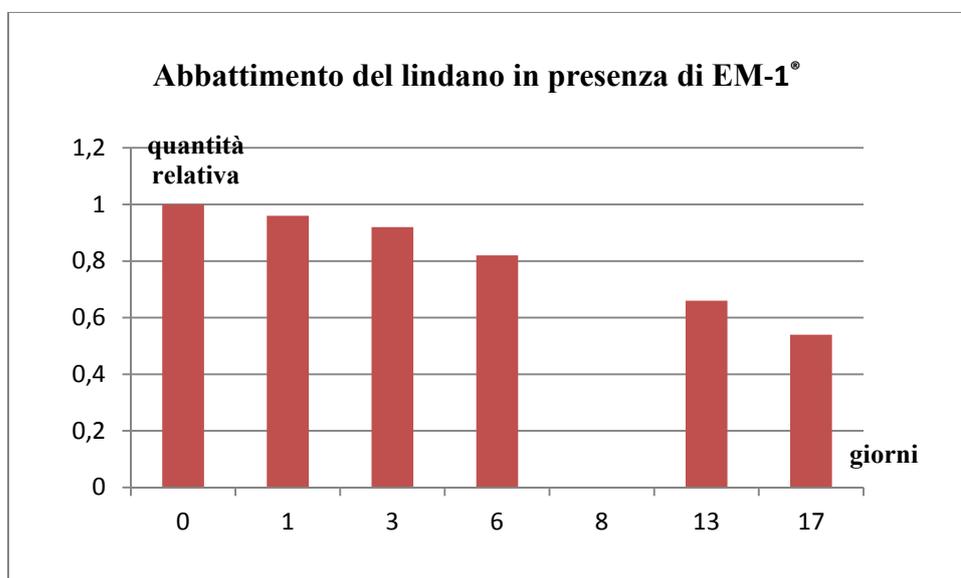


**Schema 2**

Per questi composti, con metodologia analoga a quella usata per le aldeidi aromatiche sopra citate, abbiamo osservato che gli EM-1<sup>®</sup> hanno tendenza al loro abbattimento, fino a circa al 30% del valore iniziale, almeno per la prima settimana di osservazioni e analisi, ma successivamente i dati analitici sono stati scarsamente riproducibili.

Probabilmente la scarsa solubilità di questi composti clorurati, in ambiente acquoso, e i tempi di abbattimento molto lunghi sono alcuni degli ostacoli ad avere un monitoraggio accettabile e i nostri tentativi di utilizzare un solvente (in concentrazione inferiore al 10%, come etanolo e *N,N*-dimetilformamide) non hanno risolto il problema.

I risultati, almeno per ora, sono di difficile razionalizzazione, ma in via preliminare si può pensare che questa via di abbattimento possa avere almeno un parziale successo nell'abbattimento di questi composti.

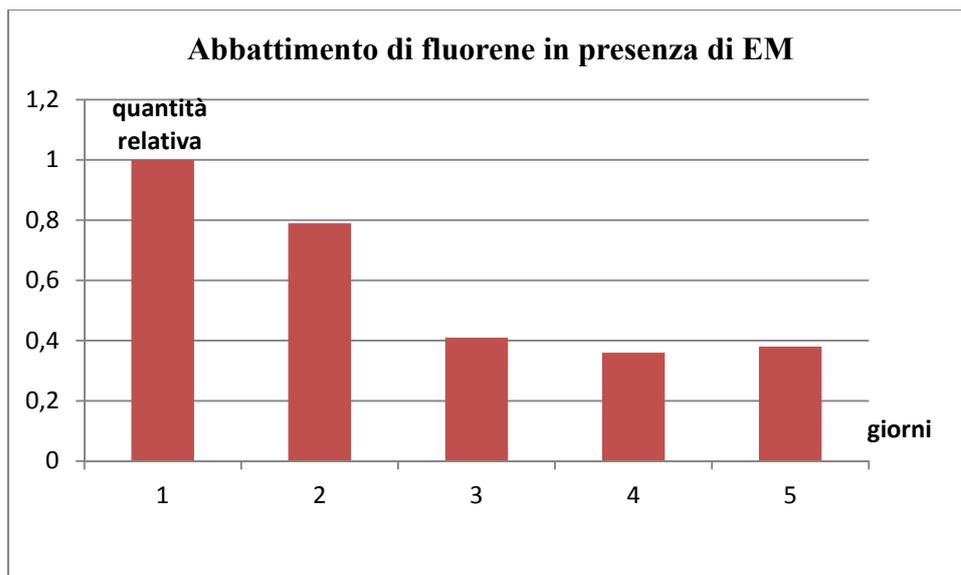


**Figura 5**

### **Abbattimento di IPA (Idrocarburi Polinucleari Aromatici)**

Infine, abbiamo esteso l'indagine ad un'altra classe di composti pericolosi e diffusi: gli IPA (Idrocarburi Polinucleari Aromatici) che sono contenuti in percentuale anche notevole nei bitumi e quindi negli asfalti. Molti IPA, tra questi il benzopirene, hanno conclamate proprietà cancerogene. Abbiamo scelto il fluorene che avevamo già indagato in altra occasione [19].

L'abbattimento del fluorene da parte degli EM è stato regolare per una settimana con una netta diminuzione di circa il 60%. Purtroppo la regolarità si perde con le ultime analisi anche se, in via preliminare si può affermare un effetto positivo degli EM sulla presenza anche di questo inquinante.



**Figura 6**

Possiamo concludere che i derivati policlorurati (e gli IPA, anche se si è potuto prendere in considerazione un solo elemento della classe) hanno dato segni di essere “eliminati” dagli EM-1<sup>®</sup>, ma sul meccanismo delle loro interazioni e sulla capacità di bonifica degli EM-1<sup>®</sup> non si può che formulare qualche incerta ipotesi.

### **Ringraziamenti**

Questo studio è stato finanziato dalla Ditta REGEA srl (Gubbio) avente come suo referente l'Ing. Mario Franceschetti ed è stato condotto nel Dipartimento di Chimica Industriale dell'Università di Bologna dalla Dott.ssa Erminia Del Vecchio con i Proff. Carla Boga e Luciano Forlani quali referenti scientifici. Si ringrazia la Sig. Yurie Orimoto della ditta Punto EM srl per aver gratuitamente fornito i Microorganismi Effettivi EM-1<sup>®</sup>, i tubetti in ceramica grigi EM-X<sup>®</sup>, e la melassa utilizzata per l'attivazione di EM-1<sup>®</sup>, nonché il protocollo per la attivazione.

### **Bibliografia**

- [1] Hesse, W. "Phenolic Resins" in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2002, Wiley-VCH, Weinheim.
- [2] Diem, H.; Matthias, G.; Wagner, R.A. "Amino resins" in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2002, Wiley-VCH, Weinheim.
- [3] IARC. Formaldehyde. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* **2012**, 100F, 401-435.
- [4] Amato, P.; Demeer, F.; Melaouhi, A.; Fontanella, S.; Martin-Biesse, A.-S.; Sancelme, M.; Laj, P., Delort, A.-M. *Atmos. Chem. Phys.* **2007**, 7, 4159-4169.
- [5] Glancer-Šoljan, M.; Šoljan, V.; Dragičević, T.L.; Čačić, L. *Food technol. Biotechnol.* **2001**, 39, 197-202.
- [6] Kaszycki, P.; Kolocze, H. *Microbiol. Res.* **2000**, 154, 289-296.

- [7] Higa, T. Effective microorganisms: A biotechnology for mankind. In: Parr, J.F.; Hornick, S.B.; Whitman, C.E., Eds. Proceedings of the First International Conference on Kyusei Nature Farming. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C., USA. pp. 8-14 (1991).
- [8] Higa, T.; Wididana, G.N. The concept and theories of Effective Microorganisms. In: Parr, J.F.; Hornick, S.B.; Whitman, C.E., Eds. Proceedings of the First International Conference on Kyusei Nature Farming. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C., USA. pp. 118-124 (1991).
- [9] Aruoma, O.I.; Deiana, M.; Rosa, A.; Casu, V.; Piga, R.; Peccagnini, S.; Dessì, M.A.; Ke, B.; Liang, Y-F.; Higa, T. *Toxicol. Lett.* **2002**, *135*, 209-217.
- [10] Higa T. et al. *Int. J. Mol. Med.* **2006**, *18*, 975-979.
- [11] Shalaby, E.A. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2011**, *1*, 243-248.
- [12] Sivasubramanian, S.; Namasivayam, S.K.R. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2013**, *7*, 4117-4122.
- [13] World Petrochemicals (WP) report on formaldehyde (37% solution), January 2011:  
<http://www.ihs.com/products/chemical/planning/ceh/formaldehyde.aspx?pu=1&rd=chemihs>
- [14] Sawicki, E.; Hauser, T.R.; Stanley, T.W.; Elbert, W. *Anal. Chem.* **1961**, *33*, 93-96.
- [15] Monakhova, Y.B.; Kuballa, T.; Mildau, G.; Kratz, E.; Keck-Wilhelm, A.; Tschiersch, C.; Lachenmeier, D.W. *Int. J. Cosm. Sci.* **2013**, *35*, 201–206 e referenze ivi citate.
- [16] Le Botlan, D.J.; Mechim, B.G.; Martin, G.J. *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 587-591.
- [17] Vogel, A.I. VOGEL's Textbook of Practical Organic Chemistry, 5<sup>th</sup> Edn. Longman Scientific & Technical, Harlow, p. 1218 (1989).
- [18] Boga, C.; Del Vecchio, E.; Forlani, L.; Franceschetti, M. *Environm. Chem. Lett.* 2014, in stampa. Doi.: 10.1007/s10311-014-0465-3.
- [19] Boga, C.; Del Vecchio, E.; Forlani, L.; Vaccari, R. *Res. J. Chem. Environm.* **2005**, *9*, 16-21.