



Nicodemo Bruzzese, Manuela Aiossa,
Nicola Caretto, Luigi Campanella
Dipartimento di Chimica
Università di Roma "La Sapienza"
Domenico Anderlini, Patrizia Di Gennaro,
Giuseppina Bestetti
Dipartimento di Scienze dell'Ambiente
e del Territorio
Università Milano-Bicocca
Maddalena Papacchini
Dipartimento Insedimenti Produttivi
ed Interazione con l'Ambiente
ISPESL - Roma
bruzzen@yahoo.com

BIOSENSORI PER IL BENZENE IN RAFFINERIA

*Un biosensore basato su cellule di *Pseudomonas putida* è stato impiegato per l'analisi del benzene nell'atmosfera di un impianto industriale di raffinazione del petrolio. Il metodo biosensoristico è stato confrontato con analisi gascromatografiche. Sono stati inoltre sviluppati ceppi di *Escherichia coli* geneticamente modificati per metabolizzare il benzene. La ricerca ha incluso l'analisi di campioni provenienti dalla raffineria. I sensori microbici sono risultati di facile impiego e sufficientemente affidabili per valutare l'inquinamento atmosferico.*

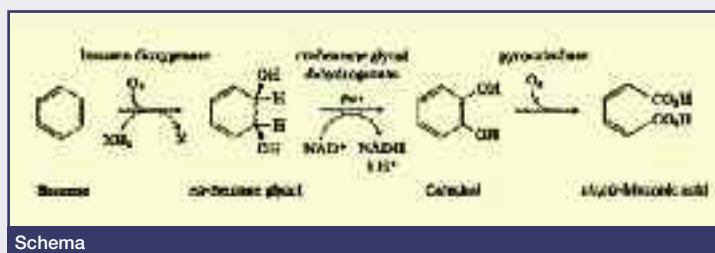
L'impatto ambientale di poli industriali di grandi dimensioni si manifesta con alti livelli di inquinamento di acqua, aria e suolo, causa di patologie tra i lavoratori e la popolazione che vive nel territorio circostante.

Il monitoraggio delle aree contaminate si rende quindi obbligatorio per pianificare adeguati interventi per la protezione della salute di cittadini e lavoratori.

Il benzene è presente nell'elenco delle sostanze pericolose a causa della sua tossicità e per i rischi di esposizione. Questo idrocarburo è classificato come carcinogeno di Classe A, perché è stato dimostrato che può causare neoplasie ematologiche nell'uomo.

Il benzene è usato come solvente nella fabbricazione di molti prodotti, quali polimeri plastici, resine, esplosivi e pesticidi, e come componente di adesivi, vernici, detergenti e lubrificanti.

I rischi occupazionali di esposizione al benzene, sebbene derivino principalmente da dispersioni accidentali, sono elevati nell'industria petrolchimica, della raffinazione di petrolio e negli impianti di sintesi



e distribuzione di carburanti.

I metodi correntemente impiegati per la valutazione del rischio nei siti contaminati, oltre alle analisi chimico-cliniche dei soggetti esposti (per esempio ricerca dell'acido muconico nelle urine), includono l'analisi delle concentrazioni del benzene nell'aria.

Usualmente tecniche di campionamento, quali il campionamento diffusionale per adsorbimento passivo su carbone, successive procedure di estrazione e analisi gascromatografiche e spettrografiche sono usate per determinare la concentrazione di benzene aerodi-

Impianto	GC [ppm]	Biosensore [ppm]
Treco S16	2,8	
Treco S14	0,69	
Treco MS4 B1/B2		0,29
Tp2	0,06	
Tp1/Tp2	0,03	≤0,01
Tp1 E12	0,07	
Tp1 P16B		0,02
Tp1 FRC8		0,02
Vacuum	<0,01	<0,01
FCC P203	<0,01	0,09
FCC P108		0,01
Merex 2	<0,01	0,07
Merex 3		0,02
BTX P11	0,03	
BTX P1	0,01	
Fraz. Benzine		0,02
Fraz. Benzine		0,03
PLF FORNO		0,03
PLF P1		0,04
MF		0,05

Tabella

il loro uso. I biosensori per il benzene sono fondamentalmente sensori basati su un ceppo batterico, quale *Pseudomonas* e le specie correlate, che possiede un *pathway* enzimatico (vedi Schema) che gli dà la capacità di utilizzare l'idrocarburo come fonte di carbonio. Questi microrganismi sono capaci di ossidare il benzene a diidrodioolo, deidrogenarlo a catecolo e ancora ossidare questo, aprendo l'anello aromatico, ad acido muconico. La quantificazione del consumo di ossigeno necessario per metabolizzare, in tale modo, l'idrocarburo è uno dei metodi più sensibili per valutare quantitativamente queste reazioni.

Un biosensore amperometrico per il benzene, batterico a cellula integra, basato sul microrganismo *Pseudomonas putida* immobilizzato in un terreno di coltura agarizzato e accoppiato a un elettrodo di Clark per l'ossigeno, che abbiamo già da tempo ben caratterizzato e migliorato, è stato impiegato allo scopo di determinare la concentrazione media dell'idrocarburo nell'atmosfera di alcune aree di un grande impianto industriale di raffinazione del petrolio.

Il sistema convenzionale per il monitoraggio del benzene nell'aria include la raccolta dei vapori dell'idrocarburo adsorbiti su substrato non specifico ed è detto campionamento diffusionale o passivo. Questa operazione viene effettuata semplicemente esponendo all'aria opportuni dispositivi per il periodo di tempo necessario ad ottenere un campione significativo e sufficiente per l'analisi.

Per il campionamento diffusionale nell'impianto di raffinazione sono stati impiegati elementi commerciali a carbone per la raccolta dei composti presenti nell'aria sotto forma di gas o vapori.

I campionatori sono stati sistemati presso 20 postazioni corrispondenti a diversi impianti e zone riservate al personale, ad altezze fra i due e i tre metri.

Alla fine del periodo di esposizione il contenuto di parte dei campionatori passivi è stato eluito e misurato con il metodo biosensoristico e confrontato con un altro corrispondente gruppo di campioni valutati mediante analisi gascromatografiche.

Successivamente all'adsorbimento dei vapori di benzene sui cam-

perso e stimarne le quantità medie nel periodo di rilevazione. Sebbene accurata e riproducibile l'analisi della contaminazione da benzene con tali tecniche risulta lunga, costosa e complessa da usare.

In molti casi i saggi con biosensori hanno affiancato o sostituito i metodi tradizionali in molti programmi di monitoraggio perché sono tecniche più veloci economiche e che non richiedono consistente esperienza per

pionatori, è stato importante trovare un metodo valido per l'estrazione dal carbone dell'idrocarburo compatibile con l'analisi mediante il biosensore che opera in fase acquosa.

Generalmente l'idrocarburo è estratto con CS₂ e analizzato con GC. Tale solvente è altamente tossico e di difficile manipolazione per la sua altissima tensione di vapore, causa anche di errori sperimentali, ed è inoltre poco solubile nell'acqua.

La dimetilformammide, invece, sebbene non meno tossica, è meno volatile, più facilmente manipolabile e completamente miscibile in soluzioni acquose e quindi idonea alle analisi con i biosensori.

Nella Tabella sono riportati i valori calcolati delle concentrazioni di benzene misurate col biosensore e parallelamente con gascromatografia (GC) in aree omogenee dove i campionatori erano esposti.

L'analisi della varianza fra i risultati ottenuti con le due tecniche fornisce un valore di F superiore ai valori tabulari che indica l'assenza di differenze significative fra le due serie.

Una chiara indicazione di elevate concentrazioni di benzene in alcune postazioni determinata mediante gascromatografia è confermata dal metodo biosensoristico.

Più in particolare una buona corrispondenza fra i metodi usati è evidenziata dalla rappresentazione grafica in Fig. 1.

I risultati mostrano che la concentrazione media di benzene (per minuto) è superiore, in alcune delle postazioni, ai valori limite di sicurezza. Tale dato richiede attenta considerazione indicando la necessità di ulteriori rilevazioni e, se confermato, di adeguati interventi correttivi.

In questo stesso progetto sono stati pure sviluppati alcuni ceppi di *Escherichia coli* ricombinanti per una sequenza di DNA, isolata da *P. putida* MST che contiene i geni della benzene diossigenasi e della diidrodioleideidrogenasi, fornendo al ceppo ricombinante la capacità di aggredire il benzene e di metabolizzarlo accumulando catecolo.

I ceppi di *E. coli*, geneticamente modificati per ossidare il benzene, erano sviluppati con l'intento di ottenere un biosensore più selettivo e con un più basso limite di rivelabilità.

Nella Fig. 2 sono schematizzati l'isolamento e il clonaggio della

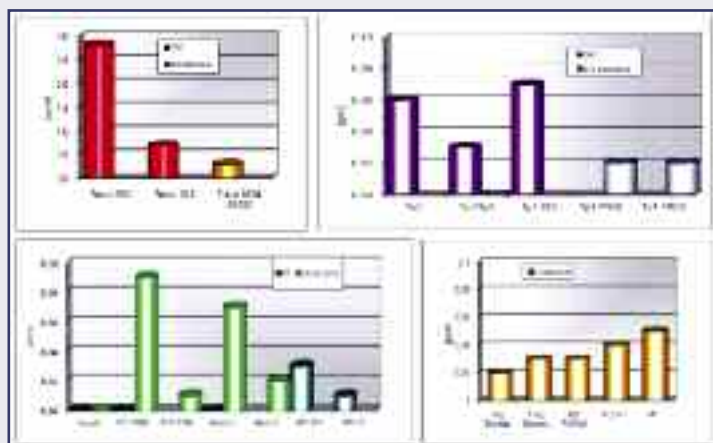


Fig. 1

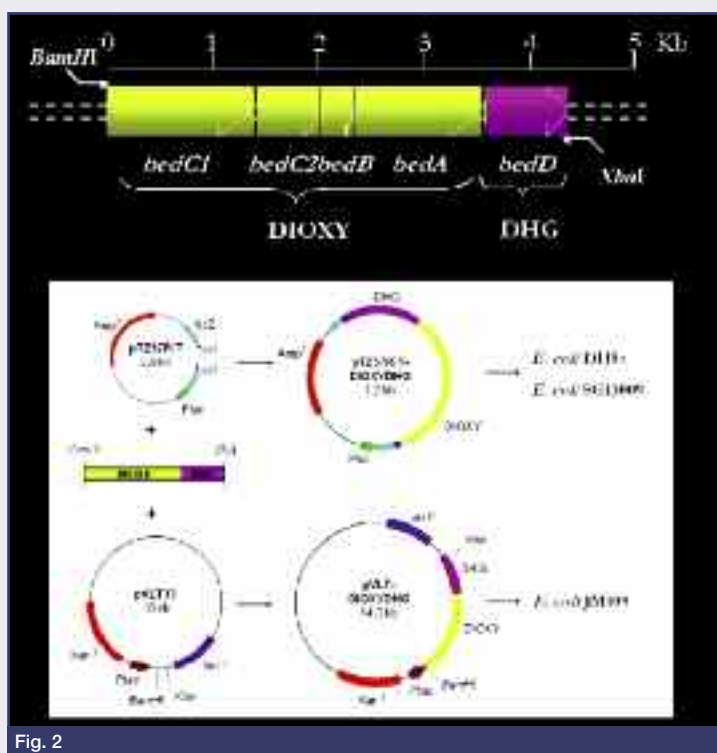


Fig. 2

regione contenente la benzene diossigenasi e la diidrodioleideidrogenasi trasferite da *P. putida* MST ai ceppi di *E. coli*.

Abbiamo esaminato le possibilità applicative di questi microrganismi per la determinazione del benzene, ricercando i metodi più facili, più economici e più adatti a tale impiego.

Alla bioconversione, ottenuta esponendo questi microrganismi al benzene e alla conseguente formazione di catecolo abbiamo associato una ulteriore reazione "ex vivo" usando l'enzima perossidasi per convertire il catecolo in polimeri di o-chinone la cui colorazione può essere misurata spettrofotometricamente.

La ricerca per sviluppare i sensori batterici ricombinanti per il metabolismo del benzene ha incluso l'analisi di campioni provenienti dalla raffineria.

Alcuni campioni provenienti dall'impianto di raffinazione sono stati

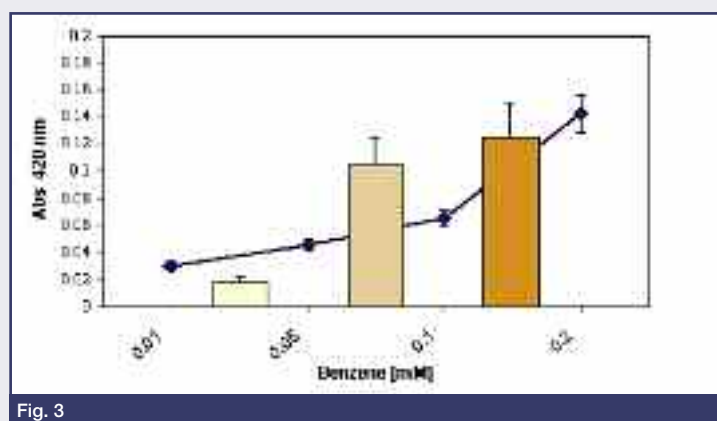


Fig. 3

analizzati con tale procedura e paragonati alla bioconversione di concentrazioni note di benzene. Nel grafico della Fig. 3 è riportato tale confronto.

In conclusione, la ricerca ha permesso di applicare l'analisi biosensoristica a campioni provenienti da un luogo di lavoro dove può essere alto il rischio di esposizione e confrontarla con un metodo di riferimento.

Il sensore ricombinante da noi sviluppato, accoppiato a una semplice tecnica colorimetrica, ha consentito di determinare la concentrazione di benzene nei campioni ambientali. Il metodo è risultato più vantaggioso per gli elevati limiti di rivelabilità e di selettività.

La concentrazione media di benzene valutata con i sensori microbici, pur non presentando un grado di precisione eccellente, raggiunge l'obiettivo di indicare chiaramente il livello di inquinamento atmosferico.

La maggiore praticità dei biosensori ne determina un più facile impiego in modo da poter aumentare gli interventi di sorveglianza e conseguentemente di messa in sicurezza degli impianti verificati.

Ringraziamenti: Questo lavoro è stato realizzato nell'ambito di un più vasto progetto del Ministero della Salute, coordinato dall'ISPESL ed eseguito presso il Dipartimento di Chimica dell'Università di Roma "La Sapienza" in collaborazione con l'Università di Milano-Bicocca. Gli autori ringraziano Lelio Zoccolillo e Pietro Costa del Dipartimento di Chimica dell'Università di Roma "La Sapienza" per le analisi gascromatografiche.

Bibliografia

- [1] L. Campanella et al., *Annali di Chimica*, 1996, **86**, 527.
- [2] Y.H. Lanyon et al., *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, **20**, 2089.
- [3] Y. Lei et al., *Analitica Chimica Acta*, 2006, **568**, 200.
- [4] Y. Paitan et al., *Analytical Biochemistry*, 2004, **335**, 175.
- [5] S. Rodriguez-Mozaz et al., *Talanta*, 2005, **65**, 291.
- [6] K.R. Rogers, *Analytica Chimica Acta*, 2006, **568**, 222.
- [7] S.J. Sørensen et al., *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, **17**, 11.
- [8] A.C. Tizzard, G. Lloyd-Jones, *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, **22**, 2400.
- [9] Z. Xu et al., *Biotechnol. Prog.*, 2003, **19**, 1812.

Biosensing Benzene in the Refinery

A biosensor based on *Pseudomonas putida* cells was utilized for benzene analysis in air of an oil refinery. Biosensoristic approach was compared to gaschromatographic assay. We also developed biosensing benzene genetically modified *Escherichia coli* and tested them with refinery samples. Microbial biosensor were useful to determine air pollution.