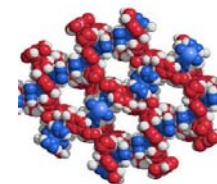


CHIMEC

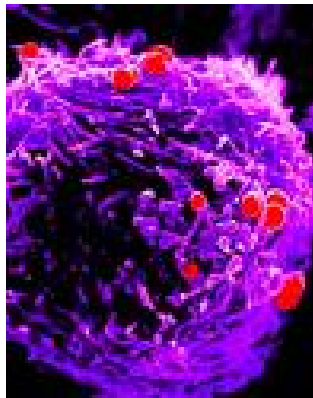
SAVE ENERGY AND IMPROVE PROCESSES
WITH CHIMEC SERVICE



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

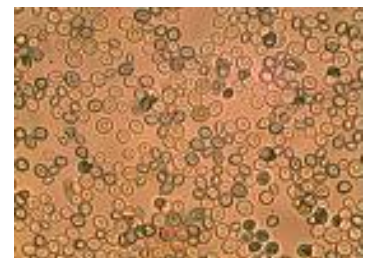
Temperatura, pH

Idrocarburi – Fuels

C – N – P – O – S

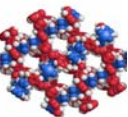
Macronutrienti organici

H₂O



	Level of Biodegradation				
	very slight	slight	moderate	heavy	severe
C ₁ -C ₅ gases	methane				
	ethane			****	—————▶
	propane	*****			—————▶
	iso-butane			*****	—————▶
	n-butane		****		—————▶
pentanes		****		—————▶	

C ₆ -C ₁₅ HCs	n-alkanes	*****			—————▶
	iso-alkanes		****		—————▶
	isoprenoids		*****		—————▶
	BTEX aromatics		*****		—————▶
	alkylcyclohexanes		*****		—————▶
C ₁₆ -C ₃₅ HCs	n-alkanes, iso-alkanes	*****			—————▶
	isoprenoids		*****		—————▶
	naphthalenes (C ₁₀)		*****		—————▶
	phenanthrenes, DBTs		*****		—————▶
	chrysenes		*****		—————▶
C ₁₅ -C ₃₅ biomarkers	regular steranes			*****	—————▶
	C ₃₀ -C ₃₅ hopanes			*****	—————▶
	C ₂₇ -C ₂₉ hopanes			*****	—————▶
	triaromatic steranes			*****	—————▶
	monoaromatic steranes			*****	—————▶
	gammacerane			*****	—————▶
	oleanane			*****	—————▶
	C ₂₁ -C ₂₂ 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

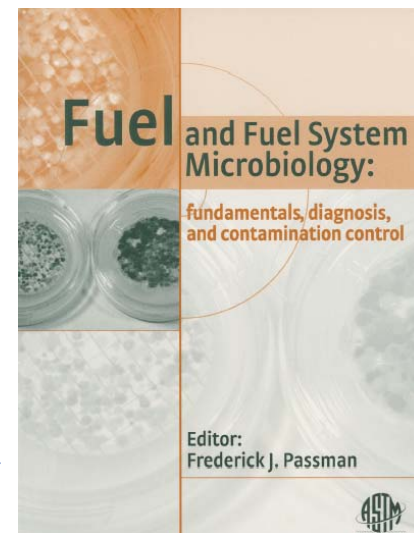
A temperature generalmente fra 25 e 35 °C

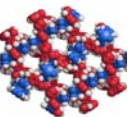
- Formazione di fouling organico all'interfaccia acqua carburante
- Occlusione dei filtri degli impianti di stoccaggio e distribuzione (*)
- Occlusione dei sistemi di alimentazione dei motori
- Possibile corrosione

(*) 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”

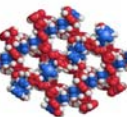
- Easicult TTC
- ASTM D 4412-84 e metodo per la determinazione dei batteri acidofili

- IP 385/99:

Determination of viable microbial content of fuels and fuel components

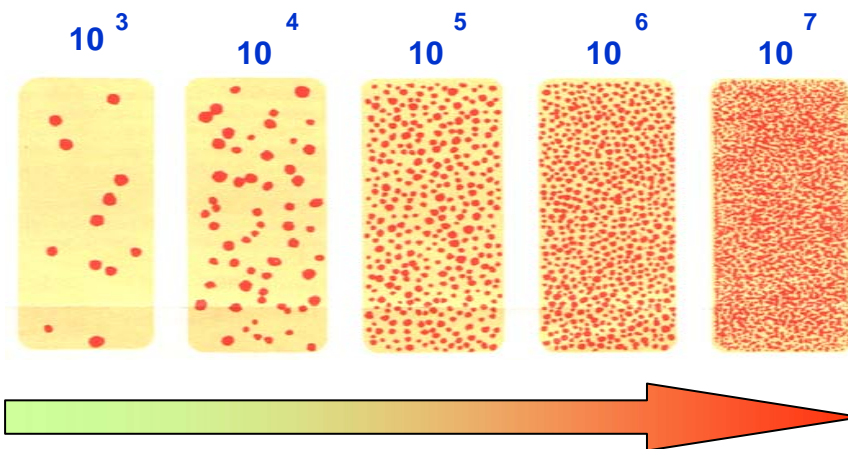
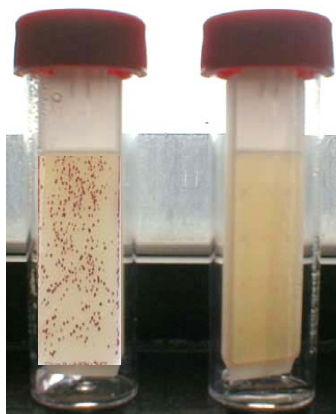
- ASTM D 4012:

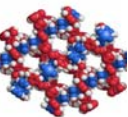
Adenosine Triphosphate (ATP) Content of Microorganisms in water



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

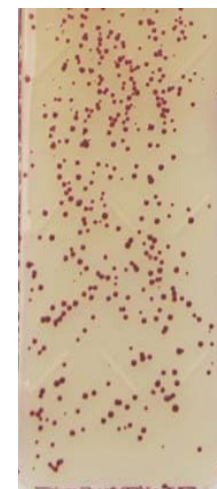
Aerobici che crescono su terreni di Agar sottoforma di colonie rosse

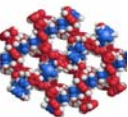
- Limiti del metodo

Applicabilità tra 10^3 e 10^7 CFU/ml

Incubazione: 37-38°C per 48 ore

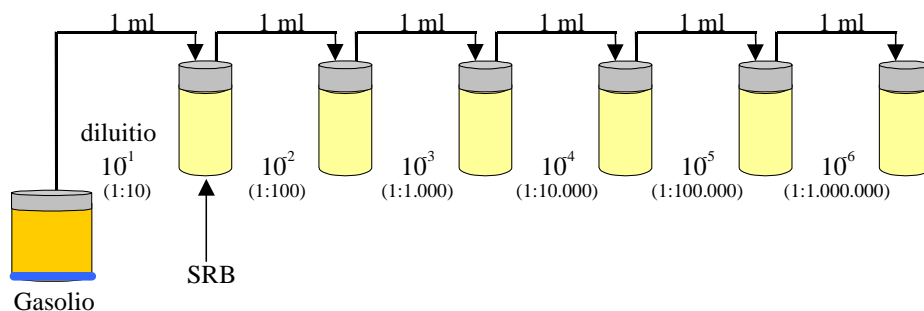
Pretrattamento del campione





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

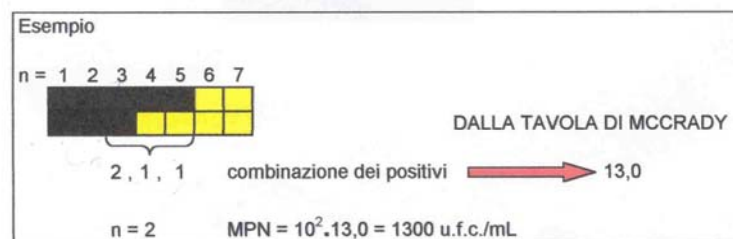
Pretrattamento del campione

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

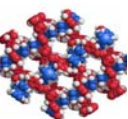


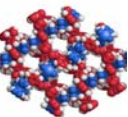
IP 385

- 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

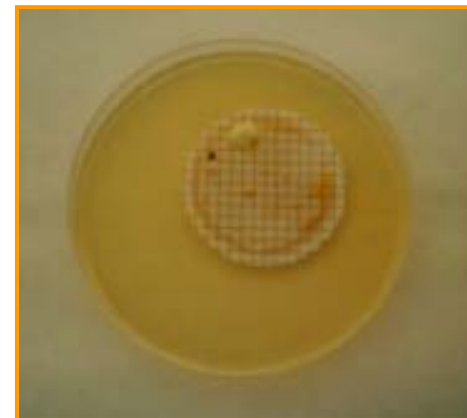
$$\text{u.f.c./L} = \text{CC} \times 1000 / V$$

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



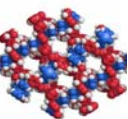
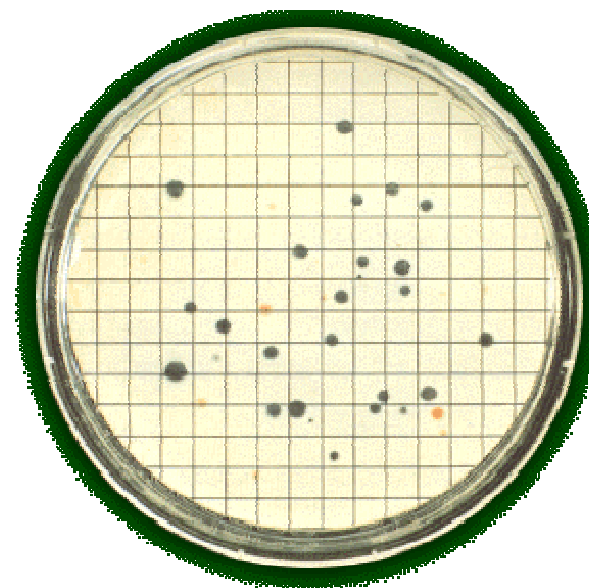
IP 385

■ 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_T	\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

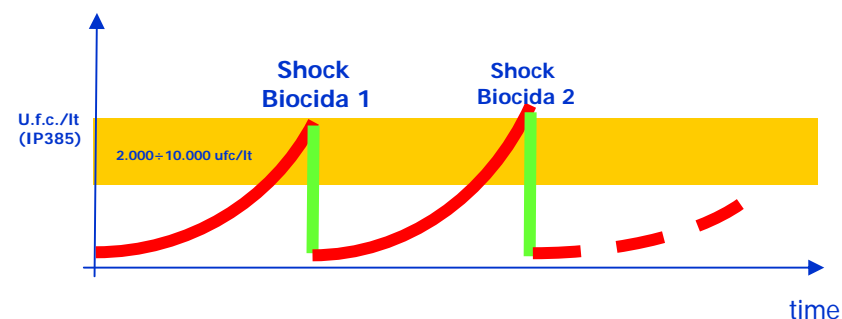
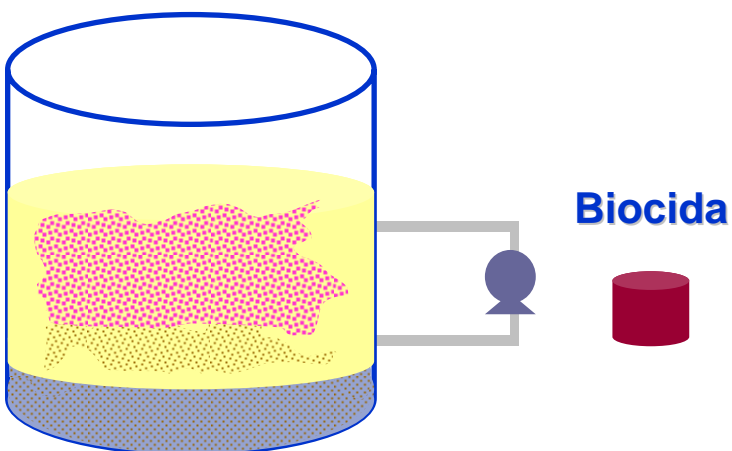
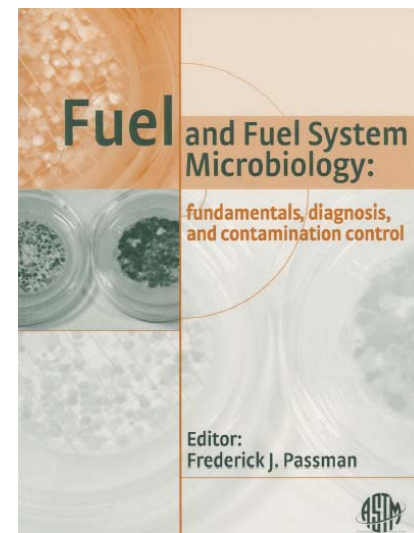
ASTM D 4012 – Metodi da campo

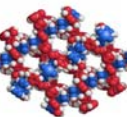
- Vantaggi
 - Portatili
 - Tempi di analisi brevi
- Svantaggi
 - Interferenze
 - Modalità di prelievo campione



Tenere sotto controllo il problema

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



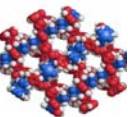


Interventi Consigliati

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”



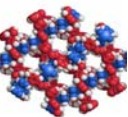


Interventi Consigliati

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