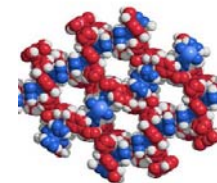


CHIMEC

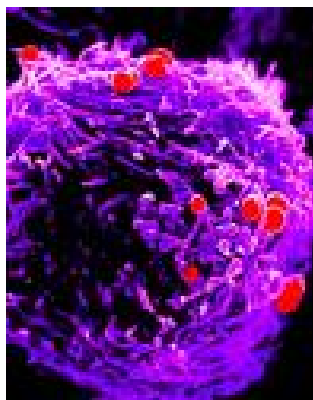
SAVE ENERGY AND IMPROVE PROCESSES  
WITH CHIMEC SERVICE



# Metodi per la misura della contaminazione microbiologica

Milena Mantarro

# Batteri Muffe & co



**Batteri:** Microrganismi unicellulari senza membrane intracellulari definite

**Funghi:** Microrganismi unicellulari (**Lieviti**) o filamentosi (**Muffe**) con definite membrane intracellulari

**Condizioni per la proliferazione**

Acqua,

Fonte di Carbonio, Azoto, Fosforo, Zolfo

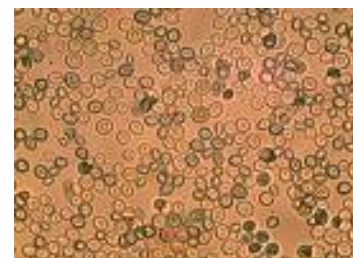
Temperatura, pH

**Idrocarburi – Fuels**

**C – N – P – O – S**

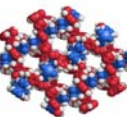
**Macronutrienti organici**

**H<sub>2</sub>O**



	Level of Biodegradation				
	very slight	slight	moderate	heavy	severe
C <sub>1</sub> -C <sub>5</sub> gases	methane				██████████
	ethane			██████████	██████████
	propane	██████████			
	iso-butane			██████████	██████████
	n-butane		██████████		
pentanes		██████████			██████████

C <sub>6</sub> -C <sub>15</sub> HCs	n-alkanes	██████████				██████████
	iso-alkanes		██████████			██████████
	isoprenoids			██████████		██████████
	BTEX aromatics			██████████		██████████
	alkylcyclohexanes			██████████		██████████
C <sub>16</sub> -C <sub>35</sub> HCs	n-alkanes, iso-alkanes	██████████				██████████
	isoprenoids			██████████		██████████
	naphthalenes (C <sub>10</sub> )			██████████		██████████
	phenanthrenes, DBTs			██████████		██████████
	chrysenes			██████████		██████████
C <sub>15</sub> -C <sub>35</sub> biomarkers	regular steranes				██████████	██████████
	C <sub>30</sub> -C <sub>35</sub> hopanes				██████████	██████████
	C <sub>27</sub> -C <sub>29</sub> hopanes				██████████	██████████
	triaromatic steranes				██████████	██████████
	monoaromatic steranes				██████████	██████████
	gammacerane				██████████	██████████
	oleanane				██████████	██████████
	C <sub>21</sub> -C <sub>22</sub> steranes				██████████	██████████
	tricyclic terpanes				██████████	██████████
	diasteranes				██████████	██████████
diahopanes				██████████	██████████	
25-norhopanes*				██████████	██████████	
seco-hopanes*				██████████	██████████	



# Problema di campo

La presenza di acqua e la disponibilità di nutrienti favoriscono la riproduzione di una biofilm avente le seguenti caratteristiche:

- Solvente resistente
- Oleofilicità
- Peso specifico simile a quello del gasolio
- Alta disperdibilità



## Inconvenienti in campo

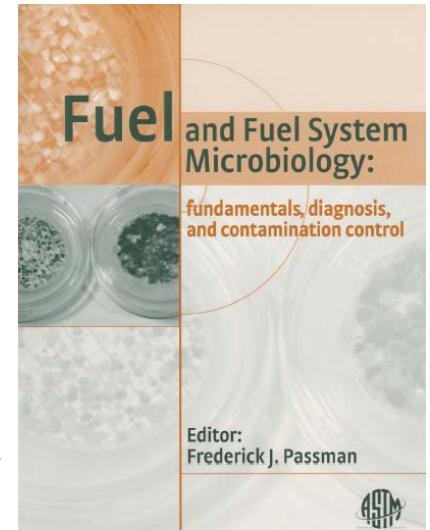
A temperature generalmente fra 25 e 35 °C

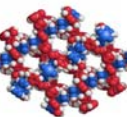
- Formazione di fouling organico all'interfaccia acqua carburante
- Occlusione dei filtri degli impianti di stoccaggio e distribuzione (\*)
- Occlusione dei sistemi di alimentazione dei motori
- Possibile corrosione

(\*) L'esperienza ha dimostrato che i punti più sensibili sono i filtri degli erogatori di gasolio alle Stazioni di Servizio.

# Capire il problema

- ASTM D 6469-04:  
Standard Guide for Microbial  
contamination in Fuel and Fuel  
System
- IP London – 88:  
Microbial Problem in oil Industry
- IP London – 87  
Microbiology of Fuels





# Analizzare il problema

- E 1326-98:

Standard guide for “Evaluating Nonconventional Microbiological Tests Used for Enumerating Bacteria”

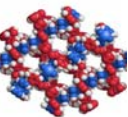
- Easicult TTC
- ASTM D 4412-84 e metodo per la determinazione dei batteri acidofili

- IP 385/99:

Determination of viable microbial content of fuels and fuel components

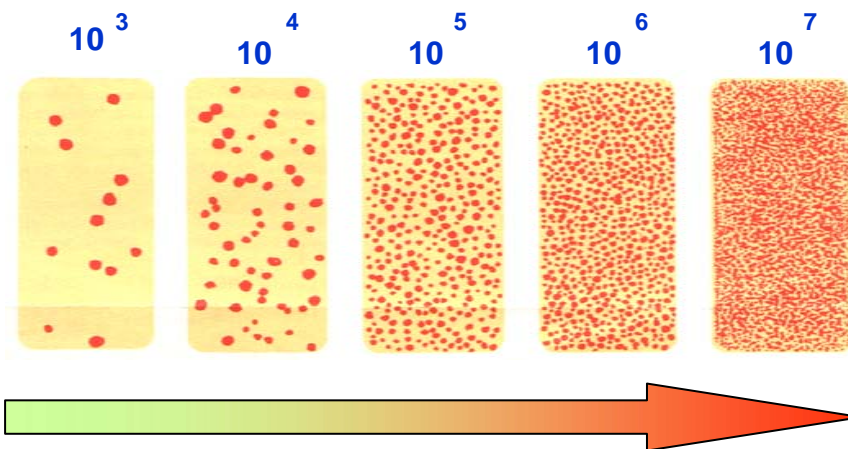
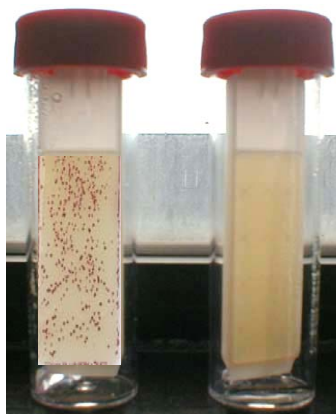
- ASTM D 4012:

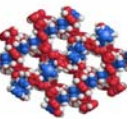
Adenosine Triphosphate (ATP) Content of Microorganisms in water



# EASICULT TTC

- Pretrattamento del campione  
Estrazione con acqua (5 ml /100 ml Gasolio)
- Inoculazione e incubazione  
Terreno: TTC Agar  
Incubazione: 37-38°C per 48 ore





# EASICULT TTC

- Batteri

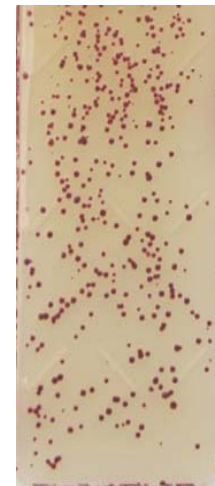
Aerobici che crescono su terreni di Agar sottoforma di colonie rosse

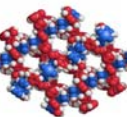
- Limiti del metodo

Applicabilità tra  $10^3$  e  $10^7$  CFU/ml

Incubazione: 37-38°C per 48 ore

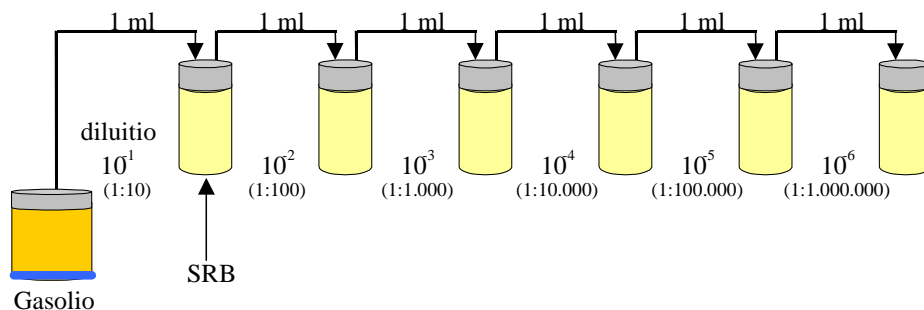
Pretrattamento del campione





# ASTM D 4412-84 etc

- Pretrattamento del campione  
Estrazione con acqua (5 ml /100 ml Gasolio)
- Inoculazione e incubazione
  - Terreno: Formula nota
  - Incubazione: 37-38°C per 48 ore  
fino ad un max di 21 gg





# ASTM D 4412-84 etc

## ■ Batteri

Aerobici - acidofili

Anaerobici - SRB

## ■ Limiti del metodo

Preparazione dei terreni

Scarsa affidabilità su campioni a bassa

Densità di organismi

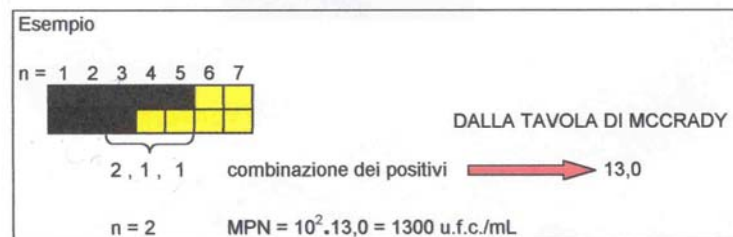
Pretrattamento del campione

Impossibilità di fare un RRT

Tempi di risposta lunghi

## Lettura: Most Probable Number

Organism do not appear to be hypersensitive to small amount of oxygen



COMBINAZIONI DEI POSITIVI	MPN/mL
000	0,0
001	0,5
010	0,5
011	0,9
020	0,9
100	0,6
101	1,2
110	1,3
111	2,0
120	2,0
121	3,0
200	2,5
201	5,0
210	6,0
211	13,0
212	20,0
220	25,0
221	70,0
222	110,0

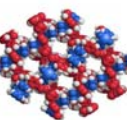
# IP 385

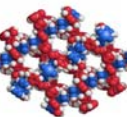
- Metodo quantitativo
  - Procedura A: applicabile a c.f.u. < 25000 /L
  - Procedura B. applicabile a c.f.u. > 25000/L
- Applicabile direttamente su carburanti con p.eb.< 390°C
- Determina batteri e funghi



# IP 385

- Procedura
  - Filtrazione del campione
  - Lavaggio con soluzioni specifiche
  
- Incubazione a 25°C per 120 ore
  
- Terreno di coltura TSA e MEA





# IP 385

## ■ Lettura e calcolo dei risultati

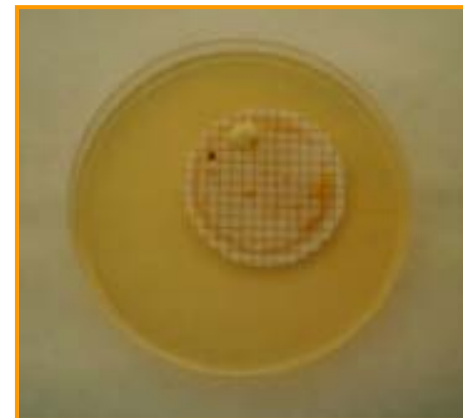
$$\text{u.f.c./L} = \text{CC} \times 1000 / V$$

CC: numero delle colonie sul filtro

V : volume di gasolio filtrato, in ml

Interpretazione dei risultati:

- Da 0 a 400 UFC/l: contaminazione lieve  
condizione di normalità
- Da 401 a 1000 UFC/l :contaminazione moderata  
condizione di allarme
- Superiore a 1000 UFC/l: contaminazione grave  
condizione di prossimo blocco  
dei filtri



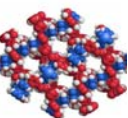
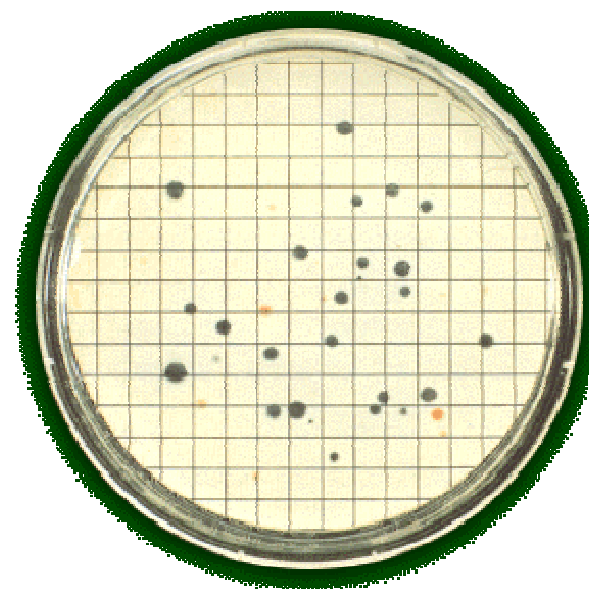
# IP 385

## ■ Vantaggi

- Analisi quantitativa
- Applicabile per selezioni di biocidi

## ■ Svantaggi

- Tempi di risposta lunghi
- Selettività dei terreni
- costo dell'analisi



# ASTM D 4012

La concentrazione di ATP è strettamente legata all'attività metabolica della biomassa.

## ■ Procedura

- Estrazione della ATP
- Reazione con Luciferin-Luciferasi
- Determinazione fotometrica



## ■ Svantaggi

- Interferenze
- Soluzioni STD

**TABLE 1 Precision and Bias**

Known Concentration, $\mu\text{g/L}$	Single-Operator Precision, $S_o$ , $\mu\text{g/L}$	Overall Precision, $S_7$	$\pm$ % Bias, $\mu\text{g/L}$
0.4	0.166	0.162	6.9
4.0	0.540	0.521	0.3
16.0	1.171	1.479	0.7
64.0	3.180	4.251	0.8
96.0	5.516	5.343	0.9

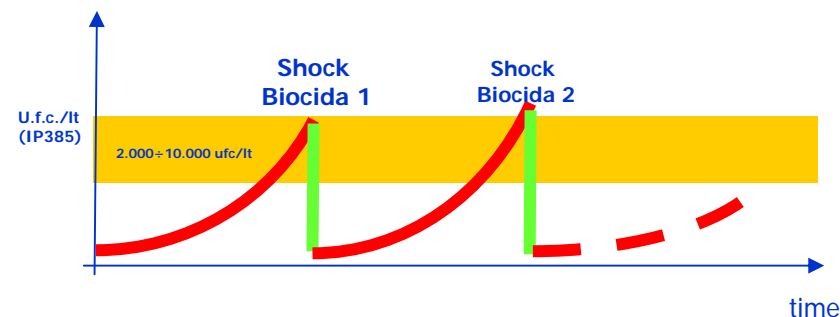
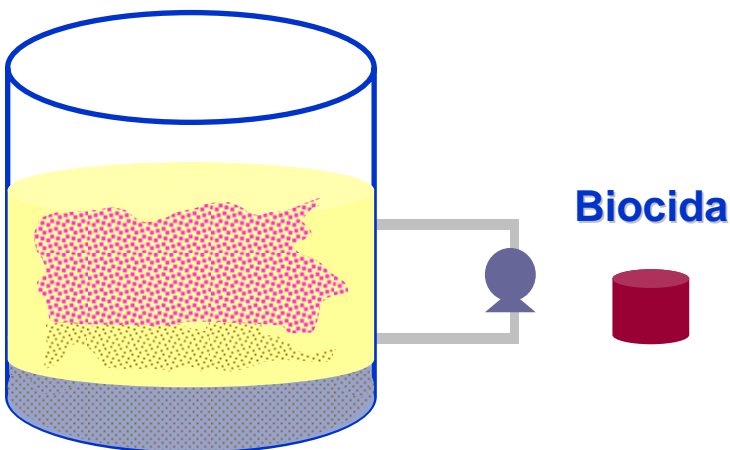
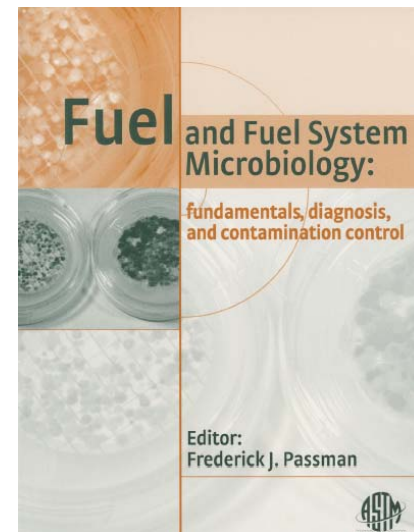
# ASTM D 4012 – Metodi da campo

- Vantaggi
  - Portatili
  - Tempi di analisi brevi
- Svantaggi
  - Interferenze
  - Modalità di prelievo campione

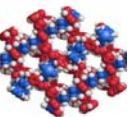


# Tenere sotto controllo il problema

- ASTM D 6469-04:  
Standard Guide for Microbial  
contamination in Fuel and Fuel  
System
- Trattamento con biocidi





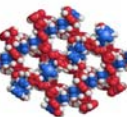


# Interventi Consigliati

## Nei casi di **contaminazione grave**

- **Rimozione** dell' **acqua libera** con sistemi di aspirazione o drenaggio
- **Revisione** delle eventuali **superfici corrose**
- **Lavaggio** superfici interne dei **serbatoi**
- **Trattamento** dei serbatoi bonificati con **biocida** al cosiddetto “dosaggio di prevenzione”



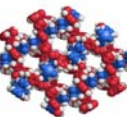


# Interventi Consigliati

## Nei casi di **contaminazione grave**

Suggerimenti alternativi per interventi rapidi e meno onerosi

- **Svuotare** i serbatoi fino al minimo fisiologico
- **Trattamento** dei **fondami** con **biocida** a dosaggio shock
- Controllo a di 24 ore, del campione di fondame per verificare l'avvenuta sterilizzazione
- **Trattamento** continuo dei serbatoi sterilizzati con **biocida** al cosiddetto dosaggio di prevenzione



# Grazie dell'attenzione

**Milena Mantarro**

**Chimec Spa**

tel. ufficio: +39 06.91825258

cellulare: +39 340.1250166

e-mail: [mmantarro@chimec.it](mailto:mmantarro@chimec.it)