

**TECNICHE DI "BIODEGRADAZIONE NATURALE STIMOLATA"  
APPLICATE AD UN CASO DI INQUINAMENTO DA IDROCARBURI DI UN ALVEO FLUVIALE**

## INDICE

RIASSUNTO	85
1. INTRODUZIONE	85
2. I PROCESSI DI DEGRADAZIONE DEI COMPOSTI ORGANICI AD OPERA DI MICRORGANISMI	85
3. APPLICAZIONE DELLA "BIODEGRADA- ZIONENATURALE STIMOLATA"	86
4. CENNI SULLE PRINCIPALI TECNICHE APPLICATIVE	86
4.1 <i>Bioventing</i>	86
4.2 <i>Air Sparging</i>	86
4.3 Pile Biologiche	87
5. BONIFICA DI UN ALVEO FLUVIALE INQUINATO DA IDROCARBURI	87
5.1 Descrizione dell'evento	87
5.2 Fase d'indagine e selezione delle tecniche di bonifica	87
5.3 Fase di bonifica	88
5.4 Risultati	89
BIBLIOGRAFIA	89

## RIASSUNTO

A partire dagli anni '70, la presa di coscienza che i composti inquinanti rilasciati nell'ambiente potessero costituire un potenziale pericolo per la salute umana e per gli ecosistemi, ha innescato processi di ricerca volti a determinare le migliori tecnologie utilizzabili per l'abbattimento del rischio connesso alla presenza di contaminanti nell'ambiente.

Una delle tecniche di bonifica che si è rivelata più valida, sia per le acque che per i terreni contaminati da composti organici ed in particolare da idrocarburi, è basata sulla stimolazione dei processi di biodegradazione naturale aerobica.

Nel presente articolo sono descritti i principi teorici essenziali di questo metodo di disinquinamento, nonché una sua applicazione ad un caso reale verificatosi in Italia.

## 1. INTRODUZIONE

Nonostante i processi biologici siano stati utilizzati per decine di anni per il trattamento di acque di scarico e di rifiuti organici e, in particolare, la biodegradazione di idrocarburi del petrolio sia stata osservata per la prima volta in laboratorio negli anni '40 da C.E. Zobell, la prima applicazione su scala reale delle tecniche di

"Biodegradazione Naturale Stimolata" per la bonifica di siti contaminati da idrocarburi, risale soltanto agli anni '80, in occasione dell'incidente della *Exxon Valdez*, in cui enormi quantità di petrolio inquinarono le coste dell'Alaska.

Da allora, le ricerche e le applicazioni effettuate hanno consentito di comprendere, in modo sufficientemente preciso, i meccanismi del processo e di ottimizzarne le prestazioni, con risultati quasi sempre soddisfacenti. Attualmente la "Biodegradazione Naturale Stimolata", nelle sue diverse tecniche applicative (*bioventing*, *bio-sparging*, *biopile*, *landfarming*, etc.), è uno dei metodi più utilizzati per il disinquinamento di acque e terreni contaminati da composti organici. Infatti essa offre, oltre alla garanzia dei risultati (qualora adeguatamente progettata), due vantaggi fondamentali: i costi relativamente contenuti e la possibilità di essere applicata *in situ*, eliminando quindi la necessità di smaltire in discarica i terreni inquinati o di trattare grandi volumi di acque, come normalmente avviene con il tradizionale metodo del pompaggio da pozzi di emungimento.

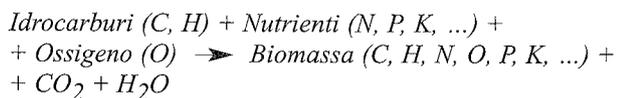
## 2. I PROCESSI DI DEGRADAZIONE DEI COMPOSTI ORGANICI AD OPERA DI MICRORGANISMI

Le tecniche di biobonifica utilizzano la capacità dei microrganismi naturalmente presenti nell'ambiente per degradare contaminanti organici nelle acque e nei terreni. Aumentando la concentrazione di questi microrganismi in condizioni controllate, i processi di degradazione naturale sono notevolmente accelerati.

In generale, le reazioni metaboliche costituiscono il più frequente meccanismo di biodegradazione di composti organici. Ad esempio, gli idrocarburi del petrolio vengono utilizzati come fonte di energia e substrato carbonioso da diverse specie batteriche; tra queste, gli organismi più importanti appartengono al genere *Pseudomonas*. Inoltre, affinché il processo di degradazione batterica degli idrocarburi possa realizzarsi, occorre anche la presenza nell'ambiente di accettori di elettroni; tra di essi i più comuni sono l'ossigeno (respirazione aerobica), i nitrati (denitrificazione), i solfati ed il ferro ferrico.

La maggior parte degli idrocarburi è particolarmente degradabile in condizioni aerobiche. In questo caso, i batteri utilizzano nutrienti inorganici ed ossigeno per trasformare gli idrocarburi in biomassa, biossido di carbonio e acqua, come evidenziato nella seguente equazione semplificata:

(\*) Fluor Daniel GTI Italia S.r.l., Cantù, Como.



In generale, allo scopo di determinare l'applicabilità e la potenziale efficacia dei processi biodegradativi aerobici dei composti organici, occorre valutare in dettaglio diversi fattori e in particolare quelli di carattere chimico, ambientale e microbiologico. I primi sono riferiti in modo specifico alle caratteristiche dei contaminanti, che devono generalmente essere solubili, costituiti da molecole di piccole dimensioni, formati da catene lineari di atomi di carbonio con pochi anelli benzenici e non includere alogeni nella struttura molecolare. I fattori ambientali sono legati a certe condizioni che devono verificarsi affinché sia consentito il metabolismo batterico aerobico. In particolare, oltre alla ovvia presenza di carbonio (fornito dal contaminante) e ossigeno, devono essere presenti, in quantità sufficienti, nutrienti inorganici quali azoto, fosforo ed elementi in tracce (Fe, Mg, Ca, S, Mn, etc.), nonché condizioni ottimali di temperatura, pH, umidità, potenziale redox, permeabilità e assenza di composti tossici inibitori (ad es. alcuni metalli pesanti). Infine, per quanto riguarda il fattore microbiologico, occorre naturalmente che siano presenti quantità sufficienti di popolazioni batteriche adatte a degradare i contaminanti presenti.

### 3. APPLICAZIONE DELLA "BIODEGRADAZIONE NATURALE STIMOLATA"

L'applicabilità delle tecniche di biobonifica viene valutata mediante indagini di campo e di laboratorio. Alle prime appartengono quelle mirate alla definizione delle caratteristiche idrogeologiche del sito contaminato ed alla realizzazione di prove pilota di breve durata (ad es. test respirometrici *in situ* per la determinazione dei tassi di biodegradazione dei contaminanti). Le analisi di laboratorio sono invece mirate alla definizione in dettaglio delle caratteristiche geochimiche del sottosuolo (analisi per l'individuazione dei composti presenti e delle loro concentrazioni nel terreno e nelle acque di falda) ed alla caratterizzazione microbiologica del mezzo contaminato (conta dei batteri eterotrofi e di quelli utilizzatori di idrocarburi, studi di colture in *batch* e in continuo, etc.).

Una volta stabilita la potenziale efficacia dei processi di biodegradazione naturale in un sito contaminato, noti anche i fattori limitanti, viene selezionata la tecnica (o le tecniche) d'intervento. Vengono quindi progettati tutti gli elementi necessari alla sua implementazione, con l'obiettivo primario di raggiungere nel sottosuolo le condizioni ambientali ottimali per il metabolismo batterico.

### 4. CENNI SULLE PRINCIPALI TECNICHE APPLICATIVE

In generale, i metodi d'intervento si dividono in tecniche *in situ* e "on site". Le prime sono applicate direttamente nel mezzo contaminato, senza rimozione di materiale (acque o terreni); le seconde prevedono l'escavazione dei terreni inquinati dalla loro sede naturale, il tratta-

mento in aree adiacenti ed il ripristino a bonifica ultimata. In entrambi i casi viene eliminata la necessità di smaltire in discarica enormi volumi di materiali, spesso con caratteristiche di rifiuti tossico-nocivi.

Nei paragrafi seguenti vengono illustrati sinteticamente i principi operativi delle tecniche di biobonifica attualmente più diffuse (*Bioventing*, *Air Sparging* e *Pile Biologiche*), che sono state utilizzate anche nel caso reale oggetto del presente articolo.

#### 4.1 *Bioventing*

Il *bioventing* è una tecnica di aerazione del sottosuolo mirata a stimolare l'attività biologica aerobica *in situ* e indurre quindi un processo di biodegradazione naturale dei composti organici inquinanti. Sebbene il *bioventing* sia molto simile alla tecnica del *Soil Vapor Extraction* (SVE), i principi di azione sono nettamente differenziati: nel SVE il meccanismo primario di rimozione è quello fisico di volatilizzazione, mentre nel *bioventing* il sistema viene progettato per massimizzare la degradazione aerobica dei composti organici. Nelle applicazioni di campo, questa tecnologia si è rivelata particolarmente efficace nel trattamento di terreni contaminati dagli idrocarburi del petrolio, generalmente sensibili all'attività biologica.

Le caratteristiche principali che concorrono alla corretta applicazione di un sistema di *bioventing* sono le seguenti:

1. ottimizzazione del flusso d'aria in modo da ridurre la volatilizzazione mantenendo le condizioni utili al processo di biodegradazione aerobica;
2. definizione dei parametri geologici ed idrogeologici del sito; in particolare, occorre determinare le caratteristiche di permeabilità all'aria dei terreni da trattare;
3. individuazione di eventuali fattori limitanti l'attività delle popolazioni batteriche indigene;
4. definizione dei parametri operativi dei sistemi da installare (ad es. raggi d'influenza, pressioni d'iniezione dell'aria, numero e spaziatura dei punti bioventilazione, etc.) mediante prove pilota *in situ*;
5. determinazione dei tassi di biodegradazione degli idrocarburi mediante l'esecuzione di test respirometrici.

#### 4.2 *Air Sparging*

L'*air sparging* è una tecnologia sviluppata alla fine degli anni '80 per la bonifica *in situ* di acque di falda e terreni in zona satura. Il metodo si basa sull'iniezione di aria al di sotto del livello di falda, tipicamente in acquiferi freatici permeabili per porosità. L'aria iniettata si muove attraverso la zona satura contaminata inducendo una porosità aerata transitoria. In tal modo i contaminanti possono essere rimossi sia per strappaggio diretto, che mediante i processi biologici aerobici stimolati dalla diffusione dell'ossigeno contenuto nel flusso d'aria.

Anche in questo caso, come per il *bioventing*, occorre determinare i parametri progettuali mediante l'esecuzione di prove pilota che hanno lo scopo sia di verificare la fattibilità tecnica, che di evitare potenziali effetti negativi (ad es. lo spandimento incontrollato della piuma di inquinante disciolto).

In figura 1 è riportato uno schema semplificato di un tipico sistema di *air sparging*, accoppiato ad un impianto di estrazione vapori.

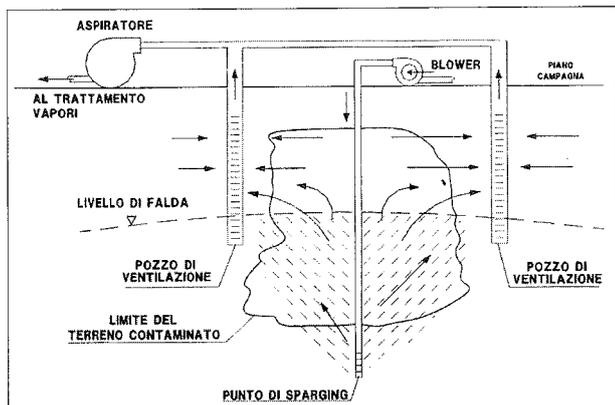


Fig. 1 - Schema di un impianto di *air sparging* abbinato ad un sistema di estrazione vapori

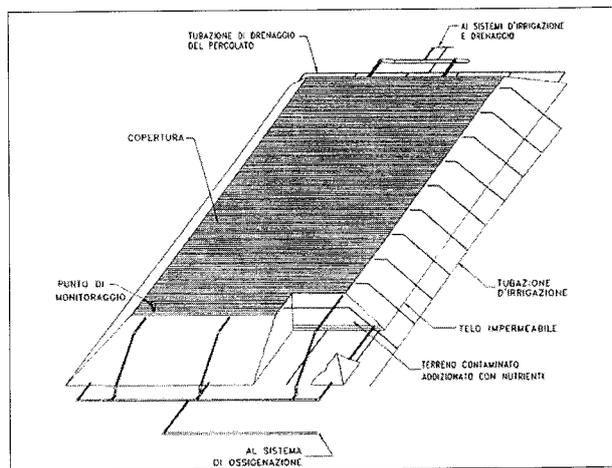


Fig. 2 - Schema costruttivo di una pila di trattamento biologico

#### 4.3 Pile Biologiche

L'applicazione di questa metodologia di biobonifica consiste essenzialmente nel rimuovere il terreno contaminato dalla sua sede naturale e disporlo in pile, a sezione generalmente trapezoidale, dove vengono ottimizzate le condizioni di crescita batterica per favorire la degradazione dei composti inquinanti. In particolare, il terreno viene disposto su un letto drenante, impermeabilizzato alla base, in strati sovrapposti. In fase di posa in opera, il terreno viene addizionato con nutrienti inorganici e *bulking agent* (ad es. trucioli di legno, per favorire un'uniforme distribuzione dei flussi d'aria).

Tra i singoli strati vengono inoltre predisposte apposite linee di ventilazione che hanno lo scopo di fornire l'ossigeno necessario ai processi aerobici di degradazione e di volatilizzare le frazioni più leggere dei composti organici presenti.

Ulteriori sistemi di ottimizzazione di altri parametri fondamentali (pH, temperatura, umidità, etc.) vengono installati in fase di costruzione delle pile biologiche. Preliminarmente alla fase realizzativa, le prove in sito e di laboratorio consentono di definire i parametri necessari alla progettazione esecutiva delle pile. In particolare, risulta di fondamentale importanza definire preventivamente la biodegradabilità dei composti, l'eventuale presenza di fattori limitanti, i tassi di degradazione giornalieri e la quantità di ossigeno da fornire all'unità di massa contaminata.

In figura 2 è illustrato uno schema costruttivo tipico di una pila di trattamento biologico.

### 5. BONIFICA DI UN ALVEO FLUVIALE INQUINATO DA IDROCARBURI

Nei paragrafi seguenti viene illustrata un'applicazione delle tecniche sopra descritte ad un caso di inquinamento da olio combustibile in un alveo fluviale in provincia di Alessandria, verificatosi nei primi anni '90.

#### 5.1 Descrizione dell'evento

Il fenomeno d'inquinamento si è verificato a causa della rottura di un oleodotto interrato su un versante collinare, in sponda sinistra del Rio Barca, nel comune di

Voltaggio (Alessandria). Il Rio Barca è un corso d'acqua a regime torrentizio, affluente del Torrente Lemme. L'inquinamento ha interessato un tratto di circa 500 m di alveo fluviale, fino alla confluenza con il Lemme. La perdita, stimata in circa 150 metri cubi di olio combustibile, si è verificata in un periodo in cui il Barca era totalmente asciutto, permettendo quindi all'olio di saturare i sedimenti ghiaioso-sabbioso-limosi dell'alveo. L'impatto della contaminazione risultava quindi manifesto in modo evidente nei periodi di portata moderata o piena del corso d'acqua. Infatti, in tali occasioni, a causa del rilascio di gocce di olio combustibile dai sedimenti nelle acque correnti, si innescavano fenomeni di coalescenza e formazione di iridescenze sulla superficie libera dell'acqua.

La conseguenza più grave di tale fenomeno era la migrazione di idrocarburi a valle del Lemme, dove sono presenti opere di captazione delle acque fluviali ad uso anche potabile.

La Fluor Daniel GTI Italia (ex Groundwater Technology) fu incaricata di eseguire le necessarie indagini di campo e procedere quindi alla bonifica *in situ* dell'area.

In figura 3 è riportato uno schema della zona delle operazioni.

#### 5.2 Fase d'indagine e selezione delle tecniche di bonifica

Il programma di campionamento realizzato per verificare l'estensione della contaminazione evidenziò un volume di circa 6000 m<sup>3</sup> di sedimenti dell'alveo e 700 m<sup>3</sup> di versante collinare altamente inquinati da idrocarburi. In considerazione della carenza legislativa italiana all'epoca dei fatti, in accordo con le Pubbliche Autorità locali, fu deciso di adottare le concentrazioni massime ammissibili (CMA) della normativa olandese (che prevedevano un limite di 5000 mg/kg di oli minerali adsorbiti come CMA) e di eseguire una valutazione del rischio connesso alla presenza di idrocarburi residuali nel terreno.

Le analisi di laboratorio evidenziarono una distribuzione eterogenea dell'inquinamento, con valori medi di 10000 mg/kg nei sedimenti fluviali e di 25000 mg/kg nel versante collinare. Sulla base della situazione riscontrata, la selezione dei metodi d'intervento fu indirizzata verso tecniche *in situ*, che consentissero di bonificare l'area evitando la rimozione del terreno ed il suo smalti-

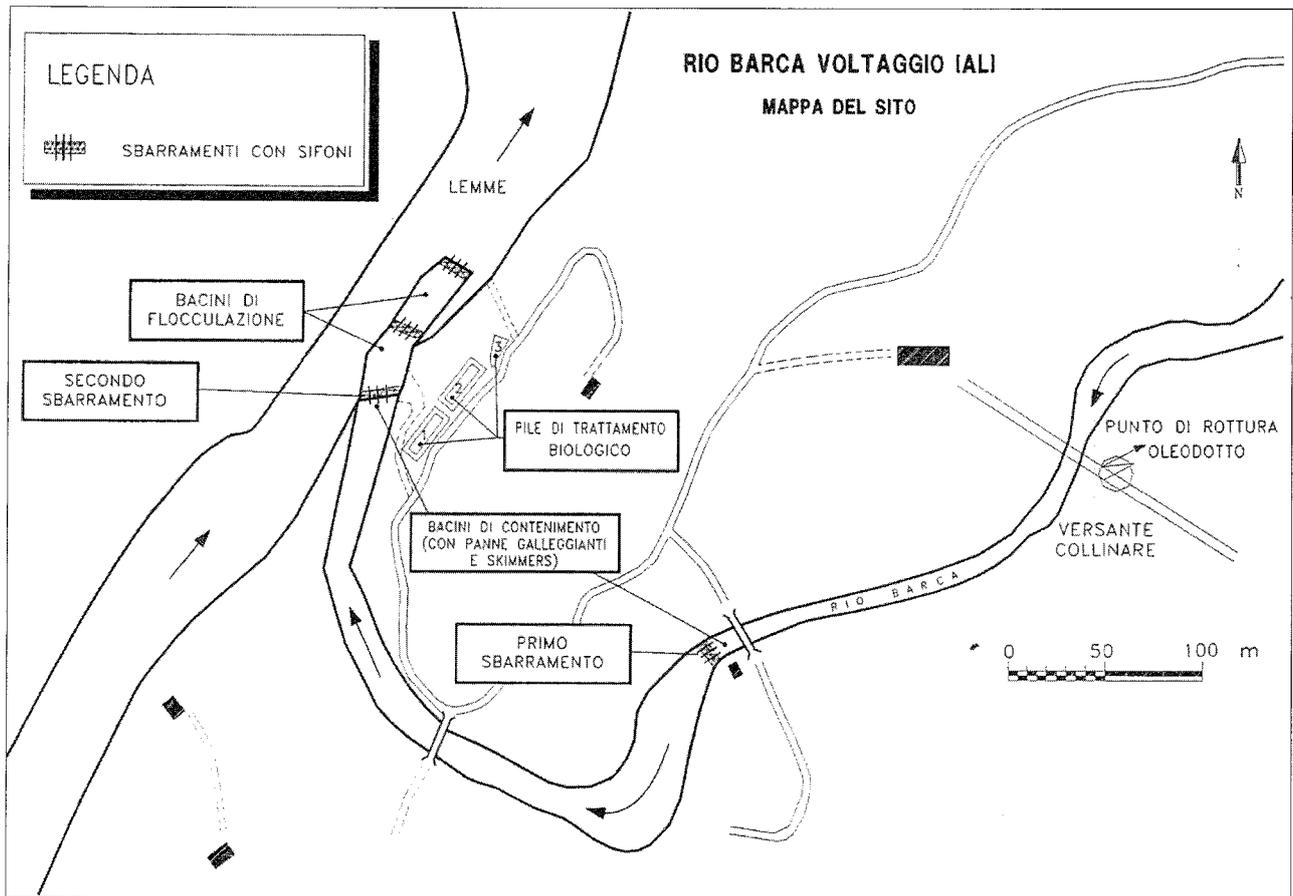


Fig. 3 - Schema degli interventi nell'area del Rio Barca.

mento in discarica. Lo studio di fattibilità fu mirato alla verifica di due metodi distinti:

1. recupero fisico della fase separata (prodotto in galleggiamento);
2. biobonifica *in situ* degli idrocarburi residuali adsorbiti.

I test in campo mostrarono che notevoli quantità di olio combustibile potevano essere liberati dai sedimenti mediante agitazione fisica ed essere quindi recuperati prima della loro confluenza nel Lemme. Inoltre, per quanto concerneva la fattibilità della biobonifica, le analisi di laboratorio evidenziarono la diffusa presenza di popolazioni batteriche utilizzatrici di idrocarburi sia nei sedimenti fluviali, che nei terreni della collina.

### 5.3 Fase di bonifica

#### A) Recupero degli idrocarburi in fase separata

Lavorando i sedimenti fluviali con un escavatore durante le fasi ottimali di regime idrologico del corso d'acqua, fu possibile liberare grandi quantità di prodotto in fase separata. Esso, una volta in galleggiamento sulla superficie dell'acqua, iniziava a defluire verso valle. Per le operazioni di recupero furono costruite due dighe di sbarramento completate con bacini di sedimentazione sul lato di monte e sifoni a 2 m di profondità per consentire il passaggio delle acque fluviali non contaminate.

Il prodotto che si accumulava sul lato di monte veniva recuperato mediante *skimmer* e immesso in un separatore acqua/olio allo scopo di minimizzare i volumi dei fluidi da smaltire. Inoltre, per evitare l'immissione di solidi in sospensione con idrocarburi adsorbiti nel Torrente

Lemme, furono costruiti due bacini di chiari-flocculazione alla confluenza del Rio Barca con il Lemme. In tal modo, i sedimenti fini, messi in movimento dalle operazioni di agitazione fisica, si depositavano nei diversi bacini ubicati sul lato di monte delle dighe.

Al termine delle operazioni *in situ* questi sedimenti dovettero essere rimossi e trattati in pile biologiche costruite nelle adiacenze del corso d'acqua.

#### B) Bonifica dell'alveo fluviale

La bonifica dei sedimenti fluviali comportò notevoli difficoltà di ordine logistico, legate essenzialmente alla coincidenza con un periodo di precipitazioni molto intense. Frequentemente, la portata del corso d'acqua passava in breve tempo da poche centinaia di litri al secondo a  $10 \div 20 \text{ m}^3/\text{sec}$ .

La biobonifica *in situ* fu realizzata una volta completata la fase di recupero del prodotto in fase separata. Una miscela di nutrienti in forma solida, costituita da azoto e fosforo, fu immessa nei sedimenti, in modo da ottenere un rilascio costante nel tempo della giusta quantità di materia inorganica necessaria alla proliferazione batterica. Inoltre, linee di ossigenazione furono interrato a circa un metro di profondità nell'alveo fluviale, perpendicolarmente alla direzione di deflusso e ad intervalli di circa 10 m. La combinazione della continua fornitura di ossigeno e di nutrienti essenziali favorì un aumento della popolazione batterica di diversi ordini di grandezza, accelerando, in modo significativo, il tasso di biodegradazione degli idrocarburi residuali.

### C) Bonifica del versante collinare

Il programma originario di rimozione del terreno inquinato e suo trattamento in pile biologiche in sito fu abbandonato a seguito delle verifiche geotecniche che evidenziarono condizioni d'instabilità del versante collinare. Pertanto, una volta analizzato il rischio di destabilizzazione ulteriore dell'oleodotto a seguito delle operazioni di scavo, in una zona peraltro sede di altri due oleodotti, fu deciso di procedere con un trattamento *in situ*.

In particolare, l'intervento fu articolato integrando diverse tecnologie di bonifica, secondo il seguente schema:

1. *air sparging* nella zona satura del versante;
2. *bioventing* nella zona vadosa (o insatura);
3. addizione di nutrienti al terreno mediante trincee d'infiltrazione.

### D) Bonifica dei sedimenti accumulati nei bacini di contenimento

I terreni fini recuperati dai bacini di sedimentazione, furono trattati in pile biologiche costruite adiacenti al corso d'acqua. A causa della granulometria fine di questi sedimenti, fu necessario aggiungere dei *bulking agent* per migliorare la permeabilità all'aria. Inoltre, apposite miscele di nutrienti inorganici furono addizionate al terreno da trattare e linee di ossigenazione furono installate tra i diversi strati delle biopile, secondo lo schema classico già illustrato nel paragrafo 4.3 e in figura 2.

#### 5.4 Risultati

L'obiettivo di bonifica concordato con le Pubbliche Autorità (5000 mg/kg di idrocarburi totali adsorbiti) fu

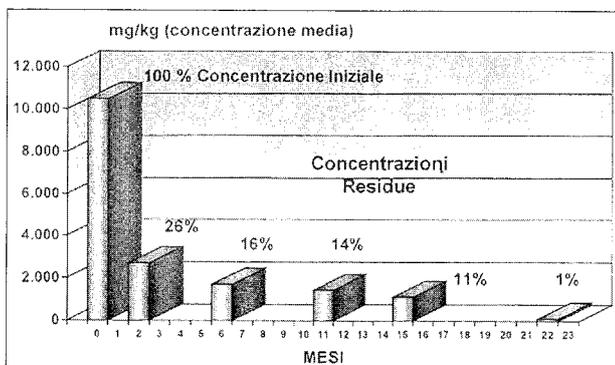


Fig. 4 - Idrocarburi totali nei terreni. Alveo del Rio Barca

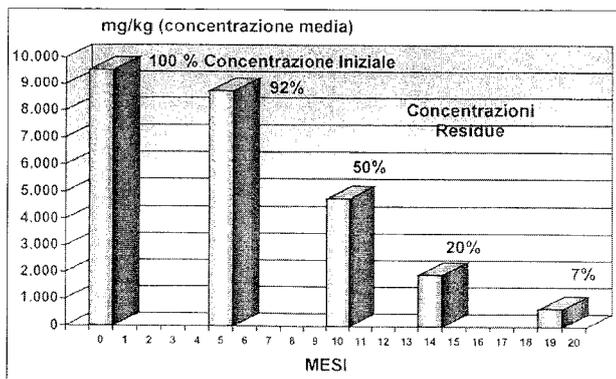


Fig. 5 - Idrocarburi totali nei terreni. Bio-pile di trattamento

raggiunto mediamente dopo un anno di trattamento. Solo per i terreni del versante collinare fu necessario attendere un ulteriore anno, a causa delle limitazioni al trattamento imposte dalla natura dei terreni presenti e dalle concentrazioni iniziali mediamente più alte. Nelle figure 4, 5, 6 e 7 sono riportati i diagrammi che illustrano l'andamento del processo di bonifica nelle diverse situazioni riscontrate.

In conclusione, si può affermare che le tecnologie adottate hanno fornito risultati ampiamente soddisfacenti in tempi ragionevolmente brevi, garantendo al contempo la messa in sicurezza delle fonti di approvvigionamento idrico a valle dell'area contaminata.

Infine, per quanto riguarda i costi, si evidenzia che, sebbene la spesa complessiva di circa 2 miliardi possa sembrare rilevante, occorre considerare che i metodi tradizionali di escavazione e smaltimento in discarica, peraltro difficilmente attuabili in questa situazione, avrebbero comportato un costo maggiore, stimato all'epoca in circa 6 miliardi.

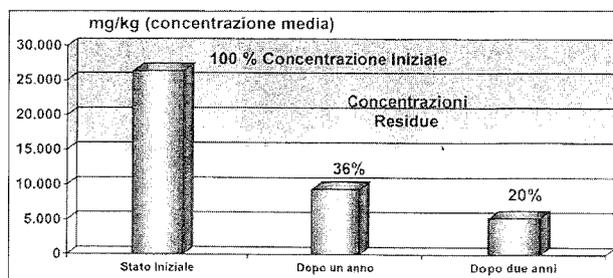


Fig. 6 - Idrocarburi totali nei terreni. Collina

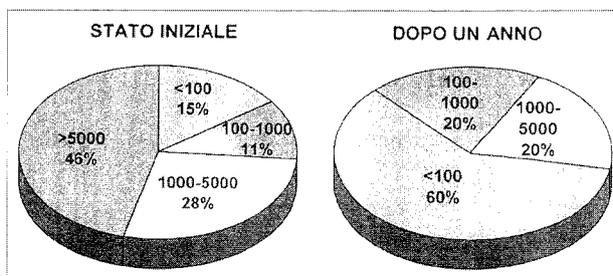


Fig. 7 - Distribuzione areale delle concentrazioni di idrocarburi totali. Concentrazioni medie in mg/kg

#### BIBLIOGRAFIA

- ATLAS R.M. (1981) - *Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective*. Microbial Rev., **45**, 180-209.
- CLAYTON W.S. & NELSON C.H. (1995) - *In-situ sparging: managing subsurface transport and mass transfer*. Abst. Superfund XVI Conference, Washington DC, USA.
- CLAYTON W.S., BASS D.H. & BROWN R.A. (1995) - *Air sparging and bioremediation: the case for in-situ mixing*. In: HINCHEE R.E., MILLER R.N. & JOHNSON P.C. (Eds.) (1995) - *In-situ aeration: air sparging*,

- bioventing, and related remediation processes.* Columbus (OH), Battelle Press, 75-85.
- DUPONT R.R. (1993) - *Fundamentals of bioventing applied to fuel contaminated sites.* Environmental Progress, **12**, 1.
- DUPONT R.R., DOUCETTE W.J. & HINCHEE R.E. (1991) - *Assessment of in situ bioremediation potential and the application of bioventing at a fuel-contaminated site.* In: HINCHEE R.E. & OLFENBUTTEL R.E. (EDS.) (1991) - *In situ bioreclamation. Applications and investigations for hydrocarbon and contaminated site remediation.* Butterworth-Heinemann, Boston, Mass, USA.
- ENVIRONMENTAL SERVICES OFFICE, AIR FORCE CENTER FOR ENVIRONMENTAL EXCELLENCE (1992) - *Test plan and technical protocol for a field treatability test for bioventing.* Department of the Air Force, May.
- GALT Y.A., LEHR W.J. & PAYTON D.L. (1991) - *Fate and transport of the Exxon Valdez oil spill.* Environ. Sci. Technol., **25**, 202-209.
- HINCHEE R.E. & ONG S.K. (1992) - *A rapid in situ respiration test for measuring aerobic biodegradation rates of hydrocarbons in soil.* J. Air Waste Manag. Assoc., **42**, 10.
- JOHNSON R.L. (1994) - *Enhancing biodegradation with in situ air sparging: a conceptual model.* In: HINCHEE R.E. (ED.) (1994) - *Air sparging for site remediation.* Lewis publishers, Boca Raton (USA).
- JOHNSON R.L., JOHNSON R.C., MCWORTER D.B., HINCHEE R.E. & GOODMAN I. (1993) - *An overview of in-situ air sparging.* Groundwater monitoring and Remediation (Fall), 127-135.
- LUNDEGARD & LABRECQUE (1995) - *Air sparging in a sandy aquifer (Florence, Oregon): actual and apparent radius of influence.* J. Contam. Hydrol., **19** (1).
- MACDONALD J.A. & RITTMANN B.E. (1993) - *Performance standards for in situ bioremediation.* Environ. Sci. Technol., **27**, 10.
- MAJOR D.W., MAYFIELD C.I. & BARKER J.F. (1988) - *Biotransformation of benzene by denitrification in aquifer sand.* Ground Water, **26**, 1.
- MORGAN P. & WATKINSON R.J. (1992) - *Factors limiting the supply and efficiency of nutrient and oxygen supplements for the in situ biotreatment of contaminated soil and groundwater.* Water Resources, **26**, 1.
- SIMS J.L., SIMS R.C. & MATTHEWS J.E. (1990) - *Approach to bioremediation of contaminated soil.* Hazardous waste & hazardous materials, **7**(2), 117-149.
- SOLANAS A.M. & PARES R. (1984) - *Degradation of aromatic petroleum hydrocarbons by pure microbial cultures.* Chemosphere, **13**, 593-601.